



HAL
open science

Délicnification du bois de châtaignier par une approche de chimie verte : Mise en œuvre et impacts sur la structure et le potentiel anti-radicalaire des phyto-polysaccharides extraits

Emmanuel Renault

► To cite this version:

Emmanuel Renault. Délicnification du bois de châtaignier par une approche de chimie verte : Mise en œuvre et impacts sur la structure et le potentiel anti-radicalaire des phyto-polysaccharides extraits. Chimie théorique et/ou physique. Université de Limoges, 2014. Français. NNT : 2014LIMO0076 . tel-01254295

HAL Id: tel-01254295

<https://theses.hal.science/tel-01254295>

Submitted on 12 Jan 2016

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.

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 523 « Gay-Lussac »

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles EA1069

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Chimie appliquée / Chimie des Substances Naturelles

présentée et soutenue par

Emmanuel RENAULT

le 15 décembre 2014

**Délicatification du bois de châtaignier par une
approche de chimie verte.**

**Mise en œuvre et impacts sur la structure et le
potentiel anti-radicalaire des phyto-polysaccharides
extraits**

Thèse dirigée par Vincent GLOAGUEN, Vincent CHALEIX et Claude-Alain CALLISTE

JURY :

Rapporteurs

Mme. Patricia VICENDO, Directrice de Recherche, *Université Paul Sabatier de Toulouse*

M. Nicolas JOLY, Professeur, *Université d'Artois*

Examineurs

Mme. Sandrine BOUQUILLON, Professeur, *Université de Reims Champagne-Ardenne,*

M. Vincent GLOAGUEN, Professeur, *Université de Limoges*

M. Vincent CHALEIX, Professeur, *Université de Limoges*

M. Claude-Alain CALLISTE, Maître de Conférences, *Université de Limoges*

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier le Professeur Vincent Sol de m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire, mais également pour les discussions scientifiques, les conseils tous pertinents, mais également les sujets plus légers comme sur la route vers Orléans. J'espère avoir donné une bonne image du laboratoire au cours des congrès que j'ai eu la chance d'effectuer, mais également au sein des conseils centraux de l'Université.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse : les Professeurs Vincent Gloaguen Vincent Chaleix et le docteur Claude Calliste. Depuis le master recherche, vous n'avez cessé d'être présents pour moi, d'une façon différente chacun. Vincent G., je vous remercie particulièrement pour votre présence immatérielle constante, pouvant vous joindre à n'importe quelle heure du jour comme de la nuit, ainsi que pour vos conseils et votre plume scientifique. Ce fût un réel plaisir de travailler sous votre direction. Vincent C., je vous remercie pour vos conseils scientifiques toujours intéressants, vous avez réussi à maintes reprises à me sortir de la galère. Merci pour ces petites séances de « système D » ou de formation sur le tas. J'ai beaucoup apprécié d'avoir été votre élève durant toutes ces années. Merci à vous aussi Claude, même si nous sommes vus moins souvent pendant ces années, vous m'avez appris la rigueur biologiste, et c'est avec vous que nous avons trouvé les résultats les plus intéressants pour la valorisation de mon travail. Votre bonne humeur a accompagné nos rencontres et à l'instar des Vincent, j'ai été ravi de travailler avec vous pendant 3 longues années. Trois années qui n'ont pas été toutes roses, et je vous remercie vivement d'avoir accepté dans un premier temps de réorienter mon sujet de thèse vers un peu plus de synthèse organique, mais aussi et surtout je ne sais comment vous remercier d'avoir accepté et respecté sans jugement mes choix d'avenir. Pour cela, vous avez ma reconnaissance éternelle.

Merci à Madame Patricia Vicendo et Monsieur Nicolas Joly d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'à Madame Sandrine Bouquillon d'avoir accepté d'être examinatrice lors de la soutenance. Merci à vous trois pour vos remarques scientifiques tout à fait pertinentes.

Je souhaite ici remercier Madame Rachida Zerrouki, qui en plus de ses conseils scientifiques a réussi à plusieurs reprises à me remonter le moral. Merci à vous également d'avoir compris et respecté mes choix, à vous aussi je vous transmets ma reconnaissance éternelle.

Un grand merci à M. Robert Granet : non seulement nous avons pu avoir des discussions scientifiques très intéressantes, à la fois sur mon sujet de thèse mais également sur d'autres sujets, me permettant de m'ouvrir à d'autres horizons, mais également sur des sujets comme l'histoire, qui me passionnent également. Vous êtes un puit de culture et de connaissance, merci pour tout Robert.

Je tiens aussi à remercier les permanents avec qui j'ai eu l'occasion de travailler en enseignement, je pense particulièrement à Dorothee Moine, Stéphanie Lhez et l'ensemble de l'équipe du Scientibus ! Merci aux formateurs et en particulier à Danielle Rousset, Anne Brouard et Sylvie Foucault.

Un merci particulier à Guy Costa, qui m'a supporté pendant une semaine en congrès à Montpellier, et la route ensemble, et à Nicolas Villandier pour sa bonne humeur et les spectres de masse !

Merci à tous les permanents du laboratoire avec qui je n'ai pas spécialement travaillé mais qui m'ont toujours réservé un accueil chaleureux, je ne ferai pas de liste exhaustive car j'oublierais certainement des gens, mais je pense particulièrement à Sabine Lhernould, Philippe Bressolier, Patrick Trouillas ou encore Céline Faugeron, Michèle Constantin, etc...

Cédric Astier. Je ne sais comment décrire notre relation. Tu m'as encadré lors de mon master 2 et malgré ce que tu peux dire, tu es un bon pédagogue : tu es relativement patient et bien que tu expliques mal les choses, tu les fais bien et cela est suffisant pour que tes stagiaires comprennent. Tu es passé d'encadrant à collègue, et maintenant, je crois qu'on peut le dire, nous sommes « copains comme cochon ». Nos nombreux points communs surtout sur le plan culinaire nous a rapproché énormément. Je n'oublie pas les nombreux conseils et coups de main qui m'ont sauvé de situations laborieuses. Tu es un collègue fidèle et j'espère te revoir à l'avenir.

Je pense aux anciens thésards avec qui j'ai ou j'ai eu de très bonnes relations : Benjamin Boëns, Pierre-Henri Elchinger, Pierre-Antoine Faugas, Florent Di Meo, Julien Vergnaud, Nicolas Drogat, Cyril Ringot, Ahmad Jiblaoui, Jean-Pierre M'Bakidi, les biologistes (Marietta, Rihab,...). Benj, PH, PAF, vous avez égayé le deuxième étage du bâtiment de chimie pendant une bonne moitié de ma thèse. Votre bonne humeur m'a souvent remonté le moral aussi quand cela était nécessaire. Florent, tu es quelqu'un de bien et tu as su aussi trouvé les mots quand ça n'allait pas, j'espère t'avoir prouvé mon amitié, qui je le pense est réciproque. Je pense aussi aux bons moments passés avec vous tous, notamment à l'O'Brien ! Juju, un petit merci particulier pour toi, pour les nombreuses discussions scientifiques, conseils pour avancer et autres. Nous nous retrouvons sur pas mal de sujets et je t'apprécie beaucoup, j'espère que tout ira bien pour toi. Nicolas, tu resteras un modèle pour moi. Après un stage de master 1 où tu as pu apprécier ma capacité à rédiger un rapport, ta soutenance de thèse a été vraiment marquante pour moi car c'est sans doute la meilleure thèse en termes de travail et de valorisation potentielle à laquelle j'ai assisté depuis mon arrivée au laboratoire. Tu es un modèle aussi dans le sens où j'ai pu apprécier, certes de loin, mais quand même, le travail que tu as fourni pour monter ton entreprise et pour la faire avancer, et je trouve cela exemplaire. Tu m'as parfois conseillé et souvent encouragé dans mon travail et je t'en remercie. Je te souhaite toute la réussite possible avec Novassay en compagnie de Cyril. Je termine par Ahmad le « meilleur d'entre nous », le roi de la porph. Merci de m'avoir formé à la synthèse de porphyrines, merci pour tous tes conseils, tes encouragements, ta gentillesse et ta bonne humeur. Ne change surtout pas !

Merci à mes stagiaires : Manon, Miheerba, Alex, Eddy, Paul, mine de rien vous avez participé chacun un peu à ce travail et je vous remercie de vous être engagé à fond dans votre travail. Merci à tous les stagiaires avec qui j'ai pu interagir et qui ont animé le laboratoire.

Merci à mes collègues doctorants, je pourrais faire un paragraphe pour chacun d'entre vous, donc je serai bref. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, humainement, scientifiquement et professionnellement : Romain Villéger, Amandine Dieu, mes compagnons de galère de la troisième année, Jean-Kerim NZambe Takeki, Baggio NDong Toutoume, Amandine Bonnet, Nicolas Genevois, Anaïs Raynaud, Gabin Fabre, Imène Bayach, Idelette Plazanet, Chloé Fidanzi,...

Je serai un peu plus long sur mes amis de plus longue date : Shihong Qiu, avec qui nous avons vécu des moments forts, merci pour les discussions scientifiques mais également merci de m'avoir appris des choses sur un pays que je connaissais mal, ton pays, la Chine. Florent Boissou, malgré ton exil à Poitiers, je ne t'oublie pas et je te remercie pour tout, ton amitié, ta confiance, ton intégrité. Je te souhaite tout le bonheur du monde. Manu Denoyelle je ne t'ai pas oublié ! Je te remercie aussi pour ces années passées, tu as vécu des épreuves, j'espère avoir été suffisamment présent et j'espère que ta carrière sera longue et riche ! Benjamin Rioux, mon fillot, merci pour tout, ton soutien, ton amitié, ta fidélité pour ton vieux parrain même si ces notions sont un peu plus lointaines désormais pour toi. Tu comptes beaucoup pour moi et saches que même loin je serai là pour toi. Je finis bien sûr par Olivier Rezazgui, mon ami de presque 15 ans maintenant. Nous avons connu des hauts et des bas, de par ta nature sanguine qui fait également ton charme, mais aussi par mes erreurs. J'espère garder ton amitié après mon départ. Je te remercie pour tout le bien que tu as fait pour moi, malgré les conflits, tu as toujours répondu présent quand j'en avais besoin et je ne l'oublierai pas.

Je souhaite remercier aussi mes collègues DCACE, avec qui j'ai passé de très bons moments. Merci pour les conseils et échanges sur l'enseignement, il est clair que j'ai progressé aussi grâce à vous.

Merci à mes amis hors du laboratoire : là encore j'oublierai des personnes, mais je pense particulièrement à Etienne, Geoffrey, Damien, mes amis corréziens, mes Confrères et Consœurs, mes autres amis guéretois (Antoine, Ninon, Johanne, Sophie, Nicolas, Olivier...), mes amis en général. Merci à tous pour votre soutien et votre amitié qui m'ont permis de garder le cap pendant ces trois ans.

Bien sûr, je termine en remerciant chaleureusement toute ma famille, qui m'a soutenu tout au long de ma thèse et il est clair que sans eux, je n'aurais peut-être pas terminé dans les mêmes conditions.

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne :

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Sommaire

Sommaire	IX
Liste des figures	XVII
Liste des Tableaux	XXI
Liste des abréviations	XXIII
Introduction Générale	XXV
Partie I : Le bois, la lignine et les xylanes : Etat de la question	3
Chapitre 1 : Le bois : constitution et constituants	6
I. La paroi cellulaire végétale	6
II. Les constituants de la paroi cellulaire du bois	7
II.1. La cellulose	8
II.2. Les hémicelluloses	9
II.3. La lignine	10
II.4. Composés minoritaires	11
II.4.1. Les pectines	11
II.4.2. Les composés non-structuraux	12
III. La paroi secondaire végétale	13
III.1. Organisation de la paroi	13
III.2. Interactions entre polymères pariétaux	15
Chapitre 2 : Lignine et délignification	16
I. La lignine	16
I.1. Biosynthèse de la lignine	16
I.2. Structure moléculaire de la lignine	19
I.3. Les liaisons lignine-hémicelluloses	20
II. La délignification du bois	22
II.1. Les méthodes courantes	22
II.1.1. Délignification par les chlorites acides	22
II.1.2. Délignification par acidolyse	23
II.1.3. Délignification par le système acide formique/acide acétique	23
II.1.4. Délignification par ozonolyse	23
II.2. Prétraitements	24
II.2.1. Ultrasons	25

II.2.2.	L'explosion à la vapeur	25
II.2.3.	Micro-ondes	25
II.3.	Délicnification enzymatique.....	26
II.3.1.	La Lignine Peroxydase (LiP)	27
II.3.2.	La Manganèse Peroxydase (MnP)	28
II.3.3.	La Versatile Peroxydase (VP).....	29
II.4.	Délicnification par des macrocycles tétrapyrroliques (MtP).....	29
II.4.1.	Les macrocycles tétrapyrroliques.....	29
II.4.2.	Mécanismes d'oxydation de la lignine par les macrocycles tétrapyrroliques	31
II.4.3.	Oxydation chimique de composés –type de lignines	34
II.4.4.	Utilisation en délicnification photochimique.....	38
II.4.5.	Synthèse des macrocycles tétrapyrroliques	39
a.	Les porphyrines méso-substituées	39
b.	Les phtalocyanines.....	43
c.	Synthèse de porphyrines bio-mimétiques.....	44
II.4.6.	Propriétés spectrales	46
a.	Les Porphyrines	46
b.	Les phtalocyanines.....	49
III.	Détermination de l'efficacité des techniques de délicnification.....	50
III.1.	Dosage du taux de composés phénoliques totaux	50
III.2.	Détermination du nombre Kappa.....	51
III.3.	Taux de lignines de Klason	52
Chapitre 3:	Les xylanes du bois	54
I.	Structure des xylanes	54
II.	Extraction des xylanes	56
II.1.	Méthodes d'extraction solide-liquide.....	56
II.1.1.	Extraction en milieu alcalin	56
II.1.2.	Extraction par les solvants organiques	57
II.1.3.	Extraction à l'eau	58
II.2.	Méthodes d'extraction solide-liquide assistées par traitement physique.....	58
II.2.1.	Explosion à la vapeur	59
II.2.2.	Ultra-sons	59
II.2.3.	Micro-ondes	59
III.	Caractérisation des xylanes	60
III.1.	Caratérisation de la composition centésimale et du degré de polymérisation	60
III.2.	Détermination de la composition mono-saccharidique	61

III.2.1.	Hydrolyse des polysaccharides	61
III.2.2.	Analyse des monosaccharides (CPG).....	62
III.3.	Analyses spectroscopiques	63
III.4.	Caractérisation de la structure des xylo-oligosaccharides	64
III.4.1.	Obtention des xylo-oligosaccharides.....	64
a.	Hydrolyse enzymatique.....	64
b.	Hydrolyse acide	66
c.	Autohydrolyse.....	67
III.4.2.	Séparation	68
III.4.3.	Détermination structurale	68
a.	Spectrométrie de masse MALDI	68
b.	Spectrométrie de masse ESI	69
IV.	Valorisation des xylanes et des xylo-oligosaccharides	71
IV.1.	Bioplastiques (matériaux filmogènes).....	75
IV.2.	Applications au domaine pharmaceutique.....	76
IV.2.1.	Activité anti-tumorale.....	76
IV.2.2.	Activité anti-oxydante	77
Partie II : Développement de méthodes de délignification par catalyse oxydative dans le but d'extraire les hémicelluloses du bois de châtaignier		79
Chapitre 1 : Synthèse, caractérisation et utilisation en délignification des macrocycles tétrapyrroliques		83
I.	Préparation du matériel végétal	83
I.1.	Broyage	83
I.2.	Élimination des petits composés	83
I.3.	Dépectinisation	84
II.	Développement de procédés de délignification.....	84
II.1.	Délignification par les chlorites acides	84
II.2.	Délignification par la phtalocyanine : synthèse et applications	85
II.2.1.	Synthèse et caractérisation de la tétrasulfophtalocyanine de fer	86
a.	Synthèse du 3,4-dicarboxybenzensulfonate de sodium.....	86
b.	Synthèse de la tétrasulfophtalocyanine de fer	86
c.	Caractérisations.....	87
II.2.2.	Délignification	89
a.	Protocole initial.....	89
b.	Optimisation	90
c.	Caractérisation de la délignification par détermination du nombre kappa	96

II.2.3.	Bilan de la délignification par la phtalocyanine.....	99
II.3.	Délignification par les porphyrines : synthèses et applications	103
II.3.1.	Synthèse de la tétra-(dichlorophényl)porphyrine.....	103
a.	Stratégie de synthèse.....	103
b.	Synthèse de la tétra (2,6-dichloro) phénylporphyrine.....	104
c.	Sulfonation de la tétra (2,6-dichloro) phénylporphyrine	106
d.	Méallation	108
II.3.2.	Caractérisations.....	108
a.	UV-Visible	108
b.	Spectrométrie de masse.....	111
c.	RMN ¹ H.....	112
II.3.3.	Délignification par les métalporphyrines.....	115
a.	Avec la porphyrines métallée au fer	115
b.	Avec la porphyrine métallée au manganèse	116
II.3.4.	Caractérisation de la délignification par l'indice Kappa	118
a.	Caractérisation de la délignification par FT-IR	120
b.	Caractérisation par CPG des sciures obtenues.....	124
c.	Caractérisation du filtrat de délignification	125
III.	Bilan de la délignification par les macrocycles tétrapyrroliques	127
Chapitre 2 : Extraction des hémicelluloses.....		129
I.	Extraction en milieu alcalin	130
II.	Caractérisation des extraits	132
II.1.	Composition centésimale	132
II.2.	Composition mono-saccharidique.....	133
II.3.	Analyse RMN : structure des hémicelluloses	134
II.4.	Analyse par spectrométrie de masse	136
III.	Extraction à l'eau.....	138
IV.	Caractérisation du xylane extrait à l'eau chaude	140
IV.1.	Composition centésimale	140
IV.2.	Composition mono-saccharidique par CPG	144
IV.2.1.	Caractérisation du xylane H ₂ O par RMN ¹ H	145
IV.2.2.	Caractérisation par FT-IR du xylane H ₂ O	146
IV.3.	Détermination du taux de phénols	147
V.	Bilan de l'extraction des hémicelluloses.....	148
Chapitre 3 : Propriétés anti-oxydantes des xylanes et caractérisation structurale.....		151
I.	Détermination de l'activité anti-oxydante.....	151

I.1.	Choix de la méthode	152
I.2.	Détermination de l'activité anti-oxydante des xyloles extraits par RPE	153
I.2.1.	Protocole.....	153
I.2.2.	Résultats	155
II.	Hydrolyse contrôlée des xyloles extraits – Formation et caractérisation d'oligosaccharides 157	
II.1.	Autohydrolyse.....	157
II.1.1.	Mise en œuvre et séparation	157
II.1.2.	Caractérisation structurale	159
II.2.	Hydrolyse enzymatique.....	160
II.2.1.	Optimisation, mise en œuvre et séparation.....	160
II.2.2.	Caractérisation structurale	164
a.	HPLC	164
b.	LC-MS	165
	Conclusion générale.....	171
	Partie Expérimentale.....	177
I.	Réactifs et solvants	179
II.	Analyses physico-chimiques	180
II.1.	Analyses spectroscopiques	180
II.1.1.	Spectroscopie Infrarouge.....	180
II.1.2.	Spectroscopie RMN	180
II.1.3.	Spectroscopie Ultraviolet-Visible	181
II.1.4.	Spectrométrie de masse MALDI-TOF	181
II.1.5.	UHPLC/DAD/HRMS.....	182
II.2.	Chromatographie	182
II.2.1.	Chromatographie sur couche mince	182
II.2.2.	Chromatographie flash automatisée	183
II.2.3.	Chromatographie en phase gazeuse	183
II.2.4.	Chromatographie sur Biogel P2.....	183
II.3.	Tests RPE :	184
III.	Procédés de délignification	184
III.1.	Matériel biologique	184
III.2.	Protocole d'extraction	184
III.2.1.	Extraction à l'éthanol	184
III.2.2.	Extraction des pectines	185
III.2.3.	Délignification	185

III.2.3.1.	Par le chlorite de sodium	185
III.2.3.2.	Par les macrocycles tétrapyrroliques	185
III.2.3.3.	Prétraitements	185
i.	Ultra-sons	185
ii.	Micro-ondes	185
iii.	Sous vide	186
III.2.1.	Evaluation du nombre kappa	186
IV.	Extraction des xylanes	187
IV.1.	Extraction alcaline	187
IV.2.	Extraction à l'eau chaude	187
IV.3.	Extraction des xylanes aux ultrasons	187
IV.4.	Caractérisations chimiques des xylanes	188
IV.4.1.	Etude de la composition centésimale	188
IV.4.1.1.	Dosage des sucres totaux ou dosage de Dubois	188
IV.4.1.2.	Dosage des acides uroniques ou dosage de Blumenkrantz.....	188
IV.4.1.3.	Evaluation du DP : dosage des oses réducteurs ou dosage de Lever	190
IV.4.2.	Dosage des hydroxyles phénoliques totaux	191
IV.4.3.	Etude de la composition mono-saccharidique par CPG	192
IV.4.3.1.	Préparation des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés	192
a.	Méthanolyse	192
b.	Triméthylsilylation.....	192
IV.4.3.2.	Analyse des dérivés TMS en CPG.....	192
V.	Oxydation des xylanes	193
V.1.	Protocoles	193
V.1.1.	Par le système phtalocyanine/H ₂ O ₂	193
V.1.2.	Par le <i>periodate</i> de sodium	193
V.2.	Caractérisation de l'oxydation	193
V.2.1.	Dosage des fonctions acides carboxyliques	193
V.2.2.	Dosage des fonctions aldéhydes (réaction de Cannizzaro).....	194
VI.	Détermination de l'activité anti-DPPH	194
VII.	Procédures d'hydrolyse.....	195
VII.1.	Autohydrolyse.....	195
VII.2.	Hydrolyse enzymatique.....	195
VIII.	Synthèses.....	196
VIII.1.	3,4-dicarbonylbenzènesulfonate de sodium.....	196
VIII.2.	Tétrasulfophtalocyanine de fer	197

VIII.3.	5, 10, 15, 20-tétra-2,6-dichlorophénylporphyrine :.....	198
II.3.	5,10,15,20-tétra-2,6-dichloro-3-chlorosulfo-phénylporphyrine:.....	199
VIII.4.	5,10,15,20-tétra-2, 6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine :.....	200
VIII.5.	5,10,15,20-tétra-2,6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine de fer:.....	201
VIII.6.	5,10,15,20-tétra-2,6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine de manganèse:	202
Bibliographie		203

Liste des figures

Figure 1: Organisation de la paroi cellulaire végétale	7
Figure 2: Structure chimique de la cellulose	8
Figure 3: liaisons intra- et intermoléculaires dans la cellulose.....	8
Figure 4: exemple de structure d'hémicellulose: le D-galacto-D-mannane d'après Ebringerova <i>et al.</i> ¹³	10
Figure 5: Monomères de base de la lignine.....	10
Figure 6: Structure de chaînes homo-galacturonanes stabilisées par des ions calcium	11
Figure 7: Structures des tanins catéchiques (a) et des gallotannins (b).....	12
Figure 8: De la cellulose à la fibre d'après P.H. Elchinger	14
Figure 9: Organisation des polymères dans la paroi cellulaire végétale secondaire	14
Figure 10: Liaisons covalentes dans la paroi cellulaire végétale d'après Iiyama <i>et al.</i> ²²	15
Figure 11: Voie de biosynthèse des monolignols, d'après Vanholme <i>et al.</i>	17
Figure 12: Processus de lignification dans la paroi cellulaire végétale d'après Crestini et Tagliatesta. 18	
Figure 13: Principaux types liaisons décrites dans la lignine d'après Weckhuysen <i>et al.</i>	20
Figure 14: Liaisons lignine-hémicelluloses d'après Lawoko.....	21
Figure 15: Structures ligno-saccharidiques d'après Rubio-Senent <i>et al.</i> ²⁷	21
Figure 16: Mécanisme d'ozonolyse d'après Lyse ³⁵	24
Figure 17: Action de l'ozone sur les alcènes d'après Lyse ³⁵	24
Figure 18: Structure schématique de la Lignine Peroxydase	27
Figure 19: Cycle catalytique de la manganèse peroxydase d'après Hofrichter	28
Figure 20: Structure de base d'une phtalocyanine (a) et d'une porphyrine (b)	30
Figure 21: Structure de l'hème de l'hémoglobine (à gauche) et de la vitamine B12 (à droite)	30
Figure 22: Schéma du mécanisme d'action des métalloporphyrines avec le peroxyde d'hydrogène d'après Zucca <i>et al.</i>	32
Figure 23: Mécanismes photo-chimiques induits par les métalloporphyrines	33
Figure 24: Dégradation oxydative d'un composé-type de lignine par la tétraphénylporphyrine de fer et l'hydroperoxyde de tert-butyle d'après Shimada <i>et al.</i> ⁵¹	34
Figure 25: Métalloporphyrines utilisées pour l'oxydation de composés-type lignine ⁴⁹	35
Figure 26: Exemple de porphyrine supportée d'après Zucca <i>et al.</i> ⁵⁷	37
Figure 27: Photo-oxydation du 4-chlorophénol d'après Silva <i>et al.</i> ⁶¹	38
Figure 28: Méthodes de synthèse de porphyrines <i>meso</i> -substituées	42

Figure 29: Voies de synthèse de métallophthalocyanines d'après Ongarora	43
Figure 30: Exemple de porphyrine biomimétique d'après Chang et Traylor ⁷³	44
Figure 31: Porphyrine de type "picket-fence" d'après Collman <i>et al.</i> ⁷⁹	45
Figure 32: Porphyrine à chapeau d'après Almog <i>et al.</i> ⁸⁰	45
Figure 33: mime de cytochrome c d'après Collman <i>et al.</i> ⁸²	46
Figure 34: Spectre UV-Visible d'une porphyrine à base libre (tétraphénylporphyrine) dans le chloroforme d'après C. Ringot	47
Figure 35: cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine d'après C. Ringot ⁸⁴	48
Figure 36: Spectre UV-Visible de la phtalocyanine de zinc dans le DMF.....	49
Figure 37: Formation de l'acide hexénuronique lors de l'oxydation de la lignine d'après Gellerstedt <i>et al.</i>	51
Figure 38: Exemples de structures de xylandes.....	55
Figure 39: Structure du 4-O-méthyl-D-glucurono-D-xylane d'après Ebringerova ¹³	56
Figure 40: Méthanolyse du xylane.....	62
Figure 41: Triméthylsilylation des méthylglycosides d'après Kamerling <i>et al.</i>	63
Figure 42: Hydrolyse enzymatique de GX (d'après Carvalho <i>et al.</i> ¹³⁶).....	66
Figure 43: Mécanisme général de l'hydrolyse acide des polysaccharides, d'après Bemiller	67
Figure 44: Mécanisme d'autohydrolyse d'après Ciancia et Cerezo.....	67
Figure 45: Spectromètre de masse MALDI.....	69
Figure 46: Ionisation par la méthode ESI d'après Harakat	70
Figure 47: Taux de boisement par commune du Limousin en 2000 (en %)......	71
Figure 48: Répartition des espèces d'arbres limousins en pourcentage de superficie.	72
Figure 49: Différentes voies de valorisation des xylandes et dérivés d'après Deutschmann et Dekker ...	73
Figure 50: Voies de valorisation du furfural d'après Popal	74
Figure 51: Schéma général de fractionnement du bois	81
Figure 52: Répartition des composés dans les sciures de bois de châtaignier	85
Figure 53: formation du sel d'acide sulfophtalique	86
Figure 54: synthèse de la tétrasulfophtalocyanine de fer	87
Figure 55: Spectre UV-Visible de la tétrasulfophtalocyanine de fer dans l'eau.....	88
Figure 56: spectre de masse MALDI de la tétrasulfophtalocyanine de fer	89
Figure 57: Protocole standard de délignification par la tétrasulfophtalocyanine de fer (FePcS)	90
Figure 58: Structure du dimère μ -oxo de la tétrasulfophtalocyanine de fer	99
Figure 59: Dégradation de la tétrasulfophtalocyanine métallée en milieu oxydant d'après D'Alessandro ¹⁷⁶	100
Figure 60: Structure de la tétra (dichloro-phényl) porphyrine.....	101
Figure 61: Stratégie de synthèse du catalyseur.....	103

Figure 62: Synthèse de la porphyrine par la méthode d'Adler-Longo	104
Figure 63: Synthèse de la porphyrine par la méthode de Lindsey	105
Figure 64: Synthèse de la tétra (dichloro-phényl) porphyrine.....	106
Figure 65: Réaction de sulfonation par l'acide sulfurique	106
Figure 66: Synthèse de la tétra (2,6-dichloro-3-sulfo)phénylporphyrine par la porphyrine chlorosulfonée	107
Figure 67: Métallation de la tétra (2,6-dichloro-3-sulfo)phénylporphyrine	108
Figure 68: Spectre UV-Visible de la tétra(dichlorophényl)porphyrine dans CHCl ₃	110
Figure 69: Spectre UV-Visible de la tétra (dichlorosulfo)phénylporphyrine de manganèse	110
Figure 70: Spectre MALDI de la tétra (dichloro-phényl) porphyrine.....	111
Figure 71: agrandissement du pic à m/z 891,023 du spectre MALDI de la tétra (dichloro-phényl) porphyrine	112
Figure 72: Spectre RMN ¹ H de la porphyrine octachlorée.....	113
Figure 73: Spectre RMN ¹ H de la porphyrine sulfonée.	114
Figure 74: Représentation des atropoisomères possibles de la porphyrine	114
Figure 75: Photographies des sciures dépectinisées avant délignification et après traitement à la porphyrine de fer (essai Fe-4).....	119
Figure 76: (a) Spectre FT-IR de différents échantillons: en rouge les sciures dépectinisées non traitées, en bleu l'holocellulose, en noir l'essai Fe-4. (b) agrandissement de la zone 1200-1800 cm ⁻¹ reporté en absorbance (spectres normalisés).....	122
Figure 78: Répartition massique de l'ensemble des composés du bois de châtaignier.....	131
Figure 79: Spectre RMN ¹ H du xylane KOH dans D ₂ O. (b) : Spectre RMN ¹³ C du xylane KOH dans D ₂ O.	135
Figure 80: Spectre MALDI du Xylane KOH après autohydrolyse.....	137
Figure 81: Structure du 4-O-Méthylglucuronoxylane de hêtre et de châtaignier	137
Figure 82: mécanisme d'oxydation en milieu oxydant des unités xyloses d'après Kachkarova- Sorokina ¹⁹²	141
Figure 83: Spectre infrarouge comparatifs de xylanes oxydés	143
Figure 84: Spectre RMN ¹ H du xylane H ₂ O.....	145
Figure 85: Spectre FT-IR comparatif du xylane KOH et du xylane H ₂ O	147
Figure 86: Structure du radical DPPH	153
Figure 87: Spectre RPE du radical DPPH:.....	154
Figure 88: Activité anti-DPPH du xylane KOH (500 µg.mL ⁻¹) et du xylane H ₂ O (concentrations variables).	155
Figure 89: Suivi au cours du temps de la réaction d'autohydrolyse du xylane H ₂ O à t ₀ , t _{16h} et t _{24h}	158
Figure 90: Suivi de sortie de colonne P2 du xylane H ₂ O autohydrolysé.	158
Figure 91: Spectre de masse MALDI du xylane H ₂ O autohydrolysé	159

Figure 92: Structures proposées pour deux fragments portant des résidus phénoliques, issus de l'autohydrolyse du xylane H ₂ O.....	160
Figure 93: CCM des essais d'hydrolyse enzymatique. Révélation à l'orcinol sulfurique.	162
Figure 94: CCM des essais d'hydrolyse enzymatique. Révélation au DPPH.	163
Ref: de haut en bas : xylose, glucose, acide glucuronique, saccharose. X _{H₂O} : Xylane H ₂ O.....	163
Figure 95: Résultat bio-autographique du xylane H ₂ O hydrolysé par enzyme.....	164
Figure 96: Bio-autographie de la fraction méthanolique du xylane H ₂ O hydrolysé.	165
Figure 97: Profil HPLC de la fraction méthanolique du xylane H ₂ O hydrolysé.....	166
Figure 98: Spectre UV-Visible et Spectre de masse des composé n°8 (a) et n°11 (b).....	167
Figure 99: Structure de l'acide ellagique.	167
Figure 100: Structure proposée pour le composé 11. Mécanisme de fragmentation.	169
Figure 101: Principe du dosage de Dubois.....	188
Figure 102: Principe du dosage de Blumenkrantz	189
Figure 103: Mécanisme pour la réaction de Lever	191

Liste des Tableaux

Tableau 1: répartition moyenne des différents constituants de la paroi cellulaire végétale (% de masse sèche)	8
Tableau 2: Avantages et inconvénients des différentes générations de tétraphénylporphyrines métallées d'après Zucca <i>et al.</i>	36
Tableau 3: Méthodes de dérivation des monosaccharides	62
Tableau 4: Coefficients d'extinction molaire de la tétrasulfophtalocyanine de fer selon Hadash <i>et al.</i> ..	88
Tableau 5: essais de délignification par FePcS à température ambiante sur 1 gramme de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée	90
Tableau 6: Essais de délignification par FePcS: étude de l'influence du solvant	92
Tableau 7: Essais de prétraitements aux ultra-sons: mesure de la perte de masse après délignification à partir d'1 g de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée	93
Tableau 8: Essais de prétraitements aux micro-ondes: influence sur la perte de masse après délignification à partir d'1 g de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée	94
Tableau 9: Détermination de la perte en masse des échantillons ayant subi un prétraitement sous vide. SV1 : imprégnation chaque jour de la phtalocyanine. SV2 : imprégnation unique au début du traitement.....	95
Tableau 10: Détermination de l'indice Kappa des résidus délignifiés de différents essais	97
Tableau 11: Détermination de l'indice Kappa pour les prétraitements sous vide. SV1 : imprégnation chaque jour de la phtalocyanine. SV2 : imprégnation unique au début du traitement.....	98
Tableau 12: Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des composés 3, 3', 4, 5, 5'	109
Tableau 13: Spectrométrie de masse MALDI des porphyrines synthétisées	111
Tableau 14: interprétation des spectres RMN ¹ H des composés 3, 3' et 4.....	112
Tableau 15: Essais de délignification avec la porphyrine métallée au fer.....	115
Tableau 16: Essais de délignification avec la porphyrine métallée au manganèse	117
Tableau 17: Récapitulatifs des essais à la porphyrine de fer, nombre kappa et observations sur l'apparence des fibres après délignification.....	118
Tableau 18: Récapitulatifs des essais à la porphyrine de manganèse, nombre kappa et observations sur l'apparence des fibres après délignification.....	119
Tableau 19: Composition mono-saccharidique des sciures délignifiées par la porphyrine au manganèse (% molaire).....	124
Tableau 20: Composition mono-saccharidique de l'extrait du filtrat Mn-4.....	126
Tableau 21: Résultats d'extraction alcaline des différents traitements de délignification	130
Tableau 22: Composition centésimale des filtrats (%massique) et degré de polymérisation (DP)	132
Tableau 23: Composition mono-saccharidique des xylanes extraits (%molaire)	133

Tableau 24: Rapports molaire (Xyl/4-O-MeGlcA) de quelques glucuronoxylanes extraits de différentes essences forestières.....	134
Tableau 25 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques du xylane (D ₂ O):.....	136
Tableau 26: Résultats d'extraction aqueuse des hémicelluloses à partir des résidus délignifiés	138
Tableau 27: Composition centésimale des hémicelluloses extraits à l'eau (%massique) et degré de polymérisation. Rappel des valeurs pour le xylane KOH	140
Tableau 28: Conditions d'oxydation testées pour l'oxydation du MGX commercial de hêtre	142
Tableau 29: Composition mono-saccharidique du xylane H ₂ O (% molaire). Rappel de la composition pour le xylane KOH.	144
Tableau 30: Taux de composés phénoliques dans les différents extraits (en g pour 100 g éq. acide gallique)	147
Tableau 31: CI50 des xylanes et des antioxydants de référence (radical DPPH)	156
Tableau 32: Essais d'hydrolyse enzymatique sur le xylane H ₂ O	161

Liste des abréviations

4-O-MeGlcA : Acide 4-O-Méthylglucuronique
Ara : Arabinose
AU : Acide Uronique
BHT : Hydroxytoluène Butylé
BSTFA : N,O-Bis-Triméthylsilyltrifluoroacétamide
CCM : chromatographie sur couche mince
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
Da : Dalton
DAD : Détecteur à barrettes de diode
DMA : N,N- diméthylacétamide
DMAP : 4-Diméthylaminopyridine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique
DP : Degré de polymérisation
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DS : Degré de substitution
eq. : équivalent
ESI : ionisation par électrospray
FePcS : Tétrasilfophtalocyanine de fer
FT-IR : Infrarouge par Transformée de Fourier
Gal : Galactose
GalA : Acide galacturonique
Glc : Glucose
GlcA : Acide glucuronique
GX : Glucuronoxylane
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
J : constante de couplage
LiP : Lignine Peroxydase
m/z : rapport masse sur charge
MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
Man : Mannose
MGX : 4-O-méthylglucuronoxylane

MHDP : Métahydroxydiphényle
MI : Méso-inositol
M.O. : micro-ondes
MnP : Manganèse Peroxydase
MtP : MétalloPorphyrine
ON : Oses neutres
p : Pyranose
PAHBAH : Parahydroxybenzoïque acide hydrazide
Pc : Phtalocyanine
ppm : partie par million
Rf: rapport frontal
Rha : Rhamnose
RMN : Résonance magnétique nucléaire
s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; m : multiplet
RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
SM : spectrométrie de masse
SR : Sucres réducteurs
ST : Sucres totaux
SV : prétraitement sous vide
TA : température ambiante
TAPPI : Technological Association of the Pulp and Paper Industry – Association technologique sur l'industrie de la pâte et du papier.
TdCIPP : 5,10,15,20-tétra-(2,6-dichlorophényl)porphyrine
TdCISPP : 5,10,15,20-tétra-(2,6-dichloro-3-sulfophényl)porphyrine
TdCICSPP : 5,10,15,20-tétra-(2,6-dichloro-3-chlorosulfophényl)porphyrine
MnTdCISPP : 5,10,15,20-tétra-(2,6-dichloro-3-sulfophényl)porphyrine de manganèse
FeTdCISPP : 5,10,15,20-tétra-(2,6-dichloro-3-sulfophényl)porphyrine de fer
TMCS : Triméthylchlorosylane
TMS : Tétraméthysylane
uma : unité de masse atomique
US : Ultrasons
UV : ultraviolet
 ε : coefficient d'absorption molaire ; λ : longueur d'onde
VP : Peroxydase Polyvalente (Versatile Peroxydase)
Xylp : Xylopyranosyle
Xyl : Xylose

Introduction Générale

La valorisation non alimentaire de la biomasse représente un axe majeur de recherche animant actuellement un grand nombre de scientifiques. Que ce soit à des fins énergétiques, en remplacement des énergies fossiles telles que le pétrole, ou comme stratégies innovantes permettant l'accès à de nouveaux produits bio-sourcés, les approches de valorisation modernes se veulent avant tout respectueuses des principes de chimie verte et font globalement référence à des procédés ou à l'usage de produits éco-compatibles. Composées principalement de cellulose, de lignine et d'hémicelluloses, la biomasse végétale, renouvelable, peut apporter de nombreuses solutions industrielles. La cellulose est aujourd'hui valorisée de très nombreuses manières comme pour les productions ancestrales de textile ou de papier. Bien d'autres applications industrielles contemporaines de ce polymère ou de ces dérivés pourraient être citées, comme dans les domaines des matériaux, des cosmétiques ou encore de l'agroalimentaire, et son champ d'application reste très largement ouvert. Les lignines et les hémicelluloses, moins connues, peuvent aussi trouver des applications industrielles. En particulier, les hémicelluloses sont aujourd'hui considérés par les chercheurs comme des polysaccharides hautement valorisables. Déjà utilisées comme matière première dans le domaine de l'énergie, pour la production de biocarburants, leur potentiel de valorisation atteint également les secteurs industriels des cosmétiques, de l'agroalimentaire mais aussi de la pharmacie. Toutefois, l'utilisation massive de biomasse végétale pour une valorisation non alimentaire ne doit en aucun cas altérer les productions dont l'usage est habituellement réservé à l'alimentation humaine ou animale sous peine de générer de graves déséquilibres aux répercussions mondiales. Pour cette raison, il est important d'accorder une attention plus particulière aux co-produits des productions agricoles, souvent qualifiés de déchets et représentant des volumes considérables. C'est notamment le cas des co-produits des industries forestières produisant chaque année des millions de tonnes de déchets à travers le Monde. Il s'agit donc là d'une ressource renouvelable et, si elle est utilisée de façon raisonnable et raisonnée, éthiquement acceptable.

La Région Limousin est une région très forestière. En effet, plus du tiers de sa superficie est recouverte par des arbres, dont le chêne est l'essence la plus représentée. Le châtaignier, espèce emblématique de la région, y est également bien implanté, au même titre que le pin de Douglas ou encore le hêtre. Le tiers de la superficie boisée du Limousin est constituée de résineux tandis les feuillus occupent les deux tiers restants. Implantée au cœur de la France, qui est un des pays les plus boisés d'Europe (28 % de sa superficie), le Limousin possède une filière bois très active, participant largement à la dynamique économique industrielle de la région. A l'échelle régionale, ce sont des milliers de tonnes de coproduits qui

sont produits chaque année, encore peu valorisés. La Région Limousin réfléchit également depuis quelques années sur une orientation stratégique de la filière bois afin d'optimiser son rendement économique mais également son utilité sociétale. Dans ce cadre, l'accent semble être mis sur l'innovation, qui doit être considéré comme le moteur du développement de la filière, et notamment sur la valorisation du bois et de ses composants.

C'est dans ce contexte que depuis de nombreuses années le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) s'intéresse à de nouvelles voies de valorisation de la biomasse forestière, en mettant l'accent sur les essences régionales telles que le Douglas ou le châtaignier, mais également sur des lichens ou autres végétaux forestiers. Des recherches les plus fondamentales aux plus appliquées, le LCSN s'attache à participer à l'effort régional qui va dans le sens de l'innovation.

Dans ce travail, nous nous intéresserons particulièrement au bois de châtaignier, dont les sciures sont une ressource relativement abondante et disponible. Sur la base de travaux antérieurs du laboratoire nous proposons plus précisément de revisiter le protocole de **fractionnement du bois** en ses constituants moléculaires élémentaires classiquement utilisé depuis de nombreuses années. Pour cela, notre approche à consister :

- à mettre en œuvre un processus de **délicnification** plus doux, permettant de s'affranchir des dérivés chlorés nécessaires dans la méthode classique. Cette méthodologie repose sur une réaction d'oxydation des lignines assistée par un catalyseur de type **phtalocyanine** ou **porphyrine** préalablement synthétisé et son développement s'appuie sur des résultats préliminaires obtenus au laboratoire.¹
- à **extraire les hémicelluloses** des résidus délicnifiés soit en appliquant les conditions classiques de solubilisation en milieu alcalin, soit en traitant la matière végétale simplement à **l'eau chaude**, conditions moins destructrices.
- Les hémicelluloses extraites de châtaignier étant réputées avoir des propriétés biologiques, notamment oncologiques,^{2,3} nous nous sommes proposés sur la base des structures caractérisées d'étudier leurs propriétés anti-oxydantes pour une valorisation potentielle de ces polymères comme conservateurs.

¹ Barbat, A. ; Gloaguen, V. ; Sol, V. ; Krausz, P., *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, 6538-6544

² Moine, C.; Krausz, P.; Chaleix, V.; Sainte-Catherine, O.; Kraemer, M.; Gloaguen, V. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 60-66.

³ Barbat, A.; Gloaguen, V.; Moine, C.; Sainte-Catherine, O.; Kraemer, M.; Rogniaux, H.; Ropartz, D.; Krausz, P., *Journal of Natural Products*, **2008**, *71*, 1404-1409.

Partie I : Le bois, la lignine
et les xylanes : Etat de la
question

Chapitre 1 : Le bois : constitution et constituants

I. La paroi cellulaire végétale

Le bois est un ensemble de cellules végétales formant le tronc de l'arbre. La paroi cellulaire végétale est une structure organisée et complexe, semi rigide et dynamique, qui entoure le lumen qui constitue le cœur de la cellule. Elle joue un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques des organes, participe à la croissance des tissus et assure un rôle de barrière qui permet aux cellules de résister à la pression osmotique et aux attaques des pathogènes. La paroi cellulaire végétale est constituée de trois parties distinctes⁴ :

- La lamelle moyenne, qui correspond au « ciment » intercellulaire, dont l'épaisseur est de 0,5 à 1,5 μm .⁵
- La paroi primaire, qui constitue la couche extérieure de la cellule, d'une épaisseur d'environ 0,1 μm .⁶
- La paroi secondaire correspond à la paroi interne des cellules végétales. Elle est elle-même constituée de trois sous-couches fibreuses : la couche externe S1, la couche médiane S2 et la couche interne S3.

La paroi cellulaire végétale est essentiellement constituée de polysaccharides (celluloses, hémicelluloses, pectines) et de polyphénols ($\approx 90\%$ de la matière sèche).

La lamelle moyenne est composée essentiellement de pectines et de lignines.

La paroi primaire est en majorité constituée de micro-fibrilles de cellulose, d'hémicelluloses et de pectines. Elle peut également contenir de la lignine.

La paroi secondaire a une composition similaire à la paroi primaire mais contient davantage de lignine. Les couches S1 et S3 représentent entre 5 et 10% de l'épaisseur de la membrane cellulaire alors que la couche S2 près de 85%.⁷

⁴ Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E., *Biologie végétale*, Ed. De Boeck, **1999**, Freeman and Company/Worth Publishers.

⁵ Natterer, J.; Sandoz, J.L.; Rey, M., *Traité de Génie Civil : Construction en bois*, **2004**, 13, 20.

⁶ Arnaud DAY. *Vers une compréhension moléculaire de la qualité des fibres de lin (Linum usitatissimum L.)*. Colloque annuel du GDR « Assemblages des macromolécules végétales », Draveil. **2004**.

⁷ SAFOU-TCHIAMA Rodrigue. *Caractérisation physico-chimique, stabilité supramoléculaire et réactivité chimique de quelques essences tropicales*. Thèse de doctorat : Sciences du bois. Bordeaux : Université de Bordeaux 1, Université de Masuku (Gabon), Bordeaux. **2005**

La nature et les proportions relatives des différents polymères qui entrent dans la composition de la paroi cellulaire varient selon la plante considérée et son niveau de développement (tissus, âge,...).

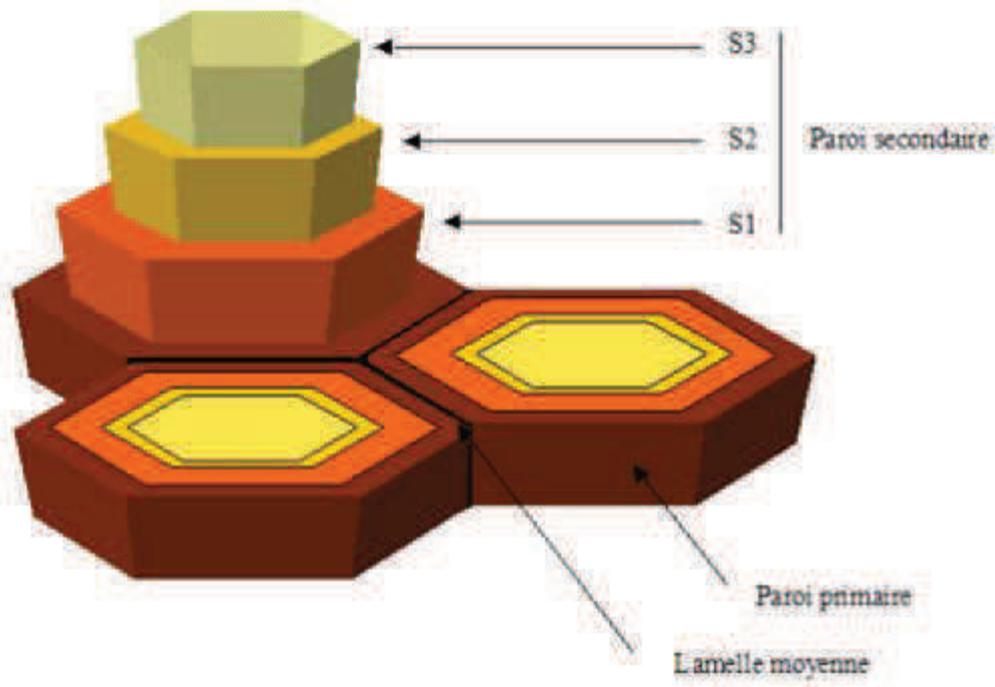


Figure 1: Organisation de la paroi cellulaire végétale
(Source : <http://amazingseaweed.wordpress.com/a-propos/>)

II. Les constituants de la paroi cellulaire du bois

Les principaux constituants de la paroi cellulaire végétale du bois sont des polymères (cellulose, hémicelluloses, pectines et lignine). On y retrouve également des molécules de faible masse moléculaire, comme des sucres simples ou des tannins. La proportion de ces polymères peut varier d'une essence de bois à l'autre. Le Tableau 1 présente un exemple des variations de composition observées entre le bois de résineux et de feuillus.⁸

⁸ GOVIN Alexandre. *Aspects physico-chimiques de l'interaction bois-ciment – Modification de l'hydratation du ciment du bois*. Thèse de doctorat : Génie des procédés. Saint-Etienne: Ecole Nationale Supérieure des Mines, 2004.

Tableau 1: répartition moyenne des différents constituants de la paroi cellulaire végétale (% de masse sèche)⁸

	Résineux (% masse)	Feuillus (% masse)
Cellulose	42 ± 2	45 ± 2
Lignine	27 ± 2	30 ± 5
Hémicelluloses	28 ± 3	20 ± 4
Extractibles	3 ± 2	5 ± 3

II.1. La cellulose

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur Terre. Il s'agit d'un homopolymère dont l'unité de base est le cellobiose, constitué de deux unités D-glucopyranose liés en $\beta(1\rightarrow4)$. (Figure 2)

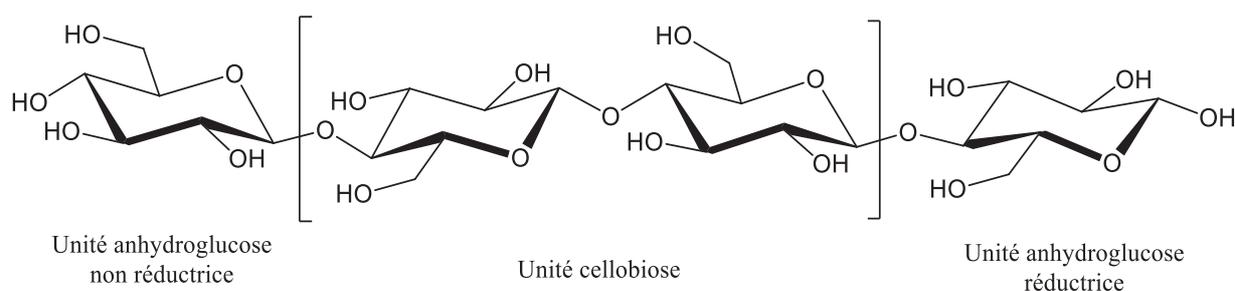


Figure 2: Structure chimique de la cellulose

Sa structure linéaire ainsi que ses nombreuses fonctions hydroxyles lui permettent d'établir de très nombreuses liaisons hydrogène à la fois intra et intermoléculaire (Figure 3). Ces liaisons lui confèrent sa forte résistance mécanique ainsi que son caractère insoluble dans la plupart des solvants. Cette organisation permet de retrouver au sein même de la cellulose des fractions dites « cristallines » et amorphes, et des fractions dites « fibrillaires », plus souples.

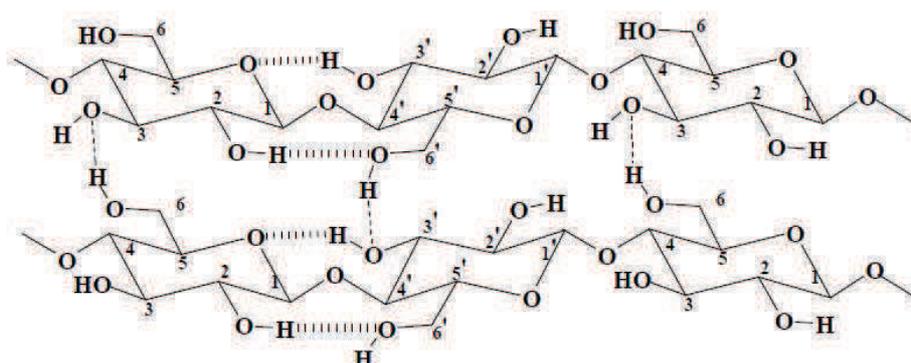


Figure 3: liaisons intra- et intermoléculaires dans la cellulose

Le degré de polymérisation de la cellulose (DP : nombre d'unité anhydroglucose moyen par chaîne de cellulose) peut varier de plusieurs centaines à quelques milliers et diffère suivant l'espèce de l'arbre (DP moyen de l'épicéa : 8000, du coton : 20000).⁹

La solubilisation de la cellulose a fait l'objet de quelques études reportées dans la littérature. Insoluble dans l'eau, la cellulose peut être solubilisée dans différentes conditions :

- En solution saline après décongélation¹⁰
- Dans des liquides ioniques (sels de pyridinium ou d'imidazolium couplés à des contre-ions de type halogène, acétate ou BF_4^-)¹¹
- Dans un mélange DMAc/LiCl¹²

II.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses regroupent l'ensemble des polymères glucidiques non cellulosiques et non pectiques. Elles permettent de renforcer la cohésion de la paroi cellulaire en formant des réseaux entre la cellulose et la lignine. Elles sont, après la cellulose, les polysaccharides les plus abondants de la paroi cellulaire.

Les hémicelluloses sont souvent constituée d'un axe osidique principal linéaire substitué par des chaînes latérales variables. Leur degré de polymérisation dépasse rarement 200 unités mono-saccharidiques. Le suffixe -ane désignera la nature de la chaîne principale. Par exemple, le xylane est un polymère de xylose. Lorsque l'enchaînement est constitué d'un seul type de monomère, on parle d'un homo-polysaccharide, dans le cas contraire, il s'agit d'un hétéro-polysaccharide. On distingue cinq familles d'hémicelluloses principales, les xylanes, les mannanes, les xyloglucanes, les glucanes et les arabinogalactanes.

Les hémicelluloses sont majoritairement solubles dans l'eau et sont généralement extraites en milieu alcalin.

Les xylanes sont les hémicelluloses majoritaires des essences forestières de feuillus (chêne, châtaignier...), tandis que les galactomannanes sont les polysaccharides dominants chez les résineux, dont un exemple est représenté ci-dessous (Figure 4).¹³

⁹ Berlioz Sophie. *Etude de l'estérification de la cellulose par une synthèse sans solvant. Application aux matériaux nanocomposites*. Thèse de doctorat : Sciences des Polymères. Grenoble: Université Joseph Fourier, **2007**.

¹⁰ Elchinger P.H.; Faugeras P.A.; Zerrouki C.; Montplaisir D.; Brouillette F.; Zerrouki R. *Green Chemistry* **2012**, *14*, 3126-3131

¹¹ Swatloski, R.P.; Spear, S.R.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 4974-4975.

¹² Krouit, M.; Granet, R.; Krausz, P., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, *16*, 10091-10097

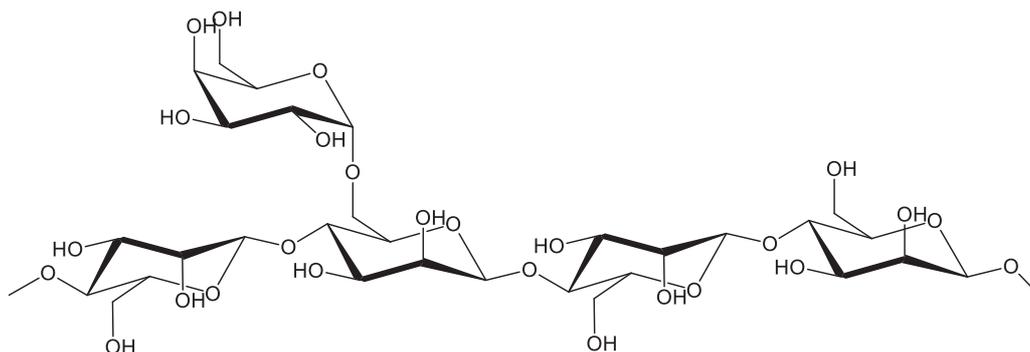


Figure 4: exemple de structure d'hémicellulose: le D-galacto-D-mannane d'après Ebringerova *et al.*¹³

II.3. La lignine

La lignine est décrite comme une macromolécule ramifiée, constituée de motifs aromatiques de type phénoliques, substitués par des groupements méthoxy et alkyles. Ces motifs sont associés entre eux par des liaisons éthers et des liaisons carbone-carbone.¹⁴ Les motifs phénoliques de base sont les alcools trans-coniférylique, trans-sinapylique et l'alcool trans-coumarylique, (figure 5). La lignine assure la rigidité et l'imperméabilité de l'arbre.

