



HAL
open science

Etude de l'impact des pré-traitements alcalins sur la digestion anaérobie du sorgho et du miscanthus

Hélène Thomas

► **To cite this version:**

Hélène Thomas. Etude de l'impact des pré-traitements alcalins sur la digestion anaérobie du sorgho et du miscanthus. Sciences du Vivant [q-bio]. Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier; Université de Montpellier, 2019. Français. NNT: . tel-02790100

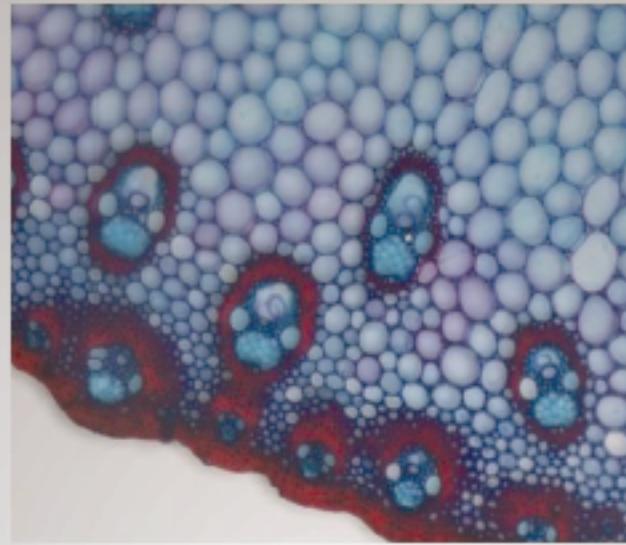
HAL Id: tel-02790100

<https://hal.inrae.fr/tel-02790100>

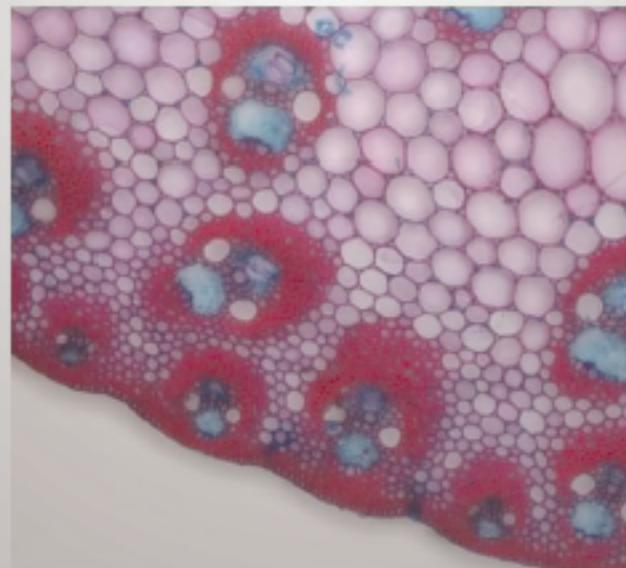
Submitted on 5 Jun 2020

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

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



Pré-traitement
alcalin



ETUDE DE L'IMPACT DES PRÉ-TRAITEMENTS ALCALINS SUR LA DIGESTION ANAÉROBIE DU SORGHO ET DU MISCANTHUS

*STUDY OF THE IMPACT OF ALKALINE PRETREATMENTS
ON ANAEROBIC DIGESTION OF SORGUM AND MISCANTHUS*

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Génie des procédés

École doctorale : GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Unité de recherche : Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE-INRA UR 0050)

Etude de l'impact des pré-traitements alcalins sur la digestion anaérobie du sorgho et du miscanthus

Présentée par Hélène THOMAS
Le 28 mai 2019

Sous la direction de Hélène CARRÈRE

Devant le jury composé de

Mme Anne TRÉMIER, Ingénieure de recherche, IRSTEA Rennes

M Thierry RIBEIRO, Enseignant-chercheur, Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

Mme Christelle WISNIEWSKI, Professeure, Université de Montpellier

M Valentin FOUGERIT, Responsable Conception/R&D, Naskeo

M Jean-Luc VERDEIL, Cadre scientifique des EPIC, CIRAD Montpellier

Mme Hélène CARRÈRE, Directrice de recherche, INRA Narbonne

Rapportrice

Rapporteur

Présidente du jury

Examineur

Examineur

Directrice de Thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Montpellier
SupAgro

Dans le contexte du réchauffement climatique et de la diminution des réserves de combustibles fossiles, la biomasse lignocellulosique peut fournir une source renouvelable d'énergie, de matériaux et de produits chimiques. En particulier, la production de biogaz par méthanisation est en plein essor. C'est dans ce contexte de bioraffinerie environnementale que se situe ce projet de thèse. Il porte sur deux biomasses lignocellulosiques différentes : le sorgho et le miscanthus ayant l'avantage de combiner un fort potentiel de production de biomasse avec un impact minimal sur l'environnement. Pour ce type de biomasse, il est bien connu que la lignine joue un rôle de barrière à l'accessibilité des composés. Cette thèse a pour objectif de d'étudier l'impact des pré-traitements alcalins, connus pour délignifier la biomasse de manière efficace et ainsi améliorer son bioaccessibilité et donc sa dégradation par digestion anaérobie. L'étude de l'impact de ces pré-traitements sur la composition biochimique des biomasses et leur production méthane a montré que ces impacts diffèrent en fonction de la biomasse et des conditions opératoires des pré-traitements appliqués (réactif, durée, température, teneur en eau). Dans un objectif d'application de co-digestion en méthanisation agricole, l'impact de certains des prétraitements de ces deux biomasses a été étudié lors d'essais en réacteurs batch à recirculation. Le sorgho s'est révélé être un co-substrat adéquat du fumier. Enfin, l'étude originale des mécanismes d'action de ces pré-traitements à l'échelle de la structure anatomique de la biomasse a montré que les pré-traitements agissent différemment suivant la localisation et le type de lignine. Ces travaux de thèse permettent donc une meilleure compréhension de l'impact des pré-traitements sur différentes biomasses lignocellulosiques.

Mots-clés : digestion anaérobie, biomasse lignocellulosique, pré-traitements alcalins, co-digestion, histologie

In the context of global warming and declining fossil fuel reserves, lignocellulosic biomass can provide a renewable source of energy, materials and chemicals. In particular, biogas production by anaerobic digestion is facing a fast development. This thesis project takes place in this biorefinery concept. Two different lignocellulosic biomasses, which present the advantage of combining high biomass production potential with minimal environmental impact, were studied. For this kind of biomass, it is well known that lignin acts as a barrier to the accessibility of compounds. The objective of this thesis was to study the impact of alkaline pre-treatments, known to be efficient in biomass delignification and thus improve its bioaccessibility and its degradation by anaerobic digestion. The study of the impact of these pre-treatments on the biochemical composition of biomasses and their methane production showed that these impacts were different according to the biomass and the operating conditions of the applied pre-treatments (reagent, duration, temperature, water content). With the aim of applying it in agricultural anaerobic co-digestion context, the impact of some of these pre-treatments of sorghum and miscanthus was studied in leach bed reactors. Sorghum was found to be an adequate co-substrate for manure. Finally, the original study of the mechanisms of action of these pre-treatments at the biomass anatomical structure scale showed that the pre-treatments act differently depending on the location and type of lignin. This thesis work therefore allows a better understanding of the impact of pre-treatments on different lignocellulosic biomasses.

Key-words : anaerobic digestion, lignocellulosic biomass, alkaline pre-treatments, co-digestion, histology

REMERCIEMENTS

Cette thèse est une des étapes de mon aventure méthanisation. Merci à Hélène Carrère pour avoir été ma directrice de thèse, à mes encadrants (Jean-Luc Verdeil, Renaud Escudié et Eric Trably), aux membres de mon comité de thèse (Xavier Ruau, Isabelle Bertrand, Pascal Peu, Jean-Philippe Delgenes et Eric Latrille) pour leurs remarques et conseils ainsi qu'aux membres du jury (Anne Trémier, Thierry Ribeiro, Christelle Wisniewski et Valentin Fougerit) pour évaluer ce travail.

Cette aventure a commencé à L'ENSIL. Merci à Serge Chambon et Alexandre Faix pour tout ce que vous m'avez enseigné. Merci également à Magali Caselas qui m'a permis d'aller faire mon stage à l'UPC à Barcelone. J'y ai eu la chance de travailler avec l'équipe d'Ivet Ferrer, merci de m'y avoir accueillie. J'ai, plus particulièrement, travaillé avec Maria Solé. Merci Maria pour ta gentillesse, ta rigueur et ton amitié.

Parce que le monde de la métha est petit, j'ai rencontré Audrey Battimelli en Espagne qui a pu faire suivre ma candidature au LBE. Merci Hélène de m'avoir contactée et donné ma chance. Je te remercie pour ta confiance, ta patience, tout ce que tu m'as enseigné, ta disponibilité ainsi que ta bienveillance.

Je remercie l'ensemble du personnel du LBE et de la HBE pour leur écoute, leur disponibilité et leurs conseils. En particulier : Philippe Sousbie, pour son aide technique pour les AMPTS et autres conseils et astuces bien utiles ainsi que pour les discussions à propos de note chère Normandie, Renaud Escudié, Eric Trably, Olivier Azam, Bruno Marty, Pauline Ragni, Stéphanie Deville, Dominique Patureau, Julie Jimenez, Eric Latrille, Virginie Rossard. Elie Le Quémener et Jean-Philippe Steyer pour m'avoir bien entourée dans l'avion pour Pekin, Nori pour mon ordi et le switch qui m'ont plusieurs fois, fait des misères. J'adresse également toute ma gratitude à la dream team Sylvie, Nadine, Annie et Alexandra et Ingrid. Je les remercie de m'avoir aidé avec grande patience et apporté leur soutien à bien des occasions (ordre de mission, appel et bourde de badgeage, commandes,..).

J'ai, également au l'occasion de travailler avec plusieurs partenaires de BFF. Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de l'équipe PHIV pour leur accueil et transmission de connaissances, Fabienne Montes, Christine Sanier, Christelle Baptiste, Marc Lartaud et Frédéric Gatineau. Un merci à Jean-Luc pour ses connaissances et nombreux skypes. Je remercie également David Pot, Stéphanie Arnoult, Maryse Brancourt-Hulmel, Laurent Bonnal, Gilles Trouche, pour leur relecture assidue des différentes publications.

J'ai eu la chance d'avoir encadré deux supers stagiaires. Merci à Théo, nous avons beaucoup ri, chanté et dansé et tout de même bien travaillé ! Merci à Helga pour la rigueur dont tu as fait preuve et la quantité de travail que tu as fourni même avec le pied cassé !

Merci à mes co-bureaux : Wendy, Afifi, Jordan, Pablo, Florian, Javiera, Aurélie, Kévin L et Kévin D pour le partage de moments studieux mais aussi de détente, de blagues et sucrés (surtout les galettes bretonnes tartinées de cette célèbre pâte à tartiner).

Le labo accueille de nombreux stagiaires et années sabbatiques français et internationaux. Cela a été un vrai plaisir de voyager tout en restant sur place. Je voudrais remercier en particulier : Maria, Cigdem (et son mari) pour leurs conseils, leur patience et leur aide pour améliorer mon anglais et amitié ainsi qu'Adalberto. Mais aussi Brice, Benjamin, Célia, Vincent, Djalma, Chloé, Juan, Lucie. Par avance excuses aux personnes que j'aurais oubliées !

Je remercie également l'ensemble des anciens et actuels doctorants avec qui j'ai manipulé, travaillé et passé de bons moments : Mariel-Lou, Wendy, Diane, Florian, Jordan Kevin, Aurélie, Charlotte, Ulysse, Alice, Clémence, Nicolas, Doha, Noémie, Florian, Bastien, Julien, Lucia, Mickael, Morand, Roland, Pablo, Quentin, Clément, Julien, Hicham, Esmée.

Merci également à l'équipe potager pour les moments de détente mais aussi parfois de dur labeur, néanmoins la pioche permettait de bien de se défouler après des journées difficiles ! Merci Nadine pour les plants !

La magie du labo fait que certains sont devenus de vrais amis. Aurélie, Diane, Charlotte, Izabel, Jordan (mon presque Dieu), Kévin (mon coup de foudre amical), je vous remercie d'avoir été et d'être là pour les moments bons comme mauvais. Comptez sur moi pour ne pas vous lâchez de sitôt !!

La période de rédaction a été particulière. Merci à cette célèbre plateforme de musique en ligne pour m'avoir tenir compagnie autant d'heures ! Merci Hélène, pour ta disponibilité soirée comme week-end. Aurélie, Kévin, Jordan et Mickael merci pour le soutien moral et sucré. Nico, merci pour tout....

Enfin, je tiens à remercier mes amis de longue date : Emma, Juliette, Xavier, Arafath et Solène.

Et pour finir, un grand merci à ma famille. Je remercie mes parents et à ma sœur pour leur amour et leur soutien inconditionnel. Même à 939 km de distance vous êtes à mes côtés chaque jour. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui ! Un grand merci à ma Choupinette et à ses parents pour le bonheur qu'ils m'ont apporté. Louise, ne grandit pas trop vite !

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	I
LISTE DES TABLES.....	VII
LISTE DES ABBREVIATIONS ET CODES DES ECHANTILLONS.....	X
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	XV
INTRODUCTION.....	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	5
1.1 La digestion anaérobie (ou méthanisation).....	6
1.1.1 La digestion anaérobie (DA) : production d'une énergie renouvelable.....	6
1.1.2 Les conditions physico-chimiques	11
1.1.3 Les valorisations du biogaz et du digestat	14
1.1.4 Configurations et voies de méthanisation.....	17
1.1.5 Substrats pour la méthanisation agricole	19
1.2 La biomasse lignocellulosique	22
1.2.1 Notions de biologie végétale.....	22
1.2.2 Les principaux constituants de la biomasse lignocellulosique.....	25
1.2.3 Les deux substrats étudiés.....	34
1.3 Les différents pré-traitements de la biomasse lignocellulosique.....	40
1.3.1 Pré-traitements physiques	41
1.3.2 Pré-traitements thermochimiques	43
1.3.4 Pré-traitements biologiques	51
1.3.5 Facteurs pouvant influencer l'efficacité d'un pré-traitement.....	51
1.3.6 Choix du pré-traitement pour une application industrielle	52
1.4 Observations et quantification des impacts des pré-traitements	54
1.4.1 Caractéristique de la production de méthane (biodégradabilité)	53
1.4.2 Analyse de la composition biochimique de la matière	54
1.4.3 Modifications des liaisons chimiques	55
1.4.4 Mesure des changements de la cellulose.....	55
1.4.5 Mesure de l'accessibilité.....	56
1.4.6 Utilisation de l'imagerie	58
1.5 Conclusion et objectifs de cette thèse	65
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	67
2.1 Les biomasses utilisées	68
2.1.1 Sorgho	68
2.1.2 Miscanthus	68
2.1.3 Fumier	68

2.2	Pré-traitements alcalins	69
2.2.1	Justification du choix des pré-traitements et présentation de leurs conditions opératoires	69
2.2.2	Mise en œuvre des pré-traitements	70
2.2.3	Préparation de la matière et liquides à l'issue d'un pré-traitement.....	72
2.2.4	Plan d'expérience pour étudier l'influence de la concentration en chaux et de la durée du pré-traitement, plan de Doehlert	73
2.3	Digestion anaérobie	74
2.3.1	Inoculum.....	74
2.3.2	Test BMP	75
2.3.3	Réacteurs batch voie sèche à recirculation du lixiviat	77
2.4	Analyses.....	79
2.4.1	Détermination de la composition du biogaz	79
2.4.2	Acides Gras Volatils et alcalinité.....	79
2.4.3	pH.....	79
2.4.4	Caractérisation du substrats	80
2.4.5	Fermentation sombre, mesure du BHP (Biological Hydrogène Potential).....	81
2.5	Etude microscopique de l'effet des pré-traitements sur la structure de la matière	82
2.5.1	Colorations utilisées et immunofluorescence	82
2.5.2	Etude sur fibres broyées à 1mm	84
2.5.3	Coupes transversales de tige	85
2.5.4	Traitement d'images	85
2.6	Calculs	88
2.6.1	Détermination de la cinétique de production de méthane.....	88
2.6.2	Analyses statistiques	89
Chapitre 3. Etude de l'impact des pré-traitements alcalins sur la biomasse lignocellulosique (sorgho ou miscanthus)		91
3.1.	Context and objectives	92
3.2	Biomasses pré-traitées à 55°C pendant 24 h avec une dose de réactifs de 10%	93
3.2.1	Matériel and méthodes	93
3.2.2	Cas du sorgho.....	94
3.2.3	Cas du miscanthus	95
3.3	Optimization of pretreatment in view of application to co-digestion with caw manure in LBR.....	96
3.3.1	Miscanthus: comparison of 1 and 20 mm fibre size, comparison of soda and lime, impact of the duration and the TS content	97

3.3.2 Miscanthus: experimental design to study the impact of pre-treatment duration and CaO concentration	104
3.3.3 Sorghum: study of the impact of the alkaline reagent, the temperature and the pretreatment duration	112
3.4 Complementary experiments.....	116
3.4.1 Experiment with soda and lime at the same normality	116
3.4.2 Limite de la solubilité de CaO	118
3.4.3 Potentiel acidogène (BAP) : Peut-on représenter les cinétiques de dégradation anaérobie par les cinétiques de fermentation ?	118
3.5 Discussion du chapitre 3.....	126
3.5.1 Comparaison du sorgho et du miscanthus.....	126
3.5.2 Impact des différents paramètres de pré-traitement.....	126
 Chapitre 4. Etude de la co-digestion du fumier bovin et de la biomasse lignocellulosique prétraitée (sorgho ou miscanthus)	 129
4.1. Context and objectives	130
4.2. Co-digestion of manure with pretreated miscanthus	131
4.2.1 Material and methods.....	131
4.2.2 Results.....	132
4.2.3 Conclusion	134
4.3 Co-digestion of cow manure with pretreated sorghum	134
4.3.1 Sorghum as co-substrate	134
4.3.2 Addition of alkaline reagent to the mono-digestion of cow manure.....	137
4.3.3 Economical analysis.....	140
4.4 Conclusion du chapitre 4	142
 Chapitre 5. Utilisation de l’histologie pour étudier et quantifier les mécanismes des pré-traitements alcalins sur deux biomasses lignocellulosiques.....	 145
5.1 Context and objectives	146
5.2 Analyses histologiques des matières pré-traitées broyées à 1mm colorée au FASGA	148
5.2.1 Matériel et méthodes.....	148
5.2.2 Sorgho B140 broyé à 1mm et pré-traité avec NaOH ou CaO à 55°C pendant 24h	148
5.2.3 Comparaison du miscanthus FLO broyé à 1 mm et pré-traité à 55°C avec une teneur en matière sèche de 4 ou 20%	150
5.2.4 Comparaison du sorgho B140 et du miscanthus FLO broyés 1 mm et pré-traité à 55°C pendant 1 jour	152
5.2.5 Conclusion	154
5.3 Study of the penetration of pretreatment along 1cm section of stem	154

5.3.1 Material and methods.....	154
5.3.2 Results.....	154
5.4 Histological analysis and quantification of 110µm section of stem.....	155
5.4.1 Material and methods.....	155
5.4.2 Results.....	156
5.5 Coloration au FASGA de fragments de sorgho bruts ou pré-traités et digérés	173
5.6 Conclusion du Chapitre 5.....	175
Chapitre 6 : Discussion générale.....	177
6.1 Statistiques avec les données des chapitres prétraitements et histologie et en prenant en compte la solubilisation de la matière	178
6.1.1 Analyse globale de l'ensemble des résultats sur les 2 biomasses	178
6.1.2 Analyse globale de l'ensemble des résultats du sorgho.....	181
6.1.3 Analyse globale de l'ensemble des résultats du miscanthus.....	183
6.2 Différence d'efficacité/de performances entre NaOH et CaO.....	185
6.2.1 La soude et la chaux ont en commun le pouvoir de dégrader la lignine.....	185
6.2.2... mais sont deux agents alcalins différents.....	185
6.2.3... qui permettent en partie la solubilisation des sucres et de la matière.....	187
6.3 La biomasse	188
6.3.1 Influence de la composition : sous-unités de la lignine et forme de la cellulose (cristalline ou amorphe).....	188
6.3.2 Influence de la façon dont elle a été broyée et sa granulométrie	188
6.3.3 Comportement en différentes modalités de DA.....	189
CONCLUSION.....	191
PERSPECTIVES.....	193
BIBLIOGRAPHIE.....	197

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Part du secteur agricole dans la production d'énergie renouvelables françaises en 2015 (a), évolution de mix énergétique des énergies renouvelable agricole selon le scénario médian (b) source : synthèse réalisée pour le compte de l' ADEME (ADEME et al. 2018)

Figure I-2 : Moyens mis en œuvre pour répondre aux questions scientifiques de la thèse

Figure 1-1: Les dix principaux producteurs d'EnR en 2013 dans le monde (Carrier et al. 2015)

Figure 1-2: Les principaux producteurs de biogaz en Europe en 2015

Figure 1-3 : Valorisation de la matière organique par digestion anaérobie, source : (Evergaz 2018)

Figure 1-4: Les 4 étapes de la digestion anaérobie d'après (Moletta 1990), B. signifie bactéries

Figure 1-5 : Power to gas et couplage méthanisation-méthanation, au service des énergies renouvelables électriques, source : (GRDF et al. 2017)

Figure 1-6 : Coupe d'un réacteur de digestion anaérobie, procédé Bekon (voie sèche discontinue)

Figure 1-7: Répartition des tonnages entrant en méthanisation à la ferme (Solagro-Irstea 2012)

Figure 1-8 : Les différentes échelles du végétal, (Barakat, Mayer, et al. 2014)

Figure 1-9: structure anatomique du *M. × giganteus* en fluorescence. Les légendes sont en anglais : Sf, sclerenchyma fibers; Par, parenchyma; P_{xv}, protoxylem vessel; M_{xv}, metaxylem vessel; Epi, epidermis; Phl, phloem, de (Ji et al. 2016)

Figure 1-10 : Les différents parties cristallines d'une microfibrille de cellulose, de (Karimi et al. 2013)

Figure 1-11 : Composition typique des unités de la lignine, adapté de (Min et al. 2014)

Figure 1-12 : schéma simplifié de la lignification, de l'organisation supramoléculaire et de la composition de la paroi végétale (Monlau et al. 2013)

Figure 1-13:Organisation de la paroi végétale primaire, adapté de (Wertz & Bédoué 2013)

Figure 1-14 : Facteurs affectant la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique à différentes échelles, d'après (Bichot et al. 2018)

Figure 1-15 : liaison lignine-carbohydrates dans la paille via une liaison ester, adapté de (Sun et al. 1997)

Figure 1-16 : Schéma simplifié de la fixation du carbone dans les plantes en C₃ et en C₄, (Valeria & Santiago 2011) où C₅ : ribulose-1,5-bisphosphate; PCR : Photosynthetic Carbon Reduction Cycle; PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase; Rubisco : Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase

Figure 1-17: sorgho grain (en haut à gauche), sorgho fourrager (en haut à droite), sorgho fibre (en bas à gauche), et sorgho sucrier (en bas à droite) sources : cirad.fr, arvalis.fr et inra.fr

Figure 1-18 : Bioraffinerie du sorgho, de (P. Nghiem et al. 2016)

Figure 1-19: Différents génotypes de miscanthus, photo prise sur le site de l'INRA d'Estrées Mons

Figure 1-20: Différentes étapes de conversion de la biomasse et paramètres influençant la réactivité des particules lignocellulosiques, adapté de (Barakat, Mayer, et al. 2014)

Figure 1-21 : Les pré-traitements les plus communs utilisés sur la paille et leurs effets possibles (DP, degree of polymerization; WO, wet oxidation), adapté de (Talebnia et al. 2010)

Figure 1-22 : Clivage du complexe lignine/phenolique-carbohydrates de maïs par un agent alcalin de (Y. & D.J. 1985) adapté par (Buranov & Mazza 2008)

Figure 1-23: complexe lignine-carbohydrates réagissant avec la soude, de (He et al. 2008)

Figure 1-24 : Schéma réactionnel de la fermentation sombre adapté de (Trably et al. 2018) adapté de (Guo et al. 2010)

Figure 2-1 : Pré-traitement à forte teneur en matière sèche sur de la biomasse 1mm

Figure 2-2 :Pré-traitement de coupes de 110 μm

Figure 2-3: plan de Doehlert et son extension possible pour une variable

Figure 2-4: fioles de test BMP sur un tiroir de la table agitante placée dans une pièce thermostatée à 35°C

Figure 2-5: Automatic Methane Potential Test System (AMPTS)

Figure 2-6: Réacteur batch à recirculation. Photographie d'un réacteur utilisé (a), détails (b) de (Riggio et al. 2017)

Figure 2-7: Moulage de la poudre 1mm avec de la résine (a), moule installé sur un plot sur le microtome (b), coupe sur lame après séchage (c)

Figure 2-8: Coupe de tige de 1cm pré-traitée divisée en 3 zones

Figure 2-9 : Coupe transversale d'un entre-nœud de sorgho coloré au FASGA, avec identification d'une zone externe (Z1) et d'une zone centrale (Z2). Z1 est caractérisé par sa surface en % de la surface de section d'entre-nœud (perZ1), le pourcentage de tissu sclérenchyme (coloration rouge) en % de la surface Z1 (perSclZ1) ; Z2 est caractérisé par sa surface en % de la surface de section d'entre-nœud, le pourcentage de tissu bleu en pourcentage de la surface Z2 (perBluZ2), la densité des faisceaux vasculaires de Z2 en nombre de faisceaux vasculaires par mm^2 (densVBZ2). D'après (Perrier et al. 2017).

Figure 2-10: Les différentes étapes du traitement d'image sous imageJ par la macro développée au CIRAD

Figure 3-1: Production cumulée de méthane et modélisation de la cinétique du premier ordre du sorgho brut et pré-traité à 55°C à la soude ou à la chaux

Figure 3-2: Production cumulée de méthane et modélisation de la cinétique du premier ordre du miscanthus brut et pré-traité à 55°C à la soude ou à la chaux

Figure 3-3: Cumulative methane yields ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$) at normal temperature and pressure conditions of raw and pretreated 1mm (a) and 20 mm (b) miscanthus particle size

Figure 3-4: (a) Principal component analysis (PCA) plot of variables that are related to the methane production (MP) and pretreated biomass composition according to the first and the second principal components (PC 1 and PC 2, respectively); (b) Plot illustrating the repartition of the individuals according to PC 1 and PC 2. The ellipses are empirically built.

Figure 3-5: Correlation matrix and paired scatter plots of methane production and composition variables of raw and pretreated miscanthus samples. “***”, “**” and “.” correspond to significant at 0.01, 0.05 and 0.1 probability levels, respectively

Figure 3-6: Pareto diagram showing the effect of different coefficient terms on BMP (a) and kinetics constant k (b) for Design 1. Red bars indicate a negative impact, and green bars show a positive impact. Bars exceeding the vertical line point to the significance of the coefficient terms ($p < 0.05$, corresponding to 4.3 according to Student t-test in our conditions).

Figure 3-7: Response surface plots showing the impact of lime concentration and pretreatment duration on BMP (a) and kinetics values (b) for Design 1.

Figure 3-8: Pareto diagram showing the effect of different coefficient terms on BMP (a) and response surface plot showing the impact of lime concentration and pretreatment duration on BMP in Design 2 (b).

Figure 3-9 : Les différentes voies métaboliques de la fermentation sombre adapté de (Trably et al., 2018)

Figure 3-10: Biplot (ACP et carte de répartition des individus) des métabolites pour les sorghos brut (S1 et S60) et pré-traités

Figure 3-11 : Biplot (ACP et carte de répartition des individus) des métabolites pour le miscanthus brut et pré-traité

Figure 3-12 : Potentiel hydrogène en fonction du potentiel méthane (BMP) (a) et BAP en fonction du potentiel méthane exprimé en g de DCO par g de VS (b)

Figure 3-13 : Régressions linéaires entre les cinétiques de dégradation anaérobie et la DCO totale convertie lors de fermentation sombre exprimée par quantité de substrat pour les deux biomasses

Figure 4-1: Cumulative methane production and modeling of 1st order kinetics

Figure 4-2: Volatile fatty acid (VFA) concentration (a) and pH variation (b) in leachate during the first 30 days.

Figure 4-3: Cumulative methane production and modeling of 1st order kinetics of co-digestion of cow manure with pretreated sorghum for 60 days

Figure 4-4: VFA concentration (a) and pH (b) variation in the leachate during the first 19 days

Figure 4-5: Cumulative methane production of mono-digestion of manure for 80 days

Figure 4-6: Evolution of VFA concentration (a) and pH (b) during the first 36 days

Figure 5-1 : Sorgho broyé à 1mm brut (1^{ère} colonne) et pré-traité (à la chaux : 2^{ème} colonne et à la soude : 3^{ème} colonne) coloré au FASGA (rouge= matière lignifiée, bleu= matière holocellulosique).

Figure 5-2: Comparaison miscanthus broyé à 1mm pré-traité à la chaux ou la soude à 4 ou 20 % MS, coloration au FASGA

Figure 5-3: Comparaison du sorgho et du miscanthus broyés à 1mm bruts et pré-traités, colorés au FASGA

Figure 5-4bis: Pretreated sorghum (a) or miscanthus (b) 1cm transversal internode section with NaOH 26°C, stained with FASGA, comparison between Areas 1, 2 and 3

Figure 5-4: Comparative effect of alkaline pretreatments on internode structure. The first columns corresponds to sorghum, the second one to miscanthus. 1 and 5 corresponds to pretreatments with CaO at 26°C, 2 and 6 with NaOH at 26°C, 3 and 7 to CaO at 55°C and 4 and 8 to NaOH at 55°C. Pretreatment duration: 24h. Observations made after FASGA staining

Figure 5-5: Effect of Alkaline pretreatment on the inner internode cell wall parenchyma.; Comparison of fasga stained raw and pretreated parenchyma cell (Z2) A=raw sorghum, D= raw miscanthus , B and D were pretreated with with CaO, 55°C for 24h and C and F were pretreated with NaOH, 55°C for 24h

Figure 5-6: Evolution of PercBluZ2 (a) and PercSclZ1 (b) from 0 to 144h of alkaline pretreatments

Figure 5-7: (a) Principal component analysis (PCA) plot of variables that are relative to the methane potential (MP), the first order kinetics constant (k) and the biochemical composition (Cel, Hemi and LK) according to the first and the second principal components (PC). PercSclZ1 and PercBluZ2 were considered as additional variables

Figure 5-8: Comparison between untreated sorghum or miscanthus internode section after the alkaline pretreatments during 24h at 55°C stained with phloroglucinol. The first column corresponds to raw sorghum, the second one to pretreated sorghum with CaO at 55°C for 24h and the third to sorghum pretreated with NaOH at 55°C for 24h. Ep = épiderme, Sescl= subepidermal sclerenchyma, Pscl= périvasculaire parenchyma, Xyl= xylem, Phl=Phloem, Par= parenchyma

Figure 5-9: Comparison between untreated sorghum or miscanthus internode section after the alkaline pretreatments during 24h at 55°C stained with Mäule reagent. Ep = épiderme, Sescl= subepidermal sclerenchyma, Pscl= périvasculaire parenchyma, Xyl= xylem

Figure 5-10: Comparison between untreated sorghum and miscanthus internode section next to the alkaline pretreatments during 24h at 55°C stained with Congo Red. Ep = épiderme, Sescl= subepidermal sclerenchyma, Pscl= périvasculaire parenchyma, Mxyl= metaxylem, Phl= Phloem

Figure 5-11: Comparison between untreated sorghum and miscanthus internode section after the alkaline pretreatments during 24h at 55°C with CBM. The first columns corresponds to raw sorghum, the second one to pretreated sorghum with CaO at 55°C for 24h and the third to sorghum pretreated with NaOH at 55°C for 24h.

Figure 5-12: Comparaison du sorgho brut et du sorgho prétraité broyé à 1mm récupéré dans des fioles BMP après digestion anaérobie, coloré au FASGA

Figure 6-1 : Analyse Factorielle Multivariée des données des deux biomasses compilées selon les deux premières dimensions

Figure 6-2 Contributions des différentes variables quantitatives à la variabilité de la dimension 1 (a) et 2 (b) de l'AFM. La ligne en pointillé rouge indique la valeur moyenne attendue, si les contributions étaient uniformes.

Figure 6-3 : Carte des individus (en couleur selon \cos^2) et des variables qualitatives (en noir : température, concentration granulométrie (granulo) réactif (1=NaOH, 2=CaO), teneur en matière sèche (TS) et la biomasse (S pour sorgho et M pour Miscanthus)

Figure 6-4 : Analyse Factorielle Multivariée des données du sorgho selon les deux premières dimensions

Figure 6-5: Contributions des différentes variables quantitatives aux dimensions 1 (a) et 2 (b) de l'AFM du sorgho. La ligne en pointillé rouge indique la valeur moyenne attendue, si les contributions étaient uniformes.

Figure 6-6 : Carte des individus et des variables qualitatives (température, granulométrie (granulo) réactif (1=NaOH,2=CaO), teneur en matière sèche (TS)) correspondant à l'AFM du sorgho

Figure 6-7 : Analyse Factorielle Multivariée des données du miscanthus selon les deux premières dimensions

Figure 6-8 : Contributions des différentes variables quantitatives à la variabilité de la dimension 1 (a) et 2 (b) de l'AFM du miscanthus. La ligne en pointillé rouge indique la valeur moyenne attendue, si les contributions étaient uniformes.

Figure 6-9 : Carte des individus et des variables qualitatives (température, concentration, granulométrie (60.0, 20.0, 1.0, 2c) réactif (1=NaOH,2=CaO), teneur en matière sèche (TS)) correspondant à l'AFM du miscanthus

Figure C-4 : Schéma général des principales conclusions de ce doctorat

LISTE DES TABLES

Tableau 1-1 : Concentrations seuils inhibitrices de certains nutriments pour la digestion anaérobie, d'après (Hillion 2017)

Tableau 1-2 : Comparaison des avantages et des inconvénients de la digestion anaérobie et en voie sèche et humide

Tableau 1-3 : Potentiel méthanogène des substrats les plus utilisés en DA

Tableau 1-4 : Les différents tissus d'une tige de Monocotylédones et leur fonction et compositions associées

Tableau 1-5 : Composition biochimique de différents types de biomasses lignocellulosiques, d'après (Harmsen et al. 2010)(Mussato 2016)

Tableau 1-6 : Impact des conditions de pré-traitements alcalins sur les composants de la paroi végétale. Conc : Concentration, Temp : Température, Cel : Cellulose, Hem :Hémicelluloses, Lig : Lignine

Tableau 1-7: Impact des conditions de pré-traitements alcalins sur le potentiel méthane

Tableau 1-8 : Recensement non exhaustif des différentes techniques d'imagerie pour observer les changements de la matière lignocellulosiques après un pré-traitement dans ordre décroissant des plus utilisées

Tableau 1-9 : Quelques observations par imagerie après pré-traitements de biomasse lignocellulosiques

Tableau 2-1: Résumé des conditions opératoires des différents pré-traitements réalisés (hors expériences complémentaires)

Table 2-2: Conditions de dose des réactifs alcalins pour l'étude de l'impact de la concentration et son équivalent en molarité et en normalité

Tableau 2-3: Conditions de dose en réactifs alcalins pour l'étude de l'impact de la solubilité de CaO

Tableau 2-4: Conditions opératoires des réacteurs LBR

Table 3-1: BMP, constante de cinétique du premier ordre et composition biochimique du sorgho B 140 1mm brut (S_1_NT) et pré-traité à 55°C avec de la soude ou de la chaux dosé à 10% (S_1_NaOH_10_55, S_1_CaO_10_55)

Table 3-2 : BMP, constante de cinétique du premier ordre et composition biochimique du Miscanthus FLO brut et pré-traité, 1mm

Table 3-3: Raw miscanthus and pretreatments conditions tested on Floridulus genotype (all pretreatments were performed without mixing, at ambient temperature and with a reagent dose of 10%). The different models correspond to the statistic models presented in detail in the "Statistical analysis "part.

Table 3-4: Cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI and methane production values and linear modelling analyses (Model (1) and (2)) of repeated data using FLO genotype

Table 3-5. Pretreatment conditions, biochemical methane potential (BMP), and first-order kinetics constant values and their improvement, compared to raw, for Design 1 and Design 2.

Table 3-6: Coefficients, Fisher value, and R^2 of the two designs.

Table 3-7: Cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI for 60 mm raw and pretreated miscanthus FLO

Table 3-8: Raw sorghum and pretreatments conditions tested on B140 genotype. The different models correspond to the statistic models presented in detail in the “Statistical analysis “part.

Table 3-9: Methane production and first order kinetics constant values cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI and linear modelling analyses (Models (3) and (4))

Table 3-10: Results of no parametric test for the study of the impact of the pretreatment temperature and the reagent and duration and the reagent on the first order kinetics constant

Table 3-11: Results of no parametric test for the study of the impact of the pretreatment duration and the reagent on the cellulose content

Table 3-12: Cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI and methane production values and linear modelling analyses (Model (5)) of repeated data using FLO genotypeTable

Table 3-13 : Valeurs de productions de méthane et de la constante de cinétique du premier ordre, teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine Klason

Table 3-14: Quantités de métabolites et d'hydrogène produits. Le codage des échantillons correspond à celui utilisé dans les parties précédentes.

Table 3-15 : Comparaison des BMP ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$) pour le sorgho et le miscanthus bruts aux différentes granulométries étudiées dans ce chapitre

Table 4-1: Experimental conditions of the co-digestion of caw manure with raw or pretreated miscanthus

Table 4-2 : VFA/alkalinity ratio at 3 days, methane production at 6, 10, 15, 24, 29, and 59 days, expected methane production calculated from BMP values, and first-order kinetics constants.

Table 4-3: Conditions of the co-digestion of caw-manure with raw or pretreated sorghum

Table 4-4: Methane production at 6, 12, 20, 35 and 60 days, expected methane production calculated from BMP values, and first-order kinetics constants.

Table 4-5: Conditions of mono-digestion of manure with alkaline solutions

Table 4-6: VFA/alkalinity ratio at 7 days, methane production at 4, 14, 30, 45, 58, and 79 days and first-order kinetics constants

Table 4-7: Assumptions employed for the economic assessment

Table 4-8: Economic analysis performed on the different co-digestion of cow-manure co-digested with pretreated sorghum

Table 4-9 : Calculations of the supplemental income of the use of raw and pretreated sorghum

Table 5-1 : Pretreatments conditions of internode cuttings for histology analysis

Table 5-2: Comparative Biochemical composition, LOI, methane production and first order kinetics constant of sorghum and miscanthus internode biomass : Influence of pretreatment.

Table 5-3: : Results of image processing for untreated samples, %Z1 and %Z2 indicating percentage of Z1 and Z2 area respectively, %ScI Z1 representing the percentage of red sclerenchyma area in Zone 1; nbVBZ2 indicating the number of conductive bundles; densVBZ2 indicating the density of conductive bundles and finally %bluZ2 representing the amount of blue area in Z2.

Table 5-4 : Thickness (μm) of the cell wall between 2 cell on raw internodes and pretreated for 24 with CaO or NaOH at 55°C. Each value represents a mean of 18 independent measurements

Table 5-5: Linear modelling analysis and coefficient of variation (CV)

Table 6-1 : Comparaison entre les valeurs de BMP obtenues sur les mono-substrats et les performances en co-digestion en LBR

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACP : Analyse en Composante Principale
AD : Anaerobic Digestion
ADEME: l'Agence de Développement de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie
AFEX : Ammonia Fiber EXplosion
AGV : Acides Gras Volatils
ANOVA: ANalysis of Variance
BAP : Biochemical Acidogenic Potential= potential acidogénique
BFF : Biomass For the Future
BHP: Biochemical Hydrogen Potential = potentiel hydrogène
BMP : Biochemical Methane Potentiel = potentiel méthane
BMR : Brown midrib
CIVE Culture Intermédiaires à Vocation Energétique
C/N : ratio Carbone sur Azote
CNTp : Conditions Normales de Température et de Pression
CrI : Index de Cristallinité
CVA : Charge Volumique Appliquée
DA : Digestion anaérobie
DCO : Demande Chimique en Oxygène
DP : Degré de Polymérisation
EDF : Electricité de France
EMAA : Energie Méthanisation Autonomie Azote
EnR : Eergie Renouvelable
FTIR : Infra-Rouge à Transformée de Fourier
GES : Gaz à Effet de Serre
GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
GNV : Gaz Naturel pour Véhicules
GRDF : Gaz Réseau Distribution France
LCC : Complexes lignine-carbohydrates
LBR : Leach Bed Reactor = réacteur à lit percolé
LOI : Lateral Order Index
MS : Matière Sèche
MV: Matière Volatile
NERL : National Renewable Energy Laboratory
NT : Non Traité
OHPA : Obligate Hydrogen Producing Acetogens
PercScIz1 : Pourcentage de Sclerenchyme dans la Zone 1
PercBluZ2 : Pourcentage de Bleu dans la Zone 2
pH : Potentiel Hydrogène
pKa: Constante logarithmique d'acidité
Rubisco :Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
TS: Solides Totaux
TSH Temps de Séjour Hydraulique

SS-AD : Solid State – Anaerobic Digestion = méthanisation en voie sèche

S/X: ratio Substrat sur Inoculum

UV: Ultra-Violet

VB : Vascular Bundle

VS : VSolides Volatils

CODAGE DES ECHANTILLONS PRE-TRAITES

Les échantillons pré-traités ne sont pas tous codés de la même façon. Afin de faciliter leur compréhension, le tableau ci-dessous récapitule les conditions de pré-traitements associées à chacun. La première lettre correspond à la biomasse S pour sorgho et M pour miscanthus. NT et Raw correspondent aux échantillons non traités. Le réactif utilisé (NaOH ou CaO) est explicitement indiqué.

Par exemples :

. S_2c_ CaO_10_ 55 signifie que du sorgho coupé transversalement à 2 mm a été pré-traité avec de la chaux dosée à 10% à 55°C (et pendant 1j et avec une teneur en MS de 4%)

. S_60_NaOH_24_13_1 signifie que du sorgho broyé à 60 mm a été pré-traité avec de la soude (dosée à 10%) à 24°C, avec une teneur en MS de 13% pendant 1j

Pretreatment	Particle size (mm)	Dose (g _{reagent} ·100g _{TS} ⁻¹)	Température (°C)	Dry matter content (%TS)	Duration (d)
S_2c	2 coupe	-	-	-	-
S_2c_CaO_10_55	2 coupe	10	55	4	1
S_2c_NaOH_10_55	2 coupe	10	55	4	1
S_1_NT	1	-	-	-	-
S_1_NaOH_10_55	1	10	55	4	1
S_1_CaO_10_55	1	10	55	4	1
S_60_NaOH_55_13_1	60	10	55	13	1
S_60_CaO_55_13_1	60	10	55	13	1
S_60_Raw	60	-	-	-	-
S_60_NaOH_24_13_1	60	10	24	13	1
S_60_CaO_24_13_1	60	10	24	13	1
S_60_NaOH_24_13_5	60	10	24	13	5
S_60_CaO_24_13_5	60	10	24	13	5
1_CaO_10_20_4d*	1	10	24	20	4
1_Raw_*	1	-	-	-	-
1_NaOH_10_20_6d*	1	10	24	20	6
20_NaOH_10_20_6d*	20	10	24	20	6
1_CaO_10_20_6d*	1	10	24	20	6
20_CaO_10_20_6d*	20	10	24	20	6
20_Raw*	20	-	-	-	-
20_NaOH_10_20_4d*	20	10	24	20	4
20_CaO_10_20_4d*	20	10	24	20	4
20_NaOH_10_4_4d*	20	10	24	4	4
20_CaO_10_4_4d*	20	10	24	4	4
M_1_NaOH_14.4_20_4d	1	14.4	24	20	4
M_1_CaO_14_20_4d	1	14	24	20	4
M_1_NaOH_10_20_4d	1	10	24	20	4
M_1_CaO_10_20_4d	1	10	24	20	4
M_1_CaO_0.83	1	0.83	24	20	4
M_1_NaOH_1.2	1	1.2	24	20	4
M_60_CaO_5_5	60	5	24	13	5
M_60_CaO_10_1	60	10	24	13	1
M_60_CaO_12.5_3	60	12.5	24	13	3

*Correspond à des échantillons de miscanthus

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques

H.L. Thomas, D. Pot, E. Latrille, G. Trouche, L. Bonnal, D. Bastianelli, H. Carrère. Sorghum Biomethane Potential Varies with the Genotype and the Cultivation Site. *Waste Biomass Valorization* 2017, 1-6

H.L. Thomas, J. Seira, R. Escudié, H. Carrère, Lime pretreatment of miscanthus : impact on BMP and batch dry co-digestion with cattle manure. *Molecules* 2018

H.L Thomas, S. Arnoult, M. Brancourt-Hulmel, H. Carrère. Methane Production Variability According to Miscanthus Genotype and Alkaline Pretreatments at High Solid Content, *BioEnergy Research* 2019

H.L Thomas, H;Felix Pinheiro Nolasco, H. Carrère, M Lartaud, T-V CaO, C. Baptiste, J-L. Verdeil, Alkali pretreatments for sorghum and miscanthus anaerobic digestion: impacts at plant cell scale. Soumission prévue en avril 2019

Communication internationale

H.L. Thomas, J-L. Verdeil, H. Carrère Understanding the effect of alkaline pretreatments of lignocellulosic biomass on cell wall structure. *13th International conference Renewable Resources and Biorefineries*, Ghent, Belgium, 30-31 May & 1 June 2016

Communication affichée

H.L. Thomas, D. Pot, S. Arnoult, M. Brancourt-Hulmel, P. Malvoisin, J. Alcouffe, H. Carrère. Etude de l'impact des pré-traitements alcalins et des génotypes sur la digestion anaérobie du sorgho et du miscanthus. *Journées Recherche et Innovation Biogaz et Methanisation*, Rennes, France, 2-4 Octobre 2018

H.L. Thomas, S. Arnoult, M. Brancourt-Hulmel, H. Carrère. Promising genotypes and alkaline pretreatments for methane production from miscanthus. *15th International conference Anaerobic digestion AD15*, Beijing, China, 17-20 of October 2017

H.L. Thomas, J-L. Verdeil, H. Carrère. Impacts of alkaline pretreatments on sorghum and miscanthus anaerobic digestion. Journée de l'école doctorale, filière APAB, Montpellier, France, Juin 2017

INTRODUCTION

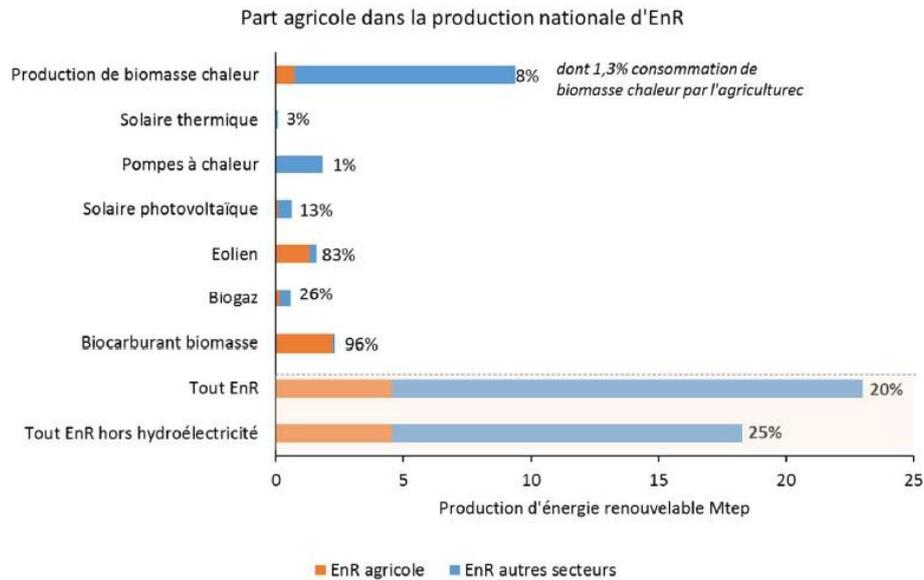
L'utilisation de l'énergie est omniprésente dans notre quotidien. Pour répondre à ses besoins, les filières du charbon, du gaz naturel, du pétrole et du nucléaire sont exploitées. Ces besoins étant de plus en plus importants, la planète doit faire face aujourd'hui à la surexploitation des ressources naturelles (Gicquel 2016). Cette dernière peut être mise en évidence par le recul du jour du dépassement, correspondant à la date à laquelle a été exploité ce que peut nous donner la nature en une année (1^{er} août en 2018 contre le 23 décembre en 1970). Cela conduit non seulement à des bouleversements dans le domaine environnemental mais aussi dans les domaines politiques et sociaux. En effet, certains approvisionnements conduisent à la dépendance de certains pays entre eux (par exemple, la France est dépendante de la Russie pour son approvisionnement en gaz naturel). La raréfaction de l'eau potable et la hausse des prix d'éléments de premières nécessités aboutissent à des conflits sociaux à certains endroits du globe.

Les estimations des quantités de ressources fossiles montrent que celles-ci décroissent fortement. De plus, nous faisons face à un réchauffement climatique dont les causes anthropiques sont largement démontrées. Les émissions de gaz à effet de serre (GES) doivent être largement réduites, en particulier le CO₂, responsable du réchauffement climatique. En effet, le rapport du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) d'octobre 2018 (<http://www.ipcc.ch/report/sr15/>) préconise une hausse des températures limitée à 1.5°C, soit une neutralité des émissions de CO₂ à l'horizon 2050. Le mode de consommation énergétique et surtout les modes de production doivent donc être modifiés.

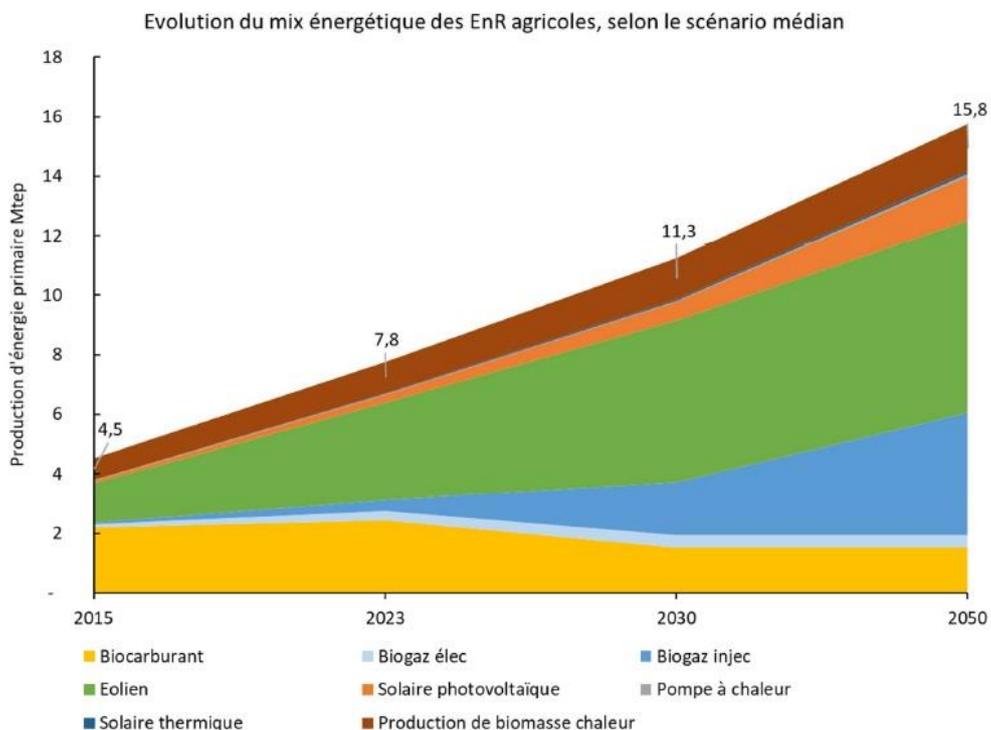
Dans ce contexte, le développement des énergies renouvelables (EnR) constitue un enjeu fort (Carrier et al. 2015). Parmi elles, l'éolien et le solaire sont les plus connues et développées. Cependant, il existe de nombreuses autres sources comme la filière marine ou bien la biomasse (ADEME n.d.). En effet, depuis plusieurs années, le concept de bioraffinerie a été développé. C'est un processus de transformations de différentes biomasses en produits biosourcés (alimentation, produits chimiques, matériaux) et en bioénergies (biocarburants, électricité, chaleur). Les bioénergies, ou énergies issues de la biomasse qui capte la lumière du soleil fournissant ainsi de l'énergie renouvelable, sont, d'après (Rittmann 2008), la meilleure option pour faire face à la demande énergétique humaine.

Parmi les différentes voies de valorisation de la biomasse en bioénergie, la méthanisation est perçue comme un procédé majeur pour la décentralisation de la production d'énergies pouvant être un élément clé pour un développement durable dans les zones rurales. En effet, le Plan Energie Méthanisation Autonomie Azote (EMAA) de l'Agence de Développement de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) vise l'intégration de la filière méthanisation dans l'activité agricole, afin de valoriser les excédents d'azote organique comme les effluents d'élevage et fournir un engrais et ainsi diminuer le recours aux intrants. Le gouvernement français s'est fixé un objectif de 1 500 installations de biogaz d'ici 2020, dont 1 000 installations de biogaz à base de matières premières agricoles (Torrijos 2016). Le scénario Afterres, quant à lui, préconise 10000 méthaniseurs d'ici 2050, avec en moyenne 15 agriculteurs par installation et un bassin d'approvisionnement de 4 km de

rayon et alimentés à 80% par des matières végétales (<http://afterres2050.solagro.org/2015/11/10-000-methaniseurs-en-2050/>). Sa part dans la production nationale d'EnR est donc conséquente. Elle a été chiffrée à 20% de la production nationale en 2015, principalement liée à la production de biocarburants et à l'éolien (Figure I-1a). Son évolution d'ici 2050, sera, d'après un scénario médian, exponentielle, notamment dans la valorisation biogaz pour l'injection de méthane dans les réseaux (Figure I-1b).



(a)



(b)

Figure I-1 : Part du secteur agricole dans la production d'énergie renouvelables françaises en 2015 (a), évolution de mix énergétique des énergies renouvelable agricole selon le scénario médian (b) source : synthèse réalisée pour le compte de l'ADEME (ADEME et al. 2018)

Le projet d'investissement d'avenir BFF (Biomass For the Future) porte sur ces différentes problématiques. En effet, ce projet a pour objectif de créer de nouvelles variétés de biomasse d'intérêt et le développement de chaînes de valeur de ces biomasses. La création variétale est assistée par la génomique et l'agronomie. La valorisation des biomasses lignocellulosiques cible les domaines du plastique automobile, du génie civil, de l'énergie thermique et du biogaz. Deux biomasses lignocellulosiques différentes sont étudiées: le sorgho et le miscanthus. Ces cultures ont l'avantage de combiner un fort potentiel de production de biomasse avec un impact minimal sur l'environnement (Anon n.d.).

Au Laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement (LBE), nous contribuons à ce projet via l'étude de la valorisation en biogaz de ces deux biomasses. Quatre tâches ont été définies. La première consiste en la mesure du potentiel méthane (BMP) des différents géotypes cultivés et créés par les différents partenaires (CIRAD, INRA,...). La deuxième consiste en l'optimisation du potentiel méthane par l'utilisation de pré-traitements alcalins, reconnus les plus efficaces pour délignifier les matières lignocellulosiques (Monlau et al. 2012). L'optimisation est également étudiée via la co-digestion de ces biomasses avec du fumier en réacteur batch voie sèche à recirculation afin de représenter les méthaniseurs dit « garage » utilisés dans la filière agricole. La troisième est le développement et l'échange de calibrations Spectroscopie Proche Infrarouge avec d'autres partenaires du projet. Enfin, la quatrième tâche est celle du transfert à l'industrie. La deuxième tâche fait, en partie, l'objet de cette étude. En effet, cette thèse est l'occasion, en plus de l'optimisation de pré-traitements alcalins, de comprendre les mécanismes de ces prétraitements sur la matière et leurs impacts sur la digestion anaérobie (DA).

Les objectifs de ce doctorat sont de comprendre les effets de la nature de la biomasse et des pré-traitements alcalins sur sa biodégradabilité, sa composition biochimique, son accessibilité aux micro-organismes et sa structure tissulaire. L'effet des pré-traitements sont-ils biomasse dépendants, réactif dépendants ? Comment est-il possible de les optimiser ? Quels sont leurs effets sur la structure de la matière végétale (tissu, paroi végétale, cellules végétales) et sur son accessibilité ?

Pour répondre à ces différentes questions scientifiques, des caractérisations à différentes échelles ont été utilisées (Figure I-2). Tout d'abord, différents pré-traitements alcalins ont été appliqués conduisant ainsi à de nombreux substrats avec des compositions biochimiques différentes. Différentes conditions opératoires (réactif alcalin, concentration, température, teneur en matière sèche, granulométrie, durée) ont été utilisées dans le but de les optimiser. La DA permet en plus de mesurer le potentiel méthane d'un substrat brut ou pré-traité d'en déterminer une biodégradabilité dans les conditions « idéales » des tests BMP. La conduite de réacteurs a permis d'appliquer des pré-traitements à plus grande échelle et dans des conditions approchant ce qui pourrait l'être sur des installations de méthanisation à la ferme de type garage. Les caractérisations biochimiques sont une première approche de l'étude du changement de la matière induite par l'application de pré-traitements alcalins. La mesure du potentiel acidogène est une mesure de l'accessibilité des sucres en s'affranchissant

de l'étape d'hydrolyse de la méthanisation. Enfin, les analyses microscopiques permettent une approche plus fine des changements induits par les pré-traitements.

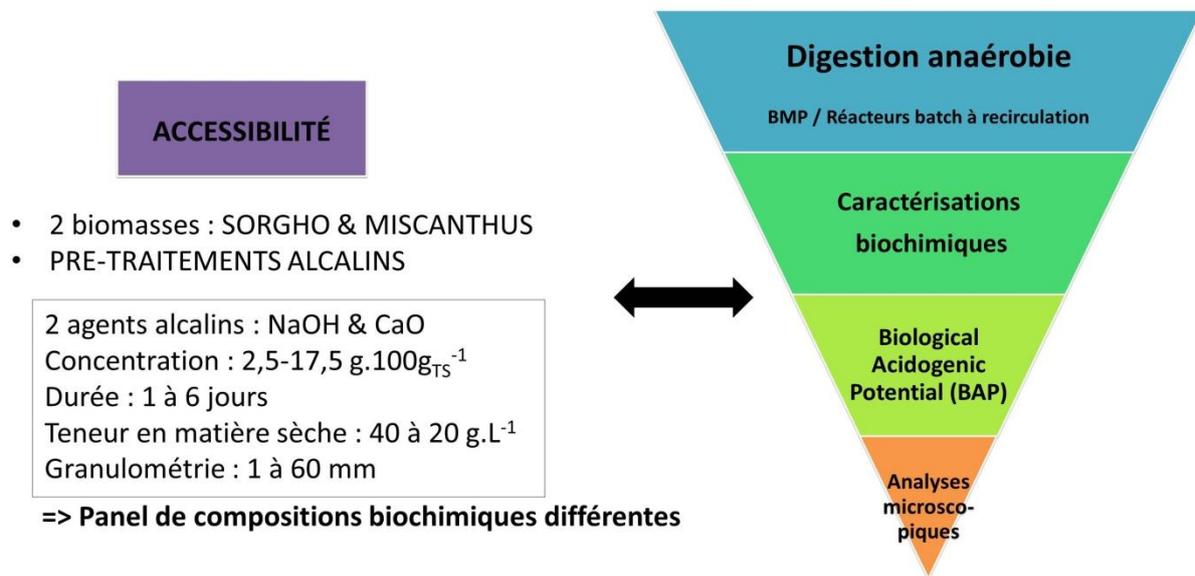


Figure I-2 : Moyens mis en œuvre pour répondre aux questions scientifiques de la thèse

Cette étude est constituée de 6 chapitres.

Le premier est dédié à une étude bibliographique rappelant le contexte ainsi que les enjeux de cette étude.

Le chapitre « Matériels et Méthodes » (chapitre 2) consiste en la description de l'ensemble des techniques expérimentales et calculs qui ont été mis en œuvre afin de répondre aux objectifs de l'étude.

Ensuite, la partie résultats regroupe les chapitres 2 à 6. Cette partie est rédigée en partie en anglais car elle se base sur différents articles scientifiques publiés et en cours de rédaction. Le chapitre 3 est consacré à l'étude des pré-traitements alcalins sur le sorgho et le miscanthus à différentes conditions opératoires (température, durée, concentration en réactifs, teneur en matières sèche, granulométrie). Le chapitre 4 présente l'application des pré-traitements de la biomasse lignocellulosique co-digérée avec du fumier. Le chapitre 5 illustre l'étude histologique. Enfin, le chapitre 6 consiste en une discussion de l'ensemble des résultats présentés précédemment.

Pour finir, une dernière partie Conclusions et Perspectives synthétise les résultats majeurs obtenus lors de ce doctorat envisagera les perspectives au niveau académique tant qu'au niveau de la mise en œuvre à plus grande échelle.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre se divise en 4 parties exposant le contexte, les enjeux ainsi que les bases scientifiques nécessaires au développement et à la compréhension des travaux de cette thèse.

La première partie de ce chapitre sera consacrée à la méthanisation, présentant ses étapes biologiques, ses enjeux ainsi que ses différentes configurations. La deuxième partie présentera des notions de biologie végétale ainsi que les caractéristiques de la biomasse lignocellulosique puis plus précisément le sorgho et le miscanthus. La partie suivante présentera les différents pré-traitements qu'il est possible d'appliquer sur cette matière ; une attention particulière sera portée sur les pré-traitements alcalins et les différents facteurs pouvant influencer les performances des pré-traitements. Enfin, les différentes méthodes d'observations et de quantification de l'impact des pré-traitements seront exposées.

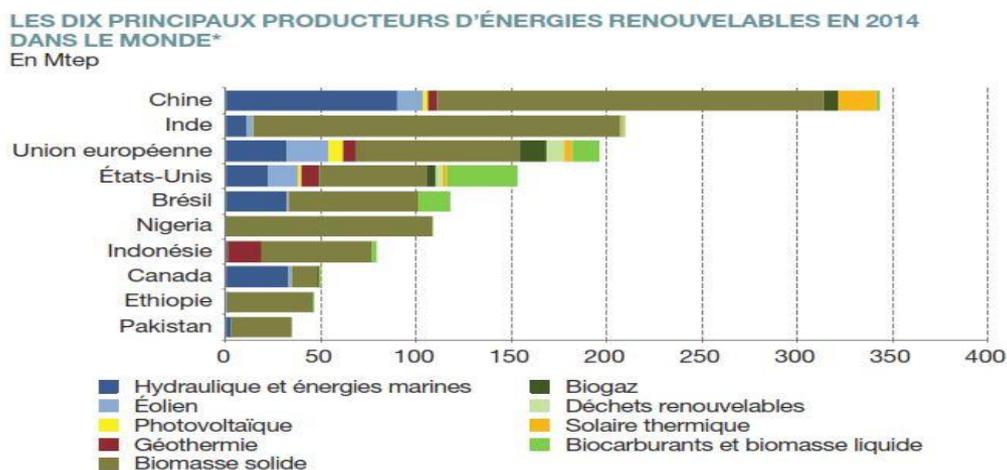
1.1 La digestion anaérobie (ou méthanisation)

1.1.1 La digestion anaérobie (DA) : production d'une énergie renouvelable

La loi Grenelle I, adoptée le 23 juillet 2009, précise que « les sources d'énergie renouvelable sont [...] l'énergie issue de la biomasse, du gaz de décharge, du gaz de stations d'épuration d'eaux usées et du biogaz ». La digestion anaérobie (DA) fournit de l'énergie (électricité, chaleur ou combustibles) à des fins agricoles locales ou à des utilisateurs externes, par le biais des réseaux d'électricité, de chauffage urbain ou de gaz naturel.

La DA n'est pas seulement une alternative à la production d'énergie à partir de ressources fossiles et un moyen de réduire les émissions de Gaz à effet de serre (GES) C'est aussi un moyen que chaque pays soit autonome et indépendant des autres pays mais c'est surtout un moyen de traiter, réduire et valoriser les déchets (Achinas et al. 2017). Cependant, le problème majeur des énergies dérivées de la biomasse est la question de leur faisabilité économique (Ghatak 2011).

L'Europe est un leader dans la production de biogaz (Figure 1-1), avec un nombre important et croissant d'installations commerciales de biogaz installées (plus de 17000 installations) et une capacité électrique totale de plus de 10 GW, contre une capacité électrique mondiale de 16 GW. Toutefois, malgré un potentiel existant élevé, la production de biogaz est encore faible dans de nombreux pays européens (Scarlat et al. 2018), (Figure 1-2).



* Pour les pays non-membres de l'OCDE, les données relatives à la biomasse solide sont des estimations. Étant donné leur poids important au sein des énergies renouvelables, les classements sont donc à prendre avec précaution.
Sources : AEI, World Energy Balances (2016 edition) © OCDE/AEI 2016

Figure 1-1: Les dix principaux producteurs d'EnR en 2013 dans le monde (Carrier et al. 2015)

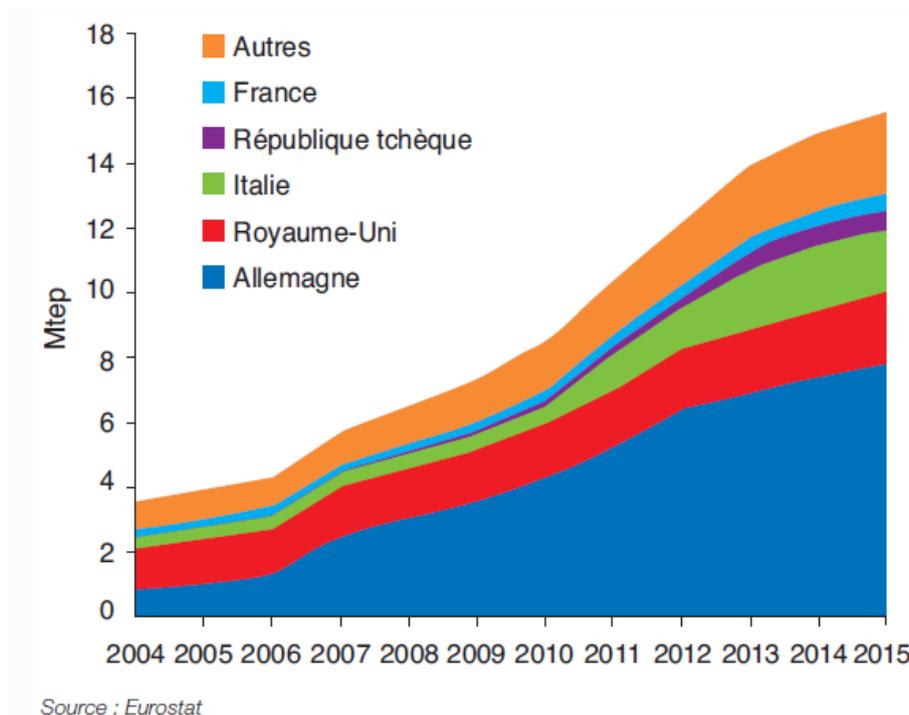


Figure 1-2: Les principaux producteurs de biogaz en Europe en 2015

Il y a également d'autres freins comme le montage de projet qui peut s'avérer être assez important étant donné le classement des installations en ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement). L'acceptation par la population peut être assez difficile par le manque d'informations (odeur, pollution, bruit,...). Une installation représente un investissement financier assez conséquent. De nombreuses installations sont en retard par rapport au plan d'amortissement en raison principalement de nombreuses pannes ou bien de la non sécurisation des intrants.

1.1.1.1 Une réaction biologique en 4 étapes

La méthanisation (encore appelée digestion anaérobie) est une technologie basée sur la dégradation par des micro-organismes de la matière organique, en conditions contrôlées et en milieu anaérobie, contrairement au compostage qui est un processus aérobie (Moletta 2011). La matière organique peut provenir de différents gisements : l'agriculture, sous-produits industriels, déchets verts et restes alimentaires (Figure 1-3). Cette dégradation aboutit à la production d'un biogaz, mélange gazeux composé d'environ 50% à 70% de méthane (CH₄), de 30% à 50% de gaz carbonique (CO₂) et de quelques gaz traces (NH₃, N₂, H₂S). Le méthane possède un pouvoir calorifique inférieur de 9,89 kWh/Nm³ : 1 m³ de méthane équivaut à 1,15 L d'essence ou bien à 1,3 kg de charbon, par exemple. La production de biogaz est associée à la production d'un produit humide riche en matière organique partiellement stabilisée appelé digestat. Il est généralement envisagé le retour au sol du digestat après éventuellement une phase de maturation par compostage.

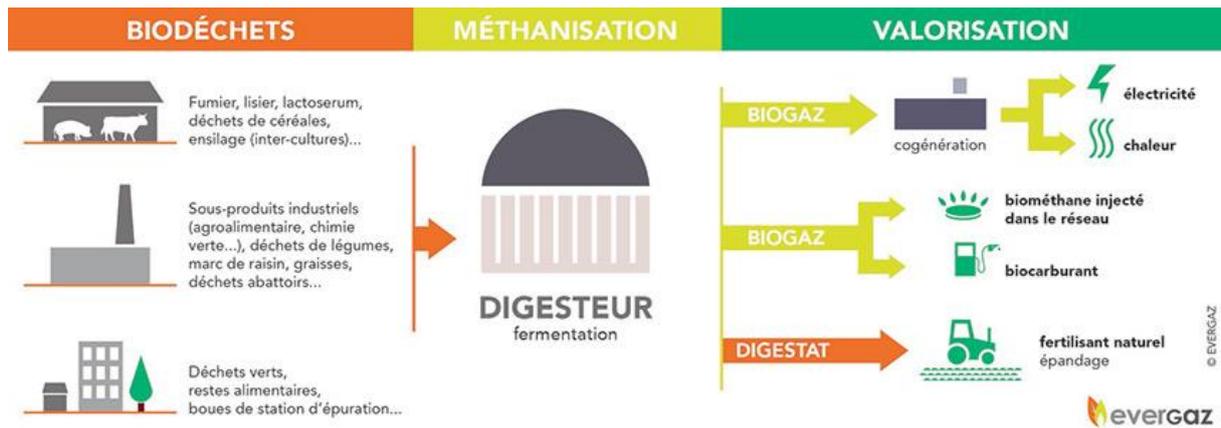


Figure 1-3 : Valorisation de la matière organique par digestion anaérobie, (Evergaz 2018)

Du point de vue biochimique, la digestion anaérobie est une succession de réactions chimiques catalysées par des enzymes produites par différents organismes vivants. Elle est composée de 4 grandes étapes : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Moletta 1990; Wei 2016)(Figure 1-4).

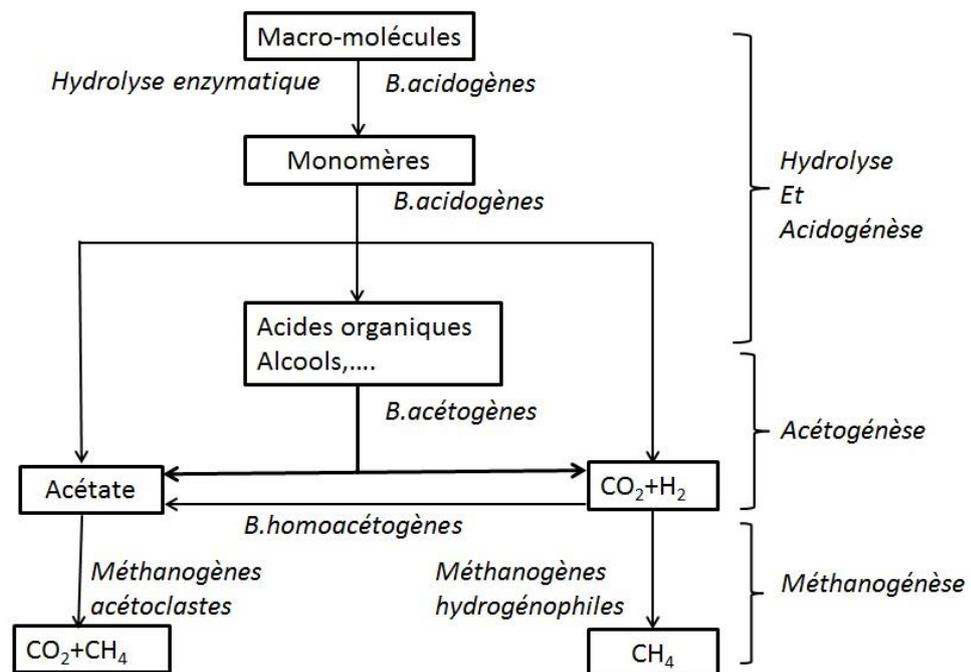


Figure 1-4: Les 4 étapes de la digestion anaérobie d'après Moletta (1990), B. signifie bactéries

1.1.1.1 L'hydrolyse

La matière organique complexe est tout d'abord hydrolysée en monomères. Cette décomposition est réalisée par des enzymes exocellulaires qui dégradent les polymères et la matière organique. Cette première étape peut devenir l'étape limitante dans le cas de composés difficilement hydrolysables tels que la biomasse lignocellulosiques, les boues d'épuration mais aussi la cellulose, l'amidon ou les graisses. Par contre, si les substrats sont solubles, la vitesse de production d'acides est très rapide et s'accompagne de production d'hydrogène et de dioxyde de carbone, ce qui peut être source d'inhibitions. Les micro-organismes principalement mis en jeu sont : *Clostridium sp*, *Caldicellulosiruptor spp*, *Bacillus sp*, *Bacteriodes sp* et *Staphylococcus sp*. (Amani et al. 2010 ; Moletta 2011 ; Cabezas et al. 2015).

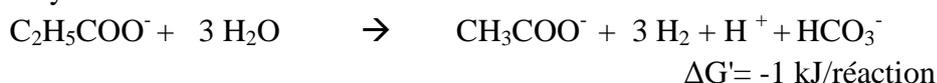
1.1.1.2 L'acidogénèse

Les monomères, issus de l'hydrolyse, sont utilisés par les espèces microbiennes hydrolytiques et fermentaires d'une grande diversité dites acidogènes, qui vont produire des acides gras volatils (AGV) (comme l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide butyrique), des alcools et des acides organiques (par exemple l'acide lactique) ainsi que de l'hydrogène et du dioxyde de carbone (Figure 1-4). Cette deuxième étape est réalisée par des bactéries hydrolytiques et fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, à croissance rapide, d'une grande diversité, notamment des genres *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, ... dont les actions enzymatiques sont intra et extra cellulaires (Amani et al. 2010).

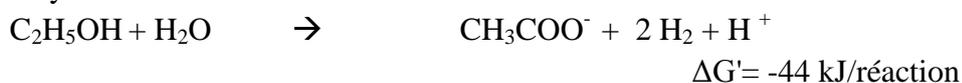
1.1.1.3 L'acétogénèse

Cette étape permet la transformation des divers composés issus de la phase précédente en précurseurs directs du méthane : l'acétate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène (Moletta 2011). Deux groupes de bactéries acétogènes sont distingués lors de cette étape. Le premier groupe comprend les bactéries productrices obligées d'hydrogène, anaérobies strictes, également appelées OHPA (« Obligate Hydrogen Producing Acetogens ») (des genres *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophosphora*, *Syntrophus*, ...). Elles sont capables de produire de l'acétate et de l'H₂ à partir des métabolites réduits issus de l'acidogénèse tels que le propionate et le butyrate. L'accumulation d'hydrogène conduit à l'arrêt de l'acétogénèse par les bactéries OHPA. La thermodynamique de ces réactions est favorisée si la pression partielle en dihydrogène est très faible (10⁻⁴-10⁻⁶atm) et donc si l'hydrogène est éliminé. Cette élimination peut être réalisée grâce à l'association syntrophique de ces bactéries avec des microorganismes hydrogénéotrophes. ($\Delta G'$: Energie libre : pH=7, 25°C, pH₂= 10⁻⁴ atm.)

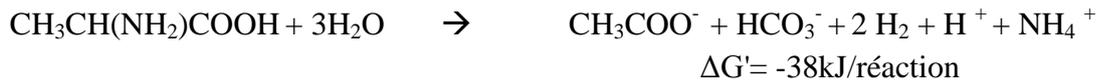
Oxydation d'acides



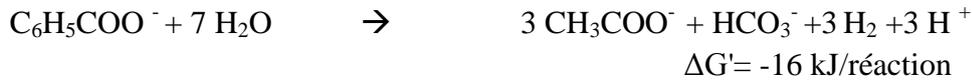
Oxydation d'alcools



Oxydation d'acides aminés



Oxydation de composés aromatiques



Le deuxième groupe réunit les bactéries acétogènes non syntrophes dont le métabolisme est majoritairement orienté vers la production d'acétate. Elles se développent dans les milieux riches en dioxyde de carbone. Les bactéries « homo-acétogènes » (du genre *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Sporomusa*, ...) font partie de ce groupe, elles utilisent l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour produire de l'acétate. Elles ne semblent pas entrer en compétition pour l'hydrogène avec les Archées méthanogènes hydrogénotrophes et sont présentes en quantité beaucoup plus faible dans les biotopes anaérobies.

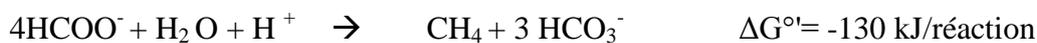
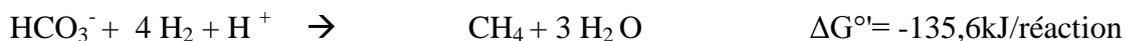


* ΔG° : Energie libre standard : pH=7, 25°C

1.1.1.4 La méthanogenèse

La méthanogenèse est assurée par des micro-organismes anaérobies stricts qui appartiennent au domaine des Archées. Cette dernière étape aboutit à la production de méthane. Elle est réalisée par deux voies : l'une à partir de l'hydrogène et du dioxyde de carbone par les espèces dites hydrogénotrophes (genres *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Methanogenium*...), et l'autre à partir de l'acétate par les espèces acétotrophes (dites aussi acétoclastes) (genres *Methanosarcina*, *Methanothrix*...)(Moletta 2011). Leur taux de croissance est plus faible que celui des bactéries acidogènes.

Méthanogènes hydrogénophiles



Méthanogènes acétoclastes



70% de méthane est produit par cette voie.

Il est reporté que les méthanogènes ont le taux de croissance le plus lent et sont les plus sensibles aux changements dans les conditions de procédé (Achinis et al. 2017).

1.1.2 Les conditions physico-chimiques

Les conditions suivantes permettent un développement optimal des micro-organismes (Moletta 2011).

1.1.2.1 Le potentiel redox

Ce paramètre physique représente l'état de réduction du système. Pour initier la croissance des microorganismes, il doit être compris entre -300mV et -500mV. Cette gamme de valeurs représente la condition optimale pour que les Archées méthanogènes puissent se développer mais aussi pour que la production de méthane soit maximale (Amani et al. 2010).

1.1.2.2 Le pH

Il doit être compris entre 6,5 et 7,3 (Jha et al. 2011). Cela correspond à l'optimum de chaque population dont principalement celui des Archées, très sensibles aux conditions acides. Les valeurs optimales de pH sont différentes pour chaque étape de la digestion (Kothari et al. 2014). Les bactéries acidogènes ont leur optimum compris entre 5,5 et 6. Celui des bactéries acétogènes est aux alentours de la neutralité. Les Archées méthanogènes ont une activité maximale pour un pH compris entre 6 et 8.

En plus d'avoir une influence sur les micro-organismes, le pH conditionne également la forme ionisée ou non des molécules telles que les AGV, NH₃ et H₂S et donc leur toxicité. En effet, c'est leur forme non ionisée qui diffuse librement à travers la membrane des micro-organismes et qui est la plus toxique.

1.1.2.3 L'alcalinité

L'alcalinité du milieu, aussi appelée « pouvoir tampon », est la capacité du milieu à neutraliser les acides/bases forts et ainsi à résister aux variations de pH. L'alcalinité est due à la présence d'acides/bases faibles dans le milieu qui fixe alors le pH aux alentours de leur pKa (constante logarithmique d'acidité). En effet, par exemple lors de l'augmentation de la concentration en ions H⁺ dans le milieu, la base faible du pouvoir tampon présent dans le milieu va capter l'ion et former ainsi l'acide faible conjugué, remplaçant ainsi l'acide fort par un acide faible. Lors de la méthanisation, l'alcalinité est principalement due à la présence de bicarbonate en équilibre avec du dioxyde de carbone gazeux (Hillion 2017). En effet, durant la dégradation de composés organiques, le dioxyde de carbone produit sous forme gazeuse s'équilibre avec le milieu liquide et aboutit à la production d'acide carbonique (H₂CO₃). Cet acide instable se dissocie rapidement et libère des ions hydrogènes et bicarbonates (HCO₃⁻) jusqu'à l'atteinte de l'équilibre, fixant alors le pH aux alentours du pKa égal à 6,3 (équation ci-dessous).



Donc l'augmentation de la quantité d'ions H⁺ dans le milieu déplace l'équilibre vers la gauche et favorise la formation de H₂CO₃, et donc de CO₂.

Le ratio AGV totaux sur alcalinité est un bon indicateur de la stabilité du réacteur. Pour un bon fonctionnement il doit être inférieur à $2 \text{ g}_{\text{HAc}_{\text{ceq}}}\cdot\text{g}_{\text{CaCO}_3}^{-1}$ (Rouches et al. 2019).

1.1.2.4 La température

Trois plages de température existent (Lettinga et al. 2001). Le régime psychrophile se situe entre 15°C et 25°C. La méthanisation a généralement lieu en régime mésophile (30°C à 40°C). Le régime thermophile se déroule entre 45°C à 65°C. Cela permet d'améliorer la vitesse d'hydrolyse par rapport au régime mésophile mais cependant il peut y avoir des risques d'instabilité en raison de possibles productions rapides d'AGV et d'hydrogène. Le second avantage est associé à la hygiénisation par rapport aux germes pathogènes. Les mêmes voies métaboliques sont utilisées et les rendements sont proches pour les deux derniers régimes de température.

1.1.2.5 La présence de macro et d'oligo-éléments

Pour son développement et sa croissance, la flore bactérienne présente a besoin d'un apport suffisant de macro-éléments (carbone, azote, phosphore, soufre). Les *Archaea* méthanogènes ont en plus des besoins en oligo-éléments particuliers comme le fer, le molybdène, le nickel, le magnésium, le cobalt, le cuivre, le tungstène et le sélénium (Raposo et al. 2011). Pour la plupart, ceux-ci sont impliqués dans la synthèse de coenzymes et cofacteurs nécessaires à la méthanogenèse.

Les substrats présentant un rapport C/N optimal fournissent suffisamment d'éléments nutritifs aux micro-organismes pour maximiser la production de biogaz. Des valeurs de C/N plus faibles entraînent des concentrations plus élevées d'ammoniac et entravent la croissance microbienne. Lorsque le rapport C/N est supérieur à la valeur optimale dans le processus de fermentation, de grandes quantités d'AGV sont produites. Par conséquent, le maintien d'un rapport C/N approprié est important. Le rapport optimal se situe entre 20 et 35 (Siddique & Wahid 2018).

1.1.2.6 Le brassage

Le brassage permet le contact entre la biomasse et le substrat favorisant ainsi les échanges thermiques, chimiques, physiques et biologiques dans l'ensemble du digesteur et d'éviter à la fois la formation de couches de boues de surface et leur dépôt au fond du réacteur. En raison de la montée des bulles de gaz et des courants de convection thermique, il y a toujours un certain degré de mélange naturel dans le réacteur de digestion (Appels et al. 2008).

Cependant, il ne faut pas que l'agitation soit trop forte car le système microbien pourrait être perturbé.

1.1.2.7 La pression partielle en dihydrogène

L'hydrogène est un inhibiteur des méthanogènes acétoclastes (cf 1.1.1.3). En effet, les réactions de l'acétogénèse ont un $\Delta G^{\circ} > 0$, la consommation en H_2 qui est un produit de ces réactions permet de déplacer l'équilibre.

Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène ne peuvent thermodynamiquement oxyder les acides gras volatils qu'à des pressions partielles en H_2 très faibles, inférieures à 10^{-4} et 10^{-5} bars respectivement pour le butyrate et le propionate (Amani et al. 2010; Appels et al. 2008). Une accumulation d'hydrogène dans le milieu empêche alors le bon déroulement de la méthanisation par l'inhibition de l'hétéroacétogénèse et l'accumulation de composés intermédiaires toxiques (AGV). Par conséquent, une association syntrophique entre les bactéries acétogènes et des microorganismes hydrogénotrophes (i.e., bactéries sulfato-réductrices, bactéries homoacétogènes et méthanogènes hydrogénophiles) est indispensable afin de consommer immédiatement l'hydrogène produit. Ce transfert inter-espèces est essentiel au bon fonctionnement de la digestion anaérobie.

1.1.2.9 Charge et temps de séjour

Le TSH (Temps de Séjour Hydraulique) est défini par le débit d'alimentation divisé par le volume du réacteur, il représente le temps de séjour du substrat dans le digesteur. C'est un des paramètres de dimensionnement des réacteurs en continu. Un autre paramètre est la CVA (Charge Volumique Appliquée) représentant la quantité journalière de matière organique introduite par unité de volume du digesteur.

Pour des digesteurs en mode batch ou discontinu, les paramètres utilisés sont le ratio S/X (substrat/inoculum) et la durée du batch (Rouches 2015).

1.1.2.10 Inhibitions

Les substances inhibitrices s'avèrent souvent être la principale cause de perturbation et de défaillance des réacteurs anaérobies. Elles peuvent être apportées par les substrats introduits dans le digesteur ou bien produites lors de la digestion. En effet, quand les charges appliquées sont trop élevées, l'équilibre entre les microorganismes peut être mis à mal, ce qui conduit à l'accumulation d'AGV ou d' H_2 . De plus, si les substrats utilisés sont trop riches en composés azotés l'accumulation en ammoniac peut causer une inhibition des microorganismes. Les autres inhibiteurs couramment présents dans les digesteurs anaérobies sont, les sulfures, les ions de métaux légers (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Al^{3+}) les métaux lourds (Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+}) et les composés organiques (phénol, par exemple). En raison de la différence entre les inocula anaérobies, la composition des déchets et les méthodes et conditions expérimentales, les résultats de la littérature sur l'inhibition causée par des substances toxiques spécifiques varient considérablement (Tableau 1-1). La co-digestion avec d'autres déchets, l'adaptation des microorganismes aux substances inhibitrices et l'utilisation de méthodes pour éliminer les substances toxiques avant la digestion anaérobie peuvent améliorer considérablement l'efficacité du traitement des déchets (Chen et al. 2008).

Tableau 1-1 : Concentrations seuils inhibitrices de certains nutriments pour la digestion anaérobie, d'après (Hillion 2017)

Composé	Concentrations (mg.L ⁻¹)	Composé	Concentrations (mg.L ⁻¹)
NH ₄ ⁺ Total	1500	Co	35
Ca	2500-3660	Cr	10-15
Mg	1000	Cu	12,5-15
K	2500	Zn	7,5-68
Na	3500	Ni	2-27
S	200-13000	Fe	1000

1.1.3 Les valorisations du biogaz et du digestat

1.1.3.1 La production de chaleur

Lors de l'utilisation de la méthanisation pour le traitement d'effluents et de déchets, le biogaz peut être valorisé en chaleur pour les besoins des procédés de l'industrie, ou alors pour d'autres industries voisines et chauffer les bâtiments. Cependant, de plus en plus d'installations valorisent maintenant le biogaz en cogénération et/ou en biométhane.

1.1.3.2 La production d'électricité

Pour produire l'électricité, une turbine à gaz ou un moteur à cogénération est utilisé. Le plus souvent, un module de cogénération est utilisé afin de produire de l'électricité et de la chaleur (Laperrière et al. 2017). Le rendement de conversion d'une cogénératrice est de 35% en l'électricité et jusqu'à 85% en chaleur si elle est utilisée en totalité. En France, l'électricité est achetée par EDF à des tarifs contractualisés sur 15 ans et dépendant de la taille des installations, de la nature des substrats. En accord avec l'arrêté du 13 décembre 2016 du code de l'énergie (Assemblée Nationale 2016), le tarif de rachat de l'électricité produite par une unité de biogaz est de 17,5 cts€/kWh⁻¹ pour des installations d'une puissance inférieure à 80 kWe et de 15 cts€/kWh⁻¹ pour des installations d'une puissance comprise entre 80 et 500 kWe. La prime effluent d'élevage de 5 cts peut s'ajouter. Il est également préférable de valoriser la chaleur produite.

1.1.3.3 L'injection dans le réseau de gaz naturel

Une combinaison de facteurs, y compris l'avancement de la modernisation des technologies du biogaz et les nouvelles possibilités d'utilisation dans le secteur des transports ont entraîné le passage de la production d'électricité et de chaleur à la valorisation du biogaz en biométhane (Scarlat et al. 2018). En effet, en France, depuis 2011, l'injection de biométhane (biogaz déshydraté et épuré) dans le réseau de gaz naturel est autorisée par les décrets n°2011-1594 à 1597 du 21 novembre 2011, arrêtés du 23 novembre 2011, arrêté du 24 juin 2014 (Assemblée Nationale 2011b; Assemblée Nationale 2014).

L'épuration consiste à éliminer du biogaz brut les substances indésirables et les traces de polluants (ammoniacale, éléments soufrés, minéraux...) et augmenter sa teneur en méthane

(par retrait du CO₂ et autres composés gazeux) pour produire un gaz comparable au gaz naturel.

Le biométhane ainsi obtenu constitue du biogaz épuré et enrichi doté d'un pouvoir calorifique équivalent à celui du gaz naturel. Cependant, les réseaux de gaz étant moins développés en territoires agricoles, le concept de biométhane porté se développe. Il s'agit de liquéfier ou compresser le biométhane puis de le transporter par camion vers un point d'injection. Avec la liquéfaction, on réduit le volume du gaz par 600, devenant ainsi stockable et transportable. D'après une étude commandée par l'ADEME en 2016, cette approche serait contraignante (pureté du biogaz pour la liquéfaction,...) et énergivore mais la mutualisation semblerait être une piste prometteuse pour la diminution des coûts (Laurent et al. 2016). En fonction de la taille de l'installation, du type d'unité de production et de la nature des déchets valorisés, les producteurs de biométhane bénéficient d'un tarif d'achat fixé par un arrêté compris entre 45 et 125 euros par MWh (Assemblée Nationale 2011a).

1.1.3.4 La production de biocarburant

La production de carburant à partir de biométhane est peu développée pour l'instant en France car le biodiesel ou le bioéthanol sont privilégiés par manque d'infrastructures de distribution. Cependant, son utilisation commence à se répandre pour les flottes captives. 160.10⁶ m³ de biométhane ont été utilisés dans les transports en Europe en 2015. Les véhicules GNV sont plus développés chez nos voisins : Suède, Allemagne, Finlande ainsi qu'en Chine et aux USA (Scarlat et al. 2018).

1.1.3.5 Power to gas et couplage méthanisation-méthanation

L'intérêt du biogaz croît de plus en plus suite à l'autorisation récente de l'injection du biométhane dans le réseau de gaz naturel français et à la montée en puissance du « power to gas ». Ce dernier est un procédé permettant le stockage de l'électricité excédante produite notamment par des EnR fluctuantes (l'éolien et le solaire) (Figure 1-5). Il est composé de deux étapes. La première est la production d'hydrogène par électrolyse de l'eau. La deuxième étape est la conversion de cet hydrogène produit en CH₄ par méthanation via une source externe de CO ou CO₂ (Götz et al. 2016).



Le couplage de la méthanation renforce également son intérêt par le couplage méthanisation-méthanation permettant ainsi la valorisation du CO₂ produit lors de la méthanisation en CH₄.

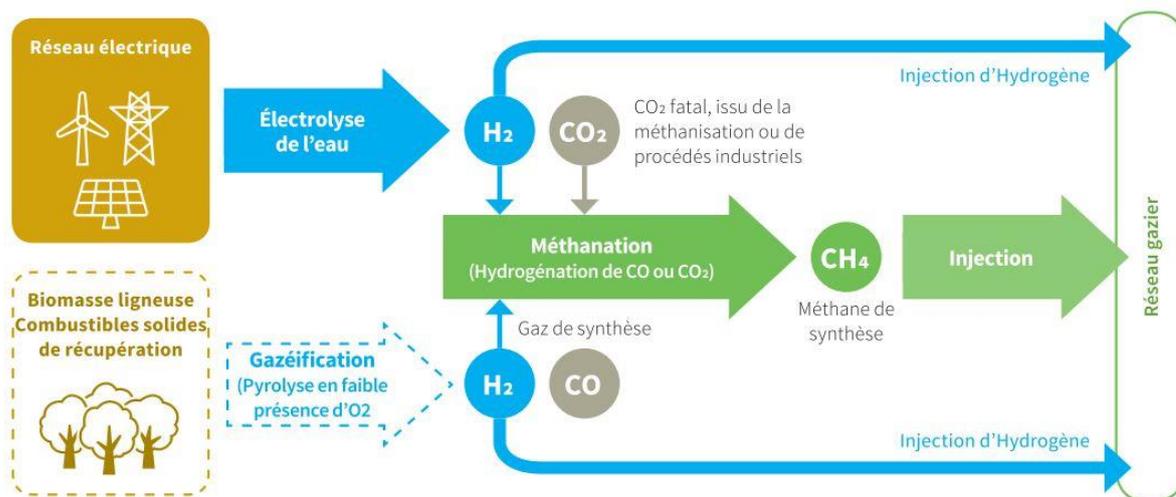


Figure 1-5 : Power to gas et couplage méthanisation-méthanation, au service des énergies renouvelables électriques, (GRDF 2017)

1.1.3.6 La valorisation du digestat

Le digestat est riche en azote minéral et en phosphate, il constitue donc un bon engrais naturel. Son retour à la terre permet de respecter la diversité biologique du sol. De plus, sa richesse en carbone organique stable permet un retour au sol du carbone de la biomasse digérée, ce qui permet un bon maintien de la qualité des sols agricoles. Cependant, les digestats à dominante agricole (méthanisation à la ferme) sont considérés comme produits depuis l'arrêté du 13 juin 2017 (Assemblée Nationale 2017). Ils peuvent se vendre à des tiers mais uniquement à des agriculteurs. Les autres digestats sont encore considérés comme des déchets. Ils doivent soit être traités, soit leur valorisation doit respecter des plans d'épandage. Il est courant que s'établisse un contrat fumier-digestat entre l'agriculteur et l'unité de méthanisation. L'épandage est sa valorisation la plus courante mais il peut également être composté (norme de compostage NFU 44-051) ou bien valorisé en produits à plus forte valeur ajoutée (pyrochar, par exemple) (Sawatdeenarunat et al. 2015), (Monlau et al. 2015). Il est également possible de séparer les phases liquide de solide par filtre-pressé, par exemple. Si ses propriétés n'étaient pas encore bien connues il y a une dizaine d'années, elles sont plus connues aujourd'hui (Tambone et al. 2010). Sa composition dépend des substrats digérés, de l'inoculum utilisé ainsi que des configurations et paramètres opératoires de la DA.

1.1.4 Configurations et voies de méthanisation

1.1.4.1 Procédés de méthanisation

Il existe différents procédés de méthanisation chacun comprenant différentes technologies (Moletta 2011). N'étant pas le cœur de cette étude, tous ne seront pas abordés en détails. Les procédés peuvent être tout d'abord distingués par leur alimentation continue ou discontinue.

Le mode continu, le plus courant à l'échelle industrielle, fonctionne à volume constant c'est-à-dire que la matière est continuellement introduite dans un réacteur et une partie du digestat est soustraite pour maintenir une quantité constante. En comparaison avec les systèmes discontinus, ce type de réacteur à l'avantage de : produire une quantité constante de biogaz, atteindre des charges volumiques appliquées plus élevées et favoriser l'automatisation. Parmi les nombreuses technologies existantes, peut être cité le CSTR (Continuous Stirred-Tank Reactor) ou réacteur à cuve agitée à flux continu.

Le deuxième, discontinu (appelé également batch) consiste à introduire la totalité des intrants en une seule fois dans un réacteur où va se dérouler la digestion anaérobie. Durant la méthanisation en batch de type voie sèche, la matière n'est pas agitée ce qui induit une séparation spontanée du liquide avec le solide. Les technologies existantes sont beaucoup moins nombreuses. Le procédé dit « garage » en France, sera explicité en détails dans la partie 1.1.4.4).

1.1.4.2 Procédés de digestion anaérobie : mono ou bi-étapes

Dans les systèmes à une étape, toutes ces réactions ont lieu simultanément dans un seul réacteur, tandis que dans les systèmes à deux étapes, les réactions ont lieu de façon séquentielle dans deux réacteurs distincts. Une première étape où l'hydrolyse, l'acidification et l'acétogénèse ont lieu et une deuxième étape où l'acétate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone sont transformés en méthane. Le pH du premier réacteur sera acide et neutre dans le deuxième (Vandevivere et al. 2003).

Un système à deux et plusieurs étapes offre plus de possibilités pour contrôler et étudier les étapes intermédiaires du processus de digestion. Par contre, un système à une étape pourra être privilégié car les conceptions plus simples souffrent moins souvent de défaillances techniques et ont des coûts d'investissement moins élevés.

1.1.4.3 Méthanisation voie humide ou voie sèche

Deux voies caractérisées par la teneur en matière sèche (MS) dans le méthaniseur : humide (MS<15%) ou sèche (MS>15%) sont distinguées et induisent des technologies différentes. A noter que pour des teneurs en MS supérieures à 50% une dilution avec de l'eau ou du lixiviat sera nécessaire (Vandevivere et al. 2003). Les avantages et inconvénients de chacune de ces deux voies sont synthétisés dans le tableau 1-2.

Tableau 1-2 : Comparaison des avantages et des inconvénients de la digestion anaérobie et en voie sèche et humide

	Avantages	Inconvénients	Références
Voie humide	Systèmes automatisés Phase de démarrage facilitée	Agitation (homogénéisation) Nombreux éléments techniques Coûts d'investissement important Coût de déshydratation du digestat Forte production de digestat liquide	(Ge et al. 2016) (Vandevivere et al. 2003)
Voie sèche	Discontinue	Taille réduite digesteur Agitation ponctuelle Récupération d'un digestat valorisable Plus grande production de méthane volumétrique	Temps de travail important Pour une production constante de méthane, il est préférable d'avoir plusieurs digesteurs en parallèle (Yang et al. 2015) (Motte et al. 2013)
	Continue	Production d'une quantité constante de biogaz Charge volumique atteinte élevée Réduction des temps de rétention Favorisation de l'automatisation	Coût de construction et énergétiques importants Système d'agitation robuste Circulation d'une matière sèche fibreuse (Hillion 2017)

La DA en voie sèche se développe pour sa technologie peu coûteuse et respectueuse de l'environnement. Le rendement en méthane et l'instabilité de ce procédé sont toujours deux défis majeurs pour l'exploiter commercialement (Ge et al. 2016). En France, un des procédés les plus utilisés en voie sèche discontinue est celui dit « en garage ».

1.1.4.4 Méthanisation garage plus ciblée dans cette thèse

Lors de la création du projet BFF, ce procédé se développait fortement en France en lien avec le développement de la méthanisation agricole. En effet, le fumier peut être un co-substrat intéressant et avec un fort gisement (point abordé dans la partie 1.1.5). Selon Shah et al. (2015), il y a des avantages à privilégier le mode batch quand l'alimentation présente des caractéristiques fibreuses avec une forte teneur en matière sèche. D'autres avantages sont également cités comme la réduction de demande en énergie par des activités dites parasites (agitation, pompage) et également la possibilité de lancer des batches à intervalles réguliers afin d'assurer une production continue de biogaz. Ce procédé est connu sous le nom de procédé Bekon en Allemagne (Figure 1-6).

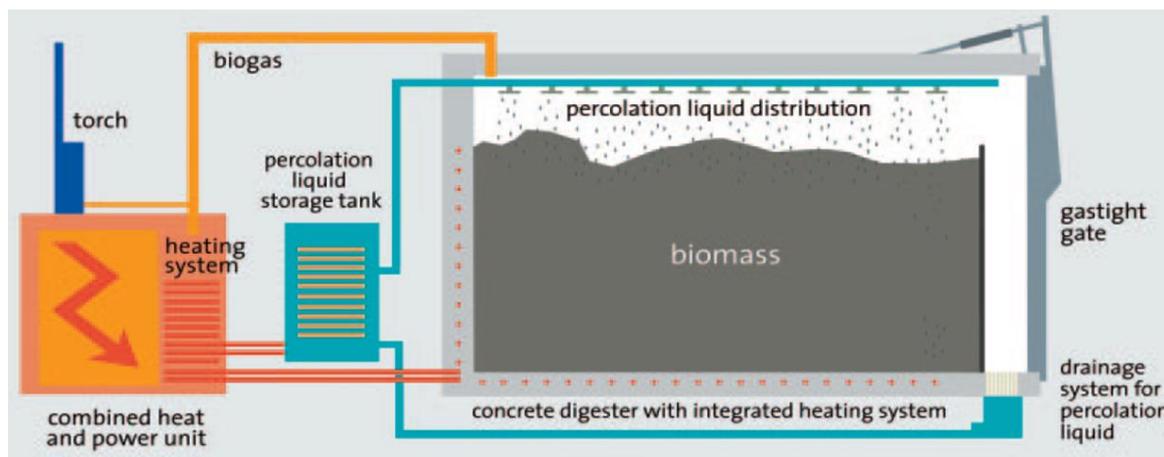


Figure 1-6 : Coupe d'un réacteur de digestion anaérobie, procédé Bekon (voie sèche discontinu)

En France, ce procédé est plus connu sous le nom digesteurs « garage » (<http://naskeo.com/offres-construction/voie-seche-discontinue/>). La matière est introduite sous forme de tas dans le garage. L'inoculation se fait par réincorporation de matière déjà digérée et par l'aspersion discontinue de percolât chauffé au travers du tas pendant toute la durée du cycle. Le massif est maintenu en régime mésophile grâce à un système de réseau de chauffage. Le percolât est ensuite récupéré via des caniveaux et stocké dans une cuve attenante aux digesteurs. A la fin du cycle de méthanisation (6 à 8 semaines), le digestat est déchargé. Le fonctionnement continu de la cogénérateur est assuré par le remplissage de plusieurs digesteurs à des intervalles de temps réguliers.

Cette technologie robuste est adaptée à des tonnages compris entre 5 000 et 30 000 tonnes/an et présente de nombreux avantages dont la non sensibilité aux indésirables tels que les pierres, les cailloux, ficelles, bois, une consommation de liquide réduite, une faible consommation énergétique, une facilité d'exploitation et de traçabilité par la conduite en lots ainsi qu'une utilisation du digestat brut solide, épandable en l'état sans traitement spécifique.

1.1.5 Substrats pour la méthanisation agricole

En France, l'exploitation agricole est beaucoup développée, ce qui représente un gisement potentiel conséquent de déchets, d'effluents et de résidus agricoles.

Parmi les substrats agricoles disponibles, le fumier représente jusqu'à 64 % des substrats utilisés en co-digestion en France (Figure 1-7) (Solagro-Irstea 2012). En 2010, la production de fumier bovin en France a été estimée à environ 69 MT (Degueurce et al. 2016). Riche en paille, sa teneur en MS est comprise entre 20 et 30%, il est donc adapté à la co-digestion voie sèche (Mata-Alvarez et al. 2000). De plus, le fumier et le lisier sont une des formes de déchets les plus couramment utilisés dans l'industrie européenne de la production de biogaz (Achinas et al. 2017).

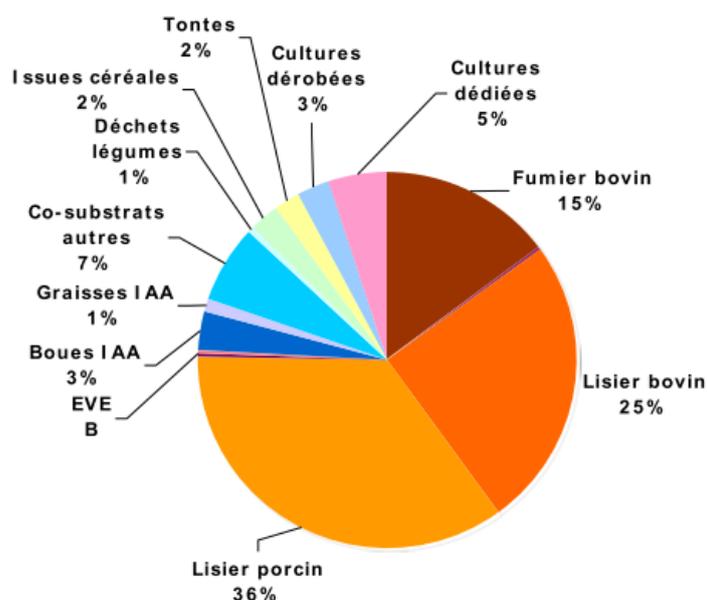


Figure 1-7: Répartition des tonnages entrant en méthanisation à la ferme, (Solagro-Irstea 2012)

Les propriétés de six types de litière usagée collectée dans des étables à litière profonde, abritant soit des moutons, soit des chèvres, soit des chevaux ou des vaches ont été étudiées par Riggio et al. (2016). La teneur en MS semblait varier considérablement d'un type de litière à l'autre, ce qui a eu des répercussions sur le méthane produit à partir du substrat brut. Cependant, tous les types de litière usagée présentaient des ratios MV/MS similaires (82,3-88,9 %), un C/N bien adapté à la digestion anaérobie (20-28, excepté celui du cheval, 42) et leurs BMP étaient compris entre 192 et 239 NmL_{CH₄}.g_{VS}⁻¹. Des essais en réacteurs batch en voie sèche avec recirculation du lixiviat ont montré que ces fumiers sont bien adaptés à ce type de procédé (récupération de 89 ± 11% de leur BMP après 60 jours d'exploitation) et donc qu'il est prometteur pour la valorisation énergétique des déchets agricoles secs.

Cependant, même si le fumier de ruminants, en particulier de bovins, est très utile pour le démarrage de la DA car il contient déjà les microorganismes méthanogènes nécessaires, sa fermentation seul (mono-digestion) conduit à une plus faible production de méthane en raison d'une biodégradabilité anaérobie modérée d'environ 45-50 % (Tufaner & Avsar 2016). En effet, les gisements agricoles, majoritairement lignocellulosiques, peuvent être un frein à leur valorisations. D'après André et al. (2017), il faut optimiser des procédés, et principalement la voie sèche pour obtenir une meilleure productivité et rentabilité d'un tel système fonctionnant à haute teneur en TS (> 15%), favorisant des procédés industriels fiables. En raison de sa forte teneur en eau (70-90 %) et de son pouvoir tampon, l'utilisation du fumier a un effet positif sur la stabilité des procédés de méthanisation. Son utilisation est donc souhaitée en co-digestion. La co-digestion anaérobie peut être considérée comme la co-digestion simultanée de deux ou plusieurs substrats en mélange (Siddique & Wahid 2018). Cela permet, par exemple, une intégration synergique de la biomasse à faible rapport C/N avec la biomasse lignocellulosique ayant un rapport C/N élevé (Paul & Dutta 2018). Par exemple, Botji et al. (2017) ont démontré que la co-digestion du fumier de volaille avec du maïs ensilé a amélioré la

production de méthane de 24% par rapport à la mono-digestion. L'effet du co-substrat est toutefois variable en fonction de ses caractéristiques et de sa proportion utilisée comme l'ont montré Cuetos et al. (2011) en comparant la codigestion de fumier porcin avec différents résidus de culture (maïs, tournesol ou colza). Le ou les co-substrats doivent également être choisis en fonction de leur disponibilité, de leur coût et de leur pouvoir méthanogène. En effet, le potentiel méthanogène varie largement en fonction de la nature du substrat (Tableau 1-3). Toutefois, en ce qui concerne les substrats agricoles et végétaux, une partie du potentiel méthane dépend de la période de récolte, de l'espèce et du génotype, du ou des fractions de la plante utilisée (Wahid et al. 2015; Thomas et al. 2017). Ceci explique la gamme de valeurs pour le BMP présentées dans le Tableau 1-3.

Tableau 1-3 : Potentiel méthanogène des substrats les plus utilisés en DA

Substrats	BMP (NmL _{CH₄} ·gVS ⁻¹)	Références
Maïs	268 - 365	(Amon, Amon, Kryvoruchko, Zollitsch, et al. 2007)
Paille de blé	150 - 300	(Motte 2013)
Paille de canne à sucre	267	(Janke et al. 2017)
Sorgho	270 - 335	(Sambusiti et al. 2013b)
Miscanthus	170 - 320	(Wahid et al. 2015)(Zhou et al. 2017)(Fu et al. 2018)
Fumier bovin	114 - 204	(Riggio et al. 2016)

Les conditions opératoires jouent, également, un rôle clé (Tufaner & Avsar 2016). Le fumier, en France est le plus souvent co-digéré avec des biomasses lignocellulosiques. Néanmoins, l'utilisation de cultures destinées à l'alimentation humaine ou animale (par exemple, les céréales) ou de cultures énergétiques comme matières premières pour la DA est limitée à moins de 15% de l'alimentation totale par la législation nationale française (Assemblée Nationale 2016). Des exceptions concernent toutefois les cultures dérobées ou CIVE (Cultures Intermédiaires à Vocation Énergétique) et la biomasse cultivée sur des terres marginales qui ne sont pas en conflit avec la production alimentaire humaine et animale. La différence entre les cultures énergétiques et les CIVE réside le fait que ces dernières ne sont pas des cultures principales. Insérées dans des rotations de culture, elles assurent une couverture longue du sol et diminuent les risques d'érosion des sols.

1.2 La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique constitue le substrat pour la production des biocarburants de seconde génération. Elle est reconnue comme un substrat majeur de la bioraffinerie (Ghatak 2011). Elle inclut les déchets de l'agriculture et des forêts, les bagasses, les molasses, la fraction déchets municipaux et ceux de l'industrie du papier ainsi que les cultures énergétiques (Wertz & Bédué 2013).

1.2.1 Notions de biologie végétale

La plante peut être observée et étudiée à différentes échelles (Figure 1-8) : la plante, le tissu, la cellule végétale et la matrice lignocellulosique.

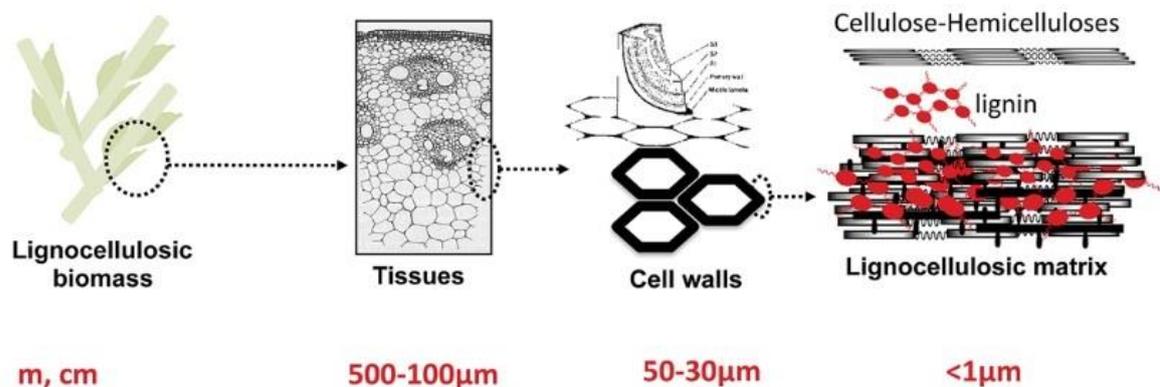


Figure 1-8 : Les différentes échelles du végétal, (Barakat, Mayer, et al. 2014)

Les cellules végétales se démarquent des cellules animales par leurs chloroplastes (siège de la photosynthèse) et leur paroi végétale. Cette paroi est composée de 3 principaux constituants : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (ces deux premières peuvent être regroupées par le terme holocelluloses) (Scheller et al. 2011). Ces trois constituants seront abordés dans la partie suivante (1.2.2). Leur présence relative dans les différents tissus détermine leur fonction. En effet, un tissu végétal regroupe des cellules végétales ayant une origine embryologique commune et qui se sont différenciées de la même façon dans le but de remplir une fonction déterminée (Tableau 1-4). Les cellules sont regroupées entre elles grâce à la lamelle moyenne. Cette dernière est, en effet commune à deux cellules contiguës et est constituée de matières pectiques.

Tableau 1-4 : Les différents tissus d'une tige de Monocotylédones et leur fonction et compositions associées

Tissu	Fonction	Composition
Épiderme	Protection	Lignine, cutine, cires
Xylème	Conduction de la sève brute (eau, sels minéraux)	Lignine
Phloème	Conduction de la sève élaborée (eau, sucres)	Holocelluloses
Parenchyme	Tissu de remplissage	Holocelluloses
Sclérenchyme	Soutien	Lignine

1.2.1.1 L'épiderme

L'épiderme est situé sur le porteur de la tige (Figure 1-9). Dans une section transversale de paille, les cellules de l'épiderme sont les cellules les plus superficielles, recouvertes d'une très fine couche de cire (Han et al. 2010). Il a un rôle de protection et d'échange des gaz de la plante avec l'extérieur via les stomates caractérisés par des cellules en forme de puzzle. Le rôle de protection est renforcé par le sclérenchyme.

1.2.1.2 Le sclérenchyme

En plus, d'être un tissu de soutien, le sclérenchyme entoure les faisceaux conducteurs afin de consolider et protéger leur structure (Figure 1-9). Comme l'ont rapporté Jung & Casler (2006), le dépôt de lignine dans la paroi cellulaire de l'entre-nœud se produit plus tôt et plus rapidement dans le sclérenchyme et le parenchyme externe que dans la zone interne de l'entre-nœud.

1.2.1.3 Les faisceaux conducteurs

Les faisceaux conducteurs sont constitués de vaisseaux de xylème et phloème (Figure 1-9). Le xylème conduit la sève brute, constituée d'eau et de sels minéraux, des racines vers le reste de la plante. Le phloème conduit la sève élaborée constituée d'eau et d'eau sucrée synthétisées par les organes photosynthétiques de la plante. Elle est conduite vers les organes de réserve (Tableau 1-4). Le nombre de faisceaux conducteurs, leur densité et leur localisation dans les tiges dépendent de l'espèce de la plante.

En raison de l'hétérogénéité de l'organisation tissulaire : les tissus vasculaires qui soutiennent la plante et conduisent les nutriments sont plus riches en lignine et moins facilement dégradables que les cellules parenchymatiques dont les parois ne sont pas très épaisses et digestes (de Oliveira et al. 2015).

1.2.1.4 Le parenchyme : tissu de remplissage

Le parenchyme sous-épidermique est à paroi épaisse, avec une concentration de faisceaux vasculaires lignifiés. La moelle est constituée de cellules parenchymatiques à paroi mince dans lesquelles sont noyées des faisceaux vasculaires lignifiés (Akin et al. 2006).

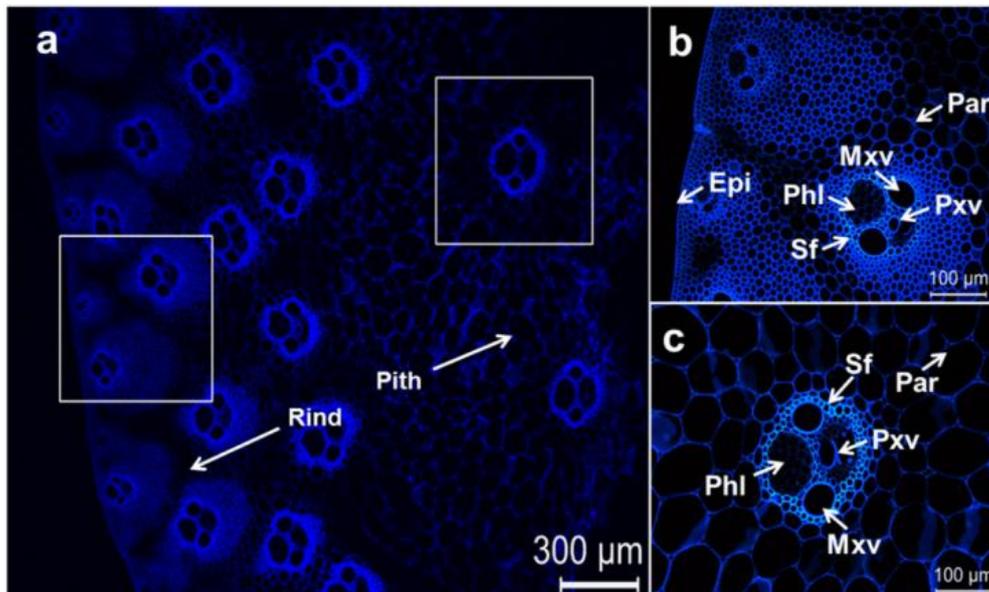


Figure 1-9: structure anatomique du *M. x giganteus* en fluorescence. Les légendes sont en anglais : Sf, sclerenchyma fibers; Par, parenchyma; Pxxv, protoxylem vessel; Mxv, metaxylem vessel; Epi, epidermis; Phl, phloem, de Ji et al. (2016)

1.2.1.5 Tissus primaires et secondaires

Au début de la croissance végétale, une paroi cellulaire primaire est synthétisée sans empêcher l'allongement de la plante ; la structure est relativement élastique en raison de la forte teneur en cellulose amorphe, des hémicelluloses et de l'absence de lignification (de Oliveira et al. 2015). Lorsque la croissance en largeur commence, l'élasticité diminue et la synthèse de la paroi cellulaire secondaire commence avec la lignification et un taux élevé de cellulose cristalline. La concentration de lignine est de plus en plus élevée avec le vieillissement cellulaire.

1.2.1.5 La DA à l'échelle cellulaire

La dégradation anaérobie des cellules végétales se produit du centre vers les tissus externes (Akin et al. 1974). Au centre, la vacuole est facilement accessible (comme un pore) et les tissus extérieurs sont plus lignifiés (sclérenchyme et xylème). Les tissus externes sont donc plus difficiles à dégrader en digestion anaérobie que le parenchyme (Motte et al. 2015). Lors de la digestion anaérobie à haute teneur en solides, Motte et al. (2013) ont montré que les tissus conservent leur structure puisque les lamelles moyennes, l'épiderme silicié et les intersections cellulaires sont récalcitrants et que les cuticules (lipophiles) sont difficiles à dégrader en anaérobiose. Les bactéries du rumen divisent la cuticule en attaquant de préférence la cellule juste sous la cuticule (Akin et al. 1974).

1.2.2 Les principaux constituants de la biomasse lignocellulosique

1.2.2.1 La cellulose

C'est un polymère constitué d'unités de D-glucose liées en liaisons β -1,4 et orientées à 180° l'une par rapport à l'autre (Klemm et al. 2005). Sa longueur de chaîne est définie par le degré de polymérisation correspondant ainsi au nombre d'unités monomériques enchainées pour former une chaîne polymérique. Pour les macromolécules de cellulose insoluble ce degré est compris entre 100 et 20000 (Karimi & Taherzadeh 2016b). Une partie de ces chaînes sont empaquetées latéralement en microfibrilles consolidées par des liaisons hydrogène inter et intramoléculaires et des liaisons de Van der Waals formant une structure microcristalline (Mcfarlane & Anett 2014). Cette structure ainsi formée est insoluble, résistante mécaniquement et insensible à l'hydrolyse biologique exceptée par les cellulases de certaines bactéries et champignons (Pelmont 2008). Les microfibrilles se composent de trois groupes de chaînes de glucose : les chaînes de vrais cristaux (chaînes centrales), les chaînes sous-cristallines (chaînes de transition) et les chaînes " sous-cristallines ou non cristallines " (chaînes de surface) (Figure 1-10). Les chaînes cristallines sont la partie la plus résistante de la cellulose pour l'hydrolyse chimique et biologique.

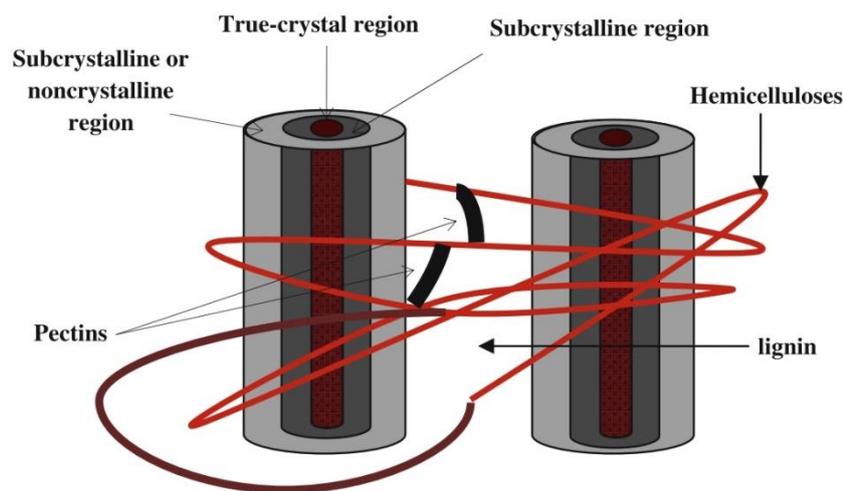


Figure 1-10 : Les différentes parties cristallines d'une microfibrille de cellulose, de Karimi et al. (2013)

La cellulose est le principal polymère porteur de la paroi cellulaire, la longueur, l'angle et la cristallinité des microfibrilles de cellulose sont des déterminants importants des caractéristiques physiques de la paroi cellulaire. Les régions amorphes de la cellulose se caractérisent, contrairement aux régions cristallines, par un assemblage non aligné, non ordonné et aléatoire des chaînes polymériques. Elles sont d'une grande importance en ce qui concerne les potentialités de dégradation de la cellulose, car elles sont beaucoup plus accessibles pour les enzymes cellulolytiques (Kumar et al. 2008).

Atalia & Vanderhart (1984) suggèrent que la cellulose native est un composite de deux unités cristallines différentes : la cellulose I_α (avec une structure triclinique à une chaîne) et la

cellulose I_β (une structure monoclinique à deux chaînes). La cellulose I_α est dominante dans le coton, tandis que la cellulose I_β est dominante dans les lignocelluloses (Karimi et al. 2013). La cellulose I (ou cellulose native) est la forme naturelle et métastable de la cellulose (Chundawat et al. 2011). Elle se caractérise par un arrangement parallèle des chaînes glucidiques. La cellulose II (arrangement des chaînes antiparallèle) est très peu synthétisée de manière naturelle et peut être obtenue par des traitements chimiques de la cellulose I, tels que la mercerisation (traitement à la soude) ou la régénération (avec des liquides ioniques, par exemple). L'arrangement des chaînes est alors antiparallèle. La transformation de cellulose I en cellulose II est une réaction irréversible, nécessitant une étape de dissolution de la cellulose, un lavage et une recristallisation, il induit une stabilité importante de la cellulose de type II. Dans le cadre des prétraitements chimiques de la lignocellulose ayant pour but de faciliter son hydrolyse, il convient donc de veiller à ne pas se rapprocher des conditions de mercerisation de la cellulose (Lazuka 2018).

1.2.2.2 Les hémicelluloses

Ce sont des polysaccharides complexes à haute masse moléculaire, associés aux pectines et celluloses, présents dans les parois primaires et abondants dans les parois secondaires des parties lignifiées de la plante. Les hémicelluloses représentent entre 20% et 35% de la masse lignocellulosique. Elles sont composées de hétéromannanes, xyloglucanes, hétéroxylanes et glucanes à liaisons mixtes (Pauly et al. 2013) (Figure 1-12). Des unités uroniques sont également présentes. Les xylanes (polymères de xylose) sont les polysaccharides les plus abondants des hémicelluloses (Pelmont 2008). Le mannose est le monomère dominant dans les hémicelluloses de résineux car il est hautement acétylé et contient des groupes latéraux galactose, alors que le xylose est dominant dans les feuillus et les résidus agricoles qui sont moins acétylés et contiennent des groupes latéraux arabinose (Karimi et al. 2013). La structure du xylane dépend du degré de substitution des chaînes linéaires xylose par les acides arabinose, hydroxycinnamiques et uroniques et de la masse molaire. Le type et la distribution de la substitution déterminent le degré de solubilité ainsi que la capacité à se lier aux composants de la paroi cellulaire végétale (Monlau et al. 2013).

Le xyloglucane est une hémicellulose abondante dans les parois cellulaires primaires qui réticulent les microfibrilles, formant soit un lien direct entre les microfibrilles soit un lien indirect (Cosgrove 2005).

Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses ont des degrés de polymérisation plus faibles (typiquement 50-300), ont souvent des groupes de chaînes latérales et sont essentiellement amorphes (Pu et al. 2008).

Les hémicelluloses sont enchâssées dans les parois cellulaires des plantes. Elles se lient à la cellulose avec la pectine pour former un réseau de fibres constitué d'hémicelluloses et de lignine qui sont liées de manière covalente par des complexes lignine-carbohydrates (LCC)(Monlau et al. 2013) (cf partie 1.2.2.6).

1.2.2.3 La lignine

La lignine représente près du quart de la masse carbonée de la biosphère. Les lignines sont des polymères aromatiques. Ce sont des polymères naturels multifonctionnels constitués par couplage oxydatif de trois unités principales C6-C3 (phénylpropanoïdes) formant une structure aléatoire dans un réseau tridimensionnel par certaines liaisons inter-unités, telles que les liaisons β -O-4, β -5 et β - β (He et al. 2008). La liaison β -O-4 est la liaison la plus fréquente. C'est une liaison dite « non condensée », une liaison éther faible qui est donc la cible des processus de dépolymérisation des lignines (Méchin 2000).

Les principaux éléments constitutifs de la lignine sont les alcools hydroxycinnamyles (ou monolignols), l'alcool coniférole et l'alcool sinapyle, avec des quantités généralement mineures d'alcool p-coumaryle. Les unités résultant des monolignols, lorsqu'ils sont incorporés dans le polymère de lignine, sont appelées unités guaiacyle (G), syringyle (S) et p-hydroxyphényle (H) (Vanholme et al. 2010) (Figure 1-11). Les proportions de lignines G, S et H dans les lignines sont de 35, 61 et 4% pour les tiges de maïs 49, 46 et 5% pour la paille de blé (Grabber et al. 2004).

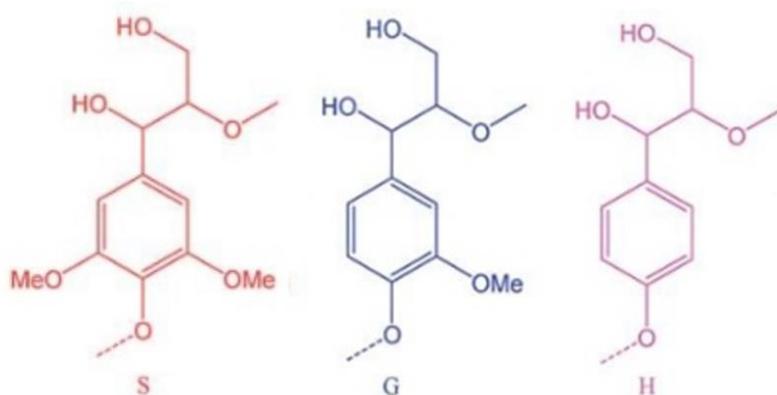


Figure 1-11 : Composition typique des unités de la lignine, adapté de Min et al. (2014)

La lignine renforce les parois cellulaires des plantes supérieures terrestres et se rencontre surtout dans les tissus vasculaires où son hydrophobicité est responsable de l'étanchéité et apporte à la fois une plus grande résistance et une rigidité accrue (Pelmont 2008). Elle joue un rôle majeur dans l'accès aux holocelluloses (Kikas et al. 2016). Non soluble, donc récalcitrante à la biodégradation anaérobie, la lignine ne contribue donc pas à la production de méthane mais doit être dégradée pour que les enzymes puissent dégrader la cellulose et les hémicelluloses. De plus, elle ne se dépose pas simplement dans les polysaccharides de la paroi cellulaire, mais elle est associée aux holocelluloses par certaines liaisons chimiques, comme les liaisons R-éther, les liaisons phénylglycosidiques, les liaisons acétal et les liaisons ester. La lignine est ainsi liée à d'autres composants de la paroi cellulaire par des liaisons ester et éther, dont les ponts d'acide férulique pour former un réseau de glucides phénoliques par des liaisons esters dans des parois secondaires (Zhang et al. 2011).

Les liaisons forment des complexes lignine-carbohydrates (LCC, détaillés dans la partie 1.2.2.6) qui sont des obstacles à une bioconversion efficace de la paille en biogaz (He et al. 2008).

La diversité dans laquelle la lignine est impliquée renforce encore sa structure et sa robustesse de résistance. La différence de teneur en lignine entre les différentes couches de paroi est le résultat des voies uniques de synthèse de la lignine au cours du développement des plantes. En effet, la lignification constitue la dernière étape de la division cellulaire, de l'expansion et de l'allongement avant la mort cellulaire (Figure 1-12). Les monomères de lignine sont biosynthétisés à l'intérieur de la membrane cellulaire puis transloqués vers la paroi cellulaire par des mécanismes qui ne sont pas encore entièrement compris (Zeng et al. 2014).

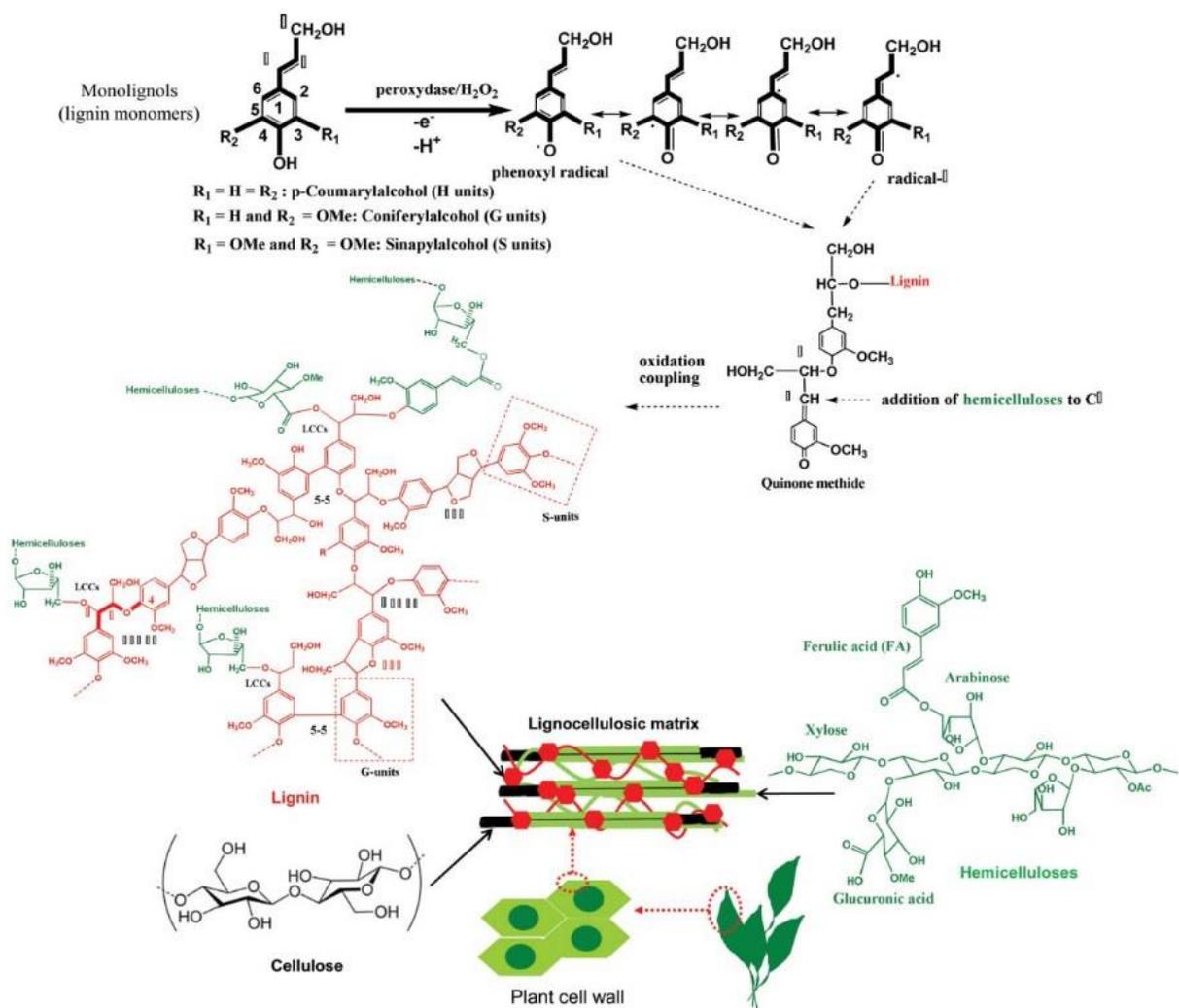


Figure 1-12 : schéma simplifié de la lignification, de l'organisation supramoléculaire et de la composition de la paroi végétale (Monlau et al. 2013)

Grâce à l'utilisation de deux composites différents de lignine (soit G, soit GS), Barakat, Gaillard, et al. (2014) ont prouvé qu'une lignine de type GS est différente d'une lignine de type G. Les ensembles Cellulose-Xylane -LGS et Cellulose-Xylane -LG peuvent donc être utilisés comme modèles pour les plantes herbacées et ligneuses. La seule différence entre les monomères de lignine G et S est la substitution par un groupe méthoxyle en position ortho dans la lignine-S. Le groupe méthoxyle permet de bloquer les sites intermonomériques de couplage et de modifier la distribution électronique. Cette capacité de réaction favorise la formation de liaisons β -O-4 qui limitent la ramification des chaînes et augmentent le poids moléculaire et la densification des polymères formés dans le cas de la lignine-S et donc une plus solide interaction avec les polysaccharides limitant ainsi la bioaccessibilité de la matière.

Dans les bioraffineries, les lignines sont valorisées de différentes façons : vanilline, acide férulique, lignanes optiquement actifs et monolignols (Buranov & Mazza 2008).

1.2.2.4 Les extractibles

Au sein des extractibles, les cendres composées de plusieurs composés inorganiques tels que Ca, K, Si peuvent atteindre des teneurs de l'ordre de 20% des matières sèches (Mussato 2016). Dans ses composés, on y retrouve également les sucres solubles, des enzymes et des protéines (expansines, endoglucanases) (Wertz & Bédoué 2013). Les pectines, polysaccharides les plus complexes et hétérogènes de la paroi cellulaire, existent principalement dans la paroi cellulaire primaire et jouent un rôle dans l'expansion, la résistance, la porosité, l'adhésion et la signalisation intercellulaire (Houston et al. 2016).

Le tout (cellulose, hémicelluloses, lignine et extractibles) forme une structure complexe, évolutive : la paroi végétale primaire (Figure 1-13).

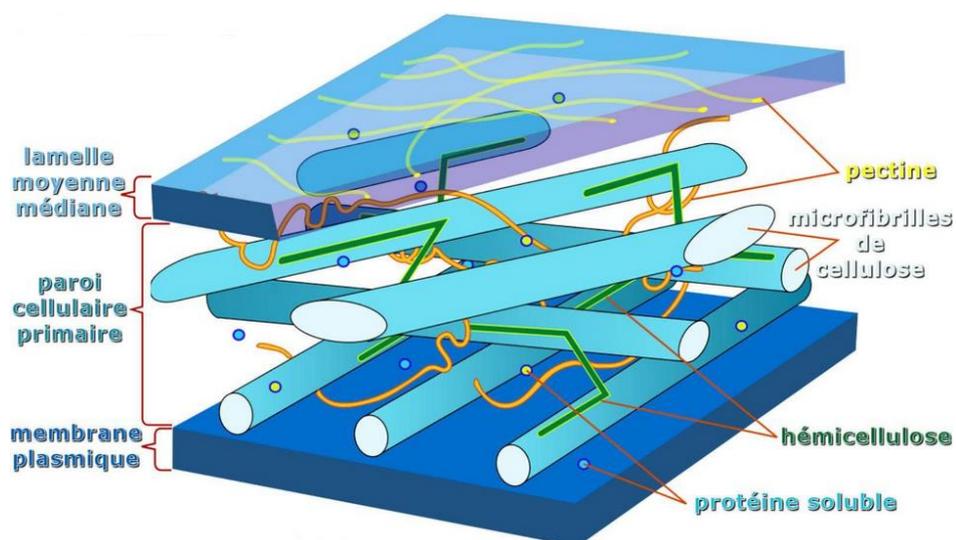


Figure 1-13: Organisation de la paroi végétale primaire, adapté de Wertz & Bédoué (2013)

1.2.2.5 Evaluation du potentiel méthane des différents composés de la biomasse lignocellulosique

Selon Li et al. (2018), le BMP de la cellulose est plus élevé que celui des hémicelluloses (cellulose microcristalline : $251 \pm 9 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$), α -cellulose : $242 \pm 8 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$, xylan : $203 \pm 3 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$, glucomannane : $179 \pm 6 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ et arabinogalactane : $224 \pm 5 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$). Cependant, les hémicelluloses étaient hydrolysées plus rapidement que la cellulose et la lignine était très difficile à digérer. Les auteurs ont justifié le plus faible BMP des hémicelluloses par des concentrations plus élevées d'acides acétique, n-butyrique et n-valérique hydrolysés à partir de ces dernières, ayant entraîné une baisse de pH et donc une inhibition plus sévère de la production de méthane que celle de la cellulose. La méthanogénèse s'est progressivement rétablie après ajustement du pH. De plus, par rapport aux mono-digestions, l'ajout d'hémicelluloses à de la cellulose a augmenté le rendement en méthane et la biodégradabilité. L'ajout de lignine à la cellulose a entraîné une diminution plus importante du rendement en méthane de la cellulose que celui aux hémicelluloses Buffière et al. (2006) ont montré un lien entre le potentiel méthane de divers résidus lignocellulosiques et la somme de leur teneur en cellulose et en lignine : plus la somme de la cellulose et de la lignine est élevée, plus le BMP est faible (Buffière et al. 2006). Le rôle de barrière de la lignine est bien connu. (Berlin et al. 2006) ont observé que les complexes cellulases sont plus fortement inhibés que les xylanases par de la lignine purifiée. Les hémicelluloses absorberaient les monolignols de la lignine via des interactions hydrophobes (Dauwe et al. 2007). Cette sorption pourrait bloquer l'accès des enzymes aux hémicelluloses. Cependant, l'adsorption des hémicelluloses sur la cellulose forme des complexes avec un taux d'hydrolyse élevé mais inférieur à celui des hémicelluloses seules (Eronen et al. 2011). Les hémicelluloses sont plus dégradables que la cellulose en conditions anaérobies (Monlau, Sambusiti, et al. 2012).

1.2.2.6 Récalcitrance de la biomasse lignocellulosique

Comme reporté par Mosier et al. (2005), la complexité d'un type de biomasse donné est reflétée par la relation entre ses composants structuraux et glucidiques. Les facteurs qui contribuent à sa récalcitrance sont : la lignine, la cristallinité et le degré de polymérisation de la cellulose, la surface accessible (ou porosité), le gainage de la cellulose par les hémicelluloses et la résistance des fibres. En effet, au cours de la biosynthèse végétale, la lignine n'est pas simplement déposée entre la cellulose et les hémicelluloses, elle est liée à au moins une partie d'entre elles. Ces liaisons sont appelées complexe lignine-polysaccharide (LPC) ou lignine-carbohydrates complexe (LCC) en anglais (Karimi et al. 2013) formant ainsi une structure complexe et compacte (Figure 1-14).

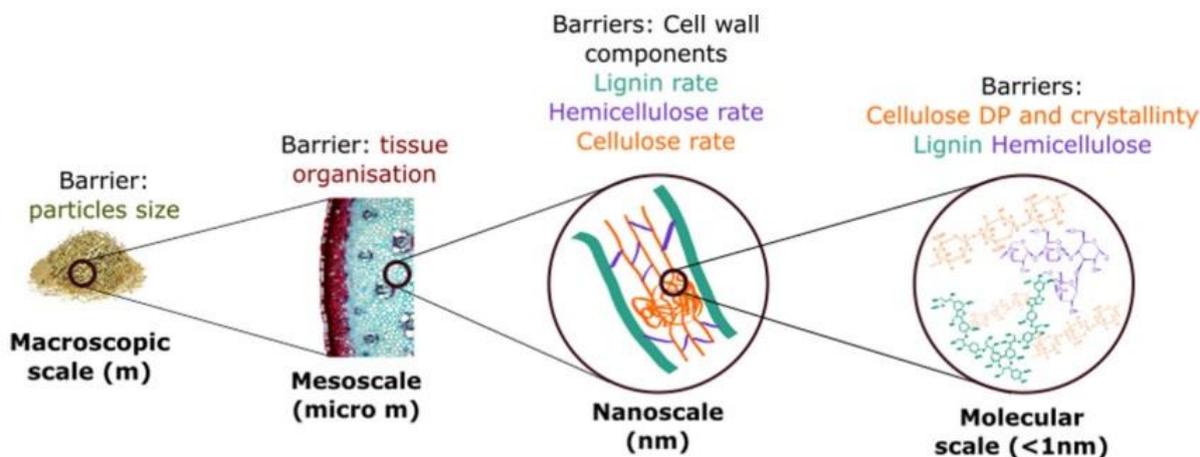


Figure 1-14 : Facteurs affectant la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique à différentes échelles, d'après Bichot et al. (2018)

1.2.2.6.1 Focus sur le LCC

Le LCC représente la liaison entre la lignine et les sucres (en particulier aux hémicelluloses) par des liaisons covalentes sur deux sites : α -carbone et C-4 du cycle benzène. Le LCC fait bouclier devant la cellulose à l'hydrolyse enzymatique. Dans les graminées, les liaisons ester alcali-labiles impliquant l'arabinose prédominent sur les liaisons stables aux alcalis comme les liaisons phénylglycosidiques et benzyléther. En raison de cette différence, la moitié des composés phénoliques totaux des plantes herbacées sont éliminés avec de l'hydroxyde de sodium à température ambiante. En plus, dans les plantes herbacées, les acides hydroxycinnamiques (acides p-coumarique et férulique) sont fixés à la lignine et aux hémicelluloses par des liaisons ester et éther comme ponts entre elles formant des complexes lignine/phénoliques-sucres (Figure 1-15) (Buranov & Mazza 2008).

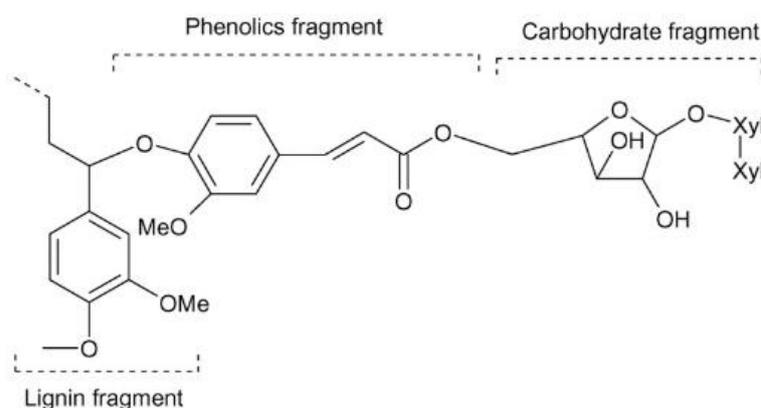


Figure 1-15 : liaison lignine-carbohydates dans la paille via une liaison ester, adapté de Sun et al. (1997)

Différents types et proportions de lignine et de polysaccharides présents dans la biomasse conduisent à la formation de LCC avec une grande variété de compositions et de structures. La nature et la quantité des liaisons LCC et des sous-structures de lignine affectent l'efficacité du pulping (ou procédé kraft permettant la conversion du bois en pâte à papier

grâce à un traitement à l'eau, la soude et au sulfure de sodium), de l'hydrolyse et de la digestion de la biomasse (Tarasov et al. 2018).

Ces liaisons ont été étudiées très tôt, initialement pour augmenter la digestibilité des fourrages de l'alimentation animale par les bactéries du rumen (Morrison et al. 1998).

Les acides hydroxycinnamiques ne sont pas seulement des intermédiaires de la chaîne de biosynthèse des lignines, mais aussi des constituants pariétaux à part entière. On différencie trois acides hydroxycinnamiques : les acides para-coumarique, férulique et sinapique (ce dernier étant quasi absent chez les poacées) (Méchin 2000). Ces acides phénoliques sont bifonctionnels, ils sont capables de former des liaisons ester ou éther par réaction de leurs groupes carboxyle ou phénolique, respectivement. L'acide para-coumarique est principalement lié aux lignines et généralement par une liaison ester. L'acide férulique, quant à lui, est principalement lié aux lignines par une liaison éther. De plus, l'acide férulique peut donc être à la fois estérifié aux hémicelluloses et éthérifié aux lignines (Scalbert et al. 1985). L'acide férulique est le principal acide hydroxycinnamique à se lier aux hémicelluloses et ceci par des liaisons esters. Ces liaisons semblent se mettre en place principalement au niveau des chaînes arabinoses des arabinoxylanes (Mueller-Harvey et al. 1986).

De plus, une étude récente a montré qu'il y avait très peu de liaisons entre la lignine et la cellulose (Kang et al. 2019). Elle suggère que la lignine et la cellulose sont espacées et reliées par des xylanes (et non pas que la cellulose soit directement enrobée de lignine). La lignine est principalement liée aux xylanes. Ces auteurs ont également souligné le rôle des pectines. Elles sont liées de façon covalente à la lignine via des liaisons ester ou éther et pontent la lignine aux hémicelluloses.

1.2.2.6.2 Cristallinité de la cellulose

Dans cette même étude, les analyses SPIR ont également montré que la présence de lignine permettait de décroître la cristallinité de la cellulose, ce qui a augmenté la production de biométhane de 32%. Ces résultats démontrent que la cristallinité de la cellulose est l'un des paramètres les plus importants de la digestion anaérobie des nanocomposites celluloses-xylan-lignine. De plus, Rollin et al. (2011) ont rapporté que pour libérer efficacement les sucres de la lignocellulose récalcitrante, l'augmentation de l'accessibilité de la cellulose était une considération plus importante que la délignification.

1.2.2.7 Facteurs influençant la composition de la biomasse lignocellulosique

La cellulose est le composé de la paroi végétale le plus abondant, représentant 30 à 70 % de la biomasse lignocellulosique, tandis que les hémicelluloses et la lignine représentent 25 à 35 % et 10 à 25 % de la biomasse, respectivement (Kumar et al. 2008). Leurs quantités relatives, et donc la composition de la biomasse, dépendent essentiellement de la nature du substrat (feuillus, résineux et herbacées) (Harmsen et al. 2010).

De plus pour une biomasse donnée, différents facteurs peuvent intervenir dans la composition des parois végétales et les liaisons. En effet (Lygin et al. 2011) ont montré que le nombre de liaisons ester diffèrent entre différents génotypes de miscanthus. (Godin et al. 2013) ont montré que la composition biochimique dépendait du moment de la récolte. Le plus

souvent, plus celle-ci est retardée, plus la digestibilité enzymatique décroît de par l'augmentation des teneurs en cellulose et en lignine. Motte et al. (2014) ont étudié les différentes fractions morphologiques de la paille de blé (nœuds, feuilles, entre-nœuds, rachis et balle). Leurs variations des teneurs en carbone et en azote sont statistiquement significatives, ceci impactant fortement le ratio C/N. Les entre-nœuds de la paille de blé sont le constituant massique majeur avec des teneurs en lignine et cellulose élevées. Les hémicelluloses et solubles sont plus dans le rachis. Les nœuds, par leur teneur élevée en lignine, ont le plus faible potentiel méthane ($140 \text{ NmL.g}_{\text{VS}}^{-1}$) ainsi que pour les entrenœuds ($148 \text{ NmL.g}_{\text{VS}}^{-1}$). Ces auteurs suggèrent que pour étudier les relations entre la composition biochimique d'une biomasse et de son potentiel méthane, d'autres pistes doivent être explorées comme leurs propriétés structurales à l'échelle du tissu.

Les conditions de culture ont également un impact. Par exemple, l'irrigation favorise la production de la biomasse et donc induit une plus forte lignification des tiges qui seront plus grandes que pour des plants non irrigués et donc qui seront moins lignifiées car le soutien devra être moins important (Carmi et al. 2006). De même, quand le substrat utilisé est une culture énergétique, intermédiaire ou principale, le but est de produire un maximum de méthane par unité de surface (maximum de rendement en biomasse, maximum de rendement en biogaz et concentration en méthane la plus élevée). Cela dépend de la culture, de son génotype de la période de récolte et de la composition en nutriments (Amon, Amon, Kryvoruchko, Machmüller, et al. 2007).

Le Tableau 1-5 indique la composition biochimique de différents types de biomasses lignocellulosiques contrastées.

Tableau 1-5 : Composition biochimique de différents types de biomasses lignocellulosiques, d'après Harmsen et al. (2010) et Mussato (2016)

Biomasse lignocellulosique	Cellulose (%MS)	Hémicelluloses (%MS)	Lignine (%MS)
Sycomore américain	37.2 - 41.8	17.6 - 19.6	25.0 - 27.3
Pin	42.0 - 50.0	24.0 - 27.0	20.0
Bagasse de canne à sucre	31.9 - 43.4	12.2 - 25.5	23.1 - 27.6
Paille de riz	29.2 - 34.7	23.0 - 25.9	17.0 - 19.0
Tige de maïs	30.6 - 38.1	19.1 - 25.3	16.7 - 21.3
Paille d'avoine	31.0 - 35.0	20.0 - 26.0	10.0 - 15.0
Graminées	25.0 - 40.0	35.0 - 50.0	10.0 - 30.0
Déchets papeterie	60.0 - 70.0	10.0 - 20.0	5.0 - 10.0
Fumier bovin	1.6 - 4.7	1.4 - 3.3	2.7 - 5.7

1.2.3 Les deux substrats étudiés

La canne à sucre, la betterave, le maïs et le blé ont été les premières biomasses utilisées en bioraffinerie (dites de première génération). Cependant, ces dernières sont en compétition avec les besoins alimentaires humains et animaux. D'autres biomasses, dites de deuxième génération, ont été étudiées dont notamment des cultures dédiées. Mais leur culture requiert des produits phytosanitaires et de l'eau (Damien 2013). Les biomasses, alors ensuite utilisées, ont été plutôt des déchets de l'industrie-agroalimentaire comme par exemple des bagasses de canne à sucre ou de l'agriculture comme le sorgho ou le miscanthus.

Koçar & Civa (2013) recommandent l'utilisation de cultures énergétiques mais mettent en évidence le fait qu'il ne doit pas y avoir de compétition avec l'alimentation. De plus, cette étude recommande l'utilisation des plantes en C4 conférant une meilleure résistance à la sécheresse, un fort rendement photosynthétique et un taux de capture de CO₂ plus élevé, ce qui induit un rendement en biomasse plus élevé que celui des plantes en C3 (Vandenbrink et al. 2013). En particulier, ils mettent en avant le sorgho et le miscanthus car en plus d'être des plantes en C4, ces deux biomasses peuvent être cultivées sur des terres marginales.

1.2.3.1 Les cultures énergétiques et les plantes en C4

Les plantes en C4, à l'opposé des plantes en C3 possèdent une autre voie d'assimilation du carbone qui se superpose au cycle de Calvin. La première étape du cycle de Calvin - Benson - Bassham (cycle RPP) est la carboxylation du ribulose 1,5 bisphosphate pour former un composé à 3 atomes de carbone, le 3-phosphoglycérate. Il est régi par la RuBisCO (Figure 1-16).

Pour les plantes en C4, le CO₂ forme un acide à 4 carbones (et non à 3 carbones pour les plantes en C3) et deux types de cellules sont impliqués. La première phase est une phase de carboxylation qui se déroule dans les cellules du mésophylle (assise cellulaire entre les nervures, siège du cycle de Calvin des plantes en C3) dépourvues de RuBisCO. La deuxième phase est celle de décarboxylation dans les cellules de la gaine périvasculaire qui contiennent la RuBisCO (dépourvues de capacité photosynthétique). L'amélioration du rendement photosynthétique est donc dû au fait que la photorespiration est quasiment nulle de par l'enrichissement en CO₂ dans la gaine.

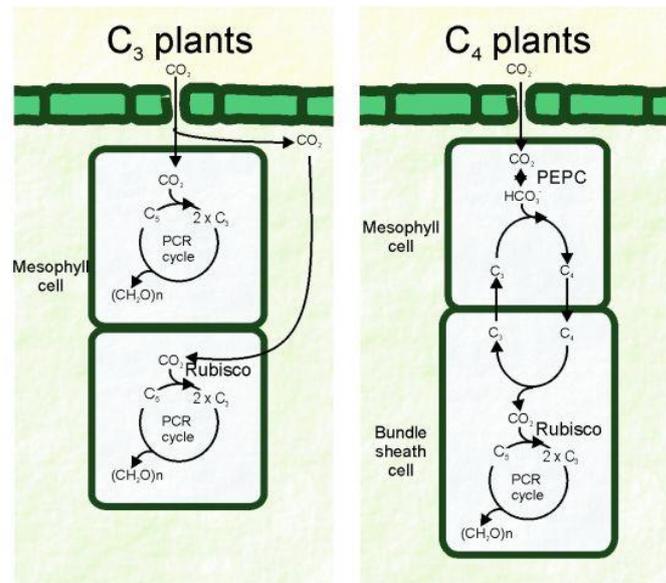


Figure 1-16 : Schéma simplifié de la fixation du carbone dans les plantes en C3 et en C4, (Valeria & Santiago 2011) où C₅ : ribulose-1,5-bisphosphate; PCR : Photosynthetic Carbon Reduction Cycle; PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase; Rubisco : Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase

En plus d'être des plantes en C₄, pouvant être cultivées sur des terres marginales, le sorgho et le miscanthus ont été choisis car ils sont censés produire 2 à 3 fois plus de matériel fibre par hectare que les autres plantes à fibres avec un impact environnemental plus faible. Ils possèdent également une capacité d'adaptation aux conditions pédoclimatiques.

1.2.3.2 Le sorgho

Sorghum bicolor L. Moench (famille des Poaceae) est une graminée d'origine tropicale présentant une grande variabilité génotypique et phénotypique. Il en existe différents types : sorgho grain, sorgho fourrager, sorgho fibre et sorgho sucrier (Figure 1-17).



Figure 1-17: sorgho grain (en haut à gauche), sorgho fourrager (en haut à droite), sorgho fibre (en bas à gauche), et sorgho sucrier (en bas à droite), sources : cirad.fr, arvalis.fr et inra.fr

Le sorgho grain est la cinquième culture céréalière fournissant des denrées alimentaires, des aliments pour animaux et des fibres dans le monde. Le sorgho sucrier se caractérise généralement par un rendement en grains plus faible, mais une teneur en sucre plus élevée dans le jus et un rendement total de la biomasse verte élevé. Il est cultivé principalement pour la production de fourrage, d'ensilage et de sirop (Wu et al. 2013), (Figure 1-18).

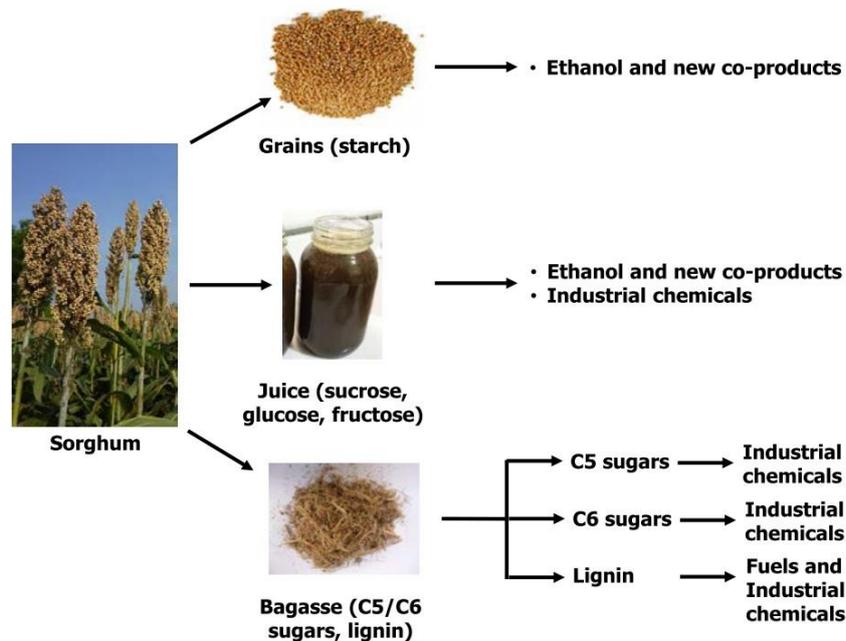


Figure 1-18 : Bioraffinerie du sorgho, de P. Nghiem et al. (2016)

Le sorgho possède de nombreux avantages :

- un potentiel de production élevé en situation pédoclimatique favorable (Garofalo.P 2011), (Trouche et al. 2014)
- une bonne faculté d'extraction de l'eau et des éléments minéraux du sol qui permet une adaptation aux conditions de sécheresse et la faible utilisation d'intrants (Barbanti et al. 2014), (Pacetti et al. 2015)
- une excellente efficacité d'utilisation de l'azote
- une forte résistance à la sécheresse, une tolérance à l'accumulation d'eau, une résistance à la salinité (B G Tamang R K Niroula R B Amgai 2011), (Vasilakoglou et al. 2011)
- possibilité d'être cultivé comme culture intermédiaire (RMT Biomasse 2013b)
- la possibilité d'être cultivé sur des terres marginales (Vandenbrink et al. 2010).

Ce sont des cultures annuelles d'été faciles à insérer dans les rotations. Cependant, elles ont une exigence thermique élevée (température du sol > 10°C) et sont sensibles à la verse (accident de végétation). Toutefois, une fois installé, le sorgho fibre est peu vulnérable aux maladies et aux attaques de ravageurs en cours de végétation. Le problème de fonte des semis (maladie fongique qui touche les plantules, juste avant, ou quelques jours après leur

levée) est maîtrisé par le traitement des semences (RMT Biomasse 2013b). Sa technique de production est très similaire à celle du maïs, ce qui la rend acceptable pour les agriculteurs et n'implique pas la nécessité de nouveaux investissements. Au niveau mondial, le sorgho est cultivé dans le cadre de systèmes de gestion des cultures très divers (cultures dédiées, doubles et à relais, cultures intermédiaires) qui permettent de développer des stratégies de production innovantes (Mitchell et al. 2016; Masood & Singh 2017). Celles-ci optimisent non seulement la production de sorgho en tant que telle, mais aussi les services écosystémiques (produits multiples sur un champ donné, réduction des intrants pour la lutte contre les mauvaises herbes,...).

Toutefois, depuis la sélection du sorgho en tant que culture à des fins de production d'énergie en Europe tempérée en est encore à ses balbutiements, plusieurs inconvénients (dont par exemple, la sensibilité au froid) doivent être surmontés pour en faire une alternative viable au maïs (Windpassinger et al. 2015). Amaducci et al. (2016) et Agostini et al. (2015) ont conclu que le sorgho devrait être cultivé plutôt que le maïs pour accroître l'efficacité énergétique d'une parcelle (notamment car le sorgho ayant un système racinaire plus efficace pour puiser l'eau du sol). La mise au point de sorgho devrait être plus rapide compte tenu des connaissances actuelles sur la génétique des caractéristiques souhaitables. Le sorgho est une excellente ressource génétique et un modèle botanique pour l'amélioration continue (Vandenbrink et al. 2013). Les résultats d'essais de rendement d'hybrides de sorgho sucré, de sorgho à grains et de sorgho sucré montrent que le partage des glucides en grains et en tiges peut accroître la capacité énergétique de la culture (Monk et al. 1984).

Le sorgho fourrager est une herbe à croissance rapide utilisée pour l'alimentation animale. Ainsi, la culture du sorgho fourrager se concentre principalement sur un rendement élevé en biomasse et non sur les sucres dans les tiges. Ils sont regroupés en 3 catégories : sorgho fourrager, sudangrass et sorgho-sudangrass. Les génotypes appelés BMR (brown midrib) ont des teneurs en lignine réduites. Le sorgho à tonnage élevé, également appelé sorgho énergétique ou sorgho photopériodique peut produire des niveaux élevés de matières cellulosiques. En effet, ce type de sorgho retarde la floraison, ce qui à son tour retardera la baisse de la qualité du fourrage et permettra d'obtenir des rendements élevés en matière sèche de biomasse pendant de plus longues périodes pendant la saison de croissance (Shoemaker & Bransby 2010). En conditions hydriques favorables, le rendement des sorgho biomasse varie de 10 à plus de 20 $t_{MS}.ha^{-1}$ (RMT Biomasse 2013b).

Pour l'année 2016, la culture du sorgho en Europe était estimée à 400232 ha, soit 1245047 tonnes. La part de production française était de 4% : 45667 ha, soit 232183 tonnes (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>).

Sambusiti et al. (2013b) ont mesuré le potentiel méthane de 5 variétés de sorgho différents, compris entre 270 et 335 $NmL_{CH_4}.g_{VS}^{-1}$. Comme explicité précédemment (1.2.2.7), il existe de nombreux facteurs influençant la composition biochimique et la structure du sorgho et donc de son potentiel méthane: sa variété, sa période de récolte, ses conditions de culture,... (Mahmood & Honermeier 2012). Dans une autre étude impliquant 4 génotypes cultivés sur 3 sites, nous avons montré que l'impact du génotype était de 36% et celui de l'environnement de culture de 34% sur le potentiel méthane du sorgho (Thomas et al. 2017).

Kalamaras & Kotsopoulos (2014) ont montré que la co-digestion du sorgho avec du fumier bovin était semblable à celle maïs (267 et 241 $L_{CH_4}.kg_{VS}^{-1}$, respectivement). Par ailleurs, Zhang et al. (2015) ont montré que la co-digestion du sorgho avec du fumier de vache avait permis d'augmenter le rendement en biogaz jusqu'à 25% par rapport à la mono-digestion de tiges de sorgho.

1.2.3.2 *Le miscanthus*

Le miscanthus est une plante pérenne (famille des Poaceae, genre *Miscanthus*) originaire d'Asie (Chine, Japon). Sa forte productivité en biomasse a conduit à son implantation et son étude en Europe depuis les années 1980 dans le cadre des recherches sur les bioénergies (Clifton-Brown et al. 2015). Il possède de nombreux avantages :

- Un potentiel de productivité important en situation pédoclimatique favorable
- La récolte d'un produit sec en fin d'hiver directement utilisable en combustion
- Une culture pérenne (au moins 15 ans)
- Des besoins modérés de fertilisation (azote, phosphore et potassium)
- Peu de protection phytosanitaire
- Un stockage de carbone dans les rhizomes
- La présence d'un couvert en hiver (Arnoult & Brancourt-Hulmel 2015; Morandi et al. 2016; Perrin et al. 2017).

Cependant son implantation est coûteuse (achat des rhizomes et main d'œuvre), nécessite un matériel spécifique et conditionne la réussite de la culture. C'est une culture très sensible aux adventices (plante herbacée ou ligneuse indésirable à l'endroit où elle se trouve) en 1^{ère} et 2^{ème} année et qui ne rentre en production que 2 à 3 ans après l'implantation. Sa productivité est très liée aux conditions pédoclimatiques, avec une assez forte sensibilité au stress hydrique (RMT Biomasse 2013a). Cette culture ne menace pas l'utilisation de terres arables et ne dégrade pas les environnements naturels (Rogowska 2017). Au contraire, elle présente de nombreux avantages : les effets du retour à une couverture végétale pérenne semi-naturelle qui protège les sols, l'augmentation du stockage du carbone dans le sol, la protection des terres vulnérables ou la culture sur sols pollués et la réduction des émissions de GES (Clifton-Brown & Harfouche 2018). Elle peut également être cultivée sur des sols pollués ou des terres marginales (Muller-Stover et al. 2016; Kiesel et al. 2016).

En fin d'hiver, juste avant la récolte, ces herbes mesurent 3,5 à 4 mètres de hauteur et trois mois après la récolte, les jeunes pousses mesurent près de 1,40 mètre (Figure 1-20). C'est une culture pérenne, implantée pour quinze à vingt ans. Les rendements varient entre 13 et 16 tonnes par hectare voire plus en fonction de la qualité des sols et de l'environnement météorologique (<https://www.ouest-france.fr/bretagne/la-culture-du-miscanthus-en-quelques-chiffres-3291966>). Comparé au sorgho et au maïs, le miscanthus a le plus important rendement en biomasse (25.3 $Mg.ha^{-1}.an^{-1}$, en Pologne) (Dubis & Stefan 2016). Cependant, sa production de biomasse est positivement corrélée aux teneurs en cellulose et lignine et négativement corrélée aux teneurs en hémicelluloses, cendres et solubles (Arnoult et al. 2015). Les clones avec le plus important rendement en biomasse ne sont pas les meilleurs

pour la composition en raison de leur importante teneur en lignine et faible teneur en hémicelluloses. En effet, la composition des parois végétales et de la composition de la cellulose varient en fonction des clones (W. Zhang et al. 2013).

Il existe 2 espèces de miscanthus : *M. x sinensis* et *M. x sacchariflorus* et un hybride interspécifique : *M. x giganteus* (Figure 1-19). Ce dernier est justement issu du croisement des 2 premières espèces. Il est stérile et dédié à industrie (Clifton-Brown et al. 2017).

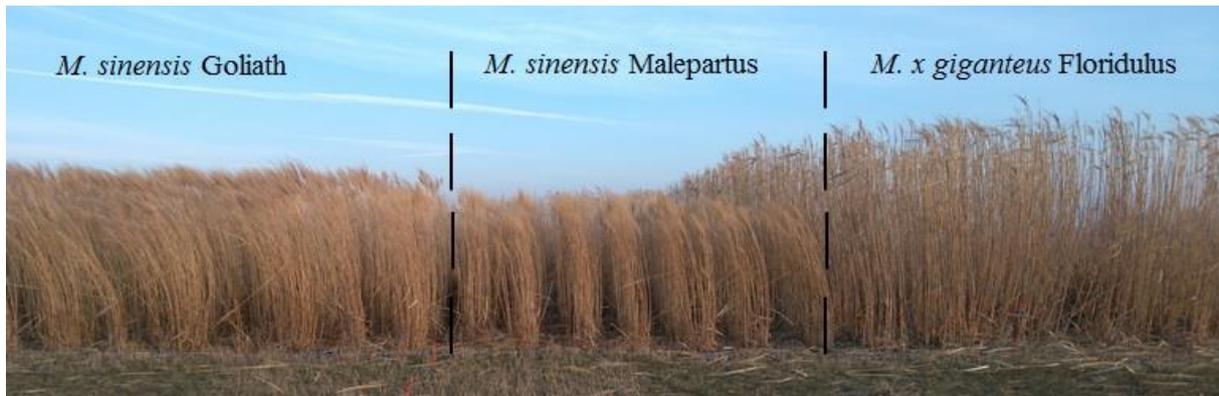


Figure 1-19: Différents génotypes de miscanthus, photo prise sur le site de l'INRA d'Estrées Mons

Sa principale utilisation actuelle est le chauffage. En effet, son pouvoir calorifique est bien supérieur à celui du bois (4700 et 3300 kWh/tonne, respectivement). Ses autres applications sont : le paillage horticole, la litière animale, complément alimentaire pour les bovins et l'industrie (bioéthanol, biogaz, béton, isolant, incorporation dans bioplastiques) (BFF, communication personnelle).

Peu d'études ont considéré le miscanthus comme matière première pour la digestion anaérobie et elles ont montré un potentiel de méthane (BMP) assez faible. Le potentiel méthane a été évalué de 280 à 320 $\text{NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$ suivant le génotype et la période de récolte et la fraction (tige ou feuilles) après 90 j (Wahid et al. 2015). D'autres références indiquent des potentiels compris entre 170 $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ (Zhou et al. 2017) et 227 $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ (Fu et al. 2018). (Frydendal-nielsen et al. 2016) ont reporté un potentiel d'environ 120 $\text{NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$ pour un *Miscanthus x giganteus* récolté en février. La récolte précoce a entraîné une augmentation de 30 % de la production de méthane, mais n'est pas compatible avec une culture pluriannuelle car elle limite le recyclage des nutriments (Frydendal-Nielsen et al. 2016; Heaton et al. 2009).

