HAL
open science

Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques

Alex Rakotovelo

To cite this version:

Alex Rakotovelo. Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques. Polymères. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0247 . tel-01501415

HAL Id: tel-01501415

https://theses.hal.science/tel-01501415

Submitted on 4 Apr 2017

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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale des Sciences Chimiques

Spécialité POLYMÈRES

Par **Alex RAKOTOVELO**

Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques

Sous la direction du Pr. Stéphane Grelier et du Dr. Frédéric Peruch

Date de soutenance prévue le 21 novembre 2016

Membres du jury :

M. FAULDS, Craig	Professeur à l'Université de Marseille	Rapporteur
M. MORTHA, Gérard	Professeur à l'Université de Grenoble	Rapporteur
M. CRAMAIL, Henri	Professeur à l'Université de Bordeaux	Examinateur
Mme GELO-PUJIC, Mirjana	Docteur - Solvay	Examinateur
Mme MICHAUD, Christelle	Docteur - Tembec	Invité
M. GRELIER, Stéphane	Professeur à l'Université de Bordeaux	Directeur de thèse
M. PERUCH, Frédéric	Directeur de recherche - CNRS	Directeur de thèse

Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques.

Résumé :

Ces travaux de thèse visent à valoriser la lignine, biopolymère aromatique le plus abondant sur terre. Pour cela, la dépolymérisation oxydante de la lignine par voie enzymatique a été explorée afin d'obtenir des synthons aromatiques fonctionnalisés. La laccase et le système laccase médiateur (LMS) ont été sélectionnés comme système enzymatique. Dans une première partie, les paramètres réactionnels (choix du médiateurs, température, co-solvant…) de fonctionnement optimal du LMS ont été déterminés notamment via l'utilisation de molécules modèles de lignine. Ces conditions optimales ont été directement appliquées pour l'oxydation d'une lignine organosolv issue d'une plante herbacée. Une étape de fractionnement organique a été conduite sur la lignine avant oxydation afin d'éliminer les populations à l'origine de réactions de couplage. La lignine a ensuite été oxydée par le LMS en milieu biphasique, puis traitée au peroxyde d'hydrogène. Ce procédé en trois étapes a permis de générer des composés aromatiques monomères à trimères (mis en évidence par chromatographies SEC, HPLC, GC et LC-MS) et a été appliqué avec succès à une seconde lignine issue de conifère. Dans les deux cas, des rendements élevés ont été constatés comparés à ceux obtenus dans la littérature. Après isolation, les composés aromatiques produits pourraient trouver des applications comme précurseurs dans les industries de la chimie fine et des polymères.

Mots clés : lignine, dépolymérisation, laccase, LMS.

Enzymatic depolymerization of lignin for the production of fine aromatic chemicals

Abstract :

This work aims at valorizing lignin, the most abundant aromatic biopolymer on earth. For that purpose, an enzymatic approach for the oxidative depolymerization of lignin was investigated in order to obtain fine chemicals. Laccase and the laccase-mediator system (LMS) were selected for the enzymatic oxidation. In the first part, optimal conditions (type of mediator, temperature, co-solvent…) were determined especially by studying reactions on lignin model molecules. These conditions were applied for the oxidation of an organosolv grass lignin. Prior to the oxidation, an organic fractionation was conducted on the lignin in order to remove the population responsible for radical coupling. Then, the lignin was oxidized by the LMS in a biphasic medium followed by a mild hydrogen peroxide treatment. This three-step process allowed the production of monomeric to trimeric aromatic compounds (as shown by SEC, HPLC, GC and LC-MS) and was successfully applied to a different organosolv lignin coming from hardwood. High yield were obtained in both cases as compared with literature results. After isolation, the obtained aromatic molecules could be of interest as precursors for the fine chemistry and polymer industries.

Keywords : lignin, depolymerization, laccase, LMS.

« Ce qu'un autre aurait aussi bien fait que toi, ne le fais pas. Ce qu'un autre aurait aussi bien dit que toi, ne le dis pas, - aussi bien écrit que toi, ne l'écris pas. Ne t'attache en toi qu'à ce que tu sens qui n'est nulle part ailleurs qu'en toi-même, et crée de toi, impatiemment ou patiemment, ah! le plus irremplaçable des êtres. »

Andrée Gide, *les nourritures terrestres*.

Remerciements

En trois ans, tellement de gens à remercier !

J'ai eu la chance d'avoir été constamment soutenu par des amis (et plus !) de longue date, d'avoir fait la connaissance d'un grand nombre de belles personnes, et d'avoir pu travailler dans un cadre idéal grâce à eux.

Beaucoup m'ont aidé, chacun à leur manière. Certains m'ont fait rire, d'autres m'ont guidé, inspiré, motivé, distrait, aimé… Tous ont contribué à faire de cette thèse une expérience exceptionnelle. J'espère leur avoir rendu au moins une partie de ce qu'ils m'ont donné !

Il me faudrait écrire au moins l'équivalent du présent manuscrit pour remercier tout le monde comme il se soit. Je l'ai déjà fait (ou du moins ai-je essayé) par d'autres biais. Je me contenterai donc d'une simple liste (non exhaustive hélas ! ma mémoire étant capricieuse…) :

Morgane (on a vécu une sacrée aventure, une belle aventure, tu m'as tant apporté… Et tu continues de le faire ! Good show !!!), **Léa** (aaaaah Léa… et dire qu'on n'a failli passer à côté l'un de l'autre ! Tout est allé si vite, c'est fou la vie !), **Condi** (ma besty !!! Tellement de moments géniaux tous les deux, toujours un bonheur de passer des journées au bureau et ailleurs avec toi, malgré ton vilain caractère…), **Geoff** (la mouc… euh le king of bling bling, médaille du mérite pour m'avoir supporté plus de trois ans, médaille de la folie pour l'ensemble de ton œuvre), **Jei** (coloc en or, mec en or, nez en or…), **Matthieu et Vincent** (toujours là depuis aussi loin que ma mémoire puisse aller, c'est beau !), **la petite Sorbet** (un coup de foudre amical, je ne te ferai pas de compliment, tu vas te la raconter après), **Alexis** (mon sacré Binôme, je savoure les rares moments où l'on arrive à se voir, même si c'est à chaque fois au péril de ma santé physique et mentale),

Groniko, Paraillous, Zarrouk, TB, Boubou, le Double, Mehdi, Grange, Océ, Lulu (la fine fleur de CBP, que des mecs géniaux (oui oui, Océ et Lulu aussi), malgré la distance, vous êtes toujours là !), et les plus jeunes copains : **Olivier** (aka Monfils), **Vinck** (champion), **Bonemère** (champion), **Dave** (champion), **Roro** (champion), **Bibiche**, **Charlotte** (qui n'a pas de …)

Mes 2 Chefs (un super duo, c'était un plaisir de travailler avec vous), **Éric V.** (ah ! ces satanées chromatos, sans toi, elles auraient certainement eu raison de moi !), **Éric D.** (meilleur stagiaire), **Gégé**, **Christian, FHP, Maud** (sans qui je n'aurais pas connu le LCPO), **Vincent N.**, **Dodzi Zigah** et **Michaël Jourdes**,

Et enfin, l'ami **Roos**, **PL** (un sacré bon gars pour un Stéphanois), **Brand**, **Benji, le ptit Sav'** (ah ben mon cochon !), **QP** (bam, tchik, bam, tchik, bam… Aussi bon à la batterie que mauvais en blagues…), **Michou, Anna, Bakka** (malgré les quelques fessées que j'ai prises), **Gauvin, Hélène, Ariane, Berto, Cédric** (que la lignine soit avec toi !), **le LCPO band, la CTVVMB** (les mecs au top), **le BDT,**

Ma famille, mes parents.

Sommaire

Liste des abréviations et acronymes…….....11

Introduction générale……..13

Chapitre bibliographique……..19

I : Le bois : structure et composition……21

I.1 : Structure macroscopique…….21

I.2 : Structure fine…….23

I.3 : Composition chimique du bois……..25

II : La lignine : caractéristiques et modes d'extraction……31

II.1 : Biosynthèse et structure chimique……31

II.2 : Source et variétés des lignines……..34

II.3 : Procédés d'extraction…….36

III : Voies de valorisation de la lignine……..43

III.1 : La lignine en tant que polymère……44

III.2 : Dépolymérisation de la lignine : vers la production de synthons biosourcés……49

IV : Les enzymes lignolytiques……..62

IV.1 : Les peroxydases…….....62

IV.2 : La laccase et le LMS.....65

IV.3 : Application à la lignine et ses dérivés.....71

IV. Conclusion.....74

Références bibliographiques.....76

Partie A : Mise en place de conditions opératoires - Oxydation de modèles de lignine

Chapitre 1 : Étude d'une laccase issue de *Trametes* versicolor.....99

I. Mesure de l'activité enzymatique.....99

II. Influence des paramètres réactionnels sur l'activité enzymatique.....102

II.1. Influence du pH.....102

II.2. Effet du co-solvant.....103

II.3. Température optimale 104

III. Conclusion.....106

Chapitre 2 : Oxydation de modèles de lignine.....107

I. Criblage de médiateurs.....109

I.1. Médiateurs naturels.....109

I.2. Médiateurs synthétiques.....110

I.3. Association de médiateurs.....112

I.3. Voltammétrie cyclique.....115

II. Conditions réactionnelles.....119

II.1. Température.....119

II.2. Concentration enzymatique.....120

II.3. Ajout d'un agent tensioactif.....121

II.4. Choix du co-solvant.....123

II.5. Type d'agitation.....124

III. Oxydation d'autres modèles de lignine.....126

III.1. Influence de l'encombrement stérique : ACVEtRéd.....126

III.2 Substrat phénolique : 2,6-diméthoxyphénol.....127

III.3. Modèles dimères.....128

IV. Immobilisation enzymatique.....132

IV.1. Immobilisation d'une laccase de *Trametes* versicolor.....133

IV.2. Propriétés des enzymes encapsulées 138

IV.3 Oxydation de l'ACVBnRéd.....143

IV.4. Conclusion.....144

Références bibliographiques.....145

Partie B : Oxydation d'une lignine de type organosolv

Chapitre 1 : Oxydation enzymatique en milieu monophasique.....153

I. Caractérisation d'une lignine organosolv.....154

I.1. Pureté, siccité et taux de cendres.....154

I.2. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....155

I.3. Spectroscopie infrarouge (IR-TF).....157

I.4. Spectroscopie RMN.....158

II. Oxydation de la lignine par le système laccase-médiateur.....163

II.1. Mise en place des conditions réactionnelles.....163

II.2. Comparaison de plusieurs systèmes laccase-médiateur.....164

II.3. Association de médiateurs.....167

III. Limitation des réactions de couplage.....170

III.1. Blocage des hydroxyles phénoliques 171

III.2. Utilisation de pièges à radicaux.....172

IV. Conclusion.....173

Chapitre 2 : Oxydation enzymatique en milieu biphasique.....174

I. Nouvelle stratégie pour la dépolymérisation de la lignine.....174

II. Choix du solvant organique.....175

II.1. Capacité d'extraction des solvants : calcul de coefficients de partage.....176

II.2. Activité de la laccase en présence des solvants d'extraction...177

III. Oxydation de la lignine en milieu biphasique.....180

III.1 Fractionnement organique de la lignine organosolv.....181

III.2. LMS en milieu biphasique.....184

III.3. Traitement de Dakin de la phase LMS aq.....193

IV. Études complémentaires.....195

IV.1. Application à un nouveau lot de lignine.....205

IV.2. Étude sur le traitement de Dakin.....209

IV.3. Renouvellement de la phase organique.....213

V. Élucidation des produits d'oxydation 213

V.1. Chromatographie d'exclusion stérique.....213

V.2. Chromatographie en phase gazeuse (GC et GC-MS).....215

V.3. Chromatographie en phase liquide (HPLC et LC-MS).....220

Références bibliographiques.....228

Conclusion générale et perspectives.....231

Partie expérimentale.....237

I. Matériel.....239

II. Techniques d'analyse.....241

II.1. Spectroscopie.....241

II.2. Chromatographie.....243

III. Modes opératoires.....245

III.1. Partie A.....245

III.2. Partie B.....254

Références bibliographiques.....257

Liste des abréviations et acronymes

Techniques d'analyse

FM - Marqueur de débit

GC - Chromatographie en phase gazeuse

HPLC - Chromatographie en phase liquide à haute performance

HSQC - Corrélation hétéronucléaire à quantum simple

IR-TF - Infrarouge à transformée de Fourier

MS - Spectroscopie de masse

RMN - Résonnance magnétique nucléaire

SEC - Chromatographie d'exclusion stérique

TIC - Courant ionique total (chromatogramme)

UV - Ultraviolet

Solvants

AcOEt - Acétate d'éthyle

DMF - Diméthyle formamide

DMSO - Diméthyle sulfoxide

MeOH - Méthanol

MIBC - Méthylisobutyl cétone

THF - Tétrahydrofurane

Réactifs

ABTS - Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzotiazoline-6-sulphonique)

APTES - 3-aminopropyltriéthoxysilane

BSTFA - N,O-bis(triméthylsilyl trifluoro acétamide)

DMP - 2,6-diméthoxyphénol

HOBt - 1-hydroxybenzotriazole

LDA - Diisopropyl admidure de lithium

NAC - N-acétylcystéine

PAH - Poly(hydrochlorure d'allylamine)

PSS - Polystyrène sulfoné

TMDP - 2-chloro-4,4,5,5-tétramathyl-1,3,2-dioxaphospholane

Autres abréviations

ACV - Acétovanillone

ACVBnOx - Forme oxydée de l'ACV benzylée

ACVBnRéd - Forme réduite de l'ACV benzylée

lbl - layer-by-layer

Lignine-Me - Lignine méthylée

LMS - Système laccase-médiateur

Introduction générale

Dès le début du XIXème siècle, Henry Ford soulignait la nécessité de mettre en place une économie basée sur les ressources naturelles. Ainsi, parmi les premiers moteurs développés par l'industriel, certains étaient alimentés par des huiles d'origine végétale. De même, les premiers moteurs conçus par Rudolf Diesel fonctionnaient à l'huile d'arachide[1]. Cependant, la découverte de nombreux gisements de pétrole et le développement des méthodes de forage au début des années 1900 a entrainé un bouleversement profond de la société : les ressources fossiles sont alors devenues la principale source d'énergie et de matière première pour l'industrie chimique, freinant considérablement le développement de moyens alternatifs.

Cette industrie essentiellement basée sur l'usage du pétrole et du gaz naturel perdure depuis lors et est encore d'actualité en 2016. Or, l'emploi intensif de ces ressources fossiles doit être rapidement interrompu pour plusieurs raisons :

- Ces ressources ne sont pas renouvelables et s'appauvrissent à un rythme élevé. La forte hausse démographique et le développement industriel des régions émergentes entraineront bientôt une hausse considérable des besoins énergétiques à laquelle les ressources fossiles ne pourront pas répondre. Malgré l'apparition récente de techniques d'extraction du gaz de schiste efficaces et à bas coût, les réserves fossiles devraient être épuisées d'ici 100 ans si nos méthodes de consommation sont maintenues[2].
- Il est avéré que l'utilisation massive du pétrole participe au réchauffement climatique. Chaque année, 29 Gt de CO_2 sont émis à cause de l'emploi des ressources fossiles, et seulement 40 % de ces gaz peuvent être absorbés selon les procédés naturels[3]. Par ailleurs, une proportion importante des produits synthétisés par la pétrochimie n'est pas biodégradable, ce qui pose la question de la gestion des déchets.
- Les avantages économiques liés au pétrole ne sont plus d'actualité. Le prix du baril est fluctuant et risque d'augmenter sensiblement dans les prochaines années bien qu'il soit encore bas actuellement. La majorité du pétrole brut (56 %) et du gaz naturel (41 %) est produit au Moyen-Orient, région peu stable politiquement.

Pour toutes ces raisons, il est absolument nécessaire de limiter de façon considérable l'usage des ressources fossiles et de trouver une alternative répondant aux « besoins de notre génération sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs », selon le concept de développement durable. Ainsi, ces ressources alternatives devront être régénérables à une courte échelle de temps afin d'éviter leur épuisement et ne devront pas générer de déchets à des taux tels qu'ils ne peuvent être assimilés de façon naturelle.

La biomasse est produite à partir de l'eau, du dioxyde de carbone et de l'énergie solaire selon le processus de biosynthèse. Les temps de régénération des espèces issues de la biomasse sont compris entre 1 et 50 ans (contre plusieurs milliers d'années pour les ressources fossiles). Ainsi, la biomasse est la seule source de carbone capable de répondre aux critères du développement durable. Ce constat a notamment conduit à la mise au point de nouvelles voies de valorisation d'huiles et de sucres d'origine végétale. Un des exemples les plus marquants est l'émergence marquée d'usines dédiées à la production de bioéthanol comme carburant pour l'automobile à partir du début des années 2000, notamment au Brésil et aux États-Unis. Ce développement de carburants agro-sourcés a été encouragé par certains États (les USA et l'UE notamment) promulguant des lois ayant pour objectif de réduire leur impact environnemental[2,4].

Bien que la transition d'une société pétro-sourcée vers une société agro-sourcée soit impérative, celle-ci pose un nouveau problème : l'utilisation des terres et la consommation d'eau ne doit pas se faire au détriment de la production alimentaire. Le choix du type de biomasse à exploiter est alors crucial. Dans la situation idéale, l'espèce cultivée devra être non comestible, posséder un rendement élevé pour une surface de terre exploitée la plus faible possible et consommer peu d'eau.

La biomasse lignocellulosique (composée majoritairement de lignine, cellulose et hémicelluloses) semble remplir ces critères :

- C'est une ressource naturelle abondante et non comestible.
- Elle coûte peu cher, et les activités liées à sa transformation (papèterie et foresterie) génèrent des volumes importants de co-produits pouvant être valorisés.
- Certaines plantes annuelles peuvent être cultivées dans des zones marginales et non exploitées par l'industrie alimentaire.

Motivé par le fort potentiel de cette ressource naturelle, le concept de bioraffinerie est apparu à la fin des années 90. Par mimétisme avec les raffineries de pétrole classique, les bioraffineries sont capables de générer du carburant, des produits chimiques et de l'énergie en exploitant les constituants de la biomasse lignocellulosique[5]. Un des pionniers dans ce secteur est la bioraffinerie norvégienne Borregaard qui produit chaque année 20 millions de litres de bioéthanol, 160 000 tonnes de cellulose de spécialité, 150 000 tonnes de lignine et 2 000 tonnes de vanilline.

Afin de concurrencer (voire remplacer) les raffineries de pétrole, les bioraffineries doivent être en mesure de valoriser l'ensemble des constituants de la biomasse par des techniques à fort rendement, peu couteuses et respectueuses de l'environnement. À l'heure actuelle, les bioraffineries n'ont pas encore le niveau de maturité que possèdent les pétroraffineries, industries dont la technologie est développée depuis 150 ans.

La conversion de la cellulose et des hémicelluloses en sucres C_5 et C_6 pour la production de carburant ou de précurseurs pour la chimie est désormais maitrisée et le déploiement industriel commence. La voie de valorisation la plus prometteuse de la lignine est sa dépolymérisation pour l'obtention d'espèces aromatiques de faibles masses molaires exploitables pour la chimie et la pharmacie notamment[6]. Bien que ce sujet ait fait l'objet de nombreuses études, seul le procédé développé par Borregaard permet d'obtenir un produit chimique d'intérêt à l'échelle industrielle. Ceci est dû à la grande complexité de la lignine ainsi qu'à sa structure hétérogène, dépendante de l'origine et du mode d'extraction employé. Ainsi, alors que plusieurs millions de tonnes de lignine provenant de l'industrie papetière et des usines de bioéthanol pourraient être obtenues et exploitées chaque année (10 à 20 % de la lignine générée), seule une infime partie est valorisée. Le développement de méthodes de dépolymérisation de la lignine efficaces et applicables à grande échelle est donc un enjeu crucial pour l'agrochimie.

L'objectif de ce travail de thèse est de mettre en place un procédé de dégradation de la lignine dans le but d'obtenir des synthons biosourcés de faibles masses molaires. Ces synthons monomères à trimères pourraient notamment être employés comme précurseurs de polymérisation. Afin de converver la structure aromatique et les fonctions oxygénées de la lignine, une voie oxydante a été employée pour la dépolymérisation de ce biopolymère. Dans une optique de respect des principes de développement durable et de chimie verte, des conditions réactionnelles douces ont été choisies. Ainsi, nos efforts se sont tournés vers l'étude de l'oxydation de la lignine par une enzyme de type oxydase : la laccase.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente tout d'abord les principales caractéristiques des constituants de la biomasse lignocellulosique. Puis, les différentes voies de valorisation de la lignine sont décrites et discutées.

Les travaux effectués au cours de cette thèse sont divisés en deux parties distinctes. La première partie présente une étude du comportement de la laccase de *Trametes versicolor* dans différentes conditions ainsi que la mise au point d'une méthode pour l'oxydation de molécules mimes de la lignine. Ces résultats ont été pris en compte dans la seconde partie, traitant de la dépolymérisation d'une lignine organosolv par un système enzymatique. Un procédé impliquant l'oxydation de la lignine par la laccase en milieu biphasique a notamment été développé pour obtenir des molécules de faibles masses molaires d'intérêt potentiel pour l'industrie.

Références bibliographiques

1. Isikgor, F. H. & Becer, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym Chem* **6,** 4497–4559 (2015).
2. D. King, O.R. Inderwildi & A. Williams. *The future of industrial biorefineries*. (World Economic Forum, 2010).
3. Maggio, G. & Cacciola, G. When will oil, natural gas, and coal peak? *Fuel* **98,** 111–123 (2012).
4. Vennestrøm, P. N. R., Osmundsen, C. M., Christensen, C. H. & Taarning, E. Beyond Petrochemicals: The Renewable Chemicals Industry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50,** 10502–10509 (2011).
5. J.H. Clark, F.D.I. Deswarte & T.J. Farmer. The integration of green chemistry in future biorefineries.pdf. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **3,** 72–90 (2009).
6. Strassberger, Z., Tanase, S. & Rothenberg, G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv.* **4,** 25310 (2014).

Chapitre 1 : Étude bibliographique

Sommaire

Chapitre bibliographique……..19

I : Le bois : structure et composition……21

I.1 : Structure macroscopique…….21

I.2 : Structure fine…….23

I.3 : Composition chimique du bois……..25

II : La lignine : caractéristiques et modes d'extraction…….31

II.1 : Biosynthèse et structure chimique……31

II.2 : Source et variétés des lignines……..34

II.3 : Procédés d'extraction…….36

III : Voies de valorisation de la lignine……..43

III.1 : La lignine en tant que polymère……44

III.2 : Dépolymérisation de la lignine : vers la production de synthons biosourcés……49

IV : Les enzymes lignolytiques……..62

IV.1 : Les peroxydases…….....62

IV.2 : La laccase et le LMS.....65

IV.3 : Application à la lignine et ses dérivés.....71

IV. Conclusion.....74

Références bibliographiques.....76

I : Le bois : structure et composition

Le bois est un assemblage complexe qui joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'arbre. Ces fonctions sont multiples : la résistance mécanique du bois permet de soutenir la structure de l'arbre ; le bois possède une fonction de conduction de la sève au sein du végétal ; plusieurs substances indispensables à l'arbre sont stockées, libérées, produites ou transformées dans le bois[1].

I.1 : Structure macroscopique

La Figure 1 présente la configuration structurale du bois. On y distingue plusieurs couches concentriques ayant chacune une composition et un rôle spécifique. De l'extérieur vers l'intérieur le bois se compose[2] :

- de l'écorce, composée essentiellement de cellules mortes. Plus ou moins épaisse selon les espèces, elle protège l'arbre des attaques extérieures. L'écorce de l'arbre est rendue imperméable par la subérine (un polymère de structure complexe), et ses pores autorisent les échanges gazeux entre le bois et l'extérieur.

- du liber, ou écorce interne. Cette couche est traversée par des canaux de transport. Ceux-ci conduisent la sève et les minéraux générés au niveau des feuilles par photosynthèse vers les zones de l'arbre en croissance.

- du cambium, situé entre l'écorce et l'aubier. C'est cette couche qui assure la croissance de l'arbre. Le cambium engendre l'aubier vers le centre du bois et l'écorce vers l'extérieur.

- de l'aubier, composé de cellules vivantes et actives. Cette couche est générée par le cambium. Il y circule la sève brute provenant des racines. Riche en eau et en matières nutritives, c'est la zone la plus exposée aux attaques des insectes xylophages et des champignons lignolytiques. En allant vers le centre du bois, les cellules de l'aubier meurent et se transforment en bois parfait. C'est le phénomène de duraminisation.

- du duramen, aussi appelé bois parfait ou bois de cœur. Il est constitué d'une succession de couches appelées cernes. Dans les bois de zones tempérées, une nouvelle couche est produite chaque année. L'observation du nombre et de l'épaisseur des couches permet ainsi d'estimer l'âge de l'arbre. Un mélange de tannins, gomme et résine protège le bois de cœur des attaques extérieures (champignons, bactéries, insectes).
  On distingue deux types de bois au sein de chaque couche du duramen. Le bois dit « de printemps » est créé lors de la reprise de la croissance de l'arbre. Tendre et clair, il favorise la conduction de la sève. Le bois « d'été » correspond au ralentissement de la croissance à l'approche de l'hiver. Ce bois est plus dense, dur et coloré que le bois de printemps. Il apporte son soutien à l'arbre.

- de la moelle, qui se forme au début de la croissance du végétal et n'est plus modifiée par la suite.

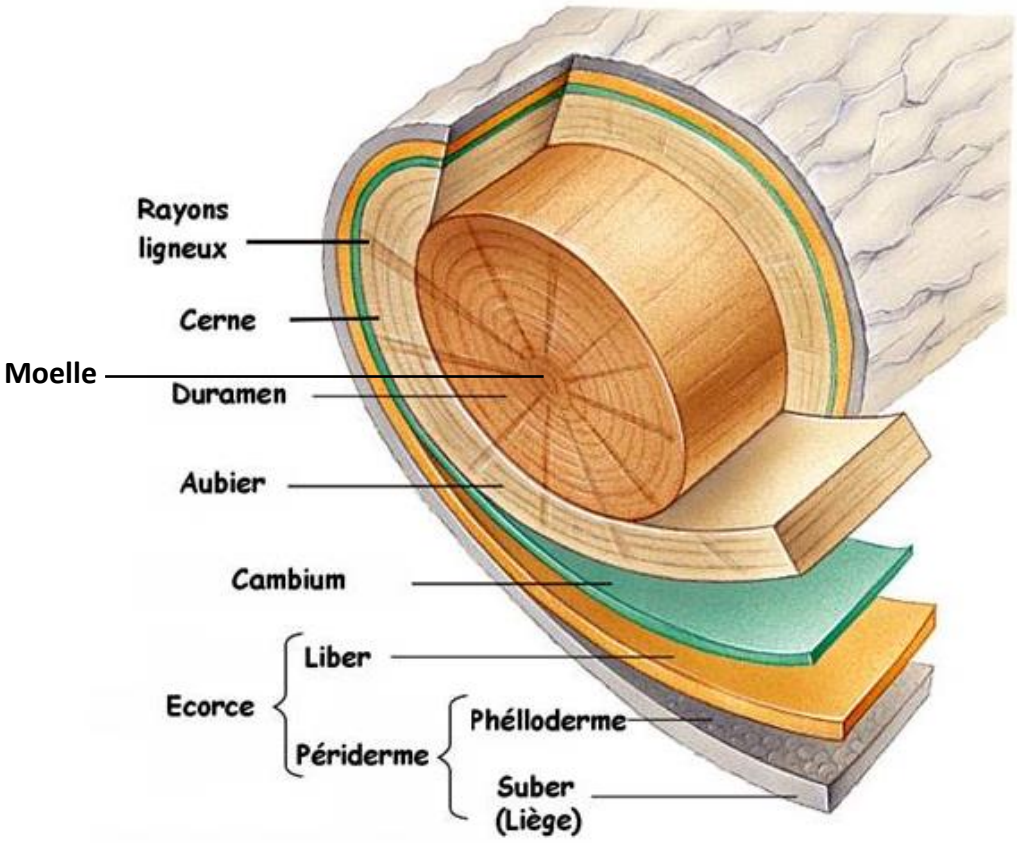


Figure 1 : Structure macroscopique du bois[3].

I.2 : Structure fine

À l'échelle microscopique, la paroi cellulaire est constituée de plusieurs couches, comme le montre la Figure 2[4]. De l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve tout d'abord la lamelle moyenne (LM) ou couche intercellulaire. Il s'agit d'une matrice principalement composées de substances pectiques et de lignine. La LM fait la jonction entre les parois primaires de plusieurs cellules. Elle mesure entre 0,5 et 1,5 µm.

Directement en contact avec la lamelle moyenne, la paroi primaire (P) est une fine couche élastique qui délimite la cellule végétale. Elle est constituée de microfibrilles de cellulose éparses disposées en spirale autour de l'axe de la cellule au sein d'une matrice amorphe principalement constituée de lignine. La paroi primaire est par ailleurs riche en eau. Ne mesurant que 0,1 µm, elle est souvent indissociable de la lamelle moyenne lorsqu'on observe la paroi au microscope optique.

Finalement, la paroi secondaire est la couche la plus épaisse de la paroi cellulaire (de 2 à 10 µm). Majoritairement composée de cellulose (Figure 3), elle apporte sa résistance mécanique à la cellule. La paroi secondaire est composée de trois couches successives qui différent par l'orientation des microfibrilles de cellulose et par leur épaisseur :

- La couche externe S1 présente des microfibrilles structurées en hélices autour de l'axe de la cellule, alternativement orientées vers la gauche et vers la droite. L'orientation des microfibrilles rend cette couche très résistante au gonflement. Elle mesure entre 0,2 et 0,3 µm (5 à 10% de l'épaisseur de la paroi secondaire).
- La couche centrale S2 est la couche la plus épaisse, elle représente 75 à 85 % de l'épaisseur totale de la paroi. La couche S2 dicte le comportement mécanique de la cellule. Les microfibrilles y sont disposées de façon parallèle dans une direction proche de l'axe de la paroi cellulaire.
- La couche interne S3 mesure entre 0,5 µm et 1 µm. Elle est constituée de microfibrilles orientées perpendiculairement à l'axe de la paroi cellulaire. Chez certaines espèces, on y observe des protubérances qui forment la paroi verruqueuse (W).

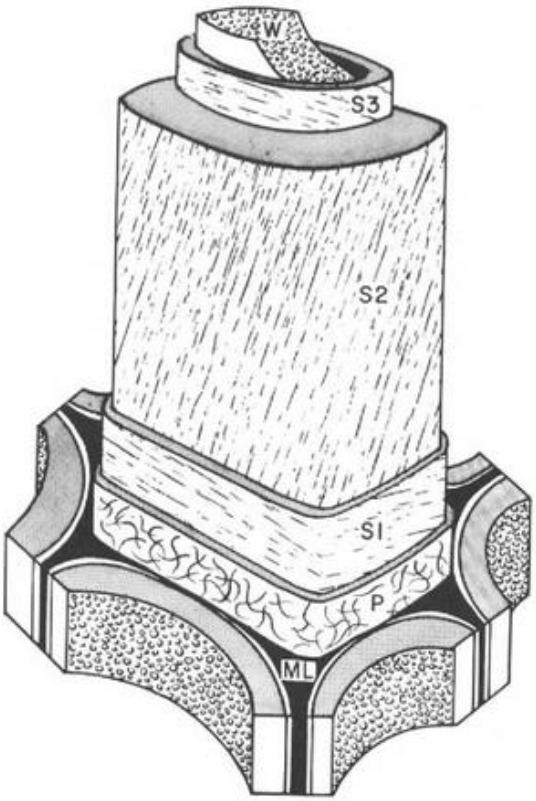


Figure 2 : Structure simplifiée d'une cellule de bois[4].

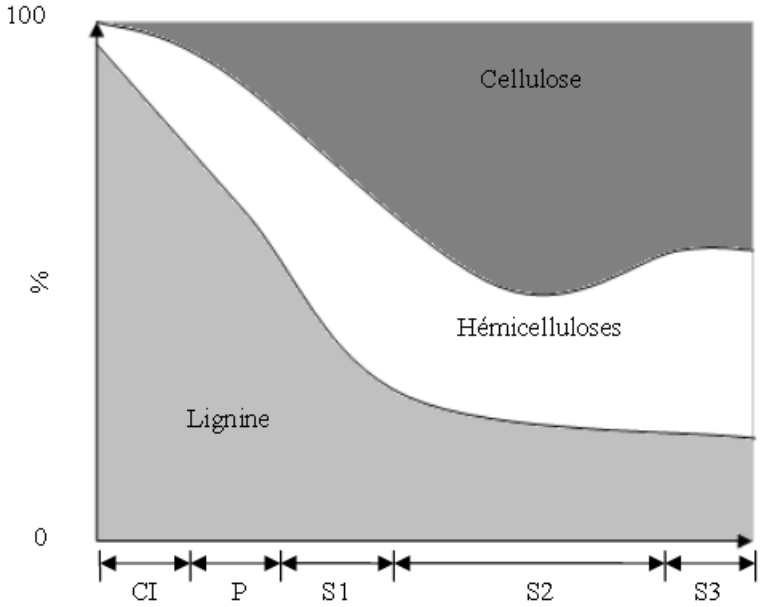


Figure 3 : Répartition des principaux constituants de la paroi cellulaire en fonction de la couche considérée[5].

I.3 : Composition chimique du bois

On distingue quatre types d'éléments constitutifs de la paroi cellulaire du végétal : la cellulose (40-50% de la masse totale), les hémicelluloses (20-35%), la lignine (15-35%) et les extractibles (3-10%).

La Figure 4 montre la structure supramoléculaire de la paroi cellulaire[6]. La cellulose - un polymère linéaire de forte masse molaire - est l'élément majoritaire du bois. Elle s'arrange en microfibrilles généralement constituées d'environ 1500 molécules parallèles entre elles. La lignine forme une matrice autour des fibres de celluloses pour assurer le renfort de la structure. Les hémicelluloses font le lien entre la lignine et la cellulose par des liaisons covalentes ou de types Van der Walls. Les extractibles sont des molécules de plus faibles masses molaires dont le rôle principal est de prévenir l'arbre de la décomposition.

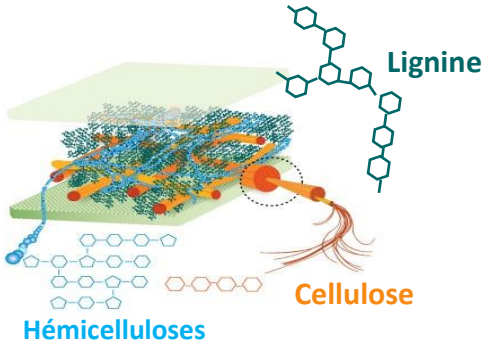


Figure 4 : Structure de la paroi cellulaire végétale[6].

Les paragraphes suivant décrivent plus en détails la structure et le rôle des principaux constituants du bois. Deux remarques essentielles sont à considérer avant de les aborder :

- La cellulose, la lignine et les hémicelluloses sont des espèces de fortes masses molaires intimement liées entre elles. Expérimentalement, il est quasiment impossible d'isoler chaque élément constitutif de la paroi cellulaire sans altérer et dégrader leur structure. La forte masse molaire des molécules, leurs nombreuses liaisons, et la cristallinité de certains éléments rendent cette séparation difficile. Aucune analyse directe de ces molécules à l'état « natif » n'est possible. Ainsi les structures proposées ne sont, au mieux, que des approximations.

- La composition du bois est dépendante de nombreux facteurs. L'espèce du végétal, son environnement, son âge ou encore la partie de l'arbre étudiée influent considérablement sur la constitution du bois. Les données évoquées ci-après sont donc des généralités applicables à la majorité des situations, mais certaines exceptions peuvent exister.

La cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant sur terre. Elle est le constituant principal de la paroi cellulaire des végétaux à qui elle confère sa structure. La cellulose est un polysaccharide linéaire dont le motif répétitif est la cellobiose, constituée de deux D-anhydroglucose liés en β-1,4 par liaison osidique (Figure 5).

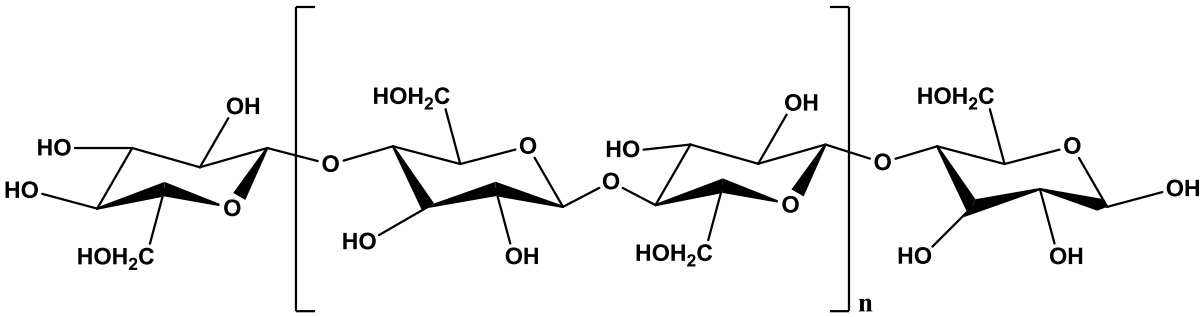


Figure 5 : Structure de la cellulose.

La cellulose est un polymère de forte masse molaire dont le degré de polymérisation (DP) est généralement compris entre 10 000 et 15 000, ce qui correspond à des molécules de 5 à 10 µm de longueur. Les chaines de cellulose ont une forte tendance à former des liaisons hydrogène inter- et intra-moléculaires par les nombreux groupements hydroxyle répartis le long du squelette. Ces liaisons entrainent la formation d'agrégats et le durcissement du système cellulosique. Dans les zones fortement agrégées, la cellulose est sous forme cristalline ; elle est amorphe dans les parties où les liaisons hydrogènes sont moins nombreuses. Le taux de cristallinité de la cellulose varie entre 50 et 70 %[7].

Cette cristallinité confère à la cellulose une forte résistance mécanique, chimique et enzymatique. La forte cohésion des liaisons hydrogène de la cellulose et sa masse molaire élevée rendent difficile voire impossible sa solubilisation dans l'eau et les solvants communs. L'utilisation de liquides ioniques semblent être une option intéressante pour la solubilisation de la cellulose[8].

Actuellement – et depuis des siècles - la cellulose est l'élément de la biomasse lignocellulosique le plus valorisé à l'échelle industrielle. Elle est principalement utilisée pour la production de pâte à papier qui représente un marché de 400 millions de tonnes par an, majoritairement employée pour l'emballage[9].

Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent 15 à 35% du bois. Principalement situées dans les parois primaires et secondaires de la cellule végétale, elles forment une famille de polysaccharides amorphes, souvent ramifiés et de plus faible masse molaire que la cellulose (DP inférieur à 200)[1].

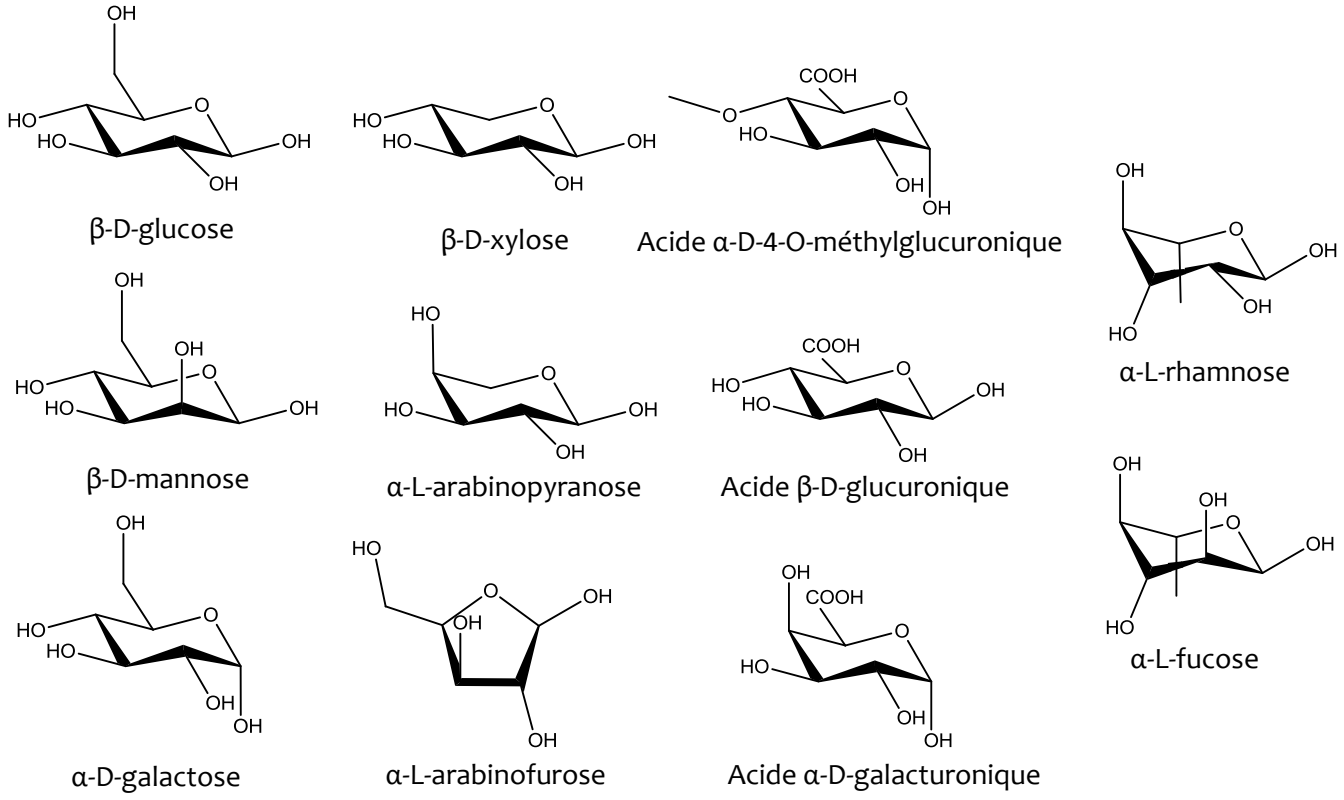


Figure 6 : Unités les plus représentées dans les hémicelluloses.

Les hémicelluloses possèdent une grande variété structurale. La Figure 6 présente les différentes unités dont les hémicelluloses sont constituées. On y retrouve des sucres de type pentose (xylose, arabinose) et hexose (mannose, glucose) qui composent les chaines principales des hémicelluloses, et des acides uroniques impliqués dans leurs ramifications. Parmi les hémicelluloses, certaines ne comptent qu'un seul type d'unité répétitive dans leur chaine ; c'est le cas des glucuronoxylanes présents en majorité chez les feuillus. D'autres sont des hétéropolymères et possèdent plusieurs types de motifs répétitifs dans leur squelette, comme le glucuronomannane des résineux.

Au sein de la paroi végétale, les hémicelluloses assurent le renfort de la cellule en faisant le lien entre la lignine et la cellulose. Ainsi, d'une part les hémicelluloses et la cellulose sont intimement liées par le biais de liaisons de type hydrogène et Van der Walls ; d'autre part, plusieurs auteurs ont montré l'existence de liaisons covalentes (ester et éther) entre la lignine et les hémicelluloses (Figure 7)[10,11]. Ces liaisons sont formées lors de la biosynthèse de la lignine et près de la moitié de la lignine est liée de façon covalente aux carbohydrates. L'existence de ces liaisons rend difficile la séparation des différents composés de la biomasse lignocellulosique, ce qui est un frein pour leur valorisation industrielle.

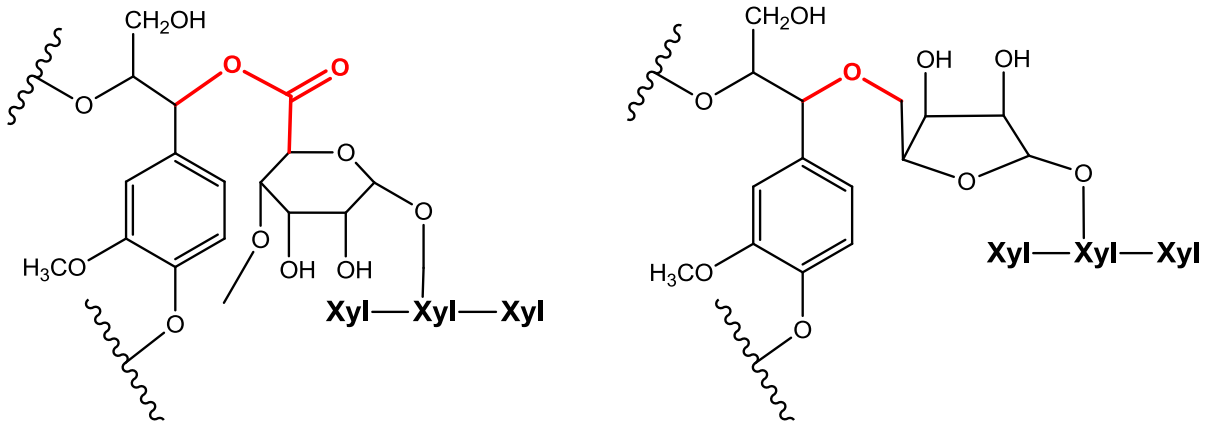


Figure 7 : Illustration des liaisons esters et éthers entre les hémicelluloses et la lignine[11].

Les principales recherches concernant la valorisation des hémicelluloses se sont concentrées vers leur conversion en éthanol comme source de carburant ou comme plateforme chimique[12]. Cette conversion comporte trois étapes : un prétraitement de la biomasse afin d'isoler les hémicelluloses, la dépolymérisation des hémicelluloses en sucres simples par hydrolyse (acide ou enzymatique), enfin la fermentation des sucres en éthanol. Pour l'instant, la difficulté d'obtenir des hémicelluloses pures et leur grande diversité ralentissent la mise en place de ce genre de procédé à l'échelle industrielle.

La lignine

La lignine est un polymère aromatique composé d'unités phénylpropane méthoxylées branchées de façon aléatoire. Elle forme un réseau tridimensionnel très complexe, de forte masse molaire, dont l'analyse structurale présente de nombreux challenges et a été l'objet de multiples études[13,14]. Comme pour les hémicelluloses, la lignine présente une grande diversité de structures et de fonctions dépendant notamment de l'origine de la plante considérée. Ainsi la lignine forme une classe de composés hétérogènes et il serait plus juste de parler de « lignines » bien que le terme soit peu employé.

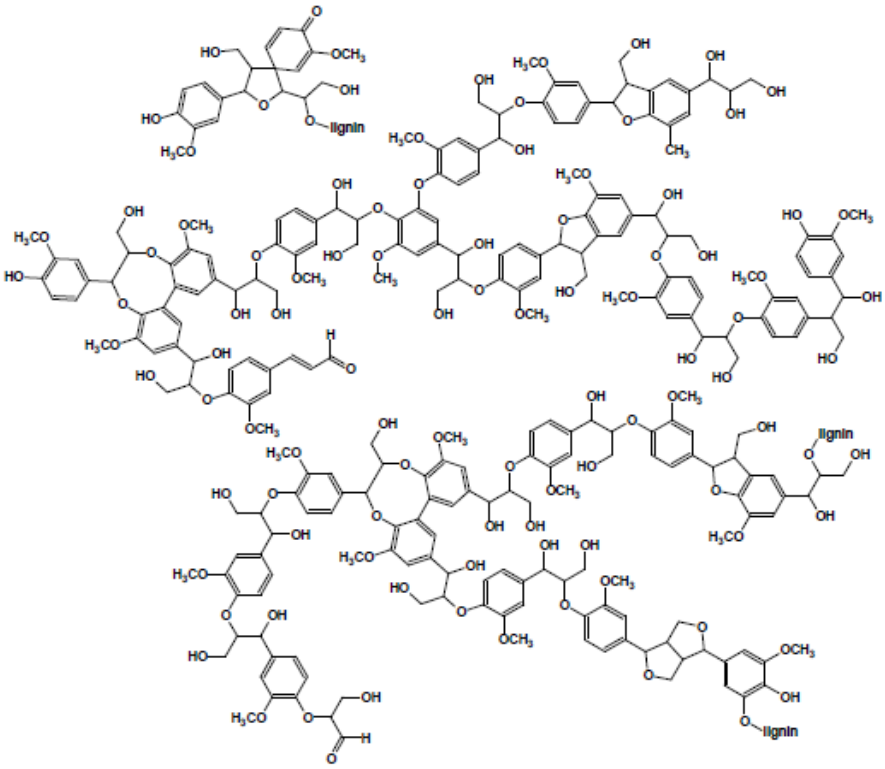


Figure 8 : Motifs structuraux d'une lignine de conifère[15].

Dans la nature, la lignine représente 20 à 30 % de la biomasse lignocellulosique et 40 % des réserves d'énergie contenues dans le bois. Elle est ainsi, et de loin, le biopolymère aromatique le plus abondant sur terre. Principalement située dans la lamelle mitoyenne de la paroi cellulaire, la lignine joue un rôle de matrice intimement liée aux polysaccharides afin d'assurer la cohésion de la structure. Par ailleurs, elle protège la cellule des attaques enzymatiques et assure le transport de l'eau dans le végétal[4].

Actuellement, l'industrie papetière génère à elle seule 70 millions de tonnes de lignine comme co-produit de son activité, en particulier dans les liqueurs de cuisson Kraft. Environ 95 % de cette lignine est brulée comme source de chaleur et d'énergie, procédé nécessaire à la régénération des réactifs de cuisson. La lignine restante est destinée à des applications de faible valeur ajoutée, notamment comme agent dispersant dans les ciments[16]. La forte complexité de la lignine, son hétérogénéité, ou encore son caractère insoluble découragent les industriels de tout investissement pour la valorisation de la lignine. Pourtant, sa structure aromatique, sa haute fonctionnalité et son abondance en font un candidat idéal pour la synthèse de produits chimiques à haute valeur ajoutée d'origine naturelle[17,18]. Les efforts de la communauté scientifique pour trouver des solutions aux problèmes liés à la lignine ont ouvert des voies prometteuses vers sa conversion en produits d'intérêt. Cependant, leur application à l'échelle industrielle nécessite encore plusieurs années de développement.

Les paragraphes suivant décrivent plus en détails les caractéristiques de la lignine ainsi que ses différentes voies de valorisation (actuelles ou futures).

II. La lignine : caractéristiques et modes d'extraction

II.1. Biosynthèse et structure chimique

Malgré plus de 50 ans d'étude, la structure exacte de la lignine native (protolignine) est toujours inconnue. De nombreuses structures ont été proposées notamment grâce à l'identification des produits de dégradation de la lignine et de ses composés modèles, parfois couplée à des études de marquage radioactif[19–21].

Aujourd'hui, les progrès effectués en spectroscopie RMN (HSQC) permettent la détermination rapide de la composition des motifs ainsi que de la distribution des liaisons de la lignine[22,23]. Afin de mieux appréhender cet aspect de la lignine, il est crucial de comprendre le procédé de biosynthèse à l'origine de ses caractéristiques structurales. C'est l'objet du paragraphe suivant.

Biosynthèse

La biosynthèse de la lignine est normalement programmée pour le développement du végétal, mais elle peut aussi être déclenchée par des événements précis comme une attaque fongique ou bactérienne, une blessure ou autres perturbations de l'arbre[24].

Trois monomères phénoliques servent de précurseurs pour la polymérisation de la lignine (Figure 9-a). Il s'agit des alcools p-coumarylique (dont découlent les unités hydroxyphényle H), coniférylique (unités guaïacyle G), et synapylique (unités syringyle S), tous biosynthétisés à partir de la phénylalanine par une cascade de réactions enzymatiques. Chacun de ces monolignols diffère par le nombre de groupements méthoxyle présents en position 3 et 5 de leur noyau aromatique. La proportion de chacun de ces précurseurs dépend de l'origine de la plante et influe directement sur les motifs et liaisons présents dans la lignine native.

La polymérisation de la lignine débute par l'oxydation radicalaire (déshydrogénation) des monolignols. Cette étape est gouvernée par des enzymes oxydantes de type peroxydases et/ou laccases. Les espèces radicalaires formées sont stabilisées par la délocalisation de l'électron libre au sein d'un système conjugué (Figure 9-b). Lors de la deuxième étape, deux motifs radicalaires peuvent se coupler et former un dimère. La Figure 9-b illustre les différentes positions où ces couplages peuvent avoir lieu. Les possibilités de liaisons sont multiples et les réactions radicalaires ne sont pas contrôlées ; c'est pourquoi on retrouve une grande variété de liaisons dans la structure de la lignine[25]. Le dimère formé peut à nouveau être déshydrogéné en espèce radicalaire (soit directement par l'enzyme, soit par transfert radicalaire) capable de se coupler à un nouveau phénol radicalaire. Le procédé se répète jusqu'à l'obtention d'un polymère de

lignine (généralement jusqu'à un DP allant de 13 à 20). Les intermédiaires radicalaires les plus stables sont ceux où le radical est porté par l'oxygène phénolique et par le carbone en position β. Ainsi, la liaison entre ces deux intermédiaires (β-O-4) est prépondérante dans la lignine.

En 1965, Freudenberg a été le premier à reproduire cette biosynthèse in vitro en faisant réagir l'alcool coniférylique et la laccase[26]. La lignine de synthèse ainsi obtenue fut qualifiée de DHP (polymère de déshydrogénation) et présentait des caractéristiques proches de celles d'une lignine moulue issue du pin.

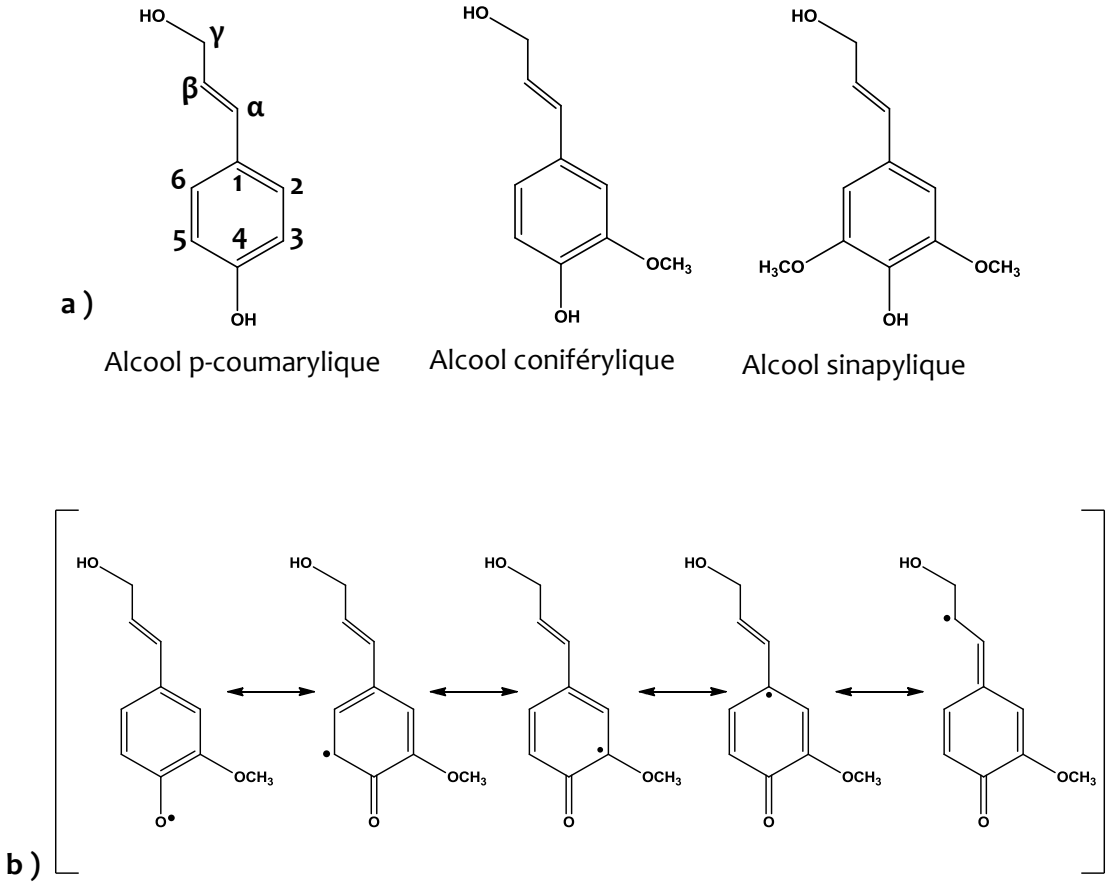


Figure 9 : a) Les trois précurseurs de la lignine. b) Exemple de formes radicalaires à l'origine de la lignification.

Structure

Une convention a été mise en place afin de classifier les différents types de liaisons que l'on peut retrouver chez la lignine. Les carbones du noyau aromatique sont numérotés de 1 à 6, et les carbones présents sur la chaine aliphatique sont dénommés α, β et γ (Figure 10). Ainsi une liaison de type β-O-4 fait référence à une liaison entre le carbone aliphatique en position β d'un monolignol et un oxygène lié à un carbone en position 4 sur le noyau aromatique d'un autre motif.

On considère communément deux familles de liaisons : d'une part les liaisons éthers, potentiellement hydrolysables, composées des liaisons β-O-4, α-O-4, et 4-O-5 ; d'autre part les liaisons carbone-carbone, dites « condensées », beaucoup plus récalcitrantes à la dégradation. La Figure 10 présente les principales liaisons inter-unités de la lignine.

Les liaisons β-O-4 (aryl-éther) sont les liaisons les plus répandues (environ 50 %). Ce sont les liaisons principalement ciblées dans les procédés industriels de délignification. Les autres liaisons (β-5, β- β etc.) sont bien plus difficiles à cliver. Trouver des méthodes afin de rompre ces liaisons sélectivement tout en préservant la nature aromatique de la lignine représente un des enjeux majeurs pour la valorisation de la lignine. De plus, la composition des motifs et la distribution des liaisons sont hautement dépendantes de la nature de la lignine. Il est donc indispensable de cibler un type de lignine précis selon les applications visées.

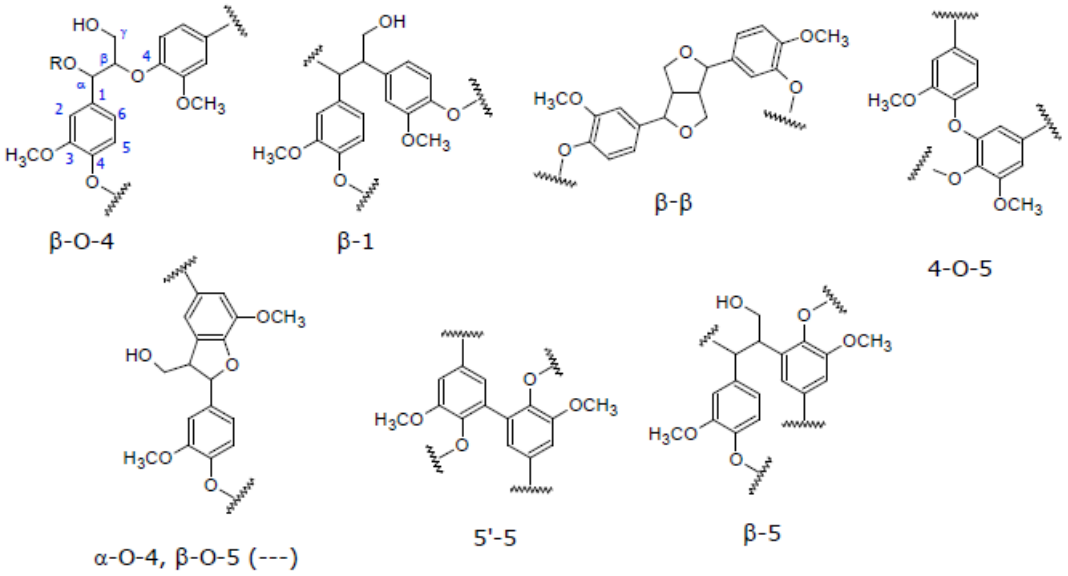


Figure 10 : Principales liaisons inter-motifs de la lignine.

II.2. Source et variétés des lignines

La grande hétérogénéité des lignines est un des freins les plus importants pour leur valorisation industrielle. En effet, les caractéristiques d'une lignine varient considérablement selon l'origine de la plante, son âge, son environnement ou encore la zone de la paroi considérée. Il est tout simplement impossible d'évaluer la quantité de lignines différentes présentes dans le monde.

Par convention, les lignines sont classées en trois grandes familles : les lignines de résineux (gymnospermes), les lignines de feuillus (angiosperme), et les lignines d'herbacées. Ces lignines diffèrent notamment par leur composition en unités répétitives. Comme le montre le Tableau I, les lignines de bois résineux sont principalement composées de motifs guaïacyle (G), celles issues de feuillus comportent des unités G et S, et trois motifs différents (S, G et H) sont présents dans les lignines d'herbacées. Il est important de noter que de grandes diversités peuvent aussi exister dans une même famille de lignine, notamment chez les feuillus où la quantité de motifs G peut varier du simple au double. La Figure 11 montre comment la RMN 2D permet de distinguer les motifs présents au sein de différentes lignines[27].

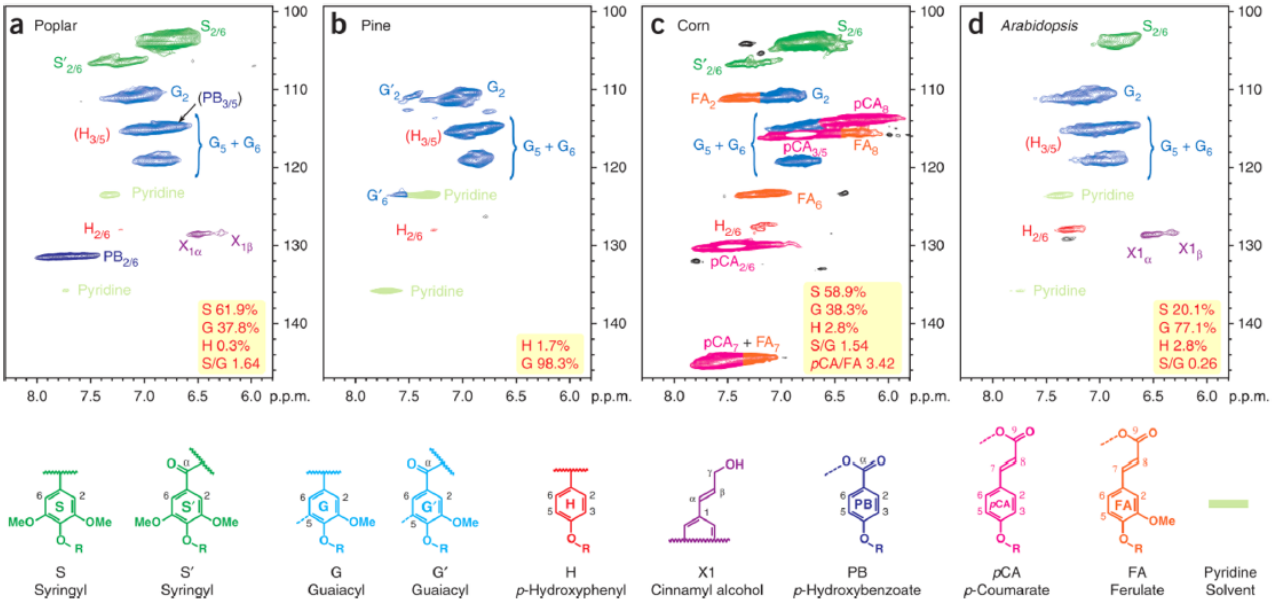


Figure 11 : Spectres RMN 2D (HSQC) mettant en évidence les différences de compositions selon l'origine des lignines[27].

Les disparités entre les motifs constitutifs des différentes lignines entrainent des variations importantes en termes de fonctionnalité et de distribution des types de liaisons (Tableau II). Ainsi les lignines de feuillus (aussi appelées lignines S/G) comportent un taux de fonctions méthoxyle plus important que les autres lignines. Les lignines de conifères sont essentiellement composées de motifs G dans lesquels le carbone en position 5 est libre. Ces lignines sont ainsi plus prédisposées aux réactions de couplage, ce qui explique leur proportion plus importante de liaisons 5-5 et leur masse molaire généralement plus élevée que celle des lignines S/G.

Tableau I : Abondance de chaque motif dans les différents types de lignine[23].

Précurseur	Herbacée	Conifère	Feuillu
Alcool sinapylique (S)	25 – 50 %	0 – 1 %	50 – 75 %
Alcool coniférylique (G)	25 – 50 %	90 – 95 %	25 – 50 %
Alcool p-coumarylique (H)	10 – 25 %	0,5 – 3,4 %	Trace

Tableau II : Proportion de chaque liaison et groupement fonctionnel dans les lignines de conifères et de feuillus.

	Nombre / 100 unités			Nombre / 100 unités	
Liaison	**Conifère**	**Feuillu**	**Groupement fonctionnel**	**Conifère**	**Feuillu**
β-0-4	43 - 50	50 - 65	**Méthoxyle**	92 – 96	132 – 146
β-5	9 – 12	4 – 6	**Hydroxyle phénolique**	20 – 28	9 - 20
α-O-4	6 – 8	4 – 8	**Hydroxyle benzylique**	16	
β-β	2 – 4	3 – 7	**Hydroxyle aliphatique**	120	
5-5	10 – 25	4 – 10	**Carbonyle**	20	3 – 17
4-O-5	4	6 – 7	**Carboxyle**		11 – 13
β-1	3 – 7	5 – 7			

Les considérations précédentes sont valables pour les lignines dites « natives » ou protolignines. Cependant il n'est pas possible d'isoler directement ces lignines sans fortement altérer leur structure. Ainsi le procédé d'extraction est un élément clé dans l'étude des lignines. Celui-ci va influer sur la structure, les fonctions et la masse molaire de la lignine extraite.

II.3 : Procédés d'extraction

Comme évoqué précédemment, la lignine est intimement liée aux hémicelluloses et à la cellulose dans la paroi cellulaire des végétaux. Sa forte masse molaire et son caractère tridimensionnel la rendent insoluble dans la plupart des solvants usuels. Aussi, l'isolation de la lignine nécessite des traitements visant à rompre les liaisons entre les différents constituants lignocellulosiques et à fonctionnaliser et dépolymériser la lignine afin d'améliorer sa solubilité.

La séparation des différents composés de la lignocellulose est un enjeu majeur pour l'industrie papetière, principalement pour l'obtention de fibres de cellulose de haute qualité. C'est ainsi que les procédés de cuisson kraft et bisulphite acide ont été développés[2]. À l'heure actuelle ce sont les deux seuls procédés utilisés à l'échelle industrielle, ils génèrent près de 70 millions de tonnes de lignine chaque année. Récemment, la société canadienne Lignol Innovation a lancé la commercialisation d'une lignine de haute pureté obtenue selon un procédé organosolv (extraction de la lignine par les solvants organiques).

De nombreuses autres méthodes de traitements (enzymatiques, mécaniques, chimiques) sont en cours de développement. Chaque méthode utilisée pour isoler la lignine a un fort impact sur la structure et les propriétés du produit obtenu. Il est alors clair que le procédé d'extraction et l'application visée sont directement liés. Par exemple, le procédé bisulphite génère des lignines de masses molaires élevées contenant généralement un fort taux d'impuretés. Ces lignines sont parfaitement adaptées à des applications en tant que dispersants dans les ciments, mais seraient d'intérêt limité pour l'obtention de molécules aromatiques pour l'industrie chimique.

Les paragraphes suivant décrivent les principales méthodes d'isolation de la lignine.

La lignine kraft

C'est le procédé industriel le plus répandu dans le monde, largement utilisé par l'industrie papetière depuis près d'un siècle. La lignine kraft représente 85 % des lignines techniques produites. Lors de la cuisson kraft, les copeaux de bois sont traités à 170°C pendant deux heures à pH élevé en présence de soude (NaOH) et de sulfure de sodium (Na_2S)[28]. Après cuisson, une liqueur noire est obtenue contenant approximativement 40 % de lignine, des hémicelluloses ainsi qu'un grand nombre de composés inorganiques issus des produits de cuisson. Cette liqueur noire est généralement concentrée puis brulée dans des chaudières de récupération afin de fournir de l'énergie et de recycler les produits chimiques de cuisson. Alternativement, la lignine peut être isolée de la liqueur de cuisson par précipitation en acidifiant le milieu.

La lignine traitée par le procédé kraft est soumise à deux types de réactions antagonistes lors de la cuisson : les réactions de dépolymérisation et de condensation. La Figure 12 montre les mécanismes de rupture des liaisons aryl-éther[29]. Ces réactions sont le mode de dégradation principal lors de la cuisson kraft de la lignine. Les unités possédant des fonctions hydroxyles phénoliques libres sont les plus faciles à rompre (Figure 12, voie A). La rupture des liaisons impliquant des motifs non-phénoliques est beaucoup plus délicate et nécessite l'attaque d'un ion alcoolate présent en position α (Figure 12, voie B). La rupture des liaisons β-O-4 entraine une forte diminution de la masse molaire de la lignine et une augmentation de la quantité de phénols libres, ce qui rend la lignine hautement soluble en milieu alcalin.

Lors de la cuisson, des carbanions dérivés de la lignine sont formés. Ces espèces nucléophiles peuvent s'additionner aux structures de type quinone et concurrencer l'attaque des ions hydrosulfures (Figure 13). Si le groupement en α de la liaison est un mauvais groupe partant, la réaction de condensation est favorisée. Se formera alors une nouvelle liaison, dite condensée, très difficile à rompre. Plus la durée de cuisson est élevée, plus le nombre de ces liaisons sera important.

Ainsi les lignines issues du procédé kraft sont fortement altérées par rapport aux lignines natives. Elles possèdent généralement une masse molaire assez faible (environ 2000 g/mol) ; la plupart des liaisons β-O-4 ont été rompues et de nouvelles liaisons ont été créées. Le taux de soufre varie de 1 à 2 %.

Il est important de noter que bien que la production de lignine kraft représente de loin le plus gros volume de lignine générée, seulement une infime partie de cette lignine est disponible (0,1 %). Le processus de combustion de la liqueur noire pour la production d'énergie et la régénération des réactifs de cuisson est indispensable pour le fonctionnement des usines papetières. Cependant, 10 à 20% de la lignine issue de la liqueur noire pourrait être utilisée à d'autres fins sans porter préjudice aux papèteries[30].

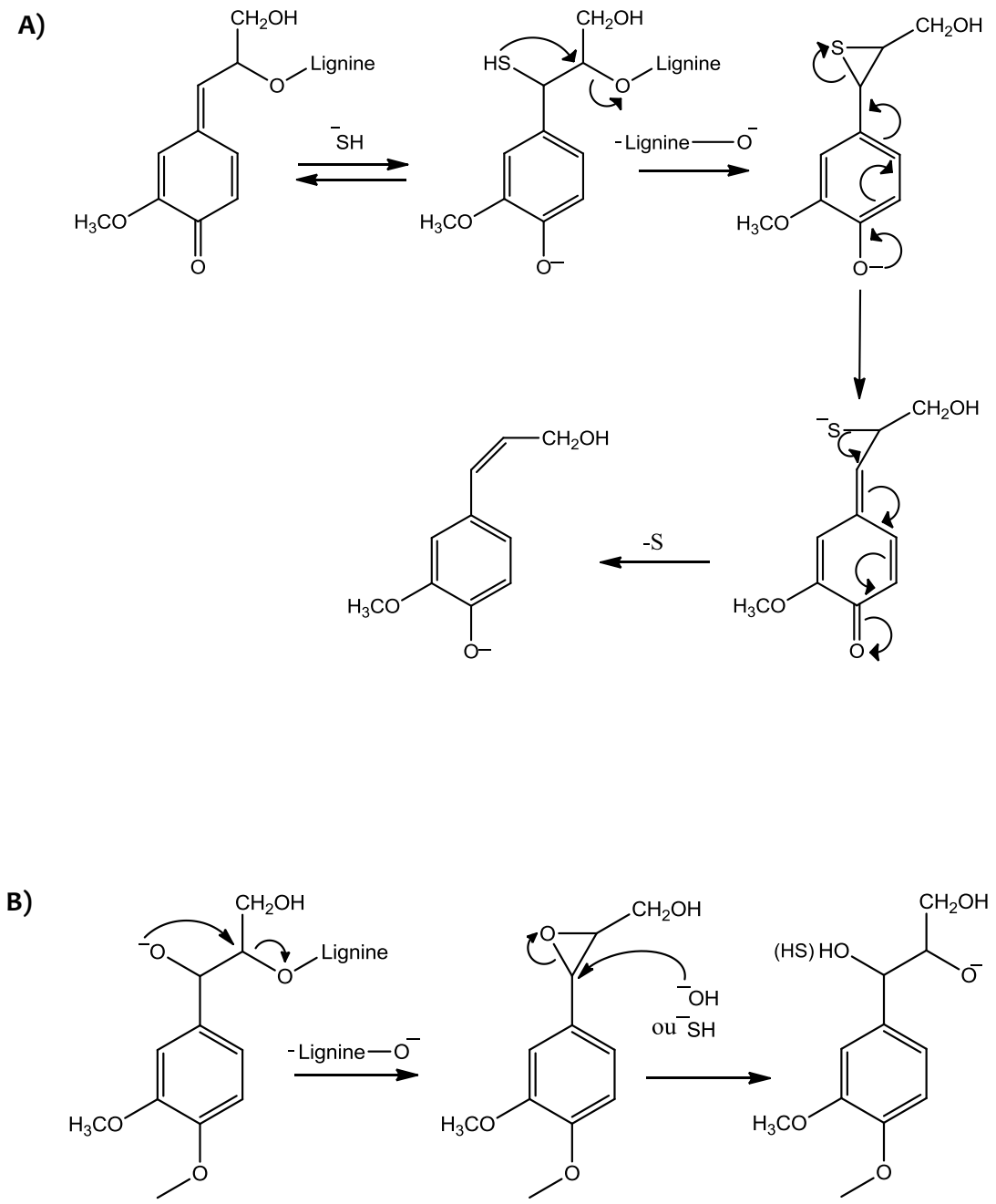


Figure 12 : Mécanismes de rupture des liaisons β-O-4 durant le procédé kraft. A) Motif phénolique B) Motif non phénolique[28].

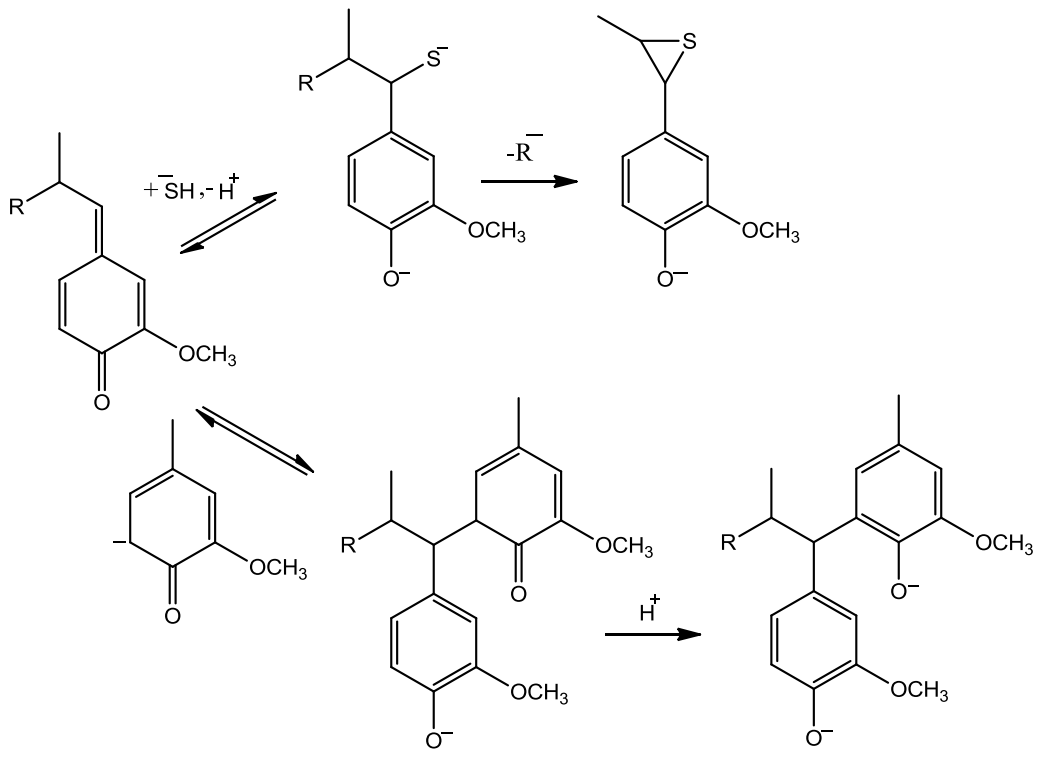


Figure 13 : Formation de liaison condensée lors du procédé kraft[28].

Les lignosulfonates

Les lignines de type lignosulfonate sont issues du procédé bisulfite développé par l'industrie papetière, comme le procédé kraft. Lors de ce procédé, la biomasse est traitée à pH acide à des températures de l'ordre de 120 à 140°C en présence d'ions HSO_3^- et SO_3^{2-}. Ce traitement entraine principalement la rupture des liaisons α-O-4 de la lignine selon le mécanisme présenté en Figure 14[15]. Les lignosulfonates sont rendues hautement solubles dans l'eau à tous pH par l'addition de groupements sulfonates en position α ou β. Cette grande solubilité des lignines issues du procédé bisulfite permet d'isoler des fragments de fortes masses molaires, généralement entre 10 000 et 20 000 g/mol.

Les lignosulfonates sont des lignines riches en groupements fonctionnels (hydroxyle, carbonyle, sulfonate) qui lui confèrent des propriétés colloïdales uniques. Ces caractéristiques particulières ont permis la valorisation des lignosulfonates pour des applications industrielles en tant que dispersant, agent tensioactif ou encore dans les résines échangeuses d'ions[31,32]. Par ailleurs, ces lignines sont employées comme source de vanilline synthétique biosourcée[33,34]. Avec près d'un million de tonnes produit par an, ce sont les seuls dérivés de lignine commercialisés à large échelle. La bioraffinerie Borregaard lignotech (Norvège) et la papèterie Tembec (France et Canada) sont les principaux producteurs de lignosulfonates.