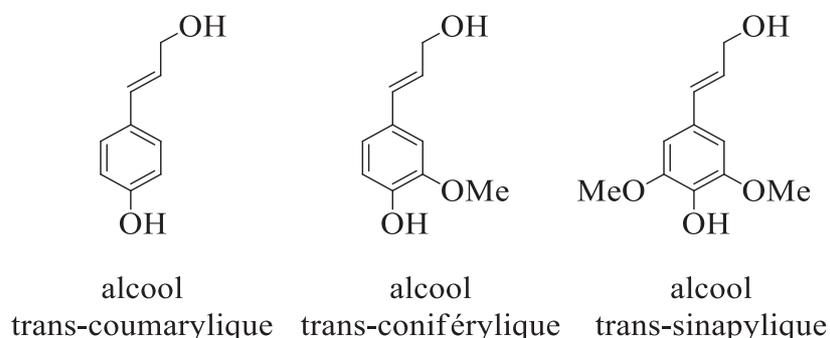


Figure 5: Monomères de base de la lignine

¹³ Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T., *Advances in Polymer Sciences* **2005**, *186*, 1-67.

¹⁴ Brauns, F.E.; *The chemistry of lignin*, The institute of paper chemistry, Appleton Wisconsin, **1962**, Academic press Inc, publishers- New York

II.4. Composés mineurs

II.4.1. Les pectines

Les pectines représentent environ 3 % de la matière sèche du bois. Ce sont des hétéropolysaccharides que l'on trouve principalement au niveau de la lamelle moyenne de la cellule. Elles sont constituées de chaînes d'acide D-galacturonique reliés par des liaisons glucidiques de type α (1 \rightarrow 4). Lorsque la chaîne homogalacturonique est assez longue, elles peuvent être stabilisées par des ions calcium (Figure 6). Des résidus de L-rhamnose pourront s'intercaler et former des repliements de la chaîne appelés « coudes pectiques ». ¹⁵

Les teneurs en rhamnose pourront augmenter et ces derniers être substitués par des chaînes latérales plus ou moins longues et ramifiées de type arabinane, galactane et/ou arabinogalactane pour former les rhamnogalacturonanes de type I (RGI).

Plus rarement, une chaîne homogalacturonique courte pourra être substituée par quatre oligosaccharides caractéristiques pour former le rhamnogalacturonane de type II (RGII).

L'organisation tridimensionnelle tout comme les interactions entre ces trois familles de pectines au sein de la paroi cellulaire font l'objet de propositions spéculatives. ¹⁶

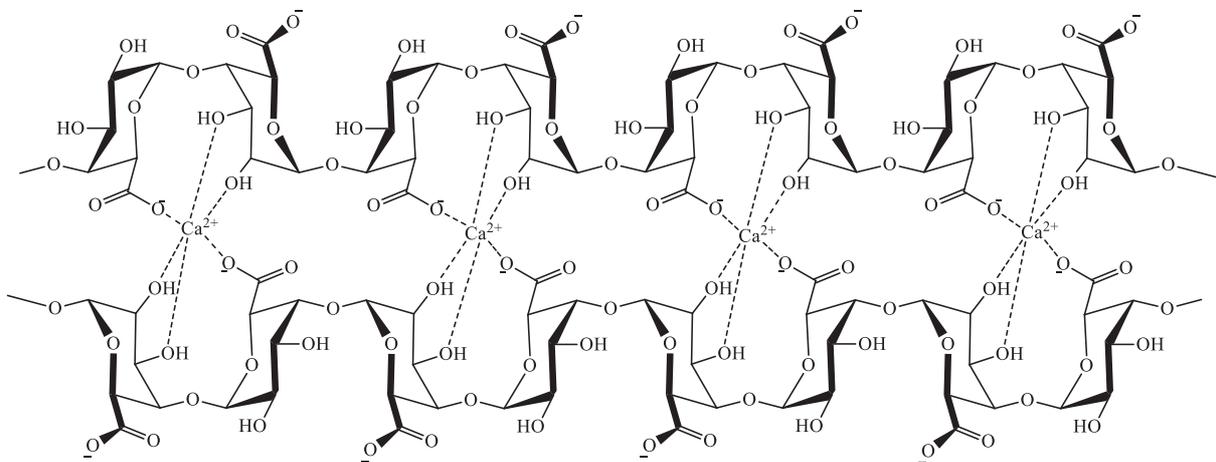


Figure 6: Structure de chaînes homo-galacturonanes stabilisées par des ions calcium
(Structure dite « boîte à oeuf ») d'après Powell *et al.* ¹⁷

Les pectines sont extractibles dans l'eau chaude en présence de chélateur de calcium (EDTA, oxalate d'ammonium...). Les protocoles d'extraction pourront varier en fonction de la nature chimique des pectines et de leur localisation dans la paroi.

¹⁵ Jarvis, M.C., *Plant, Cell and Environment*, **1984**, 7, 153-164

¹⁶ Vincken, J.P.; Schols, H.A.; Oomen, R.J.F.J.; McCann, M.C.; Ulvskov, P.; Voragen, A.G.J.; Visser, R.G.F., *Plant Physiology*, **2003**, 32, 1761-1789

¹⁷ Powell, D.A.; Moris, E.R.; Gidley, M.J.; Rees, D.A., *Journal of Molecular Biology*, **1982**, 155, 517-531.

II.4.2. Les composés non-structuraux

Les circulants sont un ensemble de petites molécules comme des sucres, des tannins, des lipides ou des minéraux. Leur faible masse moléculaire (entre 500 et 3000 Da pour les tannins) les rendent solubles dans les solvants usuels.

Les tannins du bois peuvent être classés en deux catégories, les tanins hydrolysables (ou gallotanins) et les tannins condensés (ou tanins catéchiques) (Figure 7).

Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavonoïdiques (type catéchine ou dérivés).

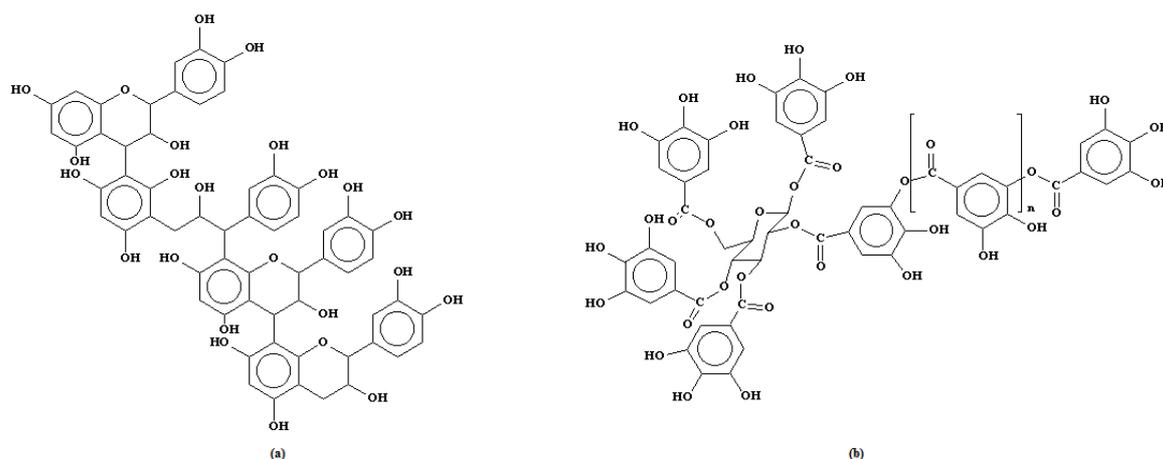


Figure 7: Structures des tanins catéchiques (a) et des gallotanins (b).

Les gallotanins sont des saccharides poly-estérifiés par un nombre variable d'acides phénoliques. L'identification des différents monomères constitutifs de la structure peut se faire après hydrolyse des fonctions ester. Les monomères les plus représentés sont le glucose ainsi que les acides gallique et ellagique.

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes. Ils ont une activité de défense antifongique, antipathogène (lutte contre les xylophages dans le cas du bois) et participent également dans les fonctions de reproduction. Il s'agit principalement de terpénoïdes, d'alcaloïdes ou de molécules phénoliques.¹⁸

¹⁸ Bakary TRAORE. *Influence de la structure anatomique et des métabolites secondaires sur les propriétés physiques et la qualité acoustique du bois de vène (Pterocarpus Erinceus poir) provenant du Mali*. Thèse de doctorat : Sciences du bois. Laval (Québec) : Université de Laval Québec, Agroparistech Nancy. 2009.

III. La paroi secondaire végétale

L'analyse ou l'extraction des différents constituants du bois passe par une étape de déstructuration de la matière ligno-cellulosique. La mise en œuvre de cette séparation requière une bonne compréhension de l'organisation et des interactions existantes entre ces différents composés. Nous allons, dans ce chapitre, nous intéresser aux caractéristiques particulières de la paroi secondaire végétale.

III.1. Organisation de la paroi

La paroi cellulaire secondaire propose une organisation structurale bien définie. Les polysaccharides y sont organisés de façon hélicoïdale. La cellulose est organisée en macro-fibrilles, formées à partir de micro-fibrilles (assemblage de polymères de glucose) (Figure 8). Elle est le constituant le plus abondant. Elle détermine l'aspect de la paroi secondaire végétale.

Dans les couches de la paroi secondaire, les micro-fibrilles de cellulose sont orientées différemment. Dans les couches S1 et S3, ils sont orientés entre 60 et 90° par rapport à l'axe de la cellule, alors que les micro-fibrilles de la couche S2 sont orientées de 5 à 30°.7 Ce maillage offre au tronc de l'arbre les conditions de résistance mécanique optimales. L'orientation verticale des micro-fibrilles de la couche S2 permet à l'arbre de s'élever. En plus de ses propriétés mécaniques, la paroi secondaire, plutôt grâce à la lignine et aux métabolites secondaires, participe à la cohésion entre les cellules, régule la croissance de l'arbre et le défend des attaques pathogènes. Elle se forme à la fin du processus d'élongation cellulaire de la paroi primaire.

Cette organisation nous permet de repérer facilement la paroi secondaire végétale lors d'analyse microscopique.

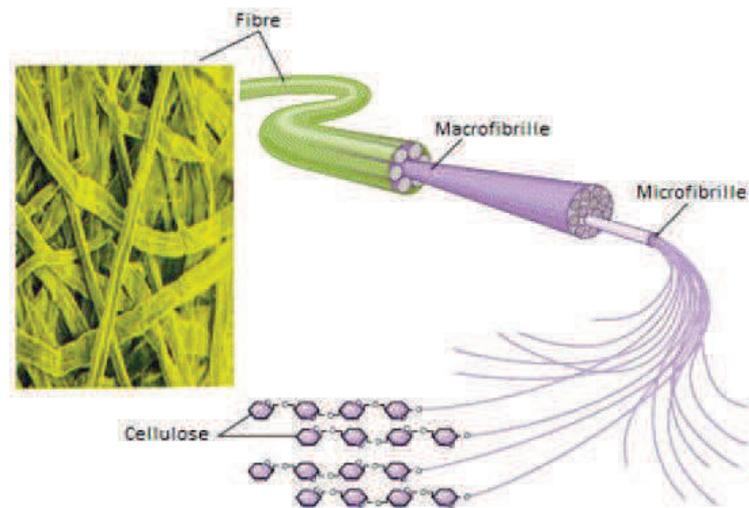


Figure 8: De la cellulose à la fibre d'après P.H. Elchinger¹⁹

Le processus de biosynthèse de la paroi cellulaire est complexe. Gorshkova *et al.*²⁰ proposent un mécanisme de formation de la paroi secondaire végétale. Une fois les fibrilles synthétisées, les hémicelluloses sont associées à la cellulose par liaisons hydrogène, formant ainsi une couche autour des fibrilles. Elles s'organisent en fonction de l'orientation des microfibrilles. La lignine (dont les monomères sont synthétisés dans le cytoplasme) vient ensuite se polymériser dans les espaces laissés libres de la structure. La structure et l'organisation de la lignine au sein de cette matrice varie en fonction de l'état physiologique (âge, stress,...) du tissu et de l'espèce considérée. Elle assure la rigidité et l'imperméabilité de l'ensemble. (Figure 9)

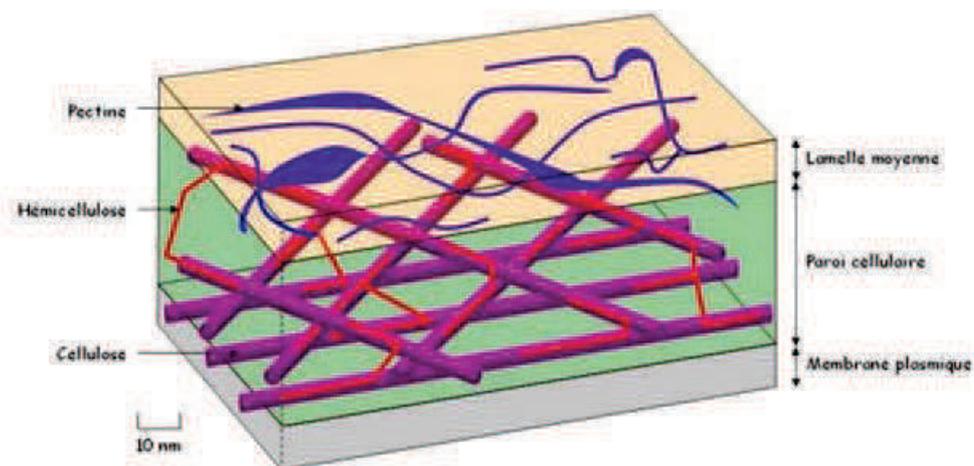


Figure 9: Organisation des polymères dans la paroi cellulaire végétale secondaire²¹

¹⁹ ELCHINGER Pierre-Henri. *Réticulation de fibres lignocellulosiques et d'amidon - Vers de nouveaux matériaux pour l'industrie papetière*. Thèse de doctorat: chimie appliquée - chimie des substances naturelles. Limoges: Université de Limoges / Université du Québec à Trois-Rivières (Canada), **2013**.

²⁰ Gorshkova, T.A. ; Mikshima, P.V.; Gurjanov, O.P.; Chemikosova, S.B., *Biochemistry (Moscow)*, **2010**, 75, 159-172

²¹ <http://botablog2.unblog.fr/2011/01/>

III.2. Interactions entre polymères pariétaux

Les différents constituants de la paroi cellulaire végétale sont reliés entre eux par des liaisons covalentes, hydrogènes ou ioniques.

Les liaisons entre polysaccharides (hémicelluloses – cellulose), sont aujourd’hui bien connues. Il s’agit principalement de liaisons hydrogène multiples qui permettent de former un complexe cellulosique extrêmement stable. Concernant les liaisons polysaccharides - lignines, il s’agit également de très nombreuses liaisons hydrogène qui stabilisent fortement le complexe lignines-sucres (LCC, Lignins-Carbohydrates Complex), mais également d’un certain nombre de liaisons covalentes, principalement de type ester ou éther.²² (Figure 10)

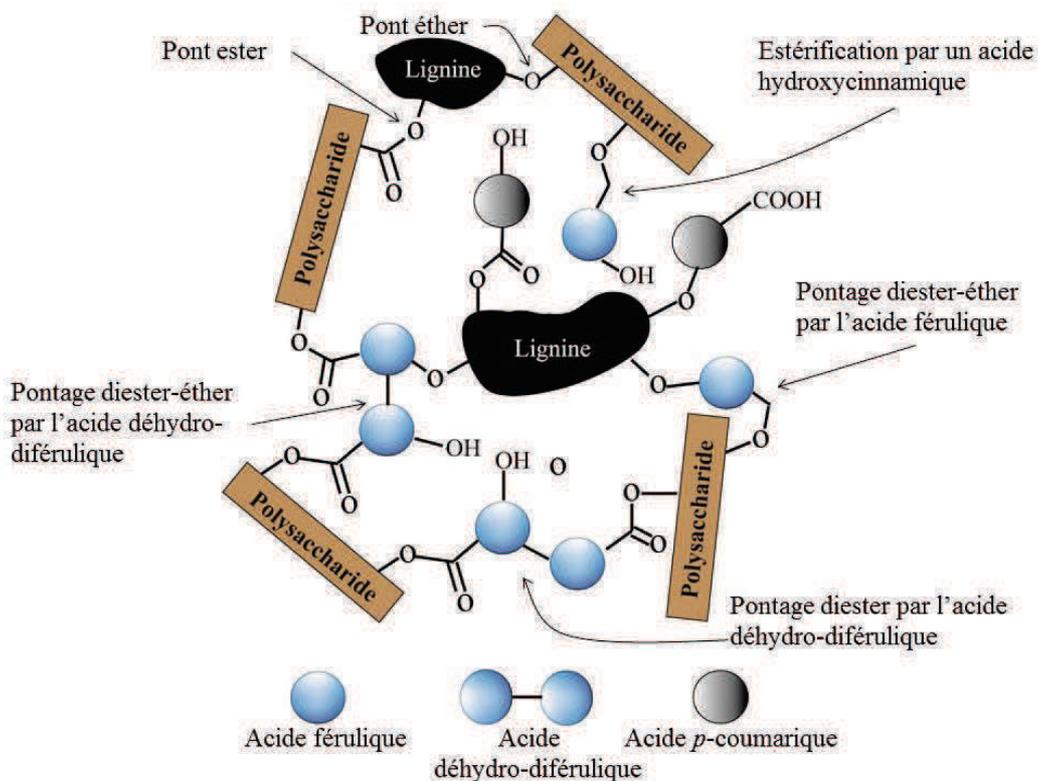


Figure 10: Liaisons covalentes dans la paroi cellulaire végétale d'après Iiyama *et al.*²²

L'extraction des hémicelluloses du bois de châtaignier, qui est l'un des objectifs principaux de notre travail, passe par une première étape de déstructuration du bois par délignification. Nous nous proposons donc dans le chapitre suivant de présenter plus spécifiquement les caractéristiques moléculaires de la lignine et les principales méthodes de délignification du bois.

²² Iiyama, K.; Lam, T.B-T. ; Stone, B.A., *Plant Physiology*, **1994**, *104*, 315-320

Chapitre 2 : Lignine et délignification

La lignine est l'un des principaux constituants de la paroi cellulaire du bois. Sa structure complexe et largement ramifiée assure la rigidité et l'imperméabilité du bois. La littérature décrit les voies de biosynthèse et propose des structures-type de la lignine. La délignification est une étape incontournable dans le processus de fractionnement du bois. De nombreuses techniques de délignification existent, des méthodes les plus classiques aux moins conventionnelles. Après une description des connaissances actuelles sur la lignine, nous verrons dans ce chapitre différents moyens permettant la délignification du matériel végétal.

I. La lignine

I.1. Biosynthèse de la lignine

Le processus de biosynthèse de la lignine débute dans le cytoplasme de la cellule végétale. Elle a lieu selon la voie du Shikimate avec formation d'acides α -aminés tels que la (L)-phénylalanine ou la (L)-tyrosine, à la base du métabolisme des phénylpropanoïdes (voie des acides cinnamiques).

Le mécanisme de ces réactions fait intervenir une association d'enzymes complémentaires qui permettent d'obtenir les trois alcools de base de la lignine, les monolignols (Figure 11). La biosynthèse est initiée par la transformation de l'acide *p*-coumarique en *p*-coumaryl-CoA grâce à l'enzyme 4-Coumarate CoA Ligase (4CL). Le coenzyme A (CoA) permet de former facilement des fonctions thioester fortes en énergie et plus facilement modifiables. Par l'intervention de l'enzyme Cinnamoyl-CoA Réductase (CCR), le thioester est réduit en aldéhyde puis en alcool par l'Alcool Cinamyl Déshydrogénase (CAD). On obtient alors l'alcool *p*-coumarylique. Le *p*-coumaryl-CoA peut également suivre une cascade de réactions enzymatiques menant au coniféraldéhyde. Ce dernier peut être réduit jusqu'à l'alcool *p*-coniférylique, ou bien réagir avec les enzymes Férulate 5-Hydrolase (F5H) et acide Caféique *O*-MéthylTransférase (COMT) pour former le sinapaldéhyde. Celui-ci est alors réduit grâce à l'action d'une déshydrogénase en alcool *p*-sinapylique.

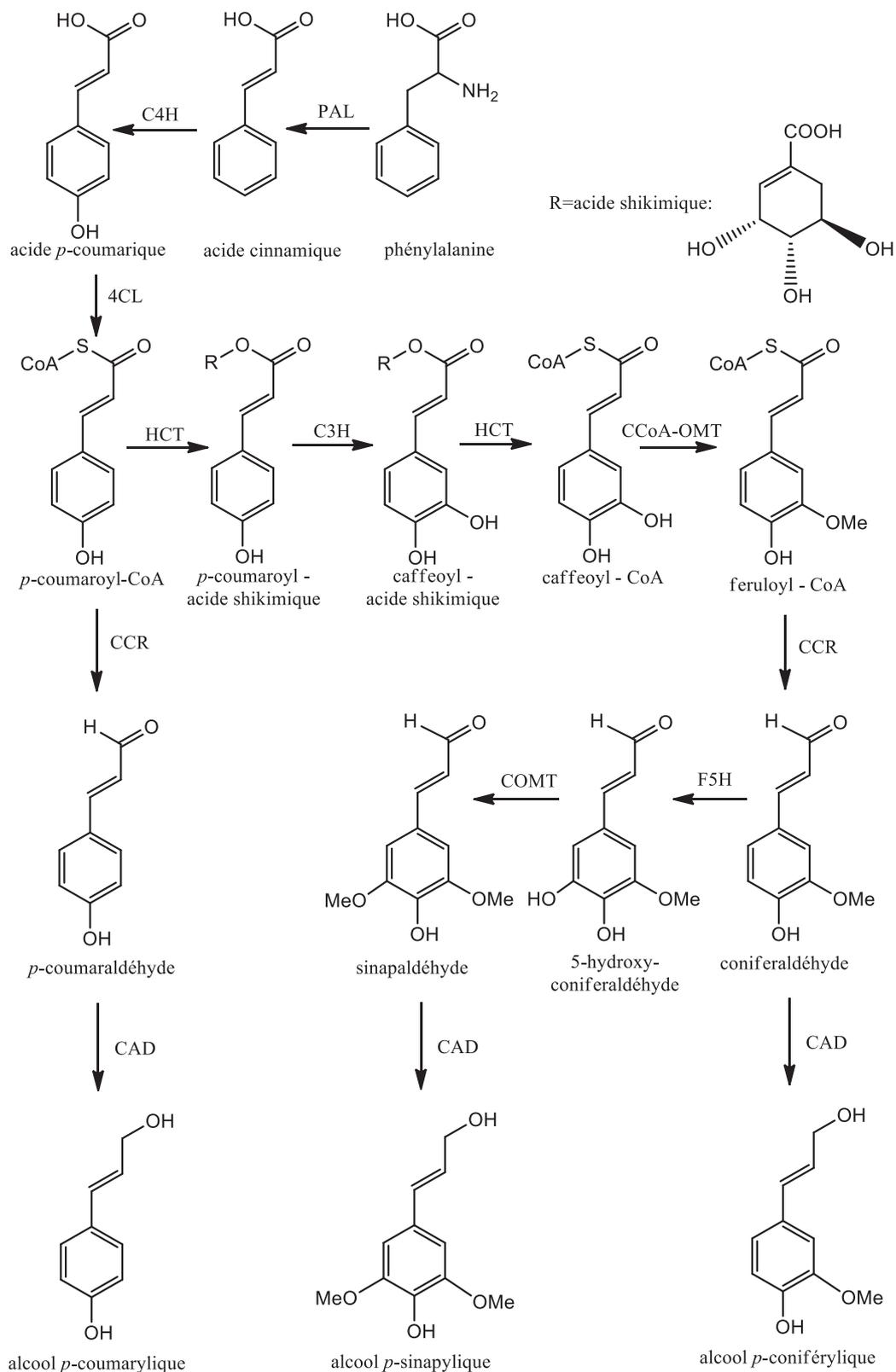


Figure 11: Voie de biosynthèse des monolignols, d'après Vanholme *et al*²³.

(PAL : phénylalanine amonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate : CoA ligase ; C3H : *p*-coumarate 3-hydroxylase ; HCT : *p*-hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate *p*-hydroxycinnamoyltransférase ; CCoA-OMT : caffeoyl-CoA *O*-méthyltransférase ; CCR : cinnamoyl-CoA réductase ; F5H : férulate 5-hydrolase ; COMT : acide cafféique *O*-méthyltransférase ; CAD : alcool cinamyl déshydrogénase.)

²³ Vanholme, R.; Demedts, B.; Moreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W., *Plant Physiology*, **2010**, *153*, 895-905

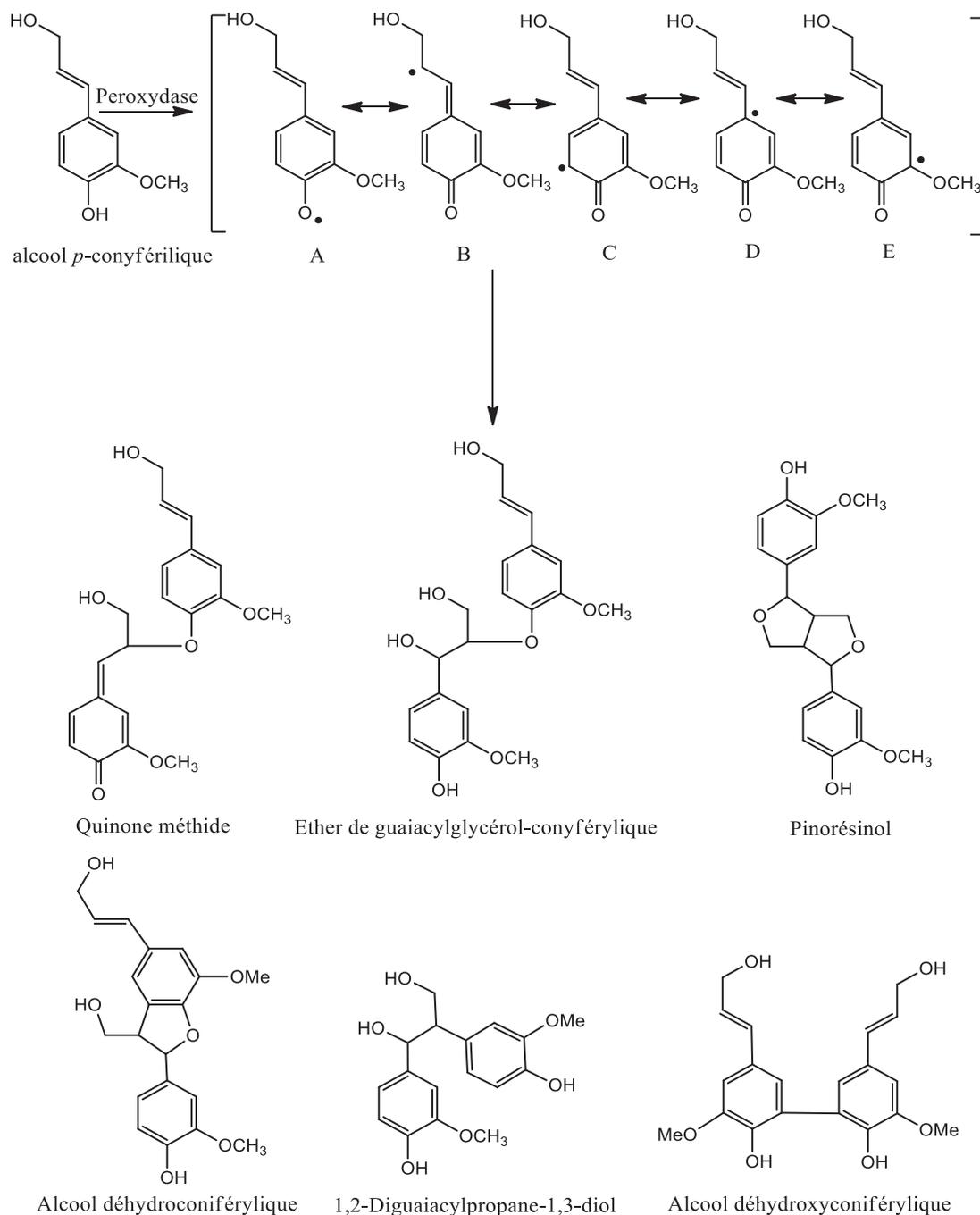


Figure 12: Processus de lignification dans la paroi cellulaire végétale d'après Crestini et Tagliatesta.²⁴

Une fois ces alcools formés, ils sont transportés à travers la membrane plasmique et déposés dans la paroi cellulaire où l'action des laccases et des *peroxydases* vont permettre leur polymérisation (Figure 12). Même si ce mécanisme de transport est encore mal compris, Vanholme *et al.*²³ ont formulés plusieurs hypothèses.

La première stipule que les monolignols traverseraient la membrane plasmique sous forme glycosylée et seraient libérés ensuite sous forme native par l'action de glycosydases

²⁴ Crestini, C.; Tagliatesta, P., *In The Porphyrin Handbook*, 2003, Volume 11, Ed. Elsevier Science (USA), p. 161-203.

présentent au niveau de la paroi. La seconde hypothèse propose que les monolignols soient transportés par des vésicules issues de l'appareil de Golgi à travers la membrane plasmique. Une dernière hypothèse propose que les monolignols traversent, par simple diffusion, la membrane plasmique.²³

Une fois déposés dans la paroi, les monolignols vont être polymérisés par l'action de *peroxydases*. La forte densité d'électrons π au niveau de l'oxygène de la fonction hydroxyle favorise la formation de liaison β -O-4, qui est la liaison la plus courante dans la lignine. La grande variété de liaisons entre les monolignols est à l'origine de la grande diversité structurale de la lignine.

I.2. Structure moléculaire de la lignine

La structure chimique exacte de la lignine est encore controversée. Cependant, grâce aux études portant sur la biosynthèse de la lignine, ainsi qu'au perfectionnement des méthodes de caractérisation, un certain nombre de liaisons caractéristiques ont pu être mises en évidence (Figure 13). Celles-ci sont classées en liaisons carbone-carbone (liaisons 5-5, β -1, β -5, β - β) ou diaryl éther (liaisons 4-O-5).

Il existe les liaisons dites «condensés», résistantes aux dégradations chimiques usuelles, et les liaisons « non condensées » ou « labiles », de type éther (liaisons α -O-4, β -O-4). Les liaisons β -O-4 sont les plus fréquentes dans les lignines naturelles. Elles peuvent être rompues facilement par les méthodes classiques de dégradation chimiques (cf partie II). Le « dibenzodioxocine » (un hétérocycle à 8 atomes dont deux oxygènes) est une structure originale qui n'a été observé que dans la lignine.

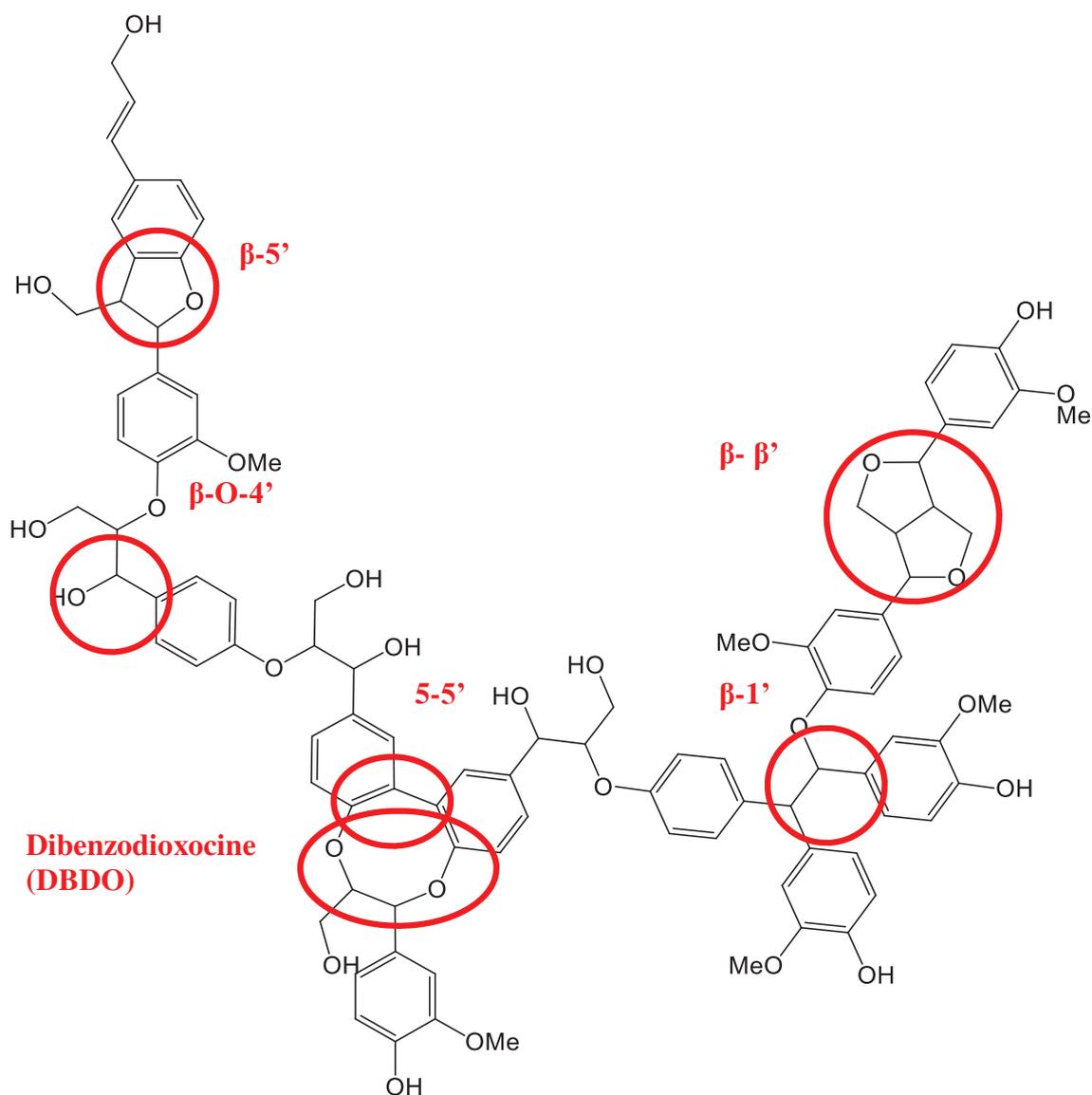


Figure 13: Principaux types liaisons décrites dans la lignine d'après Weckhuysen *et al*²⁵

I.3. Les liaisons lignine-hémicelluloses

Les liaisons lignine – hémicelluloses sont bien décrites dans la littérature. Ce sont principalement des liaisons éther et ester. Trois types de liaisons ont été décrites Figure 14 : les liaisons benzyléthers, benzylesters et phénynglycosides.

²⁵ Zakzeski J.; Bruijninx P. C. A.; Jongerius A. L.; B. M. Weckhuysen B. M., *Chemical Reviews*, **2010**, *110*, 3552-3599

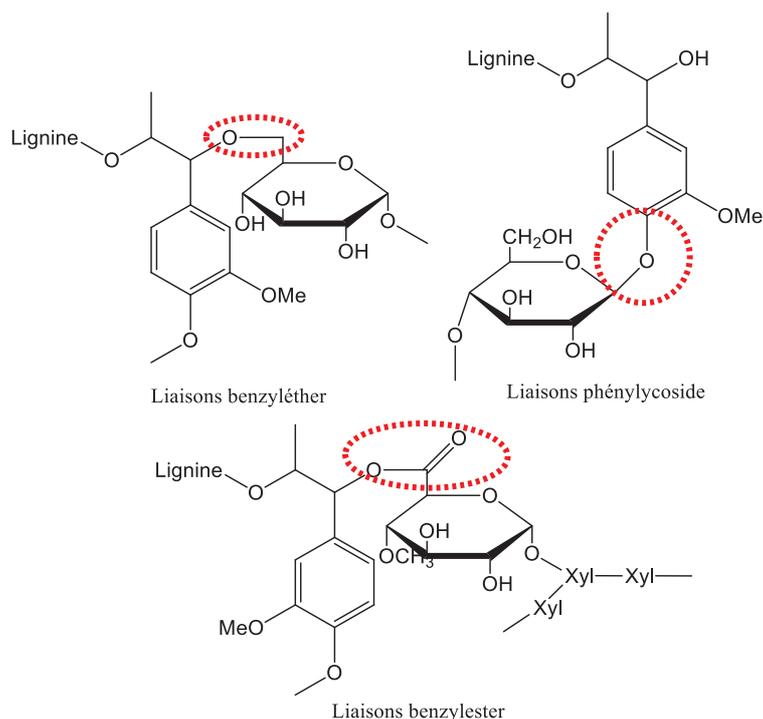


Figure 14: Liaisons lignine-hémicelluloses d'après Lawoko²⁶

De nombreuses études sur des phénols glycosylés ont permis de mettre en évidence des liaisons phénols-hémicelluloses. Rubio-Senent *et al.*²⁷ ont par exemple mis en évidence dans une étude portant sur l'analyse du processus de fabrication d'huile d'olive ce type de résidus. De telles structures ont également été décrites dans des études sur le chou²⁸ ou le vin.²⁹ (Figure 15)

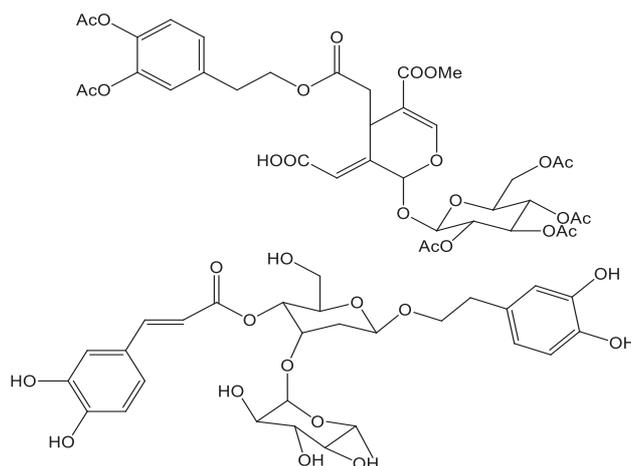


Figure 15: Structures ligno-saccharidiques d'après Rubio-Senent *et al.*²⁷
(co-produits de la fabrication d'huile d'olive)

²⁶ Lawoko, M., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2013**, 62, 705-713

²⁷ Rubio-Senent, F.; Lama-Muñoz, A. ; Rodriguez-Gutierrez, G. ; Fernandez-Bolaños, J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 1235-1248.

²⁸ Fiol, M.; Adermann, S.; Neugart, S.; Rohn, S.; Mügge, C.; Schreiner, M.; Krumbein, A.; Kroh, L.W., *Food Research International*, **2012**, 47, 80-89.

²⁹ Delcambre, A.; Saucier, C., *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, 47, 727-736.

II. La délignification du bois

La délignification est une étape indispensable dans un protocole de fractionnement d'une matière ligno-cellulosique telle que le bois. La maîtrise des techniques de délignification est un enjeu économique et environnemental important car les méthodes actuelles utilisées à une échelle industrielle sont nocives pour l'environnement. De nombreuses techniques existent, utilisées à l'échelle industrielle ou du laboratoire. Nous décrirons dans cette partie les méthodes de délignification les plus utilisées.

A l'échelle industrielle, le blanchiment des pâtes à papiers était effectué jusque dans les années 70 selon une méthode à deux étapes. La première consiste en une chloration avec le dichlore (Cl_2), tandis que la seconde utilise d'autres composés chlorés tels que le dioxyde de chlore. Ces étapes sont précédées d'une étape d'extraction alcaline. Depuis les années 70, les industries se sont tournées vers des méthodes moins nocives. Lors de l'étape d'extraction alcaline, un composé oxygéné, tel que l'oxygène moléculaire ou le *peroxyde* d'hydrogène est ajouté. Cela permet de s'affranchir de l'étape utilisant le dichlore, et par voie de conséquence fait diminuer drastiquement la quantité de déchets chlorés rejetés. C'est actuellement la méthode utilisée par 75 % des industries de blanchiment de pâtes. Des techniques dites « totalement sans chlore » (TCF, Totally Chlorine Free), utilisant des composés non chlorés (ozone, *peroxydes*...) sont apparues récemment. Elles présentent également l'avantage de produire des déchets qui peuvent être brûlés sans émission de gaz nocifs.

Nous allons maintenant aborder plus en détails les techniques développées et utilisées à l'échelle du laboratoire et parfois transposées à une échelle industrielle.

II.1. Les méthodes courantes

II.1.1. Délignification par les chlorites acides

Il s'agit de la technique la plus répandue à l'échelle du laboratoire. Elle est classiquement utilisée au LCSN comme procédé de délignification. Développée par Adams en 1965,³⁰ cette méthode est particulièrement adaptée à la délignification des sciures dépectinisées et s'effectue avec du chlorite de sodium en milieu acide (acide acétique). Le

³⁰ Adams G. A., *Carbohydrate chemistry*, Press, A., Ed. New York, 1965; Vol. V, 170-175.

chlorite en lui-même n'est pas très réactif, mais la réaction libère *in situ* du chlore et de l'acide hypochloreux, beaucoup plus réactifs. Ces agents chimiques permettent d'oxyder les lignines et de les dégrader. Ils attaquent préférentiellement les fonctions phénols mais également les doubles liaisons carbone-carbone. L'acide *peracétique* peut également être utilisé pour un mode d'action plus doux.

II.1.2. Délicnification par acidolyse

Sun *et al.*³¹ ont mis au point un processus de délicnification multi- étapes utilisant du dioxane et du DMSO en milieu acide (HCl). L'échantillon est placé quatre jours au broyeur à boules en présence de toluène. Les auteurs n'expliquent pas l'utilité du toluène dans ce cas. Cependant, l'intervention du dioxane et du DMSO en milieu acide comme délicnifiant permettraient, selon les auteurs, d'augmenter le rendement d'extraction en hémicellulose et améliorerait la sélectivité de l'extraction en hémicelluloses chargés en acides uroniques. Ce type de réaction hydrolyse en particulier les liaisons lignine-acide uronique.

II.1.3. Délicnification par le système acide formique/acide acétique

Cette méthode, connue depuis 1917, n'est réellement utilisée que depuis les années 80 (notamment par Hergert³²). Cette technique de délicnification du bois est réalisée en milieu aqueux. L'acide formique joue ici le rôle de donneur de proton, permettant le clivage des liaisons lignine-polysaccharides. L'acide acétique solubilise à la fois la lignine et les hémicelluloses, formant une « liqueur noire ». Les lignines peuvent ensuite être séparées des hémicelluloses par neutralisation à l'eau distillée.³³

II.1.4. Délicnification par ozonolyse

L'ozone est un puissant agent de délicnification parfois utilisé dans l'industrie pour le blanchiment des pâtes papetières.³⁴ Le mécanisme de dégradation de la lignine par l'ozone n'est pas totalement élucidé. On sait tout de même que durant le processus de blanchiment apparaissent des radicaux hydroxyles hautement réactifs et non sélectifs. Pour rendre cette réaction moins violente, l'ozone peut être utilisé en milieu acide. Ces réactions de type

³¹ Sun X.-F. ; Fowler P. ; Rajaratnam M. ; Zhang G., *Photochemical Analysis*, **2010**, 21, 406-415

³² Hergert H. L., *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper Industry*, Young R.A, Akhtar M Ed.; Wiley: New York, **1998**, 5-67

³³ Simon, M.; Brostaux, Y.; Vanderghem, C. ; Jourez, B. ; Paquot, M. ; Richel A., *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2013**, 89, 128-136

³⁴ Papon G., Chirat C., Lachenal D., Rapport d'activité du Laboratoire de Génie des Procédés Papetiers - UMR 5518: Grenoble, **2006**.

radicalaires conduisent à la formation de produits condensés de la lignine et de fonctions hydroperoxydes.³⁵ (Figure 16)

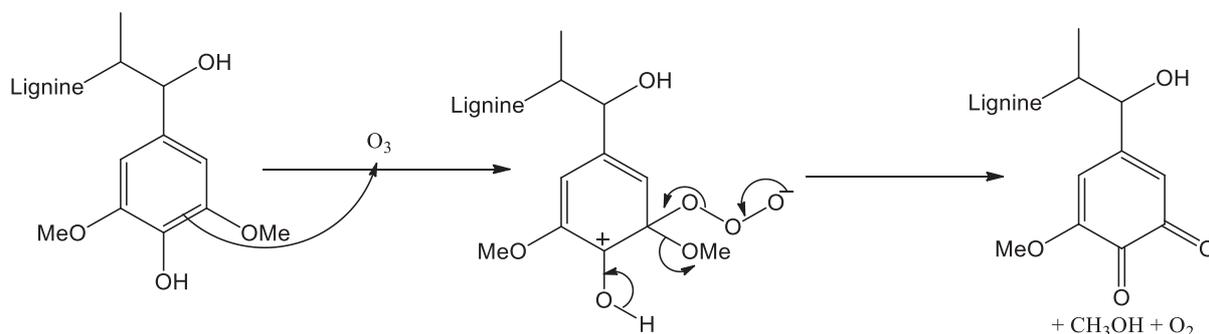


Figure 16: Mécanisme d'ozonolyse d'après Lyse³⁵

L'ozone peut également attaquer les fonctions alcène de la lignine, notamment le phénylpropène, grâce à une cycloaddition 1,3 dipolaire (Figure 17) :

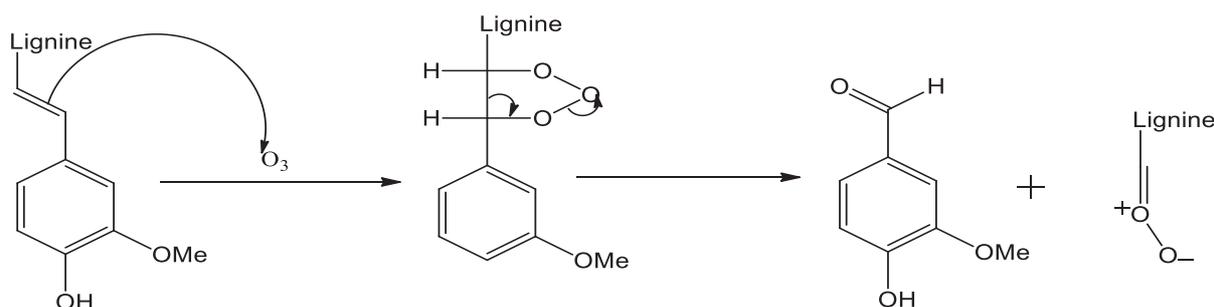


Figure 17: Action de l'ozone sur les alcènes d'après Lyse³⁵

II.2. Prétraitements

Afin d'améliorer l'efficacité des méthodes de délignification chimique, certains auteurs envisagent la mise en œuvre de procédés de prétraitements.

Nous présenterons ici quelques-unes des techniques développées récemment que sont le prétraitement ultra-sons, par explosion à la vapeur et le prétraitement par irradiation micro-ondes.

³⁵ Lyse T. E. *A Study on ozone modification of lignin in alkali-fiberized wood*. Lawrence, Thèse de Doctorat, Appleton, Wisconsin, 1979, p. 212

II.2.1. Ultrasons

Le prétraitement aux ultrasons est une méthode peu destructive qui favorise la séparation des lignines de la matière cellulosique. Les ultrasons induisent la lyse des cellules végétales et permet un meilleur accès aux fibres ligno-cellulosique. Ils déstructurent le complexe ligno-cellulosique et accroissent significativement le rendement de délignification.³⁶ Ils entraînent l'augmentation de la température et de la pression dans la matrice ligno-cellulosique. Il a été récemment utilisé sur le bambou,³⁷ ou encore sur la bagasse de canne à sucre³⁸. Cette technique est peu coûteuse car elle ne nécessite que quelques minutes d'activation. Une activation trop longue aurait un effet négatif puisse qu'elle conduirait à une baisse de rendement de délignification.³⁹

II.2.2. L'explosion à la vapeur

Cette technique consiste à mettre en contact la matière ligno-cellulosique avec de la vapeur d'eau (180-230°C) sous pression (14 à 25 bars). La phase d'imprégnation (1 à 20 min) est suivie par un retour rapide à pression atmosphérique. Ce traitement permet de diminuer la rigidité du complexe ligno-cellulosique. Ce prétraitement ne nécessite l'utilisation d'aucun produit chimique. Il a donc un faible impact environnemental. L'explosion à la vapeur a notamment été utilisée sur la paille de colza⁴⁰ pour la production de bio-éthanol avec les hémicelluloses extraites après ce prétraitement. Le prétraitement à la vapeur permet généralement d'obtenir des rendements de délignification supérieure à 90%.

II.2.3. Micro-ondes

L'utilisation de micro-ondes est particulièrement intéressante car celles-ci peuvent pénétrer en profondeur dans les milieux aqueux, par exemple dans une matrice ligno-cellulosique dispersée dans une solution aqueuse. Les micro-ondes permettent un meilleur accès aux fibres ligno-cellulosique et ne sont pas limitées en concentration de fibres en milieu aqueux. L'accès d'une enzyme, afin d'hydrolyser les polysaccharidiques, est ainsi faciliter par cette technique.⁴¹

³⁶ Bussemaker, M. ; Zhang, D., *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2013**, 52, 3563-3580

³⁷ Li M.F.; Sun S.N.; Xu F.; Sun R.C., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2012**, 19, 243-249

³⁸ Sun J.X; Xu F.; Sun R.C.; Wu S.B., *Polymer International*, **2004**, 53, 1711-1721

³⁹ Garcia A.; Gonzalez Alriols M.; Labidi J., *Bioresource technology*, **2012**, 108, 155-161

⁴⁰ Garmakhany, A.D.; Kashaninejad, M.; Aalami, M.; Maghsoudlou, Y. ; Khomieri, M. ; Tabil, L.G., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2013**, 94, 1607-1613

⁴¹ Yang, B.; Wyman, C.E., *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, **2008**, 2, 26-40.

De plus, les micro-ondes induisent un chauffage qui permet d'augmenter le rendement de délignification par rapport à un chauffage classique. En effet, Zhou *et al.*⁴² ont réalisé une étude comparative de délignification sur de la farine de bois de bouleau. Cette réaction s'effectue dans une solution d'acide formique à 88 % à 101 °C. D'une part, la réaction a lieu avec un chauffage classique, d'autre part, avec une activation micro-ondes à 700 W à différents temps de réaction. Les auteurs observent un rendement maximal de délignification de 66% par chauffage classique, 90 % pour une activation micro-ondes. De plus, le cœur de la lignine ne subirait pas de modification structurale, il n'y aurait donc qu'une modification de surface.

Le remplacement de l'acide formique par une solution de NaOH à 3% permet une plus large saponification des liaisons esters entre lignine et polysaccharides mais peut entraîner une hydrolyse des hémicelluloses.⁴³

Par conséquent, l'activation micro-ondes possède de nombreux avantages mais il paraît compliqué de transférer cette technique à l'échelle industrielle.

II.3. Délignification enzymatique

La lignine est une molécule organique extrêmement résistante à la dégradation biologique. Bien que la lignine résiste à l'attaque de la majorité des micro-organismes, certains champignons de la pourriture blanche sont capables de la dégrader principalement par des réactions d'oxydation. Les champignons dégradent la lignine par l'action combinée d'une famille d'enzymes appelées ligninases couplées à un cocktail de molécules pro-oxydantes⁴⁴. Ces enzymes ont un point commun, elles possèdent toutes un centre réactif, appelé hème, ou hème-*peroxydases*. Nous allons ici détailler le mode de fonctionnement de 3 de ces enzymes, la lignine *peroxydase* (LiP), la manganèse *peroxydase* (MnP) et la *peroxydase* polyvalente (Versatile *Peroxidase*, VP), qui sont les enzymes sécrétées par l'une des espèces de champignon de pourriture blanche les plus étudiées (*Phanerochaete chrysosporium*).

⁴² Zhou, S.; Liu, L.; Wang, B.; Xu, F.; Sun, R., *Process Biochemistry*, **2012**, *47*, 1799-1806

⁴³ Zhu, S.; Wu, Y.; Yu, Z.; Wang, C.; Yu, F.; Jin, S.; Ding, Y.; Chi, R.; Liao, J.; Zhang, Y., *Biosystems Engineering*, **2006**, *93*, 279–283.

⁴⁴ Martinez A. T.; Ruiz-Duelas F. J.; Martinez M. J.; Del Rio J. C.; Gutierrez A.; *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, *20*, 348-357

II.3.1. La Lignine Peroxydase (LiP)

La LiP est une protéine possédant un centre réactif de type porphyrinique (il s'agit d'une protoporphyrine IX) couplée à un atome de fer(III) (Figure 18). Cet atome de fer est penta-coordonné avec les quatre atomes d'azote du cœur pyrrolique, mais également avec un groupement histidine provenant de la protéine. Le fer forme une liaison avec le doublet non liant de l'azote de la fonction imidazole présente dans l'acide aminé. L'oxygène est capable de le transformer en fer(IV) qui peut ensuite oxyder la lignine, initiant ainsi sa dégradation.

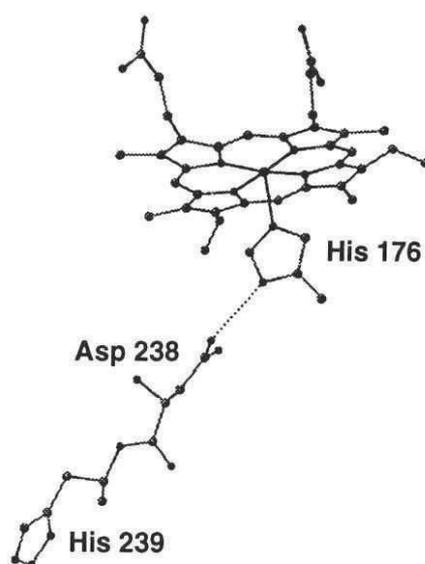


Figure 18: Structure schématique de la Lignine Peroxydase⁴⁵

La LiP peut oxyder la majorité des liaisons liant la lignine. Son activité est en revanche limitée lorsqu'elle oxyde des cycles aromatiques. Elle n'est active que sur les cycles possédant un nombre important de substituants électro-donneurs comme par exemple la tétraméthoxybenzène⁴⁶. La lignine peroxydase n'est donc pas capable à elle seule de déstructurer complètement la lignine.

⁴⁵ Johjima T.; Itoh N. ; Kabuto M. ; Tokimura F. ; Nakagawa T. ; Wariishi H. ; Tanaka H., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1999**, 96, 1989-1994.

⁴⁶ Hammel K. E.; Cullen D., *Current Opinion in Plant Biology*, **2008**, 11, 349-355

II.3.2. La Manganèse Peroxydase (MnP)

La manganèse peroxydase (MnP) vient compléter l'action de la LiP. Elle est capable, par des phénomènes de transfert électronique, d'oxyder les cycles aromatiques constituant pour partie la lignine. Elle agit en libérant des ions Mn^{3+} qui, une fois chélatés par des oxalates, sont capables de pénétrer dans la matrice ligno-cellulosique, agissant ainsi au cœur du substrat.⁴⁷ La chélation du Mn^{3+} par les oxalates permet d'empêcher le manganèse de passer à un état d'oxydation supplémentaire (Mn^{4+}).

La MnP, métallée au fer, réagit selon le cycle catalytique suivant (Figure 19).

