HAL
open science

Étude de faisabilité de la valorisation en bioraffinerie de biomasses issues de phytotechnologies : cas d'une plante hyperaccumulatrice (noccaea caerulescens) et d'un ligneux (salix viminalis)

Zahra Menana

To cite this version:

Zahra Menana. Étude de faisabilité de la valorisation en bioraffinerie de biomasses issues de phytotechnologies : cas d'une plante hyperaccumulatrice (noccaea caerulescens) et d'un ligneux (salix viminalis). Génie chimique. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0225 . tel-02102462

HAL Id: tel-02102462

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02102462v1

Submitted on 17 Apr 2019

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université de Lorraine
Faculté des Sciences et Technologies
École doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Laboratoire d'Études et de Recherche sur le MAtériau Bois EA 4370 UL-FST

THÈSE

présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lorraine
Spécialité : Sciences du Bois et des Fibres

par **Zahra MENANA**

ÉTUDE DE FAISABILITÉ DE LA VALORISATION EN BIORAFFINERIE DE BIOMASSES ISSUES DE PHYTOTECHNOLOGIES: CAS D'UNE PLANTE HYPERACCUMULATRICE (*NOCCAEA CAERULESCENS*) ET D'UN LIGNEUX (*SALIX VIMINALIS*)

Soutenue publiquement le Vendredi 21 Décembre 2018

Composition du jury :

Rapporteurs :

Roger GADIOU	Professeur, Université de Haute-Alsace, Mulhouse
Thierry RIBEIRO	Maître de conférences HDR, UniLaSalle, Beauvais

Examinateurs :

Emmanuel GUEDON	Directeur de recherche CNRS, Université de Lorraine
Léa VILCOCQ	Chargée de recherche CNRS, LGPC-Université Lyon1
Isabelle ZIEGLER-DEVIN	Maître de conférences, Université de Lorraine, Co-directrice de thèse
Nicolas BROSSE	Professeur, Université de Lorraine, Directeur de thèse

Invitée

Catherine SIRGUEY	Maître de conférences, Université de Lorraine

Remerciements

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet LORVER et je remercie les organismes qui sont à l'origine du financement, à savoir : le Fond Européen de Développement Régional et la Région Lorraine. Je voudrais remercier plus particulièrement les principales coordinatrices du projet : Sophie Guimont et Marie-Odile Simonnot, pour l'organisation des différentes plénières et réunions LORVER.

Mes sincères remerciements vont à Isabelle Ziegler-Devin et Nicolas Brosse, mes directeurs de thèse, qui m'ont offert la possibilité de travailler sur ce sujet aussi important que passionnant. Merci pour m'avoir suivie, soutenue et avoir été disponibles tout au long de ces trois années, merci pour vos qualités, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain, et pour tout le temps que vous avez consacré à corriger mon manuscrit. J'espère que vous êtes satisfaits du résultat final. Merci encore à Isabelle, le principal pilier du labo, de m'avoir formée sur les différentes chromatographies et de toujours trouver le temps pour m'expliquer, m'aider et décortiquer les résultats avec moi, même avec un emploi du temps bien chargé.

J'exprime mes remerciements à tous les membres de mon jury de thèse à savoir Thierry Ribeiro et Roger Gadiou, qui ont accepté d'évaluer et de rapporter mes travaux, et à Emmanuel Guedon, Léa Vilcocq et Catherine Sirguey pour avoir accepté de relire et d'examiner de près le manuscrit, ce qui a donné lieu à une discussion enrichissante et constructive lors de la soutenance.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Thibault Sterckeman, Damien Blaudez et Catherine Sirguey pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, c'est grâce à nos différentes discussions et à votre contribution que j'ai pu voir le bout du tunnel (j'avoue qu'au départ, on était un peu perdu dans le sujet !) mais aussi pour vos nombreux conseils scientifiques qui m'ont permis d'obtenir les meilleurs résultats possibles.

J'adresse un remerciement tout particulier à Catherine Sirguey qui a proposé de relire le manuscrit dans son intégralité et d'apporter les modifications nécessaires avant le dépôt final, merci d'y avoir consacré une partie de ton temps si précieux pour l'améliorer. Merci aussi d'avoir organisé les différentes sorties sur les parcelles de Jeandelaincourt.

Merci à Valérie Bert de l'INERIS et Michel Chalot de nous avoir fourni les différents échantillons de Saule, ce qui nous a permis de démarrer les travaux dans les meilleurs délais, et également à Thibault Sterckeman pour les échantillons de Noccaea.

Je souhaite également remercier Emmanuel Guedon de m'avoir accueilli plusieurs fois dans son laboratoire (LRGP à l'ENSAIA) pour pouvoir réaliser les nombreux essais de fermentation et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire. Merci de nous avoir aidé à trouver des pistes de valorisation pour les hydrolysats de Noccaea, et pour l'aide précieuse que tu m'as apporté quand je n'avais pas accès au site le soir. Merci pour les nombreuses discussions enrichissantes qu'on a pu avoir !

Merci à Aurélia Imbert, ma copine de toujours, pour ton amitié sans faille née en 2011 pendant un cours sur la formation du bois 😉 *et qui durera encore plus longtemps malgré la distance. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'appeler pour prendre de mes nouvelles, pour me dire que c'est bientôt fini et de m'encourager à chaque fois. Merci pour m'avoir fait découvrir la cuisine asiatique et la rando, pour les nombreux weekend shopping (j'avoue que ça me manque), et d'avoir tant insisté tous les mercredis pour que je vienne au sport (flemmarde que je suis).*

J'ai également fait la connaissance d'une belle personne lors de ma dernière année de thèse et je crois que tu es arrivée au bon moment, merci à Clémentine Vérove, avec qui j'ai partagé toutes les pauses du midi et également les pauses thé de 16h. Merci pour toutes nos sessions « râleries », oui parce qu'on n'est jamais contentes 😊*, pour avoir supporté tout le stress et la panique des derniers mois de thèse qui ont été particulièrement épuisants, et de toujours trouver les mots qui me réconfortent pour me remonter le moral quand il est au plus bas. Désolée pour tout le stress que je t'ai fait vivre. Merci d'avoir été là pour mon déménagement qui a été stressant pendant la rédaction, merci de m'avoir aidé à monter les meubles rouges de ma nouvelle cuisine* 😉*. Grâce à toi et à Aurélia j'ai découvert une nouvelle passion pour les chats.*

Merci aussi à Thibaud Sauvageon pour ta gentillesse et ta bonne humeur, François Gambier pour ta sympathie, ta disponibilité et de toujours répondre oui pour rendre service, Marie-Christine Lagel, Virginie Steinmetz, Marwa Brahim et Zineb Kebbi pour toutes les soirées, tous les bons moments partagés avec vous et pour votre gentillesse sans limite. Merci à Jingjing Liao pour tous les cadeaux et confiseries qu'elle nous ramène à chaque voyage en Chine et pour ton sourire rassurant au quotidien, et à Sébastien Ngwa-Obamé pour nos petites discussions autour d'un café.

Merci à Mathilde Guilpain qui a accepté de faire des analyses ICP sur mes échantillons même avec son programme chargé, et à Hélène Lichère, qui a pris le relais par la suite, merci pour ton sourire au quotidien et d'avoir accepté de partager ton bureau avec moi à l'arrivée des stagiaires pour échapper au bruit.

Mes remerciements vont également à Laurent Chrusciel pour sa bonne humeur, pour le café préparé avec soin chaque matin au laboratoire et de nous avoir gâté avec des glaces pendant les grosses chaleurs du mois de Juin.

Je remercie aussi tout le personnel administratif, Corinne Courtehoux et Laetitia Mouritany-Nantz qui sont toujours là pour faciliter les différentes démarches et pour les envois de courrier. Merci aux techniciens, à Nicolas Houssement pour les dépannages informatiques et à Manu pour la découpe des échantillons à la scie à ruban, qui répondent toujours présents pour rendre un service. Un énorme merci également à Hubert Chapuis, à Béatrice George et à Dominique Gérant pour leur sympathie et encouragements et pour avoir été là le jour de ma soutenance.

Merci à ma chère Chafia Tamazirt qui malgré le voyage à réussi à me sortir deux quiches et deux cakes la veille de ma soutenance, merci d'avoir fait le déplacement jusqu'à Nancy et d'avoir préparé tout le pot de thèse, je pense que la soutenance n'aurait pas eu le même goût sans ta présence et ton soutien. Un énorme merci à ma très chère Julie Medjeber, pour tes conseils si précieux et ta bienveillance.

Merci à ma meilleure amie Kahina Announe qui a toujours cru en mes capacités en toutes les circonstances, et qui malgré la distance qui nous sépare réussi toujours à me faire rire même dans les pires moments. Le destin a fait que tu ne sois pas là jour de ma soutenance mais je sais que tu as pensé à moi toute la journée et que tu m'as envoyé toutes tes bonnes ondes. Merci pour toute cette amitié à mlehnek.

Quitter le cocon familial n'est jamais facile pour personne, merci à mes parents de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi et pour tous les sacrifices qu'ils ont fait pour me permettre de venir en France, de poursuivre mes études dans les meilleures conditions et de m'avoir toujours soutenue dans mes choix. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances, et que j'ai pu vous rendre fière. Merci à mon seul et unique frère Bazil et à mes deux sœurs Fifi et Mima d'être toujours là à mes côtes et pour votre amour indéfectible depuis toujours.

Et pour finir je tiens à remercier Hamza qui a toujours été là pour moi et qui m'a toujours encouragée à aller de l'avant et à ne jamais baisser les bras même quand tout semble insurmontable, tu as toujours su trouver les bons mots pour me réconforter.

Merci à toutes les personnes qui ont croisé mon chemin, et qui ont fait de ces trois années de thèse une si belle aventure. Et encore une fois ***merci à vous tous****.*

« La réussite est l'accumulation d'échecs, d'erreurs, de faux départs, de confusions, et la volonté de continuer malgré tout »

Nick Gleason

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS viii
INTRODUCTION GÉNÉRALE 1
DÉMARCHE SCIENTIFIQUE 4
CHAPITRE I 5
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5
1. Pollution métallique : sources, risques et remédiation 7
1.1. Généralités 7
1.2. Sources de pollution 8
1.3. Effet des ETMs sur la santé 9
1.4. La phytoremédiation 10
1.4.1. Définition de la phytoremédiation 11
1.4.2. Disponibilité des ETMs dans le sol 14
1.4.3. Transfert et distribution des ETMs dans la plante 15
2. Voies de valorisation des biomasses contaminées 17
2.1. La pyrolyse 18
2.2. La gazéification 19
2.3. L'hydrométallurgie 19
2.4. Conception de catalyseurs métalliques 20
3. Qualité de la biomasse pour une valorisation en bioraffinerie 20
3.1. Cellulose 21
3.2. Hémicelluloses 22
3.3. Pectines 23
3.4. Lignines 25
3.5. Autres constituants « Extractibles » 26
4. Les procédés de prétraitement en bioraffinerie 27
4.1. Rôle du prétraitement 27
4.2. Types de prétraitement 27

4.2.1. Procédé Organosolv 28
4.2.2. Explosion à la vapeur 28
4.3. Efficacité du prétraitement 30
4.4. Sévérité du prétraitement et formation des inhibiteurs 30
5. De la biomasse aux biocarburants 33
5.1. Généralités 33
5.2. Conversion biochimique 33
5.2.1. Hydrolyse enzymatique 34
5.2.2. Fermentation 36
5.3. Marché et production 39
6. Contexte de l'étude : Le projet LORVER 39
6.1. Présentation du projet 39
6.2. Choix des espèces végétales 41
6.3. Description et intérêt des espèces étudiées 42
6.3.1. Une herbacée : *Noccaea caerulescens* (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey 42
6.3.2. Un ligneux : le saule (*Salix viminalis L.*) 44
Conclusion du chapitre 47
CHAPITRE II 48
MATÉRIELS ET MÉTHODES 48
1. Préparation des échantillons 50
1.1. Matériel végétal : collecte des échantillons 50
1.2. Séchage et broyage 51
1.3. Détermination du taux de matière sèche 51
2. Caractérisation chimique des biomasses 52
2.1. Détermination de la composition en ETMs des échantillons 53
2.1.1. Minéralisation (voie humide) 53
2.1.2. Dosage des ETMs par ICP-AES 54
2.2. Extraction au Soxhlet 55
2.3. Lignines de Klason et sucres totaux 55
2.3.1. Quantification de la lignine insoluble 55
2.3.2. Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie

HPAE-PAD 56
2.4. Extraction de l'holocellulose : délignification au chlorite 57
2.5. Extraction de l'alpha-cellulose..... 58
2.6. Quantification préliminaire des pectines de *Noccaea* par colorimétrie 58
3. Prétraitement organosolv du saule et valorisation des pâtes cellulosiques 61
3.1. Prétraitement Organosolv du saule contaminé 61
3.2. Composition en ETMs des fractions récupérées après purification et traitement organosolv..... 62
3.3. Hydrolyse enzymatique des pâtes..... 62
4. Prétraitement par explosion à la vapeur du saule et *Noccaea* et valorisation des pâtes cellulosiques 63
4.1. Procédé d'explosion à la vapeur (ou steam explosion)..... 63
4.1.1. Principe du procédé d'explosion à la vapeur 63
4.1.2. Le pilote d'explosion à la vapeur 65
4.1.3. Imprégnation acide et filtration 66
4.1.4. Conditions opératoires de SE 66
4.1.5. Analyses de la pâte après explosion à la vapeur 67
4.1.6. Détermination de la composition chimique de la pâte 67
4.1.7. Composition en ETMs de la fraction solide 67
4.2. Valorisation des pâtes obtenues par SE 68
4.2.1. Hydrolyse enzymatique 68
4.2.2. Fermentation des hydrolysats 69
4.2.3. Dosage des produits de fermentation par HPLC 74
5. Épuration du saule par des agents chélatants 75
6. Extraction et caractérisation des pectines de *Noccaea* 77
6.1. Extraction à l'oxalate d'ammonium et à l'acide citrique..... 77
6.2. Dialyse et lyophilisation..... 77
6.3. Analyse des monosaccharides dans la fraction liquide 79
6.4. Composition en ETMs des différentes fractions 79
6.5. Caractérisation des pectines extraites 79
6.5.1. Distribution de masse moléculaires 79

6.5.2. Analyse par spectroscopie FT-IR 80
CHAPITRE III 82
PRÉTRAITEMENT ET VALORISATION DU SAULE CONTAMINÉ 82
1. Introduction 84
2. Composition chimique des matières premières utilisées 85
3. Prétraitements 86
3.1. Le prétraitement organosolv 86
3.1.1. Rendement en cellulose et lignine 87
3.1.2. Distribution des ETMs après prétraitement 88
3.2. Explosion à la vapeur 90
3.2.1. Rendement en pâte cellulosique 92
3.2.2. Composition chimique de la pâte 94
3.2.3. Distribution des ETMs 98
3.3. Autres procédés de détoxification 101
3.4. Discussions 102
4. Hydrolyse enzymatique des pâtes 103
4.1. Hydrolyse des pâtes organosolv 103
4.1.1. Impact des ETMs résiduels 103
4.1.2. Cinétique et rendement d'hydrolyse 104
4.2. Hydrolyse des pâtes obtenues par SE 106
5. Fermentation des hydrolysats 108
6. Conclusion du chapitre 110
CHAPITRE IV 112
CARACTÉRISATION ET VALORISATION DE *NOCCAEA* : 112
1. Introduction 114
2. Étude de la composition chimique 115
2.1. Composition en ETMs 115
2.2. Composition chimique des *Noccaea* 115
2.3. Extraction et caractérisation des pectines 117
2.3.1. Rendements en pectines 117
2.3.2. Analyse des hydrolysats 119

2.3.3. Répartition des ETMs dans les fractions 120
2.4. Caractérisation des pectines 122
2.4.1. Distribution des masses moléculaires 122
2.4.2. Analyse FT-IR des pectines 123
2.5. Conclusion 125
3. Valorisation de *Noccaea caerulescens* en bioraffinerie 126
3.1. Prétraitement d'explosion à la vapeur 126
3.1.1. Conditions du prétraitement 126
3.1.2. Rendement en pâte cellulosique 127
3.1.3. Composition chimique de la pâte 129
3.1.4. Distribution des ETMs 136
3.2. Hydrolyse enzymatique et fermentation 138
3.2.1. Hydrolyse enzymatique 138
3.2.2. Fermentation 140
4. Conclusion du chapitre 142
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 146
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 152
LISTE DES FIGURES 171
LISTE DES TABLEAUX 174

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	Degré Celsius
µL	Microlitre
Al	Aluminium
As	Arsenic
Be	Béryllium
Ca	Calcium
CCA	Cuivre Chrome Arsenic
Cd	Cadmium
CETELOR	Centre d'essais textile lorrain
CH_3COOH	Acide acétique
Cl	Chlore
cm	Centimètres
Co	Cobalt
Cr	Chrome
CS	Sévérité combinée
Cu	Cuivre
ETMs	Éléments traces métalliques
F	Fluor
Fe	Fer
FEDER	Fonds européen de développement régional
FT-IR	Infra-rouge à transformée de Fourier
g	Gramme
h	Heure
H_2SO_4	Acide sulfurique
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hg	Mercure
HMF	Hydroxyméthylfurfural
I	Iode
ICP-AES	Inductively coupled plasma – Atomic emission spectroscopy
INERIS	Institut national de l'environnement industriel et des risques
K	Kelvin
K	Potassium
kg	Kilogramme
kWh	Kilowattheure

LERMAB	Laboratoire d'études et de recherche sur le matériau bois
LIEC	Laboratoire Interdisciplinaire des environnements Continentaux
LRGP	Laboratoire réaction génie des procédés
LSE	Laboratoire sol environnement
Mg	Magnésium
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitres
Mn	Manganèse
Mo	Molybdène
MJ	mégajoule
MS	Masse sèche
Na	Sodium
$NaClO_2$	Chlorite de sodium
NaOAc	Acétate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
Ni	Nickel
P	Phosphore
Pb	Plomb
PSM	Poste de sécurité microbiologique
S	Soufre
Sb	Antimoine
Se	Sélénium
SE	Steam explosion ou explosion vapeur
Si	Silicium
Sn	Étain
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry
TCR	Taillis à courte rotation
Ti	Titane
TTCR	Taillis à très courte rotation
V	Vanadium
Zn	Zinc

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La pollution aux éléments traces métalliques (ETMs) est devenue actuellement un vrai challenge à l'échelle de la planète et leur concentration dans l'environnement ne cesse d'augmenter. Cette pollution a différentes causes anthropiques :

- Les rejets de procédés industriels comme la métallurgie, la papeterie, les procédés miniers, la galvanoplastie, la production électronique, la production de batteries… ;
- Les retombées atmosphériques émises par des procédés d'incinération ou lors de la combustion de carburants ou de fioul (transports, chauffage…) ;
- L'utilisation intensive dans les pratiques agricoles de fertilisants, de produits phytosanitaires, et de boues d'épandage.

La pollution aux ETMs pose un problème particulier car contrairement aux composés organiques, ils ne sont pas biodégradables et s'accumulent dans l'environnement et se retrouvent via différents modes de transfert dans tous les niveaux trophiques de l'écosystème. Cette accumulation dans les sols est d'autant plus importante que les contraintes environnementales étaient peu contraignantes au plus fort de l'essor industriel. À ce jour, les mutations de l'économie ont mené à la fermeture de secteurs industriels et donc à l'abandon de surfaces souvent fortement polluées, appelées friches industrielles. En France la base de données BASOL, gérée par le Ministère de la Transition Écologique et Solidaire, recense ces sites et sols pollués ou potentiellement pollués. L'évolution de l'urbanisation dans les villes depuis les cent dernières années fait que ces friches industrielles sont aujourd'hui situées en zone urbaine ou péri-urbaine, entrainant une problématique et des risques sanitaires croissants. Face à cette situation alarmante, la décontamination des sols pollués est nécessaire pour minimiser l'impact sur l'homme mais également sur l'écosystème. Différentes techniques existent pour la décontamination des sols comme les méthodes chimiques (lavage des sols, oxydation chimique) qui consistent à dégrader partiellement ou totalement les polluants, et les méthodes physiques comme le confinement ou l'excavation. Cependant, ces dernières souffrent de certaines limitations, comme leur coût élevé, les contraintes techniques et le travail intensif du sol qui est à l'origine du changement de ses propriétés physico-chimiques. Parallèlement à ces méthodes, il existe une approche biologique qui

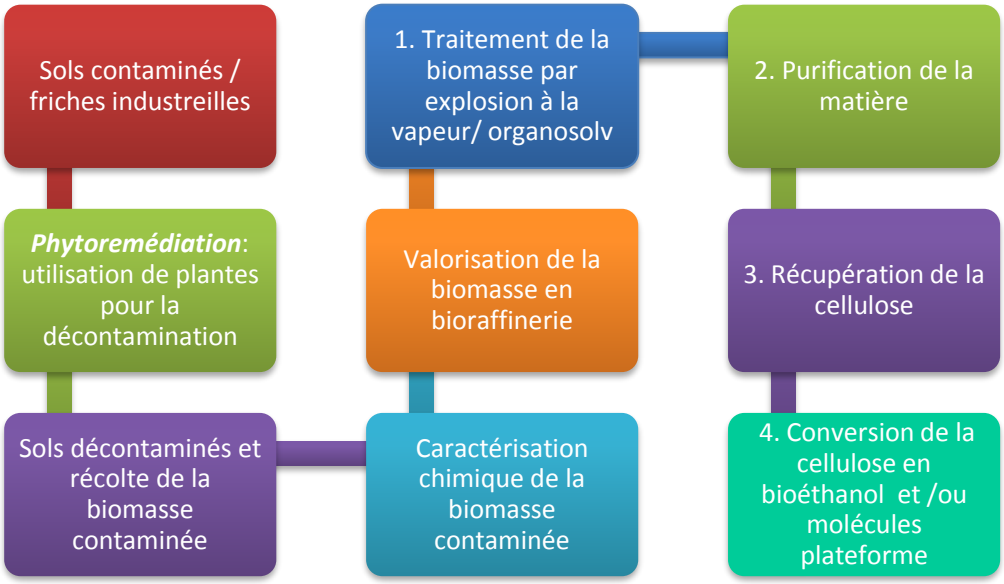
permet de détoxifier et de restaurer les sols de manière plus respectueuse de l'environnement, appelée « phytoremédiation ». Le principe de la phytoremédiation consiste en l'utilisation de plantes et des microbes associés pour traiter des sols contaminés en polluants organiques et métalliques. Concernant les ETMs, c'est une technique à faible coût qui a recours aux végétaux pour les extraire ou réduire leur biodisponibilité dans le sol. Outre les espèces accumulatrices et hyperaccumulatrices (*Noccaea caerulescens, Arenaria patula, Arabidopsis halleri*…) des ETMs, certaines espèces de plantes ligneuses (peuplier, saule) sont également utilisées en phytoremédiation en raison de leur croissance rapide et de leur capacité à vivre sur des sols contaminés. Cette technique conduit donc à la production de biomasse plus ou moins contaminée. Une gestion contrôlée de cette biomasse est indispensable pour éviter la propagation des contaminants dans l'écosystème. Des études ont montré qu'une valorisation énergétique de cette biomasse, avec une gestion des contaminants est possible par pyrolyse, par combustion ou même par gazéification (Lievens et al. 2008; Nzihou & Stanmore 2013; Han et al. 2018).

Face aux problématiques environnementales et économiques actuelles, la bioéconomie et l'économie circulaire apparaissent comme des solutions durables. La bioéconomie est basée sur le concept de bioraffinerie pour une mobilisation et une valorisation optimale de la biomasse par opposition à celle de la ressource fossile. Le bioraffinage consiste à fractionner la ressource pour la production de biocarburants et d'intermédiaires pour la chimie. L'étape clé de cette transformation est le prétraitement de la biomasse, dont le but est d'augmenter l'accessibilité de la matière lignocellulosique aux (bio)catalyseurs et aux micro-organismes. Cependant l'un des freins au développement de l'approche « bioraffinerie » est lié à l'approvisionnement et au prix de la matière première lignocellulosique. Il a ainsi été montré que le coût de la biomasse pouvait représenter de 40% à 50% du coût global de production de bioéthanol de seconde génération (Juneja et al. 2013). Dans ce contexte il apparait que l'utilisation en bioraffinerie de biomasses issues de phytoremédiation pourrait être d'un grand intérêt. Cette approche permettrait d'apporter des réponses à différentes problématiques :

- La mobilisation de terres contaminées impropres à la culture alimentaire ;
- L'utilisation de biomasses polluées et/ou présentant des teneurs en ETMs supérieures aux valeurs réglementaires ;

- La dépollution des sols par phytoextraction.

Cependant, des questions qui n'ont jamais été abordées dans la littérature scientifique se posent quant au devenir des polluants durant les procédés de bioraffinage, notamment durant l'étape de prétraitement. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, dont le but est d'étudier la faisabilité de la valorisation en bioraffinerie de biomasses issues de phytoremédiation pour la production de biocarburants et molécules plateforme par fermentation. Le schéma suivant résume les étapes clés du processus suivi :



DÉMARCHE SCIENTIFIQUE

Comme défini précédemment, l'objectif principal de ce travail est d'étudier la faisabilité de conversion de la biomasse contaminée dans une approche de bioraffinerie pour la production par fermentation de molécules plateforme de la bioraffinerie.

Deux types de biomasses, *Salix* sp plante ligneuse et *Noccaea caerulescens* plante herbacée hyperaccumulatrice, issues de procédés de phytoremédiation et contaminées avec du zinc (Zn), du manganèse (Mn) et du cadmium (Cd), ont été étudiées comme biomasses modèles. Notre travail est centré sur l'étude de l'impact de l'étape de prétraitement sur le devenir des ETMs. Le prétraitement constitue la première étape de transformation de la biomasse selon une approche de type bioraffinerie. Son but est d'altérer la structure de la lignocellulose afin de rendre ses composants accessibles. Nous nous sommes principalement intéressés au prétraitement par explosion à la vapeur qui est l'une des technologies les plus matures et les plus prometteuses. L'impact du procédé et de sa sévérité sur la répartition des ETMs dans les différentes fractions de biomasse récupérées est examiné. Enfin des études d'hydrolyse enzymatique à l'aide de cellulase sur les pâtes cellulosiques récupérées puis de fermentation ont été réalisées pour confirmer la faisabilité de l'approche « bioraffinerie ». Dans le cas du saule, le prétraitement organosolv à l'éthanol a également été étudié. Ce prétraitement, présente l'avantage de produire, outre un résidu cellulosique valorisable, une fraction de lignine relativement pure pour des applications futures. Concernant *Noccaea*, au début de nos travaux, il n'existait aucune donnée quant à la composition et à la valorisation de cette plante. La teneur élevée en pectines mise en lumière au cours de ce travail ouvre des perspectives de valorisation future.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. POLLUTION MÉTALLIQUE : SOURCES, RISQUES ET REMÉDIATION

1.1. GÉNÉRALITÉS

Dans le sol on retrouve divers types de contaminants organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les dioxines,… Parmi les contaminants inorganiques, on trouve les éléments traces métalliques (ETMs) comme l'arsenic, le chrome, le cobalt, le cadmium, le cuivre, le mercure, le manganèse, le nickel, et le zinc…

Les ETMs sont des éléments qui participent aux réactions chimiques sous forme de cations et jouent un rôle important dans les processus de la vie d'une cellule. Le terme « métaux lourds » est souvent utilisée dans la littérature mais reste très contesté (Duffus 2002). Les métaux lourds, par définition, sont des éléments dont la densité est comprise entre 3,5 g cm^{-3} et 7 g cm^{-3} avec un numéro atomique supérieur ou égal à 20, regroupant les métaux de transition et certains métalloïdes qui peuvent être potentiellement toxiques ou écotoxiques, ils forment aussi des précipités insolubles avec le sulfure (Duffus 2002; Wang & Chen 2006) et expriment également une certaine toxicité. Tous les métaux lourds essentiels ou non essentiels sont toxiques à forte dose. En très faibles quantités, certains de ces éléments sont essentiels au développement des organismes vivants, appelés micronutriments ou microéléments (Fe, Zn, Mn, Cu, Ni). Cependant d'autres éléments sont toxiques même à faible concentrations dans l'environnement (Cd, Pb, Hg, As) (Zovko & Romić 2011). Le terme « métaux lourds » a été remplacé dans les dernières années par l'appellation « Éléments Traces Métalliques » ou ETMs qui est de plus en plus utilisé, permettant de regrouper les métaux lourds avec des éléments moins lourds comme l'aluminium (Al) et le béryllium (Be) et des éléments non métalliques comme l'arsenic (As) ou le sélénium (Se).

L'air, l'eau, le sol et même tous les niveaux trophiques[1] de l'écosystème sont à l'heure actuelle menacés par la pollution aux ETMs. Cette dernière est la résultante de plusieurs facteurs, qu'ils soient anthropiques ou naturels. Contrairement aux substances organiques,

[1] Défini la position d'un organisme dans une chaine alimentaire (producteur, consommateur, décomposeur)

les ETMs ne sont pas biodégradables, s'accumulent dans l'environnement et peuvent rester jusqu'à 1000 ans dans le sol (Aryal & Liakopoulou-Kyriakides 2015; Vassilev et al. 2004). Avec l'utilisation croissante des produits agrochimiques pour maintenir et améliorer la fertilité des sols (fertilisants, engrais), certains éléments toxiques comme le cadmium sont introduits dans les sols agricoles constituant une menace potentielle pour la chaîne alimentaire (Truong et al. 2010). Selon la base de données des sols pollués en France **BASOL** (https://basol.developpement-durable.gouv.fr) **70,07 %** des sols et nappes phréatiques sont touchés par la pollution. Ces chiffres indiquent que la pollution touche les composantes de base de l'écosystème et montrent la gravité de la situation et la nécessité de réagir rapidement et efficacement.

1.2. SOURCES DE POLLUTION

Les ETMs sont naturellement présents dans le sol. Ils proviennent en premier lieu du fond géochimique qui résulte de l'évolution de la roche mère (phénomène naturel). Cependant, leur teneur dans le sol augmente de plus en plus, du fait d'apports directs ou indirects liés aux activités humaines et à la forte croissance démographique. Il existe plusieurs sources de pollution, comme les retombées atmosphériques, qui sont principalement issues de l'activité industrielle, du trafic automobile ainsi que des poussières et aérosols qui proviennent des usines d'incinération et les effluents des stations d'épuration et des industries papetières (Wang & Björn 2014). Le secteur agricole est également une réelle source de pollution aux ETMs. En effet, l'utilisation intensive des fertilisants, des engrais phosphatés, et également des pesticides et herbicides participe de manière non négligeable à la pollution du sol (Siegel 2002). Le tableau 1 présente quelques applications industrielles génératrices d'ETMs.

Tableau 1. Quelques utilisations des ETMs potentiellement toxiques (Siegel 2002)

Arsenic (As)	Additif pour alimentation animale, préservation du bois (CCA), herbicides, pesticides, fongicides, textiles et tanneries, pigments et peintures, filtres de lumières, feux d'artifices
Cadmium (Cd)	Batteries Ni/Cd, revêtements anticorrosifs, alliages, absorbeur de neutrons dans les réacteurs nucléaires, engrais, fertilisants
Chrome (Cr)	Pigments, textiles et tanneries, traitement du bois, audio, vidéo et stockage de données
Cuivre (Cu)	Conducteur de chaleur et d'électricité, conduites d'eau, ustensiles de cuisine, équipements pharmaceutiques, pigments et alliages
Manganèse (Mn)	Batteries, catalyseurs, fongicides, pigments, baguettes de soudage, préservation du bois,
Nickel (Ni)	Alliages en sidérurgie, galvanoplastie, pigments pour peintures, prothèses chirurgicales et dentaires, composants d'ordinateur, catalyseur
Plomb (Pb)	Agents antidétonants, batteries plomb-acide, pigments, verreries et céramiques, gaines de câbles, tuyaux, soudures
Zinc (Zn)	Alliages de zinc (bronze, laiton), revêtement anticorrosion, batteries, stabilisants PVC, médicaments, peintures, industrie du caoutchouc

1.3. EFFET DES ETMS SUR LA SANTÉ

En fonction de leur rôle dans les systèmes biologiques, les ETMs sont classés en essentiels et non essentiels. Les ETMs essentiels à la vie des organismes sont le Fe, le Mn, le Cu, le Zn et le Ni. Par ailleurs les ETMs non essentiels, sont le Cd, le Pb, l'As, le Hg, et le Cr. Au-delà des seuils limites d'exposition, les ETMs deviennent toxiques pour l'homme et l'environnement.

Tableau 2. Micronutriments et éléments non-essentiels pour le fonctionnement optimal des processus biologiques et des organes chez l'homme (Siegel 2002)

Micronutriments essentiels (ETMs) **(Quelques mg ou µg par jour)**	As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, V, Zn
ETMs non-essentiels	Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Ti
Macronutriments **(100 mg ou plus par jour)**	Ca, Cl, Mg, P, K, Na, S
Autres micronutriments essentiels	F, I, Si

Les ETMs peuvent être responsables de l'apparition de graves problèmes de santé, qui ont par exemple été souvent observés chez les mineurs, en raison de leur exposition permanente aux poussières lors de l'extraction des ETMs.

Outre l'exposition permanente aux différentes sources d'ETMs, l'homme peut être contaminé par le biais de la chaîne trophique, par le phénomène de bioaccumulation, permettant le passage des ETMs d'un niveau trophique à un autre. En effet, les ETMs présents dans le sol, sont absorbés par la plante, et se transfèrent dans la chaine trophique jusqu'au dernier consommateur, qui peut être l'homme. Le dépassement de la dose limite d'exposition peut provoquer l'apparition de certaines maladies, comme les cancers et également affecter le système nerveux, en provoquant des troubles neurologiques (Clarkson 1987). On considère que le cadmium est le métal le plus dangereux car il interfère avec le calcium dans le système biologique (Flora et al. 2012).

1.4. LA PHYTOREMÉDIATION

Il existe plusieurs méthodes de détoxification et de réhabilitation des sols pollués. Elles sont, cependant, pour la plupart coûteuses et provoquent même parfois un changement des propriétés physico-chimiques du sol, ce qui les rend infertiles car elles éliminent toute la faune et la flore ainsi que les champignons du sol nécessaires pour la fixation de l'azote par les plantes (Marques et al. 2009). Différentes méthodes existent pour le traitement des sols contaminés comme :

- Des méthodes chimiques : le lavage du sol, l'oxydation chimique, la vitrification ;
- Des méthodes physiques : le remplacement de sol, la désorption thermique ;
- Des méthodes biologiques : la phytoremédiation, la bioremédiation ;

1.4.1. DÉFINITION DE LA PHYTOREMÉDIATION

L'idée d'utiliser les plantes pour détoxifier et éliminer les ETMs du sols a été introduite en 1983, mais le concept a été mis en œuvre il y a 300 ans sur les rejets d'eaux usées (Blaylock 2000). La phytoremédiation est définie comme « *une technique de dépollution et de restauration des sols, utilisant les plantes pour absorber, éliminer ou immobiliser les contaminants du sol en présence des organismes microbiens de la rhizosphère* » (Lasat 2000; Baker et al. 1994; Salt et al. 1995; Cunningham & Berti 1993; Marques et al. 2009). Écologique et peu coûteuse, la technique peut nécessiter de nombreuses années pour une détoxification totale du sol. Le développement de cette technique s'explique par les coûts élevés des autres méthodes de remédiation et la volonté d'utiliser une méthode écologique et durable (Kvesitadze et al. 2006). D'ailleurs, selon Prasad (Prasad 2003) la phytoremédiation coûterait 5% du coût total des méthodes alternatives physiques et chimiques. Les plantes utilisées généralement en phytoremédiation sont divisées en plantes non accumulatrices, accumulatrices et hyperaccumulatrices d'ETMs. Le tableau 2 présente quelques espèces utilisées pour la phytoremédiation des sols contaminés.

Tableau 3. Liste des espèces végétales utilisées en phytoremédiation

Catégorie	**Espèces**	**ETMs**	**Références**
Hyperaccumulatrices	*Noccaea caerulescens*	Zn, Ni, Cd, Pb	(Dinh et al. 2015; Schwartz et al. 2003)
	Alyssum murale	Ni	(Bani et al. 2007)
	Berkheya coddii	Ni, Co, Pb	(Keeling et al. 2003)
Accumulatrices	*Cannabis sativa* L. (Chanvre)	Cd, Zn	(Linger et al. 2005)
	Urtica dioica (Ortie)	Pb, Zn	(Viktorova et al. 2017)
	Brassica juncea (moutarde indienne)	Cd, Pb	(Goswami & Das 2015)
Non-accumulatrices ou accumulatrices selon le génotype	Peuplier	Zn, Cu, Mn	(Wang & Jia 2010; Algreen et al. 2014)
	Saule (*Salix viminalis*)	Zn, Mn, Cd	(Algreen et al. 2014)
	Miscanthus	Pb, Cd, Zn	(Figala et al. 2015; Nsanganwimana et al. 2014)

Dans l'approche « phytoremédiation » on peut distinguer plusieurs stratégies (Favas et al. 2014; Ali et al. 2013; Salt et al. 1995) (figure 1) :

- ***La phytovolatilisation :*** phénomène de conversion des polluants en forme non-toxique volatile qui sont ensuite libérés dans l'atmosphère ;
- ***La phytodégradation :*** les polluants organiques sont dégradés à l'intérieur des tissus en présence d'enzymes spécifiques ;
- ***La phytoextraction :*** c'est le phénomène d'absorption et de translocation des contaminants organiques ou inorganiques depuis les racines jusqu'aux parties aériennes où ils seront stockés ;
- ***La phytostabilisation :*** est utilisée par la plante pour immobiliser ou limiter la biodisponibilité des polluants organiques ou inorganiques dans le sol ou à l'intérieur des cellules du système racinaire par l'action des exsudats racinaires ;
- ***La rhizodégradation :*** c'est la dégradation des polluants organiques dans la rhizosphère en présence des microorganismes rhizosphériques.

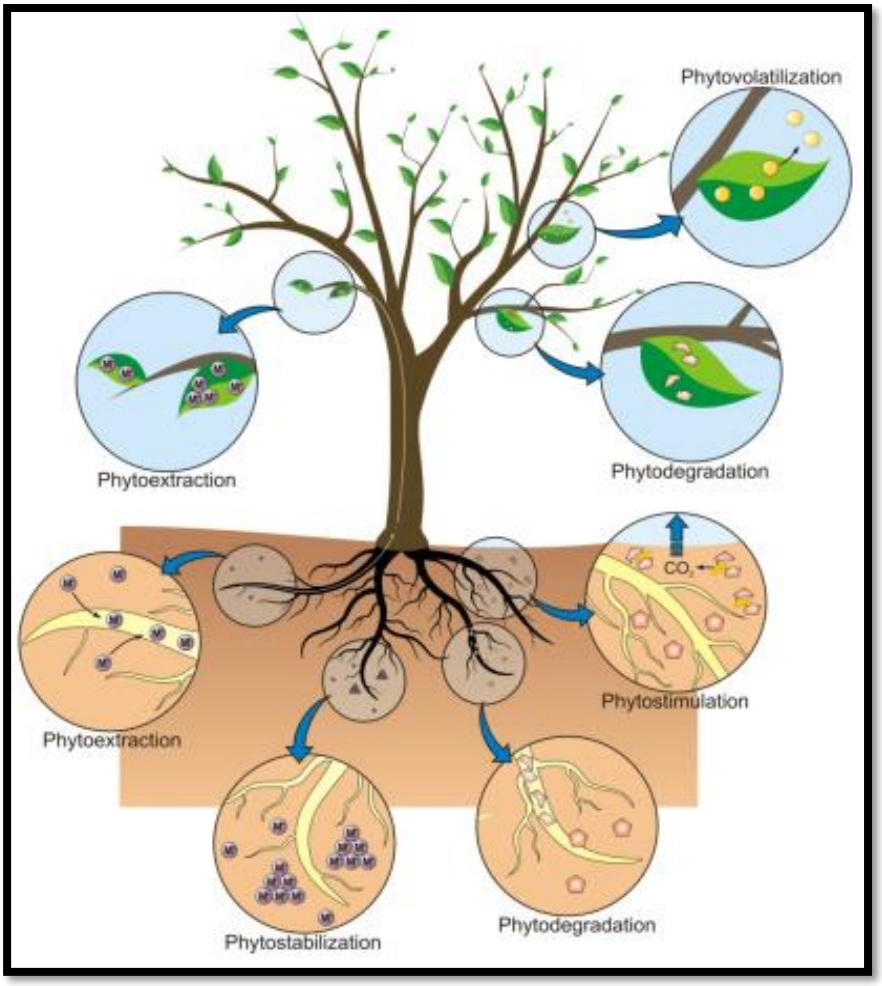


Figure 1. Représentation schématique des stratégies de phytoremédiation (Favas et al. 2014)

Les plantes optimales en phytoremédiation (processus de phytoextraction), devraient non seulement être capables de tolérer et d'accumuler des teneurs élevées en ETMs mais également avoir une croissance rapide et un taux de production de biomasse important. Pourtant la plupart des plantes hyperaccumulatrices sont de petite taille, avec une croissance lente (Salt et al. 1995). Elles peuvent toutefois accumuler des quantités supérieures à 1% (matière sèche) d'ETMs dans leur tissus (Baker & Brooks 1989; Gleba et al. 1999). Les plantes hyperaccumulatrices sont connues pour être des espèces endémiques des sols métallifères (Schat & Aarts 2003) et représentent environ 0,2 % des angiospermes (Baker & Brooks 1989) correspondant à environ 400 espèces identifiées (Li et al. 2003). Dans la catégorie des plantes accumulatrices on trouve le chanvre, l'ortie, la moutarde, la menthe et bien d'autres espèces (Augustina & Adriana 2014; Mahmood et al. 2013; Subramanian et al. 2012). Le tableau 3 suivant montre la comparaison entre la concentration en ETMs dans les feuilles chez une

plante « normale » et une plante accumulatrice vivant sur des sols métallifères. Les concentrations sont 1000 fois plus élevées que chez les plantes dites « normales » (Reeves et al. 1995).

Tableau 4. Teneurs en ETMs dans les feuilles de plantes normales et hyperaccumulatrices ($mg.kg^{-1}$)

Métal	**Plante normale ($mg.kg^{-1}$)**	**Plante hyperaccumulatrice ($mg.kg^{-1}$)**
Nickel	10	10 000 – 40 000
Zinc	400	10 000 – 50 000
Cuivre	25	1000 – 12 500
Cobalt	5	1000 – 10 000
Chrome	5	1000 - 2500

L'une des limitations de la phytoremédiation est le temps nécessaire pour une réhabilitation et une détoxification totale du sol, qui prend généralement plusieurs années. Ainsi, même les plantes hyperaccumulatrices les plus performantes en termes d'accumulation en ETMs identifiées comme Noccaea caerulescens, prendraient en culture continue, près de 15 ans pour une purification totale du sol (Salt et al. 1995). Le rendement d'extraction varie en fonction de l'élément. Ainsi la décontamination du Zn demandera plus de temps que celle du Cd. Par ailleurs, d'après Sterckeman & Puschenreiter. (2018), les rendements d'extraction du Cd avec Noccaea varient fortement entre les essais avec des temps de décontamination pouvant aller de 5 ans à plus de 40 ans selon les conditions.

1.4.2. Disponibilité des ETMs dans le sol

La présence des ETMs dans le sol est due à l'activité humaine et à certains facteurs naturels, tels que les cycles biogéochimiques. Dans les sols, seule une fraction des ETMs totaux, appelée fraction disponible, est potentiellement accessible pour le prélèvement racinaire que les plantes soient hyperaccumulatrices ou non. Dès lors, l'efficacité de la phytoextraction pour la réhabilitation des sols contaminés, dépend fortement de la disponibilité des ETMs dans le sol.

Différentes formes chimiques des ETMs sont à considérés dans les sols (Salt et al. 1995):

- Les ions métalliques libres et complexés dans la solution du sol ;
- Les ions métalliques occupant les sites d'échange d'ions, plus précisément adsorbés aux constituants organo-minéraux du sol ;
- Les précipités ou composés insolubles, en particulier des oxydes, carbonates et des hydroxydes ;
- Les ETMs inclus dans la structure des minéraux silicatés ;

Plusieurs facteurs comme la température, l'acidité (pH) et l'activité bactérienne influencent la mobilisation, la dispersion, la concentration ainsi que la distribution des ETMs dans l'environnement ainsi que les propriétés physico-chimiques du sol (Robinson et al. 2005; Siegel 2002). La matière organique du sol joue également un rôle très important dans l'absorption des ETMs du sol par la plante (Kvesitadze et al. 2006).

Autrefois utilisés comme source de micronutriments dans le sol et pour maintenir la solubilité des micronutriments dans les solutions hydroponiques, les agents chélatants peuvent aussi jouer un rôle important dans la disponibilité des ETMs dans le sol. En effet, le complexe formé (métal-chélatant) prévient la précipitation et la sédimentation des ETMs les rendant accessibles aux plantes, dont certaines sont capables de les décomposer grâce aux exsudats racinaires (Salt et al. 1995). Comme mentionné précédemment, le pH est important pour contrôler la solubilité et la disponibilité des ETMs dans le sol. En effet, plusieurs études ont montré qu'un pH acide diminue l'adsorption des ETMs qui restent mobiles dans le sol (Salt et al. 1995; DalCorso 2012), et deviennent plus accessibles pour les végétaux. Dans le sol, la plupart des ions métalliques portent une ou plusieurs charges positives et peuvent être retenus par les sites de liaisons négatives de la matrice du sol, c'est pourquoi le pH affecte considérablement la disponibilité et la mobilité des ions métalliques dans la rhizosphère (Robinson et al. 2005).

1.4.3. TRANSFERT ET DISTRIBUTION DES ETMS DANS LA PLANTE

Avec leur système racinaire, les plantes puisent les éléments minéraux du sol sous forme d'ions inorganiques. Les éléments essentiels qui regroupent les **macronutriments** et les **micronutriments** sont nécessaires au métabolisme de la plante leur permettant d'assurer leurs fonctions biologiques et physiologiques. En effet, leur absence peut causer des dysfonctionnements qui vont jusqu'à l'inhibition de la croissance et la reproduction. Les

micronutriments sont donc indispensables mais à de faibles quantités.

Les ions métalliques libres dans la solution du sol sont absorbés en même temps que l'eau par le système racinaire, impliquant le même processus physiologique que pour le transport des éléments nutritifs (Kvesitadze et al. 2006). Le transfert des ions métalliques depuis les racines jusqu'au parties aériennes se fait par le biais de transporteurs spécifiques, localisés au niveau des cellules racinaires et du xylème (Manara 2012). Les ETMs peuvent être transportés dans la sève jusqu'aux feuilles qui constituent les organes de stockage les plus importants chez les plantes hyperaccumulatrices. Les plantes supérieures possèdent des systèmes très efficaces pour l'acquisition d'ions métalliques (ex. Fe, Zn) et d'autres nutriments inorganiques (ex. Ca, Mg, K) du sol. Ceux-ci sont basés sur un petit nombre de mécanismes de transport, ce qui suggère que différents cations métalliques sont co-transportés à travers la membrane plasmique dans les racines. Les ETMs toxiques, tels que le Cd et le Pb, n'ayant pas de fonction biologique connue, il est probable qu'ils ne pénètrent pas dans les cellules via des transporteurs spécifiques mais par des transporteurs cationiques à large spectre (Manara 2012). En effet, chez les plantes hyperaccumulatrices, les recherches menées soutiennent l'idée que les gènes supposés être impliqués dans l'hyperaccumulation et l'hypertolérance ne sont pas nouveaux ou spécifiques à une espèce, mais sont plutôt exprimés et régulés de manière différente, par rapport aux espèces non hyperaccumulatrices (Verbruggen et al. 2009). La biodisponibilité de ces éléments pour la plante est affectée et contrôlée par plusieurs facteurs, comme les conditions climatiques et pédologiques, le génotype de la plante ou la réponse de la plantes à ces éléments, comme l'indique Chojnacka et al. (2005) la répartition des ETMs entre les organes de la plante est également variable d'une espèce à l'autre. Elle est par exemple décroissante en allant des racines jusqu'aux graines chez les espèces fibreuses comme le lin et le chanvre. En revanche, dans le cotonnier la distribution est différente, les ETMs s'accumulent plus dans les feuilles et les graines, comme le montre Angelova et al. (2004). L'accumulation de concentrations importantes d'ETMs chez certaines espèces peut provoquer un stress oxydatif entrainant la formation de radicaux libres. En réponse, la plante peut déclencher des mécanismes de défense face à ce stress lui permettant de prévenir ou de réduire les dommages causés par les concentrations importantes en ETMs dans ses cellules. Ainsi pour mieux s'adapter à son environnement, la plante est alors amenée à sécréter des enzymes participant au phénomène de détoxification (Kvesitadze et al. 2006). De plus, grâce

à leur membrane cellulaire les cellules des différents tissus peuvent contrôler la concentration en ETMs rentrant dans le cytoplasme (Manara 2012). En plus du transfert des racines jusqu'aux parties aériennes, les ETMs peuvent également se déposer sur les feuilles (retombées atmosphériques) et pénétrer via les stomates (petite ouverture présente sur l'épiderme et qui permet les échanges gazeux) (Kvesitadze et al. 2006). Ainsi, une variation saisonnière de la concentration en ETMs a été observée chez le hêtre (*Fagus silvatica L.*) avec une distribution radiale des éléments Cd, Pb et Zn dans le xylème, et avec une concentration importante en Zn au niveau du centre du tronc (Hagemeyer et al. 1992). De telles informations peuvent dès lors être utilisées comme marqueurs de périodes de pollution en dendrochronologie.