Généralement les lignosulfonates possèdent un taux important d'impuretés (sucres, cendre et matériaux inorganiques issus de la cuisson). Ces impuretés rendent difficile la valorisation de ces lignines en applications à haute valeur ajoutée.

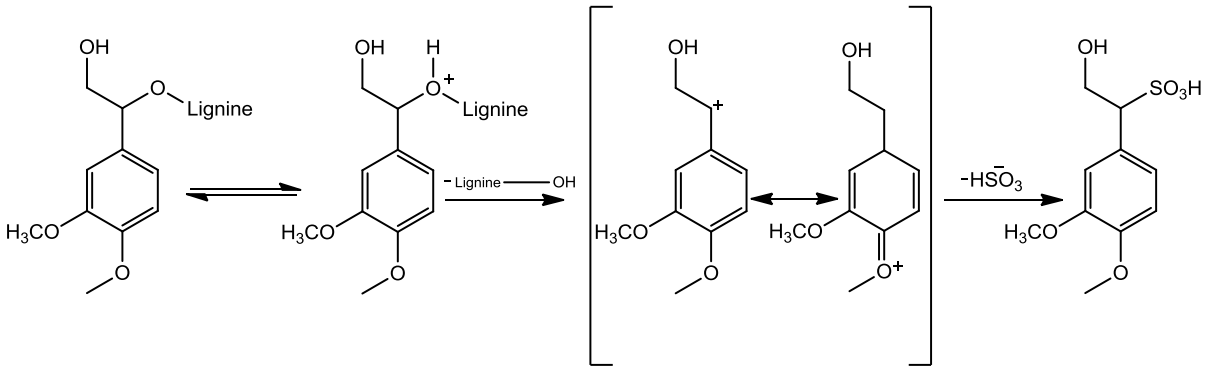


Figure 14 : Mécanisme de rupture de la liaison α-O-4 lors du procédé bisulfite[35].

Les lignines organosolv

Lors du procédé Organosolv les hémicelluloses et la lignine sont solubilisées et séparées de la cellulose par un mélange de solvant organique et d'eau. Les hémicelluloses sont ensuite précipitées dans l'éthanol et une lignine de haute pureté est obtenue après distillation des solvants (qui sont ainsi recyclés)[36].

Les solvants les plus communément utilisés lors du traitement Organosolv sont l'acide formique, l'acide acétique, le méthanol et l'éthanol. Un catalyseur acide (sulfurique ou chlorhydrique) est généralement employé pour augmenter le rendement d'extraction. Un excès de catalyseur peut cependant entrainer la formation de liaisons condensées indésirables[37]. Une grande variété de procédés ont été développés jusqu'à l'échelle pilote, tels les procédés Organocell, ASAM, FormicoFil, CIMV et Acetosolv[38].

Bien que moins polluant, le procédé Organosolv n'est pour l'instant pas assez rentable pour pouvoir remplacer les procédés papetiers déjà en place. En effet, la pâte à papier obtenue est de moins bonne qualité et le recyclage des solvants coûte cher. Une meilleure stratégie consiste à valoriser la cellulose pour la production de bioéthanol. Cette stratégie a été appliquée par la société Lignol Innovations Ldt, basée à Vancouver. Leur procédé permet la production d'éthanol cellulosique, d'une lignine Organosolv de haute pureté et de furfural issu des hémicelluloses. C'est à ce jour la seule source commerciale de lignine organosolv. Celle-ci est principalement utilisée comme liant dans les encres et les peintures[39].

Le procédé Organosolv est un traitement doux qui altère peu la structure de la lignine, contrairement aux procédés kraft et bisulfite. Une lignine de faible masse molaire est obtenue avec une pureté élevée et de nombreuses fonctions disponibles pour des modifications chimiques ou enzymatiques[40]. Ces caractéristiques font des lignines organosolv des candidats de choix comme source de molécules phénoliques ou aromatiques de faible poids moléculaire. Le principal désavantage de ces lignines est leur très faible solubilité dans l'eau.

Le Tableau suivant récapitule les caractéristiques des lignines issues des trois principaux procédés d'extraction :

Tableau III : Propriétés des lignines selon leur mode d'extraction[15].

Propriété	Lignines kraft	Lignosulfonates	Lignines organosolv
Masse molaire (g/mol)	2 000 – 3 000	20 000 – 50 000	< 2 000
M_w monomère (g/mol)	180	215 – 254	188
Dispersité	2 – 4	6 – 8	2,4 – 6,4
Taux de soufre (%)	1 – 1,5	4 - 8	0
Solubilité	Soluble dans l'eau alcaline (pH > 10)	Soluble dans l'eau (tous pH)	Soluble dans l'eau alcaline et plusieurs solvants organiques

Autres procédés

L'extraction de fractions pures de lignine a été l'objet de nombreuses études et une importante diversité de procédés ont été développés de l'échelle du laboratoire jusqu'au pilote. Ces techniques sont généralement classées selon trois types : chimique, enzymatique et mécanique.

Les lignines alcalines sont obtenues selon le procédé soda développé par l'industrie papetière[41]. La biomasse est traitée à pH élevé en présence d'anthraquinone catalysant la dépolymérisation de la lignine. Ce traitement est principalement appliqué sur des plantes de types herbacées. Ainsi la lignine extraite est beaucoup plus riche en motifs p-hydroxyphényle que les lignines issues d'arbres[42]. Les lignines alcalines trouvent leur application principale comme additifs dans les aliments pour animaux[43].

Les bioraffineries s'intéressent depuis une dizaine d'années à la production d'éthanol provenant de la fermentation de sucres dérivés de la cellulose[44]. Pour cela, la biomasse subit un premier prétraitement destiné à améliorer l'accessibilité des fibres de cellulose. Ce prétraitement peut être physique (broyage du bois avec des billes céramiques), biologique (à l'aide de champignons de pourriture blanche ou marron) ou chimique (gonflement des fibres à la soude)[45]. Il est suivi d'une hydrolyse enzymatique ou chimique de la cellulose et des hémicelluloses qui permet la dissolution des sucres destinés à la fermentation. La lignine représente le résidu solide de ce traitement et peut être isolée du reste des constituants. Elle est généralement de masse molaire élevée, présente de nombreuses liaisons condensées, et possède d'importante propriétés d'adsorption[46,47].

La lignine pyrolytique est issue du traitement de la biomasse à très haute température et en absence d'oxygène. Elle est isolée par précipitation de la biohuile obtenue dans l'eau glacée. L'avantage principal de cette technique est sa versatilité : elle peut être appliquée à toute source lignocellulosique. La lignine pyrolytique possède une faible masse molaire et sa structure est hautement modifiée (dépolymérisation et formation de nouvelles liaisons en C5). Ces particularités suggèrent qu'il serait possible d'obtenir des molécules différentes à partir de lignine pyrolytique.

Il est également possible d'obtenir des lignines de faibles masses molaires par la technique d'explosion à la vapeur. Pendant ce procédé, la biomasse subit une imprégnation de vapeur sous haute pression, suivie d'une rapide libération de la vapeur. Cette technique permet de séparer les trois composants de la biomasse lignocellulosique et d'isoler une lignine hautement soluble dans les solvants organiques, très proche des lignines organosolv. Les lignines extraites par ce traitement possèdent un fort potentiel comme source de composés aromatiques de faibles masses molaires. Cependant, comme pour les lignines organosolv, la pâte à papier extraite est de trop faible qualité pour pouvoir être exploitée industriellement.

Plus récemment, il a été montré que la lignine pouvait être isolée du reste des constituants de la biomasse par l'action de solvants de type liquide ionique[48]. Les liquides ioniques suscitent un grand intérêt dans la communauté scientifique. Ils sont considérés comme des solvants respectueux de l'environnement et sont généralement recyclables[49]. La grande versatilité des liquides ioniques permet d'ajuster leurs propriétés afin de solubiliser sélectivement la lignine en préservant au mieux sa structure[50]. Pour ces différentes raisons, l'utilisation de liquides ioniques en association avec la lignine est une voie très prometteuse.

III. Voies de valorisation de la lignine

Comme l'ont montré les paragraphes précédents, la lignine est un biopolymère aux caractéristiques singulières. Sa structure aromatique, ses propriétés physico-chimiques et sa relative abondance attirent l'attention des milieux scientifiques et industriels de façon croissante. La complexité et l'hétérogénéité des lignines font de leur valorisation un véritable défi.

Aujourd'hui la lignine est principalement utilisée comme source d'énergie dans l'industrie papetière. D'autres applications commerciales sont en place depuis plusieurs années exploitant les propriétés tensioactives de la lignine dans les bétons notamment. Ces voies de valorisation utilisent la lignine en tant que polymère de faible valeur ajoutée. D'autres stratégies à plus fort potentiel font l'objet de nombreuses études. Elles exploitent le potentiel de la lignine comme source de molécules plateforme pour l'industrie chimique. Ces molécules de faibles masses molaires représenteraient une alternative d'origine naturelle aux molécules issues de la pétrochimie, et pourraient être un des éléments-clé des futures bioraffineries[51].

Les paragraphes suivant décrivent les principales voies de valorisation des lignines.

III.1. La lignine en tant que polymère

Dans un grand nombre d'applications, la lignine est utilisée en tant que polymère avec très peu de modifications, voire aucune. Bien que la plupart de ces applications soient commerciales, elles sont généralement de faible valeur ajoutée et sont situées sur des marchés où la croissance est faible.

Agent dispersant dans les bétons et ciments

Près d'un million de tonnes de lignosulfonates est employé chaque année par l'industrie de la construction dans les ciments et bétons. C'est de loin l'application commerciale la plus importante à l'heure actuelle[52]. Les lignosulfonates y sont utilisées comme plastifiant et dispersant. En effet, l'ajout de 0,1 à 0,3 % (w/w) de lignines dans des mélanges de ciment permet d'augmenter leur fluidité. Le ciment devient ainsi plus maniable et il est possible de diminuer la quantité d'eau dans le mélange jusqu'à 15 %[53]. Les ciments obtenus sont plus denses et résistants. Les principaux atouts des lignines pour ce type d'applications sont leur faible coût et leur non toxicité. Cependant leurs performances sont moins bonnes que celles d'autres plastifiants synthétiques, et les contraintes de plus en plus exigeantes liées à la construction nécessitent l'emploi de « super plastifiants » de type polycarboxylates.

Fibres de carbone / noir de carbone

La structure aromatique et le taux élevé de carbone de la lignine en font un candidat de choix comme précurseur de fibres de carbone ou comme substitut au noir de carbone. Depuis le début des années 90, des fibres de carbone sont obtenues à partir de lignine selon le procédé « melt spinning » suivi d'une carbonisation (traitement à haute température sous une atmosphère d'azote et d'hydrogène)[54]. Acétyler la lignine avant le traitement permet de faciliter l'étape de melt spinning (Figure 15)[55]. Après extrusion, les fibres de carbone obtenues présentent de bonnes caractéristiques mécaniques. Elles représentent une alternative biosourcée et peu coûteuse aux fibres conventionnelles synthétisées à partir de polyacrylonitrile.

La carbonisation de la lignine suivi par une étape de broyage permet d'obtenir de fines particules aux propriétés similaires à celles du noir de carbone[56]. Ce noir de carbone issu de la lignine pourrait trouver des applications en tant que charge dans des matrices polymères ou dans des composites conducteurs.

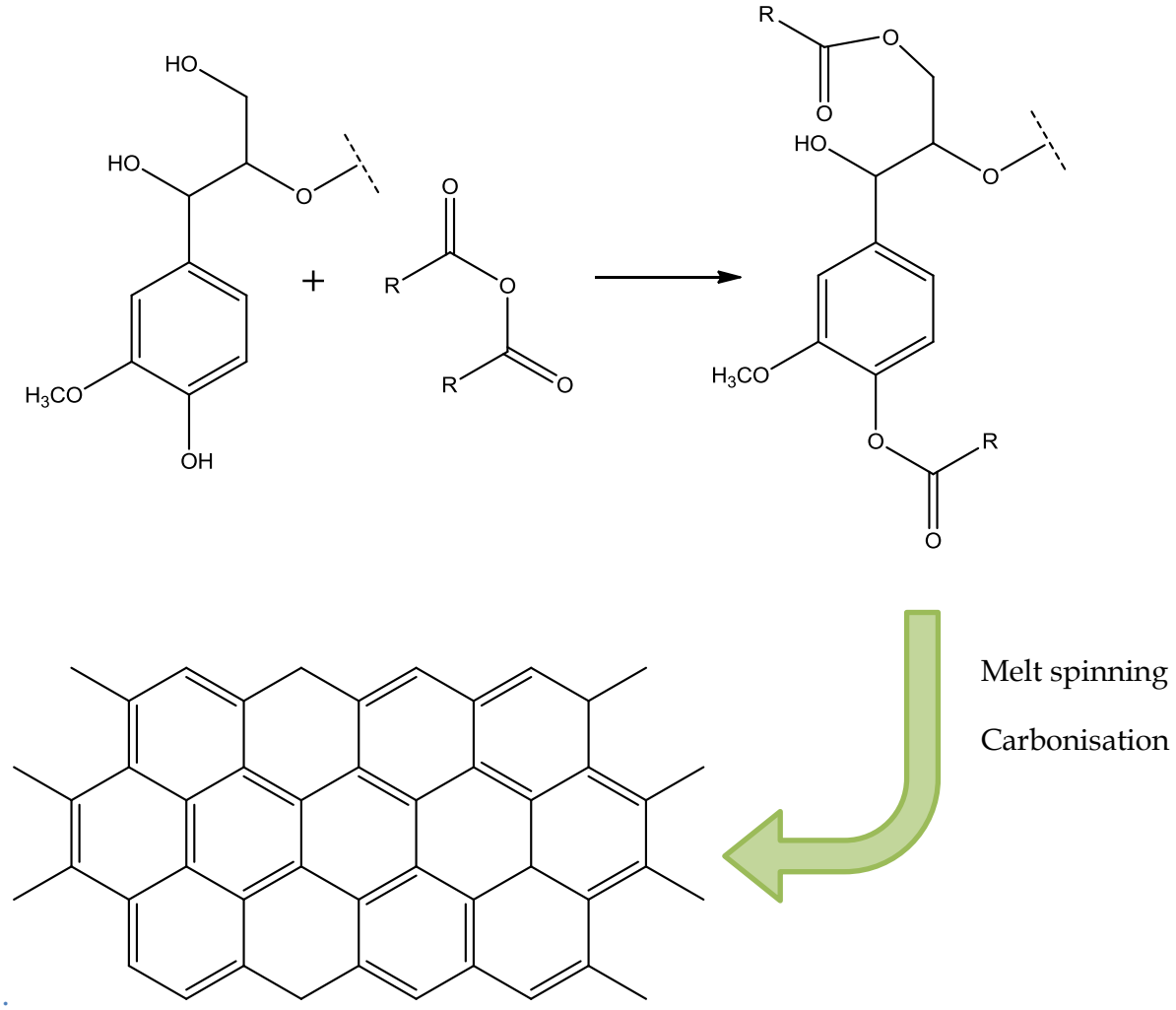


Figure 15 : Synthèse de fibres de carbone à partir de lignine acétylée[55]

Association lignine – polymères

La lignine peut être incorporée dans des matrices polymères soit comme charge de faible coût, soit comme additif permettant l'amélioration des propriétés du matériau. Les principales améliorations que la lignine peut apporter incluent la stabilisation aux UV, l'apport de propriétés antibactériennes, le renfort mécanique et thermique, ou encore la baisse de toxicité du matériau. Un des challenges les plus importants réside dans la modification chimique de la lignine afin d'améliorer sa compatibilité avec les polymères. Il s'agit de trouver un procédé efficace, économiquement viable, et adaptable à tout type de lignines.

Les polyuréthanes (PU) sont traditionnellement synthétisés à partir de polyols et de di- ou poly-isocyanates[57]. Le nombre important de groupements hydroxyle contenus dans la lignine permet son emploi comme substitut des polyols dans la formulation de polyuréthanes. Avant la synthèse du PU, la lignine est généralement fonctionnalisée avec de l'oxyde de propylène afin d'améliorer sa fluidité et d'augmenter sa réactivité[58]. Il a été montré que les mousses contenant de la lignine présentent une meilleure tolérance aux conditions de température et d'humidité élevées, ce qui limite l'émission d'espèces volatiles toxiques lors de la dégradation du matériau. Les PU classiques sont cependant plus résistants à l'abrasion. Bien que cette voie de valorisation des lignines soit prometteuses, celle-ci n'est pas encore réaliste économiquement : les polyols aromatiques employés actuellement sont des sous-produits à très bas prix issus de la synthèse du PET[53].

Les lignines peuvent être incorporées dans des polymères de type polyoléfines tels le polyéthylène (PE) ou le polypropylène (PP). La compatibilité entre la lignine et les polymères est généralement assurée par l'époxydation de la lignine et l'utilisation de l'anhydride maléique comme agent de liaison[59]. Les propriétés anti-oxydantes de la lignine permettent d'améliorer la stabilité des polymères aux rayonnements UV[60]. Par ailleurs, les matériaux contenant de la lignine présentent des propriétés mécaniques supérieures, la lignine agissant comme plastifiant.

Enfin de nombreuses études ont été menées pour développer l'association de la lignine avec d'autres polymères d'origine naturelle (amidon, protéine…) afin de créer des matériaux respectueux de l'environnement. Par exemple, des mélanges poly(acide lactique) (PLA)/lignine ont permis la production à l'échelle pilote de films biodégradables destinés à l'emballage[61].

Résines et adhésifs

L'utilisation de lignine en remplacement des phénols dans les résines phénol-formaldéhyde a été grandement étudiée[38,62,63]. Ces résines sont principalement utilisées comme adhésifs dans les panneaux de fibres de bois. La structure en réseau aromatique de la lignine est déjà proche de celle des résines phénol-formaldéhyde, ce qui permet son incorporation sans traitement préalable. Les lignines ne contenant pas de soufre sont à privilégier dans ce type d'applications. En effet, les lignines soufrées dégagent de fortes odeurs lorsqu'elles sont traitées à température élevée. Par ailleurs, les propriétés des résines varient considérablement selon la structure (et donc l'origine) de la lignine. L'utilisation de lignine en remplacement des phénols dans ce type de résines diminue leur toxicité et leur coût de production sans altérer les propriétés du matériau. Afin d'augmenter la réactivité des lignines, celles-ci peuvent être fonctionnalisées par éthérification ou estérification[64].

La lignine peut également être utilisée pour la synthèse de résines de type époxy. Cette application nécessite l'emploi de lignines non soufrées, non ioniques et de grande pureté. C'est pourquoi les lignines Organosolv sont majoritairement utilisées. Il existe de nombreuses formulations possibles pour ce genre de résine. La stratégie la plus communément employée consiste à époxyder la lignine, puis à la réticuler avec des molécules de type diamine[65]. La lignine peut également être incorporée directement dans des résines époxy de faibles masses molaires. Pour des raisons de solubilité, il est alors nécessaire de remplacer les solvants communément utilisés dans les procédés déjà en place. Il est possible d'intégrer jusqu'à 50 % de lignine au sein de ces composites[65]. La société IBM a évalué les caractéristiques de résines contenant de la lignine pour l'élaboration de circuits imprimés. Il a ainsi été montré que l'utilisation de ces résines en remplacement des résines classiques permettait une économie d'énergie de 40 % pour des performances égales[66].

Adsorbant de métaux lourds

L'utilisation de la lignine comme adsorbant de métaux lourds est une voie de valorisation émergente et prometteuse. La lignine est capable de chélater une grande variété d'ions métalliques tels le cuivre, le cadmium ou le plomb[67]. Son utilisation en tant qu'adsorbant pour la dépollution des eaux usées représente une solution peu couteuse et respectueuse de l'environnement. Les propriétés chélatantes de la lignine peuvent être améliorées par l'ajout de groupements amine ou ammonium quaternaire, ou par oxydation dans le but d'augmenter le nombre de fonctions acide carboxylique. Des composites lignine/polyaniline se sont montrés efficaces pour l'adsorption d'ions Au(III)[68].

III.2. Dépolymérisation de la lignine : vers la production de synthons biosourcés

L'utilisation de lignine comme source d'éléments de base pour la chimie suscite un fort intérêt dans le domaine de la recherche. La dépolymérisation de la lignine - par rupture des liaisons éthers notamment – conduit à la formation de molécules aromatiques biosourcées susceptibles de remplacer les synthons actuellement issus du pétrole[69]. Deux stratégies ont été principalement étudiées jusqu'ici. La voie réductrice permet d'obtenir des molécules simples dont les équivalents pétrosourcés sont commercialisés en grande quantité et à bas prix. À l'opposé, des synthons aromatiques fonctionnalisés de haute valeur ajoutée peuvent être générés par dépolymérisation oxydante.

Dans les deux cas, la dépolymérisation de la lignine présente de nombreux challenges. Tout d'abord, celle-ci conduit à la formation d'un mélange de nombreuses espèces difficiles à isoler de façon sélective. Ensuite, les conditions de dépolymérisation souvent dures sont responsables de réactions de condensation et de dégradation qui induisent la formation de résidus inexploitables (charbon). Enfin, les produits obtenus après dépolymérisation dépendent fortement de l'origine et du mode d'extraction de la lignine exploitée. Ainsi, un procédé efficace pour une lignine de conifère peut s'avérer inadapté sur une lignine issue de feuillu. C'est pour ces raisons que la majorité des travaux de recherche se sont concentrés sur l'étude de réactions sur des modèles de lignine. L'utilisation de modèles simples (monomères, dimères voire polymères) est essentielle. Elle permet de s'affranchir des problèmes de solubilité, d'hétérogénéité et de difficulté d'analyse liés à la complexité de la lignine[70].

III.2.1. Voie réductrice

La dépolymérisation réductrice de la lignine a été reportée pour la première fois à la fin des années 40[71]. Dans cette stratégie, la lignine est traitée à haute température, sous pression d'hydrogène, en présence de métaux nobles agissant comme catalyseurs. Le mécanisme réactionnel procède en deux étapes. Les liaisons éthers (β-O-4, α-O-4) sont tout d'abord rompues par hydrogénolyse. Les molécules de faibles masses molaires ainsi formées sont ensuite hydrodésoxygénées (rupture des liaisons C-O) pour former des hydrocarbures aromatiques ou aliphatiques[72].

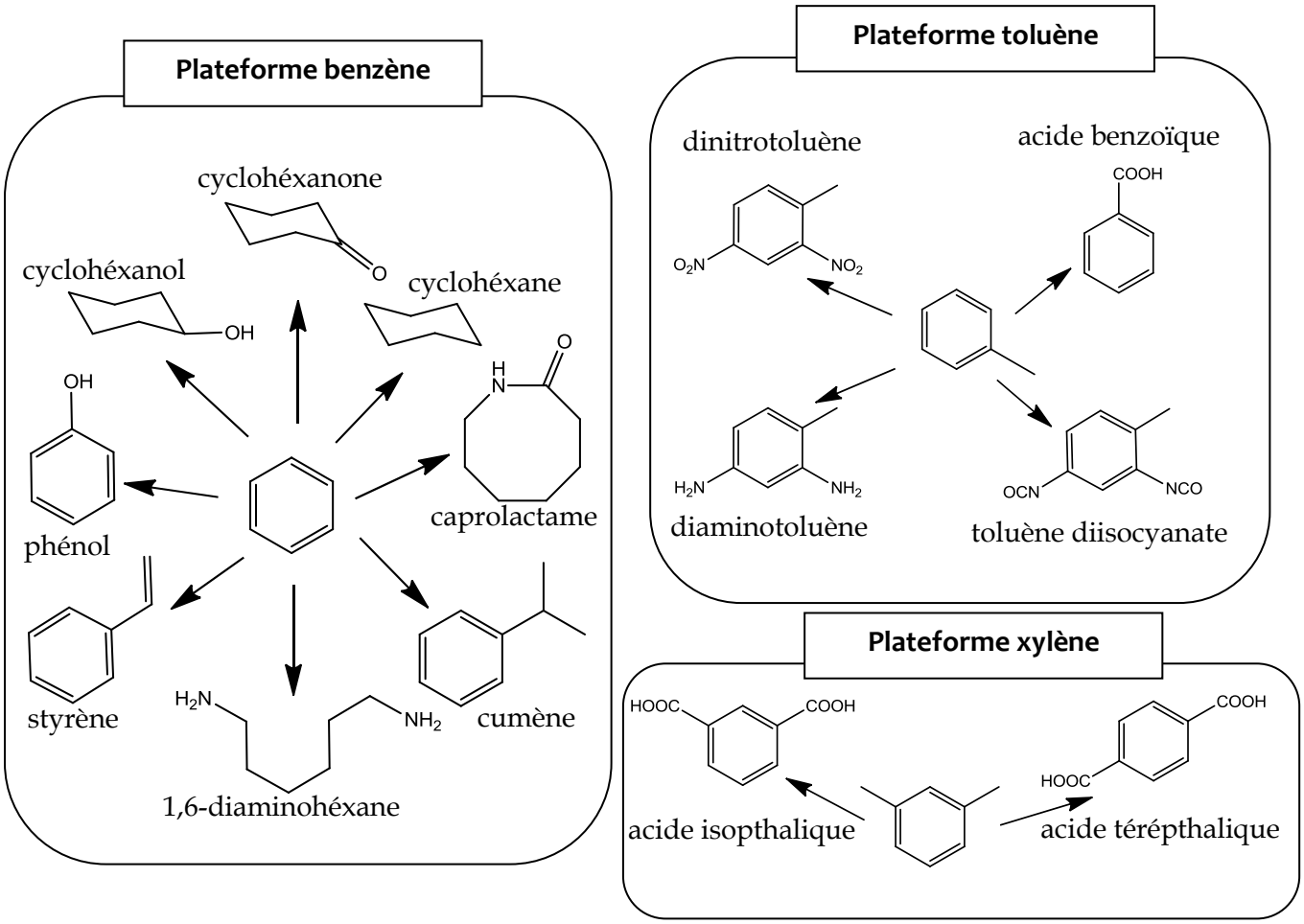


Figure 16 : Exemples de produits synthétisés à partir de la plateforme BTX.

Cette voie de valorisation de la lignine vise notamment la formation de benzène, toluène et xylène (plateforme BTX). En effet, ces trois molécules - actuellement issues de la pétrochimie – sont déjà intégrées dans un marché conséquent où elles sont exploitées comme précurseurs à de nombreux produits chimiques (Figure 16). La production mondiale de BTX est estimé à plus de 100 millions de tonnes par an[73].

Les catalyseurs les plus communément employés pour la dépolymérisation réductrice de la lignine sont des métaux nobles de la famille du platine (platine, ruthénium, rhodium, palladium) généralement supportés sur charbon actif[74]. Huibers et Parkhurst ont breveté un procédé permettant la conversion de la lignine en 20 % de phénol et 14 % de benzène par hydrogénolyse. La lignine non convertie est utilisée comme carburant pour la production d'énergie[75]. Des conversions proches de 100 % ont été obtenues pour la rupture de liaisons éthers d'un polymère modèle catalysée par le ruthénium[76]. Deux problèmes majeurs sont reportés dus aux conditions dures employées lors de la dépolymérisation : les espèces formées sont susceptibles de se re-condenser (notamment lorsque le temps de réaction est augmenté)[77] et le noyau benzénique peut-être hydrogéné, conduisant à la formation d'espèces non aromatiques.

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour contourner ces obstacles. L'utilisation de métaux nobles en association avec le zinc ou le nickel dans des systèmes bimétalliques permet d'augmenter les rendements réactionnels tout en apportant une meilleure sélectivité au système[78,79]. Ces changements s'expliquent par les modifications de géométrie et d'environnement électronique du catalyseur grâce à la présence d'un autre métal[80]. Parsell *et al.* ont reporté la désoxygénation des aldéhydes et des alcools benzyliques de modèles simples sans altérer leur structure aromatique grâce à un catalyseur combinant le palladium sur charbon et le zinc[81].

La nature du support du catalyseur influe également sur la sélectivité des systèmes. La réduction de dérivés oligomères de lignine a été catalysée par du ruthénium supporté soit sur charbon actif, soit sur alumine. Le support à base d'alumine conduit à la formation de toluène exclusivement, alors qu'un mélange de quatre produits est obtenu lorsque le charbon actif est employé comme support[82].

Un autre enjeu concernant la dépolymérisation de la lignine selon la voie réductrice est l'utilisation de l'hydrogène. La plupart des procédés nécessitent l'emploi d'une grande quantité de dihydrogène, molécule issue de ressources fossiles non renouvelables. Il a été montré qu'un solvant comme le méthanol ou l'éthanol pouvait être utilisé comme source d'hydrogène (alcoolyse) en conditions supercritiques. Bien que cette alternative soit prometteuse, elle n'est pas suffisamment sélective : le traitement de la lignine dans ces conditions génère un mélange de 25 produits[83].

Enfin, des méthodes plus récentes ont été développées afin de traiter la lignine dans des conditions plus douces. Lu *et al.* ont étudié l'hydrodésoxygénation et l'hydrogénation de modèles dimères et monomères dans un solvant liquide ionique (1-butyl-3-méthyl-imidazolium hexafluorophosphate). Plusieurs espèces aromatiques ont été converties en alcanes correspondants avec des rendements proches de 100 % en utilisant le platine comme catalyseur. Celui-ci a été recyclé jusqu'à trois fois sans perte d'activité[84]. L'hydrogénation électro-catalytique du gaïacol a été conduite à des températures inférieures à 80°C. Dans ces cas, le ruthénium ou le nickel de Raney agit comme catalyseur cathodique (Figure 17)[85,86].

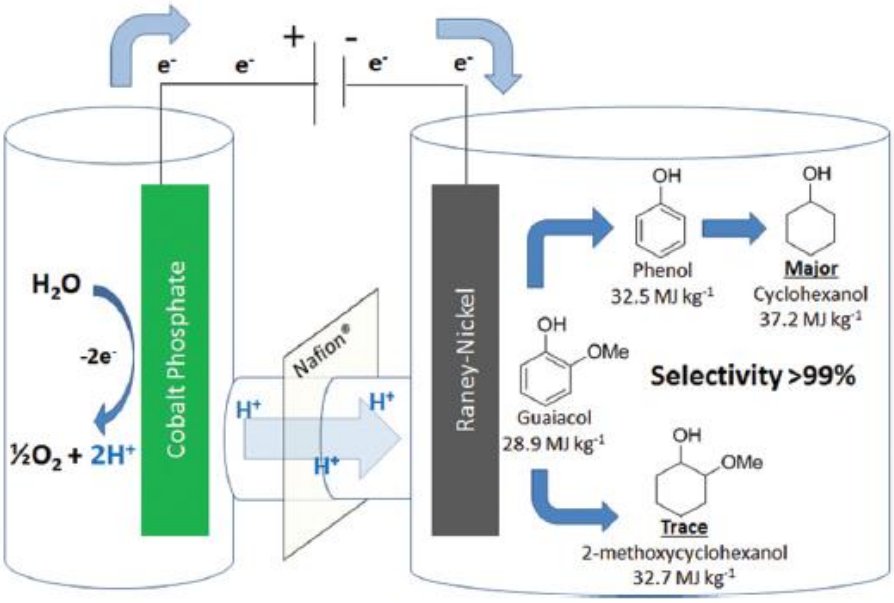


Figure 17 : Hydrogénation électrocatalytique du gaïacol dans une cellule divisée par une membrane échangeuse de protons[86].

Aucune de ces technologies n'est pour l'instant suffisamment mature pour pouvoir être développée à plus grande échelle. Une amélioration des procédés de fractionnement, de catalyse et de purification est encore nécessaire pour l'obtention de produits purs de façon sélective.

III.2.2. Voie oxydante

Une autre stratégie de valorisation de la lignine consiste en sa dépolymérisation en conditions oxydatives. Contrairement à la voie réductrice, la rupture oxydative des liaisons C-C et C-O de la lignine conduit à la formation de molécules aromatiques complexes et fonctionnalisées. La synthèse de ces molécules selon les procédés pétrochimiques classiques est difficile, alors que la lignine possède naturellement la structure et les fonctions recherchées[87]. Elle est ainsi la ressource naturelle idéale pour l'obtention de produits chimiques de haute valeur ajoutée comme la vanilline ou le syringaldéhyde[88]. Cette stratégie nécessite des conditions plus douces et sélectives que la stratégie réductrice afin de cliver les liaisons sans altérer la structure des monomères de la lignine. Développer des procédés sélectifs vers la production de molécules aromatiques issues de la lignine est un enjeu majeur. Un autre point clé est l'élaboration à l'échelle industrielle de techniques de séparation des nombreuses molécules formées lors de la dépolymérisation[89].

À l'heure actuelle, la société Borregaard est la seule entreprise à commercialiser des molécules aromatiques issues de la lignine. Elle produit chaque année 1 500 tonnes de vanilline selon une technique de dépolymérisation oxydative des lignosulfonates. Ce procédé est catalysé par le sulfate de cuivre en conditions alcalines sous pression d'oxygène. Les rendements en vanilline isolée sont de 7 %. Une méthode plus efficace (20% de rendement) utilisant le nitrobenzène a été développée à l'échelle du laboratoire. Cependant, elle nécessite des quantités très élevées de nitrobenzène, ce qui rend cette réaction impossible à mettre en place industriellement[33].

La conversion de la lignine en produits chimiques d'intérêt par voie oxydante a été étudiée de façon extensive depuis plus de vingt ans. Les types d'oxydants, de catalyseurs et de procédés explorés sont nombreux et variés. La plupart des travaux publiés porte sur des réactions sur des composés modèles de lignine. Peu de systèmes se sont montrés efficaces pour la conversion de la lignine elle-même.

Les complexes organométalliques font partie des catalyseurs les plus employés pour l'oxydation de lignine ou de molécules modèles. Les complexes Co(Salen) présentent de nombreux avantages : ils sont peu chers, faciles à synthétiser, stables, et fonctionnent en solution aqueuse[90]. L'étude de l'oxydation d'un polymère synthétique de type β-O-4 a mis en évidence des réactions d'ouverture de cycle, de rupture de liaisons éthers et de déméthoxylation catalysées par un complexe Co(Salen) en présence d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène[91]. Plus récemment, Bozell *et al.* ont appliqué cette catalyse à une lignine organosolv et ont identifié la vanilline, le syringaldéhyde et la diméthoxybenzoquinone comme principaux composés de dégradation (en faibles rendements). Ils proposent par ailleurs l'intégration de ce procédé dans une bioraffinerie[92].

D'autres catalyseurs organométalliques comme le méthyltrioxorhénium (MTO)[93,94] ou des complexes de vanadium[95,96] sont capables de scinder les liaisons β-O-4 d'un nombre variés de modèles. Leur efficacité sur la lignine est cependant limitée. Baker *et al.* ont comparé l'action de 7 différents catalyseurs sur une lignine organosolv. Seul deux des catalyseurs (des complexes d'oxovanadium) permettent la rupture des liaisons C_α-C_β conduisant à la formation d'oligomères de lignine[97].

Les polyoxométalates (POM) sont des polyanions de formule générale $X_zM_xO_y^{n-}$, où X est généralement un phosphore ou un silicium et M un métal de transition. Ces catalyseurs - considérés comme verts - sont très prometteurs pour la dépolymérisation oxydative de la lignine[98]. Une des études les plus remarquables sur l'oxydation de la lignine par les POM a été conduite par Zhao *et al*[99]. Cinq lignines d'origines différentes sont oxydées en présence de POM dans un mélange méthanol/eau sous pression d'oxygène à 190°C. Après extraction au dichlorométhane, un mélange de produits sous forme d'huile est obtenu avec des rendements massiques allant de 12 à 65 % selon les lignines. Les produits principaux sont des acides organiques issus de l'oxydation du noyau aromatique. Le catalyseur peut être recyclé jusqu'à cinq fois sans perte de rendement, et il a été montré que la ré-oxydation du catalyseur peut être conduite par voie enzymatique[100].

Les métalloporphyrines et métallophtalocyanines sont des complexes de métaux utilisés comme mimes de peroxydases, des enzymes lignolytiques notamment sécrétées par les champignons de pourriture du bois[101]. Les propriétés des ces biomimes peuvent être modifiées : la stabilité, la solubilité, et le potentiel redox du catalyseur sont dépendants de la nature de leurs substituants[102]. Ils sont par ailleurs moins chers et plus faciles à obtenir que les enzymes qu'ils imitent. Le groupe de Crestini a particulièrement étudié ces catalyseurs biomimétiques. Il a été montré que les complexes de manganèse et de fer catalysaient l'oxydation d'une grande variété de modèles en présence de peroxyde d'hydrogène[103]. Une oxydation dans des conditions similaires a été conduite sur une lignine kraft. Les analyses en RMN du phosphore effectuées sur les lignines oxydées montrent une diminution des OH aliphatiques et une augmentation des fonctions carboxyliques, ce qui confirme l'efficacité du système catalytique. L'immobilisation de métalloporphyrine sur un support d'argile stabilise le catalyseur, améliore son efficacité et permet d'envisager son recyclage[104,105]. Malheureusement, l'évolution de la masse molaire de la lignine oxydée n'a jamais été suivie en chromatographique d'exclusion stérique. Il est donc difficile de se prononcer sur l'efficacité des métalloporphyrines pour la dépolymérisation de la lignine.

Une des stratégies les plus prometteuses pour l'obtention de molécules de faibles masses consiste en l'oxydation sélective de l'hydroxyle en position benzylique de la liaison β-O-4 suivie de la rupture de la liaison C-O :

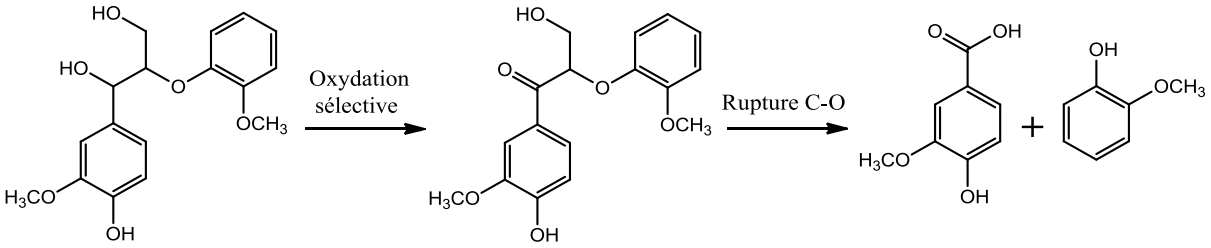


Figure 18 : Stratégie pour la dépolymérisation de la lignine : oxydation sélective de l'hydroxyle en position α suivie par la rupture de la liaison éther.

Rahimi *et al.* ont développé un système catalytique capable d'oxyder de façon très sélective l'alcool en C_α d'un grand nombre de modèles avec des rendements élevés (de 82 à 98 %). Ce système associant un dérivé de TEMPO aux acides nitrique et chlorhydrique a été appliqué avec succès à une lignine de feuillus[106]. La suite de leurs travaux porte sur la rupture de la liaison C-O après oxydation[107]. Dans les conditions optimales, la lignine est dépolymérisée dans l'acide formique en présence de sodium de formate à 110°C pendant 24 heures. Plus de 60 % de molécules de faibles masses ont été extraites à l'acétate d'éthyle, la plupart ayant été identifiées par LC-MS. C'est à ce jour le meilleur rendement en espèces aromatiques de faibles masses obtenu après dépolymérisation de la lignine. Les espèces majoritaires sont des dicétones générées selon le mécanisme proposé en Figure 19. Du syringaldéhyde et de la vanilline sont également produits à hauteur de 8,5 et 3,5 % respectivement. Le rendement en molécules de faibles masses obtenu correspond au taux de liaisons β-O-4 présentes dans la lignine originale. Cette étude montre ainsi l'importance de conserver la structure de la lignine lors de son extraction et le grand potentiel des lignines riches en β-O-4 pour l'obtention de produits chimiques d'origine naturelle.

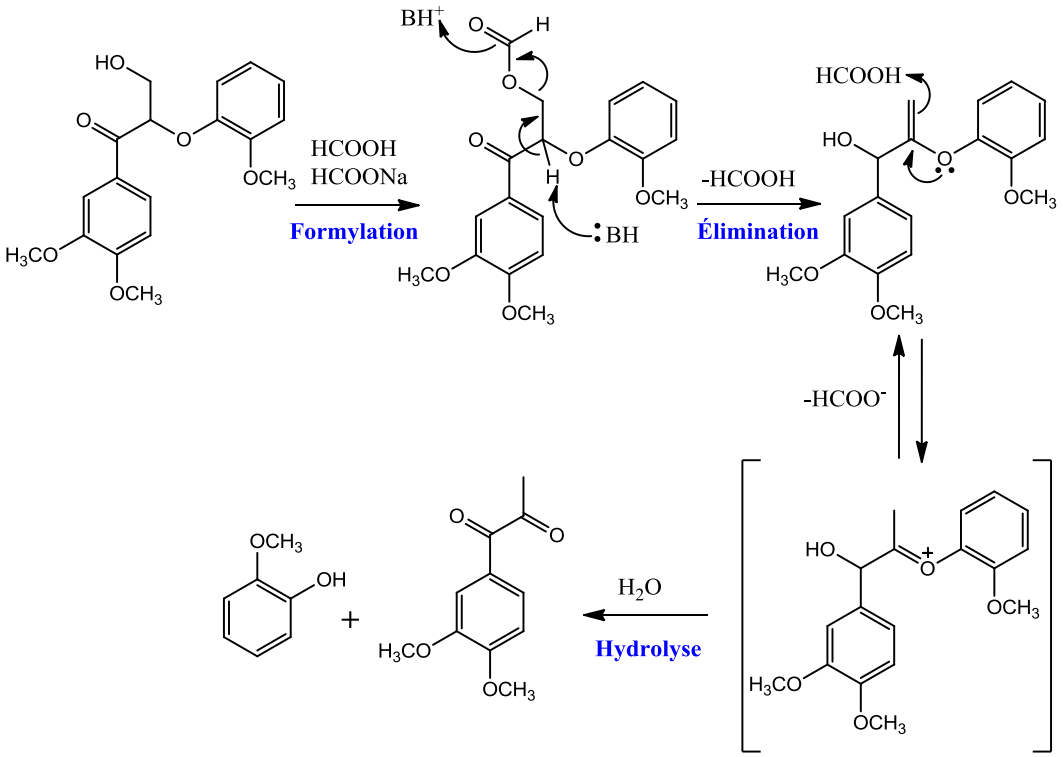


Figure 19 : Mécanisme de rupture de la liaison C-O en présence d'acide formique et de formate de sodium[107].

De façon similaire, Westwood *et al.* ont reporté l'oxydation sélective de la lignine catalysée par la DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) suivie de sa dépolymérisation en présence de zinc et de chlorure d'ammonium[108]. La DDQ s'est montrée aussi efficace que le système précédent pour l'oxydation de modèles dimères dans le 2-méthoxyéthanol. Les conditions réactionnelles ont dû être optimisées pour l'oxydation d'un polymère synthétique de type β-O-4 (ajout d'un co-solvant et de quatre fois plus de catalyseur). L'étape de rupture de la liaison C-O peut se faire immédiatement après l'étape d'oxydation, dans le même réacteur et sans purification du produit oxydé. Cette stratégie a été appliquée à une lignine organosolv riche en motifs S et en liaisons β-O-4. Un monomère phénolique pouvant servir de molécule plateforme a été obtenu sélectivement avec 5 % de rendement.

II.2.3. Limitation des réactions de couplage

Un des principaux obstacles pour la dépolymérisation de la lignine est l'occurrence de réactions de re-condensation conduisant à la formation de nouvelles liaisons récalcitrantes à la rupture. En effet, la plupart des molécules générées lors de la dépolymérisation de la lignine sont des espèces radicalaires ou anioniques instables et promptes aux couplages dans les conditions employées. Plusieurs techniques ont été étudiées afin de contourner cet écueil.

L'acide borique forme des esters de type $B(OR)_3$ avec les alcools en conditions acides, et des esters de borate $NaB(OR)_4$ en conditions alcalines. La capacité de l'acide borique à capter les phénols instables générés lors de la dépolymérisation d'une lignine organosolv par catalyse basique a été évaluée[109]. Des résultats prometteurs ont été obtenus : le rendement en espèces de faibles masses molaires a été multiplié par 6 (de 6 à 36 %). Cependant, l'acide borique doit être utilisé en fort excès pour que son effet soit significatif et des réactions de re-polymérisation sont observées pour des temps de réaction ou des températures trop élevés. Une autre étude a comparé l'effet de l'acide borique et du phénol comme agents de protection dans des conditions de dépolymérisation similaires[110]. Une légère amélioration du rendement en espèces de faibles masses est observée en utilisant l'acide borique en excès. Cependant, cet agent de protection promeut principalement la formation de « char » insoluble issu de réactions de condensation. L'utilisation de phénol à la place de l'acide borique entraine une nette hausse du rendement en petites molécules (bien que cette valeur soit biaisée par la quantité de phénol extraite avec les produits de dégradation) sans hausse de la quantité de char. Le mélange obtenu est malheureusement bien plus complexe, notamment à cause des espèces dimères issues du couplage entre le phénol et les molécules produites par la dépolymérisation.

Afin d'éviter ce type de réactions de condensations, l'équipe de Kei Saito a étudié l'action d'un phénol dont les positions -ortho et –para sont occupées : le 4-tert-butyl-2,6-dimethyl phénol (TBDMP)[111]. Le TBDMP entraine la rupture oxydante des liaisons éther et empêche la re-condensation des molécules formées selon le mécanisme de redistribution proposé en Figure 20. L'oxydation d'une lignine organosolv en présence d'un catalyseur de cuivre et de TBDMP conduit à la formation d'oligomères pouvant servir de précurseurs pour la synthèse de polyesters biosourcés. Ces conditions ont également été appliquées avec succès dans deux solvants ioniques[112].

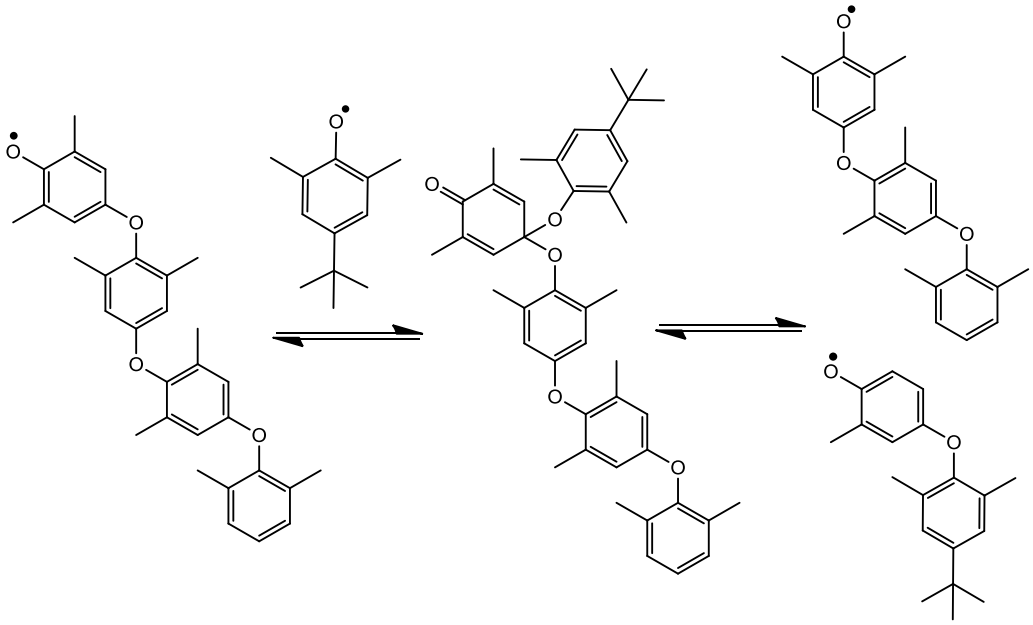


Figure 20 : Dépolymérisation d'un modèle de lignine en présence de TBDMP. Mécanisme de redistribution proposé par Saito *et al*[111].

Le choix du solvant peut jouer un rôle majeur en ce qui concerne les mécanismes de re-condensation. Tobias et Von Rohr ont étudié l'oxydation d'une lignine kraft en présence d'un polyoxométalate dans un mélange eau/méthanol. Le rendement en produits de dégradation est multiplié par un facteur 15 dans un solvant contenant 80 % de méthanol comparé à la réaction témoin dans l'eau[113]. D'après les auteurs, le méthanol est transformé en diméthyl éther (DME) dans les conditions utilisées. Le DME subit ensuite une rupture homolytique en $^{\bullet}CH_3$ et $^{\bullet}OCH_3$. Ces radicaux se greffent aux fragments radicalaires issus de la lignine et empêchent leur re-condensation. Cette théorie est confirmée par la présence de vanillate de méthyle dans les produits de dégradation lorsque le méthanol est employé, et de vanillate d'éthyle lorsque la réaction est conduite dans l'éthanol.

Pour d'autres raisons, le méthanol prévient également les réactions de couplage lors de la dépolymérisation de la lignine en milieu acide[114]. L'association du méthanol et d'un solvant apolaire entraine la rupture par solvolyse des intermédiaires énoliques générés par catalyse acide, conduisant à la formation de diméthyl acétals stables. En présence d'eau, les intermédiaires énoliques sont hydrolysés, générant des aldéhydes instables et susceptibles d'être impliqués dans des réactions de couplage (Figure 21). Ainsi, aucun monomère n'est obtenu dans un mélange eau/méthanol alors que le mélange toluène/méthanol conduit à la formation de 6 % de monomères et 18 % d'oligomères (par rapport à la masse de lignine originale).

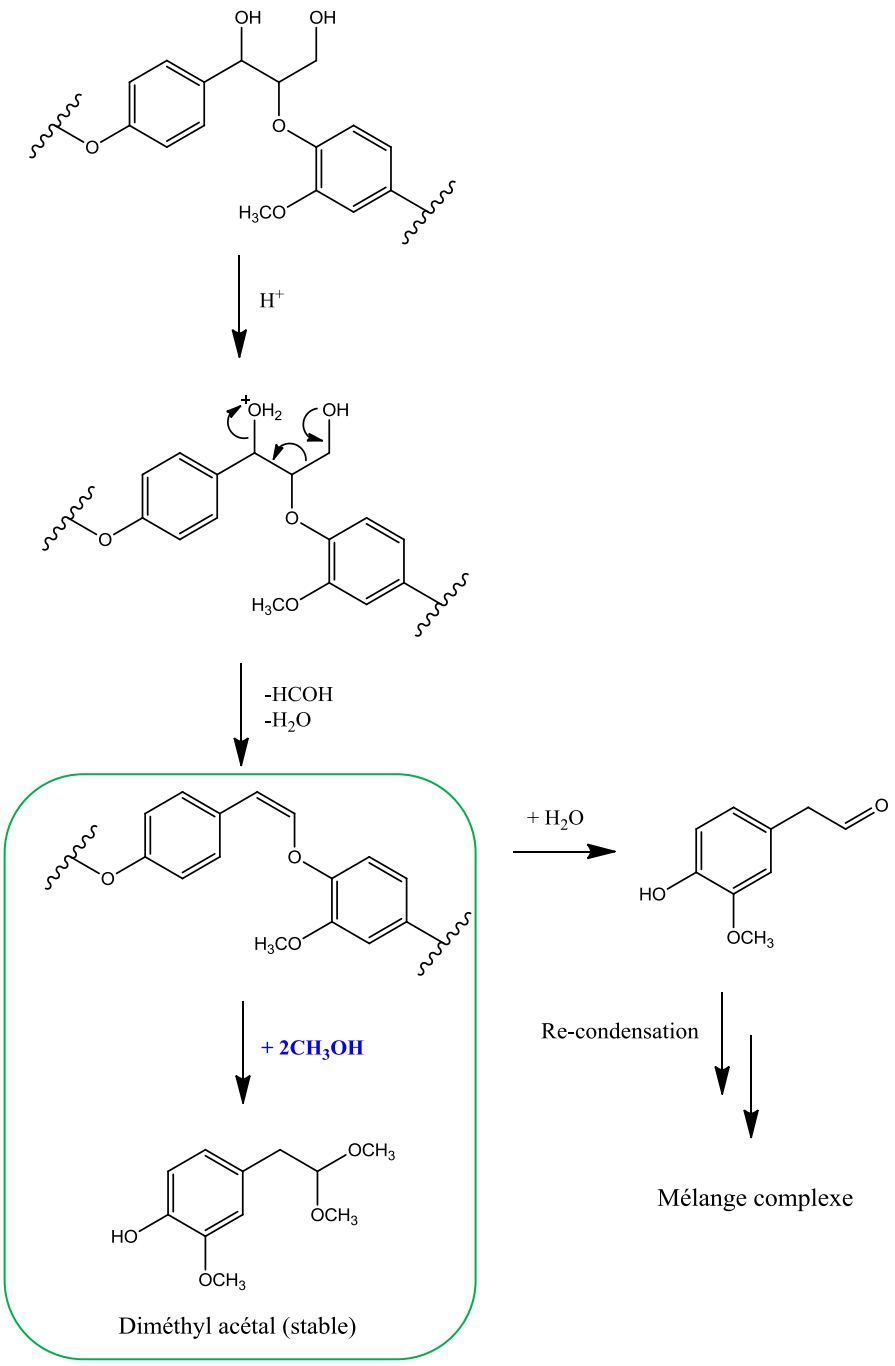


Figure 21 : Méthanolyse des intermédiaires énoliques formés en conditions acides. La présence d'eau dans le milieu entraine des réactions de recondensation[114].

II.2.4. Intégration dans une bioraffinerie

Les différentes stratégies de valorisation de la lignine ne peuvent être développées industriellement de façon isolée. Il est nécessaire que ces techniques soient intégrées au sein d'une installation en mesure de transformer l'ensemble de la biomasse : une bioraffinerie. Le modèle à suivre pour la bioraffinerie est celui de la raffinerie de pétrole, capable de convertir différentes fractions de pétrole brut en énergie, carburants et produits chimiques selon des procédés parfaitement optimisés. De même, la bioraffinerie idéale devra valoriser les différents éléments de la biomasse en énergie, biocarburants, produits chimiques de haute valeur ajoutée et matériaux[87].

Bien que renouvelable, la biomasse n'est pas une ressource illimitée et il est crucial de l'utiliser de façon raisonnée, efficace et respectueuse de l'environnement. Pour cela, les nouveaux procédés mis en place devront exploiter au maximum la biomasse (lignine, cellulose, hémicelluloses) tout en minimisant les dépenses énergétiques et l'utilisation de solvants et produits chimiques dangereux et/ou toxiques[51].

Dans cette optique, la stratégie pour la valorisation des hémicelluloses et de la cellulose semble déjà établie. L'hydrolyse enzymatique des polysaccharides génère une variété de sucres simples. Ces sucres peuvent être fermentés pour obtenir des produits de commodités largement répandus comme l'éthanol ou l'acétone. Une voie plus prometteuse consiste à modifier les sucres en produits chimiques de base pour la synthèse de molécules à haute valeur ajoutée. Ainsi la cellulose et les hémicelluloses seraient à l'origine d'une nouvelle plateforme de biomolécules capables de remplacer la plateforme pétrochimique déjà en place (Figure 22)[115].

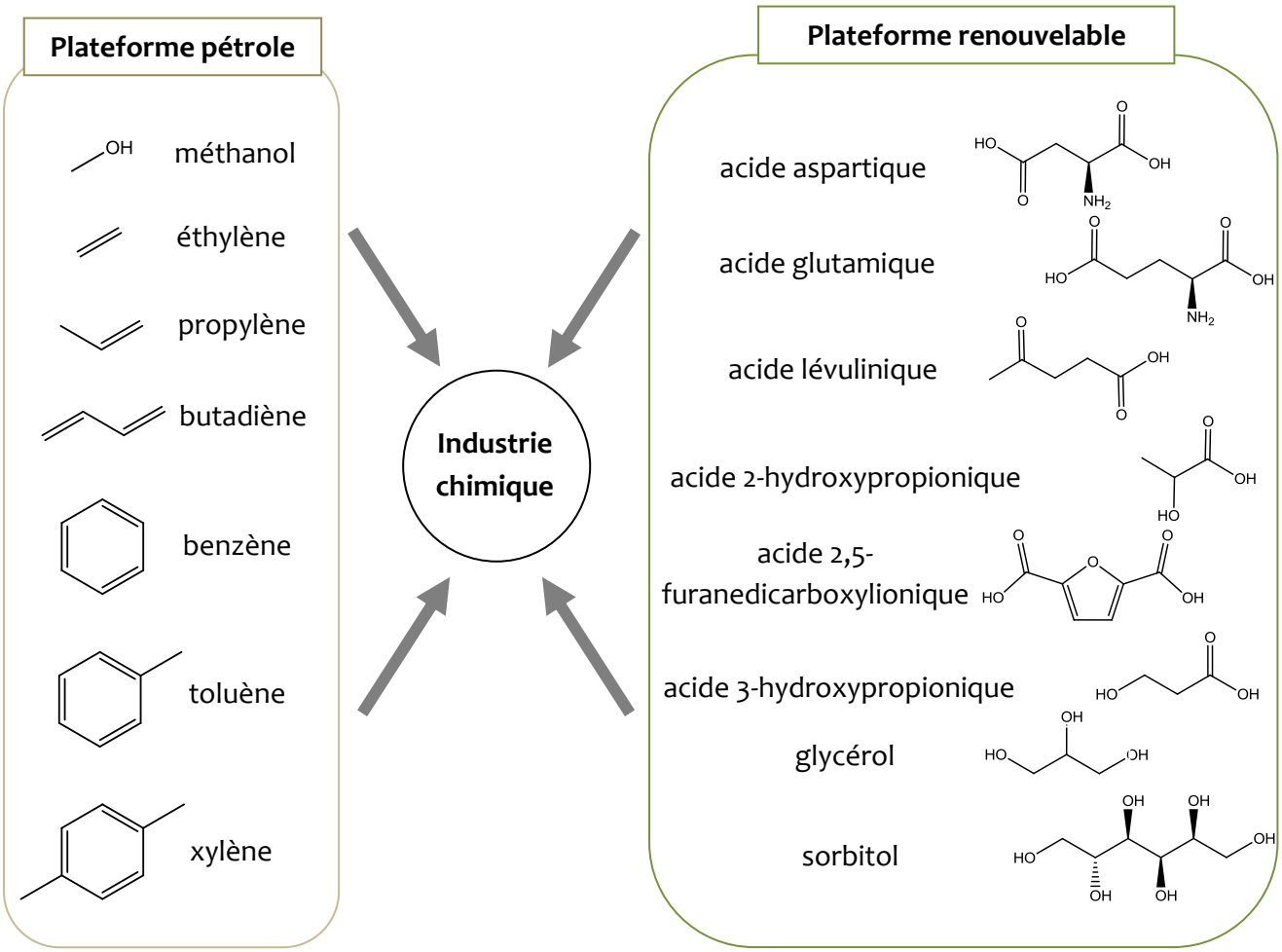


Figure 22 : Aperçu de molécules plateformes d'origines fossile et renouvelable[111].

La question de l'intégration de la lignine dans cette bioraffinerie du futur est plus délicate. Certains auteurs n'estiment encore la lignine que comme une source d'énergie, notamment par la formation de syngas issu de sa gazéification[116]. Employer cette stratégie dans une bioraffinerie serait une erreur à deux niveaux : d'une part elle ne profite pas des riches fonctionnalités de la lignine et de son fort potentiel comme source de produits chimiques de haute valeur ajoutée ; d'autre part, les sources d'énergie alternatives (géothermique, éolienne, solaire…) sont bien plus adaptées que la lignine pour substituer les énergies fossiles.

La conversion de la lignine en produits chimiques est bien plus avantageuse. Deux approches différentes peuvent être envisagées. La première consiste à dépolymériser la lignine en intermédiaires déjà utilisés dans l'industrie pétrochimique. À partir de ce point, les procédés de transformation sont déjà totalement opérationnels et les marchés sont déjà établis. Le principal challenge est le développement de procédés de synthèse suffisamment efficace pour concurrencer les équivalents fossiles. L'autre approche est le développement d'une chaine de produits exclusifs à la lignine, avec de nouveaux intermédiaires et de nouveaux produits finaux visés. Cette stratégie utilise pleinement la structure de la lignine et limite les dépenses énergétiques liées à sa modification. Le résultat pourrait être la synthèse de produits de très haute valeur ajoutée sans équivalent pétrochimique. La mise en place d'une telle chaine est très ambitieuse, puisque toute la technologie d'industrialisation est à mettre en place et que le marché n'existe pas encore. Des études prometteuses - évoquées dans les paragraphes précédents - ont déjà été mises au point à l'échelle du laboratoire. Elles nous confirment le fort potentiel de cette approche pour la valorisation durable de la lignine.

Bien entendu, la production à large échelle et l'isolation de molécules d'intérêt issues de la biomasse est le point crucial vers le développement des bioraffineries de demain. Néanmoins, de nombreux autres facteurs sont à prendre en compte. La séparation des éléments constitutifs de la biomasse est un enjeu essentiel. Il est nécessaire de trouver des techniques d'extraction respectueuses de l'environnement qui n'altèrent pas (ou peu) les structures des biopolymères. Dans cet optique, l'extraction par les liquides ioniques semble être une méthode des plus adaptées[48,50,117,118]. L'hétérogénéité des bioressources en fonction des zones géographiques est un autre paramètre à considérer. Chaque bioraffinerie devra être adaptée aux types de ressources locales afin d'optimiser aux mieux ses procédés. Enfin la culture des plantes servant de matière première aux bioraffineries devra être inscrite dans un processus durable qui n'entre pas en compétition avec la production alimentaire. L'utilisation de déchets et sous-produits de l'agriculture et de la foresterie sont à privilégier[119].

III. Les enzymes lignolytiques

Dans le but de trouver des procédés toujours plus respectueux de l'environnement, un intérêt croissant est porté sur des catalyseurs d'origine naturelle : les enzymes. Dans la nature, les champignons de pourriture blanche sont connus pour leur aptitude à dégrader le bois[120]. Ces champignons ont fait l'objet de nombreuses études afin de déterminer leurs modes d'action. Ces études ont mis en évidence la présence de plusieurs enzymes agissant en synergie[121]. Certaines ont pu être isolées et utilisées *in vitro* pour la dégradation de la lignine. Les paragraphes suivants décrivent les caractéristiques de ces enzymes lignolytiques ainsi que les travaux les plus marquants concernant la dépolymérisation de la lignine.

III.1. Les peroxydases

Les peroxydases forment une famille d'enzymes très répandues dans le monde du vivant. Ces enzymes de type oxydase catalysent des réactions d'oxydoréduction en présence de peroxyde d'hydrogène. Deux d'entre elles ont été extraites des champignons de pourriture du bois et ont été identifiées comme responsables de la délignification dans ces organismes. Il s'agit de la lignine peroxydase et de la manganèse peroxydase[122]. Comme évoqué dans le paragraphe **§** II.1., ces enzymes sont également sécrétées par les plantes pour la biosynthèse de la lignine.

Lignine peroxydase (ligninase, LiP)

La lignine peroxydase est une lignine dont le site actif est composé d'un complexe ferreux (l'hème). Son potentiel redox élevé (autour de +1,2 V) lui permet d'oxyder une large gamme de substrats phénoliques et non phénoliques en présence de peroxyde d'hydrogène. Le cycle catalytique de la LiP est schématisé en Figure 23. La première étape consiste en l'oxydation à 2 électrons de la LiP par le peroxyde d'hydrogène pour former le composé intermédiaire C(I). Ce cation-radical oxyde une molécule de substrat (l'alcool vératrylique VA sur la Figure) générant le composé C(II), lui-même capable d'oxyder le VA afin de compléter le cycle catalytique.

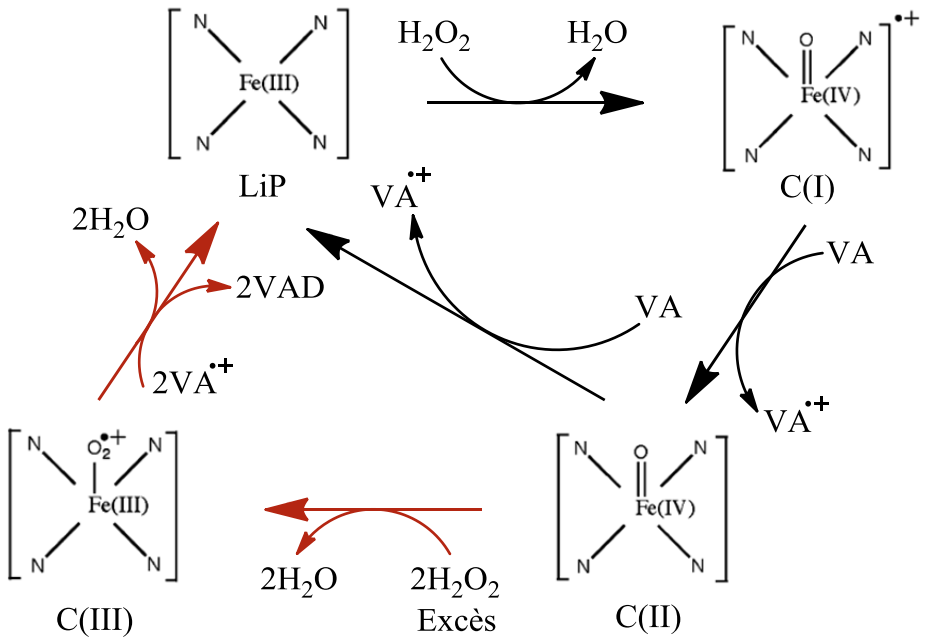


Figure 23 : Cycle catalytique de la LiP. Flèches noires : cycle normal de l'enzyme. Flèches rouges : formation d'un intermédiaire inactif dû à un excès d'H_2O_2. VA : alcool vératrylique. VAD : aldéhyde vératrylique.

En présence d'un excès d'H_2O_2 ou d'un substrat réticent à l'oxydation, le composé C(II) est oxydé en C(III), une forme inactive de l'enzyme. Il a été montré que la présence d'alcool vératrylique dans le milieu permet de convertir C(III) vers la forme active de l'enzyme. Aussi, l'utilisation d'alcool vératrylique en association avec la LiP semble indispensable pour l'oxydation de substrats complexes comme la lignine[123]. Le VA pourrait également avoir un rôle de médiateur d'oxydation[124]. Cependant, cette hypothèse est mise en doute par le caractère instable du cation-radical formé par le VA, facilement oxydable en aldéhyde vératrylique (VAD)[125].

Une grande variété de modèles monomères à tétramères ont été oxydés et dégradés par la LiP[126–128]. Malheureusement, l'application de ces travaux à la lignine est complexe. L'activité de la lignine peroxydase chute drastiquement lorsque la taille du substrat augmente[126]. La LiP catalyse simultanément les réactions de dégradation oxydante et de re-polymérisation. Les espèces phénoliques responsables des phénomènes de couplage étant plus réactives que les autres, l'oxydation de la lignine par la LiP conduit majoritairement à la formation d'espèces condensées[123]. Dans les champignons, l'enzyme, la lignine et ses produits de dégradation sont compartimentés ce qui empêche la re-polymérisation de la lignine[129].

La manganèse peroxydase (MnP)

La manganèse peroxydase est la peroxydase lignolytique la plus répandue. Son cycle catalytique est proche de celui de la LiP, mais son seul substrat est le Mn(II) :

$$2\,Mn(II) + 2H^+ + H_2O_2 \xrightarrow{MnP} 2\,Mn(III) + 2\,H_2O$$

L'ion Mn^{3+} formé par l'oxydation du Mn^{2+} est complexé par les acides carboxyliques de type lactate ou oxalate. Ces complexes peuvent se diffuser au sein du milieu pour oxyder différents substrats phénoliques[130]. L'oxydation des espèces non phénoliques nécessitent la présence de médiateurs, des molécules dont la forme radicalaire est stable et peut diffuser l'oxydation vers les substrats visés. Le glutathione (GSH) est le premier médiateur de la MnP à avoir été mis en évidence. L'oxydation de ce thiol génère un radical thiyle capable de rompre les liaisons C_α-C_β de modèles non phénoliques[131]. Bien que l'association MnP-GSH soit efficace pour l'oxydation de différents substrats, il est peu probable que le GSH puisse être sécrété par un champignon. Le GSH n'est donc pas le médiateur « naturel » du MnP. Des acides gras insaturés comme l'acide linoléique pourraient jouer ce rôle[132]. L'oxydation d'acides gras insaturés par les complexes Mn(III)-Acides entrainent la formation de radicaux peroxyle hautement réactifs (Figure 24). L'efficacité de ce système a été démontrée par la dépolymérisation d'une lignine de synthèse non phénolique par l'action de la MnP associée au Tween 80[133]. Comme pour la LiP, l'oxydation de la lignine par la MnP met en concurrence les réactions de couplage et de dépolymérisation[134,135].

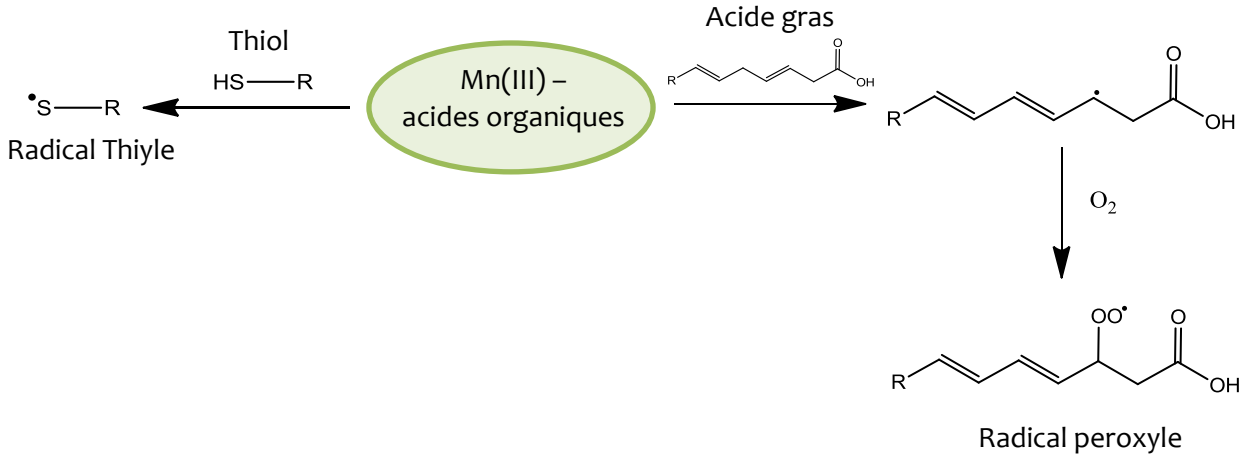


Figure 24 : Formation des radicaux médiateurs de la MnP.

III.2. La laccase et le LMS

La laccase fut une des premières enzymes isolées et décrites[136]. Elle était alors utilisée au Japon pour la synthèse d'un vernis d'origine naturel à base « d'urushi ». Cette enzyme de type oxydase catalyse l'oxydation d'un grand nombre de substrats phénoliques en présence d'oxygène selon l'équation suivante[137] :

$$4\ PhOH + O_2 \rightarrow 4\ PhO^{\bullet} + 2\ H_2O$$

Cycle catalytique

Le site actif de la laccase est généralement composé de quatre atomes de cuivre répartis en trois positions (T1, T2 et T3) tel que schématisé en Figure 25. Le cuivre en position T1 gouverne le potentiel redox de l'enzyme. C'est ici que les électrons sont arrachés aux substrats avant d'être transférés aux trois autres atomes de cuivre. Après quatre séries d'oxydation (de quatre molécules de substrats) l'enzyme se trouve sous sa forme réduite. Dans la seconde étape du cycle catalytique, une molécule d'oxygène se lie au cluster formé par les deux atomes de cuivre en T3 et l'atome de cuivre en T2. L'oxygène y est réduit en eau selon deux étapes impliquant chacune deux électrons. À la fin du cycle, les quatre atomes de cuivre du site actif sont sous leur forme oxydée (Cu^{2+}).

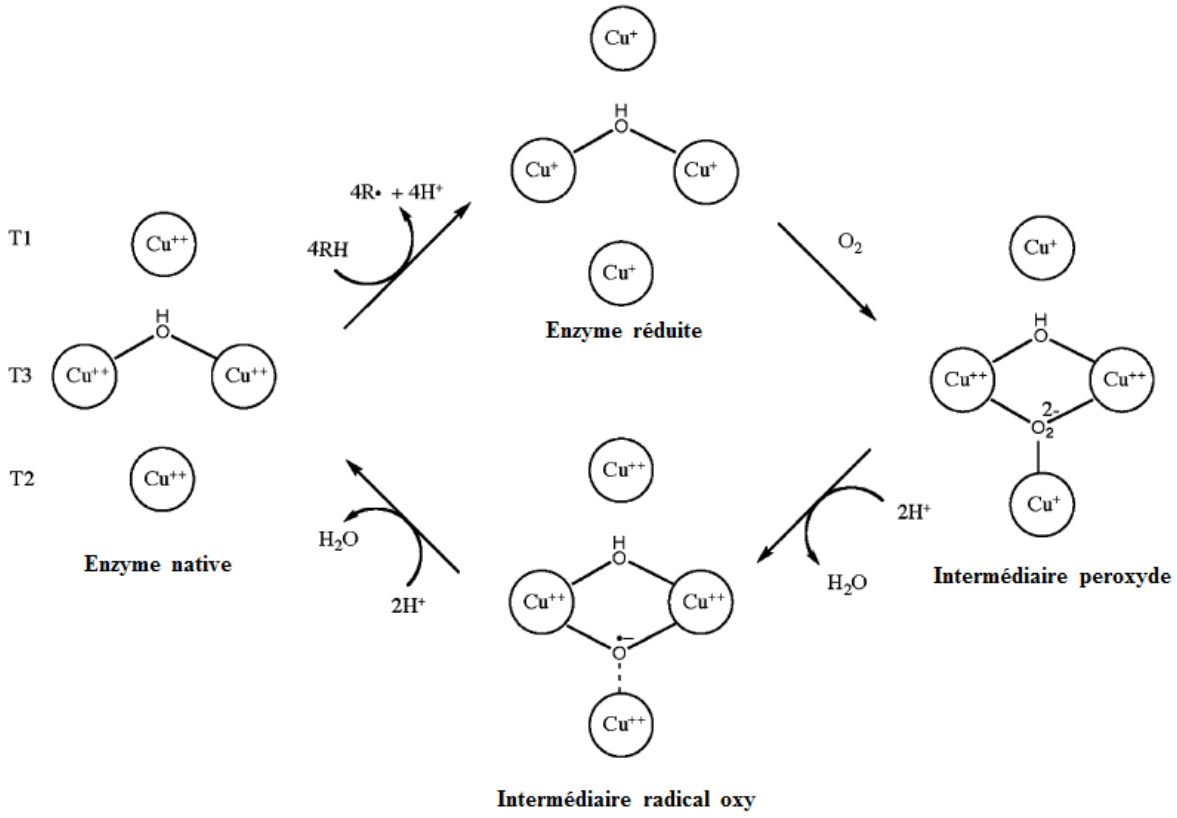


Figure 25 : Cycle catalytique de la laccase.

Variétés des laccases

De nombreux types d'organismes sécrètent des laccases. Chacune de ces laccases possèdent des caractéristiques particulières et jouent des rôles parfois radicalement opposés selon leurs origines. Ainsi, les laccases végétales (*rhus vernicifera*) catalysent la synthèse de lignine pour la croissance de l'arbre alors que les laccases fongiques (*pleurotus*, *basidiomycota*) participent à la délignification[138]. Des laccases sont également présentes dans les bactéries où elles jouent un rôle dans la synthèse de pigments. Ces laccases bactériennes ont généralement un potentiel redox plus élevé que la plupart des laccases et fonctionnent à des températures et à des pH supérieurs[139,140]. Des laccases atypiques dont le site actif ne comporte que trois atomes de Cu associés à un autre métal (Fe, Zn, Mn) ont par ailleurs été décrites[141,142].

Ces diversités d'origine et de structure ont nécessairement des conséquences sur les propriétés des différentes laccases, et notamment sur leur sélectivité. Il a par exemple été montré qu'une laccase de faible potentiel redox oxydait préférentiellement les motifs S de la lignine alors qu'une laccase au potentiel redox deux fois supérieur ne présentait pas de sélectivité particulière[143]. Par ailleurs, une laccase atypique - dite « laccase jaune » - a été décrite comme une des seules laccases à pouvoir oxyder directement des espèces non phénoliques[144]. Ainsi le choix de la variété de laccase à employer est crucial. Ce choix doit être fait en fonction des conditions opératoires optimales (pH, température, co-solvant...), du substrat à oxyder et du type de réactions visées (couplage, décomposition, fonctionnalisation).

Applications industrielles

La laccase est une enzyme attractive pour le milieu industriel notamment pour sa large gamme de substrats et l'utilisation de l'oxygène de l'air comme accepteur d'électron. Des applications industrielles des laccases existent déjà, dans des domaines variés[145].

La laccase est utilisée dans l'industrie textile pour le blanchiment des jeans ou la synthèse de colorants. De nombreux produits de l'industrie alimentaire sont des substrats de la laccase. Par exemple, l'oxydation sélective des polyphénols contenus dans le vin permet une meilleure conservation de ses propriétés organoleptiques au cours du temps[146]. La laccase est également efficace pour la dépollution des effluents industriels et des sols en décomposant les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), certains pesticides et des dérivés chlorés[147].

Le système laccase-médiateur (LMS)

Le faible potentiel des laccases (entre 0,4 et 0,8 V) ne leur permet pas d'oxyder des composés non phénoliques, contrairement aux peroxydases. Pourtant, certains champignons de pourriture blanche sont capables de décomposer entièrement la lignine - contenant 80 % d'hydroxyles benzyliques - sans utiliser de peroxydases. Ce constat soulève une question : par quels moyens la laccase de ces champignons parvient à dégrader la lignine ?