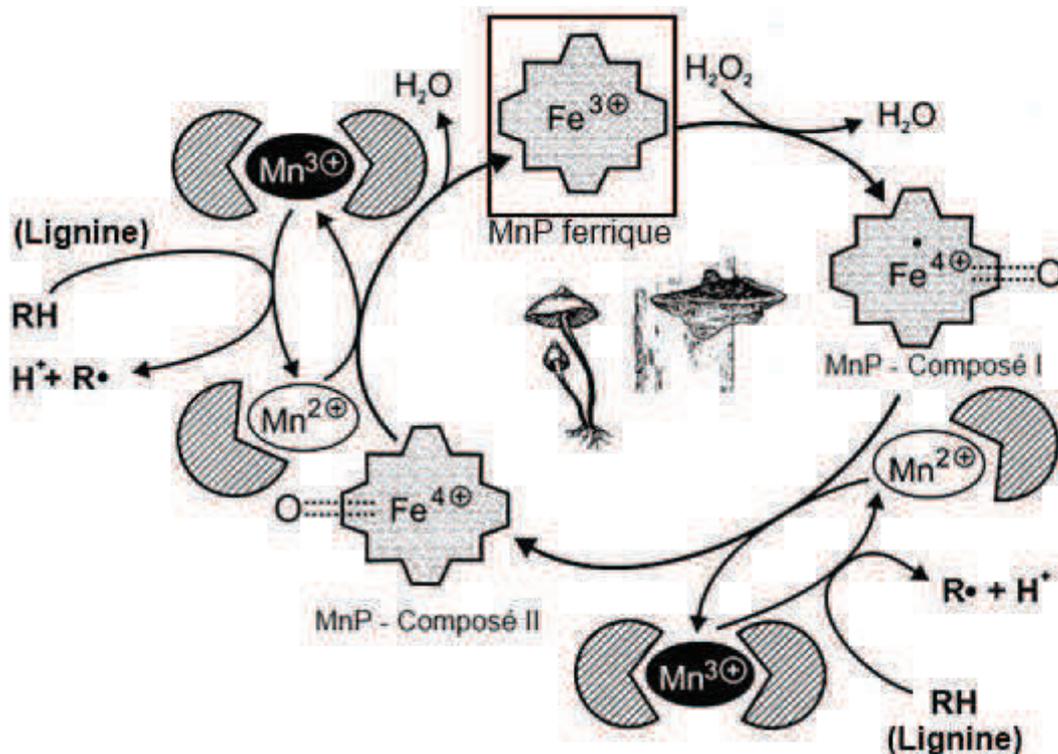


Figure 19: Cycle catalytique de la manganèse peroxydase d'après Hofrichter⁴⁸

La première étape de la réaction est l'oxydation de la MnP - Fe(III) qui entraîne la formation du **composé I** qui est un radical ($Fe^{IV}=O^{\bullet+}$). Cette oxydation a lieu en présence de composés oxydants en quantités importantes dans les milieux biologiques comme des acides carboxyliques (symbolisé par le peroxyde d'hydrogène sur la Figure 19). Le **composé I** va se stabiliser et former le **composé II** $Fe^{IV}=O^+$ en réduisant le cation Mn^{2+} en Mn^{3+} . Il initie ainsi, de manière indirecte, l'oxydation de la lignine par transfert d'électron lors du retour du manganèse à sa forme Mn^{2+} . La porphyrine réduit une seconde fois le cation Mn^{II} en Mn^{III} et

⁴⁷ Kuan I. C.; Tien M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1993**, *90*, 1242-1246.

⁴⁸ Hofrichter M., *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, *30*, 454-466

revient à son état initial par déshydratation. Le manganèse réagit également sur la lignine pour l'oxyder.

II.3.3. La Versatile Peroxydase (VP)

Il existe également des « enzymes polyvalentes » (VP), qui cumulent les activités de la LiP et de la MnP, rendant la délignification plus efficace.

Ce mécanisme de délignification naturel a suscité l'intérêt des chercheurs. Il les a poussé à envisager l'utilisation de ce type de mécanisme afin de développer de nouvelles méthodes de délignification plus « neutres » pour l'environnement que les méthodes utilisées actuellement par l'industrie.

Comme nous venons de le voir, le site catalytique des enzymes impliqués dans la délignification par les champignons est constitué d'une structure de type hème-*peroxydases* qui est un macrocycle tétrapyrrolique. L'utilisation de ce type de molécules, étudiées actuellement pour leur activité anti-cancéreuse potentielle (photothérapie dynamique), commence à être envisagée dans le cadre de la délignification de matière ligno-cellulosique. L'état actuel des connaissances concernant l'utilisation de ces composés dans les processus de délignification sera abordée dans le chapitre suivant.

II.4. Délignification par des macrocycles tétrapyrroliques (MtP)

II.4.1. Les macrocycles tétrapyrroliques

Les macrocycles tétrapyrroliques (MtP) sont représentés par deux familles de molécules : les porphyrines et les phtalocyanines (Figure 20). Ce sont des macromolécules fortement conjuguées, constituées de quatre unités pyrroles formant le cœur de la molécule. Dans le cas des porphyrines, ces unités pyrrole sont reliées par des ponts méthines. Ces molécules peuvent être substituées en position β (sur les positions libres des pyrroles) ou en position *meso* (sur les ponts méthines). Chez les phtalocyanines, les unités pyrroliques sont reliées par des ponts azotés. Les phtalocyanines sont classées parmi les macrocycles tétrapyrroliques bien qu'il serait plus juste de les décrire comme un macrocyle *iso*-indolique. Les phtalocyanines présentent l'avantage d'être plus stable que les porphyrines en conditions classiques. Porphyrines et phtalocyanines peuvent être modifiées afin de les rendre hydrosolubles (molécules rendues ioniques par sulfonation par exemples). Le centre de l'hème peut être métallé (Fe, Mn, Etc...), ce qui permet de moduler leur activité.

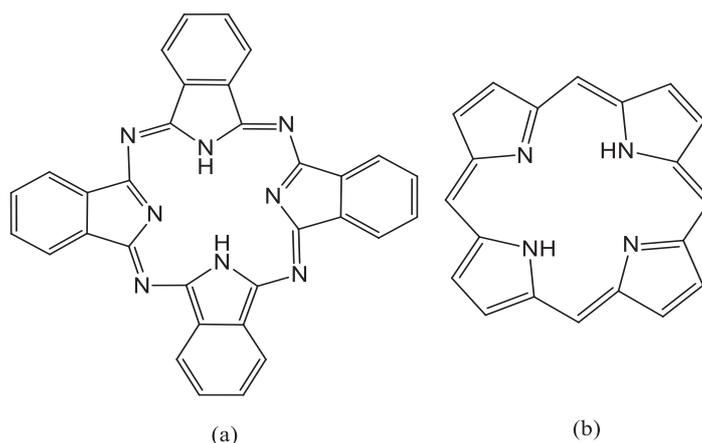


Figure 20: Structure de base d'une phtalocyanine (a) et d'une porphyrine (b)

L'aromaticité de ces molécules leur confère une grande stabilité. Les porphyrines comme les phtalocyanines sont des molécules photosensibles. Elles réagissent à la lumière en formant des radicaux libres ou de l'oxygène singulet.

Les porphyrines sont des molécules que l'on retrouve fréquemment dans les milieux biologiques. L'hémoglobine est une protéine à base porphyrinique. L'hème, qui est la « partie » active de l'hémoglobine est en fait une protoporphyrine IX métallée au fer. La vitamine B12 est une autre molécule naturelle contenant centre porphyrinique de type corrine métallé par un atome de cobalt. (Figure 21)

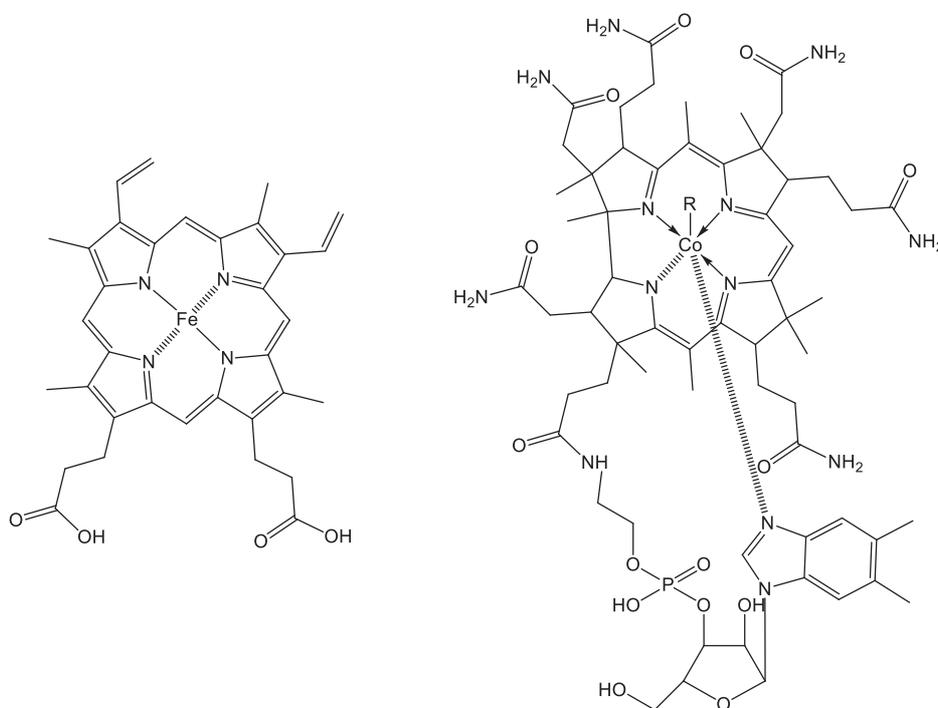


Figure 21: Structure de l'hème de l'hémoglobine (à gauche) et de la vitamine B12 (à droite)

Chez les végétaux, la chlorophylle est une molécule à base porphyrinique métallée au magnésium, et substituée par une chaîne carbonée latérale de type phytol. Parmi les

chlorophylles, on distingue les chlorophylles « typiques » rencontrées chez les végétaux supérieurs (chlorophylle a et b) et les bactériochlorophylle propres aux bactéries phototrophes. La chlorophylle est une molécule indispensable dans les processus photochimiques de photosynthèse des plantes. Elle catalyse la synthèse de molécules indispensables à la croissance de la plante.

II.4.2. Mécanismes d'oxydation de la lignine par les macrocycles tétrapyrroliques

L'oxydation de composés apparentés à la lignine peut se dérouler selon deux mécanismes différents. L'activation du MtP peut avoir lieu soit par action d'une molécule oxydante présente dans le milieu soit par activation photochimique. Nous allons ici décrire ces deux mécanismes.

Le mécanisme d'oxydation de la lignine par des MtP activés par voie chimique (*peroxyde d'hydrogène*) est très proche du mécanisme précédemment décrit pour les enzymes (Figure 22). La réaction est initiée par la réaction de la porphyrine avec le *peroxyde d'hydrogène* pour former un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-OH}$ très instable appelé **composé 0** (a). Le composé 0 se transforme par scission hétérolytique de la liaison O-OH (b) en **composé I** qui est radicalaire. Le composé I va oxyder la lignine en lui transférant son caractère radicalaire (c). Le **composé II** formé peut soit réagir à nouveau avec la lignine (d), ce qui permet à la porphyrine d'être régénérée, soit réagir avec une autre molécule d' H_2O_2 (e) pour former un nouveau radical (**composé III**) capable d'oxyder à nouveau la lignine. Ce dernier est un complexe superoxyde qui peut entraîner un blanchiment irréversible et se dégrade rapidement.

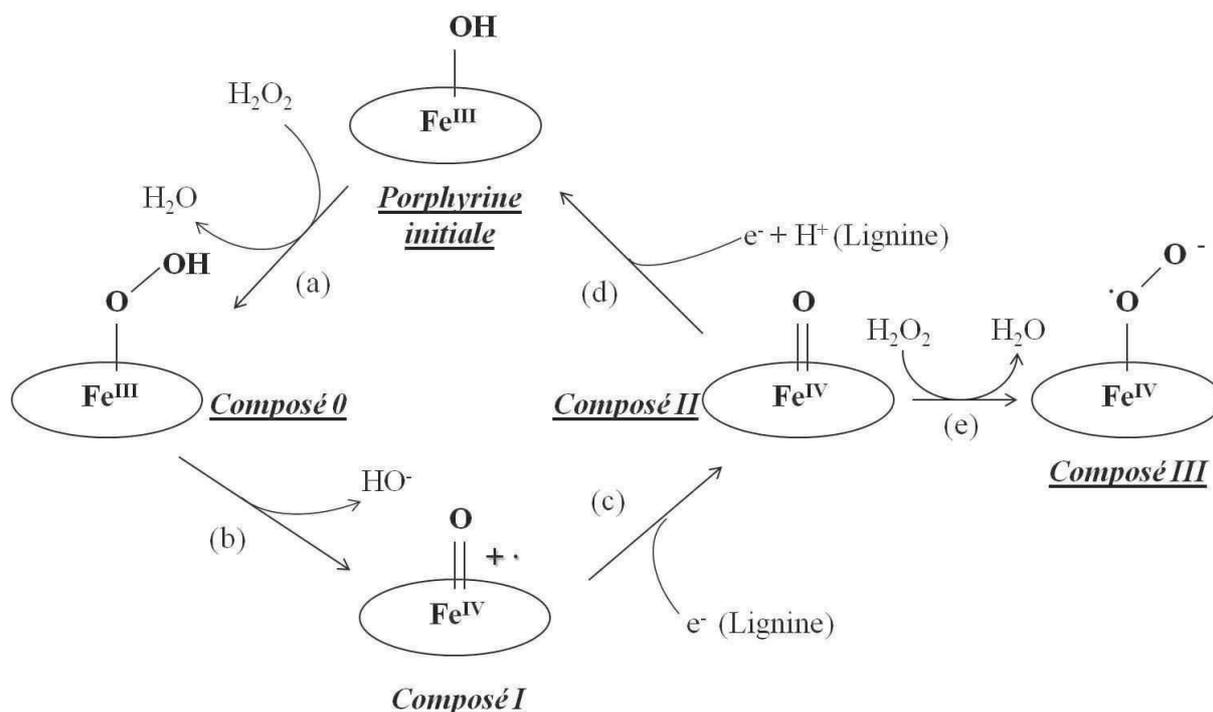


Figure 22: Schéma du mécanisme d'action des métalloporphyrines avec le peroxyde d'hydrogène d'après Zucca *et al.*⁴⁹

Dans le cas de l'activation photochimique, la métalloporphyrine se comporte comme un photosensibilisateur (Figure 23).

L'irradiation de la métalloporphyrine induit l'absorption d'un photon qui fait passer le photosensibilisateur de son état fondamental énergétique à un niveau d'énergie supérieure appelé état singulet excité S₁. La porphyrine peut alors revenir à son état fondamental par un phénomène de fluorescence, ou bien passer à un état triplet excité (T₁) par une conversion inter-système. Ce processus consiste en une inversion de spin électronique et a lieu si l'état singulet excité est assez stable (ce qui est généralement le cas pour les porphyrines). La métalloporphyrine à l'état triplet excité est très stable mais peut se désactiver lentement par un phénomène de fluorescence. De même, elle peut réagir avec son environnement selon deux mécanismes. Le mécanisme de type I consiste en une interaction avec le substrat et engendre des réactions radicalaires dont la propagation est assurée par la présence d'oxygène moléculaire. Le mécanisme de type II entraîne un transfert d'énergie à l'oxygène moléculaire qui passe de son état fondamental triplet (³O₂) à son état singulet excité (¹O₂). L'oxygène singulet est une espèce très réactive et entraîne la destruction des molécules environnantes.

⁴⁹ Zucca, P.; Rescigno, A.; Rinaldi, A.C.; Sanjust, E., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2014**, 388-389, 2-34

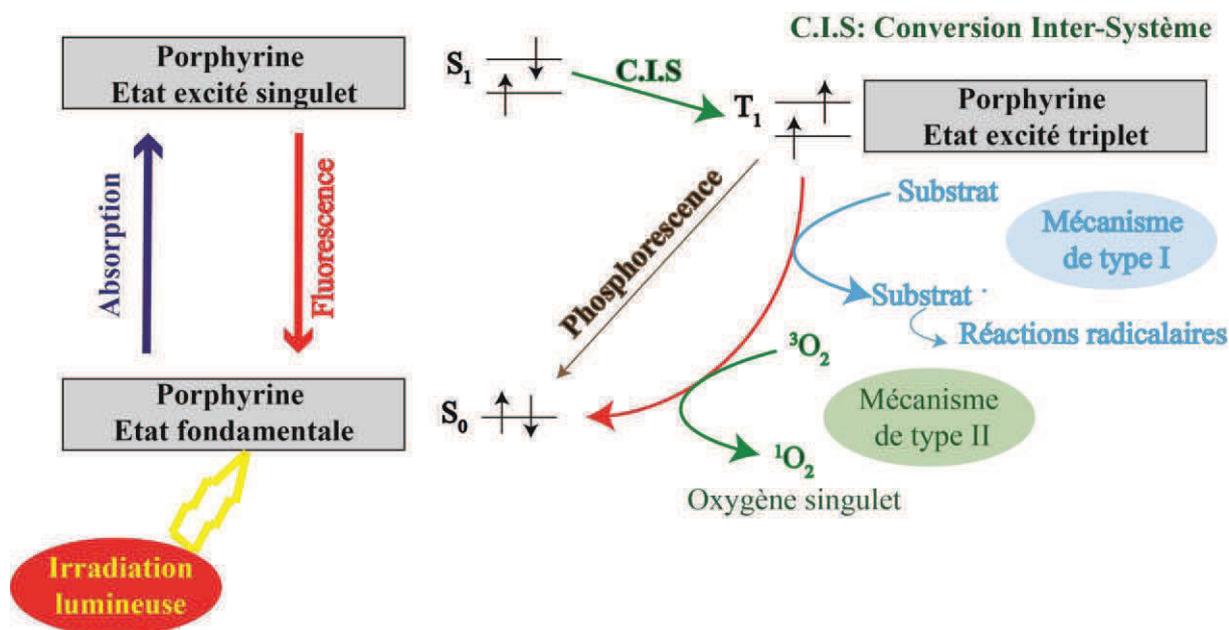


Figure 23: Mécanismes photo-chimiques induits par les métalloporphyrines

Dans la nature, l'enveloppe polypeptidique protégeant le centre réactif porphyrinique possède une structure telle qu'à proximité du métal de la porphyrine vient se complexer une fonction imidazole provenant d'un acide aminé histidine. Cette liaison s'effectue entre le doublet non-liant de l'azote libre de la fonction imidazole et le métal centre de la porphyrine. Ce complexe formé permet d'augmenter le caractère électrophile de l'atome d'oxygène et en réduit la force de la liaison métal-oxygène.

Les porphyrines bio-mimétiques développées ont été conçues selon ce principe : un atome d'azote venant complexer le métal central. Il a été remarqué que l'utilisation du manganèse plutôt que du fer, permet de diminuer les risques de réactions parasites, notamment la rupture homolytique du *peroxyde* d'hydrogène. Enfin, l'introduction de groupements en position *meso* est cruciale. La présence de groupements électro-attracteurs en *meso* de la porphyrine, comme des chlores ou des fluors sur un phényle, augmente le potentiel rédox mais également la résistance à la suroxydation.⁵⁰

⁵⁰ Fujii, H., *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, 226, 51-60

II.4.3. Oxydation chimique de composés –type de lignines

La recherche sur l'oxydation de composés-type de lignines catalysée par des macrocycles tétrapyrroliques a débuté au milieu des années 80. En 1984, Shimada *et al.*⁵¹ a réalisé l'oxydation du 1,2-bis(4-ethoxy-3-methoxyphenyl)propane-1,3-diol par une tétraphénylporphyrine de fer III possédant un le chlore comme ligand axial, en présence d'hydroperoxyde de *ter*-butyl. L'objectif de cette recherche était de déterminer les produits de réaction et d'étudier la capacité de la porphyrine à oxyder ce type de composés. Il a pu constater que le composé type lignine de départ avait été totalement oxydé. La réaction a conduit à la production de cinq composés porteurs de groupements phénoliques et d'acide formique (figure 24).

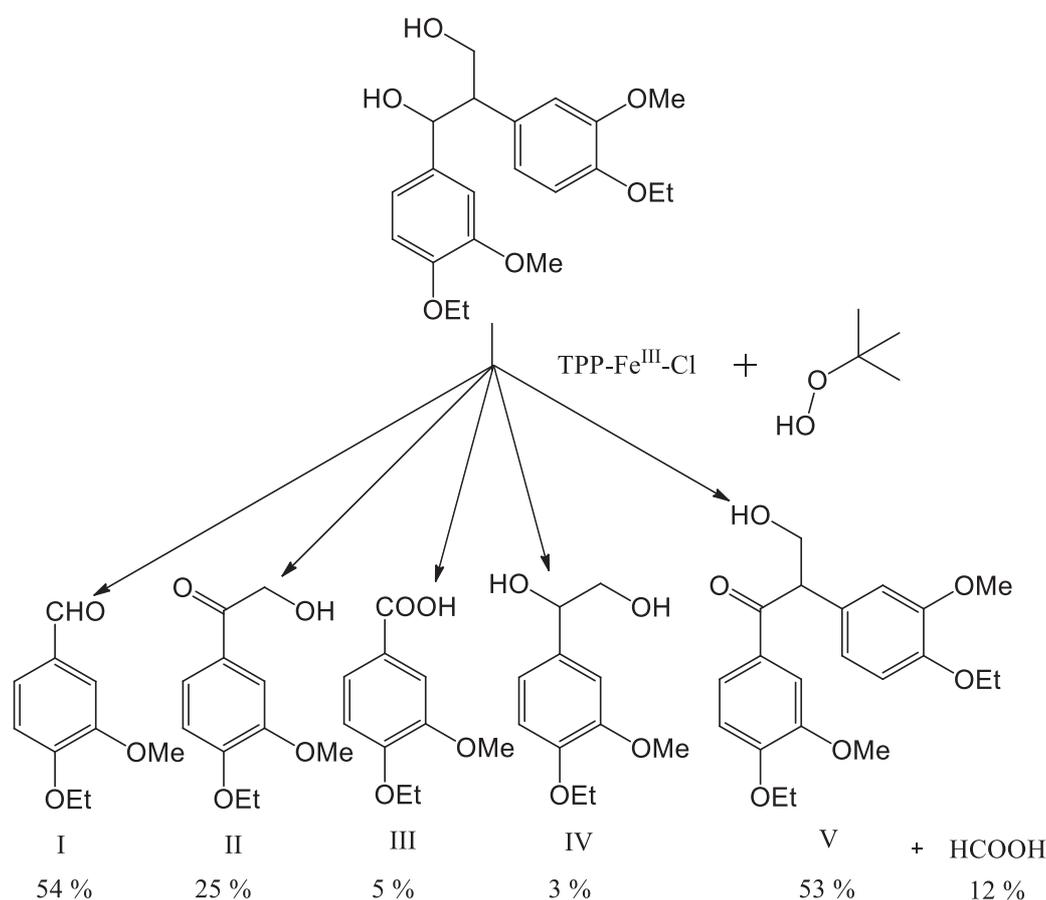


Figure 24: Dégradation oxydative d'un composé-type de lignine par la tétraphénylporphyrine de fer et l'hydroperoxyde de *ter*-butyle d'après Shimada *et al.*⁵¹

⁵¹ Shimida M. ; Habe T. ; Umezawa T. ; Higuchi T. ; Okamoto T., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1984**, 122, 1247-1252

L'utilisation d'une métalloporphyrine simple comme modèle de dégradation de lignine s'est révélée assez peu efficace, car elles sont instables en milieu oxydant.⁴⁹

Des travaux plus récents ont permis d'optimiser ce type de structures pour les rendre moins sensibles à l'oxydation. Crestini *et al.*⁵² ont utilisé, pour ce type de réaction, des porphyrines possédant des groupements halogénés, solubles dans l'eau (anioniques et cationiques), telles que la tétra-(dichloro-sulfo)phénylporphyrine et des tétra-N-méthylpyridinoporphyries métallées au fer ou au manganèse. L'introduction de groupements attracteurs, principalement en position ortho, comme des chlores ou des fluors, ont stabilisé la porphyrine et l'ont rendue plus résistante à l'oxydation.⁵⁰ Elles ont été utilisées comme catalyseur pour l'oxydation de composés-type de lignine (bi-phényles oxo-méthylés). Ils ont observé que la tétra-N-méthylpyridinoporphyrine était la plus efficace (rendement de 70% à pH 3) et que les porphyrines sulfonées (anioniques) avaient un rendement inférieur ($\approx 50\%$). Les auteurs ont également constaté que les porphyrines métallées au manganèse étaient plus efficaces que les porphyrines métallées au fer.

Meunier classe ces métalloporphyrines selon trois générations.⁵³ La première est une métalloporphyrine possédant un phényle simple en position *meso* (Figure 24porphyrine 1, Figure 25).

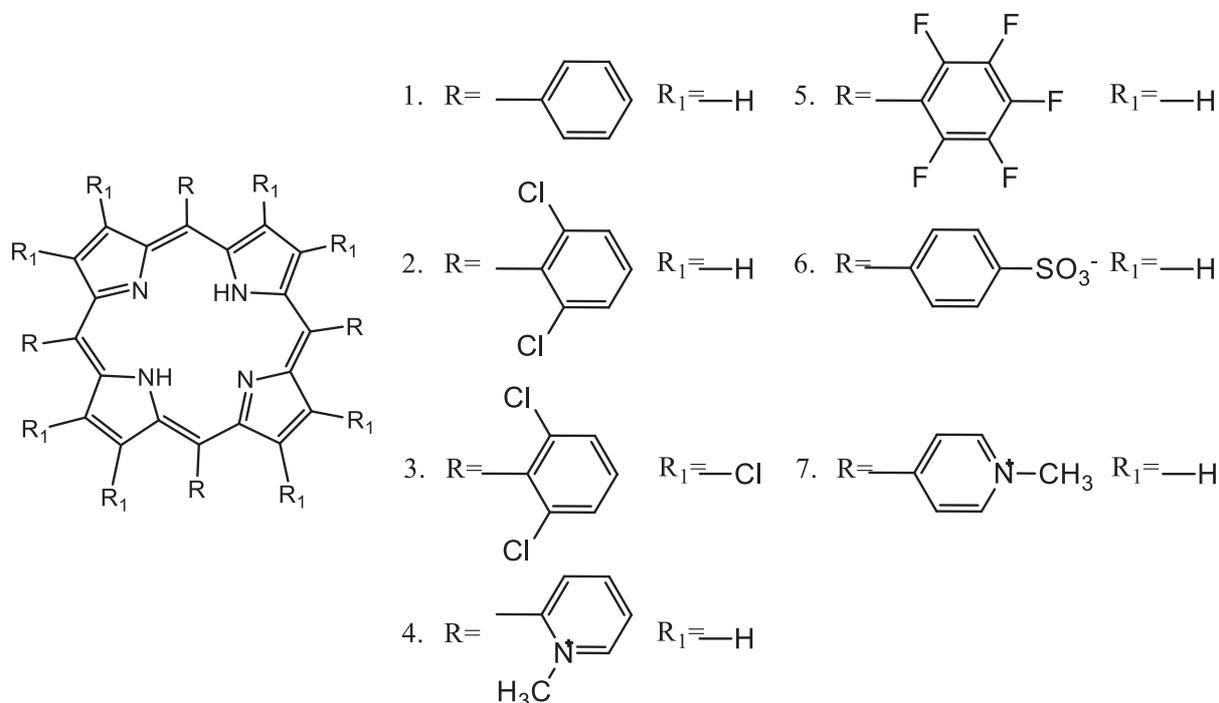


Figure 25: Métalloporphyrines utilisées pour l'oxydation de composés-type lignine⁴⁹

⁵² Crestini, C.; Saladino, R.; Tagliatesta, P.; Boschi, T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **1999**, 7, 1897-1905

⁵³ Meunier, B., *Chemical Reviews*, **1992**, 92, 1411-1456

La seconde génération introduit des groupements électro-attracteurs sur le phényl, comme des groupements halogènes (porphyrines 2 et 5, figure 25) des sulfones (porphyrine 6, figure 25) ou remplace les phényles par des pyridyls (porphyrine 4 et 7, figure 25). Cette famille de porphyrines a été récemment utilisée par Zakavi *et al.*⁵⁴ dans le cadre de l'époxydation d'alcènes. Ils ont démontré que ces composés étaient plus stables que les porphyrines de première génération.

La troisième génération introduit des groupements électro-attracteurs supplémentaires en positions β de la porphyrine (porphyrine 3, Figure 25). Ces modifications augmentent l'activité catalytique et la stabilité de ces composés si elles sont appliquées à des porphyrines polynitro en β .⁵⁵

Le Tableau 2 résume les avantages et inconvénients de ces trois générations de métalloporphyrines.

Tableau 2: Avantages et inconvénients des différentes générations de tétraphénylporphyrines métallées d'après Zucca *et al.*⁴⁹

Métalloporphyrines	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Enzyme 1 ^{ère} génération	Protoporphyrine IX de fer	-Molécule disponible en grande quantité	-Très instable
	Meso-phénylporphyrine simples	-Plus grande stabilité par rapport à l'hème naturel -Faible coût de synthèse	-Faible activité
2 ^{ème} génération	Substituants électro-attracteurs sur le phényl en <i>meso</i>	-Haute stabilité -Haute activité catalytique	-Coût de synthèse élevé
3 ^{ème} génération	Substituants en position β électro-attracteurs	-Certaines porphyrines ont une haute activité catalytique et une bonne stabilité	-La plupart sont instables -Coûts très importants de synthèse

A la même période, Hadash *et al.*⁵⁶ ont étudié l'effet de phtalocyanines dans le cadre de ce type de réactions. Ils ont déterminé les effets de l'oxydation du 2,4,6-trichlorophénol par l'eau oxygénée en présence de tétrasulfophtalocyanine de fer. Ils ont pu constater que 0,5% de phtalocyanine suffisait pour oxyder totalement le composé phénolique témoin. Ils ont également déterminé que la réaction était plus efficace à pH neutre et lorsque le peroxyde d'hydrogène était ajouté de façon fractionnée tout au long de la réaction.

⁵⁴ Zakavi, S. ; Ghanbelanie Mojarrad, A.; Rayati, S., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2012**, 363-364, 153-158

⁵⁵ Bartoli, J.F.; Battioni, P.; De Foor, W.R. ; Mansuy, D., *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, **1994**, 23-24.

⁵⁶ Hadash, A.; Sorokin, A.; Rabion, A.; Meunier, B., *New Journal of Chemistry*, **1998**, 22, 45-51

Récemment sont apparus des porphyrines biomimétiques greffées sur des supports comme des minéraux (la silice par exemple). Rappelons que dans la nature, l'enveloppe polypeptidique protégeant le centre réactif porphyrinique possède une structure telle qu'à proximité du métal de la porphyrine vient se complexer une fonction imidazole provenant d'un acide aminé histidine. Cette liaison s'effectue entre le doublet non-liant de l'azote libre de la fonction imidazole et le métal centre de la porphyrine. Zucca *et al.* ont synthétisés plusieurs porphyrines de ce type et supportées, comme par exemple une porphyrine supportée par un alcool polyvinylique⁵⁷ (Figure 26) ou une silice activée.⁵⁸ Ces porphyrines, testées dans le cadre de l'oxydation de l'alcool veratrylique, ont présentées des résultats de conversion supérieurs à 80%.

Outre l'amélioration de leur efficacité, le greffage des porphyrines sur support solide permet de récupérer le catalyseur en fin de la réaction. D'autres exemples existent dans la littérature, comme des porphyrines de cobalt greffées sur des nanoparticules de silice,⁵⁹ ou encore des porphyrines de manganèse sur des nanotubes de carbone.⁶⁰

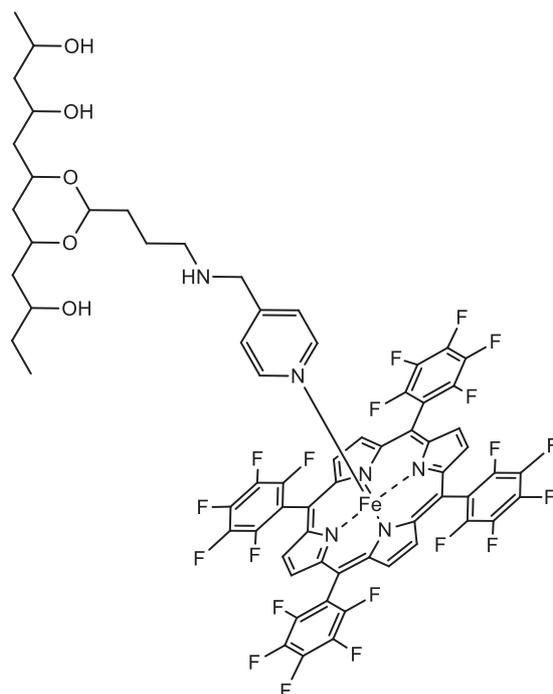


Figure 26: Exemple de porphyrine supportée d'après Zucca *et al.*⁵⁷

Les macrocycles tétrapyrroliques ont donc été utilisés comme catalyseur d'oxydation chimique de composés-type de lignine. Des porphyrines simples ont tout d'abord été utilisées mais ont montré leurs limites. L'introduction de groupements électro-attracteurs,

⁵⁷ Zucca, P.; Sollai, F.; Garau, A.; Rescigno, A.; Sanjust, E., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2009**, 306, 89-96

⁵⁸ Zucca, P.; Mocchi, G.; Rescigno, A.; Sanjust, E., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2007**, 278, 220-227

⁵⁹ Adam, F.; Ooi, W.T., *Applied Catalysis A: General*, **2012**, 445-446, 252-260

⁶⁰ Araghi, M.; Bokaei, F., *Polyhedron*, **2013**, 53, 15-19

principalement en position *meso* de la porphyrine (chlores, fluors,...), augmente le potentiel rédox mais également la résistance à la suroxydation.⁵⁰ Par conséquent, ce type de molécules est plus efficace que la tétraphénylporphyrine. De même, la solubilité des porphyrines dans l'eau semble être un critère important pour le traitement d'oxydation. Il a également été remarqué que l'utilisation du manganèse plutôt que du fer, permet de diminuer les risques de réactions parasites. Le greffage de ces molécules sur support solide semble apporter une plus grande stabilité et permet enfin de récupérer facilement le catalyseur en fin de réaction.

II.4.4. Utilisation en délignification photochimique

Des travaux récents rapportent de l'utilisation des macrocycles tétrapyrroliques comme catalyseur d'oxydation par voie photochimique. Silva *et al.*⁶¹ ont travaillé sur la photo-oxydation par la 2,6-dichlorophénylporphyrine de fer du 4-chlorophénol en présence d'oxygène. Ils ont constaté la formation de deux produits de dégradation : la *para*-benzoquinone et la *para*-hydroquinone (Figure 27). Ils rapportent que le rendement de conversion du *para*-chlorophénol observé ($\approx 65\%$, rendement moyen) peut être attribué à la photo-dégradation importante de la porphyrine au cours de la réaction.

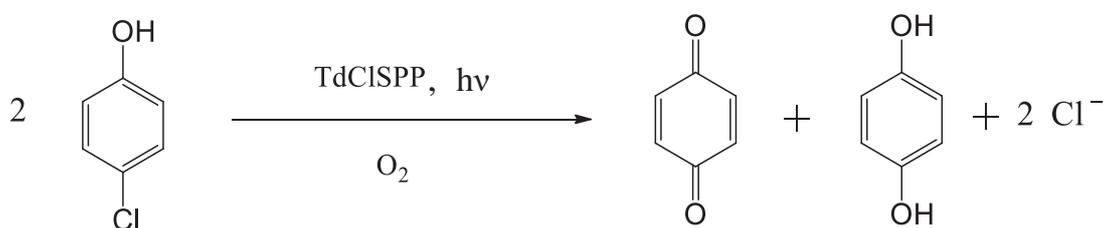


Figure 27: Photo-oxydation du 4-chlorophénol d'après Silva *et al.*⁶¹

Shiragami *et al.*⁶² ont étudié l'activité d'une porphyrine métallée à l'antimoine et supportée sur de la silice. En présence de nitrite de fer, le 4-chlorophénol et les cyclo-alcènes sont oxydés respectivement en *para*-benzoquinone et en un mélange de sous-produits d'oxydation (époxyde, alcool, diol, cyclohexènone). Ce sont des méthodes plutôt efficaces, on observe dans les deux cas 100% de conversion des produits de départ au bout d'une heure.

L'utilisation en photochimie de macrocycles tétrapyrroliques pour l'oxydation de composés-type de lignine donne donc de bons résultats et permet d'envisager des applications

⁶¹ Silva, E.; Pereira, M.M.; Burrows, H.D.; Azenha, M.E.; Sarakha, M.; Bolte, M., *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2004**, 3, 200-204

⁶² Shiragami, T.; Matsumoto, J.; Inoue, H.; Yasuda, M., *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **2005**, 6, 227-248.

directes sur le matériel végétal. Il est confirmé ici qu'une porphyrine supportée semble plus efficace qu'une porphyrine qui ne l'est pas.

Comme nous venons de le constater, les macrocycles tétrapyrroliques peuvent être de bons catalyseurs dans le cadre de l'oxydation de composés de type lignine. Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes stratégies de synthèse permettant de produire ce type de molécules.

II.4.5. Synthèse des macrocycles tétrapyrroliques

Parmi les nombreuses voies de synthèses de porphyrines et de phtalocyanines, nous avons choisis de développer ici les voies de synthèse les plus courantes des macrocycles qui seront utilisés dans la suite de ce travail. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la synthèse de *méso*-porphyrines et de phtalocyanines métallées.

a. Les porphyrines méso-substituées

Les méthodes de synthèse les plus courantes ont été décrites par Rothemund, Adler-Longo, Little et Lindsey. Elles sont résumées sur la Figure 28.

La synthèse d'une porphyrine *meso*-substituée a été décrite pour la première fois en 1939 par Rothemund.⁶³ Il a obtenu la *méso*-tétraméthylporphyrine, avec de très faibles rendements, en faisant réagir, en solution méthanolique et sous atmosphère inerte, l'éthanal et le pyrrole. Il a poursuivi ses travaux en mettant au point la procédure de synthèse de *méso*-tétraphénylporphyrines. Il a utilisé la pyridine au lieu du méthanol et travaillé dans une ampoule scellée (à 220 °C).⁶⁴ Ce qui lui a permis d'obtenir un rendement de l'ordre de 5%.

Par la suite, Adler et Longo⁶⁵ ont amélioré significativement la synthèse de la *meso*-tetraphénylporphyrine. Ils ont utilisé l'acide propionique à la place de la pyridine et travaillé dans un réacteur ouvert à reflux. Cela a permis d'obtenir un rendement de 20% (bien supérieur aux 5% obtenu par Rothemund). La mise au point de cette technique, plus simple à mettre en œuvre, a ouvert la voie à la synthèse de nombreuses autres *méso*-porphyrines symétriques.

⁶³ Rothemund P.J., *Journal of the American Chemical Society*, **1939**, *61*, 2912-2915.

⁶⁴ Rothemund P.J., Menotti A.R., *Journal of the American Chemical Society*, **1941**, *63*, 267-270

⁶⁵ Adler A.D., Longo F.R., Finarelli J.D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L., *Journal of Organic Chemistry*, **1967**, *32*, 476

Dans les années 70, Little *et al.*⁶⁶ ont adapté cette méthode à la synthèse de *méso*-arylporphyrines substituées. Cette méthode dite des "aldéhydes mixtes" consiste à condenser, dans l'acide propionique à reflux, du pyrrole avec deux aldéhydes différents. La stœchiométrie des aldéhydes initiaux permet d'accéder à des porphyrines mono, di ou trisubstituées. La technique mise au point par Little fait toujours partie des méthodes classiques de synthèse des *méso*-porphyrines monofonctionnelles.

Gonsalves *et al.*⁶⁷, puis Lindsey *et al.*⁶⁸, ont développé dans les années 80 une nouvelle technique permettant d'obtenir des rendements supérieurs à 40 %. Cette méthode se déroule en deux étapes, la formation d'un intermédiaire appelé porphyrinogène qui sera transformé par oxydation en porphyrine. Le porphyrinogène est synthétisé dans le dichlorométhane, sous argon, en présence d'un acide de Lewis (quantité catalytique). Ils ont obtenu après oxydation par une quinone (2,3-dichloro-5,6-dicyano-*para*-benzoquinone ou DDQ) la tétraphénylporphyrine avec un rendement de 46 %. Bien que très efficace, cette méthode n'est réalisable qu'en milieu fortement dilué. La production de molécules en quantité importante nécessite donc l'utilisation de gros volumes de solvant.

Plus récemment, Little a montré qu'il était possible d'obtenir spécifiquement une *trans*-porphyrine en utilisant des dipyrrométhanones.⁶⁹ Cette technique permet d'obtenir de manière stéréospécifique des porphyrines encombrées avec un rendement de l'ordre de 50 %. Il a utilisé le *mésityl*-dipyrrométhane et le méthylbenzaldéhyde en présence de TFA dans le dichlorométhane. Il a obtenu la 5,15-bis(*mésityl*)-10,20-bis(4-méthylphényl)porphyrine avec un rendement de 48 %.

Ces dernières années, deux méthodes de synthèse originales ont été développées au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles.

La première, dérivée de la méthode de Lindsey, permet, par l'utilisation d'iode et de micro-ondes, de réduire considérablement le temps de réaction (quelques minutes au lieu d'une heure) tout en gardant un rendement équivalent à la méthode d'origine (35 à 47 %).

La seconde méthode⁷⁰ est la plus originale puisque la synthèse a lieu sur support solide. Elle a été utilisée pour synthétiser des *meso*-porphyrines telles que la tétratoyl- et la tétra-anisylporphyrine et des porphyrines monofonctionnelles portant des substituants glycosylés. La synthèse se déroule sur charbon actif, préalablement activé à l'acide nitrique,

⁶⁶ Little R.G., Anton J.A., Loach P.A., Ibers J.A., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1975**, *12*, 343-349

⁶⁷ Gonsalves A.M.A.R., Pereira M.M., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1985**, *22*, 931-933

⁶⁸ Lindsey J.S., Hsu H.C., Schreiman I.C., *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 4969-4970

⁶⁹ Little B. J., Ciringh Y., Lindsey J. S., *Journal of Organic Chemistry*, **1999**, *64*, 2864-2872

⁷⁰ Vignaud Y., Granet R., Krausz P., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **10**, 2006, 937-941

ce qui limite l'utilisation de solvant. Les rendements de réaction obtenus sont très proches de ceux obtenus par les méthodes classiques (35 à 40%).

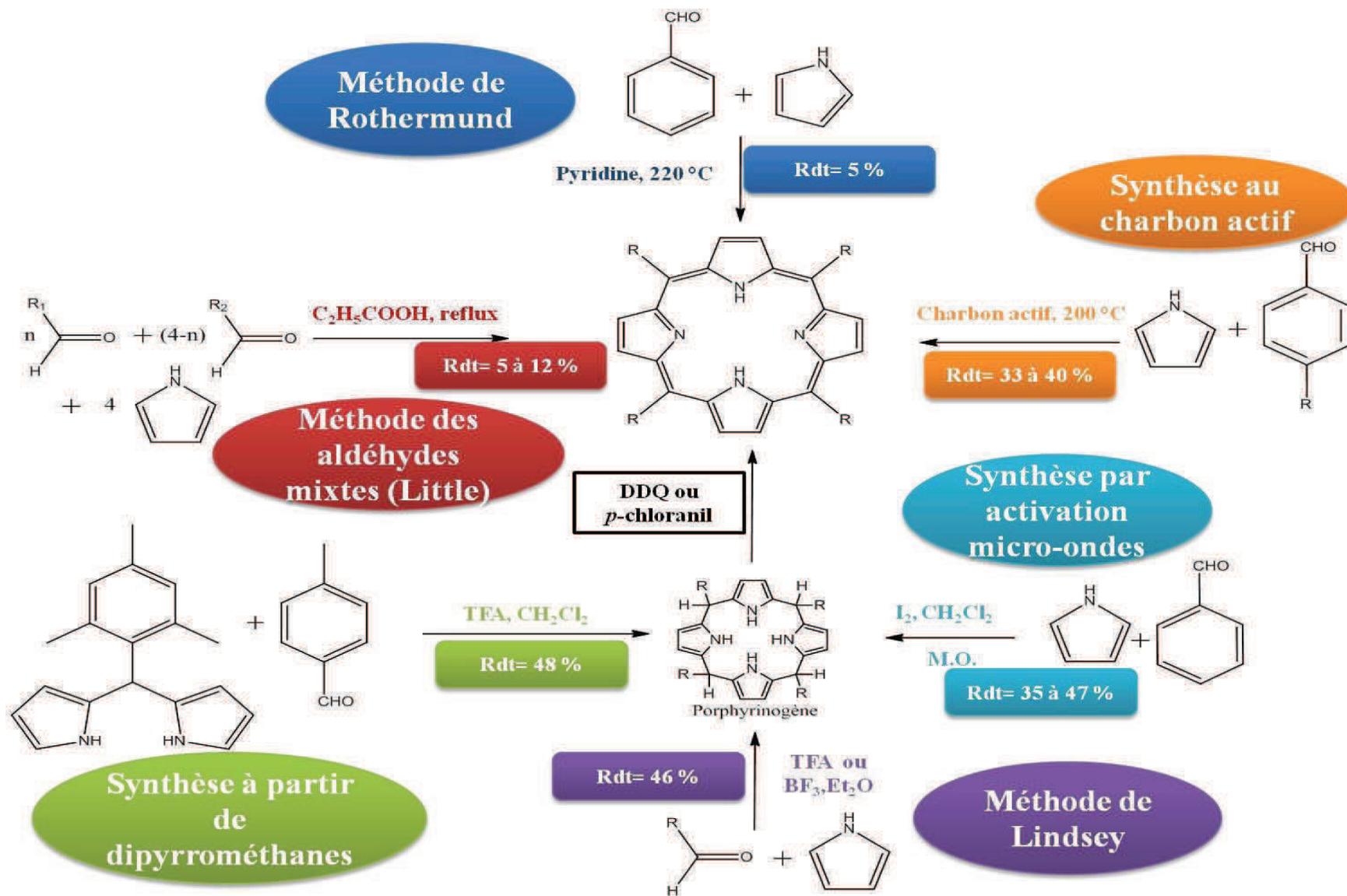


Figure 28: Méthodes de synthèse de porphyrines *meso*-substituées

b. Les phtalocyanines

La synthèse des phtalocyanines (Pc) est aujourd'hui bien connue. Les voies de synthèse les plus courantes sont présentées sur la Figure 29. Les dérivés benzéniques ortho-substitués, plus particulièrement les anhydrides phtaliques, sont les précurseurs les plus utilisés car ils permettent d'obtenir les meilleurs rendements de réaction. C'est cette voie qui est utilisée à l'échelle industrielle pour produire des phtalocyanines. Ces molécules peuvent être métallées avec la plupart des métaux. Elles sont utilisées dans le cadre de la production d'encre ou la fabrication de CD gravables.

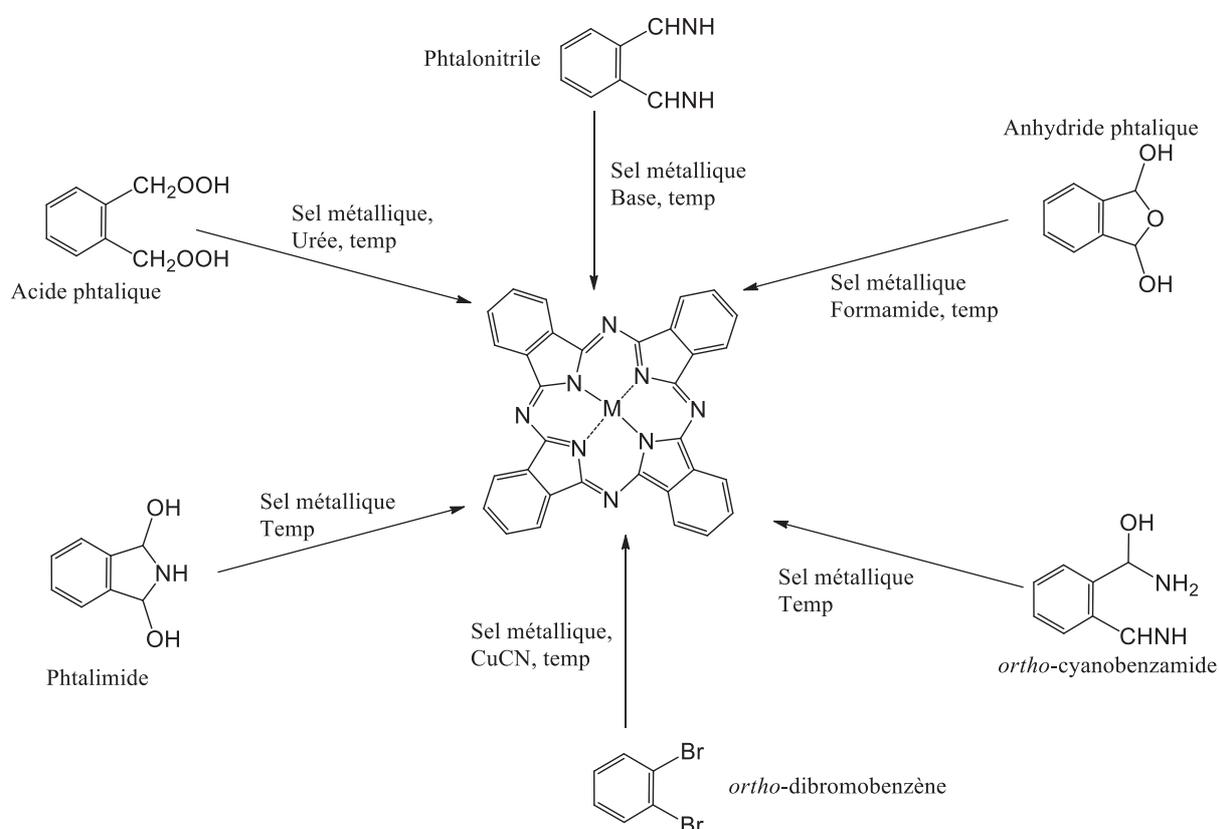


Figure 29: Voies de synthèse de métallo-phtalocyanines d'après Ongarora⁷¹

⁷¹ Benson Getenga ONGARORA. *Syntheses and characterization of water-soluble phtalocyanines for diagnosis and treatment of cancer*. Thèse de doctorat: chimie. Université de l'Etat de Louisiane. 2012

c. Synthèse de porphyrines bio-mimétiques

La recherche de composés bio-mimétiques n'est pas récente. Dès 1987, Morgan et Dolphin⁷² dressent un premier bilan de la synthèse de porphyrines biomimétiques. Pour mimer le site catalytique naturel, des chercheurs ont développé des molécules plus simples. Les premiers essais s'orientent vers l'ajout de fragments protéiniques (possédant souvent un résidu amino-acide histidine) sur des porphyrines type mésoporphyrine IX ou protoporphyrine IX.^{73,74,75} Les fragments protéiniques se greffent sur la fonction acide de ces molécules et forment un repliement au dessus du métal central. Cette conformation forme un complexe entre imidazole de l'histidine et le métal central (Figure 30). Ce ligand axial permet d'augmenter le pouvoir redox de la molécule.

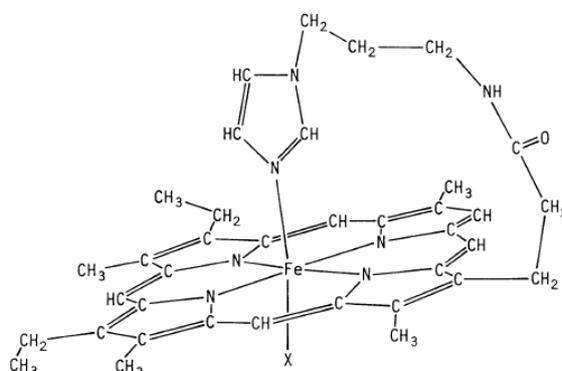


Figure 30: Exemple de porphyrine biomimétique d'après Chang et Traylor⁷³

D'autres types de ligands ont été testés pour stabiliser les porphyrines, notamment des unités sulfuriques⁷⁶ et des quinones⁷⁷, qui ont donné de bons résultats dans le transfert d'électrons en photochimie, ou encore des méthyl-imidazodipyridines,⁷⁸ qui ont permis de les utiliser comme intercalant de l'ADN.

La synthèse de porphyrines de type « picket-fence » a permis de se rapprocher encore plus de la structure de sites catalytiques enzymatiques en poursuivant les modifications de la structure tridimensionnelle de la molécule. Une des faces de ces porphyrines est très

⁷² Morgan B. ; Dolphin D. ; *Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands I : Structure and Bonding*, **1987**, 64, 115-203

⁷³ Chang C. K. ; Traylor T. G., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1973**, 70, 2647-2650

⁷⁴ Van der Heiden A. ; Peer H. G. ; Van der Oord A. H. A., *Journal of the Chemical Society: Chemical Communications*, **1971**, 369-370

⁷⁵ Momenteau M. ; Rougee M. ; Looock B., *European Journal of Biochemistry*, **1976**, 71, 63-76

⁷⁶ Traylor T. G. ; Mincey T. C. ; Berzini A. P., *Journal of the American Chemical Society*, **1981**, 103, 7084-7089

⁷⁷ Wasielewski, M.R.; Niemczyk, M.P.; Svec, W.A.; Pewitt, E.B., *Journal of the American Chemical Society*, **1985**, 107, 1080-1082

⁷⁸ Hashimoto Y., Lee C-H. ; Shudo K. ; Okamoto T., *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 1523-1526

encombrée formant ainsi une « cage ». L'oxygène moléculaire devient le seul réactif à pouvoir pénétrer dans cette « cage ». La présence d'un ligand sur l'autre face, qui forme un complexe de coordination avec le métal central, permet de stabiliser cette structure. (Figure 31)

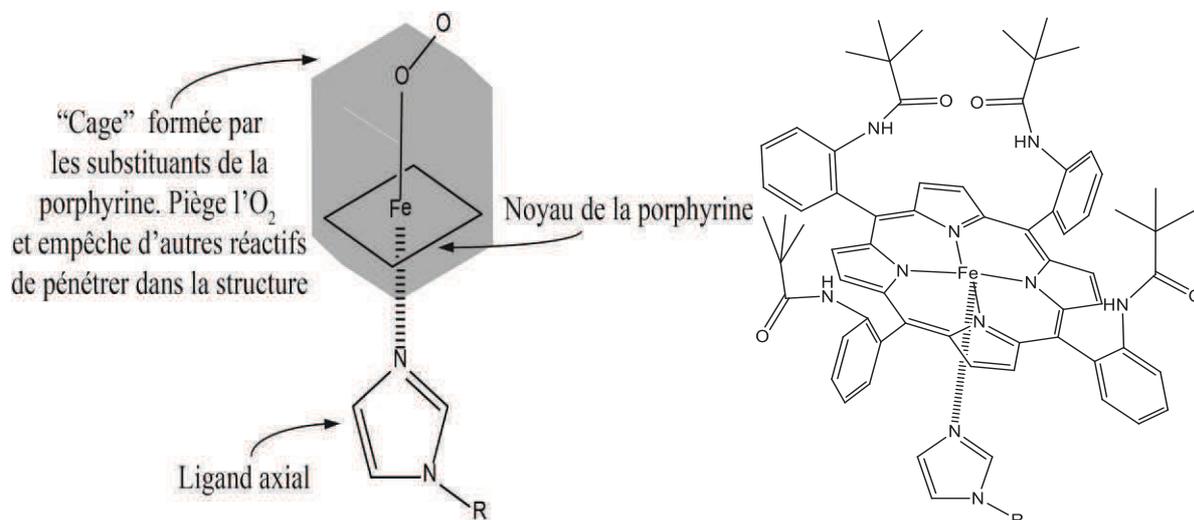


Figure 31: Porphyrine de type "picket-fence" d'après Collman *et al.*⁷⁹

Cette conformation évite l'apparition de ponts μ -peroxo intermoléculaires. L'équipe de Collman⁷⁹ a été à l'origine de la synthèse de ce type de structure.

Almog *et al.*⁸⁰ ont poussé plus loin ce concept en imaginant la synthèse de porphyrines à chapeau ou « capped porphyrins ». Dans cette structure, une molécule de benzène est reliée par liaisons covalentes aux quatre positions ortho des phényles en méso de l'anneau tétrapyrrolique, limitant ainsi l'accès à une des faces de la porphyrine. (Figure 32)

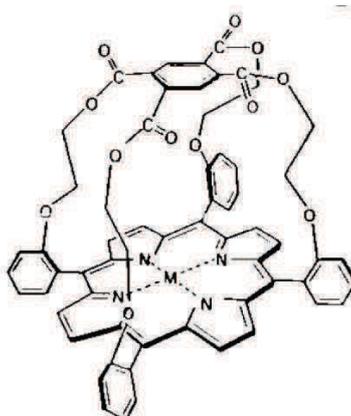


Figure 32: Porphyrine à chapeau d'après Almog *et al.*⁸⁰

⁷⁹ Collman J. P. ; Gagne R. R. ; Reed C. ; Halbert T. R. ; Lang G. ; Robinson W. T., *Journal of the American Chemical Society*, **1975**, 96, 1427-1439

⁸⁰ Almog J. ; Baldwin J. E. ; Dyer R. L. ; Peters M., *Journal of the American Chemical Society*, **1975**, 97, 226-227

D'autres types de structures ont été imaginés comme les porphyrines à « anse de panier ». ⁸¹ Les phényles en *trans* du noyau tétrapyrrolique de ces composés sont reliés en eux par des chaînes carbonées. Leur structure plus simple facilite leur synthèse.