Peu d'études ont utilisé *Miscanthus. x giganteus* comme co-substrat pour la DA du fumier. Moiceanu et al. (2016) ont utilisé le miscanthus comme co-substrat de référence pour étudier l'influence des différents types de fumier sur la production de biogaz.

De par leurs caractéristiques dues à la composition de la paroi végétale constituée de cellulose, hémicelluloses et lignine, les biomasses lignocellulosiques ont une accessibilité réduite. Dans le but d'augmenter cette bioaccessibilité par la destruction du sclérenchyme pour désintégrer la lignine et désincruster le parenchyme, un large panel de pré-traitements a été étudié dans la littérature.

1.3 Les différents pré-traitements de la biomasse lignocellulosique

Le prétraitement de la biomasse pour la dépolymérisation des composés lignocellulosiques en sucres fermentescibles est étudié depuis de nombreuses années. Les objectifs de leur utilisation sont différents suivant le produit visé. Lors de la saccharification (pour la production d'éthanol par exemple), le but est d'isoler la cellulose de la lignine et des hémicelluloses pour avoir de bons rendements lors de l'hydrolyse enzymatique. Pour la production d'H₂ en fermentation sombre, l'objectif est de solubiliser les sucres. En ce qui concerne la production de CH₄ par DA, les objectifs sont de délignifier via la rupture des liaisons lignines-carbohydrates, réduire la cristallinité de la cellulose et augmenter la surface et la taille des pores (Agbor et al. 2011). Cela induit des changements physico-chimiques, structuraux et biochimiques (Cheng et al. 2011), (Figure 1-20). Les conversions chimiques, physico-chimiques et biochimiques sont les technologies les plus prometteuses pour dépolymériser la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles (Rabemanolontsoa & Saka 2016).

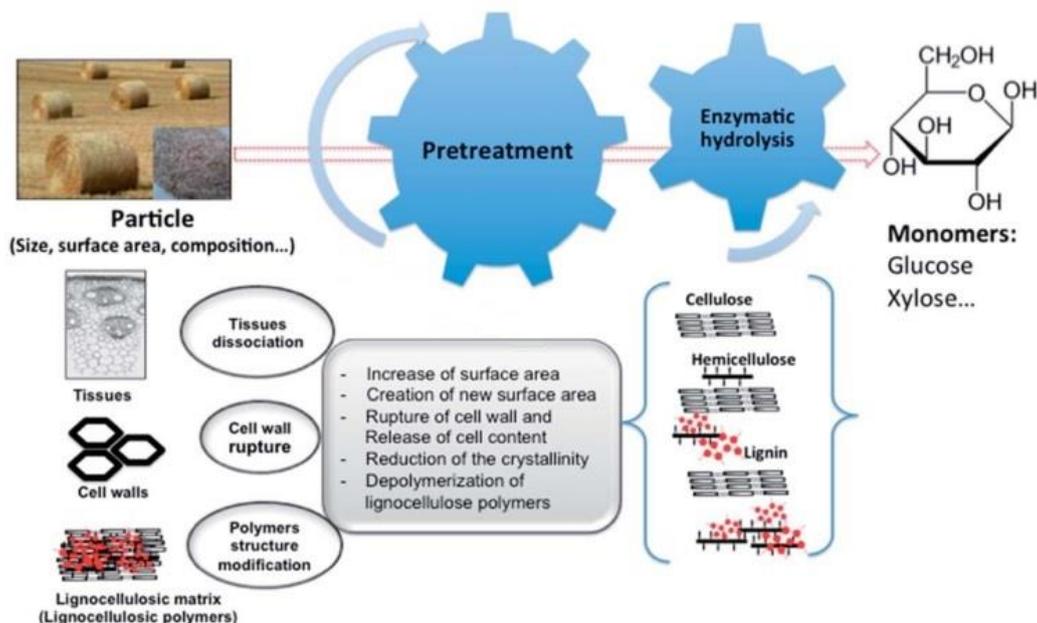


Figure 1-20: Différentes étapes de conversion de la biomasse et paramètres influençant la réactivité des particules lignocellulosiques, adapté de Barakat, Mayer, et al. (2014)

Dans le but d'améliorer le potentiel méthane, de nombreux pré-traitements sont étudiés : physiques (ex : broyage), chimiques (ex : acides, alcalins), thermiques (ex : explosion à la vapeur), thermochimiques et biologiques (ex : flore fongique) (Paul & Dutta 2018). Les principaux sont présentés par la Figure 1-21 en prenant l'exemple de la paille de blé.

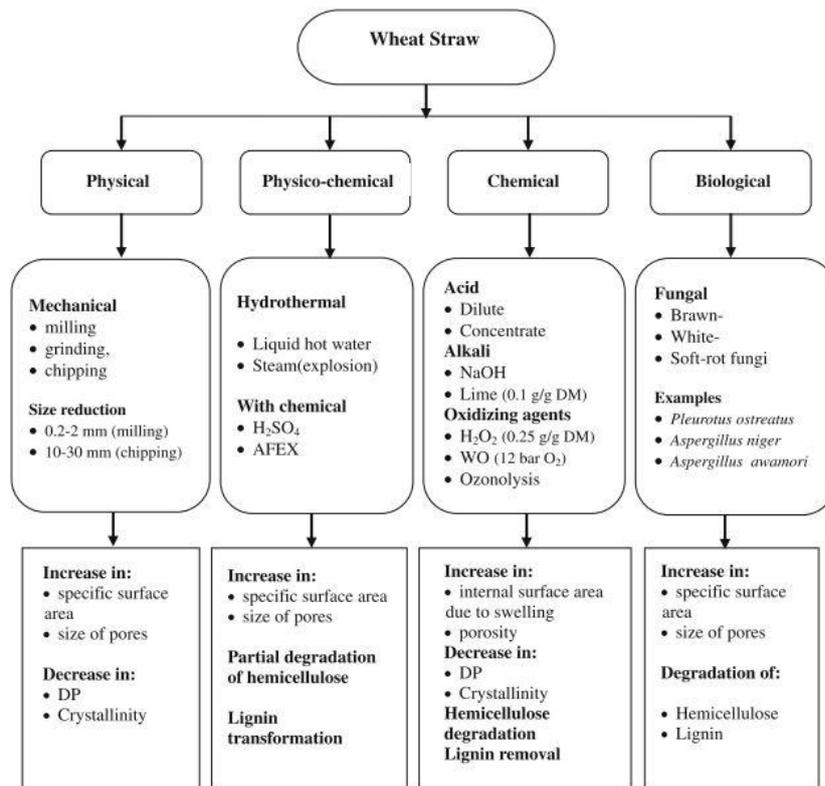


Figure 1-21 : Les pré-traitements les plus communs utilisés sur la paille et leurs effets possibles (DP, degree of polymerization; WO, wet oxidation), adapté de Talebnia et al. (2010)

1.3.1 Pré-traitements physiques

Ce type de pré-traitement a pour but d'augmenter la surface spécifique, diminuer le degré de polymérisation de la cellulose ainsi que sa cristallinité.

1.3.1.1 Mécanique

La taille des particules a un impact sur la biodégradabilité des substrats solides (Raposo et al. 2011). En effet, le broyage sur les résidus solides a un effet généralement positif sur la cinétique car ce type de prétraitement permet généralement l'augmentation de la surface spécifique de la matière organique, augmentant ainsi la surface de contact pour les micro-organismes. Cependant, l'impact sur le potentiel méthanogène dépend de la nature du substrat principalement de sa biodégradabilité initiale (Moletta 2011; Szlachta et al. 2018).

1.3.1.2 Thermique

Les prétraitements thermiques consistent à utiliser des températures élevées (> 100°C) sous des pressions parfois importantes. Selon le refroidissement appliqué, plusieurs procédés peuvent être distingués : en effet, une baisse rapide de la pression a la particularité d'exploser le tissu lignocellulosique. En règle générale, la chaleur perturbe les liaisons chimiques de la paroi des membranes cellulaires et induit une solubilisation des hémicelluloses puis de la lignine et une réduction de la cristallinité de la cellulose, rendant la cellulose plus accessible aux attaques enzymatiques (Patinvoh et al. 2016).

Les pré-traitements hydrothermiques consistent en la dégradation thermique de la cellulose et des hémicelluloses avec l'eau comme « milieu d'extraction » (Bobleter et al. 1976). Le pré-traitement hydrothermal (HTTP) ou encore appelé « Liquid hot water pretreatment » se réalise à des températures et pressions élevées : 160–260 °C, 0.69–4.83 MPa, pendant une courte durée (quelques secondes à plusieurs minutes). Il peut également être réalisé à température ambiante et pression normale mais pendant une durée relativement longue. Ces conditions évitent la corrosion et la formation de coproduits mais requièrent une énergie importante (Mustafa et al. 2018). La cuisson hydrothermale conduit à la solubilisation et à l'altération de la lignine ainsi qu'à la solubilisation des holocelluloses (Phuttaro et al. 2019).

Le pré-traitement par explosion à la vapeur consiste en le traitement de la biomasse avec de la vapeur saturée à haute pression suivi d'une réduction rapide de la pression de la vapeur pour obtenir une décompression explosive. Ce procédé conduit à deux phases. La phase aqueuse (hydrolysats) contient principalement du xylose et du glucose, du mannose, de l'arabinose et du galactose solubilisés à partir d'hémicelluloses. La fraction solide humide est enrichie en lignine et cellulose (Datar et al. 2007).

1.3.1.3 Micro-ondes

Contrairement au pré-traitement thermique, ce type de pré-traitement ne repose pas sur la conduction régie par un gradient de température mais par chauffage électromagnétique dû à la rotation des dipôles moléculaires (Hosseini Koupaie & Eskicioglu 2015). Son effet n'est donc pas uniquement thermique.

1.3.1.4 Extrusion

L'extrusion est un procédé (thermo)mécanique imposant une compression et un fort cisaillement à la matière. L'agencement des différents pas, longueurs, angles de décalage, positions et espacements définissent une configuration de vis (Zheng & Rehmann 2014). Cela conduit donc à une multitude de paramètres pouvant influencer l'efficacité du pré-traitement et son adaptabilité suivant les caractéristiques de la biomasse à pré-traiter.

1.3.2 Pré-traitements thermochimiques

Les agents chimiques les plus utilisés sont acides ou alcalins. Les premiers sont reconnus pour solubiliser les sucres, les deuxièmes pour dégrader la lignine.

1.3.4.1 Pré-traitements acides

Les agents acides sont utilisés pour solubiliser les carbohydrates, déstructurer la lignine insoluble et les séparer de la lignine insoluble (Pavlostathis & Gossett 1985). La principale réaction qui se produit est l'hydrolyse des hémicelluloses, en particulier du xylane, puisque le glucomannane est plus stable (Carrere et al. 2016). Néanmoins, les prétraitements acides conduisent à la formation possible de composés inhibiteurs tels que le furfural provenant des hémicelluloses ainsi qu'à la précipitation de la lignine solubilisée. Ce phénomène est d'autant plus prononcé lors de l'utilisation d'acides concentrés (Hendriks & Zeeman 2009). Les acides les plus utilisés sont H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 et HCl . Ils nécessitent une température (60-190°C) et une pression élevées pour être efficaces (Behera et al. 2014). Le prétraitement à l'acide dilué est également le procédé le plus efficace pour les lignocelluloses et il génère moins de produits de dégradation que les prétraitements à l'acide concentré.

1.3.4.2 Pré-traitements alcalins

Les pré-traitements alcalins sont efficaces pour leur capacité à dégrader la lignine, ce qui permet d'augmenter l'accessibilité des enzymes à la cellulose et aux hémicelluloses (Shah et al. 2018) (Figure 1-22). En effet, ce type de pré-traitement permet la saponification des ponts uroniques entre les hémicelluloses et la lignine, le gonflement des fibres ainsi que l'augmentation de la taille des pores facilitant ainsi la diffusion des enzymes hydrolytiques. Les bases utilisées sont la soude, la chaux, la potasse et l'hydroxyde d'ammonium (Kim et al. 2016). De plus, la solution alcaline peut être récupérée par séparation liquide-solide pour ensuite être réutilisée pour ajuster le pH. Ce qui ne peut pas être réalisé avec les acides car leur neutralisation serait nécessaire avant la DA (Pavlostathis & Gossett 1985). Généralement, les prétraitements alcalins dissocient principalement les polymères de la paroi en extrayant les férulates liés aux hémicelluloses et à la lignine réticulées (Mosier et al. 2005). La cellulose, bien qu'insoluble dans l'eau, a un caractère hydrophile : la fixation de très nombreuses molécules d'eau entraîne donc son gonflement. De plus, les agents alcalins peuvent cliver le composant ester des ponts éther formés entre l'acide férulique lignine (via phénylpropane), libérant ainsi la lignine des carbohydrates et de l'acide férulique en faible quantité (Buranov & Mazza 2008).

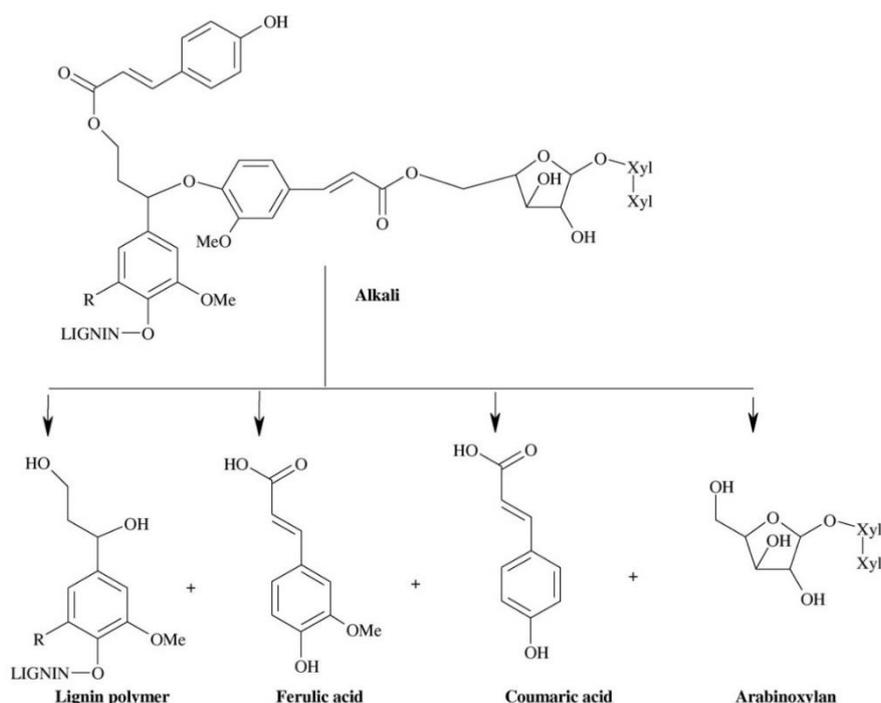


Figure 1-22 : Clivage du complexe lignine/phenolique-carbohydrates de maïs par un agent alcalin de Y. & D.J. (1985) et adapté par Buranov & Mazza (2008)

L'impact du réactif alcalin a une influence. Dans la suite, ne seront développés que les pré-traitements alcalins à la soude et à la chaux qui sont utilisés lors des travaux de cette thèse. Il a été montré que la soude a une meilleure efficacité vis-à-vis de la chaux ou potasse sur des biomasses lignocellulosiques et ce, quelle que soit la température appliquée lors du pré-traitement (Shah et al. 2018). Il en est de même à molarité équivalente en OH^- (Soares Rodrigues et al. 2016). Cependant, dans une réflexion globale il faut prendre en compte le prix du réactif ainsi que son possible épandage via les digestats.

1.3.4.2.1 Comportement des sucres en milieu alcalin

Lors de la dégradation alcaline des monosaccharides en solution aqueuse, les produits de réaction sont constitués principalement de nombreux acides sacchariniques ($\leq C_6$). Des composés de poids moléculaire plus élevé ($>C_6$) et divers composés carbonylés insaturés non acides et cycliques sont également formés en petites quantités (Yun Yang & Montgomery 1996).

La dégradation alcaline est initiée à l'extrémité réductrice des sucres, ce qui entraîne la conversion du résidu en hydroxyacides. La dégradation alcaline du glucose entraîne la formation d'un mélange d'hydroxyacides dont la composition varie en fonction du métal alcalin, de la température et de la concentration des réactifs (Yang & Montgomery 2007).

1.3.4.2.2 Pré-traitement à la soude

Le prétraitement à l'hydroxyde de sodium est étudié depuis les années 1900, l'objectif originel étant l'augmentation de la digestibilité de la cellulose chez les animaux du rumen (Kim et al. 2016).

Ce réactif induit la saponification des liaisons ester présentes entre la lignine et les carbohydrates (Figure 1-23). Cela induit la série suivante de solubilisation: hémicelluloses > lignine >> cellulose (Pavlostathis & Gossett 1985). L'ordre de réactivité des sucres vis-à-vis de l'action de la soude pour leur solubilisation est, d'après (Dubois & Rigal 1995) : fructose > glucose > mannose.

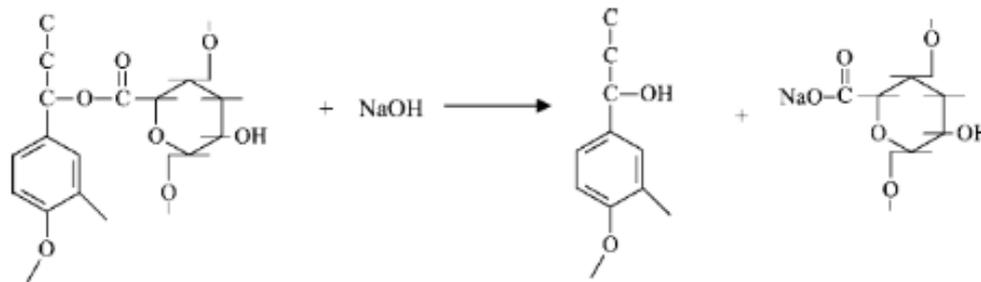


Figure 1-23: complexe lignine-carbohydrates réagissant avec la soude, de He et al. (2008)

En général, les conditions de prétraitement à la soude appliquées sont : la température comprise entre 10 °C et 200 °C, les concentrations de NaOH entre 0,1 % et 10 %, et les temps de contact compris entre quelques minutes et 5 jours et diminuant généralement lorsque la température de pré-traitement augmente (C. Sambusiti et al. 2012).

Des pré-traitements à la soude sur des sorghos fourragers et sucriers ont déjà été réalisés à des concentrations de 4 et 10 g_{NaOH}/100g_{TS} avec une concentration en matières sèches de 35g_{TS}/L, à 55°C, pendant 12 h sous agitation. Ce pré-traitement a permis la solubilisation partielle des holocelluloses et de la lignine. L'effet est une augmentation entre 40% et 64% de la cinétique de méthanisation suite à la solubilisation des hémicelluloses et cellulose mais aucun effet positif sur le rendement en méthane en test BMP (Sambusiti et al. 2013b).

Une autre étude du même auteur a été réalisée pour les mêmes concentrations que précédemment mais à 40°C et 55°C pour des temps de contact de 12 h et 24 h avec du sorgho fourrager ensilé. Comme précédemment la solubilisation de la matière a été augmentée et l'augmentation de la température et du temps de contact permettent une amélioration de la cinétique (C. Sambusiti et al. 2012).

Cependant, l'utilisation de la soude possède un inconvénient majeur. Si le pré-traitement est intégré dans une chaîne de valorisation dont notamment la DA, le retour au sol du digestat issu de la digestion d'un substrat pré-traité à la soude peut représenter un risque de pollution des sols au sodium (Zheng et al. 2014).

1.3.4.2.3 Pré-traitement à la chaux

Un ajout de CaO ou de Ca(OH)₂ a été testé sur divers substrats lignocellulosiques et s'est révélé particulièrement efficace pour augmenter la biodégradabilité des substrats à haute teneur en lignine (Ramos-suárez et al. 2017). Dans une autre étude, la chaux a été utilisée sur des tiges de tournesol à une concentration de 4g.100g_{TS}⁻¹, à des températures de 30°C, 55°C et 80°C pour un temps de contact de 24 h. A 55°C, la constante de cinétique de l'hydrolyse a été augmentée de 5% et le BMP de 26%. La lignine a été dégradée de 30% (Monlau, Barakat, et al. 2012).

Son utilisation est limitée car plusieurs résultats publiés ont montré que la chaux vive est moins capable d'éliminer la lignine que la soude ou la potasse. Ce fait pourrait être dû à sa faible solubilité. De plus, la formation d'un complexe calcium-lignine est possible. En effet, les ions calcium possédant deux charges positives ont tendance à se réticuler dans des conditions alcalines à lignine chargée négativement et donc à ioniser les groupes fonctionnels, empêchant une dégradation accrue de la lignine (Shah et al. 2018).

Les Tableaux 1-6 et 1-7 présentent les différents pré-traitements alcalins réalisés dans la littérature sur des biomasses lignocellulosiques différentes ainsi que leurs impacts sur leur composition biochimique et sur leur potentiel méthane de ces dernières, respectivement.

Tableau 1-6 : Impact des conditions de pré-traitements alcalins sur les composants de la paroi végétale. Conc : Concentration, Temp : Température, Cel : Cellulose, Hem :Hémicelluloses, Lig : Lignine

Substrat	Conditions de pré-traitement					Dégradation de la paroi végétale (%)				Référence
	Réactif alcalin	Conc	Temp (°C)	Agitation	Durée (h)	Teneur en MS	Cel	Hem	Lig	
Bagasse de canne à sucre	Ca(OH) ₂	1,70%		70 RPM			-	2,1	30,3	(Mustafa et al. 2018)
		11,90%					-	16,31	41,9	
Paille de blé	NaOH	1%	40	Non	24	160 g _{TS} .L ⁻¹	-	-	-	(C Sambusiti et al. 2012)b
		10	40	Non	24		13	66	3	
Sorgho fourrager ensilé		1%	40	Non	24		-	-	-	
		10	40	Non	24		31	45	44	
Paille de riz	NaOH	6g 100gTS	20		504	20%	16,4	36,8	28,4	(He et al. 2008)
Topinambour	NaOH	2% (w/v)	50	150RPM	2		8,4	38	21,5	(Li et al. 2016)
Canne de Provence	Ca(OH) ₂	1%	25		24		11	21	-	(Jiang et al. 2017)
		3					5	10	-	
		5					1	4	1	
		7					-	2	3	
		12					-	3	11	
		20					-	4	12	
Canne de maïs	NaOH	5%	température ambiante		24	50%	0,7	24,3	21,1	(Li et al. 2014)
Sorgho fourrager ensilé	NaOH	4%	55	Oui	12			37	29	(C. Sambusiti et al. 2012)a
		10	55		12		24	68	63	
		4	55		24			57	20	
		10	55		24		19	73	70	
		4	40		24			49	26	
		10	40		24			71	67	

Tableau 1-7: Impact des conditions de pré-traitements alcalins sur le potentiel méthane

Substrat	Conditions de pré-traitement					Conditions de la DA		Production de méthane $L_{CH_4} \cdot kg_{vs}^{-1}$		Impact sur le BMP	Impact sur k	Références	
	Réactif alcalin	Conc (%)	Temp (°C)	Agitation	Durée (h)	Teneur en MS (%)	Procédé	Inoculum	Brut				Pré-traité
Canne de maïs	NaOH	2	20		72	80%	batch, 35°C		114	215	89	(Zheng et al. 2009)	
Tiges de tournesol	NaOH		55				batch, 35°C		192	259	35	(Monlau, Barakat, et al. 2012)	
	Ca(OH) ₂		55				batch, 35°C			241	26		5
Paille de tournesol	aqueous ammonia	32% (w/w)	22				batch, 35°C	Liquide provenant d'un digesteur mésophile alimenté avec un mélange de lisier de porc	201,8	277,9	38	(Antonopoulou et al. 2015)	
									30,9	76,8	149		
Grass					72				223,1	281,6	26		
Bagasse de canne à sucre	Ca(OH) ₂	8,50%					batch, 37°C	Boues anaérobies		265	23	44	
Paille de blé		1	40	NO	24		batch, 35°C		204		14		
Sorgho fourrager ensilé	NaOH	10	40	NO	24	160 gts.L ⁻¹					31	163	(C Sambusiti et al. 2012)b
		1	40	NO	24			Boues digérées	269		17		
		10	40	NO	24						47	65	
		4	55	Yes	12		batch, 35°C		266	193	10	15	(C. Sambusiti et al. 2012)a
		10	55		12			Boues granulaires		316	19	42	
		4	55		24					292	10	12	

		10	55	24				298	12	55	
		4	40	24				287	8	0	
		10	40	24				311	17	35	
Canne de Provence	Ca(OH) ₂	7	25	24	batch, 37°C	mesophilic liquid digesteur	213	255	20		Jiang 2017
		20%						300	41		

1.3.4.3 Pré-traitements oxydants

Un prétraitement oxydatif consiste en l'addition d'un oxydant comme le peroxyde d'hydrogène ou l'acide peracétique à une biomasse en suspension dans l'eau. Au cours du prétraitement oxydatif, plusieurs réactions peuvent avoir lieu, comme la substitution électrophile, le déplacement des chaînes latérales, le clivage des liaisons alkyl aryl éther ou le clivage oxydatif des noyaux aromatiques. Dans de nombreux cas, l'oxydant utilisé n'est pas sélectif et par conséquent des pertes d'hémicellulose et de cellulose peuvent survenir. Il existe un risque élevé de formation d'inhibiteurs, car la lignine est oxydée et solubilisée en composés aromatiques (Hendriks & Zeeman 2009).

Un des pré-traitements oxydants les plus connus est l'ozonation qui permet une dégradation sélective de la lignine en réagissant préférentiellement avec les composés oléfiniques, aromatiques et phénoliques en raison de leur densité électronique. La réactivité et la voie de réaction de ces composés changent en fonction des substituants (Travaini et al. 2016).

1.3.4.5 Pré-traitements liquide ionique

Les liquides ioniques sont des sels qui ont la particularité d'être liquides à température relativement basse. Ce type de pré-traitement repose sur la perturbation des liaisons hydrogène intermoléculaires et intramoléculaires de la cellulose, qui sont principalement remplacées par des liaisons hydrogène entre l'anion et les protons hydroxyles glucidiques. La cristallinité est diminuée et la surface spécifique augmentée. Une addition d'anti-solvant est toutefois nécessaire pour récupérer la cellulose (Sun et al. 2013). Ce prétraitement, selon les conditions utilisées, peut entraîner, également, une transformation de la cellulose I en cellulose II (Cheng et al. 2011).

1.3.4.6 Pré-traitement AFEX

Le pré-traitement AFEX (Ammonia Fiber EXplosion) est un des pré-traitements thermochimiques les plus utilisés en amont de la saccharification de la biomasse. Il repose sur le même principe que celui par explosion à la vapeur (présenté dans la partie 1.3.1.2). Il consiste en un traitement de la biomasse à la vapeur, la biomasse étant, dans ce cas, en contact avec de l'ammoniaque liquide. Ce dernier est récupéré dans les vapeurs, ce qui permet sa réutilisation. L'AFEX améliore grandement la digestibilité des parois cellulaires sans éliminer la lignine ou les hémicelluloses dans des flux liquides distincts et aboutit à un substrat facilement fermentescible et qui ne nécessite pas de post-traitement (Chundawat et al. 2011).

1.3.4.7 Les pré-traitements de type OrganoSolv

Ce type de pré-traitement agit sur la lignine et les hémicelluloses en dissolvant la première et une partie de la seconde, et en laissant la cellulose en phase solide. C'est une scission solvolytique des liaisons éther dans la lignine et des liaisons hémicelluloses-lignine

par un solvant organique ou aqueux organique à haute température (100-250 °C). Les solvants les plus couramment utilisés dans ce procédé sont le méthanol, l'éthanol, l'acétone, les alcools à point d'ébullition élevé et les acides organiques (comme l'acide formique et acétique). La vitesse de déliquification dépend du solvant utilisé (Mancini et al. 2016).

1.3.3 Pré-traitements biologiques

Ce type de pré-traitement possède plusieurs avantages : un coût raisonnable, le respect de l'environnement et leur application possible à un large éventail de matières premières. Ils peuvent être divisés en trois catégories : enzymatique, anaérobie et aérobie. (Brémond et al. 2018).

Différents champignons, répartis en différents groupes suivant leurs caractéristiques macroscopiques, genres et espèces, peuvent être utilisés. La pourriture brune ou pourriture cubique, de couleur brune et de délitage cubique caractéristiques, intervient principalement dans la destruction des celluloses et hémicelluloses dans des conditions d'humidité et de chaleur importantes. La performance et la virulence des champignons de pourriture blanche dans la dégradation du bois, est très intéressante. En effet, seules les pourritures blanches minéralisent complètement la matière lignocellulosique. Néanmoins aucun micro-organisme n'est capable d'utiliser la lignine comme seule source de carbone et d'énergie et il est donc généralement admis que la dégradation de la lignine est nécessaire aux micro-organismes pour pouvoir accéder à la cellulose et aux hémicelluloses. Ils nécessitent une humidité élevée et une chaleur importante. Leur attaque est aérienne. La pourriture molle regroupe des champignons aérobies supportant des humidités élevées (>50 %), des chaleurs élevées (50°C) et des sécheresses saisonnières. Ils causent le ramollissement du bois ainsi que sa coloration noirâtre (Lekounougou 2008). Cependant, durant le pré-traitement, une quantité de négligeable de sucres a pu être utilisée et donc conduire à des pertes de potentiel méthane (Rouches et al. 2016).

L'ensilage, en plus d'être un moyen de stockage pour compenser les variations saisonnières, pourrait être un pré-traitement augmentant le rendement en méthane (Bruni et al. 2010) même si la teneur en MS diminue (Gao et al. 2012). Il se réalise en conditions humides et anaérobies favorisant ainsi les fermentations lactiques et acétiques.

1.3.4 Facteurs pouvant influencer l'efficacité d'un pré-traitement

1.3.4.1 Impact de l'humidité (teneur en MS)

C'est un paramètre peu souvent pris en considération pour l'optimisation. Cependant c'est un paramètre significatif. En effet, plus la concentration en substrat est importante (donc l'humidité est faible) plus les volumes seront diminués et donc les coûts de prétraitement, également, en particulier lors des pré-traitements thermiques (Peces et al. 2015). Dans cette étude, les auteurs ont trouvé une corrélation entre la teneur en MS d'un pré-traitement à basse

température (60 et 80°C) et le rendement en méthane. Ils suggèrent que teneur en MS optimisée (ou une humidité correcte) aurait pu favoriser une meilleure distribution des enzymes et un meilleur transfert de masse, ce qui aurait finalement augmenté le rendement en méthane. De même, lors de pré-traitements acides ou basiques opérés à une concentration identiques à différentes teneurs en MS, « la dilution » du réactif sera différente, ce qui conduit à des conditions de pH différentes.

1.3.4.2 Impact de la composition biochimique

Comme abordé dans la partie 1.2.2.7, l'impact d'un pré-traitement peut varier en fonction de la composition biochimique d'une biomasse qui varie en fonction des conditions de culture, du génotype, du tissu choisi, etc....Vandenbrink et al. (2013) ont montré que l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique variait d'un type de tissu à l'autre (feuilles ou tiges) et d'un génotype à l'autre.

1.3.4.3 Impact de la granulométrie

Peces et al. (2015) ont reporté qu'il n'y avait pas de différence significative entre les productions de méthane de différentes fractions de grains d'orge brassé (5 - 2mm, 2 -1 mm et inférieur à 1 mm). Ces auteurs ont émis l'hypothèse que la fraction 5 mm était déjà une petite taille suffisante. Cela a également été observé sur les production de méthane et cinétiques de différentes fractions de sorgho ensilé comprises entre 2 mm et 0,25 mm (Sambusiti et al. 2013a).

1.3.4.4 Impact des conditions de chauffage

Parmi différentes conditions de chauffage utilisées lors de pré-traitements alcalins(micro-ondes, autoclave et bain-marie), le micro-ondes était le plus efficace pour délignifier la matière lignocellulosique (Shah et al. 2018).

1.3.5 Choix du pré-traitement pour une application industrielle

Un pré-traitement doit être bien réfléchi pour être faisable à l'échelle industrielle. Un grand nombre de facteurs doivent être pris en compte lors du choix de l'utilisation d'un pré-traitement : son investissement en capital et en énergie, son efficacité globale et son applicabilité sur une grande variété de substrats. En effet, la mise en place d'un pré-traitement et son utilisation peuvent avoir des coûts non négligeables qui peuvent dépasser celui des gains obtenus par la production de méthane par le surplus de permis par le pré-traitement. Par exemple, les coûts d'investissement pour un prétraitement par oxydation humide ont été estimés à 725 000 € pour des équipements d'une capacité de 20 000 tonnes de biomasse solide par an et un retour sur investissement fixé à 10 ans (Uellendahl et al. 2008).

Son utilisation ne doit, également, pas rendre l'échantillon incompatible avec une utilisation ultérieure, ni produire des substances inhibitrices qui entravent la croissance des micro-organismes fermentaires ou s'avèrent nocives pour les personnes les manipulant. Les prétraitements doivent réduire le coût d'investissement, le coût opérationnel et le coût de la biomasse (Ravindran & Jaiswal 2016). En effet, à l'issue des pré-traitements des composés

récalcitrants (comme par exemple les composés de Maillard) ou bien des inhibiteurs peuvent être produits (Hendriks & Zeeman 2009). Cela peut induire, dans certains cas, la récupération des composés chimiques générant ainsi des déchets à traiter. L'utilisation de réactif chimique peut engendrer un stockage de produits chimiques dangereux, qui comme la mise en place d'un procédé complexe, est souvent onéreux. L'utilisation de réactifs chimiques peut également avoir un impact sur la valorisation du digestat après DA. En effet, suite aux problèmes de salinisation des sols, l'utilisation de la chaux est à privilégier par rapport à celle de la soude. De plus, les coûts de préparation de l'échantillon comme le broyage doivent être minimisés (Agbor et al. 2011). Selon Moletta (1990), l'application de prétraitement est rare pour des déchets solides à l'échelle industrielle mais elle pourrait contribuer à la sécurisation de l'approvisionnement et la diversité des substrats.

La solution économique optimale n'est pas durable sans l'orientation de la performance environnementale. Fan et al. (2019) ont comparé différents pré-traitements trouvés dans la littérature. D'un point de vue économique, le prétraitement alcalin CaO nécessite un coût d'exploitation plus élevé que des pré-traitements physiques tels que le broyage et l'explosion de vapeur. Cependant, il offre une meilleure amélioration du rendement du biogaz (59%, de 200 m³/t à 310m³/t). Cependant, le temps de rétention déclaré pour le traitement au CaO est de 10 jours et le coût d'investissement n'a pas été pris en compte. D'un point de vue environnemental, les impacts du pré-traitement à la chaux ne sont pas aussi faibles que le traitement biologique ou celui à la vapeur d'eau. Toutefois, il s'agit d'une option dont la faisabilité est plus coûteuse. Le prétraitement à la soude présente les pires performances environnementales notamment pour la toxicité pour l'homme. Cependant, il est difficile de déterminer l'approche la plus respectueuse de l'environnement car les impacts sur l'environnement sont différents.

Pour un même pré-traitement, le gain énergétique net après pré-traitement et DA peut être très différent en fonction des biomasses. En effet, Uellendahl et al. (2008), ont obtenu un gain net de d'énergie de 43% et 83% pour le maïs et le miscanthus bruts dans les rendements standard danois et dans des conditions de rendement élevé, respectivement, en raison des rendements inférieurs en méthane du miscanthus brut. Avec l'application du prétraitement d'oxydation humide, seul le gain net d'énergie du miscanthus est positif. Ceci montre que l'effet positif de l'augmentation du rendement en biogaz pour le miscanthus par le prétraitement par oxydation humide est beaucoup plus élevé que l'apport énergétique supplémentaire nécessaire pour le prétraitement. Cela montre également, qu'une plante pérenne nécessitant moins d'intrants peut être plus favorable qu'à une plante annuelle.

1.4 Observations et quantification des impacts des pré-traitements

1.4.1 Caractéristique de la production de méthane (biodégradabilité)

Le rendement de la production de méthane est considéré comme un indicateur de la biodégradabilité de la matière (Müller et al. 2004). Cependant, les mesures BMP sont réalisées en voie liquide et donc dans un milieu très dilué. Il peut être important de faire des essais en réacteurs quand une DA en voie sèche telle que celle conduite en réacteurs garage est envisagée. De même, les conditions opératoires utilisées en réacteurs peuvent avoir un impact. Par exemple, les essais en CSTR intègrent selon le TSH, les impacts sur la biodégradabilité du substrat et la cinétique de production.

La constante de cinétique du premier ordre est également un indicateur (Monlau, Barakat, et al. 2012). Cependant, sa méthode de calcul est controversée. Son calcul à partir des résultats de BMP est discutable. Une méthode plus robuste consiste à mesurer la vitesse de dégradation des substrats dans des batchs successifs permettant une acclimatation de l'inoculum au substrat et donc de s'affranchir de la production endogène (appelé batch 2.0) (Kouas et al. 2017).

L'impact sur la quantité de méthane produite et/ou sur sa vitesse est souvent l'objectif opérationnel de l'application d'un ou plusieurs pré-traitements. Cependant, il est intéressant de comprendre les changements induits par les pré-traitements appliqués.

1.4.2 Analyse de la composition biochimique de la matière

1.4.2.1 Détermination des teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine

Dans la littérature, 2 principales méthodes sont utilisées.

La première est la méthode (NERL National Renewable Energy Laboratory)(A. Sluiter et al. 2011). C'est une méthode basée sur une hydrolyse à l'acide sulfurique en 2 étapes. Elle permet de quantifier la lignine acido-insoluble (Lignine Klason) par filtration puis combustion, la lignine acide-soluble par spectroscopie UV-visible ainsi que les polysaccharides structuraux par analyses des sucres par HPLC. Pour la réalisation de cette analyse, il faut veiller à travailler avec une granulométrie adéquate (1 mm), extraire les solubles au préalable et que la teneur en protéines ne soit pas trop élevée (Karimi & Taherzadeh 2016a).

La deuxième méthode est la méthode Van Soest qui repose sur une solubilisation progressive du tissu lignocellulosique par des extractions successives grâce à l'action de détergents spécifiques. Chaque extraction est suivie d'une caractérisation massique du résidu fibreux. Un bilan massique permet alors d'estimer la proportion de chaque fraction extraite et ainsi d'estimer la composition de l'échantillon (Van Soest P.J., Robertson, J.D. and Lewis 1991).

Depuis quelques années, la prédiction NIR est mise en place à partir de mesures de laboratoire et de la chimiométrie permettant une estimation précise et bien plus rapide qu'une analyse biochimique (Godin et al. 2013).

1.4.2.2 Détermination des éléments solubilisés

Ces éléments peuvent être quantifiés par la mesure des concentrations en composés sucrés (holocelluloses), en phénols (lignine), en DCO ou évalués par réduction de la MS/MV solide.

1.4.3 Modifications des liaisons chimiques

Les spectroscopies H-RMN (Résonance Magnétique Nucléaire du proton) et Moyen-Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) peuvent être utilisées pour étudier les changements de liaisons entre les lignines et les groupes fonctionnels. He et al. (2008) les ont utilisées sur des échantillons de paille de riz. Un changement d'intensité au pic d'absorbance au FTIR vers 1730 nm (caractéristique des liaisons ester) indiquera une saponification des liaisons ester.

1.4.4 Mesure des changements de la cellulose

D'après W. Zhang et al. (2013), la modification de la cellulose peut être mise en évidence par la mesure de son degré de cristallinité et son degré de polymérisation (DP).

1.4.4.1 Cristallinité

La méthode de la plus reconnue pour mesurer le degré de cristallinité de la cellulose est celle utilisant la diffraction aux rayons X (Segal et al. 1959). Une équation a été proposée :

$$CrI = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100$$

où CrI exprime la quantité du degré de cristallinité, I_{002} est l'intensité maximale (en unités arbitraires) de la diffraction du réseau 002 et I_{am} est l'intensité de la diffraction dans les mêmes unités à $2\theta = 18^\circ$.

Une deuxième méthode, moins précise (ne donnant que des quantités de cellulose amorphe et cristalline relatives) est employée : la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Åkerholm et al. 2004). Les bandes caractéristiques d'absorption IR pour les deux allomorphes de la cellulose native ont déjà été identifiées dans la région d'étirement OH et dans la région 700- 800 cm^{-1} . Le Lateral Order Index (LOI) a été introduit par O'connor et al. (1958) en tant que ratio de A1430 sur A898, pour estimer le degré de cristallinité. Le LOI, également défini comme l'indice de crête empirique, est sensible à la quantité de régions cristallines par rapport aux régions amorphes dans la cellulose. Si cette méthode a été validée dans le cas de la cellulose pure, son application à des biomasses lignocellulosiques reste sujette à caution. Elle ne permet de donner que des valeurs relatives. Son principal avantage

demeure sa simplicité avec une préparation minimale de l'échantillon. La résonance magnétique est également une méthode employée pour cette mesure et reconnue comme donnant une mesure précise du CrI avec notamment l'analyse des surfaces de fibrilles accessible ou non (Karimi & Taherzadeh 2016a).

(Karimi & Taherzadeh 2016a) ont reporté que la "réduction de la cristallinité" de la cellulose a induit un taux plus élevé de bioconversions de la lignocellulose. Cependant, ce n'est pas toujours le cas, car plusieurs investigations ont montré qu'une plus grande digestibilité peut être obtenue avec une plus grande cristallinité. Dans ces cas, d'autres facteurs, comme la surface accessible, la porosité, la teneur en lignine et en hémicelluloses et la taille des particules, ont été les facteurs plus influents que la cristallinité. De plus, dans plusieurs cas, aucune relation entre la dégradabilité et la cristallinité n'a été trouvée.

1.4.4.2 Degré de polymérisation (DP)

Ce paramètre est mesuré par une méthode de viscosité mise au point par Alexander & Mitchell (1949). Le DP de la cellulose, le nombre de glucose dans le polymère, est connu comme un paramètre clé contribuant à l'hydrolyse enzymatique des lignocelluloses (Karimi & Taherzadeh 2016b).

1.4.5 Mesure de l'accessibilité

1.4.5.1 Différentes mesures

Les matériaux lignocellulosiques ont des surfaces externes et internes. La superficie totale accessible est la somme de ces superficies. La surface externe dépend de la taille et de la forme des particules, et peut être augmentée par des prétraitements physiques. Les surfaces internes dépendent de la taille et de la distribution des pores. La superficie accessible est considérée comme un facteur important pour la digestibilité d'une biomasse lignocellulosique. Il existe différentes méthodes dont l'adsorption de l'azote, la porosimétrie au mercure et la valeur de rétention de l'eau (Karimi & Taherzadeh 2016b). Elles utilisent des matériaux dont la taille est très différente de celle des enzymes qui donc ne représentent pas l'accessibilité aux enzymes. Or dans notre cas, il est nécessaire que la biomasse soit accessible à ces dernières. En effet, l'accessibilité est à penser à la fois pour les micro-organismes de la digestion anaérobie mais aussi pour les enzymes (Karimi & Taherzadeh 2016b). Lors de la DA, les bactéries cellulolitiques atteignent les surfaces cellulositiques, elles produisent des complexes multi-enzymatiques extracellulaires, appelés cellulosomes, localisés à l'interface entre la cellule et la cellulose/hémicellulose, et dégradent la cellulose et les hémicelluloses en produits solubles qui sont ensuite directement absorbés. En effet, les bactéries cellulolitiques sont plus efficaces que les systèmes enzymatiques libres (Shoham et al. 1999).

Pour réaliser une hydrolyse enzymatique, les enzymes sont produites par différents micro-organismes dont les bactéries et les champignons. Un contact direct entre les enzymes

et la cellulose est nécessaire. La surface accessible est le facteur le plus influent sur le taux et le rendement de cette méthode (Karimi & Taherzadeh 2016b).

L'accessibilité de la cellulose à la cellulase (CAC) d'un substrat peut être déterminée par une protéine recombinante, un module de liaison à la cellulose (CBM) associé à une fluorochrome. Ce paramètre représente la quantité de cellulose disponible pour la cellulase en décrivant la surface totale de la cellulose accessible (Hong et al. 2007).

1.4.5.2 Evaluation des sucres directement bioaccessibles : Principe de la fermentation sombre

Une autre méthode biologique permettant d'évaluer l'accessibilité de la biomasse lignocellulosique est basée sur sa bioconversion lors de la fermentation sombre.

Ce procédé consiste en un procédé de méthanisation où l'étape de méthanogénèse est inhibée. Pour cela, les archées méthanogènes sont éliminées de l'inoculum (par traitement thermique ou chimique) et les conditions opératoires visent à empêcher leur développement (faible temps de séjour, milieu acide). Ainsi, les temps de séjours ou durées des fermentations ne sont que de quelques jours et donc l'étape d'hydrolyse ne peut généralement pas se produire (excepté dans le cas d'inocula adaptés ou enrichis). En effet, ce qui est utilisé par les micro-organismes sont uniquement les sucres directement accessibles (Monlau, Sambusiti, et al. 2012). Les principaux produits sont alors l'hydrogène et des métabolites dont les AGV. Différentes voies métaboliques rentrent en jeu (Figure 1-24).

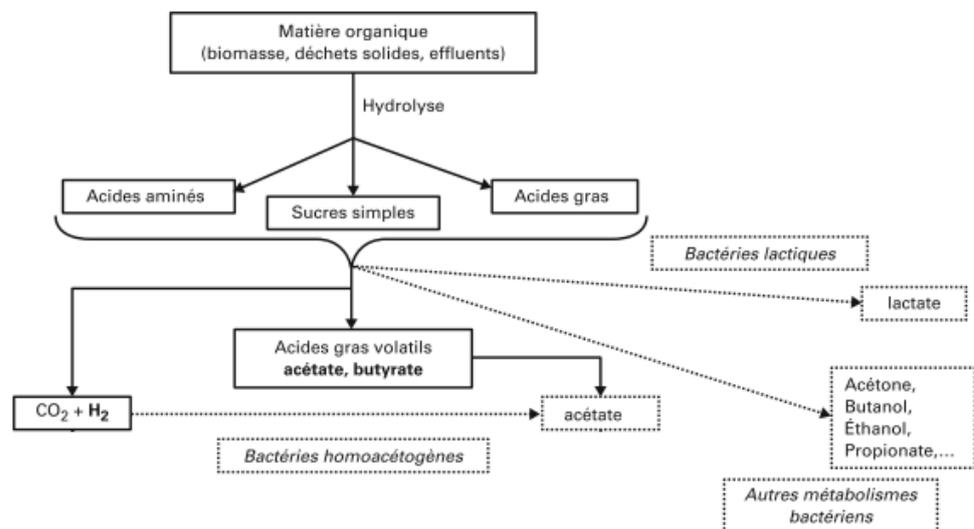


Figure 1-24 : Schéma réactionnel de la fermentation sombre adapté de Trably et al. (2018) adapté de Guo et al. (2010)

Afin de prendre en compte uniquement la consommation des sucres accessibles (et donc leur conversion), seules les productions d'AGV et d' H_2 seront utilisées dans notre étude. Le BAP (Biochemical Acidogenic Potential) représente le potentiel de fermentation.

1.4.6 Utilisation de l'imagerie

L'analyse de la composition est insuffisante pour étudier les effets des pré-traitements sur la lignocellulose (Karimi & Taherzadeh 2016a). Ces auteurs soulignent que, par exemple, il ne suffit pas de savoir quelle quantité de lignine contient une biomasse, il est également important de savoir où celle-ci est localisée et comment elle interagit avec les autres composants, dont notamment, la cellulose et les hémicelluloses. D'autre part, la relocalisation de la lignine et la délamination de la paroi cellulaire par prétraitement sont susceptibles d'être aussi importantes que l'élimination de la lignine dans l'amélioration de l'hydrolyse des lignocelluloses.

1.4.6.1 Les différentes techniques d'imagerie

De nombreuses techniques de microscopies sont utilisées dans la littérature pour observer les changements de la biomasse pré-traitée. (Chundawat et al. 2011). Cela permet d'observer les tissus végétaux à différentes échelles. Il existe de nombreuses méthodes (Tableau 1-8).

Tableau 1-8 : Recensement non exhaustif des différentes techniques d'imagerie pour observer les changements de la matière lignocellulosiques après un pré-traitement dans ordre décroissant des plus utilisées

Méthodes d'imagerie	Observations	Références
Microscopie électronique à balayage (MEB)	Caractérisation de la surface Morphologie Analyse de la microstructure	(Karimi & Taherzadeh 2016a) (Ghaffar & Fan 2013)
Microscopie électronique en transmission (MET)	Visualisation de la structure interne de la lignocellulose Modification de la lamelle moyenne Changement de la porosité	(Ghaffar & Fan 2013) (Donohoe et al. 2011)
Microscopie à force atomique (AFM)	Visualisation de la topographie de la surface d'échantillon Mesures quantitatives	(Yarbrough et al. 2009) (Lambert et al. 2019)
Microscopie optique	Visualisation de la structure globale	(Bakeer et al. 2013)
Microscope confocal à balayage laser	Image de l'objet à des niveaux de profondeurs différents	(Paës 2014)
Microscopie confocale Raman	Cartographie des changements de composition	(Ji et al. 2016)
Spectroscopie vibrationnelle : microscopie Raman cohérente (CRM)	Cartographie semi quantitative de la lignine et des glucides in situ	(Zeng et al. 2014)
Microspectroscopie Raman	Visualiser et spatialiser les changements de la composition	(Sun et al. 2013)

1.4.6.1.1 Les différentes techniques de Microscopies

Les plus utilisées sont la microscopie électronique à balayage (MEB, SEM en anglais), la microscopie électronique en transmission (MET, TEM en anglais) et la microscopie à force atomique (AFM) pour observer la structure de la lignocellulose à l'échelle nanométrique. Elles permettent l'observation de l'évolution des propriétés de la surface d'un matériel lignocellulosique (Karimi & Taherzadeh 2016a). L'analyse dispersive en énergie (EDX : Energy Dispersive X-ray) permet d'obtenir des éléments sur la composition.

Le MEB est utilisé pour examiner la microstructure, la morphologie, la structure cristalline et la taille de lignocellulose (Ghaffar & Fan 2013). C'est une technique qui utilise le principe des interactions électrons-matière. Pour les MEB à haute résolution, l'échantillon doit être rendu conducteur, ce qui est normalement réalisé en revêtant les échantillons biologiques de métal ou de carbone vaporisé.

Le TEM consiste à la « transmission » de faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre.

L'AFM est généralement utilisé pour mesurer les forces d'interaction entre le rayon de courbure de la pointe de la sonde et la surface de l'échantillon (Yarbrough et al. 2009). Les systèmes AFM utilisent généralement un circuit de rétroaction optique par lequel un point laser est réfléchi par le porte-à-faux qui maintient la pointe et la déviation de la pointe est mesurée lorsque la pointe est à sur la surface de l'échantillon. L'AFM peut être utilisée pour mesurer principalement les propriétés physiques ou topographiques, ainsi que certaines propriétés chimiques de la surface de l'échantillon. Ces observations font principalement suite à des changements visuels de certaines caractéristiques (Lambert et al. 2019). Ces auteurs ont récemment développé une méthodologie permettant non seulement de visualiser, mais surtout de quantifier l'évolution structurelle des substrats récalcitrants in situ et en temps réel par l'AFM pendant une hydrolyse enzymatique.

La microscopie confocale à balayage laser est également un outil puissant pour observer la structure de la lignocellulose mais moins utilisée que les précédents (Karimi & Taherzadeh 2016a). Pour cette technique, la source lumineuse est un laser qui balaye point par point l'objet à analyser. L'illumination et la détection sont limités à un même volume de taille réduite. L'image confocale (ou coupe optique) est ensuite obtenue par le déplacement de ce point de focalisation de la lumière d'excitation dans les trois dimensions de l'échantillon. Il existe deux types de systèmes confocaux. Le premier est le système confocal multiphoton qui utilise des lumières d'excitation dans l'infrarouge, seul le point de focalisation du faisceau laser est excitateur. Le second est le système confocal simple photon qui utilise une lumière d'excitation dont la longueur d'onde excite directement le fluorophore. Ainsi, la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau laser.

1.4.6.1.2 La fluorescence

Les techniques d'imagerie par fluorescence permettent de localiser des protéines, polysaccharides et composés phénoliques spécifiques (Jamme et al. 2013). Les parois végétales sont des matériaux autofluorescents, contenant certains fluorophores endogènes, en particulier des molécules aromatiques : monolignols dans la lignine, acide férulique et acides cinnamiques dans les hémicelluloses (Auxenfans et al. 2017). L'autofluorescence de la lignine est typiquement multimodal et très complexe (distribution spatiale et des propriétés spectrales variables). L'autofluorescence de la lignine est donc utile pour l'observation de l'architecture de la paroi cellulaire végétale. Globalement, la fluorescence de la paroi cellulaire dépend de la composition de la lignine, du type et de la teneur des liaisons entre les monolignols et le milieu environnant (proximité d'autres fluorophores, interactions avec d'autres molécules, pH, force ionique). Tous ces paramètres peuvent donc affecter le coefficient d'extinction des fluorophores, le rendement quantique et la durée de vie, modifiant ainsi l'absorption, l'émission et l'intensité de la fluorescence (Paës 2014).

1.4.6.1.3 Microspectroscopies vibratoires : les spectroscopies infrarouges ou Raman

Ces techniques permettent de fournir des informations complémentaires sur la composition moléculaire de la matière observée (Auxenfans et al. 2017). La spectroscopie vibrationnelle est largement utilisée pour caractériser la chimie de la biomasse ; en particulier, la microscopie Raman cohérente (CRM) récemment développée, qui utilise la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) et la diffusion Raman stimulée (SRS), a fourni une cartographie semi quantitative de la lignine et des glucides in situ basée sur leur mode vibratoire unique à 1600 cm^{-1} (la longueur du cycle aromatique) et 2900 cm^{-1} (C-H), respectivement (Zeng et al. 2014).

1.4.6.1.4 La (micro-)tomographie à rayons X

L'imagerie des tissus végétaux est généralement réalisée dans un champ de vision restreint, ce qui rend difficile la quantification des variations de composition à l'intérieur d'un organe tel qu'une tige. Cette technique est un outil puissant qui permet l'acquisition d'images 3D d'un échantillon entier, et plusieurs études ont été réalisées sur des matériaux végétaux (Milien et al. 2012). Cependant, le manque d'information sur la composition chimique des parois cellulaires limite la différenciation des tissus lignifiés et non lignifiés.

1.4.6.1.5 L'imagerie par spectrométrie de masse

Cette technique permet de mesurer la distribution spatio-temporelle de nombreuses biomolécules dans les tissus (Boughton et al. 2016). La résolution spatiale est supérieure à celle de la microscopie. Cela consiste à placer une section de tissu dans une source d'ions, à ioniser l'échantillon et à recueillir une série de spectres de masse. Cette série de spectres de masse individuels est collectée dans un réseau bidimensionnel (2D) à travers la section de tissu ou la surface d'un tissu en utilisant l'une des différentes sources d'ions et analyseurs de masse.

1.4.6.2 Exemples de l'application de l'imagerie à l'observation de l'effet des pré-traitements

Des exemples d'étude d'impact de pré-traitement sur différentes biomasses lignocellulosiques par différentes méthodes d'imagerie sont recensés dans le tableau 1-9.

Tableau 1-9 : Quelques observations par imagerie après pré-traitements de biomasse lignocellulosiques

Biomasse lignocellulosique et pré-traitement appliqué	Méthode d'imagerie	Observations réalisées après le pré-traitement	Références
Switchgrass prétraitée avec NaOH	MEB	<ul style="list-style-type: none"> - Ségrégation des faisceaux de fibres et isolement des cellules fibreuses - Affaiblissement de l'intégrité mécanique des particules - Particules détachées et séparées - Structure à faible densité observée sous forme de zones plus légères dans la paroi cellulaire - Déconstruction sévère par nanofibrillation et délaminage des parois intracellulaires - Contraste réduit de la paroi cellulaire indiquant une teneur réduite en lignine 	(Karimi & Taherzadeh 2016a) (Karp, E.M. et al. 2015)
Bagasse de canne à sucre pré-traitée avec Ca(OH) ₂	MEB	<ul style="list-style-type: none"> - La surface devient lisse et douce. - La fibre est broyée à partir du milieu. 	(Mustafa et al. 2018)
Canne de maïs pré-traitée avec NaOH	MEB	<ul style="list-style-type: none"> - Changement de couleur du marron clair vers le blanc indiquant une dégradation de la lignine - La fragmentation des particules et la séparation cellulaire par prétraitement peuvent être attribuées à l'élimination de la lignine et à la dépolymérisation du composé partagé dans la lamelle moyenne. - Déformation structurale des cellules fibreuses par prétraitement 	(Karimi & Taherzadeh 2016a) (Karp et al. 2014)
Paille pré-traitée avec NaOH	MEB	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'aire de la surface externe 	(Romero-Güiza et al. 2017)
<i>Miscanthus floridulus</i> pré-traité avec NaOH	MEB	<ul style="list-style-type: none"> - Apparition de pores sur la surface 	(Fu et al. 2018)
Canne de maïs pré-traité liquide ionique [C ₂ C ₁ Im][OAc]	AFM Confocal fluorescence	<ul style="list-style-type: none"> - Fibre totalement délignifiée - Diminution nette de l'intensité de la fluorescence 	(Singh et al. 2015)

Paille de blé NaOH (1-5%)	MEB	-Structure moins dense -Distorsion sur la surface -L'effet du pré-traitement augmente avec la concentration. -Dégradation des fibrilles	(Shah et al. 2018)
Paille de riz NaOH (0.25-1% (w/v))	AFM	-Diminution de la rugosité de la cuticule -Lissage de la surface	(Shabina et al. 2015)
Canne à sucre pré-traitée avec NaOH assisté par micro-ondes	MET	-Gonflement des parois secondaires -Augmentation notable de l'épaisseur des parois	(Isaac et al. 2018)
	MEB	-Elimination des couches profondes des parois cellulaires	
	AFM	-Doublement en largeur des microfibrilles de cellulose	

Souvent une analyse d'image est considérée comme qualitative et nécessite d'être complétée par des analyses quantitatives comme par exemple la mesure de la composition biochimique. Cependant, il est difficile d'obtenir une caractérisation quantitative de l'effet d'un pré-traitement.

1.4.6.3 Quantification et microscopie optique

1.4.6.3.1 Différentes colorations

Le FASGA est composé de Safranine et de bleu alcian. C'est une double coloration, non spécifique, composé d'un mélange de bleu d'alcian et de safranine colorant les holocelluloses et la lignine, respectivement (Tolivia & Tolivia 1987).

Afin de confirmer les observations réalisées avec le FASGA, il est courant d'utiliser des colorations spécifiques. Méchin et al. (2005) ont utilisé le phloroglucinol et la coloration de Mäule en plus du FASGA. En fait, la safranine n'est pas spécifique à la lignine (Wilcox 1964). Sarkanen & Ludwig (1971) ont signalé que le phloroglucinol acide avait une application universelle à toutes les lignines, bien que la réaction puisse être faible ou même absente dans les lignines contenant des quantités élevées d'unités de propane syringylé. Le réactif de Mäule, composé de permanganate de potassium est spécifique des lignines S et G (Browning 1967). Le bleu d'alcian n'est pas spécifique aux holocelluloses. La coloration Rouge Congo est spécifique à la cellulose en raison de la forte interaction avec les polysaccharides à liaisons β 1-4. La distance entre les groupes $-N = N-$ avec les groupes immédiatement adjacents est de 1,08 nm. Le motif cellobiose dans la cellulose est de 1,03 nm. Ainsi le Rouge Congo teint parfaitement la cellulose car sa molécule s'adapte bien au support (Wood 1980).

1.4.6.3.2 Exemples d'applications de ces différentes colorations sur des biomasses lignocellulosiques

Méchin et al. (2005) ont utilisé le FASGA et le réactif de Mäule pour évaluer la variation de la dégradabilité de la paroi végétale de 22 lignées différentes de maïs. La combinaison de histologie et de la biochimie a permis d'expliquer à 89% la variation de dégradabilité de la paroi cellulaire et définir un idéotype de maïs.

Y. Zhang et al. (2013) et Legland et al. (2017) ont proposé une quantification histologique des tiges de maïs utilisant le colorant FASGA permettant une double coloration des holocelluloses et de la lignine. Le but de ces quantifications était d'élucider la base génétique du dépôt et de la distribution de la lignine tout au long des sections de la tige ou de discriminer des génotypes contrastés et d'identifier les changements histologiques induits par des facteurs environnementaux tels que le déficit en eau, respectivement.

1.5 Conclusion et objectifs de cette thèse

La DA présente un intérêt particulier dans le contexte de développement d'EnR, principalement dans le domaine agricole puisqu'elle permet la valorisation énergétique et agronomique de déchets organiques et des biomasses lignocellulosiques.

Dans le contexte du PIA BFF, le sorgho et le miscanthus sont les deux biomasses qui seront étudiées, choisies pour leurs nombreux avantages présentés à plusieurs reprises précédemment. D'après la littérature, l'emploi de pré-traitements pour maximiser le potentiel méthane et la cinétique de dégradation de biomasses lignocellulosiques est courant. En effet, cette revue bibliographique a mis en évidence la récalcitrance à la dégradation de ce type de biomasse en raison de nombreuses liaisons entre la lignine et les carbohydrates formant une structure stable et complexe. Il a également été souligné que la cristallinité de la cellulose est une caractéristique à ne pas négliger. Un accent a été porté sur les pré-traitements de type chimiques et plus particulièrement alcalins qui ont été montrés à de nombreuses reprises comme efficaces pour améliorer les performances de la DA de la lignocellulose. Dans le contexte du développement de la DA en milieu agricole, l'optimisation de ces pré-traitements et leur application en co-digestion avec du fumier bovin en voie sèche discontinuée a été étudiée dans cette thèse.

Cependant, la bibliographie recense très peu d'études sur la compréhension des mécanismes, du mode d'action de ce type de pré-traitement. Nous pouvons nous demander : quel tissu et quelles liaisons sont préférentiellement dégradés ? Des questions ne sont toujours pas résolues, en particulier : Comment peut-on expliquer la différence de performance entre différents réactifs alcalins ?

C'est toute l'originalité de cette thèse d'utiliser des méthodes de quantification histologiques afin de comprendre les mécanismes d'action d'agents alcalins sur la matière.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Les biomasses utilisées

2.1.1 Sorgho

Le sorgho utilisé est le génotype commercial Biomass 140. Il a été cultivé dans le sud de la France à l'unité expérimentale du CIRAD sur un sol argilo limono-argileux très calcaire (Trouche et al. 2014). Après la récolte, il est séché au champ puis broyé (60 mm broyeur à végétaux Viking GE335, 1 mm : broyeur FRITSCH Pulverisette 14). Les coupes transversales d'entre nœuds (partie de la tige située entre 2 nœuds successifs) de 2 mm ont été réalisées avec une scie (Scie à Chantourner 65W, 1440 round-trip /Min, Castorama-France). Les coupes transversales de 115 µm ont été réalisées grâce à l'utilisation d'un Vibratome (Microm HM650V). Les premiers et derniers entre-nœuds n'ont pas été utilisés. En attente d'être utilisées, elles ont été stockées à 4°C dans une solution d'éthanol à 70%. Le sorgho broyé à 1 mm d'une part et celui broyé à 60mm ou bien coupé transversalement d'autre part, n'a pas été cultivé la même année. Il a été démontré, par nos partenaires du CIRAD qui ont fourni la biomasse, qu'il y avait un effet année mais le génotype a généralement un effet plus important que l'effet année (Trouche et al., 2014; Luquet et al., 2018). Un seul génotype ayant été utilisé, l'effet environnemental est amoindri.

2.1.2 Miscanthus

Parmi les génotypes étudiés dans le cadre du projet BFF, le *Miscanthus x giganteus* Floridulus a été choisi pour l'étude de l'impact des pré-traitements car c'est celui dont le potentiel méthane était le moins élevé. Le *Miscanthus x giganteus*, destiné à une production "industrielle", est un hybride issu du *Miscanthus sinensis* et du *Miscanthus sacchariflorus*. Il a été cultivé dans le Nord de la France (49°53 N, 3°00 E) à l'unité expérimentale de l'INRA d'Estrées-Mons et récolté en hiver 2015 au cours de sa huitième année de culture. Le sol est un sol limoneux profond (Orthic Luvisol, ville, abréviation d'état si USA, pays, classification FAO). Le climat est océanique. Les tiges ont été séchées à 64 °C pendant 4 jours dans un four ventilé (Arnoult et al. 2015). Elles ont été broyées à différentes granulométries (60 mm : Viking, model GE 220, 20 mm : broyeur FRITSCH, 1mm : FRITSCH Pulverisette 14). Pour les coupes transversales de tige de 2cm et 110 µm d'épaisseur réalisées comme précédemment, le miscanthus utilisé est le même génotype mais récolté en 2018 et âgé de 12 années. Pour ces années, la plante étant adulte, les caractéristiques varient moins pour un stade plus jeune. De plus, Arnoult et al. (2015) ont montré un effet limité de l'année de culture sur les teneurs en cellulose, hémicellulose et lignine pour les plantes adultes.

2.1.3 Fumier

Le fumier bovin utilisé lors des essais en co-digestion provenait de la litière de paille de blé de vaches laitières. Il a été collecté dans une ferme du sud de la France en hiver 2015 et stocké à -20 °C. Une partie a été décongelée avant le début de chaque lancement des réacteurs à recirculation.

2.2 Pré-traitements alcalins

2.2.1 Justification du choix des pré-traitements et présentation de leurs conditions opératoires

Dans cette étude, deux agents alcalins différents ont été utilisés : la soude (NaOH, Sigma) et la chaux vive (CaO, Akdolit[®] Q90; purity $\geq 92\%$). En effet, l'hydroxyde de sodium a un coût moindre que celui de la potasse et d'une solubilité très supérieure à celle de la chaux, qui en font la base minérale la plus utilisée. Il est obtenu par caustification au départ du carbonate de sodium, contenu dans certains minerais et les cendres végétales ou bien à partir d'eau de mer (méthode Solvay). Aujourd'hui 99 % de la production est d'origine électrochimique, sous forme de solutions titrant environ 500 g.L^{-1} , dont on tire l'hydroxyde de sodium par évaporation de l'eau. La chaux ou encore oxyde de calcium, CaO, est obtenue par la pyrolyse du calcaire, pierre riche en carbonate de calcium CaCO_3 . L'utilisation de la chaux vive CaO a été préférée à celle de la chaux éteinte Ca(OH)_2 car son hydratation est une réaction exothermique (+1155 kJ) et elle possède un pouvoir alcalin plus important par unité de masse. La chaleur ainsi libérée pourrait donc augmenter l'effet du pré-traitement.

Leur quantité a été raisonnée en dose ($\text{g}_{\text{réactif}}.100\text{g}_{\text{MS}}$) plutôt comme concentration afin de pouvoir comparer avec la littérature et d'être précis.

Les différentes conditions opératoires utilisées seront présentées dans le tableau 2-1. Les conditions seront rappelées en début de chaque sous partie des différents chapitres.

Tableau 2-1: Résumé des conditions opératoires des différents pré-traitements réalisés (hors expériences complémentaires)

Biomasse	Granulométrie (mm)	Réactif	Température (°C)	Concentration (g.100g _{MS})	Durée (j)	Teneur en MS (%)	Digestion	Histologie	Chapitre		
Sorgho	2 (coupe transversale)	NaOH	55	10	1	4	AMPTS	oui	5.3		
		CaO					BMP		3.2.2		
	1	NaOH							CaO	BMP	3.3.3
	60	NaOH					Tamb	13	5	BMP	non
		CaO	BMP réacteurs		3.3.3						
		NaOH	BMP		4.3.1						
		CaO	BMP		4.3.1						
		NaOH	BMP réacteurs								
		CaO									
	Miscanthus	2 (coupe transversale)	NaOH		55	10	1	4	AMPTS	oui	5.3
CaO			BMP	3.2.3							
1		NaOH	Tamb	20			4	AMPTS	non	3.3.1	
		CaO					6				
		NaOH			4						
		CaO			4		4				
20		NaOH		6	20						
		CaO									
60		NaOH		5-10-15	1		13	BMP			3.3.2
		CaO		2.5-7.5-12.5-17.5	3						
		CaO		5-10-15	5						
								Réacteurs*			4.2

*uniquement 5 et 10%

2.2.2 Mise en œuvre des pré-traitements

2.2.2.1 Pour les mesures BMP

Afin d'éviter toute perte de matière, les pré-traitements ont été réalisés dans les bouteilles de 500mL également utilisées pour les tests de potentiel méthane (BMP). Ils sont réalisés avec une quantité de biomasse de 2g_{TS}. Cette quantité est directement introduite dans le fond des fioles après une tare de la fiole vide préalablement étiquetée (balance Precisa XT 1220 M). Le réactif est pesé (balance Sartorius CPA2245) dans un pot en plastique de 40 mL. Sa quantité a été calculée en fonction de la dose souhaitée. L'eau distillée en quantité nécessaire pour respecter la teneur en matière sèche souhaitée lors du pré-traitement est mesurée dans une éprouvette. L'eau est ensuite versée sur les réactifs. Une fois cette solution de pré-traitement homogène, elle est versée sur la biomasse. Les bouteilles sont ensuite fermées par un bouchon ou septum afin d'éviter toute évaporation d'eau. Dans le cas des pré-traitements à forte teneur en matière sèche, la biomasse et la solution de pré-traitement sont homogénéisées à l'aide d'une spatule. Les fioles restent, ensuite, sur la pailasse du

laboratoire sans agitation pendant toute la durée du pré-traitement quand ils ont été réalisés à température ambiante (Figure 2-1) ou bien placées dans une étuve (Bioblock Scientific 3540-1B10 ou Innova 43, Incubator Shaker Series) préchauffée à la température souhaitée et programmée à 120 RPM.

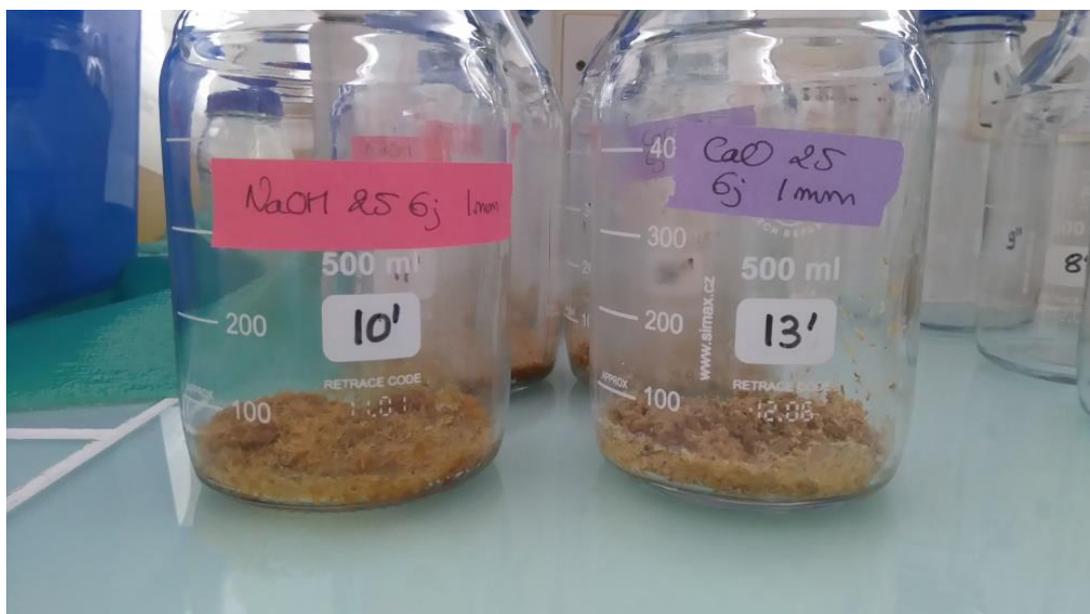


Figure 2-1 : Pré-traitement à forte teneur en matière sèche sur de la biomasse 1mm

2.2.2.2 Pour les analyses en microscopie

Les tiges broyées 1mm ou bien les tronçons d'1cm ont été pré-traités en utilisant le même protocole présenté précédemment. Le pré-traitement des coupes transversales de 115 μ m est réalisé dans des flacons de 40mL placés sous agitation dans une étuve chauffée à 25°C ou 55°C (Figure 2-2).

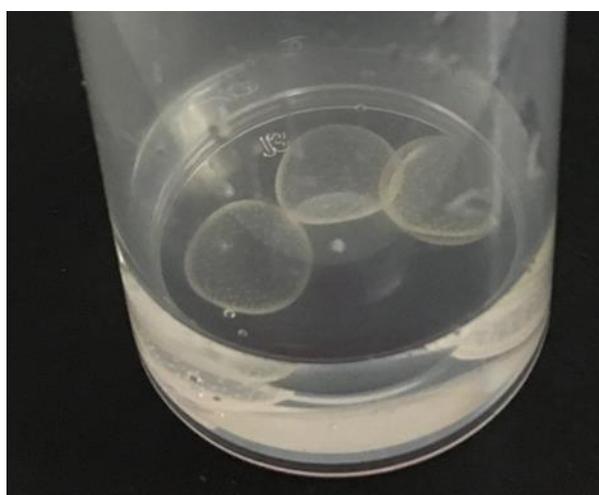


Figure 2-2 :Pré-traitement de coupes de 110 μ m

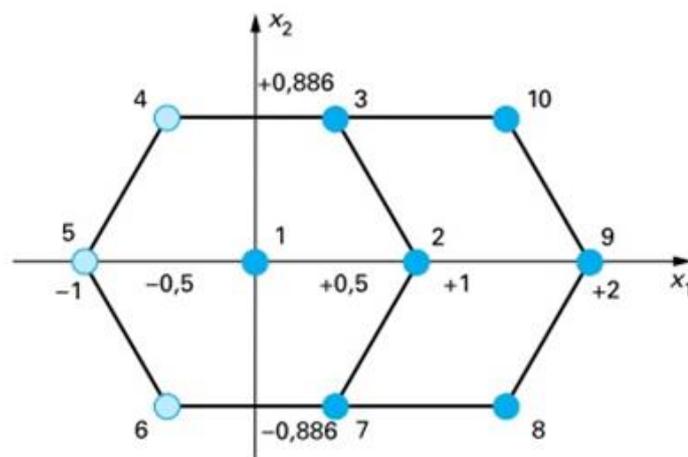
2.2.3 Préparation de la matière et liquides à l'issue d'un pré-traitement

Pour les analyses, après pré-traitements, le liquide et la matière solide sont séparés à l'aide d'un tamis de 250 μ m (marque). Le liquide est récupéré et acidifié à 4% (w/w) avec H₂SO₄ 72% pour des soucis de conservation à 4°C. Le solide est lui rincé 2 fois avec de l'eau distillée (2 rinçage à 120 RPM pendant 15 min) afin d'enlever les résidus de réactifs et les composés solubles. Cette matière est ensuite lyophilisée puis pesée pour quantifier la solubilisation de la matière engendrée par le pré-traitement. Une fois, lyophilisée, les matières de granulométrie supérieure à 1mm sont broyées à 1mm au moyen d'un broyeur FRITSCH Pulverisette 14. Le rinçage, la lyophilisation et le broyage à 1mm permettent de réduire les erreurs de mesure lorsque la méthode NREL de mesure de la composition biochimique est utilisée (Karimi and Taherzadeh 2016).

Les coupes de 110 μ m ont été rincées trois fois avec de l'eau distillée, une fois avec une solution tampon de phosphate (pH 7,2, 0,2 M) et une dernière fois avec de l'eau distillée. L'utilisation d'une solution de phosphate a permis de neutraliser le pH pour s'assurer que les colorations ne soient pas altérées par l'alcalinité du prétraitement.

2.2.3 Plan d'expérience pour étudier l'influence de la concentration en chaux et de la durée du pré-traitement, plan de Doehlert

Pour une partie des pré-traitements du miscanthus à la chaux, un plan à surface de réponse a été utilisé afin d'évaluer l'effet du prétraitement au CaO sur le BMP et la constante cinétique du premier ordre k, un réseau uniforme de type Doehlert-type à deux facteurs a été utilisé pour définir la matrice expérimentale. En raison de la non obtention d'un maximum, ce réseau a été étendu comme indiqué sur la Figure 2-3.



Les points 1 à 7 illustrent un premier plan de Doehlert.
Les trois points 8, 9 et 10 illustrent les expériences supplémentaires.
Les points 2, 7, 8, 9, 10, 3 et 1 illustrent un deuxième plan de Doehlert.

Figure 2-3: plan de Doehlert et son extension possible pour une variable

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Thomas et al. 2018). Le principe et les forces d'une telle conception sont décrits par Goupy et al (2014) (Goupy 2014) et par Witek-

Krowiak et al (2014)(Witek-krowiak et al. 2014). Il s'agit d'un plan Doehlert à deux variables ($z = 2$) et nécessite des expériences $N = z^2 + z + z + C$, avec z comme nombre de variables et C comme nombre de points centraux. Ici, N est égal à $2^2 + 2 + 2 + 1 = 7$, le point central a été répété une fois. Comme pour chaque condition, les expériences ont été réalisées en duplicats, le nombre total était de 16. Les deux variables d'intérêt (appelées facteurs) ont été définies comme la concentration de CaO appliquée pour le prétraitement (variable A) et la durée du prétraitement (variable B). Les gammes de valeurs à étudier pour les deux facteurs ont été sélectionnées sur la base de la littérature et d'expériences préliminaires réalisées au laboratoire. Ainsi, pour la variable (A), la concentration en chaux était comprise entre 7,5 et 17,5 % (% de la moyenne gCaO pour 100 gTS). Pour la variable (B), l'intervalle était compris entre 1 et 5 jours. Comme aucun optimum n'a été trouvé dans le domaine étudié, la plage de la variable (A) a été étendue à une deuxième série d'expériences et définie entre 2,5 et 12,5 %. Les domaines expérimentaux, exprimés sous forme codée ($\pm 0, 0,5, 0,866$ et 1).

Une équation polynomiale complète du second ordre a été utilisée pour modéliser les valeurs obtenues pour BMP et la constante cinétique du premier ordre k en fonction de la concentration en chaux (A) et la durée de pré-traitement (B) :

$$Y = a_0 + a_1A + a_2B + a_{12}AB + a_{11}A^2 + a_{22}B^2 \quad \text{Equation (1)}$$

où Y est le BMP ou la constante cinétique du premier ordre k , a_0 est le terme constant, a_1 et a_2 sont les coefficients linéaires associés à chaque variable, a_{12} est le coefficient associé à l'interaction entre les deux variables, et a_{11} et a_{22} sont les coefficients quadratiques. Un calcul détaillé des coefficients est déjà disponible dans la littérature (Rossi and Haupt 2007). Le modèle a été validé à l'aide d'un test de Fischer. La signification de chaque coefficient du modèle a été testée à l'aide d'un test t de Student (Rossi and Haupt 2007). Les résultats ont ensuite été comparés à l'aide d'effets normalisés dans un diagramme de Pareto.

Les résultats seront abordés dans le chapitre 3, partie 3.3.2.

2.2.4 Présentation des différentes conditions opératoires de chaque expériences complémentaires

Différents pré-traitements complémentaires ont été réalisés afin d'étudier différentes hypothèses d'explication de la différence de performances entre la soude et la chaux. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 3, partie 3.4.

2.2.4.1 Essai avec des concentrations soude et chaux à normalité ou molarité identiques

Les pré-traitements ont été réalisés avec des concentrations massiques. Or, il s'avère que pour les deux réactifs utilisés cela ne représente pas des molarités ou normalités identiques (Table 2-2).

Table 2-1 : Conditions de dose des réactifs alcalins pour l'étude de l'impact de la concentration et son équivalent en molarité et en normalité

Pré-traitement	Dose (g _{réactif} ·100g _{MS} ⁻¹)	Molarité (mol.L ⁻¹)	Normalité (mol.L ⁻¹)
M_1_NaOH_14.4_20_4d	14,4	0,72	0,72
M_1_CaO_14_20_4d	14	0,5	1
M_1_NaOH_10_20_4d	10	0,5	0,5
M_1_CaO_10_20_4d	10	0,36	0,72

Afin d'étudier si cela avait un impact, une étude complémentaire a été menée (Chapitre 3 partie 3.4.1). Les pré-traitements ont été réalisés dans des conditions identiques sur le *Miscanthus. x giganteus* Floridulus broyé à 1 mm. : sans agitation, avec une teneur en matière sèche de 20%, d'une durée de 4 jours.

2.2.4.2 Etude de la limite de la solubilité de la chaux

La limite de solubilité de la chaux à 20°C est de 1.65g.L⁻¹. Comme précédemment, Les pré-traitements ont été réalisés dans des conditions identiques sur le *Miscanthus. x giganteus* Floridulus broyé à 1 mm : sans agitation, avec une teneur en matière sèche de 20%, d'une durée de 4 jours. A cette teneur en MS, la dose a donc été de 0.83%. Pour pouvoir comparer cette effet, une dose de soude correspondant à la normalité de la dose à la limite de solubilité de la chaux a été utilisée (Table 2-3).

Tableau 2-3: Conditions de dose en réactifs alcalins pour l'étude de l'impact de la solubilité de CaO

Pré-traitement	Dose (g _{réactif} ·100g _{MS} ⁻¹)	Normalité (mol.L ⁻¹)
M_1_CaO_0.83	0.83	0.059
M_1_NaOH_1.2	1.2	0.059

2.3 Digestion anaérobie

2.3.1 Inoculums

2.3.1.1 Inoculum BMP : boues de procédés UASB

Cet inoculum est composé de boues granulaires issues d'un digesteur UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) traitant des effluents de la sucrerie Compagnie Saint Louis Sucre de Marseille.

2.3.1.2 Inoculum BAP / BHP : boues secondaires de station d'épuration

L'inoculum utilisé pour cette expérience provenait du bassin aéré de la station d'épuration de Narbonne. Afin d'éliminer les micro-organismes consommateurs d'hydrogène

et de ne conserver que ceux ayant une capacité sporulante et producteur d'hydrogène, un pré-traitement thermique (90°C pendant 30 min) lui a été appliqué (Guo et al. 2010). Il s'est effectué à l'aide d'une plaque agitante chauffante IKA C-MAG HS7 reliée à un contrôleur de température IKATRON ETS-D5.

2.3.1.3 *Inoculum LBR : digestats*

Raposo et al. (2011) ont rapporté qu'il était préférable d'inoculer initialement un méthaniseur avec un digestat issu de la digestion d'un substrat similaire pour récupérer les microorganismes spécifiques impliqués dans la dégradation du substrat. Le digestat et le lixiviat de chaque LBR de l'expérience précédente étaient donc récupérés, conservés à 35°C et réutilisés dans l'expérience suivante. Dans les cas de prétraitements, seuls les digestats des substrats non pré-traités ont été réutilisés afin d'éviter tout pré-traitement « passif » ou introductions d'ions Na^+ ou Ca^{2+} .

2.3.2 Test BMP

Le test BMP (Biochemical Methane Potential) permet de déterminer la production maximum de méthane d'un substrat en conditions optimales pour l'activité des microorganismes. Le potentiel méthane est le volume de méthane produit lors de la dégradation de l'échantillon, rapporté à la quantité d'échantillon initialement introduite (en TS ou VS et exprimé dans les conditions normales de température et pressions (0°C, 1013hPa).

Ce test est réalisé dans des bouteilles plasma de 500 mL dont le volume est mesuré précisément (par pesée du volume d'eau) et bouchées par des septa en caoutchouc. Le volume utile est de 400mL.