Bourbonnais et Paice ont été les premiers à apporter une réponse à cette question : certains substrats de la laccase agissent comme diffuseurs d'électrons et oxydent les composés non-phénoliques[148]. Ces substrats particuliers ont été qualifiés de « médiateurs » et forment avec la laccase un système communément appelé LMS.

Après leur oxydation par la laccase, les médiateurs forment des composés stables et mobiles capables d'atteindre des substrats inaccessibles à la laccase. Ils possèdent par ailleurs un potentiel redox plus élevé que celui de la laccase et procèdent selon des mécanismes différents, ce qui leur permet d'oxyder des molécules récalcitrantes à l'action de la laccase seule[149]. Le médiateur idéal est une molécule facilement oxydable par la laccase, dont le produit d'oxydation est suffisamment stable et mobile pour transférer efficacement les électrons, capable d'oxyder un grand nombre de substrats et qui ne désactive pas l'enzyme. Dans une perspective de développement durable, le médiateur idéal serait d'origine naturelle, non toxique et de faible coût.

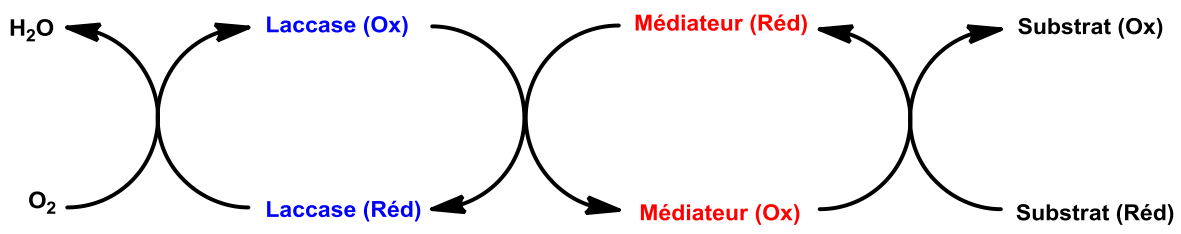


Figure 26 : Illustration du fonctionnement du système laccase-médiateur (LMS).

On distingue généralement les médiateurs dits « naturels » des médiateurs synthétiques (Figure 27). Les médiateurs naturels sont présentés comme les substrats utilisés dans la nature par les organismes sécréteurs de laccase. Il s'agit principalement de phénols syringyliques issus de la lignine[150]. Ces médiateurs sont générés par l'action de la laccase sur les groupements phénoliques de la lignine ; ils participent ensuite à l'oxydation des motifs les plus récalcitrants. Certains métabolites des champignons comme l'acide 3-hydroxyanthranilique peuvent également agir comme médiateur de la laccase[151].

Les trois médiateurs synthétiques les plus communément utilisés sont l'acide 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), le (2,2,6,6-Tétraméthyl-pipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO) et leurs dérivés. Le principal avantage de ces molécules par rapport aux médiateurs naturels est leur grande efficacité catalytique[150,152]. Leur défaut majeur est leur tendance à désactiver l'enzyme alors que les médiateurs naturels ont un effet stabilisant[153,154]. Deux autres avantages des médiateurs naturels sont leur faible coût et leur non toxicité (bien que la toxicité des médiateurs synthétiques n'ait jamais été avérée).

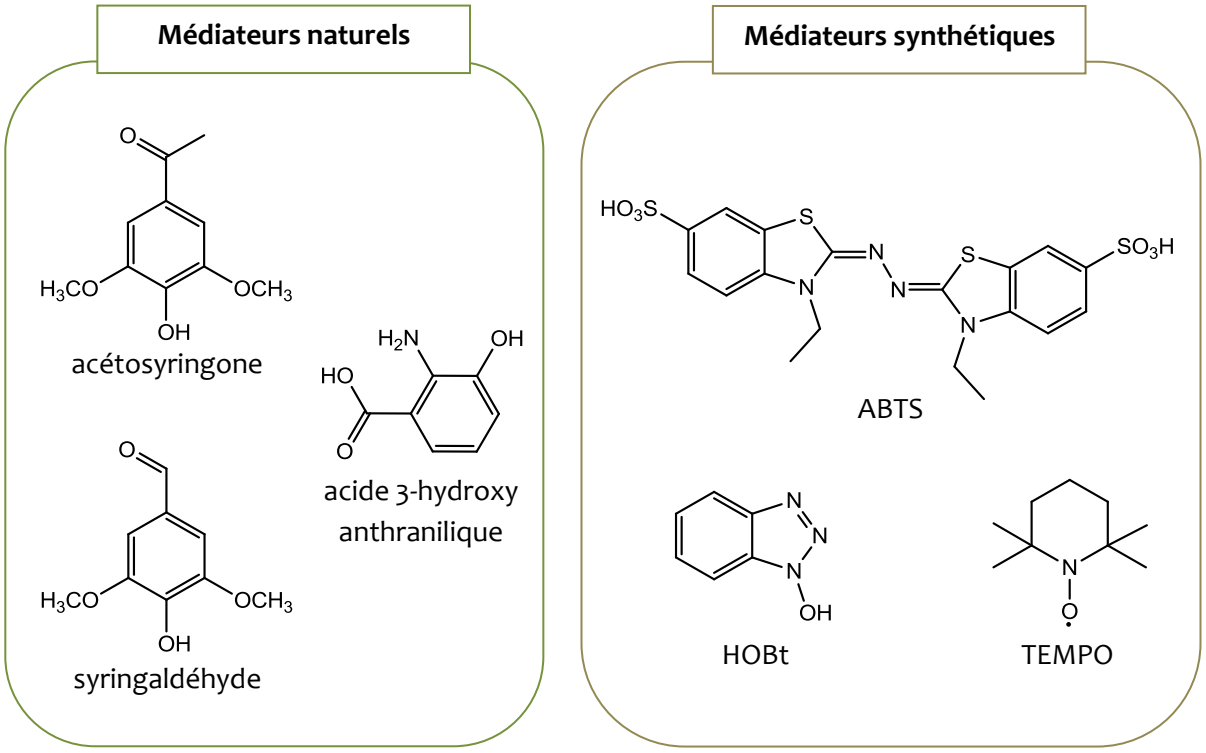


Figure 27 : Principaux médiateurs de la laccase.

Mécanismes d'oxydation

L'oxydation des substrats par le LMS procède selon trois mécanismes distincts en fonction du type de médiateur utilisé. Ces mécanismes sont schématisés dans la Figure 28-a. Les différences de mécanismes entre les divers médiateurs ont été mises en évidence par des réactions sur des substrats-cibles dont les produits d'oxydation diffèrent en fonction du mécanisme[155].

Le mécanisme le plus répandu est le transfert d'atome d'hydrogène (HAT). Ce type d'oxydation est partagé par les phénols naturels et le HOBt qui génèrent des radicaux (Ph-O$^{\bullet}$ et N-O$^{\bullet}$ respectivement) aux comportements similaires[156]. L'ABTS subit deux oxydations successives pour former l'ion $ABTS^{2+}$, espèce oxydante agissant par transfert d'électron (ET). La route HAT dépend essentiellement du caractère labile de l'hydrogène à arracher alors que la route ET est régie par le potentiel redox du substrat à oxyder[157]. Enfin le TEMPO et ses dérivés oxydent les substrats phénoliques et non phénoliques par l'intermédiaire d'un ion oxonium selon un mécanisme proposé par Gentilli *et al.* et schématisé en Figure 28-b[152].

Les différences de structure, de potentiel redox et de mécanisme des médiateurs ont des répercussions directes sur les produits d'oxydation générés. Jönsson *et al.* ont comparé la sélectivité des systèmes laccase-ABTS et laccase-HOBt sur un mélange érythro/thréo équimolaire d'un modèle de lignine. L'HOBt oxyde préférentiellement la forme érythro alors que l'ABTS ne présente pas de sélectivité particulière[158]. De plus, l'affinité d'une laccase pour un médiateur varie selon les couples LMS. Certaines variétés de laccase se sont montrées plus efficaces en présence de l'HOBt que de l'acide violurique quand d'autres présentaient le comportement inverse[159].

Ainsi le choix du médiateur devra se faire en fonction de la variété de la laccase, du substrat, du type de réactions visées (oxydation ou couplage) et des conditions réactionnelles.

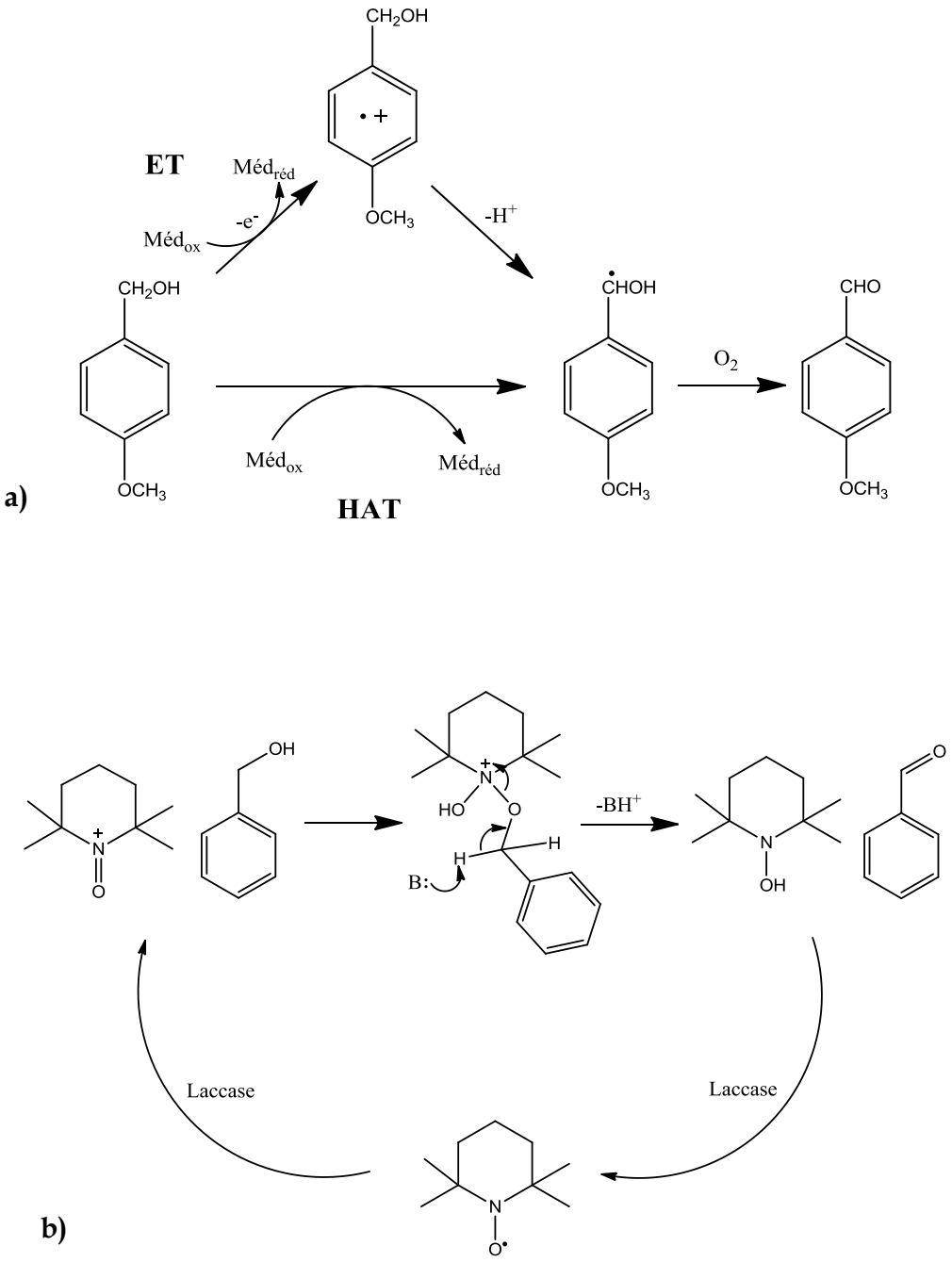


Figure 28 : Illustration des différents mécanismes utilisés par les médiateurs de la laccase. a) Transfert d'électrons (ET) et transfert d'atome d'hydrogène (HAT)[150]. b) Mécanisme ionique propre au TEMPO[147].

III.3. Application à la lignine et ses dérivés

Comme déjà évoqué, la laccase catalyse naturellement deux types de réactions opposées : la biosynthèse de la lignine par couplage radicalaire et la dégradation oxydante de la lignine. Les facteurs favorisant l'un ou l'autre phénomène dans la nature sont encore inconnus bien que des hypothèses soient proposées (compartimentation du substrat, de la laccase et des produits d'oxydation, action combinée de plusieurs enzymes[160]…).

Lorsque la laccase est directement appliquée sur la lignine *in vitro*, un nombre important de réactions d'origine radicalaire est observé : réaction de condensation, oxydation de l'hydroxyle en position α, rupture de la liaison C_α-C_β, déméthylation, formation de quinones. La présence de nombreuses fonctions réactives et la variété des structures présentes dans la lignine expliquent la complexité liée à son oxydation enzymatique. À titre d'exemple, la Figure 29 montre les produits d'oxydation de l'alcool vanillique par la laccase[161]. L'oxydation de ce modèle monomère simple conduit à la formation d'au moins sept molécules différentes (d'autres n'ayant pas été identifiées), ce qui laisse présager l'extrême complication des mécanismes mis en jeu lors de l'oxydation d'un polymère aussi complexe que la lignine.

Les hydroxyles phénoliques jouent un rôle majeur dans les réactions de condensation. Lorsque ces fonctions OH sont bloquées, le système laccase-médiateur est capable de rompre les liaisons β-O-4[162,163] et β-1[164] de dimères modèles. Mais ce même système promeut essentiellement des réactions de polymérisation quand il est appliqué à la lignine (qui contient 10 à 20 % d'unités phénoliques) ou à des modèles phénoliques[161,165,166]. L'enjeu principal concernant la dépolymérisation de la lignine par voie enzymatique est de trouver des conditions limitant ces réactions de condensation.

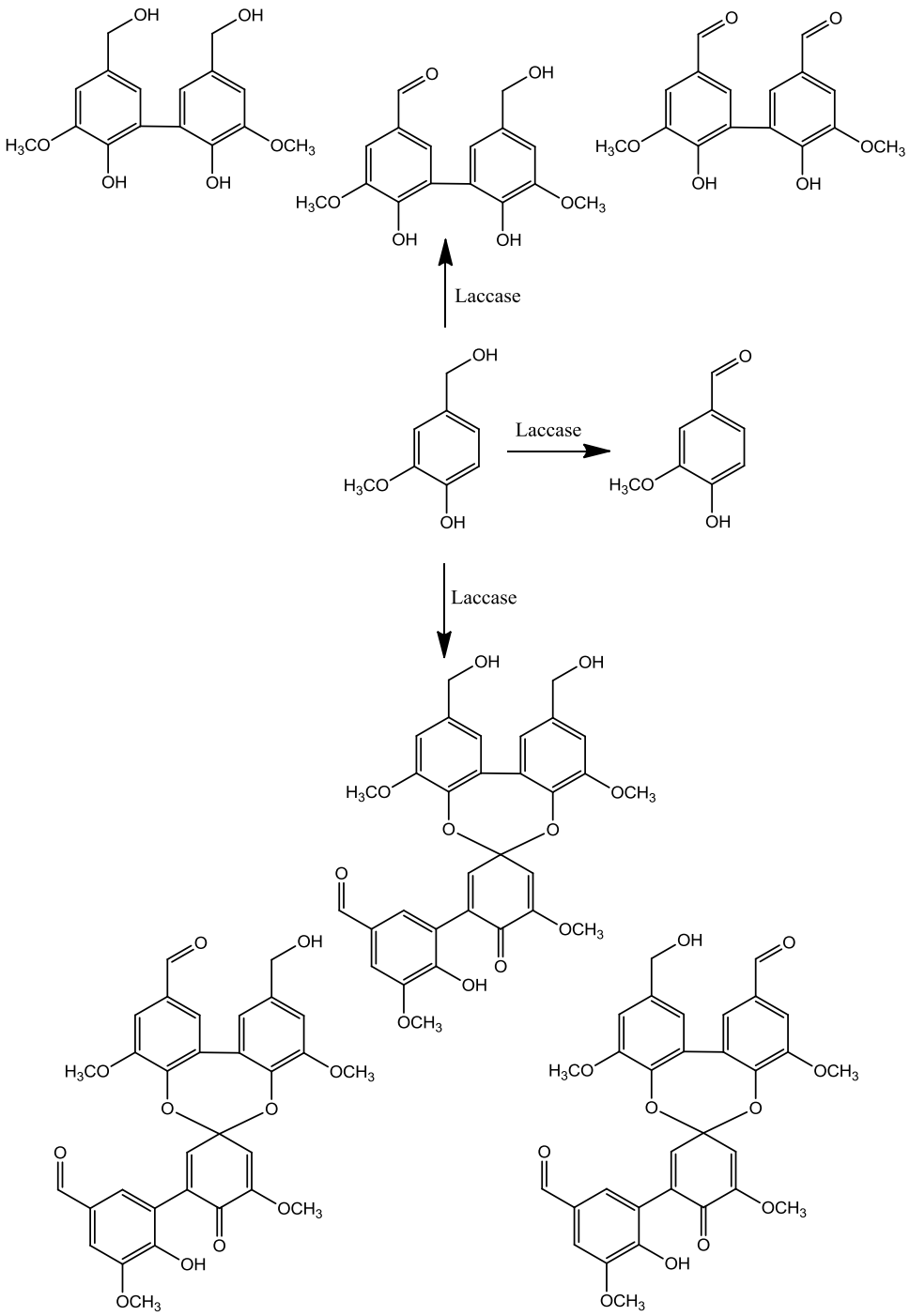


Figure 29 : Produits issus de l'oxydation de l'alcool vanillique par la laccase. Par ailleurs, des trimères et tétramères ont été détectés mais non identifiés[156].

Choix du solvant

Le paragraphe § II.3. a montré que seuls quelques solvants sont efficaces pour la solubilisation des lignines. Or, la laccase fonctionne essentiellement dans l'eau à pH 4-5. Dans ces conditions, certaines lignosulfonates sont solubles, mais la majorité des lignines ne l'est pas. Trouver un solvant compatible avec les deux systèmes n'est pas une tâche aisée. Certains auteurs choisissent de travailler dans un tampon optimal pour la laccase mais dans lequel la lignine est dispersée et non solubilisée[166,167]. Par cette stratégie, la mobilité des molécules de lignine est réduite ce qui diminue les probabilités de couplage. Cependant une dépolymérisation extensive de la lignine semble irréaliste dans ces conditions, la majorité de la lignine étant inaccessible.

Une méthode alternative profite du caractère robuste de la laccase, enzyme tolérant la présence de certains solvants organiques[165]. L'ajout d'un co-solvant organique dans les proportions adéquates permet d'améliorer considérablement la solubilité de la lignine tout en préservant l'activité de la laccase. Plusieurs solvants usuels ont montré de bonnes propriétés pour l'oxydation de la lignine par le LMS. Parmi ceux-ci, on peut citer l'acétone, le dioxane, le propylène glycol ou encore l'isopropanol[168]. Là encore le choix du solvant dépend du type de laccase utilisée et de l'origine de la lignine à oxyder.

Les liquides ioniques semblent posséder les caractéristiques idéales pour résoudre les problèmes de compatibilité entre la laccase et la lignine. Les solvants de type imidazolium sont de bons solvants de la lignine[48,50] et plusieurs d'entre eux sont compatibles avec la laccase[169]. Les performances de la laccase en présence d'IL sont généralement égales voire supérieures à celles observées dans les solvants organiques conventionnels[170]. Il a par ailleurs été montré que les IL pouvaient protéger l'enzyme par écrantage des ions responsables de sa désactivation[171]. Les interactions entre la laccase, l'eau et les ions des liquides ioniques déterminent le comportement de l'enzyme et sont difficiles à prédire[172]. Des tendances ont pu cependant être identifiées : plus les chaines alkyles des imidazoliums sont longues, plus l'activité de la laccase est inhibée[173] ; les anions halogénés perturbent le fonctionnement du site catalytique de l'enzyme et sont à éviter ; les anions de type sulfate d'alkyle sont les plus compatibles avec la laccase[174].

Influence du médiateur

L'hypothèse selon laquelle l'utilisation d'un médiateur favorise l'occurrence de réactions de dépolymérisation au profit du couplage a été communément diffusée[167,175]. Bien que l'emploi d'un médiateur soit indispensable à l'oxydation extensive de la lignine, ce n'est pas une condition suffisante pour s'affranchir des phénomènes de condensation. Des travaux plus récents utilisant les mêmes médiateurs conduisent à des conclusions opposées : le LMS semble induire essentiellement des réactions de couplage[176,177]. Enfin dans certains cas, la coexistence des produits d'oxydation et de dégradation a été observée[166].

De toute évidence, les deux phénomènes entrent constamment en compétition et ce sont les conditions opératoires qui orienteront la réaction vers une voie ou l'autre. La température et le pH du milieu, le mode d'agitation, l'activité de la laccase, le choix du co-solvant, la concentration et la solubilité de la lignine, tous ces paramètres ont autant d'influence que le choix du médiateur sur les produits finaux. La moindre variation d'un de ces paramètres peut avoir des conséquences insoupçonnées. Ceci explique les divergences de résultats entre les différents auteurs. C'est aussi la raison pour laquelle aucune méthode efficace de dépolymérisation de la lignine n'a encore pu être développée.

IV. Conclusion

Cette étude bibliographique a mis en évidence les enjeux et les difficultés liés à la recherche d'une voie de valorisation efficace de la lignine. Malgré les nombreux efforts tournés vers cet objectif, elle reste le seul constituant de la biomasse lignocellulosique pour lequel quasiment aucun procédé industriel n'a pu être développé pour exploiter au mieux cette ressource au fort potentiel. Ainsi, la conversion de la cellulose et des hémicelluloses en sucres simples par hydrolyse permet la production de carburant et de molécules plateformes pour la chimie d'origine naturelle. Ces techniques sont actuellement appliquées dans des usines de capacité de production élevée.

Malheureusement, la forte complexité de la lignine et son caractère hétérogène limitent pour l'instant son utilisation commerciale à des applications de faible valeur ajoutée, comme celle d'agent dispersant dans les ciments. La dépolymérisation de la lignine pour l'obtention de molécules aromatiques d'origine naturelle capables de remplacer leurs équivalents pétrosourcés semblent être la voie de valorisation la plus prometteuse pour ce biopolymère. Il est clair que la mise au point de procédés de dépolymérisation de la lignine à grande échelle est indispensable pour le développement des bioraffineries de demain.

Parmi les nombreuses stratégies développées pour la dépolymérisation de la lignine, l'oxydation sélective des fonctions hydroxyles en position α suivie de la rupture de la liaison C-C oxydée est une des voies les plus prometteuses. Dans le meilleur des cas, jusqu'à 60% de lignine ont pu être convertis en molécules de faibles masses molaires. Dans cette étude, un dérivé du TEMPO est utilisé pour l'étape d'oxydation sélective. Cette méthode n'a cependant été conduite qu'à l'échelle du laboratoire et la question de l'isolation des nombreux produits générés devra être traitée avant de pouvoir imaginer une application industrielle.

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte de valorisation d'une ressource naturelle au fort potentiel. Il a pour but la mise au point d'un procédé de dépolymérisation de la lignine impliquant un système enzymatique pour l'obtention de molécules aromatiques de faibles masses molaires (monomères à trimères). La première partie de ce manuscrit présente l'étude des caractéristiques d'une laccase fongique de type *Trametes versicolor*. L'oxydation de modèles de lignine par différents systèmes laccase-médiateur a notamment permis une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu ainsi que la mise au point des conditions réactionnelles optimales. Ces conditions ont été adaptées pour l'oxydation de deux lignines de type organosolv dans la seconde partie. Une stratégie de dépolymérisation en trois étapes a été développée. Des molécules de faibles masses molaires ont pu être obtenues par cette stratégie pour les deux lignines étudiées.

Références bibliographiques

1. P. Jodin. *Le bois. Matériau d'ingénierie*. (Arbolor, 1994).
2. J.D. Hale & R.L. Janes. *Pulp and paper manufacture - The pulping of wood*. **1,** (McGraw-Hillbook Company, 1969).
3. Philippe Berger. Le matériau bois.
4. E. Sjöström. *Wood chemistry - Fundamentals and applications*. (Academic Press, Inc., 1993).
5. Panshin, A. J. & C. de Zeeuw. *Textbook of wood technology*. (McGraw-Hillbook Company, 1964).
6. Ceres, Inc.
7. Pettersen, R. C. The chemical composition of wood. *Chem. Solid Wood* **207,** 57–126 (1984).
8. Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D. & Rogers, R. D. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **124,** 4974–4975 (2002).
9. www.wwf.panda.org. Pulp and paper.
10. You, T.-T., Zhang, L.-M., Zhou, S.-K. & Xu, F. Structural elucidation of lignin–carbohydrate complex (LCC) preparations and lignin from Arundo donax Linn. *Ind. Crops Prod.* **71,** 65–74 (2015).
11. Takahashi, N. & Koshijima, T. Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (Fagus crenata) wood. *Wood Sci. Technol.* **22,** 231–241 (1988).
12. Gírio, F. M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* **101,** 4775–4800 (2010).

13. Adler, E. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **11,** 169–218 (1977).

14. Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W. Lignin Biosynthesis and Structure. *PLANT Physiol.* **153,** 895–905 (2010).

15. Holladay, J. E., Bozell, J. J., White, J. F. & Johnson, D. Top value-added chemicals from biomass. *DOE Rep. PNNL* **16983,** (2007).

16. Areskogh, D., Li, J., Gellerstedt, G. & Henriksson, G. Investigation of the Molecular Weight Increase of Commercial Lignosulfonates by Laccase Catalysis. *Biomacromolecules* **11,** 904–910 (2010).

17. Varanasi, P. *et al.* Survey of renewable chemicals produced from lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* **6,** 1 (2013).

18. Azadi, P., Inderwildi, O. R., Farnood, R. & King, D. A. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **21,** 506–523 (2013).

19. Crestini, C. & Argyropoulos, D. S. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative 31P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α-O-4 substructures. *J. Agric. Food Chem.* **45,** 1212–1219 (1997).

20. Dodd, A. P., Kadla, J. F. & Straus, S. K. Characterization of Fractions Obtained from Two Industrial Softwood Kraft Lignins. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3,** 103–110 (2015).

21. Wen, J.-L., Sun, S.-L., Yuan, T.-Q. & Sun, R.-C. Structural elucidation of whole lignin from Eucalyptus based on preswelling and enzymatic hydrolysis. *Green Chem* **17,** 1589–1596 (2015).

22. Gordobil, O., Moriana, R., Zhang, L., Labidi, J. & Sevastyanova, O. Assesment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. *Ind. Crops Prod.* **83,** 155–165 (2016).

23. Constant, S. *et al.* New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. *Green Chem* (2016).

24. T. Higushi. Lignin biochemistry : biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* **24,** 23–63 (1990).

25. Ghaffar, S. H. & Fan, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass Bioenergy* **57,** 264–279 (2013).

26. K. Freudenberg. Lignin : its constitution and formation from p-hydroxycinnamym alcohols. *Science* **148,** 595–600 (1965).

27. Mansfield, S. D., Kim, H., Lu, F. & Ralph, J. Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR. *Nat. Protoc.* **7,** 1579–1589 (2012).

28. Chakar, F. S. & Ragauskas, A. J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Ind. Crops Prod.* **20,** 131–141 (2004).

29. Gierer, J. Chemical aspects of kraft pulping. *Wood Sci. Technol.* **14,** 241–266 (1980).

30. Pu, Y., Kosa, M., Kalluri, U. C., Tuskan, G. A. & Ragauskas, A. J. Challenges of the utilization of wood polymers: how can they be overcome? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91,** 1525–1536 (2011).

31. Stern, T. & Schwarzbauer, P. Wood-based lignosulfonate versus synthetic polycarboxylate in concrete admixture systems: the perspective of a traditional pulping by-product competing with an oil-based substitute in a business-to-business market in Central Europe. *For. Prod. J.* **58,** 81 (2008).

32. Acar, N., Moran, E. T., Revington, W. H. & Bilgili, S. F. Effect of improved pellet quality from using a calcium lignosulfonate binder on performance and carcass yield of broilers reared under different marketing schemes. *Poult. Sci.* **70,** 1339–1344 (1991).

33. Bjørsvik, H.-R. & Minisci, F. Fine Chemicals from Lignosulfonates. 1. Synthesis of Vanillin by Oxidation of Lignosulfonates. *Org. Process Res. Dev.* **3,** 330–340 (1999).

34. Priefert, H., Rabenhorst, J. & Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56,** 296–314 (2001).

35. Condassamy, O. Valorisation d'une lignine alcaline industrielle: vers le développement de nouveaux synthons et oligomères bio-sourcés issus de la lignine. (Université de Bordeaux, 2015).

36. Muurinen, E. Organosolv pulping: a review and distillation study related to peroxyacid pulping. (Oulun yliopisto, 2000).

37. Katahira, R. *et al.* Evaluation of Clean Fractionation Pretreatment for the Production of Renewable Fuels and Chemicals from Corn Stover. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2,** 1364–1376 (2014).

38. Wang, M., Leitch, M. & (Charles) Xu, C. Synthesis of phenol–formaldehyde resol resins using organosolv pine lignins. *Eur. Polym. J.* **45,** 3380–3388 (2009).

39. Belgacem, M. N., Blayo, A. & Gandini, A. Organosolv lignin as a filler in inks, varnishes and paints. *Ind. Crops Prod.* **18,** 145–153 (2003).

40. Xu, F., Sun, J.-X., Sun, R., Fowler, P. & Baird, M. S. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Ind. Crops Prod.* **23,** 180–193 (2006).

41. Rodríguez, A., Sánchez, R., Requejo, A. & Ferrer, A. Feasibility of rice straw as a raw material for the production of soda cellulose pulp. *J. Clean. Prod.* **18,** 1084–1091 (2010).

42. González-García, S., Teresa Moreira, M., Artal, G., Maldonado, L. & Feijoo, G. Environmental impact assessment of non-wood based pulp production by soda-anthraquinone pulping process. *J. Clean. Prod.* **18,** 137–145 (2010).

43. X. Li & S. Wu. Chemical structure and pyrolysis characteristics of the soda-alkali lignin fractions. *Bioresources* **9,** 6277–6289 (2014).

44. Wyman, C. E. & Goodman, B. J. Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39,** 41–59 (1993).

45. Chandra, R. P. *et al.* in *Biofuels* (ed. Olsson, L.) **108,** 67–93 (Springer Berlin Heidelberg, 2007).

46. Nakagame, S., Chandra, R. P., Kadla, J. F. & Saddler, J. N. The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour. Technol.* **102,** 4507–4517 (2011).

47. Carrott, P. J. M., Suhas, Carrott, M. M. L. R., Guerrero, C. I. & Delgado, L. A. Reactivity and porosity development during pyrolysis and physical activation in CO2 or steam of kraft and hydrolytic lignins. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **82,** 264–271 (2008).

48. Achinivu, E. C., Howard, R. M., Li, G., Gracz, H. & Henderson, W. A. Lignin extraction from biomass with protic ionic liquids. *Green Chem* **16,** 1114–1119 (2014).

49. Lee, S. H., Doherty, T. V., Linhardt, R. J. & Dordick, J. S. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **102,** 1368–1376 (2009).

50. Pu, Y., Jiang, N. & Ragauskas, A. J. Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin. *J. Wood Chem. Technol.* **27,** 23–33 (2007).

51. J.H. Clark, F.D.I. Deswarte & T.J. Farmer. The integration of green chemistry in future biorefineries.pdf. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **3,** 72–90 (2009).

52. Plank, J. Applications of biopolymers and other biotechnological products in building materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66,** 1–9 (2004).

53. Lora, J. H. & Glasser, W. G. Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *J. Polym. Environ.* **10,** 39–48 (2002).

54. Y. Uraki, S. Kubo, N. Nigo, Y. Sano & T. Sasaya. Preparation of carbon fibers from organosolv lignin. *Holzforschung* **49,** 343–350 (1995).

55. Chatterjee, S. *et al.* Conversion of Lignin Precursors to Carbon Fibers with Nanoscale Graphitic Domains. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2,** 2002–2010 (2014).

56. Snowdon, M. R., Mohanty, A. K. & Misra, M. A Study of Carbonized Lignin as an Alternative to Carbon Black. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2,** 1257–1263 (2014).

57. Silva, E. A. B. da *et al.* An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chem. Eng. Res. Des.* **87,** 1276–1292 (2009).

58. Kelley, S. S., Glasser, W. G. & Ward, T. C. Engineering Plastics from Lignin XIV. Characterization of Chain-Extended Hydroxypropyl Lignins. *J. Wood Chem. Technol.* **8,** 341–359 (1988).

59. Cazacu, G. *et al.* Polyolefin/Lignosulfonate Blends, 9. *Macromol. Mater. Eng.* **289,** 880–889 (2004).

60. Gosselink, R. J. A. *et al.* Characterisation and application of NovaFiber lignin. *Ind. Crops Prod.* **20,** 191–203 (2004).

61. H. Li, A. Rakotovelo, M.T. Ton-that & N. Legros. PLA-Thermoplastic lignin blends. *Plast. Eng.* **69,** 60–64 (2013).

62. Muller, P. C., Kelley, S. S. & Glasser, W. G. Engineering Plastics from Lignin. IX. Phenolic Resin Synthesis and Characterization. *J. Adhes.* **17,** 185–206 (1984).

63. N. S. Cetin & N. Özmen. Use of organosolv lignin in phenol-formaldehyde resins for particleboard production.pdf. *Int. J. Adhes. Adhes.* **22,** 477–480 (2002).

64. Vazquez, G., Rodríguez-Bona, C., Freire, S., Gonzalez-Alvarez, J. & Antorrena, G. Acetosolv pine lignin as copolymer in resins for manufacture of exterior grade plywoods. *Bioresour. Technol.* **70,** 209–214 (1999).

65. Hofmann, K. & Glasser, W. Engineering plastics from lignin, 23. Network formation of lignin-based epoxy resins. *Macromol. Chem. Phys.* **195,** 65–80 (1994).

66. Kosbar, L. L., Gelorme, J. D., Japp, R. M. & Fotorny, W. T. Introducing biobased materials into the electronics industry. *J. Ind. Ecol.* **4,** 93–105 (2000).

67. Suhas, Carrott, P. J. M. & Ribeiro Carrott, M. M. L. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: A review. *Bioresour. Technol.* **98,** 2301–2312 (2007).

68. He, Z.-W., He, L.-H., Yang, J. & Lü, Q.-F. Removal and Recovery of Au(III) from Aqueous Solution Using a Low-Cost Lignin-Based Biosorbent. *Ind. Eng. Chem. Res.* **52,** 4103–4108 (2013).

69. Mathers, R. T. How well can renewable resources mimic commodity monomers and polymers? *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **50,** 1–15 (2012).

70. Zakzeski, J., Bruijnincx, P. C. A., Jongerius, A. L. & Weckhuysen, B. M. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chem. Rev.* **110,** 3552–3599 (2010).

71. Pepper, J. M. & Hibbert, H. Studies on Lignin and Related Compounds. LXXXVII. High Pressure Hydrogenation of Maple Wood1. *J. Am. Chem. Soc.* **70,** 67–71 (1948).

72. Lange, H., Decina, S. & Crestini, C. Oxidative upgrade of lignin – Recent routes reviewed. *Eur. Polym. J.* **49,** 1151–1173 (2013).

73. Haveren, J. van, Scott, E. L. & Sanders, J. Bulk chemicals from biomass. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2,** 41–57 (2008).

74. Zakzeski, J., Jongerius, A. L., Bruijnincx, P. C. A. & Weckhuysen, B. M. Catalytic Lignin Valorization Process for the Production of Aromatic Chemicals and Hydrogen. *ChemSusChem* **5,** 1602–1609 (2012).

75. D.T.A. Huibers & H.J Parkhurst Jr. Lignin hydrocracking process to produce phenol and benzene.

76. Nichols, J. M., Bishop, L. M., Bergman, R. G. & Ellman, J. A. Catalytic C−O Bond Cleavage of 2-Aryloxy-1-arylethanols and Its Application to the Depolymerization of Lignin-Related Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **132,** 12554–12555 (2010).

77. Ma, X., Tian, Y., Hao, W., Ma, R. & Li, Y. Production of phenols from catalytic conversion of lignin over a tungsten phosphide catalyst. *Appl. Catal. Gen.* **481,** 64–70 (2014).

78. Li, C., Zheng, M., Wang, A. & Zhang, T. One-pot catalytic hydrocracking of raw woody biomass into chemicals over supported carbide catalysts: simultaneous conversion of cellulose, hemicellulose and lignin. *Energy Env. Sci* **5,** 6383–6390 (2012).

79. Molinari, V., Giordano, C., Antonietti, M. & Esposito, D. Titanium Nitride-Nickel Nanocomposite as Heterogeneous Catalyst for the Hydrogenolysis of Aryl Ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **136,** 1758–1761 (2014).

80. Alonso, D. M., Wettstein, S. G. & Dumesic, J. A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chem. Soc. Rev.* **41,** 8075 (2012).

81. Parsell, T. H. *et al.* Cleavage and hydrodeoxygenation (HDO) of C–O bonds relevant to lignin conversion using Pd/Zn synergistic catalysis. *Chem Sci* **4,** 806–813 (2013).

82. Laskar, D. D., Tucker, M. P., Chen, X., Helms, G. L. & Yang, B. Noble-metal catalyzed hydrodeoxygenation of biomass-derived lignin to aromatic hydrocarbons. *Green Chem.* **16,** 897 (2014).

83. Ma, R., Hao, W., Ma, X., Tian, Y. & Li, Y. Catalytic Ethanolysis of Kraft Lignin into High-Value Small-Molecular Chemicals over a Nanostructured α-Molybdenum Carbide Catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53,** 7310–7315 (2014).

84. Chen, L. *et al.* Conversion of lignin model compounds under mild conditions in pseudo-homogeneous systems. *Green Chem* **18,** 2341–2352 (2016).

85. Li, Z. *et al.* Mild electrocatalytic hydrogenation and hydrodeoxygenation of bio-oil derived phenolic compounds using ruthenium supported on activated carbon cloth. *Green Chem.* **14,** 2540 (2012).

86. Lam, C. H. *et al.* Electrocatalytic upgrading of model lignin monomers with earth abundant metal electrodes. *Green Chem* **17,** 601–609 (2015).

87. Vennestrøm, P. N. R., Osmundsen, C. M., Christensen, C. H. & Taarning, E. Beyond Petrochemicals: The Renewable Chemicals Industry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50,** 10502–10509 (2011).

88. Rodrigues Pinto, P. C., Borges da Silva, E. A. & Rodrigues, A. E. in *Biomass Conversion* (eds. Baskar, C., Baskar, S. & Dhillon, R. S.) 381–420 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).

89. Wang, Z., Chen, K., Li, J., Wang, Q. & Guo, J. Separation of Vanillin and Syringaldehyde from Oxygen Delignification Spent Liquor by Macroporous Resin Adsorption. *CLEAN - Soil Air Water* **38,** 1074–1079 (2010).

90. Oxidation activity and stability of homogeneous cobalt-sulphosalen catalyst.pdf.

91. Zhou, X.-F. & Liu, J. Co(salen) catalysed oxidation of synthetic lignin-like polymer: Co(salen) effects. *Hem. Ind.* **66,** 685–692 (2012).

92. Bozell, J. J. *et al.* Integrating Separation and Conversion—Conversion of Biorefinery Process Streams to Biobased Chemicals and Fuels. *BioEnergy Res.* **7,** 856–866 (2014).

93. Harms, R. G. *et al.* Cleavage of C□O Bonds in Lignin Model Compounds Catalyzed by Methyldioxorhenium in Homogeneous Phase. *ChemSusChem* **7,** 429–434 (2014).

94. Crestini, C., Pro, P., Neri, V. & Saladino, R. Methyltrioxorhenium: a new catalyst for the activation of hydrogen peroxide to the oxidation of lignin and lignin model compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **13,** 2569–2578 (2005).

95. Hanson, S. K., Baker, R. T., Gordon, J. C., Scott, B. L. & Thorn, D. L. Aerobic Oxidation of Lignin Models Using a Base Metal Vanadium Catalyst. *Inorg. Chem.* **49,** 5611–5618 (2010).

96. Son, S. & Toste, F. D. Non-Oxidative Vanadium-Catalyzed C-O Bond Cleavage: Application to Degradation of Lignin Model Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49,** 3791–3794 (2010).

97. Díaz-Urrutia, C. *et al.* Towards lignin valorisation: comparing homogeneous catalysts for the aerobic oxidation and depolymerisation of organosolv lignin. *RSC Adv* **5,** 70502–70511 (2015).

98. Sik Kim, Y., Chang, H. & Kadla, J. F. Polyoxometalate (POM) Oxidation of Milled Wood Lignin (MWL). *J. Wood Chem. Technol.* **27,** 225–241 (2007).

99. Zhao, Y. *et al.* Depolymerization of lignin by catalytic oxidation with aqueous polyoxometalates. *Appl. Catal. Gen.* **467,** 504–508 (2013).

100. Gamelas, J. A. F., Pontes, A. S. N., Evtuguin, D. V., Xavier, A. M. R. B. & Esculcas, A. P. New polyoxometalate–laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochem. Eng. J.* **33,** 141–147 (2007).

101. Cuit, F. & Dolphin, D. e Pergamon. *Bioorg. Med. Chem.* **3,** 471–477 (1995).

102. Barbat, A., Gloaguen, V., Sol, V. & Krausz, P. Aqueous extraction of glucuronoxylans from chestnut wood: New strategy for lignin oxidation using phthalocyanine or porphyrin/H2O2 system. *Bioresour. Technol.* **101,** 6538–6544 (2010).

103. Crestini, C., Saladino, R., Tagliatesta, P. & Boschi, T. Biomimetic degradation of lignin and lignin model compounds by synthetic anionic and cationic water soluble manganese and iron porphyrins. *Bioorg. Med. Chem.* **7,** 1897–1905 (1999).

104. Crestini, C., Pastorini, A. & Tagliatesta, P. Metalloporphyrins immobilized on motmorillonite as biomimetic catalysts in the oxidation of lignin model compounds. *J. Mol. Catal. Chem.* **208,** 195–202 (2004).

105. Crestini, C., Pastorini, A. & Tagliatesta, P. The Immobilized Porphyrin-Mediator System Mn(TMePyP)/clay/HBT (clay-PMS): A Lignin Peroxidase Biomimetic Catalyst in the Oxidation of Lignin and Lignin Model Compounds. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004,** 4477–4483 (2004).

106. Rahimi, A., Azarpira, A., Kim, H., Ralph, J. & Stahl, S. S. Chemoselective Metal-Free Aerobic Alcohol Oxidation in Lignin. *J. Am. Chem. Soc.* **135,** 6415–6418 (2013).

107. Rahimi, A., Ulbrich, A., Coon, J. J. & Stahl, S. S. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. *Nature* **515,** 249–252 (2014).

108. Lancefield, C. S., Ojo, O. S., Tran, F. & Westwood, N. J. Isolation of Functionalized Phenolic Monomers through Selective Oxidation and C-O Bond Cleavage of the β-O-4 Linkages in Lignin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54,** 258–262 (2015).

109. Roberts, V. M. *et al.* Towards Quantitative Catalytic Lignin Depolymerization. *Chem. - Eur. J.* **17,** 5939–5948 (2011).

110. Toledano, A., Serrano, L. & Labidi, J. Improving base catalyzed lignin depolymerization by avoiding lignin repolymerization. *Fuel* **116,** 617–624 (2014).

111. Nanayakkara, S., Patti, A. F. & Saito, K. Chemical depolymerization of lignin involving the redistribution mechanism with phenols and repolymerization of depolymerized products. *Green Chem* **16,** 1897–1903 (2014).

112. Nanayakkara, S., Patti, A. F. & Saito, K. Lignin Depolymerization with Phenol via Redistribution Mechanism in Ionic Liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2,** 2159–2164 (2014).

113. Voitl, T. & Rudolf von Rohr, P. Oxidation of Lignin Using Aqueous Polyoxometalates in the Presence of Alcohols. *ChemSusChem* **1,** 763–769 (2008).

114. Kaiho, A., Kogo, M., Sakai, R., Saito, K. & Watanabe, T. In situ trapping of enol intermediates with alcohol during acid-catalysed de-polymerisation of lignin in a nonpolar solvent. *Green Chem* **17,** 2780–2783 (2015).

115. Vennestrøm, P. N. R., Christensen, C. H., Pedersen, S., Grunwaldt, J.-D. & Woodley, J. M. Next-Generation Catalysis for Renewables: Combining Enzymatic with Inorganic Heterogeneous Catalysis for Bulk Chemical Production. *ChemCatChem* **2,** 249–258 (2010).

116. Huang, H.-J., Ramaswamy, S., Tschirner, U. W. & Ramarao, B. V. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Sep. Purif. Technol.* **62,** 1–21 (2008).

117. Imperato, G., König, B. & Chiappe, C. Ionic Green Solvents from Renewable Resources. *Eur. J. Org. Chem.* **2007,** 1049–1058 (2007).

118. Zhu, S. *et al.* Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chem.* **8,** 325 (2006).

119. Strassberger, Z., Tanase, S. & Rothenberg, G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv.* **4,** 25310 (2014).

120. Boyle, C. D., Kropp, B. R. & Reid, I. D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **58,** 3217–3224 (1992).

121. Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M. & Rahmanpour, R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.* **28,** 1883 (2011).

122. Wong, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157,** 174–209 (2009).

123. Hammel, K. E. *et al.* Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* **268,** 12274–12281 (1993).

124. Koduri, R. S. & Tien, M. Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase role of veratryl alcohol. *J. Biol. Chem.* **270,** 22254–22258 (1995).

125. Ma, D. Oxidation of 4-Methoxymandelic Acid by Lignin Peroxidase. MEDIATION BY VERATRYL ALCOHOL. *J. Biol. Chem.* **272,** 8912–8917 (1997).

126. Mester, T. *et al.* Oxidation of a Tetrameric Nonphenolic Lignin Model Compound by Lignin Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276,** 22985–22990 (2001).

127. Fernández-Fueyo, E. *et al.* Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnol. Biofuels* **7,** 1 (2014).

128. Umezawa, T. & Higuchi, T. Aromatic ring cleavage of β-O-4 lignin model dimers without prior demeth (ox) ylation by lignin peroxidase. *FEBS Lett.* **205,** 293–298 (1986).

129. Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. & Del Rio, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* **8,** 187204Minami (2005).

130. Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* **30,** 454–466 (2002).

131. Wariishi - Mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase.pdf.

132. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by MnP.pdf.

133. Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K. A., Moen, M. A. & Hammel, K. E. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.* **354,** 297–300 (1994).

134. Hofrichter, M., Lundell, T. & Hatakka, A. Conversion of Milled Pine Wood by Manganese Peroxidase from Phlebia radiata. *Appl. Environ. Microbiol.* **67,** 4588–4593 (2001).

135. Depolymerization of straw lignin by manganese peroxidase.pdf.

136. Yoshida, H. LXIII.—chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. *J. Chem. Soc. Trans.* **43,** 472–486 (1883).

137. Pollegioni, L., Tonin, F. & Rosini, E. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J.* **282,** 1190–1213 (2015).

138. Giardina, P. *et al.* Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67,** 369–385 (2010).

139. Suzuki, T. *et al.* A Thermostable Laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67,** 2167–2175 (2003).

140. Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O. & Carrondo, M. A. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component: A LACCASE WITH ENHANCED THERMOSTABILITY PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* **278,** 19416–19425 (2003).

141. Palmieri, G. *et al.* A novel white laccase from Pleurotus ostreatus. *J. Biol. Chem.* **272,** 31301–31307 (1997).

142. Zhao, D., Zhang, X., Cui, D. & Zhao, M. Characterisation of a Novel White Laccase from the Deuteromycete Fungus Myrothecium verrucaria NF-05 and Its Decolourisation of Dyes. *PLoS ONE* **7,** e38817 (2012).

143. Crestini, C., Jurasek, L. & Argyropoulos, D. S. On the Mechanism of the Laccase–Mediator System in the Oxidation of Lignin. *Chem. - Eur. J.* **9,** 5371–5378 (2003).

144. Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. & Golovleva, L. Yellow'laccase of Panus tigrinus oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Lett.* **413,** 446–448 (1997).

145. Rodríguez Couto, S. & Toca Herrera, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol. Adv.* **24,** 500–513 (2006).

146. Pezzella, C., Guarino, L. & Piscitelli, A. How to enjoy laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72,** 923–940 (2015).

147. Cambria, M. T., Minniti, Z., Librando, V. & Cambria, A. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Rigidoporus lignosus and its Laccase in the Presence of Redox Mediators. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **149,** 1–8 (2008).

148. Bourbonnais, R. & Paice, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS Lett.* **267,** 99–102 (1990).

149. d'Acunzo, F., Galli, C., Gentili, P. & Sergi, F. Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. The case of bifunctional substrates. *New J. Chem.* **30,** 583 (2006).

150. Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M. J. & Martinez, A. T. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71,** 1775–1784 (2005).

151. Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. & Eriksson, K.-E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *Febs Lett.* **391,** 144–148 (1996).

152. Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **16,** 231–240 (2002).

153. Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E. & Borneman, S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **63,** 4627–4632 (1997).

154. Aracri, E., Colom, J. F. & Vidal, T. Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: An effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres? *Bioresour. Technol.* **100,** 5911–5916 (2009).

155. Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **18,** 169–171 (2002).

156. Calcaterra, A., Galli, C. & Gentili, P. Phenolic compounds as likely natural mediators of laccase: A mechanistic assessment. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **51,** 118–120 (2008).

157. Cantarella, G., Galli, C. & Gentili, P. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **22,** 135–144 (2003).

158. Bohlin, C., Lundquist, K. & Jönsson, L. J. Oxidation of the erythro and threo forms of the phenolic lignin model compound 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1,3-propanediol by laccases and model oxidants. *Bioorganic Chem.* **37,** 143–148 (2009).

159. Li, K., Xu, F. & Eriksson, K.-E. L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **65,** 2654–2660 (1999).

160. Ander, P., Sena-Martins, G. & Duarte, J. C. Influence of cellobiose oxidase on peroxidases from Phanerochaete chrysosporium. *Biochem. J.* **293,** 431–435 (1993).

161. Lahtinen, M., Kruus, K., Heinonen, P. & Sipilä, J. On the Reactions of Two Fungal Laccases Differing in Their Redox Potential with Lignin Model Compounds: Products and Their Rate of Formation. *J. Agric. Food Chem.* **57,** 8357–8365 (2009).

162. Aromatic ring cleavage of a non phenolic bo4 lignin model dimer by laccase.pdf.

163. Kawai, S. *et al.* Degradation of a non-phenolic β-O-4 substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of Coriolus versicolor in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *FEMS Microbiol. Lett.* **170,** 51–57 (1999).

164. Kawai, S., Umezawa, T. & Higuchi, T. Degradation mechanisms of phenolic β-1 lignin substructure model compounds by laccase. *Archives of biochemistry and biophysics.* **262**. 99-110 (1988)

165. Mattinen, M.-L. *et al.* Oxidation of lignans and lignin model compounds by laccase in aqueous solvent systems. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **72,** 122–129 (2011).

166. Shleev, S. *et al.* Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme Microb. Technol.* **39,** 841–847 (2006).

167. Crestini, C., Jurasek, L. & Argyropoulos, D. S. On the Mechanism of the Laccase–Mediator System in the Oxidation of Lignin. *Chem. - Eur. J.* **9,** 5371–5378 (2003).

168. d'Acunzo, F., Barreca, A. M. & Galli, C. Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **31,** 25–30 (2004).

169. Rehmann, L. *et al.* Measuring the effect of ionic liquids on laccase activity using a simple, parallel method. *Green Chem.* **14,** 725 (2012).

170. Hinckley, G., Mozhaev, V. V., Budde, C. & Khmelnitsky, Y. L. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnol. Lett.* **24,** 2083–2087 (2002).

171. Lahtinen, M. *et al.* On the reactivity of the Melanocarpus albomyces laccase and formation of coniferyl alcohol dehydropolymer (DHP) in the presence of ionic liquid 1-allyl-3-methylimidazolium chloride. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **85–86,** 169–177 (2013).

172. Shipovskov, S., Gunaratne, H. Q. N., Seddon, K. R. & Stephens, G. Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chem.* **10,** 806 (2008).

173. Rodríguez, O., Cristóvão, R. O., Tavares, A. P. M. & Macedo, E. A. Study of the Alkyl Chain Length on Laccase Stability and Enzymatic Kinetic with Imidazolium Ionic Liquids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164,** 524–533 (2011).

174. Domínguez, A. *et al.* Studies of laccase from *Trametes* versicolor in aqueous solutions of several methylimidazolium ionic liquids. *Bioresour. Technol.* **102,** 7494–7499 (2011).

175. Hernández Fernaud, J. R. *et al.* Upgrading of an industrial lignin by using laccase produced by Fusarium proliferatum and different laccase-mediator systems. *Enzyme Microb. Technol.* **38,** 40–48 (2006).

176. Moya, R. *et al.* Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresour. Technol.* **102,** 10006–10012 (2011).

177. Nugroho Prasetyo, E. *et al.* Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. *Bioresour. Technol.* **101,** 5054–5062 (2010).

Partie A: Mise en place de conditions opératoires – Oxydation de modèles de lignine

Sommaire

Partie A : Mise en place de conditions opératoires - Oxydation de modèles de lignine

Chapitre 1 : Étude d'une laccase issue de *Trametes* versicolor.....99

I. Mesure de l'activité enzymatique.....99

II. Influence des paramètres réactionnels sur l'activité enzymatique.....102

II.1. Influence du pH.....102

II.2. Effet du co-solvant.....103

II.3. Température optimale 104

III. Conclusion.....106

Chapitre 2 : Oxydation de modèles de lignine.....107

I. Criblage de médiateurs.....109

I.1. Médiateurs naturels.....109

I.2. Médiateurs synthétiques.....110

I.3. Association de médiateurs.....112

I.3. Voltammétrie cyclique.....115

II. Conditions réactionnelles.....119

II.1. Température.....119

II.2. Concentration enzymatique.....120

II.3. Ajout d'un agent tensioactif.....121

II.4. Choix du co-solvant.....123

II.5. Type d'agitation.....124

III. Oxydation d'autres modèles de lignine.....126

III.1. Influence de l'encombrement stérique : ACVEtRéd.....126

III.2 Substrat phénolique : 2,6-diméthoxyphénol.....127

III.3. Modèles dimères.....128

IV. Immobilisation enzymatique.....132

IV.1. Immobilisation d'une laccase de *Trametes* versicolor.....133

IV.2. Propriétés des enzymes encapsulées 138

IV.3 Oxydation de l'ACVBnRéd.....143

IV.4. Conclusion.....144

Références bibliographiques.....145

Chapitre 1 : Étude d'une laccase issue de *Trametes versicolor*

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été conduits exclusivement sur des laccases fongiques issues de l'espèce *Trametes versicolor*. Cette variété de laccase est largement employée dans le domaine de la recherche notamment pour son potentiel redox élevé, situé autour de 0,8V[1]. De plus, elle est une des rares laccases disponibles commercialement.

Comme évoqué dans le chapitre bibliographique, différentes variétés de laccase peuvent avoir des comportements très distincts. L'origine d'une laccase conditionne par exemple son potentiel redox, sa température et son pH de fonctionnement optimal, ou son affinité pour certains substrats. Les modes de production et de purification employés jouent également un rôle majeur sur l'activité de l'enzyme. Il est donc indispensable de déterminer les principales caractéristiques d'une enzyme avant toute étude. C'est l'objet de ce chapitre.

Tout d'abord, l'activité de la laccase de *Trametes versicolor* a été déterminée selon deux méthodes différentes. Puis l'impact de plusieurs paramètres réactionnels sur l'activité de l'enzyme a été évalué.

I. Mesure de l'activité enzymatique

La laccase possède une faible spécificité de substrat : elle est capable d'oxyder une grande variété de molécules. Bien que cette versatilité soit un atout indéniable pour les chercheurs et les industriels, elle pose problème pour la détermination de l'activité de l'enzyme. L'enjeu est d'identifier la molécule la plus adaptée à cette analyse parmi la quantité élevée de substrats connus de la laccase.

Malheureusement, aucune méthode normalisée n'a été établie à ce jour et les méthodes d'évaluation de l'activité de la laccase sont multiples. Par conséquent, la comparaison des résultats de différentes études est souvent biaisée par le fait que les activités enzymatiques n'ont pas été définies selon les mêmes critères.

Les méthodes de mesure de l'activité étant arbitraires, nous avons choisi d'utiliser les deux plus répandues dans la littérature et dans le milieu industriel. Ces deux méthodes spectroscopiques suivent l'oxydation de deux substrats de la laccase : l'ABTS et le gaïacol.

Les deux techniques d'évaluation de l'activité enzymatique choisies reposent sur le même principe : l'oxydation du substrat génère un produit coloré dont la concentration en solution peut être suivie par spectroscopie UV. Ce sont des techniques simples à mettre en place, rapides, reproductibles et largement décrites.

Méthode 1 : substrat gaïacol

L'oxydation du gaïacol par la laccase conduit à la formation d'une espèce tétramère issue de phénomènes de couplage (Figure 30)[2]. La génération de ce tétragaïacol colore la solution en orange. La réaction peut ainsi être suivie par spectroscopie UV à 470 nm, la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) du produit. Par convention une unité d'activité a été définie comme le changement d'absorbance de 0,01 par minute et par millilitre[3].

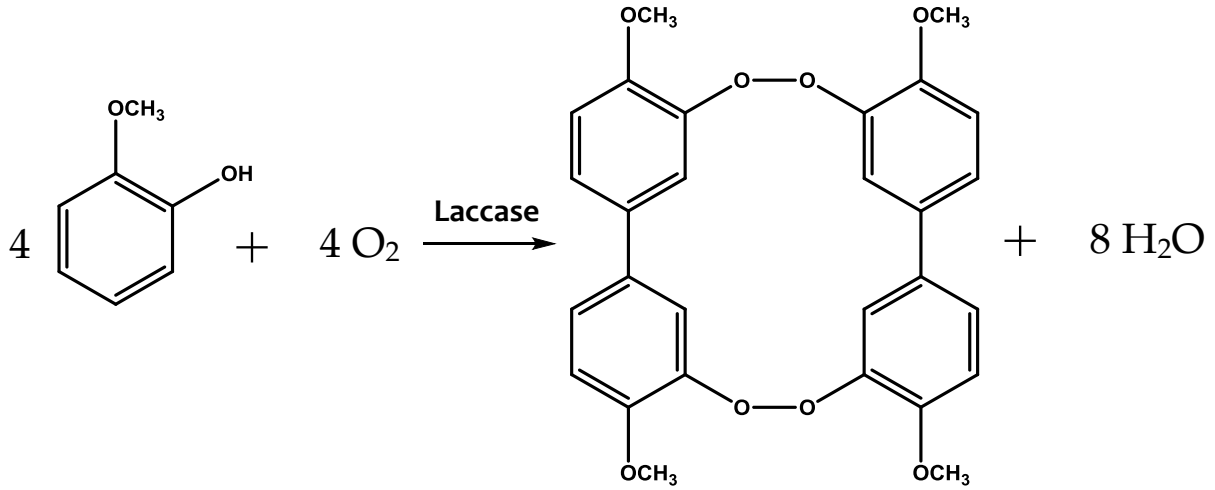


Figure 30 : Formation du tétragaïacol catalysée par la laccase[2].

Méthode 2 : substrat ABTS

L'ABTS est oxydé par la laccase en ion $ABTS^{2+}$ de λ_{max} égale à 414 nm. À cette longueur d'onde le coefficient d'absorption ε_{max} de l'ABTS oxydé est de 36 000 $M^{-1}.cm^{-1}$. L'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 µmole d'ABTS en 1 minute[4].

La figure ci-après montre un exemple du type de courbes obtenues par suivi spectroscopique pour la détermination de l'activité enzymatique selon les deux méthodes évoquées :

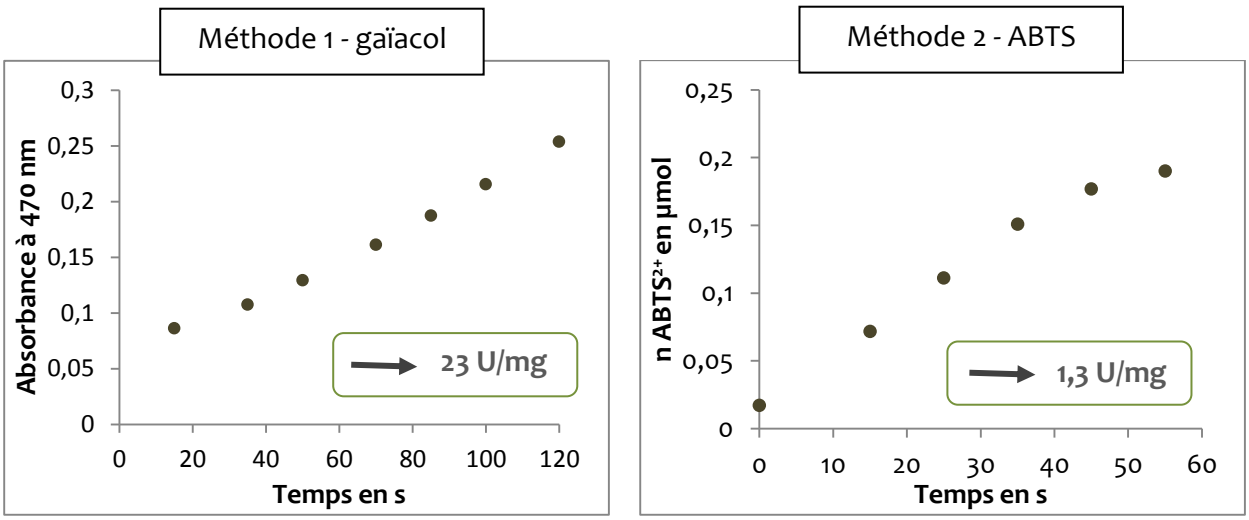


Figure 31 : Courbes de référence pour la détermination de l'activité de la laccase.

Il n'est pas possible de comparer directement les valeurs obtenues selon deux méthodes différentes. En effet, d'une part l'activité n'est pas définie selon les mêmes critères, d'autre part l'oxydation des deux substrats est régie par deux mécanismes différents (abstraction d'atome d'hydrogène pour le gaïacol, transfert d'électron pour l'ABTS). C'est pourquoi la méthode employée sera systématiquement précisée lors de ce travail.

II. Influence des paramètres réactionnels sur l'activité enzymatique

Cette étude préliminaire a pour but d'évaluer l'impact de plusieurs paramètres réactionnels sur l'activité de la laccase afin de déterminer les conditions opératoires optimales à son fonctionnement. Ainsi, les effets du pH, de la température et de la concentration en co-solvant ont été étudiés.

II.1. Influence du pH

L'activité de la laccase est fortement impactée par le pH du milieu réactionnel. Ce dernier influence notamment deux phénomènes aux effets antagonistes. D'une part l'augmentation du pH abaisse le potentiel *redox* des substrats phénoliques, ce qui favorise leur oxydation par la laccase. D'autre part une hausse du pH signifie une augmentation de la concentration en ions OH^- inhibiteurs de la laccase. La conséquence de ces deux phénomènes est l'existence d'un pH optimal - généralement situé entre 4 et 5 - où l'activité de la laccase est maximale[5].

L'activité de la laccase de *Trametes versicolor* a été évaluée selon les méthodes ABTS et gaïacol dans des solutions tampon de pH 3 à 7. Pour les deux substrats l'enzyme se comporte comme attendu (Figure 32) : le tracé de l'activité en fonction du pH se traduit par une courbe en cloche avec un maximum atteint pour un pH entre 4 et 5. Dans les deux cas, l'activité chute nettement pour les deux pH extrema de l'étude.

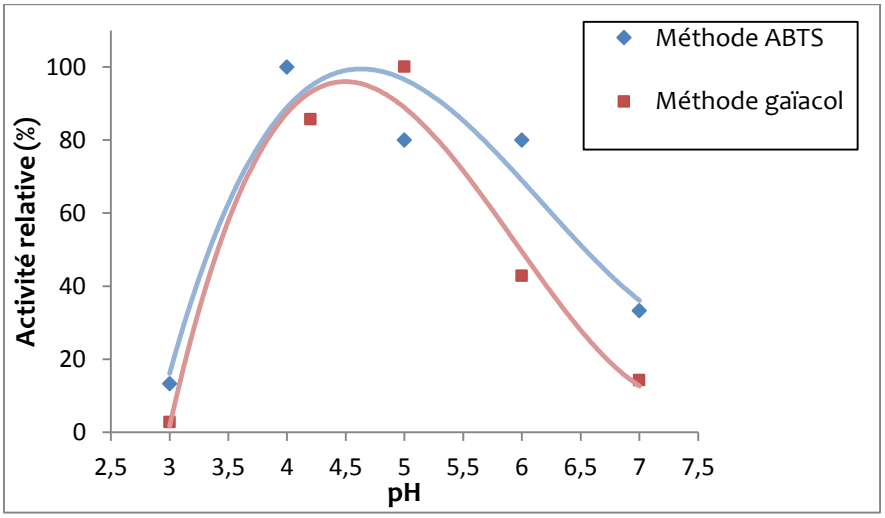


Figure 32 : Activité de la laccase en fonction du pH. Les valeurs d'activité sont normalisées en fonction de la valeur au pH optimal.

Des différences de comportement existent entre les deux substrats. Le pH optimal de la laccase est de 4,3 pour l'ABTS, il est égal à 4,8 pour le gaïacol. Lorsque le substrat étudié est l'ABTS, une activité relative supérieure ou égale à 80% est maintenue sur une gamme de pH plus étendue que pour le gaïacol. Ainsi la laccase de *Trametes versicolor* oxyde l'ABTS plus facilement que le gaïacol dans des conditions éloignées des conditions optimales d'oxydation. Ces résultats montrent que le comportement d'une laccase peut s'avérer très différent selon la molécule à oxyder. Cette caractéristique peut sembler être préjudiciable, mais elle peut être utilisée à notre avantage : il est ainsi possible d'ajuster les conditions réactionnelles afin de favoriser l'oxydation d'un type de substrat aux dépends d'un autre.

Pour la suite de l'étude, un tampon acétate à pH 4,5 a systématiquement été utilisé afin de se situer dans la zone de pH optimale.

II.2. Effet du co-solvant

Nous venons de le voir, le pH optimal de la laccase utilisée dans ce travail est situé entre 4 et 5. Dans cette gamme de pH, seules les lignines issues du procédé bisulfite sont solubles. Ce problème de concordance entre les solvants compatibles avec la laccase et ceux capables de solubiliser les lignines a été évoqué en détail dans le paragraphe § III.3. du chapitre bibliographique. L'emploi d'un co-solvant est une des solutions largement répandues pour pallier à ce problème. Le co-solvant idéal permettrait d'améliorer sensiblement la solubilité de la lignine dans le tampon acide tout en limitant la perte d'activité de la laccase.

Le dioxane a été choisi comme co-solvant pour cette étude en raison de sa capacité à solubiliser un grand nombre de lignines[6]. L'influence de ce solvant organique a été évaluée sur l'activité de la laccase déterminée selon les deux méthodes déjà décrites.

La présence de dioxane entraine une importante chute de l'activité de l'enzyme (Figure 33 et Tableau IV). Lorsque le tampon acétate et le dioxane sont mélangés en proportions égales, aucune activité n'est décelable selon la méthode gaïacol et l'oxydation de l'ABTS est cinquante fois plus lente qu'en l'absence de dioxane. Pour une concentration volumique en dioxane de 25%, l'activité de la laccase est divisée par un facteur 6 et 10 pour le gaïacol et l'ABTS respectivement. Cette chute d'activité est significative, mais l'activité de la laccase reste suffisamment élevée pour oxyder efficacement un médiateur ou un substrat phénolique. Utiliser des concentrations plus faibles en co-solvant ne permettrait pas de solubiliser la lignine de façon satisfaisante. Une concentration en dioxane de 25 % (v/v) semble être le bon compromis afin d'obtenir une solubilité de lignine convenable tout en préservant l'activité de la laccase. Cette concentration a été employée tout au long de ce travail de thèse.

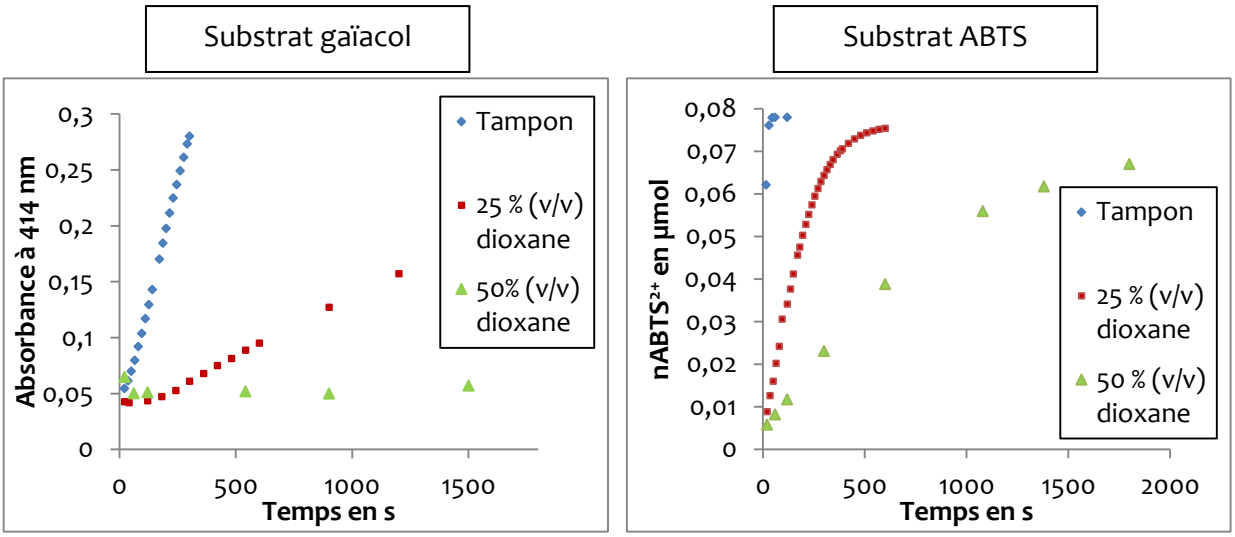


Figure 33 : Suivi de l'oxydation de deux substrats de la laccase en présence de dioxane.

Tableau IV : Activité de la laccase en fonction de la concentration en dioxane.

	Gaïacol			ABTS		
% (v/v) dioxane	**0**	**25**	**50**	**0**	**25**	**50**
Activité (U)	1,6	0,3	--	0,10	0,01	0,002

II.3 : Température optimale

Pour chaque laccase, il existe une température – ou une gamme de températures – à laquelle son activité est maximale. En dessous de cette température optimale, elle ne fonctionne pas à son plein potentiel ; au-dessus de cette température, elle est dénaturée et son activité chute de façon irréversible. La température optimale de fonctionnement d'une laccase est généralement liée aux conditions dans lesquelles elle opère dans la nature. Pour des laccases fongiques telles que la laccase de *Trametes versicolor*, cette température est ordinairement proche de la température ambiante[7].

L'oxydation de l'ABTS par la laccase a été suivie par spectroscopie UV à 414 nm dans un tampon acétate à pH 4,5. Les réactions ont été conduites à des températures allant de 25°C à 50°C. La quantité d'ABTS oxydé est estimé à partir de la loi de Beer-Lambert et du coefficient d'absorbance de l'$ABTS^{2+}$ ($\varepsilon_{414\ nm}$ = 36000 $M^{-1}.cm^{-1}$). Les résultats sont illustrés en Figure 34.

De 25°C à 30°C, l'activité de l'enzyme est doublée et la conversion en espèce oxydée est proche de 90 % dans les deux cas. La conversion maximale n'est pas atteinte. Ceci peut s'expliquer par le fait que les interactions entre le substrat (ABTS) et la laccase peuvent entrainer une dénaturation de la protéine et ainsi diminuer son action catalytique. Lorsque la température du milieu dépasse 30°C, les performances de la laccase déclinent sensiblement. D'une part, l'activité initiale chute à une valeur deux fois plus faible qu'à 25°C, d'autre part les taux de conversion en espèces oxydées sont faibles et diminuent avec l'augmentation de la température. Ainsi, alors que la conversion est égale à 90 % à 30°C, elle chute à 60 % à 35°C et à 30 % à 45°C. Une augmentation de température au-delà de 30°C entraine donc une importante désactivation de l'enzyme.

Aucune des conditions ne permet d'atteindre 100 % de conversion. Ceci peut être expliqué par l'équilibre existant entre les trois formes de l'ABTS, variant par leur degré d'oxydation : $ABTS + ABTS^{2+\bullet} \rightleftarrows 2\ ABTS^{+\bullet}$. Ainsi une partie de l'$ABTS^{2+}$ généré par la laccase évolue en $ABTS^{+\bullet}$ dans une réaction de médiamutation (inverse de dismutation), empêchant d'atteindre 100 % de conversion[8].

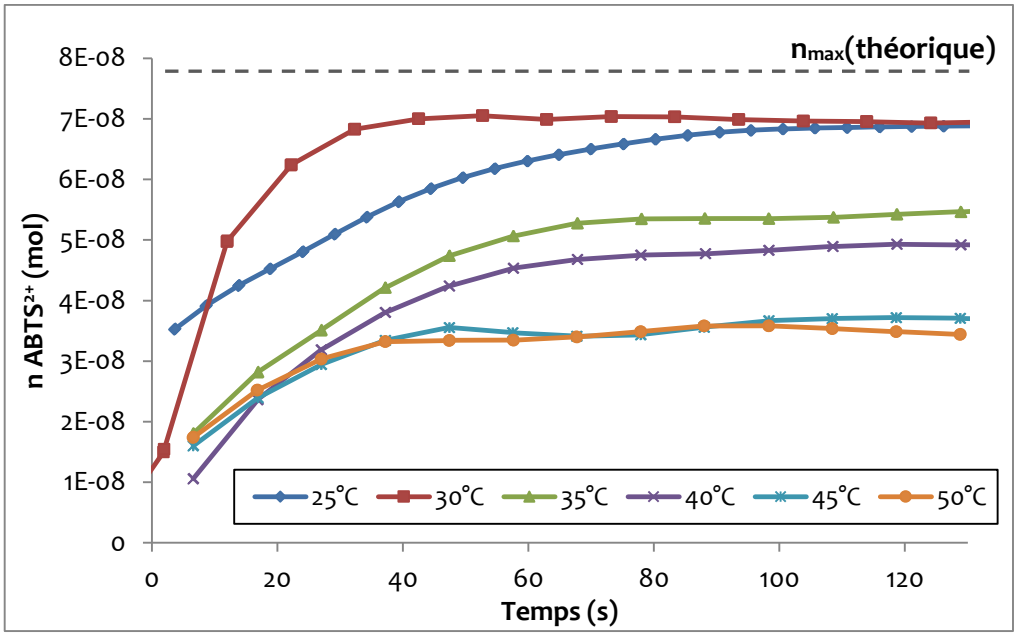


Figure 34 : Suivi de l'oxydation de l'ABTS par la laccase à différentes températures.

III. Conclusion

Deux méthodes spectroscopiques ont été appliquées afin de déterminer l'activité de la laccase de *Trametes versicolor* dans différentes conditions réactionnelles. Cette étude a permis d'évaluer l'incidence de plusieurs paramètres sur le comportement de cette protéine fongique.

L'existence d'une gamme de pH optimal a été mise en évidence. Celle-ci varie en fonction du substrat étudié : de 4 à 6 pour l'ABTS, et de 4,2 à 5,3 pour le gaïacol. À ces pH, la plupart des lignines sont insolubles et l'utilisation d'un co-solvant organique est nécessaire à sa solubilisation. L'influence du dioxane comme co-solvant a ainsi été évaluée. L'ajout de dioxane fait chuter drastiquement l'activité de la laccase. À une concentration volumique de 25 % en dioxane, l'activité de la laccase est divisée par un facteur allant de 6 à 10 selon le substrat. Bien que cette baisse d'activité soit importante, on ne peut diminuer la concentration en co-solvant sans risquer de rencontrer des problèmes de solubilité majeurs avec un substrat comme la lignine. Enfin, le dernier paramètre étudié a été la température. Il a été montré qu'augmenter la température jusqu'à 30°C entrainait une hausse de l'activité de la laccase. Au-delà de cette température l'enzyme est dénaturée, entrainant une diminution de l'activité et du taux de conversion.

L'ensemble de ces résultats a été pris en compte pour les travaux présentés dans le chapitre suivant, traitant de l'oxydation de molécules de structures proches de celle de la lignine.

Chapitre 2 : Oxydation de modèles de lignine

Choix du modèle

La complexité et l'hétérogénéité des lignines ont poussé les chercheurs à utiliser des molécules modèles pour leurs travaux sur la valorisation de la lignine. Ces molécules synthétiques de faibles masses molaires possèdent des structures et des fonctions proches de celles retrouvées dans la lignine. Ainsi, l'étude de leur réactivité peut donner des informations cruciales sur la réactivité du biopolymère lui-même. L'emploi de modèles de lignine facilite considérablement l'analyse des produits de dégradation et permet de s'affranchir des problèmes de solubilité communément rencontrés avec la lignine.

Nous avons choisi de travailler sur un modèle monomère dont la fonction hydroxyle phénolique est bloquée et comportant un OH en position benzylique : il s'agit de l'alcool benzylique issu de l'acétovanillone benzylée (ACVBnRéd). Ce choix a été motivé par plusieurs raisons. Tout d'abord, la laccase est connue pour sa capacité à oxyder un grand nombre d'espèces phénoliques et l'enjeu principal réside dans l'oxydation des autres groupements hydroxyle présents dans la lignine. Ensuite, il a été montré que l'oxydation des OH phénoliques entrainait des réactions de couplage inter-motifs pouvant donner lieu à une quantité importante de produits[9]. En estérifiant la position phénolique du modèle, on peut s'affranchir de ce type de phénomènes. Ainsi, le chemin réactionnel est clairement identifié (Figure 35), ce qui simplifie l'analyse des performances catalytiques de la laccase.