Une des porphyrines biomimétiques les plus abouties en termes de structure et d'efficacité a été réalisée en 1997 par Collman *et al.* ⁸² Ils ont synthétisé un mime du cytochrome C, capable de convertir de manière irréversible, à pH physiologique, le dioxygène en eau avec un rapport molaire 1 :1. Ce système associe une porphyrine de cobalt (II) et un chapeau triazacyclonane (TACN) permettant la coordination d'un atome de cuivre. Les deux sites de complexation sont reliés par des liaisons amide permettant de maintenir la distance cobalt-cuivre entre 4,5 et 5,5Å. (Figure 33) Ce modèle comporte une base axiale de type imidazole imitant l'histidine proximale du système naturel.

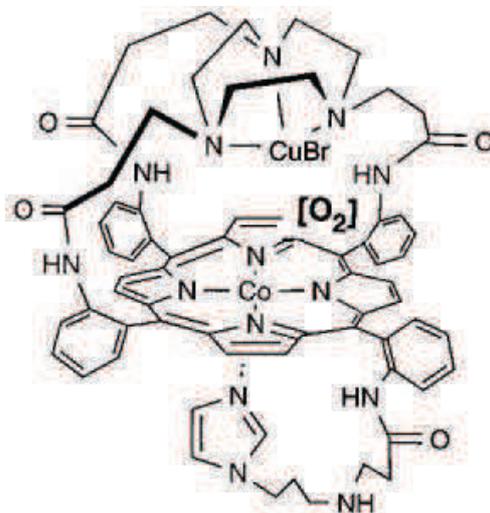


Figure 33: mime de cytochrome c d'après Collman *et al.* ⁸²

II.4.6. Propriétés spectrales

a. Les Porphyrines

- Spectroscopie UV-Visible

Rappelons que les porphyrines sont constituées d'un noyau tétrapyrrolique renfermant un système d'électrons π fortement conjugué. Ces molécules, fortement colorées, absorbent donc dans le domaine du visible et présentent des spectres d'absorption très caractéristiques (Figure 34). Les bandes d'absorption sont le résultat de transitions électroniques centrées sur

⁸¹ Ogoshi H. ; Sugimoto H. ; Yoshida Z., *Tetrahedron Letters*, **1977**, 18, 1515-1518

⁸² Collman J. P.; Fu L.; Herrmann P. C.; Zhang X., *Science*, **1997**, 275, 949-951

le macrocycle tétrapyrrolique et peuvent être interprétées à partir des niveaux énergétiques de quatre orbitales moléculaires de type π selon le modèle de Goutermann.⁸³

Le spectre d'absorption se compose alors d'une bande intense ($\epsilon > 10^5 \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm, appelée bande de Soret (ou bande B) correspondant à la transition de l'état électronique fondamental au second état électronique singulet ($S_0 \rightarrow S_2$). La transition $S_0 \rightarrow S_1$ conduit à une série de 4 bandes, de moindre intensité, dans le rouge (500 à 600 nm) appelées bandes Q.

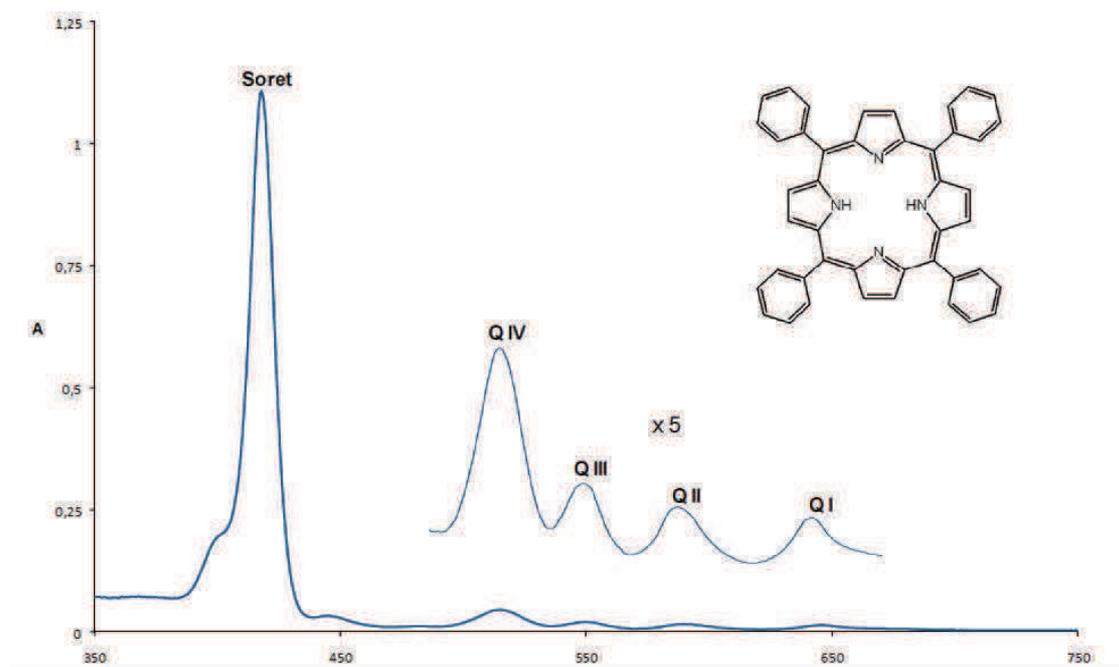


Figure 34: Spectre UV-Visible d'une porphyrine à base libre (tétraphénylporphyrine) dans le chloroforme d'après C. Ringot⁸⁴

Les quatre bandes Q, numérotées de I à IV (de la longueur d'onde la plus élevée à la plus basse), sont les plus sensibles à la nature et la position des substituants du noyau pyrrolique.⁸³

La métallation d'une porphyrine entraîne la disparition de deux des bandes Q et modifie l'intensité relative des bandes restantes. Dans ce cas, on les appelle bandes α et β , en partant de la longueur d'onde la plus élevée. Leur intensité relative, ainsi que les longueurs d'onde maximales d'absorption qui leur sont associées dépendent de la nature du métal et de son degré d'oxydation.

⁸³ Gouterman; M., *Journal of Molecular Spectroscopy.*, **1961**, *6*, 138-163

⁸⁴ Ringot Cyril. Elaboration de nouveaux matériaux cellulosiques photobactéricides. Thèse de doctorat: Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles. Limoges : Université de Limoges, **2010**.

- Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) appliquée aux macrocycles porphyriniques produit des spectres très caractéristiques. Le courant de cycle généré par le champ magnétique (imposé par l'appareil) induit un important cône d'anisotropie magnétique dont l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.**). Les protons à l'intérieur de ce cône sont blindés alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont fortement déblindés. Le spectre RMN s'étend alors sur une large zone de plus de 15 ppm entre -4 et 11 ppm.

Dans le cas d'une porphyrine méso-substituée non métallée, nous observons un fort blindage des protons internes. Les protons portés par les atomes d'azote des unités pyrroles présentent des déplacements chimiques négatifs, souvent autour de -2 ppm. Les autres protons de la molécule sont quant à eux déblindés, conduisant à des signaux caractéristiques généralement entre 6 et 9 ppm (zone des aromatiques).

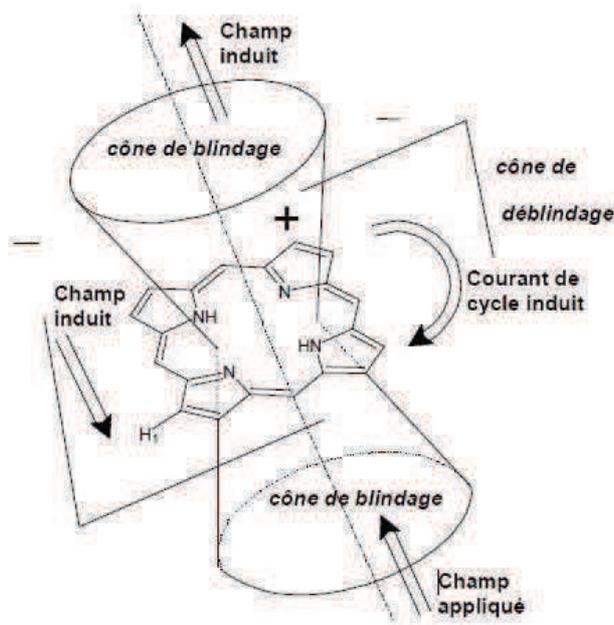


Figure 35: cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine d'après C. Ringot⁸⁴

Le spectre RMN du carbone (RMN ^{13}C) se compose de trois zones. La première zone située entre 95 et 120 ppm correspond aux carbones *méso*. La seconde zone est caractéristique des carbones β -pyrroliques qui résonnent vers 130 ppm. Enfin, les déplacements chimiques caractéristiques des carbones α -pyrroliques se situent vers 145 ppm. Ces signaux sont généralement élargis et assez mal définis, ce qui est la conséquence directe de la tautomérie des protons NH internes. Ce phénomène peut également affecter, dans certains cas, la forme des signaux des carbones β -pyrroliques.

b. Les phtalocyanines

Les phtalocyanines présentent, comme les porphyrines, une couleur intense due à la forte conjugaison du centre tétrapyrrolique. Elles ont en commun la présence d'une bande de Soret entre 300 et 400 nm, bien que celle-ci soit moins intense (de l'ordre de $10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). En revanche, le profil des bandes Q est très différent. On ne distingue généralement que deux bandes intenses dans le rouge (entre 650 et 720 nm) (Figure 36). Dans le cas des phtalocyanines métallées, il n'y en a plus qu'une seule. Ce spectre permet d'expliquer la couleur bleue intense des phtalocyanines.

Comme pour les porphyrines, les phtalocyanines peuvent également être analysées par RMN.

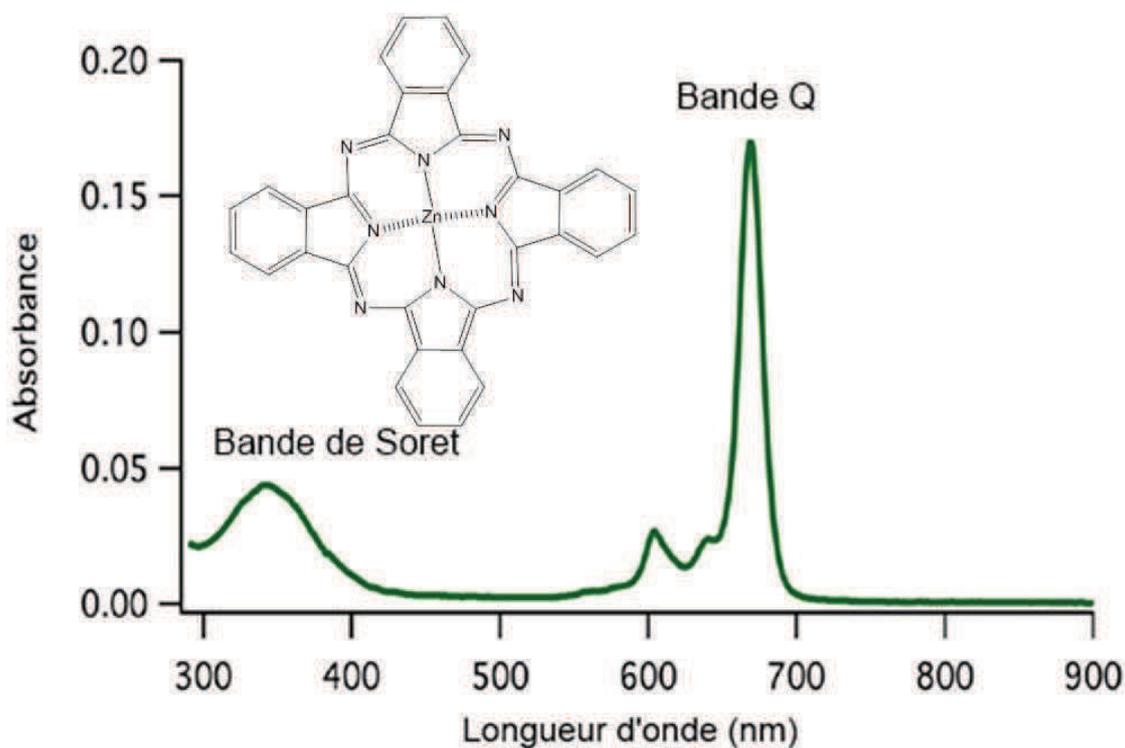


Figure 36: Spectre UV-Visible de la phtalocyanine de zinc dans le DMF

III. Détermination de l'efficacité des techniques de délignification

Un des objectifs de notre travail est de mettre au point de nouvelles méthodes permettant l'extraction d'hémicelluloses à partir de bois de feuillu. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de passer par une étape de délignification de la matrice ligno-cellulosique. Quelles que soient les techniques retenues, nous devons être en mesure de déterminer leur efficacité. Dans ce chapitre, nous présenterons trois techniques complémentaires permettant de caractériser l'efficacité d'un traitement de délignification appliqué sur la matière végétale.

III.1. Dosage du taux de composés phénoliques totaux

Rappelons que la lignine est un polymère principalement constitué d'unités dérivées de l'acide cinnamique (monolignols). Au cours du processus de délignification, ce polymère est déstructuré, libérant dans le milieu des composés oxydés dérivés des monolignols. Ces structures porteuses d'unités phénoliques vont pouvoir être dosées par la méthode dite de Folin-Ciocalteu. Cette technique décrite par Pereira⁸⁵ et modifiée par Pilo-Veloso *et al.*⁸⁶ utilise du réactif de Folin-Ciocalteu, composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). La première étape du dosage consiste à déprotoner la fonction alcool des phénols à l'aide de Na_2CO_3 . Leur réduction par le réactif de Folin-Ciocalteu produit des composés de couleur bleue (oxyde de tungstène W_8O_{23} et oxyde de molybdate Mo_8O_{23}). L'absorbance de l'échantillon est mesurée à 760 nm. On utilise l'acide gallique comme composé de référence.

Les résultats sont exprimés en g/100 g équivalents acide gallique. Cette technique est couramment utilisée pour la détermination du taux de composés phénoliques des extraits végétaux.^{87,88,89}

⁸⁵ Pereira, H., Dosage des tanins de *Quercus suber* L. Anais Inst. Sup. Agronomia XL, **1981**, 9-15.

⁸⁶ Pilo-Veloso, D. ; De Nascimento, E. A. ; Morais S. A. L., *Quimica Nova*, **1993**, 16, 435-448.

⁸⁷ Takeda K.; Moriki M.; Oshiro W.; Sakugawa H., *Marine Chemistry*, **2013**, 157, 208-215

⁸⁸ Rumiya; Jayasena V.; James A.P., *Plant Foods for Human Nutrition*, **2013**, 68, 352-357

⁸⁹ Cömert Önder F.; Ay M.; Sarker S.D., *Journal of agricultural and food chemistry*, **2013**, 61, 10498-10506

III.2. Détermination du nombre Kappa

La détermination du nombre kappa permet de caractériser la quantité de lignine présente dans une fibre. Le dosage débute par l'oxydation des phénols par un excès de permanganate de potassium en milieu acide. La quantité de permanganate résiduelle oxyde une solution d'iodure de potassium pour le transformer en diiode (I_2). L'iode formé est dosée par une solution de thiosulfate de sodium.

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un indice (souvent compris entre 1 et 100) qui est comparé à un composé de référence (dans notre cas le matériel végétal avant délignification). Cet indice est caractéristique de la quantité de lignines encore présente de la fibre. Plus l'indice est faible, plus le traitement a été efficace. Ce test est particulièrement adapté aux fibres délignifiées, au moins partiellement.

Ce protocole a été standardisé par l'industrie papetière en 1993. On parle alors de méthode TAPPI 236 cm-85 (Technical Association of the Pulp and Paper Industry).^{90,91}

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de ce test peuvent être perturbés par un mécanisme d'oxydation « parasite » lorsque le produit testé contient des acides 4-*O*-méthylglucuroniques.

Lors du processus de délignification, la fonction méthoxy de l'acide uronique peut s'oxyder, ce qui conduira à la formation d'un alcène (acide hexénuronique, Figure 37).

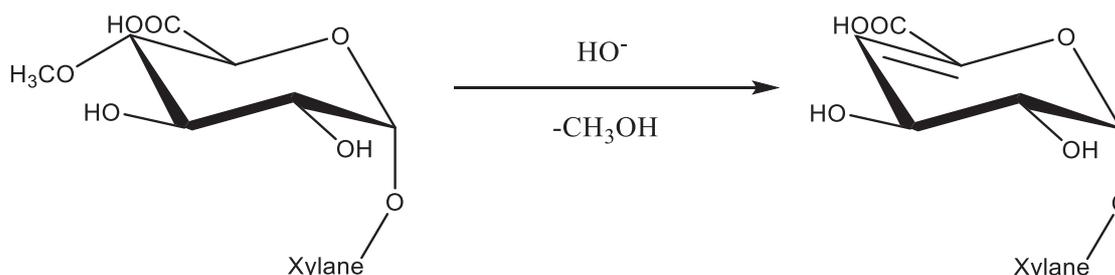


Figure 37: Formation de l'acide hexénuronique lors de l'oxydation de la lignine d'après Gellerstedt *et al.*⁹²

Le permanganate pourra réagir avec la double liaison formée, ce qui augmentera artificiellement la valeur de l'indice kappa.

⁹⁰ Wang X.; Xu M.; Liu Z.; Cao Y., *Bioresources*, **2013**, 8(2), 2558-2567

⁹¹ Mansouri S.; Khiari R.; Bendouissa N.; Saadallah S.; Mhenni F.; Mauret E., *Industrial Crops and Products*, **2012**, 36, 22-27

⁹² Gellerstedt G.; Li J., *Carbohydrate Research*, **1996**, 294, 41-51

III.3. Taux de lignines de Klason

Ce test permet de mesurer la quantité de lignines résistant aux procédés d'hydrolyse acide classique (lignines de Klason) présentes dans la matière végétale après délignification.

Le résidu délignifié est traité à l'acide sulfurique concentré à 72 % v/v. Le milieu réactionnel est dilué dans l'eau jusqu'à atteindre un pourcentage d'acide de 3%. Ce traitement permet de dissoudre les fibres cellulosiques et entraîne la précipitation des lignines de Klason.

Cette technique a été normalisée (TAPPI 222 om-02). Elle est couramment utilisée par l'industrie papetière et en laboratoire.^{93,94} Comparée à la méthode de détermination du nombre Kappa, cette technique est intéressante mais le protocole est plus long et elle est plutôt adaptée aux matériaux présentant une masse importante de lignine.

⁹³ Du S.; Li J.; Gellerstedt G.; Rencoret J.; Del Rio J.C.; Martinez A.T.; Gutierrez A., *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 3073-3080

⁹⁴ Martin-Sampedro R.; Martin J.A.; Eugenio Maria E.; Revilla E.; Villar J.C., *BioResources*, **2011**, *6*, 4922-4935

Chapitre 3: Les xylanes du bois

Rappelons que l'un des objectifs de notre travail est le développement et la mise en oeuvre de techniques originales (ayant un bilan plus neutre pour l'environnement) d'extraction des hémicelluloses. Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de coproduits issus de l'industrie forestière qui est l'une des plus dynamique de notre région. Dans ce chapitre, nous décrirons en détails la structure des xylanes, famille d'hémicelluloses la plus présente dans le bois de feuillus,⁹⁵ qui présente un bon potentiel de valorisation. Nous aborderons ensuite les différentes techniques permettant de les extraire de la matrice ligno-cellulosique. La dernière partie sera consacrée aux méthodes utilisées pour analyser leur structure.

I. Structure des xylanes

La structure de base des xylanes est une chaîne composés d'unités xylose reliés deux à deux par une liaison glycosidique de nature $\beta(1\rightarrow4)$. Leur degré de polymérisation est compris entre 100 et 400 unités glucidiques (le plus souvent 200). Cette chaîne peut être substituée par un ou plusieurs types de monosaccharides. Dans ce cas, le polymère est un hétéropolysaccharide. Les substitutions se situent sur l'hydroxyle en position 3 ou plus rarement en position 2. Le degré de substitution de la chaîne principale déterminera ses propriétés physico-chimiques telles que sa solubilité et sa capacité à interagir avec la cellulose.

Il existe plusieurs types de xylanes qui diffèrent en fonction des substituants de la chaîne principale et/ou de l'origine de la plante. Les plus représentés sont les arabinoxylanes, les arabinoglucuronoxylanes et les glucuronoxylanes (Figure 38). Si la chaîne contient plus de deux types de substituants, ce composé est un hétéroxylane. L'homoxylane n'est constitué que de xylose. On retrouve les xylanes dans de nombreux végétaux comme le son de maïs⁹⁶ (principalement des arabino- ou des glucuronoxylanes), la coque de fruits de l'arganier⁹⁷ (homoxylane), dans certaines graines de céréales comme le seigle,^{98,99} dans les fibres de lin¹⁰⁰ ou la paille¹⁰¹ (principalement des hétéroxylanes).

⁹⁵ Ebringerová A. ; Hromadková A. ; Heinze T., *Advances in Polymer Science*, **2005**, 186, 1-67

⁹⁶ Ebringerova A.; Hromadkova Z., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2002**, 9, 225-229

⁹⁷ Habibi, Y.; Vignon, M. R., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 1431-1436

⁹⁸ Aman P.; Bengtsson S., *Carbohydrate Polymers*, **1991**, 15, 405-414

⁹⁹ Cyran M.R., *Carbohydrate Research*, **2010**, 345, 899-907

Les xylanes sont généralement solubles dans l'eau, dans les solutions aqueuses alcalines, mais également dans certains solvants organiques comme le DMSO ou le DMF.

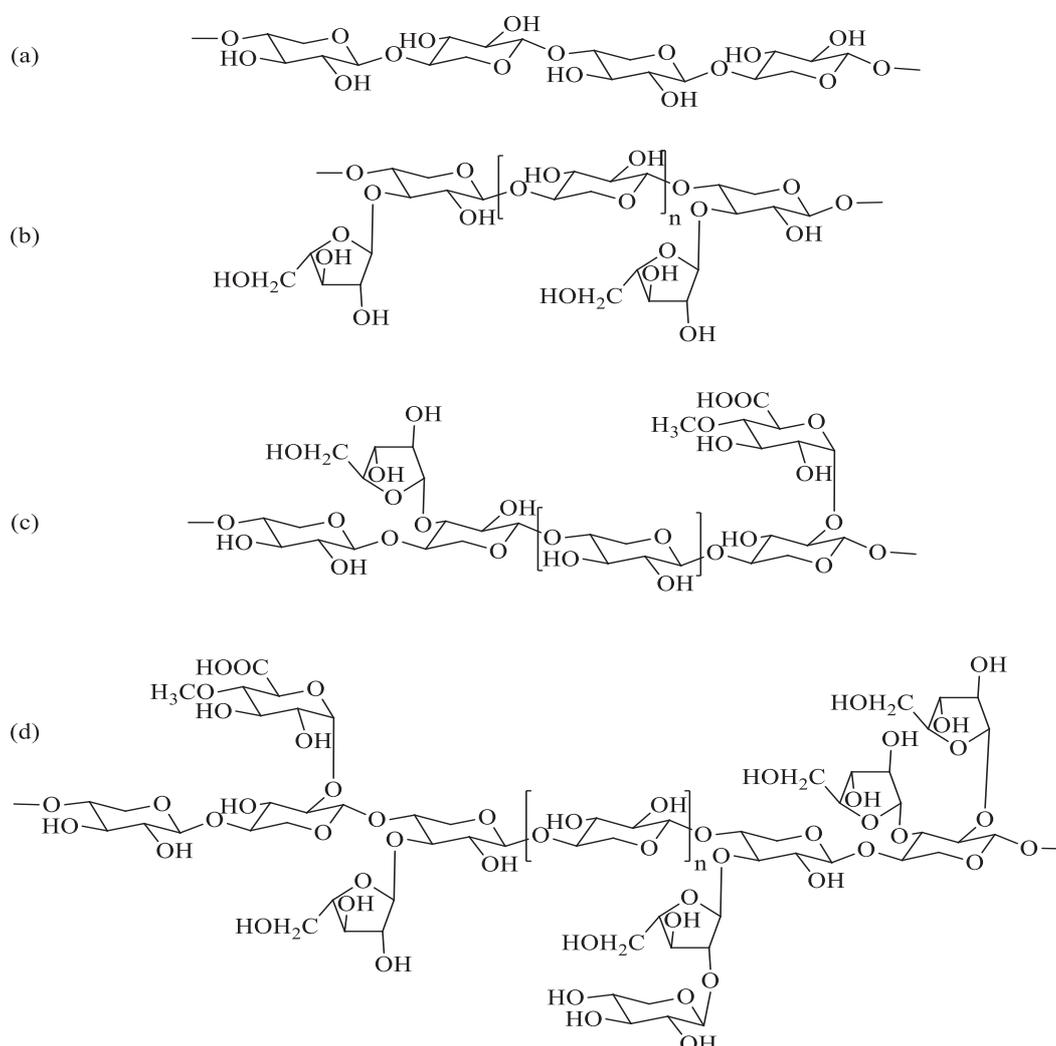


Figure 38: Exemples de structures de xylanes.
(a) Homoxylane ; (b) Arabinoxylane ; (c) Arabinoglucuronoxylane; (d) Hétéroxylanes

Dans le bois des feuillus, et particulièrement le bois de châtaignier qui est le sujet de notre étude, l'hémicellulose majoritaire est le glucuronoxylane (GX).¹⁰² Dans ce composé, le substituant est l'acide α -D-glucopyranosyluronique (acide uronique). Il est relié à la chaîne principale par des liaisons α (1 \rightarrow 2) (Figure 39). Le degré de substitution de la chaîne de

¹⁰⁰ Jacobs A.; Palm M.; Zacchi G.; Dahlman O., *Carbohydrate Research*, **2003**, 338, 1869-1876

¹⁰¹ Garcia J.C. ; Diaz M.J. ; Garcia M.T. ; Feria M.J.; Gomez D.M.; Lopez F., *Biochemical Engineering Journal*, **2013**, 71, 127-133

¹⁰² MOINE Charlotte, Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois-Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. Thèse de doctorat: Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles. Limoges : Université de Limoges, **2005**.

xyloses par l'acide glucuronique varie d'une espèce végétale à l'autre ou en fonction des conditions d'extraction. Généralement, le ratio est d'un acide uronique pour 10 xyloses.¹³

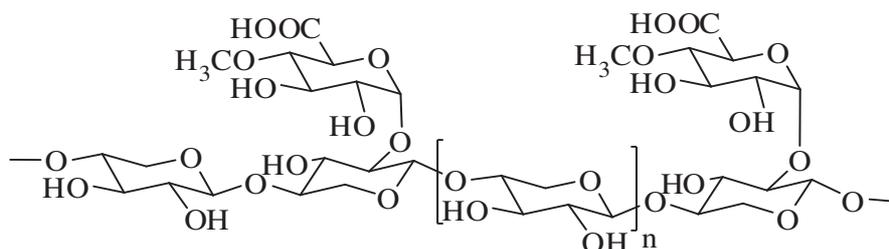


Figure 39: Structure du 4-O-méthyl-D-glucurono-D-xylane d'après Ebringerova¹³

Dans le bois de châtaignier, l'acide uronique est méthylé en position 4. Cette structure est donc appelée 4-*O*-méthyl-D-glucurono-D-xylane (MGX). Dans la matière brute, les unités xyloses sont *O*-acétylés en position 2 et/ou 3.¹⁰³ Sa structure a été totalement élucidée par Moine *et al.*¹⁰⁴ au laboratoire. Son DP est d'environ 200 et son rapport unité d'acide/unité de xylose est d'environ 1/6. De plus, certaines de ses propriétés biologiques ont été mises en évidence et évaluées, notamment cytotoxiques.³

II. Extraction des xylanes

Rappelons que, pour pouvoir arriver à cette étape, la matière brute ligno-cellulosique a subi une étape de délignification qui nous a permis de déstructurer le matériel végétal. La fibre obtenue ne contient plus que de l'holocellulose (cellulose et hémicelluloses). Dans ce chapitre, nous présenterons différentes méthodes permettant de séparer ces composés.

II.1. Méthodes d'extraction solide-liquide

II.1.1. Extraction en milieu alcalin

Les solvants d'extraction les plus utilisés sont les solutions alcalines (soude ou potasse). L'extraction des hémicelluloses peut également se faire en présence de chaux, de carbonate de potassium, de formiate de sodium ou d'ammoniaque, bien qu'ils soient moins efficaces.

La soude concentrée est le solvant le plus courant utilisé dans le cadre de l'extraction des hémicelluloses. Son mécanisme d'action a été proposé par Johansson *et al.*¹⁰⁵ Elle provoquerait la solubilisation des hémicelluloses par ionisation et rupture des liaisons

¹⁰³ Gröndahl M., Gatenholm P., *Polysaccharides*, **2005**, 509-514.

¹⁰⁴ Mazeau, K.; Moine, C.; Krausz, P.; Gloaguen, V., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 2752-2760

¹⁰⁵ Lawther, J.M.; Sun, R., *Industrial Crops and Products*, **1996**, 5, 87-95

hydrogène intra- et intermoléculaires, saponification des liaisons ester. Ceci permettrait de séparer les hémicelluloses de la cellulose. Ce traitement entraîne également la désacétylation des chaînes de xylanes.

La soude est utilisée à des fortes concentrations (>1 M) car il a été démontré que le rendement d'extraction des hémicelluloses était directement lié à sa concentration

Dans le cadre de notre travail, nous avons travaillé avec de la potasse concentrée car il a été démontré qu'elle était plus sélective que la soude pour l'extraction des xylanes.¹⁰⁶ Son utilisation permet également d'éliminer plus facilement, au cours de l'étape de purification des hémicelluloses par précipitation dans l'éthanol, l'acétate de potassium formé lors de sa neutralisation (meilleure solubilité dans l'éthanol).

L'utilisation de solutions alcalines présente cependant quelques inconvénients. Elle peut modifier la structure de l'hémicellulose par saponification des polysaccharides estérifiés. Elle peut également entraîner l'élimination du groupement méthoxy en position 4 des acides uroniques, formant un intermédiaire acide 4-déoxyhex-4-énuronique, (cf. III.2, chapitre 2). Des réactions de « peeling » (β -élimination) peuvent également se produire, entraînant une rupture des liaisons glycosidiques en C-4 d'un ose en position terminale réductrice. Cette réaction peut être évitée en réalisant l'extraction en milieu réducteur (borohydrure de potassium).¹⁰⁷

II.1.2. Extraction par les solvants organiques

Les solvants organiques les plus couramment utilisés pour extraire les hémicelluloses sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF). Le DMF est utilisé pur, alors que le DMSO est utilisé en mélange avec l'eau (90/10).¹⁰⁸ Le temps de contact varie en fonction de la température. Quel que soit le solvant utilisé, le rendement d'extraction augmente avec la température. Cependant, afin d'éviter les phénomènes de dépolymérisation, les solvants organiques ne peuvent pas être utilisés au-delà de 100 °C. C'est la raison pour laquelle ils sont généralement utilisés à température ambiante avec des temps de réaction longs pouvant dépasser 24 heures.

¹⁰⁶ Bochicchio, R.; Reicher, F., *Carbohydrate Polymers*, **2003**, *53*, 127-136

¹⁰⁷ Johansson, M.H.; Samuelson, O., *Wood Science and Technology*, **1977**, *11*, 251-263

¹⁰⁸ Ebringerová, A.; Heinze, T., *Macromolecular Rapid Communications*, **2000**, *21*, 542-556

L'extraction par le DMSO préserve l'acétylation des xylanes.¹⁰⁹

Il a été démontré que l'utilisation de ces solvants favorisait l'extraction des hexosanes. Cette technique est donc moins efficace pour extraire des xylanes.

II.1.3. Extraction à l'eau

Les xylanes étant hydrosolubles, il apparaît naturel d'envisager l'eau comme solvant d'extraction. L'extraction a lieu dans l'eau distillée à chaud. Elle est souvent assistée par un traitement physique comme les microondes¹¹⁰ ou les ultrasons¹¹¹ qui permettent de travailler à des températures plus basses et d'augmenter les rendements d'extraction. Bien que peu décrite car les rendements d'extraction sont plus faibles que ceux obtenus en milieu alcalin ou lors de l'utilisation de solvants organiques, une méthode de ce type a été développée au laboratoire par Barbat *et al.* et a été utilisée pour la suite de ce travail. Cette technique permet de préserver la structure native des xylanes et de limiter l'utilisation de composés polluants.

II.2. Méthodes d'extraction solide-liquide assistées par traitement physique

La tendance actuelle au développement d'une chimie plus « verte » pousse les chercheurs à modifier ou développer de nouvelles techniques. L'idée générale est de produire les mêmes composés en utilisant des réactifs moins toxiques tout en diminuant les quantités de solvant organique utilisées. L'idéal étant de pouvoir, si possible, travailler dans l'eau. Dans le cas de l'extraction des hémicelluloses, l'utilisation de traitements physiques permet de s'approcher de cet objectif puisqu'ils permettent, pour un résultat identique, de travailler avec moins de solvant, d'abaisser les temps et températures de réaction. Les méthodes les plus couramment utilisées sont les mêmes que celles que nous avons décrites dans le chapitre précédent (cf. II.2, chapitre 2) c'est pourquoi nous traiterons uniquement de leur application à l'extraction des hémicelluloses.

¹⁰⁹ Prozil, S.O.; Costa, E.V.; Evtuguin, D.V.; Cruz Lopes L.P.; Domingues, M.R.M., *Carbohydrate Research*, **2012**, 356, 252-259

¹¹⁰ Immerzeel, P.; Falck, P.; Galbe, M.; Adlercreutz, P.; Nordberg Karlsson, E.; Stalbrand, H., *LWT-Food Science and Technology*, **2014**, 56, 321-327.

¹¹¹ Hromádková, Z.; Kováčiková, J.; Ebringerová, A., *Industrial Crops and Products*, **1999**, 9, 101-109.

II.2.1. Explosion à la vapeur

Ce traitement permet de limiter la dégradation des acétyles des hémicelluloses observés en cas d'extraction alcaline. Il permet d'extraire à l'eau les hémicelluloses et d'éviter l'utilisation de solvants organiques ou de solutions alcalines. Cette méthode a déjà été utilisée pour extraire les xylooligosaccharides de paille de blé,¹¹² d'orge¹¹³ ou plus récemment d'un arbuste (*Lespedeza thunbergii*).¹¹⁴ Toutefois, certains groupements acétyls peuvent être hydrolysés sous l'action de la pression pour donner de l'acide acétique. Celui-ci pourra hydrolyser les hémicelluloses, ce qui diminuera le degré de polymérisation des composés extraits.¹¹⁵ Une attention particulière doit être portée aux choix des conditions opératoires (durée, température et granulométrie du matériel végétal) pour éviter une dégradation partielle ou totale des hémicelluloses en furfural lors de l'extraction.

II.2.2. Ultra-sons

Ebringerová et Hromádková se sont intéressées à l'extraction en milieu alcalin des hémicelluloses couplée à la sonication.¹¹⁶ Elles ont travaillé sur des hétéroxylooligosaccharides de son de blé. Le traitement aux ultra-sons a permis d'améliorer à la fois la pureté des extraits, le rendement d'extraction, tout en diminuant la température et le temps de réaction (5 min. à température ambiante contre 1 heure à 60 °C).

II.2.3. Micro-ondes

Les traitements micro-ondes sont réalisés lors d'extraction d'hémicelluloses à l'eau ou dans les solutions alcalines. Les résultats obtenus lors de l'extraction de xylooligosaccharides de peuplier,¹¹⁷ de bouleau,¹¹⁸ ou de bagasse de canne à sucre,¹¹⁹ sont rapportés dans la littérature. Ils ont montré que ce traitement permettait d'augmenter le rendement d'extraction, ce rendement étant directement corrélé avec le temps d'activation. Il semblerait qu'un temps d'activation long couplé à une puissance d'irradiation importante entraînerait une diminution du degré de polymérisation des xylooligosaccharides.

¹¹² Sun, X.F.; Sun, R.C.; Fowler, P.; Baird, M.S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 860-870

¹¹³ Krawczyk, H.; Persson, T.; Andersson, A.; Jönsson, A.J., *Food and Bioproducts Processing*, **2008**, 86, 31-36.

¹¹⁴ Wang, K.; Xu, F.; Sun, R.C.; Jones, G.L., *Industrial and Engineering Chemical Research*, **2010**, 49, 8797-8804

¹¹⁵ Korte, H.E.; Offermann, W.; Puls, J., *Holzforschung*, **1991**, 45, 419-424.

¹¹⁶ Hromádková, Z.; Kost'álová, H.; Ebringerová, A., *Ultrasonics Sonochemistry* **2008**, 15, 1062-1068.

¹¹⁷ Teleman, A.; Lundqvist, J.; Tjenneld, F.; Stalbrand, H.; Dahlman, O., *Carbohydrate Research*, **2000**, 329, 807-815.

¹¹⁸ Panthapulakkal, S.; Pakhareenko, V.; Sain, M., *Journal of Polymers and the Environment*, **2013**, 21, 917-929

¹¹⁹ Wang, L.; Liu, X.; Weng, M.; Wu, F.; Li, Z.; Wang, S., *Advanced Materials Research*, **2013**, 634-638, 975-980

III. Caractérisation des xylanes

L'extraction des xylanes est suivie d'une série d'analyses dont l'objectif est de qualifier la nature de l'extrait, d'en préciser la composition osidique et les caractéristiques structurales (type de liaisons, DP, substitution...). Dans ce chapitre, nous présenterons les techniques de caractérisation et de dosage qui nous permettront d'atteindre cet objectif.

III.1. Caratérisation de la composition centésimale et du degré de polymérisation

Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosages simples et rapides à mettre en œuvre. Nous les utilisons pour déterminer les oses totaux, les oses réducteurs et les acides uroniques. Ces dosages reposent sur l'utilisation de chromophores (phénols, orcinol,...) qui sont fixés sur des dérivés furfurals formés après hydrolyse à l'acide sulfurique des sucres et des acides uroniques. Les chromophores ainsi formés absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité d'oses présents. Le développement de la coloration, la longueur d'onde à laquelle on observe l'absorption maximale, ainsi que l'intensité de l'absorbance dépendent des réactifs, de la nature de la structure des oses dosés (hexose, pentose, acide uronique ou sucre réducteur) et des conditions de réaction (température, temps de réaction et concentration de l'acide).

- Les **oses totaux** sont dosés par la méthode de Dubois *et al.*¹²⁰ Cette technique permet de déterminer la quantité, exprimée en % massique, d'oses présents sur le polysaccharide. Ce taux est comparé à des composés de référence, dans notre cas le xylose. Elle utilise le phénol comme chromophore.

- Les **oses réducteurs** sont déterminés par la méthode de Lever.¹²¹ Ce dosage permet de mesurer le pourcentage massique de monosaccharides réducteurs présents dans l'échantillon. Le rapport entre les quantités d'oses totaux et réducteurs nous permet d'obtenir le degré de polymérisation (DP). Ce dosage utilise comme chromophore l'acide parahydroxybenzoïque hydrazide (PAHBAH).

- Les **acides uroniques** sont dosés par la méthode de Blumenkrantz *et al.*¹²² Elle permet de déterminer la quantité, en % massique, d'acide uronique du polysaccharide. L'acide glucuronique est utilisé comme référence pour ce dosage. Une fois comparé à la quantité

¹²⁰ Dubois M.; Gilles K.A.; Hamilton J.K.; Rebers P.A.; Smith F. *Analytical Chemistry* **1986**, 28, 350-356.

¹²¹ Lever M. *Analytical Biochemistry* **1972**, 47, 273-279.

¹²² Blumentkrantz N.; Asboe-Hansen G.; *Analytical Biochemistry* **1973**, 54, 484-489.

d'oses totaux, nous pouvons déterminer le degré de substitution du polymère par les acides uroniques. Expérimentalement, le *mé*ta-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium est utilisé pour ce dosage.

Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidiques ont été déterminées par la méthode de correction développée par Montreuil et Spick.¹²³ Il est alors possible de corriger les interférences des acides uroniques dans le dosage des oses totaux et réciproquement.

III.2. Détermination de la composition mono-saccharidique

La détermination de la composition en monosaccharides est couramment réalisée par CPG. Les polysaccharides sont préalablement hydrolysés puis dérivés afin de les rendre volatiles.

III.2.1. Hydrolyse des polysaccharides

La dépolymérisation peut être conduite par hydrolyse acide. Cette technique utilise des acides de forces et de concentrations variables sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction) adaptées à la nature et la structure du polysaccharide. Les liaisons osidiques sont, en fonction de leur stabilité relative ($1,6' > 1,4' > 1,3' > 1,2'$), plus ou moins sensibles à l'hydrolyse. Il est parfois impossible de dépolymériser totalement le polysaccharide.

La stabilité des monosaccharides libres en solution varie fortement d'un ose à l'autre. Les conditions d'hydrolyse doivent être adaptées pour chaque type de monosaccharides. Une température trop élevée du milieu réactionnel provoque la dégradation de certains oses, notamment le xylose.¹²⁴ La force de l'acide peut entraîner la dégradation des acides uroniques par décarboxylation.

Une méthode alternative et rapide pour l'hydrolyse des liaisons glycosidiques dans les hémicelluloses est la méthanolyse (Figure 40). Elle ne peut être appliquée qu'à l'analyse d'échantillons non cristallins. Une conversion quasi totale en méthylglycosides est généralement atteinte par chauffage pendant 24 heures à 80°C, en présence de méthanol chlorhydrique 1M. Les liaisons uronosidyles sont alors rompues probablement du fait de l'estérification des unités d'acides uroniques. De plus ces acides uroniques libérés sont mieux

¹²³ Montreuil, J. ; Spik, G. ; Chosson, A. ; Segard, E. ; Shepler N., *Journal de Pharmacie de Belgique* **1963**, 18, 529-546.

¹²⁴ Blakeney, A. B.; Harris, P. J.; Henry, R. J.; Stones, B. A., *Carbohydrate Research*, **1983**, 113, 219-299.

préservés dans le cas de la méthanolyse étant donné qu'ils sont convertis en méthylglucuronosides très stables.¹²⁵

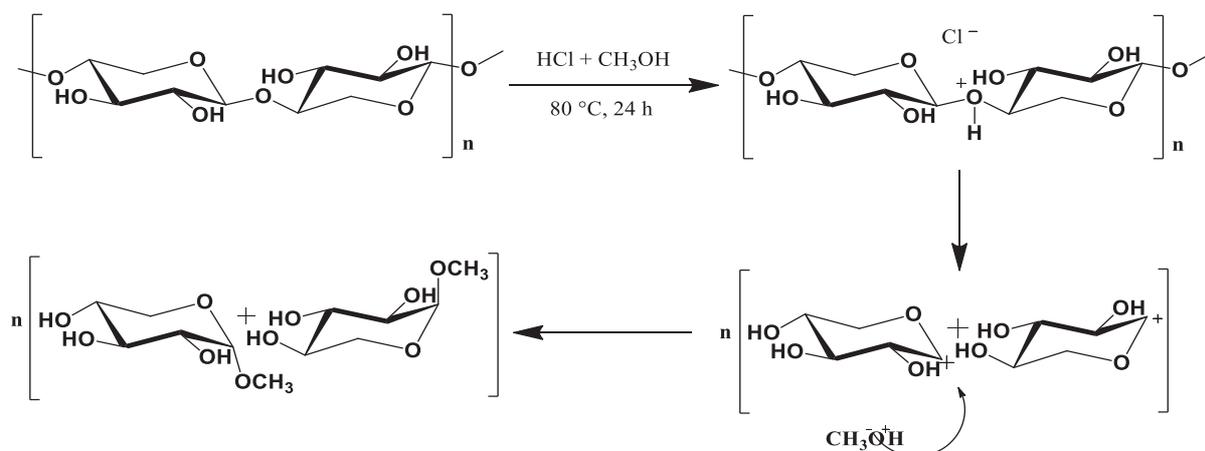


Figure 40: Méthanolyse du xylane

III.2.2. Analyse des monosaccharides (CPG)

La dérivation des monosaccharides peut être réalisée selon plusieurs méthodes résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3: Méthodes de dérivation des monosaccharides

Méthode de dérivation	Dérivé	Référence
Triméthylsilylation	TMS	Bleton <i>et al.</i> ¹²⁶ Kamerling <i>et al.</i> ¹²⁷
Acétylation	Acétates	Biermann ¹²⁸
Trifluoroacétylation	Trifluoroacétates	Englmaier ¹²⁹
Réduction/acétylation	Alditols acétates	Black and Fox ¹³⁰
Osimation/acétylation	Aldonitriles acétates	McGinnis ¹³¹
O-méthylolation/acétylation ou triméthylsilylation	O-méthyloloxime acétates ou O-méthyloloxime TMS	Neeser et Schweizer ¹³²

¹²⁵ Huang, Y.Z.; Indrarti, L.; Azuma, J.; Okamura, K.; *Mokuzai Gakkaishi*, **1992**, 38, 1168-1171.

¹²⁶ Bleton J.; Mejanelle P.; Sansoulet J.; Goursaud S.; Tchaplà A., *Journal of Chromatography A*, **1996**, 720, 27-49.

¹²⁷ Kamerling J. P. ; Gerwing G. J. ; Vliegthant J. F. G. ; Clamp J. R., *Biochemical Journal*, **1975**, 151, 491-495.

¹²⁸ Biermann C. J., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton **1989**, 1-17.

¹²⁹ Englmaier P., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 127-141.

¹³⁰ Black G. E., Fox A., *Journal of Chromatography A*, **1996**, 720, 51-60.

¹³¹ McGinnis G. D., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 19-26.

¹³² Neeser J. R., Schweizer T. F., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 143-155.

La méthode la plus utilisée est la méthode de Kamerling *et al.*,¹²⁷ modifiée par Montreuil *et al.*¹³³ car elle permet l'identification simultanée des hexoses, déoxyhexoses, pentoses, acides uroniques et osamines. Elle consiste en une triméthylsilylation par réaction des *O*-méthylglycosides avec du BSTFA (N,O-bis-triméthylsilylacétamide à 95 % stabilisé par du chlorure de triméthylsilane 5 % dans de la pyridine anhydre). (Figure 41)

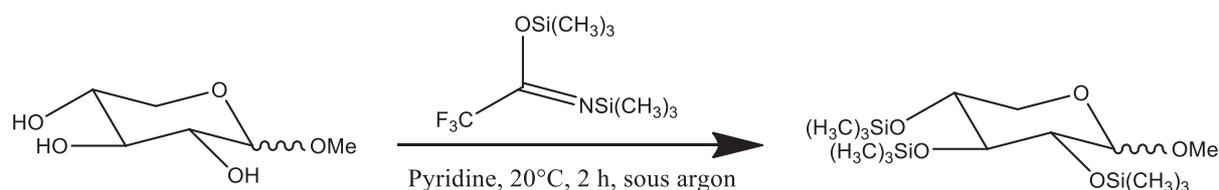


Figure 41: Triméthylsilylation des méthylglycosides d'après Kamerling *et al.*

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont enfin analysés par CPG où ils sont séparés (après avoir été volatilisés dans une chambre d'injection) sur des colonnes apolaires de type diméthylpolysiloxane. Ils sont détectés par ionisation de flamme (FID).

En fonction de la méthode d'analyse sélectionnée, les oses seront observés sous la forme d'un ou plusieurs pics. En effet, les sucres, en solution, existent en équilibre dynamique sous deux formes cyclique et ouverte. Lors de la cyclisation (formes pyranose et/ou furanose), deux anomères α et β peuvent être formés pour chacune des formes pyranose et furanose, dépendant de l'orientation de l'hydroxyle anomérique. Si la dérivation conserve l'anomérie du sucre, deux à quatre isomères peuvent être observés pour chaque monosaccharide, certains sucres existant soit sous forme pyranose soit sous forme furanose et d'autres présentant les deux formes.

III.3. Analyses spectroscopiques

Pour déterminer le type de fonctions présentes dans les xylanes extraits, la méthode la plus couramment utilisée est la spectroscopie infrarouge. Les hémicelluloses présentent en général une bande élargie autour de 3400 cm^{-1} correspondant aux fonctions OH, très nombreuses dans le xylane. Un glucuronoxylane présentera une bande caractéristique aux environs de 1650 cm^{-1} correspondant à la fonction acide des acides uroniques.

¹³³ Montreuil J. ; Bouquelet S. ; Debray H. ; Fournet B. ; Spick G. ; Strecker G., *Glycoproteins*. Chaplin M.F and Kennedy Ed.; IRL Press: Oxford, Washington D.C, **1986**, 143-204.

La nature de la chaîne principale, son acétylation éventuelle, son taux de substitution et le type des substituants sont déterminés par spectroscopie RMN (^1H - et ^{13}C - RMN). Des informations complémentaires sur les interactions carbone-hydrogène à courte et longue distance de la chaîne sont apportées par des analyses RMN bidimensionnelles homo- et hétéronucléaires de type COSY, TOCSY, HSQC ou NOESY.

La masse moléculaire peut être déterminée par spectrométrie de masse MALDI. Cette analyse n'est réalisable que si l'échantillon possède une polydispersité limitée (inférieure à 1,1). Pour les polysaccharides poly-dispersés, une séparation préalable par chromatographie d'exclusion stérique est nécessaire. On diminue ainsi la poly-dispersité des échantillons jusqu'à des valeurs compatibles avec l'analyse MALDI.¹³⁴ Par conséquent, l'analyse MALDI est possible, mais particulièrement inadaptée pour l'analyse spectroscopique des xylandes en général.

III.4. Caractérisation de la structure des xylo-oligosaccharides

La structure d'un polysaccharide étant souvent trop complexe, il est difficile de déterminer sa structure directement. Des étapes d'hydrolyse ménagée sont souvent proposées. Elles permettent, après séparation des composés majoritaires, d'isoler des oligosaccharides représentatifs de la structure native dont l'analyse est plus aisée.

III.4.1. Obtention des xylo-oligosaccharides

Le découpage partiel des polymères à des fins analytiques nécessite l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Nous présentons ici différentes méthodes possibles.

a. Hydrolyse enzymatique

Les méthodes les plus spécifiques sont celles qui utilisent des enzymes qui vont permettre l'hydrolyse du polymère sur des positions bien définies.

L'action combinée d'endo- ou d'exo-enzymes permet l'hydrolyse totale des glucuronoxylanes (GX) en unités monomériques de xylose et d'acide uronique. Les endo-enzymes hydrolysent les liaisons osidiques au hasard dans la chaîne, elles génèrent, en fonction du temps de réaction, des oligomères de taille variable. Les exo-enzymes hydrolysent

¹³⁴ Garozzo D. ; Spina E. ; Cozzolino R. ; Cescutti P. ; Fett W.F., *Carbohydrate Research*, **2000**, 323, 139-46.

spécifiquement les liaisons des extrémités terminales et entraînent la production de monomères.

On appellera xylanases les enzymes entraînant l'hydrolyse de la chaîne principale, tandis que celles qui éliminent les chaînes latérales sont communément appelées enzymes « accessoires ».¹³⁵ Les xylanases sont extraites de microorganismes tels qu'*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Fibrobacter* ou certains *Bacillus*.¹³⁶

Les endoxylanases de GX sont nommés glucuronoxylane xylanohydrolases.¹³⁷ La spécificité de reconnaissance de leurs sites de coupure varie selon l'enzyme. L'endoxylanase de *Thermomyces Lanuginosus* (1,4- β -D-xylane-4-xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8), rompt spécifiquement la liaison β -(1 \rightarrow 4) de la chaîne principale de xylane. Elle libère des oligomères linéaires, substitués ou non (acide uronique, résidu de lignine...), de fort puis de faible DP.

Plusieurs types d'enzymes accessoires sont capables d'hydrolyser les chaînes latérales de GX. Les glucuronidases (xylane- α -D-1,2-glucuronohydrolase, E.C. 3.2.1.131) libèrent spécifiquement l'acide glucuronique ou son dérivé méthylé reliés à la chaîne de xylane par des liaisons α -(1 \rightarrow 2).¹³⁸ Leur action se conjugue à celle des endoxylanases strictes pour permettre l'hydrolyse totale des xylanes. Les xylanes acétyl estérase (E.C.3.2.1.6) permettent d'hydrolyser les groupements acétyls des carbones C-2 ou C-3 des xyloses. Leur action facilite l'adsorption des endoxylanases sur leur substrat.¹³⁹ Certaines enzymes accessoires permettant de détacher les fragments de lignines (acide ferrulique, monolignols,...) éventuellement encore liés au polysaccharide.

L'action conjuguée de ces enzymes permet l'hydrolyse complète du 4-O-méthylglucuronoxylane. (Figure 42)

¹³⁵ Bonnin E. ; Renard C. ; Thibault J. F. ; Ducroo P., *Enzymes en agroalimentaire*, Ed. Techniques et documentation Lavoisier: Paris, **1997**, 169-197.

¹³⁶ Carvalho, A.F.A.; De Oliva Neto, P. ; Fernandes Da Silva, D. ; Pastore, G.M., *Food Research International*, **2013**, *51*, 75-85.

¹³⁷ Nishitani K.; Nevins D. J., *Journal of Biological Chemistry*, **1991**, *266*, 6539-6543.

¹³⁸ Siika-Aho M.; Tenkanen M.; Buchert J.; Puls J.; Viikari L., *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, *16*, 813-819.

¹³⁹ Biely P.; MacKenzie C. R.; Puls J.; Schneider H., *BioTechnology* **1986**, *4*, 731-733.

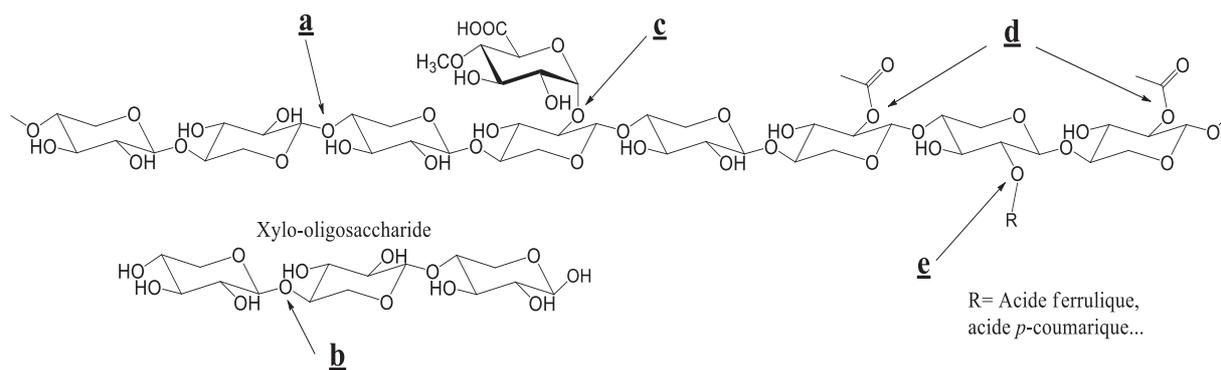


Figure 42: Hydrolyse enzymatique de GX (d'après Carvalho *et al.*¹³⁶)

a : 1,4 β -D xylane-4-xylanohydrolase (E.C. 3.2.1.8) ; b : 1,4 β -D xylane-4-xylohydrolase, (E.C. 3.2.1.37) ; c : xylane β -D-1,2-glucuronohydrolase, (E.C 3.2.1.31) ; d : acétyl-estérase (E.C. 3.2.1.6) ; e : acide *p*-coumarique estérase ou acide ferrulique estérase (EC 3.1.1.73).

b. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide ménagée constitue parfois une approche complémentaire à l'hydrolyse enzymatique. Grâce au caractère aléatoire de cette réaction, certains motifs structuraux peuvent être identifiés. Ceci apporte un complément d'information pour l'analyse de la structure du polymère.

Quand les liaisons glycosidiques du polysaccharide sont comparables en termes de stabilité (polysaccharide neutre de type homoxylane, arabinoxylane,...), l'hydrolyse acide fournit un mélange aléatoire d'oligosaccharides et de monosaccharides. Dans le cas des polysaccharides acides, tels que les glucuronoxylanes, la stabilité chimique des liaisons xylose-acide uronique lui confère une résistance importante aux acides forts (HCl ou TFA, y compris à température élevée). On obtient alors un mélange contenant une proportion importante d'acides aldobiuroniques (par hydrolyse des xylanes).¹⁴⁰

La Figure 43 illustre le mécanisme général de l'hydrolyse acide des liaisons glycosidiques. Elle se déroule en 3 étapes successives, la protonation de l'oxygène anomérique, la décomposition de l'acide conjugué (formation d'un ion oxonium) et addition rapide d'eau (génération d'une extrémité réductrice).

¹⁴⁰ Timell T. E., *Wood Science and Technology* **1965**, 1, 45-70.