Les fioles sont préparées avec 2 g de matière sèche d'échantillon, une concentration en inoculum de $5 \text{ g}_{\text{VS}} \cdot \text{L}^{-1}$, 4 mL d'une solution d'oligo-éléments (FeCl_2 , $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; CoCl_2 , $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; MnCl_2 , $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; NiCl_2 , $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; ZnCl_2 , $0,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; H_3BO_3 , $0,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; Na_2SeO_3 , $0,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; CuCl_2 , $0,04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; Na_2MoO_4 , $0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 8,6 mL d'une solution de macro-éléments (NH_4Cl , $26,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 , $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; MgCl_2 , $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; CaCl_2 , $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) nécessaires à la croissance des micro-organismes ainsi qu'avec 26,8 mL de tampon bicarbonate (NaHCO_3 , $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Avant de boucher les fioles et de les mettre à agiter dans une enceinte chauffée à 35°C (Figure 2-4), celles-ci sont flushées à l'azote. Dans le cas de substrats pré-traités, le liquide et les solides restent dans la fiole et ce sont les différentes solutions qui sont ajoutées, l'inoculum étant ajouté en dernier afin de ne pas le mettre en contact avec les solutions alcalines. Chaque condition se fait en triplicats. Dans chaque série de test BMP, un témoin est réalisé. C'est-à-dire que le potentiel méthane de l'inoculum est mesuré afin de pouvoir le soustraire à celui des échantillons. La matière étant pré-traitée directement dans les fioles BMP, les productions de méthane sont exprimées en volume de méthane produit par gramme de matières organiques initiales ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$).



Figure 2-4: fioles de test BMP sur un tiroir de la table agitante placée dans une pièce thermostatée à 35°C

2.3.2.1 BMP (Biochemical Methane Potential), mesure manuelle

Au début, la pression est relevée et les fioles dégazées tous les jours puis tous les 2 jours, 3 jours et enfin toutes les semaines sur plus de 50 j à l'aide d'un manomètre Mano200 Keller Leo2. A chaque relevé de pression et avant dégazage, 250µL de gaz sont prélevés et analysés par chromatographie gazeuse TCD (cf 2.4.1). Ensuite, les fioles sont dégazées. La mesure du volume de gaz produit se fait donc par différence de pression calculée et grâce à la loi des gaz parfait (Equation 2).

$$\Delta V_{CH_4} = \left(\left[y(j)P1(j) \frac{V}{RT} \right] - \left[y(j-1)P2(j-1) \frac{V}{RT} \right] \right) \frac{RT^\circ}{P^\circ} \quad \text{Equation (2)}$$

Où P1(j) est la pression dans la fiole au prélèvement actuel lue au manomètre (Pa), P2(j) est celle dans la fiole après dégazage lors du prélèvement précédent (Pa), y(j-1) et y(j) sont les teneurs en CH₄ dans le biogaz le jour du prélèvement précédent et celui actuel respectivement, ΔV_{CH₄} le volume de méthane produit depuis le dernier prélèvement (mL), R la constante des gaz parfaits (8.314 J.(mol.K)⁻¹), V, le volume du ciel gazeux (mL), T la température dans la bouteille (K), T° et P°, les température et pression en conditions normales de température et pression (273,15 K, 1013 hPa).

2.3.2.2 AMPTS (mesure automatisée des potentiels méthanogènes)

Ce système a été conçu par une entreprise suédoise (BioProcess Control). Il permet la mesure en temps réel de très faibles débits de méthane issus de la digestion anaérobie de tout substrat biologiquement biodégradable à l'échelle du laboratoire. Ce système est constitué de 3 unités (Figure 2-5). (Bioprocess Control, 2011).

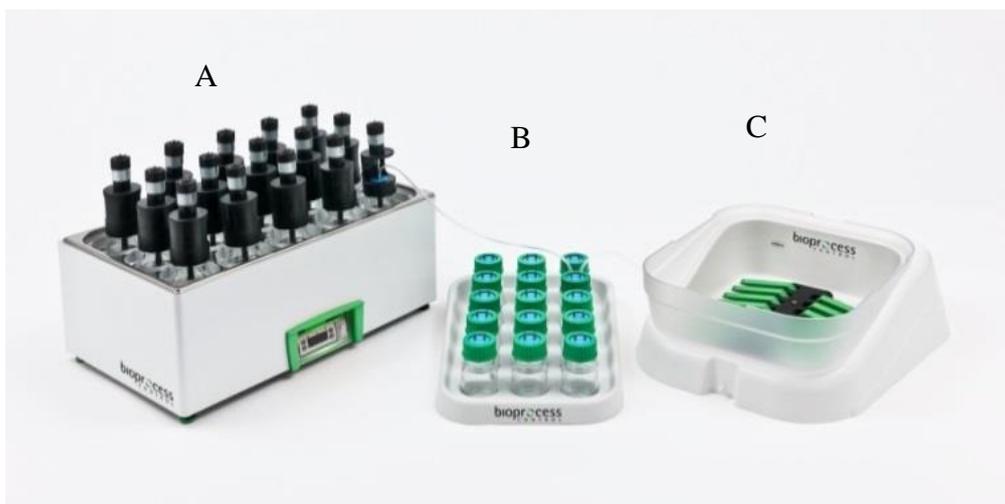


Figure 2-5: Automatic Methane Potential Test System (AMPTS)

L'unité A est l'unité d'incubation des échantillons, elle est composée de 15 réacteurs agités de 500 mL placés dans un bain marie à 37 °C.

L'unité B est celle de capture du CO₂. Via ce système, chaque digesteur est relié à un flacon de soude 3 M. Le CO₂ du biogaz est fixé à 98% par cette solution qui piège également H₂S. Le biogaz qui arrive à l'unité de mesure est considéré comme composé uniquement de CH₄. Un indicateur coloré du pH (la thymolphthaléine 0,4%) est ajouté à chaque flacon de soude pour contrôler la saturation des solutions en acides. Initialement bleue, la solution de soude doit être changée lorsqu'elle devient rose.

Le volume de méthane sortant de l'unité de capture du CO₂ est mesuré par un capteur volumétrique multivoies (unité C). Chaque cellule est calibrée et son volume est connu (10 mL environ). Lorsqu'une cellule est pleine, elle se soulève et libère une bulle de méthane. Une pulsion est alors enregistrée sur l'interface via un système embarqué d'acquisition des données.

2.3.3 Réacteurs batch voie sèche à recirculation du lixiviat

Six LBR ont été exploités en parallèle. Chaque réacteur était composé d'un réacteur cylindrique en verre à double enveloppe de 7,3 L de 14,5 cm de diamètre et 38,0 cm de hauteur intérieure. Les LBR ont été maintenus dans des conditions mésophiles (37°C) en recirculant l'eau d'un bain thermorégulé dans la double enveloppe (Figure 2-6). Un tamis de 1 mm a été placé à 10,0 cm du fond de chaque réacteur pour retenir le substrat solide, créant ainsi un volume de 1,7 L au fond des réacteurs pour le stockage temporaire des lixiviats. Le substrat solide occupait un volume de 3,0 L alors que l'espace de tête était de 2,9 L. Une pompe péristaltique a été utilisée pour extraire le lixiviat qui s'accumulait au fond du réacteur et l'asperger par le haut (1L toutes les 2h). Au niveau de ce circuit de recirculation, un point de prélèvement a été installé à environ 10 cm de la sortie du réacteur afin de pouvoir suivre l'évolution du pH et de la concentration en AGV (Acides Gras Volatils). Le calcul du volume de méthane produit est calculé comme pour les BMP en fonction du volume de biogaz produit (mesuré par un compteur gaz Ritter) et des analyses GC gaz régulières. Les productions de méthane sont exprimées en quantité de matières organiques totales (c'est-à-dire substrat

+inoculum ; $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$). Dans certains cas, la quantité de matière organique de l'inoculum ne sera pas prise en compte. Cela sera précisé dans l'unité ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}_{\text{substrate}}}^{-1}$).

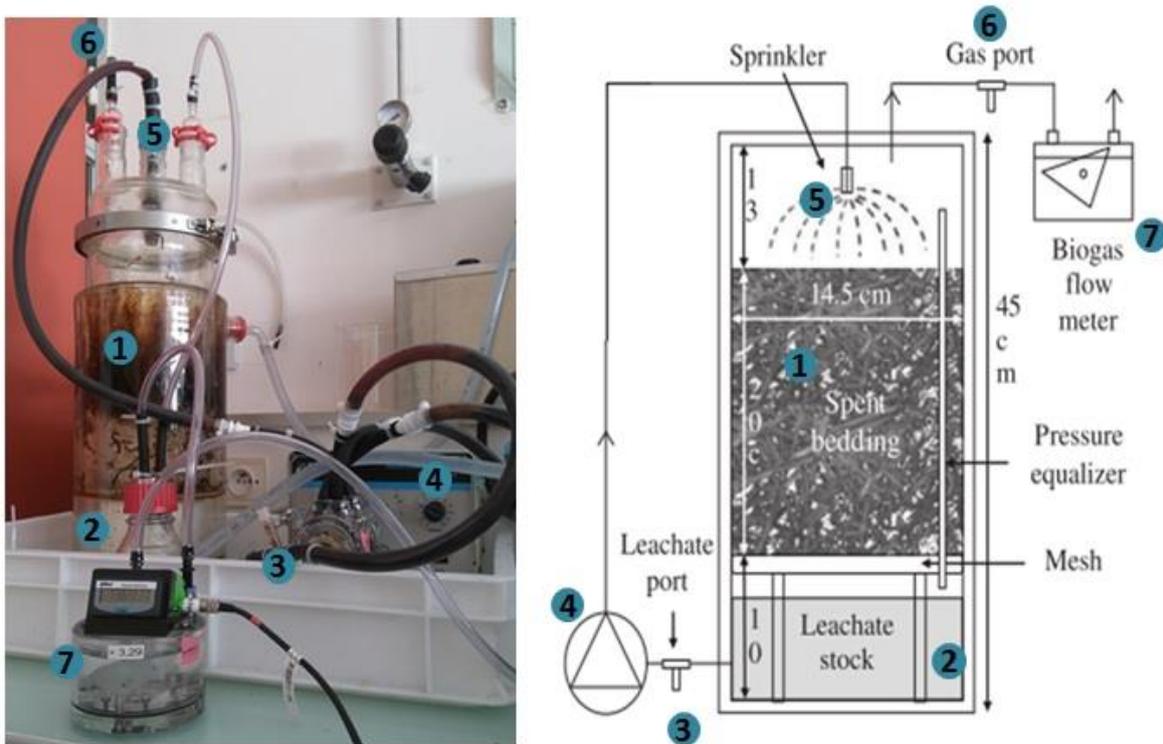


Figure 2-6: Réacteur batch à recirculation. Photographie d'un réacteur utilisé (a), détails (b) de (Riggio et al. 2017)

Tout comme pour les pré-traitements, par soucis de clarté du manuscrit, les conditions opératoires seront brièvement indiquées dans ce chapitre (Tableau 2-4) et seront explicitées en début de chaque sous-chapitre correspondant.

Tableau 2-4: Conditions opératoires des réacteurs LBR

Ratio de l'alimentation (% _{VS})	Pré-traitements*	S/X	MS Total	Chapitre 4
60% fumier -40% miscanthus	CaO 5 ou 10% 5j	8	309	4.2
61% fumier -40% sorgho	NaOH 10% 1j, CaO 10% 5j	8	298	4.3.1
100% fumier	NaOH ou CaO 3,9%	8		4.3.2

*pour le cas de la mono-digestion du fumier, ce n'est pas un pré-traitement, la solution est mélangée au fumier au début du batch

D'après Raposo et al. (2011), le choix du ratio S/X n'a pas d'influence sur le potentiel méthane mais plutôt sur la cinétique de production de méthane. Le choix de ce ratio s'est fait afin de ne pas provoquer d'inhibitions par une production trop rapide d'AGV, soit un ratio S/X compris entre 6 et 8. La concentration totale en matière sèche dépend du volume du réacteur. Elle correspondait à la hauteur de biomasse qui une fois tassée à l'aide de 2 poids de 1kg ne dépasse pas la partie chauffée du réacteur. Le lixiviat était mélangé à de l'eau

tamponnée avec du bicarbonate de sodium ($1,3 \text{ g.L}^{-1}$) afin qu'une quantité suffisante soit disponible pour la recirculation jusqu'à la fin de l'expérience.

Théo Closet, étudiant en 2^{ème} année à l'IUT d'Aix Marseille, a contribué à la conduite de 2 séries d'expérimentations.

2.4 Analyses

2.4.1 Détermination de la composition du biogaz

La détermination de la composition du biogaz produit lors des différents tests BMP et des réacteurs LBR a été réalisée par une GC Perkin Elmer Clarus 480 ou GC Perkin Elmer Clarus 480, respectivement et du logiciel TotalChrom Navigator. Les deux chromatographes sont équipés de deux colonnes capillaires: (i) RtUBond column ($30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 10 \text{ }\mu\text{m}$) permettant la séparation du CO_2 des autres gaz (H_2S , O_2 , N_2 , CH_4) ou (H_2 , O_2 , N_2 , CH_4) qui eux sont séparés avec: (ii) RtM-olsieve 5A column ($30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 30 \text{ }\mu\text{m}$). Le gaz vecteur est l'hélium ou l'argon, suivant l'appareil utilisé. Les températures sont de $65 \text{ }^\circ\text{C}$ pour le four et de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ pour l'injecteur et le détecteur. La détection se fait grâce à un détecteur à conductivité thermique.

2.4.2 Acides Gras Volatils et alcalinité

Les acides gras volatils (AGV) ont été mesurés dans les lixiviats des réacteurs. Au préalable, le lixiviat doit être centrifugé ($13,4 \cdot 10^3 \text{ RPM}$, 13 min, Eppendorf Mini Spin) puis filtré à $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ au moyen d'un filtre seringue en nylon. Un mélange égal d'échantillon et d'étalon interne est ensuite analysé en chromatographie en phase gazeuse, calibrée pour mesurer les AGV suivants : acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, isovalérique et caproïque. Le chromatographe utilisé est un Perkin Clarus VARIAN 580 (PerkinElmer®, Waltham, USA) muni d'un injecteur chauffé à 250°C et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) à 280°C et est équipé d'une colonne Elite-FFAP crossbond®carbowax® 15 m chauffée à $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Le gaz vecteur est du N_2 injecté à 6 mL.min^{-1} .

Les équivalents acétiques acides des AGV utilisés pour calculer le rapport AGV Totaux/alcalinité sont : 1,0 (C2), 0,818 (C3), 0,682 (C4), 0,588 (C5) et 0,515 (C6). Ces coefficients correspondent au rapport entre la masse molaire de l'acide acétique et celle de l'AGV concerné. Les mesures d'alcalinité ont été réalisées sur certains lixiviats par à l'acide chlorhydrique 0,1 M jusqu'à une valeur finale en pH de 4,3 (Ripley, Boyle, and Converse 1986).

2.4.3 pH

Le pH a été mesuré sous agitation par une électrode WTW pH-electrode SenTix 41 connectée à un lecteur WTW inoLab pH 7110 operational manual transmitter.

2.4.4 Caractérisation du substrats

2.4.4.1 Mesure de la matière sèche et de la matière organique

La méthode utilisée est en accord avec les méthodes standard de l'APHA (APHA American Public Health Association 1998).

Mesure de la matière sèche :

$$MS(\% \text{brut}) = \frac{\text{masse séchée à } 105^{\circ}\text{C}}{\text{masse prise d'essai}} \times 100 \quad \text{Equation (3)}$$

Mesure de la matière organique après calcination de la matière sèche :

$$MO(\%MS) = \frac{\text{masse séchée à } 105^{\circ}\text{C} - \text{masse séchée à } 550^{\circ}\text{C}}{\text{masseséchée à } 105^{\circ}\text{C}} \times 100 \quad \text{Equation (4)}$$

2.4.4.2 Mesure des solubles

Cette mesure a été réalisée selon la procédures analytiques de laboratoire (LAP) établies par le Laboratoire national des énergies renouvelables (NREL) « Détermination of extractives in Biomass » (Sluiter et al. 2008). L'extraction a été réalisée à l'eau à l'aide d'une ASE (Extraction Accélérée par Solvant). Les échantillons ont ensuite été filtrés et analysés par HPLC. Les résultats étant de 7.7 et 0.4 % pour le sorgho et le miscanthus, respectivement. La teneur est un peu élevée pour le sorgho, cependant comme la matière pré-traitée a été lavée (pour éviter toutes interactions avec les réactifs alcalins), la méthode suivante peut être utilisée.

2.4.4.3 Lignine klason, cellulose et hémicelluloses

C'est une méthode NREL (A. Sluiter et al. 2011). Tous les échantillons prétraités et non pré-traités ont été broyés en particules de 1 mm à l'aide d'un broyeur FRITSCH Pulverisette 14. Les échantillons (100 mg) ont été hydrolysés avec 1mL d'H₂SO₄ 72% pendant 1 h à 30°C sous agitation grâce à une plaque agitante chauffante IKA C-MAG HS7 reliée à un contrôleur de température IKATRON ETS-D5, puis dilués avec le l'eau MilliQ pour atteindre une concentration finale en acide sulfurique de 4% et maintenus à 120°C pendant 1 h sous agitation. Le mélange a été filtré au travers de filtre en papier de verre (GFF, WHATMAN). Ce résidu insoluble est placé dans un creuset. Le creuset et la fibre de verre ont été séchés à 105°C pendant 24 h et brûlés à 550°C pendant 3 h afin de déterminer la teneur en lignine Klason, appelée également lignine acido-insoluble (Equation 5). Le filtrat a été filtré à travers des filtres en nylon (0,20 µm) pour l'analyse des du glucose, du xylose et de l'arabinose par analyse en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Cf 2.4.4.4) afin de déterminer les teneurs en cellulose et hémicelluloses (Equations 6 et 7).

$$\%(LAI) = \frac{\text{masse après séchage} - \text{masse après combustion}}{\text{masse de l'échantillon pesé pour l'hydrolyse acide}} * 100 \quad \text{Equation (5)}$$

$$\text{Cellulose (\%)} = \frac{\text{Glucose (\%)}}{1,11} \quad \text{Equation (6)}$$

$$\text{Hémicelluloses (\%)} = \frac{\text{Xylose (\%)} + \text{Arabinose (\%)}}{1,13} \quad \text{Equation (7)}$$

Avec : Cellulose et Hémicelluloses exprimées en % de matière sèche initiale ; Glucose, Xylose et Arabinose, sont exprimées en % ($\text{g} \cdot \text{g}_{\text{biomasse initiale}}^{-1}$) ; 1,11 le facteur de conversion pour les polymères à base de glucose (glucose) en monomères et 1,13 le facteur de conversion pour les polymères à base de xylose (arabinose et xylose) en monomères (Petersson et al. 2007).

Les concentrations de glucose, arabinose et xylose sont exprimées en $\text{g} \cdot \text{g}_{\text{biomasse initiale}}^{-1}$. Pour cela leur concentration en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, la masse initiale de matière brute pré-traitée et la solubilisation de la matière de masse durant ce même pré-traitement.

C'est une méthode analytique largement utilisée, considérée comme simple mais dont les résultats peuvent rapidement être faussés par l'échantillonnage, la taille des particules, l'humidité et la présence d'impuretés (Karimi and Taherzadeh 2016).

2.4.4.4 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les analyses sont réalisées grâce à un système combiné Water/Dionex. Les composés ont été séparés par une colonne Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm, Biorad) équipée d'une précolonne de protection (Microguard cation H refills cartridges, Biorad). L'éluant est composé de $2\text{mM H}_2\text{SO}_4$, le débit était de $0,3\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, la température de la colonne était de $45\text{ }^\circ\text{C}$ et le détecteur d'indice de réfraction (Waters 2414) était chauffé à $45\text{ }^\circ\text{C}$ pour quantifier les sucres. Le système a été calibré avec du glucose, du xylose, de l'arabinose et de l'acétate (Sigma-Aldrich).

2.4.4.5 Spectroscopie à transformation de Fourier InfraRouge (FTIR)

La spectroscopie moyen infrarouge a été utilisée pour estimer la cristallinité de substrats lignocellulosiques. Les spectres FTIR ont été obtenus sur un spectromètre Nicolet iS10 FTIR (Thermo-scientifique) équipé d'un module Smart iTR (plaque diamant). Les spectres ont été enregistrés en dix répétitions, 16 balayages avec une résolution d'intervalles de 4 cm^{-1} de 4000 à 600 cm^{-1} . Ensuite, les spectres ont été analysés à l'aide du logiciel Omnic (version 9.1).

L'indice d'ordre inférieur (LOI) a été déterminé à l'aide d'un rapport de bande à 1430 et 898 cm^{-1} (surface des pics). Il représente le ratio cellulose amorphe / cellulose cristalline.

2.4.5 Fermentation sombre, mesure du BHP (Biological Hydrogène Potential)

Comme le test BMP, ce test est réalisé dans des bouteilles plasma de 500mL dont le volume est mesuré précisément et bouchées par des septums en caoutchouc. Le volume utile est de 200mL. Les fioles sont préparées avec 2 g de matière sèche d'échantillon, un ratio

substrat/inoculum de 10, des solutions d'oligo-éléments (NH_4Cl , 32 g.L^{-1} ; K_2HPO_4 , 20 g.L^{-1} ; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g.L^{-1} ; $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,06 g.L^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,117 g.L^{-1} ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,025 g.L^{-1} ; ZnCl_2 , 0,07 g.L^{-1} ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,025 g.L^{-1} ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,015 g.L^{-1} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g.L^{-1} , HCl , 1,755 g.L^{-1}), tampon MES (acide 2-[N-morpholino] ethane sulfonique, 40 mmol.L^{-1}). Avant de boucher les fioles et de les mettre à agiter dans une enceinte chauffée à 35°C, celles-ci sont flushées à l'azote. Dans le cas de substrats pré-traités, le liquide et les solides restent dans la fiole et ce sont les différentes solutions qui sont ajoutées. Chaque condition a été réalisée en triplicats. Le pH a été ajusté à 6 à l'aide d'une solution de soude à 32% afin d'inhiber les potentiels méthanogènes qui auraient résisté au pré-traitement thermique (Guo et al. 2010). Lors de chaque analyse gaz, un prélèvement de 1,5mL de liquide a été réalisé afin de pouvoir analyser les AGV et les sucres par HPLC.

2.5 Etude microscopique de l'effet des pré-traitements sur la structure de la matière

Cette étude a été réalisée au CIRAD de Montpellier sur la Plateforme d'Histologie et d'Imagerie Végétale (PHIV), encadrée par Jean-Luc Verdeil et son équipe. Pour la partie coupe transversale, Helga Felix Pinheiro Nolasco, étudiante en Master 2 à Montpellier Supagro, a contribué à l'obtention des résultats.

2.5.1 Colorations utilisées et immunofluorescence

2.5.1.1 Coloration FASGA

Le FASGA est un colorant composé de safranine et de bleu alcian permettant la mise en évidence des zones lignifiées et celluliques (Tolivia and Tolivia 1987). Le bleu d'alcian en solution aqueuse réagit avec les composés contenant des groupes anioniques et peut être utilisé à n'importe quel pH pour identifier les macromolécules chargées négativement dont la cellulose et les hémicelluloses. Il est totalement compatible avec la safranine. Ses avantages sont la double coloration présente sur une même coupe utilisable à différentes échelles (tissu, parenchyme, cellules), rapide, peu coûteuse et qui nécessite l'utilisation d'un simple microscope optique. Cependant ce n'est pas une coloration spécifique de la lignine et de la cellulose. La réalisation de coloration complémentaire afin de confirmer les observations au FASGA est donc nécessaire.

2.5.1.2 Coloration au rouge Congo

Ce colorant permet la mise en évidence de la cellulose. Les coupes sont directement placées dans la solution à 0,1% de rouge Congo pendant 5 minutes puis rincées à l'eau distillée. Avant observation en lumière blanche, les coupes colorées sont montées entre la lame et la lamelle dans un mélange d'eau et de glycérol (50 % v/v).

2.5.1.3 Coloration au phloroglucinol

Ce colorant composé de chlorhydrate de chloroglucinol est spécifique des lignines de type guaiacyle et de type syringyle (Pomar, Merino, and Barceló 2002). Elle est peut être utilisée pour confirmer les colorations avec le FASGA.

Pour préparer la solution de coloration, il faut une solution d'éthanol saturée en phloroglucinol (Sigma, P3502-25G) à 2% et une solution d'acide chlorhydrique (HCl) (Sigma, 07102_1L_D) à 18% (diluée dans l'eau). Cette solution est maintenue à l'obscurité à 4°C. Les coupes de tige sont immergées dans la solution de phloroglucinol pendant 5 minutes. Ensuite, elles sont placées sur une lame de verre et quelques gouttes de la solution d'acide chlorhydrique y sont versées, afin de couvrir la section. Une couleur rouge apparaît alors immédiatement lorsqu'il y a présence de lignine. Dès que la couleur est visible, l'échantillon doit être assemblé entre lame et lamelle dans une solution aqueuse de glycérol à 50 % et observé directement en lumière blanche. Cette coloration n'est pas stable, la couleur rouge commence à s'estomper après quelques minutes.

2.5.1.4 Réactif de Mäule

L'échantillon est, tout d'abord, laissé dans une solution de permanganate de potassium à 1% pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, il est lavé deux fois à l'eau distillée. Une solution de 18% de HCl permet de décolorer le permanganate. Ensuite, la couleur rouge est révélée grâce à une solution d'ammoniaque à 20%. La coloration Mäule est spécifique à la lignine de Syringyle (S) et de Guaiacyle (G) (colorée en rouge et jaune brun, respectivement) (Iiyama and Pant 1988). Comme la coloration est passagère, l'échantillon a été assemblé entre des lames microscopiques dans une solution aqueuse de glycérol à 50 % et a été observé immédiatement à la lumière blanche.

2.5.1.5 Mesure de la cristallinité de la cellulose par immunolocalisation

La cristallinité de la cellulose a été observée grâce à un module de liaison aux sucres (Carbohydrates-binding module, CBM) dirigé par la cellulose (ref CBM3a, Plant Probes). La procédure a été réalisée selon (Blake et al. 2006; Hernandez-Gomez et al. 2015). Les coupes ont été saturées avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) (5% dans une solution de PBS (Phosphate-buffered saline)) pendant la nuit pour éviter une liaison non spécifique, rincées avec du PBS et incubées pendant 1,5 heure à température ambiante dans une solution de CBM (dilution 1:50 dans une solution de PBS). Après quatre rinçages avec du PBS (10 min chacun), les coupes ont été incubées avec un anticorps anti Xyloglucan-souris (Molecular probes) utilisé à dilution 1:100 dans une solution de PBS et de BSA 3% pendant 3h à température ambiante. Un rinçage en quatre étapes avec du PBS a ensuite été effectué. Alexa Fluor 546 (Molecular Probes/Interchim) dans une dilution de 1:1000 dans le PBS pendant 1,5h a été utilisé comme anticorps secondaire.

2.5.2 Etude sur fibres broyées à 1mm

Tout d'abord, les échantillons pré-traités de 1 mm sont mis en contact avec un fixateur, sous agitation pendant 4 j afin de conserver l'état des cellules. Puis, ils sont inclus en résine et coulés dans des moules en plastique (Figure 2-7a). Une fois secs, les échantillons sont démoulés puis à l'aide de colle super glue, sont collés sur des plots adaptés à l'appareil de découpe (Figure 2-7b). Les échantillons sont découpés avec une épaisseur de 5 μm grâce à un microtome Leica 2255. Les coupes sont plongées dans de l'eau MillQ puis placées sur des lames en verre préalablement dégraissées à l'éthanol. Le tout est placé sur une plaque chauffée à 40°C pour permettre le séchage des coupes et ainsi leur fixation sur la lame (Figure 2-7c).

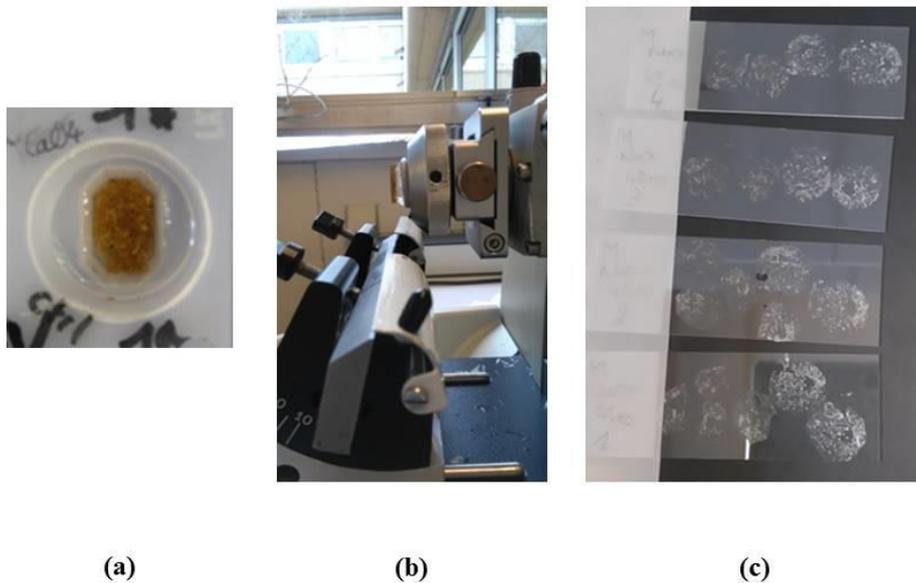


Figure 2-7: Moulage de la poudre 1mm avec de la résine (a), moule installé sur un plot sur le microtome (b), coupe sur lame après séchage (c)

Une fois sèches, les lames peuvent être colorées. Une fois la coloration réalisée et les lames séchées, une lamelle est montée avec un mélange eau/glycérol.

Seulement quelques images seront montrées et exploitées dans le chapitre 5. En effet, les exploitations qui ont pu être réalisées étaient qualitatives et subjectives. Il était très difficile de reconnaître les tissus et de pouvoir faire une quantification robuste des différents tissus et des effets des pré-traitements.

2.5.3 Coupes transversales de tige

Afin de s'assurer que le prétraitement appliqué aux tronçons de tiges de 1cm était absorbé de manière égale et efficace sur toute la tige dans sa longueur et son volume, quelques tronçons ont été sélectionnés et divisés en 3 zones (Figure 2-8): la zone 1 qui représente la partie initiale de la tige jusqu'à 1mm de longueur, la zone 2, représentant entre 1mm et 4,5mm de longueur et la zone 3, entre 4,5mm et 5,5mm de longueur.

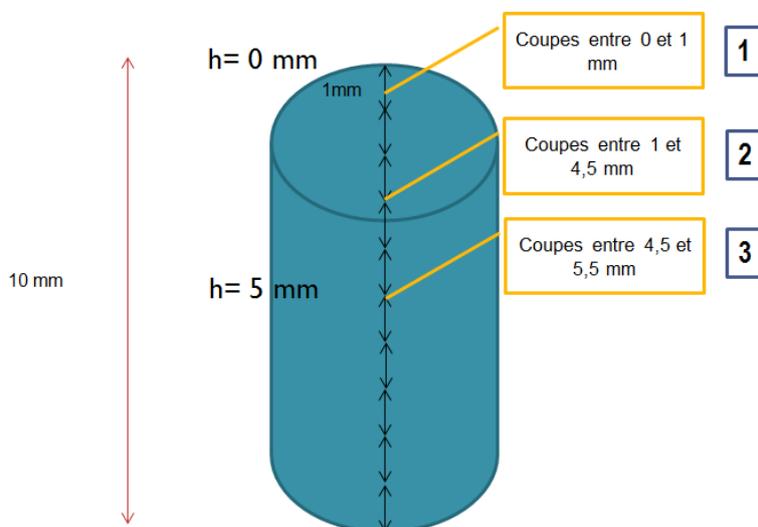


Figure 2-8: Coupe de tige de 1cm pré-traitée divisée en 3 zones

2.5.4 Traitement d'images

2.5.4.1 Acquisition des images

Les lames des poudres 1mm ont été observées au microscope DM 4500 Leica. Les clichés sont réalisés à partir d'une caméra Retiga 2000R et du logiciel Volocity.

Dans le but d'obtenir des images de haute qualité pour le traitement d'image, les lames des entre-nœuds colorés au FASGA sont digitalisées par un NanoZoomer (Hamamatsu, Photonics Ltd., Hertfordshire, UK) capable de numériser jusqu'à 210 diapositives standard en une seule fois. Après avoir numérisé des images en haute résolution d'une taille totale d'environ 2 Go sont sauvegardées et peuvent être visualisées à l'aide du visualiseur NDPI de Hamamatsu (Hamamatsu, Photonics Ltd, Hertfordshire, UK) librement disponible sur <https://www.hamamatsu.com/eu/en/product/type/U12388-01/index.html>. Pour réduire le temps de calcul et l'espace mémoire, chaque image a été convertie en une image TIFF ordinaire.

L'acquisition des images des sections colorées au Phloroglucinol, au réactif de Maïle et au Rouge Congo a été réalisée à l'aide d'un microscope Nikon Ni-E (Objectif 20X) équipé d'une caméra couleur DS-Ri2.

Les images de l'immunofluorescence de la cellulose cristalline a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal LSM 800 (Zeiss) avec un objectif 40X (LD C-Apo 1.1NA W) à longueur d'onde de 561 nm.

2.5.4.2 Analyse d'images

2.5.4.2.1 Analyse des sections transversales colorées au FASGA

Le traitement d'images pour la coloration au Fasga est réalisé à partir du logiciel de traitement Image J. Une macro a été spécialement développée pour l'analyse de coupes de tiges colorées au FASGA (Perrier et al. 2017). L'algorithme semi-automatisé crée une segmentation des images brutes en régions tissulaires distinctes. La taille et la surface de fractionnement de chaque région tissulaire peuvent être quantifiées, ainsi que la coloration moyenne dans chaque région (Figure 2-9).

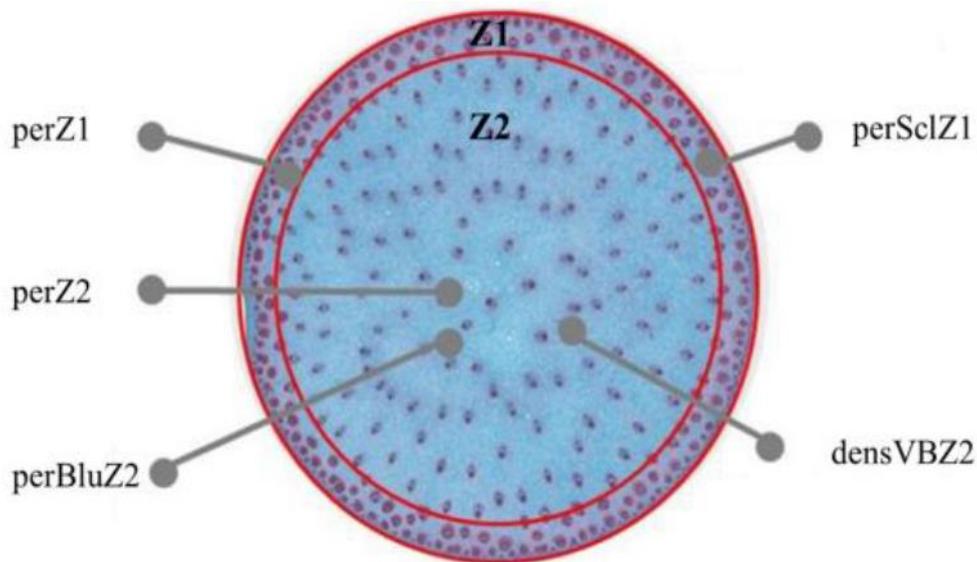


Figure 2-9 : Coupe transversale d'un entre-nœud de sorgho coloré au FASGA, avec identification d'une zone externe (Z1) et d'une zone centrale (Z2). Z1 est caractérisé par sa surface en % de la surface de section d'entre-nœud (perZ1), le pourcentage de tissu sclérenchyme (coloration rouge) en % de la surface Z1 (perScIz1) ; Z2 est caractérisé par sa surface en % de la surface de section d'entre-nœud, le pourcentage de tissu bleu en pourcentage de la surface Z2 (perBluz2), la densité des faisceaux vasculaires de Z2 en nombre de faisceaux vasculaires par mm^2 (densVBZ2). D'après (Perrier et al. 2017).

Le traitement réalisé par la macro comprend les étapes suivantes :

1) Sélection d'images : La première étape consiste à ouvrir l'image à traiter et à la dupliquer afin de préserver l'image originale (étape a Figure 2-10).

2) Sélection de l'image complète ou incomplète : Dans cette étape, il est possible de choisir si l'utilisateur souhaite travailler avec l'image entière ou non. Dans le cas d'une image incomplète, l'utilisateur peut sélectionner la partie de la section qu'il souhaite traiter, de sorte que l'algorithme puisse ensuite répéter statistiquement les données trouvées pour compenser toute la surface de la coupe.

3) Définitions des zones : Cette étape divise la coupe en deux zones : zone externe (Z1) et zone interne (Z2). La zone 1 (Z1) est caractérisée comme étant la zone externe où il y a une densité significativement plus importante de faisceaux conducteurs et un sclérenchyme fortement lignifié par rapport à la zone 2 (Z2). Deux valeurs importantes sont générées à la suite de ce processus : Le pourcentage de la zone 1 (perZ1) et le pourcentage de la zone 2 (perZ2) (Figure 2-9). Un filtre gaussien est appliqué pour faciliter les sélections de Z1 et Z2 (il atténue les détails). Il est toujours possible d'éditer les configurations du filtre par un clic droit sur l'icône. (Étape b Figure 2-10)

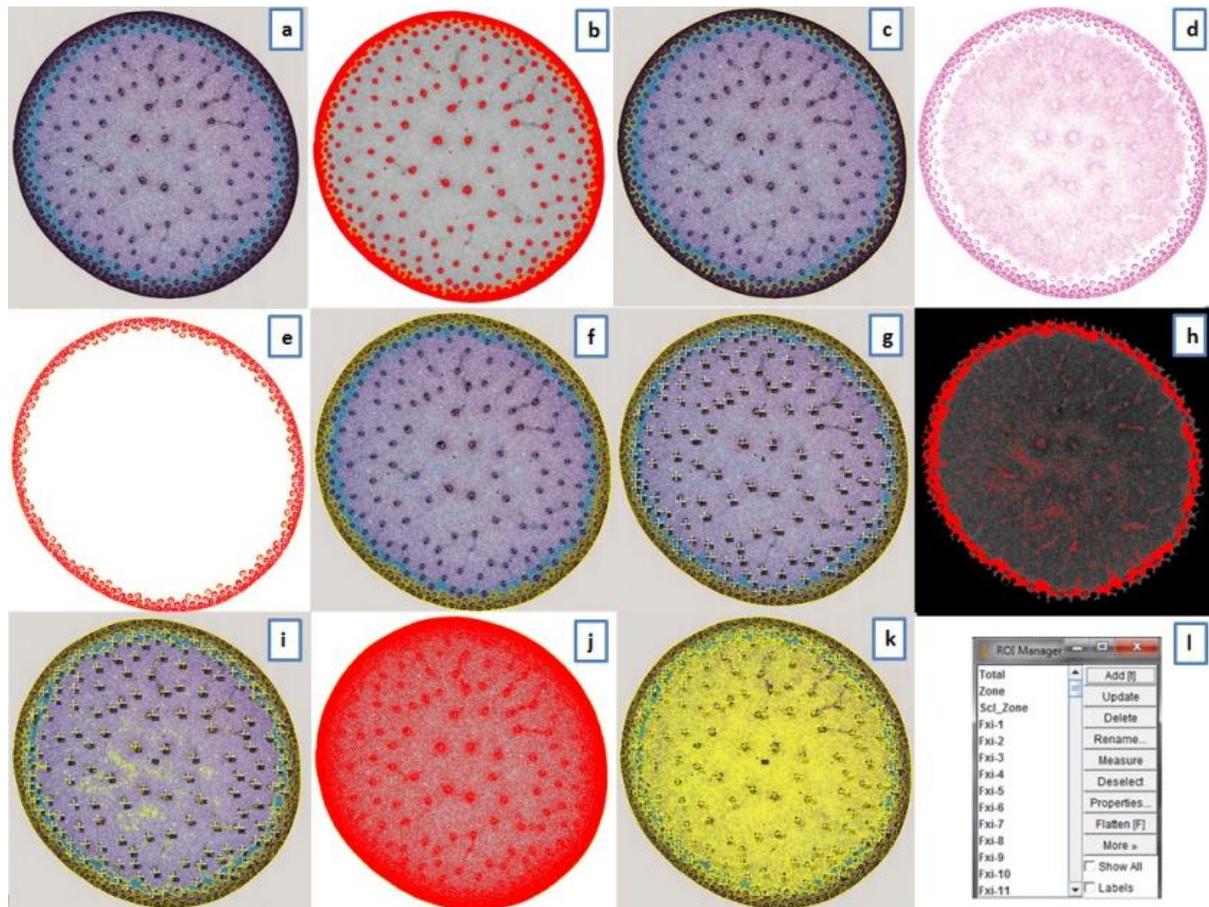


Figure 0-10: Les différentes étapes du traitement d'image sous imageJ par la macro développée au CIRAD

4) Zone de sclérenchyme : Après ajustement d'un seuil (threshold color), le sclérenchyme dans Z1 est déterminé. Cette étape génère les valeurs de pourcentage de tissu sclérenchyme dans Z1 (PercSclZ1) (Figure 2-9). Après l'application d'un filtre gaussien (afin d'atténuer les détails de l'image) et "lissage des pixels", l'utilisateur peut éditer la sélection du sclérenchyme effectuée par le filtre par érosion de dilatation des sélections. Un filtre de déconvolution de couleur est utilisé sous la forme d'un calque rouge. La quantité de sclérenchyme peut alors être ajustée par l'utilisateur (étapes d, e et f Figure 2-10).

5) Sélection de la zone des vaisseaux conducteurs (VB pour Vascular Bundle) : A ce stade, le programme compte automatiquement les faisceaux vasculaires présents dans Z2 en fonction des paramètres établis, présentés plus tard dans les résultats sous forme de nombre de

faisceaux vasculaires (nbVBZ2) et de densité des faisceaux vasculaires (densVBZ2). Le processus est très semblable à celui des étapes précédentes : Dans un premier temps, un filtre gaussien est appliqué, générant une image plus lisse. Ensuite, le programme recherche les pics d'intensité de l'image : il s'agit des faisceaux vasculaires, qui sont plus foncés après le premier filtre appliqué, si nécessaire l'utilisateur peut ajouter ou supprimer une sélection de faisceaux (étape g Figure 2-10).

6) Sélection du parenchyme : L'étape suivante consiste à sélectionner la zone de parenchyme, pour cela il est nécessaire de sélectionner les "zones bleues" par seuillage en utilisant une couche de Teinte de HSB, un filtre gaussien et un filtre de lissage de pixels. (Étapes h et i Figure 2-10) Cette étape permet le calcul du pourcentage de la zone bleue dans Z2 (PercBluZ2) représentant ainsi la matière cellulosique disponible.

7) Sélection de la biomasse : Enfin, la quantité de biomasse est également sélectionnée à l'aide d'un filtre, pour faciliter le processus de seuillage (étapes j et k Figure 2-10).

8) Résultats : Le résultat final est un tableau qui présente tous les paramètres présentés sur les étapes précédentes et plus encore. La table générée peut être exportée sous forme de fichier Excel.

2.5.4.2.2 Mesure de l'épaisseur de la paroi entre 2 cellules holocellulosiques dans la zone 2

L'épaisseur de la paroi cellulaire entre deux cellules adjacentes du parenchyme a été mesurée à l'aide du visualiseur NDPI. Cette mesure a été effectuée au milieu de la jonction et répétée 18 fois au centre de Z2.

2.6 Calculs

2.6.1 Détermination de la cinétique de production de méthane

Pour quantifier l'impact du prétraitement sur la cinétique de la production de méthane, les constantes cinétiques du premier ordre ont été calculées en utilisant l'ajustement par moindres carrés des données de production de méthane en fonction du temps. Cependant, certaines critiques ont été soulevées dans la littérature concernant l'utilisation de la cinétique de production de méthane k dérivé d'essais effectués sur un seul batch (Kouas et al. 2017). Par conséquent, les valeurs k doivent être discutées avec prudence. Néanmoins, comme le même biais a été introduit pour chaque série, la comparaison de ce paramètre a été considérée comme possible dans le cadre strict de chaque étude.

$$V = V_{max}(1 - e^{-kt}) \quad \text{Equation (8)}$$

où V est le volume de méthane ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$), V_{max} le volume maximal de méthane pouvant être produit ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$), k la constante cinétique du premier ordre (j^{-1}), et t est le temps de digestion (j). V_{max} et k ont été déterminés à l'aide de la fonction Microsoft Excel Solver.

Si la production de méthane présente un temps de latence (Δ), celui-ci intervient comme un troisième paramètre à prendre en compte lors du calcul du volume théorique (Equation 9):

$$V_{th} = V_{max}(1 - e^{-k(t-\Delta)}) \quad \text{Equation (9)}$$

Le calcul de la constante de cinétique de premier ordre est réalisé sur chaque réplicat puis moyenné. Le R^2 indiqué dans les tableaux de résultats correspond au plus faible obtenu des réplicats utilisés.

2.6.2 Analyses statistiques

A l'exception de l'ANOVA de la partie histologique (chapitre 5) réalisée avec le logiciel SAS, les autres analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.2).

2.6.2.1 Analyse de la variance

Une analyse ANOVA est un test statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population, ils ont statistiquement une même moyenne. L'hypothèse nulle correspond à celle que les distributions suivent la même loi normale. Avant toutes analyses de variance, la normalité et l'homogénéité des variances sont vérifiées grâce à un test de Shapiro et de Bartlett, respectivement. L'analyse de variance est réalisée à l'aide de `test.aov`. Les degrés de liberté (DF Degree of Freedom, en anglais), la F-value et la p-value sont ainsi calculés. La p-value est la probabilité d'obtenir la même valeur du test si l'hypothèse nulle est vraie. Les effets sont considérés comme significatifs lorsque la p-value est inférieure à 0.05 (test de confiance à 95%). Dans cette condition l'hypothèse nulle est rejetée et le résultat du test est déclaré « statistiquement significatif ». Le coefficient de variation est calculé à l'aide du package `agricolae`. Parfois, un test de Tukey a été réalisé en complément de l'ANOVA afin de séparer les échantillons par famille (J. 1949). Les modèles ANOVA utilisés seront explicités en chaque début de chapitre.

Dans le cas où les données n'ont pas suivi une distribution normale, un test non paramétrique de Kruskal Wallis a été utilisé. L'équivalent du test de Tukey utilisé alors a été le `conover` test.

2.6.2.2 Analyses en Composantes Principales (ACP)

Cette analyse permet d'analyser et de visualiser un jeu de données contenant des individus décrits par plusieurs variables quantitatives. Cela permet de visualiser les informations importantes contenues dans ce jeu de données. L'objectif de l'ACP est d'identifier les directions (i.e., *Dim*) le long desquelles la variation des données est maximale.

Après avoir éliminé les données manquantes (`NA.omit`) et calculer les moyennes, les ACP ont été réalisées à l'aide des packages `ade4` et `factoextra`. Afin d'indiquer la qualité de la représentation des variables sur l'ACP, le `cos2` a été calculé. Un `cos2` élevé indique une bonne représentation de la variable sur les principaux axes considérés.

2.6.2.3 Analyse Factorielle Multiple (AFM)

C'est une analyse factorielle basée sur l'ACP quand les variables sont quantitatives et sur l'Analyse des Correspondances Multiples (AFM) lorsque les variables sont qualitatives. Plusieurs ensembles de variables sont considérés simultanément, ce qui nécessite d'équilibrer les influences de chaque ensemble de variables. Par conséquent, dans l'AFM, les variables sont pondérées lors de l'analyse. Les variables du même groupe sont normalisées en utilisant la même valeur de pondération, qui peut varier d'un groupe à l'autre.

Après avoir éliminé les données manquantes (NA.omit) et calculer les moyennes, les AFM ont été réalisées à l'aide des packages FactorMineR et factoextra.

Chapitre 3. Etude de l'impact des pré-traitements alcalins sur la biomasse lignocellulosique (sorgho ou miscanthus)

Ce chapitre présente différents objectifs :

- Etudier l'impact des pré-traitements alcalins en fonction des conditions opératoires
- trouver des conditions opératoires de pré-traitements optimales,
- étudier l'impact de la biomasse (sorgho et miscanthus)
- comprendre les effets des pré-traitements sur la biomasse en utilisant la composition biochimique.

Dans un premier temps, cette partie portera sur l'étude de pré-traitements alcalins appliqués dans des conditions connues de la littérature (réactif, granulométrie de l'ordre du millimètre, 55°C, faible teneur en MS). Dans un second temps, trois expérimentations successives permettront d'étudier l'impact des différents paramètres de pré-traitements (réactif, durée, concentration, granulométrie, teneur en MS). Dans le sous-chapitre suivant, des expériences complémentaires, afin d'essayer de mieux comprendre la différence entre les deux réactifs alcalins utilisés (NaOH et CaO) seront présentées. La compréhension des mécanismes d'action sera abordée différemment et plus en détails dans le chapitre histologie (chapitre 5). Plusieurs parties sont en anglais car elles ont été valorisées dans des articles scientifiques. Afin de faciliter la lecture, un matériel et méthodes plus précis et spécifique à chaque expérimentation débutera chacun des sous-chapitres, le matériel et méthode général étant décrit dans le chapitre 2.

3.1. Context and objectives

Cellulose, hemicelluloses and lignin are the three main components of lignocellulosic biomass (and so of sorghum and miscanthus). The use of a pretreatment aims for advantageous composition changes according to the increase of the digestibility of the biomass (Hendriks and Zeeman, 2009; Monlau et al., 2013). Consequently, cellulose, hemicelluloses, lignin contents and the crystallinity of the cellulose were commonly measured (Karimi and Taherzadeh, 2016). As the lignin is known to reduce the accessibility of microorganisms to carbohydrates and the crystalline cellulose to be less accessible than amorphous one, a substrate with a low lignin content and a low crystallinity index would be preferred (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Methane potential of lignocellulosic biomass has been reported to be negatively correlated to its lignin content (Monlau et al., 2012b). The hydrolysis was also the rate-limiting step in anaerobic digestion of such substrates (Reddy and Yang, 2005). Two strategies can thus be considered to improve the methane production from lignocellulosic biomass. The first one is breeding strategy to develop genotypes suited to anaerobic digestion and leading to high methane potential (Ghatak, 2011). A first step of this approach is the investigation of various genotypes considering their biochemical composition and methane potential (Arnoult et al., 2015; Costa et al., 2016). There is not yet any study on the effect on genotype on the biogas production of total aboveground biomass of miscanthus and there are very few on sorghum. This approach is a part of my engineer missions in the BFF project for both sorghum and miscanthus biomasses. They will not be presented in this thesis but some results can be found in (Thomas et al., 2017), (Thomas et al., 2019).

The second one is to study biomass pretreatment which is a key step in biorefinery for cell wall deconstruction and increase the accessibility of sugars to enzymes and microorganisms (Ravindran and Jaiswal, 2016). Nonetheless, for most of lignocellulosic biomasses, carbohydrate accessibility is limited and AD performance can be improved by pretreatment (Monlau et al., 2013). Different kinds of pretreatment techniques (mechanical, biological, chemical) have been studied (Agbor et al., 2011). As Barakat et al. (2014b) have illustrated, a mechanical pretreatment is not enough to increase the accessibility or digestibility of holocelluloses. Moreover, size reduction processes have a high-energy requirement and are often not economically advantageous (Barakat et al., 2014a). Combination of mechanical and chemical pretreatments is preferred, especially with alkali for delignification. Indeed, among efficient pretreatments for delignification, chemical and more precisely alkaline pretreatments have been highlighted (Haghighi Mood et al., 2013) (Kim et al., 2016; Monlau et al., 2012a). They selectively remove or degrade lignin without degrading cellulose, and increase porosity and surface area, thereby enhancing enzymatic hydrolysis (Kim et al., 2016). Soda pretreatment is the most studied, classical parameters are alkali dose 1-10 % ($\text{g}_{\text{NaOH}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$), temperature around 40-60°C, duration from 0.5 to few days and solid loading from 30 to 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cadoux et al., 2014; Carrere et al., 2016; Ravindran and Jaiswal, 2016; Zheng et al., 2014). However, sodium presence can be detrimental for both anaerobic microorganisms or for soil quality if digestate is used as fertilizer. CaO is an interesting alternative alkali agent as it is already used to mitigate soil acidity and is also less expensive than soda, but the performance of both alkali needs to be compared.

In addition, solid state or high solid content anaerobic digestion processes are facing fast development within agricultural biogas plant sector which deals with low-water content feedstocks such as lignocellulosic biomass and cattle manure (André et al., 2017). These processes avoid the use of high amounts of water and allow reducing heating energy inputs while treating higher amounts of biomass per volume of digester. If high solid anaerobic digestion processes are widely studied in literature (André et al., 2017), papers related to pretreatments operated in high solid content conditions are scarce (Di Girolamo et al., 2014). But this could be a crucial parameter for industrial application (Barakat et al., 2014a). As highlighted by Barakat et al. (2013), dry or high solid content pretreatment processes minimise waste generation, do not need a separation step before further processing and reduce the environmental impact of the entire process.

The aim of this chapter is to therefore investigate sorghum B140 and miscanthus *M. x giganteus* Floridulus alkali pretreatment with lime and compare it to soda. These two genotypes were those with the lowest BMP for the whole sorghum and miscanthus genotype panels we had. The most influential parameters (duration, reagent, particle size, TS content, alkali reagent) and their consequences on the biochemical composition, the crystallinity of the cellulose and on the methane kinetics and yield of the biomass will be studied.

3.2 Biomasses pré-traitées à 55°C pendant 24 h avec une dose de réactifs de 10%

Dans la littérature, les paramètres classiques des pré-traitements alcalins sont une concentration comprise entre 1 et 10% ($\text{g}_{\text{NaOH}} \cdot \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$), une température d'environ 40-60 °C, une durée de 0,5 à quelques jours et une charge solide comprise entre 30 et 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cadoux et al., 2014; Carrere et al., 2016; Zheng et al., 2014). En prenant en compte ces données et les études précédentes réalisées au laboratoire, les conditions de 10% d'agent alcalin, 55°C, à faible teneur en MS (40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) pendant 24 h ont été choisies (Monlau et al., 2012a; Sambusiti et al., 2012). De plus, ces pré-traitements sont généralement appliqués sur des biomasses à faible granulométrie (de l'ordre du millimètre ou moins). Ces conditions de pré-traitements étant largement référencées (Monlau et al., 2012a), elles semblent donc adaptées pour commencer à étudier les deux biomasses choisies pour cette thèse.

3.2.1 Matériel and méthodes

La réalisation des pré-traitements et la mesure du potentiel méthane sont présentées dans le chapitre 2 (parties 2.2.2.1 et 2.3.2). Les conditions de pré-traitements sont une dose de réactif alcalin 10% (c'est-à-dire 10 $\text{g}_{\text{réactif}}$ pour 100 g_{MS}), à faible teneur en MS (40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), avec une température de 55°C pendant 24 h et sur des biomasses broyées avec une grille de 1mm. Pour rappel, les teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine Klason sont toujours exprimées en % de matière sèche initiale.

3.2.2 Cas du sorgho

Les potentiels méthane du sorgho brut et pré-traité à la soude ou à la chaux sont similaires (271 ± 13 , 269 ± 10 et 266 ± 15 $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$, Figure 3-1, p -value = 0.932). Cependant, la cinétique de production a été accélérée (p -value = $3.2 \cdot 10^{-4}$; + 60 et + 59%, respectivement, Table 3-1). Des conclusions similaires ont été observées par Sambusiti et al. (2013a) sur 5 variétés de sorgho différentes pré-traitées avec de la soude pendant 12h à 55°C.

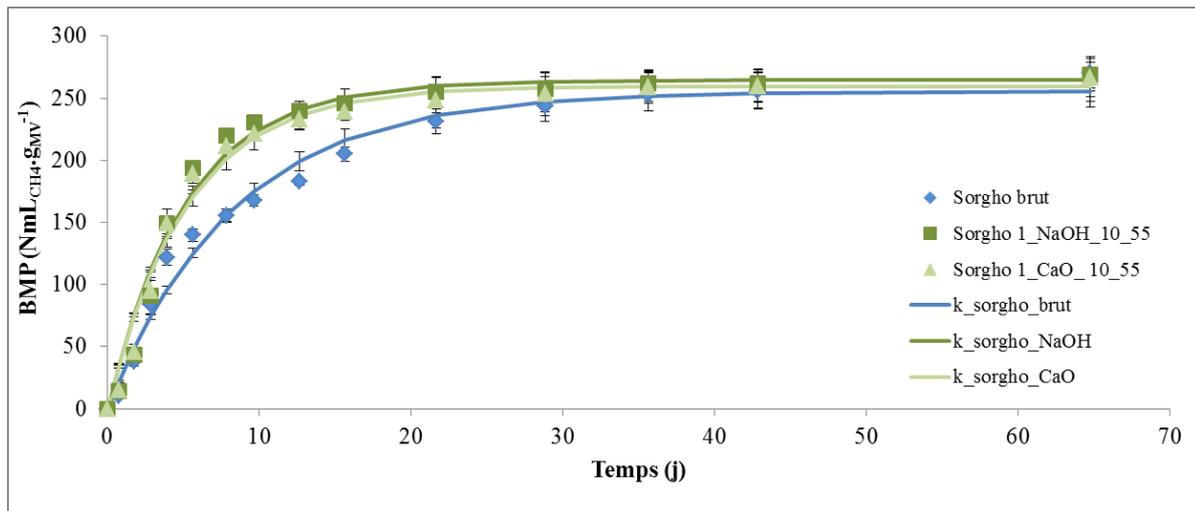


Figure 3-1: Production cumulée de méthane et modélisation de la cinétique du premier ordre du sorgho brut et pré-traité à 55°C à la soude ou à la chaux

L'application de pré-traitements alcalins a permis une solubilisation de 22 et 27% de la cellulose et 48 et 39% de la lignine (pour NaOH et CaO, respectivement, Table 3-1) et une modification de la structure de la cellulose. Les taux de solubilisation de la cellulose et des hémicelluloses observés ici sont inférieurs à ceux obtenus par Sambusiti et al. (2013a) bien que parmi les variétés étudiées il y avait également un sorgho biomasse (B133). Cela peut s'expliquer par le fait que le sorgho B 140 est très riche en solubles. La bioaccessibilité des sucres est donc déjà importante, d'où un potentiel méthane à l'état brut intéressant. L'application de pré-traitements alcalins a permis de rendre ces sucres plus rapidement bioaccessibles en solubilisant la lignine. Cependant, cela n'a pas permis de produire plus de méthane, soit parce que la totalité des sucres est bioaccessible ou bien ces pré-traitements ne sont pas assez sévères pour rendre biodégradable la matière récalcitrante.

Table 3-1: BMP, constante de cinétique du premier ordre et composition biochimique du sorgho B 140 1mm brut (S_1_NT) et pré-traité à 55°C avec de la soude ou de la chaux dosé à 10% (S_1_NaOH_10_55, S_1_CaO_10_55)

	BMP	k (j^{-1})	R^2	Cellulose (%)	Hémicelluloses (%)	Lignine Klason (%)	LOI
S_1_NT	271 ± 13	0.120 ± 0.003	0.980	24.1 ± 0.3	15.7 ± 0.7	13.9 ± 0.1	0.530 ± 0.017
S_1_NaOH_10_55	269 ± 10	0.192 ± 0.010	0.979	18.7 ± 0.1	15.9 ± 0.2	7.3 ± 0.4	0.519 ± 0.015
S_1_CaO_10_55	266 ± 15	0.191 ± 0.006	0.981	17.7 ± 0.1	14.9 ± 0.3	8.5 ± 0.1	0.581 ± 0.013

Trulea et al. (2016) ont obtenu une amélioration de 22 % du rendement en méthane avec 3 différents géotypes de sorgho broyés à 2 cm et prétraités avec 2 % de NaOH pendant 30 min à 121°C. Di Girolamo et al. (2014) ont obtenu une amélioration de 10 % du rendement en méthane avec du sorgho fibre 2 mm prétraité avec de la soude dosée à 4 ou 6 % (m/m) à 25°C pendant 24 heures et sous mélange (120 tr/min). Sur 5 variétés différentes de sorgho broyées à 1 mm et prétraitées avec de la soude dosée à 4 ou 10 $\text{g}_{\text{NaOH}} \cdot 100\text{g}_{\text{TS}}^{-1}$ à 55°C pendant 12 h, Sambusiti et al. (2013a) ont observé une augmentation de la constante cinétique du premier ordre (jusqu'à 61%) mais aucune augmentation du rendement du méthane.

3.2.3 Cas du miscanthus

Le potentiel méthane du miscanthus est peu élevé ($200 \pm 1 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$, Figure 3-2). Les productions de méthane des échantillons pré-traités à la soude ou à la chaux sont significativement supérieures à celle du miscanthus brut (p-value=0.0078, 0.0005, + 31 et 33%, avec NaOH et CaO, respectivement). Ces valeurs sont similaires à celles obtenues par Nkongndem Nkemka et al. (2016) avec du *Miscanthus x giganteus* pré-traités avec NaOH ou CaO concentré à 6% pendant 24 h à 70°C : + 20 et + 39% de rendement méthane.

La constante de cinétique de production du premier ordre a également été significativement augmentée (p-value = 0.0078, 0.0005;+ 136 et +161%, avec la soude et la chaux, respectivement).

L'amélioration en rendement méthane est similaire à celle obtenue par (Fu et al., 2018) avec du *Miscanthus floridulus* pré-traité avec 6% de NaOH à 35°C pendant 3 h (+ 25.5%) mais l'amélioration de la cinétique est plus élevée que la leur (+ 60%).

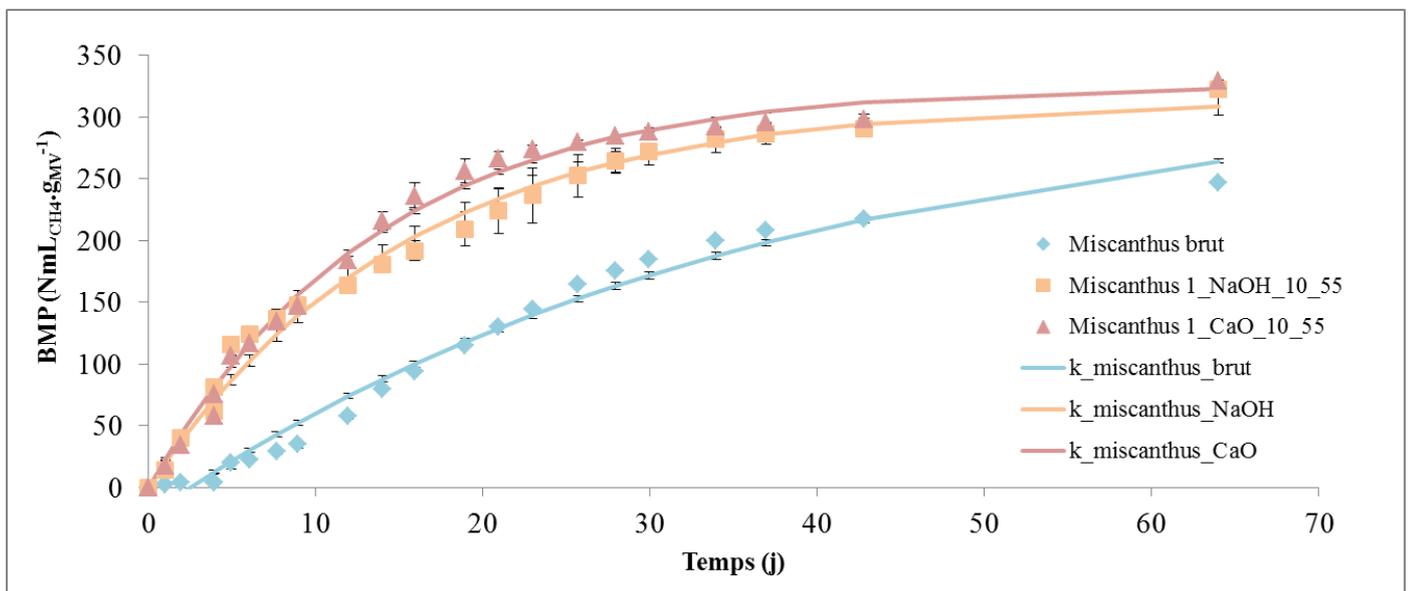


Figure 3-2: Production cumulée de méthane et modélisation de la cinétique du premier ordre du miscanthus brut et pré-traité à 55°C à la soude ou à la chaux

Comme le montre le tableau 3-2, le miscanthus *x giganteus* est une biomasse très lignifiée (25.4 ± 2.4 %) ; ce qui justifie un BMP plutôt bas ($200 \pm 1 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$) et un temps de latence de l'ordre de 2,5 jours. Après pré-traitement, les taux de solubilisation de la lignine sont importants (48 et 29% avec NaOH et CaO, respectivement). Le potentiel méthane est fortement augmenté (+ 31 et 33%, respectivement). La dégradation de la lignine permis la solubilisation des hémicelluloses. La structure de la cellulose a également été modifiée. En effet, après pré-traitements, les valeurs de LOI ont augmenté. Cela suggère une diminution de la cellulose cristalline.

Table 3-2 : BMP, constante de cinétique du premier ordre et composition biochimique du Miscanthus FLO brut et pré-traité, 1mm

	BMP	k (j ⁻¹)	Temps de latence (j)	R ²	Cellulose (%)	Hémicel-luloses (%)	Lignine Klason (%)	LOI
M_1_NT	200 ± 1	0.028 ± 0.000	2.5 ± 0.1	0.978	41.0 ± 0.9	20.8 ± 0.4	25.4 ± 2.4	0.446 ± 0.005
M_1_NaOH_10_55	282 ± 4	0.066 ± 0.002	0	0.976	43.2 ± 1.2	20.1 ± 0.8	13.2 ± 0.7	0.497 ± 0.002
M_1_CaO_10_55	292 ± 1	0.073 ± 0.002	0	0.990	39.9 ± 0.7	18.4 ± 0.2	18.1 ± 1.7	0.555 ± 0.030

Un prétraitement hydrothermal à 170°C du miscanthus a entraîné une augmentation de 21 % de la production de biogaz (Zhou et al., 2017). Nges et al. (2016) ont appliqué différents broyages, un pré-traitement à l'explosion de vapeur et des pré-traitements acides et alcalins sur *M lutarioriparius*. Le meilleur résultat, soit une augmentation de 57 % de la production de méthane, a été obtenu avec un léger prétraitement alcalin (0.3 M).

3.3 Optimization of pretreatment in view of application to co-digestion with caw manure in LBR

Dans un objectif d'application de ces pré-traitements en méthanisation à la ferme, des conditions « plus réalistes » doivent être envisagées. Le chauffage représente un cout énergétique et d'équipements important. Le choix a donc été fait de réaliser les pré-traitements à température ambiante. La température étant moins élevée, la durée doit être augmentée pour compenser l'effet de la température (plusieurs jours). Le broyage représentant également un coût énergétique important, les études suivantes ont été menées sur des granulométries supérieures (20 à 60 mm, 60 mm correspondant à la granulométrie en sortie de déchiqueteuse à végétaux). Enfin, l'eau est une source de dépense supplémentaire et dans l'optique d'appliquer ces pré-traitements lors de co-digestion en réacteurs garage, la teneur en MS des pré-traitements a été augmentée. C'est un paramètre qui est très peu pris en compte dans la littérature mais qui est très important car il conditionne la concentration et le pH. Cela implique de prendre en compte le « pouvoir absorbant » des différentes biomasses. De plus, bien que cette dernière soit reconnue moins efficace, l'utilisation de la chaux a été privilégiée. En effet, cet agent alcalin présente différents avantages (Soares Rodrigues et al., 2016) (i) un coût faible par rapport à la soude et surtout par rapport à la potasse ; (ii) la possibilité de récupérer facilement ce réactif en le faisant précipiter sous forme de carbonate

de calcium avec du CO₂ ; (iii) c'est un réactif moins caustique que la soude ou la potasse ; (iv) après épandage du digestat, le calcium n'impactera pas la salinité des sols. La soude sera toutefois parfois étudiée afin de comparer leurs performances.

3.3.1 Miscanthus: comparison of 1 and 20 mm fibre size, comparison of soda and lime, impact of the duration and the TS content

This part is adapted from Methane Production Variability According to Miscanthus Genotype and Alkaline Pretreatments at High Solid Content, H el ene Laurence Thomas, St ephanie Arnoult, Maryse Brancourt-Hulmel, H el ene Carr ere. BioEnergy Research doi.org/10.1007/s12155-018-9957-5

The objective is to study and compare the impact of different alkaline pretreatments using soda or lime in conditions requiring low water and low energy inputs. The impact of the different conditions of the pretreatment (particle size, dry matter content and duration) will be studied.

3.3.1.1 Material and Methods

3.2.2.1.1 Pretreatment conditions

High Total Solids (TS) loading (200 g.L⁻¹) was selected to test conditions with low water input and compared with classical low TS loading (40 g.L⁻¹). The experiments were carried out at room temperature (between 23 and 26 C) and without mixing in BMP bottles. The conditions pretreatments are summarized in the Table 3-3. The Model (1) studied the impact of the reagent and the TS content. The model (2) studied the impact of the reagent, the duration and the particle size. Three samples of each condition were used for BMP measurement and the remaining pretreated samples were filtered through a 0.25 mm sieve to separate the solids from the liquid fraction for further chemical analysis.

Table 3-3: Raw miscanthus and pretreatments conditions tested on Floridulus genotype (all pretreatments were performed without mixing, at ambient temperature and with a reagent dose of 10%). The different models correspond to the statistic models presented in detail in the "Statistical analysis" part.

	Pretreatment	Particle size (mm)	Concentration (g _{reagent} ·100g _{TS} ⁻¹)	Dry matter content (%TS)	Duration (d)
Model (1)	1_NaOH_10_20_4d	1	10	20	4
	1_CaO_10_20_4d	1	10	20	4
	1_Raw_	1	0	-	0
	1_NaOH_10_20_6d	1	10	20	6
	20_NaOH_10_20_6d	20	10	20	6
	1_CaO_10_20_6d	1	10	20	6
	20_CaO_10_20_6d	20	10	20	6
	20_Raw	20	0	-	0
	20_NaOH_10_20_4d	20	10	20	4
	20_CaO_10_20_4d	20	10	20	4
Model (2)	20_NaOH_10_4_4d	20	10	4	4
	20_CaO_10_4_4d	20	10	4	4
	20_CaO_10_4_4d	20	10	4	4

3.2.2.1.2 Principal components analysis (PCA)

The PCA for comparing raw and pretreated miscanthus samples was performed on duplicates using R software (version 3.3.2). In order to indicate the quality of the variables representation on the PCA, the cos2 was displayed. A high cos2 indicates a good representation of the variable on the main considered axes. The correlation matrix was then analyzed according to the PCA. In the PCA analysis the dependence between the biochemical composition of raw and pretreated miscanthus samples and their methane production (MP) was studied. Each sample was considered as an individual.

3.2.2.1.3 Linear modelling analysis

Linear modelling analysis was performed using R software (version 3.3.2). The sources of variation of the biomethane potential and the miscanthus chemical composition were analysed using linear modelling analysis. For preliminary analysis, repetitions were considered as factor and they had no effect on the variables (data not shown). In order to reduce the number of analysis, this study was done with these 2 following ANOVA models. The models (3) and (4) were used to test different conditions of pretreatment applied on *Floridulus* genotype.

$$\text{Model (1)} \quad Y_{is} = \mu + R_i + T_s + (RT)_{is} + \varepsilon_{is}$$

Where Y_{is} is the studied variable (BMP, cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents or LOI) measured according to the pretreatment varying with the reagent i and the TS content s . μ is the trial mean, R_i is the reagent main effect, T_s is the TS content of the pretreatment main effect, $(RT)_{is}$ is the interaction between the reagent and the TS content and ε_{is} is the residual error.

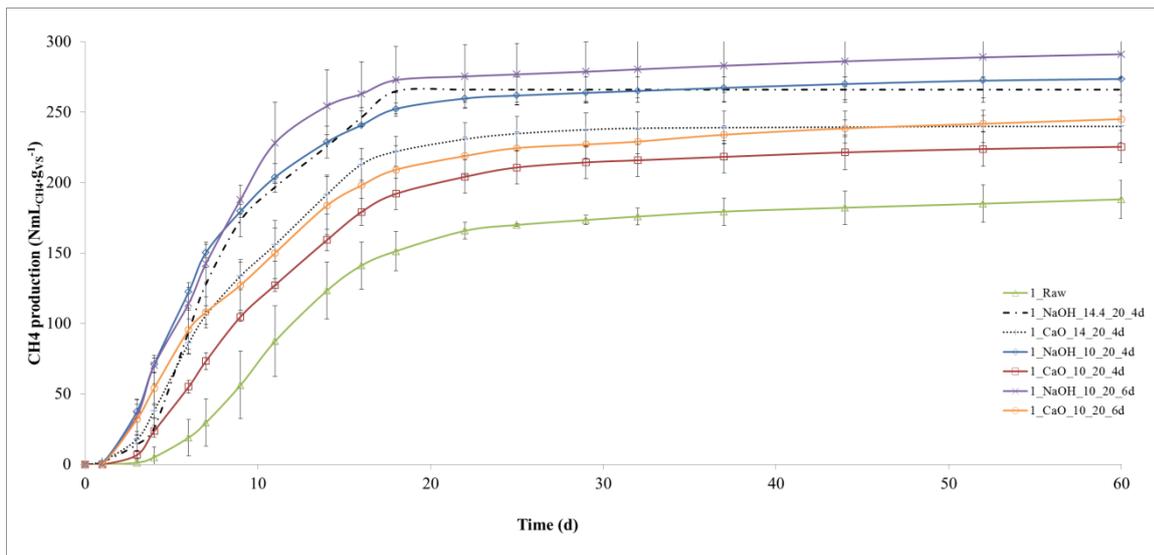
$$\text{Model (2)} \quad Y_{ijk} = \mu + R_i + D_j + S_k + (RD)_{ij} + (RS)_{ik} + (DS)_{jk} + (RDS)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Where Y_{ijk} is the variable studied (BMP, cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents or crystallinity index) according to the pretreatment varying with the reagent i during the time j on the particle size k . μ is the trial mean. R_i is the reagent main effect, D_j is the duration of the pretreatment main effect, S_k is the particle size main effect, $(RD)_{ij}$ is the interaction effect between the reagent i and the duration j , $(RS)_{ik}$ is the interaction effect between the reagent i and the particle size k , $(DS)_{jk}$ is the interaction effect between the duration j and the particle size k , $(RDS)_{ijk}$ is the interaction effect between the reagent, the duration and the particle size and ε_{ijk} is the residual error.

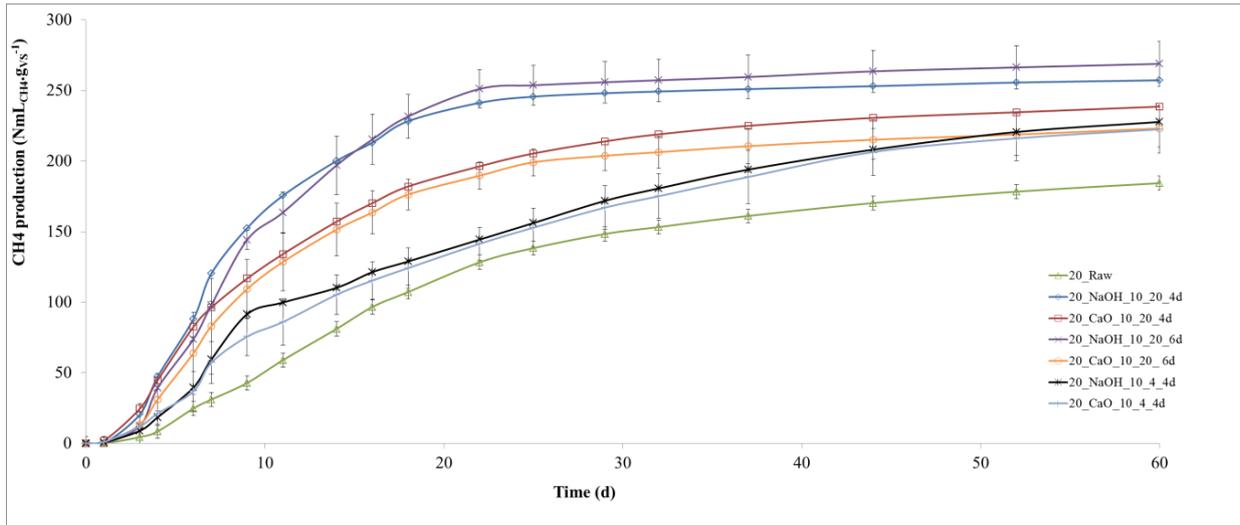
The published paper focused on the maximization of the miscanthus methane production and the impact of the different pretreatments conditions on the evolution of the first order kinetics constant was not studied. However, they are described in this manuscript in order to be consistent. Because of the study of the impact of the TS content was done in two different BMP series, the k could not be compared. The ANOVA was done only for the Model (2) (Table 3-4).

3.2.2.1.4 Results

The aim of pre-treatments was to produce methane faster and in larger amount. The Figure 3 depicts the cumulative methane production of raw and pretreated *M. x giganteus* Floridulus samples. The methane yield of miscanthus pretreated with soda was up to 291 $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$ whereas ones pretreated with lime which were around 235 $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$ (Figure 3-3). The highest methane yield was obtained with soda pretreatment during six days for both miscanthus sizes (291 ± 17 and 269 ± 16 $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$ for 1 mm and 20 mm fibre size, respectively, Figure 3-3). These experimental data highlighted the positive effect of the alkaline pretreatments on the methane yield and the best efficiency of soda compared to lime. In identical operational conditions (same duration and alkali dose per gram of TS) and for the two particle sizes, soda was more efficient than the lime (for example for 6 days on 1mm size, the methane production was 291 ± 17 and 245 ± 6 $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$ with NaOH and CaO, respectively) (Table 5, Figure 3). The same conclusion was found by Jiang et al. (2017) with giant reed with NaOH and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrated at 20% ($\text{g}_{\text{CaO}} \cdot \text{g}_{\text{initialTS}}^{-1}$) at $100 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of solid content where methane yield improvement was 61 and 34%, respectively.



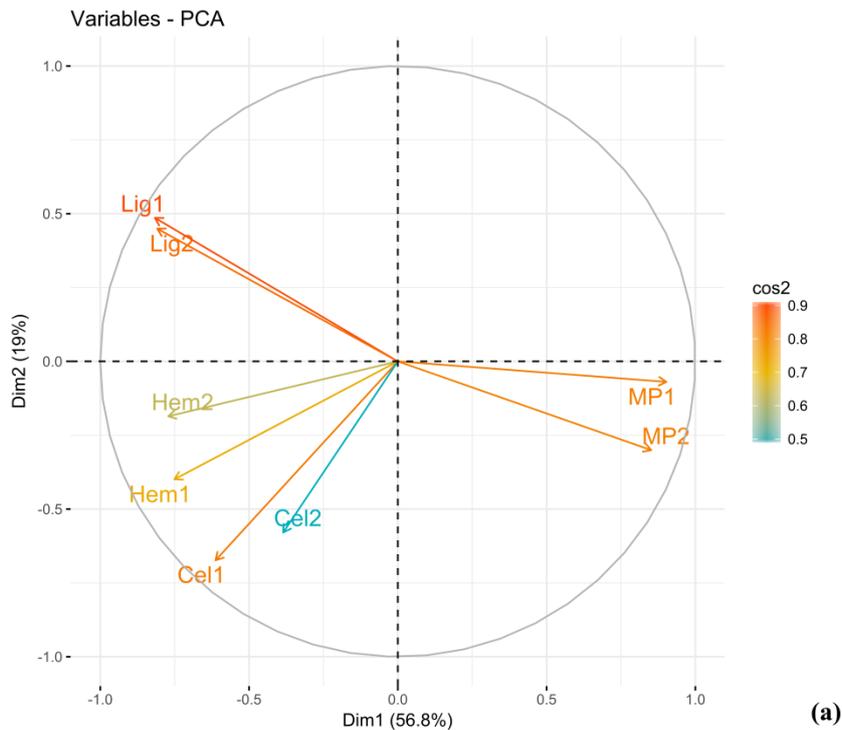
(a)



(b)

Figure 3- 3: Cumulative methane yields ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$) at normal temperature and pressure conditions of raw and pretreated 1mm (a) and 20 mm (b) miscanthus particle size

In the PCA, the first two PCs accounted for 75.8% of the total variation (Figure 3-4a). PC1 accounted for a high value of the variation in the correlation matrix (56.8%). PC1 indicated that the methane production was anti-correlated to the Klason lignin content ($r=-0.73$) (Figure 3-4a & Figure 3-5). The cellulose and hemicellulose contents seemed slightly correlated ($r=0.56$). The plot of the repartition of the individuals suggested that the reagent (CaO or NaOH) and the size (1 or 20 mm) let to distinguish the pretreated samples (Figure 4b). It should be confirmed by further statistical analysis.



(a)

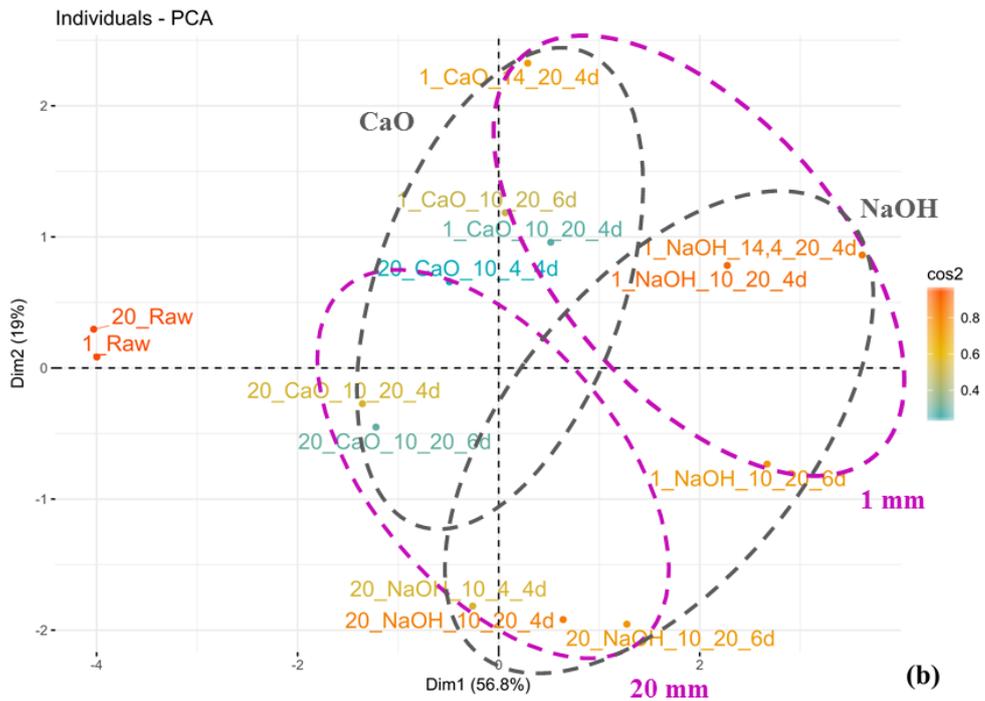


Figure 3-4: (a) Principal component analysis (PCA) plot of variables that are related to the methane production (MP) and pretreated biomass composition according to the first and the second principal components (PC 1 and PC 2, respectively); (b) Plot illustrating the repartition of the individuals according to PC 1 and PC 2. The ellipses are empirically built.

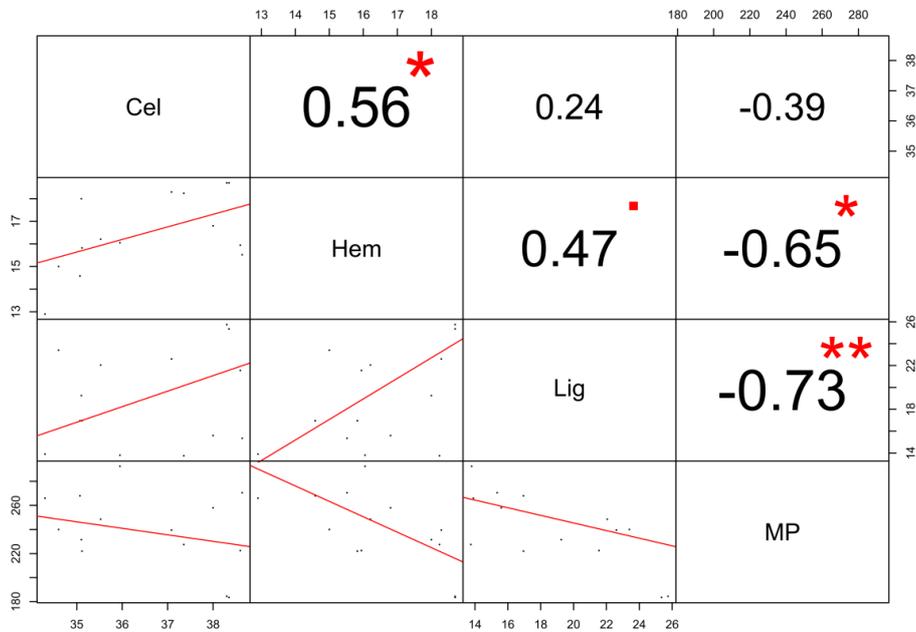


Figure 3-5: Correlation matrix and paired scatter plots of methane production and composition variables of raw and pretreated miscanthus samples. “**”, “*” and “.” correspond to significant at 0.01, 0.05 and 0.1 probability levels, respectively

Table 3-4 presents the biochemical composition, the methane productions and the results of the different ANOVA models (Models (1) and (2)).