Tout au long de ce chapitre, les réactions d'oxydation sont suivies par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Au préalable, un mélange équimolaire des modèles réduit et oxydé a été analysé (Figure 36). D'après les résultats de cette analyse, les deux espèces possèdent un coefficient de réponse similaire. Cette approximation a été effectuée afin de déterminer les taux de conversion exprimés lors de la suite de ce travail.

Conditions opératoires

La réaction de référence se déroule à température ambiante dans un milieu contenant du tampon acétate à pH 4,5 et 25% volumique de dioxane. L'oxydation est conduite sur 0,1 mmol de modèle en présence de 20 U de laccase (selon la méthode ABTS) et de 0,01 mmol de médiateur. La solution est saturée en oxygène avant que la laccase soit introduite dans le milieu.

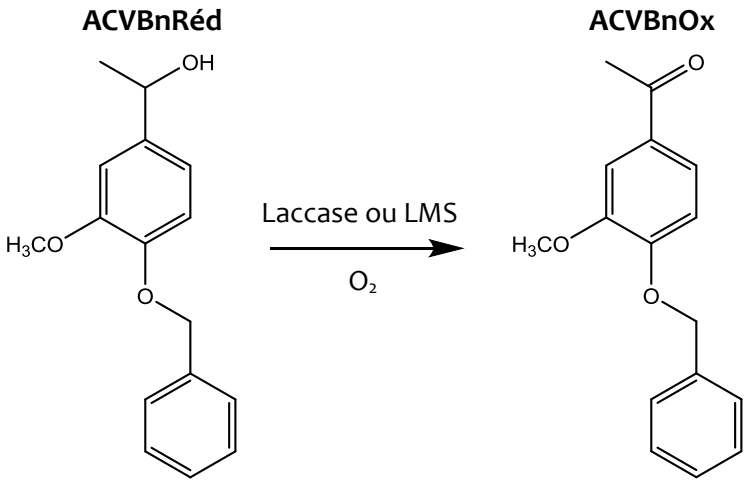


Figure 35 : Schéma réactionnel de la réaction de référence : oxydation de l'ACVBn par la laccase. La formation de l'espèce oxydée est suivie par HPLC.

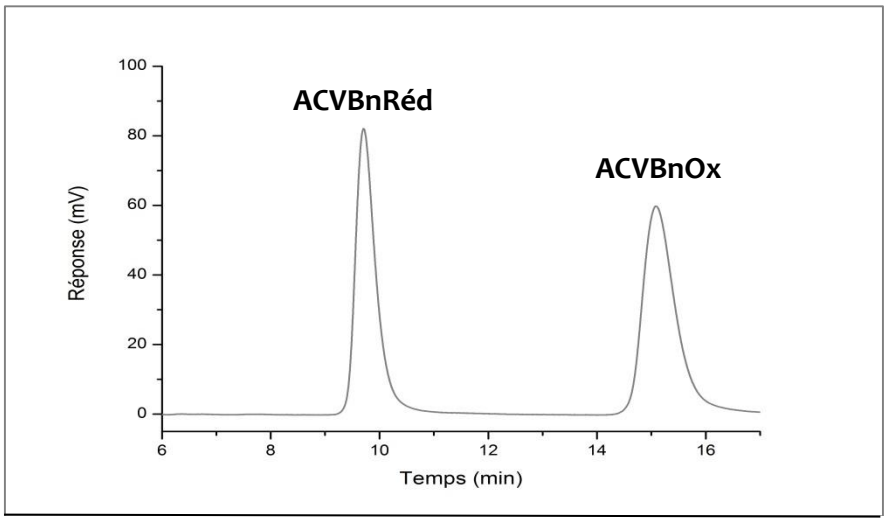


Figure 36 : Chromatogramme HPLC du mélange équimolaire des formes réduites et oxydées du modèle de référence. Les aires sous la courbe sont équivalentes pour les deux pics.

I. Criblage de médiateurs

Une première expérience a été conduite en utilisant la laccase seule. Aucun produit d'oxydation n'a été observé dans nos conditions opératoires, ce qui confirme le fait que le potentiel redox de l'enzyme est trop faible pour pouvoir oxyder des hydroxyles benzyliques directement. L'utilisation de molécules appelées « médiateurs » est nécessaire à l'oxydation de ces fonctions. Les médiateurs sont dans un premier temps oxydés par la laccase. Leur forme oxydée se diffuse ensuite dans le milieu afin d'oxyder les substrats inaccessibles à l'enzyme.

On distingue généralement les médiateurs « naturels » - molécules utilisées par la laccase dans son milieu naturel – et les médiateurs « synthétiques ». Les deux types de médiateurs ont été étudiés dans la suite de ces travaux.

I.1. Médiateurs naturels

Quatre médiateurs reportés comme de potentiels médiateurs naturels de la laccase ont été testés (Figure 37) : l'acide 4-hydroxybenzoïque, le 4-hydroxybenzaldéhyde, le syringaldéhyde et le méthyle syringate. Parmi ces quatre molécules, seul le méthyle syringate a permis l'oxydation de l'ACVBnRéd, les autres sont inefficaces. La vitesse d'oxydation du système laccase-méthyle syringate est par contre très lente, avec seulement 8 % d'espèce oxydée formée en 7 jours (Figure 38).

L'oxydation de l'acide 4-hydroxybenzoïque et du 4-hydroxybenzaldéhyde par la laccase entraine un net changement de la couleur de la réaction. La solution incolore en début de réaction devient marron rapidement après l'ajout de la laccase. Ceci indique la formation d'espèces de type quinone. Ces espèces ne possèdent cependant aucune activité catalytique pour l'oxydation de l'ACVBnRéd.

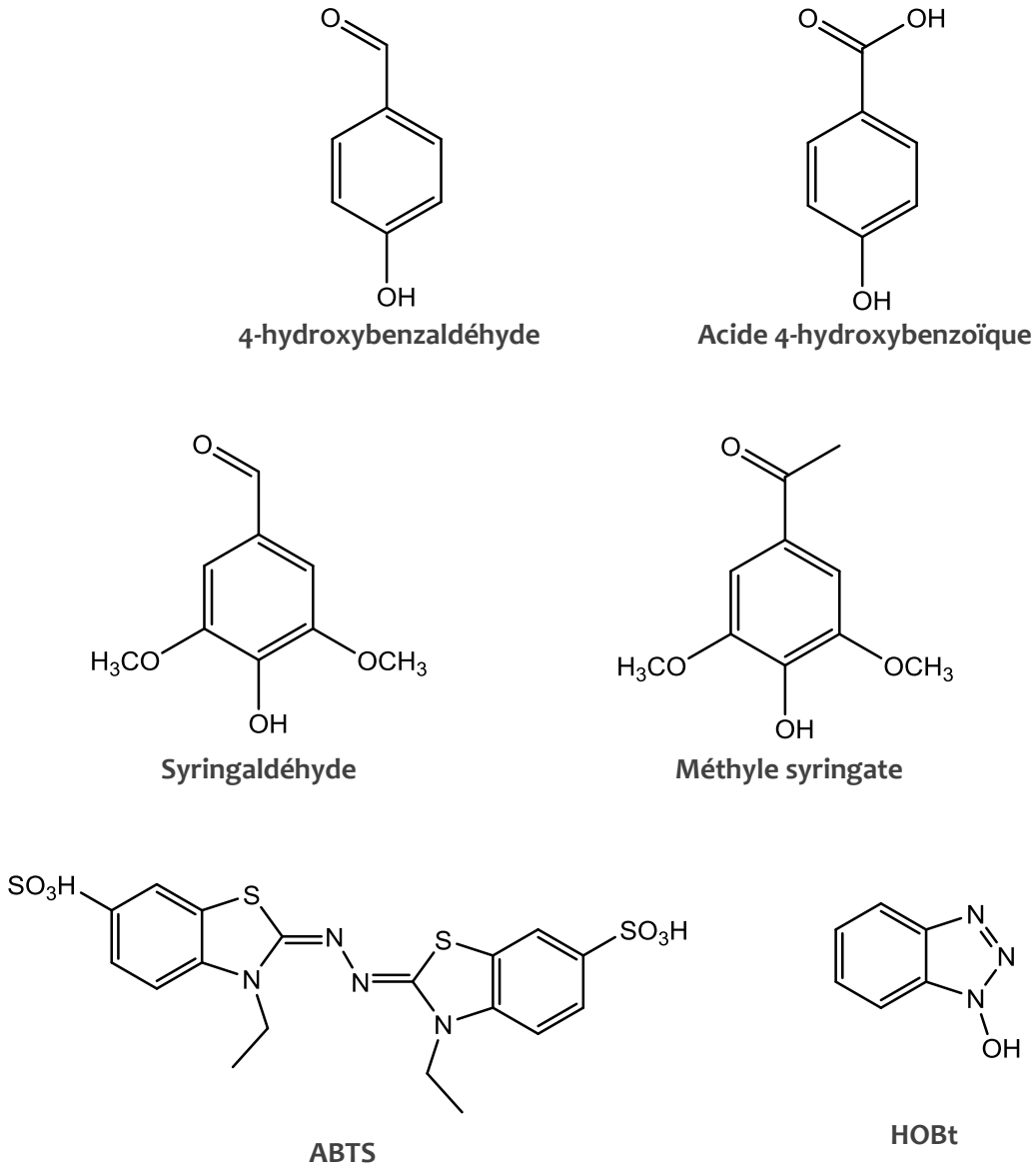


Figure 37 : Molécules utilisées comme médiateurs de la laccase.

I.2. Médiateurs synthétiques

L'efficacité de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) et du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) en tant que médiateurs de la laccase a été évaluée selon les conditions de référence. Les performances catalytiques des deux médiateurs synthétiques sont bien meilleures que celles des médiateurs naturels (Figure 37). Ce comportement était attendu car communément reporté dans la littérature[10,11].

En 7 jours, 50 % de conversion sont atteints avec l'HOBt, 26 % avec l'ABTS et 8 % avec le méthyle syringate. Bien qu'une meilleure cinétique soit obtenue avec l'HOBt, un plateau est atteint après 6 jours de réaction. Deux facteurs peuvent expliquer ce comportement. Une étude de Gentili *et al.* a montré que l'hydroxybenzotriazole n'est pas stable dans les conditions employées et se convertit en benzotriazole, espèce inactive vis-à-vis de la laccase[12]. Ce phénomène de dégradation de l'HOBt les a contraints d'utiliser des quantités importantes de médiateurs pour obtenir des conversions totales. Par ailleurs, il est généralement admis que l'utilisation de médiateurs synthétiques perturbe le site actif de la laccase et peut entrainer la désactivation de l'enzyme. De façon surprenante, un plateau est également atteint lorsque le méthyle syringate est employé, bien que celui-ci soit considéré comme un médiateur naturel de la laccase. De tous les médiateurs testés, l'ABTS est le seul qui semble stable au cours du temps et ne désactive pas l'enzyme. Bien que son activité catalytique soit deux fois plus faible que celle de l'HOBt, sa stabilité en fait un médiateur de choix.

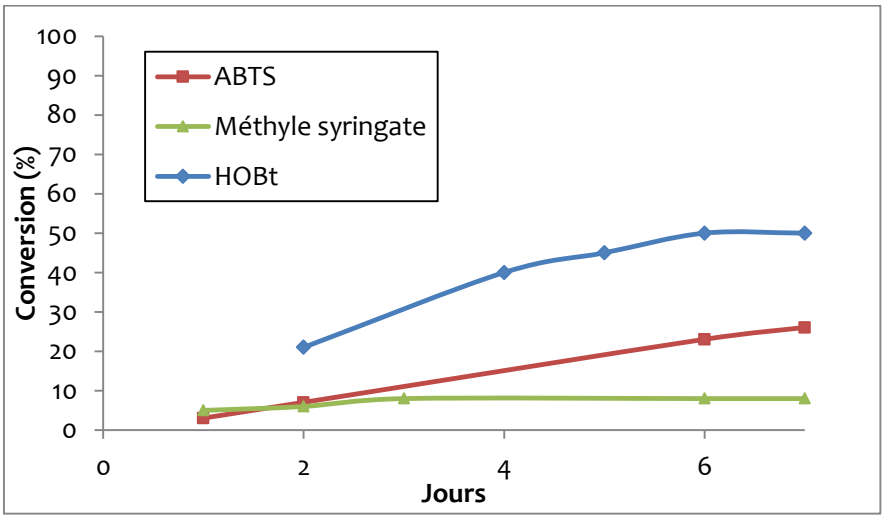


Figure 38 : Comparaison de l'effet catalytique de trois médiateurs pour l'oxydation de l'ACVBnRéd.

I.3. Association de médiateurs

Dans la nature, la laccase des champignons de pourriture blanche oxyde dans un premier temps les fonctions phénoliques les plus accessibles de la lignine. Cette action libère de petites molécules phénoliques qui sont ensuite utilisées comme médiateur de l'enzyme pour l'oxydation de parties réticentes et/ou inaccessibles. Ainsi, la laccase n'utilise pas un médiateur spécifique mais un ensemble de médiateurs travaillant en synergie. À ce jour, peu d'efforts ont été faits pour mimer ce phénomène naturel et la plupart des études ne portent que sur l'emploi d'un médiateur à la fois.

En 2008, Jeon *et al.* ont testé l'association par paire de plusieurs médiateurs de la laccase pour la dégradation du pentachlorophénol, un polluant des sols et des eaux[13]. Un effet synergique a été observé lorsque l'ABTS est associé à la vanilline ou à l'acétovanillone à un ratio équimolaire. Un mécanisme selon lequel l'ABTS agit comme médiateur pour la vanilline (ou l'acétovanillone) a été proposé pour expliquer ces résultats :

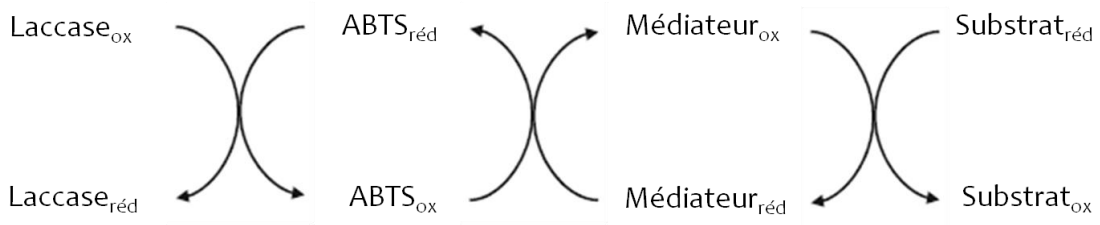


Figure 39 : Mécanisme proposé pour l'association synergique de deux médiateurs.

Inspirés par ces travaux, nous avons associé l'HOBt et l'ABTS en quantité équimolaire (0,005 mmole de chaque médiateur) pour l'oxydation de l'ACVBnRéd dans les mêmes conditions employées lors du chapitre précédent. La Figure 40 montre les taux de conversion obtenus après 24 heures de réaction pour le mélange ABTS/HOBt et pour les deux médiateurs seuls. Une importante synergie est observée lorsque ces deux médiateurs sont associés. Lorsque l'HOBt et l'ABTS sont utilisés conjointement, 40% de l'ACVBnRéd est convertie en ACVBnOx, contre 14% et 3% pour l'HOBt seul et l'ABTS seul respectivement.

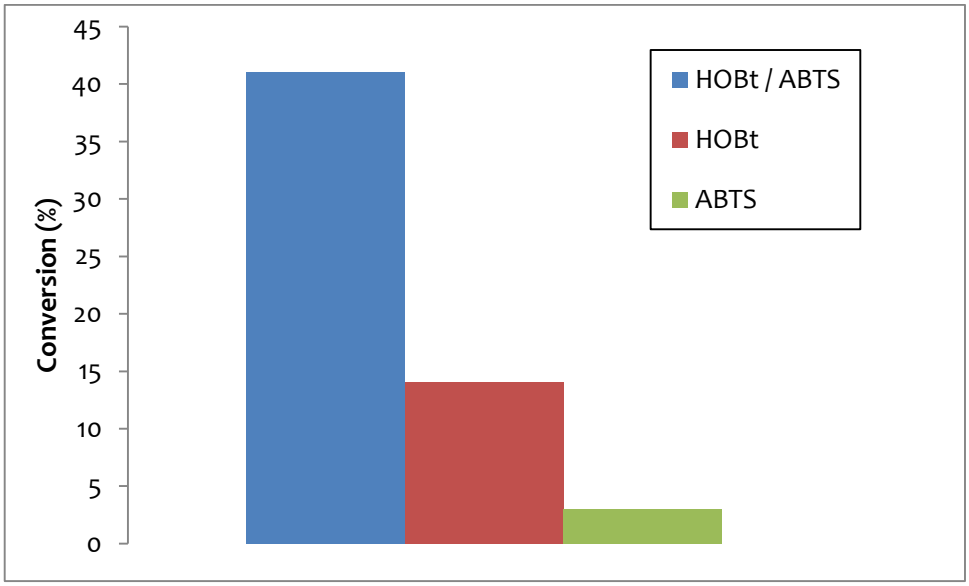


Figure 40 : Taux de conversion de l'ACVBnRéd après 1 jour de réaction en présence de trois LMS différents. L'association de l'HOBt et de l'ABTS est synergique.

À la suite de ces résultats prometteurs, une étude complémentaire a été conduite. Les trois médiateurs les plus efficaces ont été associés pour former trois différentes paires : HOBt/ABTS, HOBt/Méthyle syringate, et ABTS/Méthyle syringate. Ici, les quantités de médiateurs ont été doublées (0,1 mmole de chaque médiateur) afin d'améliorer les taux de conversion. L'oxydation de l'ACVBnRéd par les différents systèmes laccase-médiateur est suivie pendant 7 jours (Figure 41).

Un effet synergique marqué est observé pour les deux paires dans laquelle l'ABTS est impliqué (HOBt/ABTS et ABTS/Méthyle syringate). Ces deux couples de médiateurs ont des comportements similaires. Une conversion élevée est atteinte dès le premier jour de réaction, elle évolue très peu par la suite. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Jeon *et al.*, dans lesquels l'effet synergique entre deux médiateurs était très présent en début de réaction et s'estompait ensuite. Dans les deux cas, la hausse de la cinétique de réaction est spectaculaire : près de 80% de conversion en 1 jour pour la paire HOBt/ABTS (14% et 3% pour les médiateurs seuls) ; 45% d'oxydation en 1 jour avec le couple ABTS/Méthyle syringate (3% et 5% pour les médiateurs seuls).

La courbe montrant la conversion du couple HOBt/Méthyle syringate en fonction du temps semble correspondre à la somme des conversions des deux médiateurs seuls. Ainsi, ils n'interagissent pas entre eux et aucun effet synergique n'est observé.

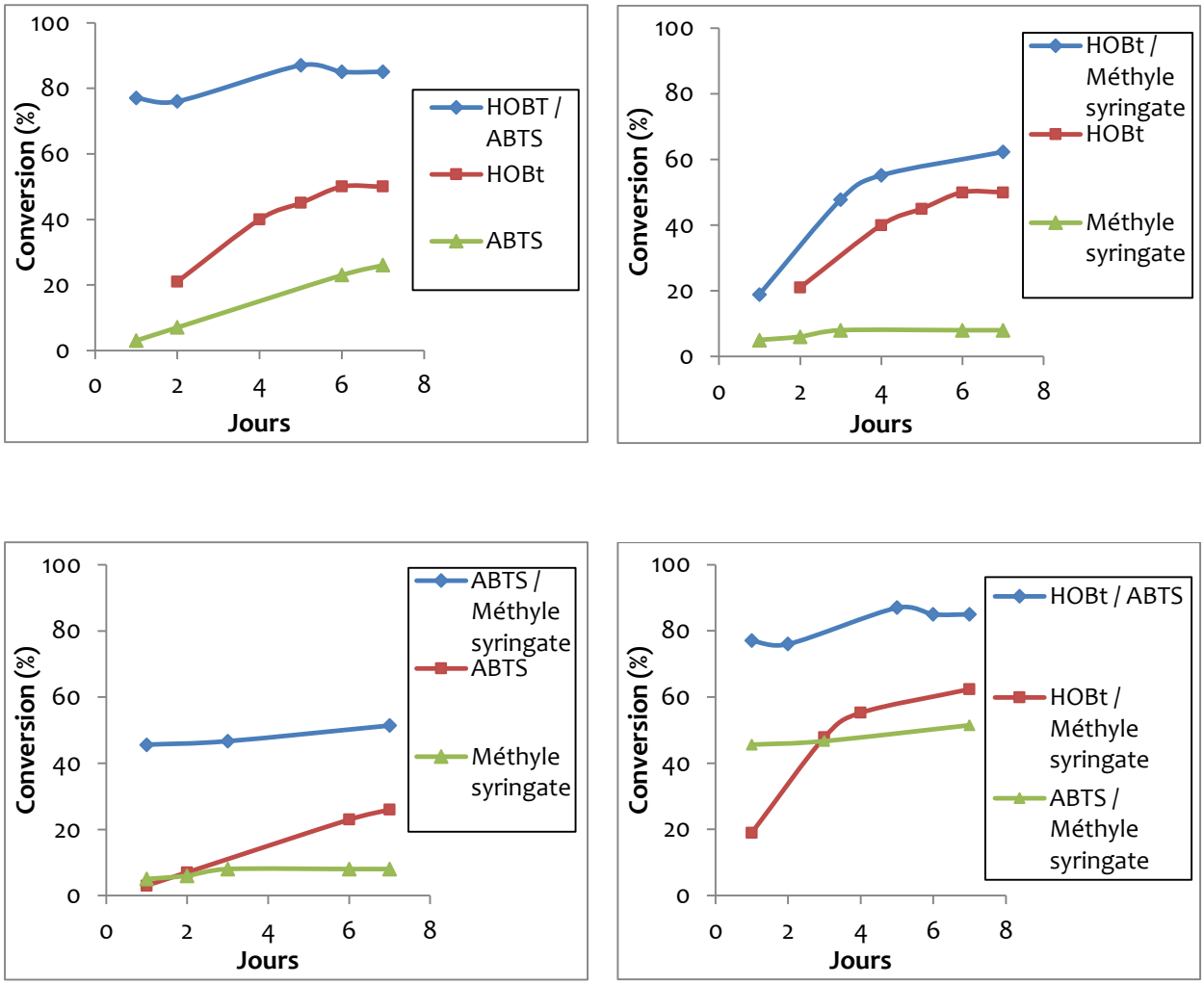


Figure 41 : Effet de l'association de plusieurs médiateurs sur la conversion de l'ACVBnRéd.

Bien que peu étudiée jusqu'à présent, l'utilisation d'un mélange de médiateurs est une technique particulièrement intéressante. Les interactions entre deux médiateurs peuvent être synergiques, avec pour effet une hausse considérable de la cinétique de réaction. Les mécanismes mis en jeu sont encore flous, mais l'ABTS parait être le médiateur responsable de ces phénomènes de synergie : on le retrouve dans nos travaux comme dans ceux de Jeon *et al*. L'hypothèse selon laquelle l'effet synergique est gouverné par une succession de réactions d'oxydoréduction en cascade (Figure 39) semble la plus probable. La laccase possédant une plus grande affinité pour l'ABTS, celui-ci est oxydé préférentiellement. La forme oxydée de l'ABTS diffuse ensuite l'oxydation vers les autres médiateurs qui vont eux-mêmes oxyder le substrat-cible.

I.3. Voltammétrie cyclique

Les interactions entre la laccase, ses médiateurs et leurs substrats sont gouvernées par des réactions d'oxydoréduction. L'électrochimie analytique est une technique puissante pour étudier les procédés catalytiques dans lesquels des transferts d'électrons ont lieu. La voltammétrie cyclique a notamment été utilisée pour étudier les caractéristiques électrochimiques de différents médiateurs ainsi que leur interaction avec la laccase[8,14].

Nous avons conduit des analyses en voltammétrie cyclique sur les médiateurs déjà utilisés au cours de ce travail dans le but de trouver une corrélation entre leurs propriétés électrochimiques et leurs comportements dans les réactions de type LMS. Ces réactions électrochimiques ont été réalisées dans les mêmes conditions que les réactions impliquant la laccase (tampon acétate à pH 4,5 contenant 25% (v/v) de dioxane, température ambiante).

Principes de base

La Figure 42 montre le diagramme voltammétrique typique d'un couple redox stable et réversible, celui du cyanure de fer ($[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(CN)_6]^{4-}$). Cette analyse a été conduite comme réaction de référence pour attester du bon fonctionnement du système.

Lors de cette analyse, le médiateur est soumis à un potentiel électrique et l'intensité du courant qui en résulte - courant issu de l'oxydoréduction - est mesurée en fonction du potentiel appliqué. Le potentiel de départ est proche de 0 V et augmente jusqu'à 1 V (partie haute du diagramme en Figure 42). Ce premier balayage entraine l'oxydation du substrat, le courant mesuré est appelé courant anodique (I_a). Puis le balayage est effectué dans le sens inverse jusqu'à la valeur de potentiel initial. Lors de ce processus le substrat retourne à son état réduit (partie basse du diagramme). Le courant mesuré est nommé courant cathodique (I_c).

Trois valeurs caractéristiques sont tirées du diagramme voltammétrique. Le potentiel redox (E_o) du composé est la moyenne entre le potentiel au pic anodique ($E_{p,a}$) et le potentiel au pic cathodique ($E_{p,c}$). La différence entre $E_{p,a}$ et $E_{p,c}$ est notée ΔE. Sa valeur doit être la plus proche de zéro pour un couple oxydoréducteur stable. De même le rapport $I_{p,a}/I_{p,c}$ renseigne sur la stabilité du système : ce rapport est égal à 1 pour un couple idéal. À titre d'exemple, le composé de référence étudié ici possède un E_0 de 0,19 V, un ΔE égal à 0,073 V et un rapport $I_{p,a}/I_{p,c}$ de 1,06. Ces valeurs correspondent parfaitement à celles d'un composé stable d'un point de vue électrochimique.

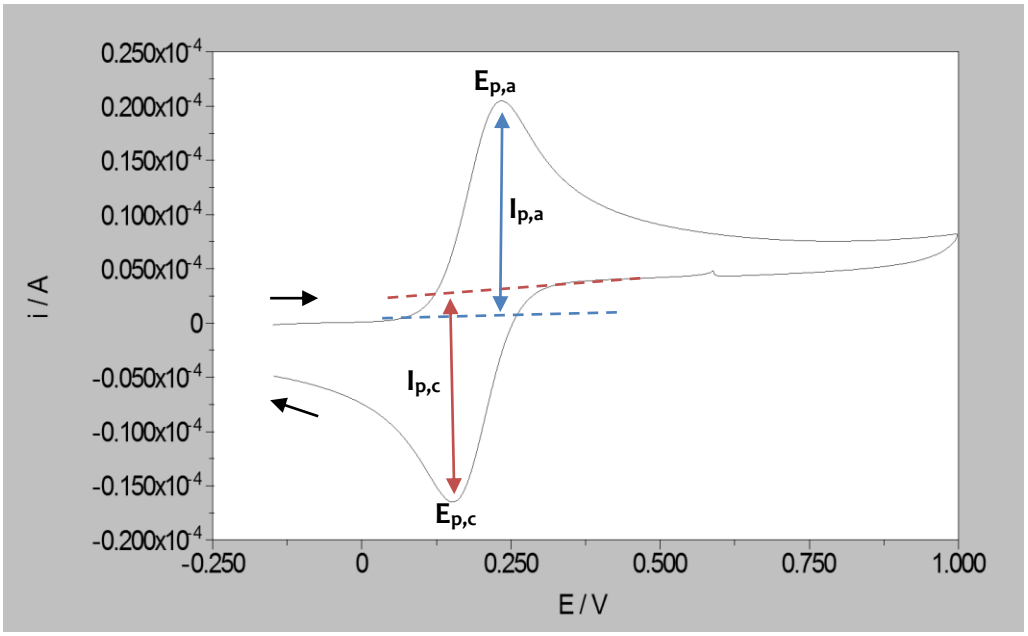


Figure 42 : Diagramme voltammétrique du ferricyanure, composé de référence. Les flèches noires indiquent le sens du balayage.

Application aux médiateurs de la laccase

Les diagrammes voltampérométriques des six médiateurs étudiés sont présentés en Figure 43. Deux types de comportements sont observés concernant les médiateurs naturels. L'acide 4-hydroxybenzoïque possède une faible réponse anodique (probablement due à la formation de la quinone correspondante) et quasiment aucune réponse cathodique. Aucun courant de réponse n'est détectable sur la plage de potentiel appliqué pour le 4-hydroxybenzaldéhyde. Ceci explique pourquoi ces deux molécules de type p-hydroxyphényle ne possèdent pas d'activité catalytique en tant que médiateur de la laccase.

Les médiateurs de type syringyle (syringaldéhyde et méthyle syringate) possèdent des profils voltampérométriques complexes. Deux pics anodiques sont détectés lors de la phase d'oxydation, le second pic étant d'intensité plus élevée. Ce comportement a déjà été reporté pour l'acétosyringone, mais aucune explication n'a pu être apportée sur l'origine de ces deux pics[14]. La réponse cathodique est bien plus faible, signe que le procédé n'est pas réversible. Dans le cas du syringaldéhyde, trois pics cathodiques de très faibles intensités sont observés. Pour le méthyle syringate, le premier cycle d'oxydation possède un comportement quasi-réversible, avec un ratio $I_{p,a}$/ $I_{p,c}$ égal à 1,15 et un ΔE de 0,018 V pour un potentiel redox de 0,62 V. L'activité catalytique du méthyle syringate provient donc certainement de ce couple redox. Aucune réponse cathodique claire n'est détectable pour le second pic anodique, pourtant majoritaire.

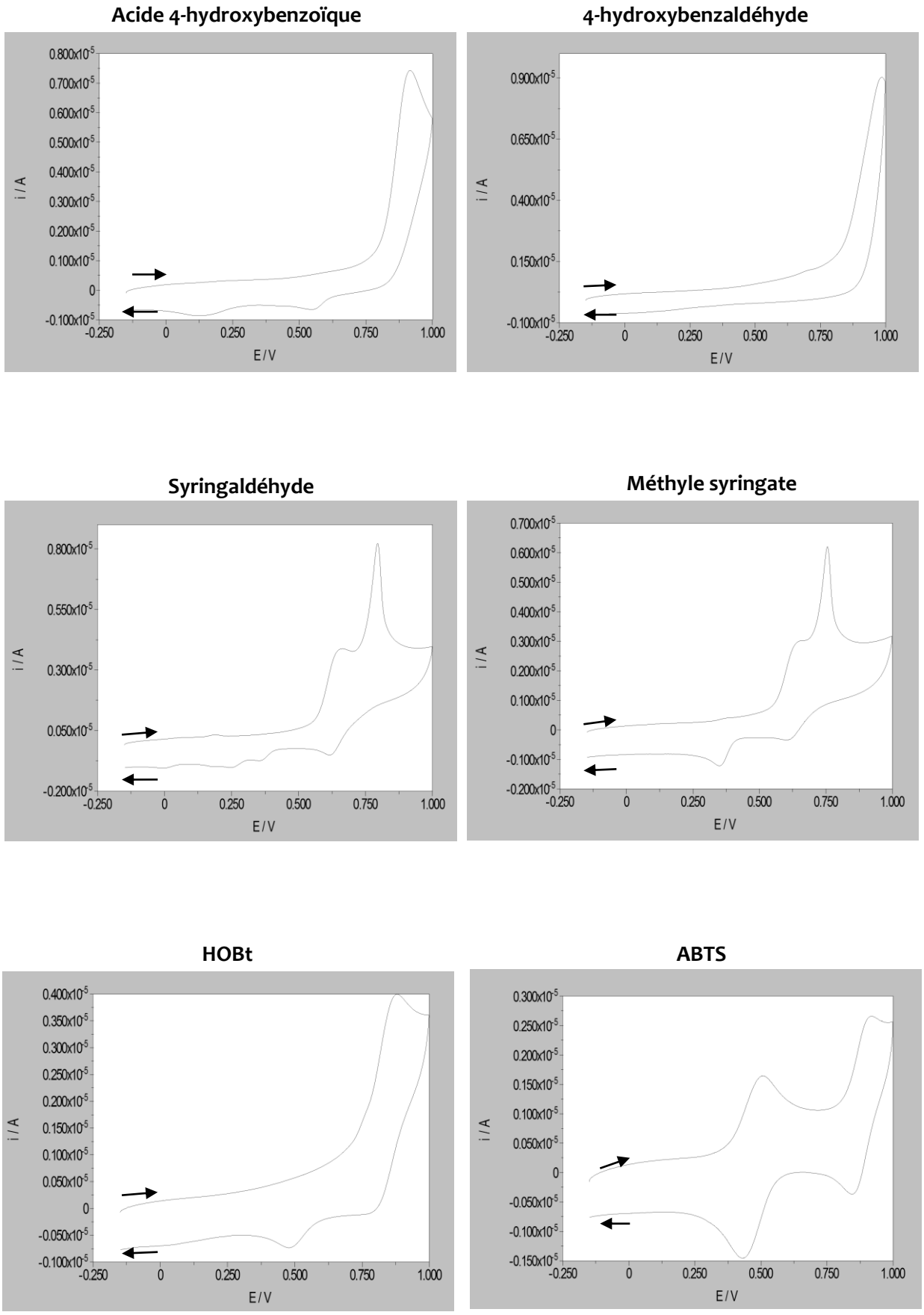


Figure 43 : Diagrammes voltammétriques de six médiateurs de la laccase. Les flèches indiquent le sens du balayage.

L'instabilité de l'HOBt déjà mise en avant dans le paragraphe § I.2. est confirmée par la voltammétrique cyclique. En effet, alors qu'un seul pic anodique est détecté, deux pics cathodiques apparaissent, ce qui montre que le système n'est pas réversible.

Parmi les six médiateurs testés, seuls l'ABTS possède un comportement électrochimique stable. Son diagramme voltampérométrique présente deux pics cathodiques et deux pics anodiques correspondant aux couples $ABTS/ABTS^{+\bullet}$ et $ABTS^{+\bullet}/ABTS^{2+}$. Ces deux paires ont des profils d'espèces stables et réversibles avec des ratios $I_{p,a}/ I_{p,c}$ proches de 1 (0,87 et 0,79) et de faibles ΔE (0,069 V et 0,043 V). Les potentiels redox de ces deux paires correspondent à ceux reportés dans la littérature : 0,47 V pour le premier couple et 0,88 V pour le second[8].

Conclusion

Les analyses en voltammétrie cyclique conduites sur les médiateurs ont permis de révéler leurs caractéristiques électrochimiques. Les informations obtenues par ce biais ont donné des explications sur les comportements observés lors des expériences d'oxydation d'un modèle de lignine en présence de la laccase et de ces médiateurs :

- la non-réversibilité des systèmes impliquant les médiateurs naturels explique leur incapacité à catalyser la réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd.

- le caractère instable de l'HOBt a été confirmé par la cyclovoltammétrie.

- l'ABTS est le seul médiateur stable d'un point de vue électrochimique. Ceci explique pourquoi l'activité oxydante du système laccase-ABTS est maintenue après 7 jours de réaction, contrairement aux autres systèmes.

II. Conditions réactionnelles

L'influence de divers paramètres réactionnels a été évaluée en prenant la réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd par le système LMS comme référence. Lors de cette étude, l'HOBt a été systématiquement utilisé comme médiateur. Bien que les expériences précédentes aient montré son instabilité sur le long terme, c'est avec ce médiateur que les cinétiques de réaction les plus élevées ont été mesurées. Ainsi, l'HOBt a été sélectionné pour les travaux décrits dans les prochains paragraphes afin de limiter le temps de réaction.

II.1. Température

Dans le chapitre précédent, une température optimale de fonctionnement de la laccase a été déterminée selon une méthode utilisant l'ABTS comme substrat. En dessous de 30°C, l'activité de la laccase n'est pas maximale ; au dessus de cette valeur la laccase est dégradée et de plus faibles taux de conversion sont obtenus. Ce constat est vrai lorsqu'on s'intéresse à la seule réaction de la laccase avec un bon substrat. Mais dans ce chapitre, la laccase est impliquée dans un système comportant un médiateur et un substrat non phénolique. Prédire le comportement de l'enzyme en fonction de la température dans ces conditions est bien plus complexe. Deux phénomènes antagonistes entrent en jeu lorsque la température du milieu augmente : d'une part la laccase est progressivement désactivée, d'autre part les transferts d'électrons entre le médiateur et le substrat-cible sont facilités par l'augmentation de température. Cette étude va nous permettre de déterminer lequel de ces effets est prédominant.

L'oxydation de l'ACVBnRéd a été conduite en présence du système laccase-HOBt à deux températures différentes pendant sept jours (Figure 44). Dans ces conditions, l'augmentation de la température n'a pas d'effet bénéfique sur la cinétique de réaction. Au contraire, elle semblerait affecter négativement l'activité du système. À 40°C, 15% de conversion sont obtenus après 2 jours de réaction contre 21% à température ambiante. La conversion n'évolue quasiment plus ensuite à 40°C (18% en 6 jours) alors qu'elle atteint 50% à température ambiante.

Afin de vérifier si ces résultats étaient dus au caractère instable de l'HOBt, la même expérience a été conduite en le remplaçant par l'ABTS comme médiateur de la laccase (Figure 44). Dans ce cas, une nette hausse de la cinétique est observée dès le premier jour de la réaction : la conversion passe de 3% à 23% lorsque la température passe de l'ambiante à 40°C. Cette hausse de conversion peut s'expliquer par l'amélioration des échanges entre le médiateur (l'ABTS) et le substrat (l'ACVBnRéd) à température élevée. Cette effet ne dure cependant pas et la réaction n'évolue quasiment plus à 40°C alors que la conversion augmente de façon linéaire à température ambiante.

À 40°C, l'activité de la laccase est trop impactée pour pouvoir régénérer le médiateur et la réaction est quasiment stoppée après 24 heures de réaction.

Les résultats de cette étude nous montrent que l'effet de désactivation de l'enzyme est prédominant à température élevée. Il est donc nécessaire de travailler à des températures inférieures ou égales à la température optimale de la laccase afin de s'affranchir de ce phénomène négatif.

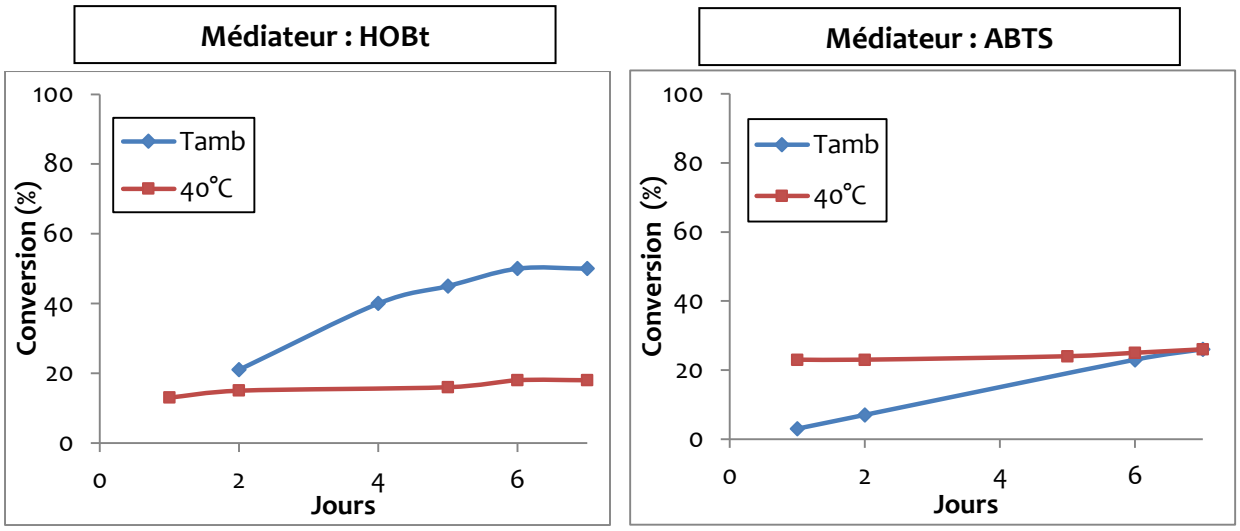


Figure 44 : Influence de la température sur la réaction d'oxydation de l'ACVBNRéd par deux LMS.

II.2. Concentration enzymatique

La réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd par le système laccase-HOBt a ensuite été conduite à des concentrations en laccase allant de 1 U/mL à 10 U/mL (l'activité est déterminée selon la méthode ABTS). Les taux de conversion obtenus en fonction du temps de réaction sont présentés en Figure 45.

Entre 1 U/mL et 2 U/mL, l'évolution du taux de conversion est proportionnelle à la concentration en laccase, ce qui est un résultat intuitif. De façon intéressante, la réaction à 1 U/mL semble continuer après sept jours de réaction alors qu'un plateau est atteint au bout de 6 jours pour toutes les autres concentrations. À 4 U/mL, une hausse significative de la conversion est observée dès le premier jour de réaction : 52% de conversion sont obtenus, valeur atteinte en 6 jours à 2 U/mL. Après 7 jours de réaction, 90% de l'ACVBnRéd est oxydée en ACVBnOx.

Aucune amélioration significative de la conversion n'est obtenue lorsque la concentration en laccase est augmentée de 4 à 10 U/mL. La concentration de 4 U/ml est donc le seuil à partir duquel tous les sites actifs de la laccase sont occupés par une molécule de médiateur. En dessous de cette concentration, la laccase est en défaut par rapport au médiateur et le LMS ne fonctionne pas à son plein potentiel. Au dessus de cette valeur, une certaine quantité d'enzymes sont inactives. Ce dernier cas de figure est à proscrire pour les réactions ayant pour but la dépolymérisation de la lignine. En effet, un excès de laccase augmente les risques d'oxydation des fonctions phénoliques de la lignine et donc les probabilités que des réactions de couplage se produisent.

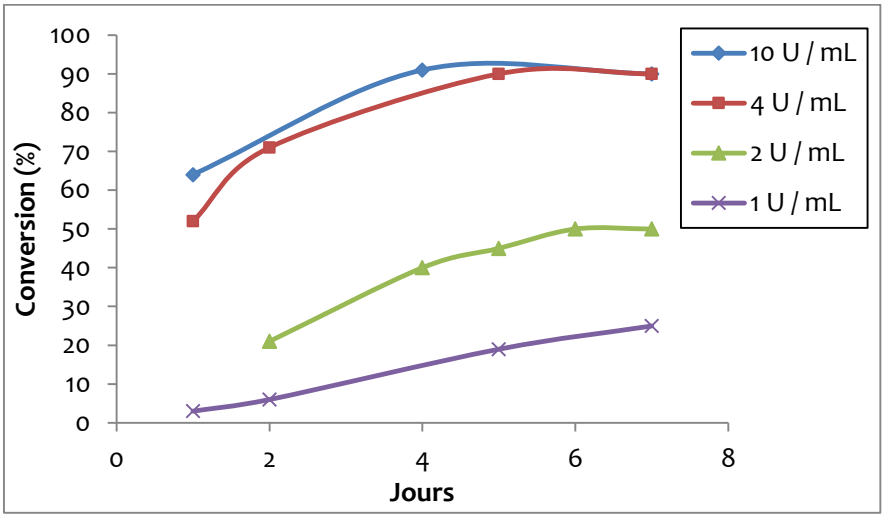


Figure 45 : Influence de la concentration en laccase sur la réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd par le système laccase-HOBt. L'activité de la laccase est exprimée selon la méthode ABTS.

II.3. Ajout d'un agent tensioactif

Hammell *et al.* ont étudié la dégradation de plusieurs modèles de lignine par le système laccase-HOBt[15]. Dans leurs travaux, un agent tensioactif (le Tween 20) est ajouté au mélange afin de solubiliser les espèces de fortes masses molaires telles que les lignines synthétiques. L'influence de ce surfactant n'a cependant pas été discutée bien que d'autres études évoquent l'existence d'interactions protéine/tensioactif[16,17].

Afin d'attester l'effet d'un agent tensioactif sur le système laccase-HOBt, 0,1% (v/v) de Tween 20 a été ajouté au milieu pour la réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd. La réaction a été suivie pendant 7 jours par HPLC et comparée à la réaction de référence (Figure 46). L'ajout du Tween 20 améliore considérablement l'efficacité du LMS. Après 7 jours de réaction, la conversion est 1,5 fois plus élevée en présence de Tween 20. De plus, la réaction sans Tween 20 atteint un pallier au bout de 6 jours alors que le système est encore actif lorsque le tensioactif est présent. Ces résultats montrent clairement que le Tween 20 confère une plus grande stabilité à l'enzyme.

L'effet stabilisant de plusieurs agents tensioactifs sur la laccase a déjà été reporté par Faure et Prévoteau[18]. Les tensioactifs utilisés dans cette étude possèdent des structures très différentes de celle du Tween 20, ce qui permet de penser qu'une grande variété de surfactants pourraient être associés à la laccase afin d'améliorer son activité. Des phénomènes d'adsorption gouvernés par des interactions coulombiennes existent entre les protéines et les agents tensioactifs. Ces interactions apportent une plus grande rigidité à la structure de l'enzyme et donc une meilleure stabilité. Une autre hypothèse selon laquelle les contacts enzyme/tensioactif participent au repliement de la protéine a également été soumise[17,19]. Enfin, la présence d'agents tensioactifs peut améliorer la solubilité du médiateur et du substrat et ainsi augmenter leur réactivité.

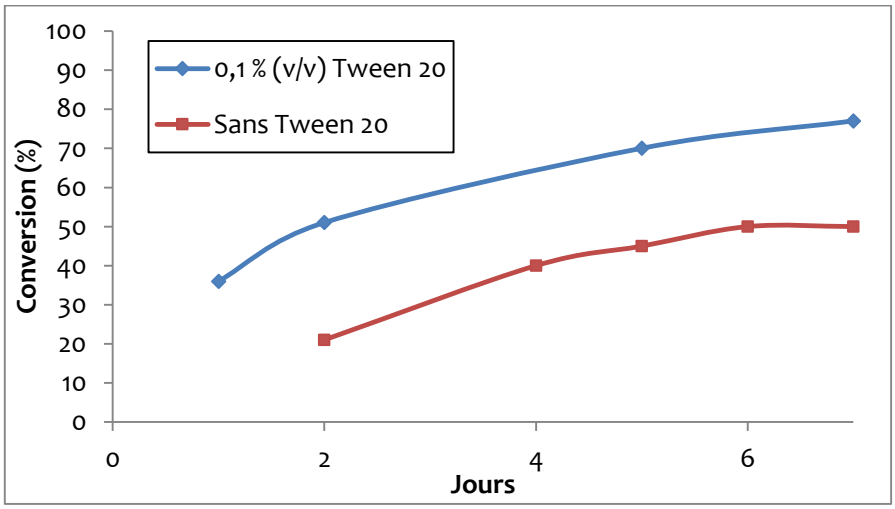


Figure 46 : Influence du Tween 20 sur la réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd par le système laccase-HOBt.

II.4. Choix du co-solvant

Jusqu'ici, le dioxane a été systématiquement utilisé comme co-solvant afin de favoriser la solubilisation de l'ACVBnRéd dans le tampon acétate à pH 4,5. Bien que l'emploi de ce solvant organique altère les performances de la laccase, sa présence a permis d'obtenir des rendements d'oxydation suffisamment élevés dans la réaction entre le LMS et le modèle de lignine étudié.

Le dioxane est un solvant communément employé dans la chimie de la lignine. D'autres solvants peuvent cependant être utilisés en remplacement notamment pour les lignines de type organosolv, généralement solubles dans une vaste gamme de solvants organiques. Aussi, nous avons évalué les performances du système laccase-HOBt en présence d'acétone ou de propane-1,2-diol comme alternative au dioxane. Ces deux solvants sont des solvants usuels répandus et potentiellement compatibles avec la laccase de *Trametes versicolor*[20].

Les résultats obtenus sont présentés en Figure 47. L'évolution de la conversion de l'ACVBnRéd est identique lorsque le co-solvant employé est le dioxane ou le propane-1,2-diol. En présence d'acétone, la cinétique de réaction est supérieure à celle des deux autres en début de réaction : 37% d'oxydation sont obtenus dès le premier jour, alors que quatre jours de réaction sont nécessaires pour atteindre une telle valeur avec le dioxane ou le propane-1,2-diol. Cet effet n'est plus visible par la suite, et les taux de conversion des trois réactions sont quasiment identiques au bout de 6 jours (55%, 52% et 50% avec l'acétone, le propane-1,2-diol et le dioxane, respectivement).

Un des aspects les plus remarquables de cette expérience est visible au septième jour de réaction. Alors que la conversion atteint un pallier vers 50% pour les réactions contenant du dioxane ou du propane-1,2-diol, ce n'est pas le cas pour la réaction impliquant l'acétone : 61% de l'ACVBnRéd est converti et la réaction semble continuer. L'acétone est donc le co-solvant qui déstabilise le moins le système laccase-HOBt.

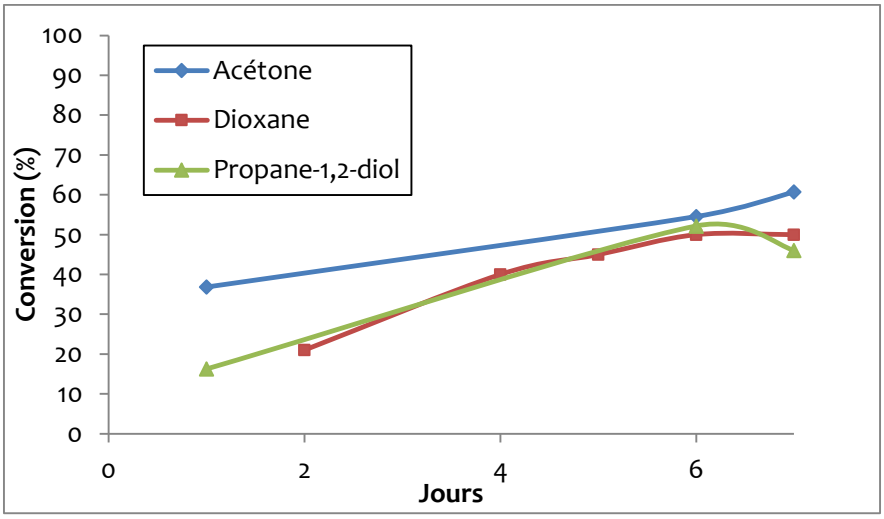


Figure 47 : Influence du co-solvant sur la réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd par le système laccase-HOBt. La concentration en co-solvant est de 25% (v/v).

II.5. Type d'agitation

L'influence du type d'agitation a été évaluée sur le système laccase-HOBt. Deux méthodes ont été comparées (Figure 48) : l'agitation au moyen d'un barreau aimanté (utilisée depuis le début de l'étude) et l'agitation orbitale.

Les meilleures performances sont obtenues avec l'agitateur orbital. Tout au long de la réaction, le taux de conversion est 10% plus élevé avec ce type d'agitation comparé à l'agitation magnétique. Deux facteurs principaux permettent d'expliquer ce phénomène :

- l'agitation par le barreau magnétique provoque des contraintes de cisaillement pouvant altérer la structure de l'enzyme[21, 22]. Ces contraintes sont moins présentes lorsque la solution est agitée de manière orbitale.

- le site actif de la laccase - composé de quatre atomes de cuivre - peut être perturbé par les champs magnétiques générés par l'aimant et l'agitateur.

Pour la suite de ce travail, l'agitation orbitale sera préférentiellement utilisée.

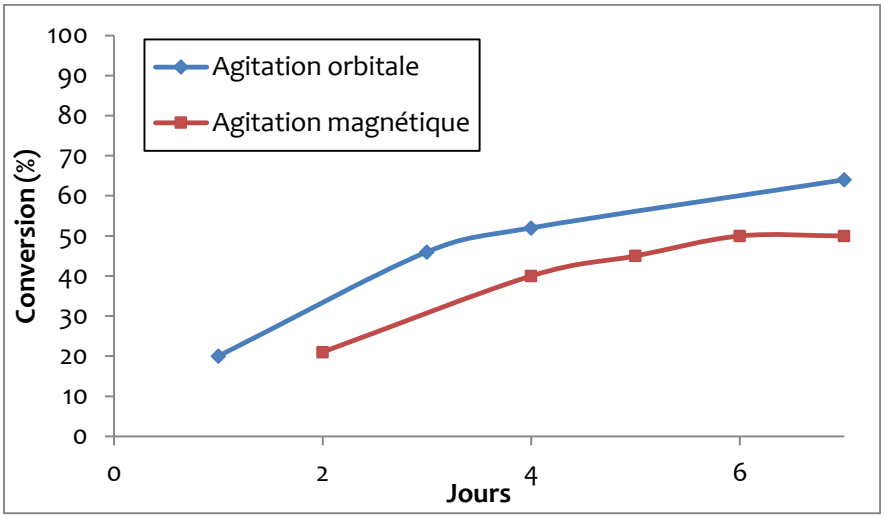


Figure 48 : Influence du type d'agitation sur la réaction d'oxydation de l'ACVBnRéd par le système laccase-HOBt.

III. Oxydation d'autres modèles de lignine

Le comportement du système laccase-HOBt a été évalué lors de l'oxydation de quatre autres types de modèles. Le but de cette étude est d'analyser les mécanismes mis en jeu lors de l'oxydation de différentes structures présentes en grande quantité au sein de la lignine par notre système enzymatique. Ainsi, des modèles phénoliques et dimères ont notamment été traités.

III.1. Influence de l'encombrement stérique : ACVEtRéd

Le modèle de référence utilisé depuis le début de ce travail est l'ACVBnRéd, l'alcool benzylique issu de l'acétovanillone benzylée. L'intérêt d'éthérifier l'hydroxyle en position phénolique a déjà été discuté en début de chapitre. Dans le cas de l'ACVBnRéd, cette éthérification a été conduite en couplant l'acétovanillone et le bromure de benzyle, apportant ainsi une fonction benzyle au modèle. L'intérêt principal de cette modification est le blocage de l'hydroxyle phénolique par une fonction aromatique qui mime la structure de la lignine.

D'autres types d'éthérification du OH phénolique sont néanmoins envisageables. Aussi, un modèle issu de l'acétovanillone éthylée (ACVEtRéd) a été synthétisé et oxydé par le système laccase-HOBt afin d'évaluer l'influence de l'encombrement stérique en position 4 du noyau aromatique du modèle. La modification d'une fonction à cette position impacte très peu le potentiel redox du OH en position benzylique. Ainsi, la gêne stérique est le seul facteur pouvant expliquer une éventuelle différence de réactivité entre l'ACVBnRéd et l'ACVEtRéd.

La Figure 49 montre l'évolution du taux de conversion des substrats éthylé et benzylé en fonction du temps. Après un jour de réaction, le taux de conversion du substrat le moins encombré est 20% plus élevé que celui du substrat benzylé. Lorsque la réaction se poursuit, cette tendance s'inverse et 90% de l'ACVBnRéd est oxydé en 7 jours contre 81% pour l'ACVEtRéd. Ces écarts sont très faibles, ce qui signifie que la différence de masse molaire entre les deux modèles n'est pas assez conséquente pour influer sur l'action du LMS. Ce résultat illustre un des principaux intérêts des médiateurs : leur faible taille et leur grande mobilité permet un transfert efficace des électrons malgré l'encombrement stérique du substrat.

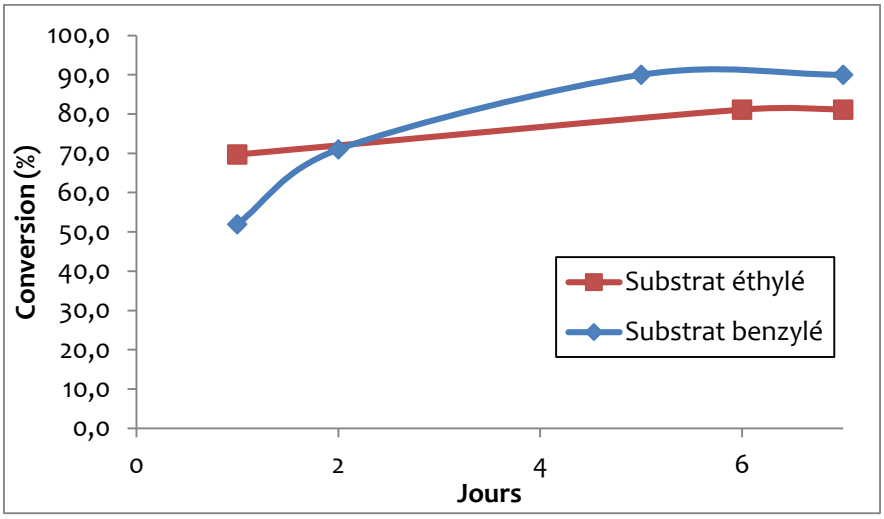


Figure 49 : Influence de l'encombrement stérique sur le système laccase-HOBt.

III.2 Substrat phénolique : 2,6-diméthoxyphénol

La réaction d'oxydation par le système laccase-HOBt a été conduite sur un modèle de type phénolique : le 2,6-diméthoxyphénol (DMP). L'évolution de la réaction a été suivie par HPLC (Figure 50).

Deux observations majeures ont été faites d'après les résultats de cette expérience. La préférence du système laccase-HOBt pour les substrats de type phénolique est clairement démontrée ici. La totalité du DMP est consommée après 1,5 heures de réaction alors que l'oxydation des composés non phénoliques testés jusqu'à présent durait plusieurs jours dans les mêmes conditions.

Par ailleurs, la réaction prend instantanément une couleur orange qui s'intensifie au cours du temps et un précipité violet apparait après une heure de réaction. Ce solide a été identifié comme la molécule issue du couplage entre deux molécules de DMP. Le pic correspondant à ce dimère est observable sur le chromatogramme HPLC au temps de rétention de 400 secondes (Figure 50). Ceci illustre parfaitement la propension des espèces phénoliques aux réactions de couplage en présence de la laccase.

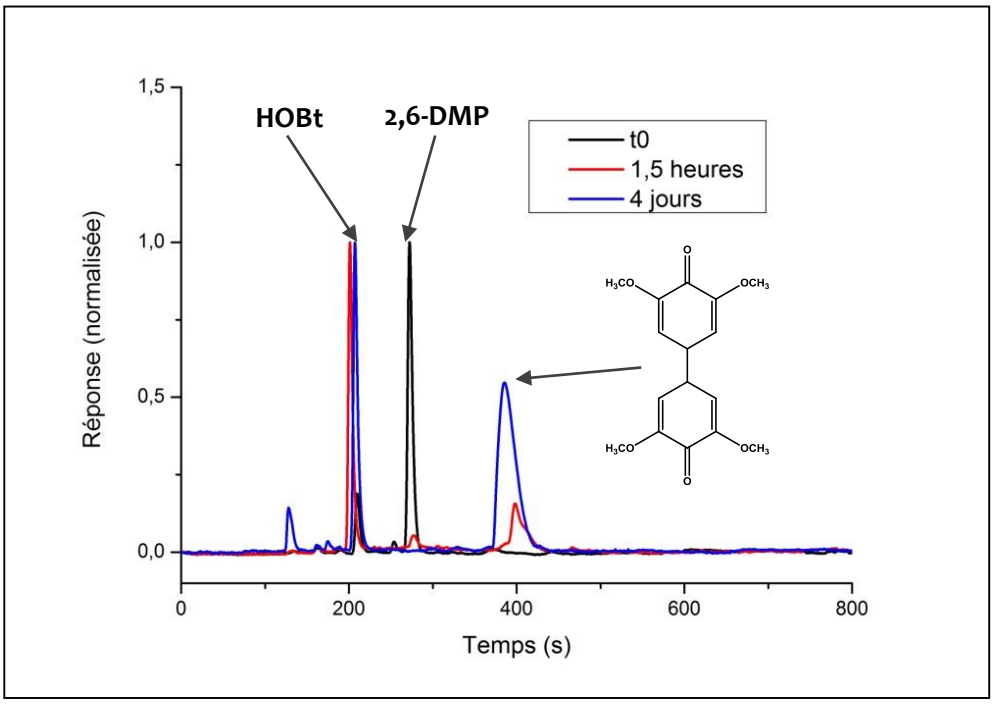


Figure 50 : Chromatogramme HPLC de la réaction d'oxydation du 2,6-diméthoxyphénol par le système laccase-HOBt.

III.3. Modèles dimères

Deux modèles dimères de lignine ont été synthétisés selon les schémas réactionnels présentés en Figure 51. Ces modèles comportent chacun une des liaisons les plus présentes au sein de la lignine : la liaison éther β-O-4 et la liaison β-1. Pour des raisons largement évoquées précédemment, les OH phénoliques ont été benzylés. Les molécules ainsi obtenues ont des structures très similaires à celles retrouvées dans la lignine : elles possèdent trois noyaux aromatiques et plusieurs fonctions hydroxyle et méthoxy.

Les réactions d'oxydation de ces deux dimères par le système laccase-HOBt ont été conduites pendant 6 jours. Les chromatogrammes HPLC de la Figure 52 sont issus d'échantillons prélevés au début et à la fin de ces réactions.

Avant toute analyse des résultats, deux remarques d'ordre général sont à émettre :

- après 6 jours de réaction, le pic correspondant au produit de dégradation de l'HOBt (le benzotriazole, BT) est observable peu après le pic de l'HOBt. Ceci confirme l'instabilité du médiateur.
- on retrouve un léger décalage de temps entre les temps de rétention des dimères réduits en début et en fin de réaction. Cet écart est probablement dû à des différences de pression au sein de la colonne au moment des analyses.

L'oxydation du dimère de type β-1 conduit à la formation du produit attendu : (issu de l'oxydation du OH en position α). Après 6 jours, 58% de conversion sont obtenus, ce qui montre que le système laccase-HOBt est efficace pour l'oxydation de composés de masses molaires élevées et de structures proches de celle de la lignine.

L'interprétation du chromatogramme correspondant à la réaction du dimère β-O-4 avec le LMS est plus délicate. Le pic du dimère de départ diminue sensiblement, signe que la molécule a été consommée au cours de la réaction. Cependant, aucun pic ne semble correspondre au produit d'oxydation attendu, dont le temps de rétention est connu (RT 750 s). Bien que ce résultat soit inattendu dans les conditions douces employées ici, le système laccase-HOBt a pu rompre la liaison éther et ainsi générer plusieurs espèces de plus faibles masses. Les quatre pics de faible intensité observés entre RT 220 et 400 secondes pourraient provenir de ces molécules. Ces espèces ont pu elles-mêmes subir des modifications liées à l'action du LMS, rendant le système final complexe et difficile à analyser (d'autant plus que les quantités de produits mis en jeu sont faibles).

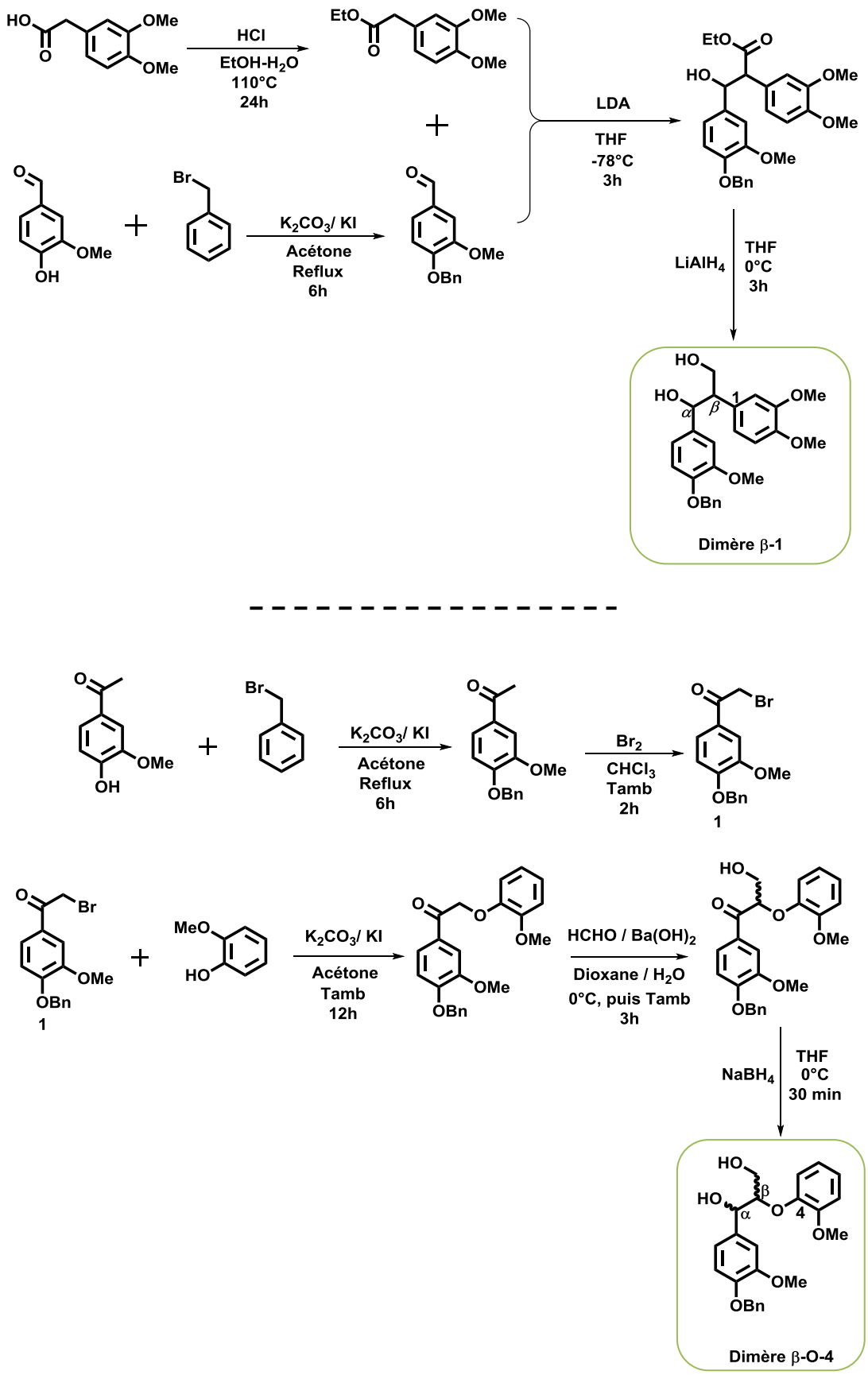
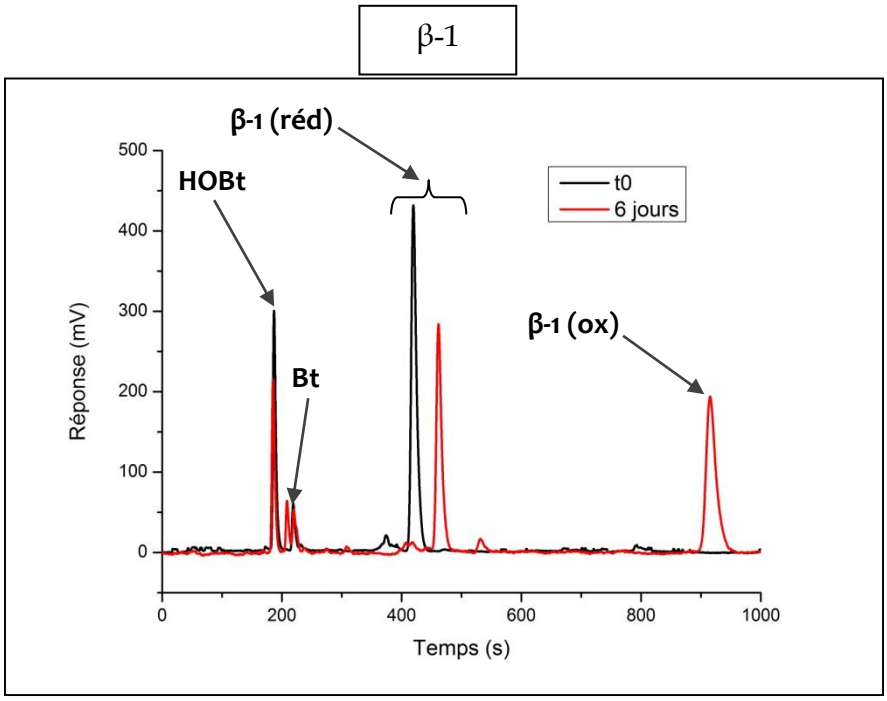


Figure 51 : Synthèse de deux dimères modèles utilisés pour cette étude.



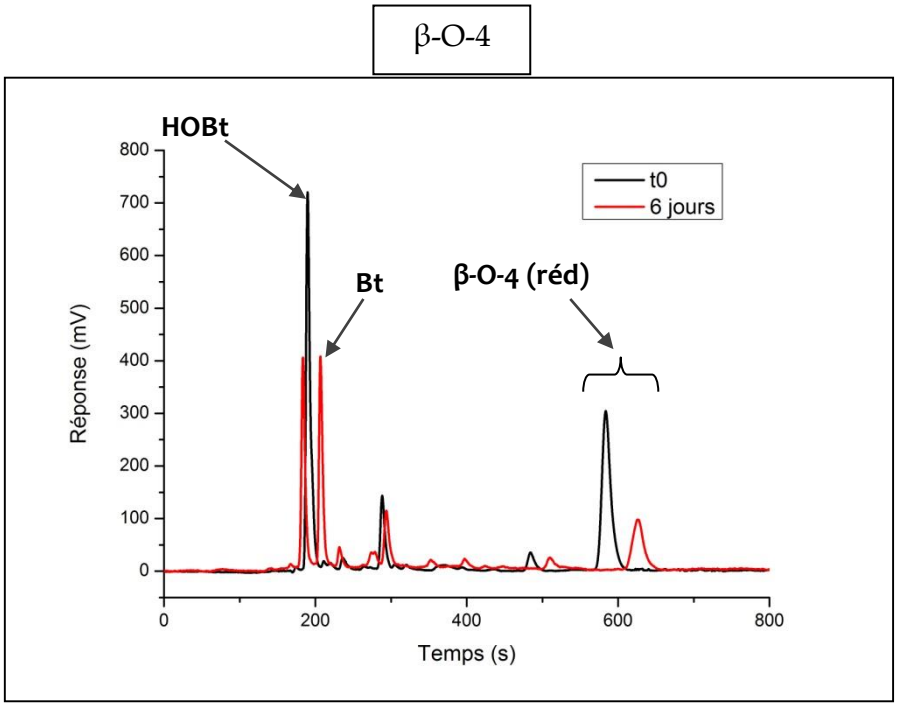


Figure 52 : Chromatogrammes HPLC des réactions d'oxydation des dimères modèles par le système laccase-HOBt.

IV. Immobilisation enzymatique

Dans leur milieu naturel, les enzymes sont généralement compartimentées et immobilisées au sein de matrices solides (membranes, gels…). Ainsi, les réactions catalytiques impliquant des enzymes sont naturellement menées en milieu hétérogène. Afin de reproduire ces conditions, de nombreuses méthodes d'immobilisation enzymatique ont été développées. On distingue généralement deux principaux types d'immobilisation :

- l'immobilisation chimique, où l'enzyme et le support sont liés de façon covalente. C'est la technique la plus stable au cours du temps.

- la rétention physique, où l'enzyme est soit adsorbée sur le support au moyen d'interactions faibles (liaisons hydrogène, Van der Walls…) soit emprisonnée physiquement dans un gel. Ces techniques nécessitent un contrôle précis des paramètres réactionnels afin d'éviter la désorption de l'enzyme.

Immobiliser l'enzyme sur un support solide comporte plusieurs avantages. L'immobilisation apporte une meilleure stabilité à l'enzyme, permettant de travailler à une gamme de température et de pH plus large, ou en présence d'espèces susceptibles de la dénaturer (solvants organiques, médiateurs…). De plus, il est possible d'isoler facilement la protéine du milieu réactionnel. Ainsi, la réaction peut être stoppée de façon contrôlée et l'enzyme peut être réutilisée. Ce dernier point est crucial d'un point de vue industriel, le coût d'une enzyme purifiée étant généralement élevé. Enfin, le choix du support influe directement sur l'environnement proche de l'enzyme et donc sur son comportement. Le choix du mode d'immobilisation conditionne ainsi les propriétés de l'enzyme.

Deux inconvénients sont régulièrement rencontrés lors de l'immobilisation de protéines. Les procédés d'immobilisation peuvent dénaturer l'enzyme, notamment lorsque celle-ci est impliquée dans des liaisons de type covalent. Par ailleurs, l'accessibilité de l'enzyme peut-être restreinte, empêchant une bonne diffusion du substrat vers la protéine.

Lors de cette étude, la laccase de *Trametes versicolor* a été immobilisée sur différents types de support. Dans un premier temps, l'influence de l'immobilisation sur la stabilité de l'enzyme et la capacité de recyclage des différents systèmes ont été évalués. Puis l'oxydation du modèle ACVBnRéd par les laccases supportées a été conduite.

À cause de problèmes d'approvisionnement, ces travaux n'ont pu être effectués sur le même lot de laccase que celui utilisé dans les paragraphes précédents. Les résultats obtenus ne peuvent ainsi pas être directement comparés.

IV.1. Immobilisation d'une laccase de *Trametes versicolor*

Laccase immobilisée chimiquement

La laccase a été fixée de manière covalente à des billes d'alumine selon une méthode dérivée de Rodriguez Couto *et al.* et présentée en Figure 53[23]. Le glutaraldéhyde sert ici d'agent de liaison entre l'enzyme et le support : les fonctions amine de surface de la protéine réagissent avec les fonctions aldéhydes du glutaraldéhyde. Sont ainsi formées des laccases liées chimiquement à un support solide ; elles seront par la suite appelées « **c-laccase** ».

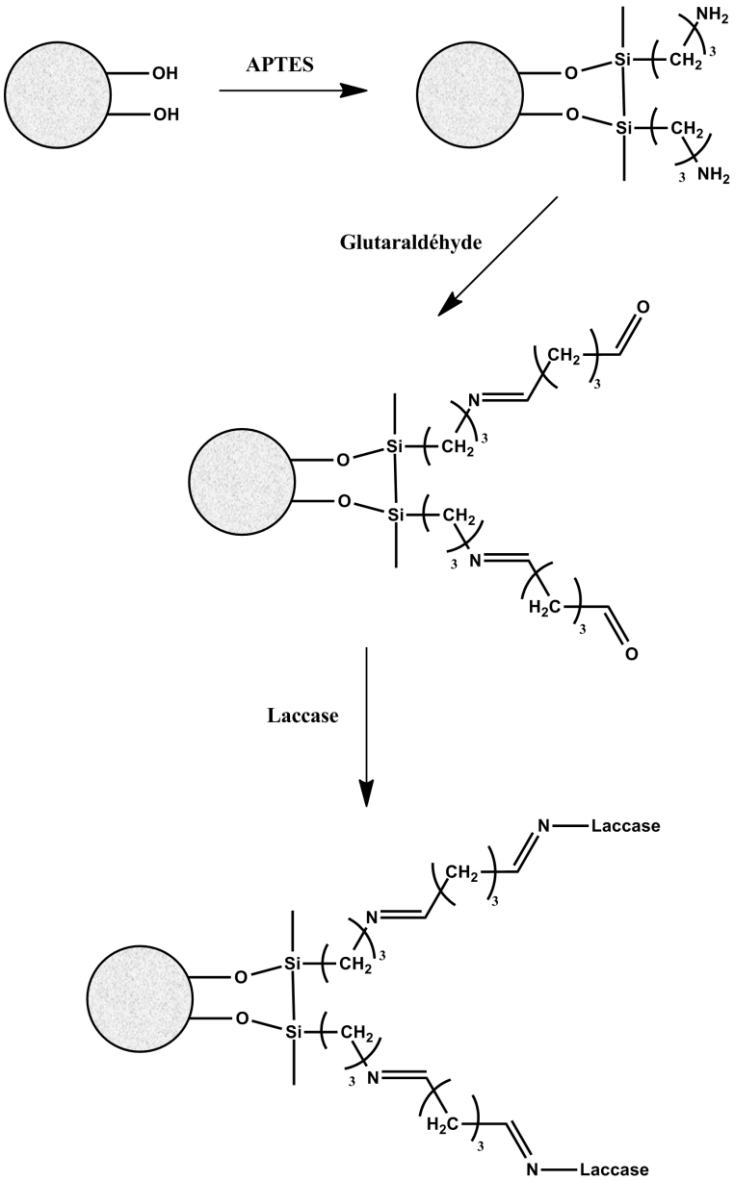


Figure 53 : Immobilisation chimique de la laccase sur des billes d'alumine[23].

Une seconde technique combinant les immobilisations chimique et physique a été développée. Pour cela, des couches alternées de polyélectrolytes positifs (hydrochlorure de poly(allylamine), PAH) et négatifs (polystyrène sulfoné, PSS) ont été appliquées en surface des **c-laccases** selon la méthode dite « layer-by-layer » ou « lbl ». Quatre couches de polyélectrolytes ont été déposées. La charge partielle en surface de la laccase étant négative, le PAH de charge positive a été appliqué en premier. Les systèmes ainsi synthétisées ont été dénommés « **c-lbl** ».

Laccase immobilisée physiquement

Pour cette technique, la laccase est immobilisée physiquement dans des capsules formées par des couches alternées de polyélectrolytes. Le processus de synthèse de ces microcapsules (**m-lbl**) est illustré en Figure 54. Premièrement, des billes de carbonate d'un diamètre de 5 µm ont été synthétisées selon la méthode d'Antipov *et al*. Puis, des couches alternées de polyélectrolytes (PAH et PSS) ont été déposées sur les billes de carbonate via le procédé **lbl** déjà décrit. Bien que la charge partielle du carbonate soit négative, le PSS a été choisi pour le dépôt de la première couche pour ses propriétés d'adsorption de surface. L'efficacité du procédé **lbl** a été confirmée par suivi du potentiel ζ des particules (Figure 55) : celles-ci se chargent négativement pour chaque couche de PSS déposée, et positivement pour chaque couche de PAH.