2. VOIES DE VALORISATION DES BIOMASSES CONTAMINÉES

Le traitement et la valorisation de biomasses issues de phytoremédiation constituent un vrai challenge. En effet, la présence d'ETMs dans cette biomasse rend le champ de valorisation de cette dernière limitée. Le traitement de ce type de matière constitue en même temps un enjeu environnemental et économique. Une gestion inappropriée, peut conduire à des traitements supplémentaires et coûteux. Dans leur étude Evangelou et al (Evangelou et al. 2012) proposent un schéma des multiples possibilités de valorisation des biomasses issues de phytoremédiation (figure 13).

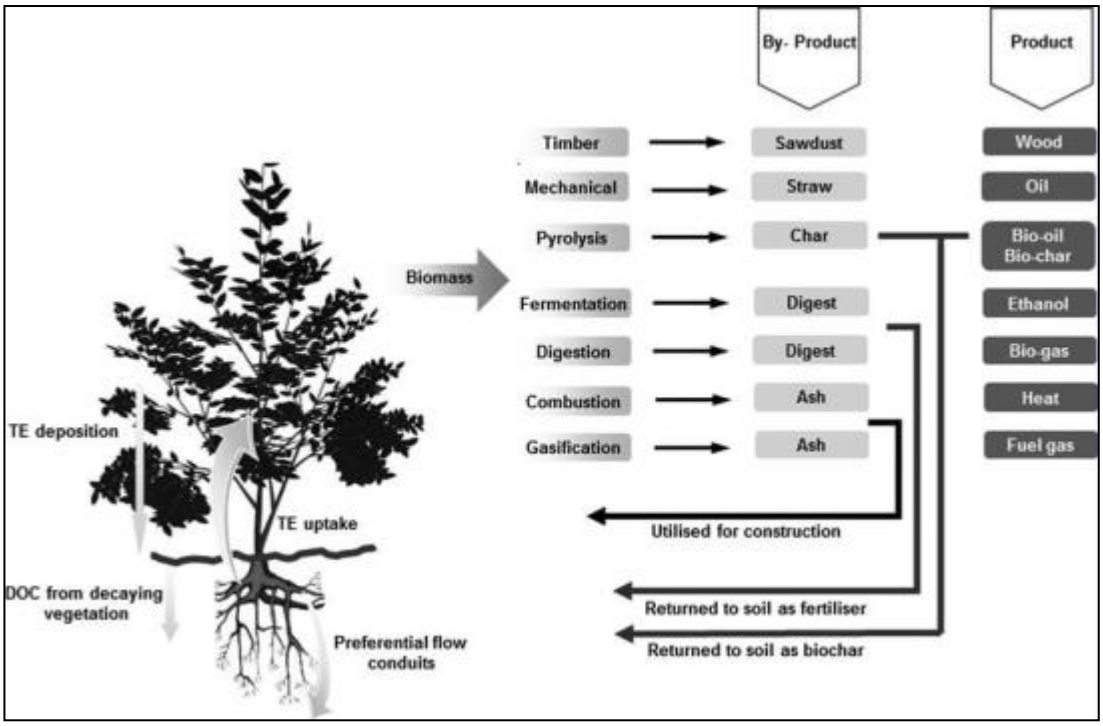


Figure 2. Schéma des valorisations possibles des biomasses issues de phytoremédiation (Evangelou et al. 2012)

Quelques voies de traitement envisageables pour les biomasses contaminées sont présentées ci-dessous.

2.1. LA PYROLYSE

La pyrolyse est définie comme la décomposition thermochimique de la biomasse lignocellulosique en absence d'oxygène pour former du charbon ou biochar, des bio-huiles ou des gaz pyrolytiques. La pyrolyse de la biomasse a lieu dans une gamme de température allant de 300 à 800 °C (Kan et al. 2016; Sharma et al. 2015; Briens et al. 2008). Le traitement des biomasses polluées par pyrolyse a beaucoup été étudié dans la littérature (Lievens et al. 2008; Debela et al. 2012; Gong et al. 2018) tout en s'intéressant également au devenir des ETMs pendant le procédé. Dans leurs travaux, Lievens et al. (2009) ont étudié la pyrolyse rapide du saule contaminé avec des teneurs élevées en Cd, Cu, Pb et Zn. Elle conduit à la récupération des ETMs dans le charbon à des teneurs allant jusqu'à 90 % tandis que très peu d'éléments sont retrouvés dans la phase gazeuse. Des résultats similaires ont été obtenu par Stals et al. (2010). À côté des espèces ligneuses, Zhong et al. (2016) se sont intéressés à la pyrolyse lente et rapide d'une plante hyperaccumulatrice (*S. plumbizincicola)* pyrolysée à des températures

allant de 450 à 750 °C. L'étude montre que 43,6 % du Zn est récupéré dans le charbon contre 54,4 % dans l'huile de pyrolyse. Le Pb et le Cd se retrouvent essentiellement dans la bio-huile avec des teneurs de 73,6 % et 87,6 % respectivement. Keller et al. (2005) ont également étudié le traitement thermique du saule et *Noccaea* cultivés sur sols contaminés.

2.2. LA GAZÉIFICATION

La gazéification constitue un autre moyen de traiter la biomasse issue de phytoremédiation. La gazéification est une oxydation partielle de la matière organique à des températures élevées (500 – 1800 °C) pour produire des gaz de synthèse ou syngaz (Gumisiriza et al. 2017). La gazéification de biomasses contaminées nécessite de comprendre le comportement des ETMs pendant le processus (Vervaeke et al. 2006; Nzihou & Stanmore 2013). Selon Nzihou & Stanmore. (2013), pendant cette étape, certains ETMs comme le Cd, Pb et le Zn, s'adsorbent aux fines particules et se retrouvent dans les fumées, ce qui demande une étape supplémentaire pour traiter les émissions dégagées pendant le processus et éviter leur diffusion dans l'atmosphère. Concernant la conversion en énergie, à partir de 1 kg de matière sèche de saule, on peut obtenir jusqu'à 1,2 kWh d'électricité et 9 MJ de chaleur ainsi que 40 g de cendres (Vervaeke et al. 2006).

2.3. L'HYDROMÉTALLURGIE

Dans la même approche écologique et dans le but de valoriser les biomasses issues de phytoextraction, les plantes hyperaccumulatrices sont valorisables par hydrométallurgie, défini comme un procédé de traitement des ETMs en milieu humide, qui comporte plusieurs étapes dont l'incinération, la lixiviation et la cristallisation (Saad 2017). En effet, de nombreuses études démontrent l'intérêt de ce traitement (Van Der Ent et al. 2015; Vaughan et al. 2017). Cette approche a été particulièrement étudiée pour la production de sels de Ni à partir de la plante *A. murale*, capable de pousser sur des sols métallifères riches en Ni ou même sur des sols contaminés en Ni (Li *et al.*, 2003; Barbaroux *et al.*, 2011). D'ailleurs, il en existe pas moins de 400 espèces hyperaccumulatrices de Ni dans la nature (Bani et al. 2007). Cette voie semble donc être prometteuse tant sur le plan environnemental et économique. De récents travaux ont également été menés sur la valorisation du Cd et du Zn, par des techniques similaires, à partir de l'hyperaccumulateur *N. caerulescens* (Hazotte et al. 2017).

2.4. CONCEPTION DE CATALYSEURS MÉTALLIQUES

Les biomasses issues de la phytoremédiation peuvent également être utilisées pour la conception de catalyseurs par pyrolyse, utiles pour la synthèse des biomolécules par voie catalytique. Cette approche vise à valoriser les ETMs de la biomasse pour la conception de catalyseurs ayant une activité spécifique. Des applications dans les domaines des médicaments, des cosmétiques et même des biopesticides ont été décrites (Escande et al. 2014). Cependant, la valorisation en bioraffinerie de matières issues de phytoremédiation pour la production de biocarburants et/ou de molécules plateformes n'a jusqu'à présent jamais été envisagée. Cet axe pourrait constituer une nouvelle voie de valorisation tout en prenant en compte la gestion des polluants du début jusqu'à la fin du processus.

3. QUALITÉ DE LA BIOMASSE POUR UNE VALORISATION EN BIORAFFINERIE

Le bioraffinage vise à transformer les productions agricoles végétales et la biomasse en biocarburant, agrocarburant destinés à produire de la chaleur et de la puissance (agroénergie), ainsi qu'en produits chimiques à valeur ajoutée, biomatériaux voire en produits destinés à l'alimentation humaine et animale. L'étude de la composition chimique de la biomasse à valoriser est très importante, car elle permet d'une part d'évaluer la teneur en biopolymères et d'autre part de définir le type de prétraitement adéquat afin de répondre à ces exigences.

La matière lignocellulosique est composée de trois principaux biopolymères : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (figure 2).

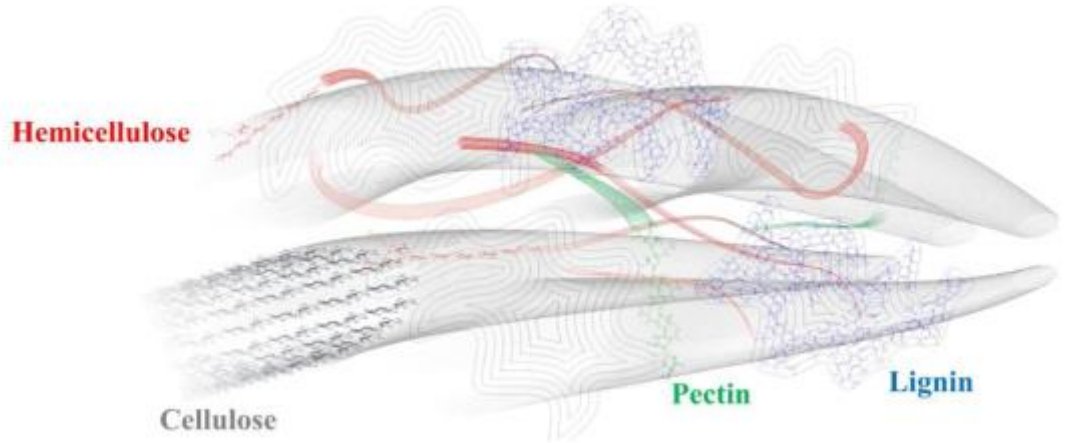


Figure 3. Structure chimique de la matière lignocellulosique (Silveira et al. 2015)

Ces biopolymères sont liés entre eux pour former un réseau complexe, par sa composition et sa structure. La composition chimique et les propriétés de chaque constituant contribuent à définir les propriétés globales de chaque biomasse, ainsi que son domaine de valorisation possible. Des plantes ligneuses en passant par les plantes herbacées et marines, les biopolymères varient en fonction de la situation géographique et des conditions climatiques.

3.1. CELLULOSE

La cellulose est l'élément de base de toute paroi végétale. Elle est également présente chez les bactéries, champignons et algues (Agbor et al. 2011) et c'est l'un des biopolymères les plus abondants sur terre. La cellulose représente environ 35 à 50% de la composition de la matière lignocellulosique.

La cellulose est un **homopolysaccharide** linéaire de formule $(C_6H_{12}O_5)_n$, formé par un enchainement d'unités **β-D-glucopyranose** liées entre elles par des **liaisons glycosidiques** de type **β-(1,4)** (Pettersen 1984; Zimmermann et al. 2004). Le nombre d'unités glucose dans une chaine de cellulose défini son degré de polymérisation (DP). Il est estimé entre 9 000 et 10 000 dans la cellulose du bois et peut atteindre 15 000 dans le coton natif (Rowell 2016; Pettersen 1984).

La cellulose est composée de régions cristallines et amorphes. Dans les zones cristallines, les fibrilles de cellulose (constituées de plusieurs chaines linéaires de cellulose)

sont organisées parallèlement et liées soit par des **liaisons hydrogènes** intra et intermoléculaires, soit par des **forces de Van der Waals** (Biswas & Ahring 2016) (figure 3). Ces zones confèrent à la matière lignocellulosique élasticité, rigidité et résistance. Entre ces régions cristallines, on retrouve des zones de cellulose dites amorphes. Ces dernières sont beaucoup moins ordonnées et apportent au matériau de nombreuses caractéristiques mécaniques.

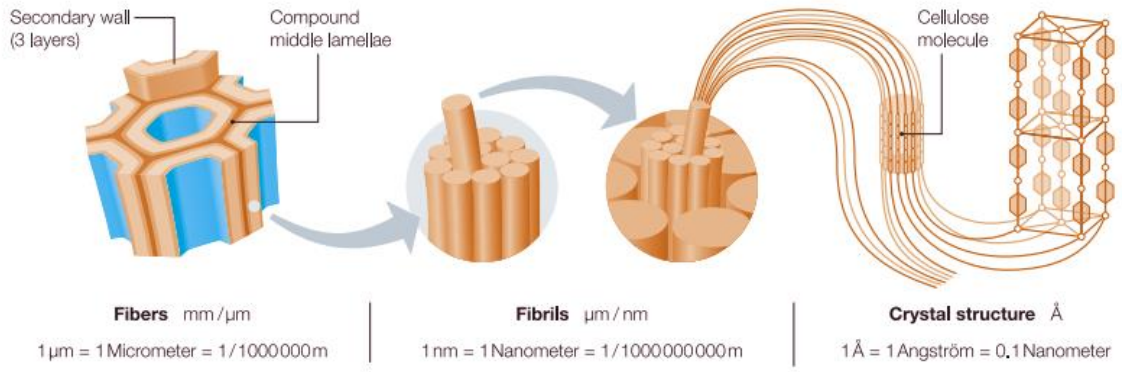


Figure 4. Organisation des microfibrilles de cellulose dans la paroi végétale (Zimmermann et al. 2004)

Ainsi, la structure moléculaire de la cellulose lui confère de nombreuses propriétés telles que l'hydrophilie, la flexibilité, la résistance mécanique et une activité chimique importante grâce à la réactivité élevée des groupements hydroxyles qu'elle contient (Li et al. 2018). La cellulose est insoluble dans la plupart des solvants et même dans les bases fortes. Il est également difficile d'isoler de la cellulose pure du bois car elle est intimement liée par des interactions non covalentes aux hémicelluloses et à la lignine (Pettersen 1984). Dans le cadre d'une valorisation en bioraffinerie, la cellulose peut être hydrolysée en glucose, avant d'être fermentée en éthanol et ce en présence d'enzymes et de levures respectivement.

3.2. HÉMICELLULOSES

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides ramifiés composés de sucres en C_5 et C_6 (Biswas & Ahring 2016). Elles sont composées principalement d'unités de glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose, acide 4-O-méthylglucuronique, et de résidus d'acide galacturonique (Magee & Kosaric 1985), présentées dans la figure 4. Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses sont entièrement amorphes, et leur degré de polymérisation peut

varier entre 50 et 300 (Biswas & Ahring 2016) ce qui les rend facilement hydrolysables. Elles sont principalement solubles dans les milieux alcalins et sont facilement hydrolysées en milieu acide (Pettersen 1984). La structure et l'abondance des hémicelluloses varient en fonction des espèces (Scheller & Ulvskov 2010; Chen 2014).

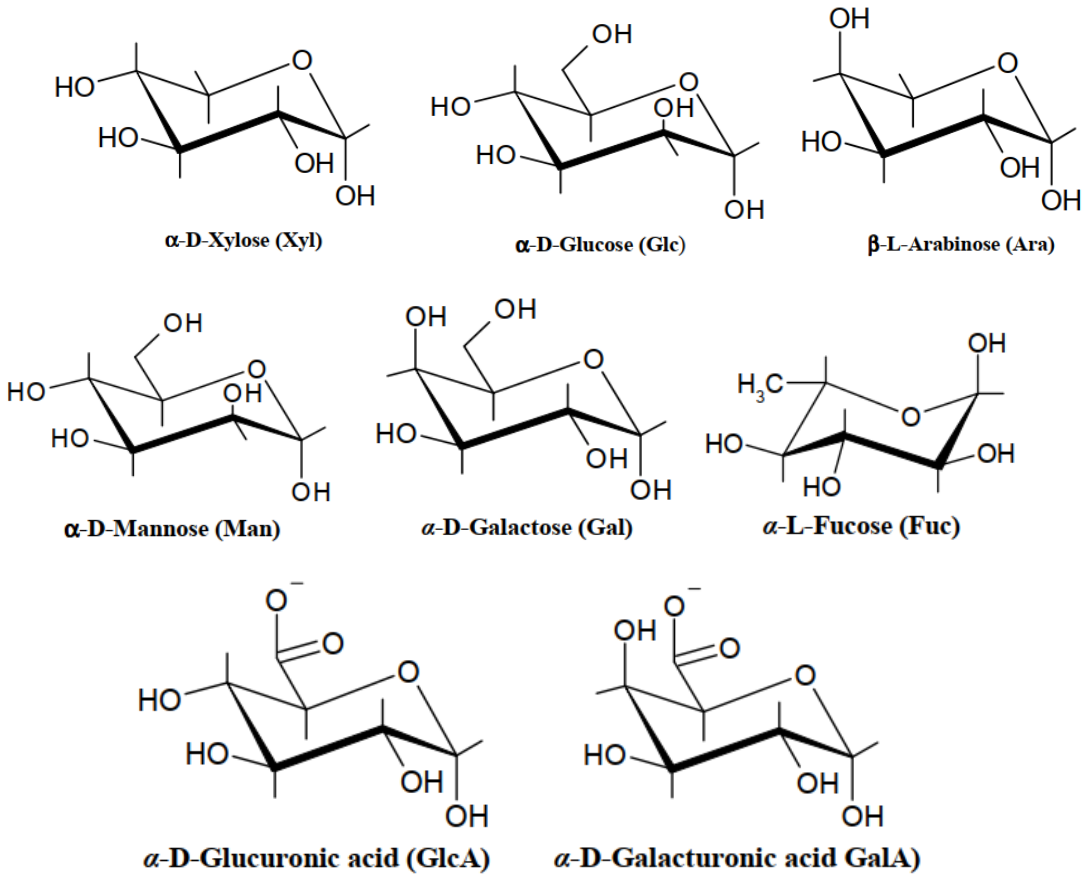


Figure 5. Monosaccharides constitutifs des hémicelluloses

3.3. PECTINES

Ce sont des polysaccharides complexes et hétérogènes qu'on retrouve dans la lamelle moyenne, et les parois cellulaires primaires des parois végétales (Albuquerque et al. 2016). Elles ont été isolées pour la première fois par Henri Braconnot en 1825 (May 1992). Les pectines sont caractérisées par leur richesse en résidus d'acide galacturonique. Dans les chaines d'acide polygalacturonique, les groupes carboxyles peuvent être partiellement estérifiés par des groupements méthyles et neutralisés partiellement ou totalement par une ou plusieurs bases (Nussinovitch 1997). Les pectines sont en général composées de sucres neutres notamment l'arabinose, le galactose et en plus faible quantité le rhamnose, xylose et

le glucose, et sont fréquemment associées à des chaines composées entièrement des sucres neutres (May 1990; Mohnen 2008). On distingue quatre domaines de polysaccharides dans la structure des pectines (figure 5):

→ **Les homogalacturonanes (HG)** : ils constituent environ 65% de la molécule de pectine. La région HG est une chaine linéaire d'unités d'acide D-galactopyranosyluronique, liées par des liaisons de type α-1-4 (Leclere et al. 2013). Selon les espèces végétales, les HG peuvent être méthyl-estérifiés ou partiellement acétylés (Nussinovitch 1997) ;

→ **Les rhamnogalacturonanes Ⅰ (RG Ⅰ)** : ils représentent environ 20-35% de la molécule et constituent une région ramifiée des pectines, dont la chaine principale est une répétition de disaccharides composés d'acide galacturonique α-D-GalpA (Acide α-D-Galactopyranosyluronique) et des résidus α-L-Rhap (α-L-Rhamnopyranose), α-L-Araf (α-L-Arabinofuranose), et α-D-Galp (α-D-Galactopyranose) (Leclere et al. 2013; Yapo 2011) ;

→ **Les rhamnogalacturonanes Ⅱ (RG Ⅱ)** : faiblement présents dans la paroi cellulaire primaire, ils représentent environ 10% de la molécule de pectine (Babbar et al. 2016). Ils sont très répandus chez les végétaux (Ovodov 2009; Yapo 2011). Les RG II comptent environ 20 résidus glycosylés et entre 28 et 36 monosaccharides différents interconnectés par une vingtaine de liaisons glycosidiques et liées par des liaisons (1 → 4) au squelette de α-D-galacturonane, faisant de cette région une molécule très complexe (Yapo 2011) ;

→ **Les xylogalacturonanes (XG)** : souvent présents dans les tissus des graines et des fruits, ils ont été récemment identifiés chez *Arabidopsis* thaliana qui comme *Noccaea* est une Brassicacée (Voragen et al. 2009).

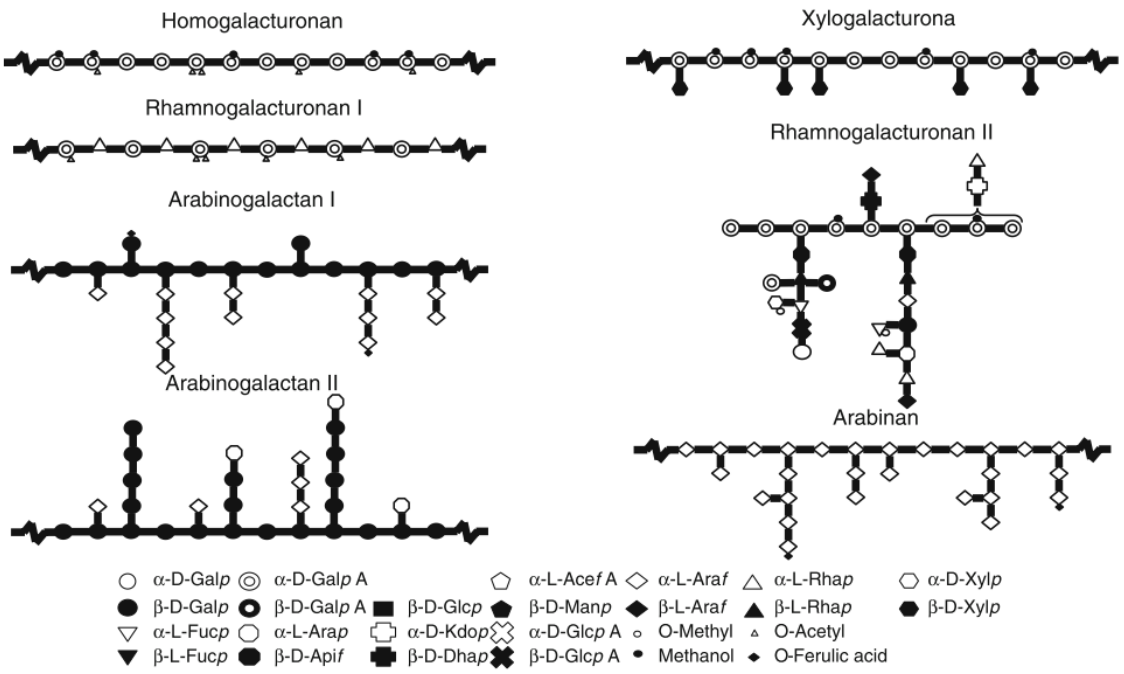


Figure 6. Représentation schématique des éléments structuraux de la pectine (Hilz 2007)

Présentes dans la paroi végétale, les pectines sont également liées aux hémicelluloses, aux composés phénoliques et même aux protéines, ce qui offre à la paroi végétale une fonction et une structure plus complexe (Caffall & Mohnen 2009). En plus de leur rôle dans le maintien de la structure de la paroi végétale, elles assurent le contrôle de la porosité et de l'intégrité de la paroi cellulaire (Yapo 2011) et également un rôle de défense et de protection contre les agents pathogènes (Caffall & Mohnen 2009; Mohnen 2008).

3.4. LIGNINES

La lignine est un biopolymère phénolique amorphe et sa structure tridimensionnelle la rend très complexe (Chen 2014). Cette macromolécule joue un rôle essentiel dans le maintien de la structure végétale car elle assure la liaison entre les chaines de cellulose et d'hémicelluloses (Bajpai 2017). Lors de la formation de la lignine, le couplage radicalaire provoqué par les mécanismes enzymatiques des trois alcools précurseurs (alcool coniférylique, alcool sinapylique et alcool coumarylique) (figure 6) conduit à la formation d'unités **gaïacyle (G)** et **syringyle (S)** ainsi qu'à une variété de liaisons inter-unités. Le réseau tridimensionnel est assuré par des liaisons de type C-O-C (éther) et C-C (Rowell 2016). Sa

structure est également différente entre les ligneux et les herbacées. Pendant la croissance, les fibres de cellulose sont imprégnées de lignine, ce processus est appelé lignification (Bajpai 2017).

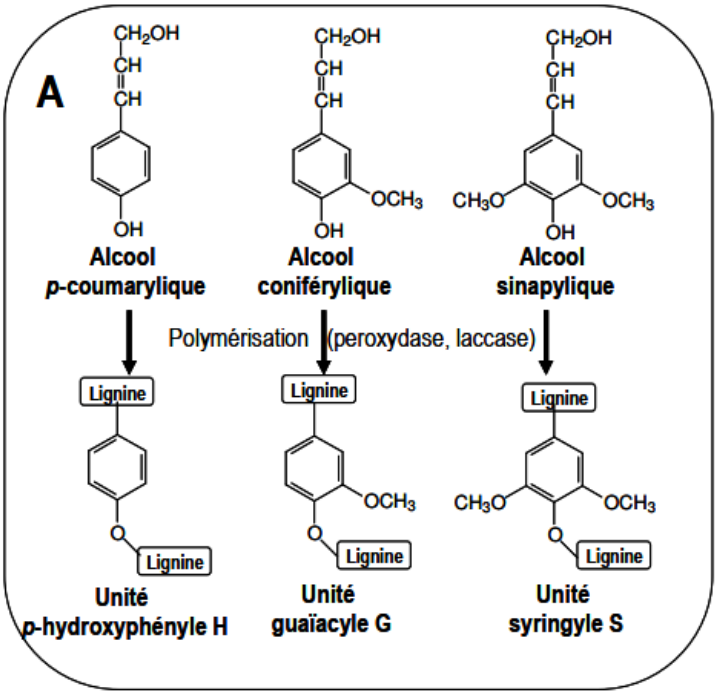


Figure 7. Structure simplifiée des 3 unités de base des lignines et de leurs précurseurs (Lapierre 2010)

On retrouve la lignine en quantité importante dans le bois, et les taux varient selon l'âge et l'espèce : ils sont de l'ordre de 20-40 % dans le bois et de 15-20 % chez les graminées (Chen 2014). Enfin, elle assure aussi un rôle important dans la défense contre les agents biotiques et abiotiques qui provoquent la dégradation du bois (Bajpai 2017).

3.5. Autres constituants « Extractibles »

En plus des éléments structuraux, on retrouve également dans le bois d'autres constituants non structuraux qui représentent jusqu'à 5% de la matière sèche. Ces constituants sont en grande partie des **extractibles** appelés aussi métabolites secondaires, qui sont des composés de faibles poids moléculaires facilement isolables avec des solvants. Dans le groupe des extractibles on identifie : les acides gras, les phénols, les terpènes, les cires ainsi que des éléments inorganiques (Rowell 2016).

En général on retrouve les extractibles en grande quantité dans le duramen du bois dont ils sont responsables de la couleur, l'odeur et de la durabilité naturelle. La teneur est variable selon les espèces et aussi en fonction des conditions environnementales. On peut également citer les éléments de réserve, comme l'amidon stocké dans les cellules vivantes du parenchyme. L'amidon est une famille de polysaccharides composés de chaines d'amylose et d'amylopectine, que les végétaux forment lors de la photosynthèse.

4. LES PROCÉDÉS DE PRÉTRAITEMENT EN BIORAFFINERIE

4.1. RÔLE DU PRÉTRAITEMENT

Le prétraitement est une étape cruciale dans la conversion biochimique des biomasses lignocellulosiques en bioraffinerie (Mussatto & Dragone 2016; Duque et al. 2016). Le but principal du prétraitement est de réduire le degré de complexité de la matière lignocellulosique (Chornet & Overend 1988). Le prétraitement permet de rompre les liaisons reliant les constituants de la biomasse et de rendre la cellulose plus accessible aux enzymes lors de l'étape de conversion des carbohydrates en sucres fermentescibles. Le prétraitement idéal permettra de rendre la cellulose plus accessible à une hydrolyse ultérieure, de récupérer une fraction importante de polysaccharides en phase aqueuse et de limiter, durant le procédé, la formation de produits de dégradation tels que le furfural et l'hydroxyméthylfurfural (5-HMF). Ces produits de dégradation des sucres sont inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique et peuvent diminuer le rendement de cette dernière (Harmsen et al. 2010; Mussatto & Dragone 2016).

4.2. TYPES DE PRÉTRAITEMENT

Pour une valorisation optimale de la matière lignocellulosique, le prétraitement est une étape importante, et nécessite l'utilisation de méthodes chimiques, physiques, mécaniques, biologiques ou thermiques. Le type de prétraitement varie en fonction de la biomasse utilisée ainsi que de la valorisation souhaitée. Une multitude de prétraitements sont cités dans la littérature, parmi eux deux sont particulièrement prometteurs à l'échelle industrielle : les procédés organosolv et d'explosion à la vapeur.

4.2.1. PROCÉDÉ ORGANOSOLV

Habituellement utilisé pour la délignification de la biomasse végétale, le procédé organosolv est actuellement utilisé pour la conversion de la biomasse en bioénergie (Li et al. 2012). Le prétraitement organosolv est un procédé qui vise à séparer et rendre accessible les constituants intimement liés de la biomasse lignocellulosique. La biomasse est traitée dans un mélange eau – solvant organique miscible à l'eau, en présence éventuelle d'un catalyseur sous différentes conditions de température qui peuvent aller de 130 à 220 °C, de pression et de temps de séjour qui peut aller de 30 à 90 min. La réaction se déroule généralement dans un réacteur auto-agité sous pression. Ce procédé permet de récupérer un résidu solide (la pâte) constitué principalement de cellulose, et une liqueur noire riche en lignine et en hémicelluloses (Chiaramonti et al. 2012; Zhao et al. 2009; Huijgen et al. 2008).

Ce prétraitement peut être appliqué à différentes sévérités et sur différents types de biomasses végétales comme les feuillus (Pan et al. 2007; Romaní et al. 2011), les résineux (Agnihotri et al. 2015; Lai et al. 2014) la paille de blé (Huijgen et al. 2014), le miscanthus (El Hage 2010)... La cellulose récupérée sous forme solide après traitement organosolv est généralement liée à une faible quantité de lignine (Li et al. 2012) qui reste difficile à extraire.

Différents solvant sont utilisés pour ce prétraitement, comme le méthanol, l'acétone et l'éthanol qui est le plus communément utilisé en présence de catalyseurs (acides minéraux) (Sannigrahi & Ragauskas 2013). Ces derniers permettent l'hydrolyse et une meilleure solubilité des lignines durant le processus (Chiaramonti et al. 2012). De plus, différentes conditions de cuisson sont utilisées, afin de définir les paramètres optimaux d'extraction sur chaque biomasse étudiée. La lignine extraite par ce procédé est non soufrée et relativement peu dégradée. Des travaux ont montré qu'elle peut être valorisée par la production de colle pour la fabrication des panneaux de particules , ou convertie en fibres de carbone (Ragauskas et al. 2014).

4.2.2. EXPLOSION À LA VAPEUR

Le traitement d'explosion à la vapeur est un prétraitement thermo-mécano-chimique connu de longue date (Cybulska et al. 2013) et aujourd'hui considéré comme l'un des plus prometteur pour le traitement de la biomasse lignocellulosique au niveau industriel (Chiaramonti et al. 2012). Il peut être appliqué sur le bois et sur la biomasse herbacée (Faik

2013). Ce prétraitement combine les forces mécaniques, l'effet thermique et l'effet chimique. Durant ce prétraitement, la biomasse est traitée avec une vapeur d'eau à des températures allant de 170-260 °C pour des temps de séjour de 1 à 30 min dans un réacteur sous pression. Le procédé est composé de deux étapes essentielles (1) le vapocraquage dans le réacteur sous pression suivi (2) d'une décompression explosive (Jacquet et al. 2010). Le vapocraquage permet de faire pénétrer la vapeur d'eau sous haute pression par diffusion à l'intérieur de la structure de la biomasse où elle va se condenser. Pendant cette étape, l'hydrolyse de certains groupements acétyles contenus dans les xylanes ainsi qu'une partie des galactomannanes est initiée. L'étape suivante est la décompression explosive, où une fois le temps de séjour écoulé, la pression du réacteur est brusquement relâchée provoquant la revaporisation de l'eau de condensation contenue dans la matière et donc le fractionnement des différents biopolymères : cellulose, hémicelluloses et lignine (Duque et al. 2016; Cybulska et al. 2013).

L'ajout d'un catalyseur tel que le H_2SO_4 ou SO_2 peut améliorer efficacement l'hydrolyse en diminuant la production des composés inhibiteurs (Sun & Cheng 2002). Ce procédé provoque la solubilisation des hémicelluloses et l'hydrolyse des groupements acétyles des hémicelluloses (Faik 2013). Contrairement aux hémicelluloses, les lignines sont faiblement solubilisées pendant le prétraitement d'explosion vapeur. Par contre elles subissent une modification dans leur structure, résultant du clivage des liaisons entre les lignines et les polysaccharides (Cybulska et al. 2013). La solubilisation d'une partie des hémicelluloses et de la lignine permet ensuite d'augmenter l'accessibilité des enzymes à la cellulose lors d'une étape ultérieure d'hydrolyse enzymatique (Brodeur et al. 2011). La technologie d'explosion à la vapeur a fait l'objet de plusieurs études souvent liées à la production de bioéthanol avec une large gamme de matières premières, comme le peuplier (Negro et al. 2003), l'olivier (Cara et al. 2008) et des résidus d'herbacées comme la paille de blé (Ballesteros et al. 2006) et du miscanthus (Kataria et al. 2017).

Le choix de ce prétraitement repose sur son faible coût énergétique et sur le fait qu'il soit respectueux de l'environnement car il n'utilise pas ou peu de produits chimiques ou de solvants organiques mais seulement de la vapeur d'eau pour traiter la biomasse.

4.3. EFFICACITÉ DU PRÉTRAITEMENT

Pour une valorisation optimale de la matière première, il est important de choisir un prétraitement adapté au type de valorisation finale du produit. Selon l'objectif final de l'étude, il est parfois difficile de gérer plusieurs facteurs. Selon (Agbor et al. 2011; Silveira et al. 2015) un prétraitement est efficace si :

- La consommation en énergie est basse ;
- Il minimise la formation des produits inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique et de fermentation ;
- La majeure partie de la cellulose est récupérée sous forme de pâte ;
- Il permet d'éliminer ou déstructurer la lignine.

4.4. SÉVÉRITÉ DU PRÉTRAITEMENT ET FORMATION DES INHIBITEURS

Pendant le prétraitement et surtout dans des conditions acides, des acides organiques sont générés par la biomasse tel que l'acide acétique qui est en général formé suite à l'hydrolyse des hémicelluloses acétylées (Faik 2013; Cybulska et al. 2013). En plus des acides organiques, des composés furaniques sont produits, comme le furfural et le 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) par déshydratation des monosaccharides en C_5 et C_6 respectivement (figure 7) ainsi que des composés phénoliques issus de la solubilisation des lignines (Alvira et al. 2010).

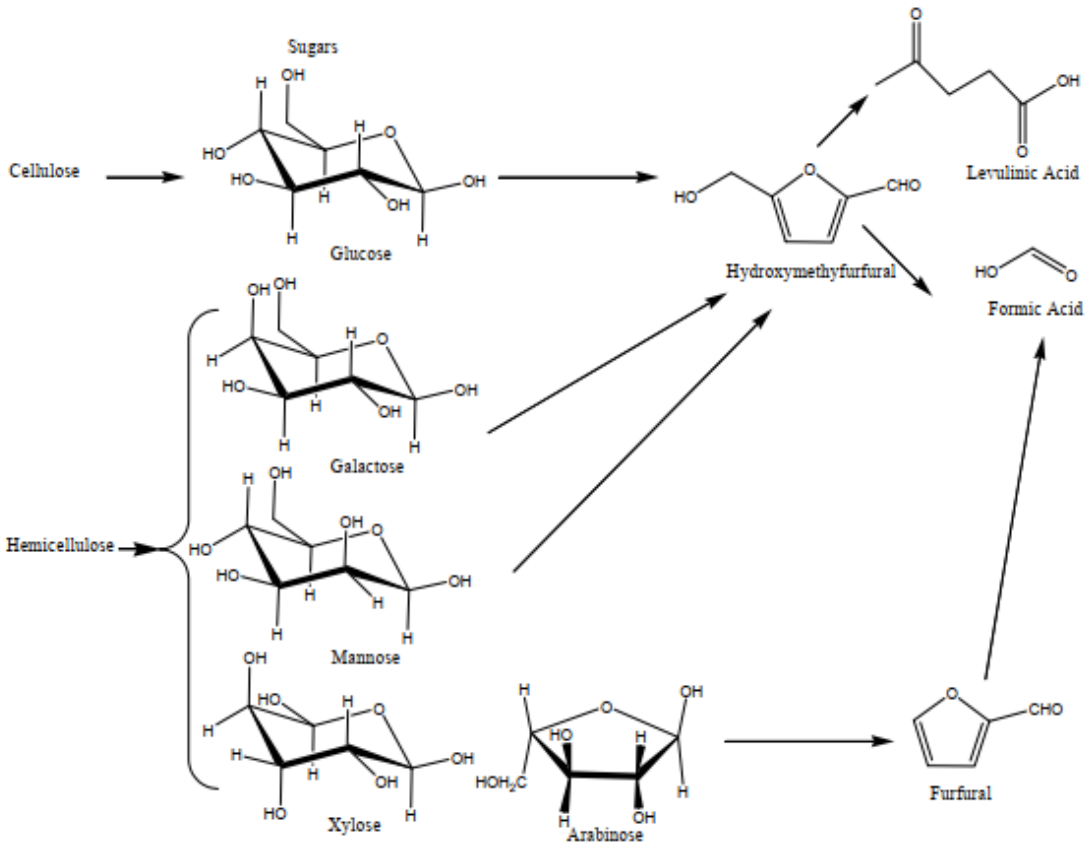


Figure 8. Formation des produits de dégradation à partir des sucres en C_5 et C_6 (Hu et al. 2008)

Comme le montre la figure 8, en conditions acides et à haute température les fibrilles de cellulose se séparent des hémicelluloses et lignine. Sous des conditions sévères, les microfibrilles de cellulose et les chaines d'hémicelluloses sont à leur tour réduite en oligosaccharides puis en monosaccharides, ces derniers évoluant ensuite vers la formation de produits de dégradation (furfural, HMF, acides carboxyliques). La formation de ces produits est liée à la sévérité des conditions du prétraitement. Initialement utilisé en industrie papetière pour contrôler les procédés de délignification suivant la température et le temps de traitement (Pedersen & Meyer 2010), le facteur de sévérité développé par Overend et al. (Overend et al. 1987) a été réintroduit pour comparer l'efficacité du prétraitement et évaluer l'effet de chaque prétraitement sur le taux de polysaccharides récupérés en phase solide ainsi que sur la formation des inhibiteurs par dégradation des hémicelluloses. Ce facteur a été repris dans plusieurs études et notamment celles dont la finalité est de produire du bioéthanol.

Le facteur de sévérité se calcul comme suite :

$$\text{Sévérité} = \log \int_0^t e^{\frac{T_r - T_b}{14,75}} dt$$

Où :

T_r est la température de réaction en Kelvin ;

T_b est une température de référence ; T_b = 373 K ;

14,75 est une constante, ici arbitraire (en K), rendant compte de l'énergie d'activation de la réaction (Chum et al. 1990).

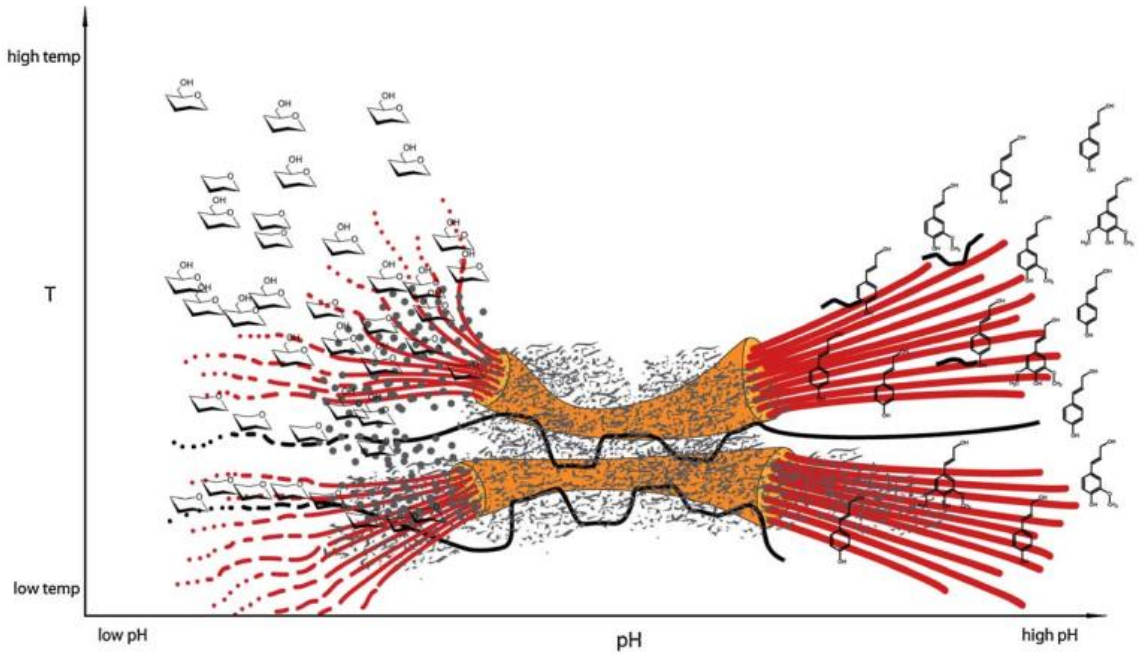


Figure 9. Effet du pH et de la température sur la matière lignocellulosique pendant le prétraitement (Pedersen & Meyer 2010)
Le « nuage » gris indique la gaine de lignine ; les tubes orange et rouge illustrent les fibrilles et microfibrilles de cellulose respectivement ; les lignes noires courbées indiquent les hémicelluloses ; les points noirs sur les microfibrilles de cellulose dans la région à bas pH illustrent la lignine redéposée.

Dans le cadre d'une valorisation de ressources renouvelables en bioraffinerie par voie fermentaire, la formation des produits de dégradation ou inhibiteurs n'est généralement pas souhaitable. En effet, la présence de ces produits va affecter non seulement le rendement en sucres mais également l'activité des enzymes ainsi que les rendements en fermentation.

5. DE LA BIOMASSE AUX BIOCARBURANTS

5.1. GÉNÉRALITÉS

Différentes biomasses telles que le bois, la paille, les déchets agricoles ainsi que les algues peuvent être transformées en bioéthanol. La biomasse végétale est devenue une matière première intéressante dans le domaine des énergies renouvelables et ce pour différentes raisons. Il s'agit particulièrement d'une ressource renouvelable disponible, et moins cher que les combustibles fossiles (Demirbas & Demirbas 2010). Dans le domaine des biocarburants, la valorisation des déchets est une voie prometteuse pour éviter la compétition avec les productions agricoles destinées à l'alimentation humaine et animale. L'éthanol généré par cette voie est attractif du fait de sa faible toxicité et sa biodégradabilité (Briens et al. 2008).

Les biocarburants de première génération, sont issus de la conversion de plantes sucrières et amylacées comme la betterave, la pomme de terre ainsi que les oléagineux en utilisant des technologies conventionnelles. Les biocarburants de deuxième génération, proviennent de la transformation de paille de blé, de bois et de déchets agricoles en éthanol cellulosique. Enfin, les biocarburants de troisième génération sont issus de la biomasse algale (Demirbas & Demirbas 2010). Les technologies de production des biocarburants de 2eme et 3eme génération font actuellement l'objet de travaux de recherche et de développement industriels importants.

5.2. CONVERSION BIOCHIMIQUE

La conversion de la matière lignocellulosique en éthanol repose sur une succession de différentes étapes de fractionnement et de transformation, allant du prétraitement jusqu'à la distillation du produit final. La figure 9, résume les étapes clés de conversion de la biomasse en bioéthanol.

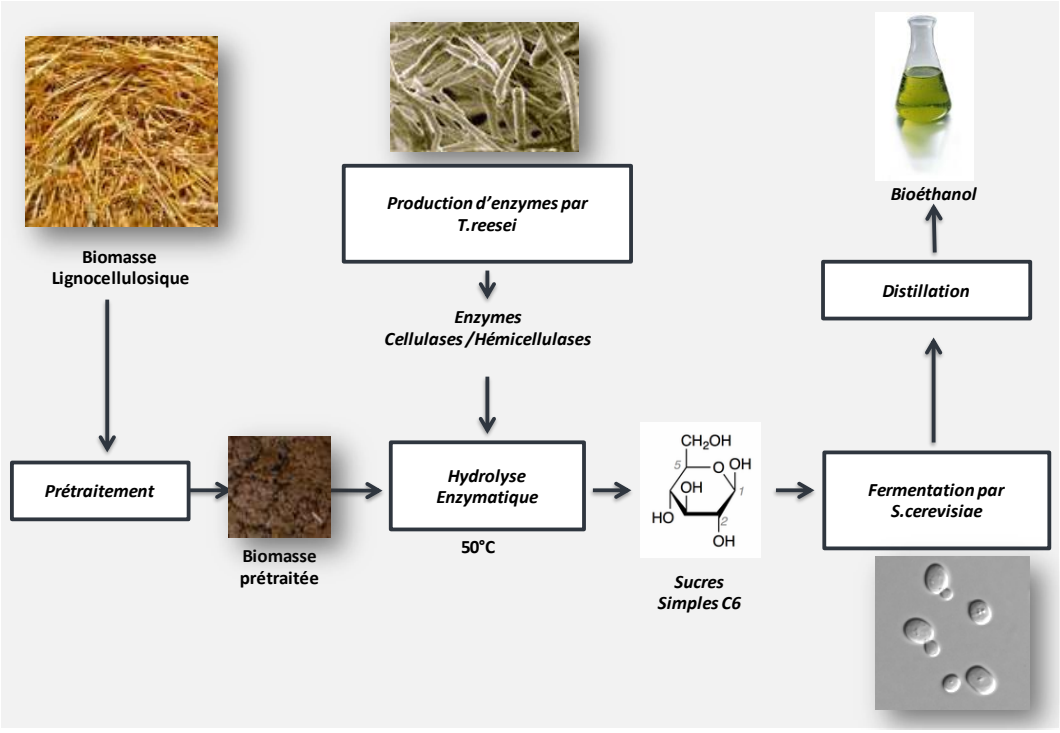


Figure 10. Schéma des étapes clés de la conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol

5.2.1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Dans le schéma classique d'une conversion de la matière lignocellulosique en biocarburant l'hydrolyse enzymatique vient juste après le prétraitement de la matière végétale. Le processus d'hydrolyse enzymatique vise à hydrolyser les chaînes de cellulose en présence de cellulases (Aditiya et al. 2016). La cellulose est la partie de la biomasse la plus utilisée pour produire de l'éthanol (Faik 2013). Durant cette étape, les polysaccharides sont réduits en monosaccharides sous l'action des enzymes, qui interviennent pour rompre les liaisons hydrogènes entre les unités de glucose composant le biopolymère. L'hydrolyse enzymatique a lieu généralement dans des conditions douces (pH 4,8 ; 45-50 °C) (Duff & Murray 1996). Parmi les cellulases impliquées dans le processus d'hydrolyse de la cellulose, on trouve : (1) **les endoglucanases**, qui attaquent en général les régions amorphes de la cellulose ; (2) **les exoglucanases** ou cellobiohydrolases, qui éliminent les unités de cellobiose des extrémités de la chaîne libre ; et enfin (3) les **β-glucosidases**, qui réduisent le cellobiose en unités glucose (Duff & Murray 1996; Prasad et al. 2007; Balat 2011). La figure 10 présente de façon schématique les différentes étapes de transformation de la cellulose en glucose.