Table 3-4: Cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI and methane production values and linear modelling analyses (Model (1) and (2)) of repeated data using FLO genotype

	Pretreatment	Cellulose (%TS)	Hemicelluloses (%TS)	Klason Lignin (%TS)	LOI	Methane production (NmL _{CH₄} ·g _{VS} ⁻¹)	k (d ⁻¹)	Δ (d)	R ²				
M (1)	1_NaOH_10_20_4d	35.1 ± 0.6	14.6 ± 0.1	17.0 ± 0.4	-	274 ± 11	0.119±0.016	0.9±0.2	0.984				
	1_CaO_10_20_4d	35.5 ± 1.1	15.8 ± 0.5	17.0± 1.9	-	226 ± 11	0.084±0.001	1.5±0.2	0.980				
	1_Raw	38.3 ± 1.3	18.7 ± 0.4	25.3 ± 0.2	0.796 ± 0.001	188 ± 14	0.068±0.021	2.2±0.5	0.927				
	1_NaOH_10_20_6d	36.0 ± 1.1	16.1 ± 1.6	13.8 ± 0.3	0.986 ± 0.019	291 ± 17	0.120±0.006	1.0±0.2	0.986				
	20_NaOH_10_20_6d	38.6 ± 0.4	15.5 ± 1.5	15.4 ± 0.1	1.070 ± 0.032	269 ± 16	0.088±0.003	1.3±0.1	0.982				
	1_CaO_10_20_6d	35.2 ± 0.9	16.1 ± 0.3	22.1 ± 0.1	1.530 ± 0.148	245 ± 6	0.103±0.012	0.9±0.2	0.994				
	20_CaO_10_20_6d	38.6 ± 0.1	16.0 ± 1.3	21.6 ± 0.4	1.308 ± 0.022	223 ± 13	0.081±0.011	1.2±0.5	0.981				
	20_Raw	38.3 ± 1.8	18.7 ± 0.4	25.8 ± 1.2	0.796 ± 0.001	184 ± 4	0.090	1.8	0.950				
	20_NaOH_10_20_4d	38.0 ± 1.1	16.8 ± 1.1	15.6 ± 0.4	0.985 ± 0.062	257 ± 15	0.103±0.007	1.0±0.3	0.985				
	20_CaO_10_20_4d	37.1 ± 1.3	18.3 ± 0.8	22.6 ± 1.3	1.197 ± 0.021	239 ± 6	0.079±0.025	0.9±0.7	0.992				
M (2)	20_NaOH_10_4_4d	37.4 ± 0.2	18.2 ± 0.5	13.8 ± 0.2	0.984 ± 0.010	228 ± 5	-	-	-				
	20_CaO_10_4_4d	35.1 ± 0.4	18.0 ± 0.6	19.3 ± 0.1	1.165 ± 0.006	223 ± 17	-	-	-				
	Source of variation	DF	F	DF	F	DF	F	DF	F	DF	F	DF	F
	Reagent	2	1.1	2	2.0	2	136*	2	119.9*	2	37.3*	-	-
TS content	1	2.8	1	1.4	1	20.5*	1	0.6	1	13.7*	-	-	
Reagent×TS content	1	1.1	1	3.1	1	1.7	1	0.6	1	4.5	-	-	
CV		4.0		4.0		4.2		2.9		3.7		-	
M (2)	Reagent	2	2.5	2	8.0*	2	149.9*	2	55.5*	2	70.9*	2	8.2*
	Duration	1	3.1	1	0.8	1	0.2	1	6.1*	1	2.7	1	0.1
	Size	1	30.2*	1	4.1	1	10.5*	1	3.4	1	1.7	1	4.9
	Reagent×Duration	1	0.1	1	1.3	1	21.0*	1	11.3*	1	2.0	1	1.6
	Reagent×Size	1	0.1	1	0.1	1	8.9*	1	2.9	2	0.7	2	2.0
	Duration×Size	1	0.2	1	8.2*	1	3.8	1	0.1	1	6.3*	1	1.4
	Reagent×Duration×Size	1	0.5	1	1.10 ⁻³	1	30.3*	1	6.8*	1	0.3	1	0
	CV		2.6		5.8		4.3		6.2		5.2		14.7

- Significant at the 0.1 probability level

* Significant at the 0.05 probability level

In order to minimize the pretreatments costs, the pretreatments were preferentially done with a high TS content. However, some pretreatments were also done with a low TS content (Model (1), Table 3-4). The TS content was significant for the methane production with an effect twice lower than the reagent (F-value = 13.7 and 37.3, respectively) and for Klason lignin content (F-value=20.5). The high solids content pretreatment was the most efficient on the improvement of the methane production, this may be explained by the higher concentration of the alkali reagent in the liquid phase. Among reagent and TS content factors, the reagent had the highest impact due to a high significant impact on the Klason lignin content (F-value = 136). It supported the impact of the reagent of pretreatments performance suggested by PCA (Figure 3-4). The consequence was the increase of the methane productions and the LOI (Table 3-4). Moreover, the interaction of these two factors had a significant impact at 10%. The combination of a pretreatment using soda and high TS content

seems to be the most efficient to improve the methane production. Using a solid state pretreatment with NaOH 5% (w/w) at 25 °C during five hours with 30% dry basis on wheat straw, Barakat et al. (2014a) observed a slight change in cellulose and xylan content and a decrease of the lignin content compared to the raw substrate. Mancini et al. (2016) highlighted that in presence of high amount of water (*i.e.*, above 94 wt %), the amount of soda is insufficient to dissolve cellulose, or the size of the NaOH hydrates is too large to penetrate the cellulose fibers. In contrast, when the concentration of soda exceeds 20%, NaOH hydrates penetrate into the fibers and form crystals with the cellulose chains. So the high solid content alkali pretreatments of this study induced significant delignification but a slight decrease of holocelluloses for soda. Regarding lime, no significant holocelluloses decreases were observed. It could be explained by the low solubility of CaO (Nkongndem Nkemka et al., 2016). It could confirm the hypothesis that alkaline pretreatment does not necessarily lead to complete destruction of the lignocelluloses structure of biomass but rather leads to its swelling, increase pore size and breakage of hydrogen bonds (Neves et al., 2006).

The Model (2) considered as factors reagent, duration and particle size with pretreatment carried out for high solids content and at same concentration. The factor with the highest significant impact was the reagent (F-value=149.9, Table 3-4). This effect was a decrease of the Klason lignin content which induced an increase of the methane production (F-value = 70.9). It also led to an increase of the LOI (F-value 55.5). Soda is one more time highlighted more efficient than lime. After 5% NaOH pretreatment of corn stover for one day, at room temperature and 50% TS content, Li et al. (2014) showed that cellulose, hemicelluloses and lignin decreased of 0.7%, 24.3% and 21.1% by weight, respectively. Jiang Jiang et al. (2017), with NaOH pretreatment at 20%, 100 g.L⁻¹ of giant reed at 25 °C during one day, showed a cellulose content increasing between 34.9% and 40.5%, the xylan content remained nearly at the same level, and the lignin content decreased from 20.1% to 15.1%.

Moreover, the crystallinity of the cellulose is another parameter that limits its conversion. Indeed, Katukuri et al. (2017) reported that crystalline cellulose is hard to break through enzymatic routes. Li et al. (2016) showed a significant increase of the cellulose crystallinity index on Jerusalem artichoke stem after a pretreatment with NaOH 2% (w/v) at 50 °C for 2 h under mixing at 150 rpm. In our study, the LOI increased (Table 3-4). This increase could be explained by a decrease of the amorphous cellulose solubilised by the pretreatment and so an increase of the crystalline cellulose in the ratio.

The interactions of the reagent with the duration of the pretreatment or the particle size or both are also significant on the Klason lignin content (F-value = 21, 8.9 and 30.3 respectively). The particle size affected the cellulose and the Klason lignin content (F-value=30.2 and 10.5, respectively). It confirmed the impact of the particle size of pretreatments performance suggested by the PCA (Figure 3-4). With a confidence at 10%, the size affected, at the same level as the duration, the LOI (F-value = 3.4 and 6.1, respectively). Their interaction had a significant impact on the Klason lignin, hemicellulose contents and on the methane production (F-value = 3.88.2 and 6.3, respectively). The particle size had no significant impact on the methane production (Table 5), as already shown by Sambusiti et al. (2013b) in a study of NaOH pretreatment on sorghum biomass using particle size ranging from 0.25 mm to 2 mm.

Concerning the first order kinetics constant, once again, the reagent is the pretreatment parameter which had the most and significant impact (F-value=8.2). At same pretreatment conditions, soda speeds up the kinetics. The size had also an impact at the 10% level. A shorter fibre size of miscanthus favors the accessibility of the matter to the micro-organisms. Aforementioned, soda favors the lignin degradation and so improves the matter accessibility.

3.2.2.3 Conclusion

Alkaline pretreatments with high solids contents are promising to improve the methane production from miscanthus. The best performance obtained was +55% of methane with soda at 10% during 6 days on 1 mm particle size. High TS content during the pretreatment also improved the methane production and to a lesser extent a reduced particle size increased the solubilisation of the cellulose. The efficiency of the studied alkaline pretreatment was highlighted by the increase of the methane production and LOI resulting from the effects on Klason lignin, cellulose and hemicelluloses solubilisation (up to 45%, 9% and 24% respectively). Although the performances of lime are lower than those of soda, lime should be considered due to the use of its digestate as fertiliser and consequently, its better environmental impact. Nevertheless, these pretreatments were done on only one genotype. An interaction between the genotype and the pretreatment could be expected. Therefore, it could be relevant to study the impact of these same pretreatments on different genotypes.

3.3.2 Miscanthus: experimental design to study the impact of pre-treatment duration and CaO concentration

In order to prepare the application of alkaline pre-treatments to the co-digestion of biomass pre-treated with manure, BMP tests were performed with the grain size that will be used in batch reactors (about 60 mm). As previously observed, the alkaline reagent and its interaction with the pretreatment duration had also a significant effect on the solubilisation of miscanthus lignin. An experimental design was used in order to be able to study the influence of lime concentration and duration but also of interaction (concentration x duration) in an optimized way. Although soda has been shown to be more effective than lime, lime has been used to ensure that the digestate does not return to the soil at the expense of soil salinity.

These part is adapted from H.L. Thomas, J. Seira, R. Escudié, H. Carrère, Lime pretreatment of miscanthus : impact on BMP and batch dry co-digestion with cattle manure. *Molecules* 2018, 23, 1608, :10.3390/molecules23071608

3.3.2.1 Material and Methods

The different pretreatments were carried out at a TS content of 13%. This percentage corresponds to the minimum of water needed for the pretreatment solution spread uniformly. Owing to the high absorption capacity of the 60 mm miscanthus, this content is lower than 20% used in the previous part (used with lower fiber size). CaO concentrations were between 2.5 and 17.5%, and pretreatment durations were 1, 3, or 5 days (Table 3-6). Two experimental designs were created consecutively: Design 1 (CaO concentrations between 7.5 and 17.5%, and durations of 1, 3, or 5 days) and Design 2 (CaO concentrations between 2.5 and 12.5%, durations of 1, 3, or 5 days) (Table 3-6). BMP tests were performed in duplicate using these pretreated substrates. The concept of the Doehlert response surface methodology was explained in the chapter 2. As reminder, a full second-order polynomial equation was used to model the values obtained for BMP and the first kinetics constant k as a function of the applied lime concentration (A) and the duration of the pretreatment (B). The system can be described by the following equation (Equation (1)):

$$Y = a_0 + a_1A + a_2B + a_{12}AB + a_{11}A^2 + a_{22}B^2 \quad (1)$$

3.3.2.2 Results

3.3.2.2.1. BMP and first order kinetics constant results

Table 3-5 reports the BMP and first-order kinetics constant k values. The duplicates revealed a very good repeatability. In comparison with the BMP obtained for the non-pretreated biomass ($158 \pm 2 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$), the effect of the pretreatment was significant (p -value = 9.8×10^{-4}) and positive. An improvement in BMP was observed, ranging from +14% (for 15% CaO; 1 day) to +37% (for 5% CaO; 5 days) for the best-performing condition.

The adjustment the equation for estimating k was excellent over all experimental conditions ($R^2 > 0.97$; data not shown, equation described in chapter 2 (2.2.3)). With a focus on the first kinetics constant k , a strong and positive effect was also noticed as an improvement, ranging from +63% (for 10% CaO; 1 day) to +221% (for 17.5% CaO; 3 days). This was calculated by comparing k with that obtained for raw biomass ($0.024 \pm 0.002 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Even though a clear correlation did not emerge, the evolution of BMP and k presented similar trends, as the highest BMPs were mostly characterized by the highest k values. These results show that lime pretreatment of the miscanthus does, indeed, induce an increase for both BMP and k . Despite these positive observations, it was not possible to assess which parameter was most relevant. The effect of each parameter therefore needs to be unraveled using an experimental design.

Table 3-5. Pretreatment conditions, biochemical methane potential (BMP), and first-order kinetics constant values and their improvement, compared to raw, for Design 1 and Design 2.

Design 1	Variable A: [CaO]		Variable B: Duration		BMP	K		
	Run	Coded	%	Coded			d	NmL _{CH₄} ·g _{VS} ⁻¹
Raw	-	-	-	-	158 ± 2	-	0.024 ± 0.002	-
1	0	12.5	0	3	196	+24%	0.047 ± 0.001	+96%
1'	0	12.5	0	3	201	+27%	0.048 ± 0.001	+100%
2	1	17.5	0	3	191 ± 2	+21%	0.077 ± 0.005	+221%
3	0.5	15	0.866	5	207 ± 1	+31%	0.075 ± 0.004	+213%
4	-0.5	10	0.866	5	208 ± 4	+32%	0.051 ± 0.004	+113%
5	-1	7.5	0	3	202 ± 4	+28%	0.042 ± 0.001	+75%
6	-0.5	10	-0.866	1	199 ± 2	+26%	0.039 ± 0.002	+63%
7	0.5	15	-0.866	1	179 ± 13	+14%	0.050 ± 0.002	+108%
Design 2								
Raw	-	-	-	-	158 ± 2	-	0.024 ± 0.002	-
1	0	7.5	0	3	204	+29%	0.041 ± 0.001	+71%
1'	0	7.5	0	3	199	+26%	0.043 ± 0.001	+79%
2	1	12.5	0	3	199 ± 4	+26%	0.047 ± 0.001	+96%
3	0.5	10	0.866	5	208 ± 4	+32%	0.051 ± 0.004	+113%
4	-0.5	5	0.866	5	216 ± 1	+37%	0.050 ± 0.001	+108%
5	-1	2.5	0	3	193 ± 3	+22%	0.040 ± 0.003	+67%
6	-0.5	5	-0.866	1	193 ± 1	+22%	0.048 ± 0.003	+100%
7	0.5	10	-0.866	1	199 ± 2	+26%	0.042 ± 0.004	+75%

* by comparison with raw (i.e., non-pretreated) sample.

3.3.2.2.2 Experimental Design 1 (CaO Concentration from 7.5 to 17.5% and Duration from 1 to 5 Days)

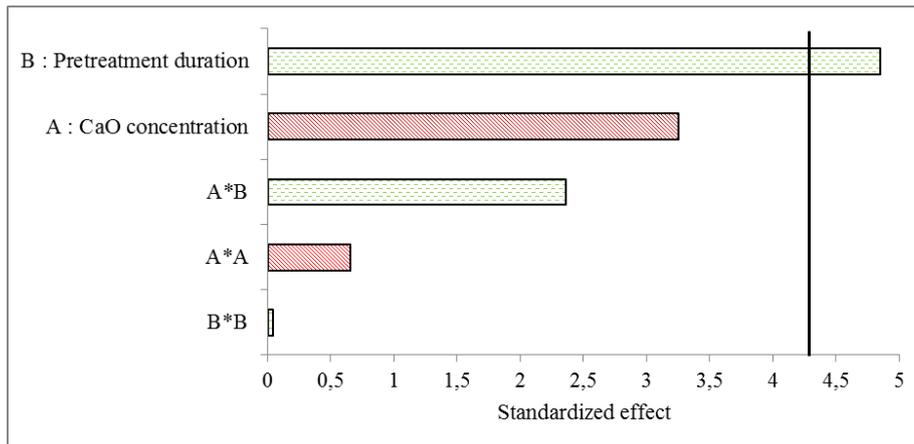
The effect of variables A (CaO concentration) and B (pretreatment duration) on BMP and first-order kinetics constant k was investigated by statistical analysis based on response surfaces. According to (Oliveira et al., 2015), response surface methodology (RSM) is a collection of both mathematical and statistical techniques that involve (i) designing and carrying out experiments with a reduced investment; (ii) building models; (iii) evaluating the relative significance of the studied variables; and (iv) assessing the optimal conditions for a favorable response. Using data displayed in Table 3-5 and multiple regression analysis, a polynomial equation was determined to predict BMP and k depending on the variables, as well as their interactions (Equation (1)). The different coefficients with their standard deviation, the Fisher value (F-value), and the coefficient of determination R² of the models are provided in Table 3-6 for each design.

Table 3-6: Coefficients, Fisher value, and R^2 of the two designs.

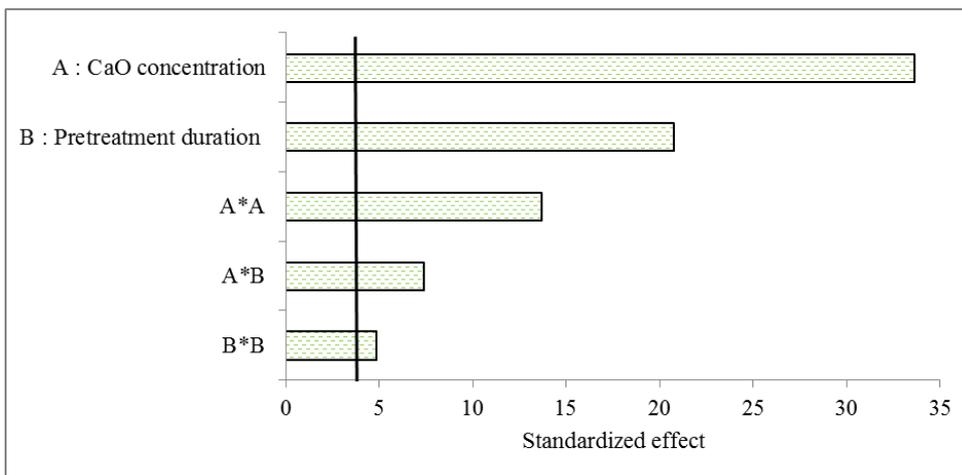
Coefficient	Design 1		Design 2
	Y_{BMP}	Y_k	Y_{BMP}
a_0	198.5 (± 2.7)	0.0474 (± 0.0006)	201.5 (± 2.3)
a_1	-7.2 (± 2.2)	0.0173 (± 0.0005)	1.5 (± 1.9)
a_2	10.7 (± 2.2)	0.0107 (± 0.0005)	9.5 (± 1.9)
a_{12}	10.4 (± 4.4)	0.0076 (± 0.0010)	-8.1 (± 3.8)
a_{11}	-2.5 (± 3.8)	0.0122 (± 0.0009)	-5.8 (± 3.3)
a_{22}	0.2 (± 3.8)	0.0043 (± 0.0009)	4.9 (± 3.3)
F-value	1.33	0.22	0.75
R^2	0.952	0.999	0.950

The F-value for each case was far less than the Fisher parameter calculated at the 95% confidence level (161.45), thus indicating that the models were significant and fitted the data nicely. (Joglekar and May, 1987) suggested that, for a good fit of a model, the R^2 should be higher than 0.8. The high R^2 (≥ 0.95) obtained for each case was a strong hint of suitability, as it indicated that 95% of the data were explained by the regressions, even reaching 99.9% for the prediction of k in Design 1. Consequently, all the models were validated.

Standardized Pareto charts displaying the effects of the different terms of the models are provided for BMP in Figure 3-6a and for the first-order kinetics constant k in Figure 3-6b. The duration of the pretreatment (variable B) was the only parameter that significantly affected the BMP (Figure 3-6a). Moreover, the effect being positive, long contact times between CaO and miscanthus should favor methane production. Interestingly, the pretreatment duration also produced a very significant and positive effect on the first-order kinetics constant k , although this effect was less significant than the effect of CaO concentration (Figure 3-6b). In addition, both quadratic terms proved to be significant for the first-order kinetics constant k , thus implying that the influence of the variables was not necessarily linear. Finally, the interaction term A*B was also significant, with a positive effect on the first-order kinetics constant. This result could not have been anticipated by using a univariate approach. Although both BMP and k were related, it is noteworthy that both selected variables affected these responses at different levels (positive or negative effect) and with various extents of contribution.



(a)



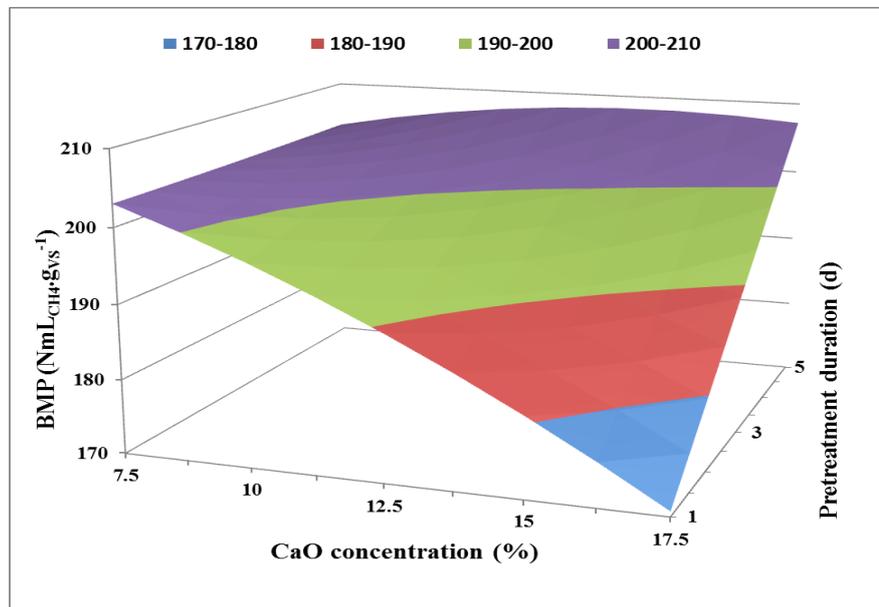
(b)

Figure 3-6 : Pareto diagram showing the effect of different coefficient terms on BMP (a) and kinetics constant k (b) for Design 1. Red bars indicate a negative impact, and green bars show a positive impact. Bars exceeding the vertical line point to the significance of the coefficient terms ($p < 0.05$, corresponding to 4.3 according to Student t-test in our conditions).

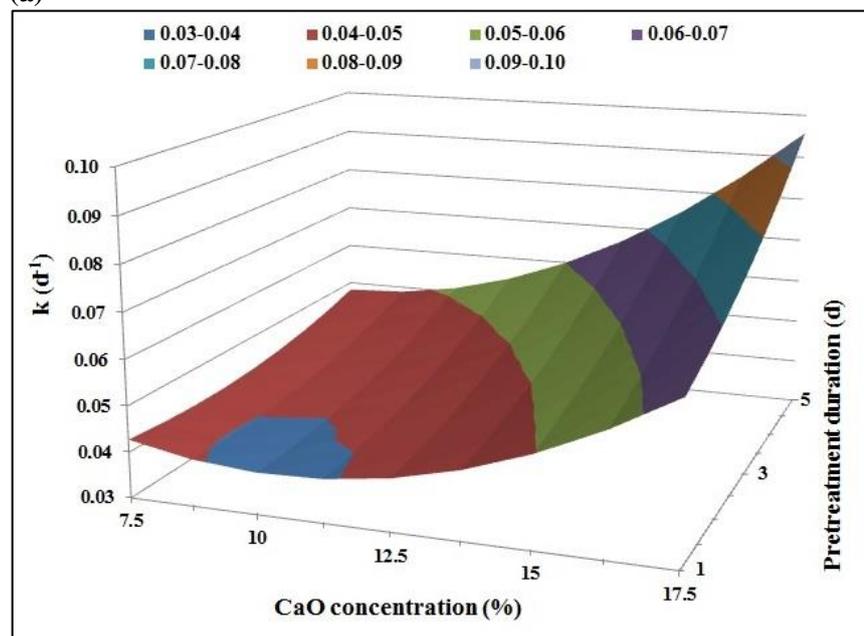
Response surfaces were plotted in 3-D for each parameter (i.e., BMP and k) as a function of CaO concentration and pretreatment duration (Figure 3-7). The response surface plot for BMP (Figure 3-8a) led to the following observations: (i) the longer the duration of the pretreatment, the better the BMP, which is the same conclusion as that stated in a previous section; (ii) the more the CaO concentration increases within the experimental domain, the more the BMP decreases. Even if it was not significant, the negative effect of this variable could be anticipated from Figure 3-6. Consequently, in order to favor methane production, a combination of “low” CaO concentration (lower part of the experimental domain) with “high” contact time for pretreatment (upper part of the experimental domain) could be a viable option.

Focusing on the response surface plot for k (Figure 3-7b), the coupling of a “high” CaO concentration with a “long” pretreatment duration was linked to a high methane production rate. Nevertheless, the effect was more pronounced in the upper part of the domain (CaO concentration $> 16\%$ and pretreatment duration > 3 days) where few experimental data were generated (Table 3-6). The prediction thus rather relies on extrapolation rather than on interpolation. Therefore, the selection of the experimental domain to be exploited was made

where the trend described by the model is well established. In this case, it is the middle-upper part of the domain that was chosen. Application of a “medium” CaO concentration with a “long” contact time pretreatment was hence considered most relevant to achieve a high first-order kinetics constant k .



(a)



(b)

Figure 3-7 : Response surface plots showing the impact of lime concentration and pretreatment duration on BMP (a) and kinetics values (b) for Design 1.

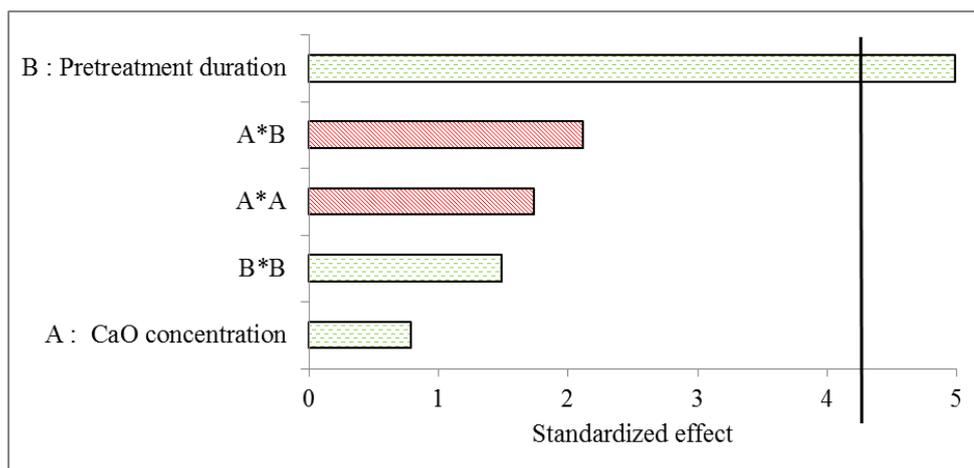
As the responses for BMP and k reflect different impacts, it is difficult to find a consensus regarding the values of the variables to select (lime concentration and pretreatment duration) in order to optimize both parameters simultaneously. Moreover, no optima could be determined within the investigated domain. Only one extreme stationary point was identified in the lower domain for the kinetics constant k , which is irrelevant when both BMP and k

need to be maximized. Owing to its energetic relevance, BMP is the parameter to prioritize in this study. The first-order kinetics constant k will therefore not be discussed anymore in the further section.

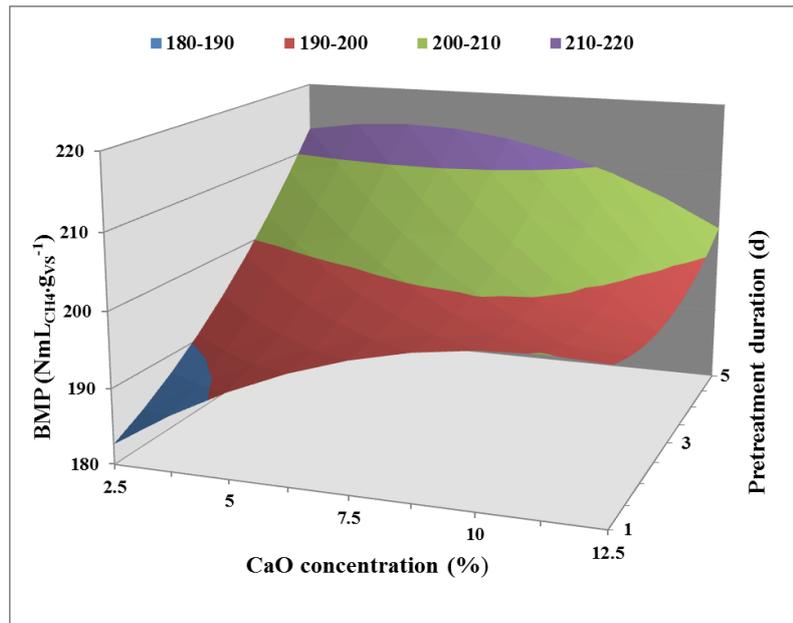
3.3.2.2.3 Experimental Design 2 (CaO Concentration from 2.5 to 12.5% and Duration from 1 to 5 Days)

According to the trend displayed in Figure 3-7a, the application of a lower CaO concentration could contribute to enhancement of the BMP and even lead to an optimal result. The experimental domain was thus extended to CaO concentrations ranging from 2.5 to 12.5% for a second design of experiments (DOE). Finally, and even though the duration of pretreatment had a positive effect on BMP, its experimental domain was not extended for the following reasons: (i) longer contact times would not be realistic for applications in full-scale plants; (ii) the extension of a Doehlert design with the reuse of certain points is only possible for one factor; (iii) the possible formation of refractory compounds, which could further impede methane production (Carlsson et al., 2012); and (iv) the possible pre-degradation of accessible substrates by microorganisms already present in the bulk matrix, which could decrease the bioavailable fraction for methane production (Sole-Bundo et al., 2017).

The results obtained for the second DOE are summarized in Table 3-7, and as a Pareto chart and response surface plot in Figure 3-8a&b. As depicted in Figure 3-8a, variable B (pretreatment duration) was the only one that significantly and positively impacted methane production, as was previously observed. The response surface (Figure 3-8b) confirmed this observation, as BMP increased with the application of longer contact times. Regarding variable A (CaO concentration), the effect was minor within the investigated domain (from 2.5 to 12.5%), even though the highest concentrations appear to lead to an increase in BMP. Unfortunately, it was not possible to determine an optimum in the second DOE domain. However, high responses for BMP can be observed in a region of interest.



(a)



(b)

Figure 3-8 : Pareto diagram showing the effect of different coefficient terms on BMP (a) and response surface plot showing the impact of lime concentration and pretreatment duration on BMP in Design 2 (b).

According to these results, the application of a long contact time seems necessary for enhancing methane production. A duration of 5 days for the “pretreatment duration” variable was thus selected. For the CaO concentrations, response surfaces revealed that the additional increase in BMP was negligible when a concentration above 10% was applied, while a detrimental effect was even possible for concentrations below 5% (Figure 3-8).

3.3.2.2.4 Effect of the pretreatment on the cell wall composition and the cellulose crystallinity

This part was not in the article because there only few data were available. However the of the composition and the LOI variations of the composition and the LOI are presented here (Table 3-7) in order to be able to compare between the different parts of this chapter.

Table 3-7 : Cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI for 60 mm raw and pretreated miscanthus FLO

Concentration (g/100g _{TS})	Duration (day)	Cellulose (%TS)	Hemicelluloses (%TS)	Klason lignin (%TS)	LOI
0	0	36.2 ± 0.1 ^a	19.5 ± 0.4 ^a	24.6 ± 1.7 ^a	0.847 ± 0.009 ^a
2.5	3	nd	nd	nd	0.960 ± 0.149 ^{ab}
5	1	nd	nd	nd	1.092 ± 0.030 ^{ab}
5	5	36.2 ± 0.3 ^a	19.4 ± 0.6 ^a	15.0 ± 0.1 ^c	1.197 ± 0.049 ^{bc}
7.5	3	nd	nd	nd	1.166 ± 0.019 ^{bc}
10	1	37.4 ± 0.2 ^a	18.6 ± 0.3 ^a	18.6 ± 0.3 ^{bc}	1.092 ± 0.023 ^{ab}
10	5	36.1 ± 0.2 ^a	18.5 ± 0.3 ^a	21.5 ± 0.3 ^{ab}	1.140 ± 0.091 ^{abc}
12.5	3	36.8 ± 0.5 ^a	18.8 ± 0.2 ^a	23 ± 1.1 ^a	1.140 ± 0.097 ^{abc}
15	1	nd	nd	nd	1.156 ± 0.136 ^{abc}
15	5	nd	nd	nd	1.249 ± 0.024 ^{bc}
17.5	3	nd	nd	nd	1.448 ± 0.055 ^c

* Different letters differ significantly for p<0.05

The cellulose and hemicellulose contents are not significantly different between the different samples. Pre-treatments at 5% for 5 days and 10% for 1 day induce a significant solubilization of lignin compared to raw miscanthus. At higher concentrations, the lignin content is similar to raw. This may explain the results of the Design 2 (Figure 3-7) showing a negative impact of concentration on BMP although they are not negatively significant according to the Pareto diagram. Several hypotheses are possible: the low solubility of lime, the bridging power of divalent calcium ion. These assumptions will be discussed in a subsequent sub-chapter (3.4). The LOI values significantly different from the raw miscanthus concern pre-treatments 5%-5 d, 7.5%-3 d, 15-5 d and 17.5%-3 d. The fact that these different pre-treatments did not have a significant effect on sugar solubilization did not prevent a significant increase in kinetics (Figure 3-6b). It also suggests that alkaline reagents may be less effective on larger particle sizes.

3.3.3 Sorghum: study of the impact of the alkaline reagent, the temperature and the pretreatment duration

3.3.3.1 Material and methods

3.3.3.1.1 Pretreatment conditions

The pretreatments conditions are presented in the Table 3-8. The fiber size was the same as aforementioned (60 cm) and the same as further used in LBR codigestion. The Model (3) studied the impact of the temperature and the reagent. The Model (4) studied the impact of the duration and the reagent.

Table 3-8: Raw sorghum and pretreatments conditions tested on B140 genotype. The different models correspond to the statistic models presented in detail in the “Statistical analysis” part.

	Pretreatment	Size (mm)	Temperature (°C)	Dry matter content (%TS)	Duration (d)
Model (3)	S_60_NaOH_55_13_1	60	55	13	1
	S_60_CaO_55_13_1	60	55	13	1
	S_60_Raw	60	-	-	-
Model (4)	S_60_NaOH_24_13_1	60	24	13	1
	S_60_CaO_24_13_1	60	24	13	1
	S_60_NaOH_24_13_5	60	24	13	5
	S_60_CaO_24_13_5	60	24	13	5

3.3.3.1.2 Statistical analysis

These analyses were performed using R software (version 3.2). The sources of variation of the biomethane potential, the raw and pretreated sorghum chemical composition and LOI were analysed using linear modelling analysis. The normality and the variances homogeneity of the data, was previously verified with a Shapiro test and a Bartlett test, respectively (data not shown). For preliminary analysis, repetitions were considered as factor

and they had no effect on the variables (data not shown). Two different ANOVA models were used to test different conditions of pretreatment applied on sorghum.

Model (3)

$$Y_{eb} = \mu + T_e + R_b + (TR)_{eb} + \varepsilon_{eb}$$

Where Y_{eb} is the variable studied (BMP, cellulose, hemicelluloses and Klason lignin contents and LOI) according to the pretreatment varying with the temperature e and the reagent b . μ is the trial mean. T_e is the temperature during the pretreatment main effect, R_b is the reagent main effect, $(TR)_{eb}$ is the interaction effect between the temperature e and the reagent b , and ε_{eb} is the residual error.

Model (4)

$$Y_{db} = \mu + D_d + R_b + (DR)_{db} + \varepsilon_{db}$$

Where Y_{db} is the variable studied (BMP, hemicelluloses and Klason lignin contents) according to the pretreatment varying with the duration d and the reagent b . μ is the trial mean. D_d is the duration of the pretreatment main effect, R_b is the reagent main effect, $(DR)_{db}$ is the interaction effect between the duration d and the reagent b , and ε_{db} is the residual error.

As the cellulose data distribution was not normal (data not shown), the sources of its variation for this Model were analysed with a non parametric test (Kruskal-Wallis and conover tests).

For the same reasons, the sources of the variation of the first order kinetic constant were analysed with this non parametric test.

3.3.3.2 Results

The methane yield of raw sorghum ground at 60 mm was $250 \pm 14 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$ (Table 3-9). These experimental data are well in agreement with literature values. (Trulea et al., 2016) obtained a BMP of $284 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{kgVS}^{-1}$ with the *Sorghum bicolor x sudaneze cv. Jumbo*. The cellulose, hemicelluloses and Klason lignin contents before pretreatment were 30.4 ± 0.9 , 15.1 ± 0.3 and 19.5 ± 0.5 , respectively. It was in same range as results reported by Sambusiti et al. (2013a) done on five sorghum varieties.

Table 3-9: Methane production and first order kinetics constant values cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI and linear modelling analyses (Models (3) and (4))

	Pretreatment	Methane production ($\text{NmL}_{\text{CH}_4 \cdot \text{gVS}}^{-1}$)		k (d^{-1})		Cellulose (%)		Hemi-celluloses (%)		Klason Lignin (%)		LOI	
		DF	F	DF	F	DF	F	DF	F	DF	F	DF	F
M (3)	S_60_NaOH_10_55_13_1												
	S_60_CaO_10_55_13_1												
	S_60_Raw												
M (4)	S_60_NaOH_10_24_13_1												
	S_60_CaO_10_24_13_1												
	S_60_NaOH_10_24_13_5												
	S_60_CaO_10_24_13_5												
M (3)	Temperature	1	4.8	no parametric test	1	5.0*	1	152.3*	1	4.3	1	0.8	
	Reagent	2	8.8*	Table3-X	2	182.6*	2	7.8*	2	15.9*	2	6.9*	
	Temp*Reagent	1	0.2		1	2.9	1	48.1*	1	0.7			
	CV		4.7			1.8		2.1		11.1			4.6
M (4)	Duration	2	1.8	no parametric test			2	27.6*	2	11.6*			-
	Reagent	1	6.2*	Table3-X			Cf no parametric test	1	5.0	1	4.1		-
	Duration*Reagent	1	0.2				Table3-X	1	16.8*	1	0.1		-
	CV		5.6					1.8		11.9			

*Significant at the 0.05 probability level

ˆSignificant at the 0.10 probability level

The Model (3) studies the impact of the temperature and the reagent on sorghum pretreated for 1 d. The temperature had a significant impact on the cellulose and hemicelluloses contents (at 5%, F-value = 5.0 and 152.3, respectively, Table 3-9) and on Klason lignin (at 10%, F-value = 4.3). At ambient temperature more carbohydrates were solubilized than at 55°C. However, on cellulose content, the reagent had a higher significant impact than the temperature (F-value = 182.6 versus 5). Its impact was significant on Klason lignin content, methane production and on LOI too, but in a lower extent (F-value = 15.9, 8.8 and 6.9, respectively). The interaction between these two factors was only significant for the hemicelluloses content. Their impacts on Klason lignin were not significant too. On sunflower stalks, Monlau et al. (2012a) did not clearly conclude on the impact of temperature on NaOH pretreatment on the methane potential.

The reagent and the temperature had also a significant impact on the first order kinetics constant (Table 3-9). They induced an acceleration of the methane production compared to the raw sorghum but none of the pretreatment conditions emerged. In fact the temperature or the reagent impacts were not significantly different (p-value = 0.1204, 0.4354, respectively).

Table 3-10: Results of no parametric test for the study of the impact of the pretreatment temperature and the reagent and duration and the reagent on the first order kinetics constant

		Effect of temperature			Effect of reagent		
M(3)	Kruskal-Wallis p-value	0.02			0.03		
			24	55		CaO	NaOH
	Conover test p-value*	55	0.1204	-	NaOH	0.4354	-
	Raw	0.0042	0.0136	Raw	0.0085	0.0132	
		Effect of duration			Effect of reagent		
M(4)	Kruskal-Wallis p-value	0.03			0.03		
			1 d	5 d		CaO	NaOH
	Conover test p-value	5 d	0.3722	-	NaOH	0.3722	-
	Raw	0.0114	0.0095	Raw	0.0114	0.0095	

*The Conover test compares two pretreatment conditions with each other

The Model (4) studies the impact of the duration and the reagent. The duration led to a significant decrease of hemicelluloses and Klason lignin contents (F-value = 27.6 and 11.6, respectively, Model (2), Table 3-9). The reagent had a significant impact on the Klason lignin and methane production (at 10%, F-value = 4.1 and at 5%, F-value = 6.2, respectively). A significant decrease of the lignin content did not conduct to an increase of BMP but induced a significant kinetics improvement (p-value = 0.0114, 0.0095, respectively, Table 3-10). Similar results were found by Sambusiti et al. (2013) on other types and genotypes of sorghum. In this same study, authors suggested that the impact on methane production of sodium hydroxide pretreatment depends on the type and variety of substrate used.

Concerning the cellulose content, the reagent had a higher significant impact than the temperature (p-value=0.01 versus 0.02, Table 3-11). Soda was significantly different from lime (p-value= 0.0067) and conducted to a higher solubilisation.

Table 3-11: Results of no parametric test for the study of the impact of the pretreatment duration and the reagent on the cellulose content

		Effect of duration			Effect of reagent		
Kruskal-Wallis p-value		0.02			0.01		
			1 d	5 d		CaO	NaOH
Conover test p-value	Raw	0.0036	0.0243		NaOH	0.0067	-
	5 d	0.0863	-		Raw	0.0067	0.0002

3.4 Complementary experiments

As mentioned previously, different hypothesis were done in order to explain the impact difference between soda and lime.

3.4.1 Experiment with soda and lime at the same normality

Lime and soda are two different alkaline reagents. A same dose expressed with the same amount of chemical on a weight basis induces an imbalanced comparison as sodium and lime possess different OH⁻ concentrations (Soares Rodrigues et al., 2016).

This part is adapted from : Methane Production Variability According to Miscanthus Genotype and Alkaline Pretreatments at High Solid Content, Hélène Laurence Thomas, Stéphanie Arnoult, Maryse Brancourt-Hulmel, Hélène Carrère. BioEnergy Research doi.org/10.1007/s12155-018-9957-5

3.4.1.1 ANOVA model

The following Model (Model (5)) led to study the impact of the reagent and its concentration.

$$\text{Model (5)} \quad Y_{io} = \mu + R_i + C_o + (RC)_{io} + \varepsilon_{io}$$

Where Y_{io} is the studied variable measured (BMP, cellulose, hemicelluloses or Klason lignin contents) according to the pretreatment varying with the reagent i and the concentration o . μ is the trial mean, R_i is the reagent main effect, C_o is the concentration of the reagent main effect, $(RC)_{io}$ the interaction between the reagent i and its concentration o and ε_{io} is the residual error.

3.4.1.2 Results

The ANOVA Model (5) studied the impact of the reagent and the concentration. In fact, the concentration was per gram of dry matter which induced the use of lime and soda at different normality and molarity from each other which could explain the best efficiency of soda.

Table 3-12: Cellulose, hemicelluloses, Klason lignin contents, LOI and methane production values and linear modelling analyses (Model (5)) of repeated data using FLO genotype

Pretreatment	Cellulose		Hemicelluloses		Klason Lignin		Methane production	
	(%TS)		(%TS)		(%TS)		(NmL _{CH₄} ·g _{VS} ⁻¹)	
M_1_NaOH_14.4_20_4d	34.3 ± 1.8		12.9 ± 1.1		13.9 ± 0.6		266 ± 9	
M_1_CaO_14_20_4d	34.6 ± 1.8		15.0 ± 1.4		23.4 ± 0.7		240 ± 11	
M_1_NaOH_10_20_4d	35.1 ± 0.6		14.6 ± 0.1		17.0 ± 0.3		274 ± 11	
M_1_CaO_10_20_4d	35.5 ± 1.1		15.8 ± 0.5		17.0 ± 1.9		226 ± 11	
M_1_Raw	38.3 ± 1.3		18.7 ± 0.4		25.1 ± 0.2		188 ± 14	
Source of variation	DF	F	DF	F	DF	F	DF	F
Reagent	2	7.7	2	94.0*	2	69.7*	2	25.6*
Concentration	2	0.4	2	25.5*	2	27.5*	2	1.0
Reagent×Concentration	2	2.3	2	14.4*	2	1.2	-	-
CV		3.6		2.5		5.0		5.4

*Corresponds to the same normality as CaO

** Corresponds to the same molarity as NaOH

Nevertheless, at the same molarity (10% NaOH treatment for 4 days with 14% CaO for 4 days) and at the same normality (14.4% NaOH for 4 days against treatment with 10% CaO for 4 d) soda was again more efficient than lime (274 ± 11, 240 ± 11, 266 ± 9 and 226 ± 11 NmL_{CH₄}·g_{VS}⁻¹, respectively; Table 3-12). The reagent had a higher significant and positive effect on the hemicelluloses and Klason lignin contents than the concentration (F-value= 94 versus 25.5 and 69.7 versus 27.5, respectively). It supported the results of the PCA (Figure 3-5). This fact could be explained by a high significant effect of the reagent on the decrease of the hemicellulose content (at 5%, F-value = 94.0) and on the cellulose content (at 10%, F-value = 7.7). The reagent appeared to be the most important factor due its higher impact on the solubilisation of carbohydrates, in addition of the Klason lignin removal. The efficiency of the pretreatment with soda at room temperature could be explained by the stronger binding capacity of Na⁺ and OH⁻ at lower temperatures, which enables the alkali solution to break the hydrogen bonds within the lignocellulosic structure, converting cellulose I (*i.e.*, native cellulose) to cellulose II (Mancini et al., 2016). At the same dosage of 20%, Ca(OH)₂ pretreatment resulted in lower cellulose and xylan contents, and higher lignin content, compared to NaOH pretreatment (Jiang et al., 2017). Rodrigues et al. (2016) also demonstrated that at a same molarity, soda is more efficient than lime.

3.4.2 Limite de la solubilité de CaO

Cette expérience a pour objectif d'étudier l'influence de la solubilité de la chaux qui est de 1.65 g.L^{-1} à 20°C . L'hypothèse est que cette faible solubilité peut affecter son efficacité. Comme précédemment, une granulométrie de 1 mm a été choisie afin de s'affranchir d'une possible réduction de la bioaccessibilité de la matière. Une comparaison entre une quantité de miscanthus pré-traité avec 10% de CaO et pré-traité avec CaO dosée à 0.83% correspondant à sa limite de solubilité (à une teneur en MS de 20%) a été réalisée. Afin de pouvoir mesurer son effet et le comparer à la soude, une quantité identique de miscanthus a été pré-traitée avec NaOH à même normalité que l'échantillon précédent (soit 1.2% de soude).

En raison de problèmes lors de la mesure de la composition de ces échantillons, ces données n'ont pas pu être exploitées.

Table 3-13 : Valeurs de productions de méthane et de la constante de cinétique du premier ordre, teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine Klason

	BMP ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$)	k (j^{-1})	Δ (j)	R ²
M_1	203 ± 5^a	0.065 ± 0.004	1.79 ± 0.05	0.970
M_1_CaO_10	278 ± 5^c	0.082 ± 0.005	0	0.983
M_1_CaO_0.83	186 ± 2^b	0.093 ± 0.007	0	0.935
M_1_NaOH_1.2	253 ± 1^d	0.079 ± 0.024	$0.62 \pm 0.88^*$	0.978

*un des duplicats a eu un temps de latence de 1.2j, l'autre aucun

Les potentiels méthane des 4 échantillons sont significativement différents (p -Value = $3.7 \cdot 10^{-5}$, Table 3-13). En se plaçant à la limite de solubilité de la chaux, le pré-traitement ne permet pas d'augmenter le BMP du miscanthus (186 ± 2 versus $203 \pm 5 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$). En utilisant la chaux à une concentration de 10%, le BMP est augmenté (+ 37%). La cinétique ayant été très différente entre les duplicats pour les échantillons M_1_NaOH_1.2 en raison d'un temps de latence pour un réplicat, il est impossible de faire une analyse statistique cohérente pour ce paramètre, ni de conclure sur l'effet de la soude dans ce cas. Pour une même normalité, la soude a été plus efficace que la chaux sur le potentiel méthane (augmentation du BMP de 25% avec NaOH). Il est donc possible d'écarter l'hypothèse de la solubilité puisque des traitements à des concentrations supérieures à la solubilité de la chaux permettent d'améliorer le BMP.

3.4.3 Potentiel acidogène (BAP) : Peut-on représenter les cinétiques de dégradation anaérobie par les cinétiques de fermentation ?

L'objectif de cette étude est d'évaluer si les performances et/ou cinétiques de fermentation acidogène de sucres facilement accessibles (hors hydrolyse) peuvent permettre de mieux comprendre l'impact des prétraitements alcalins sur les cinétiques des potentiels méthanogènes. Cela permettrait de distinguer les différents échantillons du point de vue de la cinétique de production de méthane plutôt qu'au niveau du potentiel méthane. En effet, dans les parties précédentes, la cinétique a été, le plus souvent, plus améliorée que le potentiel méthanogène.

Les pré-traitements pour chacune des biomasses ont été choisis parmi ceux qui étaient les plus contrastés du point de vue de la cinétique (cf 3.2.2, 3.3.1 et 3.3.3). Ainsi, les prétraitements testés ont été différents sur les deux séries, le but étant de fournir une hypothèse quant aux différences de cinétiques observées sur les échantillons pré-traités.

3.4.3.1 Production de métabolites et d'hydrogène

Aucune trace de méthane n'a été observée dans la phase gazeuse (données non présentées). Le traitement de l'inoculum (chauffage à 90°C pendant 30 min) a donc été efficace. C'est bien une fermentation et non une digestion anaérobie qui a eu lieu.

La Table 3-14 présente les quantités cumulées d'AGV, d'éthanol et de d'hydrogène produits lors des fermentations du sorgho et du miscanthus bruts et pré-traités. En effet, elles n'ont pas uniquement conduit à la production d'hydrogène mais également à la synthèse de métabolites (Table 3-14).

Table 3-14: Quantités de métabolites et d'hydrogène produits. Le codage des échantillons correspond à celui utilisé dans les parties précédentes.

	Acétate (mg _{DCO} ·g _{substrat} ⁻¹)	Butyrate (mg _{DCO} ·g _{substrat} ⁻¹)	Formate (mg _{DCO} ·g _{substrat} ⁻¹)	Ethanol (mg _{DCO} ·g _{substrat} ⁻¹)	H ₂	
					(mg _{DCO} ·g _{substrat} ⁻¹)	(NmL _{H2} ·g _{vs} ⁻¹)
S_1_NT	74	21	6 ± 1	0	0.39	11 ± 3
S_60_NT	57 ± 14	20 ± 0	0 ± 0	0	0.56 ± 0.08	13 ± 2
S_1_NaOH-10-55	131 ± 6	43 ± 7	37 ± 11	0	1.5 ± 0.4	31 ± 1
S_1_CaO-10-55	114 ± 25	61	23 ± 2	0	1.5	36 ± 1
S_60_NaOH-24-13-1	58 ± 5	43 ± 6	9 ± 1	0	1.5	36 ± 1
S_60_CaO-24-13-1	73	53	5	0	0.67 ± 0.32	20 ± 1
M_20_Raw	37 ± 3	4 ± 1	0 ± 0	6 ± 3	0.62 ± 0.26	9 ± 1
M_1_NaOH_10_20_4d	69 ± 7	9 ± 4	13 ± 4	20 ± 4	0.94 ± 0.21	13 ± 1
M_1_CaO_10_20_4d	113 ± 3	28 ± 3	0 ± 0	13 ± 9	1.1 ± 0.6	13 ± 1
M_20_NaOH_10_20_4d	71 ± 5	26 ± 9	13 ± 2	20 ± 4	2.1 ± 0.2	24 ± 0
M_20_CaO_10_20_4d	121 ± 15	17 ± 7	0 ± 0	14 ± 4	0.32 ± 0.12	3 ± 1

La production d'hydrogène est majoritairement le résultat des 2 voies métaboliques classiques : celles de l'acétate et du butyrate, mais aussi celui de deux autres voies : celles du formate et de l'éthanol (Figure 3-9). La voie du formate est une voie alternative via la consommation du pyruvate, majoritairement réalisée par des micro-organismes aérobies facultatifs (Trably et al., 2018). La voie éthanol est une voie concurrente de celle de l'acétate qui ne conduit pas à la production d'hydrogène.

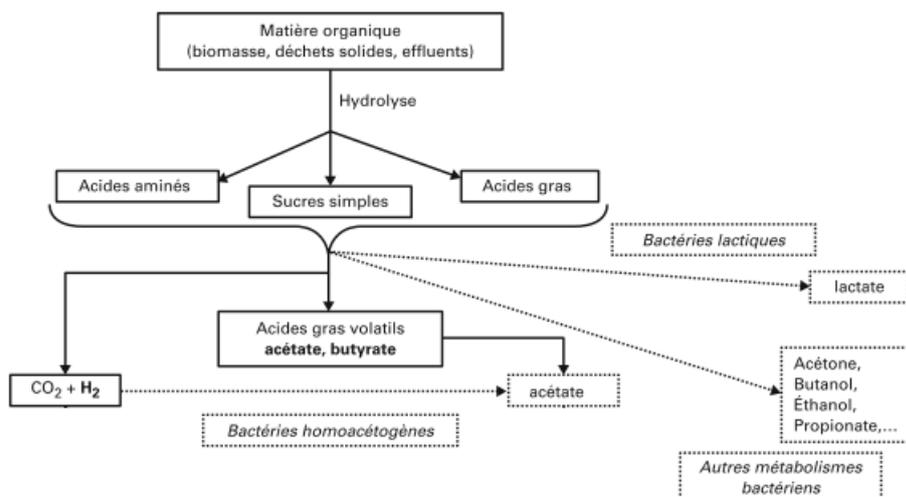


Figure 3-9 : Les différentes voies métaboliques de la fermentation sombre adapté de (Trably et al., 2018)

Le sorgho brut broyé à 1 et 60 mm permet une production d'acétate 3.5 et 3 fois supérieure à celle du butyrate tandis que le miscanthus conduit à une production 9 fois supérieure (Table 3-14). L'éthanol n'est produit qu'avec le miscanthus. Une différence de voies métaboliques existe entre le sorgho et le miscanthus.

Après pré-traitements, certaines quantités de métabolites et d'hydrogène sont augmentées. Les échantillons de sorgho pré-traités à 55°C présentent des quantités d'acétate et de formate deux et trois fois supérieures, respectivement, à ceux pré-traités à température ambiante. Les quantités de butyrate sont plus importantes pour les échantillons de sorghos pré-traités avec de la chaux qu'avec la soude. Il semble donc il y avoir à la fois un effet de la température et du réactif alcalin. Pour le miscanthus pré-traité avec CaO, la quantité d'acétate est triplée alors qu'elle est seulement doublée avec NaOH par rapport au miscanthus brut. Du formate est produit lorsque les échantillons de miscanthus ont été pré-traités avec de la soude. Plus d'éthanol semble également être produits pour ces mêmes échantillons. Dans le cas du miscanthus l'effet réactif semble être bien supérieur à celui de la granulométrie. Pour les deux biomasses, la quantité d'hydrogène des échantillons pré-traités est supérieure à celle des échantillons bruts excepté pour le sorgho 60 mm et le miscanthus 20 mm pré-traités avec de la chaux.

De plus, cette expérience a permis la mesure du potentiel hydrogène de ces deux biomasses (11 ± 3 et 9 ± 1 NmL_{H2.gVS⁻¹}, pour le sorgho et le miscanthus, respectivement). Comparés à celui du topinambour (62 ± 6 NmL_{H2.gVS⁻¹}; (Monlau et al., 2012b)) par exemple, elles ne sont pas les meilleures candidates.

3.4.3.2 Liens entre métabolisme fermentaire et échantillons bruts et pré-traités

Des biplots (ACP et répartition des échantillons) ont été réalisés dans le but de mieux visualiser les résultats obtenus précédemment (Table 3-13).

3.4.3.2.1 Cas du sorgho

Les pré-traitements retenus pour le sorgho ont été soude et chaux dosées à 10% à 55°C avec une teneur en MS de 4% pour une granulométrie de 1 mm et à température ambiante pendant un jour pour une granulométrie de 60 mm à 13% de teneur en MS.

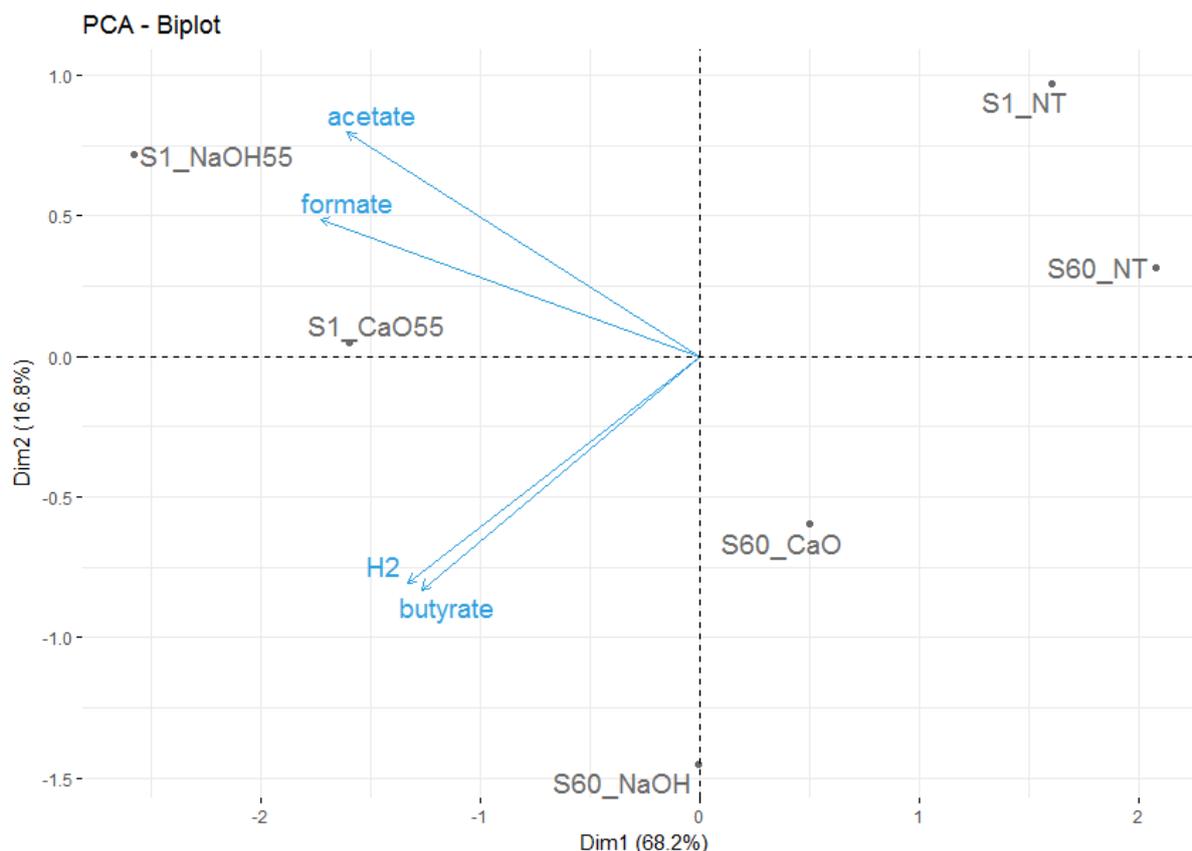


Figure 3-10: Biplot (ACP et carte de répartition des individus) des métabolites pour les sorghos brut (S1 et S60) et pré-traités

Les deux premières dimensions de l'ACP comptent pour 85% de la variabilité. La première composante explique à 68.2% la variabilité (Figure 3-10). Les échantillons pré-traitement à 55°C semblent avoir eu un effet différent que les contrôles et les pré-traitements réalisés à température ambiante. Les deux sorghos bruts sont anti-corrélés à l'H₂ et au butyrate. La deuxième composante explique à 16.8% la variabilité. Les voies acétate et formate semblent avoir été favorisées par l'augmentation de la température du pré-traitement. Ces deux dernières observations confirment les résultats de la partie précédente. La voie butyrate semble avoir principalement contribué à la production d'H₂. Guo et al. (2014) ont montré que le butyrate est souvent corrélé à la production d'H₂ contrairement à l'acétate qui l'est moins. En effet, l'acétate peut-être produit lors de l'homoacétogénèse par reconsommation de l'hydrogène (Figure 3-9).

3.4.3.2.2 Cas du miscanthus

Les pré-traitements retenus pour le miscanthus ont été soude et chaux dosées à 10% à température ambiante avec une teneur en MS de 20% pour des granulométries de 1 mm et 60 mm.

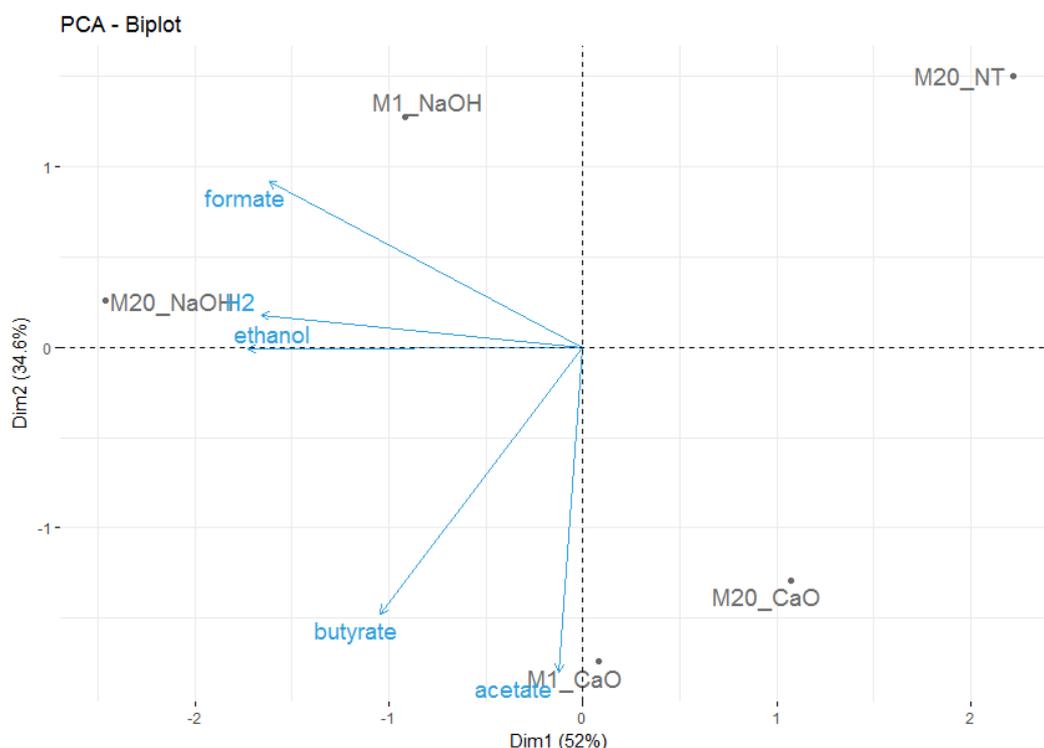
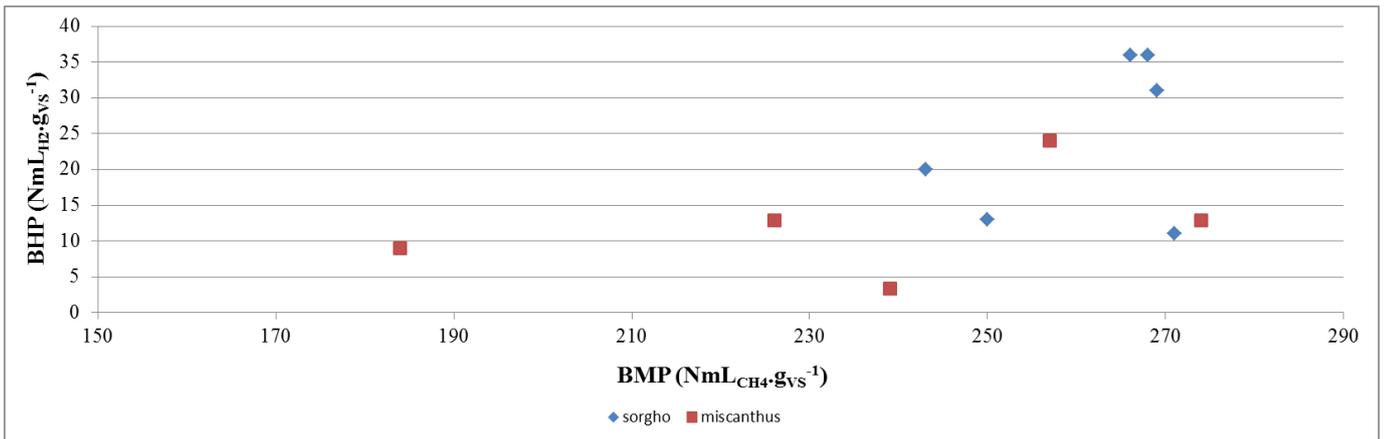


Figure 3-11 : Biplot (ACP et carte de répartition des individus) des métabolites pour le miscanthus brut et pré-traité

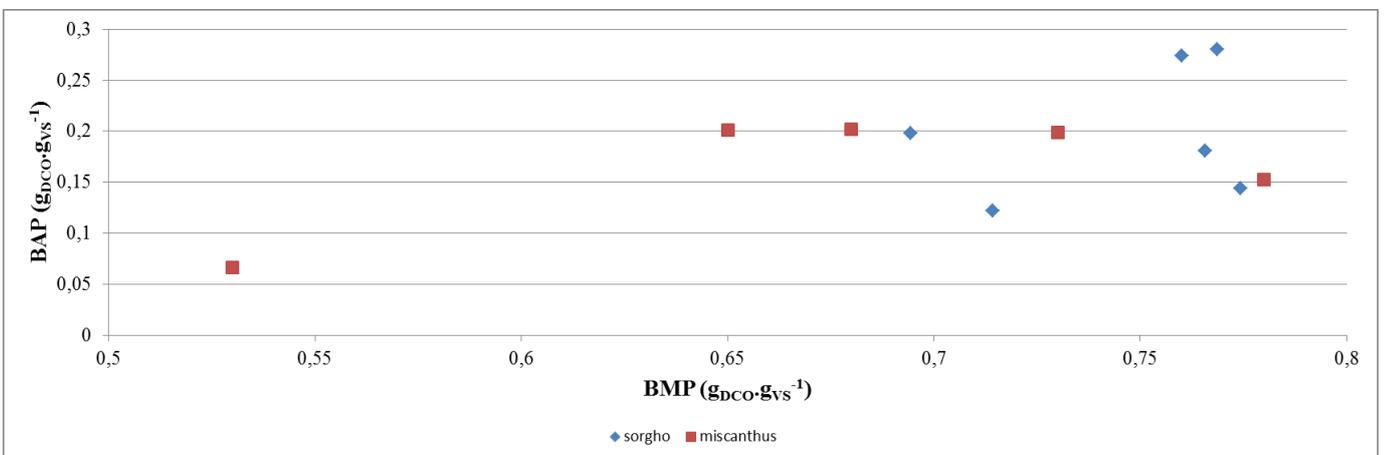
Les deux premières dimensions de l'ACP comptent pour 86.6% de la variabilité (Figure 3-11). La production d'hydrogène n'est ni corrélée à celles l'acétate, ni à celle du butyrate. Elle semble plutôt corrélée à la voie métabolique du formate utilisée par des bactéries anaérobies facultatives. Elle semble également corrélée à celle de l'éthanol. Cela pourrait expliquer, le fait que le miscanthus à un très faible potentiel hydrogène. De plus, la soude semble privilégier la formation d'hydrogène (en initiant l'utilisation de la voie du formate). La chaux quant à elle semble, avec cette biomasse, privilégier la production d'acétate et donc potentiellement desservir la production d'hydrogène sachant que l'importante quantité d'acétate peut s'expliquer par l'homoacétogénèse.

3.4.3.3 Existe-t-il un lien entre la dégradation anaérobie (BMP et cinétique) et les potentiels de fermentation sombre ?

La figure 3-12 représente, d'une part, le potentiel hydrogène en fonction du potentiel méthane et d'autre part, le potentiel de fermentation (c'est-à-dire le BAP) en fonction du potentiel méthane exprimé en g de DCO par g de VS, ce qui correspond donc à la quantité de matière biodégradable.



(a)



(b)

Figure 2-12 : Potentiel hydrogène en fonction du potentiel méthane (BMP) (a) et BAP en fonction du potentiel méthane exprimé en g de DCO par g de VS (b)

La Figure 3-12 montre que ni le BHP ni le BAP ne sont corrélés avec le BMP, ce qui montre bien que l'hydrogène ainsi que l'ensemble des métabolites de fermentation ne sont pas produits à partir des mêmes composés de la biomasse lignocellulosique que le méthane. Plus de composés sont bioconvertis lors de la méthanisation (jusqu' à 0.8 g_{DCO}.g_{VS}⁻¹) que lors de la fermentation (moins de 0.3 g_{DCO}.g_{VS}⁻¹). Les consortia de méthanisation sont, en effet, capables

de convertir les polysaccharides (dans la limite de leur accessibilité) alors qu'en fermentation uniquement les sucres solubles sont bioconvertis (Monlau et al., 2012b).

La comparaison des v_{max} de la fermentation avec la cinétique de la DA n'a pas permis pas d'établir un lien entre les cinétiques de dégradation entre les deux procédés (données non montrées). Cela peut s'expliquer par le fait qu'en DA la vitesse peut être limitée par la méthanogenèse ou l'hydrolyse dans le cas des biomasses lignocellulosiques, alors qu'en fermentation l'hydrolyse n'a généralement pas lieu.

La figure 3-13 représente les cinétiques de production de méthane en fonction de la DCO totale convertie en fermentation. En effet, selon une hypothèse généralement admise, aussi bien la vitesse initiale de méthanisation que le potentiel de fermentation sont liées aux sucres facilement accessibles, ces deux variables devraient donc être corrélées.

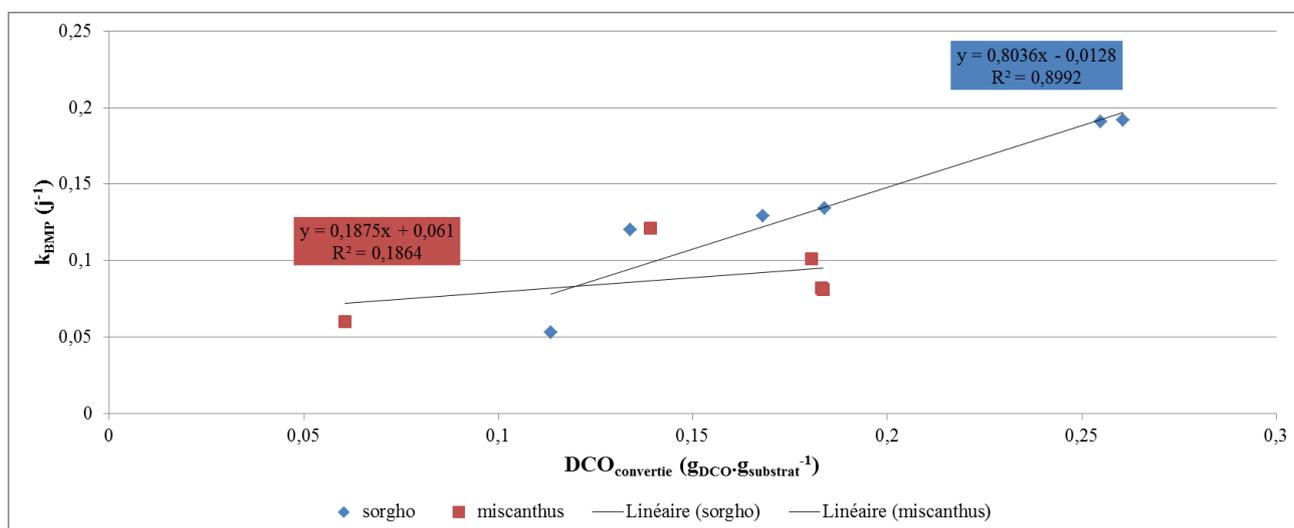


Figure 3-13 : Regressions linéaires entre les cinétiques de dégradation anaérobie et la DCO totale convertie lors de fermentation sombre exprimée par quantité de substrat pour les deux biomasses

Cette hypothèse est confirmée pour le sorgho mais pas pour le miscanthus ($R^2 = 0.90$ et 0.19 , respectivement, Figure 3-13). L'absence de corrélation pour le miscanthus pourrait provenir d'un part plus importante que pour le sorgho, de matière non biodégradable. Or le tracé des constantes cinétiques de méthanisation en fonction de la DCO convertie en fermentation par gramme de matière biodégradable n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation entre ces deux paramètres ($R^2 < 0.09$, données non présentées). L'absence de corrélation pour le miscanthus pourrait peut-être s'expliquer par les faibles taux de conversion mesurés en fermentation impliquant de fortes erreurs relatives. Il faudrait cependant réaliser d'autres mesures de BAP sur des miscanthus prétraités afin de pouvoir conclure de manière plus tranchée.

3.4.3.4 Discussion de la partie 3.4.3

Un effet biomasse semble encore une fois se dégager. Cet effet pourrait s'expliquer par le fait qu'il y a plus de solubles dans le sorgho que dans le miscanthus. Dans le cas du miscanthus l'étape d'hydrolyse est importante pour solubiliser les hémicelluloses et la cellulose, or il n'y en a pas durant ce type de fermentation. Seuls les sucres facilement accessibles seront convertis. Cet effet biomasse est en accord avec de précédents résultats. En effet, Guo et al. (2014) ont montré que parmi les différents groupes de substrats étudiés (riches en sucre, en protéines, déchets de l'agriculture, produits de l'agriculture) ceux riches en sucres étaient favorables à la production d'hydrogène. De plus, Monlau et al. (2012b) ont montré que les caractéristiques structurelles ainsi que la composition chimique des substrats organiques pouvaient jouer un rôle important sur la production d'hydrogène dans les bioprocédés de fermentation sombre. Leur analyse PLS n'a trouvé qu'une forte corrélation positive entre les potentiels d'hydrogène et les sucres solubles alors que toutes les autres variables étudiées (teneurs en lignine, holocelluloses amorphes, cellulose cristalline, acide uronique, protéines) n'ont eu aucun impact significatif.

L'accessibilité de ces sucres est, dans cette partie du chapitre, représentée par le BAP. Les pré-traitements alcalins augmentent ce potentiel acidogène via l'augmentation de la solubilisation des holocelluloses et la dégradation de la lignine (résultats des parties précédentes du chapitre). Shi et al. (2010) ont suggéré que l'augmentation du rendement en hydrogène coïncidait pratiquement avec une augmentation des sucres solubles dans l'eau disponibles à partir de tiges de sorgho sucrier pré-traitées par un agent alcalin (0,4 % de NaOH à température ambiante pendant 24 heures). Ils ont conclu que le pré-traitement alcalin du substrat joue un rôle crucial dans la conversion des déchets des tiges de sorgho sucrier en biohydrogène par les boues anaérobies mixtes. Dans notre étude, il semblerait que la soude soit plus favorable que la chaux à la production d'hydrogène.

De plus, d'après le schéma de la DA (chapitre 1, Figure 1-4), l'acétate est précurseur de la production d'un mélange de CO_2 et CH_4 alors que le mélange CO_2 - H_2 conduit à la production de méthane. La voie acétate est une voie lente de production de méthane. Or le miscanthus a un ratio acétate/butyrate beaucoup plus élevé que celui du sorgho. Cela pourrait expliquer le fait que le miscanthus conduit à une plus faible production d' H_2 que le sorgho. Le sorgho semble donc être plus approprié que le miscanthus à la production d' H_2 .

3.5 Discussion du chapitre 3

3.5.1 Comparaison du sorgho et du miscanthus

Le miscanthus est plus lignifié que le sorgho (+ 29 % en moyenne), ce qui induit un potentiel méthane plus faible (- 30 %). Le faible taux de lignine du sorgho, ajouté au fait que son BMP ne soit pas amélioré après pré-traitement suggère l'importante accessibilité des holocelluloses du substrat non traité. Les prétraitements alcalins ont alors eu pour conséquence uniquement une accélération de la cinétique de méthanisation, lié à la solubilisation des sucres. Le cas du miscanthus est différent ; les sucres ont été également solubilisés, ce qui a permis une accélération de la cinétique de production de méthane et une suppression du temps de latence. Mais la matière étant plus lignifiée, l'effet de la dégradation de la lignine par les agents alcalins est plus important. La dégradation de la lignine mais aussi la modification de la cristallinité de la cellulose ont augmenté la bioaccessibilité des sucres. Cette. Contrairement au sorgho, cela a également induit l'amélioration du potentiel méthane du miscanthus (jusqu'à + 113% pour des réactifs dosés à 10 %).

Les deux biomasses sont donc appropriées pour comparer les effets de la soude et de la chaux, alors que le miscanthus est plus pertinent pour l'optimisation des pré-traitements.

3.5.2 Impact des différents paramètres de pré-traitement

3.5.2.1 Effet du réactif

Dans l'étude de l'impact des différents paramètres de prétraitement sur la méthanisation du sorgho et miscanthus, le facteur réactif s'est avéré avoir le plus fort impact, la soude étant plus efficace que la chaux. Une discussion sur la comparaison des deux réactifs alcalins est proposée dans la discussion générale (chapitre 6) afin de permettre la prise en compte de tous les résultats de ce manuscrit. Les agents alcalins ont un effet sur le BMP par leur action sur la lignine, ce qui a justifié notre choix de ce type de pré-traitements. Cependant, leurs effets ne se limitent pas à la lignine mais également sur les holocelluloses, c'est pourquoi les évolutions de la composition de la paroi et de la cristallinité de la cellulose ont été étudiées.

3.5.2.2 Effet de la concentration en réactif (à une teneur en MS identique)

Puisque il semblait évident au fur et à mesure des expériences que l'effet réactif primait sur celui de sa concentration, la variation de ce dernier paramètre a plus particulièrement été étudiée. Le raisonnement de la quantité de réactif en dose et non pas en concentration a induit des différences de molarité et de normalité.

La partie 3.4.1 a permis de mettre en évidence que cette différence avait un effet significatif sur la dégradation de la lignine du miscanthus mais l'effet du réactif était le plus important sur la dégradation de cette dernière ainsi que sur la solubilisation des sucres et donc sur le BMP également. La partie 3.4.2 a étudié l'impact de la concentration en termes de solubilité. Celle-ci ne semble pas jouer un rôle puisque des traitements à des concentrations supérieures à la solubilité de la chaux permettent d'améliorer le BMP alors que ce dernier

n'est pas impacté par un traitement à la concentration de solubilité. Cela renforce l'hypothèse de l'effet pontant du calcium et de sa possible interaction avec la lignine.

Dans la partie 3.3.2, la concentration a été étudiée en tant que facteur à une même teneur en MS lors du pré-traitement afin de s'affranchir de tout autre effet. Son effet est inférieur à celui de la durée et est non significatif. Bien que non significatif, le plan d'expérience a mis en évidence un effet négatif de la concentration principalement des concentrations élevées (> 16%). Shah et al. (2018) ont montré que l'effet de la concentration pouvait être délétère car une trop grande concentration induit une trop forte solubilisation des holocelluloses engendrant une quantité trop importante d'AGV en méthanisation. Cependant, dans leur publication, il n'est pas indiqué si le BMP a été mesuré uniquement sur la matière solide ou bien en prenant en compte les sucres solubilisés. Dans notre cas, étant donné que les pré-traitements ont directement été réalisés dans les fioles BMP, il serait plutôt question du pouvoir pontant du calcium.

3.5.2.3 Effet de la température

Trop peu de conditions ont été réalisées pour pouvoir conclure sur l'effet de ce paramètre. Toutefois, il semblerait qu'elle induise une amélioration de la cinétique de méthanisation. D'après les résultats de la partie 3.3.2, l'interaction réactif×température était significative pour la solubilisation des hémicelluloses. Plusieurs hypothèses peuvent alors être envisagées : (i) la température peut catalyser l'effet des agents alcalins, (ii) la température est en soit un pré-traitement de la matière. En effet, Monlau et al. (2012a) ont distingué les pré-traitements thermiques et thermo-chimiques. Ou encore Shah et al. (2018) ont comparé l'effet de différents mode de chauffage sur l'effet de pré-traitements alcalins, le micro-ondes se révélant le plus efficace.

3.5.2.4 Effet de la teneur en MS lors de la réalisation du pré-traitement

Ce paramètre a eu un effet significatif sur la dégradation de la lignine et l'amélioration du potentiel méthane. Une forte teneur en MS favorise l'augmentation du BMP. Cela peut s'expliquer par le fait que le raisonnement utilisé pour l'utilisation des réactifs alcalins était une dose c'est-à-dire une quantité de réactif par quantité de matière sèche. La teneur en MS lors du pré-traitement et donc la quantité d'eau utilisée conditionne donc la concentration de ces réactifs et a donc un impact sur le pH. Malheureusement, cet aspect est très peu considéré dans la littérature. Dans beaucoup d'articles, la teneur en MS n'est pas précisée, ce qui reflète le manque de considération en l'importance de ce facteur et la difficulté de pouvoir comparer les résultats des pré-traitements.

3.5.2.5 Effet de la durée du pré-traitement

Dans la littérature, il est courant d'utiliser des durées inférieures ou égales à 24 h quand les températures de pré-traitement utilisées sont supérieures à 30°C environ. Pour compenser l'utilisation d'une température plus faible, des durées de 24 h ou de plusieurs jours sont utilisées. Pour les deux biomasses étudiées dans cette thèse, l'impact de la variation de ce facteur a été étudié sur la plus grosse granulométrie (60 mm) dans le but d'une application en méthanisation à la ferme. En ce qui concerne le miscanthus, la durée avait un effet significatif,

et plus important que la concentration, sur l'augmentation du BMP ainsi que celle de la cinétique (partie 3.3.2). La durée semble « remplacer/compenser » l'effet de la température. Il serait intéressant d'étudier l'interaction temps×température. Concernant le sorgho, la durée a eu un impact plus important que le réactif sur la solubilisation des hémicelluloses et sur la dégradation de la lignine mais aucun effet sur le BMP (Partie 3.3.3). Une fois de plus, l'effet est biomasse dépendant. La comparaison d'une durée d'un jour avec celle de plusieurs jours (ici 6 j) a également été réalisée avec une granulométrie inférieure (partie 3.2.2.1.4). La durée a eu uniquement un effet significatif sur le LOI. Son interaction avec le réactif a été également significative sur le LOI et la dégradation de la lignine permettant une meilleure réduction de la cristallinité de la cellulose et dégradation de la lignine.

Une des conclusions émergeant du plan d'expérience de Doelhart et des différentes analyses de variance est que l'effet des différentes conditions opératoires n'est pas nécessairement linéaire. En effet, certaines interactions ont eu des effets significatifs soit sur la composition biochimique (exemple de l'interaction réactif×durée, partie 3.2.2.1.4).