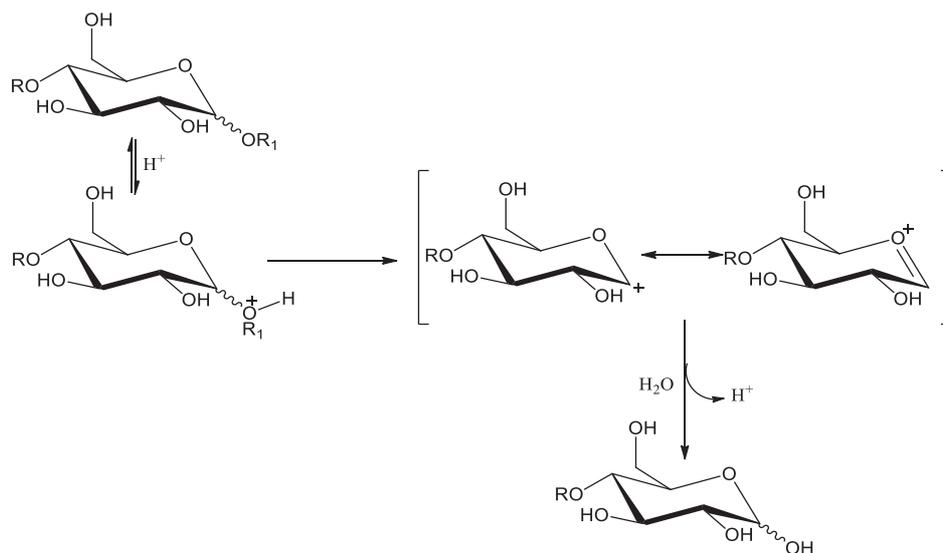


Figure 43: Mécanisme général de l'hydrolyse acide des polysaccharides, d'après Bemiller¹⁴¹

c. Autohydrolyse

L'autohydrolyse des polysaccharides est une méthode d'hydrolyse douce. Elle suit un mécanisme identique à celui de l'hydrolyse acide mais la protonation est induite par les fonctions carboxyliques et/ou sulfates portées par les acides uroniques.

Cette réaction produit des xyl-oligosaccharides de taille aléatoire en fonction de la distribution des acides uroniques. La liaison hydrolysée sera celle la plus proche de l'acide (Figure 44).

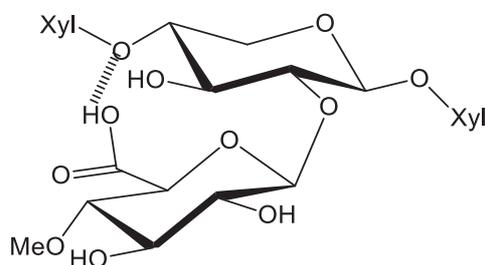


Figure 44: Mécanisme d'autohydrolyse d'après Ciancia et Cerezo¹⁴²

L'autohydrolyse nécessite une étape préalable de conversion des polysaccharides sous leur forme acide par passage sur résine échangeuse d'ions. L'hydrolyse se déroule dans des

¹⁴¹ Bemiller J. N., *Advances in Carbohydrates Chemistry*, **1967**, 22, 25-108.

¹⁴² Ciancia M.; Cerezo A.S., *Ciencia e cultura*, **1993**, 45, 54-61.

conditions de température et de pression qui varient en fonction de la nature du polysaccharide (de 20 à 190 °C pour des pressions allant jusqu'à 13 bars).^{143,144}

Cette méthode produit généralement des oligosaccharides de DP supérieurs à 10 et pour obtenir des fragments plus petits (2-6 unités), il est souvent nécessaire de coupler cette réaction à une hydrolyse enzymatique.¹⁴⁵ Il a été montré au laboratoire que cela n'était pas le cas pour le 4-*O*-Méthylglucuronoxylane et pour l'homoxylane d'Argan. Nous avons obtenu des xylo-oligosaccharides possédant 1 à 14 unités de xyloses.

III.4.2. Séparation

La séparation des mélanges d'oligosaccharides après hydrolyse est certainement l'étape la plus fastidieuse de l'étude structurale d'un polysaccharide. Les fractions oligosaccharidiques peuvent être séparées par chromatographie d'exclusion stérique en fonction de leur masse moléculaire ou plus exactement en fonction de leur volume hydrodynamique ; d'autres méthodes de séparation sont liées à la charge des molécules (chromatographie d'échange d'ions), à leur polarité (chromatographie en phase inverse), et plus rarement à leur structure (chromatographie d'affinité).

III.4.3. Détermination structurale

La détermination structurale des xylo-oligosaccharides (XOS) peut être menée par différentes techniques spectroscopiques. La RMN et l'Infrarouge, que nous avons déjà présenté (partie III.3), peuvent être appliqués aux oligomères. Le polymère ayant été fractionné, la spectrométrie de masse devient une méthode utilisable pour son analyse structurale. Il existe plusieurs techniques de spectrométrie de masse. Les deux techniques les plus adaptées sont le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) et l'ESI (Electro-Spray Ionisation).

a. Spectrométrie de masse MALDI

Le mode d'ionisation MALDI (Désorption/ionisation laser assistée par matrice) est une méthode sensible capable d'analyser des molécules de taille supérieure à 300 Da. Il est donc adapté à l'analyse d'oligosaccharides (> 2 ou 3 unités glucidiques).

¹⁴³ Xiao, X.; Bian, J.; Peng, X.P.; Xu, H.; Xiao, B.; Sun, R.C., *Bioresource Technology*, **2013**, 138, 63-70

¹⁴⁴ Chen, M.H.; Browman, M.J.; Dien B.S.; Rausch, K.D.; Tumbleson, M.E.; Singht, V., *Bioresource Technology*, **2014**, 155, 359-365

¹⁴⁵ Moure, A.; Gullon, P.; Dominguez, H. ; Parajo, J.C., *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 1913-1923.

La spectrométrie MALDI utilise un faisceau laser pulsé pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. L'énergie transmise est absorbée par la matrice ce qui provoque son expansion en phase gazeuse, l'ionisation et l'entraînement de l'échantillon. Le laser peut également induire la fragmentation de la molécule d'intérêt. La matrice permet de limiter la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident.

La majorité des ions observés en MALDI sont mono-chargés (type $[M+H]^+$), bien qu'il soit possible d'observer la formation d'ions multichargés du type $[M+nH]_n^+$. L'ionisation s'effectue par transfert de protons, avant désorption dans la phase solide, ou après désorption par collision avec la matrice excitée (ou d'autres molécules du plasma). Le principe d'ionisation par MALDI est décrit sur la Figure 45.

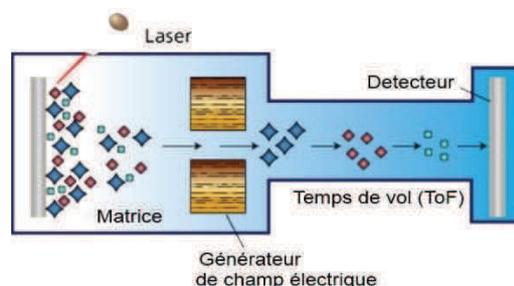


Figure 45: Spectromètre de masse MALDI

Un laser frappe la matrice dans laquelle le composé à analyser a été incorporé. Cela provoque une expansion de la matrice, entraînant celle-ci et le composé dans le nuage d'ionisation. Le composé ionisé va alors jusqu'au détecteur qui permet l'analyse. D'après Sigma-Aldrich¹⁴⁶

b. Spectrométrie de masse ESI

Comparée à la MALDI, la spectrométrie de masse ESI (ionisation par électro-spray) génère moins de fragmentations. L'utilisation de cette technique est généralement plus pertinente dans le cadre de l'analyse de masse de molécules plus sensibles à la fragmentation ou plus petites que les XOS.

La génération des ions se produit lors du passage de la molécule en solution dans un champ électrique intense. Elle se déroule en trois étapes : (Figure 46)

- La solution est nébulisée et la molécule ionisée lors de son passage sur un capillaire métallique auquel on a appliqué une haute tension.
- Les gouttelettes sont fractionnées par explosions coulombiennes.

¹⁴⁶<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/learning-center/qc-qa/qc-analysis-by-mass-spectrometry.html>

- Le fractionnement se poursuit jusqu'à l'obtention d'ions en phase gazeuse qui peuvent être analysés.

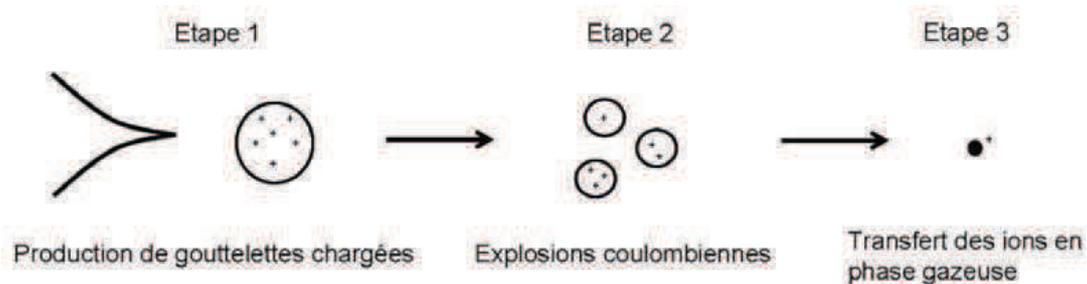


Figure 46: Ionisation par la méthode ESI d'après Harakat¹⁴⁷

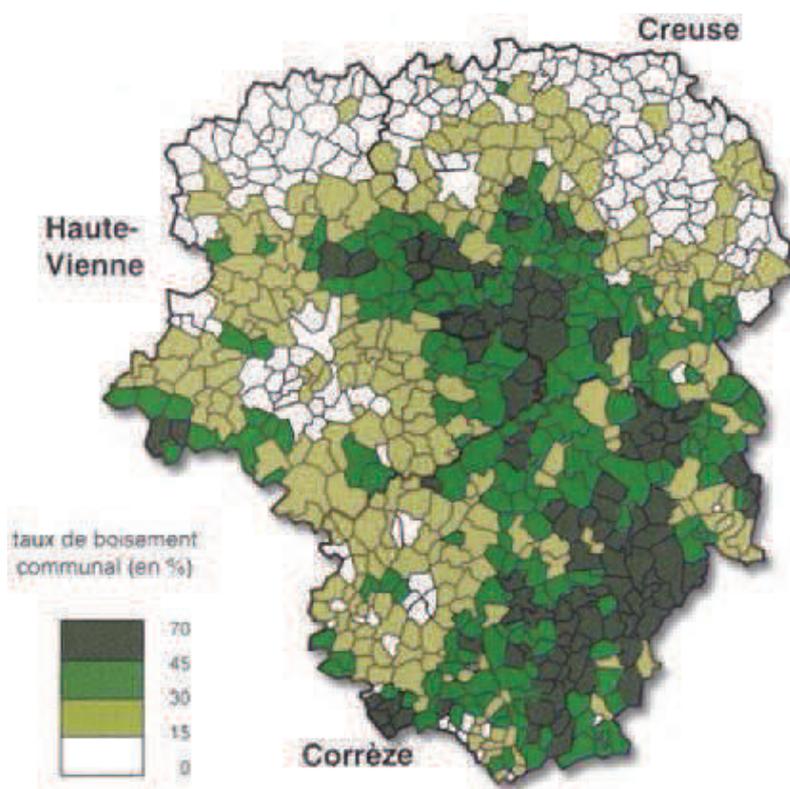
Couplée à des techniques de chromatographie en phase liquide ou gazeuse (GC/MS, LC/MS),¹⁴⁸ cette technique permet l'analyse de composés en mélange. La méthode ESI est couramment utilisée dans la détermination d'intermédiaires réactionnels en phase liquide.

¹⁴⁷ HARAKAT Dominique. *Etudes mécanistiques par ESI-MS de réactions palladocatalysées*. Thèse de doctorat : Sciences, Technologies, Santé : Chimie Organique. Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne, **2011**.

¹⁴⁸ Whitehouse, C.M. ; Dreyer, R.N.; Yamashita, M.; Fenn, J.B., *Analytical Chemistry*, **1985**, 57, 675-679

IV. Valorisation des xylanes et des xylo-oligosaccharides

Les xylanes et les xylo-oligosaccharides sont des composés d'intérêt biologique et chimique majoritairement isolés à partir de son de maïs⁹⁶, de céréales,⁹⁸⁹⁹ dans les fibres de lin¹⁰⁰ ou la paille.¹⁰¹ De tels composés peuvent également être isolés à partir de bois, et de ses co-produits où ils peuvent représenter jusqu'à 20 % de la matière sèche. Leur valorisation constitue donc un enjeu économique d'importance pour la filière bois en général, tout particulièrement en Limousin. En effet, le Limousin présente un taux de boisement très important (Figure 47) et l'industrie forestière y est très active. De la scierie à l'usine papetière, la filière bois prend une part importante dans la dynamique économique régionale. Elle représente plus de 3,4 % des emplois salariés de la région (source : INSEE, 2010), et peut monter jusqu'à 9,2 % dans certaines communes de Haute Corrèze (où le taux de boisement peut aller jusqu'à 70 %). Ceci en fait le 2^{ème} employeur régional et place la Région Limousin au premier rang national en proportion d'emplois pour la filière bois.



Les forêts limousines sont constituées au 2/3 de feuillus et 1/3 de résineux. Les principales espèces représentées sont le chêne (33 %), le châtaignier (14 %) et le Douglas (12 %) (Figure 48).

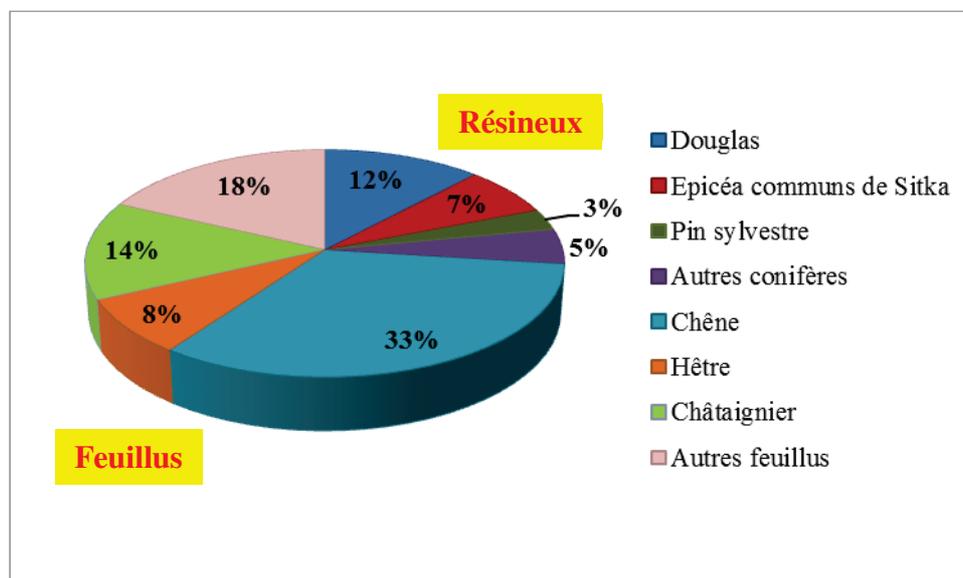


Figure 48: Répartition des espèces d'arbres limousins en pourcentage de superficie.
(Source : Inventaire Forestier National de l'IGN)

En Limousin, le volume de bois exploités est en moyenne de 2,1 millions de mètres cubes par an (47 millions à l'échelle nationale). Ce chiffre est monté jusqu'à 3 millions après la tempête de 1999. Si l'on compare ce volume à celui de l'accroissement annuel de la matière ligneuse qui est de 4,2 Mm³/an, on constate qu'il reste une marge de manœuvre importante permettant de poursuivre le développement de cette filière.

Actuellement, environ 400000 m³ de bois sont sciés annuellement en Limousin (principalement des conifères). Cette activité produit plusieurs milliers de m³ de coproduits (sciures, chutes diverses,...), dont la composition chimique permet d'envisager des voies de valorisation y compris à l'échelle industrielle.

Dans ce travail, nous nous sommes principalement intéressés aux techniques permettant d'extraire les hémicelluloses des sciures (particulièrement les xylanes du bois de châtaignier).

Différentes voies de valorisation de ce type de composés ont déjà été explorées. Les xylanes, utilisés à l'état natif ou modifié, ont pu montrer leur potentiel dans des domaines aussi vastes que l'agro-alimentaire, les biomatériaux ou la santé. La Figure 49 résume les différentes voies de valorisation envisagées pour les xylanes et ses différents produits d'hydrolyse (xylo-oligosaccharides et xylose).

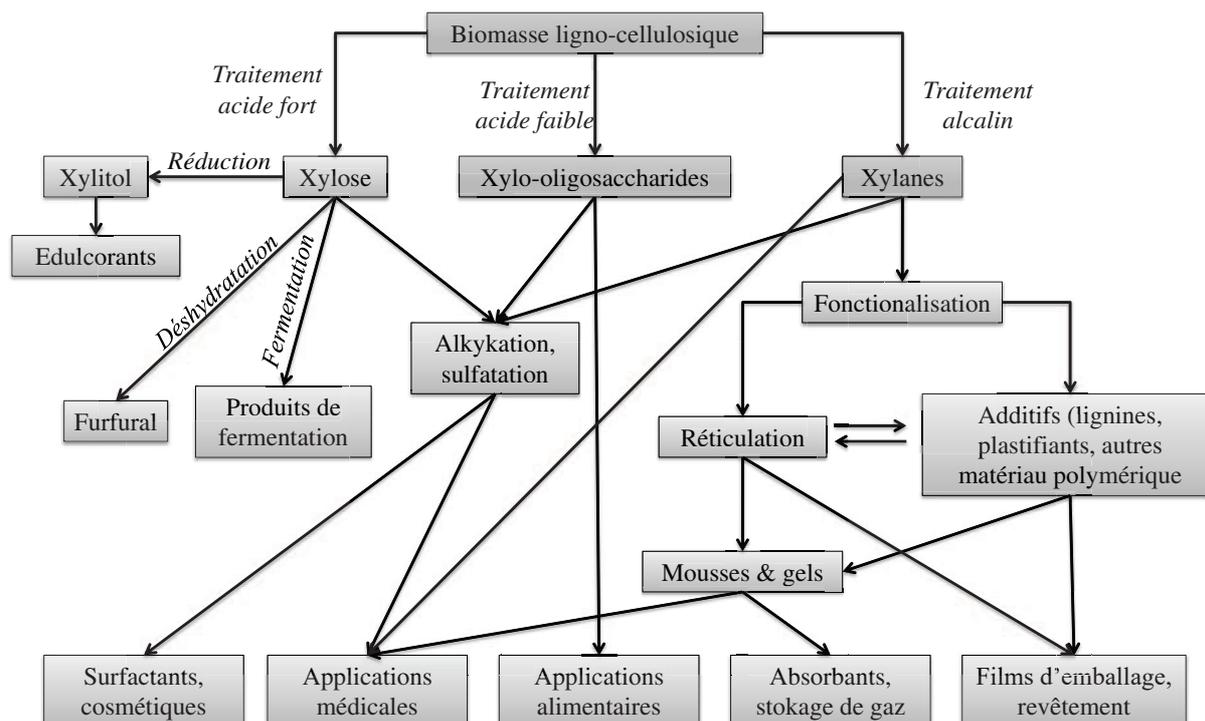


Figure 49: Différentes voies de valorisation des xylanes et dérivés d'après Deutschmann et Dekker¹⁴⁹

Le xylose, constituant majoritaire du xylane, peut offrir, après modifications, toute une gamme de composés directement valorisables.

Sa réduction peut permettre de former du xylitol, qui est un édulcorant largement utilisé dans l'industrie (il possède un pouvoir sucrant équivalent au saccharose).¹⁵⁰ Sa fermentation peut aboutir à la production de bio-éthanol. Cette voie n'est pas exploitée pour l'instant car l'obtention de bio-carburant à partir du bois n'est pas encore concurrentielle par rapport à l'utilisation des énergies fossiles. Elle permettrait malgré tout d'obtenir du bio-éthanol sans utiliser les réserves végétales destinées à l'alimentation humaine.¹⁴⁹ Sa déshydratation le transforme en furfural,¹⁵¹ composé offrant de nombreuses voies de valorisation potentielles comme le montre la Figure 50.

¹⁴⁹ Deutschmann, R.; Dekker, R.F.H., *Biotechnology Advances*, **2012**, *30*, 1627-1640

¹⁵⁰ Holmbom, B., *Actualité chimique*, **2002**, *11-12*, 52-53.

¹⁵¹ Gandini, A. ; Belgacem, M.N.; *Actualité Chimique*, **2002**, *11-12*, 56-61.

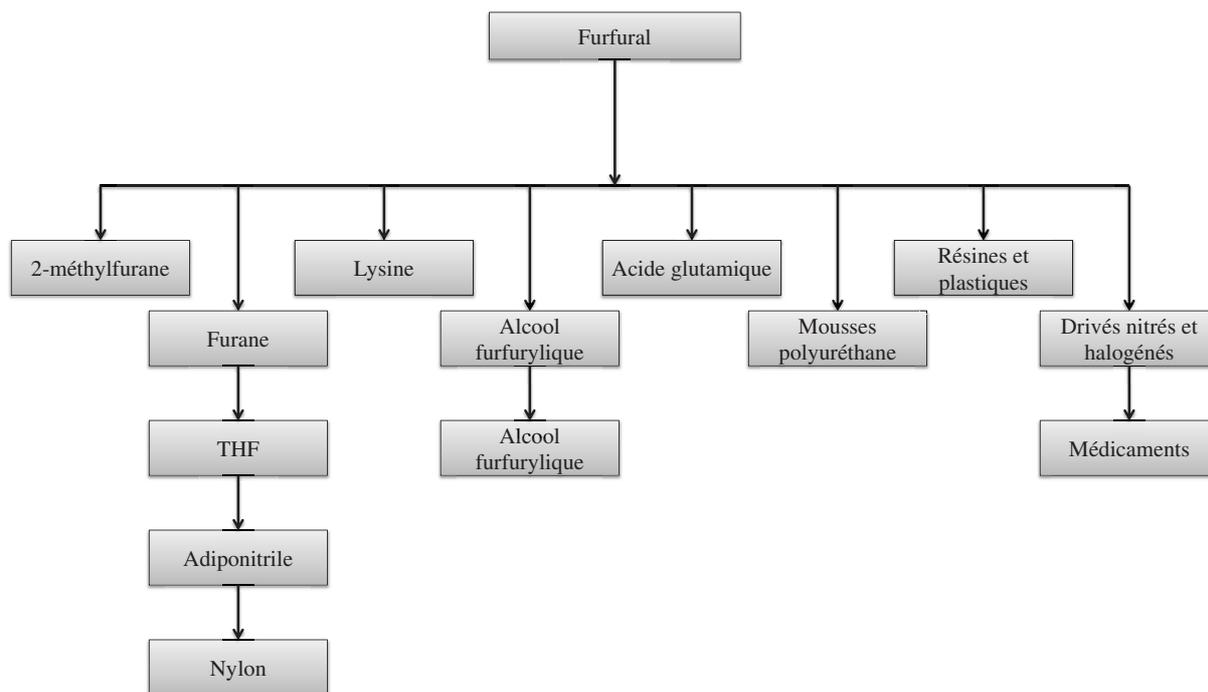


Figure 50: Voies de valorisation du furfural d'après Popal¹⁵²

L'inuline, tout comme les fructo-oligosaccharides, sont à l'heure actuelle, très utilisés pour l'industrie agroalimentaire où ils sont principalement employés comme édulcorants ou encore comme prébiotiques.¹⁵³

L'industrie alimentaire s'intéresse également aux propriétés des xylanes de faible degré de polymérisation (< 20 unités), les xylo-oligosaccharides (XOS). Ces composés sont connus pour leurs propriétés prébiotiques.¹⁵⁴ Une fois dans le colon, les XOS seront métabolisés par les micro-organismes du microbiote intestinal. Selon Hughes *et al.*,¹⁵⁵ les oligomères de DP inférieur à 4 unités sont les plus efficaces pour favoriser la prolifération de la bifido-bactérie. Ces micro-organismes exercent leur activité bénéfique en inhibant la prolifération dans l'intestin de bactéries pathogènes et en limitant les phénomènes de putréfaction. Les XOS permettraient également d'améliorer l'absorption du calcium et le métabolisme des lipides. Ils auraient un effet préventif sur la survenue de maladies cardio-vasculaires, réduirait les risques de développement du cancer du côlon et préviendrait l'apparition des caries dentaires.¹⁵⁶

¹⁵² Popa, V. I., In *Polysaccharides in Medicinal Applications*, **1996**, 107-124

¹⁵³ Saad, N.; Delattre, C.; Urdaci, M.; Schmitter, Bressolier, P., *LWT-Food Science and Technology*, **2013**, *50*, 1-16

¹⁵⁴ Vázquez, M. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, *11*, 387-393.

¹⁵⁵ Hughes, S.A.; Shewry, P.R.; Li, L.; Gibson, G.R.; Sanz, M.L.; Rastall, R.A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, *55*, 4589-4595

¹⁵⁶ Grootaert, C.; Delcour, J.A.; Courtin, C.M.; Broekaert, W.F.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T., *Food Science & Technology*, **2007**, *18*, 64-71

La valorisation chimique et biologique des xylanes de bois a fait l'objet de quelques études récentes en plusieurs directions.

IV.1. Bioplastiques (matériaux filmogènes)

La pénurie des ressources pétrolières, base de l'industrie plastique, a poussé les industriels à se pencher sur de nouvelles stratégies de production. Il a été démontré que les xylanes pouvaient, après modification chimique, servir de substrat de base à la synthèse de bioplastiques.

Diverses sources de xylanes ont été utilisés, c'est par exemple le cas des xylanes extraits des bois de tremble,¹⁵⁷ d'épicéa,¹⁵⁸ ou de bouleau,¹⁵⁹ ou encore de l'orge¹⁶⁰ et du son de seigle.¹⁶¹

Des additifs tels que le sorbitol ou le glycérol sont parfois employés.¹⁶² Ils permettent d'abaisser la température de transition vitreuse des polysaccharides. Ceci permet de produire des matériaux flexibles, utilisables sous forme de film à température ambiante.

Au cours des dernières années, le LCSN s'est particulièrement intéressé à ce type de valorisation. Les voies de synthèse, tous comme les propriétés physiques de ces matériaux ont été étudiées notamment à partir du MGX de châtaignier¹⁶³ et des hétéroxylanes de son de céréales.¹⁶⁴ Les matériaux obtenus présentent des propriétés barrières qui peuvent être modulées, ce qui rend leur utilisation extrêmement intéressante pour l'industrie agro-alimentaire. Ces travaux du laboratoire ont encouragé la création de l'entreprise Ecomeris, start-up adossée au laboratoire travaillant sur la valorisation des bioplastiques.

¹⁵⁷ Gröndahl, M. ; Eriksson, L. ; Gatenholm, P., *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 1528-1535.

¹⁵⁸ Escalante, A.; Gonçalves, A.; Bodin, A.; Stepan, A.; Sandström, C.; Toriz, G.; Gatenholm, P., *Carbohydrate Polymers*, **2012**, 87, 2381-2387.

¹⁵⁹ Ibn Yaich, A. ; Edlund, U.; Albertsson, A.C., *Biomacromolecules*, **2012**, 13, 466-473.

¹⁶⁰ Höije, A.; Stermalm, E.; Heikkinen, S.; Tenkanen, M.; Gatenholm, P., *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 2042-2047

¹⁶¹ Sarossy, Z. *Production and utilization of hemicelluloses from renewable resources for sustainable advanced products*. Thèse de doctorat. Roskilde: Université du Danemark (Danemark), **2011**.

¹⁶² Mikkonen, K.S.; Tenkanen, M., *Food Science and Technology*, **2012**, 28, 90-102

¹⁶³ Moine, C. ; Gloaguen, V. ; Gloaguen, J.M. ; Granet, R. ; Krausz, P., *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **2004**, 39, 627-240

¹⁶⁴ Fredon, E.; Granet, R.; Zerrouki, R.; Krausz, P.; Saulnier, L.; Thibault, J.F.; Rosier, J.; Petit, C., *Carbohydrate Polymers*, **2002**, 49, 1-12.

IV.2. Applications au domaine pharmaceutique

Au-delà des secteurs des matériaux et de l'agroalimentaire, des études plus fondamentales reportent des activités biologiques susceptibles d'intéresser l'industrie pharmaceutique. C'est notamment le cas des propriétés anti-tumorales et anti-oxydantes.

IV.2.1. Activité anti-tumorale

Le potentiel des xyloxyanes en termes d'activité anti-tumorale, actuellement décrit dans la littérature, porte essentiellement sur des résultats d'études *in vitro*.

Une des premières études rapporte l'activité anti-tumorale du xyloxyane 4-*O*-méthylglucuronoxyloxyane de hêtre japonais 148. Hashi *et al.*¹⁶⁵ ont démontré que ce composé était capable d'inhiber la prolifération de cellules de type sarcome-180 (cellules malignes chez la souris). L'activité du MGX, extraite du châtaignier, a été récemment confirmée puis précisée par le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles. Le MGX inhibe la prolifération et la migration de cellules cancéreuse de la lignée A431 (cancer de la peau).²³ L'inhibition de la prolifération cellulaire passe par l'induction de l'apoptose chez les cellules A431. L'inhibition de la migration de ces cellules a été attribuée à l'inhibition de la sécrétion de métallo-protéases (MMP2 et MMP9) par le 4-*O*-méthylglucuronoxyloxyane.

L'activité anti-proliférative du MGX a pu être confirmée sur différents types de lignées cellulaires, les DU145 (lignée cancéreuse de la prostate), HT1080 (fibrosarcome), MDA-MB 231 (cancer du sein), HuH-7 (cancer du foie).

Une étude récente porte sur l'activité anti-tumorale d'un arabinoxyloxyane modifié extrait de son de riz, le MGN-3. Cet arabinoxyloxyane a démontré son efficacité sur différentes lignées cellulaires issues de cancer du sein.¹⁶⁶ Il a également démontré une capacité à stimuler différents types de cellules du système immunitaire.¹⁶⁷

Plus généralement, les xylo-oligosaccharides ont démontré qu'ils pouvaient être de bons inhibiteurs dans le cadre de la lutte contre le cancer du sein. Des auteurs ont montré que des XOS extraits d'une algue verte ayant un DP moyen de 5 avaient une bonne activité anti-proliférative sur la lignée MCF-7.¹⁶⁸

L'ensemble de ces études n'a toutefois pu dépasser le stade de l'évaluation *in vitro*. Aucune étude n'est, à notre connaissance, disponible *in vivo*.

¹⁶⁵ Hashi, M.; Takeshita, T.; Ibaraki, F. *Agricultural. Bioogical Chemistry* **1979**, *43*, 951-959.

¹⁶⁶ Ghoneum, M.; Badr El-Din, N.K.; Ali, D.A.; Alaa El-Dein, M., *Anticancer Research*, **2014**, *34*, 81-88.

¹⁶⁷ Ghoneum, M., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1998**, *243*, 25-29.

¹⁶⁸ Maeda, R.; Ida, T.; Ihara, H. ; Sakamoto, T., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **2012**, *76*, 1032-103.

IV.2.2. Activité anti-oxydante

La recherche du potentiel anti-oxydant des hémicelluloses, et plus particulièrement des xylanes est très récente. A notre connaissance, aucune étude n'a démontré l'activité d'un xylane ou d'un xylo-oligosaccharide natif, leurs structures ne permettant pas d'envisager ce type d'activité. La recherche porte essentiellement sur l'étude de xylanes modifiés.

L'activité anti-oxydante est généralement attribuée à la présence sur une molécule de motifs phénoliques. Comme nous l'avons vu précédemment, la lignine est composée de molécules contenant de nombreux cycles phénoliques. Nous verrons dans la suite de ce travail que la modulation des procédures d'extraction permet d'obtenir des xylanes porteurs de ce type de motifs. La littérature nous montre des exemples de xylanes substitués par des dérivés phénoliques présentant une bonne activité anti-oxydante.^{110, 169, 170} Le développement de ce type de méthode nous amènera à déterminer l'activité anti-oxydante et la structure de ces composés originaux.

¹⁶⁹ Hromádková, Z.; Paulsen, B.S.; Polovka, M. ; Košťálová, Z.; Ebringerová, A., *Carbohydrate Polymers*, **2013**, 93, 22-30.

¹⁷⁰ Veenashri, B.R.; Muralikrishna, G., *Food Chemistry*, **2011**, 128, 1475-1481.

Partie II : Développement de
méthodes de délignification
par catalyse oxydative dans
le but d'extraire les
hémicelluloses du bois de
châtaignier

Les travaux menés par Charlotte Moine¹⁰² puis par Aline Barbat¹⁷¹ au laboratoire de chimie des substances naturelles ont ouvert la voie à de nouvelles stratégies de valorisation des hémicelluloses issues du bois, du châtaignier en particulier, en étudiant notamment leurs propriétés, à l'état natif ou après modification chimique pour divers domaines d'application comme par exemple la conception d'éco-matériaux ou encore comme molécules bioactives. Ces travaux ont par ailleurs démontré qu'il est absolument nécessaire de maîtriser les procédés de fractionnement du bois en ses constituants moléculaires élémentaires afin d'optimiser leur potentiel de valorisation. Ainsi, ces travaux antérieurs ont largement contribué à l'amélioration du protocole de fractionnement général, présenté figure 51, et d'usage classique en laboratoire pour l'étude de la composition macromoléculaires des parois secondaires.

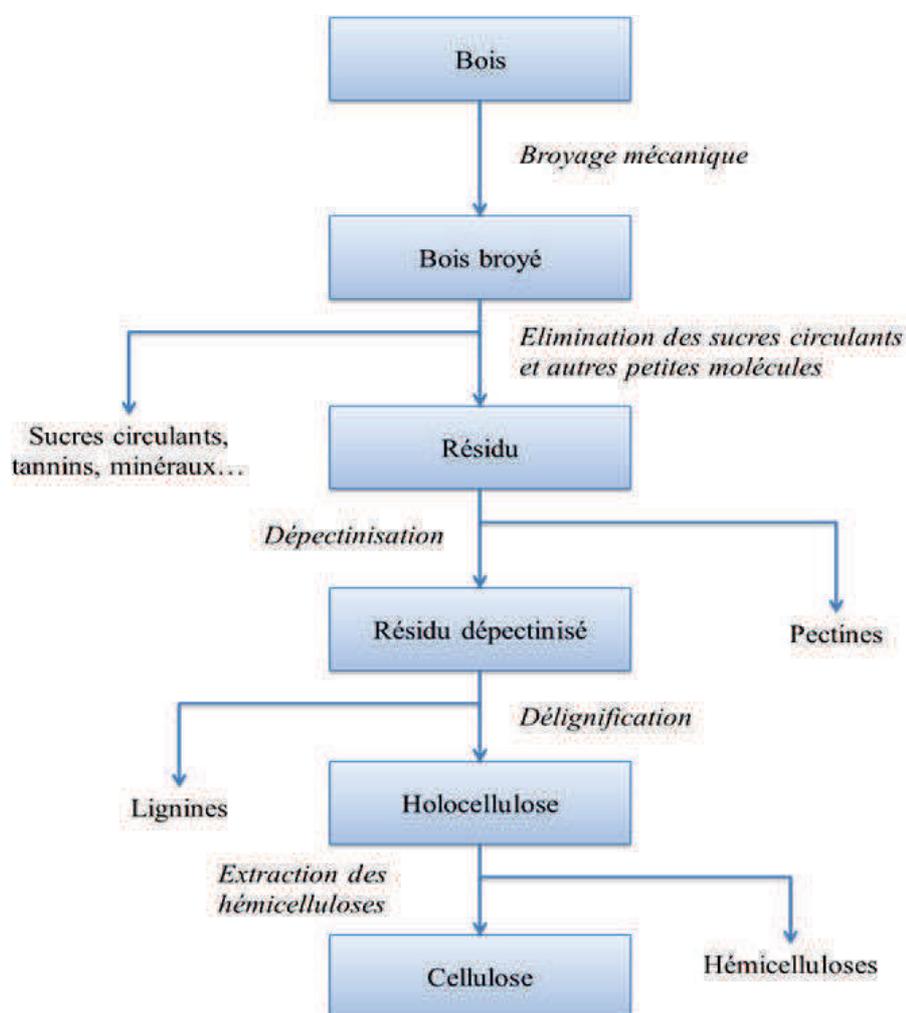


Figure 51: Schéma général de fractionnement du bois

171 BARBAT Aline. *Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de châtaignier : développement de nouveaux procédés de délignification*. Thèse de doctorat: Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles. Limoges: Université de Limoges, 2009.

Le bois, qui peut être sous forme de sciures, d'écorce ou même de bois brut, est tout d'abord broyé à une granulométrie déterminée. La seconde et la troisième étape consiste en une élimination des circulants et des tannins puis d'une dépectinisation. L'opération suivante est une étape-clé dans le procédé de fractionnement du matériel végétal: la délignification. Elle permet d'accéder à l'holocellulose qui est un mélange d'hémicelluloses et de cellulose. Enfin, une série d'extractions séquentielles permet de séparer les hémicelluloses de la cellulose.

En nous basant sur les travaux antérieurs d'Aline Barbat,¹⁷¹ s'intéressant plus particulièrement à l'optimisation de l'étape de délignification, nous présentons dans la première partie l'étude d'une méthodologie originale de délignification s'appuyant sur l'utilisation de catalyseurs de réaction d'oxydation de type macrocycles tétrapyrroliques. Par la suite, nous détaillons l'extraction et la caractérisation structurale d'hémicellulose selon deux protocoles, l'un qualifié de procédé référence, utilisant des solutions alcalines et le second consistant en un simple traitement à l'eau. Enfin, sur la base des structures obtenues, nous présentons une voie possible de valorisation pour ces composés.

Chapitre 1 : Synthèse, caractérisation et utilisation en délignification des macrocycles tétrapyrroliques

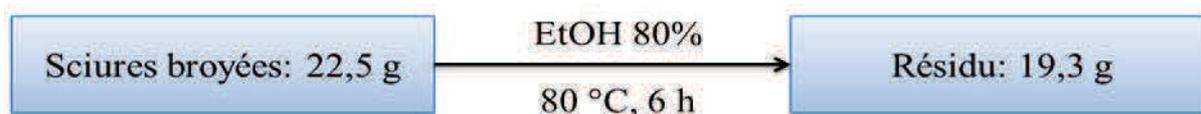
I. Préparation du matériel végétal

I.1. Broyage

La préparation des sciures de bois de châtaignier en vue des extractions successives débute par une étape de broyage du matériel végétal brut. En effet, une étude préliminaire menée par Barbat *et al.* au laboratoire a montré que la granulométrie des sciures de départ influence l'efficacité de la délignification ainsi que le rendement d'extraction des hémicelluloses ; l'extractibilité des hémicelluloses augmentant lorsque la granulométrie diminue. En nous basant sur ces résultats, nous avons choisi de broyer les sciures à une granulométrie de 200 μ m, caractéristique permettant un fractionnement optimal de la sciure.

I.2. Elimination des petits composés

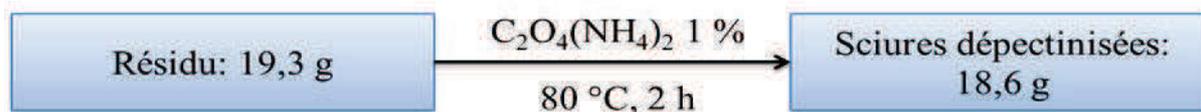
La première phase du fractionnement consiste en une extraction par une solution hydro-alcoolique (éthanol/eau 8/2) de petites molécules qualifiées d'extractibles. Sont ainsi éliminés les sucres simples dits circulants, les tannins ou encore les minéraux.



Ce traitement, effectué en batch à reflux du solvant pendant 6 heures permet d'obtenir, après filtration et séchage dans une étuve ventilée à 40 °C, un résidu avec un rendement massique de 85,7 %.

I.3. Dépectinisation

Les pectines sont ensuite éliminées à partir du résidu précédent par extraction à l'aide d'une solution d'oxalate d'ammonium à 1%. Dans ce procédé, l'oxalate d'ammonium joue le rôle de chélateur de calcium, permettant ainsi la solubilisation des pectines en phase aqueuse.



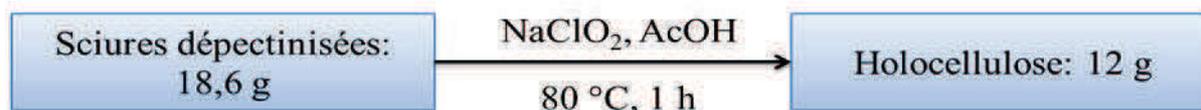
Après refroidissement, les sciures sont filtrées puis séchées à l'étuve ventilée à 40 °C. Le résidu dépectinisé est obtenu avec un rendement massique de 82,7 % par rapport aux sciures brutes.

Ces sciures dépectinisées constituent le matériel de départ de l'étape de délignification. Nous allons maintenant développer en détail cette étape, indispensable à une extraction optimale des hémicelluloses et donc très importante, rappelons-le, dans le schéma de fractionnement d'une matière végétale.

II. Développement de procédés de délignification

II.1. Délignification par les chlorites acides

Parmi les diverses techniques de délignification classiquement utilisées en laboratoire, décrites dans le chapitre précédent, la délignification par les chlorites acides est le procédé probablement le plus largement utilisé. Nous avons donc dans un premier temps appliqué cette méthode classique, choisie pour notre étude comme procédure de référence. Cette méthode utilise une solution tamponnée de chlorite de sodium (0,6 g pour 1g de matière sèche) dans l'acide acétique (0,2 mL pour 1 g de matière sèche) à 80 °C pendant 1 h. Elle mène à l'holocellulose, mélange d'hémicelluloses et de cellulose.



Conduit sur 18,6g de sciures dépectinisées, ce traitement de délignification permet d'obtenir après filtration et séchage, 12 g d'holocellulose, soit un rendement massique de 53,3 % par rapport aux sciures brutes.

Ces résultats nous permettent de déterminer la distribution de chaque composé dans la sciure de châtaignier. (Figure 52)

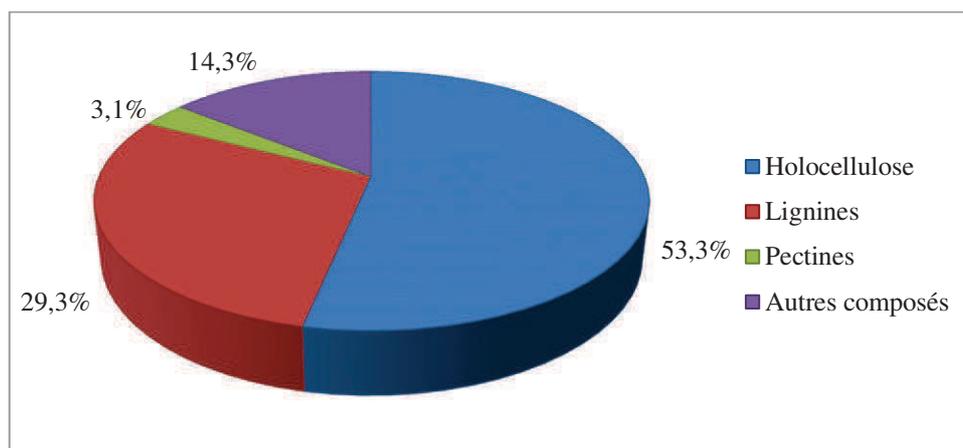


Figure 52: Répartition des composés dans les sciures de bois de châtaignier

Si l'on prend en compte uniquement les sciures dépectinisées, celles-ci sont composées de 35,5 % de lignines et donc de 64,5 % d'holocellulose.

Afin de répondre aux problématiques environnementales actuelles des industries de fabrication des pâtes à papier, nous avons étudié des procédés de délignification respectant des critères de chimie verte et plus particulièrement utilisant des catalyseurs. Plus précisément, nous avons préparé des catalyseurs de type macrocycle tétrapyrrolique et nous avons étudié leur capacité à délignifier le bois par des réactions d'oxydation. Nous allons maintenant présenter en détail les résultats obtenus.

II.2. Délignification par la phtalocyanine : synthèse et applications

Les travaux d'Aline Barbat ont démontré qu'il est possible d'altérer la structure chimique des constituants macromoléculaires du bois, en particulier de la lignine par action de la tétrasulfophtalocyanine de Fer (FePcS) en milieu oxydant. Dans une première partie de notre étude, nous avons cherché à optimiser cette stratégie, notamment en combinant l'action chimique du catalyseur tétrapyrrolique à des prétraitements physiques de la matière végétale.

II.2.1. Synthèse et caractérisation de la tétrasulfophtalocyanine de fer

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe de nombreuses méthodes de préparation des phtalocyanines. Nous avons choisi d'adapter la méthode de Weber et Bush,¹⁷² qui est une méthode utilisant des acides phtaliques. Dans notre cas, il s'agit de l'acide sulfophtalique. Ce dernier, préalablement converti en sel de sodium, permet la formation du macrocycle tétrapyrrolique par condensation avec de l'urée autour d'un atome de fer central.

a. Synthèse du 3,4-dicarboxybenzensulfonate de sodium

La réaction de formation du 3,4-dicarboxybenzensulfonate de sodium est réalisée suivant le schéma suivant :

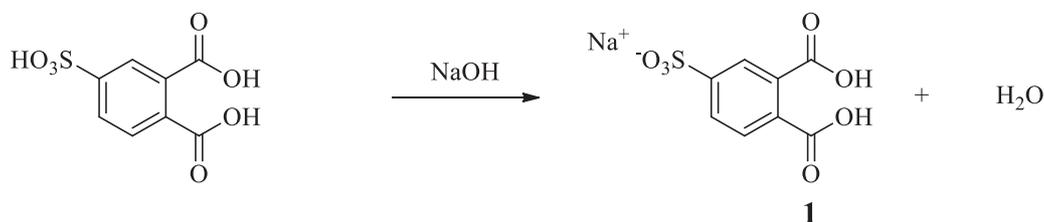


Figure 53: formation du sel d'acide sulfophtalique

Ce sel monosodique est obtenu par un traitement à la soude et consiste en une réaction acido-basique simple. La fonction sulfone réagit cinétiquement en premier. La réaction est arrêtée à pH=1,3, à la première équivalence. L'eau est alors évaporée et la poudre est reprise dans l'éthanol. Enfin, le sel est filtré et séché sur fritté. A partir de 77,6 mL (en solution à 50% soit 50 g de produit pur) d'acide sulfophtalique, on récupère une fraction pure d'une masse de 42,4 g, soit un rendement de 78 %.

b. Synthèse de la tétrasulfophtalocyanine de fer

La tétrasulfophtalocyanine de fer est obtenue par réaction du sel d'acide sulfophtalique précédemment décrit avec l'urée, en présence de molybdate d'ammonium, de sulfate de fer et de chlorure d'ammonium (Figure 54).

¹⁷² Weber, J.H.; Bush, D.H.; *Inorganic Chemistry* **1965**, 4, 469-471.

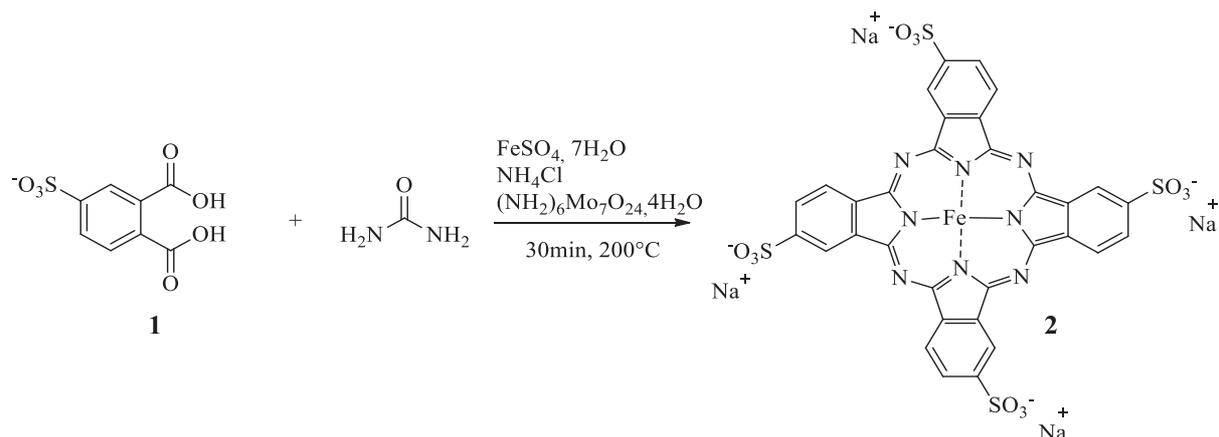


Figure 54: synthèse de la tétrasulfophtalocyanine de fer

Plus précisément, cette synthèse conduite en milieu hétérogène, à 200°C, consiste à faire réagir 1 équivalent de 3,4-dicarboxybenzenesulfonate de sodium avec 6 équivalents d'urée et 0,2 équivalent de sulfate de fer en présence de quantités catalytiques de molybdate d'ammonium et de chlorure d'ammonium.

La purification du produit brut obtenu est adaptée de la méthode proposée par Weber et Bush.¹⁷² Tout d'abord la phtalocyanine est traitée en milieu acide avec de l'acide chlorhydrique saturé en chlorure de sodium, afin d'éliminer les résidus de fer. Le produit est ensuite neutralisé par l'ajout d'une solution de soude afin de dissoudre la phtalocyanine et d'éliminer par filtration les impuretés résiduelles. Du chlorure de sodium est alors ajouté au filtrat ainsi obtenu jusqu'à saturation afin de provoquer la précipitation de la phtalocyanine. Cette dernière est enfin lavée plusieurs fois à l'éthanol.

La phtalocyanine (FePcS), est obtenue sous la forme d'une poudre vert-bleue, avec un rendement brut de 90,8% (14,1 g). Ce rendement, élevé, indique que le produit contient du chlorure de sodium résiduel. Bien que particulièrement difficiles à éliminer compte tenu de la solubilité de la phtalocyanine dans l'eau, ces sels ne sont pas gênants pour la suite de l'étude. La quantification de la phtalocyanine réellement présente dans le mélange brut est possible par spectroscopie d'absorption UV-Visible, présentée dans la suite.

c. Caractérisations

La caractérisation de la phtalocyanine synthétisée a été effectuée par spectroscopie d'absorption UV-Visible, ainsi que par spectrométrie de masse MALDI.

➤ UV-Visible

L'analyse par spectroscopie d'absorption UV-Visible a été réalisée dans l'eau à pH 7.

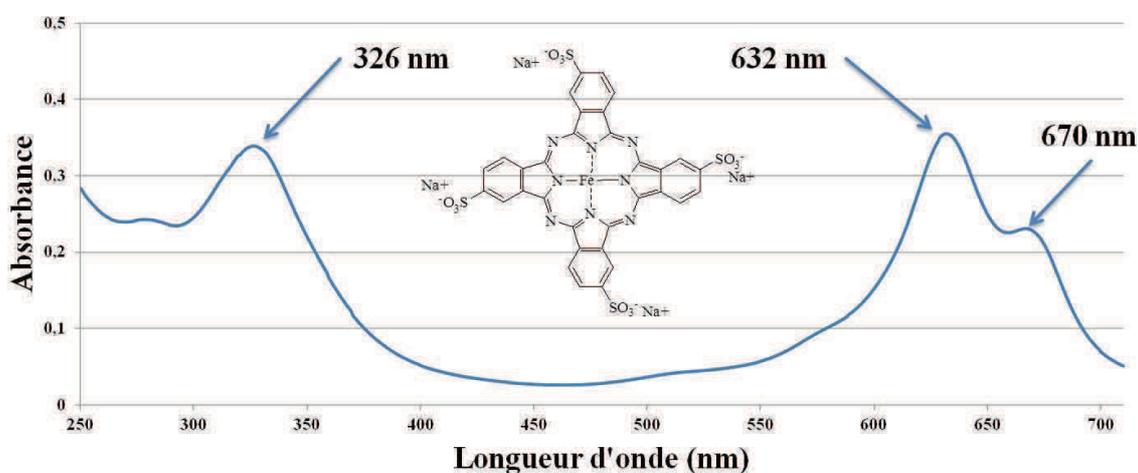


Figure 55: Spectre UV-Visible de la tétrasulfophtalocyanine de fer dans l'eau

Le spectre mesuré pour la phtalocyanine laisse apparaître trois bandes caractéristiques à 326, 632 et 670 nm.

En solution dans l'eau, les phtalocyanines métallées, en particulier au fer, peuvent former des dimères par l'établissement de pont μ -oxo.

Les deux bandes observées respectivement à 632 et 670 nm correspondent à la forme monomère et à la forme dimère μ -oxo.¹⁷³ Les valeurs des coefficients d'extinction molaire, disponibles dans la littérature, sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 4: Coefficients d'extinction molaire de la tétrasulfophtalocyanine de fer selon Hadash *et al.*⁵⁶

Longueur d'onde (nm)	326	632
Coefficient d'extinction molaire (mol.L ⁻¹ .cm ⁻¹)	55700	65200

Compte tenu de ces données, il est possible de déterminer la concentration réelle de phtalocyanine dans l'échantillon testé et donc d'accéder à la masse de composé synthétisé. . Ainsi, le rendement de la réaction, calculé en exploitant la relation de Beer-Lambert est de 35 % ce qui correspond à une masse de phtalocyanine récupérée de 5,45 g.

¹⁷³ Blagrove, R.J.; Gruen, L.C., *Australian Journal of Chemistry*, **1972**, 25, 2553-2558

➤ Spectrométrie de masse MALDI

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI a été effectuée en mode négatif et est présentée Figure 56:

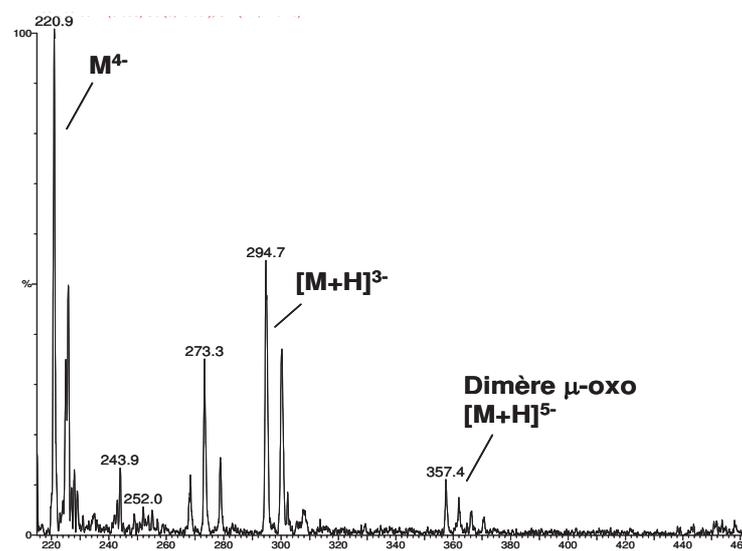


Figure 56: spectre de masse MALDI de la tétrasulfophtalocyanine de fer

Le spectre montre un ensemble de pics de masses attribués à la structure du produit attendu. Le pic majoritaire à m/z 220,9 correspond à la masse de la phtalocyanine quatre fois chargée négativement. Le pic à m/z 294,7 correspond à la phtalocyanine trois fois chargée négativement. Enfin, un pic caractéristique du dimère μ -oxo est également observé à m/z 357,4, ce qui est en accord avec l'analyse par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

Par conséquent, l'ensemble de ces analyses confirme sans ambiguïté la structure de la tétrasulfophtalocyanine de fer.

II.2.2. Délicignification

a. Protocole initial

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les travaux d'Aline Barbat menés au laboratoire ont permis d'établir un protocole de délicignification utilisant la tétrasulfophtalocyanine de fer comme catalyseur. Dans cette étude, nous nous proposons dans un premier temps, de l'optimiser. Le protocole initialement développé est le suivant (Figure 57):

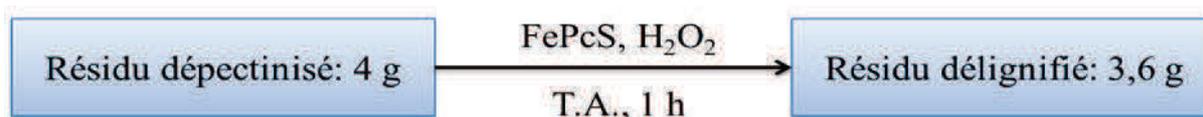


Figure 57: Protocole standard de délignification par la tétrasulfophtalocyanine de fer (FePcS)

La délignification s'effectue sur 4 g de sciures dépectinisées dispersées dans 200 mL d'eau distillée en présence d'une quantité catalytique de FePcS (4,7 mg par gramme de sciures dépectinisées) à température ambiante pendant 100 heures. Chaque jour est ajouté 1 mL de peroxyde d'hydrogène (35 % en masse) par gramme de sciures dépectinisées. La délignification par catalyse oxydative mène à un résidu délignifié d'une masse de 3,6 g, soit une perte de masse de 10 %.

b. Optimisation

Afin d'améliorer l'efficacité de la délignification, nous avons eu recours à différents essais d'optimisation consistant à faire varier les conditions de réaction mais également à appliquer aux sciures des prétraitements.