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est divisée en trois grandes étapes : l'adsorption des enzymes à la surface de la cellulose ; la biodégradation de la cellulose en sucres fermentescibles et la désorption des cellulases (Prasad et al. 2007). Plusieurs enzymes sont couramment utilisées comme les cellulases de *Trichoderma reesei* ou les β-glucosidases d'*Aspergillus niger* (Zhao et al. 2012; Talebnia et al. 2010). Les cellulases de *Trichoderma reesei* sont les plus étudiées et utilisées dans les fermentations alcooliques. Ces champignons présentent un intérêt particulier, car ils produisent de manière extracellulaire des cellulases résistantes faces aux inhibiteurs chimiques et stables à des températures allant jusqu'à 50 °C (Ryu & Mandels 1980).

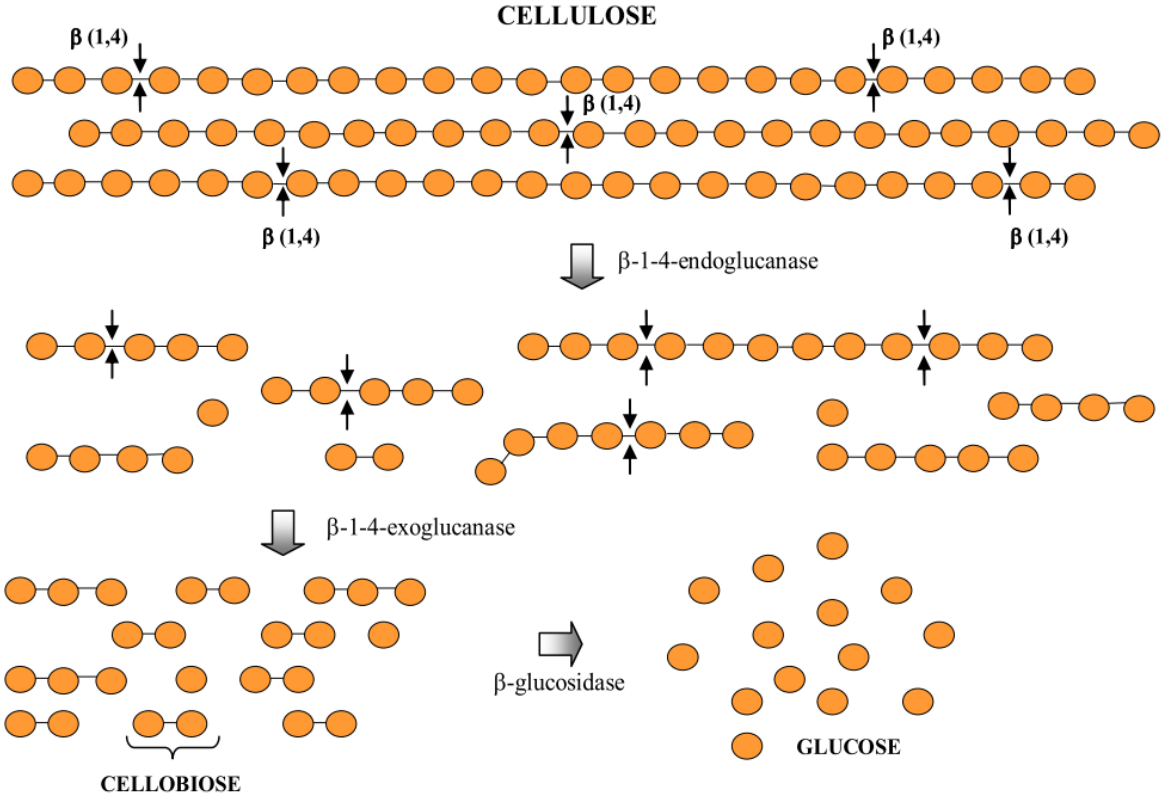


Figure 11. Représentation schématique de l'action des cellulases sur la structure de la cellulose (Mussatto & Teixeira 2010)

Plusieurs facteurs peuvent limiter l'hydrolyse enzymatique, certains liés aux enzymes elles-mêmes et d'autres à la nature de la biomasse (Alvira et al. 2010). La réactivité du substrat cellulosique à l'hydrolyse enzymatique, dépend des caractéristiques structurelles de la cellulose, comme le degré de cristallinité, le degré de polymérisation et le taux de lignine dans le substrat qui limite l'accès des enzymes à la cellulose (Sun & Cheng 2002; Hendriks & Zeeman 2009). L'élimination des hémicelluloses rend la surface de la cellulose plus accessible aux

enzymes favorisant ainsi le processus d'hydrolyse (Alvira et al. 2010; Hendriks & Zeeman 2009). La solubilisation des lignines pendant le prétraitement améliore de manière efficace le rendement d'hydrolyse enzymatique (Prasad et al. 2007).

Durant le prétraitement de la matière lignocellulosique, généralement sous des conditions acides, des produits de dégradation ou des inhibiteurs peuvent se former. Ils sont divisés en trois catégories : les dérivés furanes (HMF et furfural), les acides faibles et les composés phénoliques (Liu 2006; Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000; Pedersen & Meyer 2010; Sami & Shakoori 2011). Ces composés ont un effet négatif sur l'activité des enzymes, et peuvent soit réduire et/ou complètement inhiber l'activité enzymatique. La présence de ces composés peut provoquer la désactivation de 20 à 80 % des cellulases après 24 heures d'incubation (Ximenes et al. 2011), ce qui a un effet direct sur le rendement en glucose.

En plus des produits de dégradations générés pendant le prétraitement, la présence de certains éléments comme les ETMs, les ETMs lourds et certains ETMs de transition peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur vis-à-vis de l'activité des cellulases, qui dépend de la nature des ETMs et du type d'enzymes (Pereira et al. 2017). La toxicité de ces éléments est causée par les liaisons étroites entre le métal et le groupement fonctionnel situé sur le site actif de l'enzyme (Sharma 2012). Cependant, peu d'études ont évalué l'effet des ions métalliques sur l'activité des cellulases (Pereira et al. 2017; Wang et al. 2012). Par ailleurs, il a été démontré que la présence des ions métalliques Fe^{2+} et Cu^{2+} a un effet inhibiteur sur l'activité des endoglucanases, exoglucanases et β-glucosidases (Tejirian & Xu 2010). Geiger *et al* montrent également dans leur étude l'effet inhibiteur des ions Cu^{2+} sur l'activité des cellulases et des β-glucosidases (Geiger et al. 1998).

5.2.2. FERMENTATION

Afin d'accomplir et de boucler le processus de bioconversion, il est nécessaire de fermenter les monosaccharides obtenus pour produire de l'éthanol cellulosique. La fermentation consiste donc à utiliser l'hydrolysat, riche en monosaccharides (C_5 et C_6), récupéré après hydrolyse enzymatique du substrat issu du prétraitement de la matière lignocellulosique, pour produire des alcools ou des acides en présence de levures ou de bactéries spécifiques (Balat 2011). Différentes levures et bactéries ont montré leur capacité à produire de l'éthanol comme *Saccharomyces cerevisiae* (levure), *Escherichia coli* (bactérie)

(Geddes et al. 2011), *Zymomonas mobilis* (Yamashita et al. 2008), et différentes *Clostridium* (bactérie), parmi lesquelles *Clostridium acetobutylicum* (Nölling et al. 2001) et *Clostridium cellulolyticum* (Williams et al. 2013). La fermentation peut avoir lieu en aérobiose ou anaérobiose, selon le type de microorganisme utilisé mais également en fonction du produit final recherché. Afin d'obtenir le meilleur rendement possible, les conditions de fermentation tels le pH du milieu, le milieu nutritif, la température et les exigences en oxygène, doivent être optimisées (Humphrey & Lee 1992). La fermentation alcoolique aérobie est réalisée en général, avec des levures de type *S. cerevisiae*, habituellement utilisées à l'échelle industrielle, grâce à son haut pouvoir fermentatif et également à sa grande capacité d'adaptation (Albergaria & Arneborg 2016). La conversion du glucose en éthanol peut être schématisée par la stœchiométrie suivante qui ne prend pas en compte les transferts énergétiques :

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Dans le processus de fermentation on distingue également la fermentation anaérobie, dont celle appelée « fermentation ABE (Acétone/Butanol/Ethanol)», développée à l'échelle industrielle et qui semble être prometteuse (Patakova et al. 2013; Lütke-Eversloh & Bahl 2011; Qureshi & Maddox 1992; Green 2011). Dans la fermentation ABE, le butanol est l'alcool le plus recherché en raison de ses performances proches de celles de l'essence sans plomb (Baral & Shah 2014; Ni & Sun 2009).

L'activité des microorganismes pendant la fermentation, est liée au pH du milieu, à la température, aux taux de croissance ainsi qu'à la tolérance aux inhibiteurs. Tous ces facteurs peuvent avoir un effet plus ou moins positif sur les rendements (Balat 2011). La présence d'inhibiteurs durant la fermentation est l'un des problèmes majeurs associé à la production d'éthanol cellulosique (Sun & Cheng 2002). Certains de ces composés peuvent se former pendant l'étape de prétraitement, résultant de la dégradation et de la déshydratation des hémicelluloses comme le HMF et le furfural. Les composés phénoliques comme la lignine sont aussi responsables de l'inhibition de l'activité des microorganismes ainsi que les acides faibles (Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000; Brexó & Sant'Ana 2017; Baral & Shah 2014). L'élimination ou la conversion de ces composés est nécessaire pour un rendement optimal des hydrolysats d'un point de vue économique et environnemental. D'autres paramètres peuvent affecter le

processus de fermentation comme la présence des ETMs qui sont connus pour être toxiques vis-à-vis de l'activité de microorganismes (Chen et al. 2008). Cet effet inhibiteur a été le plus souvent observé dans les procédés de méthanisation (Bhattacharya et al. 1995). À faible concentration, les ETMs peuvent montrer parfois un effet activateur du développement cellulaire des microorganismes (Akrida-Demertzi et al. 1988; Akrida-Demertzi & Koutinas 1992). La réduction du rendement de fermentation du glucose a également été observée en présence du cuivre (Cu) qui réduit l'activité cellulaire des *S. cerevisiae*, pour des concentrations en Cu allant de 5 mg kg^{-1} à 50 mg kg^{-1} (Akrida-Demertzi & Koutinas 1992).

5.2.2.1. MICROORGANISMES UTILISÉES À L'ÉCHELLE INDUSTRIELLE

Plusieurs types de microorganismes sont utilisés en fermentation, on peut trouver des levures, des bactéries mais aussi des champignons. Ils sont généralement spécifiques et peuvent se développer soit en milieu aérobie ou anaérobie. Dans le domaine des biocarburants « *S. cerevisiae »* est la levure la plus utilisée dans la production d'éthanol cellulosique à partir de sucres en C_6 et plus particulièrement du glucose. Sa large utilisation est due à sa capacité d'adaptation face aux variations de pH, à la présence d'acides organiques et à sa tolérance face aux concentrations élevées en éthanol produit pendant la fermentation (Zhao et al. 2012; Albergaria & Arneborg 2016; Alfenore et al. 2004). La plupart des microorganismes utilisés en fermentation sont sensibles à certains composés qui peuvent affecter leur développement dans le milieu et donc le rendement en produit final. Parmi ces composés, les produits de dégradation formés lors du prétraitement de la biomasse et provenant de la dégradation des sucres en C_5 et C_6, ainsi que les composés phénoliques comme les résidus de lignine, mais également la présence de certains ETMs qui peuvent être toxiques pour les microorganismes (Akrida-Demertzi & Koutinas 1992; Chen et al. 2008).

La bactérie *C. acetobutylicum* est également très utilisée à l'échelle industrielle car en plus de produire des solvants (éthanol, butanol, acétone), elle a la capacité de convertir ces derniers en acides organiques (acide acétique, acide butyrique). Contrairement à *S. cerevisiae , C. acetobutylicum* est capable de métaboliser les sucres simples issus de la cellulose, des xylanes, et des oligo- et polysaccharides ; un caractère qui la rend attractive au niveau industriel (Charubin et al. 2018). L'utilisation de *Clostridium* a été développée depuis 1912 (Green 2011). La fermentation en présence de *Clostridium* se fait en milieu anaérobie.

En effet, la présence d'oxygène dans le milieu va provoquer une diminution de l'activité des microorganismes qui va affecter directement le rendement en produit. Contrairement au type Saccharomyces, l'utilisation des bactéries du genre *Clostridium* nécessite le contrôle des échanges gazeux pendant le procédé de fermentation.

5.3. MARCHÉ ET PRODUCTION

Le coût de production du bioéthanol peut varier en fonction de plusieurs facteurs, tels le coût de la matière première, le coût énergétique du procédé ainsi que le coût d'investissement (Demirbas & Demirbas 2010; Balat 2011).

En s'appuyant sur la littérature, on constate que le coût de la matière première est l'un des postes les plus onéreux dans une transformation de la matière lignocellulosique en biocarburant, comme le montre l'étude de Dietrich et al (Dietrich et al. 2018). De ce fait, les biomasses issues des phytotechnologies, semblent être pertinentes pour d'éventuelles valorisations en bioraffinerie, pour remplacer et protéger les ressources utilisées actuellement ; elles pourraient ainsi être une bonne alternative d'un point de vue économique et également écologique.

6. CONTEXTE DE L'ÉTUDE : LE PROJET LORVER

6.1. PRÉSENTATION DU PROJET

Le projet LORVER est un projet soutenu par la région Grand Est et par l'Union Européenne (FEDER). L'objectif principal est de créer une filière de production de biomasse à usage non alimentaire par la valorisation de sites dégradés et de sous-produits industriels (ressources délaissées).

L'enjeu principal de LORVER est d'élaborer une chaîne de services écosystémiques conduisant à la requalification durable de friches industrielles tout en permettant une production végétale à usage industriel et sa valorisation.

Le projet dans sa totalité regroupe un consortium de 4 entreprises et 5 laboratoires (LIEC, LSE, LERMAB, LRGP, CETELOR) afin de lever les verrous scientifiques et techniques relatifs à l'ingénierie écologique, aux procédés de valorisation de la biomasse ainsi qu'identifier les conséquences environnementales liées aux procédés mis en œuvre. L'enjeu

principal de LORVER est d'élaborer une chaîne de services écosystémiques conduisant à la requalification durable de friches industrielles tout en permettant une production végétale à usage industriel et sa valorisation. Pour ce faire, des essais pilotes ont été conduits sur deux dispositifs constitués de parcelles de sols construits soit à partir de sols et sous-produits industriels contaminés en ETM, soit à partir de sols et sous-produits industriels non contaminés.

Concernant les biomasses végétales, quatre espèces ont été particulièrement étudiées dans LORVER :

- le peuplier (*Populus* sp.) pour son potentiel de production de biomasse a vocation énergétique,
- le chanvre (*Cannabis sativa* L.) et l'ortie (*Urtica* sp.) pour leur potentiel de production de fibres végétales à usage industriel,
- *Noccaea caerulescens* pour son aptitude à l'hyperaccumulation des métaux.

Pour ce qui est des voies de valorisation de la biomasse végétale, quatre ont été initialement insérées dans LORVER :

- la production d'énergie renouvelable (chaleur et électricité) par pyrolyse,
- la production de charbon (biochar) destiné à de multiples applications environnementales à partir du procédé de pyrolyse,
- l'élaboration de produits et matériaux fibrés,
- l’extraction d’éléments d’intérêt économique (ETMs)

Les travaux de thèse entrent dans le lot 3 « Production de biomasse » sous-tâche 3.3 « caractérisation chimique des matières végétales récupérées ». Ils visent à explorer une cinquième voie de valorisation, en complément à celles déjà citées, à savoir la bioraffinerie des biomasses produites sur les parcelles de sols construits contaminés en ETMs.

Organisation du projet LORVER

6.2. CHOIX DES ESPÈCES VÉGÉTALES

Dans le cadre de ce travail et pour répondre aux différents objectifs du projet deux espèces ont été sélectionnées :

Le Saule (***Salix viminalis***) : un ligneux à haut pouvoir calorifique, espèce non accumulatrice d'ETMs, mais capable de pousser sur des sols contaminés ou friches industrielles. Le but est de convertir la partie polysaccharidique en bioéthanol.

Une plante herbacée hyperaccumulatrice (***N. caerulescens***) : connue pour son pouvoir

hyperaccumulateur d'ETMs. Cette espèce a également été étudiée durant le projet LORVER dans le but de récupérer des ETMs potentiellement valorisables selon le concept d'agromine (Hazotte et al. 2017).

Pour les deux types de biomasse, il s'agira d'étudier le potentiel de valorisation en bioraffinerie ainsi que l'impact des métaux accumulés dans la biomasse sur ce potentiel.

6.3. DESCRIPTION ET INTÉRÊT DES ESPÈCES ÉTUDIÉES

6.3.1. UNE HERBACÉE : *NOCCAEA CAERULESCENS* (J.PRESL & C.PRESL) F.K.MEY

6.3.1.1. CLASSIFICATION BOTANIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE

N. caerulescens J.Presl & C.Presl (anciennement *Thlaspi caerulescens*), de son nom français « tabouret bleuâtre » est une plante hyperaccumulatrice qui appartient à la famille des brassicacées. C'est une plante herbacée annuelle, bisannuelle ou pérenne avec un cycle de vie relativement court (Frérot et al. 2005). Elle pousse sous forme de rosette (figure 11) et la floraison s'étale de mai à juillet. Pour son développement, elle a besoin de beaucoup d'ensoleillement et d'humidité et de températures assez basses. Elle préfère des sols à pH neutre, même pauvres en nutriments et ne tolère pas la salinité (Anon 2018b). Elle peut atteindre 15 à 40 cm de hauteur (Lehmuskallio 2018). L'espèce est répandue un peu partout en Europe : Allemagne, Espagne, Italie, elle est particulièrement abondante en France et en Scandinavie (Koch et al. 1998; Reeves et al. 2001a; Gonneau 2014).

N. caerulescens pousse naturellement dans trois types édaphiques contrastés à savoir : deux types édaphiques métallicoles que l'on trouve sur des sols calaminaires (à fortes teneurs en Cd, Pb et Zn) et des sols serpentiniques (sols ultramafiques à forte teneur en Ni et Mg) et un type édaphique non-métallicole que l'on retrouve sur des sols non métallifères.

Figure 12. Photos de Noccaea caerulescens (Lehmuskallio 2018)

La taxonomie de *Noccaea caerulescens*, est résumée ci-après (GBIF 2014)

Règne	Végétal
Phylum	Trachéophytes
Classe	Angiospermes
Ordre	Brassicales
Famille	Brassicaceae
Genre	*Noccaea* Moench
Espèce	*Noccaea caerulescens* (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey

6.3.1.2. UTILISATION DE *NOCCAEA* EN PHYTOREMÉDIATION

Dans la famille des **Bracicasseae**, *Arabidopsis*, *Noccaea* ou *Brassica* ont beaucoup été étudiées pour comprendre le phénomène d'hyperaccumulation et d'hypertolérance vis-à-vis des ETMs (Krämer 2010; Bareen 2012). Grâce à leur pouvoir accumulateur et leur capacité à croitre sur des sols métallifères (Schat & Aarts 2003), elles ont été choisies comme plantes modèles dans l'étude et la compréhension des mécanismes de prélèvement et de stockage des ETMs (Halimaa et al. 2014; Cobbett 2003).

N. caerulescens présente une grande variabilité phénotypique, tant à l'échelle de l'espèce qu'à celle du type édaphique. Ainsi, en milieu naturel, la gamme de variation des concentrations en Cd et en Zn dans les parties aériennes est respectivement 0,56 - 2 315 mg Cd kg^{-1} et 479 – 19 290 mg Zn kg^{-1} (Gonneau 2014). À l'échelle mondiale, environ 15 dispositifs expérimentaux au champ (majoritairement implantés en Europe) ont testé le potentiel de *N. caerulescens* pour la phytoextraction des ETMs durant les 25 dernières années (Sterckeman & Puschenreiter 2018). Si la majorité de ces essais concernent des sols agricoles contaminés par les activités humaines, seuls les travaux récents de Jacobs et al. (2017; 2018a; 2018b) s'intéressent aux sols urbains. L'efficacité globale d'extraction de ces essais est hautement

variable et, parmi les études qui évaluent la diminution relative dans le sol, l'ordre de grandeur moyen est autour de 5-10 % de la diminution des concentrations totales en Cd dans les 20 à 30 premiers centimètres du sol après une récolte jusqu'à 20-25 % dans deux essais. Par ailleurs, les rendements de biomasse présentent également une forte variabilité avec des valeurs comprises entre 0,28 t ha^{-1} et 7,8 t ha^{-1} (en matière sèche) en lien avec les différences de pratiques, de type de sols et de populations de *N. caerulescens* utilisées.

Sterckeman et al. (2018) ont simulé les flux de cadmium (Cd) dans les sols sous grande culture à l'échelle de la France et de ses 22 anciennes régions administratives. Dans les conditions de fertilisation et de réglementation actuelles, la teneur en Cd dans les sols français (0,31 mg kg^{-1}) augmentera de 3 à 5 % au bout d'un siècle. La teneur dans les récoltes suivra la même tendance renforçant ainsi la surexposition de la population au Cd par les denrées alimentaires. Pour réduire la teneur en Cd dans les sols agricoles français, la phytoextraction en tant que culture intermédiaire tous les quatre à cinq ans a été testée par simulation (Sterckeman et al. 2019). Un rendement de 2,5 t de MS ha^{-1}, ce qui semble réaliste, permettrait alors d'abaisser la teneur totale en Cd à 0,11 mg kg^{-1}. Une telle phytoextraction demanderait de cultiver 4 millions d'hectares par an et produirait environ 10 millions de tonnes de biomasse sèche. Dès lors, des procédés doivent impérativement être mis au point pour récupérer de l'énergie, des métaux ou des composés bénéfiques de la biomasse produite par phytoextraction. Malgré l'intérêt que présente cette plante en phytotechnologie et son potentiel de développement, aucune étude scientifique n'a été jusqu'à présent consacrée à la caractérisation de sa biomasse dans l'optique d'une valorisation industrielle en bioraffinerie.

6.3.2. UN LIGNEUX : LE SAULE (*SALIX VIMINALIS L.*)

6.3.2.1. CLASSIFICATION BOTANIQUE

Le saule (*Salix viminalis*) appartient à la famille des salicacées. Il pousse sous forme d'arbres avec des rameaux flexibles et nombreux (Lehmuskallio 2018), avec une hauteur entre 2 et 6 mètres. La floraison se fait entre avril et mai. Il fait partie des espèces à croissance rapide. Concernant les caractéristiques climatiques, le saule a tendance à préférer des endroits ensoleillés avec des températures plutôt tempérées. Il a également une préférence pour les sols argileux, plus ou moins riches en nutriments et assez humides (Anon 2018a). Les

saules sont connus pour leur capacité à contrôler l'érosion des sols ainsi que les infiltrations des eaux (Meers et al. 2007). D'un point de vue géographique, le saule est plus répandu dans les zones tempérées (Europe, Asie tempérée, Amérique) (Anon 2018a).

Figure 13. Photos du saule (Salix viminalis L.) (Lehmuskallio 2018)

La classification du saule est adapté de (GBIF 2014)

Règne	Végétal
Phylum	Trachéophytes
Classe	Magnoliophytes
Ordre	Salicales
Famille	Salicacées
Genre	Salix L.
Espèce	*Salix viminalis L*.

6.3.2.2. Utilisation du saule en phytoremédiation

Le saule est très étudié pour la phytoremédiation en taillis à courte ou très courte rotation (TCR et TTCR). Grâce à sa croissance rapide, et à son pouvoir calorifique élevé, le saule est très utilisé de façon générale dans la production d'énergie, soit par combustion, ou par conversion biochimique pour produire du biocarburant et des gaz de synthèse. Le saule est communément utilisé comme taillis à courte rotation pour la production de biomasse et certains clones peuvent produire plus de 35 tonnes de bois par hectare par an sous des conditions climatiques favorables (Greger & Landberg 1999). Cette haute productivité constitue l'un des critères recherchés pour la phytoremédiation comme le montre les travaux de Baltrėnas & Čepanko. (2009).

Ainsi, bien qu'il soit non hyperaccumulateur d'ETMs, des études ont montré la capacité du saule à pousser sur des friches industrielles et des sols contaminés (Meers et al. 2007;

Baltrėnas & Čepanko 2009). D'après la revue de littérature de Sterckeman & Puschenreiter. (2018), il semble que pour le saule, la durée de traitement des sols contaminés en Cd nécessite plusieurs décennies pour atteindre l'objectif de décontamination. Ainsi, la phytoextraction des ETMs avec *Salix* spp. devrait de préférence être associé à d'autres options pour l'utilisation de la biomasse, telles que la production d'énergie ou la bioraffinerie. Cette approche a été suggérée comme une stratégie de phytogestion efficace pour un site contaminé, plutôt que comme une option de restauration (Robinson et al. 2009).

CONCLUSION DU CHAPITRE

La phytoremédiation est une méthode prometteuse pour détoxifier et donner une nouvelle vie à des sols délaissés et/ou pollués. En effet, pour qu'une biomasse soit adaptée à la technique de phytoremédiation, elle doit réunir certains critères : (1) être capable d'accumuler et de tolérer des teneurs importantes en ETMs et (2) avoir une croissance rapide pour la production de biomasse.

Face à la demande croissante en énergie et aux problèmes environnementaux liés à l'exploitation intensive des sols, la phytoremédiation représente une bonne alternative grâce à son double intérêt : (1) elle permet de décontaminer et de purifier le sol via les racines des plantes sans pour autant modifier ses propriétés physico-chimiques; (2) elle permet également une production de biomasse. La plupart des travaux abordés dans la littérature montrent que les biomasses issues de phytotechnologies (ligneuses ou herbacées) peuvent être valorisées soit en bioénergie, soit pour l'extraction des ETMs (phytomining) soit encore pour des applications de niche (catalyseurs). Cependant la valorisation des biomasses polluées en bioraffinerie pour produire des biocarburants et/ou pour extraire des molécules plateformes n'a jamais été développée jusqu'à présent.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL : COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de saule utilisés dans la thèse proviennent de deux sites différents. Le saule, appelé dans la suite de ce travail, saule 1 *(Salix viminalis*) a été récolté sur un terrain de dépôt de sédiments, situé à Deûlémont (département du Nord), riche en cadmium, zinc, plomb, cuivre et arsenic (Delplanque et al. 2013). Les échantillons proviennent de taillis à courte rotation et ont été fournis par l'INERIS. Le saule, appelé par la suite, saule 2 *(Salix aquatica grandis)* fourni par le Laboratoire Chrono-Environnement de l'université de Franche-Comté, a été récolté sur une parcelle expérimentale, où le sol est argilo-limoneux, située sur la commune de Leforest (département du Pas de Calais) à quelques kilomètres de l'ancienne usine Métaleurop Nord. Malgré la fermeture du site en 2003, les sols autour de l'usine sont encore fortement pollués sur une surface de 120 km^2 par le zinc, le plomb et le cadmium (Sterckeman et al. 2002).

Les plants de *N. caerulescens* utilisés pour montrer la faisabilité de leur utilisation en bioraffinerie ont été fournis par le Laboratoire Sol et Environnement de l'Université de Lorraine. Certains plants ont été cultivés en serre sur du terreau artificiellement contaminé en Cd et en Zn. Des échantillons provenant de différents sites ont par ailleurs été utilisés pour établir la première caractérisation chimique détaillée de *Noccaea*, puisqu'à ce jour, elle n'est pas publiée. Les échantillons utilisés proviennent de différents sites géographiques et ont grandi sur des sols de composition variable. La description des différents échantillons de *Noccaea* est résumée dans le tableau 5.

Tableau 5. Description des échantillons de Noccaea

Provenance	Nom attribué	Caractéristiques
Laboratoire Sol et Environnement (LSE) à **Nancy**	LS	Échantillon cultivé dans des serres (LSE) sur terreau artificiellement contaminé en Cd et Zn. Les graines sont issues de la population Ganges
Croix des Moinats (près de **la Bresse**, dans les Vosges)	CM	Population dite non-métallicole, se développe sur un sol ne contenant pas particulièrement d'ETMs ; Elle hyperaccumule le Zn
Ganges (dans l'Hérault)	G	Population métallicole qui hyperaccumule particulièrement le Cd ; hyperaccumule également le Zn
Viviez (dans l'Aveyron)	VI	Échantillon cultivé sur un sol agricole artificiellement contaminé en Cd et Zn. Les graines proviennent de la population de Viviez
Parcelle TB2M Jeandelaincourt près de **Nancy**, (Projet LORVER)	LO	Échantillon cultivé sur sol reconstitué contaminé en Cd, Cu et Zn. Les graines sont issues de la population Ganges

1.2. SÉCHAGE ET BROYAGE

Tous les échantillons cités dans le paragraphe précédent sont triés, nettoyés puis séchés pendant 48 h dans une étuve à 50 °C avant d'être broyés. Pour réaliser toutes les caractérisations chimiques, le lot d'échantillons de *Noccaea* ainsi que les échantillons de Saule sont réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à billes. Afin d'éviter toute contamination extérieure par des ETMs, le broyage est effectué à l'aide d'un broyeur à billes en Agate (Retsch®). Le temps de broyage varie entre 30 min et 1 heure selon la taille initiale de l'échantillon. Les poudres sont ensuite conservées dans un endroit sec.

1.3. DÉTERMINATION DU TAUX DE MATIÈRE SÈCHE

Le taux de matière sèche des échantillons est déterminé à l'aide d'un dessiccateur infra-rouge Kern MRS 120-3. Environ 100 mg de poudre sont placés dans une coupelle en aluminium le tout placé dans le dessiccateur. L'échantillon est séché à 105 °C (lumière

infrarouge) jusqu'à stabilisation (10-15min) de la masse. Le taux de matière sèche est indiqué directement sur l'appareil, en prenant en compte la masse initiale. Cette opération est effectuée avant chaque analyse ou caractérisation et permet de déterminer la masse sèche de l'échantillon.

2. CARACTÉRISATION CHIMIQUE DES BIOMASSES

L'étape de caractérisation consiste à quantifier les biopolymères de la biomasse lignocellulosique (cellulose, hémicelluloses et lignine) ainsi que des métabolites secondaires connus sous le nom d'extractibles. On commence par une extraction au Soxhlet pour récupérer les extractibles, puis une partie de cette biomasse sans extractibles est utilisée pour évaluer le taux de lignine de Klason, ainsi que le taux d'holocellulose qui représente la fraction polysaccharidique de la biomasse. La teneur en ETMs dans la matière première est également déterminée. La figure 14 ci-après résume les différentes étapes suivies.

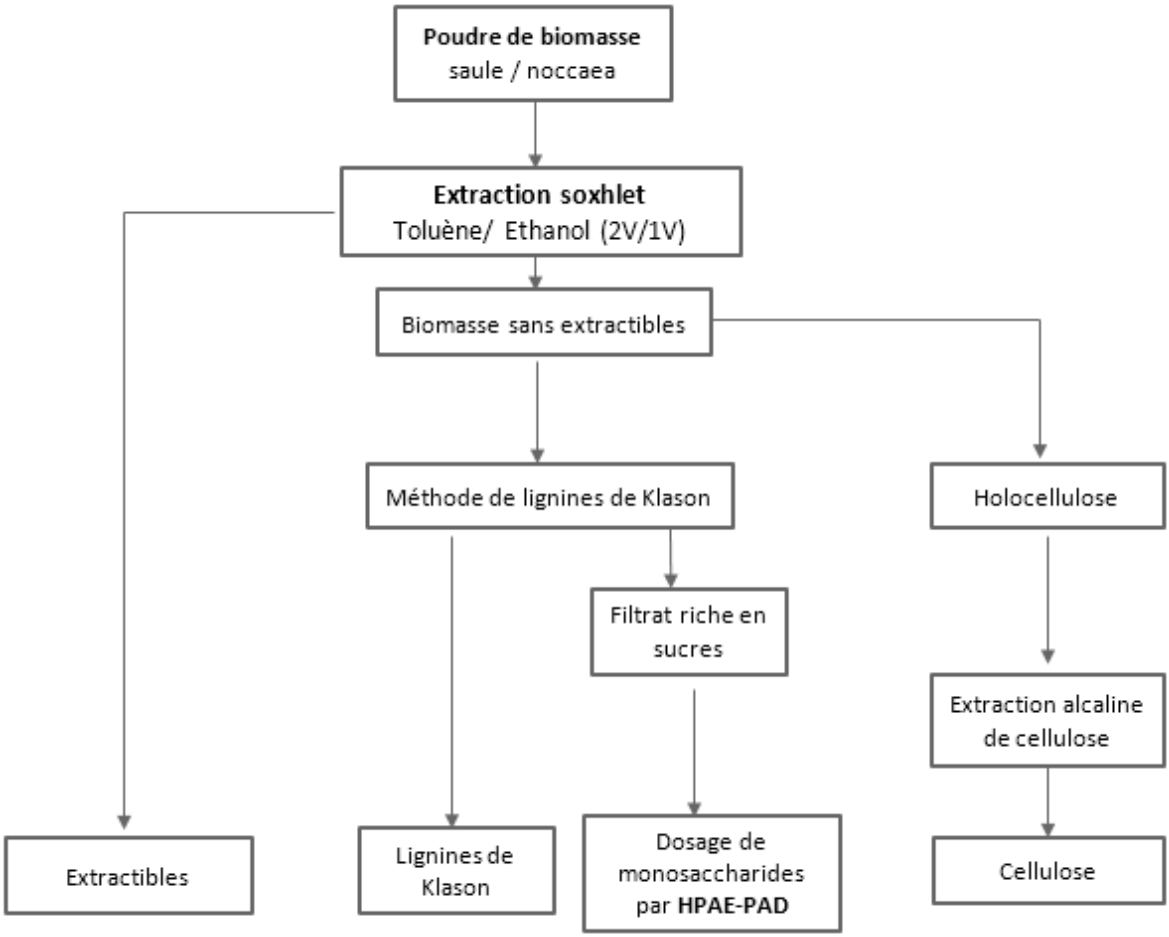


Figure 14. Représentation schématique des différentes étapes de caractérisation chimique

2.1. DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN ETMS DES ÉCHANTILLONS

La première étape de caractérisation consiste à déterminer la teneur en éléments-traces métalliques (ETMs) des échantillons de *Noccaea* et de saule.

2.1.1. MINÉRALISATION (VOIE HUMIDE)

Avant minéralisation les poudres sont séchées pendant une nuit dans l'étuve à 105 °C. La minéralisation est réalisée suivant une méthode standardisée de l'American Wood Protection Association (AWPA-A7-04- Standard wet ashing procedure for preparing wood for chemical analysis)

Une masse de 200 mg est pesée dans un erlenmeyer, et 5 mL d'acide nitrique (HNO_3, 65%) sont ajoutés. Le mélange est placé dans un bain de sable préchauffé à 120°C, pendant 6 h. La dégradation de la matière organique est accompagnée par un dégagement de fumées

rouge orangé. La température est ensuite baissée à 100°C, et le mélange est laissé dans le bain toute la nuit jusqu'à dégradation complète de la matière organique. La minéralisation peut être prolongée jusqu'à 48 h pour une minéralisation totale. Une fois la minéralisation achevée, 2 mL d'eau oxygénée (H_2O_2, 30 %) sont ajoutés dans le mélange qui est maintenu pendant 20 min dans le bain jusqu'à ce que la solution devienne limpide. Une fois refroidie, la solution est filtrée puis le volume est complété à 50 mL avec de l'eau ultrapure. Les solutions sont conservées au congélateur jusqu'à analyse.

2.1.2. Dosage des ETMs par ICP-AES

Le dosage des ETMs contenus dans les biomasses étudiées est réalisé par ICP-AES, qui est l'association d'un Plasma à Couplage Inductif et d'un Spectromètre d'Émission Optique (Thermo Fischer iCAP 6300 Duo), étalonné avec des solutions certifiées (PlasmaCAL, SCP Science). Pendant l'analyse l'échantillon sous forme liquide passe dans un nébuliseur où il est dispersé en présence d'argon dans une chambre de vaporisation qui permet de séparer les fines gouttelettes de l'échantillon formées et d'éliminer les plus grosses laissant le passage des plus petites vers la torche à plasma (figure 15).

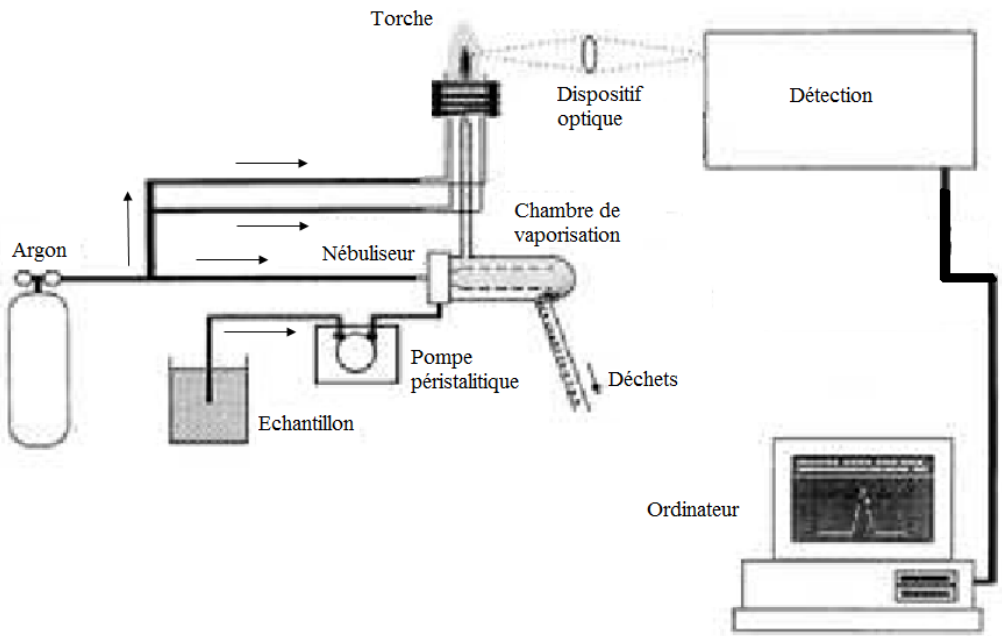


Figure 15. Représentation schématique des composantes d'un ICP-AES

L'échantillon est ensuite injecté sous forme de fines gouttelettes dans le plasma d'argon où il est ionisé. Le plasma chauffe l'échantillon à une température élevée qui peut atteindre 6000 K, faisant passer les électrons d'un état stable à un état excité. Le retour des électrons à leur état fondamental est accompagné par une libération d'énergie sous forme de lumière, qui correspond à une longueur d'onde, qui est propre à chaque atome. Cette longueur d'onde est ensuite détectée par une caméra CID (Charge Injection Device) qui transforme le signal lumineux en signal électrique. Une série de standards d'ETMs de concentrations connues est également injectée afin de permettre l'étalonnage et la quantification des éléments analysés.

2.2. Extraction au Soxhlet

Avant toute extraction, le taux d'humidité de chaque échantillon est déterminé. Pour réaliser l'extraction au toluène-éthanol (2V/1V), une cartouche de cellulose contenant 3 g de poudre est placée dans le Soxhlet. Ce dernier est placé sur un ballon contenant 150 mL de solvant. L'ensemble placé sur chauffage à reflux est ensuite porté à ébullition. Après 6 h d'extraction, environ 80 mL d'éthanol sont ajoutés dans chaque ballon. L'extraction dure 17 h à raison de 5 à 6 cycles par heure. À la fin de chaque extraction, le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi). Les cartouches contenant la biomasse extraite sont placées dans l'étuve à 40 °C pendant une nuit, puis pesées afin de quantifier le contenu en extractibles de chaque échantillon. Trois essais sont réalisés pour chaque échantillon, et le résultat représente la moyenne des trois essais. Le contenu en extractibles est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ Extractibles} = \frac{\text{Masse des extraits secs (g)}}{\text{Masse sèche initiale (g)}} \times 100$$

2.3. Lignines de Klason et sucres totaux

2.3.1. Quantification de la lignine insoluble

Le contenu en lignine insoluble est déterminé suivant la norme TAPPI 222 OM-83, qui est une méthode d'hydrolyse en deux étapes pour isoler les lignines de Klason. Elle consiste à ajouter 1,5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4, 72%) à une masse de 0,175 g de matière sèche

finement broyée (sans extractibles). Ce mélange est ensuite incubé à 30°C pendant 1 h, cette étape est nommée hydrolyse primaire. Le mélange est ensuite dilué dans 42 mL d'eau ultrapure pour une atteindre la concentration finale de 4% en acide, puis placé dans un autoclave à 121°C durant 1 heure. Cette deuxième étape est appelée hydrolyse secondaire. Une fois le mélange refroidi, la suspension est filtrée sous vide sur un creuset fritté contenant un filtre en fibre de verre. Le résidu solide qui représente la lignine insoluble est séché à l'étuve à 105°C pendant 24 h. La fraction liquide est diluée dans une fiole de 100 mL, dont 4 mL sont conservés au frais pour le dosage des sucres totaux et acides uroniques par chromatographie ionique. Le taux de lignine est calculé comme suit :

$$\% \text{ Lignines de Klason} = \frac{\text{Masse du résidu solide (g)}}{\text{Masse sèche initiale avec extractibles (g)}} \times 100$$

2.3.2. IDENTIFICATION ET DOSAGE DES MONOSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE HPAE-PAD

La séparation des monosaccharides présents dans les échantillons est réalisée par chromatographie d'échange d'anions couplée à un détecteur par ampérométrie pulsée (HPAE -PAD) DIONEX ICS-3000 (figure 16). L'appareil est constitué d'une pompe à gradient, d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur à ampérométrie pulsée avec une électrode de travail en or une électrode de référence Ag/AgCl. La phase mobile est constituée d'un gradient d'eau ultrapure, d'une solution de soude (NaOH 250 mM) et d'une solution d'acétate de sodium (NaOAc 1 M et NaOH 20 mM) préparées avec de l'eau ultra pure. Les éluants sont dégazés à l'hélium pendant l'analyse. Le module d'analyse est constitué d'une colonne de garde (3x50 mm) et d'une colonne CarboPaC™ PA20 (3x150 mm). La séparation des monosaccharides est réalisée à une température de 35°C avec un débit d'éluant de 0,4 mL/min. Le logiciel Chromeleon version 6.8 (Dionex Corporation, USA) est utilisé pour l'exploitation des résultats.

*Appareil	DIONEX – ICS 3000
*Colonne	CarboPaC™ PA20 (3 x 150mm)
*Dégazage	Hélium
*Éluant	H_2O/NaOH/NaOAc
*Débit	0,4mL/min
*Température	35°C
*Temps d'analyse	60min
*Volume d'injection	25µL

Figure 16. Conditions d'analyse de chromatographie échangeuse d'ions (HPAEC-PAD) pour le dosage des monosaccharides et des acides uroniques

L'analyse est réalisée sur la fraction liquide obtenue après dosage des lignines de Klason. Avant l'analyse des échantillons, une série de solutions de standards est injectée, contenant des mélanges de sucres à différentes concentrations qui sont : le **fucose** (Fuc), l'**arabinose** (Ara), le **rhamnose** (Rha), le **galactose** (Gal), le **glucose** (Glc), le **xylose** (Xyl), le **mannose** (Man), l'**acide galacturonique** (GalUA) et l'**acide glucuronique** (GlcUA).

2.4. EXTRACTION DE L'HOLOCELLULOSE : DÉLIGNIFICATION AU CHLORITE

La fraction d'holocellulose est isolée en dégradant la lignine à l'aide de chlorite de sodium dans un milieu acide. Une masse de 2 g de biomasse préalablement extraite, est mélangée avec une solution composée de 125 mL d'eau ultrapure, 2 g de chlorite de sodium ($NaClO_2$) et de 2 mL d'acide acétique glacial (CH_3COOH). Le mélange est placé dans un ballon baignant dans un bain d'huile et équipé d'un montage à reflux sous agitation continuelle pendant 6 h à 70°C. L'ajout du chlorite de sodium et de l'acide acétique est répété toutes les deux heures jusqu'à obtention d'une pâte blanchâtre. Le mélange obtenu est filtré sur un verre fritté, lavé plusieurs fois à l'eau ultrapure puis séché à l'étuve pendant 24 h à 40 °C. Le taux d'holocellulose est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ Holocellulose} = \frac{\text{Masse du résidu solide (g)}}{\text{Masse sèche initiale avec extractibles (g)}} \times 100$$

2.5. EXTRACTION DE L'ALPHA-CELLULOSE

Pour séparer la cellulose, l'hydrolyse alcaline des hémicelluloses est adoptée car elle est moins agressive que l'hydrolyse acide et moins longue à réaliser. On mélange 1 g d'holocellulose avec 50 mL de solution de NaOH à 17,5%. Le mélange est agité à température ambiante, pendant 30 mn. Un volume de 50 mL d'eau ultra-pure est ensuite ajouté donnant ainsi une concentration finale de NaOH de 8,75 %, toujours à 25 °C pendant 30 mn. Après une heure de réaction le mélange est filtré sous vide sur un verre fritté. Le résidu est ensuite rincé avec 50 ml d'une solution d'acide acétique à 1% et enfin avec 100 mL d'eau ultrapure. La pâte blanchâtre récupérée est placée à l'étuve pendant une nuit à 40 °C. Le taux de cellulose est défini comme suit :

$$\% \ \alpha\text{-Cellulose} = \frac{\text{Masse du résidu solide (g)}}{\text{Masse sèche initiale avec extractibles (g)}} \times 100$$

2.6. QUANTIFICATION PRÉLIMINAIRE DES PECTINES DE *NOCCAEA* PAR COLORIMÉTRIE

La quantification des pectines dans les différents échantillons de *Noccaea* est réalisée selon la méthode de Ahmed and Labavitch (Ahmed & Labavitch 1978). La méthode comporte deux étapes : (1) l'hydrolyse des pectines dans de l'acide sulfurique concentré et ensuite (2) un dosage par spectrophotométrie UV-VIS. Pour cela environ 5 mg de chaque échantillon (avec extractibles) sont soigneusement pesés dans un tube à centrifuger de 15 mL contenant un barreau magnétique. Ensuite 2 ml d'acide sulfurique concentré (97 %) glacé sont ajoutés dans chaque tube et le tout est mélangé doucement sur agitateur motorisé pendant 10 min, puis placé dans un bain d'eau glacé en maintenant l'agitation. Les tubes sont passés de temps à autre au vortex pour homogénéiser le mélange et mieux hydrolyser la matière. Approximativement 0,5 mL d'eau ultrapure sont ajoutées goutte à goutte dans chaque tube, qui est ensuite laissé au repos pendant 5 min. De nouveau 0,5 mL d'eau sont ajoutés goutte à goutte et agité jusqu'à dissolution complète. L'échantillon dissous est transféré dans une fiole de 10 mL et complété avec de l'eau ultra-pure. Le mélange est ensuite centrifugé pour précipiter la fraction insoluble correspondant à la lignine et permettre une meilleure lecture

au spectrophotomètre. Pour l'étape de dosage, 0,6 mL de solution récupérée après centrifugation sont placés dans un tube à essai, dans lequel on ajoute 3,6 mL du réactif de tétraborate refroidi ($1,25.10^{-2}$ M $Na_2B_4O_7$ dans de l'acide sulfurique concentré). Les tubes sont placés dans un bain d'eau bouillante pendant 5 min ensuite dans l'eau froide et enfin laissés pendant 10min à température ambiante. Dans chaque tube, 60 µL de m-hydroxydiphenyl ($C_6H_5C_6H_4OH$) sont ajoutés dans les tubes. L'absorbance du mélange est mesurée rapidement à 520 nm. Un schéma résumant les différentes étapes d'extraction est présenté à la figure 18. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle en remplaçant l'échantillon par une série de solutions d'acide galacturonique (de 10 à 150 mg L^{-1}) (figure 17).