À la fin du procédé **lbl**, des particules de type cœur-écorce sont générées. Le cœur composé de carbonate est alors dissous en milieu acide pour obtenir une capsule vide avec une membrane constituée de couches alternées de PAH et PSS. La porosité de cette membrane est régulée par le pH du milieu. À pH faible, les pores de polyélectrolytes sont ouverts ce qui permet à l'enzyme de pénétrer dans les capsules. Lorsque le pH est rehaussé, les pores se referment et la laccase est encapsulée.

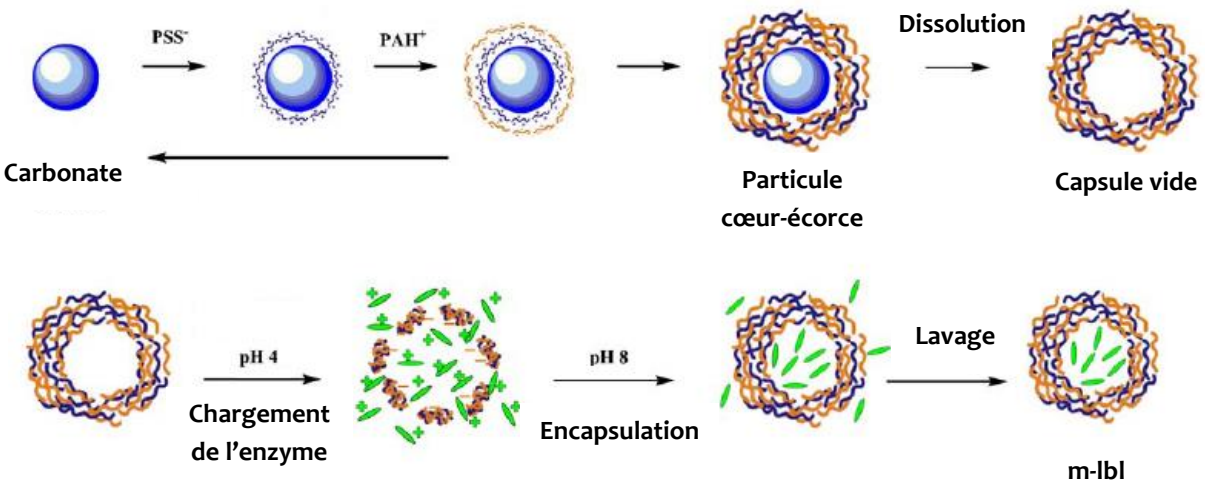


Figure 54 : Schémas illustrant la synthèse des m-lbl[22].

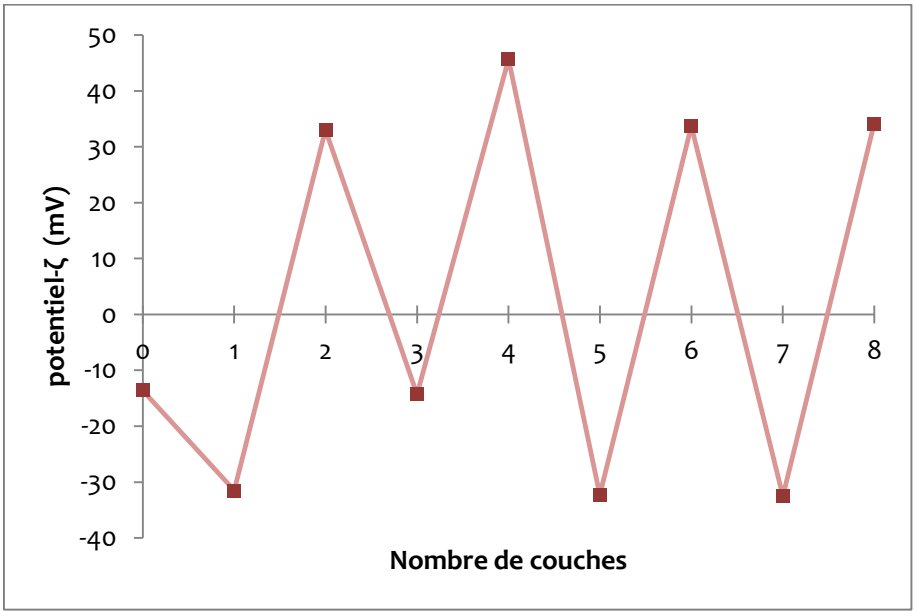


Figure 55 : Variation du potentiel ζ des m-lbl en fonction du nombre de couches déposées. Les couches impaires correspondent à un dépôt de PSS, les couches paires à un dépôt de PAH.

Afin d'évaluer la position des enzymes à l'intérieur des capsules, des laccases ont été marquées par un agent fluorescent, puis encapsulées selon la technique présentée précédemment. Les **m-lbl** ainsi marquées ont été observées en microscopique confocale (Figure 56). L'observation en fluorescence confirme la présence des laccases marquées au sein des **m-lbl**. De façon intéressante les enzymes sont préférentiellement positionnées en surface des particules, emprisonnées dans les couches de polyélectrolytes, plutôt qu'au centre des capsules. Ce phénomène a déjà été reporté dans la littérature pour des systèmes similaires[25]. Afin de valider ce résultat, l'encapsulation de laccases marquées dans des capsules contenant encore le cœur de carbonate a été effectuée. L'observation en microscopie confocale montre que la laccase est immobilisée en superficie des particules, malgré la présence du carbonate (Figure 57).

Les observations faites en microscopie ont également permis de constater les caractéristiques morphologiques des **m-lbl**. Elles possèdent un diamètre trois plus faible que celui des particules dont le cœur n'a pas été dissous et leurs contours sont plus irréguliers. Ceci indique que la dissolution du cœur de carbonate entraine un affaissement des multicouches de polyélectrolytes. Pour la suite de ce travail, les particules sont conservées avec leur cœur de carbonate afin de maintenir leur structure. Le cœur est dissous juste avant l'utilisation des **m-lbl** pour les diverses réactions d'oxydation présentées ci-après.

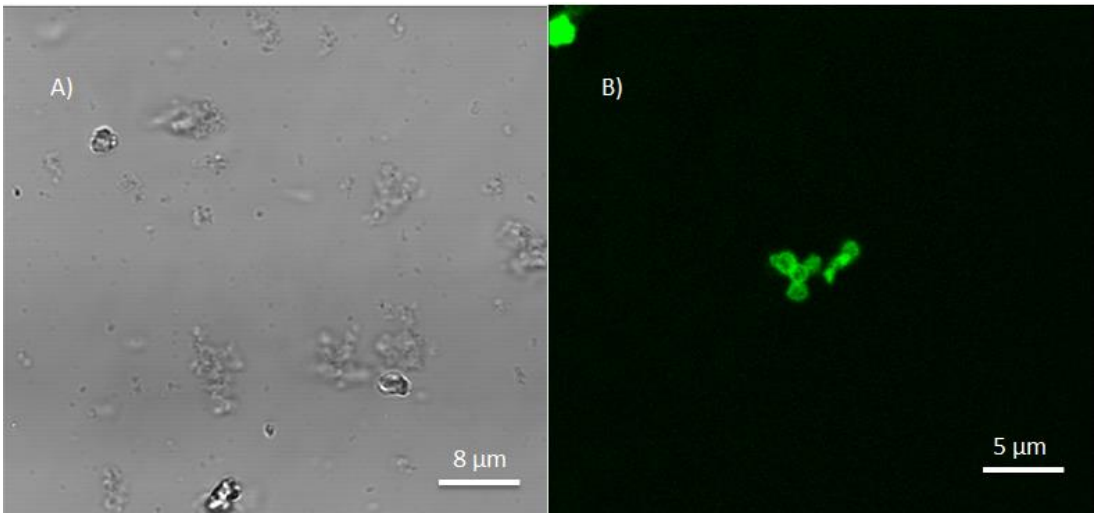


Figure 56 : Clichés en microscopie confocale des m-lbl. La laccase est marquée par la NHS-fluorescéine.

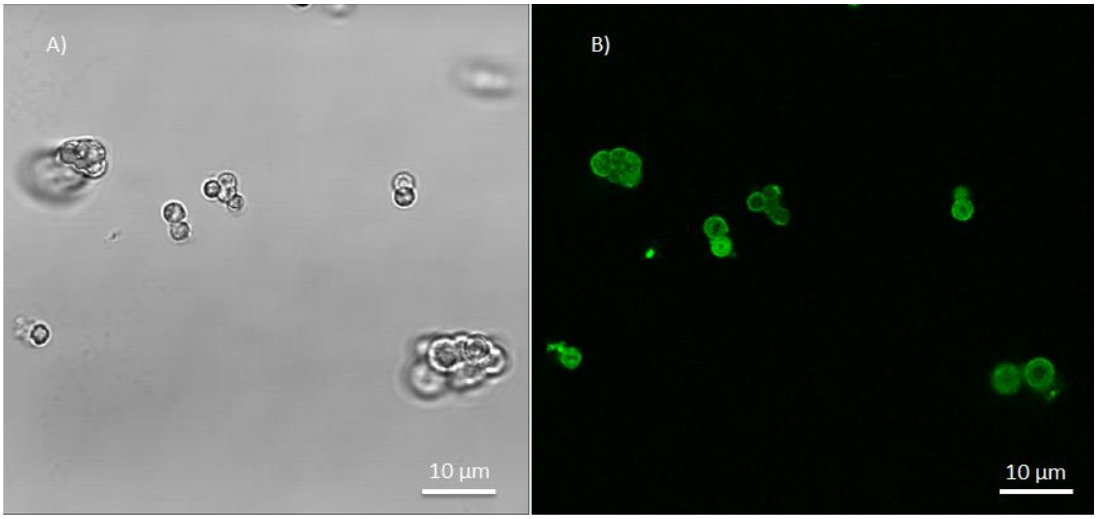


Figure 57 : Clichés en microscopie confocale des particules de type cœur-écorce contenant des laccases marquées par NHS-fluorescéine.

Taux d'immobilisation et dénaturation de l'enzyme

L'efficacité des différentes méthodes d'immobilisation a été évaluée. Pour cela, le taux d'immobilisation a été défini comme le rapport entre l'activité enzymatique présente dans les eaux de lavage après immobilisation et l'activité enzymatique de la solution initiale. L'activité est ici déterminée selon la méthode ABTS. Par ailleurs, les activités spécifiques (en U/mg) des enzymes immobilisées ont été comparées à celle de la laccase libre dans le but d'évaluer l'impact dénaturant des techniques d'immobilisation. Les résultats sont compilés dans le tableau V.

Tableau V : Efficacité des méthodes d'immobilisation de la laccase.

Méthode	Immobilisation (%)	Activité spécifique (AS) relative (%)
c-laccase	81	28
c-lbl	79	32
m-lbl	45	61

Des taux d'immobilisation élevés (autour de 80%) sont obtenus pour les techniques où la laccase est liée chimiquement à son support (**c-laccase** et **c-lbl**). Ceci confirme l'efficacité du glutaraldéhyde comme agent de liaison. Les **m-lbl** possèdent un taux d'immobilisation plus faible (45%), ce qui est un résultat attendu. En effet, lors de l'encapsulation des enzymes, aucune force motrice ne conditionne la diffusion de la laccase à l'intérieur des microcapsules. L'encapsulation est donc essentiellement gouvernée par le mouvement brownien des particules et des enzymes. De meilleurs taux d'encapsulation peuvent être obtenus en augmentant la concentration des capsules, mais des problèmes d'agrégation des particules pourraient alors être rencontrés.

La technique **m-lbl** est la plus respectueuse de l'intégrité de l'enzyme. 61% d'activité spécifique relative est maintenue après l'immobilisation de type **m-lbl**, contre 30% pour les méthodes d'immobilisation chimique. L'implication des fonctions amine de la laccase dans des liaisons covalentes rigidifie et altère la structure de l'enzyme, ce qui explique la baisse d'activité observée.

IV.2. Propriétés des enzymes encapsulées

Les parties précédentes ont montré que l'activité de la laccase était fortement impactée par les paramètres réactionnels, notamment le pH et la composition du solvant. Les différentes techniques d'immobilisation employées pourraient apporter une meilleure stabilité de l'enzyme vis-à-vis de ces paramètres. C'est l'objet des expériences présentées dans ce paragraphe. Lors de cette étude, les systèmes sont comparés à unité d'activité enzymatique (U) constante. Les activités sont déterminées selon la méthode ABTS.

Influence du pH

La Figure 58 illustre le comportement des laccases immobilisées à des pH allant de 3 à 9. On observe tout d'abord que l'immobilisation enzymatique n'influe pas sur le pH optimal de la laccase. Celui-ci est situé vers 4,3 pour la laccase libre et les laccases immobilisées (indépendamment de la méthode utilisée).

L'élément essentiel concernant la stabilité de l'enzyme au pH est la présence de couches de polyélectrolytes. Les **c-lbl** et **m-lbl** possèdent une plus grande stabilité aux pH qui bornent l'étude (pH 3 et pH supérieurs à 7) que la laccase libre et la **c-laccase**. Ainsi à pH 3, les systèmes possédant des bicouches alternées maintiennent plus de 50 % de leur activité maximale, contre des valeurs inférieures à 20% pour les systèmes **c-laccase** et laccase libre. À pH élevé, l'activité relative des systèmes de type **lbl** est 3 à 6 fois plus élevée que celle des autres systèmes.

La présence de couches alternées de polyélectrolytes modifie le micro-environnement à proximité de l'enzyme. Ces bicouches forment un écran protecteur qui apporte une meilleure stabilité de l'enzyme aux variations de pH. L'utilisation de systèmes de type **lbl** représente donc une stratégie intéressante pour toute application nécessitant des conditions de pH éloignées du pH optimal de la laccase.

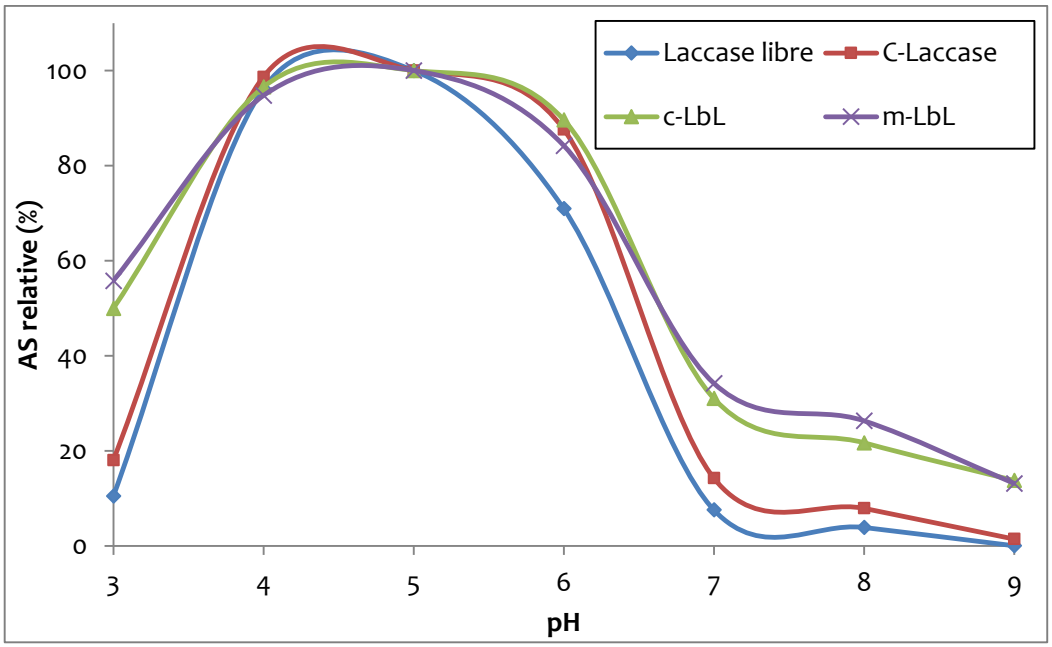


Figure 58 : Influence du pH sur l'activité des laccases libre et immobilisées

Influence du co-solvant

L'évolution de l'activité des différents systèmes enzymatiques a été suivie en fonction de la concentration en acétone (Figure 59) et en dioxane (Figure 60). L'immobilisation covalente de la laccase améliore sa stabilité en présence d'un co-solvant organique. Les enzymes immobilisées chimiquement (**c-laccase** et **c-lbl**) maintiennent près de 70% de leur activité initiale en présence de 20% (v/v) d'acétone. À cette concentration, les activités de la laccase libre et des **m-lbl** sont divisées par deux. L'effet est encore plus marqué lorsque le dioxane est utilisé comme co-solvant : pour des concentrations allant de 10 à 20% (v/v), les activités relatives des systèmes immobilisés chimiquement sont deux fois plus élevées que celles des autres systèmes. La technique lbl n'a cette fois aucun impact sur la stabilité de l'enzyme.

L'immobilisation covalente de la laccase lui apporte une plus grande rigidité structurale. Cette plus grande rigidité améliore sa stabilité vis-à-vis des solvants organiques.

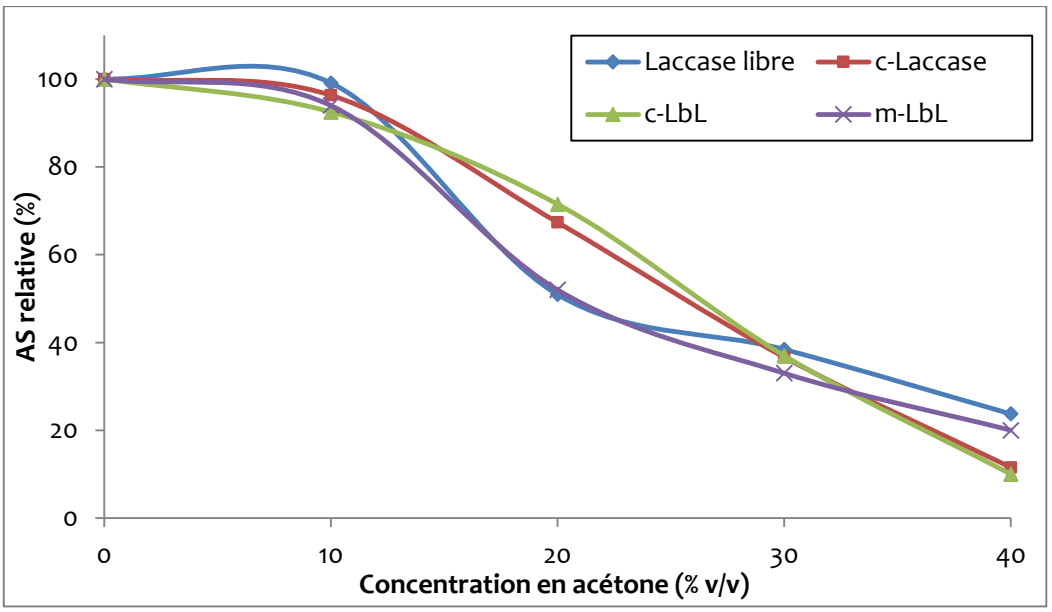


Figure 59 : Influence de la concentration en acétone sur l'activité des laccases libre et immobilisées.

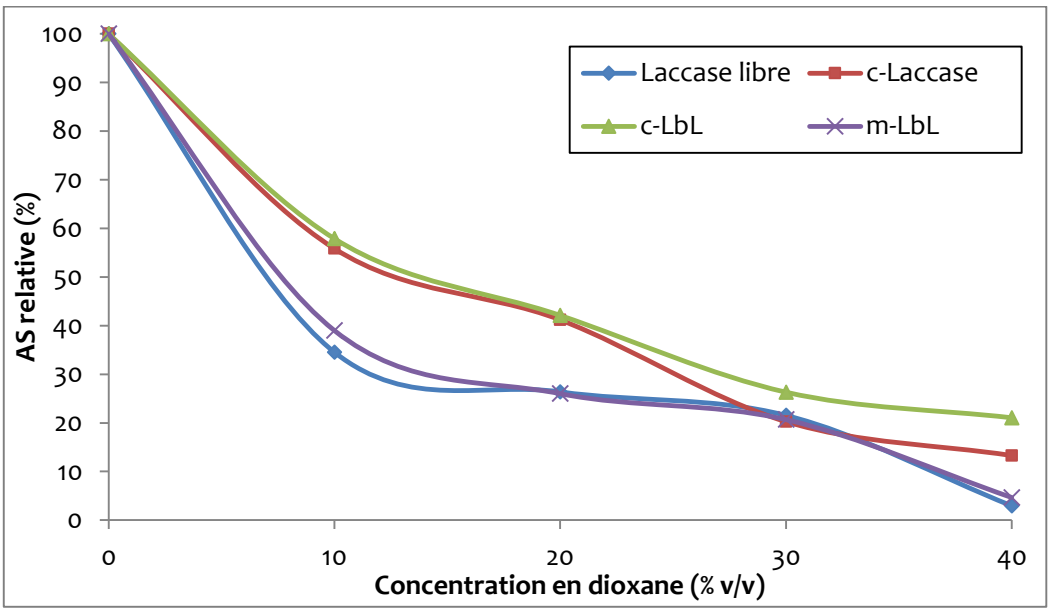


Figure 60 : Influence de la concentration en dioxane sur l'activité des laccases libre et immobilisées.

Stockage des enzymes supportées

La laccase libre et les laccases supportées ont été stockées dans le tampon acétate à pH 4,5 à 4°C pendant plusieurs jours. Des échantillons de chaque solution ont été prélevés à différents intervalles de temps afin de mesurer l'évolution de l'activité des différents systèmes au cours du temps (Figure 61). L'activité de la laccase libre diminue progressivement au cours du temps, jusqu'à atteindre 43% de sa valeur initiale en 28 jours. Les **m-lbl** ont un profil identique à celui de la laccase libre, ce qui semble indiquer que l'encapsulation des enzymes n'est pas stable. Afin de confirmer cette hypothèse, les **m-lbl** ont été isolées du tampon par centrifugation et l'activité présente dans le surnageant a été évaluée. Ce test a montré que la majorité des laccases étaient relâchées hors des capsules de **lbl**.

La technique d'immobilisation chimique est particulièrement efficace pour stabiliser l'enzyme en solution. L'activité des **c-laccase** et des **c-lbl** ne varie quasiment pas après 28 jours de stockage dans le tampon acétate.

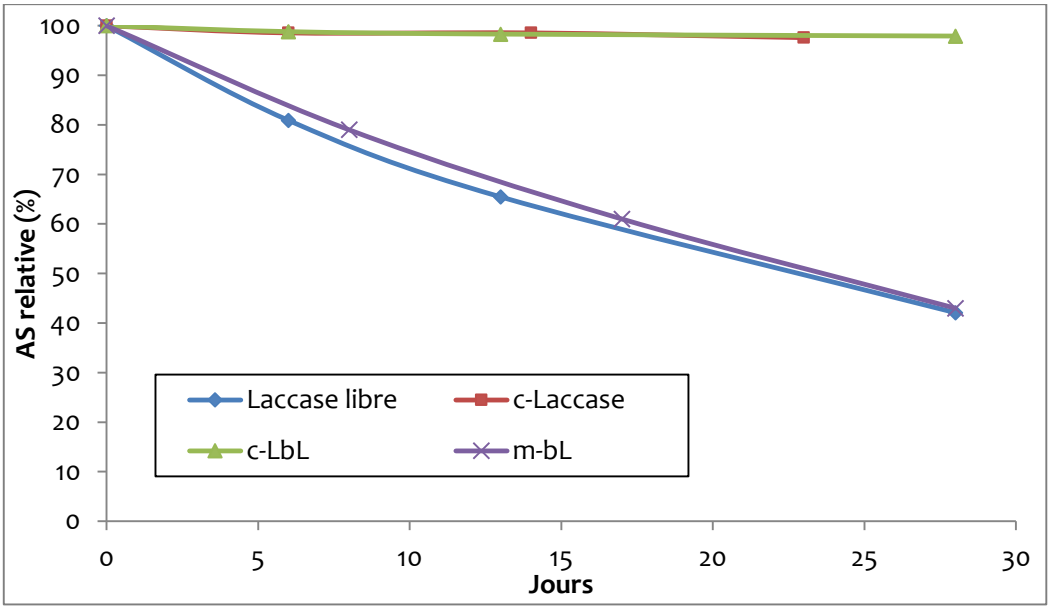


Figure 61 : Stabilité des laccase libre et immobilisées lors de leur stockage en solution à 4°C dans le tampon acétate à pH 4,5.

Recyclage des enzymes supportées

Un des principaux intérêts des enzymes supportées est la possibilité de les isoler du milieu réactionnel et les réutiliser pour de nouveaux cycles de catalyse. Dix réactions successives d'oxydation de l'ABTS ont été conduites avec les systèmes **c-laccase**, **c-lbl** et **m-lbl**. Après chaque cycle d'oxydation, les enzymes immobilisées sont isolées du milieu par centrifugation, rincées à l'eau distillée, et réutilisées aussitôt. L'activité relative de chaque système en fonction du nombre d'oxydations réalisées est présentée en Figure 62.

L'instabilité du système **m-lbl** est confirmée par cette expérience. Dès le premier cycle d'oxydation, l'activité du système est divisée par trois. Après cinq cycles, l'activité spécifique des **m-lbl** est dix fois plus faible que l'activité initiale. Seules les enzymes intimement piégées dans les bicouches sont alors actives, alors que la majorité des laccases ont été relâchées en solution.

Les systèmes aux enzymes immobilisées de façon covalente sont parfaitement adaptés pour les procédés de recyclage. Le diamètre plus élevé de ces particules facilite leur isolation par filtration ou centrifugation et 70% de l'activité initiale de l'enzyme est maintenue après 10 cycles d'oxydation. Ceci atteste la stabilité des **c-laccase** et **c-lbl**. La présence des bicouches **lbl** n'a pas d'incidence sur le processus de recyclage.

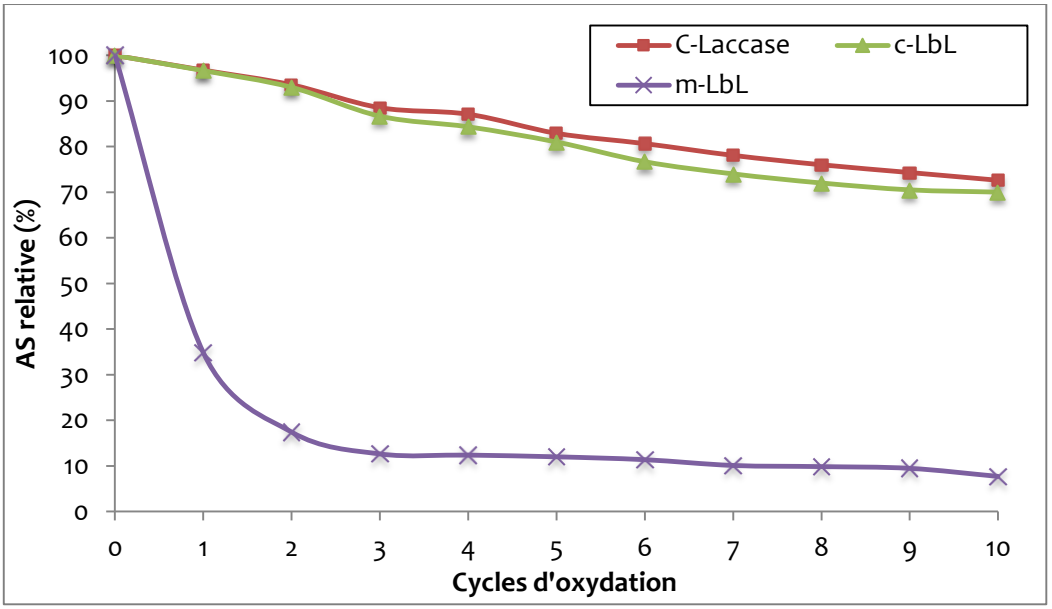


Figure 62 : Capacité de recyclage des enzymes supportées lors de l'oxydation de l'ABTS.

IV.3 Oxydation de l'ACVBnRéd

L'oxydation du modèle de lignine ACVBnRéd a été conduite avec la laccase libre, les **c-laccase** et les **c-lbl** selon les conditions déjà décrites précédemment. Le système m-lbl n'a pas été étudié ici, du fait de sa faible stabilité. La conversion de l'ACVBnRéd en ACVBnOx est suivie par HPLC (Figure 63).

Dans les deux premiers jours de réaction, une conversion 10 à 15% plus élevée est obtenue avec la laccase libre par rapport aux laccases supportées. La cinétique de réaction plus faible des laccases immobilisées s'explique par le fait que ces systèmes sont hétérogènes et ainsi moins mobiles et moins accessibles par le substrat que l'enzyme libre en solution.

L'effet stabilisant apporté par l'immobilisation enzymatique est mis en évidence à partir du troisième jour de réaction. Alors que la cinétique de réaction diminue significativement pour la laccase libre, celle-ci est stable pour les enzymes supportées. Par conséquent, les taux de conversion obtenus avec les **c-laccase** et **c-lbl** sont supérieurs à celui obtenu avec la laccase libre après quatre jours de réaction. Les paragraphes précédents ont montré que la laccase libre était dénaturée par la présence de co-solvant et de substrat synthétique. L'immobilisation covalente de la laccase lui confère une plus grande rigidité, et ainsi une meilleure stabilité en solution. Les systèmes **c-laccases** et **c-lbl** sont donc très prometteurs pour l'oxydation de substrats réticents dans des conditions réactionnelles défavorables à la laccase libre.

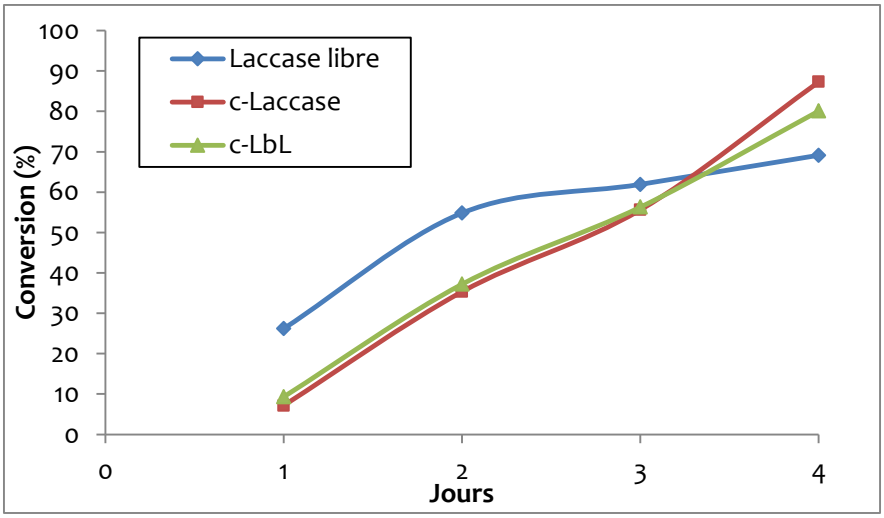


Figure 63 : Oxydation de l'ACVBnRéd par la laccase libre et les laccases supportées. L'ABTS est utilisé comme médiateur.

Les **c-laccase** et **c-lbl** utilisées dans ces réactions ont été isolées, rincées et réutilisées pour l'oxydation de l'ACVBnRéd dans les mêmes conditions. Après quatre jours de réaction, des taux de conversion proches de ceux obtenus pour la première réaction sont observés (autour de 80 %). Ceci confirme la capacité de ces systèmes à être recyclés de façon effective.

IV.4. Conclusion

Trois techniques d'immobilisation ont été testées lors de cette étude. Les particules issues de la méthode d'encapsulation physique de la laccase (**m-lbl**) ne sont pas stables, et des phénomènes de désorption de l'enzyme ont été mis en évidence. Les deux méthodes où la protéine est fixée de façon covalente à un support d'alumine ont montré des propriétés très intéressantes :

- le dépôt de couches alternées de polyélectrolytes (**lbl**) en surface des particules forme un écran permettant de protéger l'enzyme des variations de pH.

- l'immobilisation chimique augmente la rigidité structurale de la laccase. En conséquence, l'enzyme est plus stable en solution et tolère mieux la présence d'inhibiteurs que l'enzyme libre.

- les systèmes **c-laccase** et **c-lbl** se sont montrés plus efficaces que l'enzyme libre pour l'oxydation d'un modèle de lignine en présence d'un médiateur.

- il est possible de réutiliser les laccases supportées jusqu'à 10 fois avec une perte d'activité de seulement 30%.

Ces premiers résultats ouvrent des perspectives pour l'utilisation des laccases supportées. Il serait intéressant de procéder à l'oxydation de modèles comportant plusieurs types de fonctions OH afin de vérifier si la technique d'immobilisation modifie la sélectivité de l'enzyme. Une autre voie à explorer serait l'oxydation de modèles de lignine et de lignine dans des conditions plus dures (température et pH plus élevés, concentration en co-solvant supérieure…).

Références bibliographiques

1. Feng, X. U. *et al.* Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.* **334,** 63–70 (1998).
2. Koduri, R. S. & Tien, M. Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase role of veratryl alcohol. *J. Biol. Chem.* **270,** 22254–22258 (1995).
3. Chawla, S., Rawal, R., Shabnam, Kuhad, R. C. & Pundir, C. S. An amperometric polyphenol biosensor based on laccase immobilized on epoxy resin membrane. *Anal. Methods* **3,** 709 (2011).
4. Bohlin, C., Lundquist, K. & Jönsson, L. J. Oxidation of the erythro and threo forms of the phenolic lignin model compound 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1,3-propanediol by laccases and model oxidants. *Bioorganic Chem.* **37,** 143–148 (2009).
5. Xu, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. *J. Biol. Chem.* **272,** 924–928 (1997).
6. Li, C., Zhao, X., Wang, A., Huber, G. W. & Zhang, T. Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chem. Rev.* **115,** 11559–11624 (2015).
7. Singh Arora, D. & Kumar Sharma, R. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160,** 1760–1788 (2010).
8. Bourbonnais, R., Leech, D. & Paice, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **1379,** 381–390 (1998).
9. Llevot, A., Grau, E., Carlotti, S., Grelier, S. & Cramail, H. Selective laccase-catalyzed dimerization of phenolic compounds derived from lignin: Towards original

symmetrical bio-based (bis) aromatic monomers. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **125,** 34–41 (2016).

10. Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M. J. & Martinez, A. T. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71,** 1775–1784 (2005).

11. Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **16,** 231–240 (2002).

12. Cantarella, G., Galli, C. & Gentili, P. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **22,** 135–144 (2003).

13. Jeon, J.-R., Murugesan, K., Kim, Y.-M., Kim, E.-J. & Chang, Y.-S. Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by Ganoderma lucidum laccase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81,** 783–790 (2008).

14. Fernández-Sánchez, C., Tzanov, T., Gübitz, G. M. & Cavaco-Paulo, A. Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochemistry* **58,** 149–156 (2002).

15. Srebotnik, E. & Hammel, K. E. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* **81,** 179–188 (2000).

16. Finkelstein, M. & Weissmann, G. The introduction of enzymes into cells by means of liposomes. *J Lipid Res* **19,** 289–303 (1978).

17. Walde, P. & Ichikawa, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Eng.* **18,** 143–177 (2001).

18. Prévoteau, A. & Faure, C. Effect of onion-type multilamellar liposomes on *Trametes* versicolor laccase activity and stability. *Biochimie* **94,** 59–65 (2012).

19. G. Zardeneta & P.M. Horowitz. Detergent, liposome, and micelle-assisted protein refolding. *Anal. Biochem.* **223,** 1–6 (1994).

20. Rodakiewicz-Nowak, J., Kasture, S. M., Dudek, B. & Haber, J. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **11,** 1–11 (2000).

21. Tirrel, M., Middleman, S. Shear deformation effects on enzyme catalysis: Perliminary experimental results on lactic dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.* **20**. 605-610 (1978).

22. Charm, S. E., Wong, B. L. Shear effects on enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **3**. 111-118 (1981).

23. Rodríguez Couto, S., Osma, J. F., Saravia, V., Gübitz, G. M. & Toca Herrera, J. L. Coating of immobilised laccase for stability enhancement: A novel approach. *Appl. Catal. Gen.* **329,** 156–160 (2007).

24. Crestini, C., Perazzini, R. & Saladino, R. Oxidative functionalisation of lignin by layer-by-layer immobilised laccases and laccase microcapsules. *Appl. Catal. Gen.* **372,** 115–123 (2010).

25. Kouisni, L. & Rochefort, D. Confocal microscopy study of polymer microcapsules for enzyme immobilisation in paper substrates. *J. Appl. Polym. Sci.* **111,** 1–10 (2009).

Partie B : Oxydation d'une lignine de type organosolv

Sommaire

Partie B : Oxydation d'une lignine de type organosolv

Chapitre 1 : Oxydation enzymatique en milieu monophasique.....153

I. Caractérisation d'une lignine organosolv.....154

I.1. Pureté, siccité et taux de cendres.....154

I.2. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....155

I.3. Spectroscopie infrarouge (IR-TF).....157

I.4. Spectroscopie RMN.....158

II. Oxydation de la lignine par le système laccase-médiateur.....163

II.1. Mise en place des conditions réactionnelles.....163

II.2. Comparaison de plusieurs systèmes laccase-médiateur.....164

II.3. Association de médiateurs.....167

III. Limitation des réactions de couplage.....170

III.1. Blocage des hydroxyles phénoliques.....171

III.2. Utilisation de pièges à radicaux.....172

IV. Conclusion.....173

Chapitre 2 : Oxydation enzymatique en milieu biphasique.....174

I. Nouvelle stratégie pour la dépolymérisation de la lignine.....174

II. Choix du solvant organique.....175

II.1. Capacité d'extraction des solvants : calcul de coefficients de partage.....176

II.2. Activité de la laccase en présence des solvants d'extraction...177

III. Oxydation de la lignine en milieu biphasique.....180

III.1 Fractionnement organique de la lignine organosolv.....181

III.2. LMS en milieu biphasique.....184

III.3. Traitement de Dakin de la phase LMS aq.....193

IV. Études complémentaires.....195

IV.1. Application à un nouveau lot de lignine.....205

IV.2. Étude sur le traitement de Dakin.....209

IV.3. Renouvellement de la phase organique.....213

V. Élucidation des produits d'oxydation 213

V.1. Chromatographie d'exclusion stérique.....213

V.2. Chromatographie en phase gazeuse (GC et GC-MS).....215

V.3. Chromatographie en phase liquide (HPLC et LC-MS).....220

Références bibliographiques.....228

Chapitre 1 : Oxydation enzymatique en milieu monophasique

La partie précédente a permis de mettre en évidence les principales caractéristiques de la laccase de *Trametes versicolor* utilisée lors de ce travail de thèse. L'association de cette laccase avec différents médiateurs a notamment été explorée pour l'oxydation de modèles de lignine. Cette nouvelle partie s'appuie sur les résultats obtenus afin d'étudier l'oxydation d'une lignine de type organosolv par la laccase et le LMS.

Le but principal de ces travaux est de trouver une voie de valorisation de la lignine par la formation de synthons phénoliques d'intérêt pour la chimie. Les structures visées sont des composés aromatiques de faibles masses molaires et en particulier de type monomère à trimère. Le chapitre bibliographique a illustré les difficultés rencontrées lors des études traitant de la dépolymérisation de la lignine. Bien qu'un grand intérêt soit porté sur ce sujet depuis plusieurs années, aucune voie n'a pour l'instant permis la production avec un haut rendement de molécules aromatiques de faibles masses issues de la lignine. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour des traitements chimiques, dans des conditions dures[1]. Bien que prometteuse, l'oxydation de la lignine par voie enzymatique est moins efficace. Trois obstacles sont majoritairement rencontrés lors de ces expériences :

- la lignine est généralement insoluble dans les solvants compatibles avec les enzymes dans les conditions optimales de fonctionnement de la protéine. Il est nécessaire de trouver un compromis pour permettre la solubilisation de la lignine tout en limitant la perte d'activité de l'enzyme.

- l'oxydation de la lignine est généralement accompagnée de réactions de couplage. Il existe alors une compétition entre polymérisation et dépolymérisation du polymère. Les motifs favorisant une réaction au profit de l'autre sont encore flous.

- la complexité de la structure de la lignine entraine la formation de nombreux produits. Ainsi, l'isolation sélective des molécules issues de la dépolymérisation de la lignine est un défi de taille.

Les chapitres suivants prendront en compte tous ces paramètres dans le but de trouver des conditions sélectives vers la dépolymérisation d'une lignine organosolv par le système laccase-médiateur (LMS).

I. Caractérisation d'une lignine organosolv

Les travaux décrits dans cette thèse ont été majoritairement conduits sur une lignine issue d'un procédé organosolv fournie par Solvay. La structure et les propriétés d'une lignine dépendent de nombreux facteurs comme l'origine et l'âge de l'arbre, ou encore le type d'extraction employé. Ainsi les caractéristiques d'un échantillon de lignine sont singulières et propres à chaque échantillon. Il est donc nécessaire avant chaque étude impliquant la lignine de procéder à une série d'analyses afin de déterminer les attributs de chaque lot. C'est l'objet de ce paragraphe, portant sur la caractérisation de la lignine organosolv dénommée « lot 1 » par la suite.

I.1. Pureté, siccité et taux de cendres

Dans la paroi cellulaire des végétaux, la lignine est intimement liée à la cellulose, aux hémicelluloses ainsi qu'à certains minéraux nécessaires au métabolisme de la plante. Les divers procédés d'extraction mis au point visent à casser les liaisons – plus ou moins fortes – entre ces différents constituants afin d'isoler la lignine la plus pure possible. Aucun de ces procédés n'est cependant pleinement efficace et une certaine quantité de sucres et de minéraux est toujours présente au sein de chaque échantillon de lignine. Il est alors nécessaire de déterminer la pureté d'une lignine avant toute étude.

La pureté du lot 1 a été évaluée selon la méthode dite de « Klason » (norme TAPPI 222 om-02). Lors de cette analyse, l'échantillon est soumis à une hydrolyse en milieu acide afin d'éliminer les sucres liés à la lignine. La pureté est calculée en fonction de la masse de l'échantillon sec avant et après le traitement acide. La lignine organosolv du lot 1 possède une pureté de 92 %. C'est une valeur commune pour une lignine de type organosolv, souvent plus pures que les lignines kraft ou lignosulfonates[2].

Par ailleurs, la siccité et le taux de cendres de la lignine ont été déterminés. On obtient une siccité de 97 %, ce qui indique que l'échantillon est peu hydrophile. Le taux de cendres de cette lignine est dans la norme de valeurs attendues. L'ensemble de ces résultats est compilé dans le Tableau VI.

Tableau VI : Caractéristiques générales de la lignine organosolv lot 1.

	Lignine organosolv lot 1
Aspect	
Siccité	97 %
Pureté (Klason)	92 %
Taux de cendres (500°C)	5 %

I.2. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

La masse molaire de la lignine organosolv lot 1 a été évaluée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans l'eau basique. Le 4-vinylbenzènesulfonate de sodium a été employé comme marqueur de débit (FM) et une courbe de calibration a été établie avec des standards de type poly(styrène sulfoné) (PSS) afin de déterminer les masses molaires relatives des échantillons.

Le chromatogramme du lot 1 est présenté en Figure 64. On observe un profil bimodal avec une population principale éluant à un temps de rétention (RT) de 20 minutes et une seconde population à RT 22 minutes. La masse molaire au pic (M_p) de la population principale est de 1800 g/mol selon la calibration PSS.

La présence de plusieurs populations au sein de l'échantillon et le caractère relatif de la calibration ne permet qu'une estimation approximative de la masse molaire. Afin de mieux situer notre échantillon, d'autres types de lignine ont été analysées dans les mêmes conditions. La Figure 65 rassemble les chromatogrammes des différentes lignines caractérisées. Le lot 1 possède une dispersité plus étroite que celle des autres lignines testées et son temps de rétention est proche de ceux des lignines kraft et organosolv étudiées (lignines de faibles masses molaires).

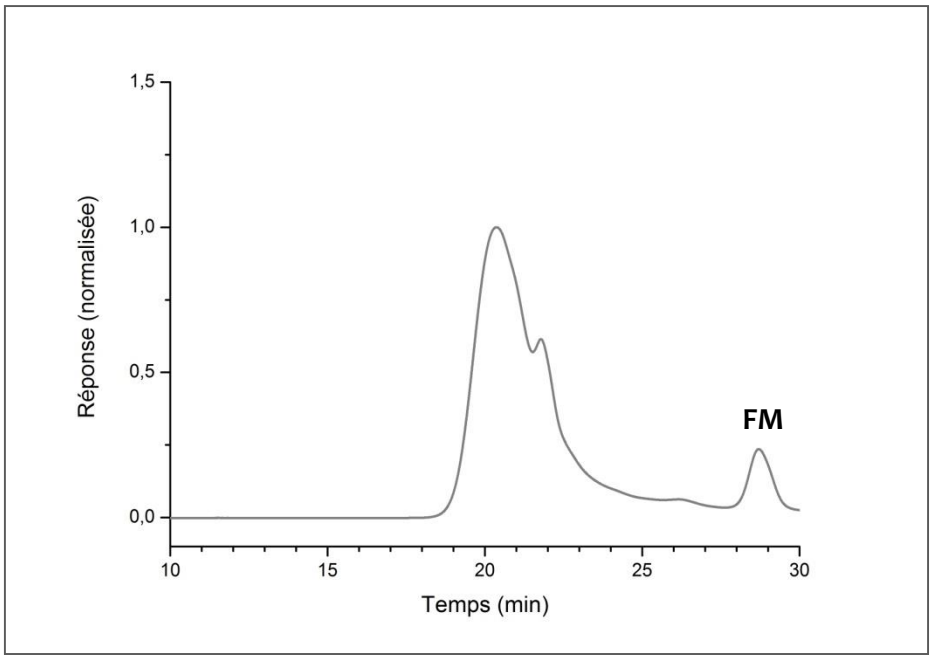


Figure 64 : Chromatogramme SEC de la lignine organosolv lot 1 (solvant : eau pH 12, température ambiante, détection UV).

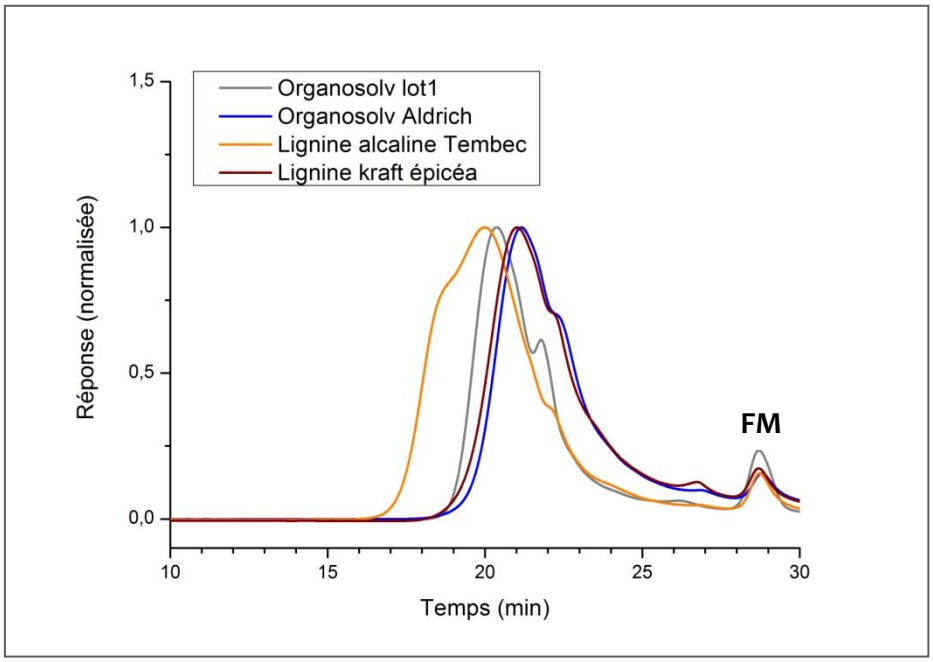


Figure 65 : Chromatogrammes SEC de différentes lignines (solvant : eau pH 12, température ambiante, détection UV).

I.3. Spectroscopie infrarouge (IR-TF)

La spectroscopie infrarouge permet d'identifier les groupements fonctionnels présents dans la lignine. La Figure 66 présente le spectre IR du lot 1 obtenu par analyse ATR. On y retrouve les groupements typiques de la lignine. On observe notamment la large bande caractéristique des fonctions hydroxyle à 3360 cm^{-1}. Le signal à 1696 cm^{-1} correspond aux groupements carboxyle de la lignine et les bandes à 1600 et 1510 cm^{-1} sont dues aux élongations et aux vibrations du noyau aromatique. On remarque à la fois des bandes caractéristiques des motifs S et des motifs G, typique d'une lignine issue de conifères ou d'herbacées.

La spectroscopie infrarouge donne des premières informations sur la structure de la lignine. Ces informations vont être complétées par des analyses en spectroscopie RMN afin d'approfondir la caractérisation de l'échantillon, notamment avec des données quantitatives.

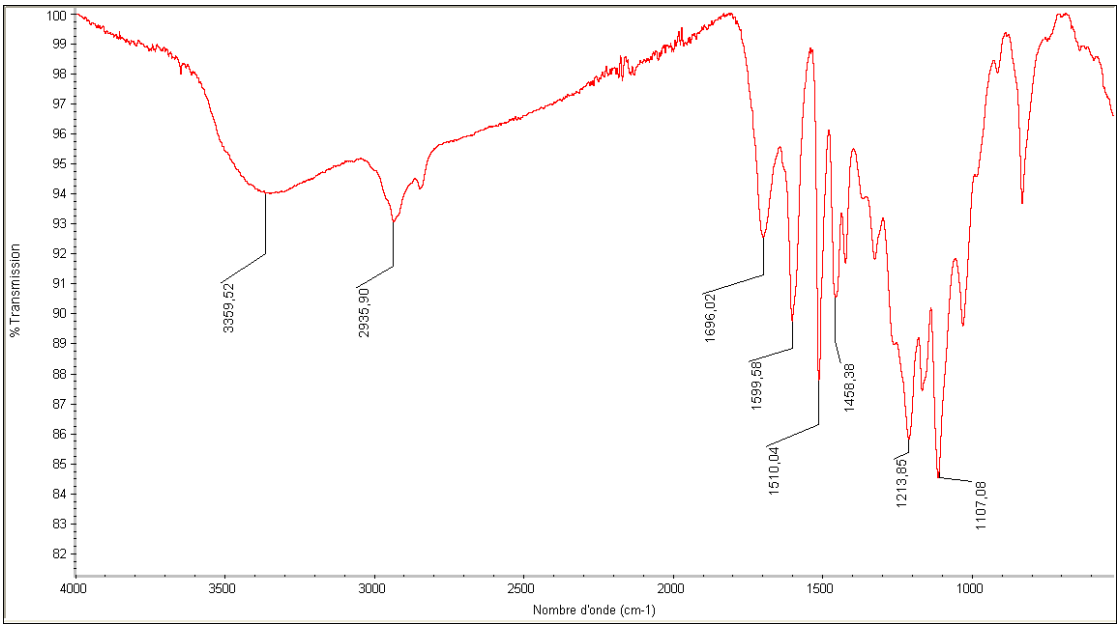


Figure 66 : Spectroscopie infrarouge de la lignine organosolv lot 1.

Tableau VII : Bandes d'absorption caractéristiques de la lignine en spectroscopie infrarouge[3].

Bande d'absorption (cm^{-1})	Groupe fonctionnel
3360	Groupements O-H
2936	Élongation des C-H (méthoxyles et chaînes latérales)
1696	Élongation des carbonyles
1600	Élongation des C=C du noyau aromatique
1510	Vibrations du squelette aromatique
1458	Déformations asymétriques des C-H
1425	Vibrations du squelette aromatique
1260	Élongation des liaisons C-O-C
1214	Élongation C-C, C=O, et C=O dans les motifs G
1107	Déformation plane des C-H dans les motifs S
1030	Déformation plane des C-H dans les motifs G
830	Déformation hors-plan du noyau aromatique

I.4. Spectroscopie RMN

RMN du phosphore (^{31}P)

La RMN du phosphore (^{31}P) permet d'identifier et de quantifier chaque type de fonctions OH présentes dans la lignine (OH aliphatiques, phénoliques et carboxyliques)[4,5]. Pour cette analyse, la lignine est phosphorylée selon la réaction présentée en Figure 66 et les proportions de chaque type de groupement hydroxyle sont évaluées en fonction d'un étalon interne (le N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide).

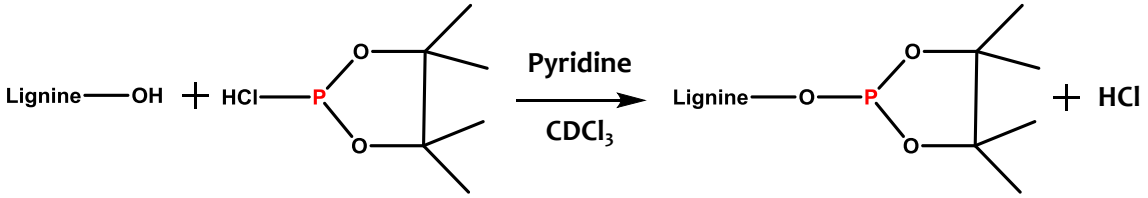


Figure 67 : Fonctionnalisation de la lignine par le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyle-1,2,3-diaxophospholane pour l'analyse en RMN ^{31}P.

La Figure 68 présente le spectre obtenu pour l'analyse du lot 1, les proportions (en mmol/g de lignine) de chaque OH sont répertoriées dans le Tableau VIII. Les hydroxyles phénoliques issus des motifs S, G et H sont présents en proportions quasiment égales (respectivement 0,96, 0,80 et 0,84 mmol/g). Ceci indique que l'échantillon analysé provient d'une plante annuelle. La quantité importante de motifs G et H phénoliques trouvés dans le lot 1 peut engendrer des complications lors des réactions d'oxydation de la lignine. En effet, dans les unités H, les carbones en position 3 et 5 du noyau aromatique sont libres et peuvent être impliqués dans des réactions de condensation, limitant ainsi la dépolymérisation de la lignine. Il en est de même pour les unités G, dont les carbones en position 3 sont disponibles.

Un des aspects les plus intéressants de cette lignine est sa très faible teneur en unités condensées (0,13 mmol/g). Les liaisons C-C – dites condensées – sont les liaisons les plus difficiles à rompre au sein de la lignine. Ainsi, une lignine possédant peu de liaisons condensées, comme celle du lot 1, sera plus facilement dépolymérisable, ce qui est un avantage certain dans le cadre de nos travaux. Enfin, le taux d'OH aliphatiques est plus faible que les taux reportés dans la littérature (généralement entre 1,50 et 2,00 mmol/g contre 0,89 mmol/g pour notre échantillon). Ceci peut être un frein dans nos travaux, ces hydroxyles étant la cible principale dans notre stratégie.

Tableau VIII : Proportions des différents groupements OH de la lignine organosolv lot 1. Les valeurs ont été déterminées par RMN ^{31}P.

Types d'OH	Concentration (mmol/g)
Aliphatiques	0,89
Condensés	0,13
S phénoliques	0,96
G phénoliques	0,80
H phénoliques	0,84
COOH	0,29

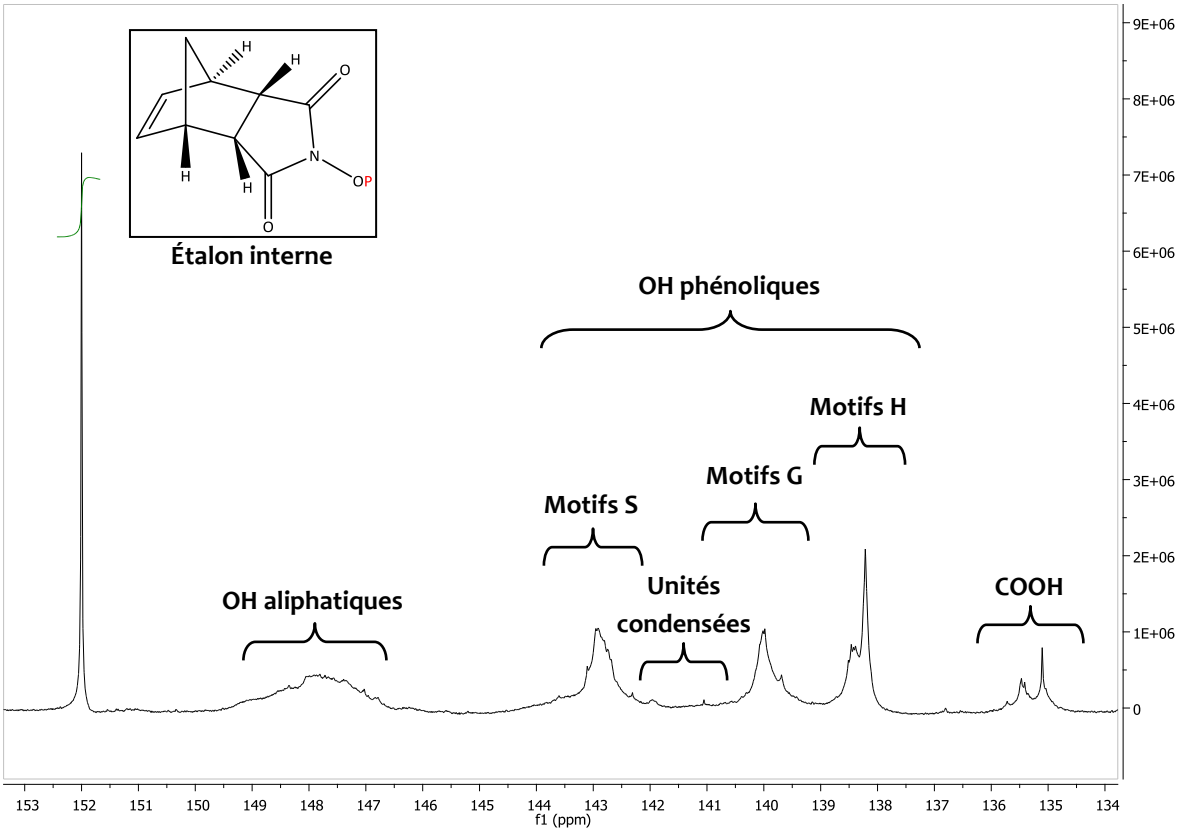


Figure 68 : Spectre RMN ^{31}P de la lignine organosolv lot 1.

RMN 2D-HSQC

La lignine organosolv lot 1 a également été analysée en spectroscopie RMN 2D-HSQC dans le DMSO-d_6. Lors de cette analyse, les signaux des protons ^{1}H sont corrélés avec ceux des carbones ^{13}C qui les portent. L'étude de la région des protons aliphatiques (Figure 69) donne des informations sur le type de liaisons présentes dans la lignine. Dans la région aromatique (Figure 70), les signaux attendus des différentes unités de la lignine sont observés.

Les attributions des signaux des spectres du lot 1 ont été faites en comparaison avec les résultats présentés dans la littérature[5,6]. L'échantillon possède des liaisons typiquement observées dans ce type de lignine : β-O-4', β-β', et β-5'. L'analyse HSQC n'étant pas quantitative, il n'est pas possible d'estimer en quelles proportions sont présentes ces liaisons. Les résultats présentés en Figure 70 confirment ceux de la RMN du phosphore : les trois unités S, G, et H sont représentées dans la lignine organosolv lot 1.

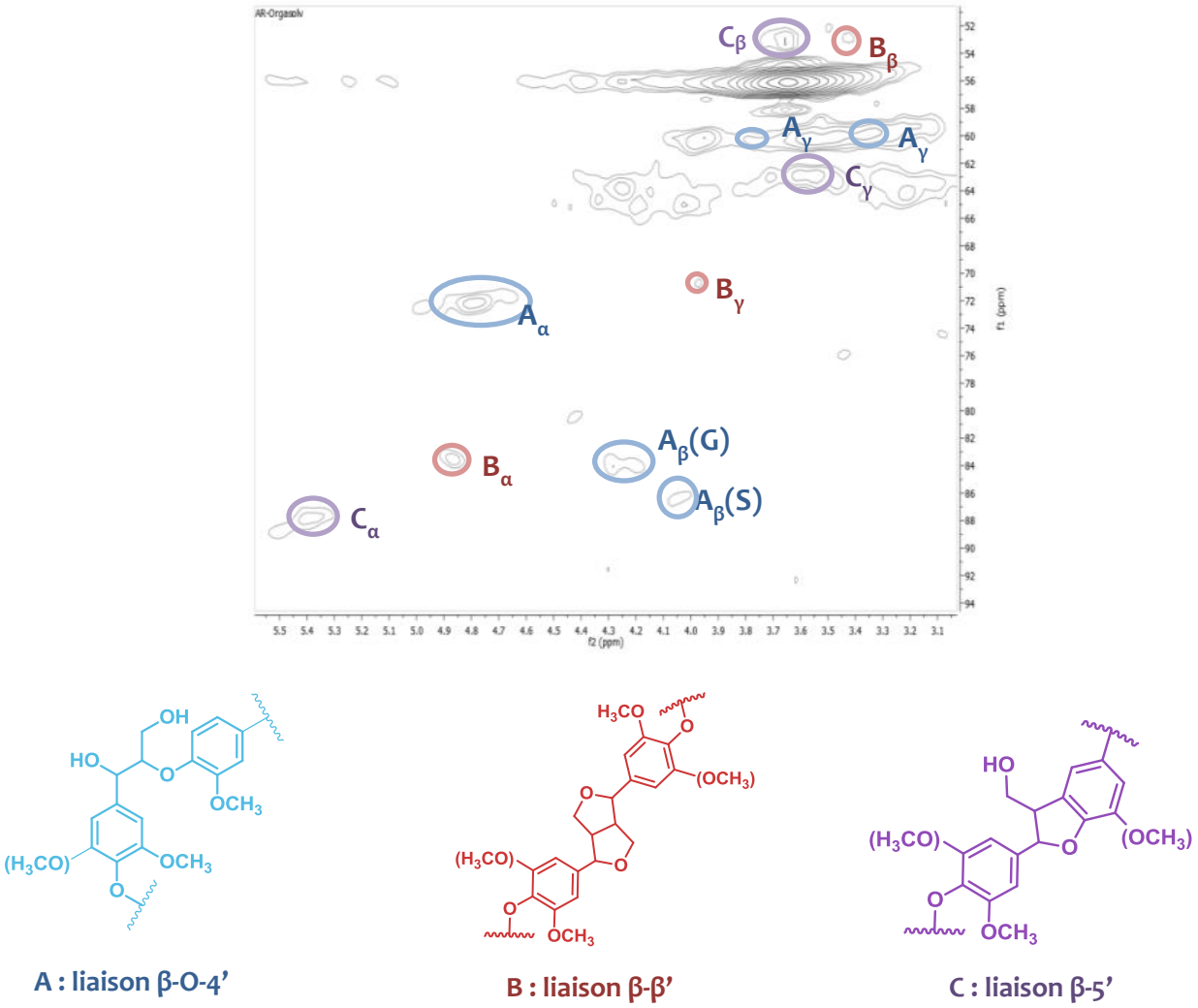


Figure 69 : Spectre HSQC de la lignine organosolv lot 1. Région aliphatique.

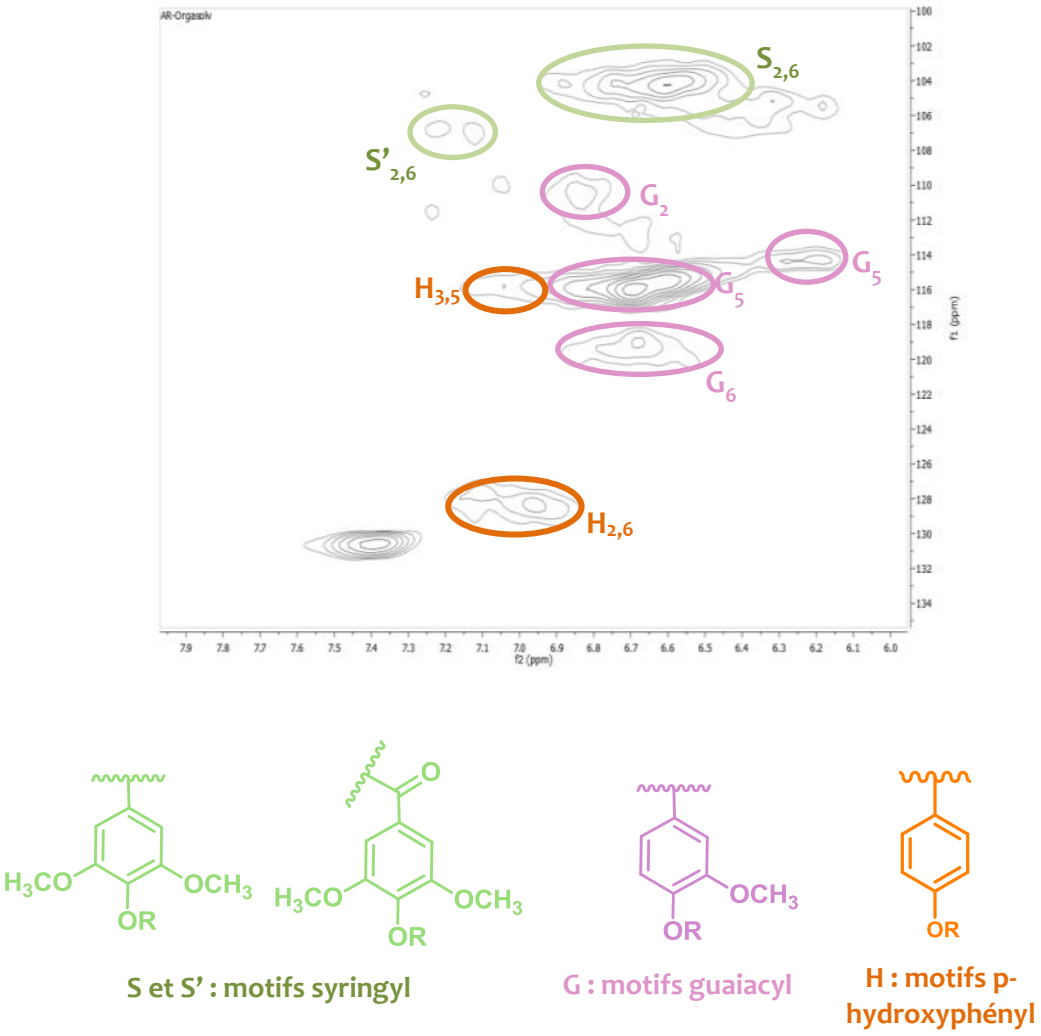


Figure 70 : Spectre HSQC de la lignine organosolv lot 1. Région aromatique.

II. Oxydation de la lignine par le système laccase-médiateur

II.1. Mise en place des conditions réactionnelles

L'ensemble des résultats discutés dans la partie A ont été pris en compte pour établir les paramètres de la réaction d'oxydation de la lignine organosolv lot 1 par la laccase de *Trametes versicolor*. Dans les conditions de référence, 40 mg de lignine sont oxydés dans 20 mL de tampon acétate à pH 4,5 contenant 25 %(v/v) de co-solvant, 0,02 mmole de médiateur et 40 U de laccase (selon la méthode ABTS). Avant de démarrer la réaction, la solution est saturée en oxygène. Les expériences sont conduites à 30°C dans une enceinte climatique associée à un agitateur orbital. L'évolution de la masse molaire des échantillons a été suivie par chromatographie d'exclusion stérique dans les conditions déjà décrites dans le paragraphe précédent.

Parmi les co-solvants organiques étudiés dans la partie A, l'acétone était le plus compatible avec la laccase et a été sélectionnée en premier lieu comme co-solvant pour les réactions d'oxydation de la lignine. Malheureusement, la présence d'acétone dans les échantillons perturbait les analyses en chromatographie d'exclusion stérique et un pic avec un fort coefficient de réponse était observé. L'origine de ce pic n'a pu être expliquée et ce phénomène n'a été constaté qu'en présence d'acétone. Pour la suite des travaux, le dioxane a été systématiquement employé comme co-solvant.

Il est peu probable que la seule action de la laccase ou du système laccase-médiateur conduise à une dépolymérisation significative de la lignine. En effet, dans la nature, les champignons de pourriture blanche sécrètent un cocktail d'enzymes agissant simultanément ou en cascade afin de détruire la lignine[7,8]. Aussi, la réaction d'oxydation de la lignine par le LMS sera suivie d'un second traitement visant à rompre les liaisons fragilisées par l'oxydation (Figure 71). Cette stratégie a déjà été discutée dans le chapitre bibliographique (§ III.2.2.). Lors de la seconde réaction, la lignine est traitée au peroxyde d'hydrogène en conditions basiques selon une réaction de type Dakin (Figure 72).

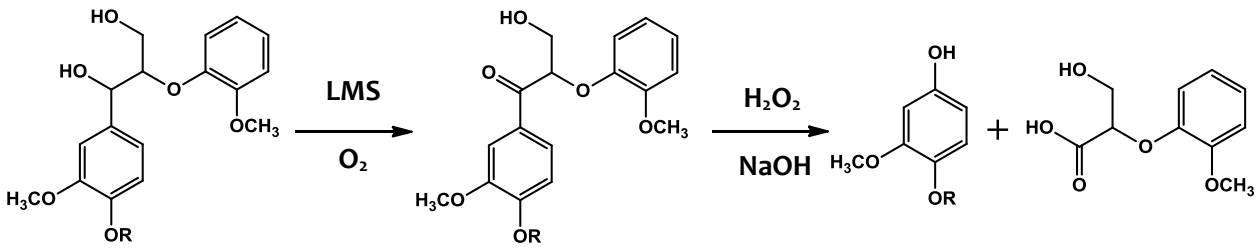


Figure 71 : Stratégie vers la dépolymérisation de la lignine.

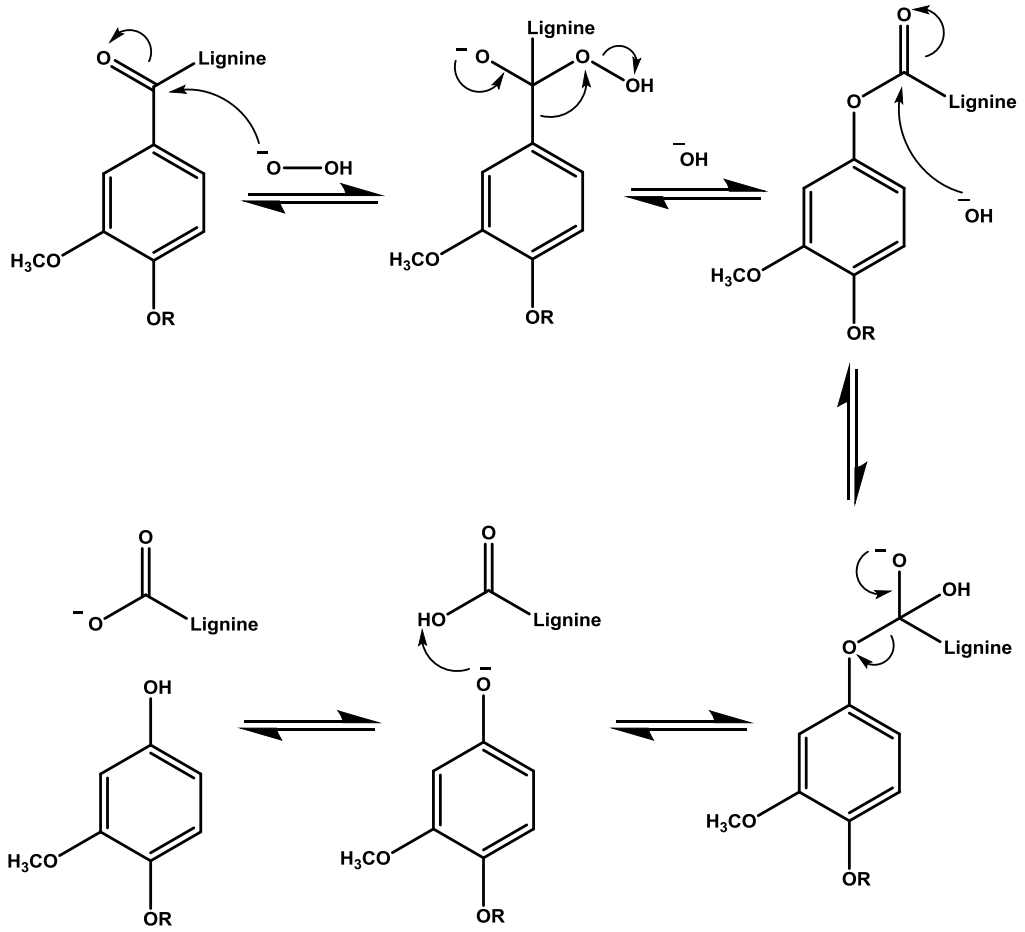


Figure 72 : Mécanisme d'oxydation de la lignine par la réaction de Dakin en conditions alcalines.

Avant de procéder à la dépolymérisation de la lignine par le LMS suivie de la réaction de Dakin, des réactions de contrôle ont été réalisées. La lignine organosolv lot 1 a été traitée directement selon le procédé de Dakin, sans oxydation préalable par la laccase. La Figure 73 présente le chromatogramme SEC de la lignine issue de cette réaction. Un profil bimodal est obtenu. Une partie de la lignine est dépolymérisée par le traitement Dakin. Cette population sensible au peroxyde d'hydrogène correspond aux parties possédant déjà des fonctions carbonyles, fonctions auparavant mises en évidence par l'analyse IR-TF de la lignine.

Une seconde réaction de contrôle a montré le caractère indispensable du co-solvant. Lorsque la réaction d'oxydation est conduite dans le tampon seul, les profils SEC de la lignine avant et après le traitement sont identiques et la majorité de la lignine est insoluble.

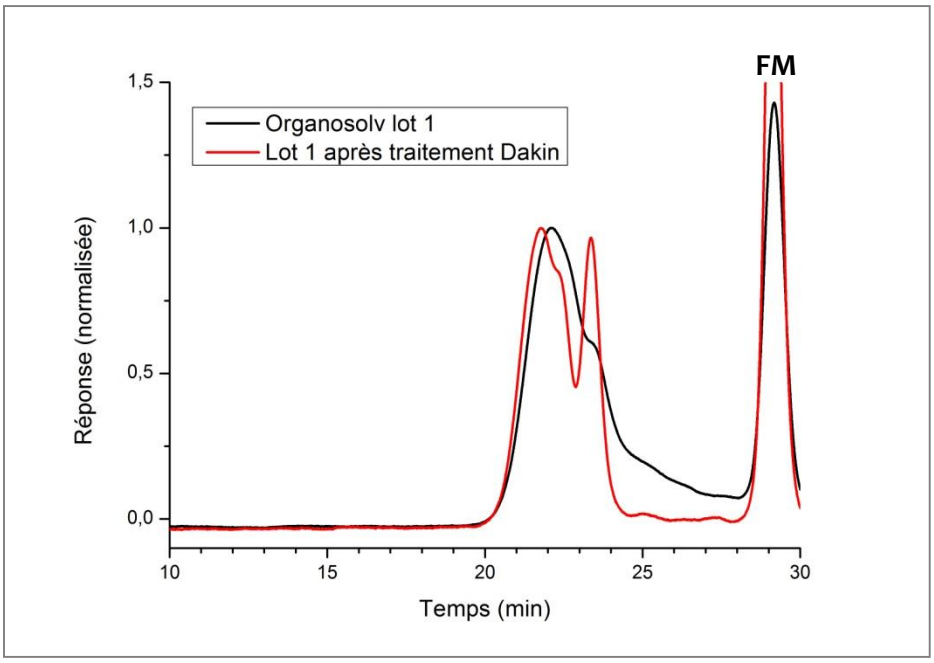


Figure 73 : Chromatogramme SEC de la lignine organosolv lot 1 après traitement Dakin.

II.2. Comparaison de plusieurs systèmes laccase-médiateur

La laccase a été associée à trois médiateurs différents pour l'oxydation de la lignine du lot 1 selon les conditions de référence présentées précédemment. Les médiateurs sélectionnés sont ceux pour qui les meilleurs résultats ont été obtenus dans la partie A : l'ABTS, l'HOBt et le méthyle syringate. La Figure 74 compare les chromatogrammes SEC de la lignine après cinq jours de réaction pour ces trois expériences.

Quel que soit le médiateur, l'oxydation de la lignine par le LMS promeut essentiellement des réactions de couplage dans les conditions employées. Les profils SEC des lignines issues des réactions impliquant les systèmes laccase-HOBt et laccase-ABTS sont identiques. L'augmentation de la masse molaire de la lignine est plus importante avec ces deux médiateurs synthétiques que lorsque le méthyle syringate est utilisé, ce qui est en accord avec les résultats décrits dans la partie A.

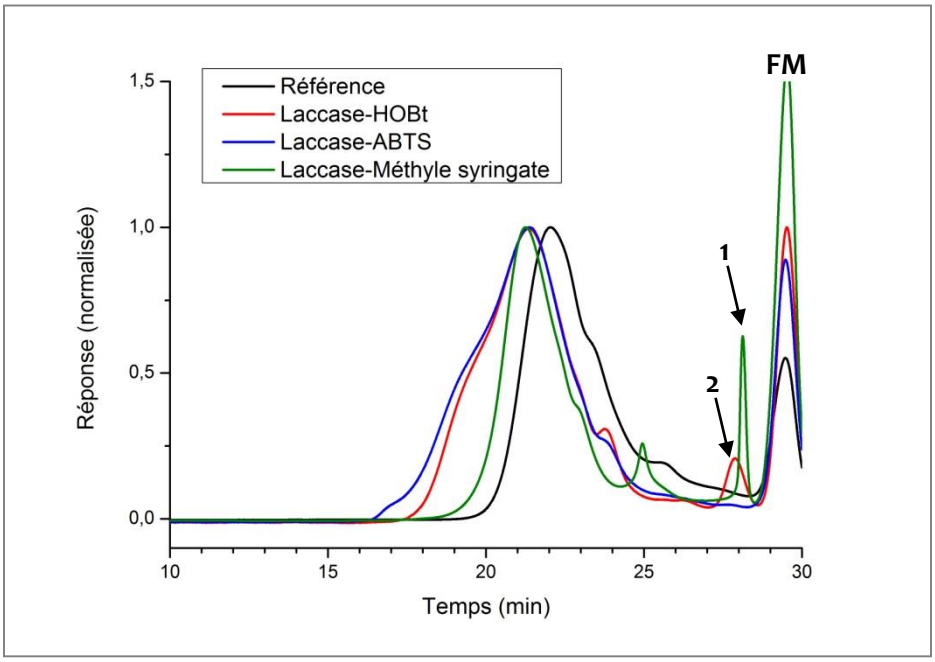


Figure 74 : Chromatogramme SEC des lignines après cinq jours d'oxydation par différents LMS. 1 : méthyle syringate. 2 : HOBt.