3.5.2.6 Effet de la granulométrie

Au travers des différents sous-chapitres, le potentiel BMP de chaque biomasse a légèrement diminué avec l'augmentation de la granulométrie (Table 3-15).

Table 3-15 : Comparaison des BMP ($\text{NmL}_{\text{CH}_4\cdot\text{gVS}^{-1}}$) pour le sorgho et le miscanthus bruts aux différentes granulométries étudiées dans ce chapitre

Granulométrie (mm)	Sorgho	Miscanthus
1	271 ± 13	188 ± 14
20	-	184 ± 4
60	250 ± 14	158 ± 2

Il est connu de la littérature que la granulométrie participe à l'accessibilité de la matière principalement en affectant son accessibilité enzymatique (Yang et al., 2015). Dans la partie 3.3.1, la granulométrie avait un impact significatif à 5% sur la teneur après pré-traitement en cellulose et en lignine Klason et à 10% sur celle en hémicelluloses et sur le LOI. Lors de la comparaison BAP/BMP, il s'est avéré que cette granulométrie pouvait réduire également la cinétique de production de méthane et de fermentation sombre.

Le sorgho et le miscanthus à la plus forte granulométrie (60 mm) vont être utilisés, dans le chapitre suivant, bruts ou pré-traités et co-digérés avec du fumier en digestion anaérobie batch voie sèche.

Chapitre 4. Etude de la co-digestion du fumier bovin et de la biomasse lignocellulosique prétraitée (sorgho ou miscanthus)

Ce chapitre se place dans le contexte applicatif du projet BFF et de ce doctorat. Le modèle français préférant l'utilisation de déchets organiques principalement agricoles et de CIVE, ce chapitre vise donc à étudier l'utilisation de miscanthus ou sorgho pré-traité en conditions alcalines dans des conditions de co-digestion avec du fumier bovin. Tout d'abord, la co-digestion du fumier avec du miscanthus pré-traité sera étudiée. Ces performances seront, ensuite, comparées à celles obtenues avec le sorgho pré-traité utilisé comme co-substrat dans les mêmes conditions de digestion. Afin de mieux comprendre les phénomènes, un sous-chapitre présentera l'étude de la digestion de fumier mélangé avec une solution alcaline. Trois séries d'expériences de méthanisation en réacteurs batch à recirculation de lixiviat sont donc présentées dans ce chapitre avec un focus sur la production de méthane mais également sur le pH et l'accumulation des AGV dans le lixiviat, permettant de qualifier l'étape de démarrage représentant la phase critique de ces procédés. Afin d'éviter des répétitions, ces résultats seront décrits dans le détail uniquement lors de la présentation de la première série d'expériences, à savoir la codigestion avec le miscanthus. Un dernier sous-chapitre sera consacré à une analyse économique préliminaire de co-digestion de fumier avec du sorgho pré-traité. Afin de faciliter la lecture, chacun des sous-chapitres débutera par une présentation du matériel et méthodes plus précise et spécifique à chaque expérimentation, le matériel et méthodes général étant décrit dans le chapitre 2.

4.1. Context and objectives

In Europe, the agricultural biogas sector is currently undergoing fast developments. In particular, the French government has set the target of 1500 biogas plants by 2020, including 1000 plants based on agricultural feedstocks (Torrijos, 2016). In many agricultural anaerobic digestion plants, manure represents the main part of the feed. Furthermore, cattle manure is available in high quantities all over the country. Its production has been estimated at about 69 MT per year in 2010 (Degueurce et al., 2016). Cattle manure is rich in straw and is characterized by a total solids (TS) content of about 20–30%. It is thus suited for dry AD, also called solid-state anaerobic digestion (Mata-Alvarez et al., 2000). A process occupying an important part in the development of the agricultural AD sector is the leach bed reactor (LBR) operated in batch mode (Riggio et al., 2016). In this high-solids process, the solid substrate is loaded into the reactor while a liquid phase, usually stored in a separate container, is regularly sprinkled over the solid bulk and percolates through it. However, batch mono-digestion of cattle manure usually takes time to start up and produces low amounts of biogas (Tufaner and Avsar, 2016).

In this view, co-digestion would be a good option for improving biogas production and productivity. For example, Botji et al. (2017) demonstrated how the co-digestion of poultry manure with maize silage improved methane production by 24% relative to mono-digestion. This is presumably due to the improved C/N ratio. Cuetos et al. (2011) studied co-digestion of swine manure with different energy crop residues (maize, rapeseed or sunflower residues). The results were different according the biomass residues and a specific gas production improvement occurred only in batch conditions, not during semi-continuous ones. Nevertheless, the use of food or feed product-dedicated crops (e.g., cereals) or energy crops as AD plant feedstocks is limited to less than 15% of the total feed ration by the French national legislation (Assemblée Nationale, 2016). Some exceptions are, however, still possible for catch crops and biomass cultivated on marginal lands that are not in conflict with food and feed production.

Among these, sorghum was one of energy crop highlighted for biorefineries due to high biomass yield potential, ease of culture and wide adaptability (Monk et al., 1984). It could be cultivated as a catch crop (Wannasek et al., 2017). Moreover, Neshat et al. (2017) reported that sorghum was used several time as co-substrate of manure. Also miscanthus presents many advantages, including high biomass yields, low input requirements (i.e., water, fertilizers), prolonged soil cover, reduced soil disturbance, and increased soil carbon content (Morandi et al., 2016; Perrin et al., 2017). This crop can also grow on polluted soils (Kiesel et al., 2016; Muller-Stover et al., 2016). Few studies have used *Miscanthus x giganteus* as a co-substrate for manure AD. Moiceanu et al. (2016) used miscanthus as a reference co-substrate to investigate the influence of different types of manure on biogas production.

Nonetheless, for most lignocellulosic biomasses, carbohydrate accessibility is limited and AD performance can be improved by pretreatment (Monlau et al., 2013). As it was demonstrated in the literature and in the previous chapter, alkaline pretreatments cause lignocellulose to swell, increasing the internal surface area and decreasing the polymerization

and crystallinity of cellulose and hemicellulose, which results in the breakage of the binding structures between lignin and holocelluloses and the lignin rupture (Patinvoh et al., 2016). Alkaline treatments stand out for their high lignin removal capacity, the need for milder conditions than in acid pretreatments and the use of non-corrosive and non-polluting chemicals (Kim et al., 2016). Therefore, the use of pretreated miscanthus or sorghum in codigestion with cow manure, could increase methane production and strengthen the interest of the AD of manure, which, otherwise releases methane into the atmosphere

The aim of this chapter is to study the codigestion of pretreated sorghum and miscanthus with cow manure. The pretreatment conditions were chosen according to previous results presented in the Chapter 3.

4.2. Co-digestion of manure with pretreated miscanthus

This part is adapted from H.L. Thomas, J. Seira, R. Escudié, H. Carrère, Lime pretreatment of miscanthus : impact on BMP and batch dry co-digestion with cattle manure. *Molecules* 2018, 23, 1608

4.2.1 Material and methods

The conditions of the co-digestion are presented in the Table 4-1. For the purpose of this part, to evaluate the effect of miscanthus pre-treatment during co-digestion, the proportion of methane produced from miscanthus digestion must therefore be significant. As a consequence, the ratio of the feed mixture was 40%_{VS} of miscanthus which corresponds to the ratio 15%_{raw} which is the limit imposed by the French government for energy crops. Miscanthus was ground with a vegetal crusher and particle size was around 60mm.

In addition, the ratio substrate/inoculum (S/X) was fixed to maximize the proportion of substrate. Riggio et al. (2016) inoculated their LBR with a ratio S/X (VS substrate/VS inoculum) of 10, in order to ensure the presence of methanogens and a good start-up of the mono-digestion of manure. However, since sorghum or miscanthus would bring more easily hydrolysable matter, we selected a S/X ratio of 8 (in VS basis).

The pretreatments conditions were chosen according to the results obtained on BMP with miscanthus at the same particle size (chapter 3-3.3.2). Lime was preferred to soda because of its beneficial contribution to soil properties when considering the spreading of digestate in fields. Each co-digestion test was performed in duplicates excepted for one with miscanthus pretreated with 5% CaO for 5 days.

Table 4-1: Experimental conditions of the co-digestion of cow manure with raw or pretreated miscanthus

Feedstock composition	85% _{wet} manure and 15% _{raw} miscanthus (60-40% _{VS})		
Miscanthus	raw	pretreated 10% CaO, 5 d	pretreated 5% CaO, 5 d
Total of TS (g)	309 (262 g of substrate and 47g of inoculum)		
S/X	8		
Leachate volume (L)	1.2 L (0.53 of leachate + 0.67 of water with NaHCO ₃ at 1.3 g.L ⁻¹)		

*co-digestion with raw miscanthus, in the case of pretreated miscanthus, the amount of water used for the pretreatment was subtracted

4.2.2 Results

Methane production of raw miscanthus and miscanthus pretreated with lime at 5 and 10% for 5 days co-digested with cattle manure was 158 ± 4 , 150, and 167 ± 2 mL·g_{VS}⁻¹ after 59 days, respectively (Figure 4-1; Table 4-2). The 59-day period was selected because it corresponds to the duration of a batch in industrial plants. For this time span, there is no significant difference in the methane production between the control and the two different conditions of pretreatment (p -value = 0.7, 0.82) nor between both pretreatments (p -value = 0.82). However, for a shorter duration, differences can be observed (Table 4-2). After 15 days of operation, the methane production was higher for the miscanthus pretreated at 10% than for the raw miscanthus (+ 18%). It is related to a higher kinetics constant (+ 23%).

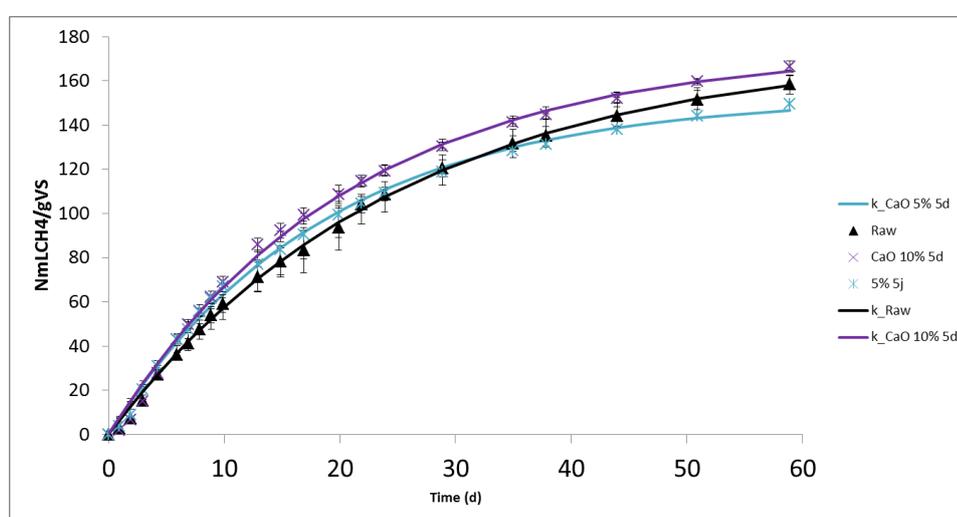


Figure 4-1 : Cumulative methane production and modeling of 1st order kinetics

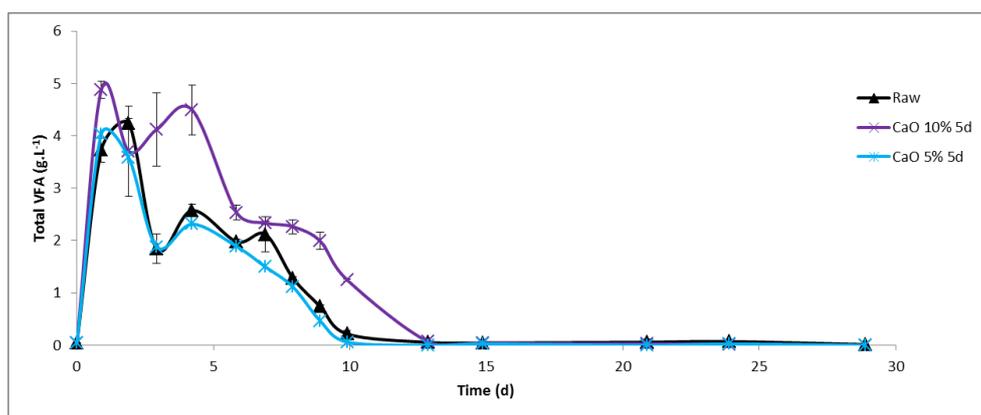
Table 4-2 : VFA/alkalinity ratio at 3 days, methane production at 6, 10, 15, 24, 29, and 59 days, expected methane production calculated from BMP values, and first-order kinetics constants.

day	VFA/Alkalinity ($\frac{\text{gHAceq} \cdot \text{gCO}_2}{\text{gVS}}$) ¹			Methane Production (NmL _{CH₄} ·g _{VS} ⁻¹) NmL _{CH₄} ·g _{VS} Substrate ⁻¹					k (d ⁻¹)	R ²	
	3	6	10	15	24	38	59	59			Expected ²
Raw	0.35±0.07	36±1	59±4	78± 7	109±3	135± 4	158±4	183±5	181	0.040±0.004	0.998
10 % 5 days	0.8±0.14	43±2	69± 3	92± 3	119±2	145± 2	167± 2	193±3	208	0.049±0.002	0.996
5 % 5 days	0.4	43	67	84	109	131	150	173	207	0.054	0.998

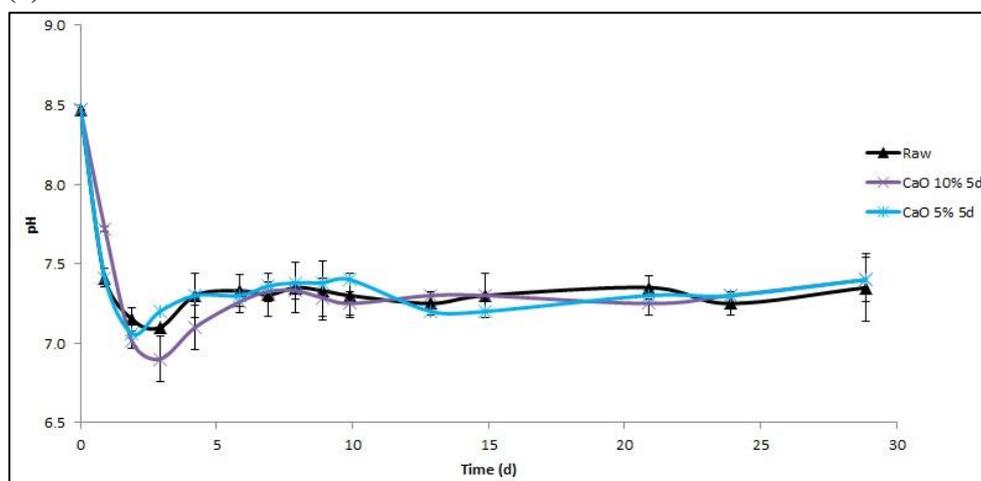
¹HAceq means acetic acid equivalent, ² from BMP values.

The concentration of VFA in the leachate and the pH were measured each day at the beginning and on a regular basis thereafter (Figure 4-2). For duplicates, the VFA concentrations were similar (Figure 4-2a). VFAs were rapidly produced, and their maximum value was reached after 1 day for miscanthus pretreated with 5 and 10% of lime for 5 days (4.5 ± 0.5 g·L⁻¹ and 4 g·L⁻¹, respectively). For raw miscanthus, the maximum was reached after 2 days (4.2 ± 0.1 g·L⁻¹). For all reactors, pH variations were similar (Figure 4-2b). The evolution of VFA and pH can be separated into two steps. During the first step, the accumulation of VFA during the first 3 days induces, with a brief delay, a slight decrease in

pH down to 6.8. Two hypotheses could explain this observation: either (1) the positive impact of higher alkalinity due to CaO or (2) the buffer capacity of manure. The second hypothesis, i.e. manure buffer capacity, seems to be more plausible, because in the case of co-digestion with the raw substrate, the pH is similar to that of the pretreated substrate. The pH did not present a sharp drop and the VFA concentration was not very high either. Moreover, since the VFA/alkalinity ratio remains below 1 (Table 4-2), the risk of acidification is avoided and the drop in pH is swiftly reduced (Rouches, 2015). During the second step (after 4 days of operation), the pH stabilized close to 7.3 due to the decrease in VFA concentrations. After 15 days, no more VFAs were measured, demonstrating that VFAs were produced and consumed at the same rate.



(a)



(b)

Figure 4-2. Volatile fatty acid (VFA) concentration (a) and pH variation (b) in leachate during the first 30 days.

Pretreatments were a promising solution in BMP test series (chapter 3-part 3.3.2). However, the performances in the LBR could not be confirmed if the methane production was estimated at 59 days. The BMP of manure used for the experiment was $202 \pm 30 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$, which was higher than the BMP of raw miscanthus and within a similar range to pretreated miscanthus BMP. The maximum expected methane production with a ratio of 40%_{VS} miscanthus and 60%_{VS} manure is presented in Table 4-2. While 87% of the expected methane production was reached after 59 days co-digestion with raw miscanthus, 75 and 80%

of expected methane production (considering 100% of the BMP) were obtained with miscanthus pretreated at 5 and 10%, respectively. If the methane productions per gram of $VS_{\text{substrate}}$ (without considering VS from inoculum) are compared to the expected value, 101, 93 and 84% were reached, respectively. Riggio et al. (2016) carried out the process using an LBR fed with spent cow bedding. They obtained $168 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ after 60 days, which represents 86% of the BMP value. Thus, the overall performance of the LBR evaluated in this study is satisfactory, although the small increase in methane production at 59 days remains surprising. Dry anaerobic digestion inoculum might require some adaptation to the pretreated biomass. Another explanation could be the high water absorption capacity of miscanthus. As BMP tests were carried out in diluted medium ($5 \text{ g}_{\text{TSmiscanthus}} \cdot \text{L}^{-1}$), the high amount of available water can favor contact between lime and biomass. This could enhance the action of lime if it continues during the AD process.

4.2.3 Conclusion

The improvement in methane production was no significant contrary to the kinetics. Nevertheless, this increase in in kinetics is not sufficient to justify the application of a full-scale pretreatment.

4.3 Co-digestion of cow manure with pretreated sorghum

4.3.1 Sorghum as co-substrate

The use of raw miscanthus raw or miscanthus pretreated with CaO did not let to an improvement of the methane yield during the co-digestion with cow manure. What about sorghum? In addition, as BMP results showed a higher efficiency of NaOH than CaO, pretreatments with NaOH were also applied to sorghum before its codigestion with manure.

4.3.1.1 Material and methods

The conditions of the co-digestion are presented in the Table 4-4. These conditions are similar to ones with miscanthus (Chapter 4.2). The pretreatments conditions were chosen according the results obtained on BMP with sorghum used at the same fibre size (around 60mm, chapter 3-3.3.3). The co-digestion of each mixture was performed in duplicates.

Table 4-3: Conditions of the co-digestion of cow-manure with raw or pretreated sorghum

Feedstock composition	85% _{raw} manure and 15% _{raw} sorghum (61-39% _{VS})		
Sorghum	raw	pretreated 10% NaOH, 1 d	pretreated 10% CaO, 5 d
Total of TS (g)	298 (256 g of substrate and 42 g of inoculum)		
S/X	8		
Leachate volume (L)	1.3 L (0.53 of leachate + 0.80* of water with NaHCO_3 at $1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)		

*co-digestion with raw sorghum, in the case of pretreated sorghum, the amount of water used for the pretreatment was subtracted

4.3.1.2 Results

The figure 4-3 represents the evolution of the cumulative methane yield. At 60 d, the methane production from the co-digestion of cow manure with sorghum was $195 \pm 6 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$. The pretreatment led to a slight increase of the methane production of the co-digestion of pretreated sorghum with cow manure (significant at 10% confidence, p -value = 0.06). For NaOH 1d and CaO 5d pretreatments, the methane production was 233 ± 16 and 209 ± 2 , respectively (Figure 4-3, Table 4-4). The co-digestion with raw sorghum was lower than that reported by Kalamaras and Kotsopoulos (2014) with $241 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{kg}_{\text{VS}_{\text{substrate added}}}^{-1}$ obtained with cattle manure and sorghum silage with a VS ratio 60:40. If the final methane production is considered, the soda pretreatment was efficient to increase the methane production and the impact of the lime was lower. However, during the start up period, lime was more efficient. At 6 days, the methane production was 26 ± 16 , 43 ± 23 and $60 \pm 1 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ for raw sorghum, sorghum pretreated with soda and with lime, respectively (Table 4-4).

Table 4-4 : Methane production at 6, 12, 20, 35 and 60 days, expected methane production calculated from BMP values, and first-order kinetics constants.

Reactor/day	Methane Production ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$)					$\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}_{\text{substrate}}^{-1}}$	Expected ¹	$k \text{ (d}^{-1}\text{)}$	R^2
	6	12	20	35	60	60		60	
Raw	26 ± 16	72 ± 14	118 ± 2	164 ± 4	195 ± 6		230	0.031 ± 0.011	0.969
10% NaOH 1d	43 ± 23	105 ± 13	155 ± 1	202 ± 11	233 ± 16		227	0.043 ± 0.015	0.977
10% CaO 5d	61 ± 1	109 ± 1	145 ± 1	185 ± 2	210 ± 2		224	0.055 ± 0.001	0.997

¹from BMP values

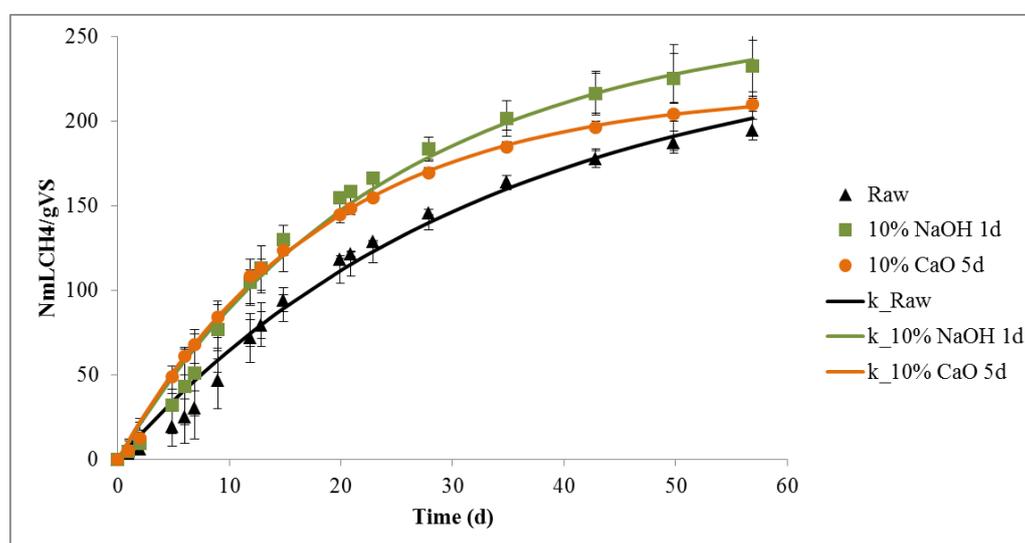


Figure 4-3 : Cumulative methane production and modeling of 1st order kinetics of co-digestion of cow manure with pretreated sorghum for 60 days

The evolution of the concentration of VFA and the evolution of pH of the leachates are represented in the figure 4-4. At 3 days, an accumulation of VFA was observed, in particular with soda pretreatment ($9.2 \pm 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) compared to 6.2 ± 0.2 and $5.9 \pm 0.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for lime pretreatment and raw sorghum. This could involve a slight slowdown of the anaerobic digestion (Figure 4-4 a). It is explained by a better carbohydrate solubilisation and so a best

efficiency of the soda reagent (chapter 3- part 3.3.3). The pH of leachate corresponding to co-digestion with raw and pretreated sorghum with NaOH and CaO was 6.3 ± 0.1 and 6.5 ± 0.1 and 6.8 ± 0.1 , respectively (Figure 4-4 b). The pH is not surprisingly the lowest with soda as expected due to the high VFA accumulation. The use of alkaline reagent led to on the one hand higher carbohydrate solubilisation and thus high VFA production, and on the other hand, to an alkalinizing effect which counteracted VFA accumulation. As a consequence, these two antagonist action may stabilize the AD process.

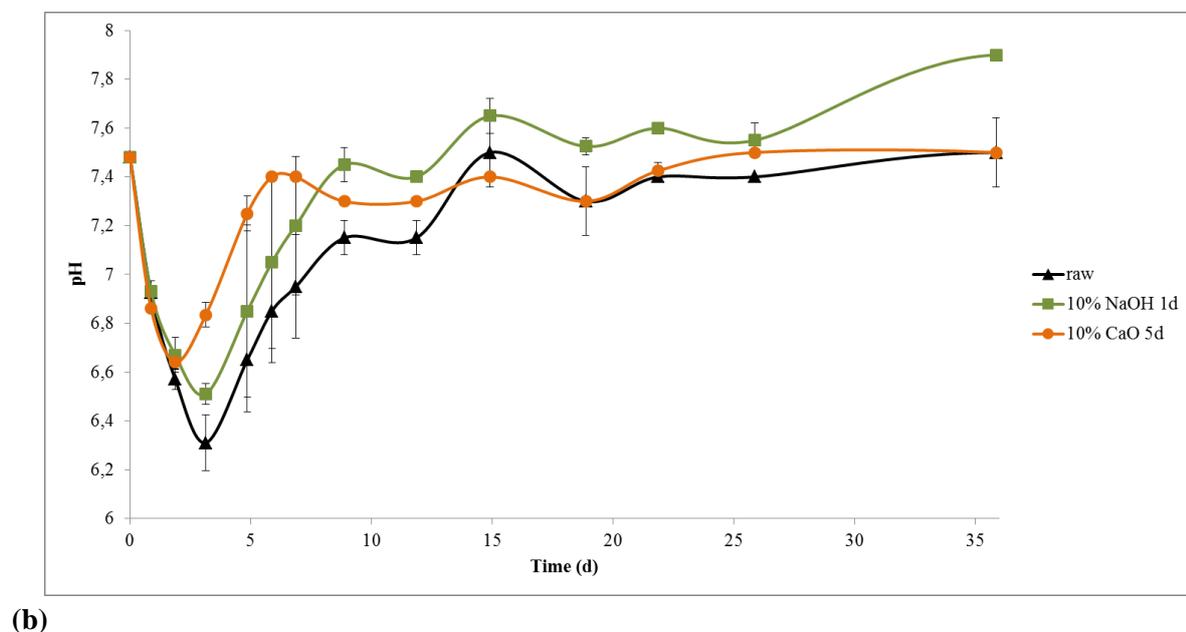
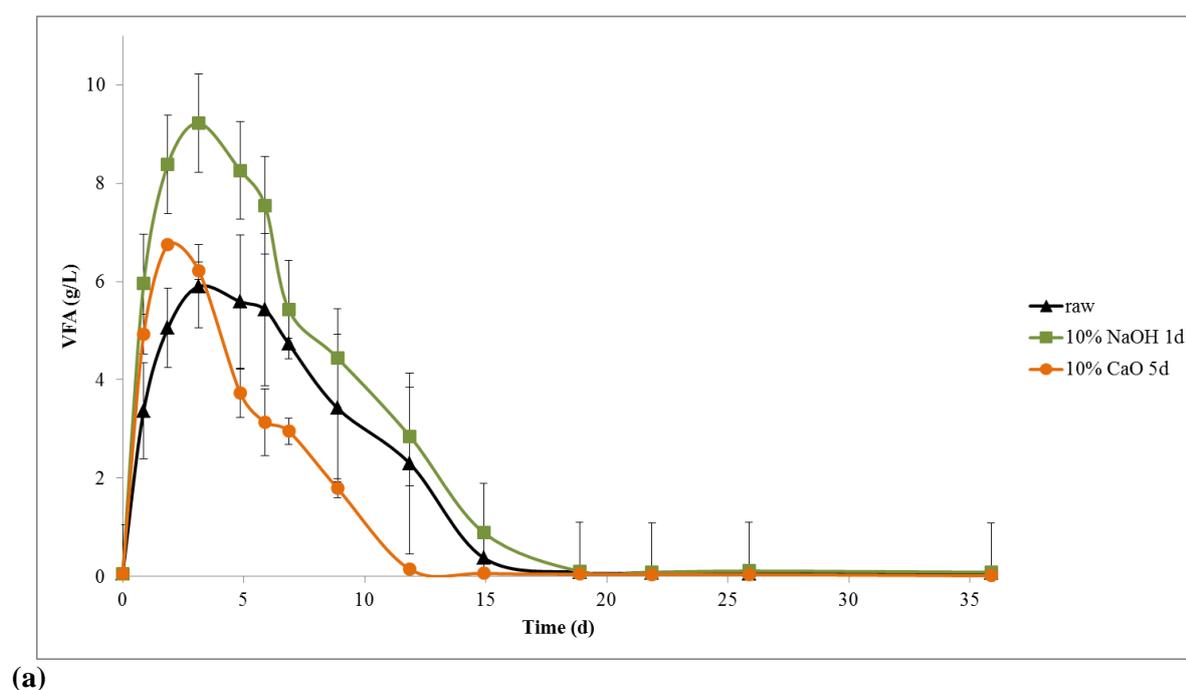


Figure 4-4 : VFA concentration (a) and pH (b) variation in the leachate during the first 19 days

The performances in the LBR were closed than expected according the BMP measured for each substrate. After 60 days co-digestion, 85, 103 and 94% of the expected methane

production were reached for raw, pretreated with NaOH or CaO sorghum, respectively. If the methane yields are compared to the expected values (without considering inoculum), 97, 118 and 108% of the BMP were obtained, respectively. NaOH pretreatment improved significantly the methane production compare to raw (+ 20%). However, the effect of NaOH pretreatment was less important than the results reported by (Wei et al., 2015) in batch condition (with a ratio 3:1(TS) corn: manure). They measured an increase of 30% methane yield with the co-digestion of cattle manure with corn stover pretreated with 2% NaOH for 3d.

4.3.1.3 Conclusion

In LBR co-digestion with cow manure, the use of sorghum pretreated with 10% soda during 1 day or with lime during 5 d led to an improvement of the methane production of 19 and 8% compare to raw sorghum, respectively. However, the kinetics was faster with sorghum pretreated with CaO. It could allow a decrease of the reaction time. In any case, the alkaline pretreatments had an alkalinizing effect, that could allow increasing the percentage of sorghum in substrate.

4.3.2 Addition of alkaline reagent to the mono-digestion of cow manure

This experiment was performed in order to try to explain why soda pretreatment of sorghum improved methane production in LBR codigestion with manure whereas alkaline pretreatment did not improve its BMP (chapter 3-part 3.3.3). Alkaline solutions (with NaOH or CaO) was added to manure before its digestion in order to know if some alkaline reagent remaining after biomass pretreatment could have treated the manure too.

4.3.2.1 Material and methods

The Table 4-8 presents the conditions of mono-digestion. Owing to the limited volume of LBR, the total TS content was reduced. It was not a pretreatment because the alkaline solution was just added to the manure before to be disposed in LBR. The dose of the alkaline solutions was in accordance with one used with sorghum at 10% NaOH reduced to the total quantity of TS (sorghum+manure). Each mono-digestion test (Raw manure, manure with NaOH or CaO solution) was performed in duplicates. From the day 30, some heater problems occurred and only one replicate for each condition could be maintained until the end of experiment.

Table 4-5 : Conditions of mono-digestion of manure with alkaline solutions

Feedstock composition	100% manure		
Manure	raw	NaOH added with the concentration of 3.9 % _{TS of manure}	CaO added with the concentration of 3.9 % _{TS of manure}
Total of TS (g)	183 (151g of manure and 32 g of inoculum)		
S/X	8		
Leachate volume (L)	1.22 L (0.46 of leachate + 0.76 of water with NaHCO ₃ at 1.3 g.L ⁻¹)		

4.3.2.2 Results

The final methane productions were similar (around $167 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$; Figure 4-5; Table 4-6). Surprisingly, the first order kinetics constants were totally different (Figure 4-5 ;Table 4-6). Moreover, the methane productions at 30 days from M_raw and M_NaOH reactors were similar (p-value = 0.36) even if VFA accumulation in reactor supplemented with NaOH was almost twice higher (Figure 4-5; Figure 4-6 a). The pH was between 7.3 and 7.7 (Figure 4-6 b). The ratio total VFA/alkalinity indicates that acidification was avoided. So, the fact that the manure with NaOH did not let to produce more methane (even the higher VFA concentration) could not be explained by an inhibition due to VFA accumulation and pH drop. However, these shows that, in this case, methanogenesis was the limiting step.

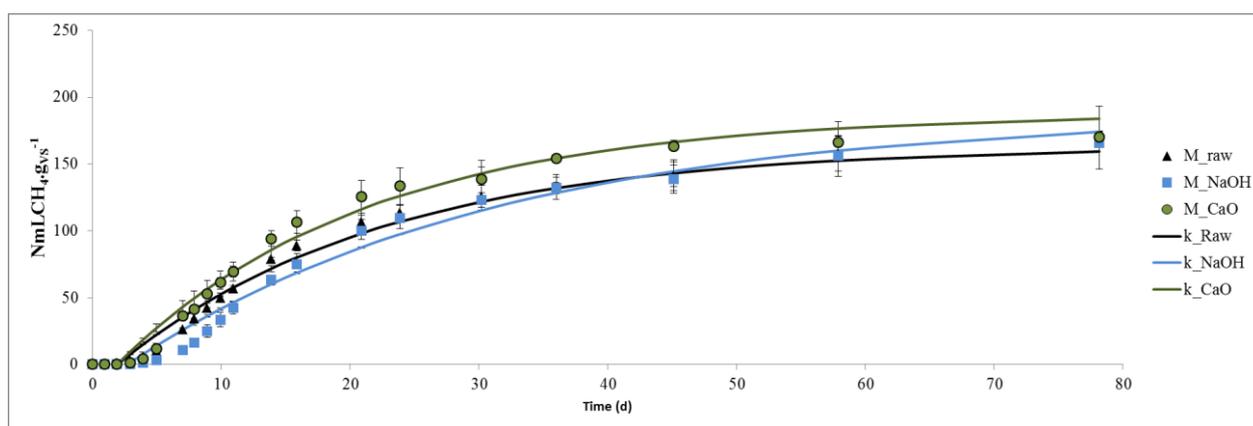
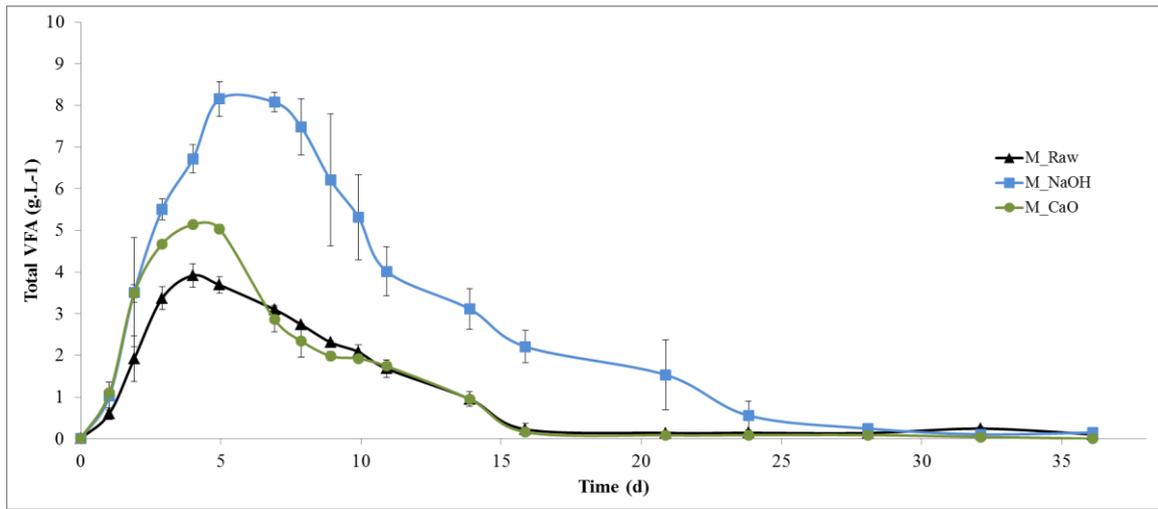


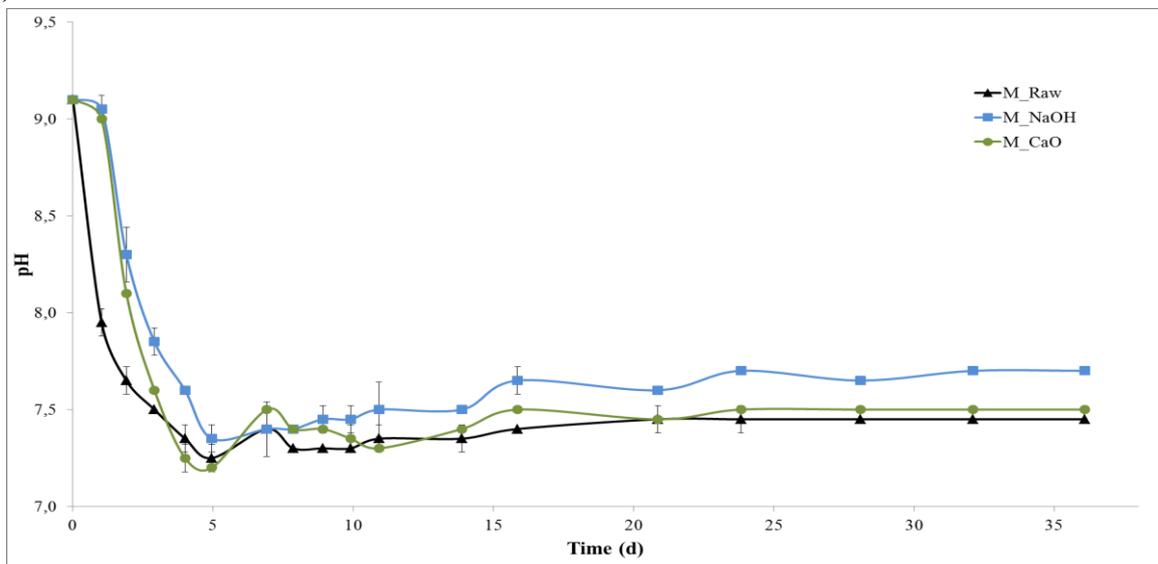
Figure 4-5 : Cumulative methane production of mono-digestion of manure for 80 days

Table 4-6: VFA/alkalinity ratio at 7 days, methane production at 4, 14, 30, 45, 58, and 79 days and first-order kinetics constants

Reactor/day	VFA/alkalinity ($\text{gHAceq} \cdot \text{gCaCO}_3^{-1}$)	Methane Production ($\text{NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$)						k (d^{-1})	Lag time (d)	R ²
	7	5	14	30	45	58	79	58		
Raw	0.48 ± 0.04	10 ± 1	79 ± 1	126 ± 8	140 ± 11	158 ± 13	166	0.049 ± 0.003	1.9 ± 0.1	0.983
Manure + NaOH	0.87 ± 0.05	3 ± 1	64 ± 2	123 ± 3	139 ± 11	156	166	0.034 ± 0.001	2.7 ± 0.3	0.965
Manure + CaO	0.39 ± 0.04	12 ± 1	94 ± 6	139 ± 14	163	166	170	0.051 ± 0.012	1.9 ± 0.2	0.970



(a)



(b)

Figure 4-6: Evolution of VFA concentration (a) and pH (b) during the first 36 days

In the literature, it is difficult to find similar experiments. Ramos-suárez et al. (2017) showed an improvement of biogas yield of 32% in batch test when manure was pretreated with CaO. However with the aforementioned chapter, batch and LBR led to different results. Lin et al. (2015) made the comparison between an initial pH adjustment at 10 (using 5M NaOH solution) and an initial adjustment and regulation of pH at 10 during batch anaerobic digestion of swine manure. The results were that an initial pH 10 could achieve the similar VFA production efficiency to the continued pH adjustment, attributed to enhancement of hydrolysis and active acidogens simultaneously. Regarding the kinetics of hydrolysis and acidification, they demonstrated that acidogenesis rather than hydrolysis limited the rate of VFAs production. In the case of CaO, the lack of over VFA production compared to the raw manure, could be due to the lower solubility of lime and its lower efficiency compared to soda.

Moreover, the methane production of mono-digestion of cow manure was $158 \pm 13 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$ at 58 days. The production obtained with its co-digestion with miscanthus was similar contrary to the one with sorghum (158 ± 4 and $195 \pm 6 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$, respectively). The miscanthus did not boost the digestion of the manure. However, it does not justify why was no increase of the performances with CaO pretreated miscanthus were observed. We could hypothesize that it can be explained by (1) the low solubility of lime (2) the high absorption potential of miscanthus. Both combined made that the efficiency of lime was minimized during manure and miscanthus co-digestion.

4.3.2.3 Conclusion

These complementary experiment let to observe that the residual alkaline solution could pretreat manure after the pretreated matter was added before starting the AD. In fact, The addition of soda could enhance the VFA production. This production was very fast which induced a slowdown of the methanogenesis without inhibited it. The addition of lime could have an impact of the first order kinetics constant. But as for both, their addition did not change the final methane production.

4.3.3 Economical analysis

This analysis was conducted as done by Ruffino et al. (2016). The Table 4-7 indicates the data used for the calculations. The efficiency for the transformation of biomethane was 0.35, 0.45 and 0.96 for electrical, thermal energy and methane injection, respectively (ADEME, 2016; Méthanisation, 2014). The energy value of methane considered was $9.7 \text{ kWh} \cdot \text{m}^3_{\text{CH}_4}$ (Moletta, 2011). The purchase prices of electricity or biomethane were a mean of value indicated in (Assemblée Nationale, 2016) and (Assemblée Nationale, 2014), respectively. The subsidy taking in account for electricity was the “breeding subsidy” of $0.05 \text{ €} \cdot \text{kWh}^{-1}$. The one for the biomethane injection was “injection subsidy” P2 of $0.025 \text{ €} \cdot \text{kWh}^{-1}$ concerning agricultural wastes and catch crop.

Table 4-7 : Assumptions employed for the economic assessment

	Electrical energy	Thermal energy	Methane injection
Efficiency ($\text{kWh} \cdot \text{kWh}^{-1}$)	0.35	0.45	0.96
Energy from one $\text{m}^3 \text{ CH}_4$ ($\text{kWh} \cdot \text{Nm}^{-3}_{\text{CH}_4}$)	9.7	9.7	9.7
Price ($\text{€} \cdot \text{kWh}^{-1}$)	0.1625	0.05	0.085
Price including subsidy ($\text{€} \cdot \text{kWh}^{-1}$)	0.2125	-	0.11
Economic value of energy from methane ($\text{€} \cdot \text{m}^{-3}$)	0.551	0.218	0.840
Economic value of energy from methane with subsidy ($\text{€} \cdot \text{m}^{-3}$)	0.721	-	1.09

The calculations are described in Table 4-8. For the assessment of the pretreatment costs, only the costs of reagents, amounting to $0.47 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ for NaOH and $0.235 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ for CaO

were taken into account (commoprices.com/fr). The alkali dose used was $0.1 \text{ kg.kg}_{\text{TS}}^{-1}$ for sorghum. Knowing that the quantity of sorghum in the mixture (sorghum+manure) was $38\%_{\text{TS}}$ and $39\%_{\text{VS}}$, the alkali dose for the substrate mixture was $0.038 \text{ kg.kg}_{\text{TS}}^{-1}$ and $0.039 \text{ kg.kg}_{\text{VS}}^{-1}$, respectively. The cost of water was not taken into account because it was supposed that rainwater will be used. The additional costs like the workforce and a place for pretreating sorghum were not taken into account.

Table 4-8: Economic analysis performed on the different co-digestion of cow-manure co-digested with pretreated sorghum

	NaOH 10% 1d	CaO 10% 5d
Alkali pretreatment (VS basis) ($\text{kg.kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.039	0.039
Cost of the pretreatment (VS basis) ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.018	0.009
Methane production ($\text{Nm}^3.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.195	0.195
Increase in CH ₄ yield (%)	19	8
Economic value of the electricity increment ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.020	0.009
Economic value of the thermal increment ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.008	0.003
Economic value of total energy increment ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.028	0.012
Economic value of the biomethane increment ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.031	0.013
Earnings if cogeneration ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.010	0.003
Earnings if injection ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.013	0.004
Economic value of the electricity increment (with subsidy) ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.027	0.011
Economic value of total energy increment (with subsidy) ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.035	0.014
Economic value of the biomethane increment (with subsidy) ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.040	0.017
Earnings if cogeneration (with subsidy) ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.017	0.005
Earnings if injection (with subsidy) ($\text{€}.\text{kg}_{\text{VS}}^{-1}$)	0.022	0.008

With reference to the conditions tested in the part 4.3 (10% NaOH or CaO for 1 and 5 days, respectively), the earnings were positive. Obviously, according if subsidies were taken in account, the overvalue was different. With subsidies, the earnings were of $17 \text{ €}.\text{t}_{\text{VS}}^{-1}$ and $22 \text{ €}.\text{t}_{\text{VS}}^{-1}$ for cogeneration or biomethane injection in the case of soda pretreatment and 5 and $8 \text{ €}.\text{t}_{\text{VS}}^{-1}$ with lime pretreatment. Without, they were 10, 13, 3 and $4 \text{ €}.\text{t}_{\text{VS}}^{-1}$.

It is necessary to compare these earnings to the income of the co-digestion of cow manure with raw sorghum. A “garage” digester can treat between 5000 and 30000 ton.y^{-1} of substrate. The calculations were done with a volume of 17500 t (Table 4-9). With the ratio used in the aforementioned experiment, this volume corresponds to 5801 t_{VS} for the codigestion (2231 t_{VS} of sorghum and 3570 t_{VS} of manure). To calculate supplemental incomes brought by the co-digestion with sorghum compared to the mono-digestion of manure, the same volume was considered : 17500 t of manure represents 4200 t_{VS} . This difference of treated VS quantity between the co-digestion or the mono-digestion will have a high impact on the results. The cost of production of sorghum ($110 \text{ €}.\text{t}_{\text{TS}}^{-1}$) was taken into account (personal communication).

Table 4-9 : Calculations of the supplemental income of the use of raw and pretreated sorghum

Energy	Manure	Income* (k€.y ⁻¹)		
		(improvement, % _{manure})	(improvement, % _{co-} digestionwithrawsorghum)	(improvement, % _{co-} digestionwithrawsorghum)
		Co-digestion with sorghum	10% NaOH 1d	10% CaO 5d
Cogeneration without subsidy	511	871 (71)	824 (-5)	834 (-4)
Cogeneration with subsidy	624	1063 (70)	1052 (-1)	1042 (-2)
Injection without subsidy	558	951 (70)	1025 (8)	974 (2)
Injection with subsidy	722	1230 (70)	1358 (10)	1276 (4)

*sorghum production costs deducted

Addition of sorghum led to a significant supplemental income to the mono-digestion of cow manure, principally by increasing the amount of substrate VS treated in a given digester. Compare to it, supplemental incomes brought by pretreated sorghum were quite negligible. Moreover, it is important to notice that in this study, the sorghum used was drought. It is more common to use “ensiled” sorghum. In this case, the quantity to add will be adjusted.

4.4 Conclusion du chapitre 4

Cette partie a permis l'application, à plus grande échelle et en conditions de méthanisation agricole, de certains pré-traitements alcalins étudiés dans le chapitre précédent.

Le fait que le sorgho soit une biomasse riche en sucres permet de booster la digestion du fumier bovin (+ 42%) qui peut être défavorisée par un ratio C/N du fumier un peu bas pour la DA (compris entre 22 et 28, manque de carbone, principalement). L'application de pré-traitement au sorgho permet d'augmenter la production de méthane par rapport à sa co-digestion brute avec du fumier (jusqu'à 19%). En comparant à la mono-digestion du fumier, cette augmentation est d'autant plus importante (+ 69 et 53% avec NaOH et CaO, respectivement). Contrairement au sorgho, le miscanthus ne semble pas être un bon candidat pour être utilisé comme un co-substrat du fumier. En effet, co-digéré brut, le sorgho a permis d'obtenir une production de méthane supérieure de + 23% par rapport au miscanthus. D'ailleurs la production de méthane obtenue avec la co-digestion du fumier bovin et du miscanthus brut est identique à celle obtenue avec la mono-digestion du fumier (Tables 4-7 and 4-9). De même, utilisés sous forme pré-traitée dans les mêmes conditions (10% CaO 5 jours), le sorgho a permis une production de méthane supérieure de 26% (Table 4-5 and 4-7). Cela soutient l'effet booster du sorgho. Le fait que le miscanthus n'a pas stimulé la digestion

du fumier peut s'expliquer par son BMP qui était inférieur ($158 \pm 2 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$) à celui du sorgho ($250 \pm 14 \text{ NmL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gVS}^{-1}$, chapitre 3). De plus, comme observé précédemment et dans le chapitre suivant, le sorgho et le miscanthus sont deux biomasses lignocellulosiques différentes. Les différences de rendement en méthane observées ici peuvent être expliquées par ce fait. Le miscanthus avec son pouvoir absorbant plus élevé, peut réduire l'action des solutions de pré-traitements.

Ces différents essais ont mis en évidence l'effet tampon du fumier et pouvoir alcalinisant de la biomasse pré-traitée avec des réactifs alcalins.

Chapitre 5 : Utilisation de l'histologie pour étudier et quantifier les mécanismes des pré-traitements alcalins sur deux biomasses lignocellulosiques

Ce chapitre vise à améliorer la compréhension de la dégradation de la matière lignocellulosique par des pré-traitements alcalins dans différentes conditions opératoires (réactif, durée, température). Pour parvenir à cet objectif, une grande partie des expérimentations a été réalisées au CIRAD de Montpellier, sur la plateforme PHIV par moi-même et une étudiante de Master 2 Helga Felix Pinheiro Nolasco. Différents protocoles ont été spécifiquement développés. Les premières expérimentations ont été réalisées sur des matières broyées à 1mm puis pré-traitées. Les résultats obtenus étant insuffisants du point de vue qualitatif et impossibles à quantifier, en raison du biais apporté par la diversité des plans d'orientation des broyats inclus, une deuxième expérimentation a été réalisée sur des tronçons de tige de 1 cm. Le pré-traitement n'ayant pas été homogène sur toute la hauteur du tronçon, les expérimentations se sont finalement portées sur des coupes transversales de tiges de 110 μm . Ces résultats constituent l'originalité de cette thèse car les techniques de coloration et quantification n'ont jamais été utilisées sur de la matière pré-traitée.

5.1 Context and objectives

Sorghum and miscanthus are mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin Scheller et al. (2011). The cellulose is a paracrystalline structure of β -(1 \rightarrow 4)-D-glucan chains, which are synthesized individually and can crystallize into cellulose microfibrils through inter- and intramolecular hydrogen bonds and Van der Waals bonds. Because cellulose is the main load-bearing polymer of the cell wall, the length, angle, and crystallinity of cellulose microfibrils are important determinants of the physical characteristics of the cell wall (Mcfarlane and Anett, 2014). The hemicelluloses are polysaccharides which encompass the heteromannans, xyloglucan, heteroxylans, and mixed-linkage glucan (Pauly et al., 2013). The amorphous and branched properties make hemicelluloses more susceptible to biological, thermal, and chemical hydrolysis of their monomer compounds. During hydrolysis, the moisture content, pH, and temperature are the most critical parameters when taking into account only hemicelluloses (Li et al. 2014). The lignin consists in a polymer of aromatic compounds. The main building blocks of lignin are the hydroxycinnamyl alcohols (or monolignols) coniferyl alcohol and sinapyl alcohol, with typically minor amounts of p-coumaryl alcohol. The units resulting from the monolignols, when incorporated into the lignin polymer, are called guaiacyl (G), syringyl (S), and p-hydroxyphenyl (H) units (Vanholme et al., 2010). Lignin is deposited secondarily in the cell wall and it acts as a protective cushion for the plant cell wall (Wertz and Bédoué, 2013). In addition lignin is not homogeneously distributed within the biomass and its distribution depends closely on the cellular and tissue structure of the biomass.

The two biomasses are good candidate for anaerobic digestion. In fact, sugars contained in cellulose and hemicelluloses have been shown anaerobically biodegradable (Monlau et al., 2013). Because it is cross-linked with the other cell wall components, lignin minimizes the accessibility of cellulose and hemicelluloses to microbial enzymes, leading to a reduced digestibility of biomass (Kikas et al., 2016). These bonds, called lignin-carbohydrate complex (LCC), form a complex and compact structure (Karimi et al., 2013). But this structure makes the lignocellulosic biomass recalcitrant to bioconversion (Bichot et al., 2018). The aims of pretreatments are to break down lignin and LCC, disarrange the crystalline structure of cellulose and expose holocelluloses, but also to assist in the hydrolysis of polysaccharides (Ravindran and Jaiswal, 2016). Their impacts are mainly studied on the methane production yield, the first order kinetics (Monlau et al., 2012), the biochemical composition (Li et al., 2014) and the crystallinity index. Among the technical used, biochemical analysis, NIR prediction (Li et al., 2017) and microscopic observations (Chundawat et al., 2011) are mostly used. Getting an effective characterization using the surface imaging is challenging (Karimi and Taherzadeh, 2016). Different microscopic methods could be used of which Scanning Electron Microscopy (Ghaffar and Fan, 2013), Confocal Raman microscopy (Ji et al., 2016), for example. Indeed, recalcitrance of plant cell wall to anaerobic digestion is a multi-scale phenomenon covering several orders of magnitude encompassing both the macromolecular barriers of the cell wall (ie crystalline cellulose or lignin carbohydrate complex) but also cellular factors. Indeed, the distribution of lignin, cellulose and hemicellulose is not uniform in all cells that make up the different tissues. For example, if one considers a lignified cell of sclerenchyma fiber, it has a thick lignified wall

with a small diameter lumen in the center, whereas lignified parenchyma cells or xylem vessels that conduct the raw sap will have finer lignified walls and large diameter center lumen providing more surface area for contact with anaerobic micro-organisms or to alkaline pretreatment solution.

It has been suggested that microscopic analyses of the lignocelluloses and comparisons with the pretreated samples can be used to qualitatively predict and understand the susceptibility of the lignocellulosic materials to subsequent hydrolysis (Karimi and Taherzadeh, 2016). In fact, a biomass is not only a biochemical composition; it is a tissue that has cellular structure as well. Despite the importance of cellular scale to fully understand the effect of biomass pretreatments, there is a lack of information about the mechanism of the alkaline reagent on the anatomical structure and the cellular components of the lignocellulosic biomass. Moreover, the microscopic observations are more often only qualitative. Zhang et al. (2013) and Legland et al. (2017) proposed a histological quantification of maize stem using FASGA staining. FASGA is composed of Safranin and Alcian blue. Alcian Blue may stain holocelluloses in blue and the safranin to stain lignin in red (Tolivia and Tolivia, 1987). The aim of these quantifications was the elucidation of the genetic basis of lignin deposition and distribution all along the stem sections or discriminate contrasted genotypes and identify changes in histology induced by environmental factors such as water deficit, respectively. The results were very interesting and could be apply on pretreated samples in order to identify changes induced by alkaline pretreatments at the tissue and cell scales. In Méchin et al., (2005), phloroglucinol and Mäule staining were used besides FASGA. In fact, safranin is not specific to lignin (Wilcox, 1964). Sarkanen and Ludwig (1971) reported that acid phloroglucinol had universal application to all lignins, although the reaction may be weak or even absent in lignins containing high amounts of syringyl propane units. Alcian blue is not specific to holocellulose. Congo Red staining is specific to cellulose (Wood, 1980).

This chapter aims to understand the effect of two alkaline reagents on the anatomical structure on sorghum and miscanthus. For the first time, using FASGA staining we provided a histological quantification of the effect of alkaline pretreatment to study the increasing of the bioaccessibility biomass through anatomical point of view. At the beginning of the study biomass ground at 1mm was used. The interpretation was too subjective and the quantification was impossible. Therefore, stem internodes were used. To complete the study of the internodes stained with FASGA, we mapped, at the tissue scale, the main cell wall components (cellulose, crystalline cellulose, lignin, lignin G and S), using histochemical methods and we described the effect of pretreatments on the spatial distribution of these compounds at the tissue and cell scale.

5.2 Analyses histologiques des matières pré-traitées broyées à 1mm colorée au FASGA

5.2.1 Matériel et méthodes

Les pré-traitements des biomasses broyées à 1 mm ont été réalisés comme ceux avant BMP (chapitre 2, partie 3.2). Ces analyses étant été menées au début du doctorat, elles ont été réalisées sur des biomasses pré-traitées comme suit: une dose de réactif de 10%, une teneur en MS de 4%, une durée de 24 h et une température de 55°C. La préparation de la matière (inclusion en résine, coupe, coloration au FASGA) et son observation sont décrites dans la partie 2.5 du chapitre 2.

5.2.2 Sorgho B140 broyé à 1mm et prétraité avec NaOH ou CaO à 55°C pendant 24h

Parmi les différentes images de sorgho brut observées, quasiment tous les différents tissus présents dans une tige ont pu être identifiés. En effet, l'épiderme est facilement reconnaissable car il est caractérisé par ses cellules en forme de pièce de puzzle (Figure 5-1 A). Les vaisseaux de xylème sont également aisément reconnaissables car ils possèdent des épaississements lignifiés sous forme d'anneaux, de spirales et quand la lignification est plus poussée, réticulés, facilement identifiables (Figure 5-1 J). Des fibres de sclérenchyme et des cellules de parenchyme ont également pu être identifiées (Figures 5-1 D,G). La matière est majoritairement colorée en rouge (excepté dans le parenchyme), ce qui signifie qu'elle semble être majoritairement lignifiée.

De plus, ces clichés permettent de voir l'effet d'un broyage à 1 mm sur la matière. Les différents types de tissus ont été séparés par cassure. Cela permet la reconnaissance de fragments tissulaires (faisceaux conducteurs, sclérenchyme, fragments de parenchyme,...).

Après pré-traitements, l'épiderme est toujours resté intact (du moins sans dégradation visible par le pré-traitement) (Figures 5-1 B, C comparées à A). De manière générale, sur la totalité des images, il a été observé une plus grande quantité de tissus colorés en bleu. Les coupes longitudinales de sclérenchyme deviennent plus bleues. Cela est plus évident sur la Figure 5-1 F que sur la 5-1 E. En effet sur des échantillons broyés à 1 mm, il est difficile d'observer un même tissu coupé de la même façon (coupe longitudinale ou transversale). Sur des coupes de parenchyme, les parois de ce dernier apparaissent plus épaisses (Figure 5-1 I). Une augmentation de l'épaisseur pourrait être un signe de relâchement. Ceci pourrait signifier que les holocelluloses ont également été dégradées par le pré-traitement. Des vaisseaux de xylème encore entiers ont pu être observés. Après pré-traitement, ces vaisseaux ont conservé la même forme spécifique mais ont changé de couleur (du rouge au bleu) (Figures 5-1 K, L). Il semblerait donc qu'ils ont été délignifiés.

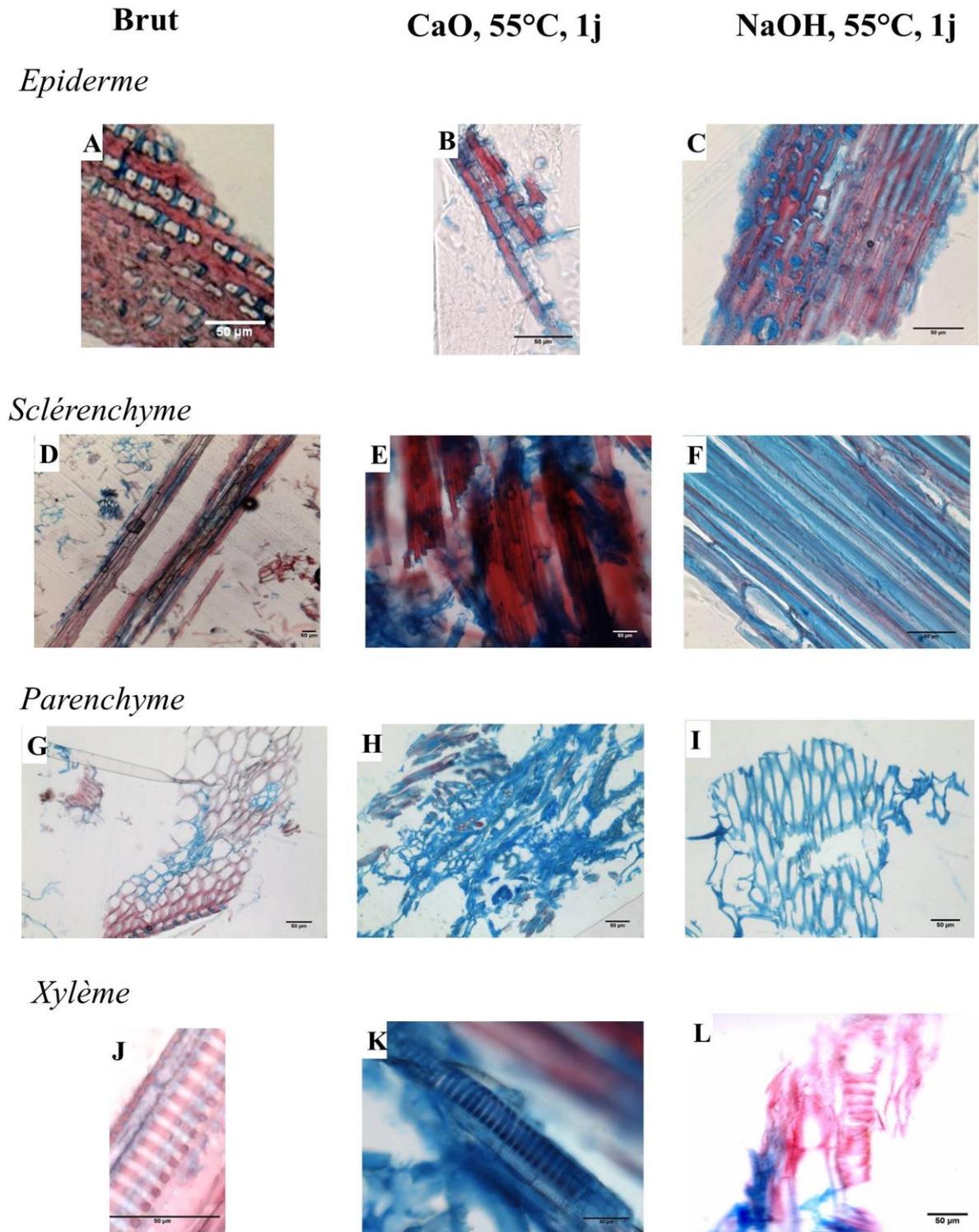


Figure 5-1 : Sorgho broyé à 1mm brut (1^{ère} colonne) et pré-traité (à la chaux : 2^{ème} colonne et à la soude : 3^{ème} colonne) coloré au FASGA (rouge= matière lignifiée, bleu= matière holocellulosique).

5.2.3 Comparaison du miscanthus FLO broyé à 1 mm et pré-traité à 55°C avec une teneur en matière sèche de 4 ou 20%

Dans la suite des travaux de doctorat, il est apparu que la teneur en MS lors du pré-traitement avait une influence non négligeable sur la matière (chapitre 3, partie 3.3.1). Cette partie essaie d'étudier cette influence. Le miscanthus a été choisi car l'étude de l'influence de la teneur en MS n'a été réalisée qu'avec cette biomasse. Les conditions de pré-traitements sont les mêmes que pour le sorgho excepté la teneur en MS (soit 4 ou 20%).

Certains clichés obtenus sont présentés par la Figure 5-2. Comme pour le sorgho, des tissus ont pu être identifiés : le sclérenchyme (1^{ère} colonne), les faisceaux conducteurs (2^{ème} colonne) et le xylème (3^{ème} colonne). Les faisceaux conducteurs sont facilement identifiables par leur forme caractéristique due à la disposition des vaisseaux conducteurs de xylème et phloème. Pour le miscanthus brut coloré au FASGA, ces tissus sont majoritairement colorés en rouge (Figure 5-2 A-C).

Après pré-traitements, une importante quantité de coloration bleue est apparue diminuant ainsi la coloration rouge (Figure 5-2 D-N). Les holocelluloses présentes dans ces tissus sont devenues accessibles à la coloration. Elles sont très certainement désincrustées de la lignine qui a été dégradée par les pré-traitements alcalins. Cependant, un grand nombre de clichés ont été réalisés et beaucoup de variabilité dans l'évolution de la coloration a été observée. Beaucoup de subjectivité intervient donc pour l'interprétation des résultats, ce qui rend très difficile cette étude car les essais de quantification ont été infructueux. Il semblerait toutefois que la coloration bleue soit moins importante sur les clichés des échantillons pré-traités à 20% de MS principalement au niveau du sclérenchyme.

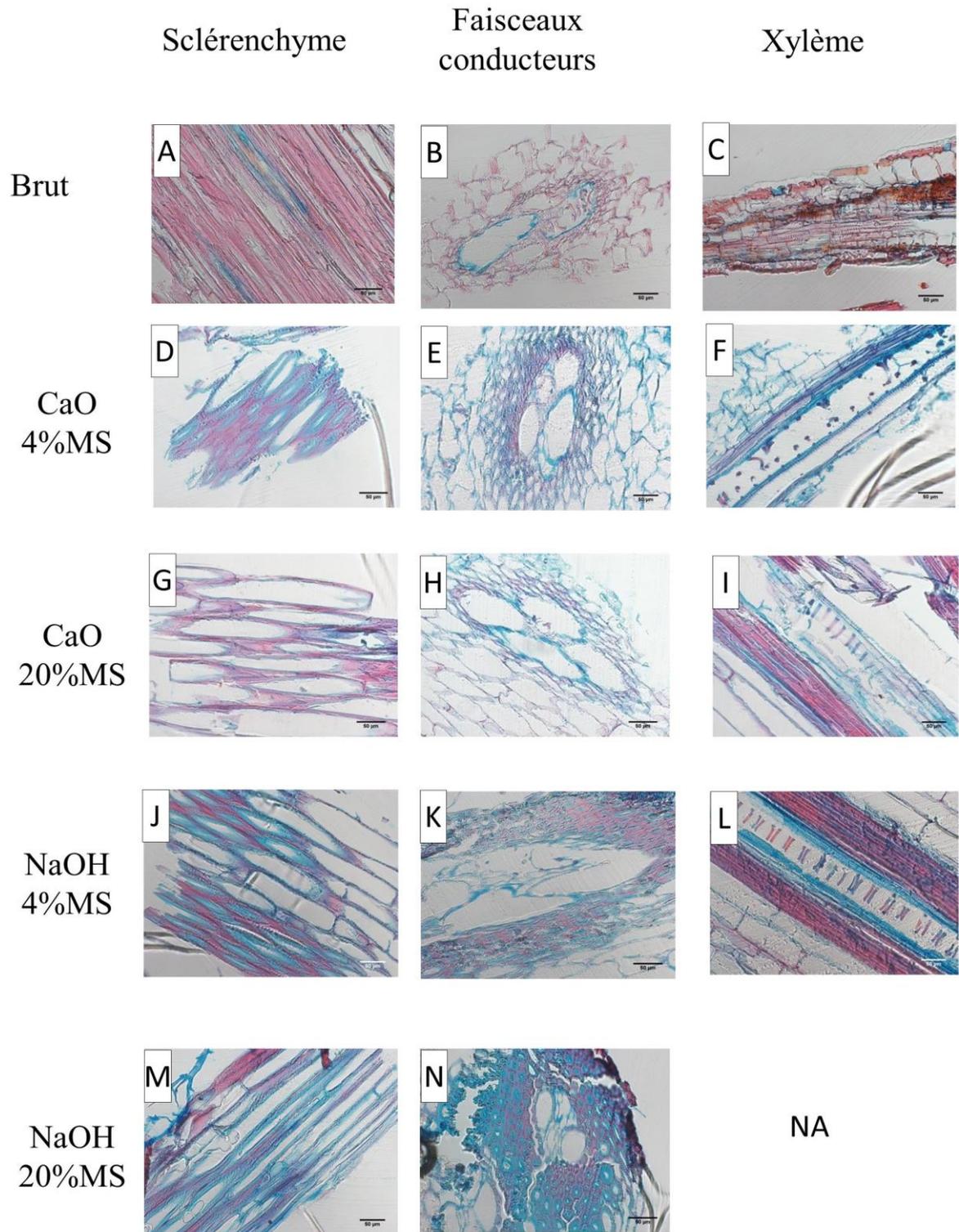


Figure 5-2: Comparaison miscanthus broyé à 1mm pré-traité à la chaux ou la soude à 4 ou 20 % MS, coloration au FASGA

5.2.4 Comparaison du sorgho B140 et du miscanthus FLO broyés 1 mm et pré-traité à 55°C pendant 1 jour

En plus de comparer l'effet des différentes conditions de pré-traitement, il est également important de comparer le sorgho et le miscanthus.

La Figure 5-3 compare ces deux biomasses broyées à 1mm brutes et pré-traités avec les mêmes conditions. En comparant les deux biomasses brutes, le miscanthus semble plus lignifié que le sorgho (Figures 5-3 A, F).

Après pré-traitements, comme observé précédemment, la coloration bleue est plus importante. Sur les clichés du sorgho pré-traité, parfois, les parois holocellulosiques n'ont plus conservé leur forme rectiligne, elles sont comme regroupées en chiffonnade, ce qui a été très peu observé sur les coupes de miscanthus (Figures 5-3 B à E). De plus, les cellules de parenchyme ont vu leur paroi s'épaissir (Figures 5-3 B, G, I). Sur des coupes transversales de sclérenchyme, dans chaque cellule, au sein de parois épaisses rouges, un nouveau cercle bleu est apparu (Figures 5-3 C, E, H, J). Des holocelluloses au sein du sclérenchyme, qui est une structure très lignifiée, sont donc devenues accessibles au colorant. Cela peut illustrer le fait que les holocelluloses ont été désincrustées de la lignine, elle-même dégradée. La dégradation des tissus lignifiés est un point commun entre ces deux biomasses.

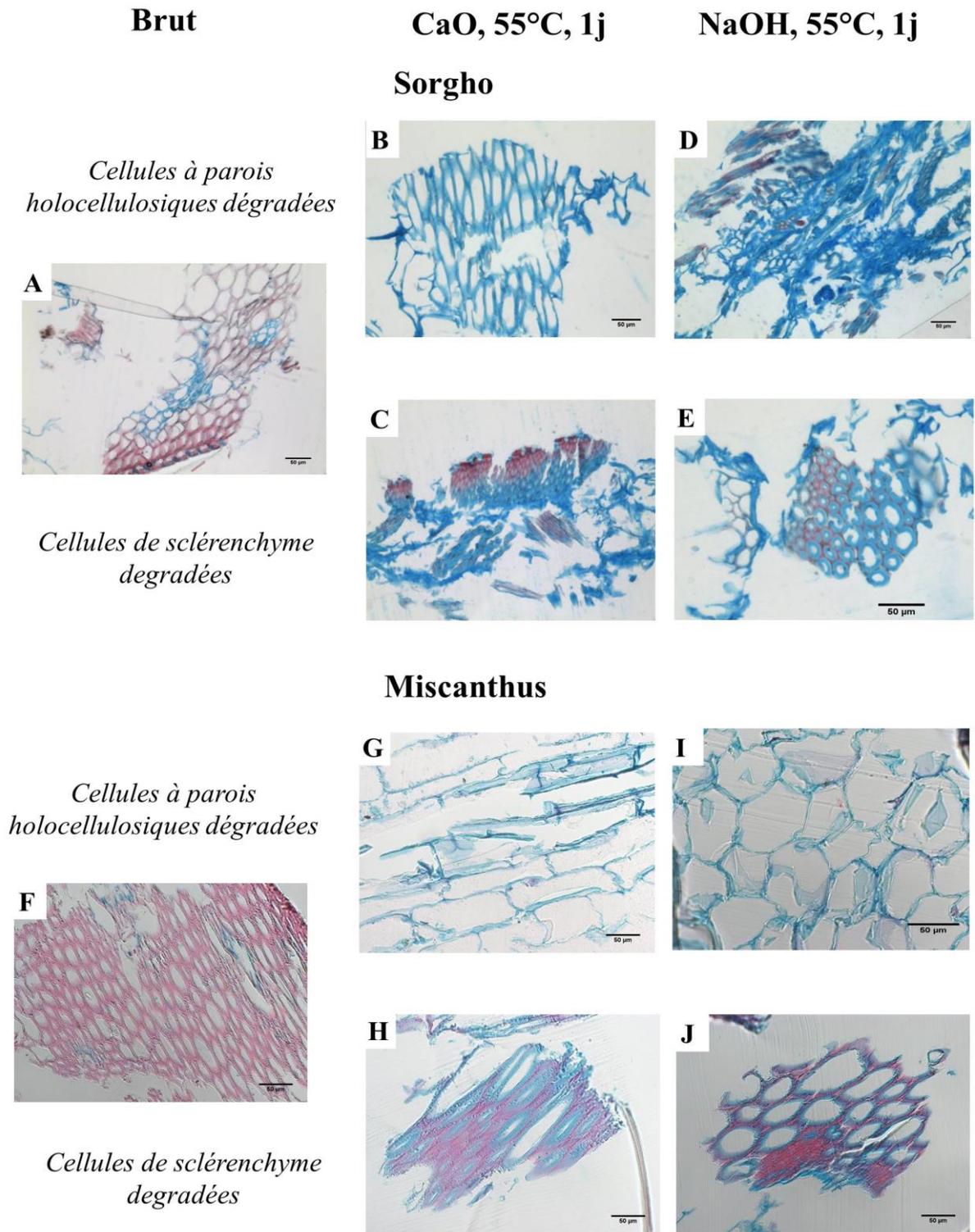


Figure 5-3: Comparaison du sorgho et du miscanthus broyés à 1mm bruts et pré-traités, colorés au FASGA

5.2.5 Conclusion

Le sorgho et le miscanthus bruts sont majoritairement lignifiés ou du moins cette lignine empêche les holocelluloses d'être accessibles à la coloration FASGA. Après les prétraitements alcalins, cette coloration est modifiée. La nette augmentation de la coloration bleue suggère que plus d'holocelluloses sont colorées et donc que la lignine a été dégradée.

Cependant, la difficulté de travailler avec une matière broyée comme celle-ci est de pouvoir observer des éléments reconnaissables comme des coupes de sclérenchyme ou de vaisseaux. Il est également difficile de savoir si ce que l'on a pu observer est vraiment représentatif. En raison de plans d'orientation trop divers, des premiers essais de quantification, n'ont pas été concluants. Après différents essais pour inclure de plus grandes quantités de matière infructueux, il a été décidé de travailler sur des coupes transversales entières de tiges, support bien maîtrisés par le personnel de la plateforme PHIV.

5.3 Study of the penetration of pretreatment along 1cm section of stem

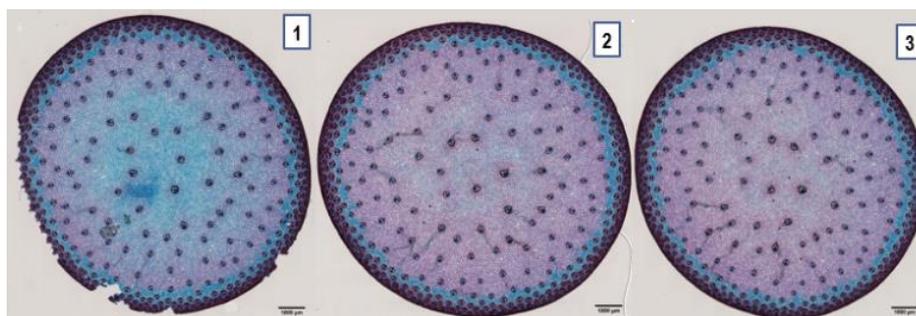
The first approach to study the internodes structure and their evolution after alkaline pretreatments was to use internodes cut at 1cm. In order to verify if the pretreatment was homogeneous along each portions, the penetration of the pretreatment was studied by cutting the 1 cm internodes every millimeter.

5.3.1 Material and methods

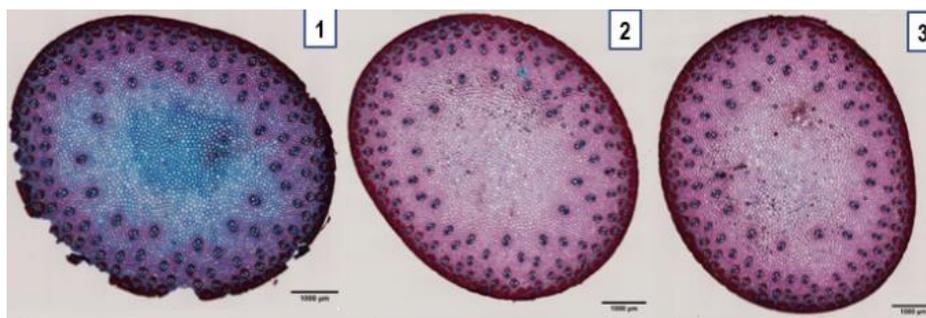
The pretreatment conditions were NaOH at 10% for 24 h at 260 °C. The sectioning was presented in the chapter 2 part 2.5.

5.3.2 Results

The Figure 5-4bis shows the sectioning and staining pretreated 1cm stems after soda pretreatments.



(a)



(b)

Figure 5-4 bis: Pretreated sorghum (a) or miscanthus (b) 1cm transversal internode section with NaOH 26°C, stained with FASGA, comparison between Areas 1, 2 and 3

In the outer ring and in the middle of the area 1 (the extremity of the 1cm cut) of sorghum the cells were staining in blue (Figure 4bis-3 a1). In the following areas (corresponding to deeper in 1 cm cut), the blue staining was only in the outer ring (Figures 4bis-3 a 2,3). For miscanthus, contrary to in the areas 2 and 3, the middle on the internode section of the area 1 was blue (Figure 4bis-3 b 1 compare to 2 and 3). The staining did not evolve in the same way for each area which induced a significant difference of pretreatment efficiency. The repartition of the pretreatment solution was not homogeneous. It affected only the first mm.

Therefore, we could not validate the results found by using this material. The exit found for this situation was to change the approach and apply the pretreatment directly into the sectioned material, avoiding any type of absorption problems by diminishing the height variable. Consequently, used 1cm internode was useless because we will not sure to observed similar cut. The best way is to pretreated 110 µm cuttings directly.

5.4 Histological analysis and quantification of 110µm section of stem

These part was from underwriting article: Alkali pretreatments for sorghum and miscanthus anaerobic digestion: impacts at plant cell scale. Hélène Laurence Thomas, Helga Felix Pinheiro Nolasco, Hélène Carrère, Marc Lartaud, Tuong-Vi Cao, Christelle Baptiste, Jean-Luc Verdeil

5.4.1 Material and methods

The measurement of the BMP, k, biochemical composition and the LOI are presented in the chapter 2 - parts 2, 3 and 4. The histological staining and the image acquisition and analysis are presented in the chapter 2- part 2.5.

5.4.1.1 Pretreatments conditions

Table 5-1 : Pretreatments conditions of internode cuttings for histology analysis

Biomass Internode	Pretreatment	Reagent	Concentration (g.100g _{TS} ⁻¹)	Temperature (°C)
Sorghum	1	CaO	10	26
Sorghum	2	NaOH	10	26
Sorghum	3	CaO	10	55
Sorghum	4	NaOH	10	55
Miscanthus	5	CaO	10	26
Miscanthus	6	NaOH	10	26
Miscanthus	7	CaO	10	55
Miscanthus	8	NaOH	10	55

In order to analyze the effect of the pretreatment on tissue, miscanthus and sorghum pretreated samples were collected for histological analysis at the following pretreatment durations 0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 9; 14; 19; 21; 24; 48; 96 and 144 hours.

5.4.1.2 Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) was performed with the software SAS. The model was :

$$Y_{brth} = \mu + B_b + R_r + T_t + H_h + (RB)_{rb} + (TB)_{tb} + (RTB)_{rtb} + (HRTB)_{hrtb} + \varepsilon_{brth}$$

Where Y_{brth} is the studied variable (PercSclZ1 or PercBluZ2) according to the pretreatment varying with the biomass b, the reagent r, the temperature t and the duration h. μ is the trial mean, B_b is the biomass effect (sorghum or miscanthus), R_r is the reagent mean effect (NaOH or CaO), T_t is the temperature mean effect (26 or 55°C), H_h is the duration of the pretreatment (from 0.5 to 144 h), $(RB)_{rb}$ is the interaction between the reagent and the biomass, $(TB)_{tb}$ is the interaction between the temperature and the biomass, $(RTB)_{rtb}$ is the interaction between the reagent, the temperature and the biomass, $(HRTB)_{hrtb}$ is the interaction between the duration, the reagent, the temperature and the biomass and ε_{brth} is the residual error.

5.4.2 Results

5.4.2.1 Impact of alkaline pretreatments on biochemical composition and methane production of internodes

The Table 5-2 provides biochemical composition and methane production of raw and pretreated internodes. Regarding the raw biomasses, miscanthus is more lignified than sorghum. After pretreatments, the Klason lignin was removed up to 7% for sorghum and 29% to miscanthus. For both, NaOH allowed removing more lignin than CaO. The methane production was improved by 5% for sorghum (CaO and NaOH pretreatments) and by 15 and

8% for miscanthus pretreated with CaO and NaOH, respectively. The first order kinetics constant was improved up to 162% and 546% for sorghum and miscanthus, respectively.

Table 5-2: Comparative Biochemical composition, LOI, methane production and first order kinetics constant of sorghum and miscanthus internode biomass : Influence of pretreatment.

	Cellulose (%TS)	Hemicel- -luloses (%TS)	Klason lignin (%TS)	LOI	Methane Production (NmL _{CH₄} .gVS ⁻¹)	k (d ⁻¹)
S_2c	31.0 ± 0.5	15.2 ± 0.5	18.7 ± 0.5	1.13 ± 0.07	241 ± 17	0.097 ± 0.010
S_2c_CaO_10_55	27.1 ± 0.1	11.5 ± 0.4	14.4 ± 1.5	1.35 ± 0.01	254 ± 5	0.254 ± 0.013
S_2c_NaOH_10_55	21.4 ± 0.1	12.5 ± 0.3	10.4 ± 1.3	1.18 ± 0.1	253 ± 32	0.205 ± 0.005
M_2c	40.3 ± 0.1	15.8 ± 0.7	24.9 ± 1.4	0.90 ± 0.1	201 ± 18	0.046 ± 0.002
M_2c_CaO_55	36.0 ± 1.3	14.2 ± 0.1	19.4 ± 1.2	1.13 ± 0.03	231 ± 16	0.232 ± 0.041
M_2c_NaOH_55	36.2 ± 0.5	14.7 ± 0.6	14.9 ± 0.6	0.91 ± 0.02	218 ± 6	0.206*

*the duplicate had an abnormal kinetics

5.4.2.2 Impact of alkaline pretreatments on biomass tissue structure and histochemistry of internodes

5.4.2.2.1 General anatomic organization plan of raw sorghum and miscanthus internodes

The Figure 5-4 presents the raw and pretreated internodes for 24 h stained with FASGA. The qualitative comparison between the two raw biomasses shows they have a similar organization plan composed of two main zones. Z1 was composed of lignified epidermis and VB protected by a developed sclerenchyma with thick lignified cell wall. Z2 was composed of parenchyma cell and VB allocated differently according to biomass.

Sorghum is anatomically similar to sugarcane and maize (Bakeer et al., 2013). It is characterized by a lignified epidermis that surrounds the VB spread throughout the parenchyma (Z1) (Figure 5-4). The rind reveals higher density of fibre bundles compared to the pith. In fact, it is this higher fibre ratio that provides for higher tensile strength of the rind. For miscanthus, the concentration of lignin and cellulose are high in the outer ring (corresponding to Z1) and then the concentration decreases exponentially towards the pith (Z2). The intensity of VB decreases from the epidermis towards the internal part of the stem that has the highest density of parenchyma and the cells around the VB are rich in lignin and cellulose. So these two biomasses had a same organization plan The VB distribution is less homogeneous in miscanthus. There are not in the center of Z2. This center presents a gap. These observations are in accordance with the miscanthus microscopic observations in literature (Ji et al., 2016; Kaack et al., 2003).