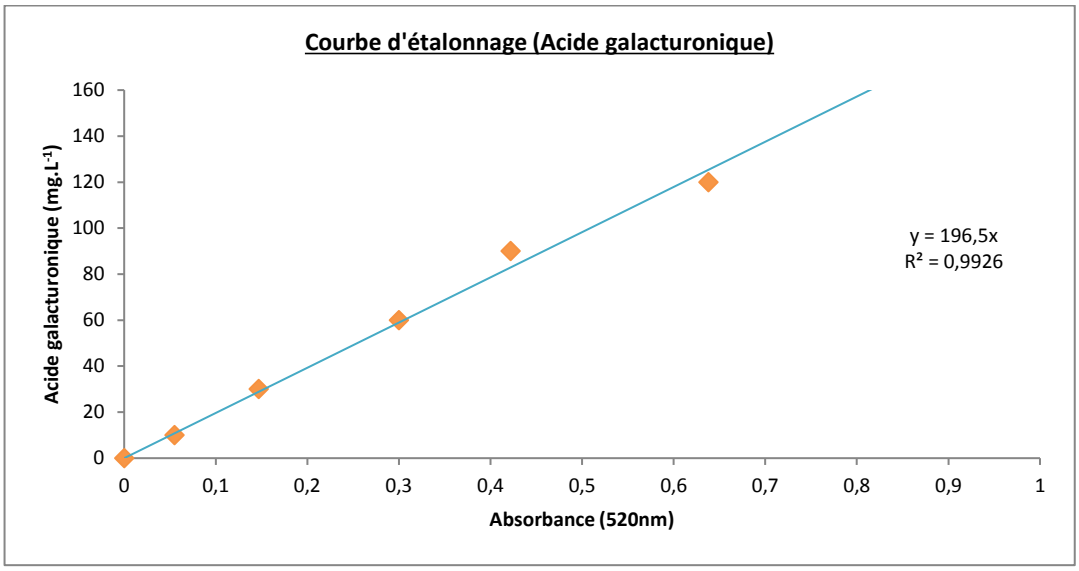


Figure 17. Courbe d'étalonnage d'acide galacturonique

La concentration d'un échantillon en acide galacturonique est calculée à partir de la mesure de son absorbance à l'aide de l'équation suivante :

$$C_{AG}(mg/L)=196,5 \times \text{Absorbance mesurée}$$

On peut par la suite calculer la teneur en acide galacturonique contenu dans l'échantillon en utilisant la formule suivante :

$$\text{Teneur}_{AG}(g/100g) = C_{AG}(mg/L)\times\frac{1}{1000}\times 10.10^{-3}(L)\times\frac{100}{\text{masse sèche initiale}(g)}$$

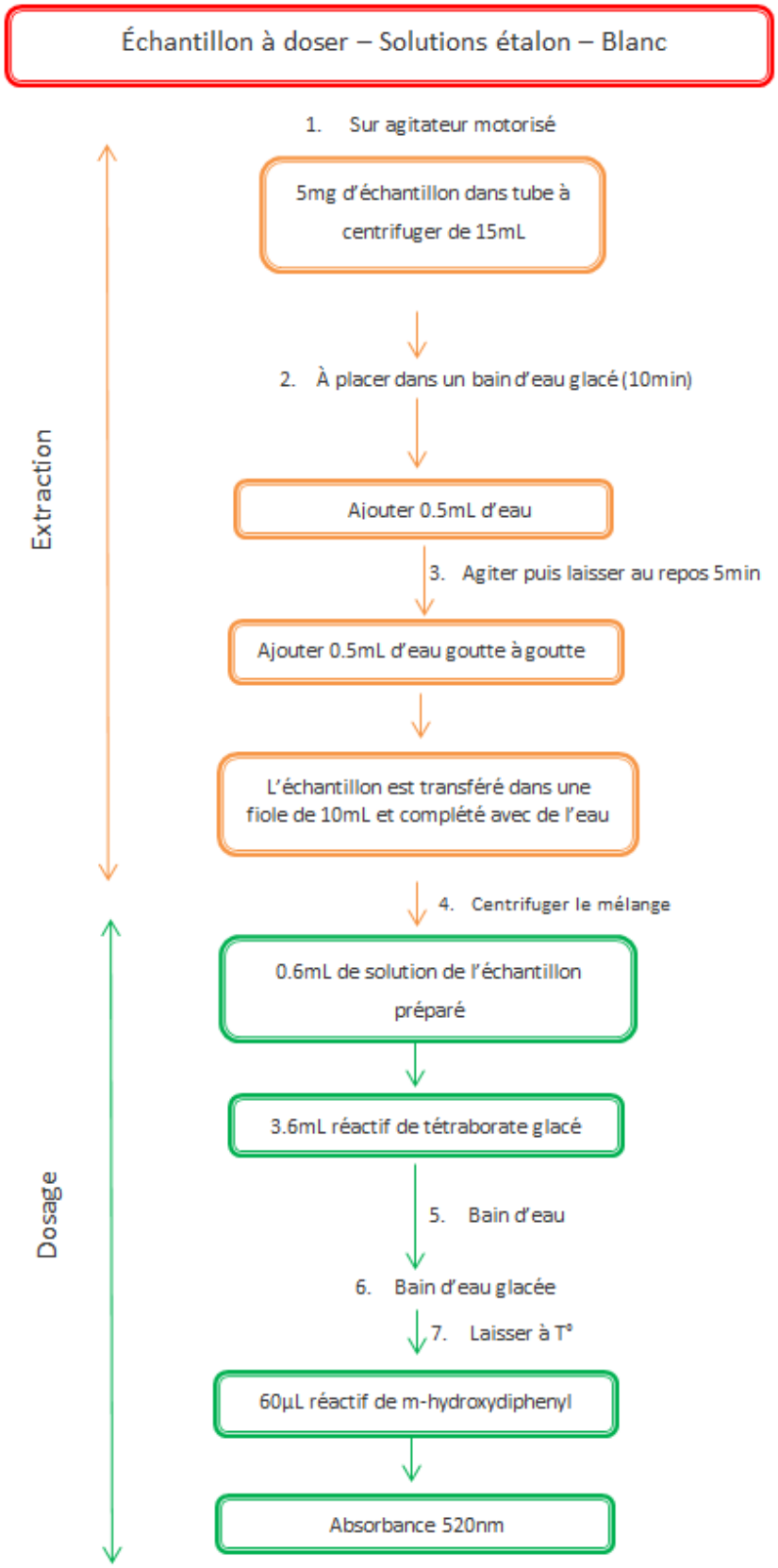


Figure 18. Diagramme résumant les étapes suivies pour le dosage des pectines par colorimétrie

3. PRÉTRAITEMENT ORGANOSOLV DU SAULE ET VALORISATION DES PÂTES CELLULOSIQUES

Le procédé de prétraitement organosolv utilise soit un solvant organique soit un mélange de solvant organique avec de l'eau et permet de solubiliser la lignine d'une biomasse et de récupérer une pâte riche en cellulose. En plus d'éliminer de la lignine, ce procédé permet dans une moindre mesure l'hydrolyse des hémicelluloses. Les solvants généralement utilisés sont l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'éthylène glycol… Les températures de prétraitement peuvent aller jusque 200°C en présence ou non d'un catalyseur.

Nous nous intéresserons d'une part au prétraitement organosolv d'échantillons de saule contaminé par des ETMs dans le but de comprendre l'impact de ce prétraitement sur la répartition des ETMs dans les différentes fractions récupérées, et d'autre part nous étudierons la valorisation des pâtes cellulosiques obtenues.

3.1. PRÉTRAITEMENT ORGANOSOLV DU SAULE CONTAMINÉ

Le traitement organosolv est réalisé dans un réacteur agité sous pression PARR (Mini Bench Top Reactor 4566) d'un volume de deux litres (figure 19). Une masse de 12 g de saule broyé, est traitée avec un mélange eau/éthanol (35/65 ; V/V) en présence d'acide sulfurique comme catalyseur à 0,5, 1 et 2% (masse d'acide/masse sèche de l'échantillon). Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau 6. À la fin du prétraitement le mélange est filtré sous vide, et le résidu solide pauvre en lignine est rincé avec un mélange eau/éthanol (35/65 ; V/V) chauffé au préalable à 60°C. La phase liquide, riche en lignine, est complétée avec trois fois son volume en éthanol 96° pour précipiter les lignines solubilisées, appelées aussi Lignine Éthanol Organosolv (EOL). Le mélange est ensuite centrifugé pour séparer la lignine des effluents liquides. Le résidu solide (pâte cellulosique) et la lignine sont séchés à l'étuve à 40 °C pendant une nuit.

Figure 19. Réacteur Parr utilisé pour le traitement organosolv

Tableau 6. Conditions opératoires appliquées sur le saule lors du traitement organosolv

Essai	Temps de séjour (min)	Température (°C)	Ratio EtOH/eau (%)	% H_2SO_4 (w/w)*
1	60	170	0,65	0,5
2	60	170	0,50	1
3	60	170	0,65	1
4	60	180	0,65	1
5	60	190	0,65	1
6	60	190	0,65	2

* masse d'acide / masse sèche de l'échantillon

3.2. COMPOSITION EN ETMS DES FRACTIONS RÉCUPÉRÉES APRÈS PURIFICATION ET TRAITEMENT ORGANOSOLV

Les fractions récupérées après traitement organosolv, pour les biomasses purifiées et contaminées, sont analysées pour évaluer leur teneur en ETMs. La minéralisation est réalisée sur 0,2 g de pâte cellulosique et de lignine ainsi que sur 2 mL d'effluent liquide suivant la méthode AWPA-A7-04 détaillée précédemment (§ 2.1.1). La méthode de dosage par ICP-AES suivie est également décrite dans la première partie de ce chapitre (§ 2.1.2).

3.3. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PÂTES

Après prétraitement organosolv, deux types de pâte riche en cellulose sont récupérés, comme résumé dans la figure 20. Dans un erlenmeyer, 2 g de pâte broyée sont introduits, auxquels on ajoute 100 mL de solution tampon d'acétate de sodium 50 mM (pH de 4,8). Les concentrations en substrat et en enzymes sont de 2 % (m/v) et de 0,8 $g.L^{-1}$ respectivement. Le mélange est incubé à 50 °C dans un incubateur rotatif à 170 rpm pendant 30 min. Après la pré-incubation, l'hydrolyse est initiée par l'ajout de cellulases de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (≥ 1 unité/mg - référence C28546 - 2.5KU Sigma Aldrich). L'hydrolysat est échantillonné périodiquement sur une durée de 72 h afin de suivre la cinétique de conversion de la cellulose en glucose. Le premier prélèvement est effectué juste avant l'ajout de l'enzyme qui représente le t_0 (point initial).

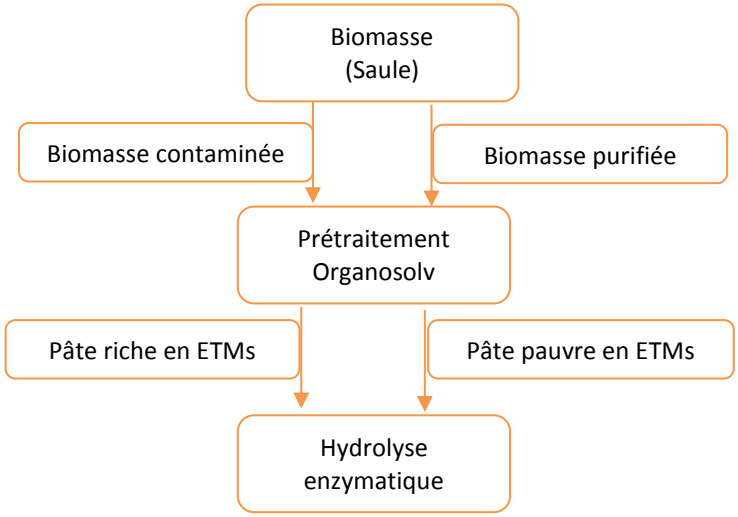


Figure 20. Représentation schématique des étapes suivies pour l'obtention des pâtes cellulosiques

Les échantillons prélevés sont trempés directement dans de l'eau bouillante pour cesser l'activité des enzymes, puis centrifugés. Le surnageant est dilué puis conservé au frais pour l'analyse du glucose et xylose par chromatographie ionique (HPAE-PAD) (§ 2.3.2).

4. PRÉTRAITEMENT PAR EXPLOSION À LA VAPEUR DU SAULE ET *NOCCAEA* ET VALORISATION DES PÂTES CELLULOSIQUES

4.1. PROCÉDÉ D'EXPLOSION À LA VAPEUR (OU STEAM EXPLOSION)

4.1.1. PRINCIPE DU PROCÉDÉ D'EXPLOSION À LA VAPEUR

L'explosion à la vapeur ou steam explosion (SE) est un procédé thermique, mécanique et chimique qui permet de déstructurer le contenu lignocellulosique de la biomasse. Le procédé de SE comporte deux étapes : une étape de vapocraquage dans un réacteur sous pression suivi d'une brusque détente explosive.

Le vapocraquage permet de faire pénétrer la vapeur d'eau sous haute pression par diffusion à l'intérieur de la structure de la biomasse où elle va se condenser. Sous l'action de la température l'eau condensée va initier des réactions d'hydrolyse des groupements acétyles des hémicelluloses. L'acide acétique ainsi libéré va ainsi contribuer à diminuer le pH du milieu

réactionnel et catalyser la dépolymérisation des hémicelluloses. La décompression explosive est ensuite provoquée par une chute brutale de la pression provoquant la revaporisation de l'eau condensée dans la biomasse. Cette variation brutale de pression va ainsi induire des forces de cisaillement à l'intérieur de la biomasse entrainant l'éclatement mécanique de la structure lignocellulosique de cette dernière. La température (et donc la pression) et le temps de séjour dans le réacteur sont donc les paramètres critiques du procédé. Une pré-imprégnation de la biomasse peut également améliorer l'efficacité du procédé de SE. Typiquement la biomasse peut être traitée avec une vapeur d'eau à 130-260 °C pour des temps de séjours allant de 1-30 min (Cybulska et al. 2013; Jacquet et al. 2015).

Afin de prendre en compte les différents paramètres opératoires du procédé un facteur représentatif de la sévérité imposée par ces conditions a été développé initialement par Brasch et Free ainsi que Chornet et Overend (Brasch & Free 1965; Chornet & Overend 1988). Ce calcul repose sur l'hypothèse que la cinétique de la dégradation de la biomasse lors du prétraitement suit une cinétique d'ordre un et suit également la loi d'Arrhenius. Le facteur de sévérité se calcule alors selon l'équation suivante :

$$\text{Sévérité} = \log \int_0^t e^{\frac{T_r - T_b}{14,75}} dt$$

Où T_r est la température de réaction en Kelvin

T_b est une température de référence ; T_b = 373 K

14,75 est une constante, ici arbitraire (en K), rendant compte de l'énergie d'activation de la réaction (Chum et al. 1990).

Afin de prendre également en compte l'effet de pH dû à l'imprégnation acide, un facteur de sévérité combiné peut alors être calculé (Chum et al. 1990) :

$$\text{Sévérité combinée} = \log \int_0^t e^{\frac{T_r - T_b}{14,75}} dt - pH$$

Où pH, est le pH de la solution d'imprégnation

L'intérêt majeur de ce procédé repose sur son faible coût énergétique, et sur le fait qu'il est respectueux de l'environnement. En effet, ce procédé n'utilise pas de solvants mais seulement de la vapeur d'eau pour traiter la biomasse.

Dans le cadre de notre étude, ce prétraitement a été choisi pour son double intérêt : d'une part fractionner la matière lignocellulosique pour favoriser l'hydrolyse enzymatique et d'autre part purifier la biomasse par libération des ETMs contenus dans la matière grâce à l'effet du prétraitement.

4.1.2. LE PILOTE D'EXPLOSION À LA VAPEUR

Le pilote d'explosion (figures 21 et 22) à la vapeur se compose d'un réacteur d'un volume de 4,8 litres ① où la vapeur produite à une température donnée par un générateur embarqué ②, est mise en contact avec la biomasse à traiter. Une détente brusque ou « éclatement » est ensuite produite à l'aide d'une vanne pneumatique ③. La matière est alors projetée vers un équipement cylindro-conique appelé « éclateur » ④ où la vapeur résiduelle est séparée de la matière qui peut être récupérée facilement par vidange de l'éclateur ⑤. Le pilote peut générer de la vapeur d'eau jusqu'à une température de 260°C et une pression de 50 bars.

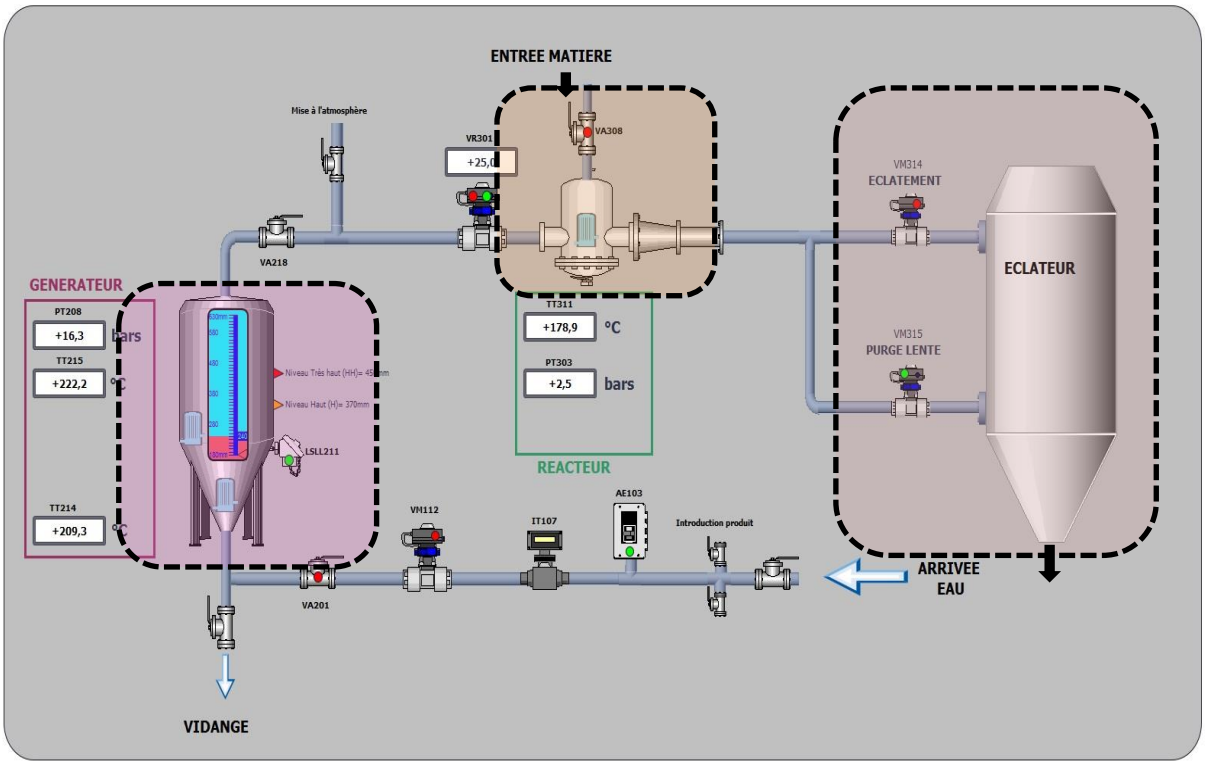


Figure 21. Schéma de fonctionnement du pilote d'explosion à la vapeur

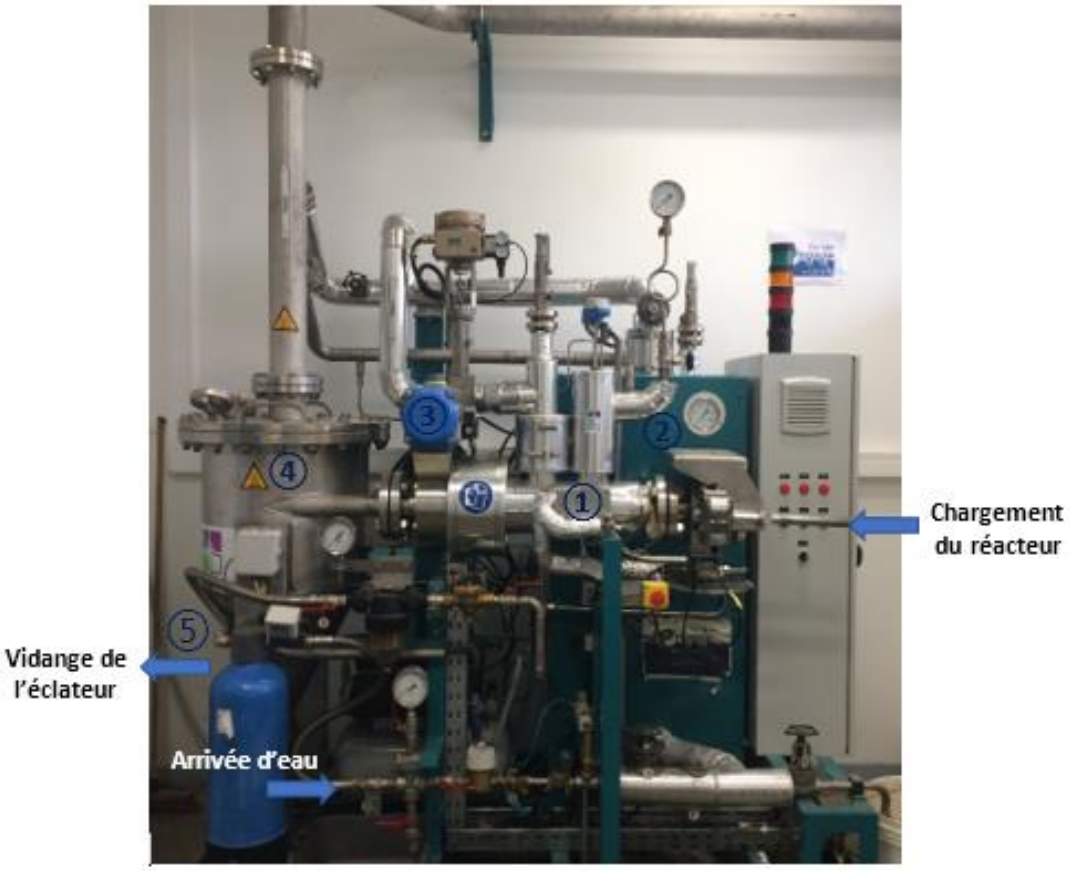


Figure 22. Illustration du pilote d'explosion à la vapeur situé au LERMAB

4.1.3. IMPRÉGNATION ACIDE ET FILTRATION

Avant prétraitement, deux imprégnations séparées à l'acide sulfurique (0,9 et 2% ; masse d'acide/masse sèche de l'échantillon) ont été effectuées sur les échantillons de saule et *Noccaea*. Un ratio solide/liquide de 1/10 est utilisé. L'opération consiste à tremper 15 g de matière grossièrement broyée dans la solution pendant 4 h. Le mélange est filtré sur fiole à vide et le résidu solide est ensuite prétraité par explosion à la vapeur.

4.1.4. CONDITIONS OPÉRATOIRES DE SE

Pour ce prétraitement le saule et les échantillons de *Noccaea* cultivé en serre au LSE sont utilisés. Les conditions de prétraitement appliquées sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7. Résumé des conditions du prétraitement d'explosion à la vapeur

Température (°C)	Temps de séjour (min)	Imprégnation H_2SO_4 (w/w)*	Sévérité
180	2	0,9 – 2 %	2,66
	5	0,9 – 2 %	3,05
	8	0,9 – 2 %	3,26
200	2	0,9 – 2 %	3,25
	5	0,9 – 2 %	3,64
	8	0,9 – 2 %	3,85
220	2	0,9 – 2 %	3,83
	5	0,9 – 2 %	4,23
	8	0,9 – 2 %	4,44

* masse d'acide / masse sèche de l'échantillon

4.1.5. ANALYSES DE LA PÂTE APRÈS EXPLOSION À LA VAPEUR

Après explosion, le mélange solide/liquide récupéré à la sortie de l'éclateur est filtré sur Büchner pour séparer le résidu solide des effluents. Le résidu solide (ou pâte) récupéré après prétraitement est séché à 40 °C pendant 48 h, puis réduit en poudre à l'aide d'un broyeur à billes en agate pour éviter toute contamination externe par des ETMs. La teneur en ETMs ainsi que la composition chimique du résidu solide sont ensuite déterminées.

4.1.6. DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PÂTE

Afin de quantifier la composition chimique (lignine insoluble et composition en sucres) et évaluer ainsi l'effet du prétraitement sur la matière lignocellulosique, le résidu solide est hydrolysé en suivant la procédure dite des lignines de Klason (voir § 2.3.1). Le filtrat récupéré est dilué puis analysé par chromatographie ionique (HPAE-PAD) (voir § 2.3.2).

4.1.7. COMPOSITION EN ETMS DE LA FRACTION SOLIDE

Pour évaluer l'efficacité du traitement d'explosion à la vapeur sur la purification de la biomasse, les fractions liquide et solide récupérées après traitement par SE, sont minéralisées

(§ 2.1.1) puis analysées par ICP-AES (§ 2.1.2) pour déterminer leur teneur en ETMs.

4.2. VALORISATION DES PÂTES OBTENUES PAR SE

4.2.1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Le résidu solide, ou pâte cellulosique, récupéré après explosion vapeur est hydrolysé enzymatiquement. Pour réaliser cette hydrolyse, 2 % de pâte (m/v) sont ajoutés à 100 mL de solution tampon d'acétate de sodium 50 mM (pH=4,8), le mélange est incubé à 50 °C dans un incubateur rotatif à 170 rpm pendant 30min. Les concentrations en substrat et en enzymes sont de 2 % (m/v) et de 0,8 $g.L^{-1}$ respectivement. Après la pré-incubation, l'hydrolyse est initiée par l'ajout de cellulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (≥ 1 unité/mg - référence C28546 - 2.5KU Sigma Aldrich). L'hydrolysat est échantillonné périodiquement sur une durée de 72 heures afin de suivre la cinétique de conversion de la cellulose en glucose. Le premier prélèvement est effectué juste avant l'ajout de l'enzyme, qui correspond au t_0.

Figure 23. Dispositif d'hydrolyse enzymatique

Les échantillons prélevés sont trempés juste après dans l'eau bouillante pour arrêter l'activité des enzymes, et sont ensuite centrifugés, dilués puis analysés par chromatographie ionique.

4.2.2. FERMENTATION DES HYDROLYSATS

Deux types de fermentation ont été réalisés sur les hydrolysats récupérés après hydrolyse enzymatique. La première est la fermentation anaérobie sur les hydrolysats de *Noccaea*, en présence des bactéries de *C. acetobutylicum*. Le choix de ce type de fermentation repose sur le fait que les hydrolysats utilisés sont riche en sucres en C_5 et C_6, et la levure choisie à la capacité de fermenter la majeure partie des monosaccharides, elle est également très utilisée dans les procédés industriels notamment à sa productivité (Sreekumar et al. 2015; Monot et al. 1982). La deuxième fermentation qui est aérobie est réalisée sur les hydrolysats de saule qui sont plus riches en glucose et moins en d'autres sucres, en présence des levures de type *S. cerevisiae,* utilisées souvent dans la conversion du glucose en éthanol (Bhadana & Chauhan 2016; Mohd Azhar et al. 2017).

4.2.2.1. FERMENTATION ANAÉROBIE DES HYDROLYSATS DE *NOCCAEA* AVEC *C. ACETOBUTYLICUM*

Les hydrolysats de *Noccaea* récupérés après hydrolyse enzymatique sont utilisés pour réaliser cette fermentation anaérobie.

4.2.2.1.1. PRÉPARATION DES SOUCHES DE *C. ACETOBUTYLICUM* ATCC 428

La réactivation des souches est réalisée en diluant 1 mL de bactéries sous forme de spores dans 10 mL de milieu de culture dans des tubes Hungate. Ces tubes ont la particularité d'être étanches aux gaz et sont utilisés pour les cultures en anaérobiose. Les tubes préparés sont ensuite placés dans un bain à 80 °C pendant 20 min puis trempés quelques secondes à l'eau froide pour provoquer un choc thermique. La culture est ensuite incubée à 37 °C pendant 48 h. Le but de cette étape est d'ouvrir les spores et accélérer leur réhydratation pour favoriser la germination.

4.2.2.1.2. PRÉPARATION DU MILIEU DE CULTURE RCM (**R**EINFORCED **C**LOSTRIDIAL **M**EDIUM)

Un volume de 500 mL de RCM est préparé pour l'ensemble des échantillons. La composition du milieu de culture est résumée dans le tableau 8. Les sels et les vitamines sont dissous dans l'eau, le tout est ensuite chauffé, sans atteindre l'ébullition. La cystéine (agent

réducteur) est ensuite ajoutée pour une meilleure dissolution. Neufs fioles (8 échantillons + un témoin glucose) sont préparées. Un volume de 40 mL du milieu de culture encore chaud est transvasé dans chaque fiole à l'aide d'une seringue. Les fioles sont fermées avec des bouchons pour empêcher les échanges gazeux et sont ensuite placées dans un autoclave pendant 20 min à 121 °C pour stériliser le tout. Après stérilisation, les fioles sont placées à l'étuve à 37 °C.

Tableau 8. Composition du milieu de culture RCM

Réactifs	$g.L^{-1}$
Phosphate de potassium monobasique	0,5
Sulfate d'ammonium	1,5
Chlorure de magnésium	1
Chlorure de calcium	0,15
Extrait de levures	1,5
Sulfate ferreux	0,01
Sulfate de manganèse	0,01
Biotine	$4x10^{-5}$
Chlorhydrate de cystéine	1
Carbonate de calcium	3
pH 7 à 37 °C	

4.2.2.1.3. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons d'hydrolysats sont tout d'abord centrifugés avant d'être introduits dans les fioles. Pour cette étape il est important de travailler dans un milieu stérile appelé aussi Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) pour éviter toute forme de contamination qui pourrait empêcher le développement des bactéries pendant la fermentation.

Un volume de 5 mL d'échantillon est injecté dans chaque fiole à l'aide d'une seringue et d'une aiguille tout en restant proche de la flamme du bec benzène pour éviter les contaminations extérieures. Une fois la seringue retirée la fiole est passée rapidement sous la flamme. Pour le témoin positif, une solution de glucose à 30 $g.L^{-1}$ est préparée.

Figure 24. Fioles de fermentation contenant le substrat et l'inoculum

4.2.2.1.4. FERMENTATION

Une fois toutes les fioles préparées, un volume de 5 mL d'inoculum (bactéries) est injecté à l'aide d'une seringue toujours en PSM pour éviter les contaminations. Un premier prélèvement (t_0) est effectué juste après l'inoculation. L'ensemble des échantillons est incubé à 37 °C pendant 48 heures. Un prélèvement intermédiaire après 24 h et un dernier au bout de 48 h sont effectués. Les échantillons sont conservés au frais jusqu'à analyse par HPLC afin de doser l'éthanol, butanol, acétone ainsi que l'acide acétique et butyrique produits durant la fermentation.

4.2.2.2. FERMENTATION AÉROBIE DES HYDROLYSATS DE SAULE AVEC *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Les hydrolysats de Saule récupérés après hydrolyse enzymatique sont utilisés pour réaliser cette fermentation aérobie.

4.2.2.2.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les hydrolysats de saule récupérés après hydrolyse enzymatique sont utilisés. Les échantillons sont tout d'abord centrifugés puis filtrés à l'aide d'un filtre d'une porosité de 0,45 µm afin d'avoir la solution la plus claire possible et permettre le développement des levures. En plus des trois échantillons étudiés, des témoins glucose sont préparés (8 $g.L^{-1}$).

4.2.2.2.2. Préparation des levures et du milieu de culture YNB (Yeast Nitrogen Base)

Un des témoins glucose préparé précédemment est utilisé pour mettre en culture les levures en pastilles (déshydratées) qui seront utilisées pour la fermentation. La préparation est mise sous agitation dans un incubateur à 37 °C pendant 6 h le temps de réhydrater les levures. Également un volume de 100 mL du milieu YNB est préparé (67 $g.L^{-1}$), le mélange est chauffé légèrement pendant quelques minutes. La composition du milieu YNB est détaillée dans le tableau 9.

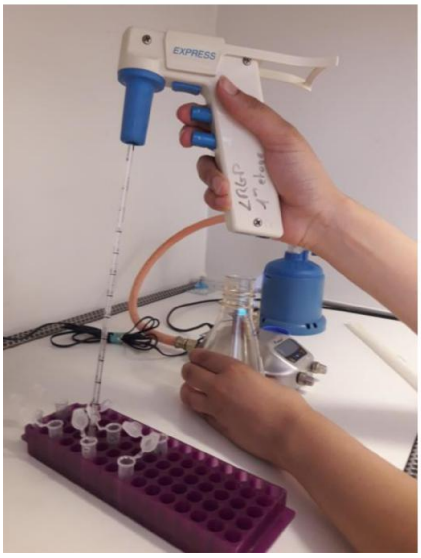
Tableau 9. Composition du milieu de culture YNB

Ingrédients	$g.L^{-1}$
Sulfate d'ammonium	5,0
L-Histidine HCl	0,01
DL-Méthionine	0,02
DL-Tryptophane	0,02
Biotine	0,000002
Calcium pantothénate	0,0004
Acide folique	0,000002
Niacine	0,0004
Acide p-Aminobenzoïque	0,0002
Pyridoxine HCl	0,0004
Riboflavine	0,0002
Thiamine HCl	0,0004
Inositol	0,002
Acide borique	0,0005
Sulfate de cuivre	0,00004
Iodure de potassium	0,0001
Chlorure de fer	0,0002
Sulfate de manganèse	0,0004
Molybdate de sodium	0,0002
Sulfate de zinc	0,0004
Phosphate de potassium Monobasique	1,0
Sulfate de magnésium	0,5
Chlorure de sodium	0,1
Chlorure de calcium	0,1
pH 5.4 +/- 0.2 à 25 °C	

4.2.2.2.3. FERMENTATION

Un volume de de 36 mL de chaque échantillon et du témoin glucose est placé dans des erlenmeyers stériles utilisés pour la fermentation. Dans chaque solution on ajoute 4 mL du milieu YNB ainsi que 0,8 mL de levures. L'ajout des levures est réalisé sous PSM et à côté d'une flamme pour éviter toute sorte de contamination. La fermentation est lancée dans un incubateur à 37 °C sous agitation à 170 rpm.

Des prélèvements périodiques (sous PSM) sont effectués sur une durée de 50 heures. Deux prélèvements par point sont nécessaires : le premier sert à mesurer le trouble, appelé aussi densité optique (DO), par UV à 600 nm et l'autre échantillon est centrifugé et gardé au congélateur jusqu'à analyse par HPLC.



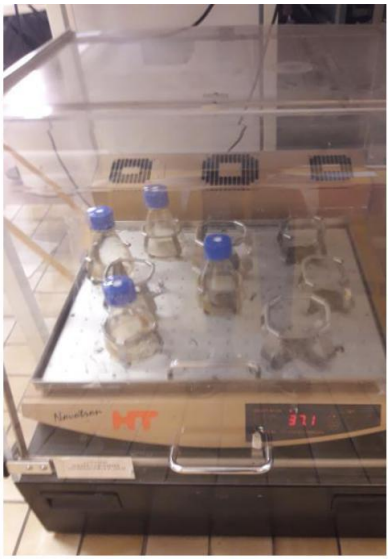


Figure 25. Dispositif de fermentation et prélèvement sous PSM

4.2.3. DOSAGE DES PRODUITS DE FERMENTATION PAR HPLC

Les produits issus des deux fermentations sont séparés et quantifiés par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC Shimadzu Prominence). Les échantillons sont tout d'abord dilués trois fois dans l'éluant d'acide sulfurique 5 mM. Les acides organiques sont quantifiés par détection UV à une longueur d'onde de 210 nm, alors que les alcools et cétones sont quantifiés par réfractométrie. Les composés dosés sont : l'acide acétique, acide butyrique, acétone, éthanol et butanol. L'ensemble des conditions appliquées pour la séparation et la quantification des composés est résumé dans la figure 26.

*Appareil	SHIMADZU-HPLC
*Colonne	Agilent Hi-Plex H^+ (7,7 × 300 mm, 8µm)
*Détecteurs	UV/RID
*Éluant	H_2SO_4 5 mM
*Débit	0,7 $mL.min^{-1}$
*Température	40 °C
*Temps d'analyse	65 min
*Volume d'injection	20 µL

Figure 26. Chromatographe HPLC utilisé pour l'analyse des produits de fermentation et la méthode appliquée

5. ÉPURATION DU SAULE PAR DES AGENTS CHÉLATANTS

Le but des travaux développés dans cette partie est de mettre au point une méthode permettant l'épuration d'une biomasse contaminée aux ETMs. L'objectif ici est d'optimiser les conditions d'extraction des ETMs dans la biomasse afin de récupérer (1) une biomasse purifiée et (2) un effluent aqueux riche en ETMs.

L'extraction acide a été abordée dans plusieurs études pour éliminer les ETMs du bois traité au CCA (Cuivre, Chrome, Arsenic) (Kartal & Kose 2003; Clausen & Smith 1998; Choi et al. 2012) ou du bois contaminé récolté sur des sols pollués, ainsi que les facteurs influençant l'extraction (Chang et al. 2013; Mohamed et al. 2013). La méthode d'extraction adoptée dans notre étude est une procédure modifiée basée sur les méthodes décrites par (Kartal & Kose 2003) et (Choi et al. 2012) effectuée sur du bois traité au CCA.

Tableau 10. Conditions opératoires appliquées pendant l'étape de purification

Température d'extraction (°C)	Temps d'extraction (h)	Solutions d'extraction	Ratio Liquide : Solide (v/m)	Masse de l'échantillon (g)
75	6	EDTA 1 %	10/1	12
75	6	EDDS 1 %	10/1	12
75	6	H_2O_2 1 %	10/1	12
75	6	H_2SO_4 1 %	10/1	12

Différentes extractions sont réalisées avec des agents chélatants: EDTA, EDDS, H_2O_2 et H_2SO_4, avec des concentrations de 1 %. Une masse de 12 g de saule broyé est pesée dans un ballon de 250 mL dans lequel on rajoute 120 mL de solution. Le mélange est plongé dans un bain d'huile chauffant à 75 °C pendant 6 h (tableau 10). Une fois refroidi, le mélangé est filtré sur Büchner, puis le résidu solide est séché à 40 °C pendant une nuit. Le filtrat est gardé au frais (4 °C) pour l'analyse des ETMs. La figure 27 résume les étapes suivies pendant la purification.

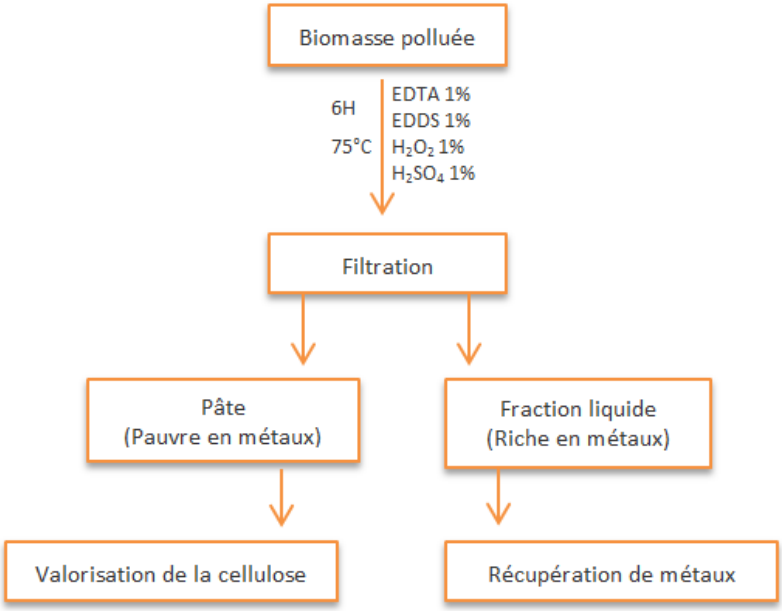


Figure 27. Étapes suivies pendant la purification de la biomasse avec les agents chélatants

6. EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DES PECTINES DE *NOCCAEA*

6.1. EXTRACTION À L'OXALATE D'AMMONIUM ET À L'ACIDE CITRIQUE

Deux extractions sont effectuées, une avec l'oxalate d'ammonium (1 %, w/w) et l'autre à l'acide citrique (1 %, w/w). Un ratio solide/liquide de 1/20 est utilisé pour chaque extraction. L'extraction consiste à placer 5 g de biomasse de *Noccaea* dans un ballon de 250 mL dans lequel on ajoute 100 mL de la solution fraichement préparée. Le mélange est placé dans un bain d'huile chauffé à 90 °C pendant 6 h. Après filtration, 3 volumes d'éthanol sont ajoutés à la phase liquide qui est ensuite placée à 4 °C pendant une nuit pour précipiter les pectines. Après 24 h le mélange est centrifugé pour séparer le gel de pectine de la phase liquide. Le résidu solide est placé à l'étuve à 40 °C, pour la suite des analyses. Toutes les étapes suivies sont résumées dans la figure 28.

6.2. DIALYSE ET LYOPHILISATION

Les pectines sont ensuite purifiées par dialyse. L'échantillon est placé dans un tube à dialyse composé de cellulose régénérée (seuil de coupure 3,5 kDa) le tout est immergé dans l'eau ultra-pure pendant 3 jours, avec un renouvellement quotidien de l'eau. Une fois la dialyse achevée, les échantillons de pectines purifiés sont séchés au lyophilisateur pendant une nuit. Le rendement est ensuite calculé comme suit :

$$\% \text{ Pectines} = \frac{\text{Masse des pectines après lyophilisation (g)}}{\text{Masse sèche initiale avec extractibles (g)}} \times 100$$

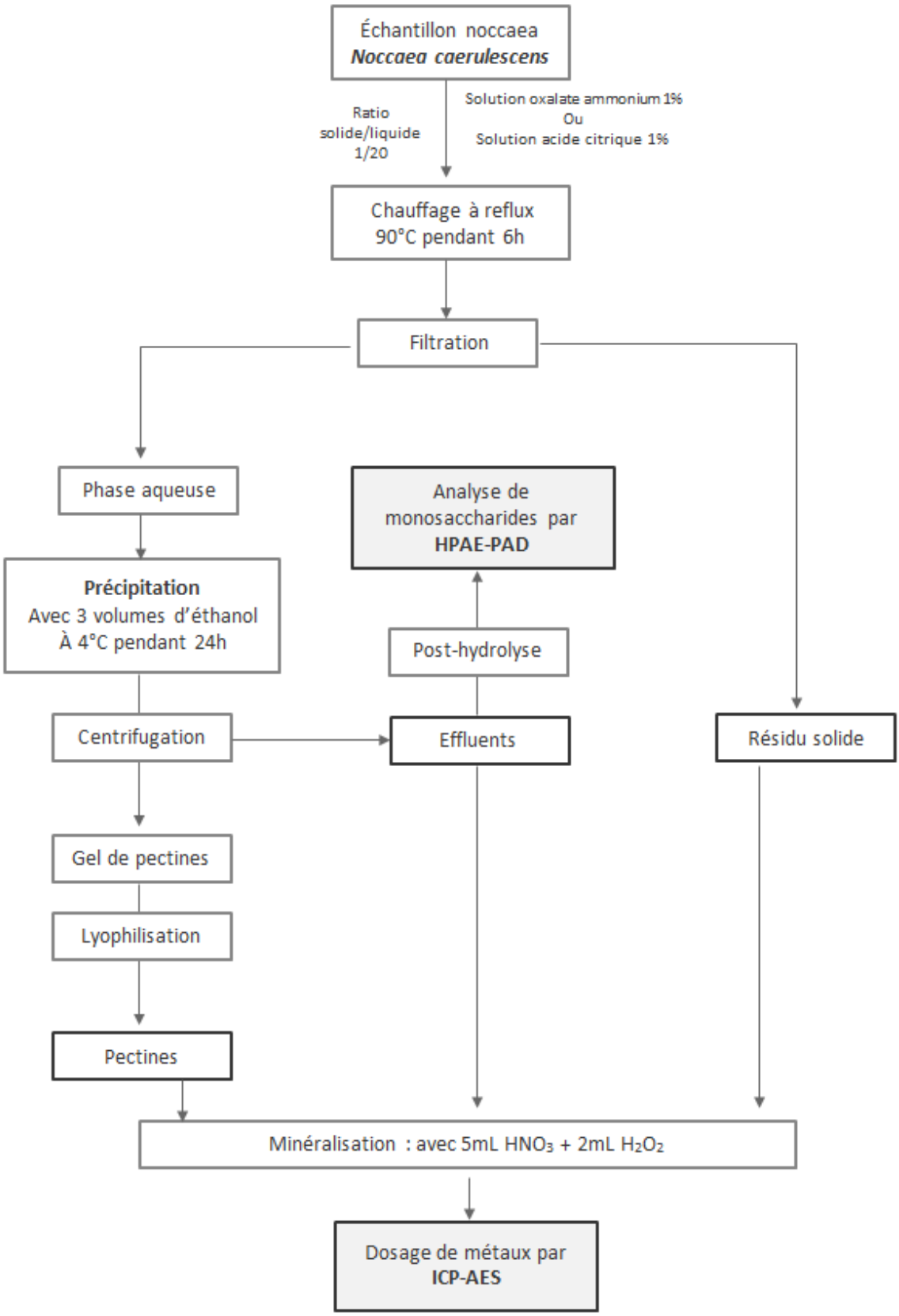


Figure 28. Diagramme des étapes suivies pour l'extraction et la purification des pectines

6.3. ANALYSE DES MONOSACCHARIDES DANS LA FRACTION LIQUIDE

Après les extractions, à l'oxalate d'ammonium ou à l'acide citrique, une partie des sucres composant la paroi végétale peut se retrouver dans la phase liquide sous forme d'oligosaccharides. Afin de les quantifier, une post-hydrolyse des oligomères en monomères est nécessaire. Cette étape consiste à ajouter un volume d'acide sulfurique à 72 % à 5 mL de la fraction liquide afin d'atteindre une concentration finale de 4% en acide. Le volume d'acide à ajouter est défini en se référant à la table des concentrations suggérée par (Sluiter et al., 2005). La suspension est ensuite placée à l'autoclave à 121 °C pendant 1 heure, puis centrifugée. Les échantillons sont dilués puis analysés par chromatographie HPAE-PAD (§ 2.3.2).

6.4. COMPOSITION EN ETMS DES DIFFÉRENTES FRACTIONS

Après extraction et précipitation des pectines à l'éthanol, trois fractions sont récupérées : une phase liquide, un résidu solide gélatineux et éventuellement les pectines purifiées et lyophilisées. Pour comprendre la répartition des ETMs dans ces différentes fractions et évaluer la répartition des ETMs dans les trois phases, une minéralisation (§ 2.1.1) suivie d'un dosage des ETMs par ICP-AES (§ 2.1.2) sont nécessaires.

6.5. CARACTÉRISATION DES PECTINES EXTRAITES

6.5.1. DISTRIBUTION DE MASSE MOLÉCULAIRES

La distribution de masses moléculaires de la fraction de pectines isolée est réalisée par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).

Une masse de 5 mg de pectines lyophilisées est dissoute dans 5mL d'éluant fraichement préparé (nitrate de sodium $NaNO_3$, 50 mM). Le tout est placé sous agitation pendant une nuit. Les échantillons sont par la suite filtrés à 0,45 µm. Des solutions de pullulanes (kit de calibration Agilent PL2090-0101) sont utilisées pour réaliser l'étalonnage. L'analyse est effectuée sur une chaine HPLC-SHIMADZU Prominence dont les conditions d'analyse sont résumées dans la figure 29.