Chacune des lignines oxydées par les LMS ont par la suite été traitées au peroxyde d'hydrogène en conditions alcalines. Dans les trois cas, on retrouve les deux populations présentes dans la réaction de contrôle (à RT 21 et 24 minutes), mais les proportions de chaque population diffèrent selon le médiateur employé. Il semblerait qu'il existe une corrélation entre l'efficacité des médiateurs mise en évidence dans la partie A et la quantité de population de plus faible masse générée (Figure 75). En effet, la proportion d'espèce observée à RT 24 minutes augmente dans le sens méthyle syringate < ABTS < HOBt, ce qui correspond au classement effectué lors de l'étude de l'oxydation de modèles de lignine.

Pour le système laccase-HOBt (en rouge), la population de plus faible masse molaire est présente en quantité supérieure comparée aux autres systèmes. L'HOBt semble être ainsi le plus efficace des médiateurs testés, bien qu'aucune des techniques ne permettent une dépolymérisation suffisamment marquée de la lignine.

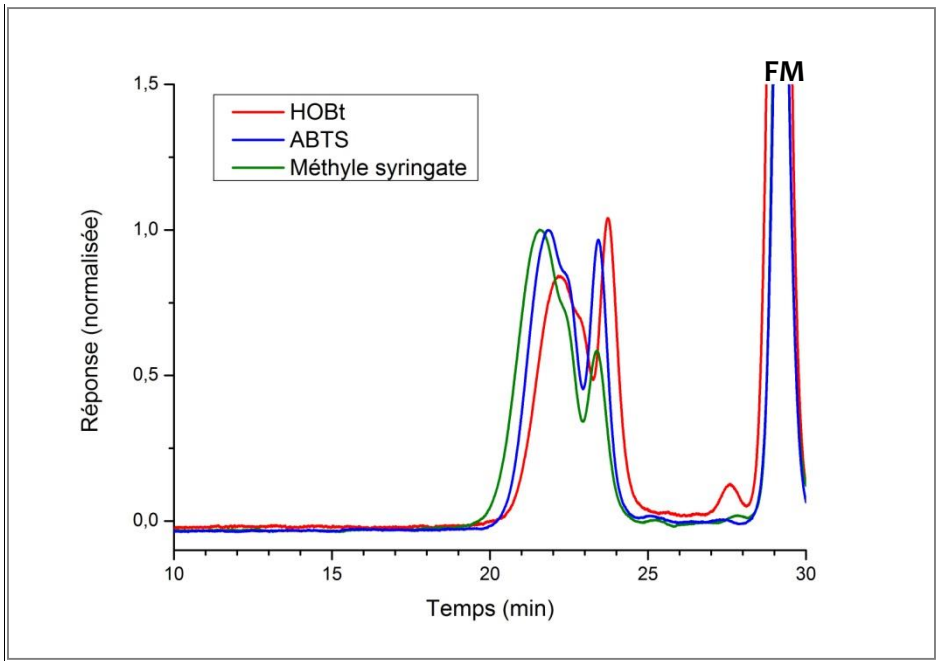


Figure 75 : Chromatogramme SEC de la lignine oxydée pendant 5 jours par le système laccase-HOBT, puis traitée au peroxyde d'hydrogène.

II.3. Association de médiateurs

En partie A (chapitre 2, §I.3.), l'effet synergique issu de l'association de deux médiateurs a été démontré pour deux systèmes : ABTS/HOBt et ABTS/méthyle syringate. Ces deux couples ont donc été utilisés comme médiateurs de la laccase pour l'oxydation de la lignine organosolv. Les lignines ainsi oxydées ont été traitées par le procédé de Dakin selon la stratégie mise en place. L'évolution des profils SEC de la lignine est présentée en Figure 76 pour le système ABTS/HOBt et en Figure 78 pour le système ABTS/méthyle syringate.

Comme dans le cas où les médiateurs seuls ont été utilisés, l'oxydation par des LMS associant deux médiateurs entrainent une forte augmentation de la masse molaire de la lignine. Des différences notables sont observées après le traitement au peroxyde d'hydrogène. Pour la première fois, une population de faible masse molaire apparait après la réaction associant la laccase et le couple ABTS/HOBt (Figure 76). Le temps de rétention de cette population se situe hors des limites de calibration de la SEC, il n'est donc pas possible d'estimer précisément sa masse molaire, mais on peut supposer qu'elle est probablement inférieure à 900 g/mol. Bien que cette population soit minoritaire, c'est un résultat encourageant : il montre que ce LMS induit simultanément des réactions de couplage et des réactions d'oxydation des fonctions hydroxyle en position α. La Figure 77 compare les résultats obtenus avec les médiateurs seuls et en association. La population de faible masse molaire à RT 25 minutes n'apparait que dans le cas où les deux médiateurs sont associés, ce qui confirme qu'un phénomène de synergie existe entre l'ABTS et l'HOBt.

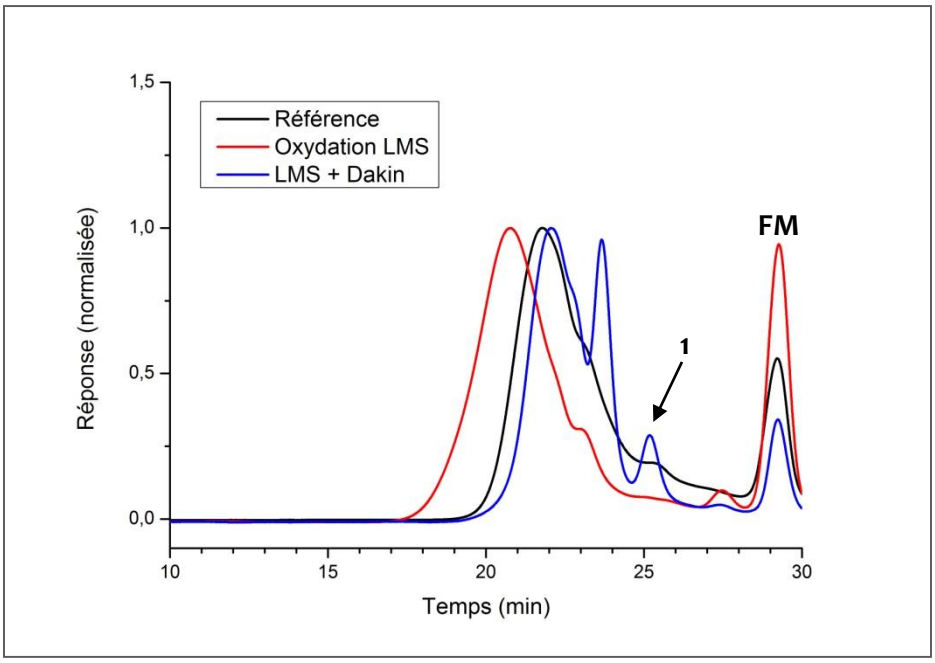


Figure 76: Chromatogrammes SEC de la lignine oxydée pendant 5 jours par la laccase associée au couple ABTS / HOBt (en rouge), puis traitée au peroxyde d'hydrogène (en bleu). 1 : Population de faible masse molaire.

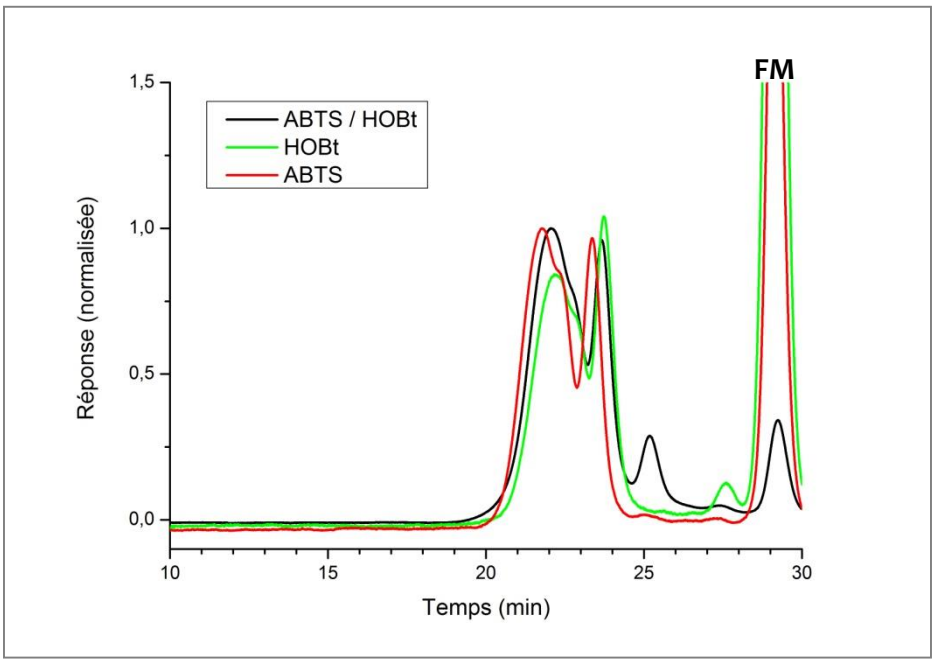


Figure 77 : Chromatogrammes SEC des lignines issues du traitement LMS suivi de Dakin. L'influence de l'association de l'ABTS et du HOBt est illustrée.

Après oxydation de la lignine par la laccase associée au couple ABTS/méthyle syringate et traitement de type Dakin, un profil SEC bimodal est obtenu (Figure 78). Ce profil semble contenir les mêmes populations que celui de la réaction de contrôle, mais pas dans les mêmes proportions. Ici la population de plus faible masse molaire est nettement majoritaire. Ceci nous permet de supposer que la réaction de la lignine avec ce LMS induit également des réactions d'oxydation des hydroxyles en position α. Là encore, l'effet synergique entre les deux médiateurs est clairement observable lorsqu'on compare les résultats obtenus lorsque les médiateurs sont utilisés seuls avec ceux où l'ABTS et le méthyle syringate sont associés (Figure 79).

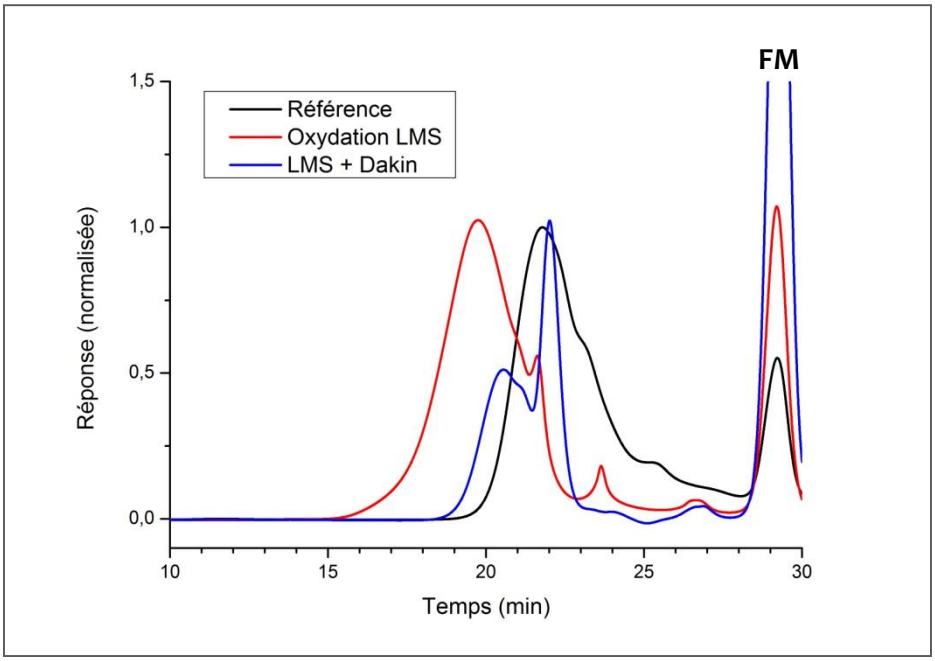


Figure 78 : Chromatogrammes SEC de la lignine oxydée pendant 5 jours par la laccase associée au couple ABTS / méthyle syringate (en rouge), puis traitée au peroxyde d'hydrogène (en bleu).

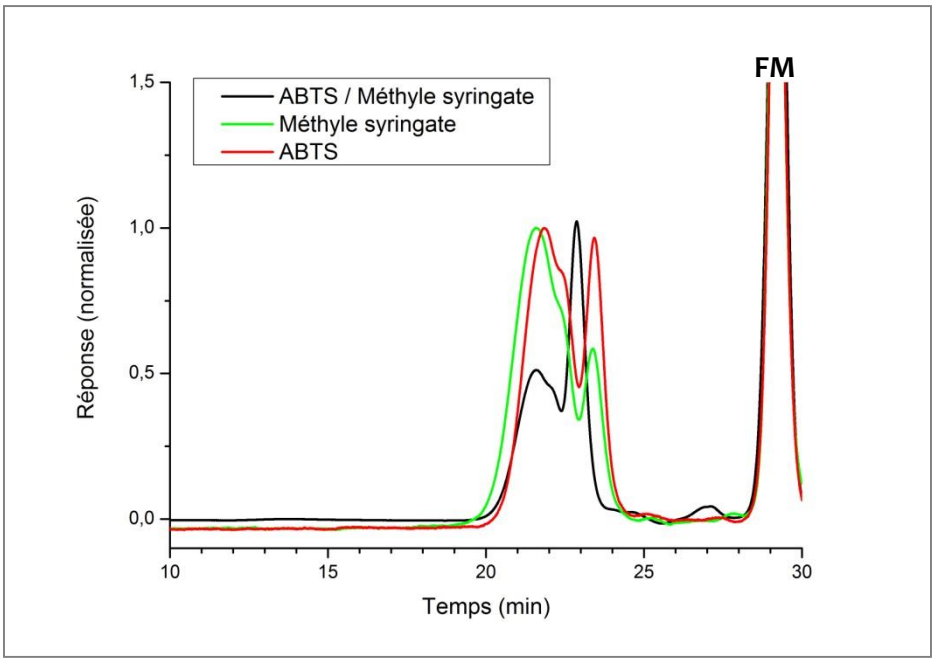


Figure 79 : Chromatogrammes SEC des lignines issues du traitement LMS suivi de Dakin. L'influence de l'association de l'ABTS et le méthyle syringate est illustrée.

Les traitements LMS et Dakin successifs augmentent considérablement la solubilité de la lignine non dépolymérisée. La séparation de la lignine des molécules issues de la dépolymérisation par extraction liquide-liquide est alors très délicate. Il n'a donc pas été possible d'analyser plus en détails les produits formés lors de ces réactions. Les populations de faibles masses molaires obtenues étant largement minoritaires, nos efforts se sont tournés vers l'amélioration du procédé en vue d'une dépolymérisation plus extensive de la lignine.

III. Limitation des réactions de couplage

Dans les conditions employées jusqu'à présent, l'oxydation de la lignine par le système laccase-médiateur engendre principalement des réactions de condensation. Il est indispensable de limiter au maximum ces réactions afin de pouvoir générer des molécules de faibles masses molaires à partir de la lignine. Deux stratégies ont été explorées dans cette optique.

III.1. Blocage des hydroxyles phénoliques

Il est clairement établi que les OH de type phénoliques de la lignine sont responsables des réactions de couplage observés lors de l'oxydation du biopolymère. Le blocage de ces fonctions pourraient permettre de limiter les phénomènes de condensation et de dépolymériser la lignine, tel que décrit dans un brevet déposé par le CNRS[9]. Une réaction de méthylation a été conduite sur la lignine organosolv lot 1 afin de bloquer sélectivement ses hydroxyles phénoliques. Pour cela, la lignine est dissoute dans l'eau alcaline et le diméthyle de sulfate est utilisé comme agent alkylant[10]. La lignine méthylée (lignine-Me) ainsi synthétisée a été oxydée par le LMS (laccase-ABTS) puis traitée au peroxyde d'hydrogène selon la stratégie déjà présentée.

Cette expérience confirme l'implication des OH phénoliques dans les réactions de condensation de la lignine. L'oxydation de la lignine-Me par le LMS n'engendre aucune espèce de fortes masses molaires, contrairement à ce qui était observé avec la lignine non modifiée. À l'inverse, la masse molaire de la lignine-Me diminue dès le traitement LMS (Figure 80). Cette dépolymérisation est accompagnée d'une nette diminution de la dispersité de la lignine-Me.

Le traitement de Dakin appliqué successivement au procédé LMS dépolymérise un peu plus la lignine-Me. Cette dépolymérisation n'est cependant pas suffisamment efficace pour obtenir des molécules de très faibles masses molaires telles que celles ciblées dans ce travail. Par ailleurs, la méthylation de la lignine diminue fortement sa solubilité dans le système de solvant employé. La lignine-Me est ainsi majoritairement dispersée plutôt que solubilisée dans les réactions présentées.

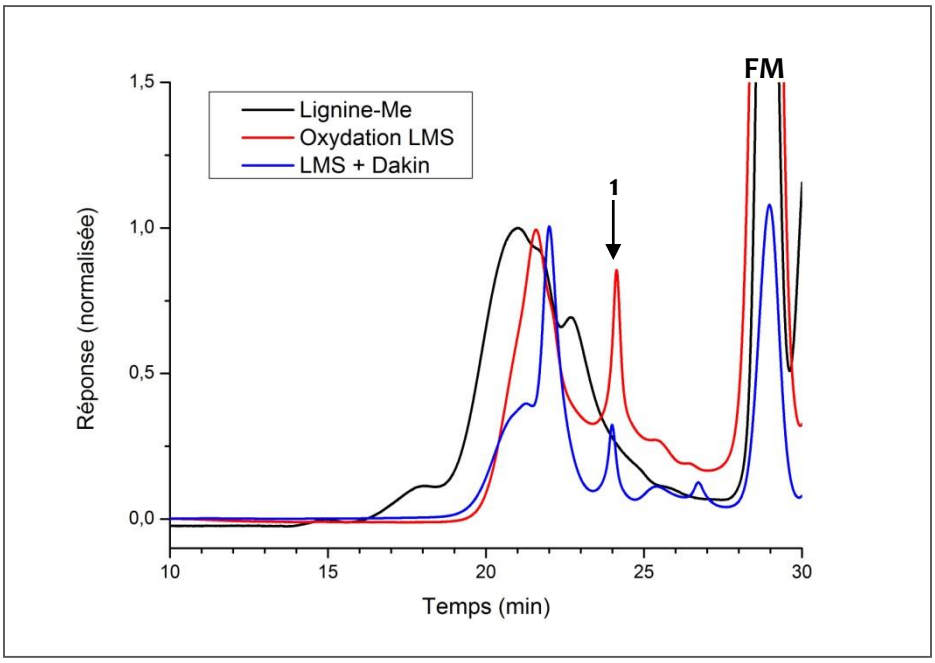


Figure 80 : Chromatogrammes SEC de la lignine méthylée oxydée pendant 5 jours par le système laccase-ABTS (en rouge), puis traitée au peroxyde d'hydrogène (en bleu). 1 : Pic parasite présent dès le départ de la réaction.

III.2. Utilisation de pièges à radicaux

Les phénomènes de condensation observés lors de l'oxydation de la lignine sont dus au couplage d'espèces radicalaires libres formées en cours de réaction. L'utilisation de pièges à radicaux pourrait limiter ces réactions de couplage. Dans ce travail, deux molécules ont été étudiées pour leur capacité à piéger les radicaux phénoliques pendant la réaction d'oxydation de la lignine organosolv par le système laccase-ABTS. Ces deux pièges à radicaux sont l'isopropanol et la N-acétylcystéine (NAC) :

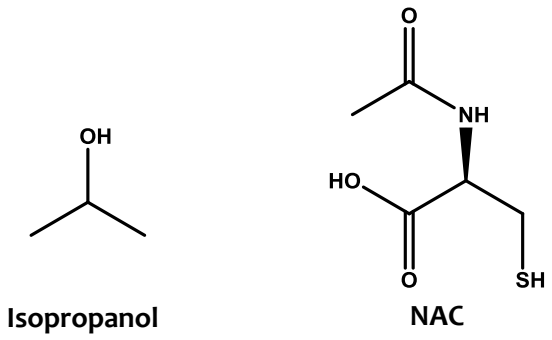


Figure 81 : Molécules utilisées comme piège à radicaux.

Lors du procédé d'oxydation par les radicaux OH, l'isopropanol est converti en acétone. Cette aptitude à capter les radicaux OH a notamment été utilisée pour montrer l'implication de ces radicaux en photocatalyse[11]. Par ailleurs, il a été montré que ce solvant organique n'affectait pas l'activité de la laccase jusqu'à une concentration volumique de 10 %[12]. La NAC est principalement utilisé dans l'industrie pharmaceutique, sa fonction thiol en faisant un antioxydant efficace[13].

Dans les deux cas, la présence d'un piège à radical semble inhiber totalement l'action du LMS sur la lignine. En effet, aucune variation du profil SEC de la lignine n'est observée pendant cinq jours de réaction. Le traitement de type Dakin effectué ensuite conduit au même résultat que celui de la réaction de contrôle, confirmant l'incapacité de la laccase à oxyder la lignine en présence de pièges radicalaires.

IV. Conclusion

Une stratégie en deux étapes a été mises au point pour la dépolymérisation d'une lignine organosolv issue de plantes annuelles. La lignine est tout d'abord oxydée par le système laccase-médiateur, puis traitée au peroxyde d'hydrogène en conditions alcalines selon un procédé de type Dakin. Cette stratégie s'est montrée inefficace lorsque la laccase était associée à un seul médiateur : les différents systèmes testés induisaient essentiellement des réactions de couplage conduisant à une augmentation de la masse molaire de la lignine. L'utilisation de couples de médiateurs au lieu de médiateurs seuls a montré des résultats intéressants. Pour la première fois, une population de masse molaire proche de celles visées (probablement inférieures à 900 g/mol) a été obtenue après les deux étapes de réaction lorsque le couple ABTS/HOBt a été associé à la laccase. Cependant, cette population est largement minoritaire par rapport aux populations de plus fortes masses molaires et n'a pu être isolée en raison de la trop forte solubilité de la lignine après traitement.

Le blocage sélectif des fonctions OH phénoliques de la lignine a confirmé leur implication dans les phénomènes de condensation que l'on cherche à éviter. Les traitements LMS et Dakin successifs sur la lignine méthylée conduisent à la dépolymérisation de la lignine sans formation d'espèces de fortes masses molaires. Cette dépolymérisation n'est cependant pas assez extensive pour obtenir des molécules de tailles suffisamment faibles. L'utilisation de pièges radicalaires pour limiter les réactions de couplage inhibe totalement l'activité du LMS.

Ces résultats nous montrent que la limitation des réactions de couplage est la clé pour la dépolymérisation de la lignine. Les conditions réactionnelles doivent être repensées afin de s'affranchir de ces phénomènes de condensation. Une nouvelle stratégie a été mise au point dans cette optique. Ces travaux sont décrits dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 : Oxydation enzymatique en milieu biphasique

I. Nouvelle stratégie pour la dépolymérisation de la lignine

Les mécanismes par lesquels les champignons de pourriture blanche parviennent à dégrader la lignine sont complexes et encore mal compris. La plupart de ces champignons utilisent un mélange de laccase et de peroxydases. Dans ces systèmes, les laccases oxydent les parties phénoliques de la lignine alors que les peroxydases peuvent également traiter les OH benzyliques. Chez certaines espèces cependant, on note l'absence d'enzymes de type peroxydase. Dans ces cas-là, il a été proposé que la laccase puisse rompre les liaisons les plus faibles et les plus accessibles de la lignine afin de libérer des molécules de faibles masses molaires pouvant servir de médiateurs. Ces médiateurs peuvent alors oxyder les fonctions réfractaires à la laccase.

Dans le cas de notre oxydation par le LMS, il est très probable que des espèces de faibles masses soient également libérées au cours de la réaction. Cependant, rien ne permet de penser que ces espèces formeront des radicaux suffisamment stables pour agir comme médiateur. Au contraire, ces petites molécules hautement mobiles pourraient être impliquées dans des réactions de couplage radicalaire. Ceci expliquerait l'augmentation de masse molaire de la lignine constatée lors des réactions de type LMS.

La nouvelle stratégie étudiée lors de ce travail vise à extraire du milieu ces molécules de faibles masses molaires avant qu'elles ne soient impliquées dans d'éventuelles réactions de condensation. Pour cela, la réaction d'oxydation de la lignine par le LMS se déroule dans un milieu biphasique selon le schéma présenté en Figure 81. Ici, la phase aqueuse est identique à celle utilisée pour l'oxydation en milieu monophasique : elle contient la lignine, la laccase et son médiateur. La phase organique permet l'extraction des molécules de faibles masses molaires générées dans la phase aqueuse.

Bien que la limitation des réactions de couplage soit l'objectif premier de ce procédé, ce n'est pas son seul intérêt. En effet, les molécules extraites en phase organique pourraient directement être des synthons d'intérêt pour la chimie tels que ceux visés dans cette étude.

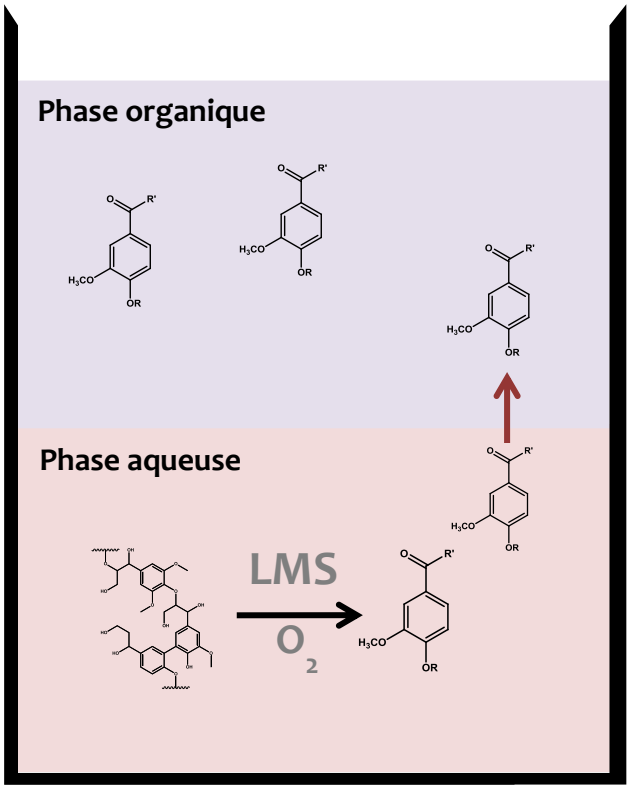


Figure 82 : Stratégie d'oxydation de la lignine par le LMS en milieu biphasique.

II. Choix du solvant organique

Dans cette partie, le choix du solvant d'extraction est crucial. Celui-ci doit remplir plusieurs critères :

- le solvant organique doit être un excellent solvant pour les molécules phénoliques de faibles masses molaires de type vanilline, gaïacol, phénol etc. En effet, il est capital que ces espèces soient extraites du milieu le plus rapidement possible.

- il ne doit pas extraire la lignine, la laccase et le médiateur : ces trois molécules doivent rester en phase aqueuse pour que l'oxydation soit menée à bien. Dans cette optique, l'utilisation de l'ABTS en tant que médiateur est un choix judicieux. En effet, cette molécule est faiblement soluble dans les solvants organiques, notamment sous sa forme cationique.

- sa miscibilité avec la phase aqueuse (tampon acétate contenant 25 % (v/v) de dioxane) doit être la plus faible possible afin ne pas altérer l'activité de la laccase.

Sept solvants ont été testés au cours de cette étude (Figure 83). Ils ont été sélectionnés pour leur faible toxicité et leur disponibilité. Il s'agit principalement d'alcools, de cétones et d'esters faiblement miscibles avec l'eau.

II.1. Capacité d'extraction des solvants : calcul de coefficients de partage.

L'aptitude des sept solvants organiques à extraire des monophénols dérivés de la lignine du mélange tampon acétate/dioxane a été évaluée en utilisant la vanilline comme molécule-cible. Pour cela, elle a été dissoute dans le tampon acétate contenant 25 % (v/v) de dioxane à une concentration de 0,5 mg/mL. Un volume équivalent de solvant organique est ajouté à la solution et l'ensemble est agité à 30°C pendant deux heures. La concentration en vanilline dans chacune des phases est alors évaluée par HPLC. Pour des concentrations faibles en soluté, on définit le coefficient de partage (K) comme le rapport des concentrations en vanilline entre les deux phases à l'équilibre :

$$K = \frac{\text{Concentration en phase organique}}{\text{Concentration en phase aqueuse}}$$

Ainsi, plus la valeur de K est élevée, plus la capacité d'extraction du solvant organique est importante. Les valeurs de K des solvants organiques testés sont regroupées dans le Tableau IX. Trois solvants possèdent des coefficients de partage élevés et pourraient ainsi être étudiés comme solvants d'extraction dans notre système biphasique. Il s'agit de l'acétate d'éthyle (AcOEt), de la méthylisobutyl cétone (MIBC), et de la 4-phényl-2-butanone. Ce dernier solvant possède une température d'ébullition élevée qui pourrait causer des difficultés pour l'isolation des molécules extraites. Son coefficient de partage n'étant pas meilleur que ceux de l'AcOEt et de la MIBC, il n'a pas été sélectionné pour la suite de cette étude. Ainsi, seuls l'AcOEt et la MIBC ont été utilisés.

Tableau IX : Coefficients de partage de divers solvants organiques. La phase aqueuse est constituée de 75 % (v/v) de tampon acétate et de 25 % (v/v) de dioxane.

Solvant	1-undécanol	1-octanol	3-octanol	Alcool benzylique	4-phényl-2-butanone	MIBC	AcOEt
$\mathbf{K_{vanilline}}$	0,7	1	1	0,5	16	20	24

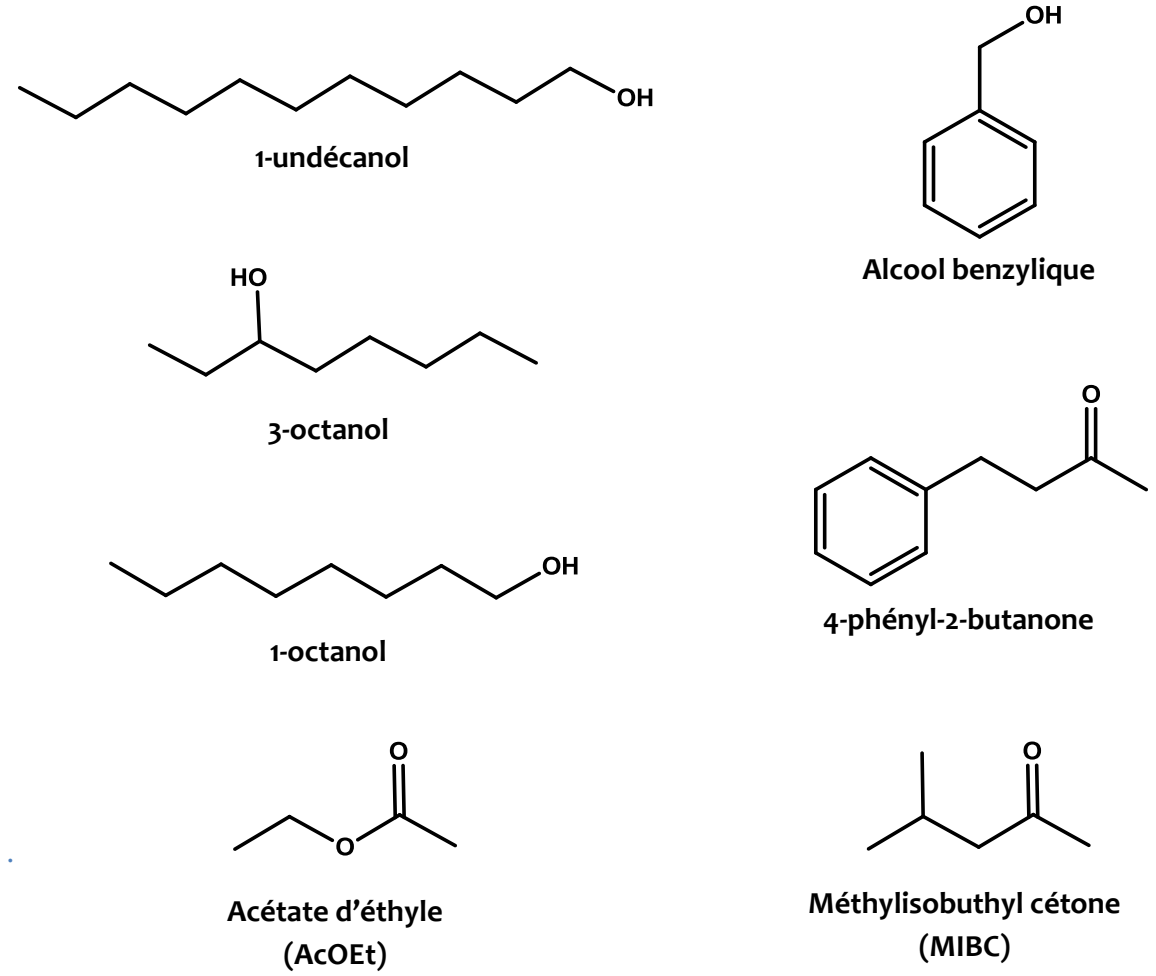


Figure 83 : Solvants organiques étudiés pour l'extraction de la vanilline dissoute en phase aqueuse.

II.2. Activité de la laccase en présence des solvants d'extraction

Bien que la réaction d'oxydation de la lignine par le LMS soit conduite dans un milieu biphasique, une partie du solvant d'extraction est toujours miscible au mélange tampon/dioxane. À titre d'exemple, la solubilité de l'AcOEt est de 8,7 g/100 mL dans l'eau à température ambiante ; celle de la MIBC est égale à 1,9 g/100 mL. La présence de ces solvants organiques en phase aqueuse peut altérer l'activité de la laccase. Ainsi, les travaux présentés dans ce paragraphe visent à évaluer l'impact de la présence de l'AcOEt et de la MIBC sur l'activité de la laccase de *Trametes versicolor*. Pour cela, l'activité de la laccase a été déterminée selon la méthode ABTS dans un tampon acétate contenant 25 % (v/v) de dioxane et saturé en solvant organique. Les résultats sont comparés à ceux obtenus dans le tampon seul et dans le mélange tampon/dioxane non saturé ; ils sont illustrés en Figure 84 pour l'AcOEt et en Figure 85 pour la MIBC.

La présence de l'acétate d'éthyle dans le mélange tampon/dioxane entraine une baisse d'activité de la laccase de 30 % par rapport au mélange non saturé. Par ailleurs une conversion 20 % plus faible est atteinte en fin de réaction lorsque le milieu est saturé en AcOEt. Ce solvant organique a donc un impact significatif sur le fonctionnement de l'enzyme. L'activité de la laccase reste cependant suffisamment élevée pour procéder à l'oxydation de la lignine par le LMS.

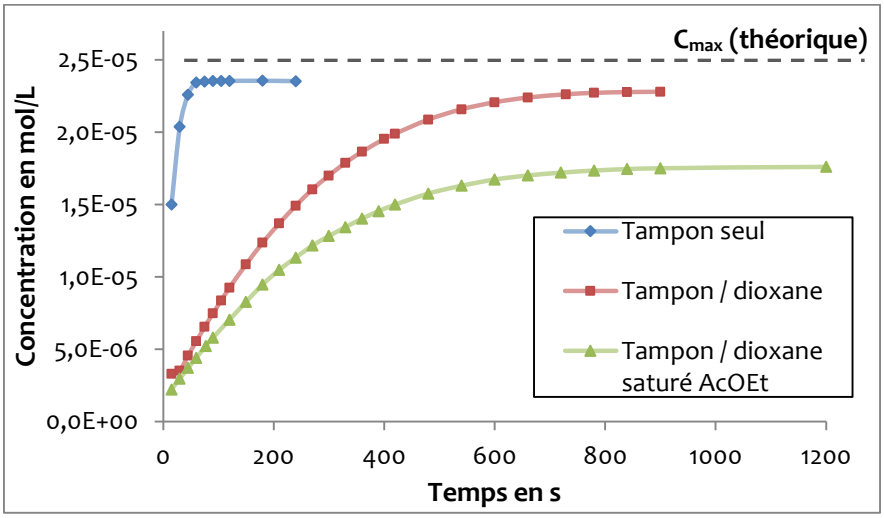


Figure 84 : Suivi de l'oxydation de l'ABTS par la laccase dans plusieurs systèmes de solvants. L'influence du dioxane et de l'AcOEt sur l'activité enzymatique est évaluée.

Tableau X : Valeurs caractéristiques issues de l'oxydation de l'ABTS par la laccase dans plusieurs systèmes de solvants.

	Activité (U)	Conversion	Temps au plateau
Tampon seul	0,105	94 %	60 s
Tampon / dioxane	0,011	91 %	800 s
Tampon / dioxane saturé AcOEt	0,008	70 %	800 s

De façon inattendue, de meilleurs résultats sont obtenus dans le mélange tampon/dioxane saturé en MIBC que dans le même système non saturé (activité plus élevée et meilleure conversion). La MIBC semble ainsi être un solvant plus compatible avec la laccase que l'AcOEt. Les structures de ces deux solvants étant proches, il est peu probable que cette différence de comportement soit uniquement due aux interactions entre la laccase et le solvant organique. L'explication réside certainement dans leur différence de miscibilité dans la phase aqueuse : la MIBC étant moins soluble dans l'eau, elle est présente en concentration plus faible que l'AcOEt dans le système tampon/dioxane et altère ainsi moins le fonctionnement de l'enzyme. Par ailleurs, le dioxane possède une miscibilité élevé dans la MIBC. Ainsi, lors du processus de saturation du mélange tampon/dioxane, une partie du dioxane est extraite dans la MIBC et la concentration en dioxane diminue dans la phase aqueuse. Ceci explique les meilleurs résultats obtenus avec le solvant saturé en MIBC.

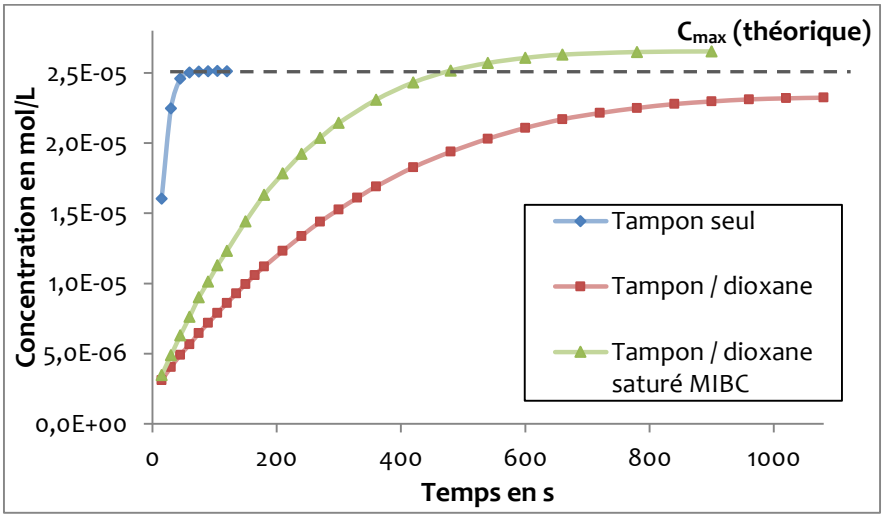


Figure 85 : Suivi de l'oxydation de l'ABTS par la laccase dans plusieurs systèmes de solvants. L'influence du dioxane et de la MIBC sur l'activité enzymatique est évaluée.

Tableau XI : Valeurs caractéristiques issues de l'oxydation de l'ABTS par la laccase dans plusieurs systèmes de solvants.

	Activité	Conversion	Temps au plateau
Tampon seul	0,114	100 %	60 s
Tampon / dioxane	0,010	93 %	900 s
Tampon / dioxane saturé MIBC	0,013	106 %	660 s

L'oxydation de la lignine par le LMS en milieu biphasique est un procédé complexe impliquant de nombreux paramètres. La mesure de l'activité de la laccase dans différents systèmes de solvants donne des informations préliminaires cruciales mais insuffisantes pour prédire le comportement de la laccase lors du procédé LMS complet. Ainsi, bien que la MIBC semble être le solvant d'extraction le plus compatible avec la laccase, l'AcOEt a également été utilisée pour l'oxydation de la lignine en système biphasique par le LMS.

III. Oxydation de la lignine en milieu biphasique

La lignine organosolv lot 1 a été traitée par le procédé LMS en milieu biphasique décrit en début de ce chapitre et schématisé en Figure 82. L'AcOEt et la MIBC ont été employées pour la phase organique.

Les premiers essais effectués se sont montrés infructueux. La même complication a été rencontrée pour les deux solvants d'extraction testés : alors qu'ils étaient destinés à l'extraction de molécules de faibles masses exclusivement, une grande partie de la lignine était également extraite. Le procédé LMS en milieu biphasique ne peut donc pas être directement appliqué à la lignine organosolv. Une première étape de fractionnement de la lignine est nécessaire afin de s'affranchir de la population soluble en phase organique. En pratique, les parties solubles et insolubles en phase organique sont séparées selon une technique d'extraction liquide-solide où la phase organique est renouvelée jusqu'à ce que plus aucune lignine ne soit extraite. Le traitement LMS en milieu biphasique est ensuite appliqué sur la population de lignine insoluble dans le solvant d'extraction.

L'ensemble du procédé de dégradation de la lignine consiste désormais en trois étapes successives : tout d'abord le fractionnement, puis l'oxydation LMS en milieu biphasique et enfin le traitement de type Dakin. Cette stratégie est illustrée en Figure 84. Les résultats de chaque étape seront discutés dans les paragraphes suivants.

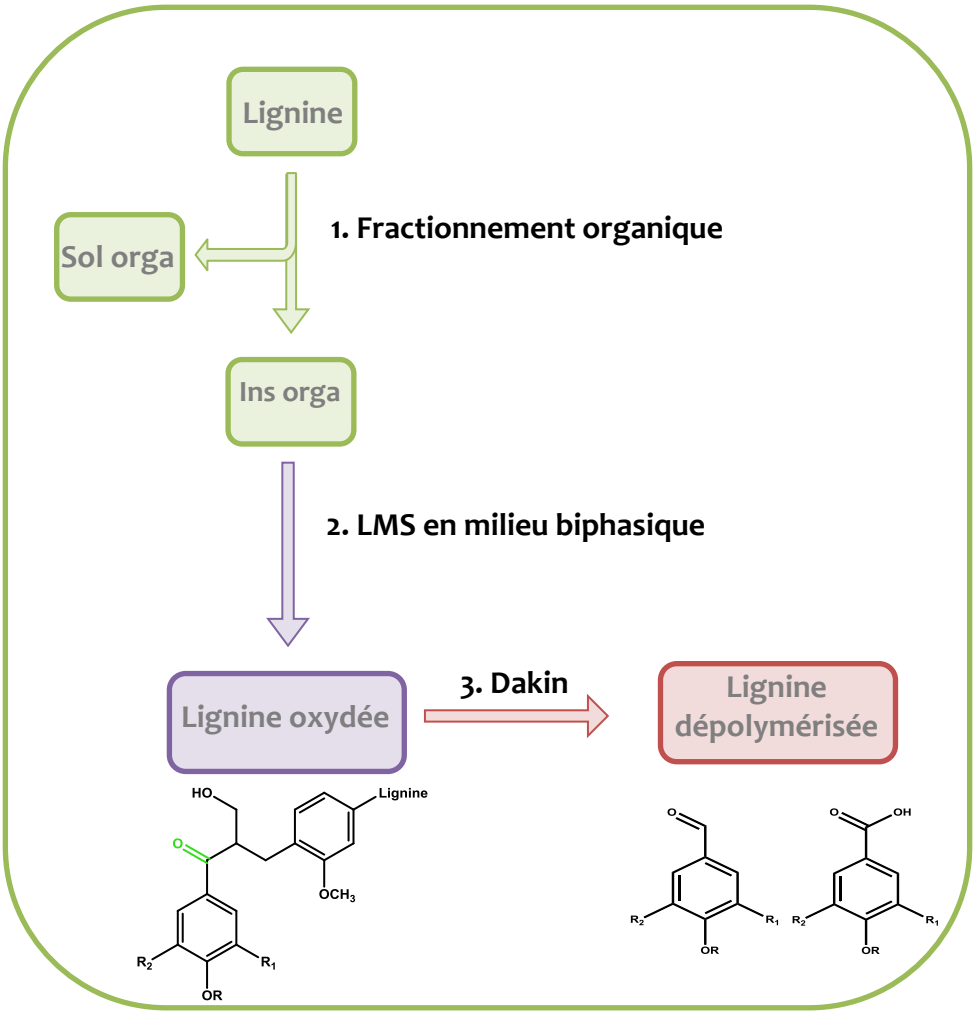


Figure 86 : Procédé de dégradation de la lignine en trois étapes.

III.1 Fractionnement organique de la lignine organosolv

Lors de la première étape du procédé, la lignine est fractionnée en deux populations selon leur solubilité dans les solvants d'extraction utilisés (AcOEt et MIBC). Ces deux populations ont été analysées par chromatographie d'exclusion stérique et par RMN du phosphore (^{31}P). Les résultats sont présentés en Figure 87 et dans le Tableau XII lorsque l'AcOEt est utilisée comme solvant de fractionnement. Les données où la MIBC est employée sont réunies en Figure 88 et dans le Tableau XIII.

Le comportement de la lignine et les caractéristiques des fractions obtenues sont similaires pour les deux solvants étudiés.

Après l'étape de fractionnement, les analyses SEC montrent que les populations de faibles masses molaires présentes dans la lignine sont extraites dans le solvant de fractionnement alors que les populations de masses molaires plus élevées sont insolubles. La fraction soluble dans les solvants organiques représente 60 % de la masse de la lignine initiale contre 40 % pour la partie insoluble quel que soit le solvant utilisé.

Les fractions soluble et insoluble ne diffèrent pas seulement par leurs solubilités et leurs masses molaires, mais aussi par la répartition des différentes fonctions hydroxyle au sein de ces fractions. Les fractions insolubles dans les solvants de fractionnement possèdent une proportion d'OH de type aliphatique deux fois plus élevée que celle de la lignine organosolv d'origine et son taux d'OH phénolique est plus faible. Cet aspect est essentiel, puisque les hydroxyles aliphatiques sont la cible préférentielle pour la stratégie mise en place. Les fonctions hydroxyles des fractions solubles sont distribuées de façon similaire à celle de la lignine avant fractionnement.

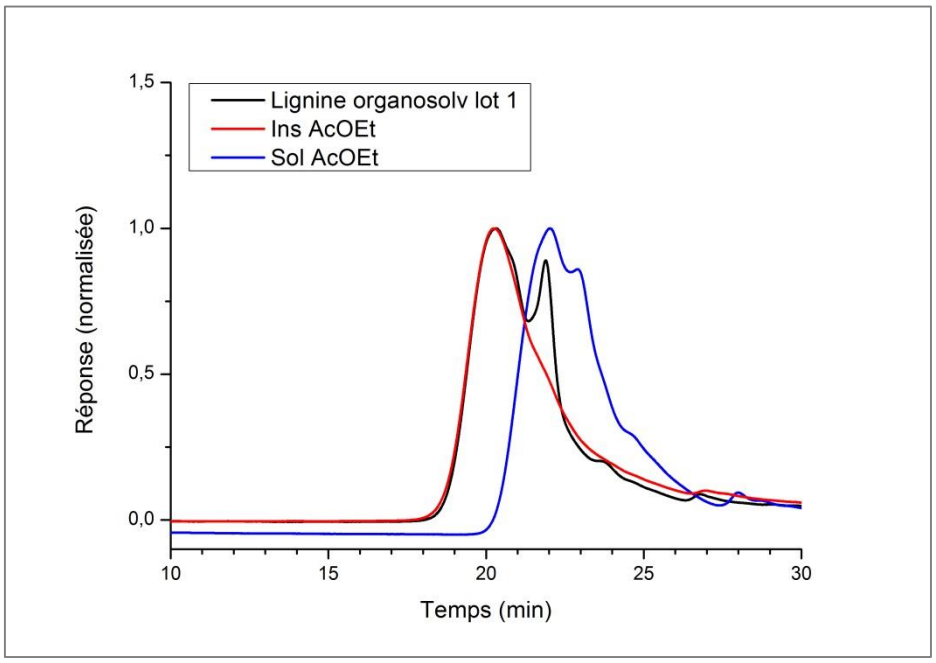


Figure 87 : Chromatogrammes SEC des deux populations issues du fractionnement de la lignine organosolv par l'AcOEt.

Tableau XII: Proportions des différents OH de la lignine organosolv et des deux fractions issues de son fractionnement par l'AcOEt. Les valeurs sont déterminées par RMN ^{31}P.

Types d'OH	Concentration (mmol /g)		
	Lignine organosolv	Sol AcOEt	Ins AcOEt
Aliphatiques	0,89	0,60	1,73
Condensés	0,13	0,10	0,11
S phénoliques	0,96	0,72	0,42
G phénoliques	0,80	0,56	0,34
H phénoliques	0,84	0,57	0,44
COOH	0,29	0,23	0,15

Tableau XIIIII : Proportions des différents OH de la lignine organosolv et des deux fractions issues de son fractionnement par l'AcOEt. Les valeurs sont déterminées par RMN ^{31}P.

Types d'OH	Concentration (mmol /g)		
	Lignine organosolv	Sol MIBC	Ins MIBC
Aliphatiques	0,89	0,58	2,08
Condensés	0,13	0,12	0,17
S phénoliques	0,96	0,84	0,59
G phénoliques	0,80	0,71	0,47
H phénoliques	0,84	0,76	0,58
COOH	0,29	0,26	0,21

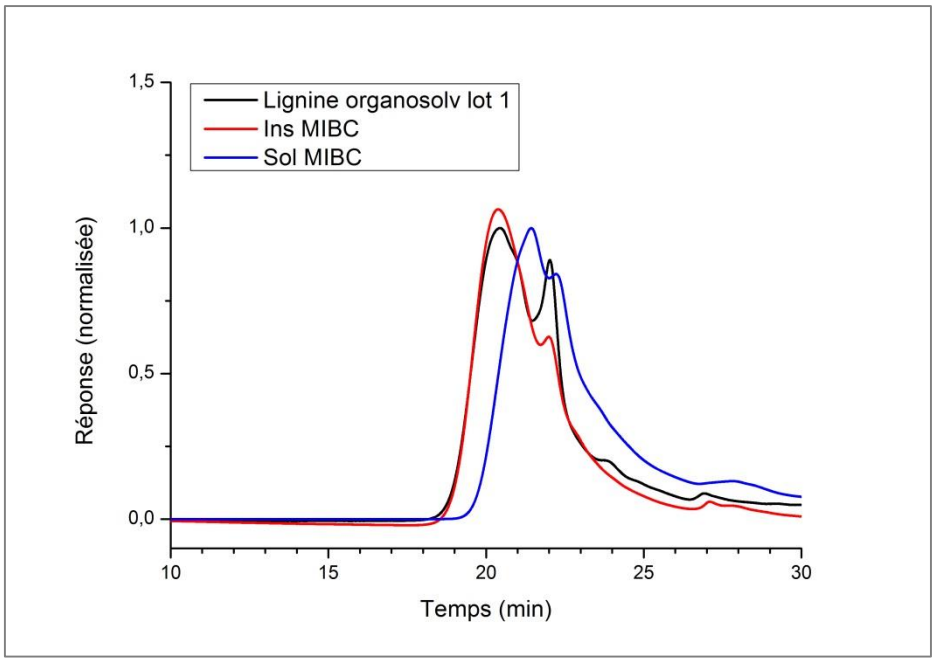


Figure 88 : Chromatogrammes SEC des deux populations issues du fractionnement de la lignine organosolv par la MIBC.

Les fractions insolubles dans les solvants de fractionnement sont séchées à la fin du procédé, puis oxydées par le système laccase-ABTS dans les conditions biphasiques déjà décrites. Lors de cette deuxième étape, le solvant d'extraction utilisé est le même que le solvant de fractionnement employé dans la première étape : l'AcOEt sera le solvant d'extraction pour l'oxydation de la fraction ins AcOEt ; la fraction ins MIBC sera oxydée en présence de la MIBC. Les résultats de la deuxième étape du procédé de dégradation de la lignine organosolv sont discutés dans le prochain paragraphe.

III.2. LMS en milieu biphasique

L'oxydation LMS en milieu biphasique a été conduite sur des fractions de lignine dont les principales caractéristiques sont l'absence de population de faibles masses molaires, le taux élevé de fonctions hydroxyles aliphatiques et la faible proportion d'OH phénoliques. Des échantillons des phases aqueuse et organique sont prélevés au cours du traitement et analysés en SEC. Trois phases sont obtenues en fin de réaction : une phase aqueuse (LMS aq), une phase organique (LMS orga) et une phase insoluble (LMS ins). Ces trois phases sont séparées selon le schéma présenté en Figure 89. La phase insoluble est tout d'abord séparée des deux autres phases par centrifugation. L'enjeu majeur concernant cette phase est de déterminer si les insolubles sont présents dès le départ à cause de la faible solubilité de la lignine ou s'ils sont générés au cours de la réaction. Il est probable que ces deux phénomènes coexistent. Le traitement de la LMS ins sera discuté en premier lieu dans ce paragraphe.

Les phases LMS orga et LMS aq sont ensuite isolées par décantation. La phase LMS orga contient tous les produits extraits par le solvant organique au cours du procédé LMS. On retrouve dans la phase LMS aq la majorité de la lignine oxydée, la laccase et le médiateur.

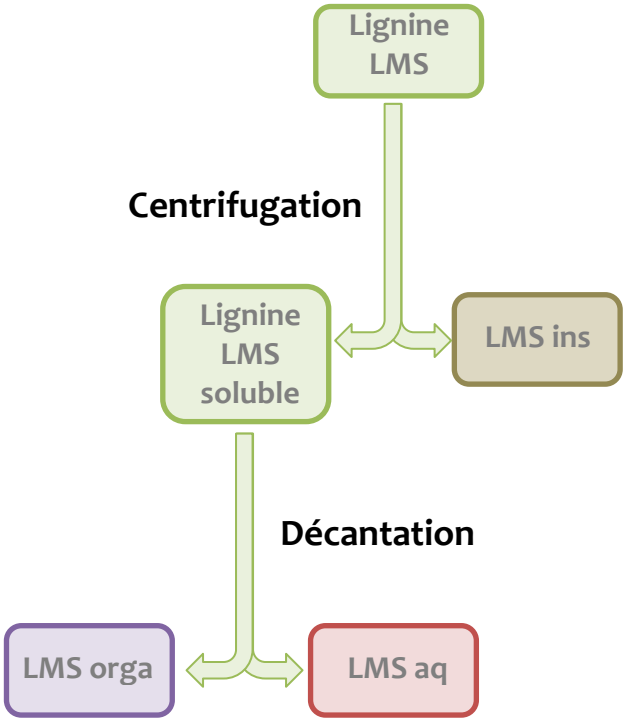


Figure 89 : Séparation des trois phases obtenues après le traitement LMS en conditions biphasiques.

Solvant d'extraction : AcOEt

L'acétate d'éthyle a tout d'abord été utilisé comme solvant d'extraction. Le Tableau XIV donne les rendements massiques des trois phases obtenues après la réaction d'oxydation. Les espèces extraites en phases organiques représentent 5 % de la masse de la fraction de lignine de départ. Les 95 % restant sont répartis entre les phases LMS aq et LMS ins à parts égales.

Tableau XIV: Rendements massiques des trois phases obtenues après traitement LMS biphasique. Solvant d'extraction : AcOEt. * : valeur calculée par différence.

Phases LMS	Rendement massique (%)
LMS aq	48*
LMS orga	5
LMS ins	47

La quantité élevée de lignine insoluble – et donc non oxydée – présente dans le milieu réactionnel est l'élément le plus problématique de ce procédé. Deux phénomènes peuvent expliquer la présence de cette phase insoluble. Tout d'abord, une partie de la lignine n'est pas soluble dès le départ dans la phase aqueuse composée du tampon acétate à pH 4,5 et de 25 % (v/v) de dioxane. L'appauvrissement du milieu en dioxane dû aux échanges entre la phase organique et la phase aqueuse pourrait par ailleurs diminuer la solubilité de la lignine. Ensuite, des réactions de couplage se produisant pendant la réaction peuvent générer des lignines condensées de plus fortes masses molaires et de très faible solubilité. L'analyse SEC de la phase LMS ins semble confirmer la coexistence de ces deux phénomènes (Figure 90). Deux populations sont observées ; une des populations correspond à des lignines de masses molaires plus élevées issues de réactions de condensation. Cette population est assez nettement majoritaire, ce qui indique que notre procédé ne permet pas d'éliminer les réactions de couplage. La seconde population possède un temps d'élution proche de celui de la lignine initiale. Il s'agit probablement d'une population insoluble dès le début de la réaction et non affectée par le traitement LMS.

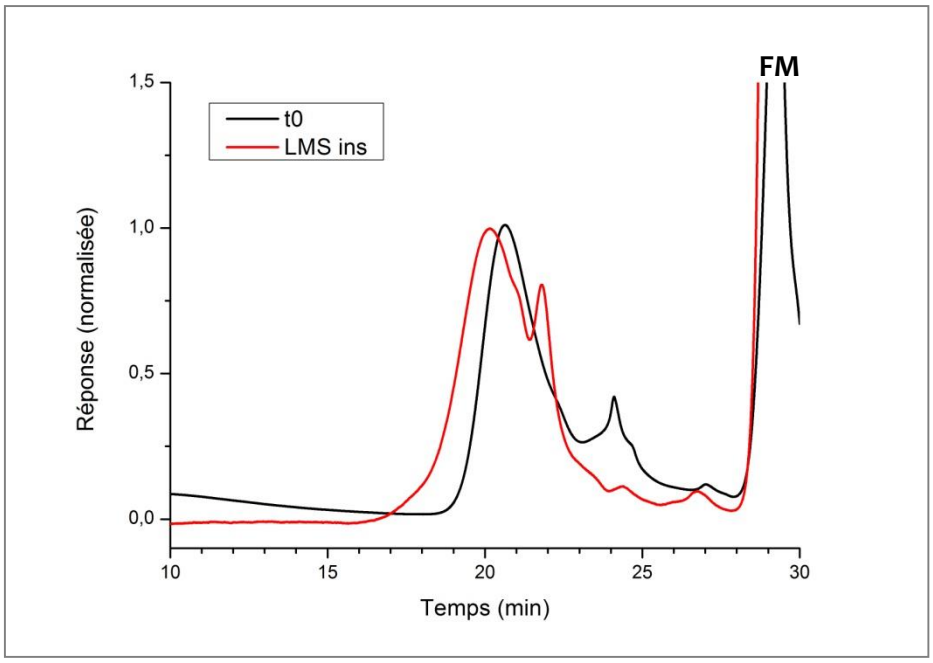


Figure 90 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS ins après traitement LMS biphasique. Solvant d'extraction : AcOEt.

Une expérience a été conduite afin d'évaluer la quantité de lignine insoluble en début de réaction. La fraction de lignine initiale a été solubilisée dans le même système de solvants que celui utilisé pour le traitement LMS biphasique pendant une heure à 30°C. Ces conditions correspondent à celles employées avant de démarrer les réactions LMS. La proportion de lignine insoluble a été mesurée après centrifugation et séchage. Les résultats obtenus montrent que 35% de la lignine est insoluble dès le départ de la réaction, contre 47% à la fin du traitement LMS. Les systèmes mis en jeu sont trop complexes pour que ces données nous permettent d'estimer précisément la quantité d'insolubles générés par couplage radicalaire. En effet, les insolubles formés au cours de la réaction ne proviennent pas seulement de réactions de couplage ; les modifications de composition que subit la phase aqueuse peuvent également provoquer la précipitation de populations de lignine non condensées. Par ailleurs, une partie de la lignine insoluble au départ peut être solubilisée pendant les cinq jours d'oxydation.

L'ensemble de ces résultats montrent clairement qu'une proportion importante - bien que non quantifiable précisément - de la lignine insoluble est composée de populations condensées de fortes masses molaires. Une question se pose quant aux autres populations, de masses molaires plus faibles : leur insolubilité est-elle due à des caractéristiques propres à cette population ou au fait qu'une limite de solubilité de la lignine soit atteinte ? Dans ce dernier cas, il serait possible de tenter de solubiliser ces fractions afin de les traiter dans le but de recycler et de valoriser une partie des insolubles. Ainsi, une tentative a été faite pour solubiliser une partie de la phase LMS ins

dans les conditions classiques du traitement LMS biphasique. Malheureusement, quasiment la totalité de cette fraction s'est avérée insoluble. La présence de ces insolubles n'est donc pas due à une saturation de la solution en lignine. Il n'a ainsi pas été possible de valoriser la phase LMS ins par cette stratégie.

La suite de ce travail se consacre désormais aux parties solubles en phase aqueuse (LMS aq) et solubles en phase organique (LMS orga).

Les chromatogrammes SEC issus des prélèvements de la phase LMS aq sont présentés en Figure 91. Le chromatogramme défini comme le « t0 » provient d'un échantillon prélevé dans la phase aqueuse dès le lancement de la réaction. Cette convention a été employée tout au long de l'étude.

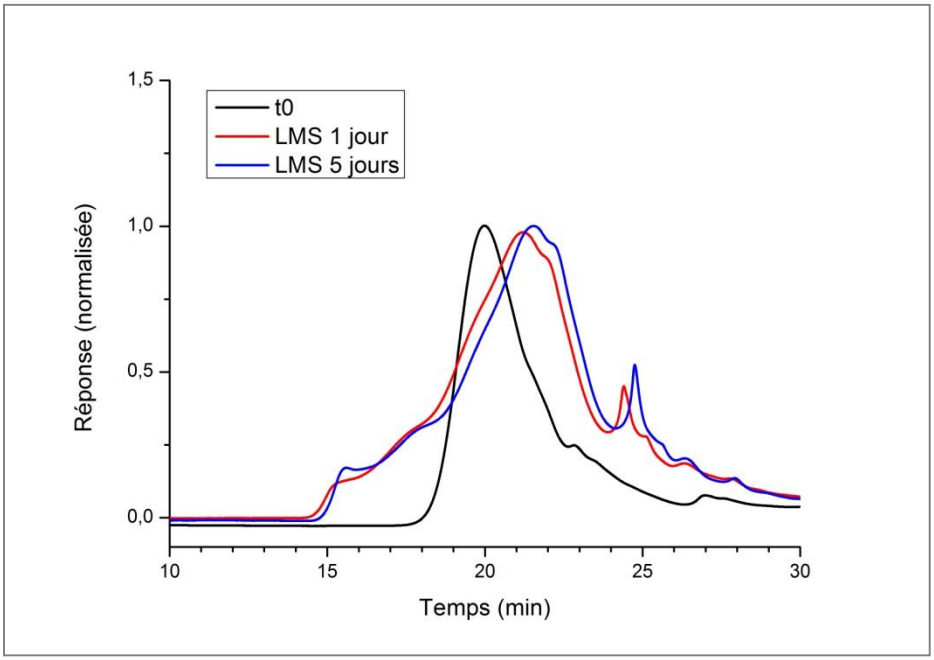


Figure 91 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS aq au cours du traitement LMS biphasique. Solvant d'extraction : AcOEt.

La compétition entre les réactions de couplage et de dépolymérisation de la lignine apparait nettement dans les profils SEC. On observe à la fois des espèces de masses molaires plus élevées que celle de la lignine de départ et des populations de plus faibles masses molaires. Pour la première fois, le traitement LMS induit une dégradation notable de la lignine. Il semblerait que les conditions employées entrainent la précipitation de la plupart des populations issues du couplage. Ainsi, on retrouve majoritairement de la lignine dépolymérisée en solution aqueuse. Le profil SEC de la phase LMS aq n'évolue plus après un jour de réaction, mais cela ne signifie pas que la réaction est arrivée à son terme. En effet, l'étude des profils SEC de la phase organique montre de nettes variations au cours des cinq jours de réaction (Figure 92).

Malgré le fractionnement effectué avant la réaction d'oxydation, une partie de la lignine est extraite dans l'AcOEt après un jour de réaction (Figure 92). Les modifications chimiques subies par la lignine peuvent expliquer ce changement de solubilité d'une partie de la population. Par ailleurs, une partie du dioxane est miscible en phase organique, ce qui pourrait entrainer l'extraction d'une petite quantité de lignine dans l'AcOEt. Après 2 jours d'oxydation, on observe une grande variété d'espèces présentes en phase organique. Les quatre populations principales (à RT 22 min, 22,5 min, 25 min et 28,5 min) correspondent à des molécules de faibles masses molaires. À la fin de la réaction, les deux populations à RT 25 min et 28,5 min ont disparu et l'espèce majoritaire est celle qui élue à un temps de rétention de 22,5 minutes. Une petite proportion de lignine de forte masse molaire issue du couplage est par ailleurs extraite dans la phase organique.

Il est difficile de conclure sur l'origine des variations de profils observées dans cette phase LMS orga. Deux phénomènes sont à prendre en compte pour expliquer les résultats obtenus. La première explication est l'existence d'échanges permanents entre les phases organique et aqueuse. Ainsi, chaque espèce pourrait être préférentiellement solubilisée dans une phase ou l'autre de façon réversible en fonction de son évolution au cours de la réaction. On peut également supposer que certaines populations sont extraites définitivement en phase organique et sont directement modifiées dans cette phase pendant le procédé LMS. La phase LMS orga ne représentant que 5 % de la fraction de départ, nos efforts se sont concentrés sur l'étude de la phase LMS aq.

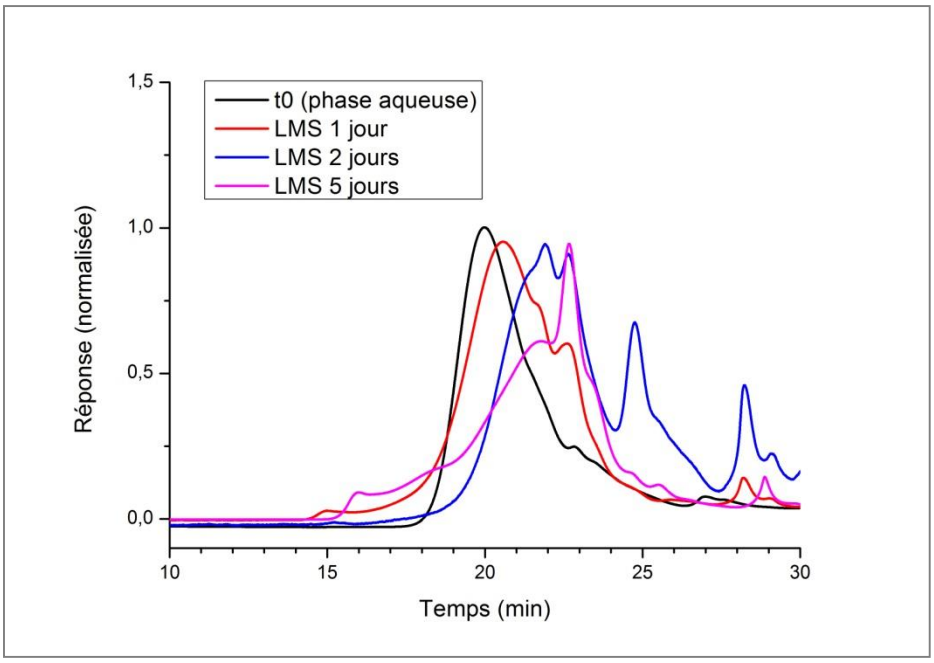


Figure 92 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS orga au cours du traitement LMS biphasique. Solvant d'extraction : AcOEt.

Solvant d'extraction : MIBC

L'oxydation par le procédé LMS biphasique a ensuite été conduite avec la MIBC comme solvant d'extraction. Comme pour l'AcOEt, 5% de la fraction de lignine initiale est extraite en phase organique en fin de réaction. De façon intéressante, la proportion d'insoluble est plus faible dans ces conditions que pour le procédé utilisant l'AcOEt (35% contre 47%). Cette valeur correspond à la proportion d'insolubles présents dès le départ de la réaction, ce qui suggère que très peu de réactions de couplage ont lieu dans ce cas-là. La phase LMS aq représente 60% de la masse de la fraction de lignine initiale (Tableau XV).

Tableau XV : Rendements massiques des trois phases obtenues après traitement LMS biphasique. Solvant d'extraction : MIBC. * : valeur calculée par différence.

Phases LMS	Rendement massique (%)
LMS aq	60*
LMS orga	5
LMS ins	35

Les chromatogrammes SEC de la phase LMS aq montrent que les réactions de couplage habituellement observées lors de l'oxydation de la lignine sont absentes dans ces conditions (Figure 93). C'est la première fois qu'aucune espèce de masse molaire plus élevée que la lignine de départ n'est obtenue en fin de réaction. Deux populations majoritaires sont constatées : une population de même masse molaire que la fraction initiale (RT 20 min) et une population issue de la dégradation de cette fraction à RT 21,5 minutes. Ainsi, le fractionnement de la lignine par la MIBC suivi du procédé LMS biphasique en présence de ce même solvant promeut essentiellement des réactions de dépolymérisation de la lignine et inhibe les phénomènes de couplage radicalaire.

Cinq populations sont extraites en phase LMS orga après le premier jour de réaction (Figure 94). La plupart de ces molécules sont de faibles masses molaires, tel que prévu par notre stratégie. Comme observé avec l'AcOEt, une population de lignine de masse molaire égale à celle de départ est présente en phase organique malgré le fractionnement effectué au préalable. Ceci témoigne probablement d'une fonctionnalisation de la lignine associée au fait qu'une partie du dioxane soit extraite en phase organique. Les quantités mises en jeu sont cependant trop faibles pour confirmer cette hypothèse par analyse RMN. En fin de réaction, trois populations principales sont observées. L'une d'entre elles correspond à la fraction de lignine initiale (RT 20 min), les deux autres sont des espèces de plus faibles masses molaires (RT 22 min et RT 24 min).

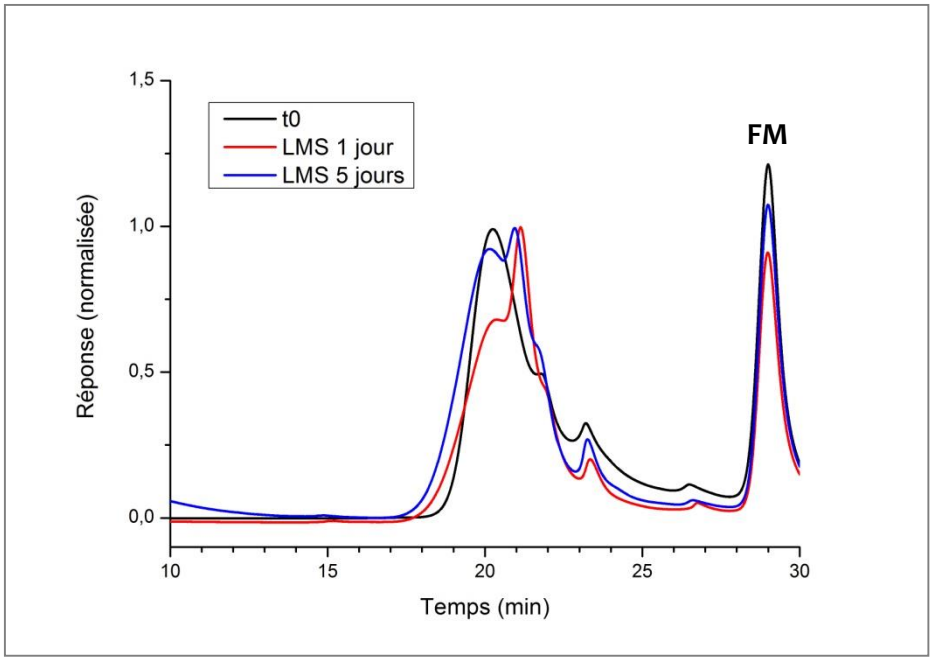


Figure 93: Chromatogrammes SEC de la phase LMS aq au cours du traitement LMS biphasique. Solvant d'extraction : MIBC.

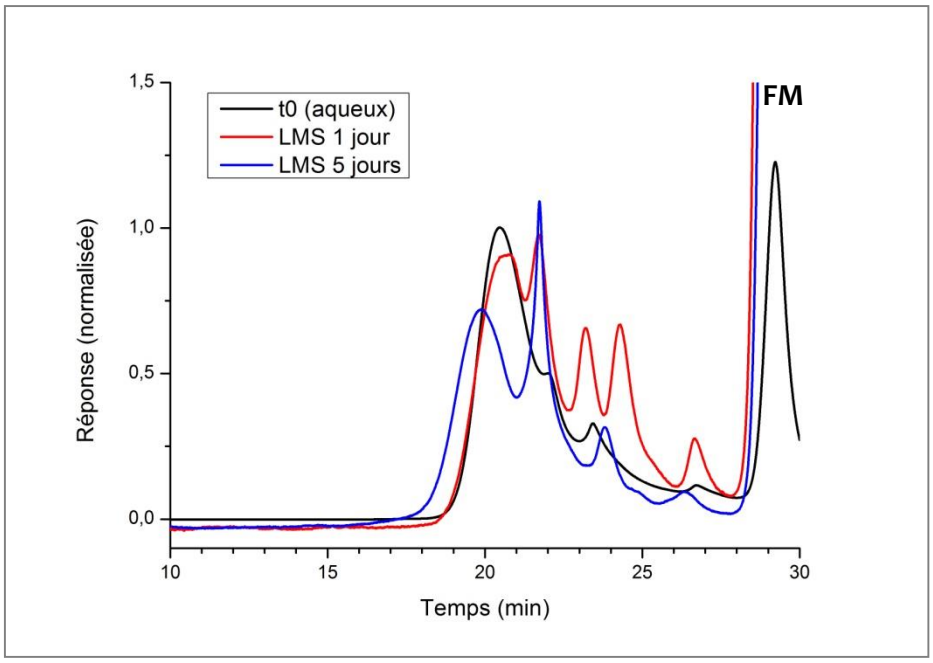


Figure 94 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS orga au cours du traitement LMS biphasique. Solvant d'extraction : MIBC.

Ainsi, la MIBC semble être le solvant le plus adapté pour le procédé de dépolymérisation de la lignine en milieu biphasique. En effet, l'utilisation de solvant dans les étapes de fractionnement et d'oxydation LMS biphasique permet de limiter les réactions de condensation tout en dépolymérisant une partie de la lignine. Des réactions de couplage sont toujours observables lorsque l'AcOEt est utilisée en remplacement de la MIBC.

Quel que soit le solvant utilisé, le traitement LMS biphasique permet de générer des populations de plus faibles masses molaires que la fraction de départ en phase aqueuse, mais aussi d'extraire des composés de faibles masses molaires en phase organique. Ces deux fractions potentiellement valorisables représentent 53 % et 65 % de la masse de la fraction initiale pour les réactions impliquant respectivement l'AcOEt et la MIBC, soit 21 % et 26 % de la masse de lignine de départ.

Bien que la masse molaire de la lignine en phase LMS aq soit plus faible que celle de la fraction de départ, celle-ci ne correspond pas encore aux unités monomère à trimère visées. Ainsi, la troisième étape du procédé de dégradation est nécessaire afin d'obtenir les synthons d'origine naturelle qui représentent les cibles de ce travail de thèse.

III.3. Traitement de Dakin de la phase LMS aq

Les phases LMS aq issues des réactions LMS biphasique en présence de l'AcOEt et de la MIBC ont été traitées directement après leur oxydation selon la réaction de Dakin déjà décrite précédemment. En bref, le pH de la solution est amené jusqu'à 12 par l'ajout de NaOH (1 M), puis 1 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène est ajouté à la solution. La réaction est conduite pendant 12 heures à 90°C. À la fin de la réaction, un échantillon du brut réactionnel est prélevé et analysé en chromatographie d'exclusion stérique. La Figure 95 présente les résultats obtenus pour le procédé dans lequel l'AcOEt a été utilisé comme solvant de fractionnement et d'extraction. De même, la Figure 96 montre les chromatogrammes du procédé impliquant la MIBC.

Dans les deux cas une population de faible masse molaire apparait à un temps de rétention de 25 minutes. Cette espèce de dispersité peu élevée se situe dans la gamme de masse molaire visée : elle est hors des limites de calibration de la SEC et comporte ainsi probablement moins de quatre unités monomères. Ces résultats montrent l'efficacité de la stratégie en trois étapes mises en place ici.

Des populations de masses molaires proches de celles des composés obtenus après LMS biphasique sont encore présentes après la réaction de Dakin. Ces espèces réticentes à la dépolymérisation sont obtenues en faible proportion lorsque l'AcOEt a été employé, malgré la présence d'espèces issues de couplage en début de réaction. Dans le cas du procédé impliquant la MIBC, les populations résistantes à la dépolymérisation sont plus nombreuses. Les raisons expliquant ces phénomènes sont floues et la grande solubilité des espèces à la fin du procédé empêche leur séparation pour d'éventuelles analyses.