Nous avons tout d'abord fait varier la quantité de phtalocyanines (FePcS), la quantité de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore le temps de réaction afin d'établir l'influence de ces variations de conditions de réaction sur la perte de masse des sciures. En outre, parce que la FePcS se dégrade en milieu oxydant, nous avons choisi de tester l'influence d'ajout répétés, en quantité variable, de catalyseur tout au long de la réaction. Chaque essai a été réalisé à température ambiante, sur 1g de sciures dépectinisées en suspension dans 50mL d'eau distillée. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 5.

Tableau 5: essais de délignification par FePcS à température ambiante sur 1 gramme de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée

Essais	Quantité de FePcS/jour (mg)	Quantité de H_2O_2 /jour (mL)	Temps de réaction (h)	Perte de masse (%)
E1	4,7	(3 x) 4	100	10
E2	4,7	1	100	5
E3	4,7	4	100	6
E4	(3 x) 4,7	1	72	7

E5	(3 x) 4,7	4	72	8
----	-----------	---	----	---

Les résultats de ces quelques essais de délignification montrent que la perte de masse est au maximum de 10 %, ce qui correspond à la perte de masse observée pour le protocole initial. Une augmentation de la quantité de FePcS, ajoutée par portions, ou encore une augmentation de la quantité de H₂O₂ ne semblent pas avoir d'influence significative sur l'efficacité du traitement.

Si les études préliminaires menées au laboratoire, comme bon nombre d'études décrites dans la littérature démontrent que des macrocycles tétrapyrroliques en milieu oxydant peuvent dégrader les lignines, ces résultats suggèrent que d'autres paramètres doivent impacter le déroulement de la réaction, comme l'accessibilité des sites réactifs au catalyseur (un point essentiel en catalyse hétérogène) ou encore la nature du solvant utilisé pouvant également conditionner l'extractibilité des produits de dégradation des lignines.

➤ **Influence du solvant**

Nous avons donc également voulu déterminer si le solvant utilisé lors de la délignification avait une influence sur le rendement de la réaction. Pour cela, des essais avec de l'éthanol comme co-solvant ont été menés afin d'étudier ce paramètre. Issu de l'industrie papetière, le procédé *Organosolv* consiste à solubiliser et extraire la lignine (ainsi qu'une partie des hémicelluloses) dans un solvant organique, en général l'éthanol ou le méthanol. Si ce procédé nécessite classiquement des conditions drastiques (fortes températures, milieu acide) rendant son exploitation industrielle délicate, il nous a semblé néanmoins pertinent d'exploiter les propriétés de solubilité des lignines, ou de leurs fragments issus de dégradation, en milieu hydro-alcoolique. La phtalocyanine utilisée dans cette étude n'étant pas soluble dans l'éthanol pur, nous avons testé des mélanges eau/éthanol avec des ratios 50/50 et 20/80. Le Tableau 6 présente les résultats obtenus à partir d'échantillons de 4 grammes de sciures dépectinisées.

Tableau 6: Essais de délignification par FePcS: étude de l'influence du solvant

Essais (4 g)	Ratio H ₂ O/EtOH	Quantité de FePcS (mg)	Volume de H ₂ O ₂ / jour (mL)	Temps de réaction (h)	Perte de masse (%)
S1	50/50	18,8	4	100	9 %
S2	50/50	18,8	4	72	10 %
S3	50/50	9,9	4	100	9 %
S4	50/50	9,9	4	72	10 %
S5	20/80	18,8	4	100	10 %
S6	20/80	18,8	4	72	9 %
S7	20/80	9,9	4	100	10 %
S8	20/80	9,9	4	72	9 %

Les résultats obtenus suggèrent que l'ajout d'éthanol au milieu réactionnel ne semble pas influencer la délignification, les rendements massiques restant sensiblement constants. Par ailleurs, aucun changement d'aspect des sciures n'est observé, en particulier le traitement dans ces conditions ne conduit pas à un blanchiment significatif du matériel végétal de départ, ce qui indique que cette modification de protocole n'apporte pas le gain d'efficacité attendu. Ce résultat décevant pourrait en partie être expliqué par une trop faible accessibilité des réactifs à leur site de réaction, indépendamment du solvant choisi pour augmenter la solubilité des dérivés phénoliques générés. En catalyse hétérogène, comme nous l'avons mentionné précédemment, des prétraitements ou des activations physiques peuvent s'avérer particulièrement utile pour contourner ce problème. Nous avons donc étudié l'influence de différents prétraitements appliqués aux sciures dépectinisées sur l'efficacité de la réaction de délignification catalysée par FePcS.

Dans la suite, nous présentons les résultats consécutifs à un prétraitement par ultrasons, par micro-onde et enfin par imprégnation sous vide des sciures par le catalyseur.

➤ Ultra-sons

Il a été montré que l'application de prétraitement par ultrason, (généralement de fréquence de 20kHz) contribue à améliorer la conversion chimique de matière ligno-cellulosique.³⁶ L'émission d'ondes ultrasonores, lorsque la puissance est suffisante, est à l'origine d'effets induits physiques ou chimiques. La propagation des ondes s'accompagne du phénomène de cavitation qui est la cause principale des effets physiques et chimiques résultants de l'irradiation ultrasonore (pression de radiation, déformation et/ou modification de surface, échauffement ...). Nous avons donc étudié l'influence d'un tel prétraitement sur la délignification avec FePcS. Le

Tableau 7 présente les résultats obtenus pour différentes conditions de prétraitements appliqués sur 1g de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée. Dans tous les cas, l'étape ultérieure de délignification a été réalisée selon le même protocole, utilisant les conditions classiques décrites précédemment (protocole initial).

Tableau 7: Essais de prétraitements aux ultra-sons: mesure de la perte de masse après délignification à partir d'1 g de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée

Essais (1 g)	Puissance de la sonde à ultra-sons (W)	Temps d'exposition (min)	Perte de masse (%)
US1	100	10	22
US2	100	20	22
US3	150	10	9
US4	150	20	19
US5	200	10	27

L'exposition des sciures à une irradiation ultrasons d'une puissance de 100 W, pendant 10 minutes a une incidence marquée sur l'efficacité de la délignification ultérieure, permettant d'atteindre une perte de masse deux fois plus grande que celle observée sans prétraitement. Une augmentation du temps d'irradiation, à cette puissance, ne semble pas induire d'effet supplémentaire. Une puissance de 200W permet en revanche d'atteindre une perte de masse proche de 30% c'est-à-dire ce rapprochant du pourcentage massique de lignine présentes dans les sciures de bois, associée à un léger blanchiment par rapport à la sciure de départ. Ces résultats, encourageants, semblent confirmer que l'efficacité du traitement par la

phtalocyanine en milieu oxydant et dépendant de la structure micro/macrosopique et de l'état de surface (paramètres directement affectés par le prétraitement) des particules du matériel végétale sur lequel il est appliqué.

➤ Micro-ondes

A l'instar de l'activation ultrason que nous venons de décrire, les irradiations micro-ondes ont été largement étudiées comme mode d'activation ou de prétraitement en synthèse organique mais également pour l'optimisation d'extractions de molécules naturelles. L'activation micro-onde induit, outre des phénomènes d'échauffement locaux des modifications d'état de surface et peut provoquer la déstructuration physique de matrice macromolécules, favorisant ainsi la réactivité chimique ou l'extractibilité de molécules. Pour ces raisons, nous avons donc choisi de tester des conditions de prétraitements micro-ondes afin d'étudier leur influence sur l'étape de délignification. Comme pour le prétraitement aux ultra-sons, la délignification a été effectuée selon les conditions standards (protocole initial) et la perte de masse a été mesurée. Ces essais ont été effectués sur 1 gramme de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée.

Tableau 8: Essais de prétraitements aux micro-ondes: influence sur la perte de masse après délignification à partir d'1 g de sciures dépectinisées dans 50 mL d'eau distillée

Essais (1 g)	Puissance d'irradiation (W)	Temps d'irradiation (min)	Perte de masse (%)
MO1	100	10	22
MO2	100	20	18
MO3	150	10	21
MO4	150	20	19
MO5	200	10	22

L'ensemble des essais mène à une perte de masse d'environ 20 %, quelle que soit la puissance ou le temps d'irradiation microonde imposé aux sciures dépectinisées. La perte de masse est donc doublée par rapport au protocole initial, sans prétraitement. Là encore, le prétraitement semble soit favoriser l'accessibilité des sites réactionnels aux réactifs soit augmenter l'extractibilité des produits de réactions.

➤ *Imprégnation sous vide*

Afin de tester l'influence d'une meilleure dispersion du catalyseur dans le substrat végétal, nous avons mis en place un protocole de prétraitement des sciures par imprégnation sous vide de ces dernières par une solution de phtalocyanine. Pour cela, nous avons ajouté 18,8 mg de phtalocyanines préalablement solubilisée dans un minimum d'eau distillée à 4 grammes de sciures dépectinisées. L'ensemble est alors placé sous vide poussé, imposé par une pompe à palette pendant 2 heures. Après retour à la pression atmosphérique, les sciures sont mises en suspension dans 200 mL d'eau distillée et traitées par le protocole utilisant les conditions standards de délignification (protocole initial). Pour l'essai SV1, un ajout de phtalocyanine, en quantité égale, a été effectué chaque jour, en appliquant le protocole d'imprégnation sous vide. On obtient une perte de masse de 5 %. Pour l'essai SV2, pour lequel la phtalocyanine a été introduite en une seule fois, on observe que 13 % de la masse est perdue.

Tableau 9: Détermination de la perte en masse des échantillons ayant subi un prétraitement sous vide. SV1 : imprégnation chaque jour de la phtalocyanine. SV2 : imprégnation unique au début du traitement.

Echantillon	Perte de masse (%)
SV1	5
SV2	13

L'étude simple de la perte de masse après le prétraitement sous vide ne permet pas de mettre en évidence une efficacité supérieure au protocole initial.

En conclusion, l'analyse de la perte de masse consécutive au traitement de délignification, obtenue après différents prétraitements montre que ces derniers conduisent dans la plupart des cas à une plus grande déstructuration du matériel végétal. Naturellement, cette donnée n'est en soi pas suffisante pour conclure quant à l'efficacité de la délignification, les pertes de masse ne pouvant pas forcément être attribuées, pour l'ensemble des essais effectués, à une dépolymérisation et/ou extraction des lignines ou fragments de polyphénols. Pour nous aider dans l'interprétation plus fine des observations présentées précédemment, une détermination du nombre kappa (ou indice Kappa) a été réalisée pour tous les résidus de réaction.

c. Caractérisation de la délignification par détermination du nombre kappa

➤ Protocole

Répondant à un protocole normé (norme TAPPI 236 cm-85) , la détermination du nombre Kappa, ou indice Kappa, largement utilisé dans les industries papetières permet d'estimer la quantité de lignines résiduelle dans une pâte à papier mais également, plus généralement, la lignine présente dans des résidus lignocellulosique. Son principe et sa mise en œuvre sont assez simples et repose sur l'oxydation des lignines par du permanganate de potassium en milieu acide puis dosage de l'oxydant résiduel en fin de réaction. Plus précisément, le permanganate n'ayant pas participé à l'oxydation des polyphénols est mis à réagir avec du diiode puis on réalise un dosage en retour par le thiosulfate de sodium selon les équations suivantes :



De l'empois d'amidon est utilisé comme test permettant de s'assurer de la totale disparition du diiode en fin de processus.

➤ Détermination du nombre Kappa

Le nombre Kappa a donc été déterminé pour l'ensemble des essais de prétraitement, dans le but d'interpréter plus en détails les résultats encourageants obtenus. Le Tableau 10 rassemble les nombres Kappa mesurés. Pour des raisons de clarté, l'indice Kappa de référence, c'est-à-dire celui des sciures dépectinisées non délignifiées a été ramené à 100. Par conséquent, des indices kappa plus faibles, correspondant à des taux de lignines plus faibles, renvoient à des réactions de délignification plus efficace. L'indice rapporté est la moyenne de trois mesures indépendantes.

Tableau 10: Détermination de l'indice Kappa des résidus délignifiés de différents essais

Echantillon	Puissance de l'appareil	Temps de prétraitement	Perte de masse (%)	Indice Kappa
Sciures dépectinisées	-	-	-	100
Holocellulose	-	-	35,5	36
Protocole initial	-	-	10	93
US1	100	10	22	81
US2	100	20	22	83
US3	150	10	9	87
US4	150	20	19	91
US5	200	10	27	69
MO1	100	10	22	81
MO2	100	20	18	77
MO3	150	10	21	69
MO4	150	20	19	83
MO5	200	10	22	66

L'indice Kappa de l'holocellulose obtenue par délignification de sciure de châtaignier aux chlorites de sodium a été déterminé et peut être considéré comme une valeur référence associée à un processus de délignification quasi-total. A la lecture du tableau, on constate tout d'abord que quelque soient les essais le nombre Kappa est inférieur à celui mesuré pour les sciures dépectinisées non délignifiées ce qui indique dans tous les cas une perte, plus ou moins conséquente, de la fraction de lignine induite par le traitement. Il est également à noter que le traitement des sciures par le protocole dit initial, c'est-à-dire sans prétraitement ne provoque qu'une faible diminution du taux de lignines, l'indice Kappa ne diminuant que de 7 unités de mesure.

En revanche, on constate globalement une diminution significative des indices kappa lorsque la délignification par le système FePcS/H₂O₂ est précédée d'un prétraitement par activation ultrason ou micro-onde. Quel que soit le procédé, les indices kappa les plus faibles sont obtenus pour les puissances d'activation les plus grandes. En outre, dans ces conditions, on induit les pertes de masse les plus importantes, dépassant 20% de la masse de départ,

résultat pouvant raisonnablement être attribué à une plus grande sélectivité du traitement pour la dégradation des lignines. A l'inverse, on note que des temps d'activation prolongés, conduisant également à des pertes de masse importante (~20%) ne s'accompagne d'une diminution que modérée de la valeur kappa. Un prétraitement prolongé semble donc provoquer une déstructuration plus globale du matériau, le traitement à la phtalocyanine conduisant alors possiblement à la dégradation et l'extraction de fractions polysaccharidiques, en plus d'une partie des lignines.

L'ensemble de ces résultats est encourageant et témoigne d'une nette amélioration du protocole en comparaison aux conditions initiales. Toutefois la délignification, dans tous les cas n'est que partielle.

Les nombres kappa ont également été déterminés pour les résidus résultants des essais de délignification réalisés par imprégnation sous vide des sciures par le catalyseur (tableau 11). Comme pour les essais précédents, les indices Kappa rapportés sont la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Tableau 11: Détermination de l'indice Kappa pour les prétraitements sous vide. SV1 : imprégnation chaque jour de la phtalocyanine. SV2 : imprégnation unique au début du traitement.

Echantillon	Perte de masse (%)	Indice Kappa
SV1	5	65
SV2	13	74

La dispersion du catalyseur, au cœur du matériau par imprégnation sous vide semble augmenter la sélectivité pour la dégradation des lignines, ce qui est indiqué par une très nette diminution du nombre kappa. Toutefois, comme nous l'avons souligné précédemment, la perte de masse induite par ce protocole reste faible

II.2.3. Bilan de la délignification par la phtalocyanine

La tétrasulfophtalocyanine de fer a donc été testée comme catalyseur oxydant en association avec l'eau oxygénée pour un traitement en délignification. Ce traitement a permis d'induire à partir de sciures dépectinisées des pertes de masse d'environ 10 %. La détermination du nombre kappa pour les sciures traitées selon le protocole initial permet de démontrer que cette perte de masse est consécutive à un processus de délignification, très partielle. La modulation des conditions de réaction n'a pas permis d'améliorer l'efficacité du traitement. En revanche, l'application de prétraitements ultrasons ou micro-ondes, en déstructurant la matrice polymérique constitutive des sciures de bois autorise vraisemblablement une meilleure réactivité du système oxydant ainsi qu'une meilleure extractibilité des molécules éliminées lors du traitement ce qui se traduit par une augmentation de l'efficacité du protocole de délignification.

Nous l'avons vu, l'hétérogénéité du milieu réactionnel est un problème majeur, en partie contourné par la mise en place de prétraitement, responsable d'une efficacité du procédé toute relative. D'autres paramètres, intrinsèques au choix même du catalyseur, sont probablement à l'origine de ces résultats modestes. D'une part, les phtalocyanines hydrosolubles métallées au fer forment quasi spontanément dans l'eau des dimères μ -oxo. La formation de ces dimères, représentés Figure 58, facilement identifiables par spectroscopie d'absorption UV-Visible serait à l'origine d'une baisse de l'activité catalytique du macrocycle, entravant la formation d'espèces intermédiaires $\text{FeIV}=\text{O}$ impliquées dans le mécanisme d'oxydation. Bien qu'encore controversée,^{174,175} cette propriété doit être prise en considération pour expliquer ces résultats et surtout orienter les choix d'optimisation du procédé.

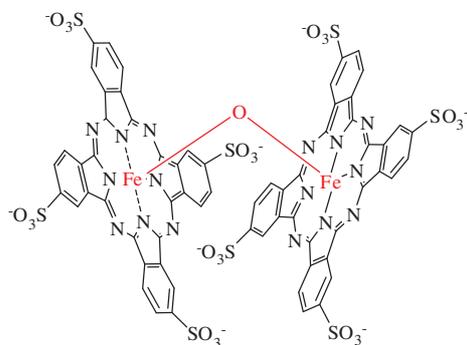


Figure 58: Structure du dimère μ -oxo de la tétrasulfophtalocyanine de fer

¹⁷⁴ Sorokin, A.B. ; Kudrick, E.V., *Catalysis Today*, **2011**, 159, 37-46

¹⁷⁵ Neu, H.M.; Yusbobov, M.S.; Zhdankin, V.V.; Nemykin, V.N., *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2009**, 351, 3168-3174.

En outre, ce catalyseur, dans tous les essais reportés, s'est avéré relativement instable dans ces conditions d'utilisation. Nous avons en effet observé une décoloration au cours de temps de la solution de phtalocyanine formant le milieu réactionnel, décoloration pouvant être totale en fin de réaction. D'Alessandro et al.¹⁷⁶ ont étudié finement le processus de dégradation de la tétrasulfophtalocyanine de fer et proposent la formation des sous-produits de dégradation présentés Figure 59.

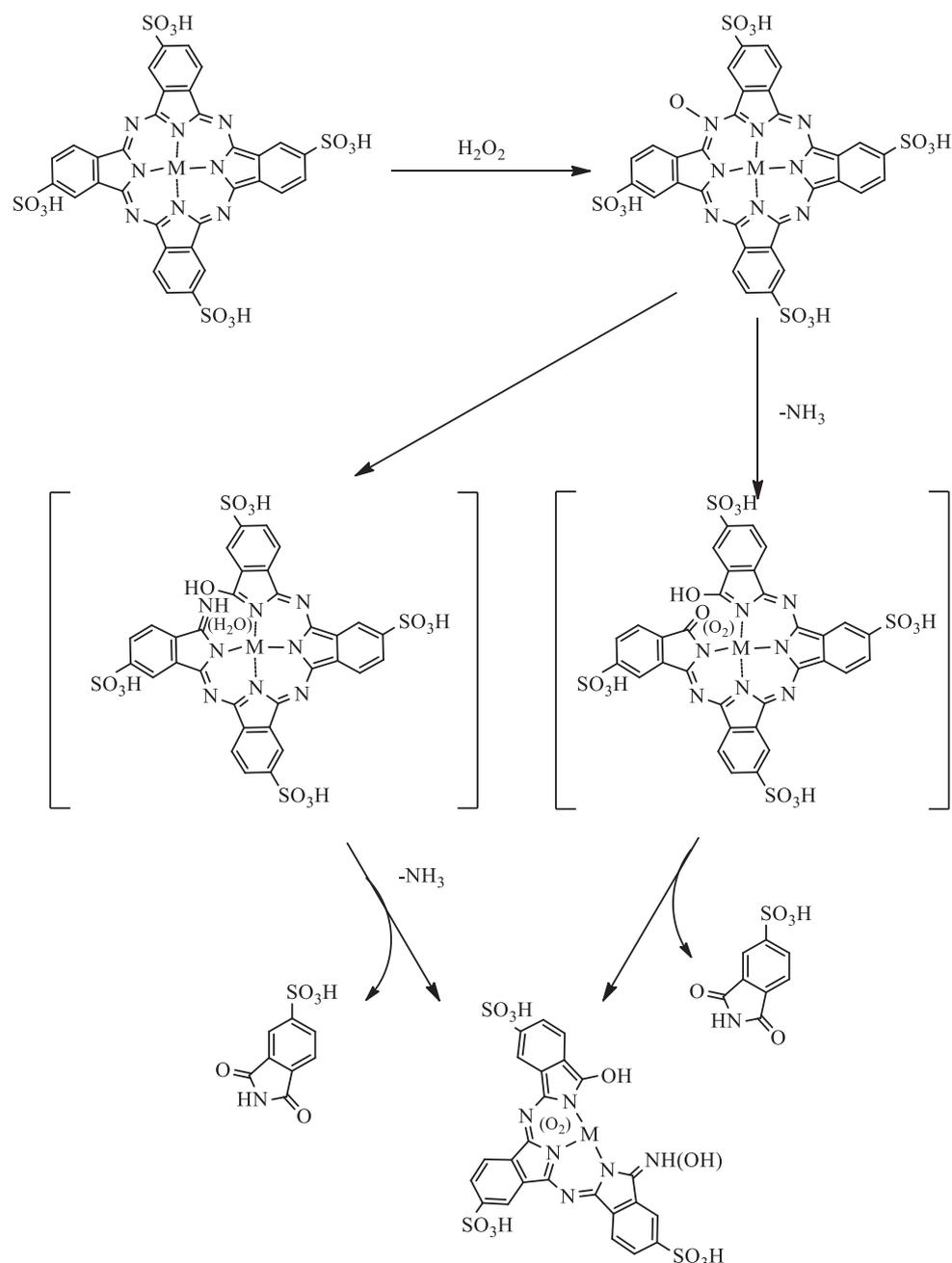


Figure 59: Dégradation de la tétrasulfophtalocyanine métallée en milieu oxydant d'après D'Alessandro¹⁷⁶

¹⁷⁶ D'alessandro, N.; Tonucci, L.; Bressan, M. ; Dragani, L.K. ; Morvillo, A., *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2003**, 1807-1814

Ces différents éléments nous ont conduit, pour la suite du travail, à imaginer de nouvelles structures catalytiques de type macrocycle porphyrinique permettant de contourner ces limites. Pour cela nous avons choisi de préparer des *méso*-arylporphyrines, polysubstituées en position *ortho* des groupements phényle. En effet, la présence de groupements encombrants en position *ortho* et donc orientés au-dessus du macrocycle d'une part préserve de la formation de ponts μ -oxo défavorisant le pouvoir catalytique du composé et d'autre part renforce la stabilité du macrocycle en milieu oxydant en protégeant les positions *méso* des additions d'espèces radicalaires de l'oxygène à l'origine de l'ouverture et de la dégradation de la porphyrine (Figure 60).

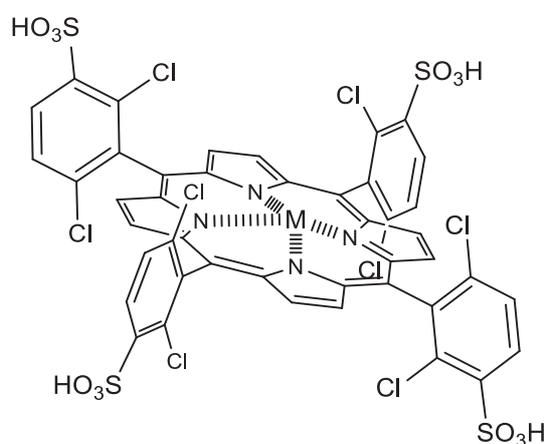


Figure 60: Structure de la tétra (dichloro-phényl) porphyrine

Compte tenu des données de la littérature, notre choix c'est porté sur la 5,10,15,20-tétradichlorophénylporphyrine. En effet, cette dernière, étudiée pour l'oxydation de composés-type de lignine,⁶¹ ou encore pour la délignification de la pâte kraft¹⁷⁷ c'est avérée particulièrement attractive.

Afin de tester cette famille de catalyseur pour la délignification, en milieu oxydant, de sciures de bois en utilisant l'eau comme solvant, nous avons modulé la structure par introduction de groupements sulfonate pour rendre le macrocycle hydrosoluble. Enfin, dans un souci de bio-mimétisme, nous avons souhaité testé, au travers de ces structures, l'activité catalytique de deux métaux : le fer et le manganèse. Rappelons en effet que ce sont ces métaux qui entre dans la composition des principales enzymes responsables de la délignification naturelle induite entre autre chose par les pourritures blanches.

¹⁷⁷ Cui, F.; Wijesekera, T.; Dolphin, D.; Farrell, R.; Skerker, P., *Journal of Biotechnology*, **1993**, 30, 15-26

II.3. Délicignification par les porphyrines : synthèses et applications

II.3.1. Synthèse de la tétra-(dichlorophényl)porphyrine

a. Stratégie de synthèse

La synthèse du macrocycle tétrapyrrolique est effectuée en trois grandes étapes comme le montre le schéma suivant (Figure 61).

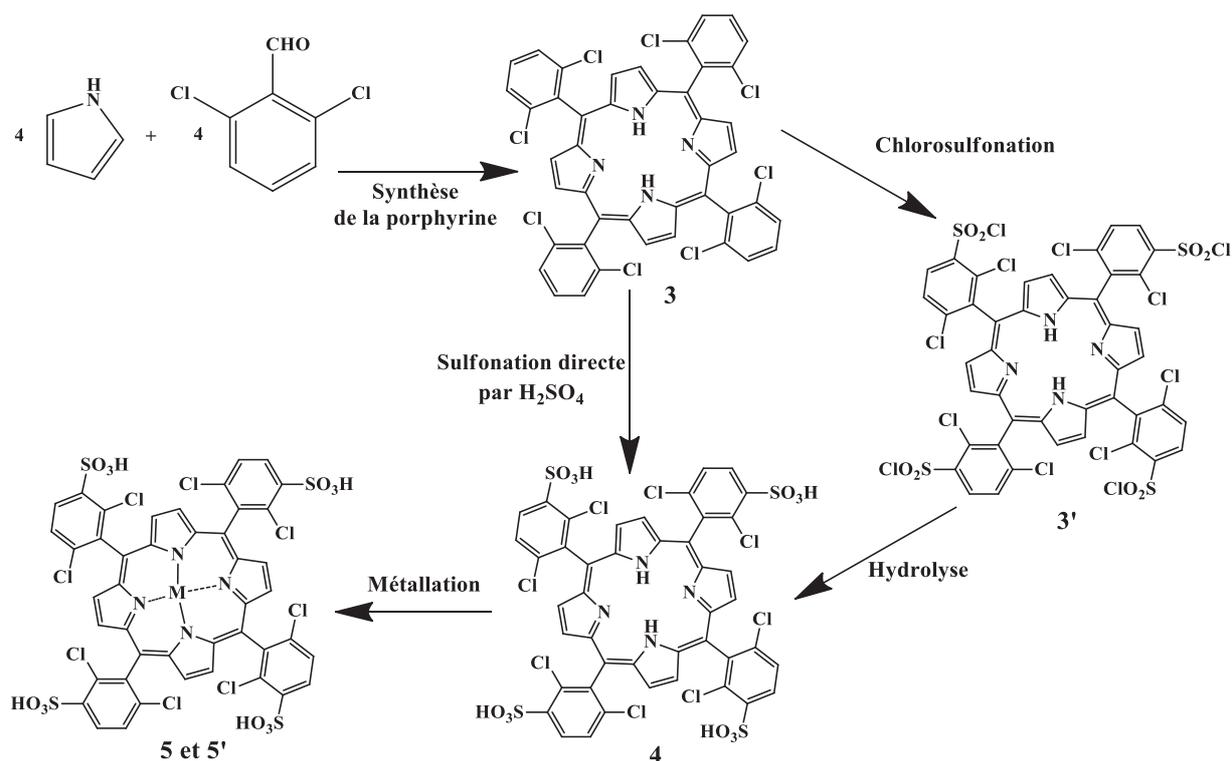


Figure 61: Stratégie de synthèse du catalyseur

Dans une première étape, la porphyrine octachlorée base libre est préparée par condensation de pyrrole et de 2,6-dichlorobenzaldéhyde. Ensuite, le macrocycle est rendu hydrosoluble par sulfonation des quatre groupements phényle. Pour cet intermédiaire, deux voies d'accès ont été étudiées : une sulfonation directe utilisant comme réactif l'acide sulfurique et une sulfonation « indirecte » par introduction de groupements chlorosulfone au moyen d'acide chlorosulfonique suivie d'une d'hydrolyse. Les catalyseurs sont finalement obtenus par métallation du macrocycle au fer ou au manganèse.

b. Synthèse de la tétra (2,6-dichloro) phénylporphyrine

Rappelons qu'il existe de nombreuses méthodes permettant de préparer des porphyrines. Parmi celles-ci, les méthodes de synthèse classiquement utilisées au laboratoire sont les méthodes d'Adler-Longo et de Lindsey.

Ainsi, la première méthode que nous avons envisagée est la méthode d'Adler Longo. Bien que conduisant généralement à des rendements moyens, même pour des macrocycles symétriques, elle présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre. Elle consiste à condenser dans l'acide propanoïque à reflux du pyrrole, ajouté goutte-à-goutte avec un (ou plusieurs selon les cas) aldéhyde(s) en quantités stœchiométriques. (Figure 62)

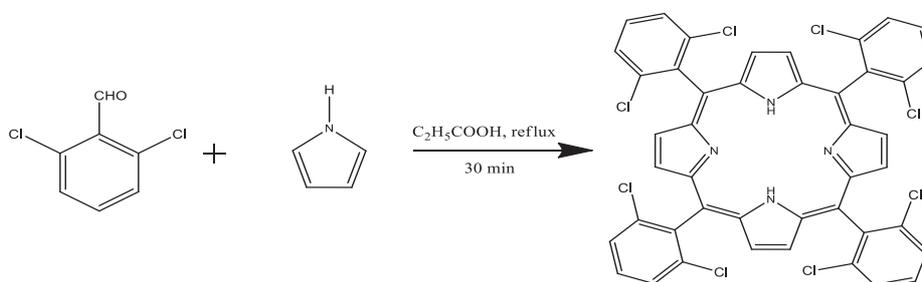


Figure 62: Synthèse de la porphyrine par la méthode d'Adler-Longo

Dans un grand nombre de cas, par cette stratégie, les porphyrines formées précipitent dans l'acide propionique à froid ce qui en facilite grandement la récupération, par simple filtration. Malheureusement, appliquée à la préparation de 5,10,15,20-tétradichlorophénylporphyrine cette méthode c'est avérée inefficace, la porphyrine ne précipitant pas en fin de réaction. Rappelons que lors de la synthèse, des « goudrons » se forment en quantité importante par polymérisation concomitante du pyrrole. Ces derniers piègent la porphyrine lorsque celle-ci ne précipite pas et rendent son extraction du milieu réactionnel particulièrement délicate. De ce fait, il ne nous a pas été possible d'isoler la porphyrine attendue. Ainsi face à ces difficultés de purification, nous avons choisi de changer de protocole de synthèse en appliquant la méthode de Lindsey : (Figure 63)

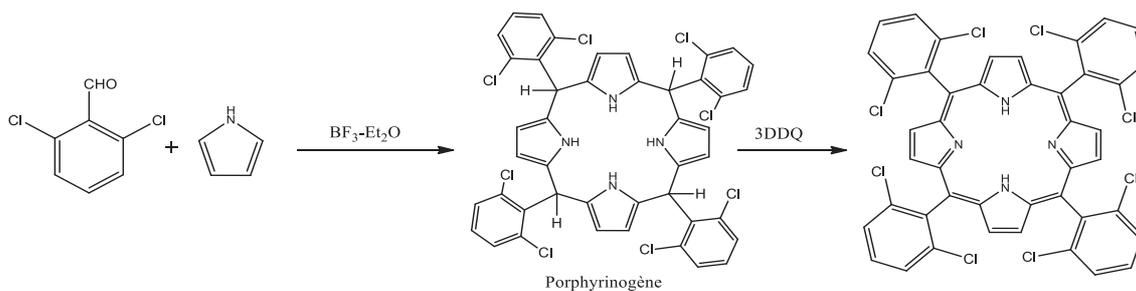


Figure 63: Synthèse de la porphyrine par la méthode de Lindsey

Cette synthèse de méso-arylporphyrines s’effectue dans des conditions douces, en deux étapes. Tout d’abord, le pyrrole et l’aldéhyde, judicieusement choisis, sont mis à réagir à température ambiante dans du dichlorométhane anhydre de sorte que les concentrations en réactifs ne dépassent pas $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Dans ces conditions diluées, en présence de quantité catalytique d’acide de Lewis (dans notre cas le BF_3 étherate), un porphyrinogène intermédiaire se forme généralement en une heure de réaction. Après cela, une quantité stœchiométrique de 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) est ajoutée pour oxyder irréversiblement le porphyrinogène en porphyrine. Cette méthode est généralement efficace et permet d’obtenir la porphyrine avec un bon rendement (autour de 45 % pour des porphyrines symétriques). Malheureusement, appliquée à la synthèse de la 5,10,15,20-tétradichlorophénylporphyrine cette stratégie, là encore, ne nous a pas permis d’isoler le produit attendu, malgré de nombreux essais pour lesquels nous avons fait varier les temps de réactions, d’oxydation ou encore les quantités de catalyseur. Dans tous les cas, la porphyrine est formée en de trop faibles quantités pour que cette réaction puisse être exploitée pour la suite.

Les méthodes classiques ne fonctionnant pas, nous nous sommes orientés vers une méthode moins conventionnelle et assez peu décrite dans la littérature. Utilisée notamment par Monteiro et al.,¹⁷⁸ cette méthode de synthèse utilise de l’acide acétique et du nitrobenzène comme oxydant. Ainsi, la synthèse de la porphyrine a été adaptée comme suit. (Figure 64)

¹⁷⁸ Monteiro, C.J.P.; Pereira, M.M.; Azeha, M.E. ; Burrows, H.D. ; Serpa, C. ; Arnaut, L.G. ; Tapia, M.J. ; Sarakha, M. ; Wong-Wah-Chung, P. ; Navaratnam, S., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2005**, 4, 617-624

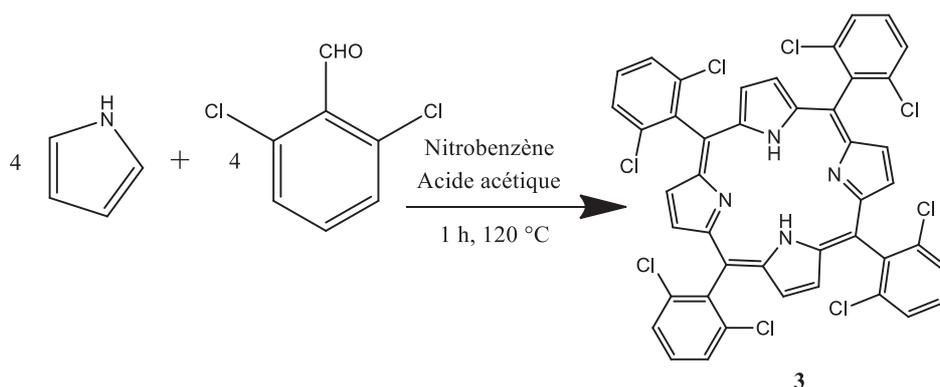


Figure 64: Synthèse de la tétra (dichloro-phényl) porphyrine

Le 2,6-dichlorobenzaldéhyde est dissout dans un mélange 2/1 (volume/volume) d'acide acétique et de nitrobenzène. Le pyrrole fraîchement distillé est alors ajouté en quantité stœchiométrique, par rapport à l'aldéhyde, goutte à goutte. Cette méthode a pour avantage de pouvoir faire précipiter la porphyrine par ajout de méthanol à la fin de la réaction. Après filtration et lavages au méthanol, la porphyrine est obtenue sous forme d'une poudre violette, pure, avec un rendement de 6,9 %.

c. Sulfonation de la tétra (2,6-dichloro) phénylporphyrine

➤ Par l'acide sulfurique

La sulfonation s'effectue à chaud par réaction de l'acide sulfurique concentré sur la porphyrine précédemment décrite. (Figure 65)

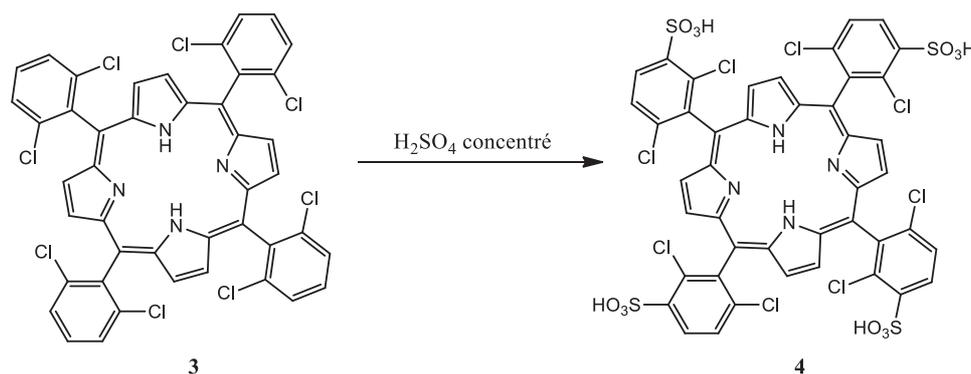


Figure 65: Réaction de sulfonation par l'acide sulfurique

Plusieurs essais, au cours desquels nous avons fait varier le temps de contact ou la température du milieu réactionnel, ont été nécessaires pour atteindre les conditions optimales correspondant à 6 heures de réaction dans l'acide sulfurique pur porté à 180°C.

Après retour à température ambiante, la solution est neutralisée avec une solution de NaHCO₃ saturée. Cela entraîne la formation de nombreux sels qui sont éliminés dans un

premier temps par précipitation au méthanol (la porphyrine étant soluble dans le méthanol), puis par dialyse. La porphyrine sulfonée est alors obtenue avec un rendement de 21 %.

➤ Par l'acide chlorosulfonique

La synthèse de la porphyrine sulfonée par l'acide chlorosulfonique s'effectue en deux étapes. La première consiste en une chlorosulfonation du macrocycle grâce à l'acide chlorosulfonique. La seconde est une hydrolyse permettant d'obtenir les fonctions acide sulfonique. (Figure 66)

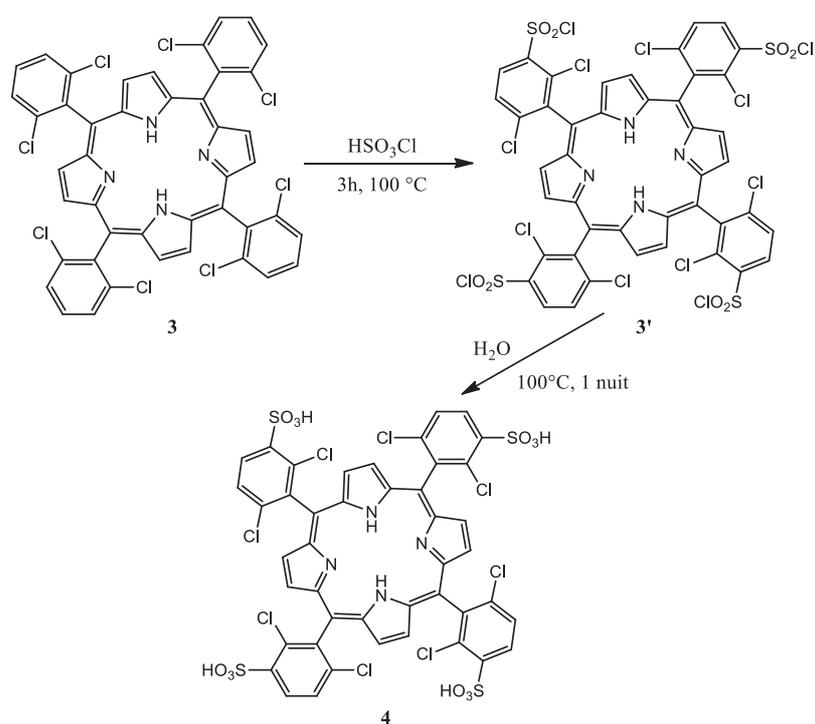


Figure 66: Synthèse de la tétra (2,6-dichloro-3-sulfo)phénylporphyrine par la porphyrine chlorosulfonée

La première étape donne, après neutralisation et purification, une poudre de couleur violette, avec un bon rendement de 90 %. La deuxième étape, consistant à placer la porphyrine 3' dans l'eau à 100°C pendant 12h, conduit à la tétra-(2,6-dichloro-3-sulfo)phénylporphyrine avec un rendement quantitatif. On obtient alors par simple évaporation du solvant le composé pur sous la forme d'une poudre violette

Cette deuxième stratégie, bien que nécessitant deux étapes, s'avère bien plus pertinente que la première, compte tenu de sa facilité de mise en œuvre et des rendements excellents obtenus

d. Métallation

La métallation de la porphyrine sulfonée a été effectuée suivant un protocole classiquement utilisé au laboratoire. (Figure 67)

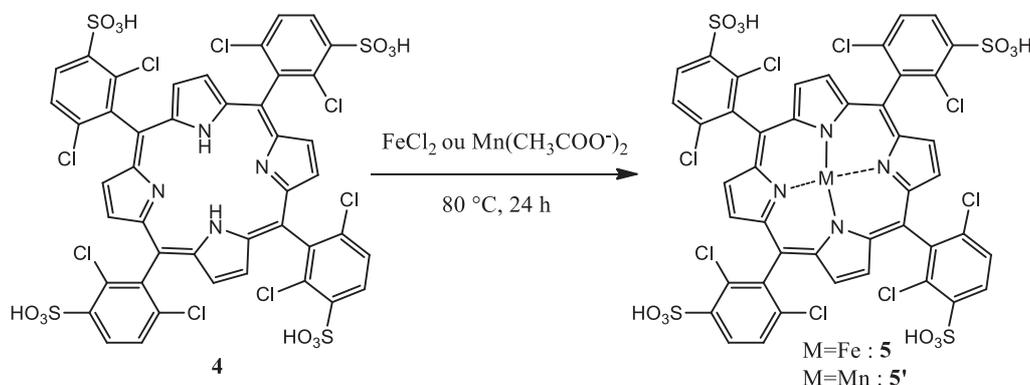


Figure 67: Métallation de la tétra (2,6-dichloro-3-sulfo)phénylporphyrine

Plus précisément, l'introduction de l'atome de fer est réalisée par réaction de la porphyrine avec du chlorure de fer II, dans l'eau à 80°C durant 24h. Après purification, une poudre marron, correspondant au composé 5 est obtenue avec un rendement de 57%

La métallation au manganèse est effectuée quant à elle selon un protocole similaire utilisant de l'acétate de manganèse II mis à réagir avec la porphyrine à 80 °C pendant 1 nuit. Le composé 5' est obtenu sous la forme d'une poudre marron-bordeaux après purification avec un rendement, plus faible, de 37 %.

II.3.2. Caractérisations

Les composés 3, 3', 4, 5 et 5' ont été caractérisés par spectrométrie d'absorption UV-Visible et par spectrométrie de masse. Les composés 3, 3' et 4 ont également été caractérisés par RMN ¹H.

a. UV-Visible

Les spectres des composés 3 et 3' ont été mesurés dans le chloroforme tandis que ceux des composés 4, 5 et 5' solubles en milieu polaire ont été enregistrés dans le méthanol. On obtient de façon générale des spectres plutôt atypiques. Alors que les bandes Q, au nombre de quatre d'une meso-arylporphyrine sont généralement sous la forme étio, c'est-à-dire que les intensités des bandes vont décroissants de la bande Q_{IV} à la bande Q_I, les spectres des composés synthésés présentent des bandes Q_{II} d'intensité plus importante que celles des

bandes Q_{III}, spectres apparentés au type *phyllo*. Pour les porphyrines **3'** et **4**, les bandes Q_{III} sont à peine visibles aux fortes concentrations et donc leurs coefficients d'extinction molaire n'ont pas été mesurés. De même pour les porphyrines métallées **5** et **5'**, seule une bande Q est réellement visible, alors que ce type de composés présente en général deux bandes. Ces observations sont toutefois concordantes avec les données rapportées dans la littérature. Le Tableau 12 rassemble les diverses longueurs d'onde maximales d'absorption pour chaque composés ainsi que les coefficients d'extinction molaire correspondants.

Tableau 12: Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des composés 3, 3', 4, 5, 5'

λ_{max} (nm) ; coefficient d'extinction molaire ϵ ($\times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Composés	Soret	Q _{IV} (ou Q _b)	Q _{III} (ou Q _a)	Q _{II}	Q _I
3 ^a	418 (138)	514 (8,3)	546 (1,2)	589 (2,8)	659 (0,7)
3 ^{a'}	421 (104)	513 (6,7)	nd ^c	589 (2,2)	nd ^d
4 ^b	415 (265)	511 (14,8)	nd ^e	588 (5,0)	nd ^f
5 ^b	413 (47,1)	511 (5,3)	580 (3,0)		
5 ^{b'}	464 (88)	508 (4,6)	562 (8,5)		

a : mesure dans CHCl₃

b : mesure dans MeOH

c : dans la littérature : 548 (3,0)¹⁷⁹

d : dans la littérature : 658 (1,7)¹⁷⁹

e : dans la littérature : 517 (0,9)¹⁷⁸

f : dans la littérature : 640 (0,4)¹⁷⁸

A titre d'exemple, le spectre d'absorption UV-Visible de la porphyrine octachlorée (composé **3**) est présenté Figure 68.

¹⁷⁹ Gonsalves, A.M.A.R.; Johnstone, R.A.W.; Pereira, M.M.; De SantAna, A.M.P.; Serra, A.C.; Sobral, A.J.F.N.; Stocks, P.A., *Heterocycles*, **1996**, *43*, 829-838

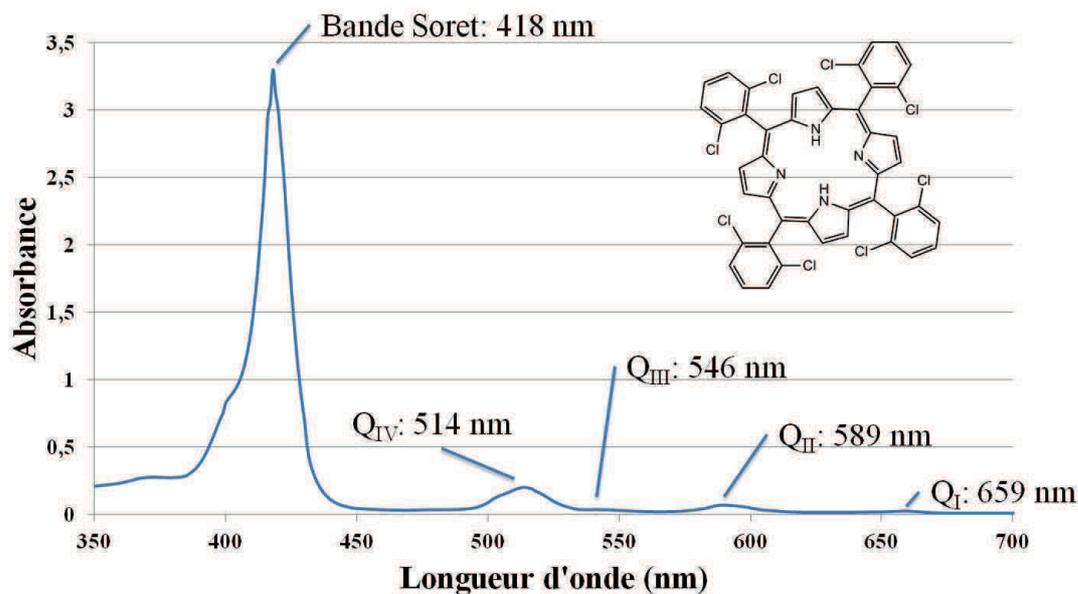


Figure 68: Spectre UV-Visible de la tétra(dichlorophényl)porphyrine dans CHCl_3

On observe la bande intense de Soret à 418 nm et les quatre bandes Q à 514, 546, 589 et 659 nm. Les bandes à 546 et 659 nm, comme indiqué précédemment sont particulièrement faibles, mais correspondent à celle décrites dans la littérature.¹⁷⁸

La figure suivante présente quant à elle le spectre d'absorption UV-Visible de la porphyrine métallée au manganèse (Figure 69).

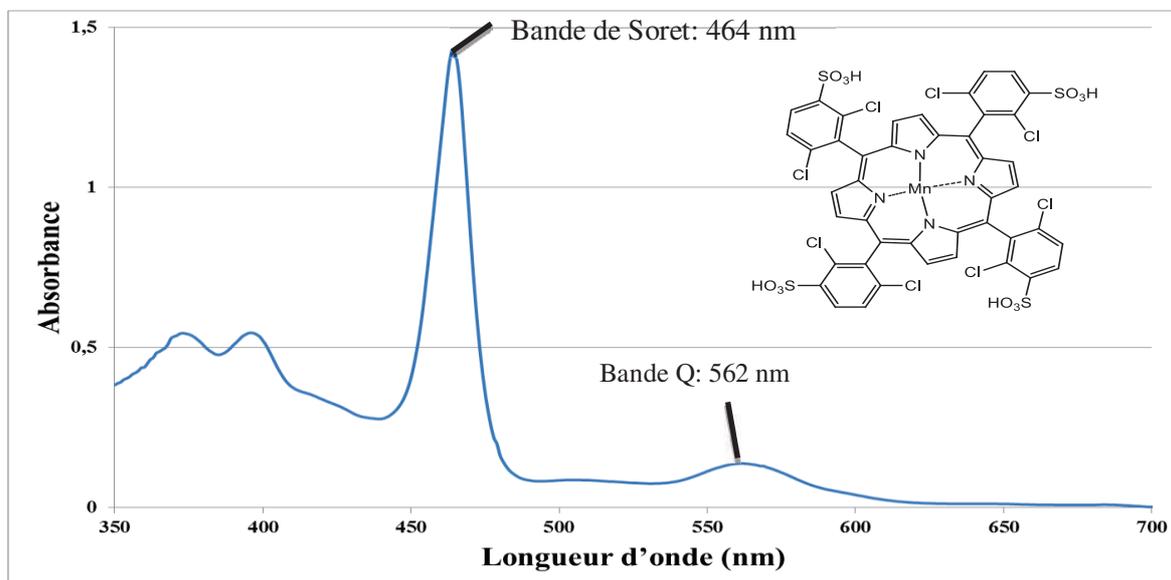


Figure 69: Spectre UV-Visible de la tétra (dichlorosulfo)phénylporphyrine de manganèse

Un agrandissement du pic à m/z 891,023, correspondant à la masse moléculaire attendue, permet d'observer le massif isotopique caractéristique d'une molécule porteuse de 8 chlores, confirmant ainsi la structure du composé **3** (Figure 71).

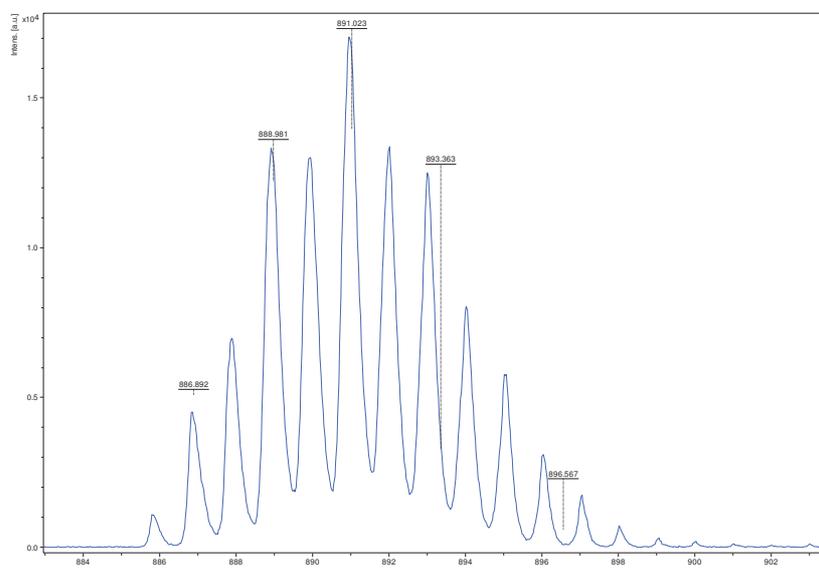


Figure 71: agrandissement du pic à m/z 891,023 du spectre MALDI de la tétra (dichloro-phényl) porphyrine

c. RMN ^1H

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) ont été mesurés à 400,13 MHz dans le chloroforme deutéré pour les composés **3** et **3'** et dans l'eau deutérée pour le composé **4**. Les spectres obtenus sont caractéristiques des porphyrines *meso*-substituées, avec les protons β -pyrroliques apparaissant vers 8,8 ppm, puis les protons phéniliques entre 7,5 et 8,8 ppm et enfin les protons des groupements N-H internes très fortement blindés entre - 2,0 et -3,0 ppm. Les attributions des déplacements chimiques observés sur les spectres des composés **3**, **3'** et **4** sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14: interprétation des spectres RMN ^1H des composés 3, 3' et 4.
Valeurs en ppm (J en Hz)

	Composé 3 ^a	Composé 3' ^a	Composé 4 ^b
β-pyrroliques	8,66 s	8,7-8,6 m (β -pyrroliques + <i>para</i>)	8,99 s
Phényliques	7,79 d (<i>meta</i>) J=8,5 7,69 t (<i>para</i>) J=7,7	8,08 d (<i>meta</i>) J=8,8	8,5-8,2 m (<i>para</i>) 8,1-7,8 m (<i>meta</i>)
N-H internes	-2,53 s	-2,50 s	Echangés

a : dans CDCl_3

b : dans D_2O

Ainsi, le spectre de la porphyrine octachlorée présente pic de déplacement chimique négatif à -2,53 ppm correspondant aux deux protons internes de la molécule, portés par les azotes. Les 8 protons pyrroliques apparaissent sous la forme d'un singulet à 8,66 ppm. Les douze protons portés par les quatre cycles phényle donnent quant à eux deux massifs à 7,7 ppm et 7.8 ppm intégrant respectivement pour 4 et 8 protons et sont attribués pour le premier aux protons occupant les positions 4 et pour le second aux 8 protons des positions 3,5. Les figures associées, complexes, correspondent à un spectre du second ordre, non interprétable simplement et caractéristique d'un système de couplage AX2, classique pour les dérivés de type 2,6-dichloroaryl.