*Appareil	SHIMADZU-SEC/RI
*Colonne	Phenomenex P2000; P3000; P4000
*Détecteur	RID
*Éluant	$NaNO_3$ 50 mM
*Débit	0,7 $mL.min^{-1}$
*Température	30 °C
*Temps d'analyse	65 min
*Volume d'injection	20 µL

Figure 29. Chromatographe utilisé pour l'analyse des pectines ainsi que les conditions de traitement

6.5.2. ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE FT-IR

L'analyse structurelle des échantillons de pectines lyophilisés obtenus après extraction à l'oxalate d'ammonium et à l'acide citrique est réalisée par FT-IR ou spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier avec un instrument Thermo Fisher « Nicolet-6700 ». L'analyse est non destructive, rapide et ne demande aucune préparation en amont de l'échantillon. Cette technique permet de mettre en évidence les groupements fonctionnels d'un polymère. L'échantillon est scanné 16 fois par analyse. Un background est effectué avant chaque analyse. Les spectres sont enregistrés dans la région située entre 4000-650 cm^{-1}. L'identification et l'attribution des pics sont réalisés à l'aide d'une table d'assignation.

CHAPITRE III

PRÉTRAITEMENT ET VALORISATION DU SAULE CONTAMINÉ

1. INTRODUCTION

Le saule est une plante utilisée en phytoremédiation pour sa capacité à accumuler des teneurs assez importantes en ETMs dans ses parties aériennes (Zn jusqu'à ~ 1000 $mg.kg^{-1}$ et Cd jusqu'à ~ 30 $mg.kg^{-1}$) (Greger & Landberg 1999; Dickinson & Pulford 2005). Dans ce contexte, les taillis à courte rotation de saule (TCR) ont un intérêt tout particulier. Il a été ainsi montré que la récolte régulière de biomasse (environ tous les 3 à 5 ans) permettait progressivement de réduire les teneurs en ETMs dans le sol tout en maximisant la production de biomasse potentiellement utilisable en bioraffinerie pour la production de bioéthanol cellulosique (Volk et al. 2006). Des questions importantes et qui n'ont jamais été abordées dans la littérature scientifique se posent cependant quant à l'impact de la présence de ETMs dans la biomasse et leur devenir durant les différentes étapes de transformation de la lignocellulose en éthanol.

Dans ce chapitre, deux lots de saule ont été utilisés, l'un, appelé S1, provient de parcelles situées à Deûlémont ; l'autre, appelé S2, provient de parcelles situées à Leforest (Chap 2-§1.1). Les lots ont grandi sur un sol riche en ETMs dont le Zn, le Cd et le Mn.

Deux technologies de prétraitement parmi les plus étudiées actuellement à l'échelle industrielle ont été envisagées : le prétraitement éthanol-organosolv et le prétraitement par explosion à la vapeur. L'impact des paramètres réactionnels (sévérité du traitement) sur la répartition des ETMs dans les différentes fractions issues du prétraitement (pâte cellulosique, phase aqueuse, lignine) a été étudié. L'étude de l'hydrolyse enzymatique des pâtes cellulosiques isolées après prétraitement a été menée à l'aide de cellulases commerciales *(Trichoderma reesei)* selon des protocoles décrits dans la littérature (Chap. 2 - §3.3 et §4.3.1). Le but de ce travail est d'identifier l'effet éventuel de la présence des ETMs présents dans les pâtes sur l'action des enzymes puis de tester la fermentabilité éthanolique des hydrolysats par des levures de type *Saccharomyces cerevisiae*.

Ce chapitre est divisé en 4 parties :

- La première partie s'intéresse à la caractérisation de la composition chimique initiale du saule ;
- La deuxième partie s'intéresse à trois prétraitements en vue d'une détoxification et

d'une valorisation du saule ;

- La troisième partie présente les résultats d'hydrolyse enzymatique des pâtes obtenues après prétraitement ;
- La dernière partie décrit les résultats de fermentation alcoolique des hydrolysats.

2. COMPOSITION CHIMIQUE DES MATIÈRES PREMIÈRES UTILISÉES

La composition chimique du saule S1 utilisé dans cette étude est donnée dans le tableau 11. Comparée aux données de la littérature, la composition du bois de saule S1 présente des teneurs plus faibles en polysaccharides (environ 52%) et plus importantes en lignine de Klason (Skrigan et al. 1967; Szczukowski et al. 2002). Des teneurs relativement importantes en certains polysaccharides comme les galactanes et les galacturonanes ont également été relevées. Ces observations peuvent être justifiées par la présence d'écorces en quantité importante dans les échantillons de S1. Ces dernières contiennent des proportions élevées en pectines riches en galactose et acide galacturonique ainsi qu'en composés phénoliques, dont les tannins peuvent être récupérés en grande partie dans la fraction insoluble du protocole de Klason ; ce qui explique le taux de « lignine » élevé comparé à ceux de la littérature.

Les teneurs en zinc, manganèse et cadmium de S1 et de S2 sont également données dans le tableau 11. Les saules S1 et S2 présentent des teneurs comparables en Zn et en Mn (respectivement ~ 200 $mg.kg^{-1}$ et 20 $mg.kg^{-1}$). Concernant S2, des teneurs relativement importantes en Cd (22 $mg.kg^{-1}$) ont été relevées alors que pour S1, les concentrations sont sous la limite de détection.

Tableau 11. Composition chimique du saule (S1) et teneurs en ETMs dans le saule S1 et S2 (mg.kg^{-1})

	saule (S1)	saule (S2)
Lignines de Klason[a]	40,1 %	
Cellulose[a]	38,2 %	
Hemicelluloses[a]	14,2 %	
Extractibles[a]	7,8 %	
Zn[b]	223,3 ± 12,0	200,3 ± 7,6
Mn[b]	25,8 ± 1,9	23,7 ± 3,3
Cd[b]	<LOD	22,1 ± 1,0

[a]Calculé par rapport à la matière sèche ; [b]Déterminée par ICP-AES

3. PRÉTRAITEMENTS

3.1. LE PRÉTRAITEMENT ORGANOSOLV

Le prétraitement organosolv est particulièrement prometteur dans le contexte de la bioéconomie. Il s'agit d'un procédé de délignification de la biomasse lignocellulosique utilisant un mélange hydro-organique permettant à la fois l'hydrolyse et la solubilisation de la lignine dans le solvant de réaction. Ce prétraitement permet un fractionnement efficace de la biomasse en ses trois composants principaux (cellulose, hémicelluloses et lignine). Il permet la production d'un résidu cellulosique aisément hydrolysable par des enzymes en sucres simples mais également d'une fraction lignine de grande pureté et peu dégradée potentiellement utilisable pour des valorisations ultérieures.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés au traitement éthanol-organosolv utilisant un mélange éthanol-eau comme solvant selon un protocole précédemment optimisé au laboratoire sur plusieurs biomasses lignocellulosiques (miscanthus (El Hage 2010) ; résidus d'huile de palme (Hussin 2014)). Les paramètres réactionnels ont été déterminés en se basant sur ces travaux :

- Températures de 170 °C à 190 °C ;
- Rapport EtOH/eau = 0,5 et 0,65 ;
- Concentration en acide sulfurique : 0,5 % à 2 % (masse d'acide/masse sèche de

l'échantillon) ;

- Durée du traitement : 1 h ;
- Biomasse utilisée : saule S1.

Pour chaque condition étudiée, trois fractions sont isolées à l'issue du traitement :

- Un résidu solide récupéré après traitement riche en cellulose qui est lavé avec un mélange eau/éthanol ;
- À partir de la liqueur noire obtenue, la lignine organosolv est isolée par précipitation par addition de trois volumes d'eau ;
- La phase liquide résiduelle, riche en hémicelluloses qui sont récupérées par lyophilisation.

3.1.1. RENDEMENT EN CELLULOSE ET LIGNINE

Le tableau 12 rassemble pour les différents essais réalisés les rendements des trois fractions isolées précédemment décrites. Les rendements sont calculés à partir des formules suivantes :

$$\text{Rendement en pâte (\% MS initiale)} = 100 \times \frac{m_{\text{sèche pâte cellulosique après organosolv}}}{m_{\text{sèche initiale saule}}}$$

$$\text{Rendement en lignine (\% MS initiale)} = 100 \times \frac{m_{\text{sèche lignine précipitée après organosolv}}}{m_{\text{sèche initiale saule}}}$$

$$\text{Rendement en effluents (\% MS initiale)} = 100 \times \frac{m_{\text{effluents lyophilisés après organosolv}}}{m_{\text{sèche initiale saule}}}$$

Où

$m_{\text{sèche pâte cellulosique après organosolv}}$: masse de pâte sèche récupérée après traitement organosolv (g) ;

$m_{\text{sèche lignine après organosolv}}$: masse sèche de lignine récupérée après traitement organosolv (g) ;

$m_{\text{effluents lyophilisés après organosolv}}$: masse de lyophilisat issu du résidu liquide après organosolv (g) ;

$m_{\text{sèche initiale saule}}$: masse sèche initiale de la sciure de saule (environ 12 grammes).

Pour chaque essai, le coefficient de Sévérité Combinée (CS) du traitement est calculé. La formule utilisée est la même que celle qui sera utilisée pour le traitement par explosion à

la vapeur (Chap. 2 §4.1.1). Les essais réalisés couvrent une large gamme de facteur de sévérité allant de 1,61 à 3,07.

Tableau 12. Rendement en pâte, lignine, hémicelluloses en fonction des conditions de prétraitement

([a] T=température, [b] %EtOH/eau=% Ethanol/eau, [c] H_2SO_4 % w/w ; [d] Sévérité combinée ; [e] % matière sèche)

Essai	T (°C) [a]	EtOH/eau (%) [b]	H_2SO_4 (%) [c]	CS [d]	Rendements (%) [e]		
					Pâte	Lignine	Effluents
1	170	0,65	0,5	1,61	53,00	14,42	18,00
2	170	0,50	1	1,91	54,08	10,95	17,00
3	170	0,65	1	2,08	53,00	14,22	19,00
4	180	0,65	1	2,19	52,92	13,33	15,50
5	190	0,65	1	2,49	45,05	15,36	15,50
6	190	0,65	2	3,07	46,14	15,68	16,00

On constate une augmentation du rendement de délignification avec une augmentation de la sévérité du traitement organosolv. Pour les sévérités combinées les plus élevées (2,49 et 3,07), la fraction lignine récupérée par précipitation représente environ 15,5 % de la masse de biomasse initiale. Cette observation est en accord avec les études précédentes menées au laboratoire. De plus pour l'essai 2, réalisé avec un ratio éthanol/eau plus faible (EtOH/Eau=0,5), un rendement nettement inférieur en lignine a été obtenu. Ce résultat est en accord avec les travaux de Pan et al. qui ont montré qu'un ratio EtOH/Eau=0,65 constitue le meilleur compromis entre dépolymérisation de la lignine et des sucres et solubilisation de la lignine dans le milieu réactionnel (Pan et al. 2007).

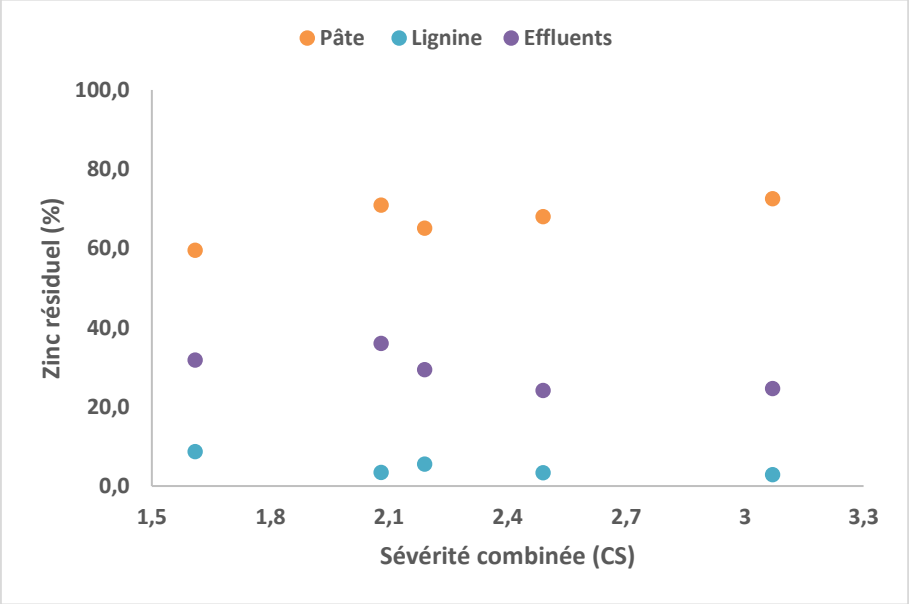
3.1.2. DISTRIBUTION DES ETMS APRÈS PRÉTRAITEMENT

L'influence des conditions du prétraitement organosolv et de sa sévérité sur la distribution du Zn et du Mn dans les trois fractions du procédé (pâte cellulosique, fraction hydrosoluble riche en hémicelluloses et lignine organosolv) a été examinée. La figure 30 présente la répartition des deux ETMs dans les différentes fractions rapportée à leurs teneurs initiales dans le saule.

On constate que :

- Le bilan matière concernant chacun des deux ETMs sur les 3 fractions est convenable et proche de 100 % ;
- Les deux ETMs sont principalement récupérés dans le résidu cellulosique : ~ 50 % à 80 % du Zn et ~ 40 % à 90 % du Mn sont isolés en phase solide ;
- La lignine organosolv récupérée après précipitation est quasiment exempte de Zn et de Mn (< 9 % de la teneur initiale dans S1).

Dans le cas du Zn, on observe relativement peu d'influence des conditions expérimentales et de la sévérité du traitement sur la répartition entre les 3 fractions. En revanche, pour le Mn son extractabilité en phase liquide est fortement influencée par les conditions réactionnelles.



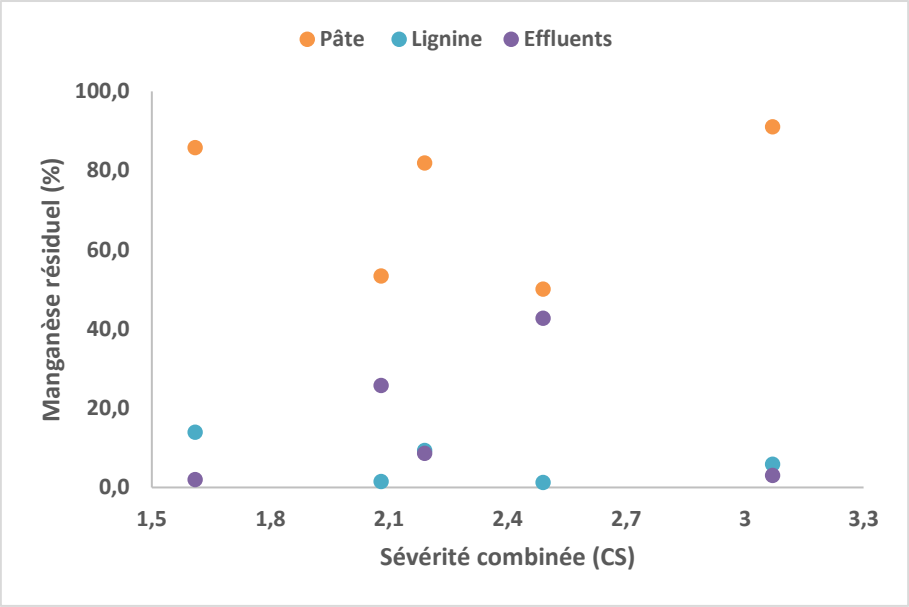


Figure 30. Répartition des ETMs dans les trois fractions lors du prétraitement organosolv

3.2. EXPLOSION À LA VAPEUR

Le prétraitement par explosion à la vapeur (ou steam explosion SE) est actuellement la technologie certainement la plus mature au niveau industriel dans le contexte du bioéthanol de deuxième génération et de la bioéconomie dans un cadre plus général. Dans l'étude qui suit, nous nous sommes intéressés au prétraitement de taillis à très courte rotation (TTCR) du saule S1 à l'aide d'un pilote batch à l'échelle du laboratoire (Chap. 2 - §4.1).

Dans la littérature le prétraitement de TCR de saule a été étudié par (Brereton et al. 2011; Han et al. 2013) avec pour objectif la production de biocarburants. Il a été décrit par ces auteurs que les conditions les plus favorables en vue d'une hydrolyse enzymatique ultérieure étaient une température de traitement de 200°C, un temps de séjour de 4 à 8 min et une pré-imprégnation acide de la biomasse. Les conditions réactionnelles retenues pour la présente étude tiennent compte de ces résultats préliminaires. Deux conditions d'imprégnation préalable de la sciure de saule ont été retenues :

- avec de l'acide sulfurique à 0,9 % (masse d'acide/masse sèche de saule) pendant 4 heures avec un ratio solide/liquide de 1/10 (w/w) ;
- avec de l'acide sulfurique à 2 % (masse d'acide/masse sèche de saule) pendant 4 heures avec un ratio solide de 1/10 (w/w).

Concernant les conditions de SE, trois températures ont été retenues (180°C, 200°C et 220°C) ainsi que trois temps de séjour (2, 5 et 8 minutes). Ce sont donc 18 conditions opératoires différentes de SE qui ont été appliquées aux sciures de saule. Les facteurs de sévérité et de sévérité combinée ont été calculés et figurent dans les tableaux 13 et 14.

Tableau 13. Conditions de prétraitement SE - Imprégnation acide à 0,9 % H_2SO_4

T (°C)	Temps de séjour (min)	Imprégnation H_2SO_4 (%)	Sévérité	pH solution imprégnation	Sévérité combinée
180	2	0,9	2,7	2,7	0,0
180	5	0,9	3,1	2,7	0,4
180	8	0,9	3,3	2,7	0,6
200	2	0,9	3,2	2,7	0,5
200	5	0,9	3,6	2,7	0,9
200	8	0,9	3,8	2,7	1,1
220	2	0,9	3,8	2,7	1,1
220	5	0,9	4,2	2,7	1,5
220	8	0,9	4,4	2,7	1,7

Tableau 14. Conditions de prétraitement SE - Imprégnation acide à 2 % H_2SO_4

T (°C)	Temps de séjour (min)	Imprégnation H_2SO_4 (%)	Sévérité	pH solution imprégnation	Sévérité combinée
180	2	2	2,7	2,4	0,3
180	5	2	3,1	2,4	0,7
180	8	2	3,3	2,4	0,9
200	2	2	3,2	2,4	0,8
200	5	2	3,6	2,4	1,2
200	8	2	3,8	2,4	1,4
220	2	2	3,8	2,4	1,4
220	5	2	4,2	2,4	1,8
220	8	2	4,4	2,4	2,0

3.2.1. RENDEMENT EN PÂTE CELLULOSIQUE

À l'issu du traitement de la sciure de saule par explosion à la vapeur, une phase solide humide, appelée pâte, est récupérée à la fois en sortie mais également à l'intérieur de l'éclateur du pilote de SE. Une phase liquide, dont le volume est de l'ordre du litre, est récupérée en sortie de l'éclateur. La pesée de la pâte séchée récupérée permet de calculer le rendement en pâte par l'équation suivante :

$$\text{Rendement en pâte (\% MS initiale)} = 100 \times \frac{m_{\text{sèche pâte après SE}}}{m_{\text{sèche initiale saule}}}$$

Où $m_{\text{sèche pâte après SE}}$: masse sèche de pâte récupéré après SE de la sciure de saule ;

$m_{\text{sèche initiale saule}}$: masse sèche initiale de la sciure de saule (environ 13 grammes) ;

La figure 31 représente l'évolution du rendement en pâte en fonction de la sévérité pour les deux imprégnations choisies (0,9 % et 2 % H_2SO_4).

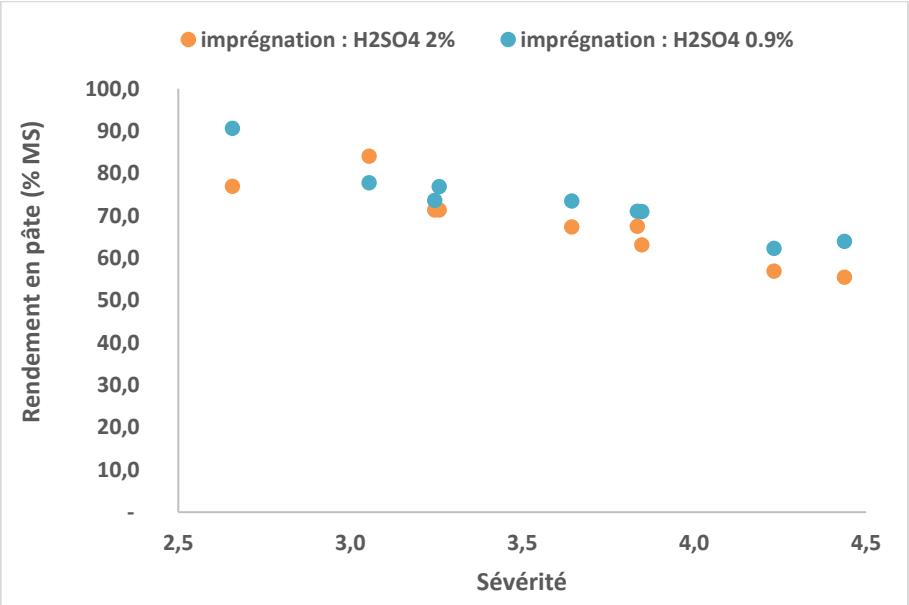


Figure 31. Rendement en pâte cellulosique (% MS initiale) en fonction de la sévérité du traitement

On constate une diminution du rendement en pâte avec la sévérité ; en effet, une augmentation de la température et du temps de séjour (et donc de la sévérité) se traduit par une dégradation des polysaccharides et plus particulièrement des hémicelluloses entrainant une diminution de la masse de pâte récupérée Le rendement en pâte passe ainsi de 90,7 % (180 °C - 2 min - 0,9 %) à 64,0 % (220 °C - 8 min - 0,9 %) et de 77,0 % (180 °C - 2 min - 2 %) à 55,5 % (220 °C - 8 min - 2 %).

L'imprégnation à l'acide sulfurique (paramètre chimique) a en revanche un effet plus limité sur le rendement en pâte que la température et le temps de séjour (paramètres thermiques) ; ainsi pour une sévérité de 3,1 et donc pour les conditions les plus douces (180 °C - 5min), le rendement passe de 77,8 % (0,9 % H_2SO_4) à 84,0 % (2 % H_2SO_4), tandis que pour une sévérité de 4,4 (conditions les plus sévères 220 °C - 8 min) le rendement passe de à 64,0 % (0,9 % H_2SO_4) à 55,5 % (2 % H_2SO_4). Les paramètres thermiques contribuent donc davantage à dégrader les polysaccharides que le paramètre chimique dans nos conditions opératoires.

La figure 32 représente l'évolution du rendement en pâte en fonction de la sévérité combinée pour les deux imprégnations choisies (0,9 % et 2 % H_2SO_4). On observe globalement une tendance linéaire de l'évolution du rendement en pâte en fonction de la sévérité combinée, malgré une très légère dispersion des points expérimentaux, ce qui confirme que le modèle cinétique utilisé (Chap. 2- §4.1.1) pour le calcul du facteur de sévérité combiné est compatible avec nos conditions de SE.

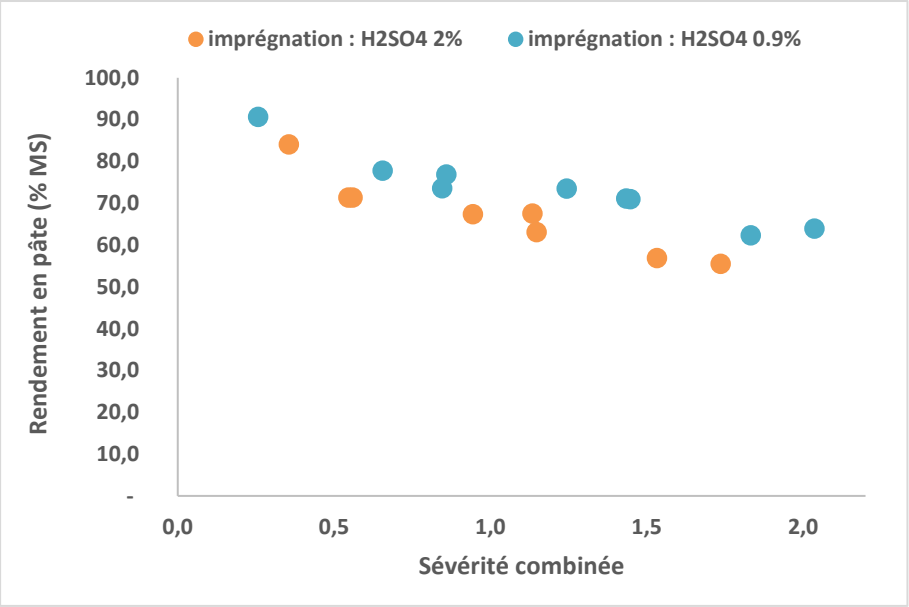


Figure 32. Rendement en pâte (% MS initiale) en fonction de la sévérité combinée

3.2.2. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PÂTE

Les figures 33a et 33b présentent respectivement la teneur en lignine insoluble résiduelle et la teneur en sucres résiduels contenus dans la pâte obtenue par SE des sciures de saule en fonction de la sévérité. Ces teneurs sont mesurées grâce à la méthode des lignines de Klason directement sur la pâte (c'est-à-dire sans extraction préalable au Soxhlet) et se calculent grâce aux formules suivantes :

$$\text{Teneur en lignine dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{m_{\text{lignine dans la pâte après SE}}}{175}$$

Avec : $m_{\text{lignine dans la pâte après SE}}$: masse de lignine insoluble extraite de la pâte (en mg).

175 : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason (en mg).

$$\text{Teneur en sucres dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{\sum_1^9 C_{\text{monosaccharides}} \left(\frac{mg}{L}\right) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

Avec :

$\sum_1^9 C_{\text{monosaccharides}}$: concentration totale en monosaccharides (et acides uroniques) mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$) ;

0,1 (L) : volume de la solution de monosaccharides obtenus dans le protocole des lignines de Klason ;

175 (mg) : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason ;

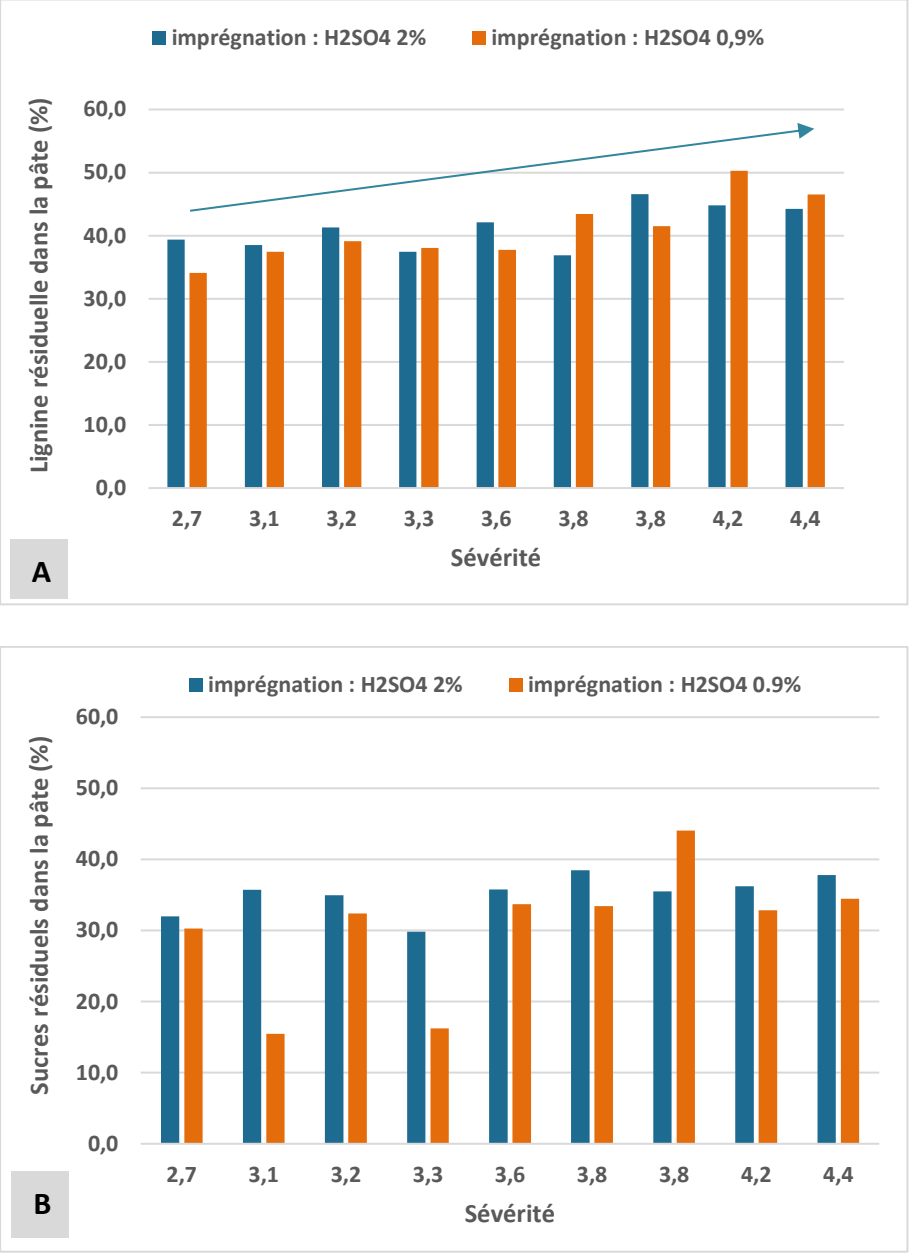


Figure 33 A et B : Teneur en lignine et en sucres résiduels dans la pâte (% MS de pâte) en fonction de la sévérité

On observe que le taux de lignine résiduelle augmente dans la pâte lorsque la sévérité augmente, ce qui s'explique par le fait que lorsque la sévérité augmente, les hémicelluloses

sont davantage dégradées et passent en phase liquide, ce qui enrichit la pâte en lignine. Le taux de lignine passe ainsi de 34,1 % (180 °C - 2min - 0,9 %) à 46,5 % (220 °C - 8 min - 0,9 %) et de 39,7 % (180 °C - 2min - 2 %) à 44,2 % (220 °C - 8 min - 2 %). On constate donc que les paramètres thermiques ont une influence importante sur les teneurs en lignine ; ce qui était déjà le cas sur les rendements en pâte.

Concernant l'influence de l'imprégnation (paramètre chimique), on constate une influence plus faible sur le rendement en lignine, même si globalement les rendements en lignine sont généralement supérieurs avec une imprégnation à 2 % en acide sulfurique dans la mesure où l'hydrolyse des hémicelluloses est plus efficace qu'à 0,9 %.

Pour interpréter la figure 33b, qui présente la teneur en sucres « totaux » en fonction de la sévérité, il faut distinguer les sucres provenant des hémicelluloses et le sucre constitutif de la cellulose. Pour cela, les figures 34a et 34b présentent la teneur en glucose, qui peut être considérée comme le marqueur de la cellulose, et en xylose, qui peut être considérée comme le marqueur des hémicelluloses, dans la pâte en fonction du facteur de sévérité.

Ces teneurs se calculent grâce aux formules suivantes :

$$\text{Teneur en glucose dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{C_{glucose}\ (\frac{mg}{L}) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

$$\text{Teneur en xylose dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{C_{xylose}\ (\frac{mg}{L}) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

Avec :

$C_{glucose}$: concentration en glucose mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$) ;

C_{xylose} : concentration en glucose mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$) ;

0,1 (L) : volume de la solution de monosaccharides obtenus dans le protocole des lignines de Klason ;

175 (mg) : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason.

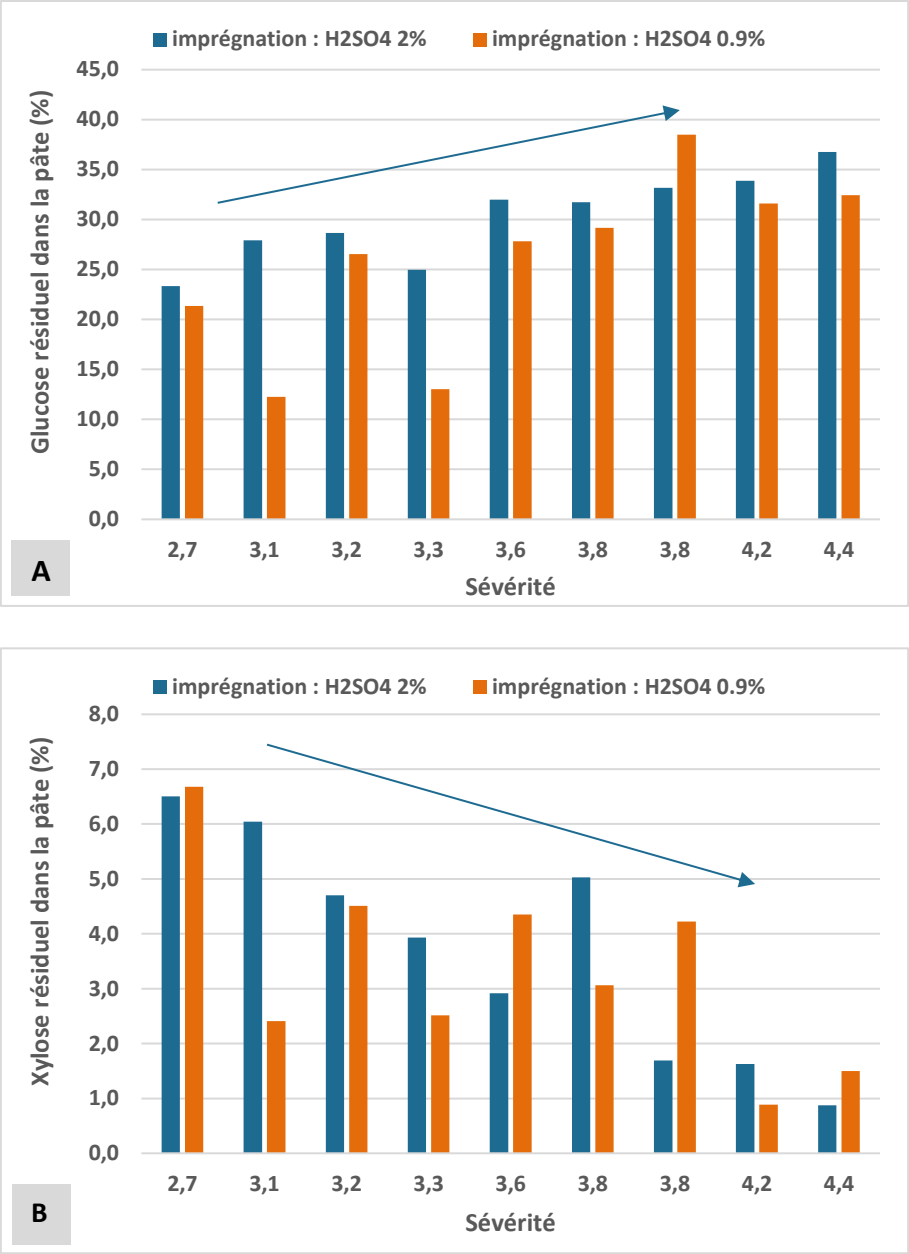


Figure 34 A et B : Teneur en glucose et en xylose résiduels dans la pâte (% MS de pâte) en fonction de la sévérité

On observe une augmentation de la teneur en glucose et une diminution de la teneur en xylose avec la sévérité, quelle que soit l'imprégnation. La diminution de la teneur en xylose, qui est le monosaccharide majoritaire dans les hémicelluloses du saule, s'explique par la dégradation croissante des hémicelluloses avec la sévérité du procédé de SE. À contrario, l'augmentation de la teneur en glucose montre que la cellulose n'est pas ou peu affectée par le procédé de SE. En conclusion, quand la sévérité augmente, on constate que :

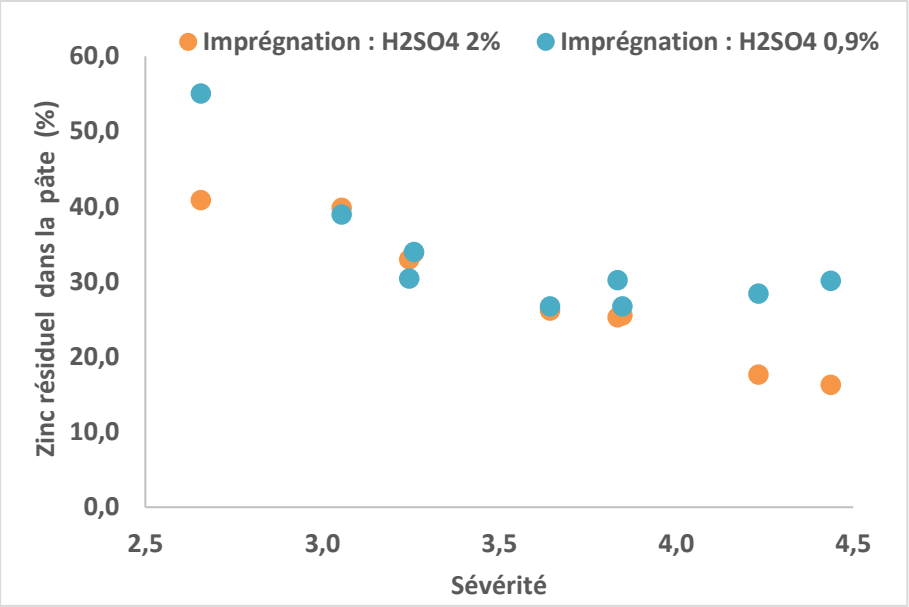
- la teneur en cellulose augmente ;
- la teneur en lignine augmente ;
- la teneur en hémicelluloses diminue.

Afin de valoriser au mieux les pâtes cellulosiques, il est important que :

- la teneur en cellulose soit maximale pour optimiser les futurs en rendements en bioéthanol ;
- la cristallinité de la cellulose soit la plus altérée pour optimiser le traitement enzymatique de la pâte ;
- le facteur de sévérité soit le plus faible pour optimiser les coûts énergétiques.

3.2.3. DISTRIBUTION DES ETMS

L'influence des conditions du traitement par explosion à la vapeur et de sa sévérité sur le devenir des ETMs (Zn, Mn et Cd) des saules S1 et S2 a été étudiée. Les pourcentages de Mn et Zn pour S1 et de Zn, Mn et Cd pour S2 récupérés dans le résidu solide (sur la base de la teneur initiale) ont été analysés par ICP-AES (Figure 35 et 36). L'analyse des ETMs extraits dans la phase liquide isolée après explosion à la vapeur n'est pas rapportée dans ce travail. En effet, le pilote de SE expérimental utilisé conduit à une contamination en ETMs importante des effluents liquides ainsi qu'à des pertes de liquide par l'évent connecté à l'éclateur (voir Fig. 22).



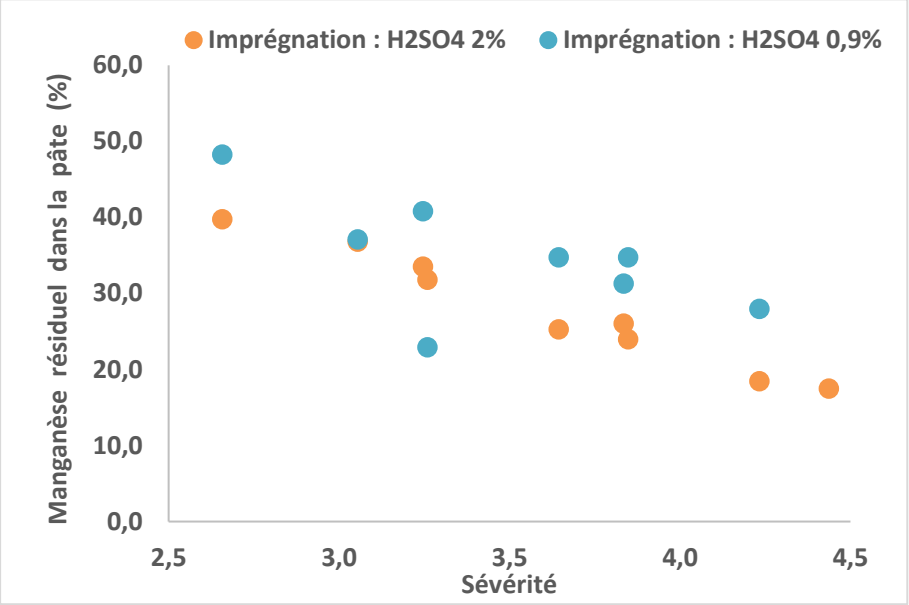


Figure 35. Taux d'ETMs récupérés dans les pâtes après explosion vapeur sur le saule 1 (S1) avec imprégnation à 0,9 et 2 % H_2SO_4

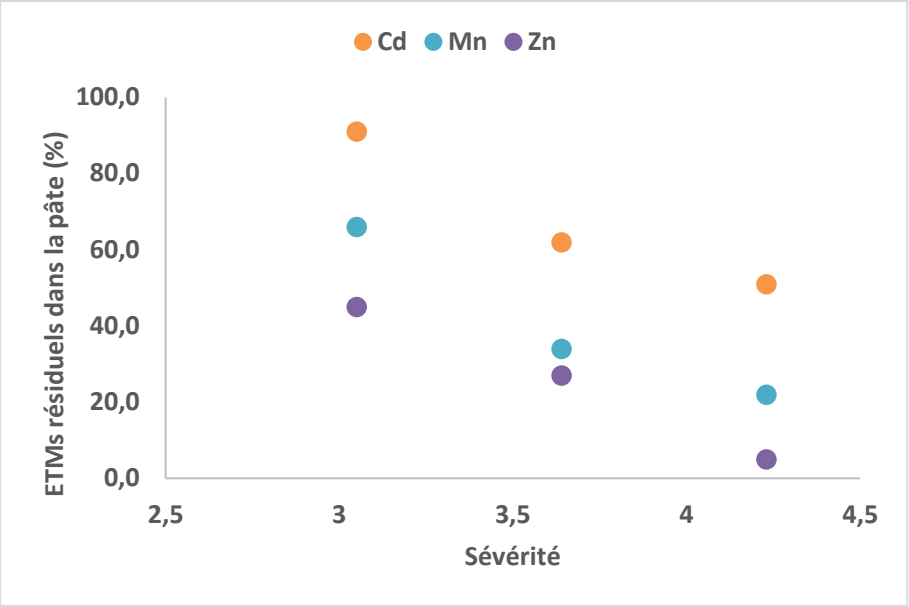


Figure 36. Taux d'ETMs récupérés dans les pâtes après explosion à la vapeur du saule-2 (S2) avec imprégnation 2 % H_2SO_4

À partir des résultats obtenus les observations suivantes peuvent être faites quant au comportement des ETMs analysés durant le traitement par explosion à la vapeur.

- L'extraction des ETMs en phase liquide est affectée par les conditions de pré-imprégnation, les conditions acides favorisant la solubilisation des ETMs ;
- L'extraction est fonction des conditions réactionnelles utilisées. Une augmentation de la température et/ou du temps de séjour conduisent à une plus grande extractabilité en phase liquide. Cette tendance est observée pour S1 et S2. Ainsi pour un traitement réalisé à 220°C avec une imprégnation à 2 % d'acide, environ 80 % à 85 % du Zn et du Mn sont extraits de la pâte cellulosique.

Ces observations semblent en accord avec des travaux antérieurs. Des résultats du laboratoire ont montré qu'une diminution du pH lors d'une hydrolyse acide d'une biomasse contaminée par des ETMs provoque une augmentation de l'extractabilité en phase aqueuse. Šyc et al ont également étudié la lixiviation de bois de saule contaminé par de Zn et du Cd. Il a été montré dans cette étude que 24 % à 30 % du Zn et seulement 8 % à 12 % du Cd étaient éliminés par lixiviation (Šyc et al. 2012). Dans cette même étude, un effet important du pH a

été montré, les pH faibles favorisant l'extraction des ETMs en phase aqueuse.

D'après ces résultats, l'explosion à la vapeur après imprégnation acide est un procédé prometteur permettant à la fois le prétraitement et également l'extraction d'une part importante des ETMs présents dans la biomasse. Ainsi ~80 % du Zn et du Mn et ~50 % du Cd peuvent être extraits de la pâte cellulosique et récupérés en phase liquide.

3.3. AUTRES PROCÉDÉS DE DÉTOXIFICATION

Il est connu en papeterie que la présence des ETMs divalents dans une pâte cellulosique a un impact négatif sur les opérations de blanchiment de cette dernière. Cette problématique est devenue particulièrement importante avec le développement des procédés de recyclage de la pâte et de l'eau qui concentrent les impuretés et les ETMs en solution. Différentes méthodes ont été décrites pour nettoyer une pâte cellulosique des ETMs qu'elle contient.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à quatre méthodes de détoxification appliquées au saule S1 ; elles utilisent deux compléxants des ETMs (EDDS* et EDTA**), un oxydant (H_2O_2) et un acide fort (H_2SO_4) dans des conditions douces avec H_2SO_4. La figure 37 présente les rendements d'extraction en phase aqueuse du Zn et du Mn. Dans notre étude les deux chélatants utilisés (EDDS et EDTA) permettent une élimination de ~90 % du Zn et ~80 %, du Mn. (Hart & Rudie 2012) ont décrit une épuration quasi totale de ces deux ETMs à partir d'une pâte Kraft en utilisant l'EDTA comme chélatant. L'eau oxygénée conduit à une détoxification partielle alors qu'une élimination efficace du Zn et du Mn a été observée par hydrolyse acide. Cette dernière observation est en accord avec les résultats donnés plus haut quant à l'importance du pH dans les processus de détoxification.

** EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique - $(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$*

*** EDDS : acide éthylenediamine-N,N'-disuccinique ($C_{10}H_{13}N_2Na_3O_8$)*

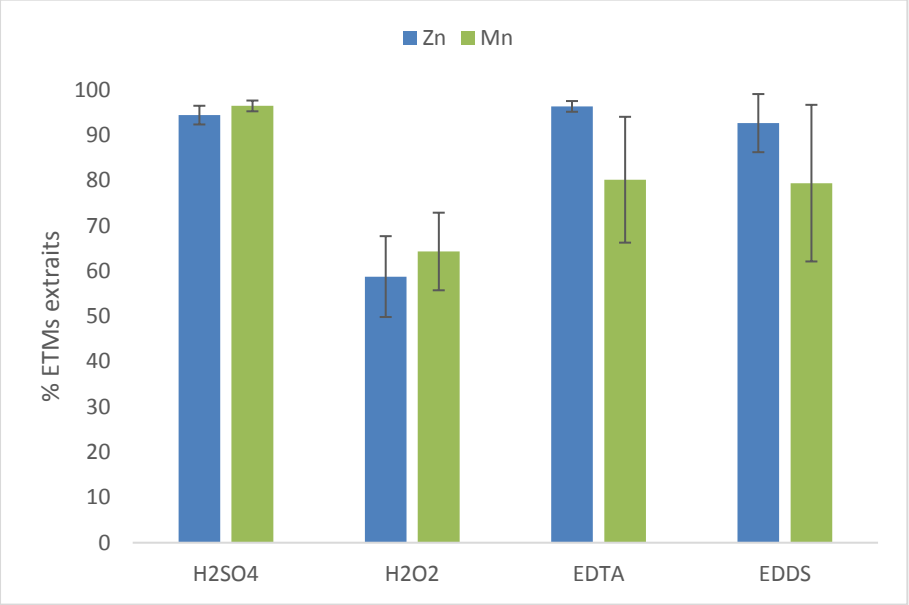


Figure 37. (%) d'ETMs extraits (Zn, Mn) à partir de sciure de saule (S1) en utilisant deux chélatants (EDTA, EDDS), H_2SO_4 et H_2O_2

3.4. Discussions

Dans des travaux antérieurs cités dans la littérature, il a été décrit que la pâte cellulosique présente des propriétés de résines échangeuses d'ions et notamment vis-à-vis des ETMs divalents (Rezić 2013). Il a ainsi été montré que les ions métalliques étaient liés à des fonctions ionisées de la pâte comme des groupes acides carboxyliques et ce particulièrement à pH élevé. Ces remarques sont en accord avec les résultats présentés précédemment sur plusieurs points :

- Les teneurs en ETMs très faibles relevées dans la fraction lignine organosolv qui confirme la faible capacité de complexation de cette fraction vis-à-vis des ETMs considérés ;
- L'effet du pH, une augmentation de l'acidité pour le procédé d'explosion à la vapeur augmentant l'extraction en phase aqueuse des ETMs ;
- Concernant le traitement organosolv, l'utilisation d'un solvant hydro-alcoolique qui limite l'extraction en phase liquide des ETMs complexés aux groupes carboxylates de la pâte cellulosique ;

- La corrélation entre les teneurs en hémicelluloses des résidus cellulosiques et celle en ETMs. En effet les hémicelluloses possèdent des groupements acides carboxyliques par la présence d'acides uroniques (acides galacturonique et glucuronique) constituant ainsi des sites de complexation pour les ETMs divalents.