The Table 5-3 presents the results of image J processing carried out on raw FASGA stained internodes. The area of the stem section of sorghum is twice bigger than the miscanthus one. The zone definitions are alike, but the percentage of red sclerenchyma in Z1 and the quantity of conductive bundles are more abundant for sorghum. However, the density of conductive bundles is higher in miscanthus due to its smaller area.

Table 5-3: : Results of image processing for untreated samples, %Z1 and %Z2 indicating percentage of Z1 and Z2 area respectively, %SclZ1 representing the percentage of red sclerenchyma area in Zone 1; nbVBZ2 indicating the number of conductive bundles; densVBZ2 indicating the density of conductive bundles and finally %bluZ2 representing the amount of blue area in Z2.

Biomass	Area (mm ²)	%Z1	%Z2	PercSclZ1	nbVBZ2	densVBZ2	PercBluZ2
Sorghum	68.2 ± 2.0	20.6 ± 2.1	79.4 ± 2.1	50.8 ± 5.1	112.6 ± 11.3	1.8 ± 0.7	1.8 ± 0.6
Miscanthus	30.3 ± 1.9	21.4 ± 0.7	78.6 ± 0.7	39.9 ± 2.4	63.0 ± 6.7	2.6 ± 0.1	3.3 ± 1.3

5.4.2.2.2 Influence of alkaline pretreatments on internodes tissues

5.4.2.2.2.1 Qualitative observations : FASGA staining on internodes pretreated for 24h

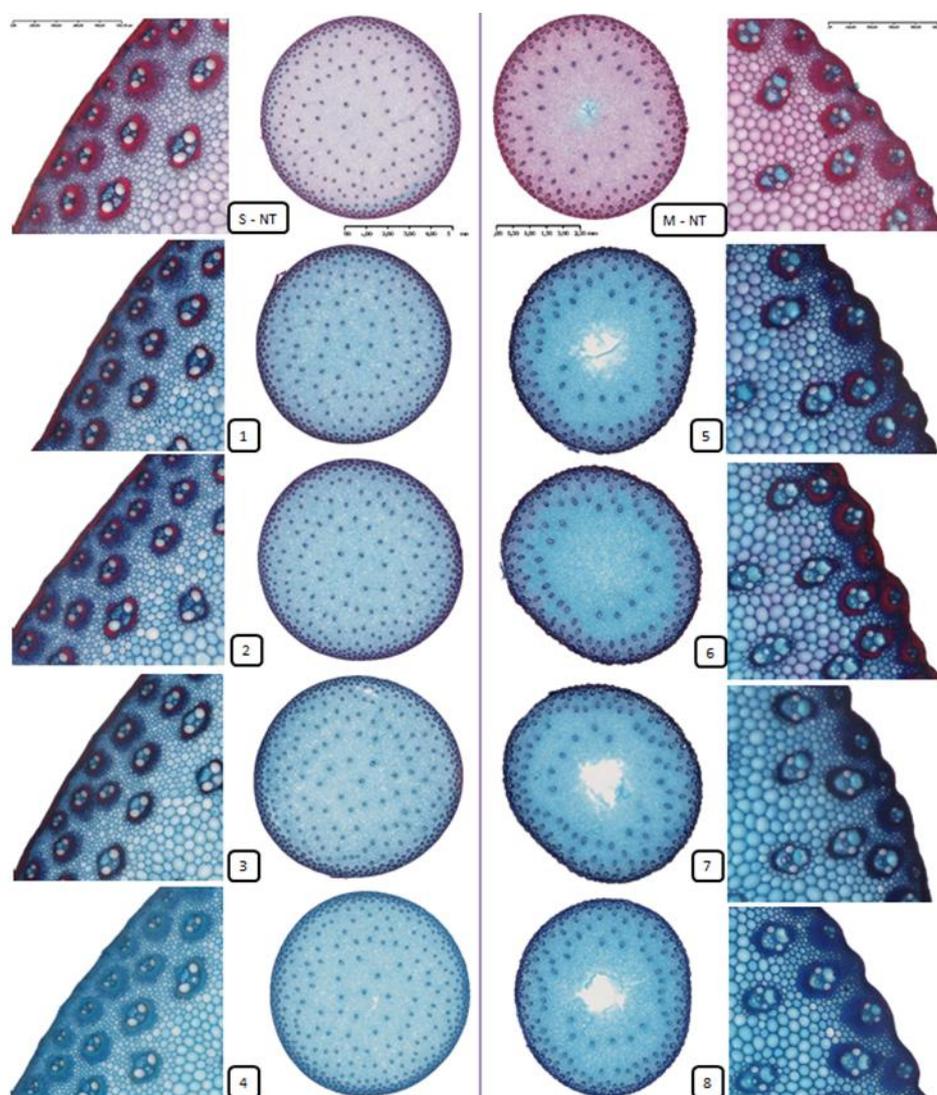


Figure 5-4 : Comparative effect of alkaline pretreatments on internode structure. The first columns corresponds to sorghum, the second one to miscanthus. 1 and 5 corresponds to pretreatments with CaO at 26°C, 2 and 6 with NaOH at 26°C, 3 and 7 to CaO at 55°C and 4 and 8 to NaOH at 55°C. Pretreatment duration: 24h. Observations made after FASGA staining

In the pretreated stem internodes, an important evolution of staining could be noticed for all the pretreatments compared with the controls. The percentage of blue staining increased obviously (Figure 5-4). There was a significant decrease in the red sclerenchyma area in Z1. There was, therefore, a great color difference in the parenchymal area in Z2 that turned blue showing that cellulose became more accessible to the staining. It was desembedded from the lignin. For sorghum, the sclerenchyma around the conductive bundles looks smaller. For all pretreated internodes, the phloem inside the VB looked intact. Comparing among all pretreatments applied on sorghum, the pretreatment NaOH at 55°C (n° 4) seems to have the most remarkable change in the reduction of the lignification portion of the sclerenchyma in the Z1 (Figure 5-4). Even without zoom, a strong color difference can be noticed in this area, which is almost entirely blue. For miscanthus, visually, pretreatments CaO at 26°C (n°5) and NaOH at 26°C (n°6) seemed to retain part of the red coloration in Z2, possibly because these treatments did not have such a strong effect in the lignified sclerenchyma area as pretreatment NaOH at 55°C (n°8). As for sorghum, pretreatment with NaOH at 55°C seems to be the most effective. In all pretreated miscanthus samples, we can notice that the center is teared apart. This is a characteristic that presents itself sometimes also on the untreated miscanthus samples, but, pretreatments seem to attack the central parenchyma cells in the inner zone (Z1) increasing the hole in the center.

To resume, the epidermis and the perivascular peribundle sclerenchyma were the less affected tissues by alkaline pretreatment. The parenchyma in Z2 was the most affected.

Moreover, these pretreatments did not affect only lignified structure. The Figure 5-5 illustrates the evolution of parenchyma cell walls. A thickening of cell walls could be noticed.

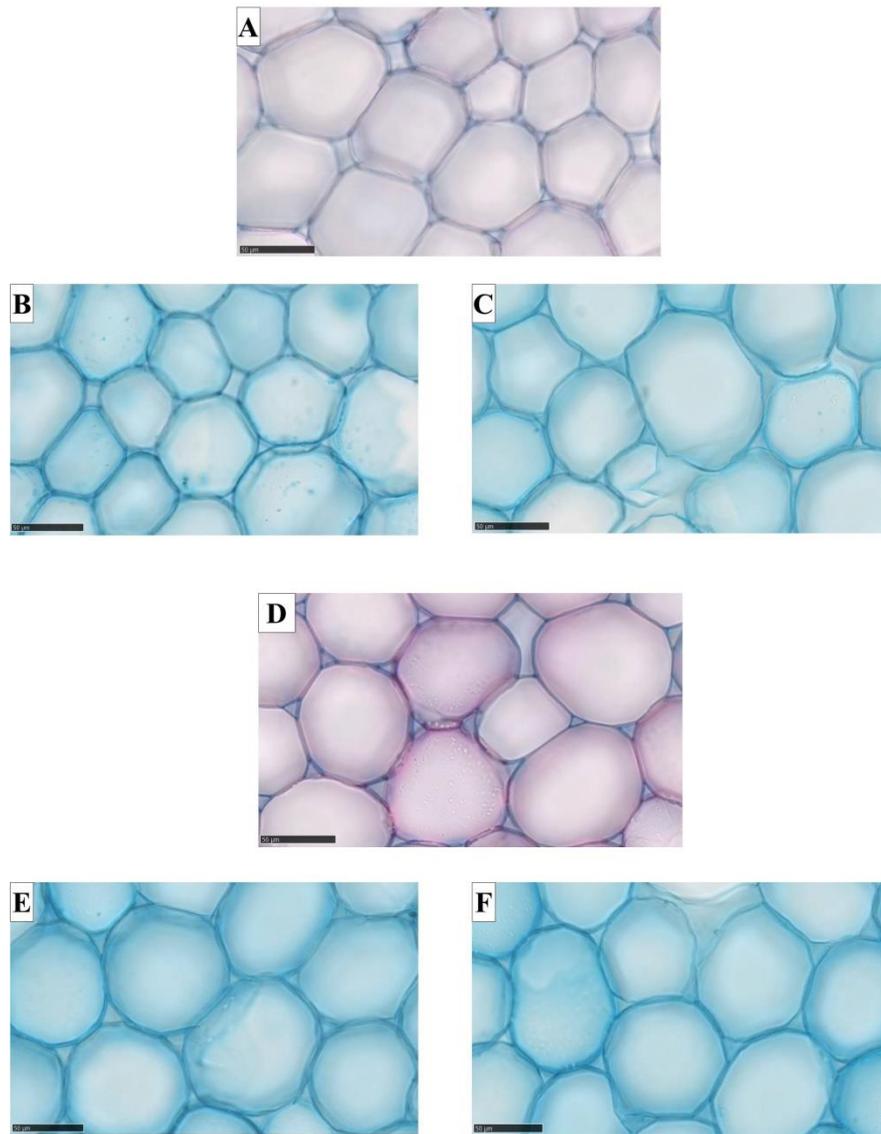


Figure 5-5: Effect of Alkaline pretreatment on the inner internode cell wall parenchyma.; Comparison of fasga stained raw and pretreated parenchyma cell (Z2) A=raw sorghum, D= raw miscanthus , B and D were pretreated with with CaO, 55°C for 24h and C and F were pretreated with NaOH, 55°C for 24h

The Table 5-4 presents the measure done on raw and pretreated at 55°C internodes images. For the two biomasses, the pretreatment had a significant impact on the thickness of the wall between two cells (p-value = $6.3 \cdot 10^{-6}$ and $9.5 \cdot 10^{-10}$, for sorghum and miscanthus, respectively). Contrary to sorghum, the impact of NaOH and CaO is significantly different for miscanthus internodes (p-value = 0.33 and $9.5 \cdot 10^{-3}$, respectively). Soda conducted to a higher wall thickening.

Table 5-4 : Thickness (μm) of the cell wall between 2 cell on raw internodes and pretreated for 24 with CaO or NaOH at 55°C. Each value represents a mean of 18 independent measurements

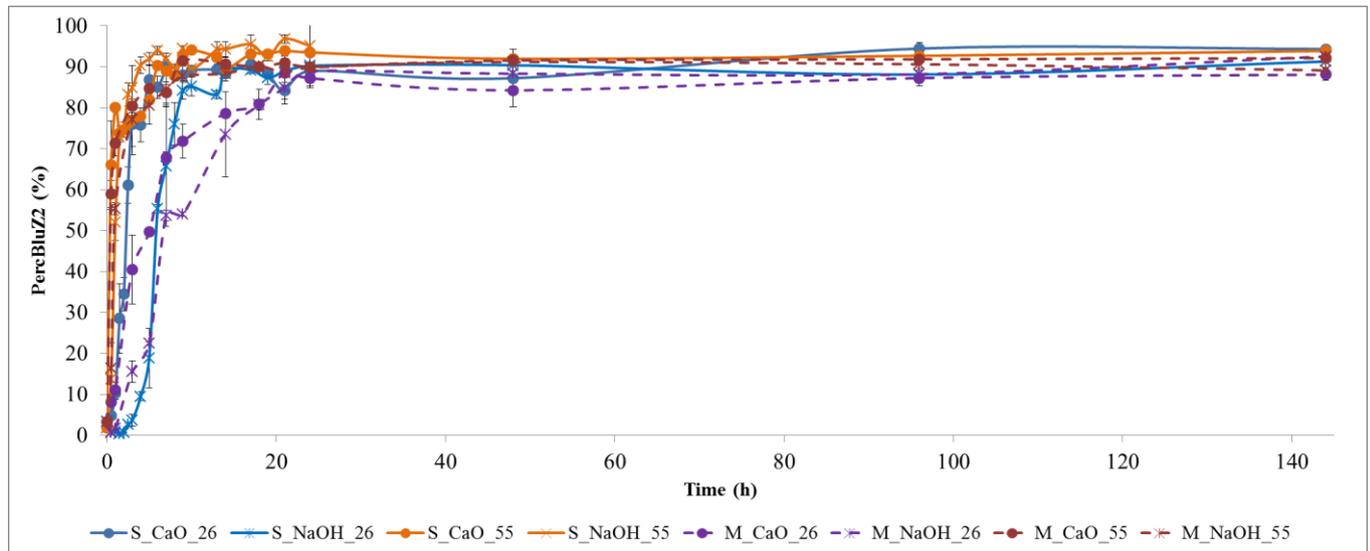
	Sorghum	Miscanthus
Raw	1.41 ± 0.56^a	1.88 ± 0.43^a
CaO 55°C	2.07 ± 0.54^b	2.64 ± 0.49^b
NaOH 55°C	2.31 ± 0.45^b	3.13 ± 0.55^c

* Different letters differ significantly for $p < 0.05$

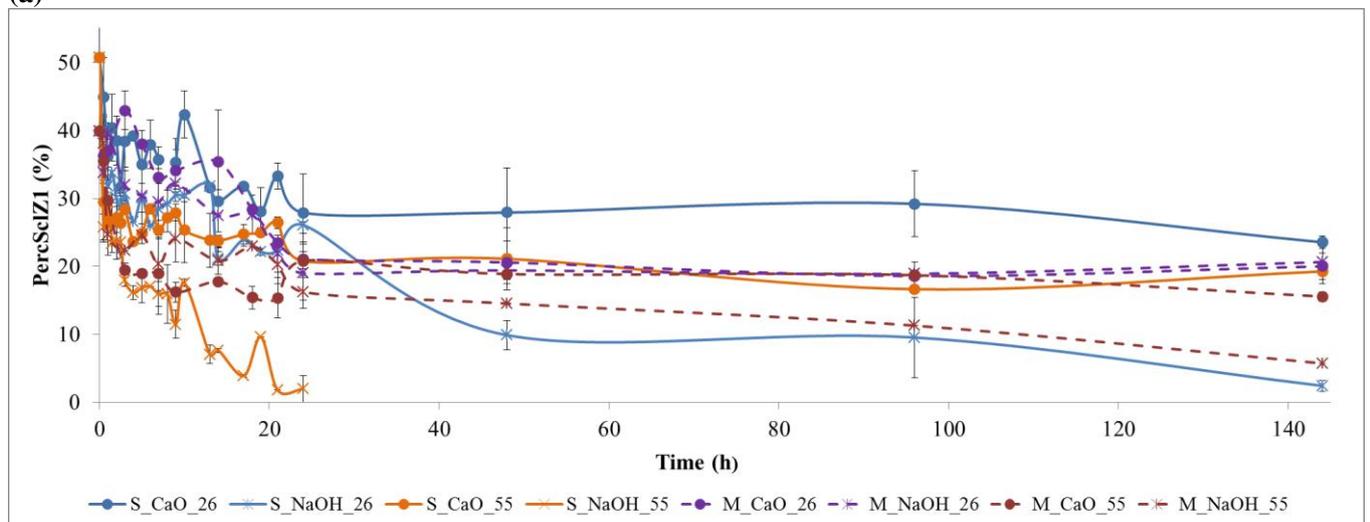
5.4.2.2.2.2 Quantitative observations : FASGA staining evolution over time

The quantitative results of the kinetics pretreatments study are reported in the Figure 5-6. The evolution of the percentage of blue staining (PercBluZ2) in Z2 increased exponentially until around 24 h where a plateau around 90% was achieved (Figure 5-6 a). The remained 10% could correspond to the xylem and sclerenchyma unaffected by the pretreatment. In the case of sorghum, the evolution of this percentage for internodes pretreated with NaOH at 26°C was slower than the others. For miscanthus, there were two different kinetics according the pretreatment temperature. Those at 55°C were faster than those at 26°C.

The percentage of sclerenchyma in Z1 (PercSclZ1) decreased rapidly until 24 h and then decreased slower (Figure 5-6 b). As for PercBluZ2, the kinetics of the decrease of PercSclZ1 was faster at 55°C than at 26°C and was faster with NaOH than with CaO. A large part was degraded in the first 24 hours. The pretreatment with NaOH at 55°C seemed particularly efficient on sorghum.



(a)



(b)

Figure 5-6: Evolution of PercBluZ2 (a) and PercSclZ1 (b) from 0 to 144h of alkaline pretreatments

The aforementioned observations were confirmed by ANOVA analysis (Table 5-5). In fact, the pretreatment temperature had the highest impact on the evolution of PercBluZ2 (F-value = 2207). The reagent had an impact 10 times lower than the temperature (F-value = 298). The pretreatment duration had also an impact (F-value = 462) but after 24h, this percentage evolved a little. Therefore, the main effects of the pretreatment took place in the first day. The impact of the biomass on the evolution of PercBluZ2 variables was the lowest (F-value = 37). Its interaction with the reagent or the temperature had low impacts. However, its interaction with temperature and reagent had a consequent impact (F-value = 154). Soda is more efficient and a high temperature seemed to accelerate the reaction and seemed to be more efficient on sorghum.

Concerning PercSclZ1, the impact of the different parameters was lower than for PercBluZ2. The temperature was again the parameter with the highest impact (F-value=494), followed by the reagent (F-value=181). The duration and biomass had lower impacts (F-value = 34 and 5, respectively). However the interaction between the reagent and the biomass was significant (F-value=111). The other interactions were quite low (Table 5-5).

Table 5-5: Linear modelling analysis and coefficient of variation (CV)

Variable Source of variation	PercBluZ2		PercSclZ1	
	DF	F	DF	F
Biomass	1	37*	1	5*
Reagent	1	298*	1	181*
Temperature	1	2207*	1	494*
Duration	22	462*	22	34*
Reagent×Biomass	1	6*	1	111*
Temperature×Biomass	1	2	1	8*
Reagent×Temperature×Biomass	2	154*	2	6*
Duration×Reagent×Temperature×Biomass	107	37*	107	3*
CV		5.1		12.2

*Significant at the 0.05 probability level

The Figure 5-7 presents the results of the PCA which study the dependence between the biochemical composition of raw and pretreated internodes and their methane production, first order kinetics constant and their imaging analysis results. It reflects that the first two PC accounted for 88.7% of the total variability.

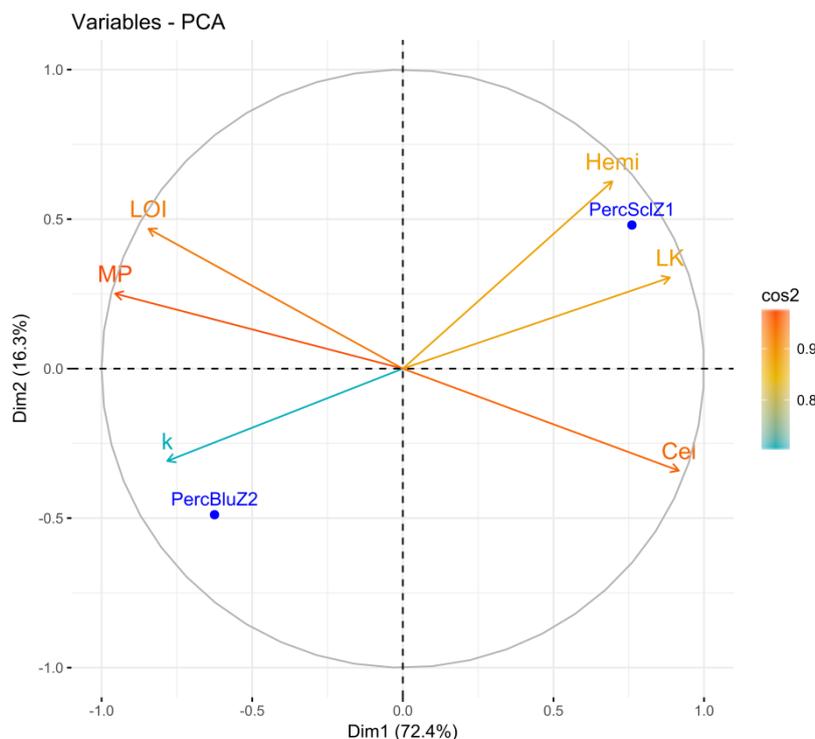


Figure 5-7 : Principal component analysis (PCA) plot of variables that are relative to the methane potential (MP), the first order kinetics constant (k) and the biochemical composition (Cel, Hemi and LK) according to the first and the second principal components (PC).PercScZ1 and PercBluZ2 were considered as additional variables

The first PC accounted for 72.4% of the variation in the correlation matrix. The methane potential (MP) was anti-correlated to the cellulose and the Klason lignin content. The first order kinetics constant was anti-correlated to the hemicelluloses content. The analysis of the biochemical composition was done only on the solids matter. Consequently, MP and k were anti-correlated to the hemicelluloses and cellulose contents which remained in the matter after the pretreatment so correlated to its solubilisation. Moreover, MP and k particularly were anti-correlated with the Klason lignin content. The second PC accounted for 16.3% of the variability. The MP and the LOI were correlated. The decrease of the cellulose crystallinity improves its accessibility. The parameter PercScZ1 of the image analysis was correlated with the hemicelluloses and the Klason lignin contents. The decrease of the sclerenchyma in Z1 induced the solubilisation of the hemicelluloses by the degradation of the lignin. (Boon et al., 2008) showed that the differences in digestibility between internodes and the differences between maize cultivars are associated with differences in relative abundance of VB and sclerenchyma, in cell wall thickness, cell wall content and cell wall composition. The sclerenchyma is a key tissue due to its supporting and protecting roles. In the case of the corn stover, the sclerenchyma represents around 70% of the mass fractions (Sun et al., 2013). Consequently the variable PercScZ1 is very informative. Moreover, the ANOVA results showed that the temperature and then the reagent had highest impacts but these impacts were

lower than for PercBluZ2. It could be due to the fact that Z1 is more lignified and richer in sclerenchyma than Z2. PercBluZ2 was correlated with the methane production kinetics. The cellulose became accessible to the staining (because it was desembedded from the lignin which was removed by alkaline reagents) and its crystallinity was decreased. Consequently, more cellulose was bioaccessible and this accessibility was getting faster.

FASGA is a very convenient staining allowing lignin and holocellulose visualization in a single step. However, because FASGA is not highly specific of lignin and cellulose, other complementary histochemical stainings have been used to better understand the alkaline pretreatment mechanisms on tissue.

These stainings were applied on internodes pretreated at 55°C for 24h (in order to compare two contrasted samples: raw and pretreated).

5.4.2.3 Histochemical characterization of lignins in different tissues and influence of pretreatments on their location

The Figure 5-8 illustrates lignin localization (in red after phloroglucinol staining) on raw and pretreated sorghum and miscanthus internode sections.

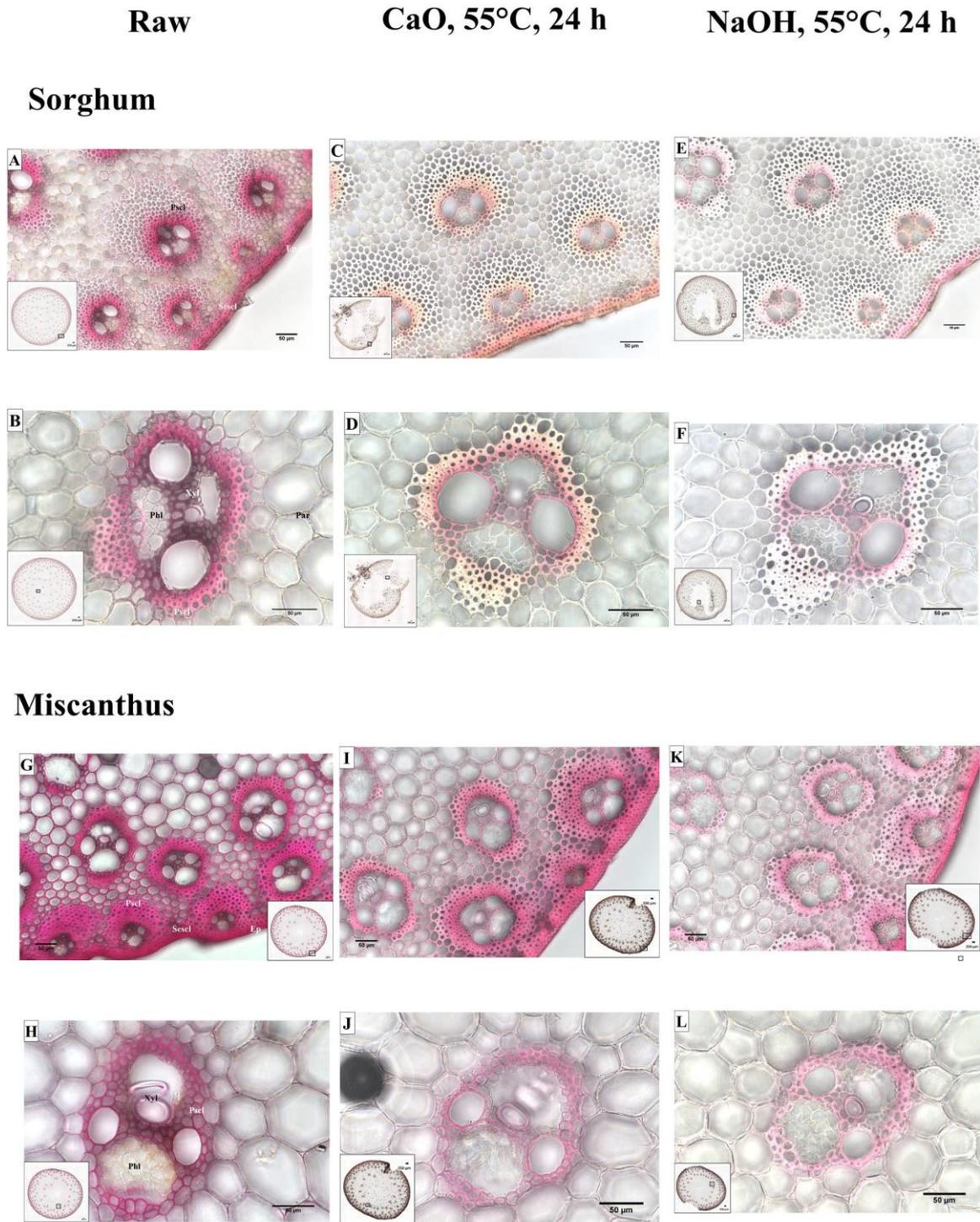


Figure 5-8 : Comparison between untreated sorghum or miscanthus internode section after the alkaline pretreatments during 24h at 55°C stained with phloroglucinol. The first column corresponds to raw sorghum, the second one to pretreated sorghum with CaO at 55°C for 24h and the third to sorghum pretreated with NaOH at 55°C for 24h. Ep = épiderme, Sescf= subépidermal sclerenchyma, Pscf= périsvascular parenchyma, Xyl= xylem, Phl=Phloem, Par= parenchyma

The results obtained confirmed the localization of the lignin observed with FASGA on raw sorghum and miscanthus.

In Z1, the epidermis, the subepidermal and perivascular sclerenchyma were entirely red reflecting they high lignin cell wall content. (Figure 5-8 A, B, G, H). The sclerenchyma around the VB located in Z1 (Figure 5-8 A, C, E) is thicker that the perivascular sclerenchyma of the vascular bundles located in the inner internode zone (Z2, Figure 5-8 B, D, F). In this zone, nothing is lignified in the parenchyma, it was entirely holocellulosic. Inside the vascular bundles, as expected, the xylem was highly stained in red by contrast with phloem known to have cellulosic cell walls (Figure 5-8 B, D, F). Moreover, miscanthus seems to be more lignified than sorghum (Figure 5-8 A compare to Figure 5-8 G).

After pretreatments, there was a sharp decrease in the intensity of the red color in all lignified tissues excepted epidermis, for both miscanthus and sorghum (Figure 5-8 C,F compared to Figure 5-8 A,B and Figure 5-8 I-L to Figure 5-8 G,H). This reflects a possible attack of lignin by alkaline solutions which seems lower in miscanthus for treatment with CaO than with NaOH (Figure 5-8 C, D, I, J and 5-8 E, F, K, L). This suggests that degradation of lignified cell walls is more effective after NaOH pretreatment than after CaO pretreatment.

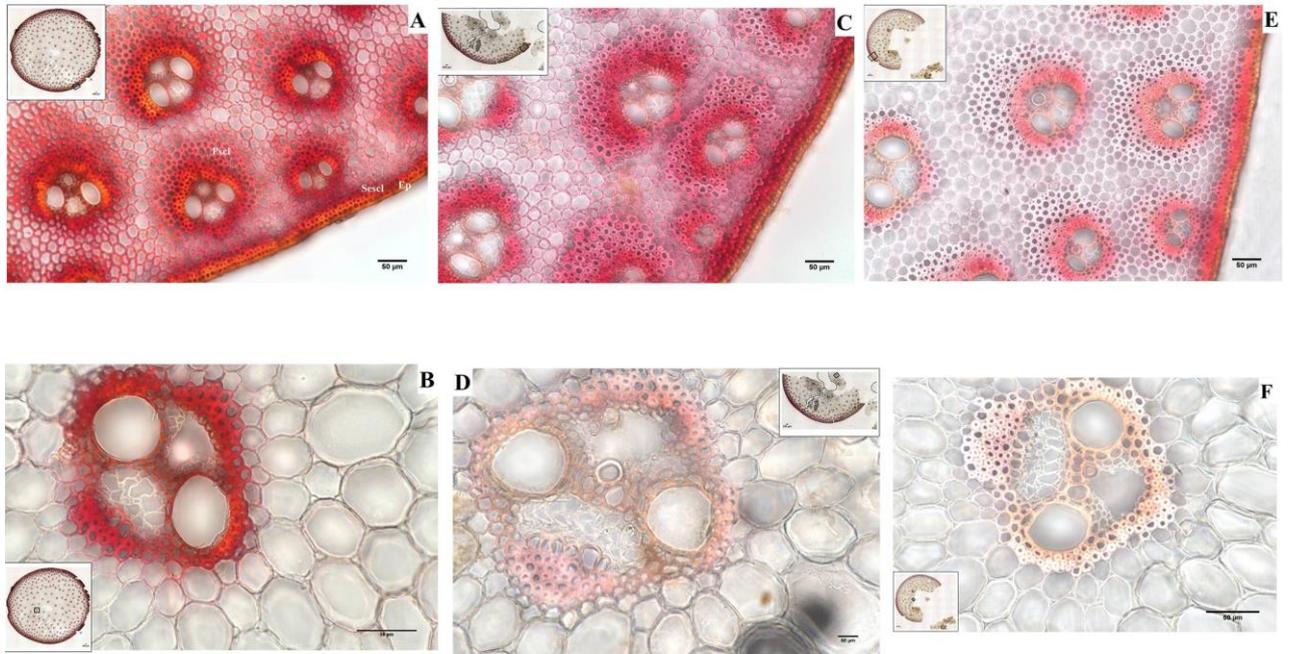
As with phloroglucinol staining, a strong coloration of Maule reagent which stains the G-type lignins in orange-brown and the S-type lignins in red was present in Z1 at the level of the epidermis, the subepidermal and the perivascular sclerenchyma (Figure 5-9 A,G).

Raw

CaO, 55°C, 24h

NaOH, 55°C, 24h

Sorghum



Miscanthus

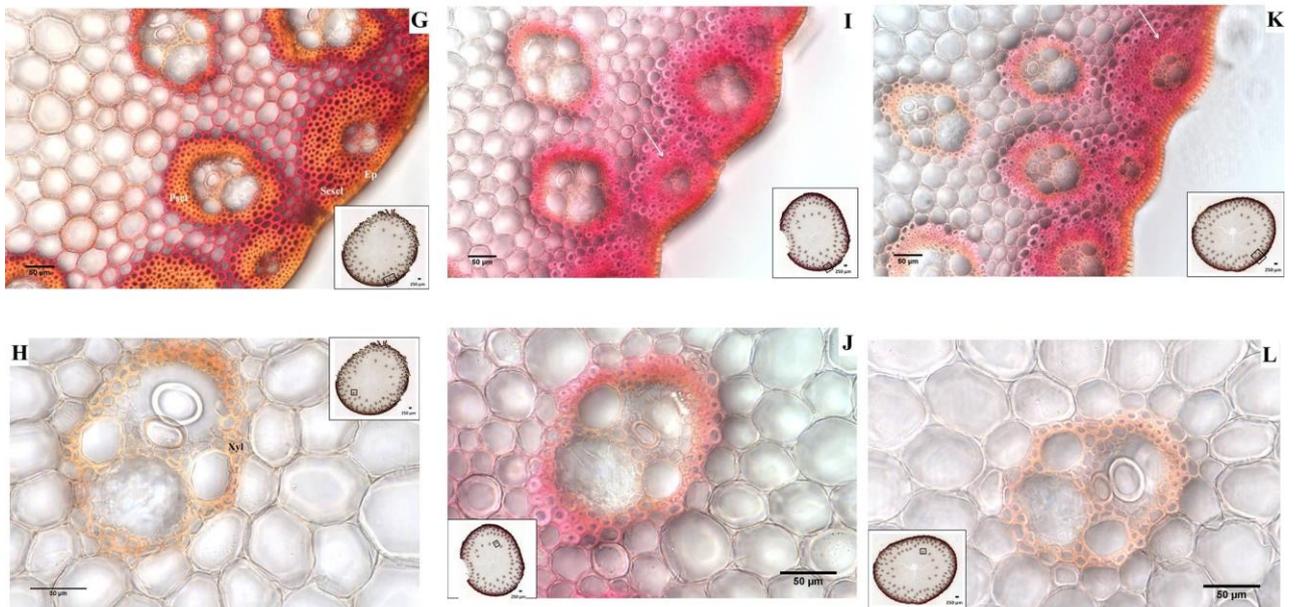


Figure 5-9 : Comparison between untreated sorghum or miscanthus internode section after the alkaline pretreatments during 24h at 55°C stained with Mäule reagent. Ep = épiderme, Sescl= subépidermal sclerenchyme, Psc1= périvasculaire parenchyme, Xyl= xyleme

These colorations were also in Z2 located in VB (Figure 5-9 B, H). However, the staining was different for the two biomasses. In fact, mainly in the epidermis, perivascular sclerenchyma in Z1 of miscanthus internode and in Z2 VB, the staining was more orange brown than red. Miscanthus is richer in lignins G than sorghum and contains more lignins G than lignins S. Villaverde et al. (2009) found that *M. x giganteus* showed a low S/G ratio (0.7). At tissue scale, the composition of the lignin was different according the biomass and its location.

After alkaline pretreatment, the staining was modified. The epidermis, xylem and perivascular parenchyma of the VB located in the inner stem zone (Z2) of Miscanthus stem remains brown (Figure 5-9 I to L) and for sorghum after pretreatment only the G lignin types remains in the inner VB of the Z2 (Figure 5-9 D, F). However in Z1, in the perivascular sclerenchyma of sorghum and miscanthus, the orange brown staining disappeared and so the red staining was more present (Figure 5-9 C, E, I, K). It seems that some lignins G had been degraded by alkaline solution. This preferential degradation and the fact that more lignin was degraded in miscanthus could explain the miscanthus BMP improvement. So the association of the study of the biochemical composition and the structure is novel and very useful. Moreover, Li et al. (2014) studied NaOH effects on three standard pairs of Miscanthus accessions that showed three distinct monolignol (G, S, H) compositions but with similar biochemical composition. G-rich samples showed more effective extraction of lignin–hemicellulose complexes than the S- and H-rich samples upon NaOH pretreatment (0.5%, 1%, 4%, 8%, w/v, 50 °C for 2 h). Moreover, after an enzymatic hydrolysis, they observed that G-rich biomass samples, rather than the H- or S-rich samples, can be completely hydrolyzed by cellulase enzymes into soluble sugars after the 4% NaOH pretreatment at 50 °C for 2 h. The increased biomass enzymatic digestibility in the G-rich samples was attributed to efficient lignin extraction from the alkali pretreatments, lignin is directly associated with hemicelluloses that form cell wall networks. Comparing internodes pretreated with CaO or NaOH pretreatment, the staining was lower with NaOH. Once again, the pretreatment using NaOH is suggested more efficient to degrade lignified tissues.

If phloroglucinol staining showed a high decrease of lignin in the xylem and in the inner perivascular sclerenchyma cells, the Maüle reagent, showed that the tissues in which the lignin remaining after alkaline treatment is located correspond mainly to lignins-S in Z1 and to lignins-G in Z2. Moreover, these two stainings showed that, after alkaline pretreatments, the epidermis was unaffected. The epidermis is a very specialized tissue rich in lignin but also in suberin and cuticle composed of cutin and waxes (Reina-Pinto and Yephremov, 2009). Suberin is a composite of polymeric phenylpropanoids and ester-linked long chain fatty acids and alcohols, it consists of a hydrophobic layer (Norman and Michael, 1989). Cuticle is a hydrophobic surface layer. Cutin is typically composed of interesterified hydroxyl fatty acids, with lesser amounts of glycerol, phenyl- propanoids, and dicarboxylic acids (Kolattuduky, 2001). Waxes are derived from very-long-chain fatty acids including alkanes, aldehydes, primary and secondary alcohols, ketones, and esters (Yeats and Rose, 2013). Due to these different lipidic components, the epidermis is a barrier against diffusion water loss and microbial invasion (Norman and Michael, 1989). It is so a strong structure that even after anaerobic digestion remained unbroken (cf part 5-5.5).

5.4.3.4 Histochemistry characterization of celluloses and localization of crystalline cellulose ; influence of pretreatments on their location

5.4.3.4.1 Total cellulose : Congo red staining

The Figure 5-10 shows the location of cellulose in internodes thanks to the Congo red staining.

The Congo red staining on raw biomasses highlighted the fact that highly lignified tissues such as the epidermis, the subepidermal sclerenchyma and the perivascular sclerenchyma are not stained in red (Figure 5-10 A, G). In those tissues cellulose is probably masked by lignin. Only phloem and parenchyma cells of the Z2 (Figure 5-10 B, H) and Z1 known to have cellulosic or poorly lignified cell walls are stained in red by Congo red.

After alkaline pretreatments, there was a strong increase in Congo red staining affecting all tissues except the epidermis, the subepidermal sclerenchyma and part of the perivascular sclerenchyma surrounding the vascular bundles located inside the Z1 (Figure 5-10 C, E, I, K). The increase in the intensity of the Congo red staining, which marks the cellulose after alkaline pretreatment, is related to the degradation of the lignins, which would thus allow unmasking of the cellulose. In VB in Z2, metaxylem became slightly red. It could suggest that metaxylem was a mixture of lignin and cellulose. The intensity of the staining was different between the two pretreatments. The staining was more intense for NaOH than for CaO.

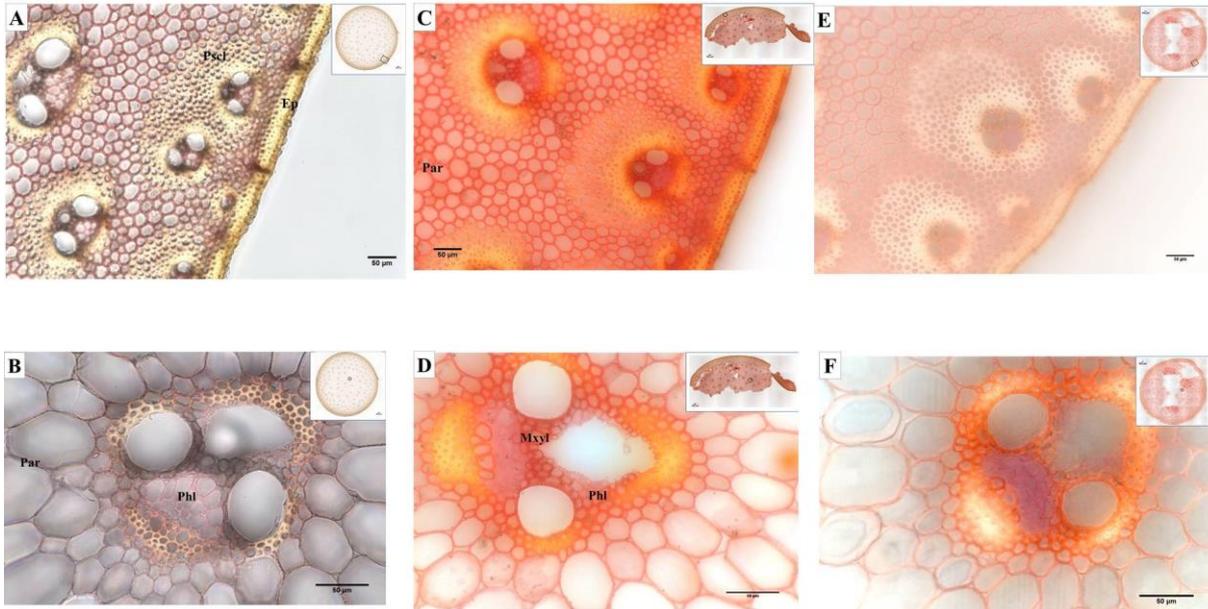
These results are consistent with those obtained with FASGA staining and with the fact that alkaline treatments attack lignin (a decrease in the intensity of phloroglucinol staining) of certain tissues such as the xylem and more the sclerenchyma around the vascular bundles located inside Z2 than in Z1 (Figure 5-4 and 5-10). Li et al. (2018) divided sorghum stems in different fractions separating the pith from epidermis and outer rind and from VB and inner rind. The fractions isolated from the pith parenchyma were the least recalcitrant to mild alkaline pretreatments, epidermis and the outer rind were the most. Because of the miscanthus was more lignified, the unmasking of the cellulose was more substantial.

Raw

CaO, 55°C, 24 h

NaOH, 55°C, 24 h

Sorghum



Miscanthus

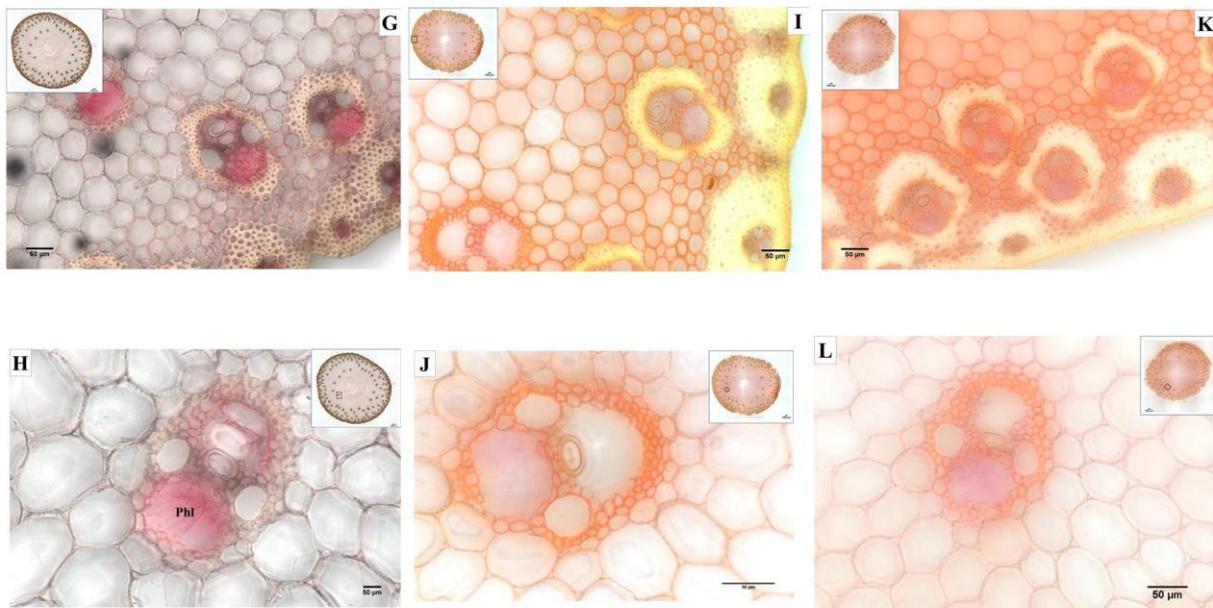


Figure 5-10: Comparison between untreated sorghum and miscanthus internode section next to the alkaline pretreatments during 24h at 55°C stained with Congo Red. Ep = épiderme, Sescl= subepidermal sclerenchyma, Pscl= périvasculaire parenchyma, Mxyl= metaxylem, Phi= Phloem

5.4.3.4.2: Mapping of crystalline cellulose : use of immunolocation with CBM

On the Figure 5-11, the crystallinity of the cellulose is represented by the orange fluorescence signal. On raw internodes, in accordance with what was expected, the signal is strongly localized in the cell walls of the parenchyma of the inner zone and in those of the Z1 zone. It is absent from the conductive bundles except in the phloem. When present, the signal which represents cellulose in crystalline form is arranged homogeneously and regularly along the walls (Figure 5-11, A, B, G and H). After alkaline pretreatment of sorghum and miscanthus tissues, a significant drop in fluorescence intensity occurred and this signal, when present, is no longer homogeneously distributed but is in the form of irregular clusters concentrated in certain areas of the cellulosic cell walls (Figure 5-11, C-F, I-L). In Z2, the cell wall of parenchyma cells was thin and the fluorescence was homogeneous (Figure 5-11).

As shown with Congo red staining (Figure 5-10) alkaline pretreatment reduced the crystallinity of the cellulose and thus slackened the cellulose fibers. The evolution of the location of the fluorescence implied an evolution of the biomass tissue's structure. The pretreatments reduced the crystallinity of the cellulose. The cellulose became more amorphous and thus more biodegradable. In the literature, the crystallinity of the cellulose was often measured or evaluated. Alkaline pretreatments were well known to decrease it (Li et al., 2016).

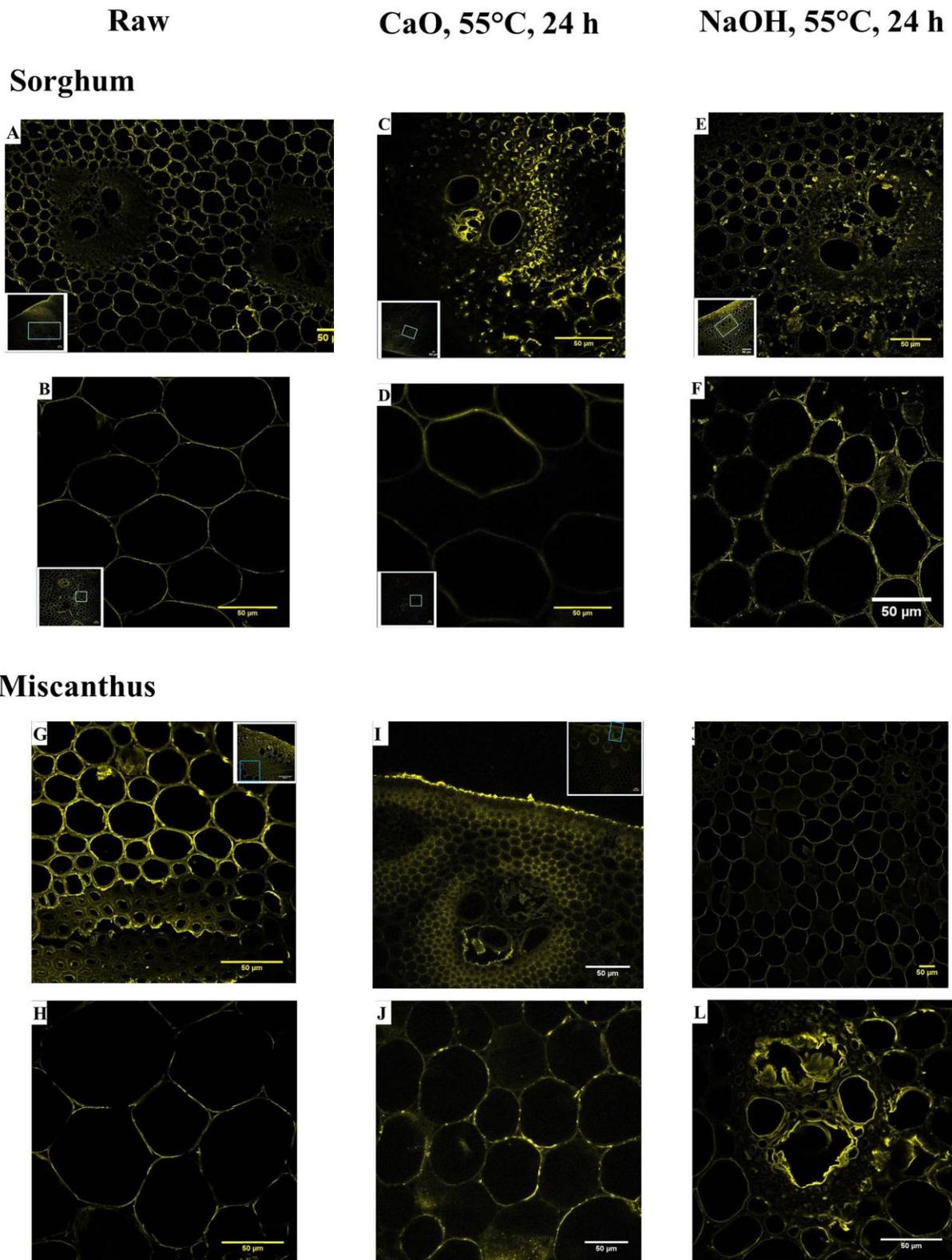


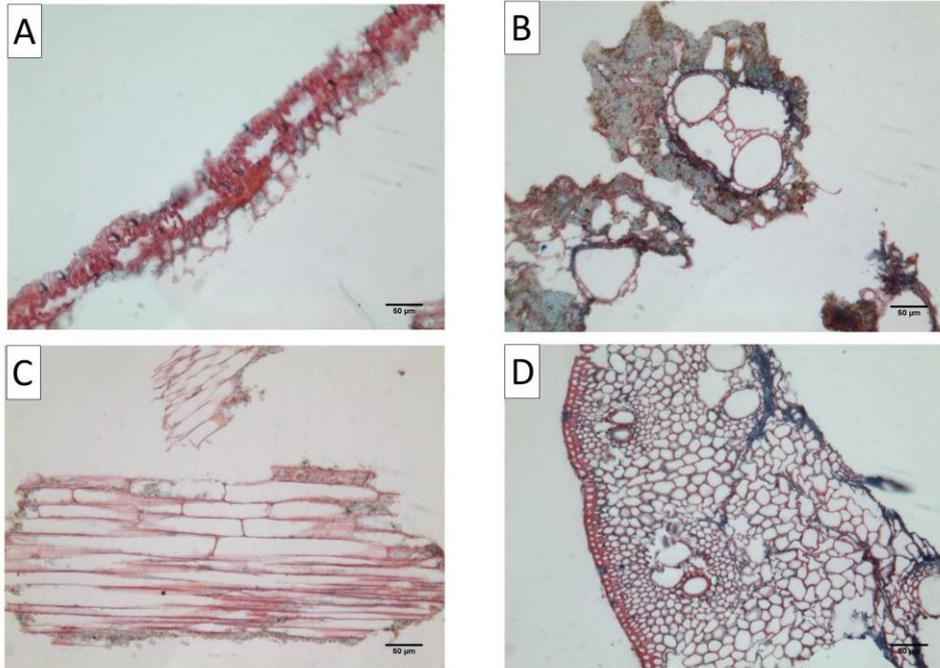
Figure 5-11: Comparison between untreated sorghum and miscanthus internode section after the alkaline pretreatments during 24h at 55°C with CBM. The first columns corresponds to raw sorghum, the second one to pretreated sorghum with CaO at 55°C for 24h and the third to sorghum pretreated with NaOH at 55°C for 24h.

5.5 Coloration au FASGA de fragments de sorgho bruts ou pré-traités et digérés

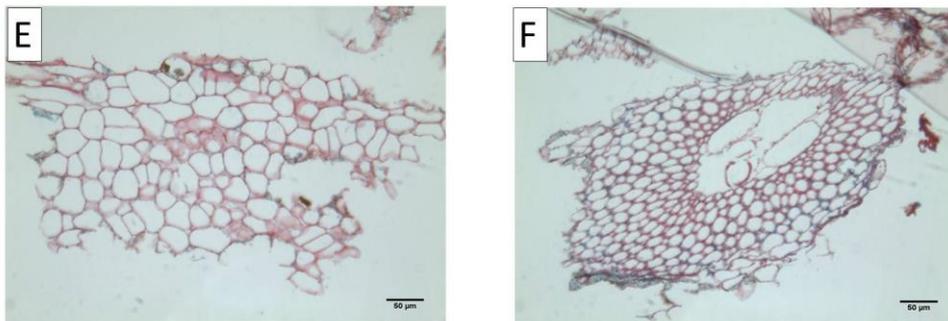
Après pré-traitement et digestion anaérobie, quelques fragments de sorgho ont été récupérés, lavés puis colorés au FASGA et observés (Figure 5-12).

Les fragments digérés bruts ou pré-traités sont tous colorés en rouge à l'exception d'un fragment brut et pré-traité à la chaux. Les petits points noirs autour des faisceaux conducteurs de la Figure 5-12 B correspondent à des granules de boues. Il ne reste donc quasiment que de la biomasse lignifiée après digestion quasiment toute la partie holocellulosiques de la biomasse a été dégradées pendant la DA. L'épiderme est lui resté intacte (Figure 5-12 A). Cette observation est en accord avec celle de Motte et al. (2015) sur de la paille après digestion de la paille en DA voie sèche. Il semblerait que la soude soit plus favorable pour rendre la totalité de la matière holocellulosiques bioaccessibles.

Brut



NaOH



CaO

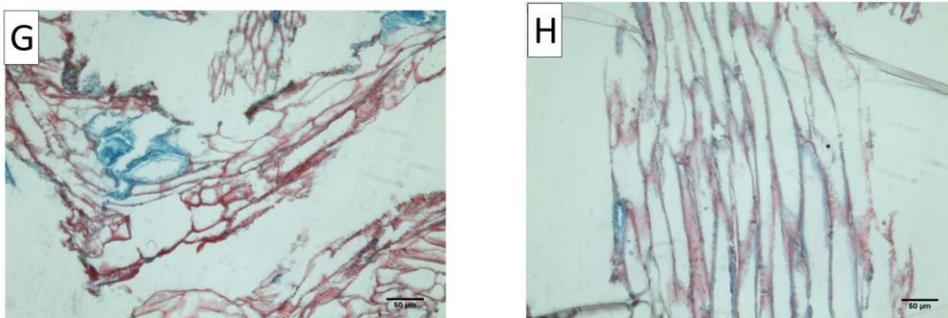


Figure 5-12: Comparaison du sorgho brut et du sorgho prétraité broyé à 1mm récupéré dans des fioles BMP après digestion anaérobie, coloré au FASGA

5.6 Conclusion du Chapitre 5

Au niveau du sclérenchyme un lien peut être fait entre les différentes fractions. Sur les clichés broyés à 1mm, au niveau des coupes transversales de sclérenchyme, après prétraitements aux parois rouges était juxtaposée une coloration bleue en cercle en interne. Sur les coupes de 110 µm le sclérenchyme était partiellement dégradé. Au sein du sclérenchyme même si la lignine est restée présente, elle a été cependant affectée par le pré-traitement puisque les holocelluloses ont pu devenir accessibles à la coloration. Il peut en être déduit que la bioaccessibilité de ces parois sera augmentée. Cependant seule l'étude portant sur les sections transversales d'entre-nœuds a été concluante. Le sorgho et le miscanthus sont deux biomasses lignocellulosiques avec quelques différences anatomiques et histologiques. Dans les deux cas, le prétraitement a dégradé la lignine en fonction de sa localisation et des unités. L'épiderme n'a pas été affecté alors que le sclérenchyme sous-épidermique et périvasculaire ont été plus ou moins dégradés. En effet, la cutine présente sur l'épiderme est une des molécules les plus difficiles à attaquer. Ces dégradations ont conduit à un dégagement de la cellulose et à une diminution de sa cristallinité. La différence entre les deux biomasses et principalement la teneur plus élevée en lignine G dans le miscanthus a conduit à des impacts différents sur le potentiel méthane et la cinétique de production. Le lien réalisé pour la première fois entre la biochimie et l'histologie a donc montré que les impacts du prétraitement sont différents selon le tissu et sa composition (en plus de l'être en fonction du réactif).

Chapitre 6 : Discussion générale

Ce chapitre a pour but de discuter des résultats obtenus dans les 3 chapitres précédents entre eux ainsi qu'avec la littérature. Différents points seront abordés. Tout d'abord, la totalité des résultats des chapitres 3 et 5 (pré-traitements et histologie) ainsi que les résultats de la solubilisation de la matière seront analysés statistiquement. L'impact du réactif et enfin celui de la biomasse seront discutés. Finalement les performances des prétraitements obtenues en codigestion avec le fumier réacteurs seront comparées avec celles des BMP.

6.1 Statistiques avec les données des chapitres prétraitements et histologie et en prenant en compte la solubilisation de la matière

Dans le but d'analyser les données décrites par plusieurs ensembles de variables structurées en groupe, des Analyses Factorielle Multiple (AFM) ont été réalisées afin de pouvoir visualiser à la fois les variables qualitatives et quantitatives. Les différents groupes choisis sont : les conditions de pré-traitements (réactif, granulométrie, température, biomasse, concentration et teneur en MS), méthane (BMP et k) et composition (cellulose, hémicelluloses, lignine Klason, LOI et solubles évalués par diminution de la masse des solides). Toutes les conditions de pré-traitements étudiées n'ont pu être prises en compte en raison de certaines données manquantes (principalement solubilisation de la matière ou LOI).

6.1.1 Analyse globale de l'ensemble des résultats sur les 2 biomasses

Cette analyse regroupe les données des chapitres 3 et 5, inclut les résultats de solubilisation de la matière et considère la biomasse comme un facteur en plus de ceux déjà considérés auparavant (conditions de pré-traitements).

Les deux premières dimensions de l'AFM comptent pour 73.3% de la variabilité. La dimension 1 permet d'expliquer 58.3% de la variabilité (Figure 6-1).

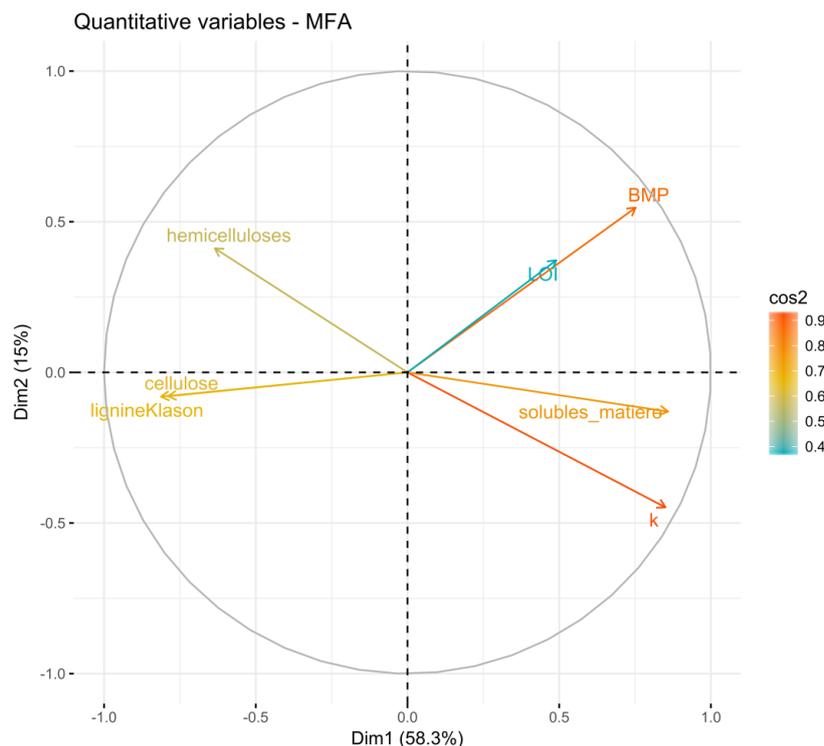


Figure 6-1 : Analyse Factorielle Multivariée des données des deux biomasses compilées selon les deux premières dimensions

Ce sont les paramètres liés à la production de méthane qui contribuent le plus à cette variabilité (Figure 6-2 a). La constante de premier ordre est la variable qui l'explique le plus (28.1%) suivie du BMP (22%). Ces deux variables ne sont pas corrélées entre elles. Le BMP est à relier avec la solubilisation de la lignine et de la cellulose (12.4 et 11.6 et %), la

cinétique avec celle des hémicelluloses 7.6%). Ces dégradations et solubilisations sont finalement résumées par les matières solubles qui contribuent à 14%. Cette dernière variable représente la solubilisation des hémicelluloses et de la cellulose et les composés solubles sont directement disponibles pour la production de méthane et vont favoriser des cinétiques rapides. Les hémicelluloses représentent la fraction de la paroi la plus accessible pour les micro-organismes et la plus facilement solubilisée par les traitements alcalins et rendue accessible en partie également par la dégradation de la lignine Klason.

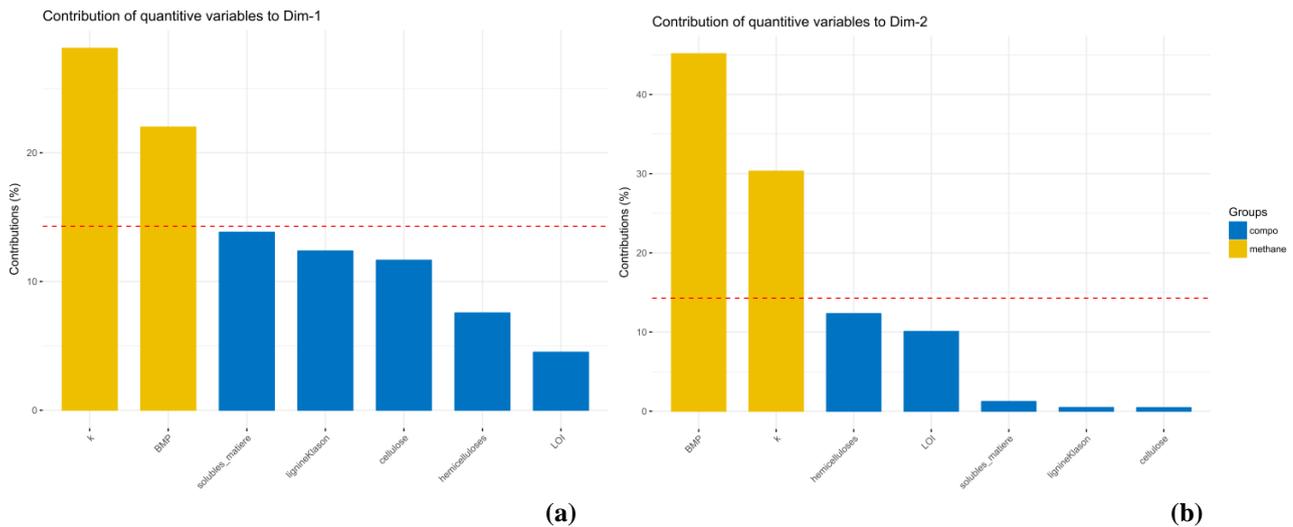


Figure 6-2 Contributions des différentes variables quantitatives à la variabilité de la dimension 1 (a) et 2 (b) de l'AFM. La ligne en pointillé rouge indique la valeur moyenne attendue, si les contributions étaient uniformes.

La variabilité sur la deuxième dimension est également expliquée par le groupe méthane et en particulier par le BMP à 45.1% (Figure 6-2b). La cinétique permet d'expliquer 31% de la variabilité de cette dimension. Selon cette dernière, elle est corrélée à la solubilisation de la matière. Selon cette même dimension, les teneurs en cellulose et en lignine sont fortement corrélées. Cela illustre, les observations du chapitre 5. La coloration FASGA a mis en évidence la désincrustation de la cellulose. La qualité de la représentation du LOI et de la lignine étant faible ($\cos^2 < 0.7$, Figure 6-1) aucune conclusion ne peut être émise sur ces paramètres qui sont généralement mis en avant pour leur rôle dans la bioaccessibilité de la matière.

La Figure 6-3 représente, selon les deux premières dimensions de l'AFM, la répartition des individus (c'est-à-dire les échantillons bruts et pré-traités utilisés dans l'analyse). Seuls les échantillons de miscanthus brut, broyé à 1 mm (M_1) et coupé transversalement à 2 mm (M_2c) d'une part, et d'autre part les échantillons de miscanthus coupés transversalement pré-traités à la soude et à la chaux à 55°C à faible teneur en MS, se démarquent des autres ainsi que, dans une moindre mesure, ceux de sorgho pré-traitements de la même manière. Le miscanthus brut étant très lignifié il est n'est pas surprenant qu'il se démarque de tous les autres individus. Le sorgho brut étant peu lignifié, il n'est pas surprenant

qu'il soit au sein des échantillons pré-traités. Les échantillons coupés transversalement sont démarqués des autres (granulo-2) et principalement ceux de miscanthus.

Cela reflète à la fois l'impact de la biomasse mais aussi de sa granulométrie et de son broyage (cf partie 6.3.2). Au sein du groupe, les individus sont distingués selon la première dimension par la biomasse (M ou S), le réactif (NaOH (reactif_1) ou CaO (reactif_2)) et les concentrations 10 d'une part et 5 et 12.5 d'autre part sont différenciées. Selon la deuxième dimension, la température (temperature_55 ou _25).

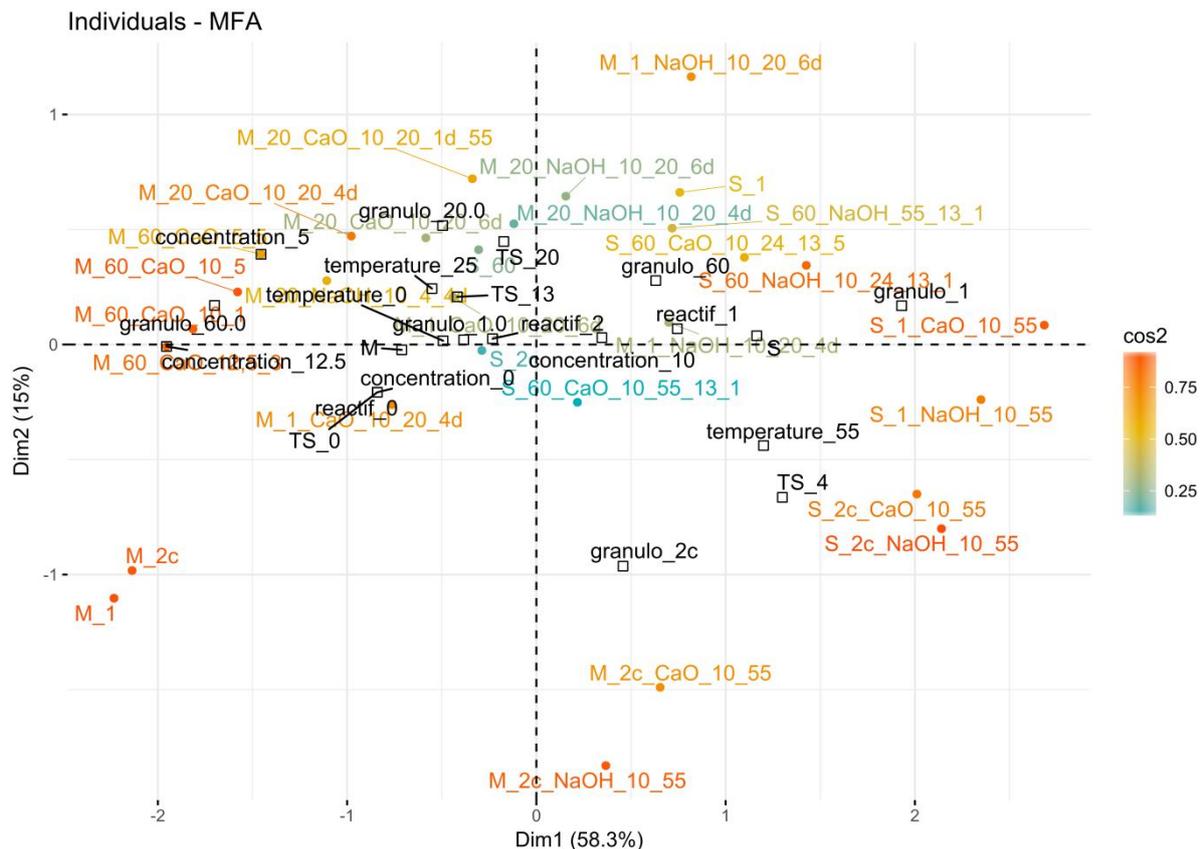


Figure 6-3 : Carte des individus (en couleur selon cos2) et des variables qualitatives (en noir : température, concentration granulométrie (granulo) réactif (1=NaOH, 2=CaO), teneur en matière sèche (TS) et la biomasse (S pour sorgho et M pour Miscanthus)

L'effet biomasse est l'un des plus importants. Dans les deux sous-parties suivantes, les AFM auront été réalisées pour chacune des biomasses afin de voir la répartition des variables quantitatives et qualitatives pour chacune.

6.1.2 Analyse globale de l'ensemble des résultats du sorgho

Les deux premières dimensions de l'AFM comptent pour 72.6% de la variabilité (Figure 6-4).

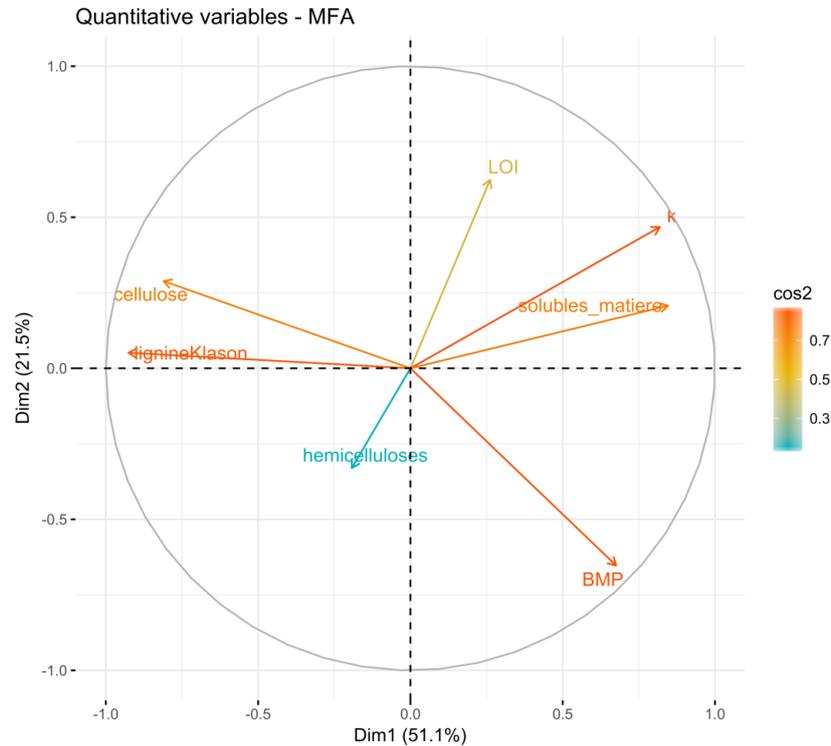


Figure 6-4 : Analyse Factorielle Multivariée des données du sorgho selon les deux premières dimensions

La dimension 1 permet d'expliquer 51.1% de la variabilité. Cette variabilité est principalement expliquée par le groupe de variable « méthane » et par la teneur en lignine de la matière solide après pré-traitement. Ces variables expliquent la variabilité de cette dimension à 29.8% pour la cinétique, 20.3% pour le BMP et à 18.3% pour la lignine Klason (Figure 6-5 a). La cinétique est très fortement corrélée à la solubilisation de la matière. Le BMP ne leur est pas corrélé. Cela illustre bien les observations faites dans le chapitre 3. Les pré-traitements ne permettent qu'une amélioration de la cinétique de la production de méthane du sorgho en accélérant la solubilisation de la matière par une dégradation importante de la lignine mais pas une augmentation du potentiel méthane car la matière biodégradable du sorgho est déjà accessible. La dimension 2 permet d'expliquer 21.5% de la variabilité qui est elle-même également expliquée par le groupe de variable « méthane » (à 45% par le BMP et à 23.1% par la cinétique, Figure 6-5b) et par le LOI (19.8%). La diminution de la cristallinité de la cellulose contribue à l'amélioration de la cinétique. Ces résultats montrent une fois de plus que le sorgho B 140 est peu lignifié que et que son potentiel méthane est déjà maximal à l'état brut.

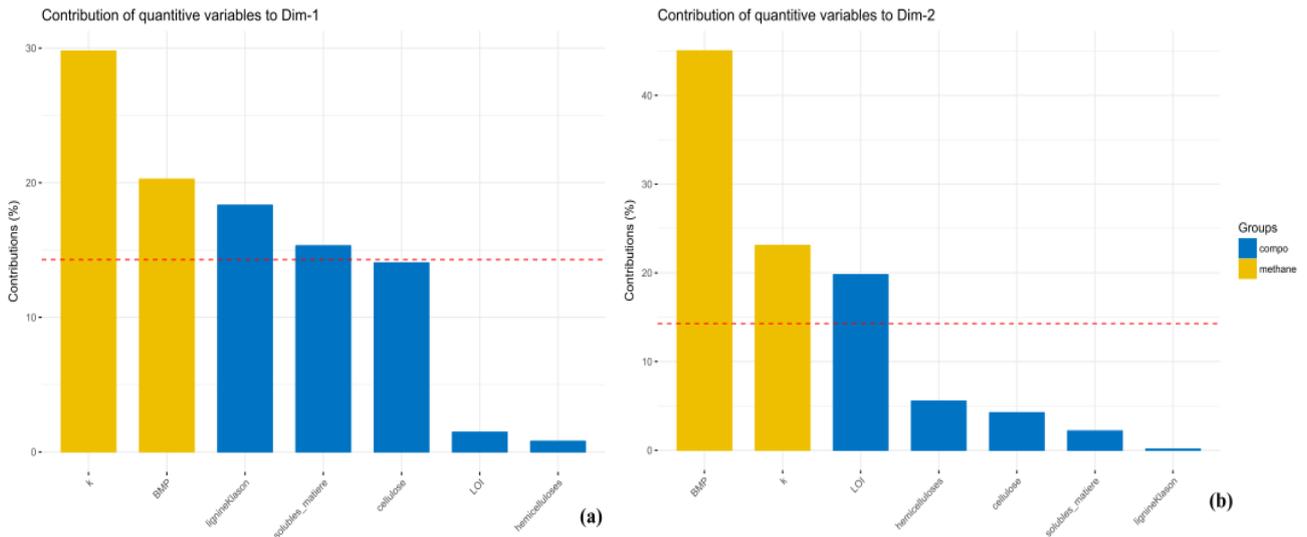


Figure 6-5: Contributions des différentes variables quantitatives aux dimensions 1 (a) et 2 (b) de l'AFM du sorgho. La ligne en pointillé rouge indique la valeur moyenne attendue, si les contributions étaient uniformes.

Au sein des individus, seuls les échantillons non pré-traités semblent se démarquer (Figure 6-6). En effet, les variables qualitatives TS_0, reactif_0 et temperature_0 sont réunies en un seul point distinct du reste de la représentation. Cependant, les sorghos bruts (S_1, S_2 et S_60) sont séparés par leur granulométrie selon la première dimension (granulo_60 et granulo_2 d'un côté et granulo_1 de l'autre). Les teneurs en matière sèche sont également séparées selon cette même dimension. Les réactifs sont séparés selon la deuxième dimension tout comme la température.

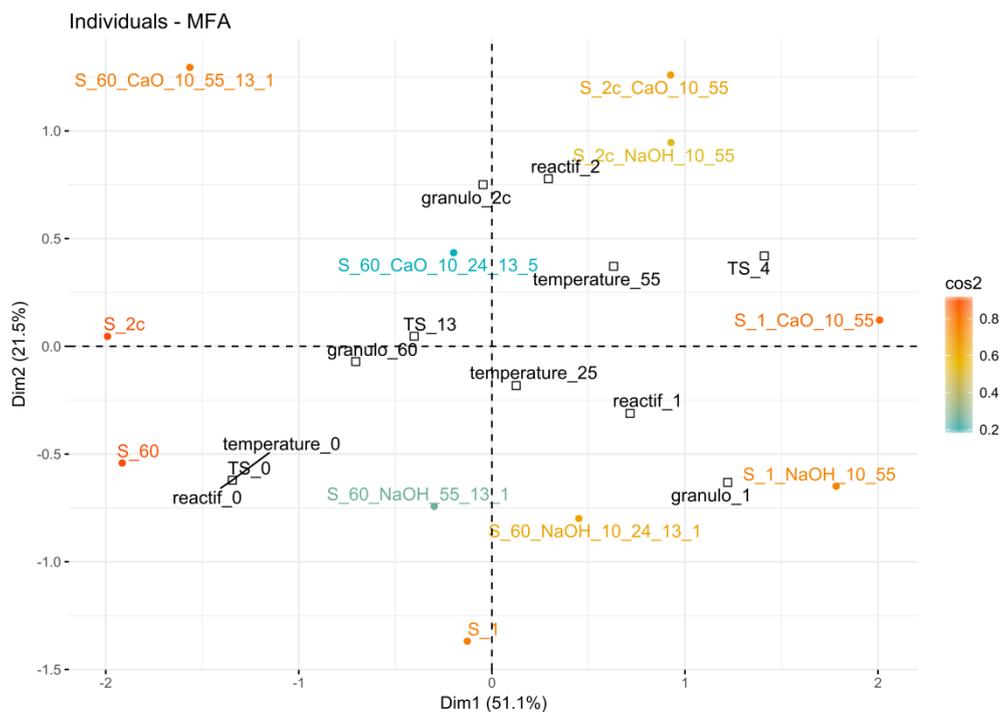


Figure 6-6 : Carte des individus et des variables qualitatives (température, granulométrie (granulo) réactif (1=NaOH,2=CaO), teneur en matière sèche (TS)) correspondant à l'AFM du sorgho

6.1.3 Analyse globale de l'ensemble des résultats du miscanthus

Les deux premières dimensions de l'AFM comptent pour 68.2% de la variabilité (Figure 6-7).

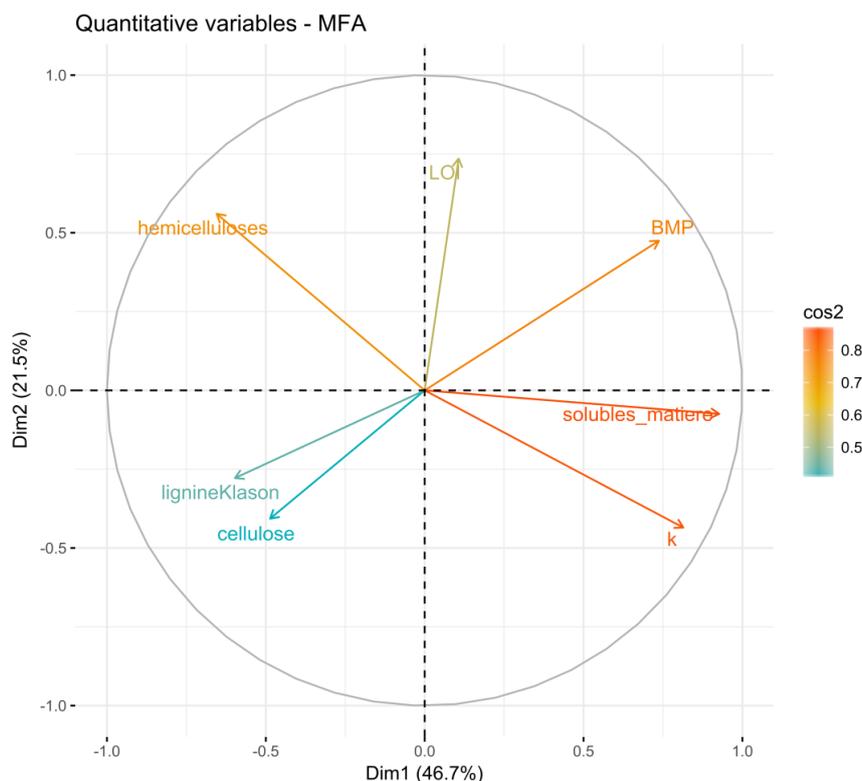


Figure 6-7 : Analyse Factorielle Multivariée des données du miscanthus selon les deux premières dimensions

La dimension 1 permet d'expliquer 46.7% de la variabilité. Cette variabilité est principalement expliquée par le groupe méthane (27.8 et 22.8% par k et le BMP, respectivement) et la solubilisation de la matière (22%) principalement des hémicelluloses (11.2%) (Figure 6-8 a). Contrairement au sorgho, en plus de la cinétique, le BMP est ici corrélé à la solubilisation de la matière. La variabilité de la deuxième dimension est principalement expliquée par le LOI puis le BMP et la teneur en hémicelluloses (30.5, 20.1 et 17.5, respectivement, Figure 6-8b). Les mêmes tendances que précédemment sont retrouvées : anti-corrélation de k avec les hémicelluloses et absence de corrélation avec le LOI et le BMP. La lignine est corrélée ici selon la première dimension avec le BMP alors qu'elle ne l'est pas pour le sorgho. *Miscanthus x giganteus* est un génotype fortement lignifié.

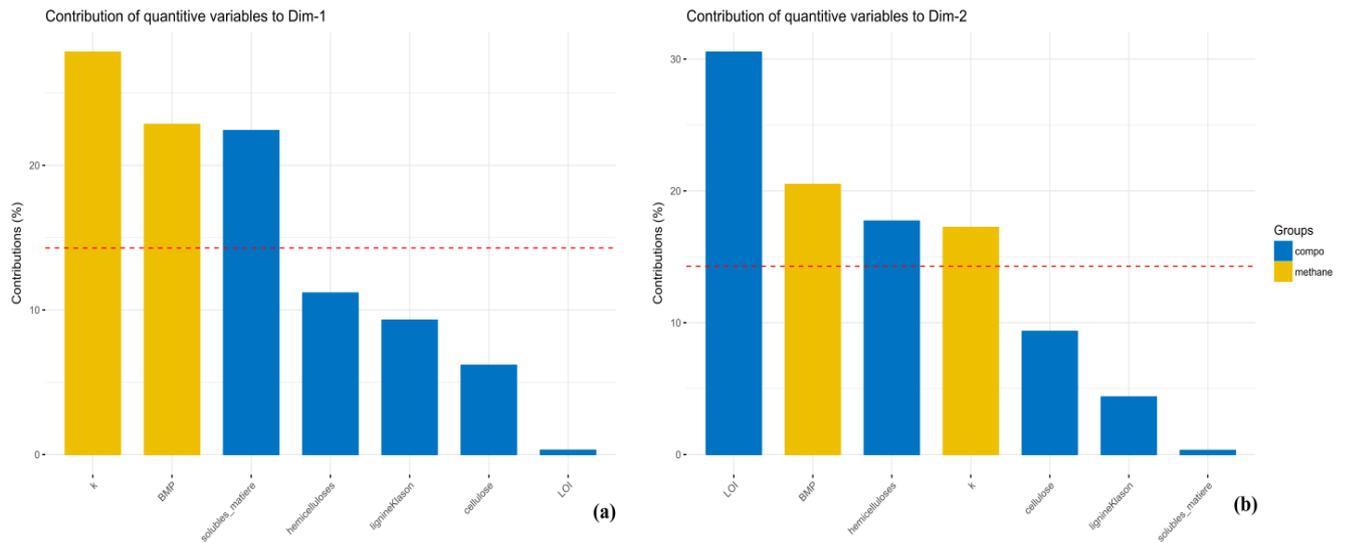


Figure 6-8 : Contributions des différentes variables quantitatives à la variabilité de la dimension 1 (a) et 2 (b) de l'AFM du miscanthus. La ligne en pointillé rouge indique la valeur moyenne attendue, si les contributions étaient uniformes.