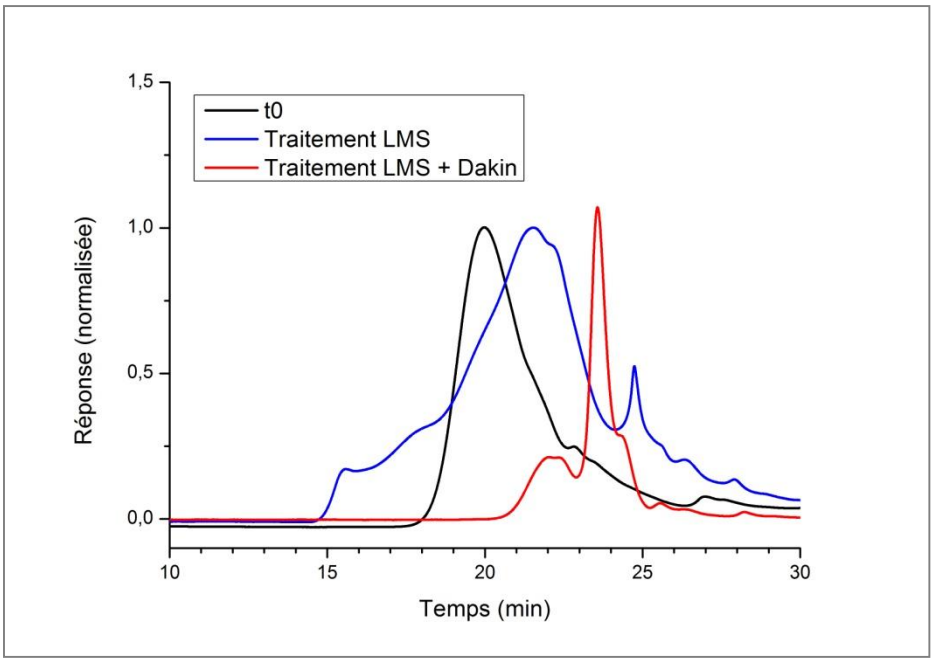


Figure 95 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS aq après les trois étapes de dégradation. Solvant d'extraction : AcOEt.

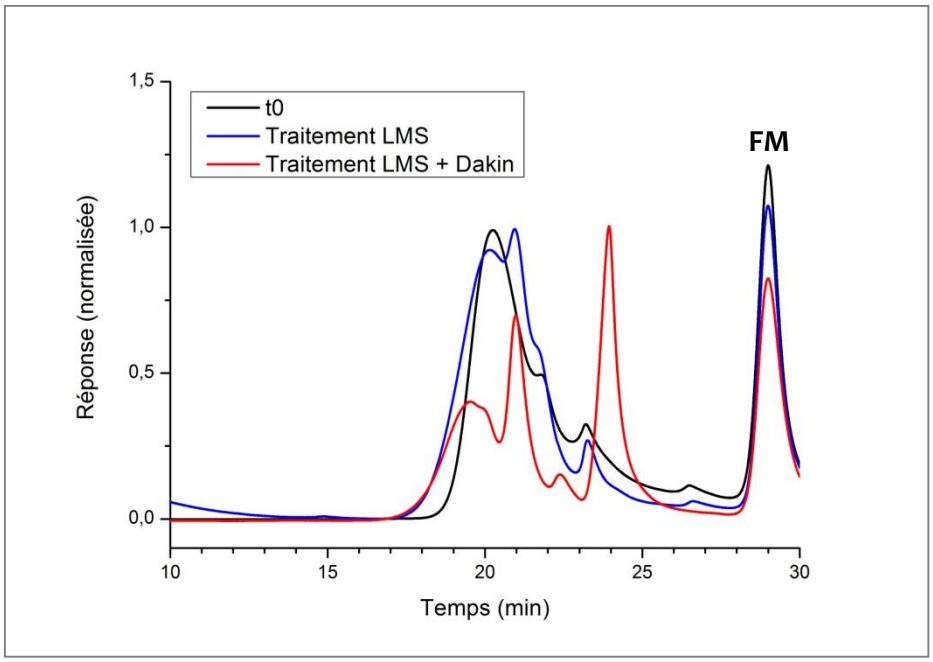


Figure 96 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS aq après les trois étapes de dégradation. Solvant d'extraction : MIBC.

IV. Études complémentaires

Comme nous venons de le voir, la stratégie de dégradation de la lignine en trois étapes mise en place dans ces travaux semble être une technique prometteuse pour l'obtention d'espèces aromatiques de faibles masses molaires de potentiel intérêt pour la chimie. Dans ce paragraphe, des études complémentaires ont été menées afin de déterminer si cette stratégie pouvait être appliquée à un autre lot de lignine d'une part et si le procédé pouvait être optimisé afin notamment d'améliorer les rendements en fractions de faibles masses molaires d'autre part.

IV.1. Application à un nouveau lot de lignine

La grande hétérogénéité des lignines a déjà été discutée à plusieurs reprises dans ce manuscrit. La structure et les propriétés de chaque lignine dépendent de multiples facteurs et de grandes disparités peuvent être observées même pour des échantillons issus de la même variété de bois. Ainsi, rares sont les procédés efficaces sur toute sorte de lignine. Dans cette étude, le procédé de dégradation de la lignine en trois étapes a été appliqué à une lignine de type organosolv d'origine différente de la lignine utilisée dans les expériences précédentes. Cette nouvelle lignine sera dénommée « lot 2 » tout au long de ce travail.

Propriétés de la lignine organosolv lot 2

La lignine du lot 2 est issue d'un procédé organosolv similaire à celui utilisé pour l'isolation du lot 1. Ces deux lots de lignine possèdent des puretés et des masses molaires proches (Figure 97). Le lot 2 est une lignine provenant d'un bois de conifère. Ainsi, sa structure et ses fonctions diffèrent largement de celles de la lignine du lot 1, issue d'une plante herbacée (Tableau XVI).

Les résultats des analyses RMN ^{31}P conduites sur les deux lots de lignine illustrent parfaitement leurs disparités. Le lot 2 est constitué presque uniquement de motifs coniféryliques alors que lot 1 possède les trois motifs (S, G, et H) à proportions égales. Cette plus grande homogénéité pourrait simplifier l'analyse des produits réactionnels. Deux caractéristiques de la lignine du lot 2 pourraient être des freins dans notre étude : son taux d'OH aliphatiques est deux fois plus faible que celui du lot 1 et elle est trois fois plus riche en unités condensées que le lot 1. De façon générale, la lignine du lot 2 est moins fonctionnalisée que celle du lot 1, il est ainsi probable qu'elle soit moins réactive.

Tableau XVI : Proportions des différents OH des deux lots de lignine et des fractions insolubles issues des fractionnements du lot 2. Les valeurs sont déterminées par RMN ^{31}P.

Types d'OH	Concentration (mmol /g)			
	Organosolv lot 1	Organosolv lot 2	Ins AcOEt lot 2	Ins MIBC Lot 2
Aliphatiques	0,89	0,41	0,34	0,49
Condensés	0,13	0,47	0,37	0,59
S phénoliques	0,96	0,11	0,19	0,16
G phénoliques	0,80	1,27	1,12	1,43
H phénoliques	0,84	0,09	0,09	0,05
COOH	0,29	0,30	0,13	0,19

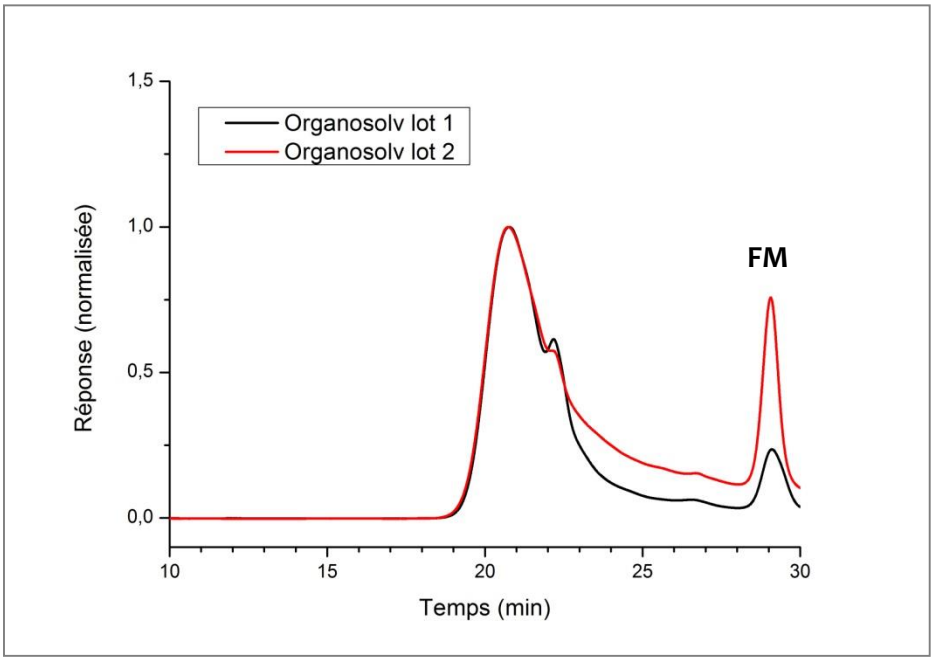


Figure 97 : Chromatogrammes SEC des deux lots de lignine organosolv utilisés dans ce travail.

Fractionnement organique

Le fractionnement organique est la première étape du procédé de dégradation de la lignine. Cette méthode a été appliquée au lot 2 avec les deux solvants de fractionnement utilisés jusqu'ici : l'AcOEt et la MIBC. Les proportions de chaque fraction obtenue sont compilées dans le Tableau XVII. Les résultats montrent que ce nouveau lot est très peu soluble dans les solvants de fractionnement utilisés. Le faible taux de fonctions OH présentes dans le lot 2 est certainement la cause de cette plus faible solubilité. C'est un avantage considérable pour notre procédé : 79 à 92 % de la lignine pourra être utilisée pour l'étape suivante, contre seulement 40 % pour le lot 1.

La répartition des hydroxyles des fractions insolubles dans les solvants de fractionnements est très proche de celle de la lignine originale (Tableau XVI). Ceci est un résultat attendu puisque ces fractions représentent 79 et 92 % de la lignine initiale. Elles diffèrent seulement par leur taux de fonctions COOH plus faible.

Les profils SEC des fractions issues des fractionnements par l'AcOEt et par la MIBC sont présentés en Figure 98 et 99 respectivement. Là encore, les caractéristiques des fractions insolubles sont très proches de celles de la lignine originale. Les fractions solubles en phases organiques correspondent aux populations de plus faibles masses molaires présentes dans la lignine.

Tableau XVII : Répartition des différentes fractions issues des fractionnements de la lignine organosolv lot 2.

Fraction	Rendement massique (%)
Ins AcOEt	79
Sol AcOEt	21
Ins MIBC	92
Sol MIBC	8

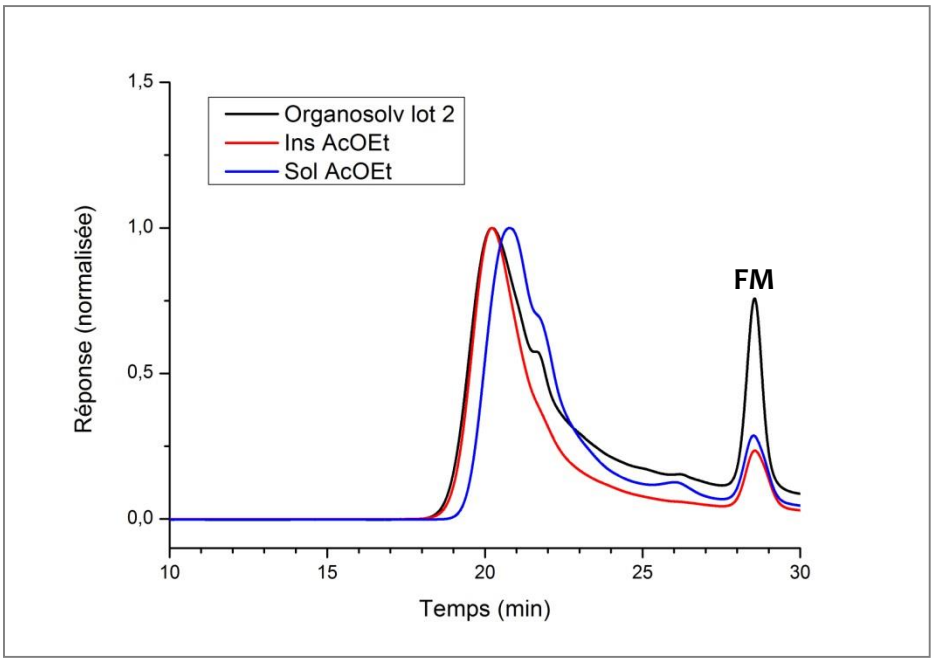


Figure 98 : Chromatogrammes SEC des deux populations issues du fractionnement du lot 2 par l'AcOEt.

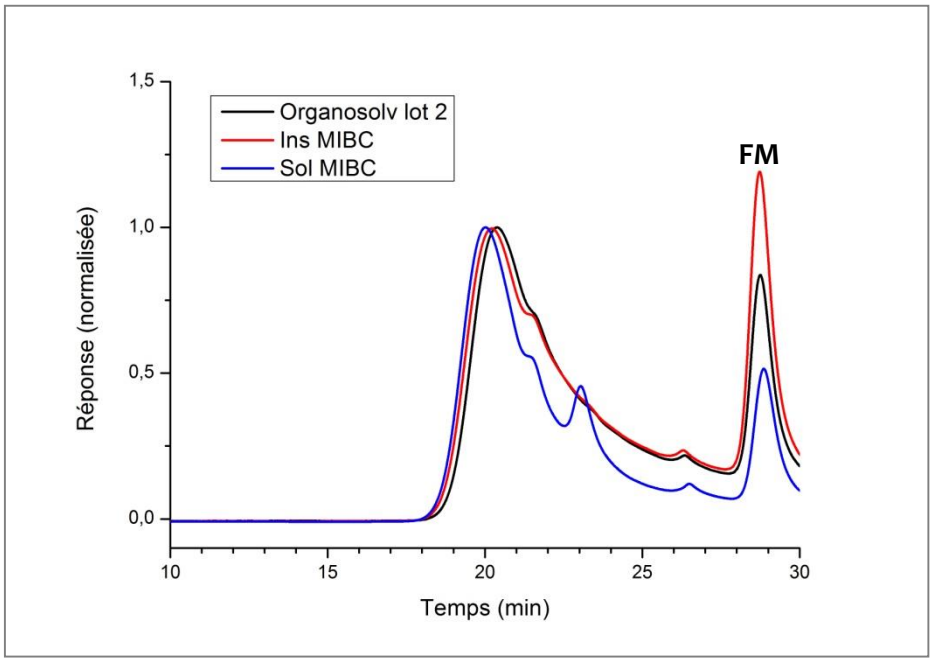


Figure 99 : Chromatogrammes SEC des deux populations issues du fractionnement du lot 2 par la MIBC.

Traitements LMS biphasique et Dakin

Les fractions ins AcOEt et ins MIBC du lot 2 ont été oxydées par le procédé LMS biphasique en présence d'AcOEt ou de MIBC respectivement, puis traitées selon la réaction de Dakin.

Les rendements des trois phases issues de l'oxydation sont présentés dans le Tableau XVIII. Quel que soit le solvant d'extraction employé, une très faible quantité d'espèces est extraite en phase organique (entre 1 et 3 % de la masse de lignine initiale). Les rendements obtenus avec l'AcOEt comme solvant d'extraction sont similaires pour les lots 1 et 2. Lorsque la MIBC est employée, la quantité d'insolubles mesurée en fin de réaction est très élevée pour le lot 2 (73 % contre 35 % pour le lot 1). Ces résultats sont à l'opposé de ceux obtenus avec le lot 1, où la MIBC permettait de limiter les réactions de couplages et la génération d'insolubles. Il est peu probable que l'oxydation LMS entraine la formation d'une telle quantité d'insolubles. Aussi, cette fraction doit certainement être intrinsèquement difficile à solubiliser. Comme déjà évoqué, le dioxane possède une miscibilité importante avec la MIBC. Par conséquent, la concentration en dioxane dans la phase aqueuse diminue au cours du procédé LMS biphasique, ce qui fait chuter la solubilité de cette fraction déjà faiblement soluble. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces hypothèses.

Tableau XVIII : Rendements massiques des trois phases obtenues après traitement LMS biphasique sur les fractions issues du lot 2. * : valeur calculée par différence.

Phases LMS	Rendement massique LMS AcOEt (%)	Rendement massique LMS MIBC (%)
LMS aq	52*	24*
LMS orga	1	3
LMS ins	47	73

Une première étude a été menée sur la phase LMS ins issue du traitement LMS biphasique avec l'AcOEt comme solvant d'extraction. Comme pour le lot 1, cette phase semble contenir à la fois des populations de fortes masses molaires issues du couplage et des populations aux temps de rétention semblables à celui de la lignine de départ, populations non affectées par le traitement LMS (Figure 100). Le caractère insoluble d'une partie de ces populations pourrait être dû au fait qu'une limite de solubilité de la lignine soit atteinte. Ces populations possèderaient alors une structure similaire à la fraction de départ et pourraient être ré-oxydées.

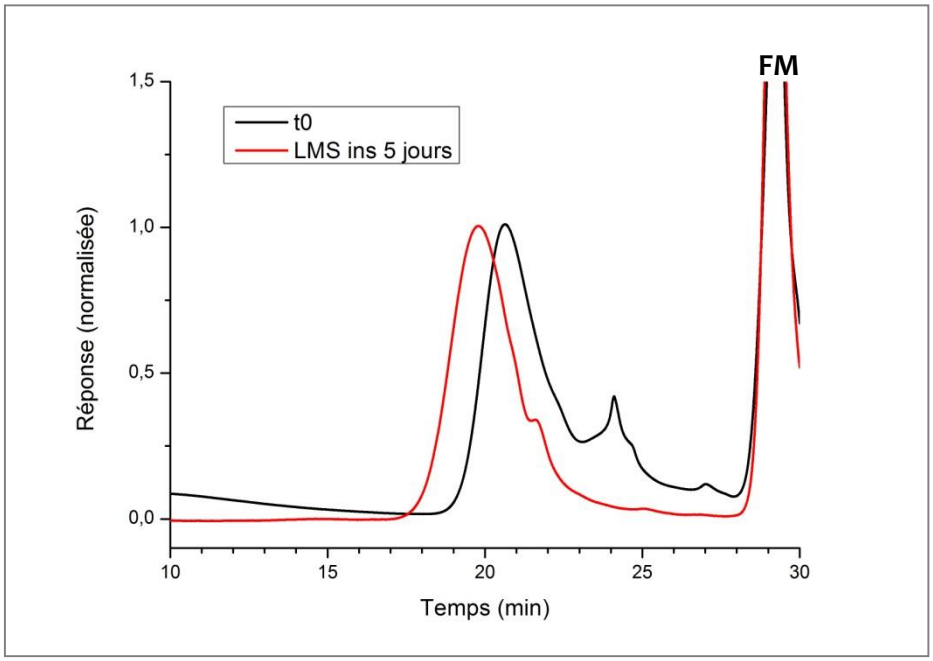


Figure 100 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS ins après traitement LMS biphasique. Lot 2. Solvant d'extraction : AcOEt.

Ainsi, comme pour le lot 1, des essais ont été effectués afin d'évaluer la possibilité de retraiter la phase LMS ins afin de valoriser certaines populations présentes dans cette phase. Contrairement à ce qui a été observé avec le lot 1, une partie de la phase LMS ins issue de l'oxydation du lot 2 a pu être solubilisée et retraitée par la réaction LMS biphasique suivi de la réaction de Dakin. La Figure 101 montre les chromatogrammes SEC de la phase aqueuse issue de ces réactions.

L'oxydation LMS biphasique entraine une dépolymérisation marquée de la lignine. Ceci montre que certaines populations présentes dans la phase insoluble sont insolubles parce que la limite de solubilité de la lignine est atteinte et peuvent donc être ré-oxydées. Un pic étroit est obtenu à un temps de rétention proche de celui de la lignine originale. Aucune population de forte masse molaire n'est observée. Le traitement de Dakin successif génère une population de très faible masse molaire dont le temps de rétention (RT 26 min) se situe dans la gamme des temps de rétention visées. Une partie de la lignine n'est pas affectée par le traitement de Dakin.

Les faibles quantités mises en jeu pour cet essai n'ont pas permis d'effectuer un bilan massique complet afin d'évaluer les proportions de chaque phase, mais les résultats obtenus nous apportent déjà deux informations cruciales :

- le procédé de dépolymérisation de la lignine en trois étapes est effectif sur ce nouveau lot de lignine provenant d'une source différente. En effet, une population de faible masse molaire a été obtenue à partir la phase LMS ins.

- la possibilité de recycler une partie des insolubles pour l'obtention de molécules de faibles masses molaires a été démontrée pour ce nouveau lot. Ainsi, la quantité de lignine valorisable ne se limite plus seulement aux phases solubles (aqueuse et organique).

D'autres expériences seraient nécessaires afin de déterminer précisément la proportion que représentent les populations valorisables au sein de la phase LMS ins. Cette étude devrait également être conduite sur la fraction issue du procédé effectuée en présence de la MIBC à la place de l'AcOEt. Malheureusement, ceci n'a pu être fait dans le temps imparti pour ce travail.

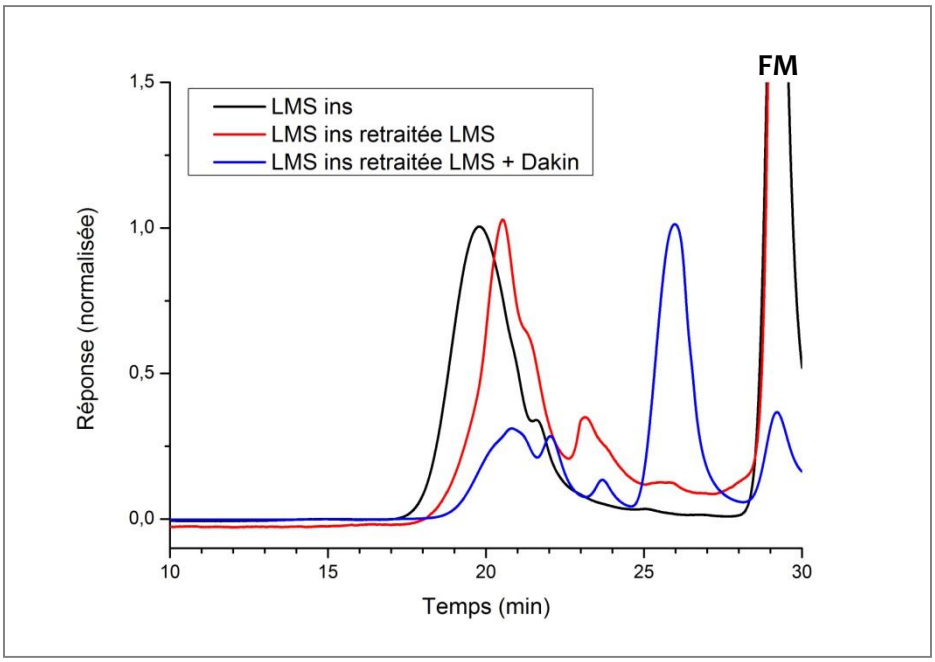


Figure 101: Chromatogrammes SEC issus du retraitement de la phase LMS ins par LMS biphasique suivi de Dakin. Lot 2. Solvant d'extraction : AcOEt

La Figure 102 réunit les chromatogrammes des prélèvements issus de la réaction LMS biphasique en présence de l'AcOEt (en bleu) et de la réaction de Dakin successive (en rouge). Ces résultats confirment que le procédé de dégradation en trois étapes est effectif sur ce nouveau lot de lignine issu de conifère. Aucune population issue de réactions de couplage n'est observée lors de l'oxydation LMS biphasique, ce qui n'était pas le cas pour le lot 1 dans les mêmes conditions. Cette différence peut être due soit à la plus faible solubilité du lot 2 qui entraine la précipitation de toute espèce de plus forte masse molaire, soit au fait que ce lot soit moins exposé aux réactions de condensation. L'absence de motifs de type H dans la lignine du lot 2 - motifs les plus exposés aux réactions de condensation - appuie la seconde hypothèse. Cependant, les deux phénomènes peuvent exister simultanément.

La dernière étape du procédé (réaction de type Dakin) permet une dépolymérisation extensive de la lignine. Cinq populations sont obtenues après l'ensemble du procédé (toutes de masses inférieures à la fraction de départ). Les deux populations principales correspondent à des espèces dans la gamme de masses molaires visées (à RT 26 min et 27 min). Ce sont par ailleurs les mêmes populations que celles obtenues après la dépolymérisation de la phase LMS ins, signe que cette fraction insoluble est certainement similaire à celle présente en phase LMS aq.

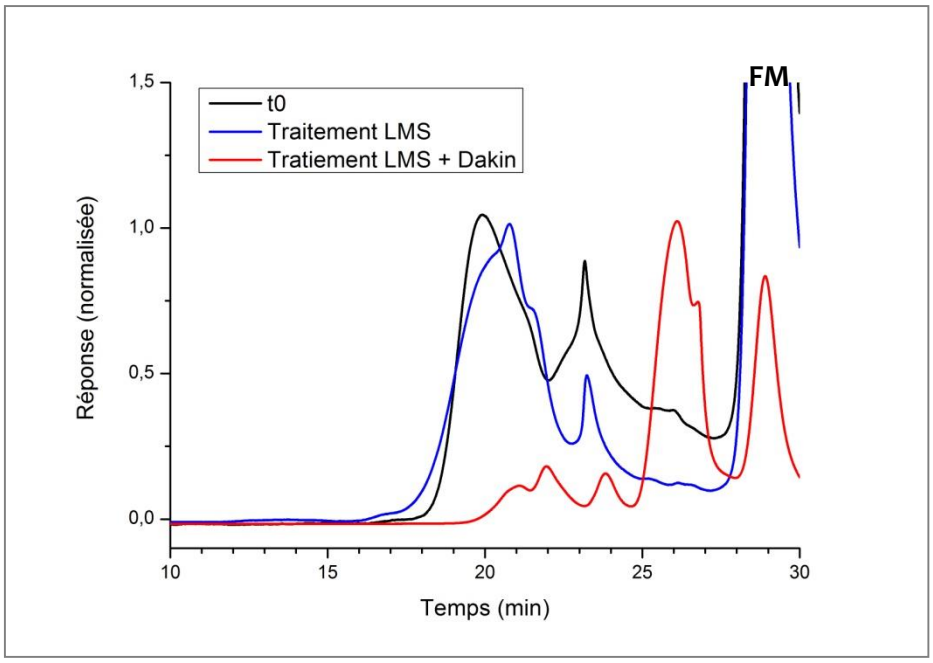


Figure 102 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS aq issue du lot 2 après les trois étapes de dégradation. Solvant d'extraction : AcOEt.

Le procédé de dégradation de la lignine en trois étapes est également performant sur le lot 2 lorsque la MIBC est employée (Figure 103). Là encore, aucune espèce de forte masse molaire n'apparait et le procédé LMS biphasique promeut une dépolymérisation marquée de la lignine. Le pic obtenu après cette réaction d'oxydation est bien plus étroit que celui obtenu avec le lot 1 dans les mêmes conditions. Cette observation traduit le caractère plus homogène de ce lot déjà évoqué lors de sa caractérisation.

Le profil SEC observé après les trois étapes est très proche de celui obtenu avec le lot 1 dans les mêmes conditions, malgré les différences existant entre les deux lignines d'origine. La population principale possède un pic étroit éluant à RT 25 minutes. Ceci correspond à une population de faible masse molaire dans la gamme des temps de rétention visés. Une partie des deux populations à RT 20 min et RT 21 min n'est pas affectée par le traitement de Dakin.

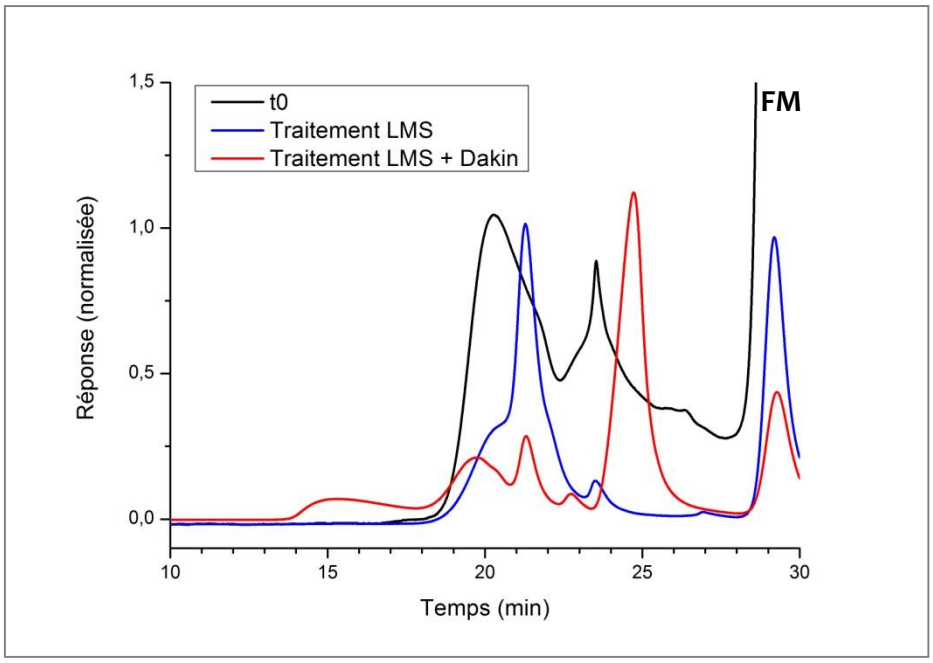


Figure 103 : Chromatogrammes SEC de la phase LMS aq issue du lot 2 après les trois étapes de dégradation. Solvant d'extraction : MIBC.

Conclusion

Le procédé de dépolymérisation de la lignine en trois étapes a permis de produire des molécules de faibles masses molaires à partir de deux lignines d'origines et de structures différentes. Bien que ce traitement soit efficace sur les deux lots étudiés, les résultats obtenus présentent de nombreuses différences. La principale cause de ces divergences de comportement semble être la solubilité des deux espèces dans les différents systèmes de solvants employés.

Ainsi, dès la première étape de fractionnement, le lot 2 a montré une solubilité bien plus faible dans les solvants organiques que le lot 1. Par conséquent, une plus grande proportion de lignine a pu être oxydée dans l'étape suivante (80 % à 92 % pour le lot 2, contre 40 % pour le lot 1). Les procédés d'extraction (organosolv) et les masses molaires des deux lignines étant similaires, cette différence de solubilité a été principalement attribuée à la faible proportion de groupements hydroxyle phénoliques présents dans le lot 2.

Après l'ensemble du traitement, 21 % du lot 1 est potentiellement valorisable sous forme de molécules de faibles masses molaires lorsque l'AcOEt est employée contre 42 % pour le lot 2. Quand la MIBC est employée, le rendement massique de lignine valorisable est quasiment identique pour les deux lots (25 et 26 % respectivement pour les lots 1 et 2). L'acétate d'éthyle semble ainsi être le solvant le plus adapté pour le lot 2. Dans chaque cas de figure, les rendements obtenus sont élevés comparés à ceux publiés dans la littérature et discutés dans le chapitre bibliographique.

La nature des insolubles formés lors de la réaction LMS biphasique est le point-clé dans la comparaison des deux lots. En effet, la phase insoluble obtenue après oxydation du lot 1 est composée d'une population intrinsèquement insoluble dans le système de solvants utilisé et d'une population issue de couplage radicalaire. Ces deux populations insensibles à la réaction de Dakin ne peuvent être valorisées sous forme de molécules de faibles masses molaires. À l'inverse, une proportion importante de la phase insoluble du lot 2 doit son caractère insoluble au fait qu'une limite de solubilité soit atteinte dans les conditions utilisées pour la réaction LMS. Nous avons montré que cette population pouvait être isolée et réutilisée afin d'obtenir des molécules de faible masse molaire. Bien que cet aspect n'ait pas été quantifié, le recyclage de la phase insoluble pourrait permettre d'augmenter sensiblement la proportion de lignine valorisable pour le lot 2.

IV.2. Étude sur le traitement de Dakin

Ajustement du pH

Une expérience a été menée sur la réaction de Dakin afin de déterminer si la présence de populations réticentes au procédé de dégradation était due aux propriétés intrinsèques de ces populations ou si la limitation provenait du procédé.

Le pH du milieu réactionnel a été mesuré à la fin de la réaction de Dakin présentée dans le paragraphe précédent en Figure 103 (procédé en trois étapes appliqué sur le lot 2 avec la MIBC). Une chute de la valeur du pH de 12 à 5 a été constatée. Ce phénomène est dû la formation d'acides carboxyliques issues de l'oxydation de la lignine par le peroxyde d'hydrogène. Pour que la réaction de Dakin soit effective, celle-ci doit être conduite en conditions alcalines. Ainsi la diminution du pH en cours de réaction pourrait expliquer le fait que l'intégralité de la lignine ne soit pas dégradée.

Afin de vérifier cette hypothèse, le pH de la solution a été ajusté à 12 par l'ajout de NaOH (1 M) et la réaction de Dakin a été relancée pour 12 heures. Les chromatogrammes SEC de la lignine après le premier traitement de Dakin (en bleu) et le second (en rouge) sont présentés en Figure 104.

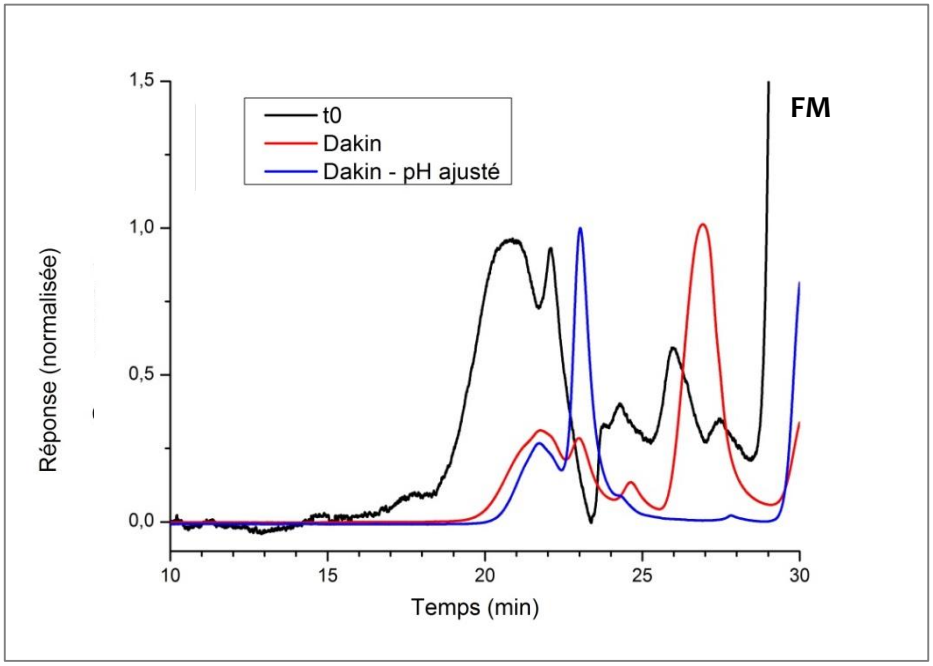


Figure 104 : Chromatogrammes SEC illustrant l'influence de l'ajustement du pH lors de la réaction de Dakin sur la lignine.

Deux observations importantes peuvent être faites à partir de ces résultats. La population de plus forte masse molaire (RT 21,5 min) n'évolue pas après l'ajustement du pH et la seconde réaction de Dakin. On ne peut donc attribuer la présence de ces espèces à la baisse de pH observée au cours du premier traitement de Dakin. De façon marquante, la population principale obtenue après la première réaction de Dakin (RT 27 min) disparait totalement à la fin de la seconde réaction au profit de la population à RT 23 min. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- la seconde oxydation par le procédé Dakin a pu provoquer des réactions de couplage, entrainant la formation d'une espèce de plus forte masse molaire.

- l'espèce formée à RT 23 min pourrait être une molécule de faible masse molaire au taux d'oxydation élevé. En effet, à ces temps d'élution élevés, la séparation des espèces en chromatographie d'exclusion stérique n'est plus essentiellement due à leur masse molaire, mais leurs fonctions et leur polarité jouent également un rôle. Ainsi des espèces de faible masse molaire de type acide vanillique possèdent des temps de rétention proche de ceux observés ici. Cet aspect sera illustré plus tard dans ce chapitre.

Un des aspects clé de cette étude est qu'elle montre la possibilité d'obtenir différents types de produits en fonction des conditions employées lors du traitement de Dakin. Bien que les espèces générées par ce procédé n'aient pour l'instant pas pu être clairement identifiées, cette piste est très intéressante pour cette potentielle sélectivité.

Traitement alternatif : dépolymérisation par l'acide formique

L'équipe de Stahl a développé une stratégie similaire à la nôtre pour la dépolymérisation de la lignine[14,15]. Dans leurs travaux, la lignine est tout d'abord oxydée sélectivement dans une réaction catalysée par un dérivé du TEMPO (étape correspondant à notre procédé LMS). Les liaisons oxydées sont ensuite rompues dans une seconde étape (équivalente à la réaction de Dakin).

Pour cette seconde étape, un nombre important de conditions ont été testées sur un modèle dimère de type β-O-4 oxydé. La réaction de type Dakin en présence du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin a notamment été évaluée. Il a été montré que le gaïacol généré lors de la rupture de la liaison éther était instable dans les conditions employées. Dans ces travaux, les meilleurs rendements ont été obtenus lorsque le modèle est dissous dans l'acide formique en présence de trois équivalents de sodium de formate. Appliqué à la lignine, ce procédé a permis l'obtention de près de 60 % massique d'espèces de faibles masses molaires issues de la lignine, un résultat sans précédent dans la littérature déjà discuté dans le chapitre bibliographique (§ III.2).

Inspirée par ces résultats, la stratégie en trois étapes utilisée jusqu'à présent a été modifiée : dans la dernière étape, le procédé de Dakin a été remplacé par la réaction avec l'acide formique (HCOOH) décrite par Stahl et ses collaborateurs. Les deux premières étapes sont inchangées, la lignine est fractionnée puis oxydée par le procédé LMS biphasique. L'étude a été conduite sur le lot 2 en utilisant la MIBC comme solvant de fractionnement et d'extraction.

La Figure 105 compare les chromatogrammes SEC des espèces obtenues par la stratégie classique (en rouge) et par la nouvelle méthode impliquant la réaction avec l'HCOOH (en bleu). Les deux techniques permettent de générer des espèces de faibles masses molaires correspondant aux objectifs de ce travail. Les produits obtenus sont clairement distincts selon la méthode employée. La population principale élue à RT 24,5 min lorsque la lignine est traitée par la réaction de Dakin alors que la population issue du traitement HCOOH apparait à RT 27 minutes. Dans les deux cas, des populations non dépolymérisées sont toujours présentes dans le milieu, ce qui confirme que la réticence de ces molécules provient de leur structure et non du procédé de dégradation utilisé.

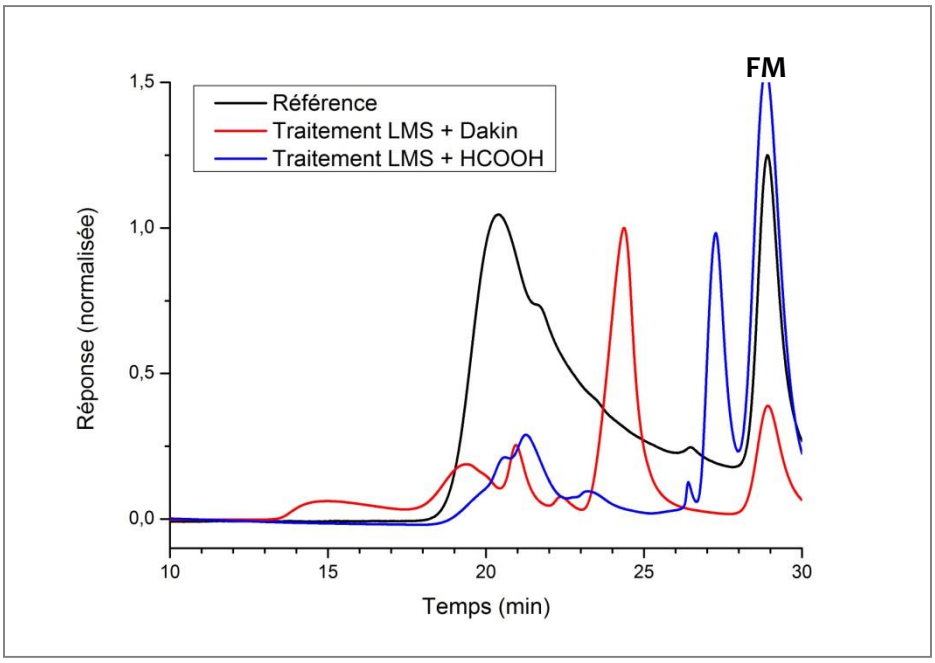


Figure 105 : Comparaison des chromatogrammes SEC des espèces obtenues par deux stratégies de dégradation différentes.

Cette seconde étude concernant le traitement de Dakin montre l'importance de la dernière étape de notre procédé de dégradation : les conditions employées lors de cette étape jouent un rôle crucial sur la nature des produits générés. À titre d'exemple, la Figure 104 montre le mécanisme proposé par Stahl pour la rupture de la liaison β-O-4 d'un dimère en présence d'acide formique et de formate de sodium. La formation d'une espèce de type dicétone est le point le plus singulier de ce mécanisme. En comparaison, la réaction de Dakin conduirait à la formation d'acides carboxyliques. Ainsi le contrôle des paramètres de cette dernière étape pourrait permettre de cibler un type de molécules en fonction des objectifs visés.

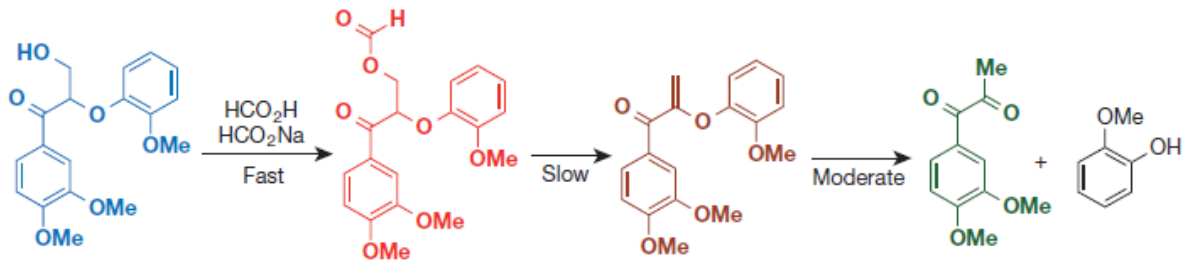


Figure 106 : Rupture de la liaison C-O d'un dimère β-O-4 en présence d'acide formique et de formate de sodium[15].

IV.3. Renouvellement de la phase organique

Comme il a été montré dans les paragraphes précédents, des espèces de faibles masses molaires sont systématiquement extraites en phase organique lors du traitement LMS biphasique de la lignine. Ces molécules ont été obtenues dans toutes les conditions employées et pourraient représenter un intérêt pour l'industrie chimique. Malheureusement, la quantité d'espèces extraites en phase organique est très faible : entre 1 et 5% selon les procédés utilisés.

Dans cette étude, le procédé d'oxydation LMS biphasique a été modifié afin d'augmenter la quantité de molécules extraites en phase organique. Cette réaction alternative a été conduite sur une fraction issue du lot 1 selon des conditions similaires à celles utilisées pour la réaction d'oxydation en milieu biphasique en présence d'AcOEt (§ III.2., Figure 91). Lors de ce nouveau procédé, la phase organique est renouvelée à plusieurs reprises alors que celle-ci est inchangée dans la réaction initiale. Ainsi, après 4 heures, 8 heures et 24 heures de réaction, la solution est décantée et la phase organique est entièrement extraite du milieu puis remplacée par le même volume d'AcOEt vierge. Pour chacune des phases extraites, la quantité de molécules extraites est évaluées (Tableau XIX) et les échantillons sont analysés en SEC (Figure 107).

Tableau XIX : Quantité de molécules extraites en phase organique lors de l'oxydation LMS biphasique du lot 1. La phase organique (AcOEt) est renouvelée après 4, 8, et 24h de réaction.

Temps de réaction (h)	Rendement massique (%)
4	9
8	3
24	2
48	4
Total	**18**

Le Tableau XIX montre que la stratégie de renouvellement de la phase organique permet bien d'extraire une plus grande quantité d'espèces. Au total, 18% de la masse de la fraction de départ a été extraite en phase organique, contre 5% lorsque la phase est inchangée. La quantité d'espèces extraites est de plus en plus faible au cours du temps : 9% sont extraits après 4 heures de réaction, 5% 20 heures plus tard et finalement 4% après 24 heures de réaction supplémentaires.

De façon intéressante, 9% d'espèces sont extraites dès la quatrième heure de réaction alors que seulement 5% sont obtenues à la fin de la réaction lorsque l'AcOEt n'est pas renouvelée. Ceci confirme que des échanges entre les phases aqueuse et organique se produisent tout au long de la réaction. Ainsi, l'affinité d'une population pour une phase ou l'autre peut évoluer selon les modifications chimiques qu'elle subit lors du traitement LMS biphasique.

Les profils SEC des trois fractions extraites les premières 24 heures sont très similaires (Figure 107). La population majoritairement extraite possède un temps de rétention de 22 minutes. Ce RT est situé à la limite des bornes de calibration de la SEC et pourrait correspondre à des oligomères de lignine. Les premières espèces de très faibles masses molaires (RT 25 et 28 minutes) apparaissent dans la phase organique entre le premier et le deuxième jour de réaction. Cette dernière portion représente 4% de la masse de lignine initiale. Ainsi, le choix du moment où la phase organique est isolée du milieu impacte directement la nature des molécules extraites.

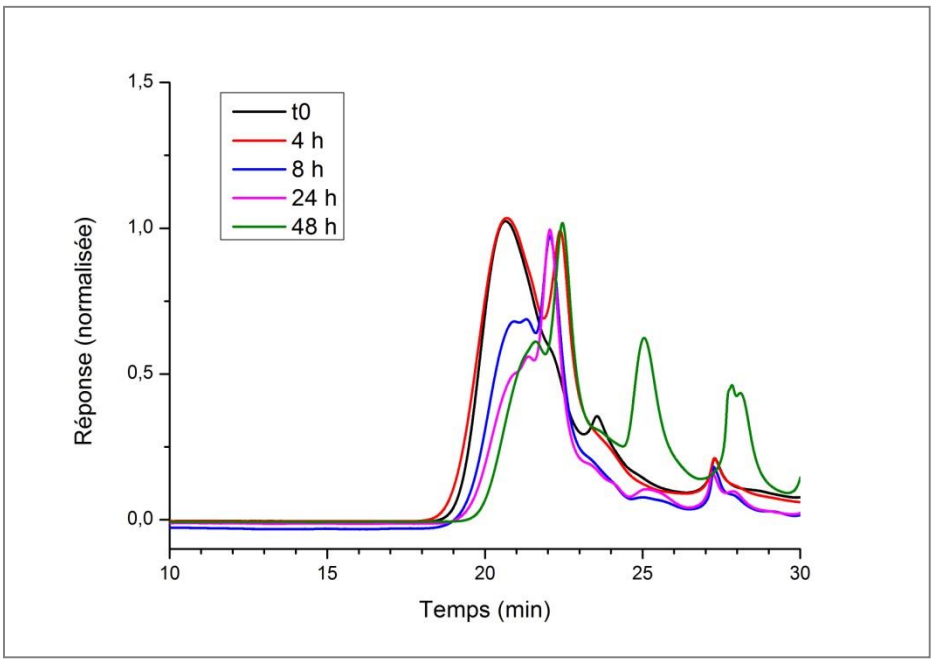


Figure 107 : Chromatogrammes SEC des différentes phases extraites lors du traitement LMS biphasique du lot 1 avec renouvellement de la phase organique (AcOEt).

L'influence du renouvellement organique a ensuite été évaluée sur la phase aqueuse. La Figure 108 compare les résultats obtenus avec et sans renouvellement après 5 jours de réaction pour les phases LMS aq (Figure 108, A), LMS orga (Figure 108, B) et LMS aq après avoir subi l'ensemble du traitement (Figure 108, C). Pour l'ensemble de ces phases, les profils SEC sont très similaires que la phase organique soit renouvelée ou inchangée. Ceci montre qu'il est possible par ce procédé d'extraire une quantité plus élevée d'espèces en phase organique sans pour autant influer sur les produits finaux des autres phases. L'intérêt du renouvellement organique devra maintenant être évalué en fonction de l'analyse du type de molécules extraites par rapport aux molécules obtenues en phases LMS aq après réaction de Dakin.

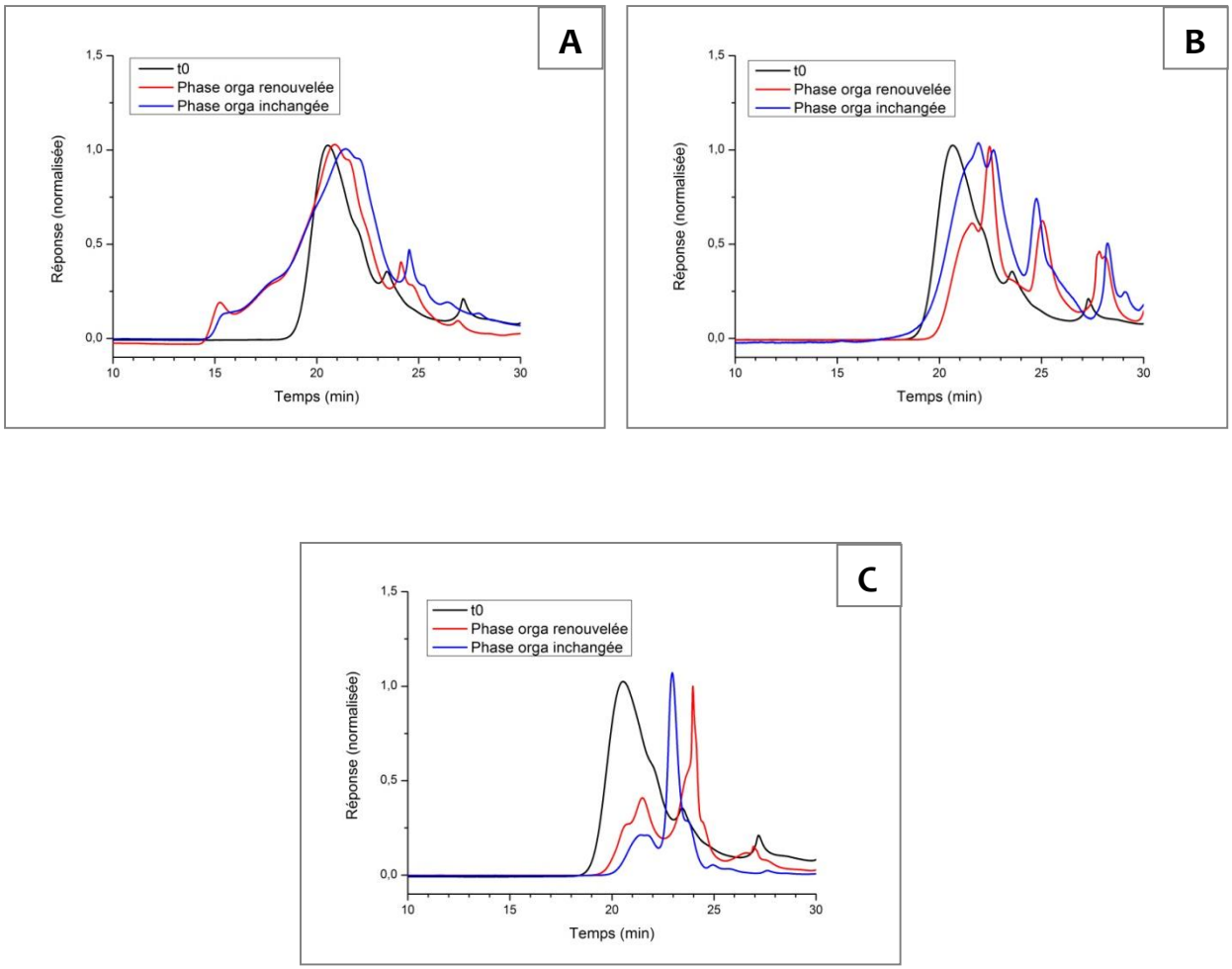


Figure 108 : Comparaison des procédés LMS biphasique avec et sans renouvellement de la phase organique. A : phase LMS aq finale. B : phase LMS orga finale. C : phase LMS aq après réaction de Dakin.

Cette stratégie de renouvellement de la phase organique ne pourrait pas être appliquée directement pour le procédé impliquant la MIBC. En effet, la forte miscibilité du dioxane avec la MIBC entrainerait un épuisement rapide du co-solvant dans la phase aqueuse, et donc des problèmes de solubilité de la lignine. Une alternative à envisager serait de conduire la réaction en utilisant une phase organique composée de 75 % (v/v) de MIBC et de 25 % (v/v) de dioxane. Ainsi, la concentration en dioxane serait équilibrée entre les deux phases et les phénomènes de transferts pourraient être limités.

V. Élucidation des produits d'oxydation

Jusqu'à présent, les produits formés lors du procédé de dégradation de la lignine n'ont été analysés que par chromatographie d'exclusion stérique. Cette technique d'analyse simple et rapide nous a permis d'observer l'évolution de la masse molaire de la lignine au cours des différents traitements et ainsi de confirmer l'efficacité de la stratégie mise en place. Cependant, la SEC ne donne aucune information précise quant à la structure des composés analysés.

Dans ce chapitre, plusieurs méthodes d'analyse ont été employées afin d'obtenir des renseignements sur le type de molécules obtenues après le traitement en trois étapes de la lignine. L'élucidation des produits de dégradation de la lignine est une tâche ardue. La structure complexe et hétérogène de la lignine entraine généralement la formation d'un grand nombre d'espèces difficiles à séparer. Les techniques les plus souvent utilisées pour l'analyse des molécules issues de la lignine sont la chromatographie en phase liquide (LC) et la chromatographie en phase gazeuse (GC), généralement couplées à la spectroscopie de masse (LC-MS et GC-MS). Ces techniques seront explorées dans cette étude.

V.1. Chromatographie d'exclusion stérique

L'acide vanillique, la vanilline et le gaïacol - trois monomères phénoliques - ont été analysés en chromatographie d'exclusion stérique dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la lignine. Leurs profils ont été comparés avec ceux des produits obtenus après le procédé de dégradation en trois étapes effectué sur le lot 2 en présence de la MIBC ou de l'AcOEt (Figure 109).

Malgré leurs masses molaires proches (entre 124 et 168 g/mol), les trois monophénols éluent sur une large gamme de temps de rétention, comprise entre 22 et 27 minutes. On peut notamment remarquer que l'acide élue dans une zone éloignée de celle des deux autres monophénols. Dans nos conditions alcalines, l'acide vanillique existe sous sa forme ionisée, ce qui peut expliquer les écarts de temps d'élution observés.

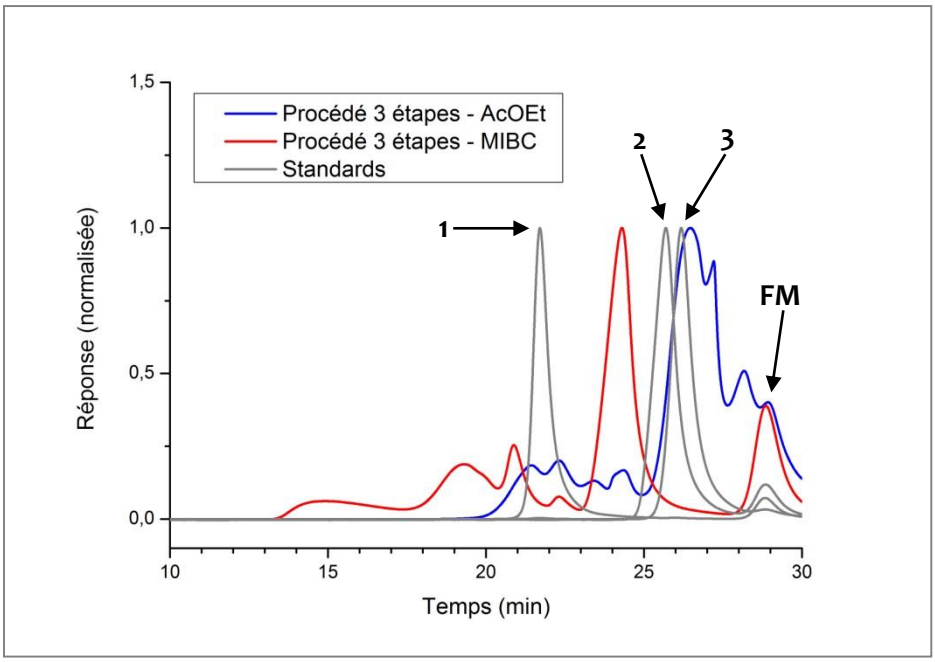


Figure 109 : Chromatogrammes SEC des produits de dégradation du lot 2 et deux trois monomères standards. 1 : Acide vanillique ; 2 : Vanilline ; 3 : Gaïacol.

Ces observations confirment que dans nos conditions la SEC ne sépare plus les espèces seulement selon leurs masses molaires lorsque celles-ci sont trop faibles. Les populations générées lors de la dégradation de la lignine possèdent des temps de rétention élevés, compris dans la gamme des monomères phénoliques analysés. Ceci nous permet d'affirmer que ces molécules possèdent des masses molaires faibles, correspondant à l'objectif de ce travail. Aucune hypothèse sur la masse précise ou sur la structure de ces espèces ne peut cependant être émise.

V.2. Chromatographie en phase gazeuse (GC et GC-MS)

Les produits issus de la dépolymérisation du lot 2 (cf. Figure 109) en présence d'AcOEt (Figure 110) et de MIBC (Figure 111) ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse associée à un spectromètre de masse (GC-MS). Ces analyses ont été réalisées sans modification préalable des échantillons dans un laboratoire prestataire sur une colonne capillaire de 15 mètres composée de 5% de phénylméthylpolysiloxane et de 95 % diméthylpolysiloxane.

Les signaux obtenus en GC sont très bruités et peu d'espèces ont pu être observées. Les conditions employées ne semblent donc pas adaptées pour nos échantillons. Quatre structures ont cependant été proposées à partir des fragments obtenus en spectroscopie de masse et par comparaison avec les valeurs fournies par la base de données NIST 2008. Ces molécules correspondent à des monomères et dimères aromatiques qui pourraient être issues de la lignine. Cependant les correspondances entre les fragments observés et les fragments théoriques sont trop faibles pour affirmer que ces espèces sont bien présentes dans nos échantillons.

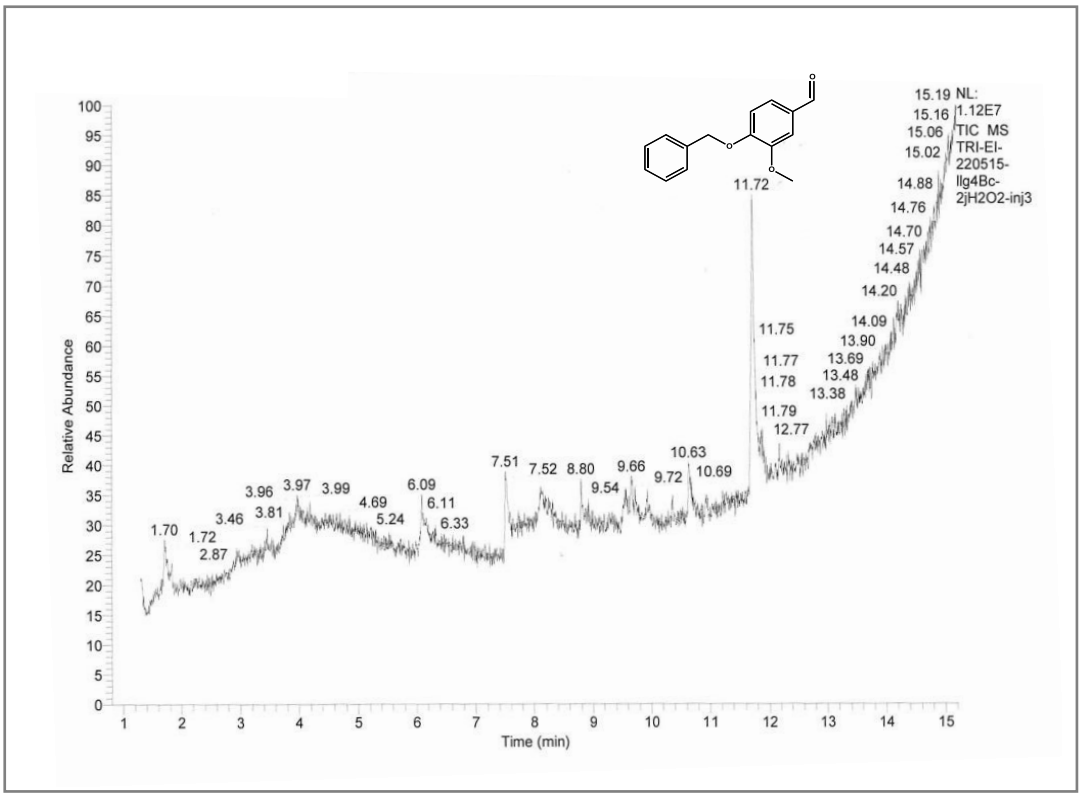


Figure 110 : Chromatogramme GC des produits issus de la dépolymérisation du lot 2 en présence d'AcOEt.

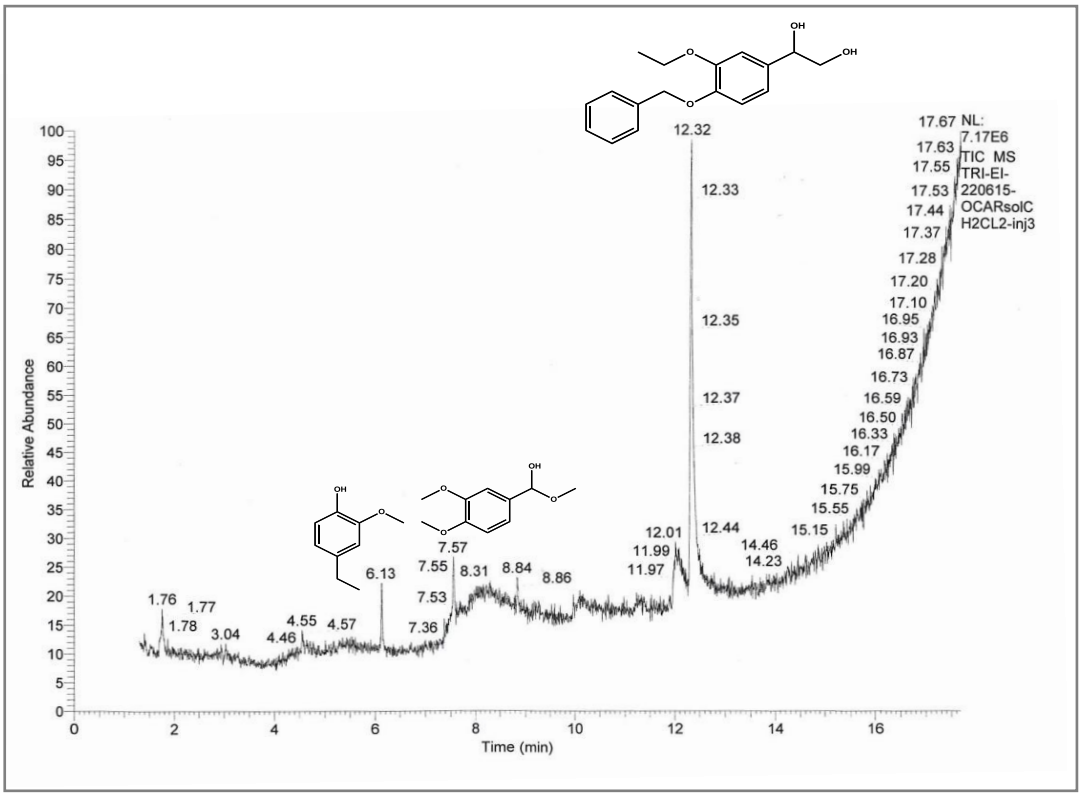


Figure 111 : Chromatogramme GC des produits issus de la dépolymérisation du lot 2 en présence de MIBC.

Les résultats obtenus lors de ces analyses n'étant pas satisfaisant, une nouvelle série d'analyses a été conduite au laboratoire. Basées sur la littérature, de nouvelles conditions analytiques ont été mises au point en GC[16,17]. Les principales différences avec l'étude précédente sont :

- l'utilisation d'une colonne de 30 mètres au lieu de 15, et contenant 5% de diphénylpolysiloxane en remplacement des 5% de phénylméthylpolysiloxane

- une montée en température plus lente (10°C/min au lieu de 15°C/min).

- les échantillons sont silylés par le N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoro acétamide avant analyse.

Ce chromatographe n'étant pas couplé à la spectroscopie de masse, l'élucidation des produits de dégradation a été conduite en comparant leurs temps de rétention à ceux de molécules monomères et dimères de structures connues analysées dans les mêmes conditions (Figure 112).

La Figure 113 présente les chromatogrammes GC des produits générés lors de la dépolymérisation du lot 2 en présence de l'AcOEt (en bleu) et de la MIBC (en rouge). Pour le procédé impliquant l'AcOEt, deux pics principaux sont observés (RT 14,15 et 16,70 min) ainsi que plusieurs pics secondaires. Un agrandissement du chromatogramme de cet échantillon est présenté en Figure 114 afin de mieux distinguer ces pics secondaires. Aucune correspondance n'a été trouvée entre les pics principaux et ceux des molécules-types. Trois pics secondaires possèdent des temps rétention similaires à des molécules de structures connues. Les pics à RT 16,90 min, 18,90 min et 20,60 min pourraient respectivement correspondre à l'alcool 4-hydroxybenzylique, à l'alcool vanillique et à l'acide vanillique. Une analyse complémentaire en spectroscopie de masse serait nécessaire pour confirmer la présence de ces espèces au sein des produits de dépolymérisation de la lignine. Néanmoins, les temps de rétention des pics majoritaires sont compatibles avec des phénols monomères. Ceci confirme la dépolymérisation de la lignine grâce au procédé mis en œuvre.

Un seul pic est observé parmi l'échantillon issu du procédé impliquant la MIBC. Quasiment aucun pic secondaire n'est observé dans ce cas-là. Il est peu probable que seul une espèce ait été générée lors de la dépolymérisation de la lignine. L'explication la plus vraisemblable et que les produits présents ne sont pas suffisamment volatiles pour pouvoir être observés en GC, malgré leur dérivatisation.

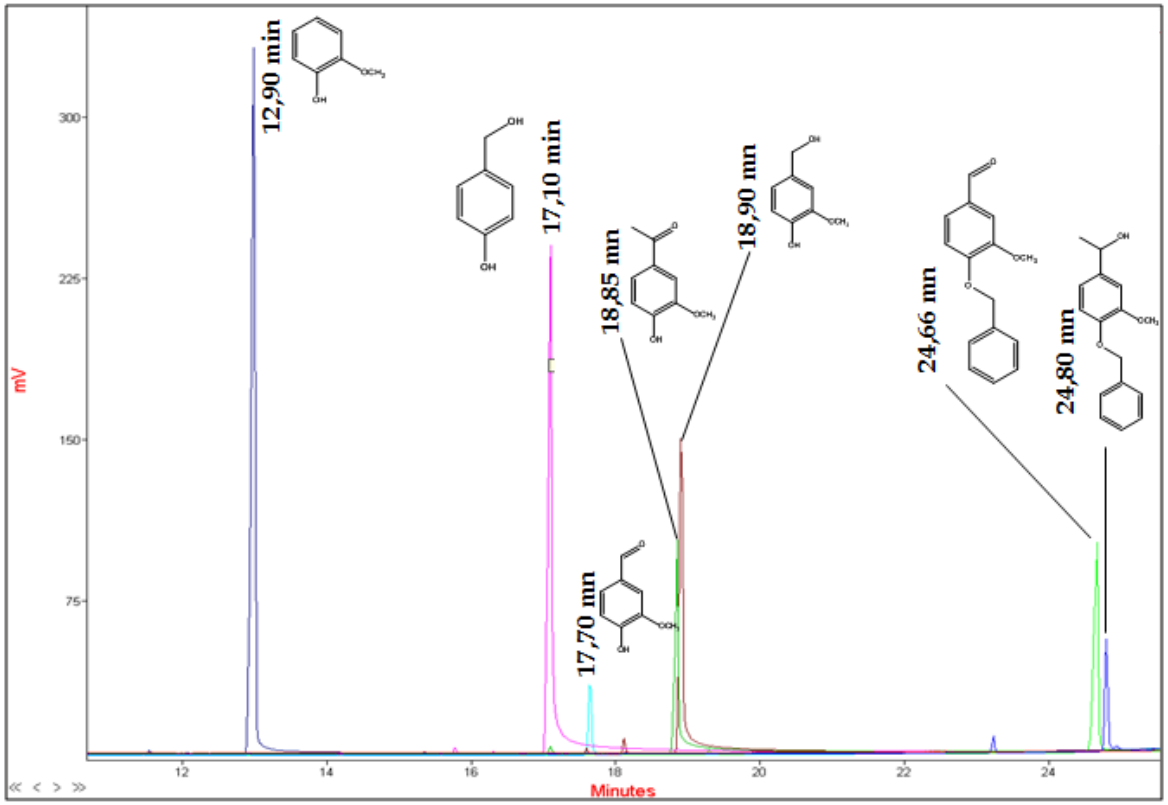


Figure 112 : Chromatogrammes GC de molécules monomères et dimères de structures connues après silylation.

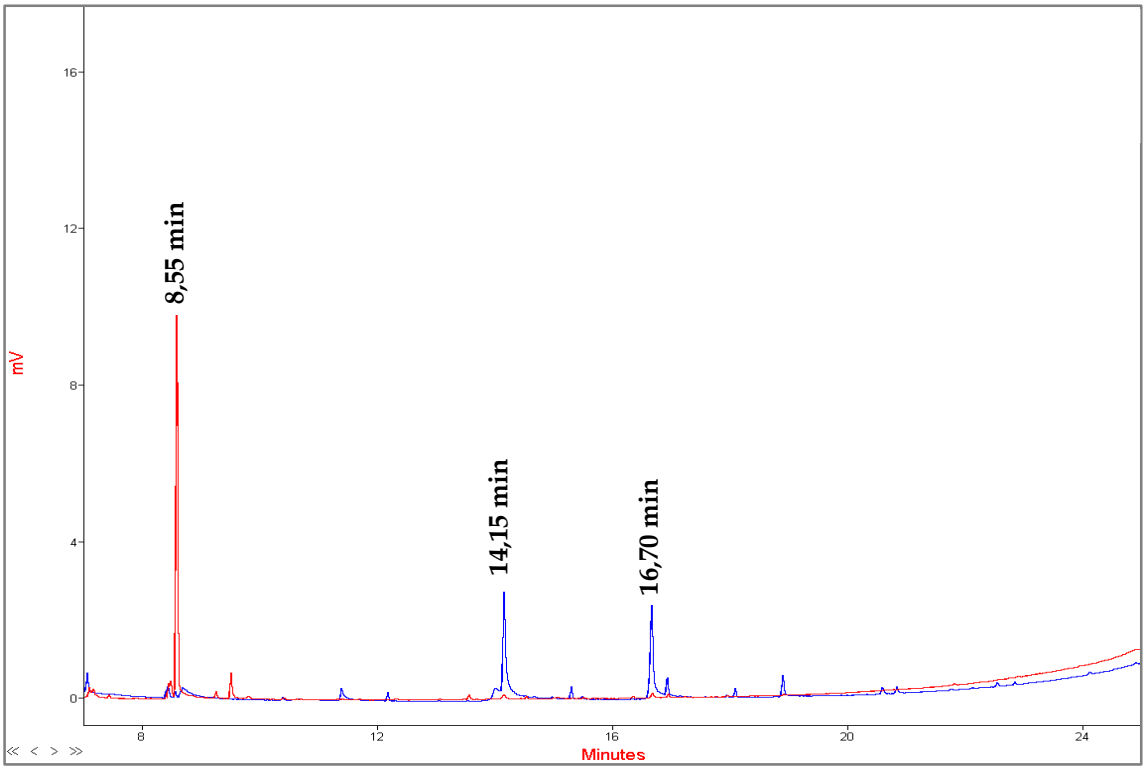


Figure 113 : Chromatogrammes GC des produits issus de la dégradation du lot 2 en présence de l'AcOEt (en bleu) et de la MIBC (en rouge) après silylation.

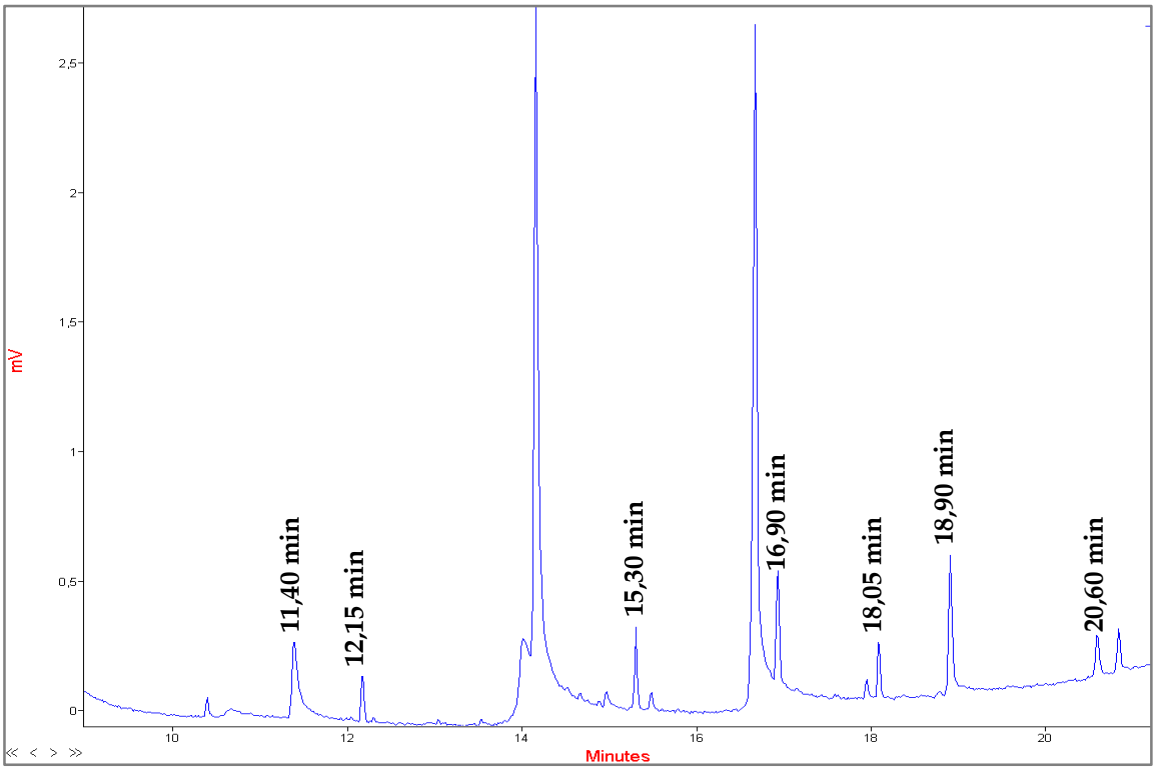


Figure 114 : Agrandissement du chromatogramme GC des produits issus de la dégradation du lot 2 en présence de l'AcOEt après silylation.

V.3. Chromatographie en phase liquide (HPLC et LC-MS)

Analyses HPLC

Les mêmes produits de dépolymérisation - provenant du lot 2 en présence de l'AcOEt et de la MIBC - ont été analysés par HPLC en mode isocratique avec un système d'éluent eau/méthanol (70/30) contenant 0,2 % (v/v) d'acide formique (Figure 115). De façon surprenante les chromatogrammes des produits sont identiques pour les deux procédés utilisés (l'un utilisant l'AcOEt, l'autre la MIBC) malgré des profils SEC (Figure 109) et GC (Figure 113) très distincts. Les temps de rétention des trois principaux pics observés à RT 3,0 min, 4,1 min et 11,2 min ont été comparés avec ceux des standards analysés dans les mêmes conditions et répertoriés dans le Tableau XX. Encore une fois, ces valeurs de temps de rétention sont compatibles avec des monomères issus de la dépolymérisation de la lignine. Malheureusement, aucune correspondance directe ne semble exister entre les standards utilisés et les produits de dépolymérisation issus du lot 2.

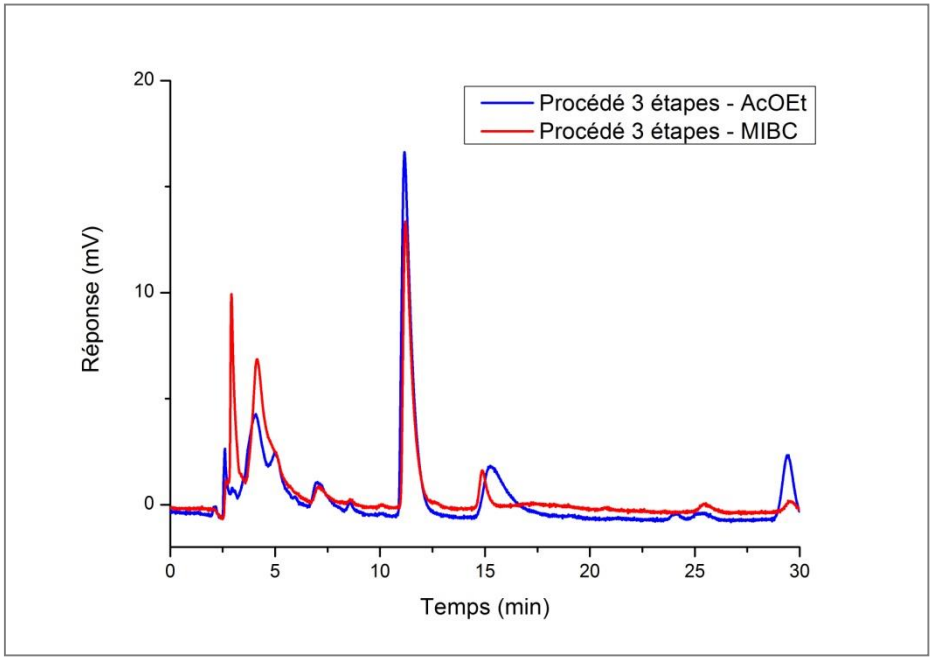


Figure 115 : Chromatogramme HPLC des produits de dégradation du lot 2.