L'hydrolyse des hémicelluloses durant le prétraitement entraine donc une diminution du nombre de sites de complexation des ETMs. On constate par conséquent une corrélation entre la sévérité du traitement, la teneur en hémicelluloses et celle en ETMs.

4. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PÂTES

L'hydrolyse enzymatique des pâtes cellulosiques produites au cours de ce travail a été étudiée en utilisant des mélanges d'enzymes cellulolytiques commerciales selon des protocoles décrits. Le but de ce travail est double : vérifier la réactivité des pâtes produites vis-à-vis des enzymes pour la production de sucres fermentescibles et étudier l'impact éventuel des ETMs résiduels présents dans les pâtes.

4.1. HYDROLYSE DES PÂTES ORGANOSOLV

4.1.1. IMPACT DES ETMS RÉSIDUELS

Dans le but d'évaluer l'impact éventuel de la présence des ETMs résiduels présents dans la pâte cellulosique, une épuration de la pâte organosolv a été réalisée à l'aide d'EDTA selon le protocole décrit précédemment (Chap.2 - §5). Le tableau 15 donne les teneurs en Zn et Mn de la pâte cellulosique avant et après épuration. Concernant le métal dominant, le zinc, on constate une diminution nette de sa teneur de 223,3 $mg.kg^{-1}$ à 43,22 $mg.kg^{-1}$.

Tableau 15. Teneurs en Zn et Mn ($mg.kg^{-1}$) dans la sciure de saule avant et après détoxification à l'EDTA (1 %)

	Avant détoxification	**Après détoxification**
Zn ($mg.kg^{-1}$)	223,3 ± 12,0	43,22
Mn ($mg.kg^{-1}$)	25,8 ± 1,9	0,15

4.1.2. CINÉTIQUE ET RENDEMENT D'HYDROLYSE

La cinétique d'hydrolyse enzymatique des pâtes cellulosiques issues du procédé organosolv a été réalisée sur :

- La pâte récupérée aux conditions : 190 °C à 1 % H_2SO_4 (Essai n°5, tableau 12) riche en ETMs ;
- La pâte issue du procédé organosolv détoxifiée au préalable à l'EDTA 1 %, pauvre en ETMs.

La figure 38a présente la cinétique d'apparition du glucose lors de l'hydrolyse et la figure 38b présente celle du xylose. En effet, les pâtes récupérées après prétraitement organosolv contiennent en plus de la cellulose une fraction d'hémicelluloses non hydrolysées pendant le traitement.

Le taux de conversion de la cellulose en glucose est calculé comme suit :

$$\text{Taux de conversion (\%)} = 100 \times \frac{m_{\text{glucose formé lors de l' hydrolyse}}}{m_{\text{glucose dans la pâte}}}$$

Avec :

$m_{\text{glucose pendant hydrolyse}}$: masse de glucose récupérée à chaque prélèvement, mesurée par HPAE-AD.

$m_{\text{glucose dan la pâte}}$: masse de glucose contenue dans la pâte obtenue dans le protocole de lignine de Klason et mesurée par HPAE-PAD.

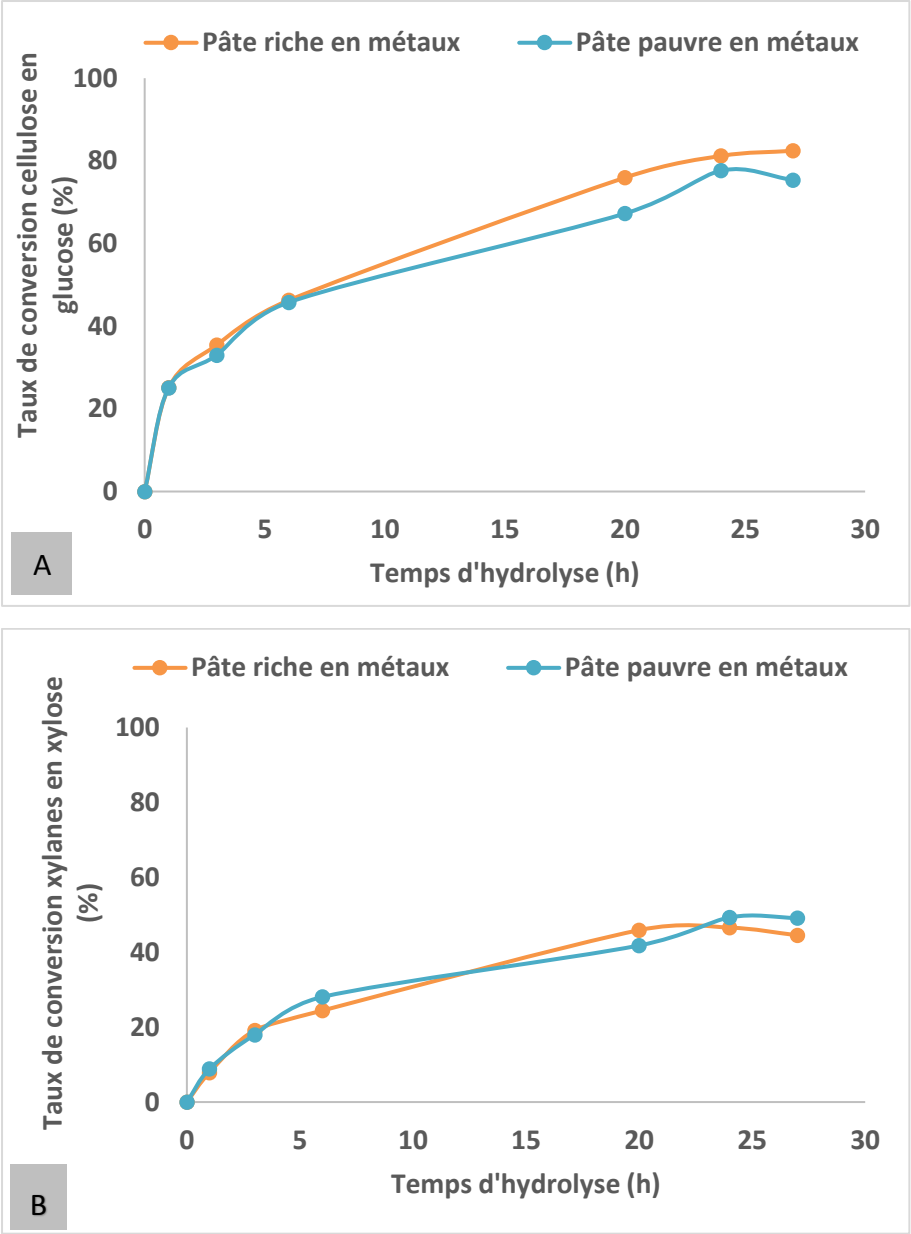


Figure 38. Cinétique d'hydrolyse enzymatique des pâtes récupérées après organosolv (avec et sans purification) du saule (S1)

On constate que le résidu prétraité selon le procédé organosolv présente une bonne hydrolysabilité enzymatique avec une digestibilité de la cellulose d'environ 80 % après 27 h d'incubation. Ce résultat est comparable à celui décrit dans la littérature pour l'hydrolyse enzymatique de pâtes organosolv de saule (Huijgen et al. 2011). La figure 38b montre que les enzymes utilisées présentent, en plus de l'activité cellulase, une activité xylanase avec un rendement de conversion xylanes-xylose d'environ 50 % après 27 h d'incubation.

De plus on n'observe aucun effet de la présence des ETMs dans la pâte cellulosique sur

la cinétique d'hydrolyse enzymatique. On peut donc conclure d'après cette étude que les résidus cellulosiques produits par prétraitement de biomasses issues de phytoremédiation semblent être valorisables pour la production de monosaccharides par voie enzymatique.

4.2. HYDROLYSE DES PÂTES OBTENUES PAR SE

L'effet de l'explosion à la vapeur sur l'amélioration des rendements d'hydrolyse enzymatique a été abordé dans plusieurs travaux. Les résultats de l'étude de Pielhop et al. montrent que le prétraitement de la biomasse par explosion vapeur améliore considérablement les rendements d'hydrolyse enzymatique (Pielhop et al. 2016).

Dans le cadre de notre étude, l'hydrolyse enzymatique des pâtes obtenues après explosion à la vapeur du saule S1 à des sévérités différentes a été réalisée selon le protocole décrit précédemment (Chap. 2 - §4.3.1). La figure 39 présente les cinétiques d'hydrolyse des six pâtes cellulosiques.

Le taux de conversion de la cellulose en glucose est calculé comme suit :

$$\text{Taux de conversion (\%)} = 100 \times \frac{m_{\text{glucose formé lors de l' hydrolyse}}}{m_{\text{glucose dans la pâte}}}$$

Avec :

$m_{\text{glucose pendant hydrolyse}}$: masse de glucose récupérée à chaque prélèvement, mesurée par HPAE-PAD.

$m_{\text{glucose dan la pâte}}$: masse de glucose contenue dans la pâte obtenue dans le protocole de lignine de Klason et mesurée par HPAE-PAD.

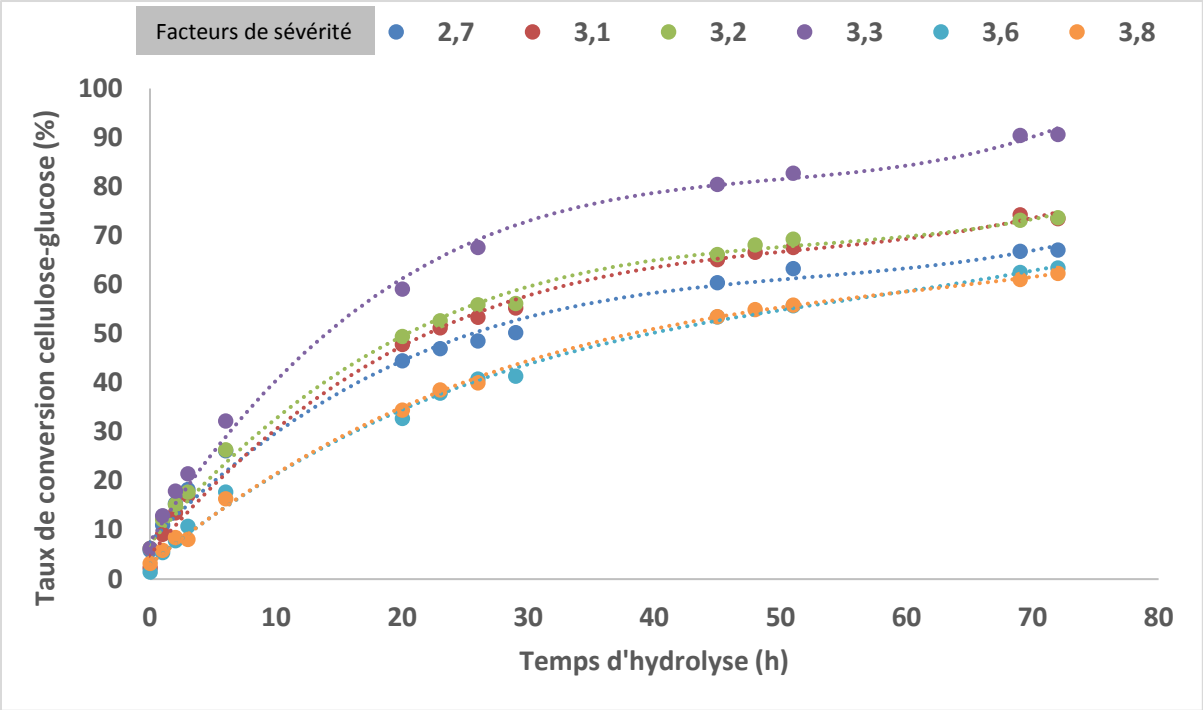


Figure 39. Cinétique d'hydrolyse enzymatique des six pâtes récupérées après SE du saule (S1) avec une imprégnation à 2 % H_2SO_4

Les résultats obtenus confirment que l'explosion à la vapeur est un prétraitement efficace pour une conversion enzymatique en glucose avec des rendements de conversion cellulose-glucose allant de 60 % à 90 %. Des différences notables sont néanmoins observées selon les conditions du prétraitement. On observe une augmentation de l'hydrolysabilité de la cellulose en passant de la sévérité 2,7 à 3,3. Un rendement optimal de 90 % étant obtenu au facteur de sévérité 3,3 qui correspond à une température de 180°C et un temps de séjour de 8 min. Les teneurs en lignine relativement élevées des résidus cellulosiques isolés après explosion à la vapeur n'affectent pas leur hydrolysabilité. Cependant, pour les sévérités 3,6 et 3,8, une tendance inverse est observée avec une baisse des rendements pour les sévérités les plus élevées. Ce résultat peut s'expliquer par la formation de produits de dégradation des sucres (furfural et HMF) qui se forment dans les conditions les plus sévères et qui ont un effet inhibiteur sur les enzymes hydrolytiques (Ximenes et al. 2011).

5. FERMENTATION DES HYDROLYSATS

La fermentation de trois hydrolysats isolés après hydrolyse enzymatique des pâtes cellulosiques prétraitées par explosion à la vapeur (180°C - 5min ; 200°C - 5min ; 220°C - 5min) correspondant respectivement aux sévérités 3,1, 3,6 et 4,2, a été menée dans une étude préliminaire de faisabilité en utilisant la levure *S. cerevisiae* (Chap. 2 - §4.3.2.1.4). La fermentation d'une solution témoin contenant une solution de glucose est également suivie. Les concentrations initiales en glucose dans les milieux étaient de 6,16 g.L^{-1}, 6,09 g.L^{-1}et 5,46 g.L^{-1} correspondant aux facteurs de sévérité 3,1, 3,6 et 4,4 respectivement. Dans le témoin glucose la concentration initiale était de 8 g.L^{-1}. Les suivis cinétiques de l'éthanol formé durant la fermentation sont présentés à figure 40.

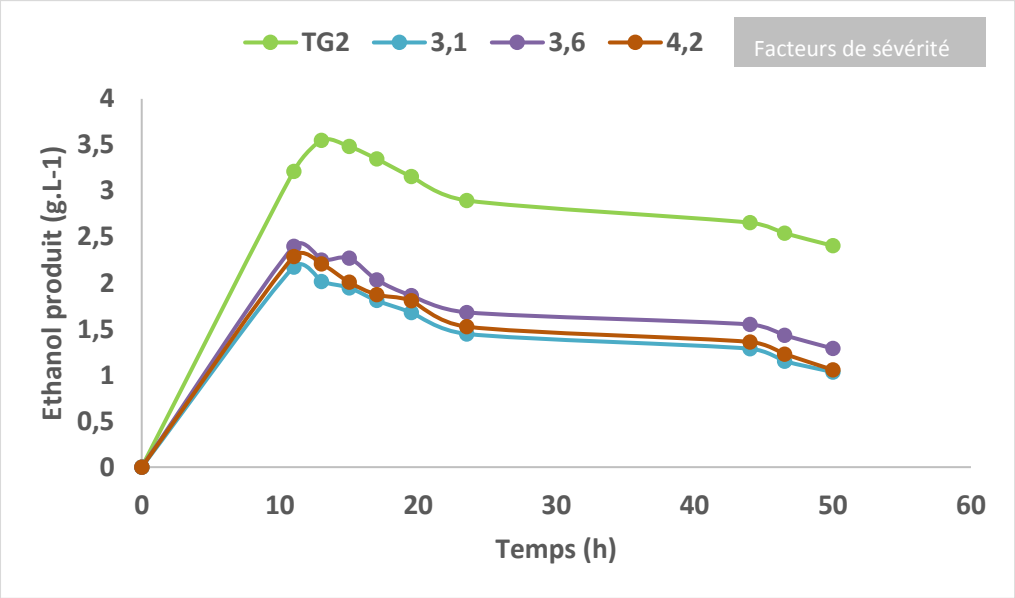


Figure 40. Cinétique de fermentation des trois hydrolysats récupérés après hydrolyse enzymatique du saule (S1)

TG= Témoin glucose

On constate que les trois hydrolysats étudiés ont conduit à une fermentation du glucose avec production d'éthanol dans des conditions comparables. Après 11h de fermentation, une concentration maximale en éthanol d'environ 2,3 g.L^{-1} a été obtenue pour les échantillons étudiés ce qui correspond à des taux de conversion allant de 69 % à 82 % (figure 41) Au-delà de 11 h de fermentation, une baisse de la concentration en éthanol dans

le milieu est observée. Cette dernière peut s'expliquer par la consommation de l'éthanol par les levures, sachant qu'après fermentation totale du glucose, l'éthanol est la seule source de carbone pour leur développement.

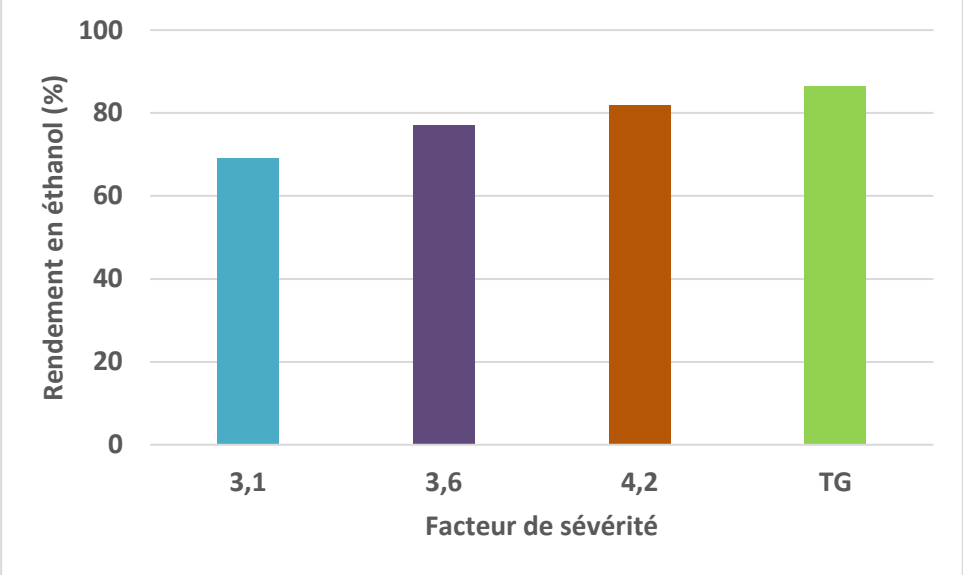


Figure 41. Rendement en éthanol produit sur la fermentation des hydrolysats du saule (S1)

TG= Témoin glucose

Le rendement en éthanol obtenu est calculé comme suit :

$$\text{Rendement éthanol (\%)} = 100 \times \frac{C_{\text{éthanol produit}}}{C_{\text{éthanol maximale théorique}}}$$

Avec

$C_{\text{éthanol produit}}$: Concentration obtenue après fermentation et quantifiée par HPLC ;

$C_{\text{éthanol maximale théorique}}$: concentration théorique initiale en éthanol, calculée à partir de la concentration initiale du glucose dans le milieu.

Cette étude préliminaire démontre que les hydrolats issus d'explosion à la vapeur de saule issu de phytoremédiation sont fermentescibles en éthanol, malgré la présence résiduelle d'ETMs. Des rendements très proches du témoin glucose sont obtenus, qui sont très satisfaisants. On peut dire que la conversion du glucose en éthanol est possible même en présence des ETMs.

6. CONCLUSION DU CHAPITRE

Le but principal de ce chapitre était d'étudier le prétraitement du saule issu de phytoremédiation afin de pouvoir valoriser ses constituants. L'objectif principal était de convertir la partie cellulosique en bioéthanol, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à optimiser les paramètres du prétraitement afin de récupérer le maximum de pâte cellulosique pour l'application bioéthanol.

Deux prétraitements ont été appliqués : le prétraitement organosolv et le prétraitement par explosion à la vapeur, d'une part pour suivre la répartition des ETMs dans la biomasse lignocellulosique et d'autre part pour purifier la matière lignocellulosique. Le procédé organosolv montre qu'une partie importante (40 à 90 %) des ETMs se localise dans les fibres de cellulose. Par contre, les résultats montrent que la purification de la biomasse via le procédé d'explosion à la vapeur est plutôt efficace, à condition que le prétraitement soit précédé d'une imprégnation acide afin de faciliter l'extraction des ETMs.

Le taux de conversion en glucose des pâtes cellulosiques issues des deux procédés est plutôt satisfaisant, même en présence d'ETMs résiduels qui n'affectent pas visiblement l'activité enzymatique. Ce résultat est encourageant dans le cadre d'une stratégie « bioraffinerie ». De plus la possibilité de fermentation des hydrolysats est également confirmée. On peut conclure que les biomasses récoltées après phytoremédiation peuvent être convertie en bioéthanol, même en présence d'ETMs résiduels dans les pâtes cellulosiques.

CHAPITRE IV

CARACTÉRISATION ET VALORISATION DE *NOCCAEA* :

ÉTUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET PRÉTRAITEMENT PAR EXPLOSION VAPEUR

1. INTRODUCTION

N. caerulescens est une plante hyperaccumulatrice d'ETMs de Cd, Ni et Zn endémique des sols métallifères (Reeves et al. 1995). Grâce à son pouvoir accumulateur elle a été utilisée dans de nombreux travaux portant sur la compréhension du phénomène d'accumulation (Pence et al. 2000; Deng et al. 2016; Basic et al. 2006). Elle est également très utilisée en phytoremédiation pour la réhabilitation des sols pollués grâce à sa capacité à croitre sur des sols contaminés et pauvres en nutriments, à absorber et à stocker les ETMs dans ses tissus (Assunção et al. 2003; Meerts & Van Isacker 1997). Malgré l'intérêt que suscite cette plante dans le domaine de la gestion des sols pollués, aucune étude de la littérature ne s'était encore intéressée à sa caractérisation biochimique ni à la valorisation de sa partie lignocellulosique.

Dans ce chapitre, cinq lots de *Noccaea* de différentes origines ont été examinés. Leurs caractéristiques et provenances géographiques sont résumées dans le tableau 5 du chapitre2. Une étude plus poussée sur l'un de ces lots a été menée pour déterminer son potentiel de valorisation. Des méthodes classiques utilisées pour la caractérisation des matières lignocellulosiques ont été adoptées. À partir de cette composition, nous avons examiné des pistes de valorisation :

- Des teneurs en pectines relativement fortes ayant été détectées, la première partie de ce travail a été consacrée à l'extraction et la caractérisation des pectines de *Noccaea* ;
- Une valorisation de type « bioraffinerie », impliquant une étape de prétraitement puis d'hydrolyse-fermentation a également été envisagée.

2. ÉTUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE

2.1. COMPOSITION EN ETMS

La caractérisation des échantillons de *Noccaea*, commence par une évaluation de la teneur en ETMs dans chaque lot. Une minéralisation suivie d'un dosage ICP-AES ont permis d'obtenir les résultats résumés dans le tableau 16.

Tableau 16. Teneurs en ETMs (mg.kg^{-1}) dans les cinq lots de Noccaea

	Cd	Cu	Mn	Zn
CM	4,33	8,32	18,7	1313
VI	30,3	8,65	34,5	1245
LO	457	15,5	22,7	3948
G	1319	14,7	25,2	16013
LS	675	<LOD	124	2080

Tous les échantillons présentent des teneurs en ETMs élevées. L'échantillon de Ganges (G) est le plus riche en Zn, avec une teneur de 16 g.kg^{-1}. La teneur la plus faible en Zn est de 1,3 g.kg^{-1} observée dans l'échantillon de Croix des Moinats (CM). L'échantillon de Ganges (G) est également celui qui est le plus riche en Cd avec une teneur de 1,3 g.kg^{-1}, contrairement à l'échantillon CM qui présente la quantité la plus faible en Cd parmi les cinq lots. En effet, la population de Ganges est connue pour ses capacités à accumuler plus de Cd que les autres populations (Liu et al. 2008; Reeves et al. 2001b). La teneur en ETMs dans la biomasse est liée plus souvent à leur disponibilité dans le sol (Kobayashi et al. 2005).

2.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES *NOCCAEA*

Dans l'objectif d'étudier la composition chimique des cinq lots de *Noccaea*, des méthodes classiques d'analyse ont été utilisées (Norme TAPPI), que ce soit pour les extractibles, la lignine de Klason et les polysaccharides. Les résultats sont présentés dans le tableau 17 ci-dessous.

Tableau 17. Composition biochimique des échantillons de Noccaea caerulescens

Échantillon	% Extractibles[a]	% Lignine	% Cellulose	% Hémicelluloses	Pectines[b]
CM	78,2	4,4	11,9	4,8	21
G	69,0	4,2	7,3	13,7	12,12
LO	58,3	3,3	8,1	15,1	14,41
LS	44,6	2,9	5,1	11,1	14,04
Vi	74,8	6,3	8,6	8,6	16,42

[a] extraction au toluène/éthanol (2v/1v) ; [b] Dosage par colorimétrie (teneur exprimée par équivalent acide galacturonique, g/100g)

On constate que, la composition est très différente des herbacées étudiées habituellement avec des teneurs en extractibles particulièrement élevées allant de 44,6 % à 78,2 %. Le procédé d'extraction utilisé dans cette étude est une extraction en deux étapes utilisant un mélange toluène/éthanol puis de l'éthanol permettant de solubiliser un maximum d'extractibles (polaires et peu polaires). Ces teneurs en extractibles sont nettement supérieures à celles relevées pour la paille de blé, de colza ou le miscanthus avec des teneurs allant de 5 à 23 % (Gismatulina & Budaeva 2017; Potucek & Milichovsky 2011). Ces teneurs peuvent s'expliquer par la présence de chlorophylle, et également de sucres solubles comme les pectines. Un dosage colorimétrique des pectines réalisé en suivant la méthode de Ahmed et Labavitch (Ahmed & Labavitch 1978) nous a permis de confirmer cette hypothèses et d'estimer la teneur en pectine entre 12 % et 21 % (équivalent en acide galacturonique) selon les lots.

Par ailleurs, on constate des teneurs en lignine, hémicelluloses et cellulose relativement faibles. À titre de comparaison, chez le switchgrass, le taux de lignines insolubles (extraites par la même méthode) est de 16 % (Ioelovich 2015) un taux nettement supérieur à celui obtenu dans les différents lots de *Noccaea* étudiés. Les plantes herbacées présentent généralement de faibles quantités en lignine (McKendry 2002). Il est à noter que le phénomène de lignification est directement lié à l'âge et à la croissance de la plante. Comme mentionné précédemment, *Noccaea* a un cycle de vie court, ce qui réduit le temps de lignification des cellules. Ce qui pourrait expliquer les faibles taux en lignines dans les lots analysés.

2.3. EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DES PECTINES

L'extraction et la caractérisation des pectines de *Noccaea* n'a pas été étudiée jusqu'à présent dans la littérature. Dans l'optique d'une valorisation ultérieure, l'extraction chimique des pectines de *Noccaea* a donc été étudiée.

Les fractions isolées ont ensuite été caractérisées par chromatographie d'exclusion stérique pour connaître la distribution de masses moléculaires et par infrarouge (FT-IR) pour déterminer la présence de groupements fonctionnels des pectines.

2.3.1. RENDEMENTS EN PECTINES

Un grand nombre de procédés d'extraction des pectines peut être trouvé dans la littérature: l'extraction assistée par micro-ondes (Lefsih et al. 2017); l'extraction acide (Nazaruddin et al. 2013) ; l'extraction alcaline (Abang Zaidel et al. 2017) ; l' extraction enzymatique (Bayar et al. 2018). À l'échelle industrielle, les pectines sont extraites en milieu aqueux légèrement acide (Ralet et al. 2001). Par contre les pectines faiblement méthylesterifiées sont facilement extraites en présence de chélateurs des ions calcium (EDTA, oxalate) (Redgwell et al. 1992). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes tournés vers deux types d'extraction par voie chimique : une à l'oxalate d'ammonium et l'autre à l'acide citrique, afin de comparer les rendements et les caractéristiques des pectines extraites.

Les extractions sont réalisées sur le lot (LS), dans l'eau en présence de 1 % en masse de réactif (oxalate d'ammonium ou acide citrique) à une température de 90 °C pendant 6 h. Les rendements en pectines des échantillons de *Noccaea* sont déterminés après dialyse contre l'eau distillée puis lyophilisation des fractions obtenues. L'étape de dialyse permet d'éliminer les fractions de faibles masses molaires (monomères, petits oligomères). Les rendements d'extraction par rapport à la matière sèche initiale sont présentés dans le tableau 18 suivant. À titre de comparaison, le rendement de pectines extraites à l'oxalate d'ammonium sans étape de dialyse est également donné.

Tableau 18. Rendements en pectines des échantillons de Noccaea après extraction à l'oxalate d'ammonium et à l'acide citrique

	Purification	Rendement (% MS)
Oxalate ammonium	Avec dialyse	11,17
	Sans dialyse	16,4
Acide citrique	Avec dialyse	7,78

Le rendement en pectines est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Rendement pectines (\%)} = \frac{m_{\text{sèche pectines}}}{m_{\text{sèche initiale Noccaea}}} \times 100$$

Où $m_{\text{sèche pectines}}$: masse sèche des pectines après lyophilisation

$m_{\text{sèche initiale } Noccaea}$: masse sèche initiale de *Noccaea* avant extraction

On constate que, l'extraction à l'acide citrique conduit à un rendement nettement plus faible en pectine (7,78 %) que celle réalisée en présence d'oxalate d'ammonium (11,17 %). On constate également que l'étape de dialyse entraine une chute de rendement, dans le cas de l'extraction à l'oxalate d'ammonium avec environ 5 % de matière perdue, qui s'explique par la présence dans le milieu d'extraction d'oligomères de faible poids moléculaires ou même de monomères. Des résultats comparables ont été décrits dans la littérature à partir de différentes biomasses comme les coques de cacao (Nazaruddin & Asmawati 2011), l'hibiscus (*Hibiscus sabdariffa L.*) (Nazaruddin et al. 2013), la mangue et les écorces d'orange (Koubala et al. 2008). Ces travaux ont tous montré des rendements supérieurs en utilisant l'oxalate d'ammonium

Les caractéristiques biochimiques des pectines dépendent de la nature de la matière première (Koubala et al. 2008) et affectent de manière directe le rendement en pectines. En effet, la composition chimique des tissus végétaux varie considérablement en fonction de l'espèce et des fonctions assurées et même entre la partie aérienne et racinaire. Ainsi dans les échantillons d'endive, il a été montré que les feuilles peuvent contenir entre 18 et 85 mg/g de

pectines, en revanche la partie racinaire peut varier entre 29 et 102 mg/g de pectines (Müller-Maatsch et al. 2016).

2.3.2. ANALYSE DES HYDROLYSATS

Afin de quantifier les monosaccharides libérés pendant l'extraction, les phases liquides récupérées après précipitation des pectines issues des deux extractions sont analysées par chromatographie HPAE-PAD après une post-hydrolyse. Les résultats d'analyse sont présentés dans la figure 42. La teneur en monosaccharides et acides uroniques est calculée avec la formule suivante :

$$\text{Teneur en monosaccharides (\% MS)} = 100 \times \frac{C\ (\frac{mg}{L}) \times V\ (L)}{m_{\text{sèche initiale}}(g) \times 1000}$$

Où

C ($mg.L^{-1}$) : concentration en monosaccharides ou acide uronique mesurée par HPAE-PAD ;

V (L) : volume de la solution obtenue après précipitation des pectines ;

$m_{\text{sèche initiale}}$ (g): masse sèche de l'échantillon utilisé pour l'extraction ;

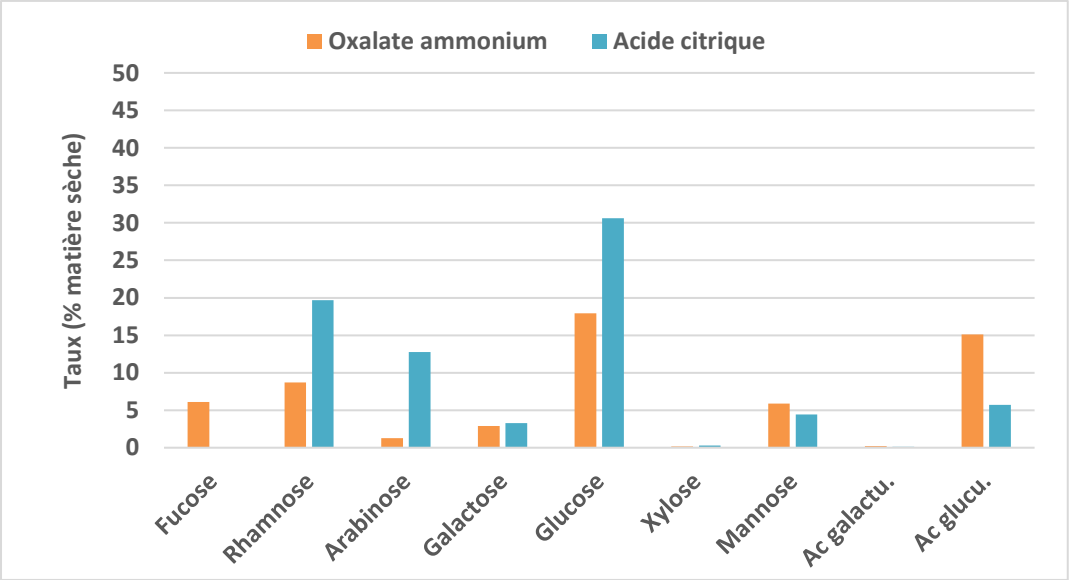


Figure 42. Taux de monosaccharides récupérés après extraction des pectines de Noccaea (LS) à l'oxalate d'ammonium et à l'acide citrique

On constate la présence du glucose comme sucre majoritaire, dont la présence peut

s'expliquer par l'hydrolyse d'amidon stocké dans les parties aériennes de *Noccaea* (pendant la photosynthèse). Deux autres sucres sont détectés en quantité importante surtout en milieu acide : le rhamnose et l'arabinose qui proviennent en grande partie de l'hydrolyse des pectines. En effet durant une extraction acide les rhamnogalacturonanes, caractérisés par la présence du rhamnose, de l'arabinose et du galactose sont très sensibles à l'hydrolyse (Thibault et al. 1993). En revanche, pendant l'extraction à l'oxalate d'ammonium, les conditions plus douces permettent de limiter les réactions d'hydrolyse des chaines de polysaccharides. Le protocole utilisé dans notre cas est adapté à une biomasse ligneuse relativement riche en lignines, qui nécessite des conditions plus sévères afin de libérer les pectines. En examinant la littérature on constate que des conditions moins sévères d'extraction (temps réduit à 1 à 2 h) pourraient être plus efficaces, pour limiter la dégradation des pectines. Dans certains travaux de la littérature à partir de matières premières peu lignifiées (Yang et al. 2018; Yuliarti et al. 2015; Kalapathy & Proctor 2001) le temps d'extraction est généralement fixé à 2h maximum.

Malgré le temps assez long des extractions (6 h à 90 °C), la chaine principale qui constitue la structure de base des pectines a été relativement peu affectée. En effet, des teneurs relativement faibles en acide galacturonique ont été détectées dans la phase liquide. Il est connu en effet qu'à pH acide les liaisons entre les unités d'acides uroniques sont beaucoup plus stables que les chaines latérales (Thibault et al. 1993). Dans cette étude des tests de solubilisation de pectines dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M pendant 72 h à 80 °C conduisent à une hydrolyse partielle du polymère (33 % pour la betterave ; 16 % pour la pomme et 10 % pour les agrumes).

2.3.3. RÉPARTITION DES ETMS DANS LES FRACTIONS

À l'issue de l'extraction des pectines, trois fractions ont été récupérées : un résidu solide pauvre en pectines, une phase liquide pauvre en pectines, les pectines elles-mêmes. Pour pouvoir suivre la distribution des ETMs dans les trois fractions, ces dernières sont minéralisées puis analysées par ICP-AES. La figure 43 résume les teneurs en Zn, Mn et Cd des différentes fractions. Toutes les fractions récupérées avec ou sans dialyse ont été analysées.

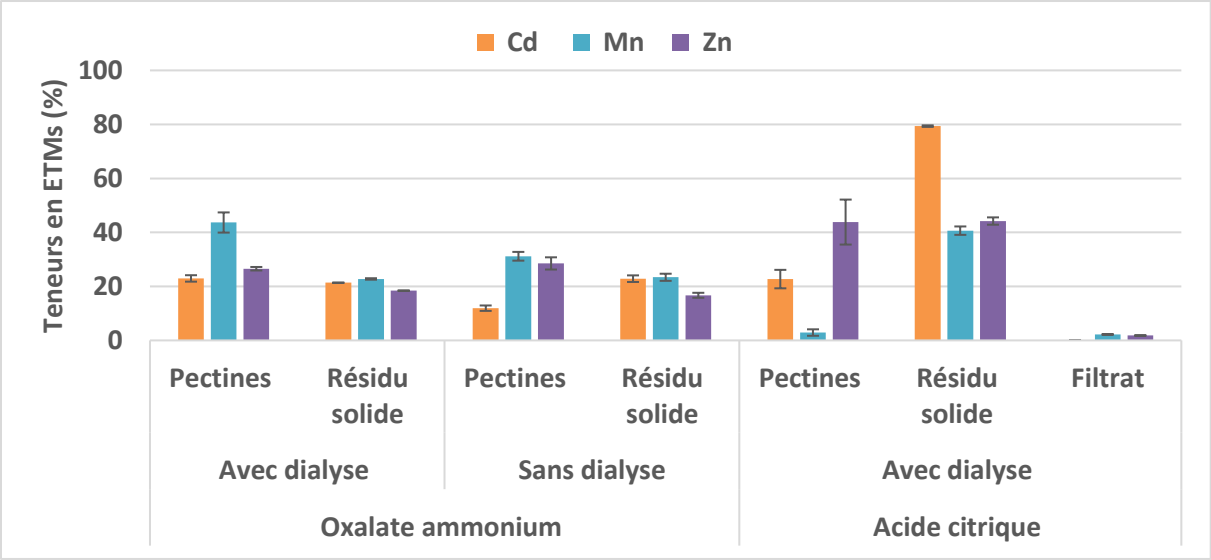


Figure 43. Ditribution des ETMs dans les trois fractions (résidu solide, pectine, filtrat) après l'extraction de pectines

Les résultats montrent que les ETMs sont répartis entre le résidu solide et la fraction pectique et une très faible quantité dans la phase aqueuse d'extraction. En ce qui concerne, les fractions issues de l'extraction à l'acide citrique, la teneur en Zn est bien répartie en deux entre les pectines et le résidu solide, si on compare avec la composition en ETMs de la matière brute. En revanche, pour le Cd la teneur est beaucoup élevée dans le résidu solide que dans la fraction de pectines. Concernant l'extraction à l'oxalate, on remarque que les teneurs en Zn et Cd sont plus basses dans le résidu solide et les pectines si on compare avec la teneur initiale dans la matière brute. Cela pourrait être expliqué par une minéralisation incomplète des échantillons, due aux fortes liaisons qui peuvent se former entre les ions métalliques et les groupes hydroxyliques et carboxyliques présents dans les échantillons extraits à l'oxalate d'ammonium (Shin & Rowell 2005; Rezić 2013). En revanche dans les phases liquides issues de l'extraction à l'oxalate d'ammonium les teneurs en ETMs sont inférieures à la limite de quantification.

La matière végétale est composée principalement de cellulose, d'hémicelluloses, de de lignine, de pectines et d'extractibles. Les ions métalliques s'adsorbent généralement aux groupes carboxyliques présents dans les hémicelluloses, la lignine et les pectines mais également aux phénols, et aux groupements hydroxyles et carbonyles, qui sont présents dans la cellulose (Pejic et al. 2009). La présence de pectines avec des teneurs élevées dans cette

biomasse indique que les sites de fixation des ions métalliques sont également nombreux. Les pectines sont connues pour être composées de chaines d'acide polygalacturonique, porteurs de groupes carboxyles qui sont des pièges à ETMs.

2.4. CARACTÉRISATION DES PECTINES

2.4.1. DISTRIBUTION DES MASSES MOLÉCULAIRES

Les distributions des masses moléculaires des échantillons de pectines isolées à l'oxalate d'ammonium avant et après dialyse ont été évaluées par chromatographie d'exclusion stérique. La détermination du poids moléculaire est importante, surtout pour une possible utilisation de pectines en tant que gélifiant. C'est un facteur essentiel pour déterminer les conditions de gélification.

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la figure 44. Pour vérifier la reproductibilité de l'analyse, deux essais par échantillon ont été réalisés.

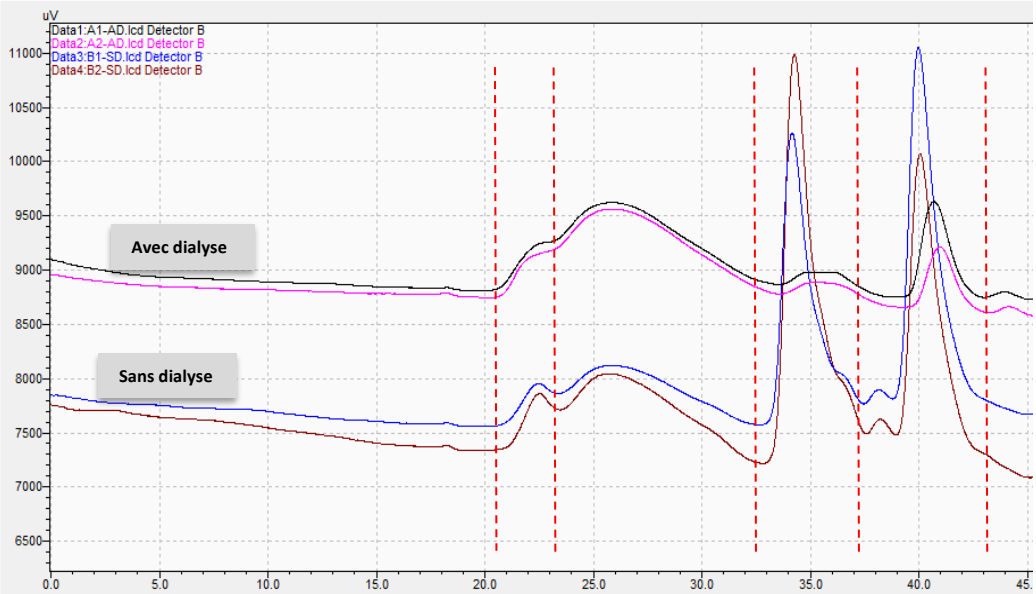


Figure 44. Profils d'élution des pectines extraites à l'oxalate d'ammonium à partir du lot de Noccaea (LS) en fonction du temps de rétention (min)

On distingue quatre zones principales : la zone située entre 20 et 23 min et entre 23 et 33 min correspondant à des fractions de pectines à haut poids moléculaire et les zones du chromatogramme situées entre 33 et 37 min et 37 et 43 min qui correspondent à des monomères et/ou oligomères de faibles masses molaires.

Les masses molaires estimées à partir de ces chromatogrammes sont présentés dans le tableau 19. Des masses molaires voisines de 400 kDa ont été mesurées. Ces valeurs sont proches de celles décrites pour les pectines extraites à partir des écorces de mangue (Koubala et al. 2008) qui ont des masses molaires moyennes de l'ordre de 414 kDa, et supérieures aux pectines des écorces d'orange (240 kDa) extraites en milieu acide (Sayah et al. 2016). Le poids molaire des pectines dépend donc fortement du matériel végétal utilisé (Willats et al. 2006).

Tableau 19. Masses moléculaires des pectines analysées par SEC avec et sans dialyse extraites à l'oxalate d'ammonium

	Temps d'élution (min)	Mw[a] (kDa)	Mw/Mn[b]
Avec dialyse	23-33	391 ± 11	1,14
	33-37	60 ± 3	1,04
	37-43	21 ± 1	1,01
sans dialyse	23-34	442 ± 94	1,07
	33-38	108 ± 66	1,01
	37-44	73 ± 2	1,09

[a]Mw = Weight Average Molecular Weight (Masse moléculaire moyenne en poids) ; [b]Mw/Mn = Indice de polydispersité

On constate d'après les chromatogrammes que l'étape de dialyse a permis d'éliminer une grande partie des fractions de faibles poids molaire présentes dans les pectines et de récupérer les fractions les plus importantes en termes de poids molaire.

2.4.2. ANALYSE FT-IR DES PECTINES

La spectroscopie infra-rouge par transformée de Fourrier est une méthode d'analyse rapide et simple qui est couramment utilisée pour l'analyse des pectines. En effet, certains groupes fonctionnels comme le groupe carbonyle peuvent être considérés comme un marqueur de la présence de pectine (Kacuráková et al. 2000). Les spectres FT-IR des pectines obtenues après extraction à l'oxalate d'ammonium et à l'acide citrique sont présentés dans la figure 45. Les spectres obtenus sont analysés pour identifier les principaux groupes fonctionnels des pectines isolées.

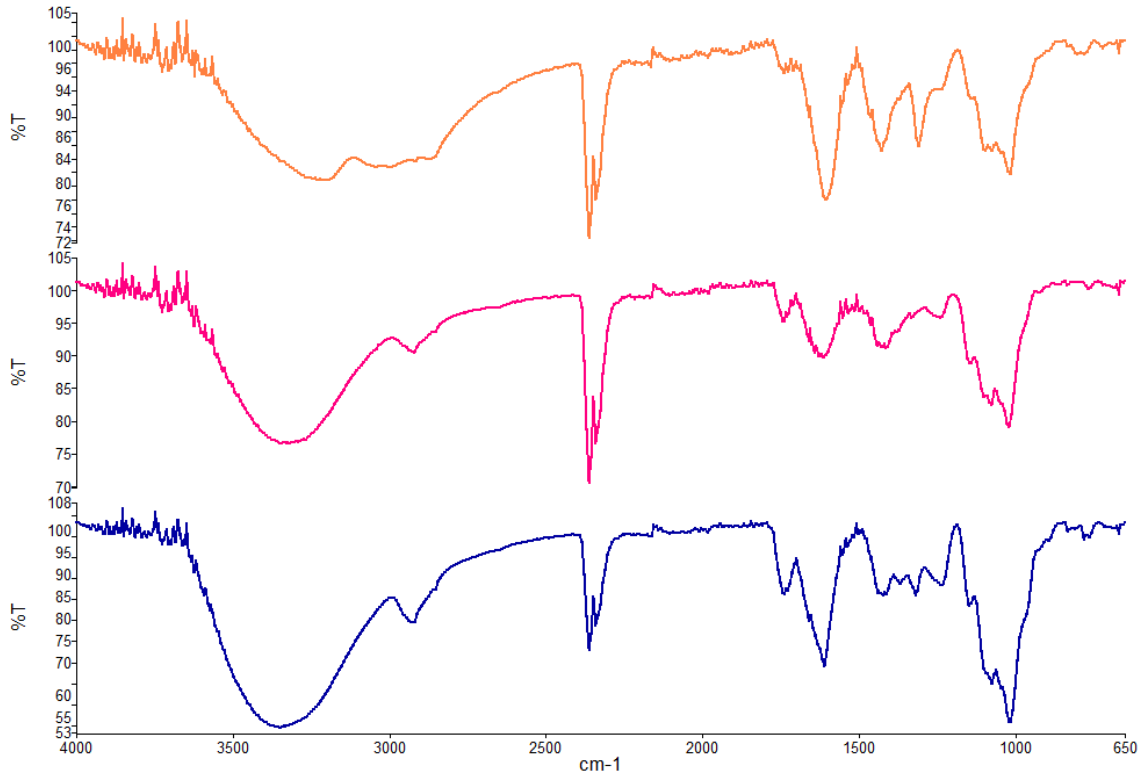


Figure 45. Spectres FT-IR des pectines isolées à partir de Noccaea (LS) avec l'acide citrique et l'oxalate d'ammonium

Oxalate d'ammonium sans dialyse
Acide citrique avec dialyse
Oxalate d'ammonium avec dialyse

La large bande vers 3500 cm^{-1} commune aux trois spectres, correspond aux vibrations d'étirement des groupements hydroxyles (–OH). On remarque pour l'échantillon non dialysé que cette bande présente un épaulement entre 2500 et 3000 cm^{-1}. Le signal à 2920 cm^{-1} correspond aux étirements des groupes CH et CH_2.