Le spectre RMN ^1H de la porphyrine sulfonée, enregistré dans D_2O est conforme à celui attendu pour ce composé. (Figure 72)

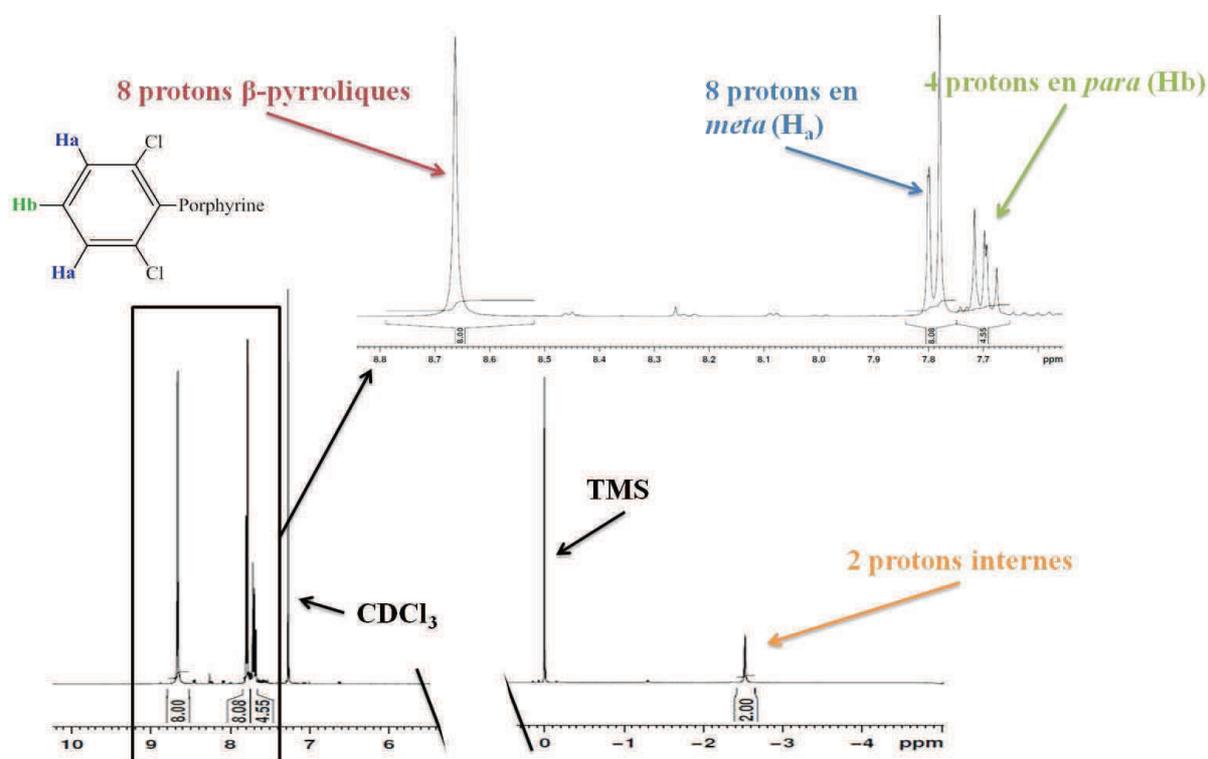


Figure 72: Spectre RMN ^1H de la porphyrine octachlorée

Les 8 protons β -pyrroliques apparaissent sous la forme d'un singulet élargi à 8,99 ppm. Les protons des phényles, contrairement au produit **3**, précédemment décrit, fournissent des signaux mal définis, apparaissant sous la forme de deux massifs intégrant chacun pour 4 protons à 8,5-8,2 ppm et 8,1-7,9 ppm (Figure 73). L'existence de deux massifs distincts confirme la régiosélectivité de la réaction de sulfonation pour les positions *méta* des phényles, laissant libres les positions 4 et 5 avec perte de symétrie. La mauvaise définition de ces massifs est la conséquence deux phénomènes se produisant en solution dans l'eau : l'auto-

association des macrocycles sous la forme d'agrégat et l'équilibre conformationnel de la molécule conduisant à l'existence en solution de 4 rotamères. Ce dernier point s'explique par la présence des atomes de chlore en position 2 et 6 bloquant la libre rotation des phényles autour des positions *méso*. Ainsi, comme le montre la représentation simplifiée de la Figure 74 suivante, les groupements acides sulfoniques peuvent se trouver de part et d'autre du plan de la porphyrine conduisant, selon les cas, à des symétries différentes.

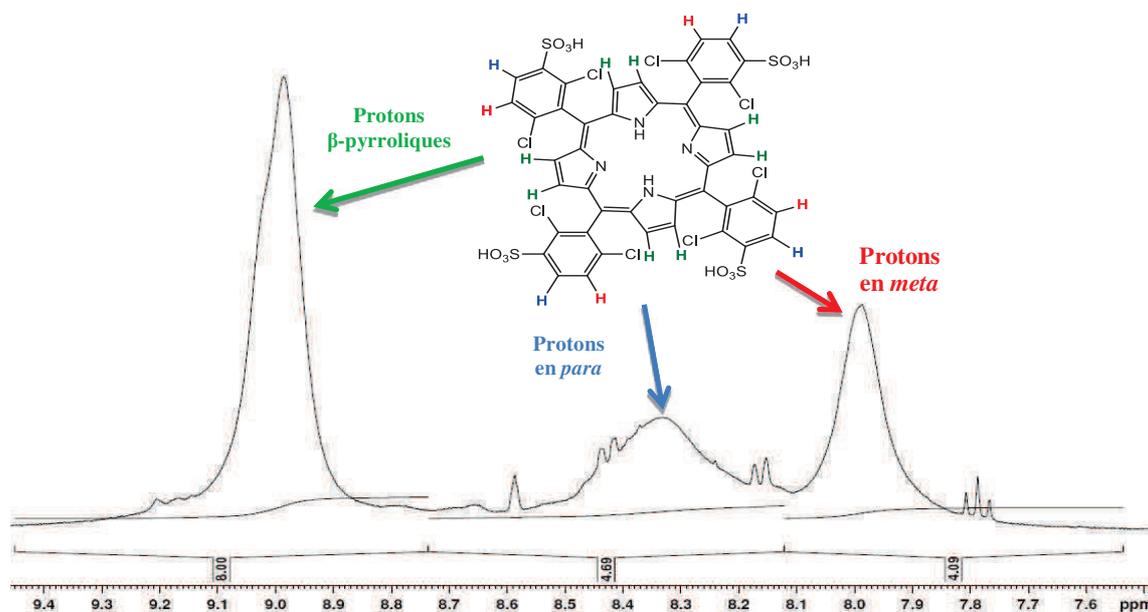


Figure 73: Spectre RMN ^1H de la porphyrine sulfonée.
Agrandissement de la zone des aromatiques

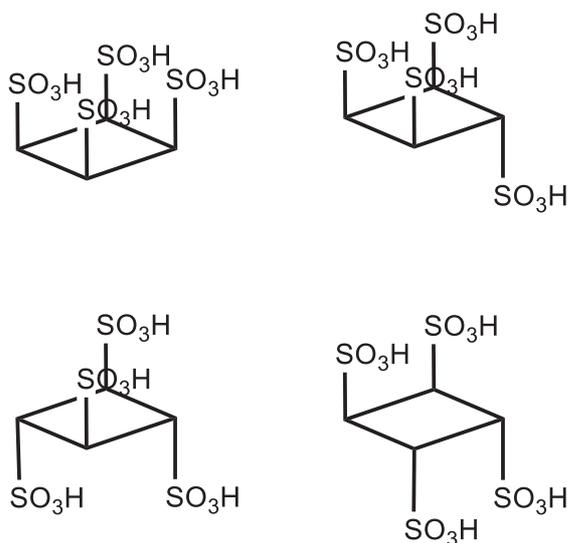


Figure 74: Représentation des atropoisomères possibles de la porphyrine

Pour la porphyrine chlorosulfonée **3'**, intermédiaire de synthèse, le spectre RMN enregistré dans le chloroforme (non présenté) confirme la structure : il présente un signal

correspondant aux deux protons internes à -2,50 ppm, un massif entre 8,63 et 8,65 ppm, intégrant pour 12 protons ainsi qu'un autre massif à 8,07 ppm intégrant pour 4 protons. Cette distribution confirme, comme pour la porphyrine sulfonée, la position occupée par les groupements SO₂Cl. La forme des signaux élargis est donc là encore attribuée à l'existence de rotamères en équilibre.

II.3.3. Délicnification par les métalporphyrines

Les porphyrines métallées au fer et au manganèse ont donc été utilisées comme catalyseur oxydant dans le traitement de délicnification des sciures dépectinisées de bois de châtaignier. Tous les essais présentés correspondent au traitement à température ambiante (sauf si précision contraire) de 1 gramme de sciures dépectinisées, dispersées dans 50 mL d'eau distillée. Dans une première approche, comme pour l'étude menée avec la phtalocyanine, nous avons mesuré les pertes de masse induites par le traitement.

a. Avec la porphyrines métallée au fer

Les essais de délicnification avec la porphyrine métallée au fer ont été reportés tableau 15

Tableau 15: Essais de délicnification avec la porphyrine métallée au fer

Essais	Quantité de porphyrine (mg)	Volume de H ₂ O ₂ (mL/jour)	Temps de réaction (h)	Perte de masse (%)
Fe-1	5	1	100	32
Fe-2	5	2	100	30
Fe-3	5	4	100	49
Fe-4	10	1	100	48
Fe-5	1	1	72	39
Fe-6	(3 x) 1	(3 x) 1	24	34
Fe-7	(3 x) 1	(3 x) 2	24	33
Fe-8	5	1	24	33
Fe-9	5	1	2	37
Fe-10	5	1	24 (à 50 °C)	35

Les différents essais reportés ont consisté à faire varier les quantités de catalyseur, d'oxydant ainsi que les temps de réaction. De manière générale, les résultats obtenus indiquent que le traitement par la porphyrine de fer provoque, même pour des temps de

réaction courts, des pertes de masse conséquentes, supérieures ou égales à la quantité moyenne de lignine contenu dans les sciures. La perte de masse peut même atteindre près de 50% pour un temps de réaction de 100h avec la quantité d'eau oxygénée la plus importante. Ce même résultat est obtenu avec un temps de réaction identique, une quantité plus faible d'oxydant mais une quantité doublée de catalyseur. Ces cas reflètent à l'évidence un manque de sélectivité du procédé pour les lignines. Toujours pour 100 heures de réaction, il est toutefois possible d'atteindre des pertes de masse se rapprochant du taux moyen de lignine (~30-35%) en engageant dans la réaction des quantités modérées à la fois d'oxydant et de catalyseur. De même des pertes de masse similaires sont obtenues si la durée du traitement est abaissée à 24 heures. Il est enfin intéressant de comparer les essais notés Fe-1 et Fe-9 : toutes choses étant égales par ailleurs, une diminution drastique du temps de réaction (2h pour Fe-9 contre 100h pour Fe-1) se traduit par une augmentation inattendue de la perte de masse. Ce constat nous amène à formuler les hypothèses suivantes : tout d'abord, il semblerait que la réaction de dégradation de la matrice polymérique, sans pouvoir préciser s'il s'agit simplement de délignification, soit très rapide. De plus, la diminution de la perte de masse lorsque le temps de traitement augmente pourrait raisonnablement s'expliquer par une repolymérisation partielle des fragments de lignines au cours du temps. En effet, des travaux de la littérature décrivent l'utilisation de macrocycles tétrapyrroliques, particulièrement des porphyrines de fer pour la polymérisation de résidus phénoliques type lignine. Le temps de contact réactifs-substrats s'avère donc être un paramètre essentiel pour le développement de ce procédé.

b. Avec la porphyrine métallée au manganèse

Des essais similaires, réalisés à l'aide de la porphyrine métallée au manganèse ont conduit aux résultats présentés dans le Tableau 16. Comme précédemment, ceux-ci ont été effectués sur 1 gramme de sciures dépectinisées dispersées dans 50 mL d'eau distillée à température ambiante (sauf précision).

Tableau 16: Essais de délignification avec la porphyrine métallée au manganèse

Essais	Quantité de porphyrine (mg)	Volume de H ₂ O ₂ (mL/jour)	Temps de réaction (h)	Perte de masse (%)
Mn-1	5	1	100	43
Mn-2	5	2	100	43
Mn-3	5	4	100	42
Mn-4	10	1	100	46
Mn-5	1	1	72	49
Mn-6	(3 x) 1	(3 x) 1	24	38
Mn-7	(3 x) 1	(3 x) 1	24	44
Mn-8	5	1	24	41
Mn-9	5	1	2	43
Mn-10	5	1	24 (à 50 °C)	30

Globalement et contrairement aux traitements utilisant la porphyrine de fer, les pertes de masse enregistrées dans le cas de la porphyrine de manganèse sont assez homogènes, comprises entre 40 et 50 % de de la masse initiale, c'est-à-dire des valeurs suggérant comme précédemment un manque de sélectivité pour les lignines. Seul l'essai Mn-10 mène à une perte de masse significativement plus faible, de 30 %. Là encore, un temps de réaction de seulement 2 heures est suffisant pour dépasser 40% de perte de masse. De plus, dans le domaine expérimentale étudié, les variations des quantités d'oxydant, de catalyseur et de la durée du traitement n'ont que peu d'effet sur la réponse mesurée. Dans ce cas, les essais Mn-1 et Mn-9, correspondants à une diminution importante du temps de réaction, les autres paramètres étant inchangés, produisent exactement la même perte de masse, de 43%. Contrairement à l'étude précédente qui, pour les mêmes conditions de réaction, nous avait conduits à postuler une repolymérisation partielle des lignines dégradées, il semblerait que le macrocycle métallé au manganèse ne soit pas en capacité d'induire ce phénomène, ce qui est à nouveau cohérent avec les données de la littérature.

II.3.4. Caractérisation de la délignification par l'indice Kappa

Afin de tenter d'établir une corrélation entre les pertes de masse mesurées et l'efficacité de la réaction, c'est-à-dire la sélectivité de l'oxydation pour les lignines, nous avons déterminé les indices kappa de chaque résidu. Comme pour l'étude de la phtalocyanine de fer, ceux-ci ont été comparé à celui des sciures dépectinisées non traitées pour lesquels le nombre kappa a été ramené à 100. Rappelons également que l'indice kappa de l'holocellulose, obtenues par traitement au chlorite de sodium a été évalué à 36. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 17, complété par une colonne indiquant des observations visuelles des résidus après réaction.

Tableau 17: Récapitulatifs des essais à la porphyrine de fer, nombre kappa et observations sur l'apparence des fibres après délignification

Essais	Quantité de porphyrine (mg)	Volume de H ₂ O ₂ (mL/j)	Tps de réaction	Perte de masse (%)	Indice Kappa	Observations
Fe-1	5	1	100	32	119	Net blanchiment
Fe-2	5	2	100	30	122	Net blanchiment et léger aspect fibreux
Fe-3	5	4	100	49	107	Net blanchiment et léger aspect fibreux
Fe-4	10	1	100	48	147	Net blanchiment et aspect fibreux
Fe-5	1	1	72	39	103	Léger blanchiment
Fe-6	(3 x) 1	(3 x) 1	24	34	105	Aucune modification apparente
Fe-7	(3 x) 1	(3 x) 2	24	33	110	Aucune modification apparente
Fe-8	5	1	24	33	102	Léger blanchiment
Fe-9	5	1	2	37	97	Sciures grises
Fe-10	5	1	24 (à 50 °C)	35	108	Net blanchiment

Les mesures des nombres Kappa pour les essais à la porphyrine de manganèse ont également été rapportées par rapport à la référence 100 correspondant au nombre Kappa des sciures dépectinisées. De même, des observations visuelles ont été transcrites dans le Tableau 18.

Tableau 18: Récapitulatifs des essais à la porphyrine de manganèse, nombre kappa et observations sur l'apparence des fibres après délignification

Essais	Quantité de porphyrine (mg)	Volume de H ₂ O ₂ (mL/j)	Temps de réaction (h)	Perte de masse (%)	Indice kappa	Observations
Mn-1	5	1	100	43	88	Net blanchiment
Mn-2	5	2	100	43	93	Net blanchiment
Mn-3	5	4	100	42	81	Net blanchiment
Mn-4	10	1	100	46	97	Net blanchiment
Mn-5	1	1	72	49	100	Léger blanchiment
Mn-6	(3 x) 1	(3 x) 1	24	38	100	Pas de modifications apparentes
Mn-7	(3 x) 1	(3 x) 2	24	44	93	Léger blanchiment
Mn-8	5	1	24	41	98	Léger blanchiment
Mn-9	5	1	2	43	114	Pas de modifications apparentes
Mn-10	5	1	24 (à 50 °C)	30	97	Léger blanchiment

De façon générale, les valeurs de nombre Kappa obtenues, pour la plupart supérieures à 100, ne sont en première lecture pas logiques. Il est à noter qu'elles sont la moyenne de trois mesures indépendantes aux faibles écarts types traduisant une bonne reproductibilité et donc fiabilité de ces déterminations. De plus, comme indiqué dans les deux tableaux, certains essais, particulièrement ceux bénéficiant des temps de réaction les plus longs, quel que soit le catalyseur, conduisent à l'observation d'un net « blanchiment » du substrat de départ, comme en témoigne la Figure 75 montrant le résidu de l'essai Fe-4 choisi comme exemple. Cette observation peut être raisonnablement attribuable à une diminution de la quantité de lignine.



Figure 75: Photographies des sciures dépectinisées avant délignification et après traitement à la porphyrine de fer (essai Fe-4)

Il est important de noter que si la perte de masse est déjà conséquente au bout de seulement deux heures de réaction, la décoloration partielle n'est observable que pour des temps de contact plus longs. Celle-ci s'accompagne d'un changement de morphologie des sciures, devenant d'aspect fibreux. Ceci suggère que ces macrocycles agissent rapidement et préférentiellement sur la fraction polysaccharidique induisant ainsi une perte de matière par dégradation des hémicelluloses et/ou de la cellulose. Les lignines ne seraient affectées que dans un second temps. L'oxydation concomitante des polysaccharides, en provoquant une surconsommation de permanganate de potassium lors de la détermination de l'indice kappa, peut donc expliquer les valeurs trouvées, égales ou supérieures à celle de la référence non délignifiée. D'une part, les unités d'acide 4-*O*-Me-glucuronique constitutives des hémicelluloses peuvent être oxydées en acides hexénuroniques, comme expliqué dans la première partie du document, groupements sensibles au permanganate de potassium. D'autre part, les hémicelluloses et dans une moindre mesure la cellulose, dans ces conditions oxydantes, peuvent être partiellement dépolymérisées et peuvent également subir des coupures oxydantes des unités osidiques, principalement des liaisons C2-C3. Dans les deux cas, ces modifications chimiques induisent une augmentation des fonctions aldéhyde (extrémités réductrices ou formation d'aldéhyde en position C2 et/ou C3) là encore possiblement responsable d'une surconsommation de permanganate de potassium lors de la mesure du nombre Kappa, faussant ainsi le dosage des lignines.

Afin d'interpréter au mieux l'action du système porphyrines/H₂O₂ sur les sciures, la détermination normalisée de l'indice kappa n'étant pas applicable dans ce cas, nous avons d'une part caractérisé les produits de réactions par spectroscopie infrarouge et d'autre part déterminé la composition mono-saccharidique des résidus par chromatographie phase gaz.

a. Caractérisation de la délignification par FT-IR

La caractérisation par FT-IR de l'ensemble des résidus obtenu pour chaque essai a été effectuée. Les spectres des sciures dépectinisées non traitées ainsi que de l'holocellulose obtenue par traitement classique au chlorite de sodium ont également été enregistrés, pour comparaison. Nous ne présentons dans la suite que quelques spectres représentatifs. De manière générale, quel que soit le catalyseur utilisé (porphyrine de fer ou de manganèse), les spectres obtenus sont très similaires et quasi superposables à celui mesuré pour les sciures dépectinisées non traitées. Ceci est une conséquence directe de la non sélectivité du traitement déjà discutée précédemment. En effet, si la réaction affecte de manière concomitante les

polysaccharides et la lignine en ne provoquant que partiellement leur dégradation et extraction, il est logique d'observer dans le résidu les signaux caractéristiques des structures de l'ensemble des composés constitutifs des sciures et donc d'enregistrer des spectres très proches de celui du produit de départ. Toutefois, un examen plus fin des spectres renseigne plus précisément sur le déroulement de la réaction. La Figure 76 présente la superposition des spectres correspondant à l'holocellulose, aux sciures dépectinisées de départ et au résidu de l'essai Fe-4, essai correspondant rappelons-le à une perte de masse importante.

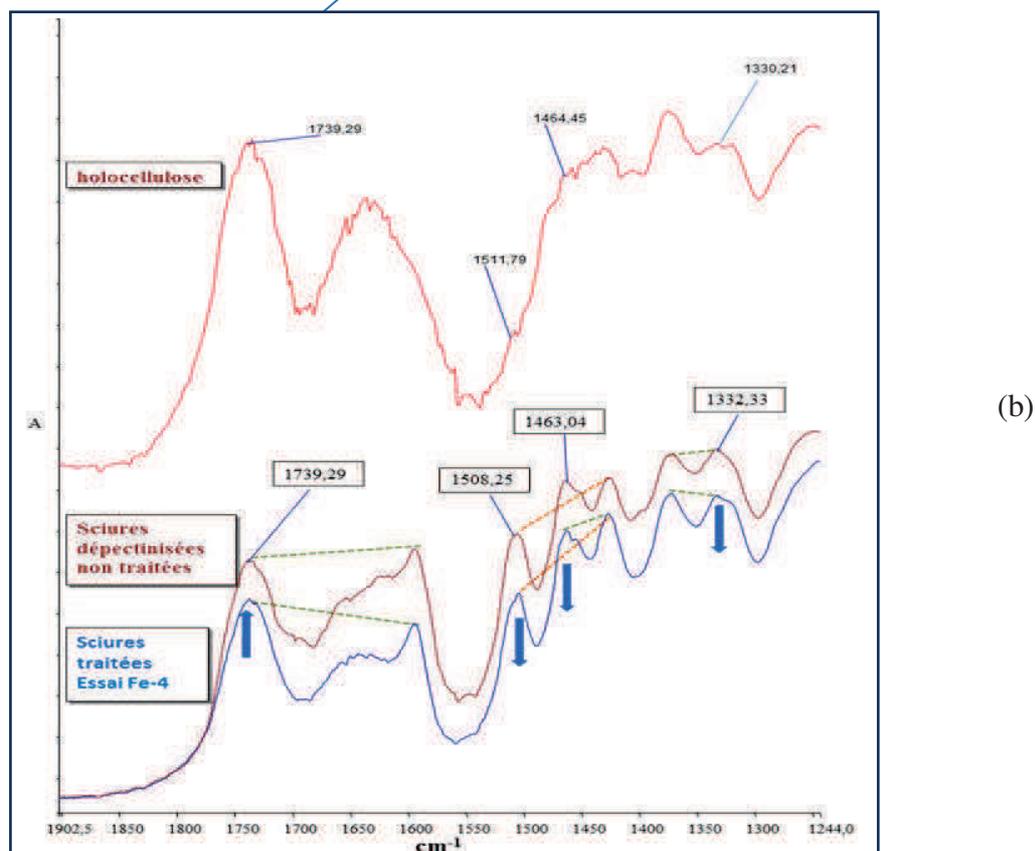
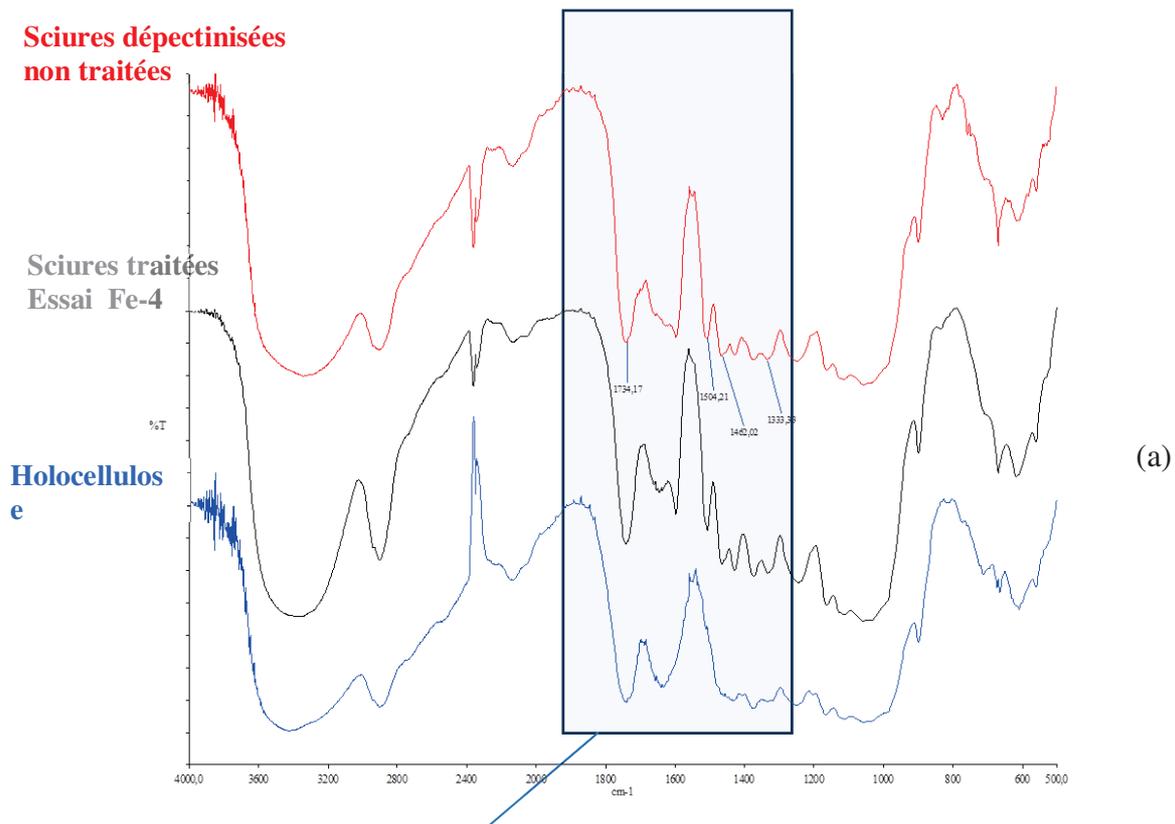


Figure 76: (a) Spectre FT-IR de différents échantillons: en rouge les sciures dépectinisées non traitées, en bleu l'holocellulose, en noir l'essai Fe-4. (b) agrandissement de la zone 1200-1800 cm^{-1} reporté en absorbance (spectres normalisés).

Lors de l'examen d'un spectre infrarouge d'une matière lignocellulosique comme les sciures de bois de feuillu, bien qu'il soit difficile d'en proposer une interprétation détaillée complète compte tenu de la diversité moléculaire constitutive des substrats, il nous est toutefois possible d'en préciser, en nous appuyant sur les données de la littérature, quelques vibrations caractéristiques pouvant être attribuées aux lignines. Nous nous intéresserons particulièrement aux bandes d'absorption situées entre 1610 et 1740 cm^{-1} attribuées par Hergert et al.^{182,183} aux vibrations des groupes carbonyle (occupants des positions α ou β), aux vibrations des liaisons C=C des cycles aromatiques situé à 1600 et 1500 cm^{-1} ,^{184,182,185} aux vibrations de déformation des groupes $-\text{CH}_2-$ et $-\text{OMe}$ vers 1460 cm^{-1} ,¹⁸⁵ ou encore une bande caractéristique des vibrations de groupements hydroxyle de phénol vers 1330 cm^{-1} .¹⁸⁶

Ces bandes, à l'exception de celle des carbonyles, sont logiquement quasi absentes du spectre de l'holocellulose. L'analyse fine de l'agrandissement de la zone 1200-1800 cm^{-1} , présentée en absorbance sur la figure précédente présente quelques légères différences entre les spectres des sciures dépectinisées et des sciures traitées par la porphyrine de fer : on observe une légère diminution des intensités relatives des bandes à 1500, 1460, et 1330 cm^{-1} , témoignant d'une diminution du taux de lignines par rapport à la fraction polysaccharidique. Cette observation semble confirmer que le traitement a permis une extraction partielle des polyphénols. En outre, on constate que l'intensité relative de la bande correspondant aux vibrations de carbonyle augmente légèrement. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'une suroxydation des fractions polysaccharidiques avec génération de groupements aldéhyde par coupure oxydante ou dépolymérisation. Elle peut être également la conséquence d'une attaque simplement partielle des lignines, insuffisante pour en provoquer l'extraction massive mais conduisant néanmoins à une modification structurale par apparition de fonctions carbonyle (oxydation d'alcool ou encore de double liaison sans dépolymérisation importante). La complexité des spectres dans cette zone d'intérêt ne permet malheureusement pas de tirer de conclusion plus précise.

¹⁸² Hergert, H.L., *Journal of Organic Chemistry*, **1960**, 25, 405-413

¹⁸³ Hergert, H.L. ; Kurth, E.F., *Journal of the American Chemical Society*, **1953**, 75, 1622-1625

¹⁸⁴ Kudzin, S.F. ; Nord, F.F., *Journal of the American Chemical Society*, **1951**, 73, 690-693

¹⁸⁵ Durie, R.A. ; Lynch, B.M. ; Sternhell, S., *Australian Journal of Chemistry*, **1960**, 13, 156-168

¹⁸⁶ Lindberg, J.J., *Paperi ja Puu*, **1961**, 43, 672-678

b. Caractérisation par CPG des sciures obtenues

La composition mono-saccharidique des sciures délignifiées par les porphyrines a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, après une étape d'hydrolyse/dérivatisation par méthanolyse et silylation. (Tableau 19)

Tableau 19: Composition mono-saccharidique des sciures délignifiées par la porphyrine au manganèse (% molaire)

Echantillon	Ara	Rha	Xyl	GalA	Gal	Man	Glc	4-O-MeGlcA
Fe-1	2,4	1,8	70,7	11,6	0	0	8	5,6
Fe-2	3,4	2,5	78,5	2,2	0,4	2,2	4,8	6
Fe-3	3,5	2,1	72,5	9,1	0,4	0	4,2	8,2
Fe-4	2,9	2,2	76,5	4,1	0,3	2,4	5,8	5,8
Fe-5	2,4	2,7	74,5	6,3	0,8	2,7	2,5	8,1
Fe-6	2,7	3,1	72	6,9	1	2,6	3,1	8,6
Fe-7	2,7	2,8	72,8	6,8	0,9	2,8	2,8	8,4
Fe-8	2,3	2,7	75,3	5,3	0,6	2,5	3,8	7,5
Fe-9	2,7	3,1	71,4	7,3	1	2,8	2,9	8,8
Fe-10	2,9	2,6	78,1	3	0,4	2,2	4,7	6,2
Mn-1	3	2,5	75,5	5,4	3,2	2,8	2,5	5,1
Mn-2	3,5	2,9	71,9	6,4	0,9	4,3	4,4	5,7
Mn-3	1,3	3,3	76,2	4,9	1,7	1,8	4,1	6,7
Mn-4	1,4	3,7	73,3	8,1	1,4	0,2	4,3	7,6
Mn-5	3,6	3,1	72,7	7,4	4,2	1,5	3,2	4,3
Mn-6	2,7	3,4	79	3,2	4,2	0,7	3,1	3,7
Mn-7	2,6	3,1	70,3	7,6	4,4	1,7	3,4	6,9
Mn-8	4,5	3,1	73,6	6,2	1,7	1,5	3,5	5,9
Mn-9	1,2	3,3	70,9	5,1	5,2	3,3	3,7	7,3
Mn-10	1,5	3,7	69,7	8,8	1,6	1,4	4,2	9,1

Le procédé de préparation d'échantillon n'affectant que très peu la cellulose, résistante aux conditions de méthanolyse, il est normale de n'observer majoritairement que du xylose et des acides 4-O-Me-glucuroniques, en des proportions classiques pour des hémicelluloses de bois de feuillu. Dans une moindre mesure, l'analyse des résidus révèle la présence d'acide galacturonique, provenant de pectines résiduelles ou encore de glucose correspondant à la faible proportion de cellulose affectée par la méthanolyse. Ainsi, la structure chimique des polysaccharides constitutifs du résidu solide après traitement par les porphyrines ne semble pas avoir été profondément modifiée.

c. Caractérisation du filtrat de délignification

L'analyse des filtrats obtenus après filtration des sciures traitées aux porphyrines a été réalisée d'une part par spectroscopie d'absorption UV-Visible et d'autre part par chromatographie en phase gaz. L'examen des spectres UV-Visibles des filtrats, comme le montre le spectre donné en exemple Figure 77, renseigne sur plusieurs points. Tout d'abord, ils indiquent qu'en fin de réaction le catalyseur est toujours présent dans le milieu réactionnel, témoignant ainsi d'une plus grande stabilité de ces macrocycles comparativement à la phtalocyanine de l'étude initiale et validant ainsi, pour ce critère, la pertinence du choix des structures. En effet, mesurés dans l'eau, les spectres laissent clairement apparaître la bande de Soret caractéristique de la porphyrine et les bandes Q associées, avec toutefois un léger effet bathochrome. La mesure précise des volumes de solvant pour la préparation de l'échantillon a permis de déterminer la quantité résiduelle de porphyrine en fin de réaction. Nous avons ainsi pu établir que pour les temps de réaction les plus longs (100h), la quantité de catalyseur encore présente représente 25% de la quantité initiale, et cela quel que soit le catalyseur (fer ou manganèse). Pour les temps testés les plus courts (2h), plus de 90% du catalyseur est présent en fin de processus.

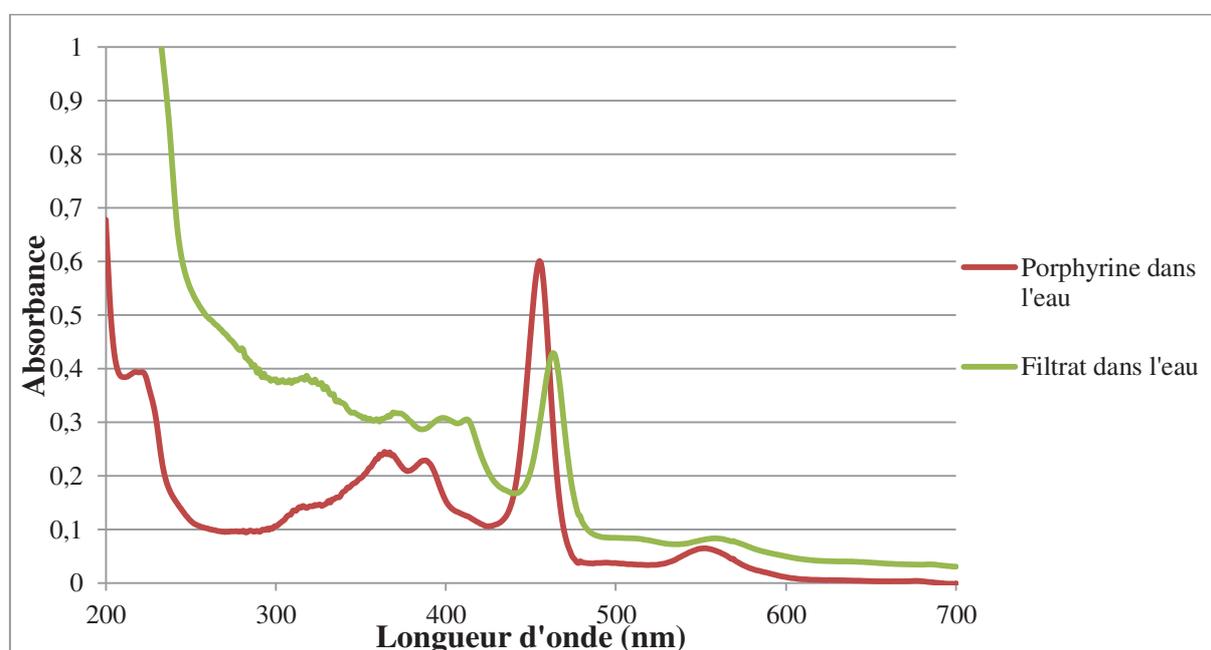


Figure 77: Spectre UV-Visible dans l'eau de la porphyrine métallée au manganèse et du filtrat issu de Mn-4

Les spectres présentent également, outre les signaux caractéristiques de la porphyrine, une zone d'absorbance intense entre 250 et 350nm (nettement plus intense que dans le cas du

spectre de la porphyrine seule) pouvant raisonnablement être attribuée à des composés phénoliques ou oligo-phénoliques provenant de la dégradation des lignines.

Par ailleurs, il est important de noter que les masses de composés récupérés après élimination des sciures par filtration et évaporation du solvant de réaction ne correspondent pas aux pertes de masse enregistrée en fin de réaction par pesé des sciures, discutées dans les

Tableau 15 et Tableau 16, et sont dans tous les cas plus faible. Ceci suggère qu'une partie des produits de dégradation des sciures de départ est soit éliminée par évaporation durant la réaction soit co-évaporée lors de l'élimination du solvant. Ce pourrait être le cas de produits issus de l'hydrolyse et oxydation partielles des polysaccharides. Nous avons donc réalisé pour quelques essais une analyse par chromatographie phase gaz des filtrats après dérivatisation par méthanolyse puis per-silylation. Nous présentons à titre d'exemple les résultats obtenus pour l'essai Mn-4 sur le Tableau 23.

Tableau 20: Composition mono-saccharidique de l'extrait du filtrat Mn-4

Echantillon	Ara	Rha	Xyl	GalA	Gal	Man	Glc	4-O-MeGlcA
Mn-4	12,9	11,4	20,6	10,7	12,5	12,9	19,1	Traces

Le chromatogramme obtenu pour cet essai, à l'image de ceux enregistrés pour les autres, montre en premier lieu que, compte tenu des très faibles intensités relatives des pics correspondant aux monosaccharides, la teneur en sucre des filtrats est faible. En outre la distribution observée semble indiquer que les sucres réputés minoritaires dans les sciures sont extraits en quantités comparables au xylose et au glucose. Ceci renforce l'hypothèse d'une dégradation des polysaccharides, qui rappelons-le n'est plus à démontrer compte tenu des fortes pertes de masses relevées, par hydrolyse et oxydation partielles majoritairement en composés volatils éliminés au cours ou en fin de procédé et que très minoritairement en monosaccharides. En effet une simple dépolymérisation des hémicelluloses et /ou de la cellulose devrait à l'inverse conduire à une proportion importante de xylose ou de glucose dans le filtrat ce qui n'est pas le cas. Notons enfin que le chromatogramme présente une série de pics à des temps de rétention compris entre 10 et 15 minutes ne correspondant pas au témoin de monosaccharides et possiblement attribuables aux dérivés phénoliques mis en évidence par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

III. Bilan de la délignification par les macrocycles tétrapyrroliques

La délignification au chlorite de sodium, largement décrite et couramment utilisée en laboratoire, est une méthode particulièrement efficace. La mesure du nombre Kappa des sciures délignifiées par ce procédé ainsi que l'analyse par spectroscopie Infrarouge de l'holocellulose obtenue nous indique d'une part que la quasi-totalité des lignines sont dégradées et éliminées et d'autre part que le traitement est sélectif des polyphénols, préservant la structures des hémicelluloses et de la cellulose ceci ayant par ailleurs été largement démontré. Pour tenter de répondre en partie aux principaux enjeux de l'innovation dans les industries entres autres papetières, nous nous sommes intéressés au pouvoir catalytique de macrocycles tétrapyrroliques pour proposer de nouvelles méthodes de délignification respectant les principaux critères d'une chimie plus respectueuse de l'environnement.

Ainsi, l'utilisation d'une phthalocyanine de fer hydrosoluble, déjà en partie étudiée pour cette application au laboratoire s'est avérée intéressante. Bien que très peu efficace sur des sciures dépectinisées brutes, son potentiel est révélé lorsque son action est conjuguée à des prétraitements physiques du matériel de départ conduisant à des pertes de masse significatives, pouvant atteindre 30% de la masse initiale correspondant à une atteinte plutôt sélective des lignines comme en témoigne les faibles indices Kappa mesurés pour les résidus obtenus. Toutefois, cette sélectivité n'est pas totale, la fraction polysaccharidique étant également affectée en partie par le traitement. En outre, la mise en œuvre, à grande échelle des prétraitements par ultrasons ou micro-ondes pourraient constituer à l'évidence un frein au développement d'une telle stratégie. Enfin, le catalyseur est relativement instable dans les conditions oxydantes d'utilisation. Pour améliorer ces différents points nous avons développé puis testé des structures de porphyrines métallées au fer ou au manganèse. Globalement et quel que soit le métal utilisé, ces catalyseurs se sont révélés nettement plus stables et plus actifs que la phthalocyanine provoquant des pertes de masses conséquentes à des temps de réaction bien plus courts et cela sans que des prétraitements ne soient nécessaires. Toutefois nous avons pu montrer par l'analyse des résidus que ce procédé ne conduit qu'à une très faible sélectivité pour les lignines, la fraction de polysaccharide étant également massivement affectée par les réactions d'oxydations. Ainsi, si ces catalyseurs semblent décevant au regard des objectifs initiaux qui étaient rappelons-le d'atteindre par une méthode de chimie verte une délignification complète et sélective concurrentielle des procédés classiques, les *meso-*

arylporphyrines, décrites dans cette étude, associées à de l'eau oxygénée forment un milieu réactionnel suffisamment agressif pour conduire à une déconstruction/dégradation significative du bois et la production de petites molécules potentiellement d'intérêt, étendant ainsi leur potentiel d'application à des secteurs variés comme par exemple la production de biocarburant à partir du bois ou encore la préparation de plateformes moléculaires pour les industries de la chimie fine.

Dans le cadre du programme de recherche du laboratoire traitant de la valorisation des coproduits générés par les industries agricoles et forestières en particulier, soutenu entre autre organisme par la région Limousin, nous avons souhaité, dans la suite de cette étude, accorder une importance particulière à l'étude de l'impact des procédés de délignification précédemment décrits sur la structure et les propriétés des hémicelluloses de bois de châtaignier. En effet, cette classe de composés, comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce document, possède un fort potentiel de valorisation dans des domaines d'application variés, dépendant des variabilités structurales de ces polysaccharides imposées soit par la variabilité même des ressources naturelles exploitées, soit par les procédés d'obtention mis en œuvre pouvant générer d'importantes et intéressantes modifications chimiques des polymères natifs. Ainsi, dans la suite de ce travail nous présentons et discutons les résultats relatifs à l'extraction, selon deux stratégies, et la caractérisation des hémicelluloses de bois de châtaignier obtenues après délignification soit par le procédé classique aux chlorites de sodium, soit par la méthodologie précédemment discutée utilisant une phtalocyanine de fer. Sur la base des structures moléculaires déterminées, nous proposons ensuite une étude des propriétés anti-oxydantes de ces polysaccharides, dans le but d'explorer leurs applications industrielles potentielles comme agent de conservation.

Chapitre 2 : Extraction des hémicelluloses

L'étude détaillée de la littérature dans le domaine de l'extraction des hémicelluloses fait état de l'existence, rappelons-le, d'un grand nombre de protocoles. Cette observation ne trouve son explication que dans la grande variété des structures hémicellulosiques identifiées au sein de la paroi cellulaire végétale. Dans le cas de l'extraction à partir du bois, les xylanes, qui en sont les principales hémicelluloses, sont classiquement recueillies après délignification par le chlorite de sodium par une extraction alcaline. Toutefois, il convient de rappeler que quelle que soit la méthode d'extraction, le fait d'extraire un polysaccharide de son milieu introduit une modification de structure par rapport à l'état natif *in situ*. Ainsi lors de l'extraction alcaline, il peut se produire des saponifications, provoquant l'élimination des groupements acétyle, des acides phénoliques et des fonctions méthylées portées par les acides uroniques.¹⁸⁷ La structure des hémicelluloses ainsi obtenues n'est plus complètement représentative du polysaccharide dans la paroi cellulaire. En outre, l'étape préliminaire de délignification, impact également l'extraction des hémicelluloses. En effet, la présence d'une trame polyphénolique formée par la lignine, ainsi que l'existence de liaisons chimiques entre les différentes hémicelluloses qui constituent la paroi, et entre les hémicelluloses, la lignine et la cellulose s'opposent à l'extraction efficace des xylanes. En agissant sur ces liaisons, la délignification conditionne à la fois l'extractibilité et la structure des hémicelluloses. Ainsi, les propriétés (chimiques, physico-chimiques ou encore biologiques) portées par les hémicelluloses sont étroitement liées au procédé global d'obtention.

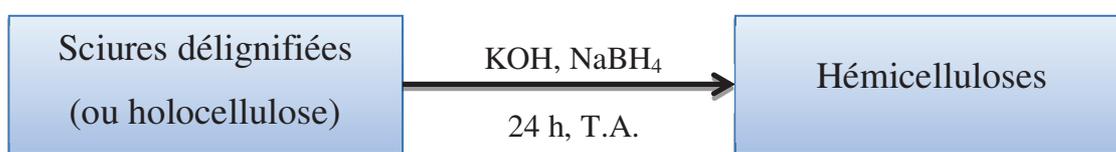
Afin d'accéder à des hémicelluloses au potentiel de valorisation varié, et en nous appuyant sur les procédés de délignification discutés dans le chapitre précédant, nous avons tout d'abord étudié l'influence du protocole de délignification utilisé sur la structure des hémicelluloses extraites en milieu alcalin. Nous nous sommes également intéressés à la nature des hémicelluloses pouvant être extraites simplement à l'eau chaude, à partir de résidus partiellement délignifiés, procédé plus doux devant préserver en partie la structure des hémicelluloses natives.

¹⁸⁷ Whistler, R.L.; Richards, E.L., *Hemicelluloses*, Academic Press, New York, **1970**, 447-469.

I. Extraction en milieu alcalin

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'extraction alcaline des hémicelluloses sur l'holocellulose, obtenue par délignification au chlorite de sodium, mais également sur le résidu des sciures délignifiées par le système FePcS/H₂O₂. Rappelons que ce dernier, s'il ne permet qu'une délignification que très partielle, est, en comparaison au système utilisant des porphyrines de fer ou de manganèse, le plus sélectif des lignines en préservant en grande partie la structure des polysaccharides.

A partir du résidu délignifié, l'extraction est réalisée à température ambiante par une solution de potasse concentrée (4,3 mol.L⁻¹).



L'utilisation de solutions alcalines concentrées peut engendrer en présence d'oxygène, un « peeling » de la chaîne liée en $\beta(1\rightarrow4)$: les groupements hydroxyle libres de l'extrémité réductrice sont oxydés, divers intermédiaires réactionnels sont alors produits avant d'être β -éliminés et de laisser paraître un nouveau groupement réducteur. Ce phénomène est récurrent et se propage le long de la chaîne jusqu'à un point de branchement. Il peut être évité par l'élimination de l'oxygène du milieu en travaillant sous atmosphère inerte ou par réduction du groupement réducteur sous l'action de NaBH₄.¹⁸⁸ C'est cette dernière condition que nous avons mis en œuvre.

Après 24 heures de temps de contact, le résidu cellulosique est éliminé par filtration et lavé plusieurs fois à l'eau. Le filtrat est alors neutralisé par de l'acide acétique glaciale et mis en dialyse dans des membranes dont le seuil de coupure est de de 6-8 kDa pendant 48 heures. La solution récupérée est précipitée par ajout de 3 volumes d'éthanol, centrifugée et le culot est repris dans l'eau, évaporé et de nouveau repris dans l'eau pour être finalement lyophilisé.

Tableau 21: Résultats d'extraction alcaline des différents traitements de délignification

¹⁸⁸ Whistler, R.L.; BeMiller, J.N., *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **1958**, 13, 289-329.

Traitement de délignification	Masse de départ de résidu délignifié (g)	Masse finale (g)	Rendement par rapport aux sciures brutes (%)
Chlorites acides	5	1,6	17
FePcS/H ₂ O ₂	3,6	0,35	4,5

A partir de 5 grammes d'holocellulose (obtenue par traitement aux chlorites acides), on obtient 1,6 gramme d'hémicelluloses soit un rendement de 17% par rapport aux sciures brutes. D'un point de vue quantitatif, cette extraction est donc efficace, compte tenu des teneurs moyennes en hémicelluloses couramment observées pour le bois de châtaignier, établies à environ 20% de la masse totale. (Tableau 21)

Après une purification identique à l'extraction à partir d'holocellulose, une masse de 350 mg d'extrait est obtenue à partir du résidu obtenu par le protocole de délignification utilisant la tétrasulfophtalocyanine de fer, soit un rendement de seulement 4,5 % par rapport aux sciures brutes. En outre, dans ce cas, d'un point de vue qualitatif l'extrait présente un aspect nettement différent, les hémicelluloses obtenues étant de couleur grisâtre, suggérant une co-extraction de composés habituellement dégradés par l'étape de délignification au chlorite de sodium.

En nous basant sur les résultats obtenus à partir de l'holocellulose, il est possible de compléter la composition moléculaire des sciures de bois de châtaignier présentée dans le premier chapitre en précisant la répartition pondérale entre hémicellulose et cellulose. (Figure 78)

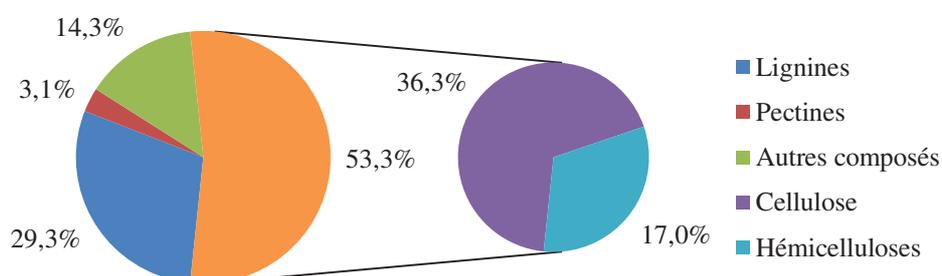


Figure 78: Répartition massique de l'ensemble des composés du bois de châtaignier.

En orange : l'holocellulose.

II. Caractérisation des extraits

II.1. Composition centésimale

La caractérisation chimique préliminaire des hémicelluloses des sciures de châtaignier repose sur 3 dosages complémentaires :

- le dosage des oses totaux par la méthode de Dubois.¹²⁰
- le dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen¹²².
- la méthode de Lever¹²¹ permettant quant à elle de quantifier les oses réducteurs. Il est alors possible d'estimer également le degré de polymérisation (DP) en comparant les teneurs en sucres réducteurs à celles des oses totaux.

Les dosages sont effectués en triplicat pour chaque concentration. Ainsi, la composition et les degrés de polymérisation des hémicelluloses de châtaignier, extraites en milieu alcalin, sont donnés dans le Tableau 22 ci-dessous, pour les deux protocoles de délignification utilisés dans cette étude :

Tableau 22: Composition centésimale des filtrats (%massique) et degré de polymérisation (DP)

Traitement de délignification	% oses neutres	% acides uroniques	DP
Chlorites acides	82,6	17,4	205
FePcS/H ₂ O ₂	89	11	477

La composition centésimale des filtrats, avec en particulier une teneur en acide uronique de 11 et 17% selon les cas est conforme à l'idée que l'on se fait de l'acidité de la fraction hémicellulosique de bois de feuillu. Par ailleurs, le degré de polymérisation de l'hémicellulose extraite après délignification aux chlorites acide est estimé à 205, ce qui là encore est une valeur classiquement observée pour les fractions hémicellulosiques de bois de feuillus obtenues par ce procédé. En revanche, pour l'extrait polysaccharidique obtenu en milieu alcalin après traitement à la phtalocyanine, nous avons déterminé un DP moyen de 477, à chaque fois confirmé par plusieurs prises d'essai indépendantes. L'obtention dans ce cas d'une hémicellulose avec un tel DP, inhabituel, peut raisonnablement s'expliquer par le caractère nettement moins agressif du traitement à la phtalocyanine de fer en comparaison au chlorite de sodium. En effet, si ce dernier peut sans doute induire une légère hydrolyse des

polysaccharides pariétaux, il semblerait à l'inverse, comme nous l'avons déjà indiqué dans le chapitre précédent, que la structure des polysaccharides soit en grande partie préservée lors du traitement par le système FePcS/H₂O₂. Le degré de polymérisation des hémicelluloses alors extraites en milieu alcalin serait plus représentatif de celui de cette famille de molécule à l'état natif.

II.2. Composition mono-saccharidique

L'analyse de la composition monosaccharidique des extraits a été réalisée par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) après hydrolyse et dérivation à partir des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 23. Constitués essentiellement de xylose et d'acide 4-*O*-méthylglucuronique, ils présentent les caractéristiques chimiques distinctives d'un 4-*O*-méthylglucuronoxylane, représentant dans tous les cas plus de 90% en masse de la fraction polysaccharidique étudiée. Ainsi nous appellerons xylane KOH l'extrait obtenu à partir d'holocellulose et xylane KOH_{FePcS} celui extrait à partir des sciures délignifiées par la phtalocyanine.

Tableau 23: Composition mono-saccharidique des xylanes extraits (%molaire)

	Rha	Xyl	Fuc	Gal	Glc	4-<i>O</i>-MeGlcA
Xylane KOH	0	82,5	0	Traces	Traces	16,6
Xylane KOH_{FePcS}	3,1	84,1	2,2	Traces	Traces	6,7

S'agissant des rapports molaires Xyl/4-*O*-MeGlcA, ils sont d'environ 5 et 12 unités xylose pour une unité d'acide 4-*O*-méthylglucuronique. Les xylanes extraits du châtaignier, quel que soit le protocole de délignification, sont donc riches en acide uronique, ce qui est en accord avec les taux classiquement rapportés pour les bois de feuillus (Tableau 24). Le plus faible taux d'acide uronique mesuré pour le xylane extrait après délignification par le système FePcS/H₂O₂ s'avère, à ce stade, difficile à expliquer. Nous pouvons néanmoins émettre l'hypothèse raisonnable que les conditions plus douces de délignification aient pu préserver certaines fonctions ester impliquant les groupes carboxyliques des acides uroniques empêchant ainsi leur quantification par le dosage mis en œuvre et se traduisant par une possible sous-estimation de ces motifs.

Tableau 24: Rapports molaire (Xyl/4-O-MeGlcA) de quelques glucuronoxylanes extraits de différentes essences forestières.

Origine	Xyl/4-O-MeGlcA	Référence
Bois de hêtre	6,7 :1	Toman <i>et al.</i> (1986) ¹⁸⁹
Bois de peuplier	8,3 :1	Jacobs <i>et al.</i> (2001) ¹⁹⁰
Bois de bouleau	11 :1/20 :1	Jacobs <i>et al.</i> (2001) ¹⁹⁰
Bois de bouleau blanc (<i>Betula Papyrifera</i> , Marsh)	12 :1	Bowering <i>et al.</i> (1961) ¹⁹¹

II.3. Analyse RMN : structure des hémicelluloses

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés dans l'eau lourde (D₂O) et la Figure 84 présente le spectre de RMN ¹H obtenu pour le 4-O-méthylglucuronoxylane extrait après délignification classique au chlorite de sodium.

Des données bibliographiques ainsi que l'interprétation des spectres 2D (COSY et HMQC) ont permis d'attribuer les différents signaux (Tableau 25). Le spectre RMN ¹H fait apparaître des signaux intenses correspondant aux protons des unités xylose de la chaîne principale non substitués, ainsi que des signaux moins intenses attribués aux unités d'acide uronique et aux unités xylose qui les portent en position 2. L'intensité de ces signaux dépend du taux de substitution par l'acide uronique, qu'il est alors possible de calculer à partir des courbes d'intégration de signaux bien choisis. Par cette méthode, on retrouve un rapport xylose/acide uronique de 5 pour 1, conforme à celui donné par l'analyse CPG. Les doublets attribués aux protons anomériques des unités xylose, substituées (4,5 ppm) ou non (4,6 ppm), sont associés à une constante de couplage d'environ 7 Hz, caractéristique d'une liaison osidique de type β. La constante de couplage du doublet correspondant aux protons anomériques de l'acide uronique, à 5,3 ppm, est quant à elle de l'ordre de 2 Hz, ce qui caractérise une liaison osidique de type α. Il est par ailleurs possible de mettre en évidence, à l'aide des expériences 2D de corrélation hétéronucléaire longue distance le signal vers 3,4 ppm associé aux groupements méthyle portés, compte-tenu de l'intégration, par l'acide uronique. Cette dernière remarque

¹⁸⁹ Toman, R. ; Kohn, R. ; Malovikova, A. ; Rosik, J., *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1981**, 46, 1405-1412

¹⁹⁰ Jacobs, A. ; Larsson, P.T. ; Dahlman, O., *Biomacromolecules*, **2001**, 2, 979-990

¹⁹¹ Bowering, W.D.S. ; Marchessault, R.H. ; Timell, T.E., *Svensk Papperstidning*, **1961**, 64, 191-194

confirme la présence de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique. Celui-ci est fixé en position 2 du xylose, ce qui se traduit par un déblindage plus important du H2 par rapport aux unités xylose non substituées.