Les taux de solubilisation mis en évidence par les taux d'amélioration de la cinétique sont plus élevés que pour le sorgho. Ils permettent de séparer plus précisément les échantillons bruts des non pré-traités (conditions 0, Figure 6-9). Le paramètre réactif (NaOH=reactif_1 ou CaO=reactif_2) se distingue le plus selon la première dimension qui reflète le plus de variabilité. La « dose » de 10% se distingue des deux autres (5 et 12.5) selon cette même dimension. Cela conforte le choix de la dose de pré-traitement utilisée en co-digestion. L'échelle de la granulométrie (60.0, 20.0, 1.0, 2c) semble suivre celle de la teneur en MS (TS_13, 20, 4). Ceci est logique puisque les teneurs en MS ont varié en fonction de la granulométrie comme le miscanthus de plus forte granulométrie absorbait une quantité importante de solution de pré-traitement. Toutefois, comme sur la carte des individus des deux biomasses compilées, la granulométrie 2c se distingue. Le type de broyage/découpe est donc plus important que la taille.

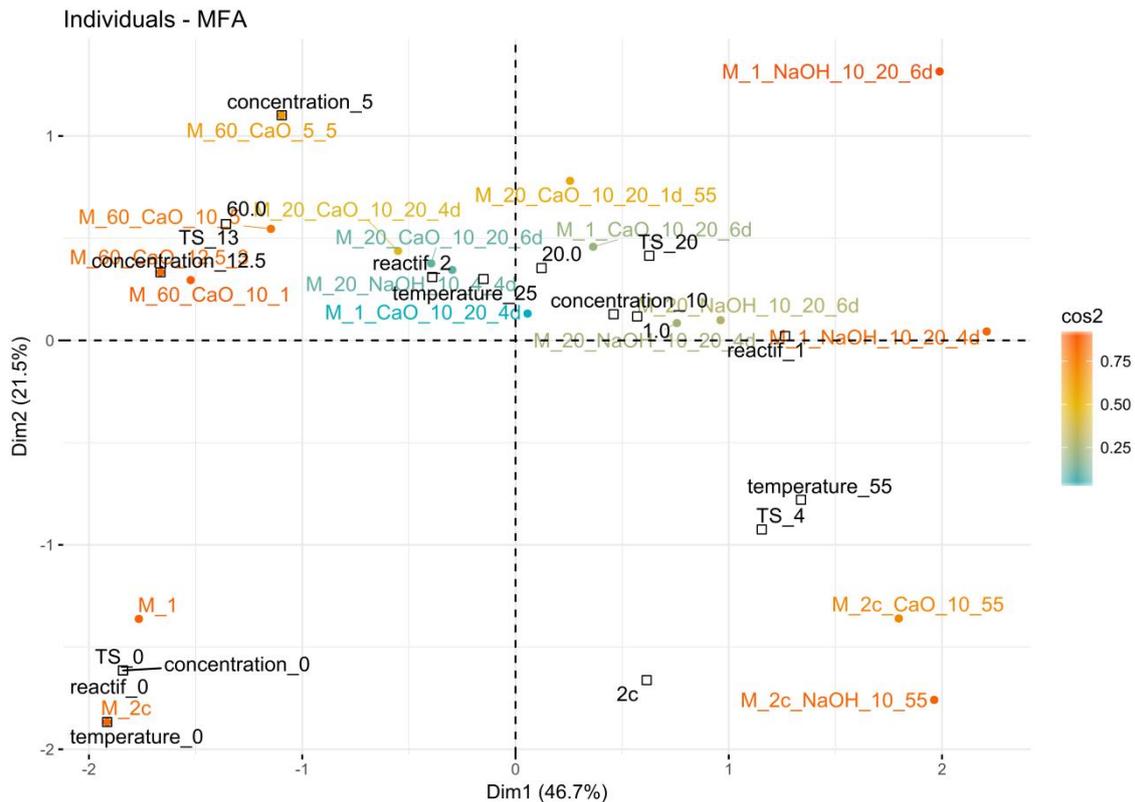


Figure 6-9 : Carte des individus et des variables qualitatives (température, concentration, granulométrie (60.0, 20.0, 1.0, 2c) réactif (1=NaOH,2=CaO), teneur en matière sèche (TS)) correspondant à l'AFM du miscanthus

6.2 Différence d'efficacité/de performances entre NaOH et CaO

6.2.1 La soude et la chaux ont en commun le pouvoir de dégrader la lignine....

La lignine joue un rôle majeur dans l'accessibilité de la lignocellulose. Il est largement reconnu dans la littérature que les réactifs alcalins permettent de la dégrader. Comme montré par les différentes colorations et principalement à l'aide de celle au réactif de Mäule, à l'échelle du tissu, la composition de cette dernière est différente selon la biomasse et son emplacement. Le miscanthus est plus riche en unités G que les unités S. La réponse des biomasses aux prétraitements alcalins n'était donc pas seulement due à la quantité de lignine, mais aussi à son emplacement et à sa composition. Finalement l'agent alcalin n'est pas le seul facteur déterminant. Il semble que la biomasse de par sa structure tissulaire joue un rôle majeur.

6.2.2...mais sont deux agents alcalins différents....

Dans presque toutes les différentes conditions de pré-traitements étudiées lors de ce chapitre, la soude s'est avérée être plus performante que la chaux dans des conditions de pré-traitements identiques. Les analyses histologiques dont notamment les colorations FASGA et phloroglucinol ont conduit aux mêmes observations. Cet aspect est bien connu dans la littérature cependant très peu d'articles abordent les raisons de ces différences. Soares

Rodrigues et al. (2016) se sont intéressés à la différence de molarité qu'il existe entre ces deux agents alcalins. Avec une base molaire équivalente d' OH^- , les hydroxydes de potassium et de sodium avaient une performance supérieure par rapport à l'hydroxyde de calcium dans un environnement à haute teneur en solides (40 %). Cependant, dans un environnement à forte teneur en MS, peut se poser la question de la disponibilité de l'eau et donc de la solubilité de la chaux. En effet celle-ci est assez faible (1.65 g.L^{-1} à 20°C contre 1090 g.L^{-1} pour la soude à cette même température). A faible teneur en matière sèche, cette faible solubilité subsiste mais permet la solubilisation d'une plus grande quantité de chaux en raison d'une plus grande quantité d'eau pour une quantité de biomasse identique. Cependant, une majeure partie des pré-traitements ont été réalisés à forte teneur en matière sèche (13 à 20%) afin de pouvoir s'adapter à des digestions en voie sèche. Un taux de matière sèche de 13% peut sembler faible. En réalité, c'est la valeur minimale nécessaire pour que la solution de pré-traitement puisse être répartie de manière homogène dans les premières minutes de pré-traitement car le miscanthus en particulier possède un fort pouvoir d'adsorption. En effet, il est beaucoup utilisé comme litière et paillage horticole. La biomasse a donc un impact non négligeable également sur la performance d'un pré-traitement (ceci sera abordé dans une partie suivante).

Une autre différence entre ces deux agents alcalins réside dans la monovalence de l'ion Na^+ alors que l'ion Ca^{2+} est divalent. Les ions calcium divalents ont une grande affinité pour la lignine et peuvent, dans des conditions alcalines, réticuler les molécules de lignine par la formation de liaisons stœchiométriques. En effet, en milieu basique, ces molécules sont chargées négativement en raison de l'ionisation de groupes fonctionnels (p. ex. carboxyle, méthoxy et hydroxyle). Ces liaisons calcium-lignine empêchent ainsi sa dégradation et diminuent la solubilisation des sucres durant les pré-traitements (Torre et al., 1992). La formation de liaisons lignine-calcium-lignine au sein de la biomasse pourrait donc avoir un effet potentiel sur l'amélioration de la digestibilité de la biomasse. Xu et al. (2010) ont également émis l'hypothèse que les ions calcium pouvaient former des liaisons avec des sucres dans des conditions alcalines, les protégeant. Cependant, ces auteurs ont souligné qu'une forte teneur en lignine n'a pas entraîné une faible saccharification enzymatique. Il semble que tant que les liaisons chimiques qui maintiennent les composés de la biomasse ensemble sont éliminées par l'attaque de réactifs alcalins et que la structure de la biomasse est relâchée, les enzymes peuvent donc avoir un bon accès aux sucres même en présence de teneur en lignine élevée. Après avoir mesuré la porosité de la biomasse, ces mêmes auteurs ont montré que la digestibilité de la biomasse était proportionnelle à sa porosité et donc qu'une teneur élevée en lignine ne va pas nécessairement engendrer de mauvaise performance d'hydrolyse enzymatique.

Une explication supplémentaire a été proposée par Mancini et al. (2016). L'efficacité du prétraitement à la soude à température ambiante pourrait s'expliquer par la capacité de liaison plus forte du Na^+ et de l' OH^- à basse température permettant une réduction de la cristallinité de la cellulose.

De plus, Kim et al. (2016) ont indiqué que le rôle de la chaux est d'éliminer la plupart des groupes acétyles et que celui de la soude est d'attaquer efficacement les liaisons principalement éther et ester entre la lignine et les hémicelluloses dans les complexes (LCC). L'hydroxyde de sodium est également efficace pour le clivage des liaisons ester dans les molécules de lignine (acide férulique).

6.2.3... qui permettent en partie la solubilisation des sucres et de la matière.

Lors des analyses histologiques, en raison du fait que le miscanthus soit plus lignifié que le sorgho, le démasquage de la cellulose était plus important. En effet, grâce à la double coloration à la fois de la lignine et des holocelluloses (coloration FASGA), une évolution assez nette de la coloration rouge en bleu a été observée. Son analyse quantitative a montré que le réactif avait un fort impact et surtout que celui-ci était beaucoup plus important sur l'évolution du parenchyme que du sclérenchyme. Le parenchyme a une plus grande surface mais aussi est beaucoup moins lignifié et donc plus riche en sucres. Cette analyse a permis également de souligner une fois de plus l'importance de l'interaction entre le réactif et la biomasse. Les holocelluloses ont donc été rendues accessibles au colorant. Cela est dû principalement à la dégradation de la lignine, mais pas seulement. Comme observé dans le chapitre 5, les pré-traitements alcalins peuvent dégrader directement les holocelluloses (la cellulose mais surtout les hémicelluloses). Ils ont un impact sur liaisons fortes mais aussi sur les plus faibles comme par exemple, les liaisons hydrogène entre les microfibrilles de cellulose qui ont conduit à leur relâchement.

Les sucres étant solubilisés, ils sont donc rendus bioaccessibles ce qui doit améliorer l'étape d'hydrolyse. Cependant, dans la littérature il est relevé que cette étape peut être critique du fait que trop de sucres seraient trop accessibles et que les micro-organismes qui sont mis en jeu lors de cette première phase ne peuvent assimiler de telles quantités. En effet si la quantité de sucres rendus bioaccessibles peut améliorer et accélérer la phase d'hydrolyse beaucoup d'AGV seront produits lors de la phase suivante (acidogénèse). Les micro-organismes mis en jeu lors de la méthanogénèse peuvent être en mesure de ne pas pouvoir dégrader tous les AGV produits simultanément, d'où une accumulation possible qui engendre une baisse de pH et un risque d'acidification des réacteurs LBR. Lors de l'étude de la monodigestion du fumier avec des solutions alcalines, il a été effectivement observé que c'est la méthanogénèse qui a été limitante, le fumier est en effet plus pauvre en sucre accessibles que le sorgho et le miscanthus.

Ces différents phénomènes ne sont généralement pas observés lors de la réalisation de tests BMP car ils sont réalisés en conditions favorables pour éviter toutes accumulations de sucres ou d'AGV et chute de pH. Cependant, lors des essais en co-digestion du sorgho pré-traité avec du fumier, le risque d'acidification fut proche.

6.3 La biomasse

Dans le projet BFF ces deux biomasses ont été retenues pour leur important potentiel biomasse avec de faibles intrants mais aussi parce que le miscanthus est adapté au climat du nord de la France et le sorgho à celui du sud. Pour chacune, le génotype retenu faisait partie de la gamme basse des potentiels méthane du panel de génotypes mis à notre disposition. Un pré-traitement sera d'autant plus efficace que le potentiel méthane est bas. De plus, le sorgho Biomasse 140 et *Miscanthus x. giganteus Floridulus* sont des génotypes bien connus. Comme exploré dans le chapitre 5, ces deux biomasses sont différentes structurellement et anatomiquement. Leurs compositions biochimiques sont également différentes ce qui renforce l'intérêt de notre étude sur ces deux biomasses en parallèle. En effet, l'impact biomasse est non négligeable.

6.3.1 Influence de la composition : sous-unités de la lignine et forme de la cellulose (cristalline ou amorphe)

Au travers des différents chapitres, des différences « de réponse » aux différents pré-traitements alcalins ainsi que des différences anatomiques et biochimiques ont été mises en évidence. Le sorgho étant moins lignifié et plus riche en solubles, les pré-traitements alcalins ont donc été moins performants que sur le miscanthus plus lignifié (chapitre 3). Cette différence de lignification a bien été confirmée par l'histologie et plus particulièrement avec le phloroglucinol et le réactif de Mäule (chapitre 5). De plus, les sous-unités de la lignine sont différentes et diffèrent en proportion. Par ailleurs, la coloration au rouge Congo a permis de montrer que sur la biomasse brute, la cellulose est principalement masquée par la lignine. Après pré-traitement, elle devient accessible à la coloration. D'après l'évolution des compositions biochimiques (chapitre 3), celle-ci est partiellement solubilisée mais change également de forme. En effet, l'immunolocalisation de la cellulose cristalline a montré que sa répartition après pré-traitement était moins homogène et sa quantité plus faible.

6.3.2 Influence de la façon dont elle a été broyée et sa granulométrie

L'expérience réalisée sur les tronçons de tige d'1 cm a montré que la solution de pré-traitement n'avait été absorbée que par le 1^{er} millimètre à chaque extrémité. Il s'avère donc qu'un broyage en tronçons/transversal n'est pas adapté pour pré-traiter la matière (mais adapté pour les observations histologiques). De plus les différentes colorations utilisées dans le chapitre 5 ont montré que l'épiderme n'a jamais été dégradé par les solutions de pré-traitements. L'épiderme hydrophobe par sa richesse en lipides principalement joue un très grand rôle de protection de la plante. Il en résulte que s'il n'est pas coupé, broyé ou déchiqueté il continuera à protéger le parenchyme. Un broyage « déchiquetant » dégageant ainsi la moelle semble donc plus approprié car il rompt l'aspect circulaire de la tige et rend la moelle accessible. Même si d'un côté elle peut rester protégée par l'épiderme, le côté intérieur est accessible. Le type de broyage ne faisait pas partie des objets d'étude de cette thèse mais il s'avère qu'il a varié (1 ou 20 mm pour les pré-traitements et broyeur à végétaux pour les pré-traitements et essais en réacteurs) et qu'il joue un rôle dans l'efficacité des pré-traitements.

En lien avec le broyage, la granulométrie utilisée a été augmentée pour se rapprocher au maximum des conditions du terrain ; elle joue un rôle non négligeable même primordial dans l'accessibilité de la matière. En effet, la littérature est riche en références. Tout comme le type de broyage, cet aspect n'est pas un aspect abordé en détails mais qu'il a fallu prendre en compte. En effet, l'augmentation de la granulométrie s'est faite par rapport à une contrainte technique. Une teneur en MS de 20% avec des particules de 20 mm ne posait pas de problèmes d'absorption avec le miscanthus par contre avec une granulométrie de 60 mm, la solution de pré-traitements n'était pas en quantité suffisante, 13% était la teneur minimale pour permettre un pré-traitement homogène.

6.3.3 Comportement en différentes modalités de DA

En résumé, nous avons montré que les traitements alcalins augmentent les cinétiques de méthanisation des 2 biomasses mais uniquement les BMP du miscanthus. En revanche, les productions de méthane obtenues en réacteurs de codigestion n'ont pas été significativement améliorées, par rapport aux témoins sans prétraitements, excepté avec le sorgho prétraité avec la soude. Il convient donc de comparer les résultats obtenus en BMP (chapitre 3, parties 3.3.2 et 3.3.3) et en co-digestion (chapitre 4, parties 4.2 et 4.3) sur les biomasses de même granulométrie (60 mm) (Table 6-1).

Table 6-1 : Comparaison entre les valeurs de BMP obtenues sur les mono-substrats et les performances en co-digestion en LBR

Substrat	BMP (NmL _{CH₄} ·g _{VS} ⁻¹)	Valeurs calculées ² (NmL _{CH₄} ·g _{VS} ⁻¹)	LBR ¹ (NmL _{CH₄} ·g _{VS} ⁻¹)	LBR ¹ (NmL _{CH₄} ·g _{VSsubstrate} ⁻¹)	LBR/BMP	
					VS _{substrat}	VS _{substrat+inoc}
Fumier bovin	207 ± 26	-	158 ± 13	-	-	-
Miscanthus (M_60)	141 ± 9	181 ± 34	158 ± 4	183 ± 5	1.01	0.87
10% CaO 5d Miscanthus	205 ± 12	208 ± 38	167 ± 2	193 ± 3	0.93	0.80
5% CaO 5d miscanthus	198 ± 9	207 ± 35	150	173	0.84	0.73
Sorgho (S_60)	250 ± 14	230 ± 42	195 ± 6	224 ± 7	0.97	0.85
10% NaOH sorgho 1d	268 ± 10	227 ± 37	233 ± 16	267 ± 17	1.18	1.03
10% CaO sorgho 5d	259 ± 13	224 ± 40	210 ± 2	241 ± 1	1.08	0.94

¹ substrat co-digéré avec du fumier

² en supposant l'additivité des BMP et en considérant 100% de la valeur du BMP

Au regard des importants écart-types des valeurs de BMP calculées (qui n'avaient pas été pris en compte dans le chapitre 3-3.3.2), les performances obtenues avec le sorgho ou le miscanthus pré-traité étaient proches de ce qui pouvait être prédit à partir des résultats obtenus en fioles BMP (Table 6-1). Si les productions de méthane ramenées à la quantité de matière organique du substrat uniquement sont considérées, les performances obtenues en co-digestion sont plus proches de celles attendues (Table 6-1). En effet, les ratios de productions de méthane des LBR sur celles des BMP, montrent qu'avec les substrats bruts, et en ne considérant pas la quantité d'inoculum, les performances attendues sont atteintes. Les performances obtenues avec le sorgho pré-traité à la chaux surpassent même celles attendues et celles avec la soude sont très proches. Ces résultats montrent que l'effet réactif peut être amoindri car avec le sorgho, la chaux a permis de bien atteindre les performances attendues. Il aurait été, cependant, intéressant d'étudier l'utilisation en réacteur du miscanthus pré-traité

avec de la soude. De plus, lors des différents tests BMP, un temps de latence a été généralement observé pour le miscanthus brut contrairement avec le sorgho (chapitre 3). De même, dans les essais de codigestion en réacteurs, les risques d'acidification étaient plus importants avec le sorgho qu'avec le miscanthus (pH minimum atteint 6.3 versus 7). Cela confirme la différence de bioaccessibilité entre ces deux biomasses. On peut cependant s'interroger sur l'intérêt d'augmenter les proportions de miscanthus/sorgho utilisées dans l'alimentation en codigestion. Malgré l'intérêt économique de fortes proportions de sorghos, des proportions plus élevées que celle étudiée (15%_{brut}) pourraient augmenter le risque d'acidification au démarrage des réacteurs. Toutefois, l'étude de plus fortes proportions de miscanthus ainsi que son intérêt économique serait intéressante. Cependant, Agostini et al. (2015) préconisent qu'une quantité de fumier comprise entre 50 et 70%_{MS} doit être présente dans la recette.

CONCLUSION

Dans un contexte de réchauffement climatique suite aux activités anthropiques et à l'épuisement des ressources fossiles, il est nécessaire de trouver des alternatives et de développer des énergies renouvelables. Au sein de ces différentes énergies, la digestion anaérobie s'avère être une bonne candidate. En effet, en plus de produire du méthane, elle produit un digestat valorisable agronomiquement et permet de traiter des déchets et résidus agro-alimentaires et agricoles. Elle permet également à la fois la valorisation du fumier et la réduction des GES (qui ne seront pas émis puisque le fumier ne sera pas stocké à l'air libre pendant une longue durée). La biomasse lignocellulosique constitue une source abondante de substrats disponibles et adaptés à la DA (dont le sorgho et le miscanthus). Elle est majoritairement composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Cette dernière est reconnue dans la littérature pour jouer un rôle de barrière dans la bioaccessibilité de ce genre de biomasse. Des stratégies de pré-traitements peuvent alors être mises en place afin d'augmenter cette accessibilité et donc augmenter leur pouvoir méthanogène. De plus, dans un contexte de politique agricole et énergétique française, la digestion voie sèche fait face à un fort développement et elle est bien adaptée aux substrats étudiés dans cette thèse. Les conditions de pré-traitements adaptés à cette digestion voie sèche sont à privilégier. Nous avons choisi de nous focaliser sur la technologie de la digestion voie sèche en réacteurs garage puisque c'est une des plus utilisées.

Le premier chapitre de résultats de ce manuscrit de thèse a porté sur l'étude de l'impact des pré-traitements alcalins et de leurs conditions opératoires sur la matière, la cinétique de dégradation et son potentiel méthane. La variabilité observée pour les deux biomasses n'est pas expliquée par les mêmes variables. Le sorgho étant moins lignifié et plus riche en solubles, les pré-traitements alcalins ont donc été moins performants et ont des effets différents par rapport au miscanthus plus lignifié (Figure C-1). Les différentes conditions de pré-traitements ont des impacts à des niveaux différents. Le réactif est le paramètre qui a le plus d'impact, la soude étant plus efficace que la chaux. Toutefois, la chaux présente de nombreux avantages. Pour essayer d'améliorer ses performances l'effet de sa dose (rapportée à la MS de la biomasse) a été évalué, or il s'est révélé peu significatif. A température ambiante, un temps de contact long (de plusieurs jours) avec la solution de pré-traitement est plus favorable. La teneur en MS s'est avérée également importante dans notre étude puisqu'elle conditionne la concentration des réactifs car leur ajout a été défini en dose (masse de réactif par masse de biomasse). Par ailleurs, l'augmentation de la granulométrie a diminué l'accessibilité de la biomasse.

Dans un objectif d'application à la méthanisation à la ferme, le deuxième chapitre de résultats a porté sur l'étude de l'application de prétraitements alcalins de la biomasse en codigestion avec du fumier, les conditions de prétraitements appliquées étant issues du chapitre précédent. Une des questions était de savoir si les pré-traitements alcalins permettent de meilleures performances en production de méthane et si oui qu'en est-il de leur rentabilité ? Cependant, il y a eu des différences entre les performances des pré-traitements observées dans le chapitre 3 et les performances de leur application en réacteurs. Quelques hypothèses ont été

émises mais il faudrait approfondir ce sujet. Il aurait été peut-être plus pertinent de mesurer l'effet des pré-traitements de la biomasse en BMP co-digérée avec le fumier en BMP pour prédire que les performances en réacteurs allaient être différentes. Cependant, il est bien connu que les performances en BMP sont une estimation de la production maximale possible. De plus les conditions de la DA étaient totalement différentes (voie liquide ou sèche, séparation liquide-solide ou non). Toutefois, il a été montré que la co-digestion est avantageuse par rapport à la mono-digestion du fumier. Ce chapitre a confirmé le comportement différent du sorgho et du miscanthus ainsi que l'effet primordial du réactif alcalin.

Afin d'approfondir les impacts des pré-traitements sur la biomasse, le dernier chapitre de résultats s'est focalisé sur l'étude histo-chimique. En effet, une biomasse lignocellulosique n'est pas seulement une composition biochimique, c'est aussi une structure tissulaire et cellulaire. Dans la littérature, beaucoup d'articles ont étudié l'effet de ces agents sur la composition biochimique (cellulose, hémicelluloses, ADL ou lignine Klason), mais l'approche histologique choisie renforce l'originalité de ces travaux de thèse. Comme supposé dans les deux chapitres de résultats précédents, les mécanismes d'un pré-traitement sont biomasse dépendants. Le sorgho et le miscanthus sont anatomiquement différents de par leur distribution de faisceaux conducteurs principalement; histologiquement différents de par la quantité et la localisation des différentes sous unités de la lignine. Ces pré-traitements semblent dégrader la lignine présente en périphérie des tissus de soutien et dans le parenchyme et mais n'altèrent pas l'épiderme et peu les faisceaux conducteurs (Figure C-1). Cette dégradation n'est pas systématique, parfois, il y a seulement une altération de de la lignine par modification de ses sous-unités. Ces dégradations et altérations ont rendu les holocelluloses plus accessibles. La soude et la chaux semblent avoir préférentiellement dégradé la lignine G que la S. En plus d'avoir conduit à la dégradation et au changement de type de lignine, ces réactifs auraient également dégradé la cellulose du parenchyme et modifié sa structure De plus, les effets des prétraitements voire même leur utilisation pourrait être différents ou remis en cause par la variation biochimique induit pas le génotype sur une même biomasse.

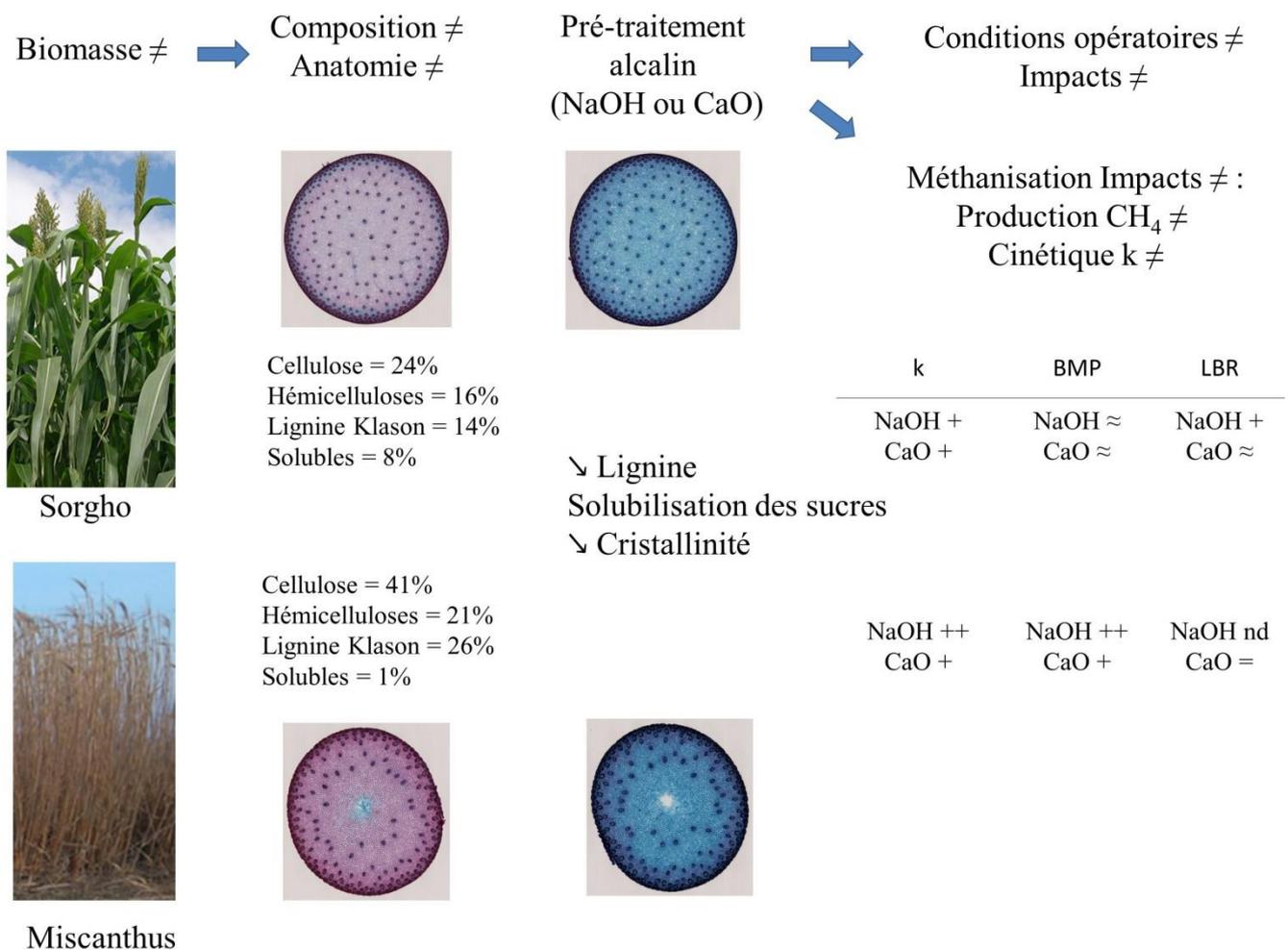


Figure C-1 : Schéma général des principales conclusions de ce doctorat

PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont permis de répondre à certaines questions mais en ont soulevé d'autres ouvrant de nombreuses perspectives.

Lors des différentes expériences, deux réactifs alcalins ont été utilisés: NaOH et CaO. Pour expliquer la plus faible efficacité de la chaux, une des hypothèses émises dans la littérature est le pouvoir pontant de l'ion calcium qui est divalent. Des complexes calcium-lignine pourraient se former ce qui diminuerait la dégradation de la matière lignocellulosique. Il pourrait être intéressant d'étudier l'impact des contre-ions pour mettre en évidence/confirmer ce pouvoir pontant. Par exemple du chlorure de calcium pourrait être

ajouté à la soude et du chlorure de sodium à la chaux lors des pré-traitements. Cependant, comme la plus faible efficacité de la chaux est reconnue dans la littérature, la mise en place de piège à calcium lors des pré-traitements pourrait également être explorée (matériaux à grande affinité au calcium, ions négatifs, cristallisation, ...).

De plus, la soude et la chaux ne sont pas les seuls réactifs alcalins disponibles. Il ne serait pas pertinent économiquement d'utiliser la potasse qui selon Soares Rodrigues et al. (2016) aurait des performances similaires à la soude mais qui a un coût 2 fois plus élevé.

Au tout début du doctorat, quelques échantillons ont été pré-traités avec de l'ammoniaque en milieu liquide (procédé AAS pour Aqueous Ammonia Soaking). L'extraction de l'ammonium restant avant digestion étant industriellement et économiquement peu viable, les essais ont été arrêtés. Cependant, indépendamment de leur pertinence ou non pour des applications à l'échelle industrielle, l'étude de ces différents agents serait très intéressante pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action sur la matière.

L'utilisation d'un seul agent alcalin n'est pas la seule option possible pour les pré-traitements de cette catégorie. Zhang et al. (2011) ont comparé l'association de CaO et NaOH par rapport à un pré-traitement sur des cannes de maïs n'utilisant que NaOH. L'association des deux bases a conduit, après hydrolyse enzymatique, à un taux de production de sucres similaire, mais à un coût potentiellement inférieur et une réduction du taux de dégradation de la lignine (et donc une meilleure préservation de la biomasse). L'ajout de CaO, réactif moins cher, a permis d'augmenter l'alcalinité, favorisant l'amélioration de la digestibilité de la biomasse, mais a également contribué à une meilleure préservation de la biomasse lors du pré-traitement via la formation de liaison lignine-calcium. Si ce phénomène a été perçu comme positif dans le cas de la saccharification de la biomasse, nous pouvons nous interroger sur son impact en méthanisation.

Une autre possibilité est d'augmenter les performances des agents alcalins en les associant avec un agent oxydant. Le premier est utilisé pour gonfler les fibres et augmenter la réaction du second réactif et de la lignine, entraînant une augmentation de l'efficacité de la délignification et une diminution du volume de réactif requis (Ramos-suárez et al., 2017).

La mesure de l'effet/de l'impact de ces pré-traitements peut être évaluée par d'autres méthodes. Concernant la lignine, il est possible de doser les monomères de la lignine par thioacidolyse puis silylation et GC-MS. La quantification de la solubilisation de la lignine et de la rupture des liaisons avec les polysaccharides peut être réalisée par mesure des composés phénoliques. Cette mesure a été abordée par une méthode colorimétrique mais n'a pas abouti. Il semblerait qu'il y ait eu des interactions avec les résidus des réactifs de pré-traitements malgré les lavages à l'eau distillée. Pour éventuellement s'en affranchir, des méthodes de mesures des composés en HPLC auraient pu être utilisées (quantification de l'acide férulique, par exemple).

L'utilisation de certains agents alcalins, comme par exemple le potassium, peut être intéressante pour le retour au sol du digestat. Cela peut conduire également à l'adoption d'une toute autre logique/stratégie de pré-traitements chimiques. En plus de l'augmentation de

l'accessibilité de la matière, l'enrichissement/ l'ajout de plus-value du digestat issus de la digestion de cette biomasse devrait être envisagé (par exemple : la combinaison de la potasse avec une solution d'ammonium, viser une certaine teneur en matières organiques). L'optimisation des conditions des pré-traitements ne serait pas à considérer du point de vue de la performance de production de biogaz mais celui de la qualité du digestat obtenu. La réalisation de tests agronomiques pourraient renseigner sur son pouvoir d'humification et structurant lors de son retour au sol.

Concernant les essais en co-digestion, il a été noté que dans la littérature, des biomasses ensilées étaient utilisées. Il serait intéressant de réaliser des essais avec un mélange fumier et sorgho pré-traité ensilés. Il pourrait, également, être intéressant de pré-traité le mélange fumier-sorgho. Pour les résultats obtenus lors de cette étude, des analyses microbiologiques pourraient être réalisées afin de savoir si les différences de performances auraient pu être liées à des perturbations ou changements de voies métaboliques ou à des différences dans l'activité des inocula. En effet, les différences de performances obtenues entre les BMP et les réacteurs ont été peu comprises. Cette étude pourrait également être complétée par des essais avec du miscanthus pré-traité à la soude. De plus, afin d'appliquer ces pré-traitements en méthanisation à la ferme, il est primordial de réaliser des essais à moyenne échelle en conditions réelles. Cela permettrait d'obtenir des performances plus proches du contexte de réacteurs garage à la ferme et ainsi réaliser une étude économique plus fiable. Celle-ci pourrait, également, prendre en compte le temps passé pour réaliser le pré-traitement, les coûts induits par la construction d'un endroit dédié à sa réalisation. L'ordre de grandeur du coût d'exploitation et d'investissement d'une installation ainsi que la cinétique de production de biogaz et le temps de latence au démarrage pourraient, également, être ajoutés. De plus, cette étude pourrait être complétée par une Analyse de Cycle de Vie (ACV) permettrait de mesurer l'intérêt environnementale de la co-digestion du fumier avec de la biomasse lignocellulosique brute ou pré-traitée.

L'imagerie hyperspectrale qui est une technologie combinant l'imagerie et la spectroscopie faciliterait la quantification par imagerie et donc l'étude histologique des pré-traitements. Sa spécificité est l'acquisition d'un spectre continu dans une gamme de longueurs d'ondes donnée permettant d'exploiter au mieux les informations et ainsi de mesurer les propriétés optiques des échantillons et donc donner une dimension quantitative à l'observation. Dans notre cas, la combinaison d'un microscope optique avec un spectroscope proche-infrarouge pourrait permettre de connaître la composition biochimique de l'échantillon broyé ou en coupe et de la spatialiser au sein de la coupe et donc des tissus.

Afin de mieux comprendre les effets de la composition et de la structure de la biomasse brute ou pré-traitée sur la cinétique et le rendement en méthane, les analyses statistiques pourraient être complétées par un modèle PLS.

Pour une biomasse donnée, il existe de nombreuses sources de variation. Un seul génotype de sorgho et de miscanthus a été étudié. Or, il est connu de la littérature que le génotype a un impact sur la composition biochimique de la plante. De plus l'environnement,

les conditions de culture, (irriguées ou non, culture principale ou dérobée), le moment de la récolte (précoce, tardive) et la partie de la plante utilisée (tiges, feuilles, plante entière) ont également des effets. De nombreuses pistes restent donc à explorer pour bien maîtriser la variation d'une biomasse donnée et ainsi pouvoir optimiser l'application de pré-traitements voire même définir si celle-ci est justifiée.

Un autre aspect important concernant la biomasse est sa granulométrie et la façon dont elle a été broyée. Cet aspect doit être pris en compte lors de la réflexion et la mise en place de la stratégie de pré-traitements (application et viabilité économique). Des essais de pré-traitements couplant le broyage et un pré-traitement alcalin pourraient être réalisés.

Une toute autre stratégie, qui est une des options envisagées dans le projet BFF, est de développer de nouvelles variétés présentant toutes les caractéristiques favorables à la DA et qui ne nécessiteraient pas l'utilisation de pré-traitements.

BIBLIOGRAPHIE

- A. Sluiter et al., 2011. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP).
- Achinas, S., Achinas, V. & Euverink, G.J.W., 2017. A Technological Overview of Biogas Production from Biowaste. *Engineering*, 3(3), pp.299–307. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.002>.
- ADEME, Vers un mix électrique 100% renouvelable en 2050.
- ADEME, 2016. Chaleur issue de la méthanisation : de réelles opportunités.
- Agbor, V.B. et al., 2011. Biomass pretreatment : Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.675–685. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.
- Agostini, A. et al., 2015. Environmentally Sustainable Biogas? The Key Role of Manure Co-Digestion with Energy Crops. *energies*, pp.5234–5265.
- Åkerholm, M., Hinterstoisser, B. & Salmén, L., 2004. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 339(3), pp.569–578.
- Akin, D.E. et al., 2006. Corn Stover Fractions and Bioenergy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104, pp.129–132.
- Akin, D.E., Burdick, D. & Michaels, G.E., 1974. Rumen Bacterial Interrelationships with Plant Tissue During Degradation Revealed by Transmission Electron Microscopy. *Applied Microbiology*, 27(6), pp.1149–1156.
- Alexander, W.J. & Mitchell, R.L., 1949. Rapid Measurement of Cellulose Viscosity by Nitration Methods. *Analytical Chemistry*, 21(12), pp.1497–1500. Available at: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/doilookup/?10.1021/ac60036a018>.
- Amaducci, S. et al., 2016. Effect of irrigation and nitrogen fertilization on the production of biogas from maize and sorghum in a water limited environment. *European Journal of Agronomy*, 76, pp.54–65. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2016.01.019>.
- Amani, T., Nosrati, M. & Sreekrishnan, T.R., 2010. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environmental Reviews*, 18(NA), pp.255–278. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/A10-011>.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, W., et al., 2007. Biogas production from maize and dairy cattle manure-Influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118(1–4), pp.173–182.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Machmüller, A., et al., 2007. Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. *Bioresource Technology*, 98(17), pp.3204–3212.
- André, L., Pauss, A., Ribeiro, T., 2017. Solid anaerobic digestion : State-of-art , scientific and technological hurdles. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.003>

Anon, BFF.

Antonopoulou, G. et al., 2015. The Effect of Aqueous Ammonia Soaking Pretreatment on Methane Generation Using Different Lignocellulosic Biomasses. *Waste and Biomass Valorization*.

APHA American Public Health Association. 1998. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater." American Public Health Association.

Appels, L. et al., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6), pp.755–781.

Arnoult, S. et al., 2015. Miscanthus clones for cellulosic bioethanol production: Relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 63, pp.316–328.

Arnoult, S. & Brancourt-Hulmel, M., 2015. A Review on Miscanthus Biomass Production and Composition for Bioenergy Use: Genotypic and Environmental Variability and Implications for Breeding. *Bioenergy Research*.

Arvalis, 2017. BILAN SORGHO GRAIN - FRANCE Evolutions des surfaces et de la collecte.

Assemblée Nationale, 2017. Arrêté du 13 juin 2017 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation agricoles en tant que matières fertilisantes. *Journal officiel de la République française*. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000034952206&categorieLien=id>.

Assemblée Nationale, 2011a. Arrêté du 23 novembre 2011 fixant les conditions d'achat du biométhane injecté dans les réseaux de gaz naturel. *Journal officiel de la République française*, p.19700. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024833895>.

Assemblée Nationale, 2014. Arrêté du 24 juin 2014 modifiant l'arrêté du 23 novembre 2011 fixant les conditions d'achat du biométhane injecté dans les réseaux de gaz naturel. *Journal officiel de la République française*, p.10479. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000029135355&categorieLien=id>.

Assemblée Nationale, 2011b. Décret n° 2011-1594 du 21 novembre 2011 relatif aux conditions de vente du biométhane aux fournisseurs de gaz naturel. *Journal officiel de la République française*. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024829777&categorieLien=cid>.

Assemblée Nationale, 2016. Décret n° 2016-929 du 7 juillet 2016 pris pour l'application de l'article L. 541-39 du code de l'environnement. *Journal officiel de la République française*. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/7/7/DEV1617121D/jo/texte>.

- Atalia, R.H. & Vanderhart, D.L., 1984. Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Cellulose*, pp.6–8.
- Auxenfans, T., Terry, C. & Paës, G., 2017. Seeing biomass recalcitrance through fluorescence. *Nature*, (March), pp.1–8.
- B G Tamang R K Niroula R B Amgai, B.P.S.A.S.K.G., 2011. Nitrogen Requirements for Ethanol Production from Sweet and Photoperiod Sensitive Sorghums in the Southern High Plains. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10(7), pp.347–356. Available at: <http://scialert.net/abstract/?doi=ajps.2011.347.356>.
- Bakeer, B. et al., 2013. On the characterisation of structure and properties of sorghum stalks. *Ain Shams Engineering Journal*, 4(2), pp.265–271. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.asej.2012.08.001>.
- Barakat, A., de Vries, H., Rouau, X., 2013. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresour. Technol.* 134, 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.169>
- Barakat, A., Chuetor, S., Monlau, F., Solhy, A., Rouau, X., 2014a. Eco-friendly dry chemo-mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: Impact on energy and yield of the enzymatic hydrolysis. *Appl. Energy* 113, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.015>
- Barakat, A., Gaillard, C., et al., 2014. Anaerobic biodegradation of cellulose-xylan-lignin nanocomposites as model assemblies of lignocellulosic biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 5(2), pp.293–304.
- Barakat, A., Mayer, C., et al., 2014. Mechanical Pretreatments of Lignocellulosic Biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *RSC Advances*, 4, pp.48109–48127. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/ra/c4ra07568d>.
- Barbanti, L. et al., 2014. Anaerobic digestion of annual and multi-annual biomass crops. *Industrial Crops & Products*, 56, pp.137–144. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.002>.
- Behera, S. et al., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, pp.91–106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>.
- Berlin, A. et al., 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*, 125(2), pp.198–209. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165606001714>.
- Bichot, A. et al., 2018. Understanding biomass recalcitrance in grasses for their efficient utilization as biorefinery feedstock, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11157-018-9485-y>.

- Blake, Anthony W., Lesley McCartney, James E. Flint, David N. Bolam, Alisdair B. Boraston, Harry J. Gilbert, and J. Paul Knox. 2006. "Understanding the Biological Rationale for the Diversity of Cellulose-Directed Carbohydrate-Binding Modules in Prokaryotic Enzymes." *Journal of Biological Chemistry* 281 (39): 29321–29. doi:10.1074/jbc.M605903200.
- Bobleter, O., Niesner, R. & Röhr, M., 1976. The hydrothermal degradation of cellulosic matter to sugars and their fermentative conversion to protein. *Journal of Applied Polymer Science*, 20(8), pp.2083–2093.
- Boon, E.J.M., Struick, P., Tamminga, S., Engles, F.M., Cone, J.W., 2008. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L .) cultivars varying in whole plant digestibility . III . Intra-stem variability in anatomy, chemical composition and in vitro rumen fermentation. *NJAS - Wageningen J. Life Sci.* 56, 101–122.
- Botji, T. et al., 2017. Pretreatment of poultry manure for efficient biogas production as monosubstrate or co-fermentation with maize silage and corn stover. *Anaerobe*, 46, pp.138–145.
- Boughton, B.A. et al., 2016. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochemistry Reviews*, 15, pp.445–488.
- Brémond, U. et al., 2018. Biological pretreatments of biomass for improving biogas production : an overview from lab scale to full-scale. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(June 2017), pp.583–604. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.103>.
- Browning, B., 1967. *Methods of wood chemistry, vol I. and II.* B.L. Brown., Wiley, New York.
- Bruni, E. et al., 2010. Anaerobic digestion of maize focusing on variety, harvest time and pretreatment. *Applied Energy*, 87(7), pp.2212–2217. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.01.004>.
- Buffiere, P. et al., 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science and Technology*, 53(8), pp.233–241.
- Buranov, A.U. & Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 8, pp.237–259.
- Cabezas, A. et al., 2015. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*.
- Cadoux, S., Ferchaud, F., Demay, C., Boizard, H., Machet, J.M., Fourdinier, E., Preudhomme, M., Chabbert, B., Gosse, G., Mary, B., 2014. Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *GCB Bioenergy* 6, 425–438. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12065>
- Carlsson, M., Lagerkvist, A., Morgan-sagastume, F., 2012. The effects of substrate pretreatment on anaerobic digestion systems : A review. *Waste Manag.* 32, 1634–1650. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.04.016>

- Carmi, A. et al., 2006. Effects of irrigation and plant density on yield , composition and in vitro digestibility of a new forage sorghum variety , Tal , at two maturity stages. *Animal Feed Science and Technology*, 131, pp.120–132.
- Carrere, H. et al., 2016. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. *Bioresource Technology*.
- Carrier, T. et al., 2015. *Chiffres clés des énergies renouvelables, édition 2015*, Commissariat général au développement durable.
- Chen, Y., Cheng, J.J. & Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process : A review. *Bioresource Technology*, 99, pp.4044–4064.
- Cheng, G. et al., 2011. Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules*.
- Chundawat, S.P.S. et al., 2011. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment †‡. *Energy & Environmental Science*, 4, pp.973–984.
- Clifton-Brown, J. & Harfouche, A., 2018. Breeding progress and preparedness for mass-scale deployment of perennial lignocellulosic biomass crops switchgrass, miscanthus, willow, and poplar. *Global Change Bioenergy*.
- Clifton-Brown, J., Schwarz, K.U. & Hastings, A., 2015. History of the development of Miscanthus as a bioenergy crop: From small beginnings to potential realisation. *Biology and Environment*, 115B(1), pp.1–13.
- Clifton-Brown, J.C. et al., 2017. Development of Miscanthus as a Bioenergy Crop. *Biofuels and Bioenergy*, pp.119–131.
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), pp.850–861.
- Costa, R.M.F., Pattathil, S., Avci, U., Lee, S.J., Hazen, S.P., Winters, A., Hahn, M.G., Bosch, M., 2016. A cell wall reference profile for Miscanthus bioenergy crops highlights compositional and structural variations associated with development and organ origin. *New Phytol.* 213, 1710–1725. <https://doi.org/10.1111/nph.14306>
- Cuetos, M.J. et al., 2011. Anaerobic co-digestion of swine manure with energy crop residues. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(5), pp.1044–1052.
- Damien, A., 2013. *La biomasse énergie* 2nd ed., Dunod.
- Datar, R. et al., 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, pp.932–939.
- Dauwe, R. et al., 2007. Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. *Plant Journal*, 52(2), pp.263–285.

- Degueurce, A. et al., 2016. Fumiers de bovins, une ressource à fort potentiel pour la filière de méthanisation en France? *Sciences Eaux & Territoires*, 24, pp.1–9.
- Di Girolamo, G., Bertin, L., Capecchi, L., Ciavatta, C., Barbanti, L., 2014. Mild alkaline pretreatments loosen fibre structure enhancing methane production from biomass crops and residues. *Biomass and Bioenergy* 71, 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.09.025>
- Donohoe, B.S. et al., 2011. Surface and ultrastructural characterization of raw and pretreated switchgrass. *Bioresource Technology*, 102, pp.11097–11104. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.092>.
- Dubis, B. & Stefan, W., 2016. Energy efficiency of crops grown for biogas production in a large-scale farm in Poland. *Energy*, 109.
- Dubois, M. & Rigal, L., 1995. la dégradation alcaline des hexoses. , 1590(iii), pp.1582–1590.
- Eronen, P. et al., 2011. Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), pp.1281–1290. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.031>.
- Evergaz, 2018. Méthanisation: naissance d'une énergie durable. Available at: <https://www.evergaz.com/article/methanisation-naissance-d-une-energie-durable-45.html>.
- Fan Y Van, Klemeš JJ, Perry S, Lee CT (2019) Anaerobic digestion of lignocellulosic waste: Environmental impact and economic assessment. *J Environ Manage* 231:352–363 . doi: 10.1016/j.jenvman.2018.10.020
- Frydendal-nielsen, S. et al., 2016. The effect of harvest time , dry matter content and mechanical pretreatments on anaerobic digestion and enzymatic hydrolysis of miscanthus. *Bioresource Technology*, 218, pp.1008–1015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.046>.
- Frydendal-Nielsen, S. et al., 2016. The effect of harvest time, dry matter content and mechanical pretreatments on anaerobic digestion and enzymatic hydrolysis of miscanthus. *Bioresource Technology*, 218, pp.1008–1015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.046>.
- Fu, S. et al., 2018. Improved anaerobic digestion performance of *Miscanthus floridulus* by different pretreatment methods and preliminary economic analysis. *Energy Conversion and Management*, 159, pp.121–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.014>.
- Gao, R. et al., 2012. Methane yield through anaerobic digestion for various maize varieties in China. *Bioresource Technology*, 118, pp.611–614. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.051>.
- Garofalo.P, 2011. Radiation-use efficiency of irrigated biomass sorghum in a Mediterranean environment. *Crop and Pasture Science*.
- Ge, X., Xu, F. & Li, Y., 2016. Solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Recent progress and perspectives. *Bioresource Technology*.

- Ghaffar, S.H. & Fan, M., 2013. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, 57, pp.264–279. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.07.015>.
- Ghatak, H.R., 2011. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Gicquel, R., 2016. *Massive Open Online Course (MOOC) Problèmes énergétiques globaux*
- Godin, B. et al., 2013. Chemical characteristics and biofuels potentials of various plant biomasses: Influence of the harvesting date. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Götz, M. et al., 2016. Renewable Power-to-Gas: A technological and economic review. *Renewable Energy*, 85, pp.1371–1390.
- Goupy, Jacques. 2014. “Modelisation Par Les Plans D’Expériences.” *Techniques de l’ingénieur* 33: 1–23.
- Grabber, J.H. et al., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies*, 327, pp.455–465.
- GRDF et al., 2017. *Panorama du gaz renouvelable en 2017*,
- Guo, X.M. et al., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), pp.10660–10673.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer, J.P., 2014. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 7476–7485. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.079>
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Han, G. et al., 2010. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 31(1), pp.28–33.
- Harmsen, P. et al., 2010. *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass*,
- He, Y. et al., 2008. Physicochemical Characterization of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide in the Solid State for Enhancing Biogas Production. *Energy & Fuels*, (7), pp.2775–2781.
- Heaton, E., Dohleman, F. & Long, S.P., 2009. Seasonal nitrogen dynamics of *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum*. *GCB Bioenergy*, pp.297–307.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>

- Hernandez-Gomez, Mercedes C., Maja G. Rydahl, Artur Rogowski, Carl Morland, Alan Cartmell, Lucy Crouch, Aurore Labourel, et al. 2015. "Recognition of Xyloglucan by the Crystalline Cellulose-Binding Site of a Family 3a Carbohydrate-Binding Module." *FEBS Letters* 589 (18). Federation of European Biochemical Societies: 2297–2303. doi:10.1016/j.febslet.2015.07.009.
- Hendriks, A.T.W.M. & Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, pp.10–18.
- Hillion, M., 2017. *Optimisation de la digestion a naérobie en voie sèche continue de résidus lignocellulosiques*. Montpellier Supagro.
- Hong, J. et al., 2007. Quantitative Determination of Cellulose Accessibility to Cellulase Based on Adsorption of a Nonhydrolytic Fusion Protein Containing CBM and GFP with Its Applications. *Langmuir*, 23, pp.12535–12540.
- Hosseini Koupaie, E. & Eskicioglu, C., 2015. Below and above boiling point comparison of microwave irradiation and conductive heating for municipal sludge digestion under identical heating/cooling profiles. *Bioresource Technology*.
- Houston, K. et al., 2016. The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), pp.1–18.
- Iiyama, K., and R. Pant. 1988. "The Mechanism of the Mäule Colour Reaction Introduction of Methylated Syringyl Nuclei into Softwood Lignin." *Wood Science and Technology* 22 (2): 167–75. doi:10.1007/BF00355852.
- Isaac, A. et al., 2018. From nano- to micrometer scale: The role of microwave-assisted acid and alkali pretreatments in the sugarcane biomass structure. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), pp.1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1071-6>.
- Jamme, F. et al., 2013. Deep UV autofluorescence microscopy for cell biology and tissue histology. *Biology of the Cell*, 105, pp.277–288.
- Janke, L. et al., 2017. Improving anaerobic digestion of sugarcane straw for methane production: Combined benefits of mechanical and sodium hydroxide pretreatment for process designing. *Energy Conversion and Management*, 141, pp.378–389. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.083>.
- Jha, A.K. et al., 2011. Research advances in dry anaerobic digestion process of solid organic wastes. *African Journal of Biotechnology*, 10(65), pp.14242–14253.
- Ji, Z. et al., 2016. Tissue specific response of *Miscanthus × giganteus* to dilute acid pretreatment for enhancing cellulose digestibility. *Carbohydrate Polymers*, 154, pp.247–256. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.086>.
- Jiang, D. et al., 2017. Comparison of sodium hydroxide and calcium hydroxide pretreatments of giant reed for enhanced enzymatic digestibility and methane production. *Bioresource Technology*, 244(June), pp.1150–1157. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.067>.
- Joglekar, A., May, A., 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World* 32, 857&.

- Jung, H.G. & Casler, M.D., 2006. Maize stem tissues: Impact of development on cell wall degradability. *Crop Science*, 46(4), pp.1801–1809.
- Kaack, K., Schwarz, K.U., Brander, P.E., 2003. Variation in morphology, anatomy and chemistry of stems of *Miscanthus* genotypes differing in mechanical properties. *Ind. Crops Prod.* 17, 131–142. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(02\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(02)00093-6)
- Kalamaras, S.D. & Kotsopoulos, T.A., 2014. Anaerobic co-digestion of cattle manure and alternative crops for the substitution of maize in South Europe. *Bioresource Technology*.
- Kang, X. et al., 2019. Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, pp.1–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0>.
- Karimi, K., Shafiei, M. & Kumar, R., 2013. Progress in Physical and Chemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Biofuel Technologies: Recent Developments*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7>
- Karimi, K. & Taherzadeh, M.J., 2016a. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource Technology*, 200, pp.1008–1018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>.
- Karimi, K. & Taherzadeh, M.J., 2016b. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. *Bioresource Technology*.
- Karp, E.M. et al., 2015. Alkaline pretreatment of switchgrass. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 3, pp.1479–1491.
- Karp, E.M. et al., 2014. Alkaline pretreatment of corn stover: bench-scale fractionation and stream characterization. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, pp.1481–1491.
- Katukuri, N.R., Fu, S., He, S., Xu, X., Yuan, X., Yang, Z., Guo, R.-B., 2017. Enhanced methane production of *Miscanthus floridulus* by hydrogen peroxide pretreatment. *Fuel* 199, 562–566. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.014>
- Kiesel, A., Wagner, M. & Lewandowski, I., 2016. Environmental Performance of *Miscanthus*, Switchgrass and Maize: Can C4 Perennials Increase the Sustainability of Biogas Production? *Sustainability*, 9(1), p.5. Available at: <http://www.mdpi.com/2071-1050/9/1/5>.
- Kikas, T. et al., 2016. Basis of energy crop selection for biofuel production : Cellulose vs . lignin. *International Journal of Green Energy*, pp.49–54.
- Kim, J.S., Lee, Y.Y. & Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, pp.42–48.
- Klemm, D. et al., 2005. Cellulose : Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material *Angewandte Chemie International Edition*, 44, pp.3358–3393.

- Koçar, G. & Civa, N., 2013. An overview of biofuels from energy crops : Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 28, pp.900–916.
- Kolattuduky, P., 2001. Polyesters in higher Plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.
- Kothari, R. et al., 2014. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, pp.174–195. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.011>.
- Kouas, M. et al., 2017. Robust assessment of both biochemical methane potential and degradation kinetics of solid residues in successive batches. *Waste Management*, 70, pp.59–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.001>.
- Kumar, R., Singh, S. & Singh, O. V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), pp.377–391.
- Lambert, E. et al., 2019. Real Time and Quantitative Imaging of Lignocellulosic Films Hydrolysis by Atomic Force Microscopy Reveals Lignin Recalcitrance at Nanoscale. *Biomacromolecules*, 20, pp.515–527.
- Laperrière, W. et al., 2017. Optimal conditions for flexible methane production in a demand-based operation of biogas plants. *Bioresource Technology*, 245(June), pp.698–705. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.013>.
- Laurent, P. et al., 2016. *Étude technique , économique et environnementale sur l ' injection portée de biométhane dans le réseau de gaz*,
- Lazuka, A., 2018. *Production de synthons par des consortia microbiens à partir de paille de blé : approches macrocinétique , enzymatique et métaprotéomique*.
- Legland, D. et al., 2017. Histological quantification of maize stem sections from FASGA - stained images. *Plant Methods*, pp.1–11.
- Lekounougou, S.-T., 2008. *Evaluation et Compréhension des Mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois*. Thèse Docteur de l ' Université Henri Poincaré , Nancy-I.
- Lettinga, G., Rebac, S. & Zeeman, G., 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. , 19(9), pp.363–370.
- Li, M. et al., 2016. Alkali-based pretreatments distinctively extract lignin and pectin for enhancing biomass saccharification by altering cellulose features in sugar-rich Jerusalem artichoke stem. *Bioresource Technology*, 208, pp.31–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.053>.
- Li, W. et al., 2018. Methane production through anaerobic digestion: Participation and digestion characteristics of cellulose, hemicellulose and lignin. *Applied Energy*, 226(May), pp.1219–1228. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.05.055>.

- Li, M., Si, S., Hao, B., Zha, Y., Wan, C., Hong, S., Kang, Y., 2014. Mild alkali-pretreatment effectively extracts guaiacyl-rich lignin for high lignocellulose digestibility coupled with largely diminishing yeast fermentation inhibitors in *Miscanthus*. *Bioresour. Technol.* 169, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.017>
- Li, Y. et al., 2014. Thermophilic Solid-State Anaerobic Digestion of Alkaline-Pretreated Corn Stover. *Energy & Fuels*, (2).
- Li, M., Williams, D.L., Heckwolf, M., Leon, N. De, Hodge, D., 2017. Prediction of Cell Wall Properties and Response to Deconstruction Using Alkaline Pretreatment in Diverse Maize Genotypes Using Py-MBMS and NIR. *Bioenergy Res.* 329–343. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9798-z>
- Li, M., Yan, G., Bhalla, A., Maldonado-pereira, L., Russell, P.R., 2018. Physical fractionation of sweet sorghum and forage / energy sorghum for optimal processing in a biorefinery. *Ind. Crop. Prod.* 124, 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.002>
- Lin, L., Wen, L., Chen, S., Yang, X., Liu, X., Wan, C., 2015. Effect of alkaline treatment pattern on anaerobic fermentation of swine manure. *Process Biochem.* 50, 1710–1717. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.08.011>
- Luquet D, Clement-vidal A, Jaffuel S, Verdeil J 2018. Genotypic covariations of traits underlying sorghum stem biomass production and quality and their regulations by water availability : Insight from studies at organ and tissue levels. *Glob Chang Biol Bioenergy* 1–19 . doi: 10.1111/gcbb.12571
- Lygin, A. V. et al., 2011. Composition of cell wall phenolics and polysaccharides of the potential bioenergy crop – *Miscanthus*. *GCB*, 3, pp.333–345.
- Mahmood, A. & Honermeier, B., 2012. Chemical composition and methane yield of sorghum cultivars with contrasting row spacing. *Field Crops Research*, 128, pp.27–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2011.12.010>.
- Mancini, G. et al., 2016. Solvent Pretreatments of Lignocellulosic Materials to Enhance Biogas Production: A Review. *Energy and Fuels*, 30(3), pp.1892–1903.
- Masood, A. & Singh, B., 2017. Weed management in sorghum [*Sorghum bicolor* (L .) Moench] using crop competition : A review. *Crop Protection*, 95, pp.74–80.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S. & Llabrés, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes . An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74, pp.3–16.
- Mcfarlane, H.E. & Anett, D., 2014. The Cell Biology of Cellulose Synthesis., pp.1–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040240>
- Méchin, V., 2000. *Etude de facteurs biochimiques et génétiques explicatifs de la variabilité pour la valeur alimentaire du maïs fourrage*. Institut National Agronomique Paris-Grignon.

- Méchin, V. et al., 2005. In Search of a Maize Ideotype for Cell Wall Enzymatic Degradability Using Histological and Biochemical Lignin Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp.5872–5881.
- Méthanisation, A., 2014. Développement de projets bio-méthane/bio-GNV.
- Milien, M. et al., 2012. Visualization of the 3D structure of the graft union of grapevine using X-ray tomography. *Scientia Horticulturae*, 144, pp.130–140.
- Min, D.Y. et al., 2014. The structural changes of lignin and lignin-carbohydrate complexes in corn stover induced by mild sodium hydroxide treatment. *RSC Advances*, 4(21), pp.10845–10850.
- Mitchell, R.B. et al., 2016. Dedicated Energy Crops and Crop Residues for Bioenergy Feedstocks in the Central and Eastern USA. *Bioenergy Research*, 9, pp.384–398.
- Moiceanu, G. et al., 2016. Comparative study on biogas production using cow and swine manure mixed with *Miscanthus x giganteus* as substrate. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(5), pp.11968–11973.
- Moletta, R., 1990. La digestion anaérobie appliquée à la protection de l'environnement.
- Moletta, R., 2011. *La méthanisation* 2ème édit., Lavoisier.
- Monk, R.L., Miller, F.R. & McBee, G.G., 1984. Sorghum improvement for energy production. *Biomass*, 6(1–2), pp.145–153.
- Monlau, F., Barakat, A., et al., 2012. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology*.
- Monlau, F. et al., 2013. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3), pp.260–322. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389.2011.604258>.
- Monlau, F. et al., 2015. New opportunities for agricultural digestate valorization: current situation and perspectives. *Energy & Environmental Science*.
- Monlau, F., Sambusiti, C., et al., 2012. Predictive models of biohydrogen and biomethane production based on the compositional and structural features of lignocellulosic materials. *Environmental Science and Technology*, 46(21), pp.12217–12225.
- Morandi, F., Perrin, A. & Østergård, H., 2016. *Miscanthus* as energy crop : Environmental assessment of a miscanthus biomass production case study in France. *Journal of Cleaner Production*, 137, pp.313–321. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.042>.
- Morrison, T.A. et al., 1998. Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. *Crop Science*, 38(2), pp.455–460.
- Mosier, N. et al., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), pp.673–686.

- Motte, J.-C., 2013. *Digestion anaérobie par voie sèche de résidus lignocellulosiques*. Université de Montpellier II.
- Motte, J.C. et al., 2013. Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. *Bioresource Technology*.
- Motte, J.C. et al., 2015. Dynamic observation of the biodegradation of lignocellulosic tissue under solid-state anaerobic conditions. *Bioresource Technology*, 191, pp.322–326. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.130>.
- Motte, J.C. et al., 2014. Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. *Industrial Crops and Products*.
- Mueller-Harvey, I. et al., 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research*, 148(1), pp.71–85.
- Muller-Stover, D.S. et al., 2016. Anaerobic co-digestion of perennials: Methane potential and digestate nitrogen fertilizer value. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179(6), pp.696–704.
- Müller, W.-R., Frommert, I. & Jörg, R., 2004. Standardized methods for anaerobic biodegradability testing. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3, pp.141–158.
- Mussato, S.I., 2016. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*,
- Mustafa, A.M. et al., 2018. Effect of hydrothermal and Ca (OH)₂ pretreatments on anaerobic digestion of sugarcane bagasse for biogas production. *Bioresource Technology*, 259, pp.54–60. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.028>.
- Neves, L., Ribeiro, R., Oliveira, R., Alves, M.M., 2006. Enhancement of methane production from barley waste. *Biomass and Bioenergy* 30, 599–603. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.12.003>
- Norman, G.L., Michael, G.P. (Eds.), 1989. *Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation*.
- Nges, I.A., Li, C., Wang, B., Xiao, L., Yi, Z., Liu, J., 2016. Physio-chemical pretreatments for improved methane potential of *Miscanthus lutarioriparius*. *Fuel* 166, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.10.108>
- O’connor, R.T., Dupré, E.F. & McCall, E.R., 1958. Applications of Infrared Absorption Spectroscopy to Investigations of Cotton and Modified Cottons: Part II: Chemical Modifications. *Textile Research Journal*, 28(7), pp.542–554.
- Oliveira, J. V, Alves, M.M., Costa, J.C., 2015. Optimization of biogas production from *Sargassum* sp . using a design of experiments to assess the co-digestion with glycerol and waste frying oil. *Bioresour. Technol.* 175, 480–485. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.121>
- de Oliveira, D.M. et al., 2015. Ferulic acid: A key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal*, 13(9), pp.1224–1232.

- P. Nghiem, N., Montanti, J. & B. Johnston, D., 2016. Sorghum as a renewable feedstock for production of fuels and industrial chemicals. *AIMS Bioengineering*, 3(1), pp.75–91. Available at: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/bioeng.2016.1.75>.
- Pacetti, T., Lombardi, L. & Federici, G., 2015. Water-energy Nexus : a case of biogas production from energy crops evaluated by Water Footprint and Life Cycle Assessment (LCA) methods. *Journal of Cleaner Production*, 101, pp.278–291. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.03.084>.
- Paës, G., 2014. Fluorescent Probes for Exploring Plant Cell Wall Deconstruction: A Review. *molecules*, 19, pp.9380–9402.
- Patinvoh, R.J. et al., 2016. Innovative Pretreatment Strategies for Biogas Production. *Bioresource Technology*, 224(November), pp.13–24. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416316042>.
- Paul, S. & Dutta, A., 2018. Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Resources, Conservation and Recycling*, 130(November 2017), pp.164–174. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.12.005>.
- Pauly, M. et al., 2013. Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, pp.627–642.
- Pavlostathis, S.G. & Gossett, J.M., 1985. Alkaline treatment of wheat straw for increasing anaerobic biodegradability. *Biotechnology and bioengineering*, 27(3), pp.334–344.
- Peces, M., Astals, S. & Mata-alvarez, J., 2015. Effect of moisture on pretreatment efficiency for anaerobic digestion of lignocellulosic substrates. *Waste Management*, 46, pp.189–196. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.08.022>.
- Pelmont, J., 2008. *Glossaire de biochimie environnementale*, EDP Sciences.
- Perrier, Lisa, Lauriane Rouan, Sylvie Jaffuel, Anne Clément-vidal, Sandrine Roques, Armelle Soutiras, Christelle Baptiste, Denis Bastianelli, Denis Fabre, and Cécile Dubois. 2017. “Plasticity of Sorghum Stem Biomass Accumulation in Response to Water Deficit : A Multiscale Analysis from Internode Tissue to Plant Level” 8 (September): 1–14. doi:10.3389/fpls.2017.01516.
- Perrin, A. et al., 2017. Integrated design and sustainable assessment of innovative biomass supply chains : A case-study on miscanthus in France. *Applied Energy*, 204, pp.66–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.06.093>.
- Petersson, Anneli, Mette H. Thomsen, Henrik Hauggaard-Nielsen, and Anne Belinda Thomsen. 2007. “Potential Bioethanol and Biogas Production Using Lignocellulosic Biomass from Winter Rye, Oilseed Rape and Faba Bean.” *Biomass and Bioenergy* 31 (11–12): 812–19. doi:10.1016/j.biombioe.2007.06.001.
- Phuttaro C, Sawatdeenarunat C, Surendra KC, Boonsawang P (2019) Anaerobic digestion of hydrothermally-pretreated lignocellulosic biomass: Influence of pretreatment temperatures , inhibitors and soluble organics on methane yield. *Bioresour Technol* 284:128–138 . doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.114

- Pomar, F., F. Merino, and A. Ros Barceló. 2002. "O-4-Linked Coniferyl and Sinapyl Aldehydes in Lignifying Cell Walls Are the Main Targets of the Wiesner (Phloroglucinol-HCl) Reaction." *Protoplasma* 220 (1–2): 17–28. doi:10.1007/s00709-002-0030-y.
- Pu, Y. et al., 2008. The new forestry biofuels sector. , pp.58–73.
- Rabemanolontsoa, H. & Saka, S., 2016. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology*.
- Ramos-suárez, J.L. et al., 2017. Alkaline and oxidative pretreatments for the anaerobic digestion of cow manure and maize straw: Factors influencing the process and preliminary economic viability of an industrial application. *Bioresource Technology*, 241, pp.10–20.
- Raposo, F., Rubia, M.A. De & Borja, R., 2011. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), pp.861–877. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>.
- Ravindran, R. & Jaiswal, A.K., 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*.
- Reddy, N., Yang, Y., 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications *Trends in Biotechnology*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.002>
- Reina-Pinto, J.J., Yephremov, A., 2009. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.004>
- Riggio, S. et al., 2016. Mesophilic anaerobic digestion of farmyard manure of different origins in a batch leach-bed reactor: substrate characterization and process performance. *Waste Management*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.027>.
- Riggio, S, M Torrijos, G Vives, G Esposito, E D Van Hullebusch, J P Steyer, and R Escudíe. 2017. "Leachate Flush Strategies for Managing Volatile Fatty Acids Accumulation in Leach-Bed Reactors." *Bioresource Technology* 232. Elsevier Ltd: 93–102. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.060.
- Ripley, L.E., W.C. Boyle, and J.C. Converse. 1986. "Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes." *Journal (Water Pollution Control Federation)* 58 (5): 406–11.
- Rittmann, B.E., 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(2), pp.203–212.
- RMT Biomasse, 2013a. Fiche culture du miscanthus.
- RMT Biomasse, 2013b. Fiche culture du sorgho.
- Rogowska, D., 2017. Renewable materials as feedstock for energy production and other applications. *Nafta-gaz*, (10), pp.793–798.

- Rollin, J.A. et al., 2011. Increasing Cellulose Accessibility Is More Important Than Removing Lignin : A Comparison of Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation and Soaking in Aqueous Ammonia. *Biotechnology and bioengineering*, 108(1), pp.22–30.
- Romero-Güiza, M.S. et al., 2017. Improvement of wheat straw anaerobic digestion through alkali pre-treatment: Carbohydrates bioavailability evaluation and economic feasibility. *Science of The Total Environment*, 595, pp.651–659.
- Rossi, Claire, and Karsten Haupt. 2007. “Application of the Doehlert Experimental Design to Molecularly Imprinted Polymers : Surface Response Optimization of Specific Template Recognition as a Function of the Type and Degree of Cross-Linking.” *Anal Ytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 455–60. doi:10.1007/s00216-007-1484-8.
- Rouches, E., 2015. *Fungal pretreatment for lignocellulosic biomass anaerobic digestion*. Université de Montpellier.
- Rouches, E. et al., 2016. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 59, pp.179–198. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.317>.
- Rouches, E. et al., 2019. Solid-state anaerobic digestion of wheat straw : Impact of S / I ratio and pilot-scale fungal pretreatment. *Waste Management*, 85, pp.464–476. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.01.006>.
- Sambusiti, C. et al., 2013a. Effect of particle size on methane production of raw and alkaline pre-treated ensiled sorghum forage. *Waste and Biomass Valorization*.
- Sambusiti, C. et al., 2013b. Effect of sodium hydroxide pretreatment on physical, chemical characteristics and methane production of five varieties of sorghum. *Energy*.
- Sambusiti, C. et al., 2012. Influence of alkaline pre-treatment conditions on structural features and methane production from ensiled sorghum forage. *Chemical Engineering Journal*, 211–212, pp.488–492.
- Sambusiti, C. et al., 2012. Sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage and wheat straw to increase methane production. *Water Science and Technology*, pp.2447–2452.
- Sarkanen, K.V. & Ludwig, C.H., 1971. *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*,
- Sawatdeenarunat, C. et al., 2015. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*.
- Scalbert, A. et al., 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, 24(6), pp.1359–1362.
- Scarlat, N., Dallemand, J.F. & Fahl, F., 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renewable Energy*, 129, pp.457–472. Scheller, H. V, Pauly, M. & Loque, D., 2011. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Plant Biology*.
- Segal, L. et al., 1959. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10), pp.786–794.

- Shabina, Y., Chul-Hwan, K. & Ji-Young, L., 2015. Comparison between Solid-State and Powder- State Alkali Pretreatment on Saccharification and Fermentation for Bioethanol Production from Rice Straw. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, pp.37–41.
- Shah, F.A. et al., 2015. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Shah, T.A. et al., 2018. Effect of Alkali Pretreatment on Lignocellulosic Waste Biomass for Biogas Production. *International Journal of Renewable Energy Research*, 8(3), pp.24–32.
- Shi, X., Song, H., Wang, C., Tang, R., Huang, Z., Gao, T., Xie, J., 2010. Enhanced bio-hydrogen production from sweet sorghum stalk with alkalization pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Int. J. energy Res.* 662–672. <https://doi.org/10.1002/er>
- Shoemaker, C.E. & Bransby, D.I., 2010. *The Role of Sorghum as a Bioenergy Feedstock*,
- Shoham, Y., Lamed, R. & Bayer, E.A., 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends in Microbiology*, 7(7), pp.275–281.
- Siddique, M.N.I. & Wahid, Z.A., 2018. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *Journal of Cleaner Production*, 194(1), pp.359–371. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.155>.
- Singh, S. et al., 2015. Comparison of Different Biomass Pretreatment Techniques and Their Impact on Chemistry and Structure. *Frontiers in Energy Research*, 2(February), pp.1–12. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fenrg.2014.00062/abstract>.
- Sluiter, A., R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D. Templeton. 2008. “Determination of Extractives in Biomasse.” *National Renewable Energy Laboratory*. doi:10.1016/S0016-5085(08)62701-8.
- Soares Rodrigues, C.I., Jackson, J.J. & Montross, M.D., 2016. A molar basis comparison of calcium hydroxide , sodium hydroxide , and potassium hydroxide on the pretreatment of switchgrass and miscanthus under high solids conditions. *Industrial Crops & Products*, 92, pp.165–173. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.010>.
- Sole-Bundo, M., Carrere, H., Garfi, M., Ferrer, I., 2017. Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO). *Algal Res.* 24, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.025>
- Van Soest P.J., Robertson, J.D. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharide in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, pp.3583–3597.
- Solagro-Irstea, 2012. *Etat de l’art des digestats et de leurs procédés de post-traitement*,
- Sun, L. et al., 2013. Unveiling high-resolution, tissue specific dynamic changes in corn stover during ionic liquid pretreatment. *RSC Advances*, 3(6), pp.2017–2027.
- Sun, R., Lawther, J.M. & Banksb, W.B., 1997. A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*, 6, pp.1–8.

- Szlachta, J. et al., 2018. Effect of Mechanical Pre-Treatment of the Agricultural Substrates on Yield of Biogas and Kinetics of Anaerobic Digestion. *Sustainability*, 10(10), p.3669. Available at: <http://www.mdpi.com/2071-1050/10/10/3669>.
- Talebna, F., Karakashev, D. & Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*.
- Tambone, F. et al., 2010. Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic digestion through a comparative study with digested sludge and compost. *Chemosphere*, 81(5), pp.577–583.
- Tarasov, D., Leitch, M. & Fatehi, P., 2018. Lignin–carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: a review. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1),p.269.
- Thomas, H.L. et al., 2017. Sorghum Biomethane Potential Varies with the Genotype and the Cultivation Site. *Waste and Biomass Valorization*, 0(0), pp.1–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-017-0099-3>.
- Tolivia, D. & Tolivia, J., 1987. Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *Journal of Microscopy*, 148(1), pp.113–1.
- Torre, M., Rodriguez, A.R., Saura-calixto, F., 1992. Study of the Interactions of Calcium Ions with Lignin , Cellulose , and Pectin. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1762–1766. <https://doi.org/10.1021/jf00022a007>
- Torrijos, M., 2016. State of Development of Biogas Production in Europe. *Procedia Environmental Sciences*, 35, pp.881–889.
- Trably, E., Christophe, G. & Larroche, C., 2018. Production de biohydrogène - Voie fermentaire sombre. *Techniques de l'ingénieur*, (0).
- Travaini R, Martín-juárez J, Lorenzo-hernando A, Bolado-rodríguez S (2016) Ozonolysis : An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresour Technol* 199:2–12 . doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.143
- Trouche, G, D Bastianelli, T V Cao Hamadou, J Chantereau, J Rami, and D Pot. 2014. “Field Crops Research Exploring the Variability of a Photoperiod-Insensitive Sorghum Genetic Panel for Stem Composition and Related Traits in Temperate Environments.” *Elsevier B.V. Elsevier B.V.* doi:10.1016/j.fcr.2014.06.008
- Trulea, A., Vintilă, T., Popa, N., Pop, G., 2016. Mild alkaline pretreatment applied in the biorefinery of sorghum biomass for ethanol and biogas production. *AgroLife Sci. J.* 5.
- Tufaner, F. & Avsar, Y., 2016. Effects of co-substrate on biogas production from cattle manure : a review. *Environmental Science and Technology*.
- Tukey, J. 1949. “Comparing Individual Means in the Analysis of Variance.” *Biometrics* 5 (2): 99–114.
- Uellendahl H, Wang G, Møller HB, et al (2008) Energy balance and cost-benefit analysis of biogas production from perennial energy crops pretreated by wet oxidation. *Water Sci Technol* 58:1841–1847 . doi: 10.2166/wst.2008.504

- Valeria, M. & Santiago, C., 2011. C4 Plants Adaptation to High Levels of CO₂ and to Drought Environments. In A. Shanker, ed. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech.
- Vandenbrink, J.P. et al., 2010. A sorghum diversity panel biofuel feedstock screen for genotypes with high hydrolysis yield potential. *Industrial Crops and Products*, 31(3), pp.444–448. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.01.001>.
- Vandenbrink, J.P. et al., 2013. Tissue specific analysis of bioconversion traits in the bioenergy grass *Sorghum bicolor*. *Industrial Crops and Products*, 50, pp.118–130.
- Vandevivere, P., Baere, L. De & Verstraete, W., 2003. Types of anaerobic digesters for solid wastes. *Biomethanization of Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*, IWA Publis, pp.111–140.
- Vanholme, R. et al., 2010. Lignin Biosynthesis and Structure 1. *Plant Physiology*, 153(July), pp.895–905.
- Vasilakoglou, I. et al., 2011. Sweet sorghum productivity for biofuels under increased soil salinity and reduced irrigation. *Field Crops Research*, 120(1), pp.38–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2010.08.011>.
- Villaverde, J.J., Li, J., Ek, M., Ligeró, P., De Vega, A., 2009. Native Lignin Structure of *Miscanthus x giganteus* and Its Changes during Acetic and Formic Acid Fractionation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6262–6270. <https://doi.org/10.1021/jf900483t>
- Wahid, R. et al., 2015. Methane production potential from *Miscanthus* sp. : Effect of harvesting time , genotypes and plant fractions. *Biosystems Engineering*, 133, pp.71–80. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.03.005>.
- Wei, S., 2016. The application of biotechnology on the enhancing of biogas production from lignocellulosic waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), pp.9821–9836.
- Wertz, J.-L. & Bédué, O., 2013. *Lignocellulosic Biorefineries*
- Wilcox, W., 1964. *Preparation of decayed wood for microscopical examination*,
- Windpassinger, S. et al., 2015. Biomass and Bioenergy Designing adapted sorghum silage types with an enhanced energy density for biogas generation in temperate Europe. *Biomass and Bioenergy*, 81, pp.496–504. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.08.005>.
- Witek-krowiak, Anna, Katarzyna Chojnacka, Daria Podstawczyk, Anna Dawiec, and Karol Pokomeda. 2014. “Application of Response Surface Methodology and Artificial Neural Network Methods in Modelling and Optimization of Biosorption Process.” *Bioresource Technology* 160. Elsevier Ltd: 150–60. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.021.
- Wood, P.J., 1980. The Interaction of Direct Dyes with Water Soluble Substituted Celluloses and Cereal β -Glucans. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, 19(1), pp.19–23.
- Wu, L. et al., 2013. Sorghum as whole-crop feedstock for integrated production of fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, 49, pp.645–647. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.020>.

- Y., K. & D.J., N., 1985. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- α -L-arabinofuranosyl)-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow)-D-xylose as a component of Zea shoot cell walls. *Carbohydrate Research*, 137, pp.139–150.
- Yang, B.Y. & Montgomery, R., 2007. Alkaline degradation of invert sugar from molasses. *Bioresource Technology*, 98(16), pp.3084–3089.
- Yang, L. et al., 2015. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Yarbrough, J.M., Himmel, M.E. & Ding, S.Y., 2009. Plant cell wall characterization using scanning probe microscopy techniques. *Biotechnology for Biofuels*, 2.
- Yeats, T.H., Rose, J.K.C., 2013. Topical Review on Cuticle Synthesis and Function The Formation and Function of Plant Cuticles 1. *Plant Physiol.* 163, 5–20. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222737>
- Xu, J., Cheng, J.J., Sharma-shivappa, R.R., Burns, J.C., 2010. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 101, 2900–2903. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.015>
- Yun Yang, B. & Montgomery, R., 1996. Alkaline degradation of glucose: Effect of initial concentration of reactants. *Carbohydrate Research*, 280(1), pp.27–45.
- Zeng, Y. et al., 2014. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*.
- Zhang, W. et al., 2013. Three lignocellulose features that distinctively affect biomass enzymatic digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in Miscanthus. *Bioresource Technology*, 130, pp.30–37. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.029>.
- Zhang, Y. et al., 2013. Color quantification of stained maize stem section describes lignin spatial distribution within the whole stem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(13), pp.3186–3192.
- Zhang, Y. et al., 2011. Impact of lignin structure and cell wall reticulation on maize cell wall degradability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), pp.10129–10134.
- Zhang, Z. et al., 2015. Enhanced biogas production from sorghum stem by co-digestion with cow manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(21), pp.9153–9158. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.02.042>.
- Zheng, J. & Rehmann, L., 2014. Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), pp.18967–18984.
- Zheng, M. et al., 2009. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. *Bioresource Technology*, 100(21), pp.5140–5145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.045>.
- Zheng, Y. et al., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*.

Zhou, X. et al., 2017. Effect of hydrothermal pretreatment on Miscanthus anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 224, pp.721–726.



STUDY OF THE IMPACT OF ALKALINE PRETREATMENTS ON ANAEROBIC DIGESTION OF SORGUM AND MISCANTHUS

In the context of global warming and declining fossil fuel reserves, lignocellulosic biomass can provide a renewable source of energy, materials and chemicals. In particular, biogas production by anaerobic digestion is facing a fast development. This thesis project takes place in this biorefinery concept. Two different lignocellulosic biomasses, which present the advantage of combining high biomass production potential with minimal environmental impact, were studied. For this kind of biomass, it is well known that lignin acts as a barrier to the accessibility of compounds. The objective of this thesis was to study the impact of alkaline pre-treatments, known to be efficient in biomass delignification and thus improve its bioaccessibility and its degradation by anaerobic digestion. The study of the impact of these pre-treatments on the biochemical composition of biomasses and their methane production showed that these impacts were different according to the biomass and the operating conditions of the applied pre-treatments (reagent, duration, temperature, water content). With the aim of applying it in agricultural anaerobic co-digestion context, the impact of some of these pre-treatments of sorghum and miscanthus was studied in leach bed reactors. Sorghum was found to be an adequate co-substrate for manure. Finally, the original study of the mechanisms of action of these pre-treatments at the biomass anatomical structure scale showed that the pre-treatments act differently depending on the location and type of lignin. This thesis work therefore allows a better understanding of the impact of pre-treatments on different lignocellulosic biomasses.

DEFENDED ON 28TH MAY 2019 AT :



WITH THE FINANCIAL SUPPORT OF :



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Unité de recherche (UR0050) - Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

102, avenue des Etangs
F-11100 Narbonne
France

Tél. : + 33 4 68 42 51 51
Courriel: lbe-contact@supagro.inra.fr
www.montpellier.inra.fr/narbonne