La bande vers 1740 cm^{-1} est caractéristique des vibrations du groupe C=O des esters méthyliques, qu'on peut retrouver dans les pectines. Les deux signaux à 1611 cm^{-1} et 1413 cm^{-1} sont attribués au groupement carboxylate (Santos et al. 2013). La forte intensité relative du pic à 1611 cm^{-1} dans les extraits à l'oxalate et à l'acide citrique suggère la présence de pectines fortement déméthylées. Le pic à 1075-1077 cm^{-1} est également caractéristique des pectines (Kacuráková et al. 2000).

2.5. CONCLUSION

Les résultats montrent que l'espèce *N. caerulescens* est particulièrement riche en pectines à hauteur de 15 à 20 % (de sa matière sèche), une teneur particulièrement élevée comparée à celles des herbacées décrites dans la littérature.

Il a été montré que l'extraction de pectines à l'aide d'un complexant (ions oxalates) est particulièrement efficace. Les pectines isolées à partir de l'échantillon de *Noccaea*, semblent avoir des caractéristiques comparables à celles contenues dans d'autres biomasses, comme les écorces d'agrumes, et les pommes de terre. Ces premiers résultats ouvrent donc des perspectives intéressantes pour la valorisation de cette plante. Cependant, les résultats obtenus semblent montrer que les conditions utilisées pour leur extraction (90 °C, 6h) étaient trop sévères compte tenu de la faible teneur en lignine de *Noccaea*.

Une caractérisation plus poussée est néanmoins nécessaire pour pouvoir définir les domaines d'application des pectines de *Noccaea* comme par exemple la détermination du degré de méthylation et d'acétylation, le pouvoir gélifiant des pectines, mais également des tests de viscosité.

3. VALORISATION DE *NOCCAEA CAERULESCENS* EN BIORAFFINERIE

Le but de cette partie est d'explorer la possibilité de valoriser *Noccaea* selon une approche biotechnologique pour la production de biocarburant et/ou de molécules plateforme. Dans ce type d'approche et comme exposé précédemment le prétraitement reste une étape clé, pour déstructurer la matière et rendre ses composants accessibles aux enzymes. Dans ce travail nous nous sommes intéressés au prétraitement de *Noccaea* par explosion à la vapeur à partir du lot LS décrit précédemment. Après hydrolyse enzymatique, la fermentation ABE (Acétone Ethanol Butanol) a été retenue. En effet, compte tenu de la composition atypique de *Noccaea* et de sa teneur relativement faible en cellulose et forte en pectines, il est apparu que ce type de fermentation impliquant un microorganisme (*C. acetobutylicum*) moins sélectif qu'une levure était plus appropriée (Hou et al. 2013; Sreekumar et al. 2015; Lütke-Eversloh & Bahl 2011). Enfin, dans le cas particulier de la biomasse utilisée, riche en ETMs, le devenir de ceux-ci et leur impact sur les étapes du procédé ont été examinés.

3.1. PRÉTRAITEMENT D'EXPLOSION À LA VAPEUR

3.1.1. CONDITIONS DU PRÉTRAITEMENT

Comme expliqué précédemment, le prétraitement par explosion à la vapeur est devenu depuis quelques années l'un des prétraitements les plus utilisés pour la valorisation des biomasses végétales. L'un des avantages qu'il présente est une modulation aisée de la sévérité en jouant sur les paramètres du procédé. Il est ainsi adapté à tous type de biomasses (ligneuse, herbacée, déchets agricoles…). Dans le cadre de notre étude les conditions opératoires envisagées pour le prétraitement de *Noccaea* ont été choisies en se basant sur les travaux de la littérature réalisés sur des herbacées (Chen et al. 2011; Hu & Ragauskas 2011).

Les tableaux suivants (20 et 21) rassemblent les 18 conditions expérimentales de prétraitement utilisées. Le temps de séjour dans le réacteur varie de 2 à 8 minutes, la température varie de 180 à 200°C et enfin deux imprégnations acides sont étudiées.

Tableau 20. Conditions de prétraitement SE – Imprégnation acide à 0,9 % H_2SO_4

Essai	T (°C)	Temps de séjour (min)	Imprégnation H_2SO_4 (%)	Sévérité	Sévérité combinée
1	180	2	0,9	2,7	0,0
2	180	5	0,9	3,1	0,4
3	180	8	0,9	3,3	0,6
4	200	2	0,9	3,2	0,5
5	200	5	0,9	3,6	0,9
6	200	8	0,9	3,8	1,1
7	220	2	0,9	3,8	1,1
8	220	5	0,9	4,2	1,5
9	220	8	0,9	4,4	1,7

Tableau 21. Conditions de prétraitement SE – Imprégnation acide à 2 % H_2SO_4

Essai	T (°C)	Temps de séjour (min)	Imprégnation H_2SO_4 (%)	Sévérité	Sévérité combinée
1	180	2	2	2,7	0,3
2	180	5	2	3,1	0,7
3	180	8	2	3,3	0,9
4	200	2	2	3,2	0,8
5	200	5	2	3,6	1,2
6	200	8	2	3,8	1,4
7	220	2	2	3,8	1,4
8	220	5	2	4,2	1,8
9	220	8	2	4,4	2,0

3.1.2. RENDEMENT EN PÂTE CELLULOSIQUE

Avant prétraitement, les échantillons ont été imprégnés dans des solutions d'acide sulfurique à 0,9 et 2 % (masse d'acide/masse de biomasse) pendant 4 heures. Une fois filtrée, la biomasse imprégnée est placée dans le réacteur pour être traitée par explosion à la vapeur sous différentes conditions. Le rendement en pâte cellulosique est présenté dans la figure 46.

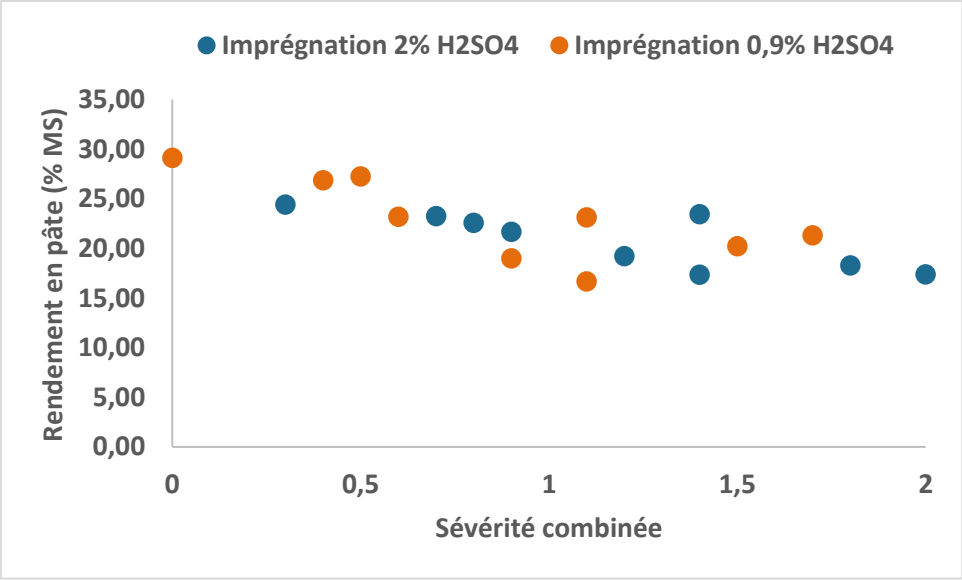


Figure 46. Rendement en pâte cellulosique de Noccaea après prétraitement d'explosion à la vapeur en fonction de la sévérité combinée

On constate une diminution du rendement en pâte cellulosique avec l'augmentation de la sévérité du traitement. Le rendement le plus élevé (29,15 %) est obtenu pour les conditions les moins sévères, avec une imprégnation à 0,9 %, à 180 °C pendant 2 min qui correspond à une sévérité de 2,7. Pendant le prétraitement, les hémicelluloses sont hydrolysées en premier lieu, à cause de leur forte réactivité en conditions acides, en plus de leur structure amorphe qui les rend plus faciles à hydrolyser (Negro et al. 2003). L'hydrolyse d'une partie de la matière lignocellulosique est la résultante de la sévérité du traitement. En effet les biopolymères composant la matière lignocellulosique sont plus sensibles aux températures élevées, qui s'accompagnent d'une dépolymérisation et d'une dégradation des hémicelluloses, cellulose et lignine pendant le prétraitement, ces phénomènes étant amplifiés en conditions acides. Le rendement est légèrement plus important avec une imprégnation à 0,9 % à l'exception de certains points. Le rendement en pâte cellulosique pour l'imprégnation à 0,9 % passe de 29,15 % à 180 °C jusqu'à 21,34 % à 220 °C et de 24,44 % à 180 °C à 17,42 % à 220 °C pour une l'imprégnation à 2 %, ce qui explique que le facteur de sévérité joue un rôle important dans l'hydrolyse des polysaccharides et même de la lignine dans notre cas.

Si on prend en compte l'âge de *Noccaea* qui était relativement jeune au moment de la récolte, et en comparant avec les données de la caractérisation chimique on peut expliquer le taux de lignine assez faible qui est de l'ordre de 3 %. Cette valeur indique que *Noccaea* est très

peu lignifiée, ce qui pourrait être la raison pour laquelle les rendements en pâte cellulosique sont aussi faibles. Elle peut également être expliquée par le fait que le teneur en extractibles est plus importante dans ce type de biomasse. En effet, la présence de la lignine à la surface des fibres de cellulose peut limiter l'effet des conditions du traitement sur l'hydrolyse et la dégradation des polysaccharides, formant une sorte de protection qui va donc limiter plus ou moins l'accessibilité à la cellulose et aux hémicelluloses pendant le prétraitement.

3.1.3. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PÂTE

Les figure 47 et 48 présentent respectivement les teneurs en lignine et sucres résiduels dans la pâte cellulosique après traitement SE en fonction de la sévérité. La teneur en lignine a été déterminée en suivant la méthode des lignines de Klason, et la teneur en sucres résiduels est évaluée par analyse du filtrat issu des lignines de Klason par chromatographie HPAE-PAD. Les calculs permettant de déterminer ces teneurs ont été présentés dans le chapitre « saule » (Voir chapitre III, § 2.)

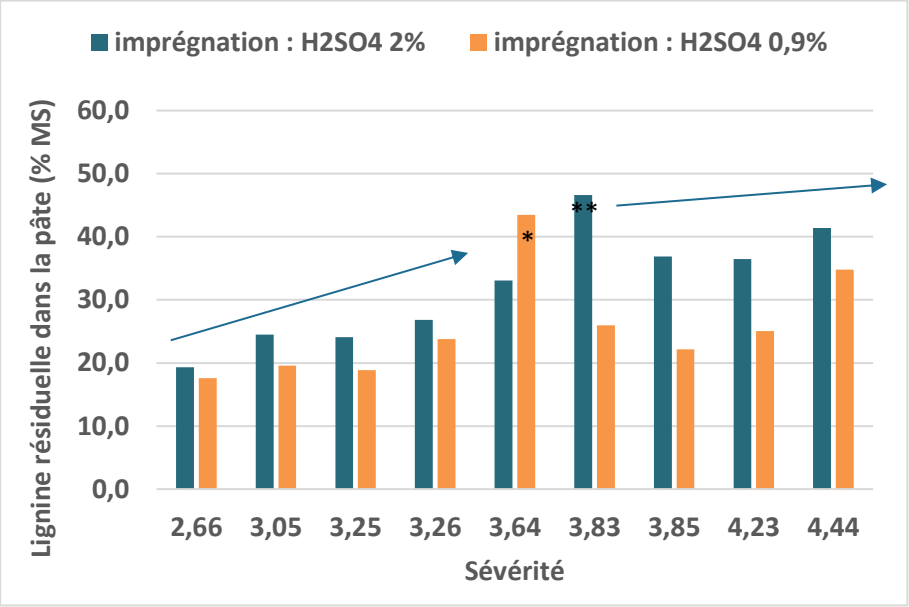


Figure 47. Lignine résiduelle (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE

Globalement (si on exclut les points * et **), on observe une augmentation du taux de lignine contenu dans la pâte avec la sévérité (jusqu'à 3,64). Au-delà d'une sévérité de 3,64 l'augmentation du taux est moins marquée, montrant que l'on tendrait vers une valeur

critique en lignine résiduelle. L'augmentation du taux de lignine peut s'expliquer d'une part par la diminution du taux d'hémicelluloses et de pectines, mais également par une diminution du reste de matières extractibles. La teneur en lignine et en sucres résiduels est calculée comme suit :

$$\text{Teneur en lignine dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{m_{\text{lignine dans la pâte après SE}}}{175\ (\text{mg})}$$

Avec :

$m_{\text{lignine dans la pâte après SE}}$: masse de lignine insoluble extraite de la pâte (en mg)

175 (mg) : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason,

$$\text{Teneur en sucres dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{\sum_1^9 C_{\text{monosaccharides}}\ (\frac{\text{mg}}{\text{L}}) \times 0{,}1(\text{L})}{175\ (\text{mg})}$$

Avec :

$\sum_1^9 C_{\text{monosaccharides}}$: concentration totale en monosaccharides (et acides uroniques) mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$)

0,1 (L) : volume de la solution de monosaccharides obtenus dans le protocole des lignines de Klason,

175 (mg) : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason,

Concernant l'imprégnation acide, on observe que son influence est plus marquée pour des sévérités supérieures à 3,64. Généralement lors du prétraitement, les hémicelluloses sont faciles à hydrolyser en conditions acides (Pettersen 1984), contrairement aux pectines qui nécessitent des conditions beaucoup plus sévères pour leur hydrolyse. En se référant aux travaux de la littérature, l'augmentation de la teneur en lignine dans les différents échantillons, pourrait être la conséquence du prétraitement en conditions sévères. En effet, le prétraitement en conditions acides, peut dans la plupart des cas provoquer la formation de ce que l'on appelle « pseudo-lignine » à partir des carbohydrates (Hu et al. 2012). Cette dernière ne provient pas de la lignine native. Elle est définie comme un polymère présent à la surface de la biomasse prétraitée sous forme de gouttelettes et présentant dans sa structure

des fonctionnalités carbonyles, aromatiques, et aliphatiques (Xu & Huang 2014).

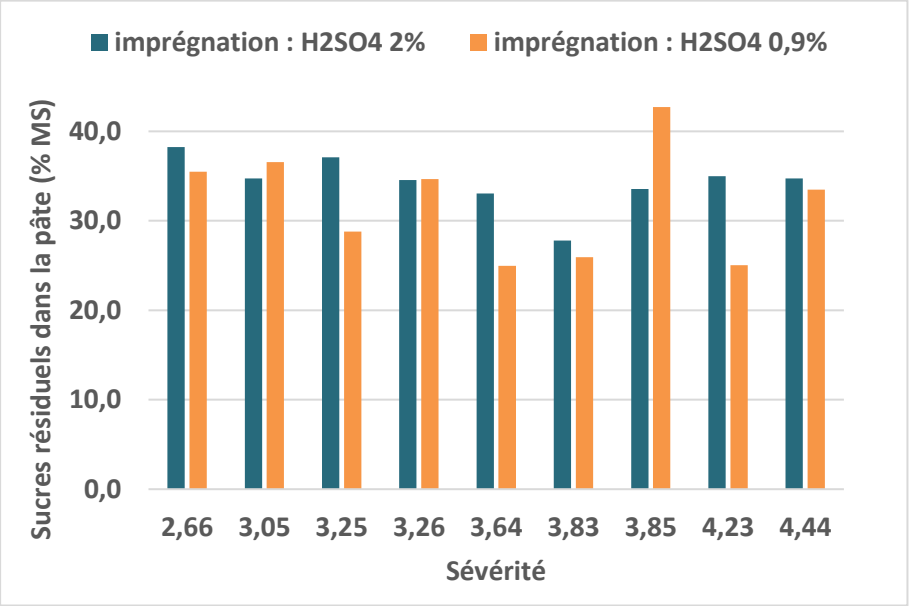


Figure 48. Sucres résiduels (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE

Pour interpréter la figure 48, qui présente la teneur en sucres « totaux » en fonction de la sévérité, il faut distinguer les sucres provenant des hémicelluloses, des pectines et le sucre constitutif de la cellulose. Pour cela, les figures 49 et 50 présentent la teneur en glucose, qui peut être considéré comme le marqueur de la cellulose et en xylose, qui peut être considéré comme le marqueur des hémicelluloses, dans la pâte. La teneur est calculée suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Teneur en glucose dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{C_{glucose}\ (\frac{mg}{L}) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

Avec :

$C_{glucose}$: concentration en glucose mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$)

0,1 (L) : volume de la solution de monosaccharides obtenus dans le protocole des lignines de Klason,

175 (mg) : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason,

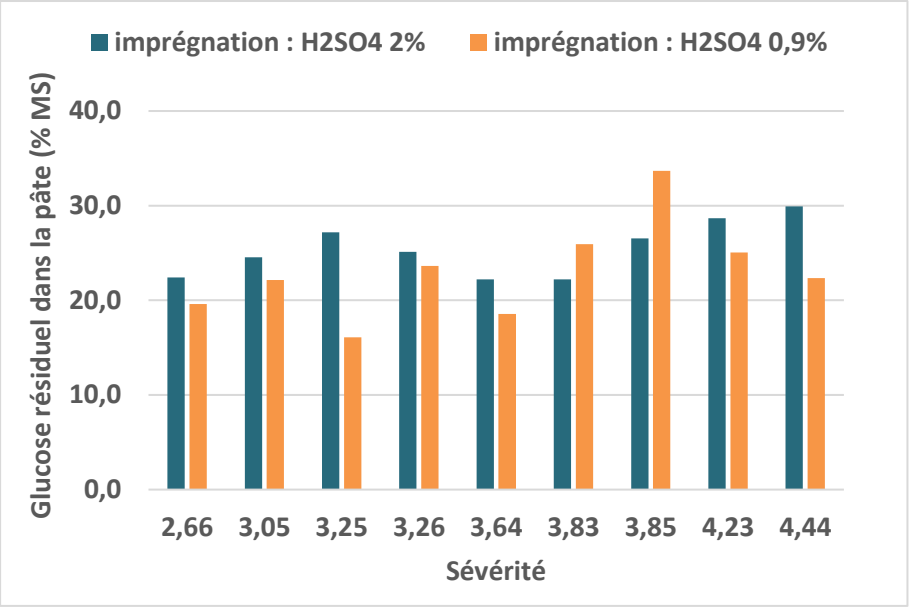


Figure 49. Glucose résiduel (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE

Globalement on observe une légère augmentation du taux de glucose, quelle que soit l'imprégnation, avec la sévérité. Cela confirme que la cellulose de *Noccaea* est quantitativement peu affectée par le procédé de SE. Avec l'imprégnation à 2 % d'acide sulfurique, on remarque une augmentation du taux de glucose, qui atteint les 30 % pour une sévérité de 4,44. Cependant, pour l'imprégnation à 0,9 % le taux de glucose augmente avec la sévérité jusqu'à 3,85 puis on observe une diminution, qui peut être expliquée par la dégradation d'une partie du glucose à partir de cette sévérité.

Le taux en xylose résiduel est calculé comme suit :

$$\text{Teneur en xylose dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{C_{xylose}\left(\frac{mg}{L}\right) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

Où :

C_{xylose} : concentration en glucose mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$)

0,1 (L) : volume de la solution de monosaccharides obtenus dans le protocole des lignines de Klason,

175 (mg) : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason,

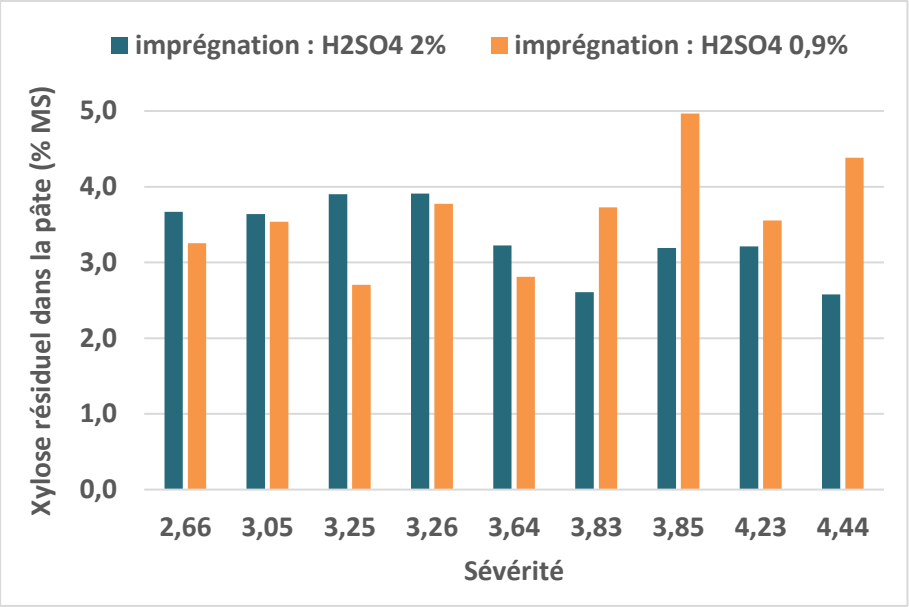


Figure 50. Xylose résiduel (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE

Le taux de xylose résiduel est nettement plus bas que celui du glucose (<5 %). Généralement le xylose diminue rapidement lors du prétraitement, si les températures appliquées sont supérieures à 170°C (Cybulska et al. 2013). À partir de la caractérisation chimique réalisée, il s'avère que *Noccaea* n'est pas spécialement riche en xylose comparée à d'autres biomasses lignocellulosiques, mais elle contient en effet plus de glucose. La figure 50 montre que plus la sévérité augmente avec une imprégnation à 2 % plus le taux de xylose diminue, ce qui pourrait être expliqué par les conditions de traitement qui provoquent la dégradation des xylanes formant ainsi des produits inhibiteurs comme le furfural et le HMF. En revanche, avec une imprégnation à 0,9 % on obtient des pâtes légèrement plus riches en xylose.

Il a été montré précédemment que *Noccaea* présente des teneurs en pectines élevées. L'évolution des concentrations de trois oses marqueurs des pectines (acide galacturonique, arabinose et rhamnose) dans les résidus solides isolés après explosion à la vapeur est donnée dans les figures 51, 52, et 53 suivantes.

Les teneurs sont calculées avec la formule ci-dessous :

$$\text{Teneur en Ac. galacturonique dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{C_{Ac.Gal}\left(\frac{mg}{L}\right) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

$$\text{Teneur en rhamnose dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{C_{rhamnose}\ (\frac{mg}{L}) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

$$\text{Teneur en arabinose dans la pâte (\% MS de pâte)} = 100 \times \frac{C_{arabinose}\ (\frac{mg}{L}) \times 0{,}1(L)}{175\ (mg)}$$

Avec :

$C_{Ac.Gal}$: concentration en acide galacturonique mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$) ;

$C_{rhamnose}$: concentration en rhamnose mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$) ;

$C_{arabinose}$: concentration en rhamnose mesurée par HPAE-PAD ($mg.L^{-1}$) ;

0,1 (L) : volume de la solution de monosaccharides obtenus dans le protocole des lignines de Klason ;

175 (mg) : masse sèche de pâte utilisée dans le protocole des lignines de Klason.

Figure 51. Taux d'acide galacturonique résiduel dans la pâte de Noccaea après SE

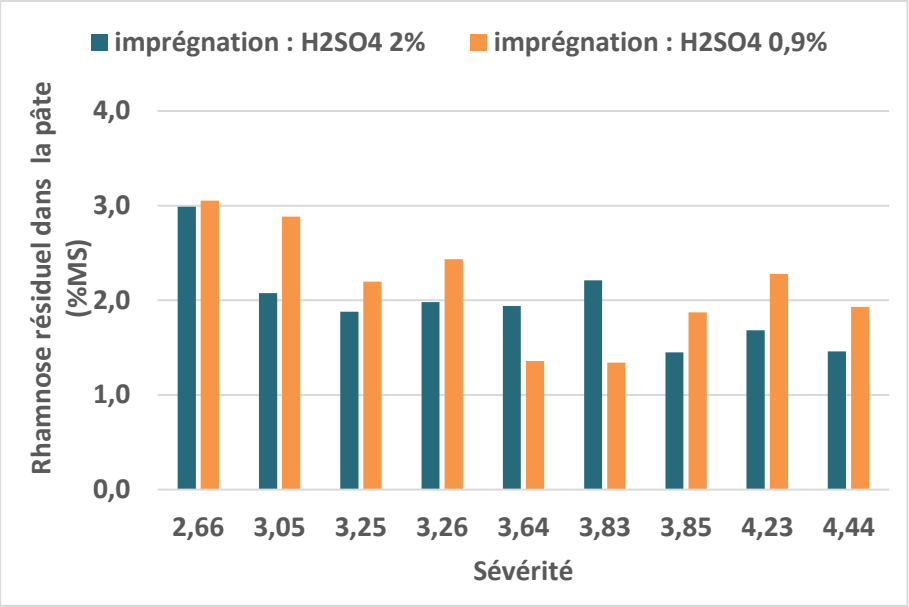


Figure 52. Taux de Rhamnose résiduel dans la pâte de Noccaea après SE

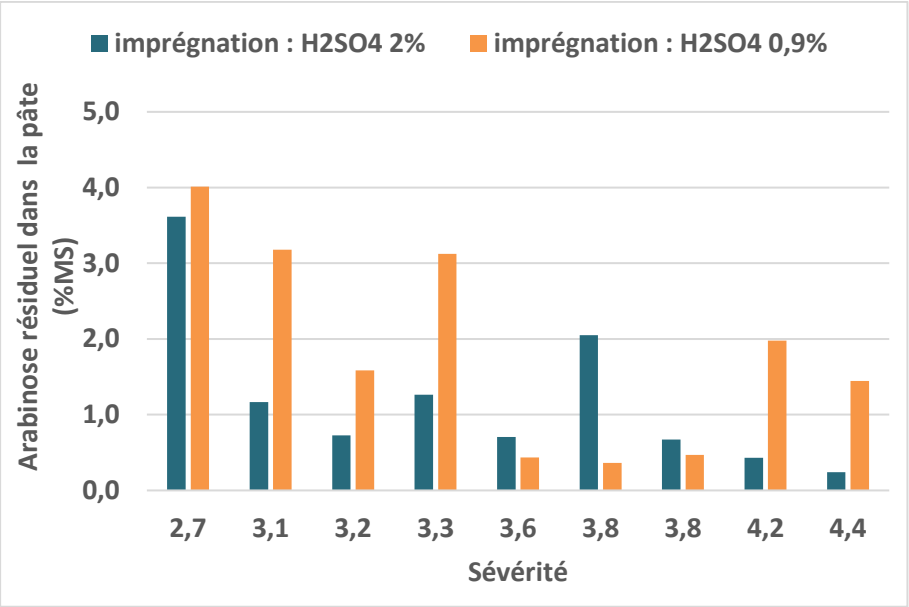


Figure 53. Taux d'Arabinose résiduel dans la pâte de Noccaea après SE

Plusieurs remarques peuvent être faites concernant l'évolution des teneurs en fonction de la sévérité du traitement :

- Les teneurs des trois marqueurs de pectines diminuent avec la sévérité du traitement ;
- On note une forte influence de l'imprégnation acide surtout dans le cas des sévérités les plus élevées pour l'acide galacturonique et l'arabinose ;

- Le rhamnose présente une sensibilité à l'hydrolyse plus faible.

Ainsi, à la sévérité la plus forte (4,44) et avec une imprégnation à l'acide à 2 %, l'acide galacturonique et l'arabinose sont pratiquement éliminés du résidu cellulosique attestant d'une extraction quasi-totale des composés pectiques. Il est décrit dans la littérature que les pectines présentent une certaine récalcitrance à l'hydrolyse. Il a été montré par extraction séquentielle que des polysaccharides pectiques pouvaient subsister dans une pâte cellulosique après hydrolyse totale des hémicelluloses. Ryden et al. (Ryden et al. 2014) ont étudié le prétraitement par explosion à la vapeur non catalysée de paille de colza. Ces auteurs ont montré que contrairement aux xylanes, les pectines ne sont hydrolysées qu'à forte sévérité et qu'une fraction n'est pas éliminée et reste liée à la cellulose. Ces faits expérimentaux sont liés à la plus grande résistance à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique (Ciancia & Cerezo 1993). Cette stabilité à l'hydrolyse s'explique par les effets inducteurs et conformationnels du groupement carboxyle en C-5 (Timell et al. 1965). Martinez et al, ont étudié les cinétiques d'hydrolyse du tourteau de betterave à sucre, riche en pectines (Martínez et al. 2010). Ces auteurs ont montré des tendances comparables avec une forte sensibilité à l'hydrolyse des arabinanes et une hydrolyse régulière des galacturonanes avec la sévérité.

3.1.4. DISTRIBUTION DES ETMS

L'effet des conditions d'explosion à la vapeur sur le devenir des ETMs a été évalué. La figure 54 présente les taux d'ETMs (Cd, Zn, Mn) dans les pâtes cellulosiques après explosion à la vapeur. Les taux sont déterminés par ICP-AES après une minéralisation avec de l'acide nitrique. La figure 54 montre que le taux de Cd dans la pâte est globalement stable en fonction de la sévérité. Le taux de Cd résiduel dans les pâtes cellulosiques est de l'ordre de 50 %.

Concernant le manganèse, le taux résiduel dans la pâte diminue avec la sévérité du traitement. Pour une sévérité de traitement de 4,44, le taux de manganèse résiduel dans la pâte est inférieur à 1 %. À partir de la sévérité 3,5, le taux de Mn résiduel est plus ou moins constant.

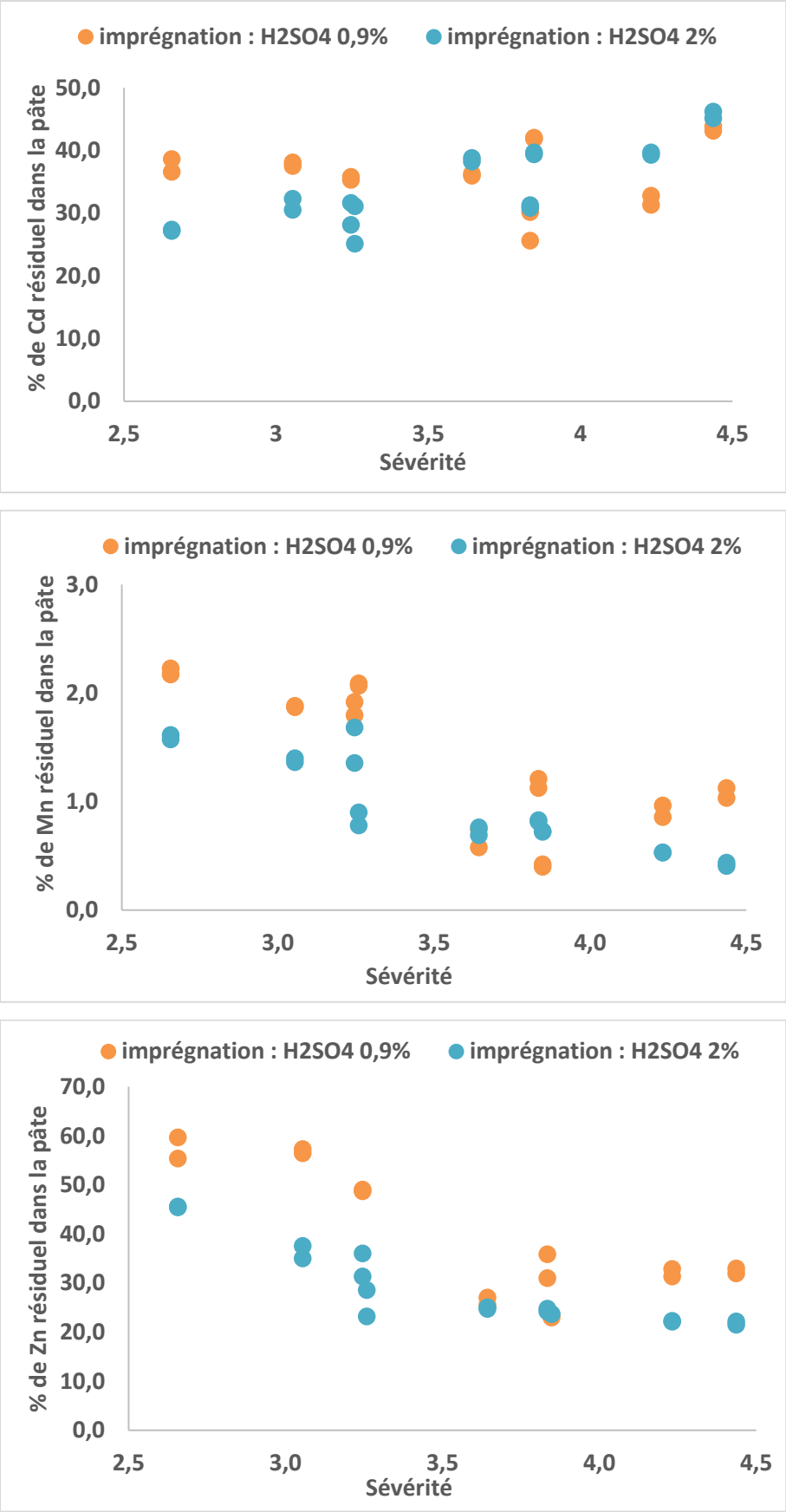


Figure 54. ETMs résiduels (Zn, Cd, Mn) dans la pâte (%) en fonction de la sévérité

Concernant le Zn, on observe une nette diminution de sa concentration dans la pâte en fonction de la sévérité et de la sévérité combinée. A sévérité élevée, environ 80 % du Zn contenu initialement dans la matière est extraite en phase aqueuse. Comme on a pu le constater également sur le traitement des échantillons de saule (voir chapitre III), le Zn est facilement extrait par explosion à la vapeur. On peut donc conclure que le prétraitement retenu semble être efficace pour détoxifier la matière et solubiliser une grande partie des ETMs qu'elle contient. En revanche, pour le Cd les résultats montrent une efficacité d'extraction plus faible avec des rendements d'environ 50 %.

3.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE ET FERMENTATION

3.2.1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

L'hydrolyse enzymatique de résidus solides issus du prétraitement de *Noccaea* a été étudiée en présence de cellulases de *Trichoderma Reesei* pendant 72 heures à 50 °C. Les cinétiques d'hydrolyse de trois pâtes cellulosiques récupérées après des traitements par explosion à la vapeur réalisés à trois températures différentes et pour le même temps de séjour (tableau 22) avec une imprégnation à 2 % H_2SO_4 sont présentées dans la figure 55.

Tableau 22. Conditions de traitement des pâtes cellulosiques choisies pour l'hydrolyse enzymatique

Essai	Température (°C)	Temps (min)	Sévérité
1	180	2	2,7
4	200	2	3,2
7	220	2	4,2

On constate d'après la figure 55 que les cinétiques d'hydrolyse de la cellulose en glucose des trois substrats sont proches : on observe une cinétique d'hydrolyse rapide durant les premières heures d'incubation. Par contre un plateau de conversion est atteint au bout de 30 h d'hydrolyse, dans les trois milieux. Le rendement maximal d'environ 60 % est obtenu.

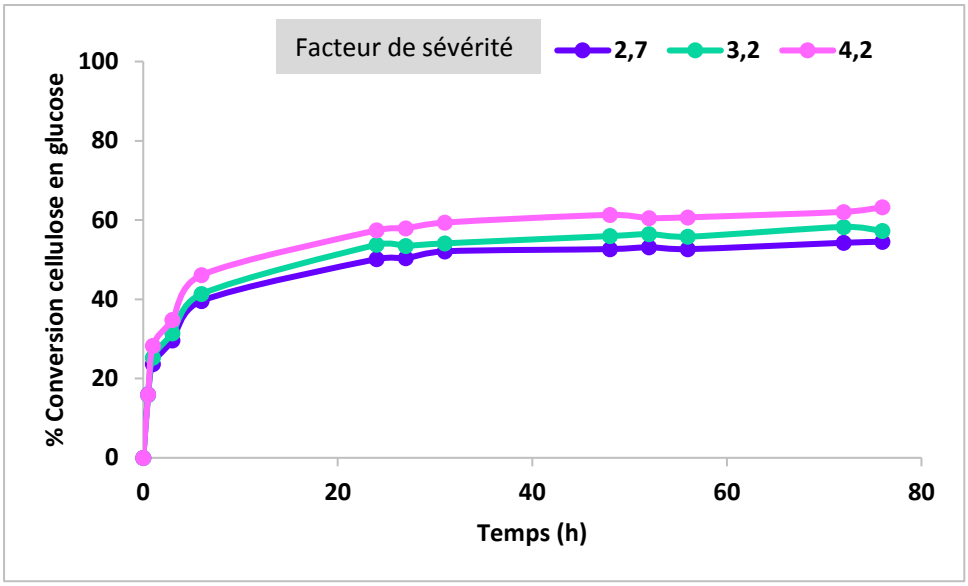


Figure 55. Cinétique d'hydrolyse enzymatique des trois pâtes de Noccaea avec imprégnation à 0,9 % acide sulfurique

On observe également dans la figure 55 une augmentation des rendements de conversion cellulose-glucose avec la température du prétraitement préalable, la conversion maximale étant obtenue pour le prétraitement effectué avec une sévérité de 4,2 (220 °C – 2 min). Cette observation est en accord avec des études antérieures concernant l'hydrolysabilité enzymatique de pâtes cellulosiques explosées à la vapeur. Selon (Yu et al. 2010), les températures inférieures à 180°C donnent généralement de faibles rendements en glucose par hydrolyse enzymatique de la paille de riz. Selon Cybulska et al (Cybulska et al. 2012), des températures supérieures à 200°C semblent donner des rendements plus importants en glucose par hydrolyse enzymatique, lorsque le traitement est appliqué sur une herbacée. Une sévérité de traitement plus élevée favorise la digestibilité de la cellulose. Cette différence de réactivité vis-à-vis des enzymes pourrait dépendre de plusieurs facteurs comme la cristallinité de la cellulose, la surface spécifique de contact, le degré de polymérisation de la cellulose ainsi que la teneur en lignine (Sun & Cheng 2002). L'hydrolyse de la cellulose se déroule en trois étapes, d'abord le contact de l'enzyme à la cellulose, ensuite l'hydrolyse de la cellulose par les enzymes cellulolytiques, en commençant par les régions amorphes qui sont plus accessibles, contrairement aux régions cristallines et enfin l'hydrolyse du cellobiose pour libérer les monomères de glucose (Alvira et al. 2010). Concernant les ETMs, on remarque également que leur présence dans le substrat semble ne pas affecter les rendements en hydrolyse, même en présence du Cd, qui est connu pour inhiber l'activité des enzymes (Geiger

et al. 1998; Sami & Shakoori 2011)

3.2.2. FERMENTATION

Une étude préliminaire a été menée pour étudier la fermentabilité des hydrolysats issus de *Noccaea*. Comme expliqué précédemment, compte tenu des compositions complexes des hydrolysats (teneurs faibles en glucose mais élevées en xylose et acides uroniques) un test de fermentation par la bactérie *C. acetobutylicum* a été envisagée, en raison de sa capacité à fermenter différents types de monosaccharides.

Les essais de fermentation ont été menés sur l'ensemble des hydrolysats obtenus par les procédés de prétraitement et d'hydrolyse enzymatique. Ainsi, chacun des hydrolysats isolés après réactions enzymatiques (§ 2.1) a été mélangé aux filtrats issus de l'imprégnation acide et à celui de la phase liquide issue de l'explosion à la vapeur. La concentration finale en sucres totaux dans les mélanges était d'environ 30 $g.L^{-1}$. La fermentation a été réalisée à 37 °C pendant 24 h en présence de *C. acetobutylicum*. Un témoin contenant une solution de glucose (30 $g.L^{-1}$) a également été étudié dans les mêmes conditions. Trois prélèvements ont été effectués : (1) initial, juste après l'ajout des bactéries, (2) intermédiaire, après 12 h et (3) final, après 24 h de fermentation.

La figure 56 présentée ci-dessous donne l'évolution des concentrations en éthanol, acide acétique, acide butyrique, butanol et acétone. On constate que les trois hydrolysats issus de *Noccaea* sont fermentescibles avec une production de trois produits majoritaires (acide acétique, acide butyrique et acétone) significatifs d'un métabolisme de type ABE. Comparé au témoin contenant du glucose, les concentrations en produits de fermentation sont supérieures. Ce résultat est prometteur puisqu'il semble attester de la fermentabilité des hydrolysats de *Noccaea*.

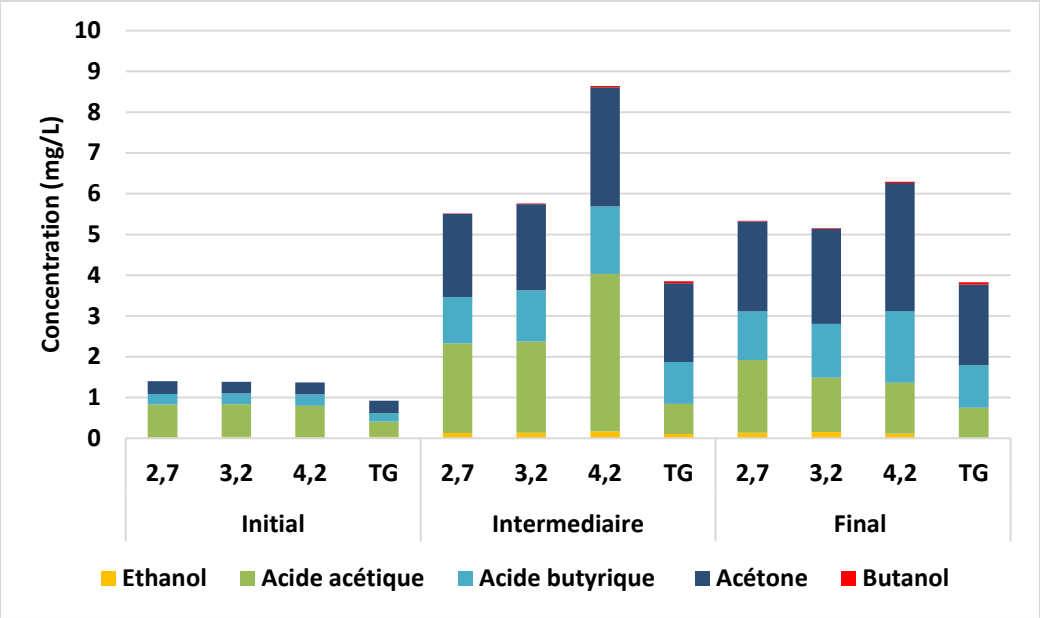


Figure 56. Produits obtenus de la fermentation ABE des hydrolysats de Noccaea

Cependant, il est à souligner que les concentrations des produits obtenus sont faibles par rapport à la concentration en substrat initial (environ 30 $g.L^{-1}$). Ces faibles concentrations pourraient être dues à des contaminations extérieures par de l'oxygène lors des prélèvements. La fermentation étant strictement anaérobie, la présence d'oxygène peut affecter négativement les conversions. Paradoxalement, les fermentations en anaérobiose sont plus difficiles à contrôler lorsque les volumes sont faibles (ici 60 mL).

On peut donc conclure de ces premiers essais de fermentation que :

- Les hydrolysats issus de *Noccaea* après explosion à la vapeur et hydrolyse enzymatique semblent fermentescibles par une fermentation ABE ;
- La présence d'ETMs dans le milieu, pourrait ne pas affecter la fermentation (en comparaison avec le témoin glucose qui n'est pas contaminé) ;
- Une optimisation des conditions de fermentation par *C. acetobutylicum* est nécessaire dans le cadre d'une valorisation de *Noccaea*, pour la production de solvant et de molécules plateformes.

4. CONCLUSION DU CHAPITRE

Dans ce chapitre nous avons exploré pour la première fois des pistes de valorisation en bioraffinerie de la biomasse produite par *Noccaea*, une plante hyperaccumulatrice en ETMs, utilisée en phytoremédiation. *Noccaea* contient des quantités relativement importantes en pectines (env. 16 %), qui sont extractibles en présence d'oxalate d'ammonium. Les caractéristiques des extraits semblent comparables à celles d'autres sources de pectines. Ces premiers résultats ouvrent donc des perspectives intéressantes pour la valorisation de cette plante par la production d'un biopolymère d'intérêt industriel. Il est cependant à souligner que les concentrations importantes en ETMs contenus dans ces extraits apparaissent comme incompatibles avec une utilisation dans le domaine de l'agroalimentaire.

Une piste de valorisation par la production par voie biotechnologique de biocarburant et molécules plateforme a également été envisagée. Un prétraitement par explosion à la vapeur suivi d'une hydrolyse par des cellulases conduit à des solutions de sucres dont la fermentabilité a été testé. Même si cette étape de fermentation est à optimiser, cette étude a montré la faisabilité de cette démarche pour la production de solvants et de biocarburants.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La décontamination des sols pollués aux ETMs est devenue une priorité à l'échelle de la planète. En effet, des hectares de sols agricoles sont classés et écartés car ils sont devenus impropres à l'agriculture. La technique de phytoremédiation existe depuis bien longtemps, elle est de plus en plus utilisée ces dernières années dans la réhabilitation des sols. Cette méthode conduit à la production en quantités importantes de biomasses contaminées.

Le but de notre travail est de proposer des voies de valorisation, et d'évaluer la possibilité de conversion de biomasses issues des phytotechnologies, dans le cadre de la réhabilitation de friches industrielles et des sols contaminés par des ETMs. Deux biomasses ont été utilisées afin de répondre à cette problématique. Ce sont des espèces très souvent utilisées en phytoremédiation : le saule (*Salix viminalis*) et *Noccaea caerulescens* comme espèce hyperaccumulatrice des ETMs. Une caractérisation chimique des matières à valoriser a été réalisée au préalable. Concernant *Noccaea*, l'étude révèle une différence importante dans la composition chimique comparée aux autres matières lignocellulosiques. *Noccaea* est pauvre en lignine, mais beaucoup plus riche en extractibles en raison de la présence de pectines.

Dans un souci de développer des procédés de traitement plus propres, le prétraitement d'explosion à la vapeur a été choisi pour traiter les deux matières à valoriser. Les conditions de prétraitement ont été fixées en se basant sur la littérature. Le traitement des échantillons de saule montre qu'une purification de la matière est possible via le prétraitement par explosion vapeur, de plus il permet de récupérer en même temps jusqu'à 70 % de pâtes cellulosiques riches en glucose utilisables comme substrat pour une hydrolyse enzymatique. Un taux de conversion de la cellulose en glucose d'environ 80 % a été établi. La fermentation des hydrolysats de saule a également été réalisée avec succès. D'après nos résultats, l'effet des ETMs présents (Zn, Mn, Cd) sur les étapes biotechnologiques (hydrolyse et fermentation) est faible voire nul. Le prétraitement par explosion vapeur de *Noccaea* a permis également de purifier la matière. Cependant, les rendements en pâtes cellulosiques après traitement sont faibles (<30 %) et ce même à basse température (180 °C), en raison de la composition chimique particulière de la plante (teneur en lignine faible, teneurs en

extractibles dont pectines élevées). La conversion enzymatique de la cellulose des pâtes cellulosiques en glucose de *Noccaea* est possible avec des taux de conversion atteignant les 60 %, après 24 h d'incubation. L'évaluation et l'extraction de pectines montrent que *Noccaea* est riche en acide polygalacturonique (jusqu'à 16 % matière sèche). La caractérisation de cette fraction, indique qu'elle est comparable avec les pectines isolées d'écorces de fruits avec des poids moléculaires très élevés.

Finalement ces travaux montrent qu'une valorisation de biomasses issues de phytotechnologie pourrait être possible en bioraffinerie. La faisabilité de cette approche a été évaluée dans cette étude, surtout dans l'étape de bioconversion des pâtes cellulosiques en éthanol, montrant que la présence des ETMs dans les substrats et les hydrolysats n'a pas d'effet détectable sur les différents procédés. *Noccaea* présente l'avantage d'être très pauvre en lignine et donc ne nécessitant pas des conditions de prétraitement sévères. Ainsi, des températures de l'ordre de 180°C pour l'étape d'explosion à la vapeur sont suffisantes

L'ensemble des résultats obtenus montrent qu'il est envisageable de combiner réhabilitation et valorisation des sols et valorisation en bioraffinerie des matières végétales qui y sont produites.