Tableau XX : Résultats des analyses HPLC de standards dérivés de la lignine.

Standards	Temps de rétention (min)
Hydroquinone	4,4
Benzoquinone	6,2
Alcool 4-hydroxybenzylique	6,7
Alcool vanillique	7,7
Vanilline benzylée	14,0
Acide vanillique	16,4
Acide coumarique	21,9
Acide férulique	24,6
Vanilline	25,5
Acétovanillone	26,7
2-6-diméthoxy phénol	31,4
Gaïacol	33,1
Acide benzoïque	36,3

Analyses LC-MS

Les produits issus de la dépolymérisation du lot 2 en présence de l'AcOEt ont également été analysés en chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse. Ces analyses ont été conduites à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV). Les conditions de chromatographie ont été mises au point à partir d'un mélange de molécules aromatiques de structures connues (l'acide coniférylique, la vanilline et la divanilline). Le chromatogramme UPLC des produits de dépolymérisation du lot 2 est présenté en Figure 116. Quatre pics majoritaires sont observés à RT 9 min, 10 min, 11 min et 11,4 min. Les m/z correspondant à ces pics sont respectivement de 258, 444, 257 et 171. Ils pourraient correspondre à des monomères, dimères et trimères de lignine tels que ceux visés dans cette étude. Le pic à RT 10 min possède un très faible taux de réponse en UV (détection à 280 nm). C'est un résultat surprenant puisque les structures attendues devraient être majoritairement de type aromatique. Néanmoins, les trois autres pics répondent en UV en plus du signal en TIC (détection universelle), ce qui est plus conforme à nos attentes.

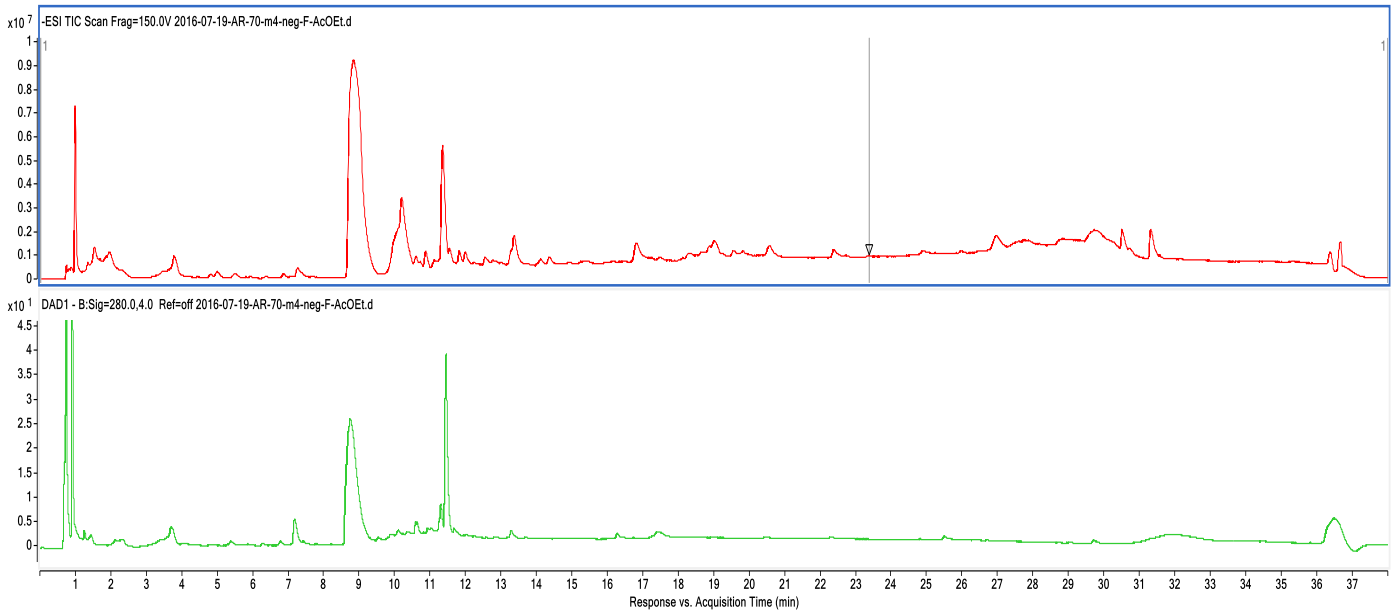


Figure 116 : Chromatogramme UPLC des produits issus de la dépolymérisation du lot 2 en présence de l'AcOEt. En rouge : détection universelle. En vert : détection UV (280 nm).

Les masses correspondant aux pics majoritaires ont été appelées et isolées informatiquement. Un logiciel a été utilisé afin de générer des propositions de formules brutes (sur la base des atomes C, H, O, N et S) à partir des spectres de masse des quatre molécules (ou fragments) majoritaires. Malheureusement, les taux de correspondance étaient très faibles pour chacun des cas (entre 70 et 90 %) et les formules brutes proposées ne semblaient pas cohérentes avec les structures attendues (taux anormalement élevé de soufre). Les structures de ces différents produits n'ont ainsi pas pu être élucidées de cette façon.

L'analyse LC-MS a été reconduite afin de fragmenter les molécules issues des quatre masses majoritaires selon la méthode MS-MS (ou MS tandem). Les spectres sont obtenus en mode d'ionisation négatif. Des propositions structurales ont pu être émises à partir des fragments obtenus et d'informations tirées de la littérature[17–19].

Le spectre MS-MS correspondant au pic éluant à RT 9 min (m/z 258) est présenté en Figure 117. Ce spectre présente une perte d'un fragment neutre de m/z 64 correspondant à une molécule SO_2. Ce signal pourrait être attribué à l'ABTS. En effet, ce médiateur comporte deux fonctions SO_3H et elle est la seule source d'atomes de soufre présente dans notre système. En mode négatif, l'ABTS se trouve sous la forme d'un dianion de m/z 256, alors que notre échantillon possède un m/z de 258. Cependant, une étude de Marjasvaara *et al*. a montré que lors de l'oxydation de l'ABTS par la laccase, le pic observé à m/z 256 disparaissait au profit d'une nouveau pic à m/z 258[19]. De plus, les fragments ioniques issus de l'analyse de cet espèce correspondent aux fragments que l'on observe en Figure 118 (m/z 229 et m/z 165). D'après Marjasvaara *et al.*, cette molécule serait une forme oxydée de l'ABTS différente du cation radical et du dication habituellement observés lors de l'oxydation de ce médiateur. Ils formulent l'hypothèse que cette forme de l'ABTS est la forme médiatrice responsable de la réaction d'oxydation des espèces non phénoliques en présence de la laccase. En effet, le pouvoir oxydant du cation radical serait trop faible et le dication serait trop instable dans les conditions habituellement employées pour ce type de réaction. Aucune hypothèse n'est cependant émise quant à la structure de cette forme particulière de l'ABTS.

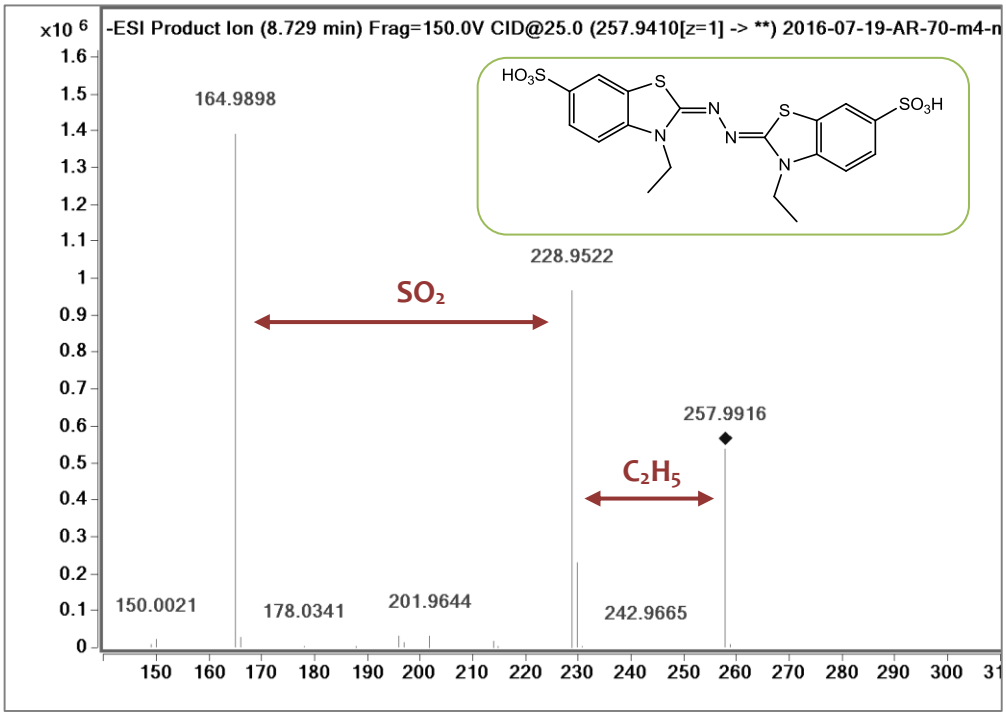


Figure 117 : Spectre MS-MS de l'espèce éluant à RT 9 min. Encadré : structure proposée.

La Figure 118 présente le spectre MS-MS de la molécule de m/z 243 éluant à RT 11 minutes. D'après la littérature, les pics moléculaires situés dans cette gamme de masses correspondent à des espèces de type dimère biphényle[17]. La liaison biphényle 5-5′ est une liaison condensée d'énergie de cohésion élevée et difficile à rompre. Il est donc probable de retrouver des espèces de type biphényle après un traitement en conditions douces comme celui effectué dans cette étude. La présence d'un fragment ionique à m/z 199 issu de la perte d'un radical C_2H_5 nous a conduit à proposer une structure de type biphényle comportant une fonction éthyle (molécule encadrée dans la Figure 119). Cette fonction pourrait être issue de la rupture d'une liaison de type β-1.

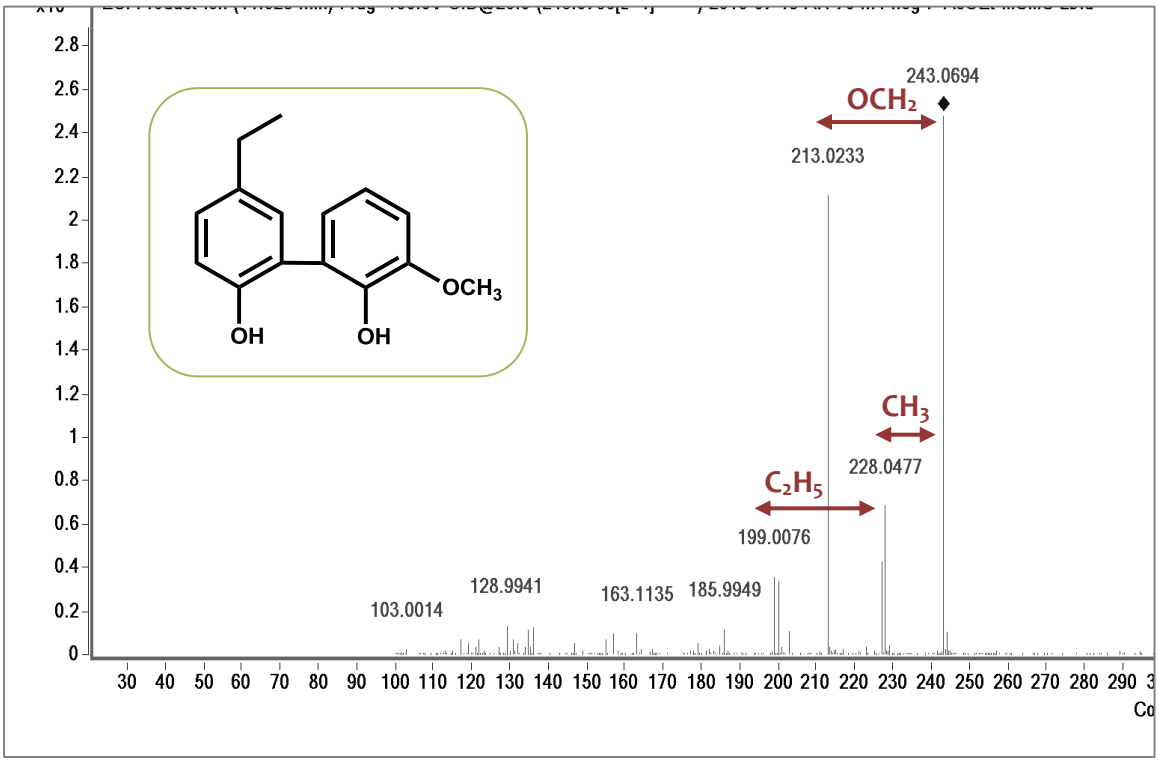


Figure 118 : Spectre MS-MS de l'espèce éluant à RT 11 min. Encadré : structure proposée.

Aucune correspondance n'a été trouvée dans la littérature pour les deux derniers spectres MS-MS obtenus (Figures 119 et 120). Le pic éluant à RT 10 min correspond à un fragment de m/z 444 (Figure 119). Il s'agit ainsi probablement d'une espèce trimère de lignine. Les deux fragments observés à m/z 307 et m/z 198 pourraient être issus respectivement de la perte d'un fragment de méthylgaïacol et d'anisole (méthoxybenzène), structures typiquement retrouvées dans la lignine. Cependant, aucune structure n'a pu être proposée à partir de ces informations.

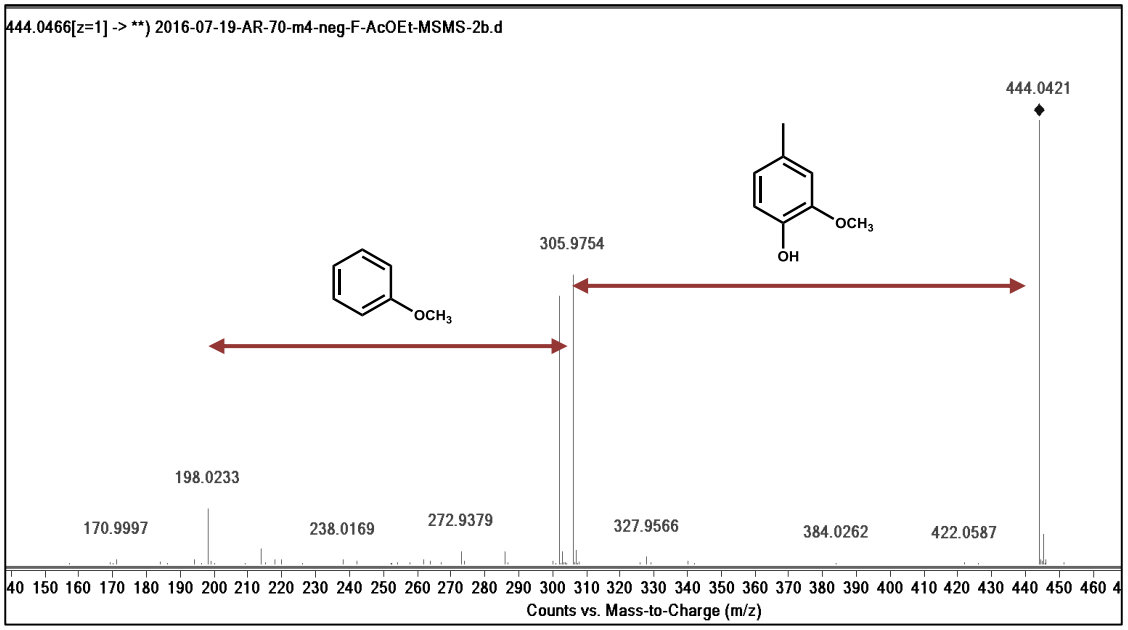


Figure 119 : Spectre MS-MS de l'espèce éluant à RT 10 min.

Le spectre MS-MS issu du pic à RT 11,4 min est présenté en Figure 120. Le pic moléculaire correspond à une espèce de faible masse molaire (m/z 171).

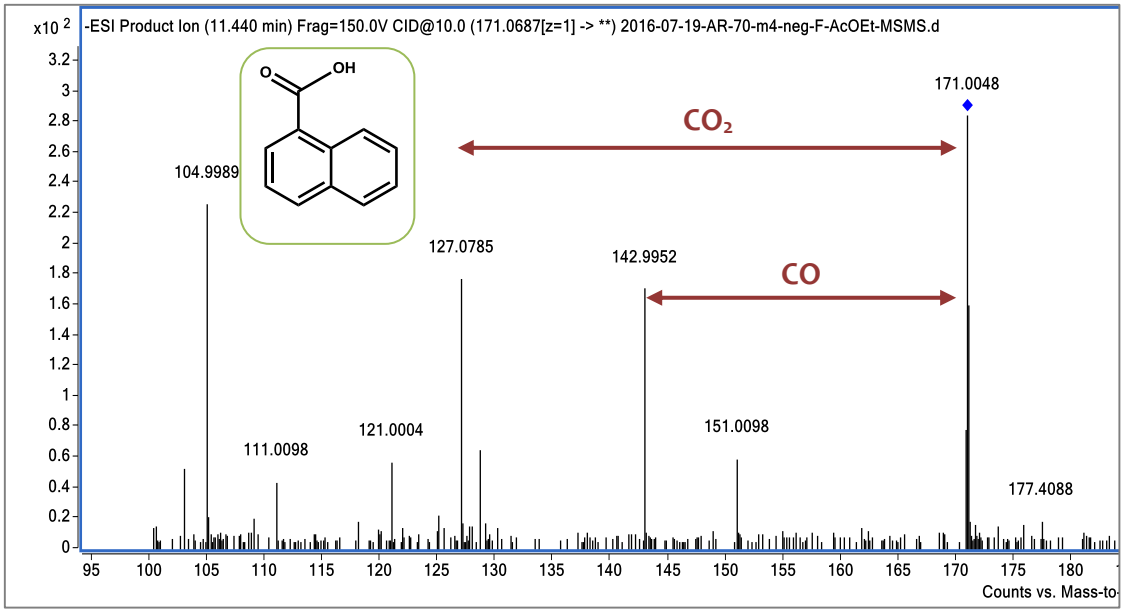


Figure 120 : Spectre MS-MS de l'espèce éluant à RT 11,4 min. Encadré : structure proposée.

Peu d'informations ont pu être obtenues à partir de l'analyse des fragments provenant de ce pic. Les tables de spectroscopie de masse établies par Beynon et Williams ont permis d'obtenir des formules brutes possibles pour un pic moléculaire à m/z 171[20]. Ces formules brutes possédaient pour la plupart des degrés d'insaturation très élevés (supérieurs ou égaux à 8) par rapport à la masse molaire de la molécule. Aussi, une structure proche du naphtalène a été proposée pour ce pic moléculaire. Celle-ci est illustrée dans l'encadré de la Figure 121.

Conclusion

La grande complexité des systèmes étudiés fait de ce travail un véritable défi qui nécessiterait un développement encore plus approfondi pour être mené à son terme.

Lors de cette étude, des conditions d'analyse LC-MS ont notamment été mises en places afin de permettre l'élucidation de structures issues de la dépolymérisation du lot 2. Cette technique de chromatographie couplée à la spectroscopie de masse semble être la méthode la plus prometteuse afin d'obtenir des informations structurales sur les espèces présentes dans ces échantillons. Elle nous a permis de mettre en évidence la présence de molécules aromatiques de type monomère à trimère. Par ailleurs, l'existence d'une forme oxydée du médiateur ABTS a été démontrée.

Différentes pistes devraient être explorées afin d'aboutir à l'élucidation d'un plus grand nombre de structures :

- les traitements de dépolymérisation de la lignine pourraient être conduits sur des volumes plus importants. Ainsi, un travail de fractionnement pourrait être effectué avant analyse afin de limiter le nombre d'espèces présentes dans chaque échantillon.

- les conditions de chromatographie pourrait être améliorées afin d'obtenir une meilleure résolution de chaque pic.

- l'analyse MS-MS de modèles synthétiques devrait être effectuée systématiquement pour confirmer les propositions structurales effectuées.

Références bibliographiques

1. Li, C., Zhao, X., Wang, A., Huber, G. W. & Zhang, T. Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chem. Rev.* **115,** 11559–11624 (2015).
2. Muurinen, E. Organosolv pulping: a review and distillation study related to peroxyacid pulping. (Oulun yliopisto, 2000).
3. Amorim, J., Oliveira, C., Souza-Corrêa, J. A. & Ridenti, M. A. Treatment of Sugarcane Bagasse Lignin Employing Atmospheric Pressure Microplasma Jet in Argon: Treatment of Sugarcane Bagasse Lignin Employing Atmospheric Pressure Microplasma Jet in Argon. *Plasma Process. Polym.* **10,** 670–678 (2013).
4. Argyropoulos, D. S. 31P NMR in wood chemistry: A review of recent progress. *Res. Chem. Intermed.* **21,** 373–395 (1995).
5. Crestini, C. & Argyropoulos, D. S. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative 31P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α-O-4 substructures. *J. Agric. Food Chem.* **45,** 1212–1219 (1997).
6. Wen, J.-L., Sun, S.-L., Yuan, T.-Q. & Sun, R.-C. Structural elucidation of whole lignin from Eucalyptus based on preswelling and enzymatic hydrolysis. *Green Chem* **17,** 1589–1596 (2015).
7. Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. & Del Rio, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* **8,** 187-204 (2005).
8. Boyle, C. D., Kropp, B. R. & Reid, I. D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **58,** 3217–3224 (1992).
9. S. Grelier & G. Koumba Yoya. Procédé de dépolymérisation de la lignine par des laccases. Brevet FR-3013713 (2013).

10. Sen, S., Patil, S. & Argyropoulos, D. S. Methylation of softwood kraft lignin with dimethyl carbonate. *Green Chem* **17,** 1077–1087 (2015).

11. Georgaki, I., Vasilaki, E. & Katsarakis, N. A Study on the Degradation of Carbamazepine and Ibuprofen by TiO_2 & ZnO Photocatalysis upon UV/Visible-Light Irradiation. *Am. J. Anal. Chem.* **5,** 518–534 (2014).

12. d'Acunzo, F., Barreca, A. M. & Galli, C. Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **31,** 25–30 (2004).

13. Agnihotri, N. & Mishra, P. C. Mechanism of Scavenging Action of *N* -Acetylcysteine for the OH Radical: A Quantum Computational Study. *J. Phys. Chem. B* **113,** 12096–12104 (2009).

14. Rahimi, A., Azarpira, A., Kim, H., Ralph, J. & Stahl, S. S. Chemoselective Metal-Free Aerobic Alcohol Oxidation in Lignin. *J. Am. Chem. Soc.* **135,** 6415–6418 (2013).

15. Rahimi, A., Ulbrich, A., Coon, J. J. & Stahl, S. S. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. *Nature* **515,** 249–252 (2014).

16. Kaiser, K. & Benner, R. Characterization of Lignin by Gas Chromatography and Mass Spectrometry Using a Simplified CuO Oxidation Method. *Anal. Chem.* **84,** 459–464 (2012).

17. Takada, D., Ehara, K. & Saka, S. Gas chromatographic and mass spectrometric (GC-MS) analysis of lignin-derived products from Cryptomeria japonica treated in supercritical water. *J. Wood Sci.* **50,** (2004).

18. Morreel, K. *et al.* Mass Spectrometry-Based Fragmentation as an Identification Tool in Lignomics. *Anal. Chem.* **82,** 8095–8105 (2010).

19. Marjasvaara, A., Jänis, J. & Vainiotalo, P. Oxidation of a laccase mediator ABTS as studied by ESI-FTICR mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **43,** 470–477 (2008).

20. J.H. Beynon & A.E. Williams. *Mass and abundance tables for use in mass spectrometry.* (Elsevier, 1963).

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif la valorisation d'une ressource naturelle issue de la biomasse lignocellulosique : la lignine. Ce biopolymère aromatique est une ressource non alimentaire générée en quantité importante comme co-produit de l'industrie papetière notamment et de la bioraffinerie lignocellulosique en générale. De par sa structure riche en noyaux aromatiques et en fonctions hydroxyle, la lignine possède un fort potentiel pour la production de molécules phénoliques biosourcées d'intérêt pour les industries chimique et pharmaceutique et d'oligomères de faible masse molaire comme base à l'élaboration de nouveaux polymères. Malheureusement, le caractère complexe et hétérogène de la lignine empêche à l'heure actuelle le développement à grande échelle de procédés de valorisation de ce biopolymère.

Lors de cette étude, une stratégie de dépolymérisation de la lignine a été mise au point afin d'obtenir des molécules aromatiques de faibles masses molaires d'origine naturelle. Cette stratégie, inspirée de la nature, met en jeu une enzyme sécrétée par le champignon lignolytique *Trametes versicolor* : la laccase.

La première partie ce manuscrit est consacrée à la mise en place de paramètres réactionnels optimaux pour le fonctionnement de la laccase. Ces expériences s'appuient notamment sur la détermination de l'activité de la laccase selon deux méthodes dans différentes conditions, ainsi que sur l'étude de l'oxydation de molécules modèles de la lignine.

Il a été montré que l'activité de la laccase de *Trametes versicolor* était maximale pour une température de 30 °C et un pH égal à 4,5. Dans ces conditions, l'emploi d'un co-solvant organique tel que le dioxane est indispensable afin de solubiliser la lignine. Or, la présence de ce solvant organique dans le tampon acétate affecte considérablement l'activité de la laccase. Une concentration volumique en co-solvant de 25 % a alors été choisie comme compromis afin d'obtenir une solubilité de la lignine satisfaisante tout en maintenant une activité enzymatique suffisamment élevée.

Ces paramètres ont directement été appliqués pour l'oxydation de modèles non phénoliques de lignine par plusieurs systèmes laccase-médiateur (LMS). L'efficacité supérieure des médiateurs synthétiques ABTS et HOBt par rapport aux médiateurs naturels a été mise en évidence. Bien que des cinétiques de réaction plus élevées aient été observées avec l'HOBt, l'ABTS s'est avéré être le médiateur le plus stable. L'analyse en voltammétrie cyclique de chaque médiateur a permis de confirmer cette observation.

Un des résultats les plus intéressants de ce travail concerne l'étude de plusieurs couples de médiateurs en association. Un important effet synergique a été mis en évidence pour les couples ABTS/HOBt et ABTS/méthyle syringate. L'utilisation de ces deux systèmes a entrainé une hausse remarquable de la conversion de la réaction d'oxydation d'un modèle monomère de lignine dès le premier jour de réaction (80 % de conversion pour le couple ABTS/HOBt contre 3 % et 14 % pour les médiateurs seuls ; 45 % de conversion pour le couple ABTS/méthyle syringate contre 3 % et 5 % pour les médiateurs seuls). Les mécanismes régissant cette synergie restent néanmoins flous. L'hypothèse selon laquelle cette effet de synergie est gouverné par une succession de réactions en cascade entre les deux médiateurs semblent la plus probable.

Plusieurs techniques d'immobilisation de la laccase ont été explorées. Il a été confirmé que le dépôt de couches alternées de polyélectrolytes en surface des systèmes immobilisés selon le procédé « layer-by-layer » (lbl) conférait à l'enzyme une plus grande tolérance aux variations de pH. L'immobilisation covalente de la laccase sur des billes d'alumine augmente sa rigidité structurale et donc sa stabilité. L'activité de la laccase est ainsi moins altérée en présence de co-solvant organique : l'activité de la laccase libre est divisée par trois en présence de 10 % (v/v) de dioxane, alors que les systèmes immobilisés maintiennent 60 % de leur activité dans les mêmes conditions.

Les laccases immobilisées chimiquement ont été utilisées pour l'oxydation d'un modèle monomère de lignine en présence de l'ABTS. Ces laccases immobilisées se sont avérées plus efficaces que l'enzyme libre. Alors que la cinétique d'oxydation en présence de la laccase libre diminue au cours du temps, le système immobilisé maintient un taux d'oxydation constant grâce à sa plus grande stabilité. De plus, ces systèmes autorisent le recyclage de l'enzyme. Ainsi, 10 cycles d'oxydation de l'ABTS ont pu être effectués avec une laccase immobilisée chimiquement tout en maintenant 70 % de l'activité initiale.

Ces systèmes aux performances très prometteuses n'ont pu être utilisés sur la lignine dans le cadre de ce travail. Il serait particulièrement intéressant de mettre à profit la meilleure stabilité de ces laccases immobilisées pour travailler dans des conditions opératoires que la laccase libre ne pourrait supporter. Par exemple, à des pH et des températures plus élevés, la solubilité de la lignine serait nettement améliorée, ce qui pourrait permettre de s'affranchir de l'utilisation de co-solvant organique. Par ailleurs, la sélectivité du LMS vis-à-vis des différentes fonctions potentiellement oxydables pourrait être modifiée par ces changements d'environnement réactionnel.

Les observations faites lors de la première partie de ce travail ont été prises en compte pour la seconde partie, traitant de l'oxydation d'une lignine de type organosolv par le LMS. Un travail de caractérisation (SEC, RMN…) de la lignine a d'abord été réalisé afin de déterminer les propriétés de cette lignine.

Une première stratégie pour la dépolymérisation de la lignine a été évaluée. La lignine est tout d'abord oxydée par le LMS dans un milieu tampon/dioxane (75/25, volumique), puis traitée au peroxyde d'hydrogène en conditions alcalines selon une réaction de type Dakin. Parmi les différents systèmes testés, seule l'association laccase-ABTS/HOBt a permis l'obtention d'espèces de faibles masses molaires telles que celles visées, confirmant ainsi l'effet de synergie déjà mis en évidence sur les modèles. La majorité des produits obtenus par cette méthode étant issus de réactions de couplage, une nouvelle stratégie a été mise en place afin de limiter ce phénomène.

Dans le dernier chapitre, la lignine a été traitée selon un procédé en trois étapes (fractionnement, oxydation LMS biphasique, réaction de Dakin). Le fractionnement organique - première étape du procédé - joue un rôle double. Il permet de limiter la quantité de lignine extraite en phase organique lors de la réaction LMS biphasique tout en éliminant une population de lignine de faible masse molaire, riche en fonctions hydroxyle phénoliques et donc prédisposée aux réactions de condensation.

L'oxydation de la lignine en milieu biphasique a été conduite en présence de deux solvants d'extraction différents : l'AcOEt et la MIBC. Ces solvants ont pour rôle d'extraire les molécules de faibles masses molaires générées pendant l'oxydation de la lignine par le LMS. Leur efficacité a été confirmée par la présence d'espèces de faibles masses molaires dans les profils SEC des phases organiques. Par ailleurs, la présence des solvants d'extraction dans le milieu entraine une chute de la solubilité de la lignine. Ainsi, les espèces issues des réactions de condensation précipitent et quasiment aucune population de masse molaire élevée n'est retrouvée dans les parties solubles, ce qui facilite le traitement de Dakin successif.

Ce procédé a été appliqué avec succès sur deux lots de lignines d'origines différentes. Dans tous les cas étudiés, entre 21 % et 42 % de la lignine initiale a pu être directement convertie en espèces de faibles masses molaires comprises dans la gamme de masses molaires visées. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour le lot 2 (lignine de conifère) en présence de l'AcOEt. Seul l'ABTS a été utilisé comme médiateur pour ces réactions en milieu biphasique. Il serait intéressant de vérifier si l'effet de synergie entre médiateurs est confirmé dans ces conditions.

Deux populations de lignine ne sont pas directement valorisables par ce procédé. La première est constituée de la fraction soluble dans le solvant d'extraction et est éliminée lors de la première étape de fractionnement. Cette population de lignine de faible masse molaire, hautement fonctionnalisée et soluble en phase organique possède un fort potentiel et pourrait être utilisées dans des applications de type résines phénoliques par exemple.

La seconde population non directement valorisable est constituée d'insolubles présents dès le début de la réaction LMS biphasique ou générés au cours de cette réaction. Dans le cas du lot 1, ces insolubles étaient composés d'espèces réticentes aux techniques de dépolymérisation employées.

À l'inverse, il a été montré que les insolubles du lot 2 étaient dus au fait qu'une limite de solubilité soit atteinte lors de l'oxydation LMS biphasique. Ces insolubles ont alors pu être isolés et retraités selon le procédé LMS biphasique suivi de la réaction de Dakin. Des espèces de faibles masses molaires - similaires à celles générées lors du procédé classique - ont ainsi pu être obtenues à partir de la phase insoluble. Bien que la quantité d'insolubles valorisables n'ait pas été estimée, leur traitement pourrait augmenter considérablement le rendement en molécules d'intérêt produites à partir du lot 2.

Plusieurs techniques d'analyses chromatographiques (SEC, GC, HPLC) ont été employées afin d'élucider les structures des produits obtenus après dépolymérisation de la lignine. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) nous a apporté le plus d'informations. Cette technique a révélé la présence d'ABTS résiduel, de deux dimères (de types biphényle et naphtalène) et d'un trimère au sein d'un échantillon issu de la dépolymérisation du lot 2 en présence d'AcOEt.

De nombreuses pistes pourraient être explorées pour poursuivre ce travail. Un des points essentiels seraient le développement de techniques d'analyse et de séparation efficaces pour l'élucidation des produits finaux. Cette étude pourrait alors mettre en évidence l'influence de paramètres comme le solvant d'extraction ou le type de lignine utilisé sur les structures obtenues après le traitement. En parallèle, de nouveaux procédés pourraient être développés afin de limiter la quantité d'espèces insolubles formées lors du LMS en mode biphasique. L'utilisation d'enzymes immobilisées résistant à des pH plus élevés pourrait être une solution à ce problème.

Ce travail propose une voie de valorisation de la lignine, une ressource naturelle dont le fort potentiel est encore trop peu exploité. Le procédé de dépolymérisation mis en place permet l'obtention de molécules phénoliques de faibles masses molaires d'intérêt potentiel pour l'industrie chimique. Ces résultats prometteurs nous permettent d'imaginer l'intégration d'un tel procédé dans les bioraffineries de demain.

Partie expérimentale

Sommaire

I. Matériel.....239

II. Techniques d'analyse.....241

II.1. Spectroscopie.....241

II.2. Chromatographie.....243

III. Modes opératoires.....245

III.1. Partie A.....245

III.2. Partie B.....254

Références bibliographiques.....257

I. Matériel

Sigma-Aldrich

La laccase de *Trametes versicolor* (>10 U/mg) est fournie par Sigma-Aldrich et a été utilisée sans purification supplémentaire.

Le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane, l'acétylacétonate de chrome(III), la laccase de *Trametes versicolor*, le dichlorométhane, l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), l'acide acétique glacial, l'acétovanillone, l'iodure de potassium (KI), le bromure de benzyle, le chlorure de sodium (NaCl), l'acétate d'éthyle (AcOEt), le borohydrure de sodium ($NaBH_4$), l'acide chlorhydrique (HCl), l'iodoéthane (EtI), l'éthanol, l'hydroxyde de baryum, l'acide homovératrique, le diisopropylamidure de lithium (LDA, solution à 2 M dans un mélange THF/heptane/éther), le tétrahydruroaluminate de lithium ($LiAlH_4$, solution à 1 M dans le THF), l'acide sulfurique (H_2SO_4, 95 %), le peroxyde d'hydrogène (30 %), le sulfate de diméthyle, le formate de sodium, le N,N-diméthyle formamide (DMF) et le tétrahydrofurane (THF) sont fournis par Sigma-Aldrich.

Fisher

La pyridine, le N,O-bis(triméthylsilyl trifluoro acétamide) (BSTFA), la méthylisobutyl cétone (MIBC), le sulfate de sodium, le dibrome, le formaldéhyde (37 %), le sulfate de manganèse ($MnSO_4$) et le chloroforme sont fournis par Fisher.

Alfa Aesar

L'endo-N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide, la soude en pastille (NaOH), l'acétate de sodium, le polystyrène sulfoné (PSS^-), le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH^+), les supports d'alumine activée (Al_2O_3) et le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) sont fournis par Alfa Aesar.

Euriso-top

L'ensemble des solvants deutérés est fourni par Euriso-top.

Prolabo

L'acide formique est fourni par Prolabo.

Fluka

La 4-vinylbenzène sulfonate, le chlorure d'ammonium et le méthanol sont fournis par Fluka.

Acros organics

Le gaïacol est fourni par Acros organics.

Life technology

La NHS-fluorescéine est fournie par Life technology.

Scharlau

Le dioxane est fourni par Scharlau.

VWR

Le carbonate de potassium (K_2CO_3) est fourni par VWR.

Polymer Standards Service

Les étalons polystyrène sulfoné sont fournis par Polymer Standards Service.

Air liquide

L'oxygène est fourni par Air liquide.

Solvay

Les deux lots de lignine organosolv sont fournis par Solvay.

Tous les réactifs sont utilisés sans purification supplémentaire.

II. Techniques de caractérisation

II.1. Spectroscopie

Spectroscopie infrarouge (IR-TF)

Les spectres IR sont enregistrés sur un spectromètre de type Vertex 70 (Bruker). La veille, les échantillons sont séchés sous vide à 40°C et directement analysés sous forme solide en mode ATR. L'acquisition est réalisée avec 32 scans, à une résolution de 4 cm^{-1}, sur une fenêtre comprise entre 4 000 et 400 cm^{-1}.

Spectroscopie à résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN sont conduites à 298 K sur un appareil Bruker Avance III HD muni d'une cryosonde directe 5 mm. La sonde opère à 400,3 MHz pour les analyses ^{1}H, à 100,7 MHz pour les carbones (^{13}C) et à 162,0 MHz pour les phosphores (^{31}P). Les données sont traitées avec le logiciel Mestrenova.

RMN 2D HSQC (^{1}H-^{13}C)

Les spectres de corrélation proton-carbone sont acquis sur une largeur spectrale de 24 000 Hz pour le carbone et de 4 800 Hz pour le proton. Le nombre d'incréments collectés est fixé à 128 pour le carbone, avec un temps de relaxation de 5 secondes. L'analyse proton est effectuée avec 16 incréments collectés et un temps de relaxation de 1,5 secondes. L'acquisition est conduite avec le programme d'impulsion hsqcedetgpsis2.3 de la base de données Bruker Topspin.

Chaque analyse est réalisée sur 20 mg de lignine dissous dans 0,5 mL de DMSO-d_6. Le signal résiduel du solvant deutéré est utilisé comme référence pour la calibration des analyses ($\delta^{13}C$: 39,5 ppm ; $\delta^{1}H$: 2,50 ppm).

RMN ^{31}P

Pour chaque analyse RMN ^{31}P, les fonctions hydroxyle de la lignine sont phosphorylées par le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphspholane (TMDP)[1]. Pour cela, une masse précise de lignine sèche comprise entre 40 et 45 mg est solubilisée dans 0,5 mL d'un mélange pyridine/chloroforme deutéré (1,6/1, v/v) ainsi que 2 à 5 mg d'endo-N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide utilisé comme référence interne[2] et 1 mg d'agent de relaxation (acétylacétonate de chrome(III)). Lorsque le milieu est homogène, 250 µL d'agent de phosphorylation (TMDP) sont ajoutés et la solution est agitée pendant 30 minutes. Puis, 400 µL du mélange et 100 µL de $CDCl_3$ sont transférés dans un tube RMN et immédiatement analysés.

L'acquisition est conduite avec le programme inverse gate zgOig de Bruker Topsin sur une fenêtre spectrale de 10 000 Hz. Le temps de relaxation est fixé à 5 secondes, avec 128 incréments collectés.

Les proportions de chaque type d'hydroxyle sont déterminées par intégration des zones recensées dans le Tableau suivant :

Tableau XXI : Déplacements chimiques des différents types d'OH de la lignine en RMN ^{31}P.

Type de groupement OH	Zone de déplacements chimiques (ppm)
Aliphatique	149,5-146,5
S phénolique	144,5-142,5
Phénol condensé	142,0-140,5
G phénolique	140,5-139,5
H phénolique	139,0-138,0
COOH	136,0-134,8

Spectroscopie UV-Vis

Les analyses en spectroscopie UV-Vis sont réalisées sur un spectroscope Cary-100 commercialisé par Agilent Technologies dans des cuves en quartz de trajet optique 10 mm (100-QS, Hellma Analytics). Le spectroscope est muni d'un bloc Peltier permettant de réguler la température de l'échantillon.

II.2. Chromatographie

Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les analyses HPLC sont réalisées à l'aide d'un système commercialisé par Thermo Fisher (pompe P 2000, passeur AS 3000 et détecteur UV 1000). L'appareil est muni d'une colonne en phase inverse de type C18 fournie par Phenomenex.

Les analyses sont conduites en mode isocratique dans un mélange équivolumique d'eau contenant 0,1 % (v/v) d'acide formique et de méthanol. Le débit est fixé à 1 mL/min. Les échantillons sont solubilisés à 1 mg/mL dans un mélange eau-méthanol de même composition que l'éluent, puis filtrés sur acétate de cellulose (45 µm) avant injection.

Chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS)

Les analyses LC-MS sont conduites sur un système UPLC-DAD-ESI-Q-TOF fourni par Agilent. Il est composé d'une pompe binaire (1290 Infinity), d'un compartiment à colonne à thermostat (1290 Infinity Thermostatted Column Compartment), d'un injecteur d'échantillon (1290 Infinity Autosampler) et d'un détecteur à barrette de diodes (1290 Infinity Diode-Array Detector) couplé à un spectromètre de masse ESI-Q-TOF (Agilent 6530 Accurate Mass).

La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Eclipse Plus C-18 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm, Agilent). Les solvants utilisés pour ces analyses sont : de l'eau acidifiée avec de l'acide formique à 0,1 % (solvant A) et du méthanol acidifié avec de l'acide formique à 0,1 % (solvant B). Le débit est fixé à 0,3 mL/min. Le gradient pour l'analyse chromatographique était : 0 % de solvant B pendant 1 min, de 0 % à 20 % de solvant B en 7 min, 20 % à 50 % de solvant B en 2 min, 50 % à 80 % de solvant B en 15 min, 80 % à 100 % de solvant B en 5 min puis 100 % de solvant B pendant 5 min. La colonne d'UPLC a été équilibrée selon les conditions initiales pendant 3 min. La détection UV est définie à 280 nm.

Les conditions du spectromètre de masse ESI-Q-TOF sont les suivantes : la température de l'ionisateur en mode négatif est fixée à 300°C pour un débit de gaz de 9 L/min. La température et le débit de gaz de gainage sont de 350°C et de 11 L/min respectivement. La tension capillaire est de 4 000 V avec le fragmenteur fixé à 200 V. Les données obtenues ont été traitées par le logiciel MassHunter Qualitative Analysis.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les distributions des masses molaires sont évaluées par analyse SEC en conditions alcalines. L'appareillage utilisé est composé d'une pompe de type P 400, d'un passeur d'échantillons de type AS 3000 et d'un détecteur UV de type UV 2000 réglé à 280 nm, tous fournis par Thermo Fisher. Trois colonnes fournies par Tosoh Bioscience sont associées en série : TSK G3000 PW/TSK G4000 PW/TSK G3000 PW.

L'éluent utilisé est de l'eau ajustée à pH 12 avec une solution de NaOH à 1M. Le débit est fixé à 1 mL/min pour un temps d'analyse de 50 minutes. Les échantillons sont solubilisés dans une solution d'eau à pH 12 contenant 1 % massique de 4-vinylbenzènesulfonate de sodium employé comme marqueur de débit, puis filtrés sur acétate de cellulose (45 µm) avant injection.

La courbe de calibration (Figure 121) est effectuée grâce au logiciel Cirrus avec des étalons de type polystyrène sulfoné.

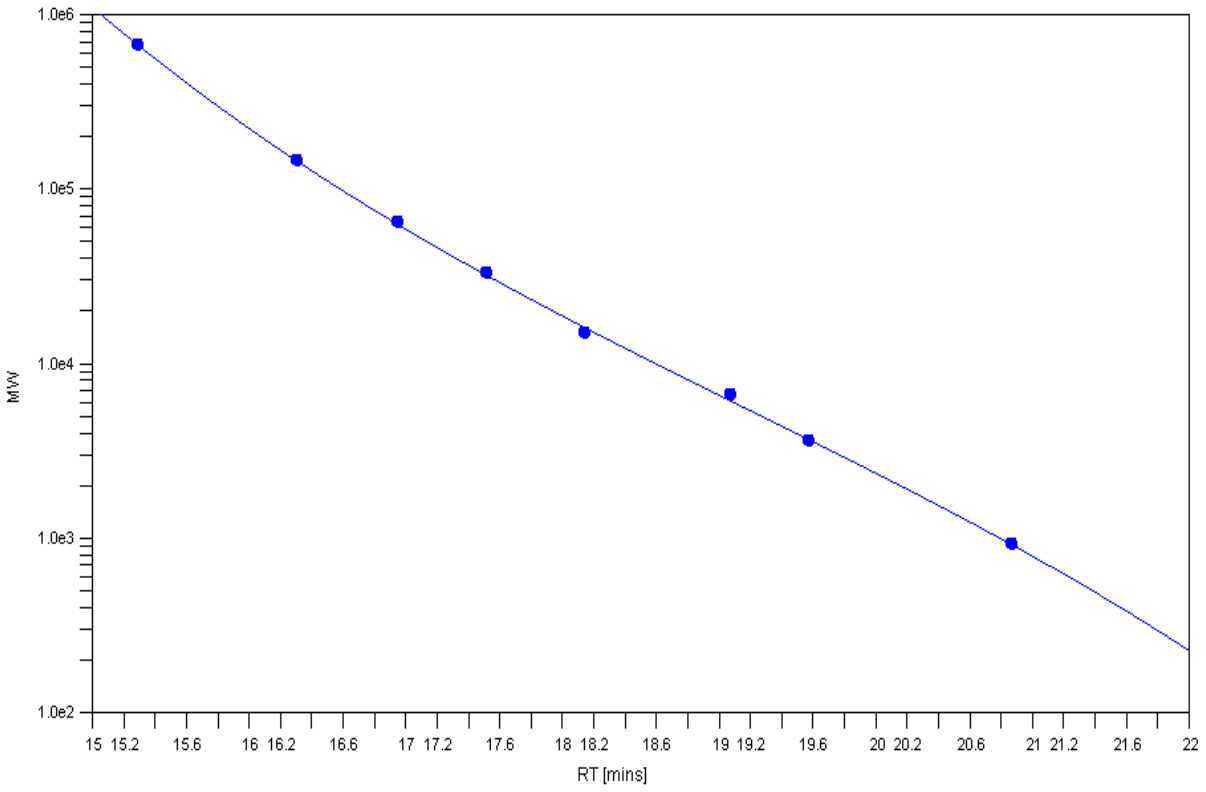


Figure 121 : Courbe de calibration SEC dans l'eau basique. Étalons PSS.

Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les caractérisations en GC-MS sont réalisées par le laboratoire CESAMO (ISM, Université de Bordeaux) sur un chromatographe Thermo Trace GC ultra couplé à un détecteur de masse Thermo ISQ. Pour ces analyses, une colonne capillaire TG-SQC, de dimension 15 m x 0,25 mm, composée de 5% de phénylméthylpolysiloxane, 95 % diméthylpolysiloxane est utilisée. Le programme de température est composé d'un isotherme d'une minute à 50°C, suivi d'une montée en température jusqu'à 300°C à une vitesse de 15°C/min et d'un isotherme d'une minute à 300°C. La température d'injection est de 230°C en « split mode ». Le gaz porteur (hélium) est injecté dans la colonne à un débit de 1,2 mL/min.

L'acquisition du spectre de masse par ionisation électronique (EI) est effectuée à 70 eV dans une gamme comprise entre 32 et 800 m/z. Les propositions structurales des composés majoritaires ont été effectuées d'après la base de données NIST 2008.

Chromatographie « flash » en phase liquide

La purification des produits par chromatographie flash est effectuée sur un appareil Grace Reveleris équipé de colonnes de silice du même fournisseur. Le système est muni d'un détecteur universel ELSD et de deux détecteurs UV fixés à 280 et 254 nm. Un système dichlorométhane/méthanol est employé comme éluent.

III. Modes opératoires

III.1. Partie A

Mesure de l'activité de la laccase : méthode ABTS

L'activité de la laccase est déterminée par suivi spectroscopique de la réaction d'oxydation de l'ABTS selon une méthode dérivée de Bohlin *et al*[4]. Une quantité connue de laccase est dissoute dans 3 mL de tampon acétate à pH 4 (les concentrations utilisées sont typiquement comprises entre 0,05 et 0,10 mg/mL). La solution est placée dans une cuve en quartz et 1 mL d'une solution d'ABTS à 0,1 mM dans le tampon acétate est ajouté pour démarrer la réaction. L'évolution de l'absorbance à 414 nm est suivie au cours du temps par spectroscopie UV. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la formation d'un µmol de cation $ABTS^{2+}$ par minute.

Mesure de l'activité de la laccase : méthode gaïacol

La méthode de détermination de l'activité de la laccase par l'oxydation du gaïacol est très proche de la méthode ABTS. 3 mL d'une solution de laccase dans le tampon acétate de concentration connue sont mis en contact avec 1 mL d'une solution de gaïacol à 0,1 mM dans le même tampon dans une cuve en quartz. La formation du tétragaïacol généré par cette réaction est suivie par spectroscopie UV à 470 nm. Une unité d'activité enzymatique est définie par le changement d'absorbance de 0,01 par minute et par mL[5].

Protocole pour l'évaluation de l'influence des paramètres réactionnels sur l'activité de la laccase

Afin d'évaluer l'influence de certains paramètres réactionnels, 3 mL d'une solution de laccase à 1 U/mL (selon la méthode ABTS) sont mis en contact avec 1 mL d'une solution d'ABTS (ou de gaïacol) à 0,1 mM dans le même solvant. L'activité de la laccase est déterminée par spectroscopie en fonction de l'évolution de l'absorbance à 414 nm (470 nm pour le gaïacol).

La composition du solvant diffère selon les paramètres à étudier (différents pH, utilisation d'un co-solvant…). Pour les essais à différentes températures, la cuve contenant la solution enzymatique sans substrat est placée dans la chambre thermostatée du spectroscope jusqu'à atteindre la température d'étude. La solution de substrat (ABTS ou gaïacol) est ajoutée ensuite.

Synthèse de l'ACVBnRéd

L'ACVBnRéd est synthétisée en deux étapes selon le schéma suivant :

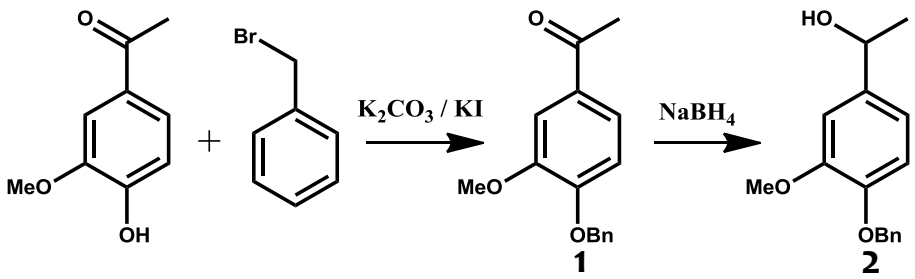


Figure 122 : Synthèse de l'ACVBnRéd

Synthèse de l'intermédiaire 1

Pour synthétiser l'intermédiaire **1**, 5 g d'acétovanillone (1 éq) sont tout d'abord dissous dans 50 mL d'acétone. Puis, une même quantité (1,5 éq) de K_2CO_3 et de KI sont ajoutés et la solution est agitée pendant 30 minutes. Le bromure de benzyle (1,5 éq) est alors introduit dans le mélange et la solution est portée à reflux pendant 4 heures. Les sels insolubles sont éliminés par filtration et rincés à l'AcOEt. La partie soluble est évaporée, reprise dans l'AcOEt et lavée à l'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée au sulfate de sodium, filtrée, puis évaporée.

Synthèse du composé 2 (ACVBnRéd)

L'intermédiaire **1** (3 g) est réduit par le $NaBH_4$ (5 éq) dans 30 mL d'un mélange THF/méthanol équivolumique. La solution est agitée pendant 1h30 à température ambiante, puis hydrolysée avec une solution d'acide chlorhydrique à 5 %. La solution est évaporée sous vide, reprise dans l'AcOEt et lavée à l'eau. La phase organique est séchée au sulfate de sodium, filtrée, puis évaporée.

Synthèse de l'ACVEtRéd

L'ACVEtRéd est synthétisée en deux étapes selon le schéma suivant :

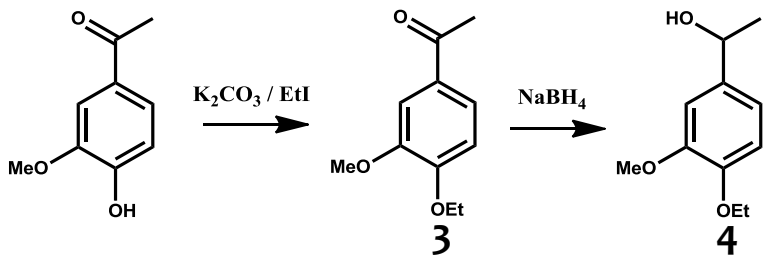


Figure 123 : Synthèse de l'ACVEtRéd.

Synthèse de l'intermédiaire 3

À 1 g d'acétovanillone (1 éq) dissous dans 20 mL d'acétone, sont ajoutés 1,25 g de K_2CO_3. Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante, puis 0,73 g d'iodoéthane (EtI, 1,5 éq) est ajouté. La solution est portée à reflux et agitée pendant 12 heures. Les sels sont alors éliminés par filtration. Le filtrat est évaporé sous vide, puis le résidu est repris dans l'AcOEt et lavé à l'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée au sulfate de sodium, filtrée, puis évaporée.

Synthèse du composé 4 (ACVEtRéd)

Le composé **4** est obtenu après réduction de l'intermédiaire **3** par le $NaBH_4$. La réaction est effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites pour la synthèse du composé **2**.

Synthèse du dimère β-O-4

La figure suivante illustre les différentes étapes de synthèse du dimère β-O-4 :

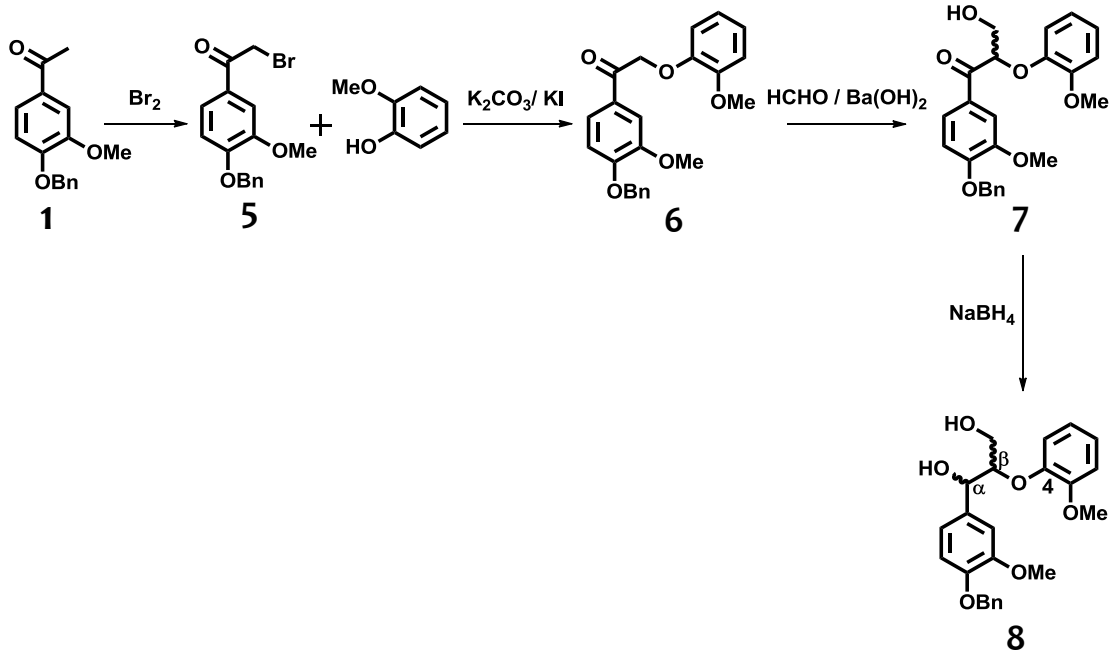


Figure 12431 : Synthèse du dimère β-O-4.

Synthèse de l'intermédiaire 5

L'intermédiaire **5** est issu de la bromation du composé **1**. Dans cette réaction, 4 g de **1** sont dissous dans 75 mL de chloroforme. Une solution de dibrome (1,1 éq) dans le chloroforme (0,85 ml de Br_2 dans 25 mL de $CHCl_3$) est ajoutée goutte à goutte à 0°C pendant une heure grâce à une ampoule de coulée. La solution est agitée pendant 2 heures à température ambiante, puis 10 mL d'une solution saturée en hydrogénocarbonate de potassium sont ajoutés au milieu. Le mélange est agité pour 10 minutes supplémentaires, puis lavé à l'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée au sulfate de sodium, filtrée et évaporée sous vide. Finalement, le résidu est recristallisé dans l'éthanol.

Synthèse de l'intermédiaire 6

L'intermédiaire **6** est issu de la condensation du gaïacol et de l'intermédiaire 5. Le gaïacol (0,39 mL) est dissous dans 10 mL d'acétone, puis le K_2CO_3 et le KI sont ajoutés en quantité équimolaire (1,5 éq). Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'intermédiaire **5** (1 éq) est ajouté lentement. La solution est portée à reflux et agitée pendant 12 heures. Les sels sont alors éliminés par filtration. Le filtrat est évaporé sous vide, puis le résidu est repris dans l'AcOEt et lavé à l'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée au sulfate de sodium, filtrée, puis évaporée.

Synthèse de l'intermédiaire 7

La formylation de l'intermédiaire **6** conduit à la formation de l'intermédiaire **7**. L'intermédiaire **6** (2 g) est dissous dans un mélange contenant 20 mL de dioxane et 2 mL d'eau distillée. Puis, 2 g d'hydroxyde de baryum ($Ba(OH_2)$) et 2,4 mL d'une solution de formaldéhyde à 37 % sont ajoutés à la solution. Le mélange est agité pendant 3 heures à température ambiante, puis évaporé sous vide. Le résidu est repris dans le dichlorométhane puis lavé avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase organique est ensuite séchée au sulfate de sodium, filtrée et concentrée sous vide. L'intermédiaire **7** est alors directement purifié par chromatographie flash avec un système d'éluents (dichlorométhane/méthanol).

Synthèse du composé 8 (dimère β-O-4)

Le dimère β-O-4 est obtenu par réduction de l'intermédiaire **7** par le $NaBH_4$ dans les conditions déjà décrites pour la synthèse du composé **2**.

Synthèse du dimère β-1

Le dimère β-1 a été synthétisé selon le schéma suivant :

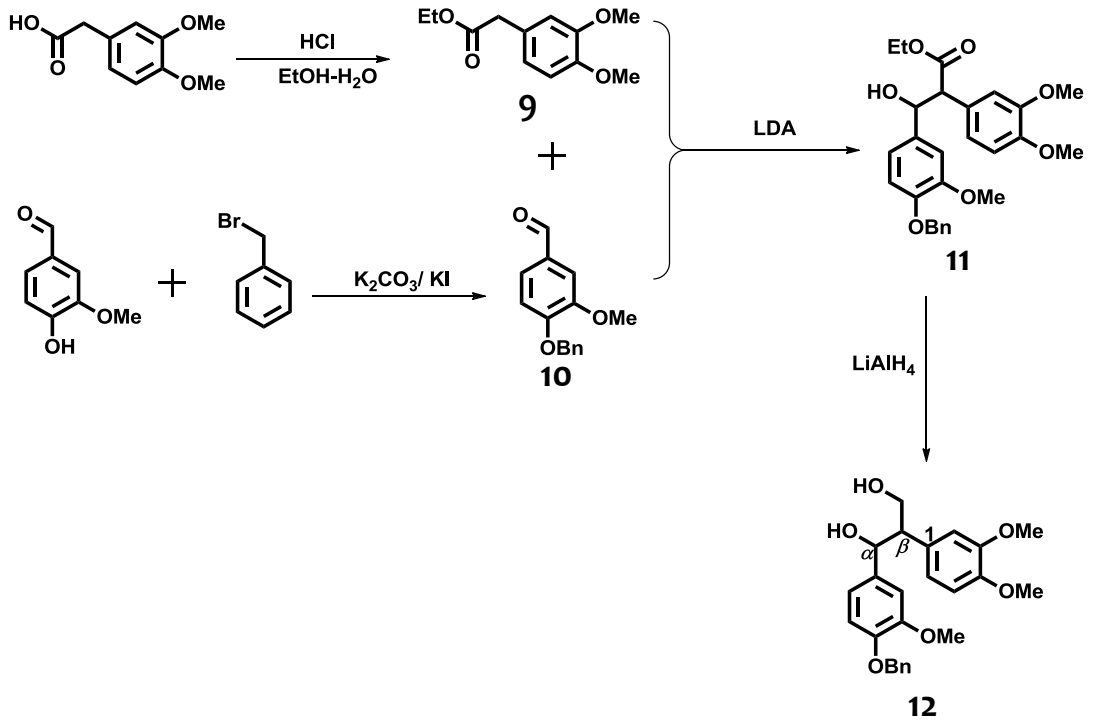


Figure 125 : Synthèse du dimère β-1

Synthèse de l'intermédiaire 9

L'intermédiaire **9** est issu de l'éthylation de l'acide homovératrique. Celui-ci est dissous dans 30 mL d'un mélange eau/éthanol (1/9, v/v), puis 1 mL d'une solution d'HCl à 37 % est ajouté à la solution. Le mélange est agité pendant 24 heures à 110°C sous reflux. La solution est évaporée sous vide. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle puis lavé avec une solution de carbonate de sodium à 5%. La phase organique est séchée au sulfate de sodium, filtrée puis évaporée sous vide.

Synthèse de l'intermédiaire 10

La benzylation de la vanilline pour l'obtention de l'intermédiaire **10** est conduite dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la synthèse de l'intermédiaire **1**.

Synthèse de l'intermédiaire 11

L'intermédiaire **11** est issu du couplage entre les intermédiaires **9** et **10**. Une solution de diisopropylamidure de lithium (LDA, 2,25 mL) à 2M dans un mélange THF/éther/heptane est dissous dans 20 mL de THF anhydre sous atmosphère inerte à -78°C. L'intermédiaire **9** (1 g) est ajouté, la solution est agitée pendant une heure à -78°C, puis l'intermédiaire **10** est introduit dans le milieu goutte à goutte. Après trois heures de réaction, la solution est portée à température ambiante et hydrolysée à l'eau. Le produit est extrait à l'AcOEt, séché au sulfate de sodium et évaporé sous vide. Le résidu obtenu est rincé à l'éther diéthylique.

Synthèse du composé 12 (dimère β-1)

L'intermédiaire **11** est réduit par le tétrahydruroaluminate de lithium ($LiAlH_4$) pour obtenir le dimère β-1. Une solution de $LiAlH_4$ à 1,0 M dans le THF est diluée dans 40 mL de THF anhydre (1,1 éq). La solution est agitée pendant 10 minutes à 0°C, puis 1 g de l'intermédiaire **11** est ajouté lentement à la même température. La solution est agitée pendant une heure à température ambiante, puis hydrolysée à 0°C avec 10 mL d'une solution d'HCl à 5 %. Le produit est extrait au dichlorométhane, séché au sulfate de sodium et évaporé sous vide. Le résidu est rincé à l'éther diéthylique.

Oxydation de modèles de lignine par le LMS

L'oxydation des modèles de lignine par le LMS est conduite sur 0,1 mmol de modèle dissous dans 5 mL de dioxane (1/4 du volume total). Une solution contenant 0,01 mmol de médiateur dans 10 mL de tampon acétate à pH 4,5 est ajoutée au milieu, et la solution est alimentée en oxygène pendant 20 minutes. Puis 5 mL de solution de laccase à 4 U/mL dans le tampon acétate sont ajoutés. La solution est agitée magnétiquement à 250 tours/min à température ambiante.

Des prélèvements de 0,5 mL sont effectués périodiquement et analysés en HPLC (éluent eau/méthanol (50/50, v/v), mode isocratique) afin de suivre l'évolution de l'oxydation.

Voltammétrie cyclique

Les analyses électrochimiques sont conduites sur un potentiostat/galvanostat E 263A (Princeton Applied Research). Une solution d'Ag/AgCl est employée pour l'électrode de référence. Elle est associée à une électrode de travail en carbone vitreux et à une contre-électrode de platine.

Les analyses sont conduites dans un tampon acétate à pH 4,5 contenant 25 % (v/v) de dioxane. Les échantillons sont dissous dans ce solvant à une concentration de 0,2 mM. Le balayage est effectué entre -150 mV et +1000 mV à une vitesse de 200 mV/s.

Synthèse des m-lbl

La synthèse des microcapsules **m-lbl** est conduite selon une méthode dérivée de la littérature[6,7]. Une solution aqueuse de $MnSO_4$ à 0,016 M est ajoutée à une solution aqueuse de NH_4HCO_3 à 0,16 M de volume équivalent sous agitation vigoureuse. Puis, de l'éthanol est incorporé au milieu jusqu'à une concentration de 5 % (v/v). La solution est alors incubée pendant 1 heure à 50°C. Les particules obtenues sont séparées par centrifugation à 1160 g et lavées à l'eau distillée.

Pour le dépôt des couches de polyélectrolytes par le procédé lbl, deux solutions aqueuses de polyélectrolytes sont préparées. La première solution est composée du polycation (PAH^+, 2 mg/mL) et de 0,2 M de NaCl. Dans la seconde solution, le PAH^+ est remplacé par le PSS^-. Les particules sont alors immergées successivement dans les solutions de PAH^+ et de PSS^-. Entre chaque dépôt, les particules sont lavées trois fois avec de l'eau distillée. Huit couches de polyélectrolytes sont ainsi déposées.

Les particules sont ensuite traitées par une solution de HCl 0,1 M pendant 1 minute afin de dissoudre les particules de $MnCO_3$. On obtient alors des particules vides dont la surface est constituée des couches lbl. Afin d'introduire la laccase dans ces microcapsules, une solution de microcapsules (200 µL) est incubée avec 200 µL d'une solution de laccase à 200 mg/mL dans un tampon acétate 0,1 M à pH 4 pendant 24h à température ambiante. À ce pH, la taille des pores des polyélectrolytes est suffisamment importante pour que l'enzyme puisse pénétrer dans les capsules. Le pH est ensuite ajusté à 8 avec un tampon phosphate afin de refermer les pores des polyélectrolytes et d'ainsi encapsuler l'enzyme.

Le surnageant contenant les enzymes non immobilisées est isolé par centrifugation. La mesure de l'activité enzymatique présente dans cette solution permet d'estimer l'efficacité de la technique d'immobilisation.

Caractérisation des m-lbl

Mesure de la charge partielle des particules (potentiel ζ)

Le suivi du dépôt successif des couches de polyélectrolytes est effectué par la mesure de la charge partielle des particules (potentiel ζ) après chaque dépôt. Un échantillon est prélevé à chaque nouveau dépôt et analysé sur un appareil Zetasizer Nano fourni par Malvern.

Microscopie confocale

Les micro-capsules m-lbl sont observées en microscopie confocale afin de déterminer la position de la laccase au sein de ces particules. Pour cela, l'enzyme est marquée avant son encapsulation avec un agent de fluorescence (la NHS-fluorescéine)[8]. Tout d'abord, 8 mg de NHS-fluorescéine sont incubés dans 300 µL de DMF. Puis, 2,7 mL de tampon phosphate 0,1M à pH 8,5 contenant 200 mg de laccase sont ajoutés à la solution. Le mélange est agité pendant 18 heures à 20°C.

L'enzyme marquée est alors séparée de la NHS-fluorescéine non greffée au moyen d'une colonne Sephadex® G-100 (1,5 g dans 150 mL de tampon). Pour suivre l'élution de l'enzyme marquée, des échantillons sont prélevés régulièrement et mis en contact avec l'ABTS.

Synthèse des c-laccase

L'immobilisation chimique de la laccase est effectuée selon un protocole décrit par Crestini *et al*[9]. Des billes d'alumines poreuses (Al_2O_3) sont silanisées avec une solution de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) à 2 % (v/v) dans l'acétone pendant 20 heures à 45°C puis lavées à l'acétone. L'opération est réitérée pendant 24 heures, puis les particules sont lavées à l'eau distillée trois fois et séchées à l'air libre.

Les supports sont ensuite traités avec une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 1 % (v/v) pendant 2 heures à 20°C, lavés trois fois à l'eau distillée et séchés à l'air. Enfin, les billes sont immergées dans une solution de laccase (250 mg dans 10 mL de tampon acétate à pH 4,5) pendant 48 heures à 20°C et rincées avec le tampon jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'activité dans le surnageant.

Synthèse des c-lbl

Les c-lbl sont synthétisées à partir des c-laccases par dépôt alterné de polyélectrolytes chargés positivement et négativement selon le procédé lbl déjà décrit pour la synthèse des m-lbl. Pour les c-lbl, quatre couches de polyélectrolytes sont déposées.

Recyclage des systèmes immobilisés

Afin d'évaluer la possibilité de recycler les systèmes immobilisés, une quantité connue (3 U) d'enzymes immobilisées a été mise en contact avec une solution d'ABTS (0,1 M) dans le tampon acétate à pH 4,5. L'activité enzymatique a été évaluée selon la méthode spectroscopique déjà décrite. Les enzymes sont alors isolées de la solution par centrifugation et lavées à l'eau distillée à trois reprises. L'oxydation de l'ABTS est alors reconduite avec ces mêmes enzymes. L'activité spécifique relative (ASR) des enzymes immobilisées après n recyclages est définie par la formule suivante :

$$ASR\ (\%) = \frac{\text{activité du n cycle}}{\text{activité du 1er cycle}} \times 100$$

III.2 Partie B

Détermination de la pureté de la lignine : méthode de Klason

La mesure de la pureté de la lignine est effectuée selon la méthode standard TAPPI T222 om-02, dite « lignine de Klason »[10]. L'échantillon de lignine (1 g, $\mathbf{m_0}$) est lentement dissous à froid (10 à 15°C) dans un bécher contenant 15 mL d'acide sulfurique à 72 %. Lors de cette étape, la solution est agitée manuellement. Le bécher est recouvert d'un verre de montre et placé dans un bain-marie à 20°C pendant deux heures. La solution est transférée dans un erlenmeyer de 1 litre et diluée avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume de 575 mL. Le mélange est porté à reflux pendant 4 heures, puis refroidi et laissé décanter. La solution est alors filtrée sur un fritté préalablement séché à l'étuve et pesé précisément ($\mathbf{m_1}$). Le précipité est rincé à l'eau chaude, puis le fritté est placé à l'étuve à 110°C pendant une nuit. Après refroidissement dans un dessiccateur, le fritté est pesé ($\mathbf{m_2}$). La pureté de la lignine est calculée selon la formule :

$$Pureté = \frac{m2 - m1}{m0} \text{ X } 100$$

Détermination de la siccité

Le taux de matière sèche (ou siccité) de la lignine est déterminée au moyen d'une thermobalance infrarouge TJ16 fournie par Mettler Toledo. Une quantité précise de lignine (approximativement 1 g) est placée sur le support de la balance. Celle-ci affiche directement la valeur de la siccité une fois le processus d'évaporation terminé.

Détermination du taux de cendres

La mesure du taux de cendres est effectuée selon la méthode standard ASTM E1755-01[11]. Une quantité connue de lignine sèche (entre 1 et 2 g) est placée dans une nacelle en platine préalablement pesée. La lignine est carbonisée au chalumeau jusqu'à ce que plus aucune fumée ne soit dégagée. La nacelle est alors placée dans un four à moufle à 575°C pendant 4 heures. La nacelle est retirée du four, placée dans un dessiccateur pendant 45 minutes, puis pesée. La différence de masse de la lignine avant et après calcination permet de déterminer le taux de minéraux qu'elle contient.

Traitement LMS monophasique

L'oxydation par le système laccase-médiateur monophasique est conduite sur 40 mg de lignine. Celle-ci est dissoute dans 5 mL de dioxane, puis 10 mL de tampon acétate à pH 4,5 contenant 0,02 mmol de médiateur sont ajoutés à la solution. Le mélange est alimenté en oxygène pendant 20 minutes, puis 5 mL de laccase à 8 U/mL dans le même tampon sont introduits pour démarrer la réaction. L'oxydation est conduite à 30°C sous agitation orbitale à 250 tours/min dans un incubateur de type ES-20 fourni par Grant-Bio. Des échantillons sont prélevés périodiquement et analysés en SEC dans l'eau basique.

Réaction de dakin en conditions alcalines

Après oxydation, la solution est amenée à pH 12 avec une solution de NaOH 1 M. Puis, 1 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30 % est ajouté et le mélange est agité à 90°C pendant 12 heures. À la fin de la réaction, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est repris dans le méthanol, centrifugé pour éliminer les sels insolubles et séché sous vide.

Méthylation sélective de la lignine[2]

La lignine (1 g) est dissoute dans 20 mL de solution de NaOH à 0,7 M. Puis, 0,8 mL de sulfate de diméthyle est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante, puis chauffé à 80°C pendant 3 heures. Le pH de la solution peut être ajusté au cours de la réaction si un précipité se forme. Après trois heures de réaction, la solution est refroidie puis acidifiée jusqu'à pH 2 avec une solution d'acide chlorhydrique à 2 M afin de faire précipiter la lignine méthylée. Le mélange est filtré sur fritté. Le précipité est rincé à l'eau puis lyophilisé.

Fractionnement organique

La lignine est dispersée dans 20 mL du solvant de fractionnement à une concentration de 50 g/L. La solution est agitée pendant une heure à température ambiante, puis centrifugée. Le surnageant est isolé et le précipité est repris dans 20 mL du solvant de fractionnement. La solution est à nouveau agitée pendant une heure, puis centrifugée. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un surnageant incolore. La fraction insoluble est alors séchée sous vide.

Traitement LMS en milieu biphasique

Le traitement LMS en milieu biphasique est conduit sur la fraction de lignine insoluble dans le solvant de fractionnement. La phase aqueuse est identique à celle du traitement LMS monophasique. La phase organique est composée du même solvant que le solvant utilisé pour le fractionnement de la lignine. Ce solvant est ajouté immédiatement après l'introduction de la laccase dans le milieu. La solution est conduite sous agitation orbitale à 250 tours/min à 30°C dans l'incubateur ES-20. À la fin de la réaction, les insolubles sont isolés par centrifugation, puis les deux phases solubles sont séparées par décantation.

Calcul des coefficients de partage

La capacité d'extraction des solvants organique est évaluée en calculant le coefficient de partage de la vanilline entre le solvant organique et la phase aqueuse utilisée pour les réactions LMS biphasique (75 % (v/v) de tampon acétate à pH 4,5, 25 % (v/v) de dioxane). La vanilline est dissoute dans 2 mL de phase aqueuse à une concentration de 0,05 mg/mL (la concentration initiale n'influe pas sur le calcul de K). Un volume égal de solvant organique est ajouté à la solution et le mélange est agité pendant deux heures à 30°C. Un échantillon est prélevé dans chaque phase et leur concentration en vanilline est déterminée en HPLC selon une courbe de calibration préalablement établie. Le coefficient de partage K est alors donné par :

$$K = \frac{Concentration\ en\ phase\ organique\ (mg\ /\ mL)}{Concentration\ en\ phase\ aqueuse\ (mg\ /\ mL)}$$

Dépolymérisation de la lignine à l'acide formique (HCOOH)

Le traitement HCOOH est conduit sur une fraction de lignine préalablement oxydée selon le procédé LMS en mode biphasique et séchée sous vide. Le résidu de lignine est repris dans 10 mL d'une solution d'acide formique (90 % massique) et transféré dans un ballon contenant 30 mg de formate de sodium. Le ballon est fermé hermétiquement et la solution est agitée pendant 24 heures à 110°C. Le solvant est évaporé sous vide.

Références bibliographiques

1. Granata, A. & Argyropoulos, D. S. 2-Chloro-4, 4, 5, 5-tetramethyl-1, 3, 2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins. *J. Agric. Food Chem.* **43,** 1538–1544 (1995).
2. Sadeghifar, H., Cui, C. & Argyropoulos, D. S. Toward Thermoplastic Lignin Polymers. Part 1. Selective Masking of Phenolic Hydroxyl Groups in Kraft Lignins via Methylation and Oxypropylation Chemistries. *Ind. Eng. Chem. Res.* **51,** 16713–16720 (2012).
3. Kaiser, K. & Benner, R. Characterization of Lignin by Gas Chromatography and Mass Spectrometry Using a Simplified CuO Oxidation Method. *Anal. Chem.* **84,** 459–464 (2012).
4. Bohlin, C., Lundquist, K. & Jönsson, L. J. Oxidation of the erythro and threo forms of the phenolic lignin model compound 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1,3-propanediol by laccases and model oxidants. *Bioorganic Chem.* **37,** 143–148 (2009).
5. Chawla, S., Rawal, R., Shabnam, Kuhad, R. C. & Pundir, C. S. An amperometric polyphenol biosensor based on laccase immobilized on epoxy resin membrane. *Anal. Methods* **3,** 709 (2011).
6. Antipov, A. A. *et al.* Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **224,** 175–183 (2003).
7. Zhu, H., Stein, E. W., Lu, Z., Lvov, Y. M. & McShane, M. J. Synthesis of Size-Controlled Monodisperse Manganese Carbonate Microparticles as Templates for Uniform Polyelectrolyte Microcapsule Formation. *Chem. Mater.* **17,** 2323–2328 (2005).

8. Wang, H. *et al.* Rapid Decolorization of Phenolic Azo Dyes by Immobilized Laccase with Fe_3O_4/SiO_2 Nanoparticles as Support. *Ind. Eng. Chem. Res.* **52,** 4401–4407 (2013).
9. Crestini, C., Perazzini, R. & Saladino, R. Oxidative functionalisation of lignin by layer-by-layer immobilised laccases and laccase microcapsules. *Appl. Catal. Gen.* **372,** 115–123 (2010).
10. TAPPI, Test method T 222 om-o2. Acid insoluble lignin in wood and pulp. (2002).
11. TAPPI, T 244 cm-1. Acid insoluble ash in wood, pulp, paper and paperboard. (2011).