Les travaux de cette thèse ont permis de répondre en partie à certains questionnements concernant la valorisation des biomasses végétales issues des phytotechnologies. Comme mentionné en introduction, la matière végétale contaminée produite par les phytotechnologies constitue un frein à ces approches considérées comme respectueuses de l'environnement. Le stockage de cette biomasse ou une valorisation non contrôlée peut en effet provoquer de nouvelles contaminations. Une solution originale pour éviter ces problèmes est donc proposée dans ce travail.

D'un point de vue économique et environnemental, l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices serait intéressante. En effet, la plupart des sols agricoles souffrent de contamination aux ETMs, due à l'utilisation intensive de pesticides et de fertilisants souvent riches en Cd, qui s'accumule d'année en année dans le sol. Pour remédier à cette problématique il serait intéressant d'utiliser *Noccaea* en rotation sur les sols agricoles, après chaque culture. En plus de son pouvoir accumulateur qui a été démontré dans de nombreux travaux (Assunção et al. 2003; Cosio et al. 2005) que *Noccaea* est également connue pour sa capacité d'adaptation pour pousser même sur des sols très pauvres en nutriments.

L'utilisation du saule en taillis à courte rotation est également intéressante, pour sa croissance rapide permettant de produire des quantités importantes de biomasses valorisables en bioraffinerie, mais également pour sa capacité à croitre sur des sols délaissés et contaminés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abang Zaidel, D.N., Hamidon, N.H. & Mat Zahir, N., 2017. Extraction and characterization of pectin from sweet potato (Ipomoea batatas) peels using alkaline extraction method. *Acta Horticulturae*, 1152(March), pp.211–217.

Aditiya, H.B. et al., 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, pp.631–653.

Agbor, V.B. et al., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.675–685.

Agnihotri, S. et al., 2015. Ethanol organosolv pretreatment of softwood (Picea abies) and sugarcane bagasse for biofuel and biorefinery applications. In *Wood Science and Technology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 881–896.

Ahmed, E.A.R. & Labavitch, J.M., 1978. A Simplified Method for Accurate Determination of Cell Wall Uronide Content. *Journal of Food Biochemistry*, 1(1973), pp.361–365.

Akrida-Demertzi, K. & Koutinas, A.A., 1992. *Effect of copper, potassium, sodium and calcium on alcoholic fermentation of raisin extract and sucrose solution*.

Akrida-Demertzi, K., Demertzis, P.G. & Koutinas, A.A., 1988. pH and trace-elements content in raisin extract industrial-scale alcoholic fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(7), pp.666–669.

Albergaria, H. & Arneborg, N., 2016. Dominance of Saccharomyces cerevisiae in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), pp.2035–2046.

Albuquerque, P.B.S. et al., 2016. Approaches in biotechnological applications of natural polymers. *AIMS Molecular Science*, 3(3), pp.386–425.

Alfenore, S. et al., 2004. Aeration strategy: A need for very high ethanol performance in Saccharomyces cerevisiae fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(5), pp.537–542.

Algreen, M., Trapp, S. & Rein, A., 2014. Phytoscreening and phytoextraction of heavy metals at Danish polluted sites using willow and poplar trees. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(15), pp.8992–9001.

Ali, H., Khan, E. & Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), pp.869–881.

Alvira, P. et al., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), pp.4851–4861.

Angelova, V. et al., 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19(3), pp.197–205.

Anon, 2018a. Tela-botanica. *Salix viminalis L. Osier blanc*. Available at: https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-60033-synthese.

Anon, 2018b. Tela-Botanica. *Noccaea caerulescens subsp. virens (Jord.) Kerguélen*. Available at: https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-44168-synthese.

Aryal, M. & Liakopoulou-Kyriakides, M., 2015. Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1), p.26.

Assunção, A.G.L., Schat, H. & Aarts, M.G.M., 2003. Thlaspi caerulescens, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159(2), pp.351–360.

Augustina, P. & Adriana, M., 2014. Phytoremediation Using Medicinal Plants - a Review. *Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 44, pp.186–193.

B

Babbar, N. et al., 2016. Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), pp.594–606.

Bajpai, P., 2017. Lignin. In *Carbon Fibre from Lignin*. Springer Briefs in materials, pp. 11–15.

Baker, A.J.M. et al., 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*, 11(1–4), pp.41–49.

Baker, A.J.M. & Brooks, R.R., 1989. Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements - A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery*, 1(2), pp.81–126.

Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), pp.858–875.

Ballesteros, I. et al., 2006. Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129(132), pp.496–508.

Baltrėnas, P. & Čepanko, V., 2009. Accumulation of heavy metals in short-rotation willow. *Ekologija*, 55(2), pp.153–163.

Bani, A. et al., 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of Alyssum murale on an ultramafic site (Albania). *Plant and Soil*, 293(1–2), pp.79–89.

Baral, N.R. & Shah, A., 2014. Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), pp.9151–9172.

Barbaroux, R. et al., 2011. A new method for obtaining nickel metal from the hyperaccumulator plant Alyssum murale. *Separation and Purification Technology*, 83(1), pp.57–65.

Bareen, F.-, 2012. Chelate Assisted Phytoextraction Using Oilseed Brassicas. In N.A. Anjum et al, ed. *The Plant Family Brassicaceae: Contribution Towards Phytoremediation*. Springer Science & Business Media, pp. 289–311.

Basic, N. et al., 2006. Cadmium hyperaccumulation and genetic differentiation of Thlaspi caerulescens populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(9), pp.667–677.

Bayar, N., Friji, M. & Kammoun, R., 2018. Optimization of enzymatic extraction of pectin from Opuntia ficus indica cladodes after mucilage removal. *Food Chemistry*, 241(August 2017), pp.127–134.

Bhadana, B. & Chauhan, M., 2016. Bioethanol Production Using Saccharomyces cerevisiae

with Different Perspectives: Substrates, Growth Variables, Inhibitor Reduction and Immobilization. *Fermentation Technology*, 5(2), pp.2–5.

Bhattacharya, S.K. et al., 1995. Toxic effects of cadmium on methanogenic systems. *Water ressources*, 29(10), pp.2339–2345.

Biswas, R. & Ahring, B.K., 2016. Fractionation of Lignocellulosic Biomass Materials With Wet Explosion Pretreatment. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Elsevier Inc., pp. 369–384.

Blaylock, M.J., 2000. Field Demonstrations of Phytoremediation of Lead-Contaminated Soils. In N. Terry & G. Bañuelos, eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis publisher, p. 381.

Brasch, D.J. & Free, K.W., 1965. *Prehydrolysis-kraft pulping of Pinus radiata grown in New Zealand*,

Brereton, N.J. et al., 2011. Investigation of tension wood formation and 2,6-dichlorbenzonitrile application in SRC Willow composition and saccharification. *Biotechnol & Bioengineering*, 4(13), pp.1–9.

Brexó, R.P. & Sant'Ana, A.S., 2017. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73(November 2016), pp.423–434.

Briens, C., Piskorz, J. & Berruti, F., 2008. Biomass Valorization for Fuel and Chemicals Production – A Review. *International journal of chemical reactor engineering*, 6, pp.1–51.

Brodeur, G. et al., 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Research*, 2011(1).

C

Caffall, K.H. & Mohnen, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), pp.1879–1900.

Cara, C. et al., 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87(6), pp.692–700.

Chang, F.C. et al., 2013. Factors affecting chelating extraction of Cr, Cu, and As from CCA-treated wood. *Journal of Environmental Management*, 122, pp.42–46.

Charubin, K. et al., 2018. Engineering Clostridium Organisms as Microbial Cell-Factories: Challenges & Opportunities. *Metabolic Engineering*, (June).

Chen, H., 2014. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Springer Science & Business Media, pp. 25–71.

Chen, W.H. et al., 2011. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102(3), pp.2916–2924.

Chen, Y., Cheng, J.J. & Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99, pp.4044–4064.

Chiaramonti, D. et al., 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, 46, pp.25–35.

Choi, Y.S., Ahn, B.J. & Kim, G.H., 2012. Extraction of chromium, copper, and arsenic from CCA-treated wood by using wood vinegar. *Bioresource Technology*, 120, pp.328–331.

Chojnacka, K. et al., 2005. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Science of the Total Environment*, 337(1–3), pp.175–182.

Chornet, E. & Overend, R.P., 1988. Phenomenological kinetics and reaction engineering. Aspects of steam/aqueous treatments. In *In: Proceedings of the International workshop on steam explosion technique: fundamentals and industrial applications*. Milan, Italy, pp. 21–58.

Chum, H.L. et al., 1990. Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24(1–14).

Ciancia, M. & Cerezo, A.S., 1993. Autohydrolysis of polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 45, pp.54–61.

Clarkson, T.W., 1987. Metal toxicity in the central nervous system. *Environmental Health Perspectives*, 75(15), pp.59–64.

Clausen, C.A. & Smith, R.L., 1998. Removal of CCA from treated wood by oxalic acid extraction, steam explosion, and bacterial fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(3–4), pp.251–257.

Cobbett, C., 2003. Heavy metals and plants - Model systems and hyperaccumulators. *New Phytologist*, 159(2), pp.289–293.

Cosio, C. et al., 2005. Distribution of cadmium in leaves of Thlaspi caerulescens. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), pp.765–775.

Cunningham, S.D. & Berti, W.R., 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: An overview. *In Vitro Cell. Dev. Biol*, 29(4), pp.207–212.

Cybulska, I. et al., 2012. Catalyzed modified clean fractionation of prairie cordgrass integrated with hydrothermal post-treatment. *Biomass and Bioenergy*, 46, pp.389–401.

Cybulska, I., Brudecki, G. & Lei, H., 2013. Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In T. Gu, ed. *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. USA: Springer, pp. 87–106.

D

DalCorso, G., 2012. Heavy Metal Toxicity in Plants. In A. Furini, ed. *Plants and Heavy Metals*. Springer, pp. 1–25.

Debela, F., Thring, R.W. & Arocena, J.M., 2012. Immobilization of heavy metals by co-pyrolysis of contaminated soil with woody biomass. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(3), pp.1161–1170.

Delplanque, M. et al., 2013. Combustion of Salix used for phytoextraction: The fate of metals and viability of the processes. *Biomass and Bioenergy*, 49, pp.160–170.

Demirbas, A. & Demirbas, F., 2010. *Algae energy* A. Demirbas & F. Demirbas, eds., Springer.

Deng, T.H.B. et al., 2016. Nickel translocation via the phloem in the hyperaccumulator Noccaea caerulescens (Brassicaceae). *Plant and Soil*, 404(1–2), pp.35–45.

Dickinson, N.M. & Pulford, I.D., 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice Salix: The evidence trail. *Environment International*, 31(4), pp.609–613.

Dietrich, R.U. et al., 2018. Cost calculations for three different approaches of biofuel

production using biomass, electricity and CO2. *Biomass and Bioenergy*, 111, pp.165–173.
Dinh, N.T. et al., 2015. Accumulation and distribution of zinc in the leaves and roots of the hyperaccumulator Noccaea caerulescens. *Environmental and Experimental Botany*, 110, pp.85–95.
Duff, S.J.B. & Murray, W.D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 55(1), pp.1–33.
Duffus, J.H., 2002. "HEAVY METALS" —A MEANINGLESS TERM? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 74(5), pp.793–807.
Duque, A. et al., 2016. Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Elsevier Inc., p. 676.

E

El Hage, R., 2010. *Prétraitement du Miscanthus x giganteus. Vers une valorisation optimale de la biomasse lignocellulosique.* Université de Lorraine.
Escande, V., Olszewski, T.K. & Grison, C., 2014. Preparation of ecological catalysts derived from Zn hyperaccumulating plants and their catalytic activity in Diels-Alder reaction. *Comptes Rendus Chimie*, 17(7), pp.731–737.
Evangelou, M.W.H. et al., 2012. Biomass Production on Trace Element–Contaminated Land: A Review. *Environmental Engineering Science*, 29(9), pp.823–839.

F

Faik, A., 2013. "Plant Cell Wall Structure-Pretreatment" the Critical Relationship in Biomass Conversion to Fermentable Sugars. In T. Gu, ed. *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. USA: Springer, pp. 1–37.
Favas, P.J.C. et al., 2014. Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, (3), pp.485–517.
Figala, J. et al., 2015. Giant miscanthus (Miscantus × Giganteus Greef et Deu.) - A promising plant for soil remediation: A Mini Review. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 63(6), pp.2241–2246.
Flora, G., Gupta, D. & Tiwari, A., 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), pp.47–58.
Frérot, H. et al., 2005. Zinc tolerance and hyperaccumulation in F1 and F2 offspring from intra and interecotype crosses of Thlaspi caerulescens. *New Phytologist*, 165(1), pp.111–119.

G

GBIF, 2014. Global Biodiversity Information Facility. *Last assessed*. Available at: http://www.gbif.org/.

Geddes, C.C. et al., 2011. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant Escherichia coli strain MM160. *Bioresource Technology*, 102(3), pp.2702–2711.

Geiger, G. et al., 1998. The effect of copper on the activity of cellulases in the presence of monmorillonite and Al-montmorillonite. , 30(12).

Gismatulina, Y.A. & Budaeva, V. V., 2017. Chemical composition of five Miscanthus sinensis harvests and nitric-acid cellulose therefrom. *Industrial Crops and Products*, 109(May), pp.227–232.

Gleba, D. et al., 1999. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), pp.5973–5977.

Gong, X. et al., 2018. Pyrolysis and reutilization of plant residues after phytoremediation of heavy metals contaminated sediments: For heavy metals stabilization and dye adsorption. *Bioresource Technology*, 253(November 2017), pp.64–71.

Gonneau, C., 2014. *Distribution, écologie et évolution de l'hyperaccumulation des éléments en traces par Noccaea caerulescens*. Université de Lorraine.

Goswami, S. & Das, S., 2015. A Study on Cadmium Phytoremediation Potential of Indian Mustard, Brassica juncea. *International Journal of Phytoremediation*, 17(6), pp.583–588.

Green, E.M., 2011. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), pp.337–343.

Greger, M. & Landberg, T., 1999. Use of willow in phytoexfraction. *International Journal of Phytoremediation*, 1(2), pp.115–123.

Gumisiriza, R. et al., 2017. Biomass waste-to-energy valorisation technologies: A review case for banana processing in Uganda. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), pp.1–29.

H

Hagemeyer, J. et al., 1992. Are there seasonal variations of trace element concentrations (Cd, Pb, Zn) in wood of Fagus trees in Germany ? *Vegetatio*, 101, pp.55–63.

Halimaa, P. et al., 2014. Comparative transcriptome analysis of the metal hyperaccumulator Noccaea caerulescens. *Frontiers in Plant Science*, 5, pp.1–7.

Han, S.H. et al., 2013. Biobutanol production from 2-year-old willow biomass by acid hydrolysis and acetone-butanol-ethanol fermentation. *Energy*, 61, pp.13–17.

Han, Z. et al., 2018. Pyrolysis Characteristics of Biomass Impregnated with Cadmium, Copper and Lead: Influence and Distribution. *Waste Biomass Valorisation*, 9(7), pp.1223–1230.

Harmsen, P. et al., 2010. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. *Food and Biobased Research*, pp.1–49.

Hart, P.W. & Rudie, A.W., 2012. Mineral Scale Management. In *The Bleaching of Pulp*. TAPPI PRESS, pp. 175–215.

Hazotte, C. et al., 2017. A novel process to recover cadmium and zinc from the hyperaccumulator plant Noccaea caerulescens. *Hydrometallurgy*, 174(January), pp.56–65.

Hendriks, A.T.W.M. & Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), pp.10–18.

Hilz, H., 2007. *Characterisation of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants*. Wageningen University.

Hou, X. et al., 2013. Engineering Clostridium acetobutylicum for alcohol production. *Journal of Biotechnology*, 166(1–2), pp.25–33.

Hu, F., Jung, S. & Ragauskas, A., 2012. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 117, pp.7–12.

Hu, G., Heitmann, J.A. & Rojas, O.J., 2008. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *BioResources*, 3(1), pp.270–294.

Hu, Z. & Ragauskas, A.J., 2011. Hydrothermal pretreatment of switchgrass. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50(8), pp.4225–4230.

Huijgen, W.J.J. et al., 2011. Catalytic organosolv fractionation of willow wood and wheat straw as pretreatment for enzymatic cellulose hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(11), pp.1428–1438.

Huijgen, W.J.J. et al., 2014. Characteristics of wheat straw lignins from ethanol-based organosolv treatment. *Industrial Crops and Products*, 59, pp.85–95.

Huijgen, W.J.J., den Laan, R.R. & Reith, J.H., 2008. Modified organosolv as a fractionation process of lignocellulosic biomass for co-production of fuels and chemicals. *16th Europian Biomass Conference and Exibition, Spain*, pp.2–6.

Humphrey, A.E. & Lee, S.E., 1992. Industrial Fermentation: Principles, Processes, and Products. In J. A. Kent, ed. *Riegel's Handbook of Industrial Chemistry*. pp. 916–986.

Hussin, M.H., 2014. *Extraction, modification et caracterisation de lignine de frondes de palmier a huile pour la production d'inhibiteurs de corrosion dans solution d'acidique*. Université de Lorraine.

I

Ioelovich, M., 2015. Methods for Determination of Chemical Composition of Plant. *Jounal SITA*, 17(4), pp.208–214.

J

Jacobs, A., De Brabanderea, L., et al., 2018a. Phytoextraction of Cd and Zn with Noccaea caerulescens for urban soil remediation: influence of nitrogen fertilization and planting density. *Ecological Engineering*, 116, pp.178–187.

Jacobs, A. et al., 2017. Phytoremediation of urban soils contaminated with trace metals using Noccaea caerulescens: comparing non-metallicolous populations to the metallicolous 'Ganges' in field trials. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), pp.8176–8188.

Jacobs, A., Drouet, T. & Noret, N., 2018b. Field Evaluation of Cultural Cycles for Improved Cadmium and Zinc Phytoextraction with Noccaea caerulescens. *Plant and Soil*, 430(1–2), pp.381–394.

Jacquet, N. et al., 2015. Application of Steam Explosion as Pretreatment on Lignocellulosic Material: A Review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 54(10), pp.2593–2598.

Jacquet, N. et al., 2010. La steam explosion : Application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 14(SPEC. ISSUE 2), pp.561–566.

Juneja, A., Ceballos, R.M. & Murthy, G.S., 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*, 6(9), pp.4607–4638.

K

Kacuráková, M. et al., 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), pp.195–203.

Kalapathy, U. & Proctor, A., 2001. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chemistry*, 73(4), pp.393–396.

Kan, T., Strezov, V. & Evans, T.J., 2016. Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, pp.126–1140.

Kartal, S.N. & Kose, C., 2003. Remediation of CCA-C treated wood using chelating agents. *Holz als Roh - und Werkstoff*, 61(5), pp.382–387.

Kataria, R. et al., 2017. Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 106, pp.48–58.

Keeling, S.M. et al., 2003. Nickel and Cobalt Phytoextraction by the Hyperaccumulator Berkheya coddii: Implication for polymetallic phytomining and phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 5(3), pp.235–244.

Keller, C. et al., 2005. Thermal treatment of metal-enriched biomass produced from heavy metal phytoextraction. *Environmental Science and Technology*, 39(9), pp.3359–3367.

Kobayashi, F. et al., 2005. Determination of Cu, Pb, Fe, and Zn in plant component polymers of a hyperaccumulating plant. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 21(12), pp.1553–6.

Koch, M., Mummenhoff, K. & Hurka, H., 1998. Systematics and evolutionary history of heavy metal tolerant Thlaspi caerulescens in Western Europe: evidence from genetic studies based on isozyme analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, pp.823–838.

Koubala, B.B. et al., 2008. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "Améliorée" and "Mango" mango peels. *Food*

Hydrocolloids, 22(7), pp.1345–1351.
Krämer, U., 2010. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp.517–534.
Kvesitadze, G. et al., 2006. *Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: Basis of phytoremediation*, Springer.

L

Lai, C. et al., 2014. Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology*, 163, pp.320–327.
Lapierre, C., 2010. *Les lignines , des polymères uniques au monde. Communication présentée lors de la séance de l'académie de l'agriculture, Paris*, France.
Lasat, M.M., 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/ metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2, pp.5–25.
Leclere, L., Cutsem, P. Van & Michiels, C., 2013. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontiers in Pharmacology*, 4 OCT(October).
Lefsih, K. et al., 2017. Pectin from Opuntia ficus indica: Optimization of microwave-assisted extraction and preliminary characterization. *Food Chemistry*, 221(December), pp.91–99.
Lehmuskallio, J., 2018. Alpine Pennycress "Thlaspi caerulescens." *Nature Gate*.
Li, M.-F. et al., 2012. Organosolv Fractionation of Lignocelluloses for Fuels, Chemicals and Materials: A Biorefinery Processing Perspective. In C. Baskar, S. Baskar, & R. S. Dhillon, eds. *Biomass conversion*. Springer-Verlag, pp. 341–380.
Li, S., Qi, D. & Huang, J., 2018. Natural cellulose based self-assembly towards designed functionalities. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 35, pp.1–8.
Li, Y.-M. et al., 2003. Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: Economic and technical considerations. *Plant and Soil*, 249(1), pp.107–115.
Lievens, C. et al., 2009. Fast pyrolysis of heavy metal contaminated willow: Influence of the plant part. *Fuel*, 88(8), pp.1417–1425.
Lievens, C. et al., 2008. Study of the potential valorisation of heavy metal contaminated biomass via phytoremediation by fast pyrolysis: Part I. Influence of temperature, biomass species and solid heat carrier on the behaviour of heavy metals. *Fuel*, 87(10–11), pp.1894–1905.
Linger, P., Ostwald, A. & Haensler, J., 2005. Cannabis sativa L . growing on heavy metal contaminated soil : growth , cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Pantarum*, 49(4), pp.567–576.
Liu, M.Q. et al., 2008. Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens? *Chemosphere*, 71(7), pp.1276–1283.
Liu, Z.L., 2006. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(1), pp.27–36.
Lütke-Eversloh, T. & Bahl, H., 2011. Metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum: Recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5), pp.634–647.

Magee, R.J. & Kosaric, N., 1985. Bioconversion of Hemicellulosics. *Agricultural Feedstock and Waste Treatment and Engineering*, 32, pp.61–93.

M

Mahmood, A., Rashid, S. & Malik, R.N., 2013. Determination of toxic heavy metals in indigenous medicinal plants used in Rawalpindi and Islamabad cities, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1), pp.158–164.

Manara, A., 2012. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. In A. Furini, ed. *Plants and Heavy Metals*. Springer, p. 96.

Marques, A.P.G.C., Rangel, A.O.S.S. & Castro, P.M.L., 2009. *Remediation of heavy metal contaminated soils: Phytoremediation as a potentially promising clean-Up technology*,

Martínez, M. et al., 2010. Kinetic assessment on the autohydrolysis of pectin-rich by-products. *Chemical Engineering Journal*, 162(2), pp.480–486.

May, C.D., 1990. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12(1), pp.79–99.

May, C.D., 1992. Pectins. In A. IMESON, ed. *Thickening and Gelling Agents for Food*. Springer Science & Business Media, p. 269.

McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technol*, 83(1), pp.37–46.

Meers, E. et al., 2007. Potential of five willow species (Salix spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany*, 60(1), pp.57–68.

Meerts, P. & Van Isacker, N., 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of Thlaspi caerulescens from continental Europe. *Plant Ecology*, 133(2), pp.221–231.

Mohamed, M.A. et al., 2013. Extraction of heavy metals from a contaminated soil by reusing chelating agent solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(3), pp.363–368.

Mohd Azhar, S.H. et al., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(February), pp.52–61.

Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), pp.266–277.

Monot, F. et al., 1982. Acetone and butanol production by Clostridium acetobutylicum in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6), pp.1318–1324.

Müller-Maatsch, J. et al., 2016. Pectin content and composition from different food waste streams in memory of Anna Surribas, scientist and friend. *Food Chemistry*, 201(January), pp.37–45.

Mussatto, S. & Teixeira, J., 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *applied Microbiology an Microbial Biotechnology*, 2, pp.897–907.

Mussatto, S.I. & Dragone, G.M., 2016. Chapter 1 - Biomass Pretreatment, Biorefineries, and Potential Products for a Bioeconomy Development BT - Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Elsevier Inc., pp. 1–22.

Nazaruddin, R. et al., 2013. Comparative chemical characteristics of hydrochloric acid- and ammonium oxalate-extracted pectin from roselle (Hibiscus sabdariffa L.) calyces. *International Food Research Journal*, 20(1), pp.281–284.

N

Nazaruddin, R. & Asmawati, 2011. Effect of ammonium oxalate and acetic acid at several extraction time and pH on some physicochemical properties of pectin from cocoa husks (Theobroma cacao). *African Journal of Food Science*, 5(5), pp.790–798.

Negro, M.J. et al., 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. In *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. pp. 87–100.

Ni, Y. & Sun, Z., 2009. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by Clostridium acetobutylicum in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(3), pp.415–423.

Nölling, J. et al., 2001. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium Clostridium acetobutylicum Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium Clostridium acetobutylicum. *Journal of Bacteriology*, 183(16), pp.a823–4838.

Nsanganwimana, F. et al., 2014. Suitability of Miscanthus species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *Journal of Environmental Management*, 143, pp.123–134.

Nussinovitch, A., 1997. Pectin. In *Hydrocolloid Applications Gum technology in the food and other industries*. Israel: Springer Science & Business Media, pp. 83–101.

Nzihou, A. & Stanmore, B., 2013. The fate of heavy metals during combustion and gasification of contaminated biomass-A brief review. *Journal of Hazardous Materials*, 256–257, pp.56–66.

O

Overend, R.P., Chornet, E. & Gascoigne, J.A., 1987. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 321(1561), pp.523–536.

Ovodov, Y.S., 2009. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(3), pp.269–284.

P

Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), pp.25–33.

Pan, X. et al., 2007. Effect of Organosolv Ethanol Pretreatment Variables on Physical Characteristics of Hybrid Poplar Substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(140), pp.367–377.

Patakova, P. et al., 2013. Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnology Advances*, 31(1), pp.58–67.

Pedersen, M. & Meyer, A.S., 2010. Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*, 27(6), pp.739–750.

Pejic, B. et al., 2009. Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions by short hemp fibers: Effect of chemical composition. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1), pp.146–153.

Pence, N.S. et al., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp.4956–4960.

Pereira, J. de C. et al., 2017. Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities. In *Enzyme Inhibitors and Activators*. pp. 139–165.

Pettersen, R.C., 1984. *The Chemical Composition of Wood*,pp. 57-126

Pielhop, T. et al., 2016. Steam explosion pretreatment of softwood: The effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), pp.1–13.

Potucek, F. & Milichovsky, M., 2011. Rapeseed Straw as a Possible Source of Non-Wood Fibre Materials. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(1–2), pp.23–28.

Prasad, M.N.V., 2003. Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(5), pp.686–700.

Prasad, S., Singh, A. & Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1), pp.1–39.

Q

Qureshi, N. & Maddox, I.S., 1992. Application of novel technology to the ABE fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 34–35(1), pp.441–448.

R

Ragauskas, A.J. et al., 2014. Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science*, 344(6185), pp.709–720.

Ralet, M.-C., Bonnin, E. & Thibault, J.-F., 2001. Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(1), pp.157–166.

Redgwell, R., Melton, L. & Brasch, D., 1992. Cell Wall Dissolution in Ripening Kiwifruit (Actinidia deliciosa) Solubilization of the Pectic Polymers. *Plant Physiology*, 98(1), pp.71–81.

Reeves, R.D. et al., 2001a. Distribution and metal-accumulating behavior of Thlaspi caerulescens and associated metallophytes in France. *International Journal of Phytoremediation*, 3(2), pp.145–172.

Reeves, R.D. et al., 2001b. Distribution and Metal-Accumulating Behavior of Thlaspi caerulescens and Associated Metallophytes in France. *International Journal of Phytoremediation*, 3(2), pp.145–172.

Reeves, R.D., Baker, A.J. & Brooks, R.R., 1995. Abnormal accumulation of trace metals by plants. *Mining Environmental Managment*, 3(3), pp.4–8.

Rezić, I., 2013. Cellulosic fibers - Biosorptive materials and indicators of heavy metals pollution. *Microchemical Journal*, 107, pp.63–69.

Robinson, B. et al., 2005. Solubility, Mobility, and Bioaccumulation of Trace Elements: Abiotic Processes in the Rhizosphere. In *Trace Elements in the Environment*. Taylor and Francis Group, p. 744.

Robinson, B.H. et al., 2009. The phytomanagement of trace elements in soil. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(4), pp.240–266.

Romaní, A. et al., 2011. Eucalyptus globulus wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresource Technology*, 102(10), pp.5896–5904.

Rowell, M.M., 2016. Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. In United States of America, p. 193.

Ryden, P. et al., 2014. Changes in the composition of the main polysaccharide groups of oil seed rape straw following steam explosion and saccharification. *Biomass and Bioenergy*, 61(0), pp.121–130.

Ryu, D.D.Y. & Mandels, M., 1980. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(2), pp.91–102.

S

Saad, R., 2017. *Agromine associant plantes hyperaccumulatrice de nickel et légumineuse, comme service écosystémique des sols ultramafiques*. Université de Lorraine et Université Libanaise.

Salt, D.E. et al., 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology*, 13(5), pp.468–474.

Sami, A.J. & Shakoori, A.R., 2011. Cellulase activity inhibition and growth retardation of associated bacterial strains of Aulacophora foviecollis by two glycosylated flavonoids isolated from Mangifera indica leaves. *journal of Medicinal Plants Research*, 5(2), pp.184–190.

Sannigrahi, P. & Ragauskas, A.J., 2013. Fundamentals of Biomass Pretreatment by Fractionation. In C. E.Wyman, ed. *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*. USA: John Wiley & Sons, pp. 201–222.

Santos, J.D.G. et al., 2013. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), pp.1997–2001.

Sayah, M.Y. et al., 2016. Yield, esterification degree and molecular weight evaluation of pectins isolated from orange and grapefruit peels under different conditions. *PLoS ONE*, 11(9), pp.1–16.

Schat, H. & Aarts, M.G.M., 2003. Model Species To Study Heavy Metal Hyperaccumulation in Plants. *New Phytologist*, (1992), pp.351–360.

Scheller, H.V. & Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp.263–289.

Schwartz, C., Echevarria, G. & Morel, J.L., 2003. Phytoextraction of cadmium with Thlaspi caerulescens. In *Plant and Soil*. pp. 27–35.

Sharma, A., Pareek, V. & Zhang, D., 2015. Biomass pyrolysis - A review of modelling, process parameters and catalytic studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, pp.1081–1096.

Sharma, R., 2012. Enzyme Inhibition: Mechanisms and Scope. In R. Sharma, ed. *Enzyme Inhibition and Bioapplications*. InTech, pp. 3–39.

Shin, W.E. & Rowell, R.M., 2005. Cadmium ion sorption onto lignocellulosic biosorbent modified by sulfonation: The origin of sorption capacity improvement. *Chemosphere*, 60(8), pp.1054–1061.

Siegel, F.R., 2002. *Environmental Geochemistry of Potentially Toxic Metals*, Washington, D. C.: Springer.

Silveira, M.H.L. et al., 2015. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. *ChemSusChem*, 8(20), pp.3366–3390.

Skrigan, A.I. et al., 1967. The chemical composition of the wood of some species of willow. *Chemistry of Natural Compounds*, 3, pp.328–330.

Sreekumar, S. et al., 2015. Production of an acetone-butanol-ethanol mixture from Clostridium acetobutylicum and its conversion to high-value biofuels. *Nature Protocols*, 10(3), pp.528–537.

Stals, M. et al., 2010. Flash pyrolysis of heavy metal contaminated biomass from phytoremediation: Influence of temperature, entrained flow and wood/leaves blended pyrolysis on the behaviour of heavy metals. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 87(1), pp.1–7.

Sterckeman, T. et al., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution*, 135(1–4), pp.173–194.

Sterckeman, T. et al., 2018. Cadmium mass balance in French soils under annual crops: Scenarios for the next century. *Science of The Total Environment*, 639, pp.1440–1452.

Sterckeman, T. et al., 2019. How could phytoextraction reduce Cd content in soils under annual crops? Simulations in the French context. *Science of The Total Environment*, 654, pp.751–762.

Sterckeman, T. & Puschenreiter, M., 2018. Phytoextraction of cadmium: feasibility in field applications and potential use of harvested biomass. In *Agromining: Farming for Metals*. Springer, Cham, p. 205 219.

Subramanian, R. et al., 2012. Analysis of mineral and heavy metals in some medicinal plants collected from local market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1 SUPPL.), pp.74–78.

Sun, Y. & Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. In *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. pp. 1–11.

Šyc, M. et al., 2012. Willow trees from heavy metals phytoextraction as energy crops. *Biomass and Bioenergy*, 37, pp.106–113.

Szczukowski, S. et al., 2002. Productivity and chemical composition of wood tissues of short rotation willow coppice cultivated on arable land. *Water*, 2002(9), pp.413–417.

T

Talebnia, F., Karakashev, D. & Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*,101(13),pp.4744–4753.

Tejirian, A. & Xu, F., 2010. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), pp.7673–7682.

Thibault, J.F. et al., 1993. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238(C), pp.271–286.

Timell, T.E. et al., 1965. The Acid Hydrolysis of Glycosides - Effect of substitutents at C-5. *Canadian Journal of Chemistry*, 43(9), pp.2296–2305.

Truong, P.N. V. et al., 2010. Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soils and Water Using Vetiver Grass. In *Environmental Bioengineering*. Springer Science & Business Media, pp. 233–275.

V

Van Der Ent, A. et al., 2015. Agromining: Farming for metals in the future? *Environmental Science and Technology*, 49(8), pp.4773–4780.

Vassilev, A. et al., 2004. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal*, 4, pp.9–34.

Vaughan, J. et al., 2017. Characterisation and hydrometallurgical processing of nickel from tropical agromined bio-ore. *Hydrometallurgy*, 169, pp.346–355.

Verbruggen, N., Hermans, C. & Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181, pp.759–776.

Vervaeke, P. et al., 2006. Fate of heavy metals during fixed bed downdraft gasification of willow wood harvested from contaminated sites. *Biomass and Bioenergy*, 30(1), pp.58–65.

Viktorova, J. et al., 2017. Native phytoremediation potential of Urtica dioica for removal of PCBs and heavy metals can be improved by genetic manipulations using constitutive CaMV 35S promoter. *PLoS ONE*, 12(10), pp.1–12.

Volk, T.A. et al., 2006. The development of short-rotation willow in the northeastern United States for bioenergy and bioproducts, agroforestry and phytoremediation. *Biomass and Bioenergy*, 30(8–9), pp.715–727.

Voragen, A.G.J. et al., 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), pp.263–275.

W

Wang, G. et al., 2012. The activity and kinetic properties of cellulases in substrates containing metal ions and acid radicals. *Advances in Biological Chemistry*, 02(04), pp.390–395.

Wang, J. & Chen, C., 2006. Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), pp.427–451.

Wang, X. & Jia, Y., 2010. Study on adsorption and remediation of heavy metals by poplar and larch in contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(7), pp.1331–1338.

Wang, Y. & Björn, L.O., 2014. Heavy metal pollution in Guangdong Province, China, and the strategies to manage the situation. *Frontiers in Environmental Science*, 2(April), pp.1–12.

Willats, W.G.T., Knox, J.P. & Mikkelsen, J.D., 2006. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17(3), pp.97–104.

Williams, K. et al., 2013. Ethanol and Volatile Fatty Acid Production from Lignocellulose by Clostridium cellulolyticum. *ISRN Biotechnology*, 2013(i), pp.1–7.

Ximenes, E. et al., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1), pp.54–60.

X

Xu, Z. & Huang, F., 2014. Pretreatment methods for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(1), pp.43–62.

Y

Yamashita, Y. et al., 2008. Ethanol production from paper sludge by immobilized Zymomonas mobilis. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), pp.314–319.

Yang, J.S., Mu, T.H. & Ma, M.M., 2018. Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244(September 2017), pp.197–205.

Yapo, B.M., 2011. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), pp.373–385.

Yu, G. et al., 2010. Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), pp.539–551.

Yuliarti, O. et al., 2015. Extraction and characterisation of pomace pectin from gold kiwifruit (Actinidia chinensis). *Food Chemistry*, 187, pp.290–296.

Z

Zhao, X.-Q. et al., 2012. Bioethanol from lignocellulosic biomass. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 128, pp.25–51.

Zhao, X., Cheng, K. & Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), pp.815–827.

Zhong, D. et al., 2016. Pyrolysis of Sedum plumbizincicola, a zinc and cadmium hyperaccumulator: pyrolysis kinetics, heavy metal behaviour and bio-oil production. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 18(7), pp.2315–2323.

Zimmermann, T., Pöhler, E. & Geiger, T., 2004. Cellulose fibrils for polymer reinforcement. *Advanced Engineering Materials*, 6(9), pp.754–761.

Zovko, M. & Romić, M., 2011. Soil Contamination by Trace Metals: Geochemical Behaviour as an Element of Risk Assessment. In I. A. Dar, ed. *Earth and environmental sciences*. InTech, pp. 437–456.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique des stratégies de phytoremédiation (Favas et al. 2014) 13
Figure 13. Schéma des valorisations possibles des biomasses issues de phytoremédiation (Evangelou et al. 2012) 18
Figure 2. Structure chimique de la matière lignocellulosique (Silveira et al. 2015) 21
Figure 3. Organisation des microfibrilles de cellulose dans la paroi végétale (Zimmermann et al. 2004) 22
Figure 4. Monosaccharides constitutifs des hémicelluloses 23
Figure 5. Représentation schématique des éléments structuraux de la pectine (Hilz 2007) .. 25
Figure 6. Structure simplifiée des 3 unités de base des lignines et de leurs précurseurs (Lapierre 2010) 26
Figure 7. Formation des produits de dégradation à partir des sucres en C_5 et C_6 (Hu et al. 2008) 31
Figure 8. Effet du pH et de la température sur la matière lignocellulosique pendant le prétraitement (Pedersen & Meyer 2010) 32
Figure 9. Schéma des étapes clés de la conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol 34
Figure 10. Représentation schématique de l'action des cellulases sur la structure de la cellulose (Mussatto & Teixeira 2010) 35
Figure 11. Photos de Noccaea caerulescens (Lehmuskallio 2018) 43
Figure 12. Photos du saule (Salix viminalis L.) (Lehmuskallio 2018) 45
Figure 14. Représentation schématique des différentes étapes de caractérisation chimique53
Figure 15. Représentation schématique des composantes d'un ICP-AES 54
Figure 16. Conditions d'analyse de chromatographie échangeuse d'ions (HPAEC-PAD) pour le dosage des monosaccharides et des acides uroniques 57
Figure 17. Courbe d'étalonnage d'acide galacturonique 59
Figure 18. Diagramme résumant les étapes suivies pour le dosage des pectines par colorimétrie 60
Figure 19. Réacteur Parr utilisé pour le traitement organosolv 61

Figure 20. Représentation schématique des étapes suivies pour l'obtention des pâtes cellulosiques 63
Figure 21. Schéma de fonctionnement du pilote d'explosion à la vapeur 65
Figure 22. Illustration du pilote d'explosion à la vapeur situé au LERMAB 66
Figure 23. Dispositif d'hydrolyse enzymatique 68
Figure 24. Fioles de fermentation contenant le substrat et l'inoculum 71
Figure 25. Dispositif de fermentation et prélèvement sous PSM 74
Figure 26. Chromatographe HPLC utilisé pour l'analyse des produits de fermentation et la méthode appliquée 75
Figure 27. Étapes suivies pendant la purification de la biomasse avec les agents chélatants 76
Figure 28. Diagramme des étapes suivies pour l'extraction et la purification des pectines ... 78
Figure 29. Chromatographe utilisé pour l'analyse des pectines ainsi que les conditions de traitement 80
Figure 30. Répartition des ETMs dans les trois fractions lors du prétraitement organosolv .. 90
Figure 31. Rendement en pâte cellulosique (% MS initiale) en fonction de la sévérité du traitement 92
Figure 32. Rendement en pâte (% MS initiale) en fonction de la sévérité combinée 94
Figure 33 A et B : Teneur en lignine et en sucres résiduels dans la pâte (% MS de pâte) en fonction de la sévérité 95
Figure 34 A et B : Teneur en glucose et en xylose résiduels dans la pâte (% MS de pâte) en fonction de la sévérité 97
Figure 35. Taux d'ETMs récupérés dans les pâtes après explosion vapeur sur le saule 1 (S1) avec imprégnation à 0,9 et 2 % H_2SO_4 99
Figure 36. Taux d'ETMs récupérés dans les pâtes après explosion à la vapeur du saule-2 (S2) avec imprégnation 2 % H_2SO_4 100
Figure 37. (%) d'ETMs extraits (Zn, Mn) à partir de sciure de saule (S1) en utilisant deux chélatants (EDTA, EDDS), H_2SO_4 et H_2O_2 102
Figure 38. Cinétique d'hydrolyse enzymatique des pâtes récupérées après organosolv (avec et sans purification) du saule (S1) 105
Figure 39. Cinétique d'hydrolyse enzymatique des six pâtes récupérées après SE du saule (S1) avec une imprégnation à 2 % H_2SO_4 107

Figure 40. Cinétique de fermentation des trois hydrolysats récupérés après hydrolyse enzymatique du saule (S1) 108
Figure 41. Rendement en éthanol produit sur la fermentation des hydrolysats du saule (S1) 109
Figure 42. Taux de monosaccharides récupérés après extraction des pectines de Noccaea (LS) à l'oxalate d'ammonium et à l'acide citrique 119
Figure 43. Ditribution des ETMs dans les trois fractions (résidu solide, pectine, filtrat) après l'extraction de pectines 121
Figure 44. Profils d'élution des pectines extraites à l'oxalate d'ammonium à partir du lot de Noccaea (LS) en fonction du temps de rétention (min) 122
Figure 45. Spectres FT-IR des pectines isolées à partir de Noccaea (LS) avec l'acide citrique et l'oxalate d'ammonium 124
Figure 46. Rendement en pâte cellulosique de Noccaea après prétraitement d'explosion à la vapeur en fonction de la sévérité combinée 128
Figure 47. Lignine résiduelle (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE 129
Figure 48. Sucres résiduels (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE 131
Figure 49. Glucose résiduel (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE 132
Figure 50. Xylose résiduel (%) dans les pâtes cellulosiques de Noccaea récupérées après SE 133
Figure 51. Taux d'acide galacturonique résiduel dans la pâte de Noccaea après SE 134
Figure 52. Taux de Rhamnose résiduel dans la pâte de Noccaea après SE 135
Figure 53. Taux d'Arabinose résiduel dans la pâte de Noccaea après SE 135
Figure 54. ETMs résiduels (Zn, Cd, Mn) dans la pâte (%) en fonction de la sévérité 137
Figure 55. Cinétique d'hydrolyse enzymatique des trois pâtes de Noccaea avec imprégnation à 0,9 % acide sulfurique 139
Figure 56. Produits obtenus de la fermentation ABE des hydrolysats de Noccaea 141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Quelques utilisations des ETMs potentiellement toxiques (Siegel 2002) 9
Tableau 4. Micronutriments et éléments non-essentiels pour le fonctionnement optimal des processus biologiques et des organes chez l'homme (Siegel 2002) 10
Tableau 2. Liste des espèces végétales utilisées en phytoremédiation 12
Tableau 3. Teneurs en ETMs dans les feuilles de plantes normales et hyperaccumulatrices ($mg.kg^{-1}$)..... 14
Tableau 5. Description des échantillons de Noccaea 51
Tableau 6. Conditions opératoires appliquées sur le saule lors du traitement organosolv 62
Tableau 7. Résumé des conditions du prétraitement d'explosion à la vapeur..... 67
Tableau 8. Composition du milieu de culture RCM 70
Tableau 9. Composition du milieu de culture YNB 73
Tableau 10. Conditions opératoires appliquées pendant l'étape de purification 76
Tableau 11. Composition chimique du saule (S1) et teneurs en ETMs..... 86
Tableau 12. Rendement en pâte, lignine, hémicelluloses en fonction des conditions de prétraitement 88
Tableau 13. Conditions de prétraitement SE - Imprégnation acide à 0,9 % H_2SO_4 91
Tableau 14. Conditions de prétraitement SE - Imprégnation acide à 2 % H_2SO_4 91
Tableau 15. Teneurs en Zn et Mn ($mg.kg^{-1}$) dans la sciure de saule avant et après détoxification à l'EDTA (1 %) 103
Tableau 16. Teneurs en ETMs ($mg.kg^{-1}$) dans les cinq lots de Noccaea..... 115
Tableau 17. Composition biochimique des échantillons de Noccaea caerulescens..... 116
Tableau 18. Rendements en pectines des échantillons de Noccaea après extraction à l'oxalate d'ammonium et à l'acide citrique 118
Tableau 19. Masses moléculaires des pectines analysées par SEC avec et sans dialyse extraites à l'oxalate d'ammonium..... 123
Tableau 20. Conditions de prétraitement SE – Imprégnation acide à 0,9 % H_2SO_4..... 127
Tableau 21. Conditions de prétraitement SE – Imprégnation acide à 2 % H_2SO_4..... 127
Tableau 22. Conditions de traitement des pâtes cellulosiques choisies pour l'hydrolyse enzymatique 138

RÉSUMÉ

La phytoremédiation est un concept pour la dépollution et de réhabilitation des sols et/ou de friches industrielles contaminés par des éléments traces métalliques (ETMs), utilisant les végétaux pour absorber ou immobiliser les contaminants en présence des organismes microbiens de la rhizosphère. Cette technique a pour conséquence une production de biomasse plus ou moins contaminée qu'il est nécessaire de traiter et également de valoriser. Cependant, la présence d'ETMs peut être problématique dans une approche de conversion en bioraffinerie. Pour répondre à cette question, deux espèces ont été étudiées : une plante herbacée hyperaccumulatrice (*Noccaea caerulescens*) et un ligneux (*Salix viminalis*). Deux prétraitements ont été sélectionnés pour cette étude : les prétraitements par explosion vapeur et organosolv, en appliquant différentes conditions opératoires, afin (1) de suivre la distribution des ETMs au cours du traitement, (2) de purifier la matière lignocellulosique et (3) d'évaluer l'effet des ETMs sur les étapes ultérieures d'hydrolyse enzymatique et de fermentation. Pour le prétraitement organosolv la majeure partie des ETMs est récupérée dans le résidu solide cellulosique alors que par explosion à la vapeur, les ETMs sont extraits en grande partie dans les effluents aqueux du traitement. La présence d'ETMs dans les pâtes cellulosiques et les hydrolysats ne montre pas d'effet significatif sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique et de fermentation. Concernant spécifiquement *Noccaea caerulescens* des teneurs relativement importantes en pectines ont été observées, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour la valorisation de cette plante par la production d'un biopolymère d'intérêt industriel. Finalement, les résultats obtenus montrent qu'il serait possible de combiner réhabilitation des sols et valorisation en bioraffinerie de biomasses issues de phytotechnologies soit pour la production du bioéthanol ou la production de molécules plateforme.

Mots clés : phytoremédiation, éléments traces métalliques, bioraffinerie, explosion vapeur, organosolv, bioéthanol, pectines

ABSTRACT

Phytoremediation is a concept for the depollution and rehabilitation of soils and/or industrial wastelands contaminated by metal trace elements (MTEs), using plants to absorb or immobilize contaminants in the presence of microbial organisms in the rhizosphere. This technique results in a more or less contaminated biomass production that must be treated and also recovered. However, the presence of MTEs can be an issue in a biorefinery conversion approach. To address this question, two species were studied: an hyperaccumulator herbaceous plant (*Noccaea caerulescens*) and a woody plant (*Salix viminalis*). Two pre-treatments were selected for this study: steam explosion and organosolv pre-treatments, applying different operating conditions, in order to (1) monitor the distribution of MTEs during the process, (2) purify lignocellulosic material and (3) evaluate the effect of MTEs on subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation steps. For organosolv pretreatment, most of the MTEs are recovered in the solid cellulosic residue while by steam explosion, MTEs are mostly extracted in the aqueous effluents of the treatment. The presence of MTEs in cellulosic pastes and hydrolysates does not show a significant effect on the kinetics of enzymatic hydrolysis and fermentation. Concerning specifically *Noccaea caerulescens*, the plant contains relatively high levels of pectins, which opens up interesting prospects for the valorization of this plant through the production of a biopolymer of industrial interest. Finally, the results obtained show that it would be possible to combine soil rehabilitation and biorefinery valorization of biomasses from phytotechnologies for either bioethanol production or the production of platform molecules.

Key words: phytoremediation, metallic trace elements, biorefinery, steam explosion, organosolv, biofuel, pectins