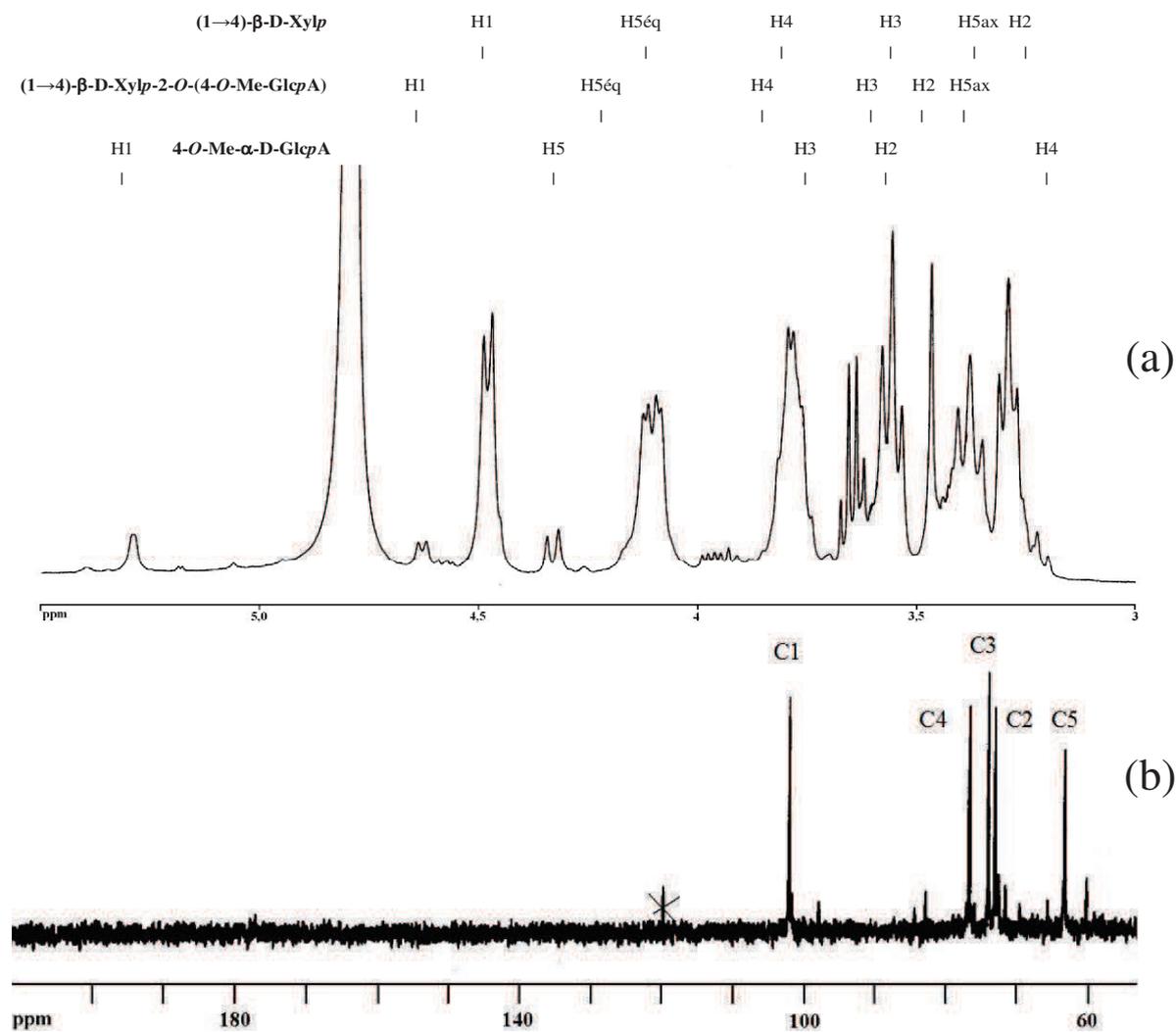


Figure 79: Spectre RMN ¹H du xylane KOH dans D₂O. (b) : Spectre RMN ¹³C du xylane KOH dans D₂O. Seules les attributions correspondant aux carbones des unités de xylose non substituées sont indiquées.

Tableau 25 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques du xylane (D₂O):

Résidus glycosidiques		Déplacements chimiques en ppm (J en Hz)				
		1	2	3	4	5
(1→4)-β-D-Xylp	¹ H	4,48 (7,5)	3,29 (8,2)	3,55 (9,0)	3,79	4,10 (4,5 ; 11,5) ; 3,38 (11,0)
	¹³ C	102,09	73,11	74,07	76,76	63,38
(1→4)-β-D-Xylp-2-O-(4-O-Me-GlcA)	¹ H	4,63 (7,2)	3,44	3,62	3,81	4,15 ; 3,42
	¹³ C	101,79	76,03	71,67*	74,21	63,20
4-O-Me-α-D-GlcA	¹ H	5,29 (2,0)	3,60	3,76	3,22 (9,7) (3,46, OCH ₃)	4,33 (10,1)
	¹³ C	97,94	72,64*	77,22	82,89 (60,29, OCH ₃)	72,76* (177,21, COOH)

*valeurs interchangeables

Le spectre ¹³C montre également deux groupes de signaux ; certains, de forte intensité, correspondent aux carbones des résidus xylose non substitués, les autres étant attribués aux xyloses substitués et aux résidus 4-O-MeGlcA. La présence de l'acide 4-O-méthylglucuronique est là aussi confirmée par la présence d'un signal à 177 ppm correspondant au groupement carboxyle et celle vers 60 ppm d'un signal d'un groupement méthyle.

II.4. Analyse par spectrométrie de masse

Cette méthode (chapitre I) consiste, par simple chauffage à l'étuve et sous l'effet de l'acidité apportée par les fonctions carboxyliques, à hydrolyser partiellement le polymère. Cette technique d'hydrolyse douce permet l'obtention de fragments relativement importants, plus caractéristiques de la structure du polymère. La spectrométrie de masse MALDI, illustrée par le profil présenté Figure 80, fait apparaître deux séries d'oligosaccharides : une première montrant des oligosaccharides constitués uniquement de xylose et une seconde révélant des oligomères ne comportant qu'une seule unité d'acide 4-O-méthylglucuronique, et comportant 4 à 12 xyloses.

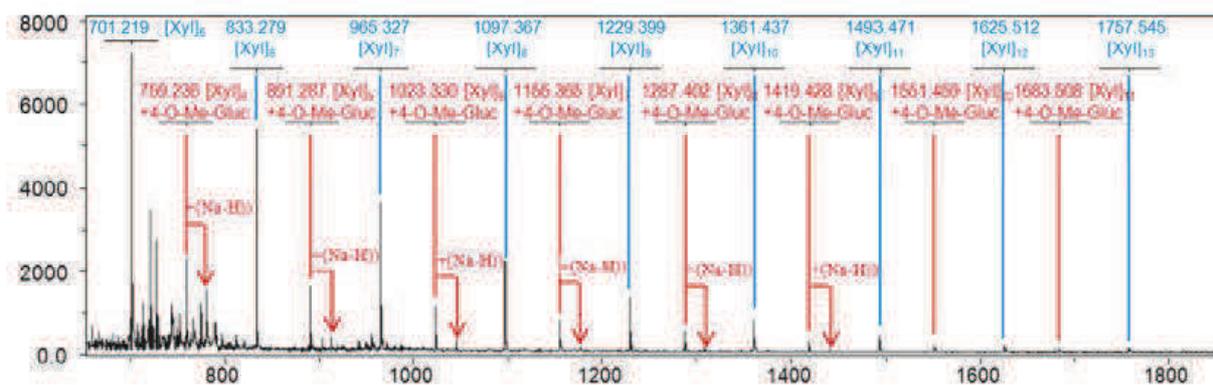


Figure 80: Spectre MALDI du Xylane KOH après autohydrolyse

Plus précisément, il est possible sur le spectre d'identifier des oligosaccharides neutres formés de 5 à 13 unités xyloses de masses comprises entre 701 et 1889 g.mol⁻¹ et des oligosaccharides acides de masse comprises entre 759 à 1815 g.mol⁻¹ ce qui correspond aux motifs notés Xyl₄+4-O-MeGlcA à Xyl₁₂+4-O-MeGlcA.

Les différentes analyses présentées permettent de présenter un modèle structural du xylane de châtaignier (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**81), sur la base des compositions chimiques obtenues par analyse CPG et de l'analyse RMN des xylanes extraits des sciures de châtaignier.

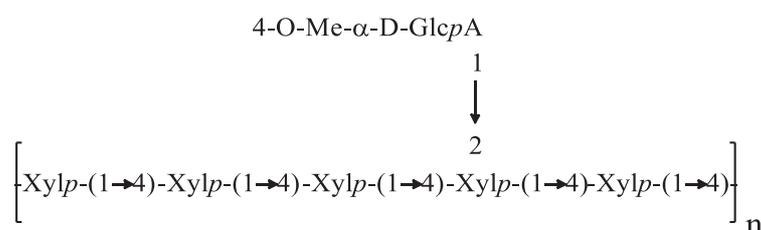


Figure 81: Structure du 4-O-Méthylglucuronoxylane de hêtre et de châtaignier

Ils sont constitués d'une chaîne de xylopyranose liés en β(1→4) et substitués en position 2 des unités xylose par des unités d'acide 4-O-méthylglucuronique, acide identifié comme le seul présent dans ces xylanes, ce qui est généralement le cas pour la plupart des xylanes isolés de végétaux. Les xylanes de châtaignier sont des polysaccharides acides comme en témoigne leur fort taux de substitution par les fonctions carboxylates.

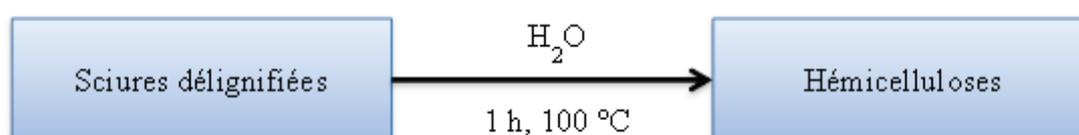
Comme nous l'avons précisé précédemment la structure d'une hémicellulose, telle qu'elle est renseignée par les méthodes de caractérisation habituellement utilisées est

fortement dépendante des protocoles d'extraction et/ou de prétraitement mis en œuvre et ne reflète pas forcément celle du polymère à l'état natif. Ceci a par exemple été illustré par la détermination du DP, conditionné par l'agressivité plus ou moins importante du protocole de délignification employé. En outre, l'extraction en milieu alcalin, si elle permet d'obtenir de bons rendements de récupération à partir de sciures délignifiées par le chlorite de sodium, conduit inévitablement à une perte d'information sur la structure de l'hémicellulose native. Dans le but d'enrichir nos connaissances concernant la nature des interactions chimiques et en particulier des liaisons impliquées dans le réseau macromoléculaire formé entre hémicellulose et lignine d'une part et pour accéder à des structures originales aux propriétés potentiellement intéressantes, nous avons dans la suite du travail réalisé l'extraction des hémicelluloses du bois de châtaignier en condition douce, utilisant uniquement l'eau comme solvant.

III. Extraction à l'eau

Comme pour les extractions en milieu alcalin, les extractions dans l'eau ont été réalisées à partir de la sciure délignifiées par le chlorite de sodium ou par le système phtalocyanine/H₂O₂.

Plus précisément, elles sont conduites à reflux de l'eau, sous agitation, pendant une heure. Après refroidissement, les polysaccharides solubilisés sont récupérés par filtration des sciures résiduelles puis purifiés par ultrafiltration avec une membrane dont le seuil de coupure est de 1 kDa.



Le suivant tableau présente les rendements obtenus exprimés par rapport à la masse de sciures brutes engagée dans l'extraction.

Tableau 26: Résultats d'extraction aqueuse des hémicelluloses à partir des résidus délignifiés

Traitement de délignification	Masse de départ de résidu délignifié (g)	Masse finale (g)	Rendement par rapport aux sciures brutes (%)
Chlorites acides	5	-	-
FePcS/H ₂ O ₂	3,6	0,085	1,1 %

L'extraction menée à partir de 5g d'holocellulose (traitée par les chlorites acides) ne permet pas d'extraire une quantité significative d'hémicelluloses. Pour l'extraction après traitement à la phtalocyanine, on obtient, après ultrafiltration et lyophilisation de l'extrait, 85 mg d'une fraction représentant un rendement de 1,1 % par rapport aux sciures brutes. Les hémicelluloses sont obtenus sous la forme d'une poudre brune, d'aspect donc très différent des xylanes KOH décrits précédemment. Ce résultat intéressant nous conduit à formuler plusieurs hypothèses. Tout d'abord, la très faible extractibilité des hémicelluloses (bien que solubles dans l'eau) formant l'holocellulose pourrait s'expliquer par la sélectivité reconnue du traitement de délignification au chlorite pour les lignines, préservant le complexe cellulose/hémicellulose et donc rendant ces dernières moins accessibles au solvant. En outre, si l'on admet que les molécules de plus faible degré de polymérisation peuvent être extraites ou dégradées lors du traitement au chlorite de sodium, il semble alors logique qu'un simple traitement à l'eau chaude ne suffise pas à rompre les interactions fortes entre cellulose et hémicellulose de DP important, ce qui se traduit par un rendement de récupération quasi nul. Rappelons en effet que la potasse, lors des extractions alcalines, joue un rôle essentiel dans la déstructuration des complexes d'holocellulose, en cassant des liaisons hydrogène entre autre action, pour permettre la solubilisation des hémicelluloses. S'agissant de l'extraction menée à partir des sciures traitées par le système phtalocyanine/H₂O₂, l'extraction à l'eau chaude d'une quantité non négligeable de polysaccharide suggère alors que le prétraitement à la phtalocyanine, moins sélectif comme nous l'avons vu, doit amorcer une déstructuration partielle du complexe cellulose/hémicellulose, tout en préservant la structure de ces dernières. Il est également possible que soient préférentiellement solubilisées dans ce cas des chaînes poly-osidiques de degré de polymérisation plus faible, plus accessibles par le solvant et non dégradées par ce prétraitement doux (à l'inverse du traitement au chlorite de sodium). Bien que le rendement d'extraction soit faible, plusieurs essais impliquant l'ensemble des étapes du protocole de fractionnement ont été réalisés et démontre qu'il est possible, au moins d'un point de vue quantitatif, de recueillir cette fraction, de structure et de propriétés potentiellement intéressantes, de façon reproductible. Nous proposons dans la suite l'étude plus détaillée de sa structure.

IV. Caractérisation du xylane extrait à l'eau chaude

IV.1. Composition centésimale

La composition centésimale de l'extrait à l'eau obtenu à partir des sciures traitées à la phtalocyanine a été déterminée grâce aux trois mêmes dosages que pour les hémicelluloses extraites en milieu alcalin (Tableau 27). Ainsi, nous pouvons en déterminer sa concentration en sucres, acides glucuroniques et son DP. Pour rappel et à titre de comparaison, sont également portées dans le tableau les valeurs obtenues pour le xylane KOH (obtenu par extraction alcaline à partir de l'holocellulose):

Tableau 27: Composition centésimale des hémicelluloses extraits à l'eau (%massique) et degré de polymérisation. Rappel des valeurs pour le xylane KOH

Traitement de délignification	% oses neutres	% acides uroniques	DP
Chlorites acides	82,6	17,4	205
FePcS/H ₂ O ₂	84	16	3

La distribution entre sucres neutres et acides uroniques est sensiblement équivalente au xylane KOH, nous indiquant que l'extrait se compose majoritairement d'hémicellulose.

En revanche, la valeur du degré de polymérisation obtenue par comparaison des teneurs en sucres totaux et sucres réducteurs est beaucoup plus faible que pour le xylane KOH. Néanmoins, et compte tenu de la méthode de purification utilisée impliquant une dialyse au seuil de coupure de 1kDa, un DP de 3 ne peut correspondre qu'à une valeur erronée, la majorité des molécules de faibles masses moléculaires ayant été éliminées. Pour tenter d'affiner le fractionnement de cette fraction polymérique, nous avons réalisé une seconde dialyse en utilisant des membranes de seuil de coupure compris entre 6 et 8 kDa. Après 96 h de temps de contact et des échanges réguliers de l'eau, plus de 70% de la masse initiale est récupérée après lyophilisation du contenu de la membrane de dialyse ce qui confirme bien que cette fraction est constituée majoritairement de polymères et donc que dans ce cas, le dosage colorimétrique n'est pas adapté à ce substrat. Une surestimation des sucres réducteurs ou encore une sous-estimation des sucres totaux sont les deux principales causes pouvant expliquer l'inefficacité du dosage colorimétrique. En effet, le dosage des sucres réducteurs mesurant la quantité de fonctions réductrices sur le polysaccharide, c'est-à-dire les

aldéhydes terminaux, peut être faussé par la présence d'autres fonctions aldéhydes. Il est par ailleurs connu que dans certaines conditions, les porphyrines ou phtalocyanine peuvent induire l'oxydation de sucre par coupure oxydative des liaisons C2-C3. Ainsi, Kachkarova-Sorokina *et al.*,¹⁹² ont montré que le système FePcS/H₂O₂ avait la capacité d'oxyder certains polysaccharides tel que l'amidon. Comme le montre le mécanisme détaillé dans la Figure 82, après une première étape d'oxydation conduisant à la formation d' α -hydroxycétone, le complexe phtalocyanine de fer/ OO⁻ permet la coupure oxydante de liaison C2-C3 et la formation de groupement acide carboxylique et aldéhyde.

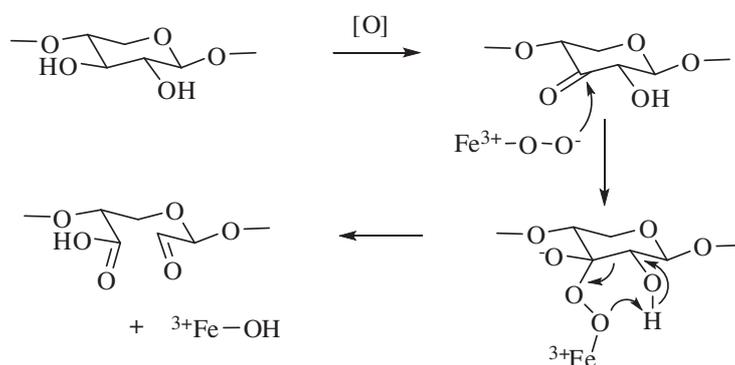


Figure 82: mécanisme d'oxydation en milieu oxydant des unités xyloses d'après Kachkarova-Sorokina¹⁹²

D'autres études menées en particulier au laboratoire de chimie des substances naturelles ont montré que d'autres polysaccharides comme la gomme de guar ou encore des dérivés de cellulose peuvent être oxydés par ce système.¹⁹³ Il a également été montré que la cellulose pouvait être oxydée mais pour ce polymère, le système oxydant doit nécessairement être couplé à une activation physique telle que l'application d'une activation micro-onde ou ultrason.

Nous avons voulu vérifier si la détermination de ce DP trop faible pouvait résulter d'un défaut du dosage des sucres réducteurs induit par la présence de groupement aldéhydes résultant d'une oxydation des hémicelluloses lors de l'étape de délignification. Pour cela nous avons réalisé plusieurs essais d'oxydation d'un xylane commercial par le système FePcS/H₂O₂ en nous inspirant des conditions de réactions décrites dans le littérature ou développées au laboratoire. Le Tableau 28 rassemble les résultats obtenus pour les essais effectués.

¹⁹² Kachkarova-Sorokina, S.L.; Gallezot, P.; Sorokin, A.B., *Chemical communications*, 24, **2004**, 2844-2845

¹⁹³ KLEIN-KOERKAMP Carmen. *Elaboration de nouveaux tensioactifs à partir de polysaccharides*. Thèse de doctorat : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles. Limoges : Université de Limoges, **2009**.

Tableau 28: Conditions d'oxydation testées pour l'oxydation du MGX commercial de hêtre

Essais	Quantité Xylane (g)	Quantité H ₂ O ₂ (mL)	Quantité FePcS (eq. UAX)	Quantité d'eau (mL)	Temps de réaction (h)
1	1	0,320	1/645	0	15
2	1	1	1/645	20	15
3	1	1	1/215	20	15
4	1	3,2	1/250	20	15
5	1	3,2	1/25	20	7
6	1	7x 0,025	1/20	20	60
7	1	0,025	1/20	20	60
8	1	0,320	1/90	20	15
9	3	3x 0,720	1/10	Qqls gouttes	6
10	1	0,720	1/10	Qqls gouttes	48
11	3	13x 0,040	0,02	Qqls gouttes	120
12	1	6x 0,120	0,02	Qqls gouttes	24
13	0,5	10x 0,025	1/10	Qqls gouttes	24

Pour cela, nous avons fait varié la quantité de catalyseur (exprimée en équivalents par unité d'anhydroxylose : eq./UAX), la quantité d'eau oxygénée ainsi que la fréquence d'ajout dans le milieu, la quantité de solvant c'est-à-dire d'eau ou encore le temps de réaction. L'efficacité de la réaction supposée d'oxydation a été estimée en enregistrant d'une part les spectres Infrarouge des produits de réaction et d'autre part en effectuant le dosage des aldéhydes totaux par le dosage de Cannizzaro suivant la méthode de Pommerening.¹⁹⁴ A titre de comparaison, nous avons également préparé un xylane oxydé en utilisant une méthode largement éprouvée utilisant le *per*-iodate de sodium comme oxydant des fonctions diols. L'examen des spectres Infrarouge, ne permet pas de mettre en évidence d'oxydation provoquée par le système phtalocyanine/H₂O₂. En effet, si le spectre obtenu pour le xylane traité par NaIO₄ laisse apparaître une bande de vibration intense vers 1730cm⁻¹ pouvant être attribuée aux carbonyles des aldéhydes formés, nous n'observons aucune modification significative pour le xylane traité par la phtalocyanine en comparaison au spectre du xylane commercial (Figure 83). Le dosage de Cannizzaro appliqué au xylane traité par NaIO₄

¹⁹⁴ Pommerening, K.; Rein, H.; Bertram, D.; Müller R. *Carbohydrate Research* **1992**, 233, 219-233.

indique que 75% des unités anhydroxyloses formant la chaîne polymérique ont été oxydées, ce qui constitue un résultat classique, tandis qu'aucune fonction aldéhyde ou acide carboxylique n'ont pu être misent en évidence pour l'oxydation par le système FePcS/H₂O₂.

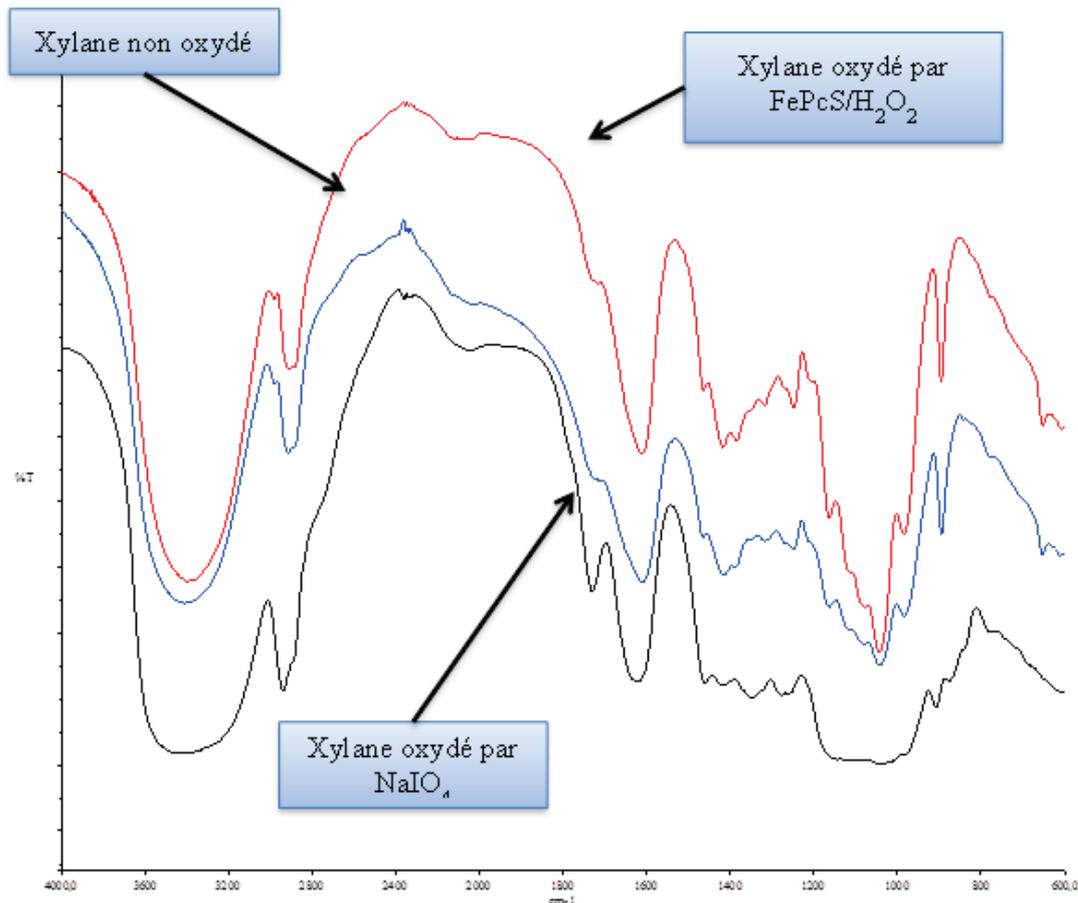


Figure 83: Spectre infrarouge comparatifs de xylanes oxydés
 En rouge : xylane oxydé par FePcS/H₂O₂
 En bleu : xylane non oxydé
 En noir : xylane oxydé par NaIO₄

Par conséquent, l'hypothèse de l'oxydation des sucres ne peut pas être retenue pour expliquer la valeur de DP trouvée.

Une sous-estimation des sucres totaux, autres hypothèse possible, est à ce stade plus délicate à mettre en évidence. Ce dosage colorimétrique peut en effet souffrir d'interférences liées à l'absorption intrinsèque de l'extrait qui est rappelons-le coloré mais également ne traduire qu'une réaction partielle des sucres avec le chromophore utilisé, ceci pouvant être le cas avec des sucres substitués. Pour ce dernier point, et si on fait l'hypothèse que le protocole de délignification utilisé dans ce cas n'affecte que très partiellement les liaisons sucres-phénols engagées dans le complexe ligno-cellulosique, il est alors raisonnable de penser que certaines unités glucidiques constitutives du polymère extrait portent des résidus phénoliques

sur les positions 2 et/ou 3. Ceci permettrait d'expliquer d'une part la coloration des hémicelluloses extraites et d'autre part les résultats aberrants des dosages colorimétriques.

Avant d'examiner plus en détail cet aspect structural du polymère, nécessitant une approche d'analyse plus fine, voyons tout d'abord l'étude de sa composition mono-saccharidique ainsi que l'examen de ses spectres de RMN du proton et infrarouge.

IV.2. Composition mono-saccharidique par CPG

De même que pour les xylandes extraits en milieu alcalin, la composition mono-saccharidique des hémicelluloses a été analysée par CPG avec hydrolyse et triméthylsilylation des monomères. Cette composition est détaillée dans le Tableau 29.

Tableau 29: Composition mono-saccharidique du xylane H₂O (% molaire). Rappel de la composition pour le xylane KOH.

Extrait	Rha	Xyl	Fuc	Man	Gal	Glc	4-O-MeGlcA
Xyl KOH	0	82,5	Traces	0	Traces	Traces	16,6
Xyl H₂O	7,5	57,7	Traces	9,5	10,4	7,0	7,9

On constate que la composition mono-saccharidique est plus hétérogène que dans le cas de l'extraction du xylane KOH. Le pourcentage relativement important d'acide 4-*O*-Methylglucuronique mesuré associé au fait que le xylose reste le glucide majoritaire suggère que la structure du polysaccharide est là encore basée sur celle d'un 4-*O*-Methylglucuronoxylane. Toutefois, la présence de galactose, de rhamnose ou encore de mannose en quantités appréciables suggère que son extraction s'accompagne de l'extraction concomitante d'hétéropolysaccharides minoritaires intimement liés à la paroi cellulaire et non solubilisés lors de l'étape de délignification à la phtalocyanine. Ainsi, et compte tenu de la masse totale extraite, qui est relativement faible, ces sucres également extraits habituellement de l'holocellulose mais en proportion beaucoup plus faible pour ne représenter que des traces, deviennent dans ce cas non négligeables.

IV.2.1. Caractérisation du xylane H₂O par RMN ¹H

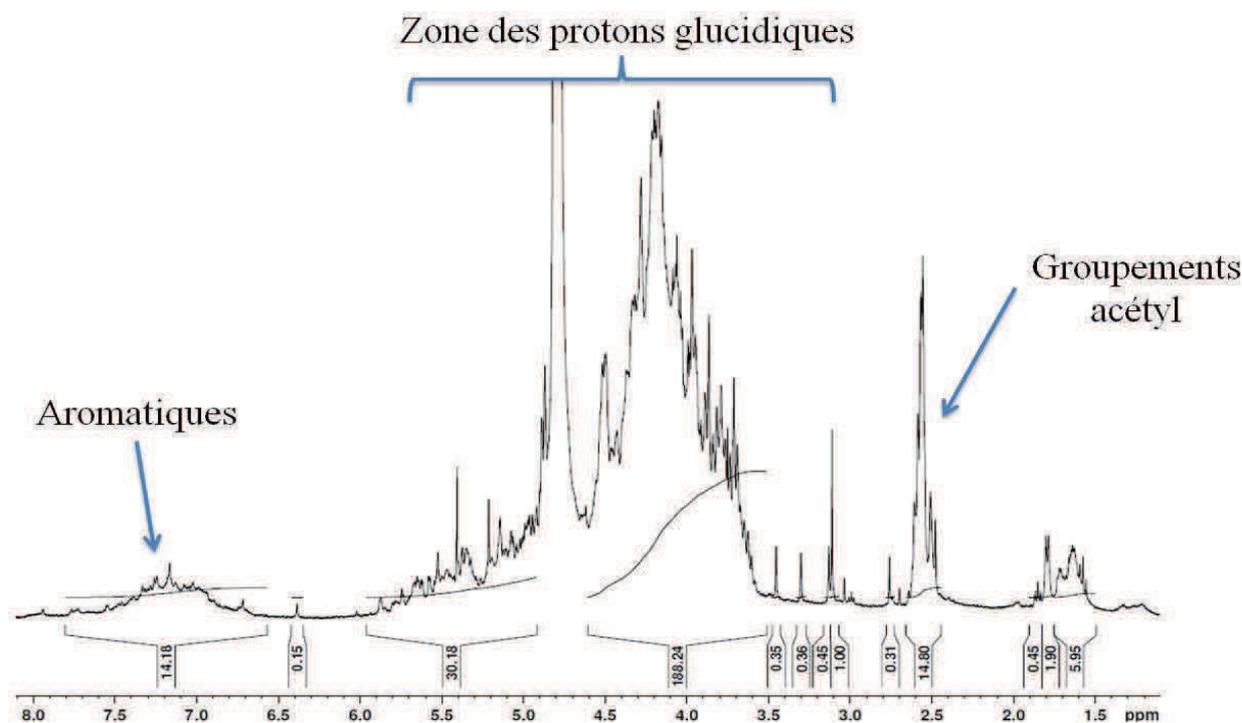


Figure 84: Spectre RMN ¹H du xylane H₂O

Le spectre RMN du proton de l'hémicellulose extraite à l'eau est, d'un point de vue général conforme à l'idée que l'on se fait du spectre d'un polysaccharide et d'un 4-*O*-méthylglucuronoxylane en particulier (Figure 84). On distingue notamment une zone de proton glucidique entre 3,5 et 4, 8 ppm ainsi qu'une zone très caractéristique, vers 4,5-5,5 ppm rassemblant l'ensemble des protons anomériques. Cependant, par comparaison au spectre du xylane KOH présenté précédemment, caractéristique d'un 4-*O*-méthylglucuronoxylane pur, les figures observées dans ce cas sont plus complexes, ce qui est le signe d'une part d'une plus grande complexité structurale (plus grande hétérogénéité de la composition monosaccharidique) et d'autre part que le squelette osidique est probablement en partie substitué. Ceci est vérifié par la présence d'un massif autour de 2,6 ppm, correspondant à des groupements acétyls. Ces derniers, estérifiant un nombre important de groupements hydroxyle du xylane à l'état natif, incorporé dans la paroi, sont généralement éliminés lors de l'extraction en milieu alcalin et n'apparaissent donc pas sur le spectre du xylane KOH. On constate qu'à l'inverse, l'extraction à l'eau chaude les préserve en partie, comme on pouvait le supposer. En outre, un autre massif, plus inattendu, apparaît dans la zone 8,0-6,5 ppm. Ce massif caractérisé par un tel déplacement chimique, doit correspondre à un ensemble de

protons portés par des cycles aromatiques et compte tenu de la structure chimique du matériel végétale de départ et des traitements appliqués, il ne peut s'agir que de résidus phénoliques dérivés des fragments constitutifs des lignines.

IV.2.2. Caractérisation par FT-IR du xylane H₂O

La caractérisation par Infrarouge a été effectuée et est reportée sur la Figure 85. En nous appuyant sur les données de la littérature, il est possible de proposer une attribution détaillée des diverses bandes de vibration les plus caractéristiques. Plus précisément, Buslov *et al.*¹⁹⁵ ont en particulier étudié les spectres FT-IR de 4-*O*-Méthylglucuronoxylanes de bouleau, de hêtre et ou encore issu d'avoine. Ainsi, les bandes à 3700-3000 cm⁻¹ et 1200-1000 cm⁻¹ correspondent aux vibrations associées aux groupements hydroxyles, très largement majoritaires dans le polysaccharide. On peut également observer une bande à 2950-2870 cm⁻¹ qui correspond aux carbonés vibrations d'élongation des liaisons carbone-hydrogène des groupements C_{Sp3}-H, C_{Sp3}H₂ et CH₃ (acétyls, méthoxy) du xylane.

D'autres bandes notables sont à remarquer, celles de la région 1800-1300 cm⁻¹, qui correspondent aux acides glucuroniques des xylanes ; en effet apparaissent dans cette région les carbonyles, donc les acides.

On observe vers 1605 cm⁻¹, une bande d'absorption indiquant la présence d'acides uroniques, sous forme de sels d'acides, partiellement masquée par une bande d'absorption à 1645 cm⁻¹, signalant la présence d'eau résiduelle (dite de structure). De façon plus précise, il est possible de noter la présence d'une bande supplémentaire sur le spectre de l'hémicellulose extraite à l'eau chaude, à 1507 cm⁻¹, vibrations caractéristiques des liaisons C=C aromatiques : ceci indique et confirme que ce xylane est porteur de résidus phénoliques provenant de fragments de lignine, ce qui n'est pas le cas du xylane KOH, extrait après délignification des sciures par le chlorite de sodium.

Enfin, La bande de faible intensité, mais très nette à 894 cm⁻¹ est caractéristique des liaisons glycosidiques de type β.¹⁹⁶

¹⁹⁵ Buslov, D.K.; Kaputski, F.N.; Sushko N.I., Torgashev, V.; Soloveva, L.V.; Tsarenkov, V.M.; Zubets, O.V.; Larchenko, L.V., *Journal of Applied Spectroscopy*, **2009**, 76, 801-805

¹⁹⁶ Gupta, S.; Madan, R.N.; Bansal, M.C., *Tappi Journal*, **1987**, 70, 113-114.

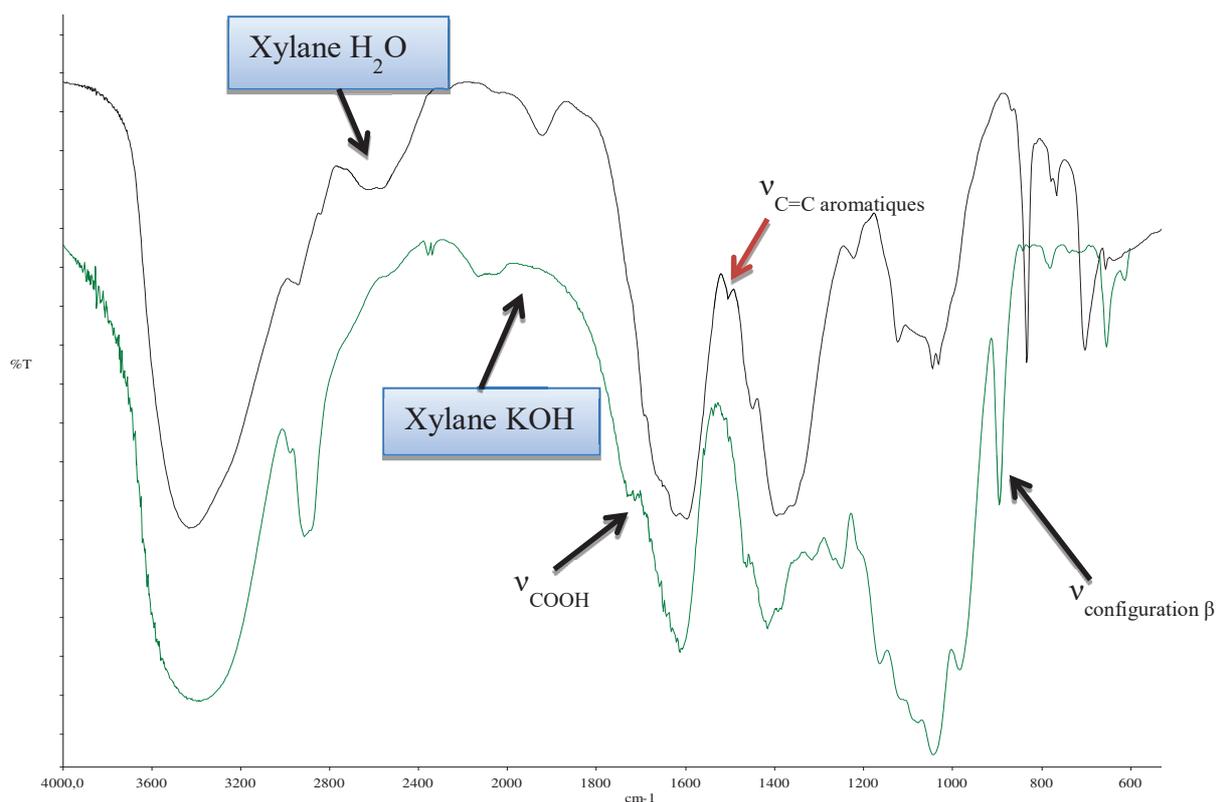


Figure 85: Spectre FT-IR comparatif du xylane KOH et du xylane H₂O

IV.3. Détermination du taux de phénols

Les analyses RMN ¹H et FT-IR ont démontré la présence de groupements aromatiques portés par le xylane H₂O. Les phénols ou dérivés, après les premières étapes d'extraction sont *a priori* les seuls groupements aromatiques susceptibles d'être présents dans la matrice ligno-cellulosique. Le dosage de ces groupements phénols a donc été effectué afin de d'approfondir l'analyse structurale. Pour cela, nous avons utilisé la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu. Le Tableau 30 présente les résultats de ce test pour le xylane KOH et pour le xylane H₂O.

Tableau 30: Taux de composés phénoliques dans les différents extraits (en g pour 100 g éq. acide gallique)

Extrait	Quantité de phénols (%)
Xylane KOH	< 1
Xylane H ₂ O	13

S'agissant de l'extrait KOH, comme attendu, la méthode de dosage employée ne permet pas de quantifier de phénol. En revanche, avec un pourcentage estimé à 13%, le dosage au réactif de Folin-Ciocalteu confirment la présence de phénols dans l'extrait H₂O. L'ensemble des analyses confirme bien la présence de groupements phénoliques dans l'extrait, très probablement liés de manière covalente au squelette polysaccharidique. En effet, encore présents après une étape d'ultrafiltration à 1kDa, ces composés sont nécessairement de type oligo- ou polymérique ce qui, s'il s'agissait de polyphénols non liées à la fraction glucidique, s'opposerait à leur solubilité dans l'eau. En outre, plusieurs essais d'extraction liquide-liquide ont été réalisés utilisant comme solvant d'extraction des solvants organiques comme l'acétate d'éthyle ou le chloroforme et n'ont pas permis d'éliminer de l'extrait la fraction phénolique, résultat qui là encore va dans le sens d'une association covalente des deux classes de composés.

V. Bilan de l'extraction des hémicelluloses

Deux protocoles de fractionnement du bois ont été appliqués à l'obtention d'hémicellulose.

S'agissant du premier, les hémicelluloses ont été extraites en milieu alcalin de l'holocellulose, obtenue par délignification au chlorite de sodium ainsi que de sciures partiellement délignifiées par FePcS/H₂O₂. On constate que quelle que soit l'étape de délignification mise en œuvre, les xylanes isolés ne diffèrent que très peu l'un de l'autre du point de vue de leur composition glucidique. Toutefois, l'hémicellulose extraite après traitement par la phtalocyanine (xylane KOH_{FePcS}) est obtenue avec un rendement massique nettement plus faible et présente un degré de polymérisation très différent de celui déterminé pour le xylane provenant de l'holocellulose (xylane KOH). Alors que le DP du xylane KOH est classique pour une hémicellulose extraite de bois, le xylane KOH_{FePcS} est proche de 500. Ce résultat en première lecture étonnant est à rapprocher de ce que doit être la taille du polymère à l'état natif, *in situ*. Très récemment, Bigand *et al.*¹⁹⁷ ont extraits des xylanes de bois de bouleau, sans délignification préalable, en milieu alcalin (NaOH 5 %, 160 °C, 20 min) et ont déterminé des degrés de polymérisation de 466 pour le 4-*O*-Méthylglucuronoxylane obtenu avec un rendement de récupération de 2,4%. Ces résultats, en parfait accord avec ceux que nous venons de décrire semblent donc confirmer l'implication de l'étape de délignification au chlorite de sodium sur la dépolymérisation partielle des hémicelluloses.

¹⁹⁷ Bigaud, V.; Pinel, C.; Da Silva Perez, D. ; Rataboul, F. ; Petit-Conil, Huber, P., *BioResources*, **2013**, 8, 2118-2134

D'un point de vue fondamental, cette étude a le mérite d'apporter de précieux compléments d'information quant à la structure des hémicelluloses impliquées dans la composition complexe de la paroi secondaire. Pour le second procédé, l'extraction des hémicelluloses a été effectuée par un simple traitement à l'eau chaude, procédé plus doux dont le principal objectif était de préserver l'intégrité de la structure des hémicelluloses mais également de proposer une méthodologie plus propre, respectueuse de l'environnement. Alors que ce traitement ne permet pas d'extraire d'hémicelluloses à partir d'holocellulose, un xylane apparenté à un 4-*O*-Méthylglucuronoxylane (xylane H₂O) est obtenu, en relativement faible quantité à partir de sciures traitées à la phtalocyanine. L'analyse de sa composition monosaccharidique, de ses spectres de RMN du proton et d'Infrarouge confirment la structure du 4-*O*-méthylglucuronoxylane et précisent qu'il est substitué par des unités phénoliques, résultat d'un processus de délignification incomplet. Un dosage des phénols permet d'estimer la teneur en composés aromatiques de l'ordre de 13 % équivalents acide gallique.

Toutefois, des questions subsistent concernant la structure de ces hémicelluloses : est-il possible d'accéder, au moins partiellement, à la structure des motifs phénoliques ? Peut-on déterminer les liens chimiques définissant les points de branchement phénol-polysaccharide ? En outre, il est connu que les polyphénols et dérivés ont des propriétés antioxydantes intrinsèques très intéressantes. Leur couplage à des polysaccharides rendrait certainement possible l'utilisation de ces antioxydants naturels par l'industrie agroalimentaire. L'examen de la littérature récente témoigne de l'engouement grandissant pour ce type de molécules. Dans quasiment tous les cas, l'activité antioxydante de ces polysaccharides extraits de plantes est portée par des motifs phénoliques ou dérivés greffés à la chaîne glucidique. Des polymères de synthèse ont également été préparés par modification chimique de polysaccharides estérifiés par des motifs phénoliques de structures inspirées des unités de bases de la lignine, conduisant à de bonnes propriétés anti-oxydantes.

Ainsi, avant d'approfondir l'analyse structurale de l'hémicellulose extraite à l'eau, nous avons tout d'abord étudié ses propriétés anti-oxydantes afin d'en valider le potentiel applicatif.

Chapitre 3 : Propriétés anti-oxydantes des xylanes et caractérisation structurale.

Les xylanes de châtaignier extraits par l'eau chaude après délignification par le traitement FePcS/H₂O₂ se caractérisent donc par une teneur en phénols greffés importante (13%). Des études antérieures menées au laboratoire¹⁹⁸ ont montré que des composés constitués de plus de 10 % de phénols en masse présentaient une forte activité anti-oxydante. Nous présentons dans la première partie de ce chapitre l'étude de l'activité anti-oxydante de ce composé original comparée à certains antioxydants de références utilisées par l'industrie agro-alimentaire. La seconde partie de ce travail est consacré à la caractérisation structurale de ces composés.

I. Détermination de l'activité anti-oxydante

Un composé anti-oxydant est un composé qui diminue ou annihile l'oxydation d'un autre composé. Pour cela, il peut agir de différentes façons. Il peut tout d'abord directement réduire les radicaux libres qui sont présents dans le milieu, qui ont été générés par réaction photochimique, enzymatique ou autre. Ces radicaux peuvent être de différente nature, et notamment être des espèces oxygénées comme les superoxydes ou les radicaux hydroxyles. Enfin, l'anti-oxydant peut chélater des métaux qui rentrent dans le mécanisme d'une réaction de génération de radicaux, comme la réaction de Fenton. Il s'agira donc d'une réaction indirecte.

L'activité anti-oxydante des xylanes ne vient pas de leur propre structure. Parmi les possibilités pour conférer des propriétés d'anti-oxydantes à une hémicellulose, il est possible d'effectuer une sulfatation ou encore une sélénium-estérification.¹⁹⁹ De même, la présence de composés phénoliques greffés sur le polysaccharide doit conférer au xylanes des propriétés anti-oxydantes. Cette activité pourra avoir lieu soit par piégeage direct des radicaux ou par réduction des métaux impliqués dans leur génération.^{200, 170}

¹⁹⁸ Calliste, C.A.; Trouillas, P.; Allais, D.P. ; Duroux, J.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 282-288

¹⁹⁹ Cao, Y.; Ikeda, I., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2009**, 45, 231-235.

²⁰⁰ Hromádková, Z.; Paulsen, B.S.; Polovka, M. ; Košťálová, Z.; Ebringerová, A., *Carbohydrate Polymers*, **2013**, 93, 22-30.

I.1. Choix de la méthode

Il existe de nombreuses méthodes de détermination de l'activité anti-oxydante d'un composé.

Elle peut par exemple être mesurée par dosages colorimétriques par spectroscopie d'absorption UV-Visible. La réaction l'agent anti-oxydant se traduit généralement par une diminution de l'absorbance. Cependant ces techniques colorimétriques présentent des limites. Elles nécessitent l'utilisation de quantités importantes de produit et ne permettent pas de s'affranchir des interférences de mesures inhérentes à l'absorbance intrinsèque des composés testés.

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une méthode spectroscopique qui permet la détection des composés radicalaires. Elle peut donc être utilisée pour caractériser l'activité anti-oxydante d'un composé. Cette technique très sensible est capable de détecter les radicaux libres dès les plus faibles concentrations (seuil de sensibilité $\sim 10^{-8}$ M). Sa précision en fait un des outils de choix pour l'étude de l'activité anti-oxydante de composés biologiques ou plus généralement de molécules naturelles ou de synthèse.^{201, 202, 203} Son principe est basé sur la capacité des radicaux libres à absorber un signal micro-onde lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Le spectre d'absorption obtenu est caractéristique d'un radical, l'amplitude du signal étant proportionnelle à la quantité de radicaux présente dans l'échantillon.

Les mesures que nous avons effectuées par Résonance Paramagnétique Electronique reposent sur une technique appelée « spin-labelling ». Elle consiste à mettre le composé à tester en présence d'un radical « stable » dont on connaît la concentration. L'activité anti-oxydante d'un composé est déterminée par sa capacité à piéger le radical (spin label) pour le transformer en un composé non radicalaire. Cette réduction du « spin label » par l'échantillon testé se caractérise par une diminution de l'amplitude du signal RPE mesuré.

²⁰¹ Bolumar, T. ; Andersen, M.L.; Orlien, V., *Food Chemistry*, **2014**, 150, 422-428.

²⁰² Stajner, D. ; Popovic, B.M. ; Canadanovic-Brunet, J.; Dilas, S. ; Cetkovic, G., *LWT-Food Science and Technology*, **2014**, 55, 408-413.

²⁰³ Pérez-Cruz, F. ; Villamena, F.A. ; Zapata-Torres, G. ; Das, A. ; Headley, C.A. ; Quezada, E. ; Lopez-Alarcon, C.; Olea-Azar, C., *Journal of Physical Organic Chemistry*, **2013**, 26, 773-783.

Pour ce travail, nous avons utilisé comme « spin-label » le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine ou DPPH

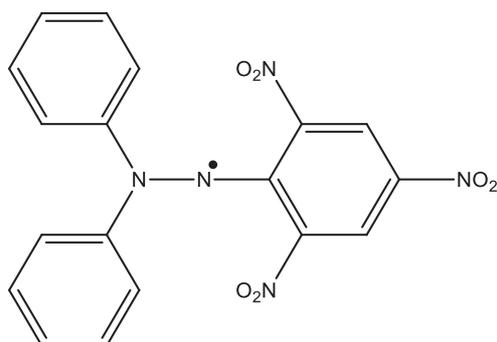


Figure 86: Structure du radical DPPH

I.2. Détermination de l'activité anti-oxydante des xylanes extraits par RPE

Une étude préliminaire visant à déterminer le pouvoir anti-radicalaire des xylanes extraits vis-à-vis du radical DPPH a été réalisée en utilisant un dosage colorimétrique par spectroscopie d'absorption UV-Visible. Malheureusement, cette technique s'est avérée peu fiable. Notre choix s'est donc rapidement porté sur l'utilisation de la RPE en utilisant le radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine.

I.2.1. Protocole

Brièvement, l'analyse par RPE permet d'obtenir un spectre d'absorption caractéristique du radical détecté, l'intensité du signal étant proportionnelle à la quantité de radicaux présents dans le milieu réactionnel (Figure 87).

La réaction réponds à l'équation bilan suivante:



Un composé actif entraîne une diminution de l'intensité du signal de référence. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

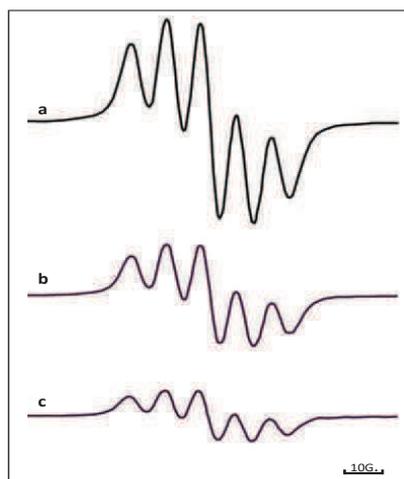


Figure 87: Spectre RPE du radical DPPH:

a : Signal témoin 100 % (sans anti-oxydant)

b et c: Signaux résiduels après inhibition du radical par des concentrations croissantes d'anti-oxydants

L'activité anti-radicalaire des extraits de xylanes a été mesurée, selon le protocole suivant.

L'activité anti-radicalaire des extraits de xylanes a été mesurée, selon le protocole suivant :

Au temps initial, on mélange :

- 50 μL de xylane (KOH ou H_2O , solubilisé dans l'eau)
- 50 μL de DPPH à $2,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ (solubilisé dans l'éthanol)

La solution est alors introduite dans un tube capillaire et placée dans l'appareil.

La mesure est effectuée au bout de 5 minutes de contact.

La concentration finale des composés testés est donc égale à la moitié de la concentration initiale.

Les solutions mères de xylane ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) ont été réalisées extemporanément selon le protocole suivant :

Les xylanes sont d'abord solubilisées dans l'eau. Les échantillons sont ensuite passés 10 minutes au bain à ultra-sons puis chauffés à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes au bain-marie. Avant de lancer les mesures, les échantillons sont laissés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

I.2.2. Résultats

L'activité anti-DPPH des xylynes KOH et H₂O est présentée sur la Figure 88.

Les valeurs sont le résultat de trois manipulations indépendantes.

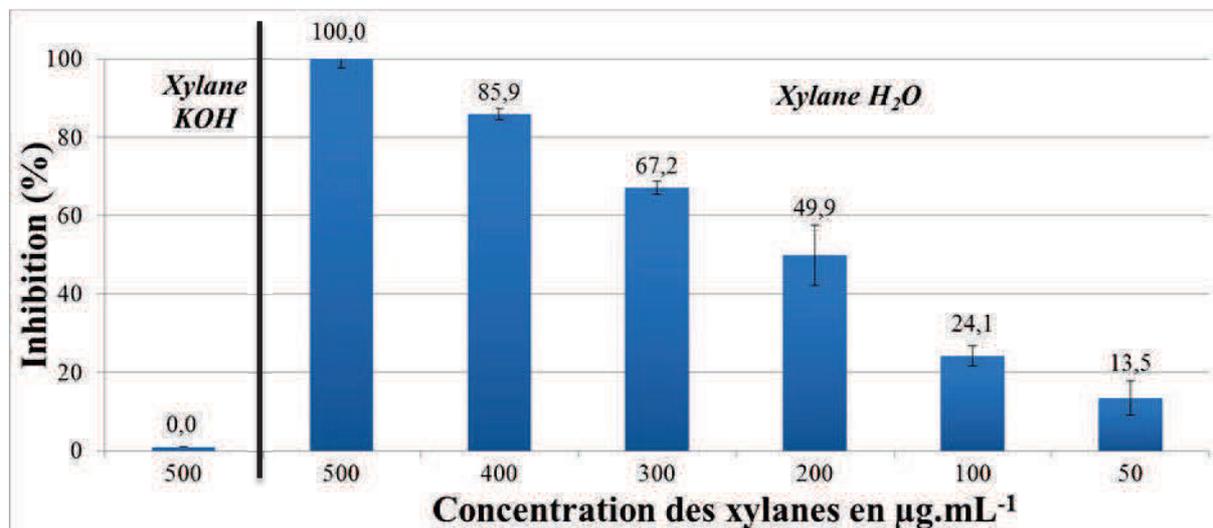


Figure 88: Activité anti-DPPH du xylane KOH (500 µg.mL⁻¹) et du xylane H₂O (concentrations variables).

La première chose que nous montre ce graphique est qu'il existe une différence d'activité anti-radicalaire très importante entre le xylane KOH et le xylane H₂O. Pour une concentration de 500 µg.mL⁻¹, le xylane H₂O piège la totalité des radicaux présents dans le milieu alors que le xylane KOH ne présente aucune activité.

Afin de pouvoir comparer l'activité du xylane H₂O à celle de composés de références, nous avons déterminé son activité anti-radicalaire à différentes concentrations. Cela nous a d'abord permis, de constater que le xylane H₂O inhibe le radical DPPH de manière dose dépendante, puis de déterminer sa CI₅₀ (concentration permettant d'inhiber 50 % des radicaux) par régression linéaire.

L'activité anti-radicalaire du xylane H₂O a été comparée à celle de deux antioxydants de référence couramment utilisés par les industries agroalimentaires, cosmétique ou pharmaceutique. Ces composés sont la vitamine E (E306, alpha-Tocophérol), antioxydant d'origine naturelle dont l'activité est unanimement reconnue et le BHT (E321, Hydroxy Toluène Butylé) qui est un antioxydant synthétique encore couramment utilisé bien qu'il soit potentiellement toxique pour l'organisme.

Les résultats sont rassemblés sur le Tableau 31 .

Tableau 31: CI_{50} des xylanes et des antioxydants de référence (radical DPPH)

Composé	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Xylane KOH	-
Xylane H₂O	225 ± 17
Vitamine E	20 ± 3
BHT	4000 ± 300

Si l'on compare l'activité anti-DPPH du xylane H₂O à celle de la Vitamine E, qui est l'un des antioxydants d'origine naturelle parmi les plus connus, on constate qu'il n'est que dix fois moins actif (CI_{50} de 225 ± 17 pour le xylane H₂O contre $20 \pm 3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la vitamine E). Ce résultat nous permet de penser que le xylane H₂O est un antioxydant d'origine naturelle à fort potentiel. Ceci semble se confirmer si l'on compare son activité à celle du BHT (CI_{50} de 225 ± 17 contre $4000 \pm 300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le BHT). On constate que le xylane H₂O est, dans le cadre de ce test, environ 20 fois plus actif que cet antioxydant de synthèse dont l'utilisation commence à être remise en question au vu de sa toxicité potentielle pour l'organisme.

Ainsi, et bien que le rendement de récupération de ce polymère soit relativement faible, nous venons de montrer qu'il est doté d'un fort potentiel applicatif en vue de son utilisation éventuelle comme conservateur. Il pourrait intéresser à la fois l'industrie agro-alimentaire, l'industrie cosmétique et l'industrie pharmaceutique qui sont de plus en plus contraintes dans leur utilisation des anti-oxydants de synthèse. En outre, il est utile de rappeler que le protocole de fractionnement développé pour son obtention est reproductible tant sur les aspects qualitatifs que quantitatifs. Fort de ces résultats particulièrement encourageants, nous avons alors tenté d'approfondir l'analyse structurale de cette macromolécule. En effet, outre l'intérêt fondamental d'une telle étude pour mieux appréhender les interconnexions qui existent entre les différents constituants polymériques de la paroi, une connaissance plus fine de la relation structure-activité serait assurément un atout pour envisager soit de l'optimisation de procédé en vue de produire des structures variées ou encore envisager de la modification chimique ciblée vers l'amélioration des propriétés.

II. Hydrolyse contrôlée des xylanes extraits – Formation et caractérisation d’oligosaccharides

Nous l’avons vu, l’analyse du polymère par spectroscopie de RMN ou Infrarouge donne des renseignements généraux sur l’architecture moléculaire. Il est en revanche très difficile d’en déduire des particularités structurales avec un niveau de détail suffisant. Dans le domaine de la caractérisation structurale des polysaccharides, une méthodologie largement utilisée consiste à fragmenter le polymère natif en oligosaccharides réputés plus faciles à analyser par les techniques usuelles. Pour cela, diverses techniques sont disponibles telles que l’hydrolyse acide, l’hydrolyse enzymatique ou encore l’auto-hydrolyse dans le cas de polymères naturellement acides. Chaque technique comporte ses propres spécificités et peut potentiellement renseigner sur des aspects différents de la structure.

II.1. Autohydrolyse

II.1.1. Mise en œuvre et séparation

Cette méthode (chapitre I) consiste à hydrolyser le polysaccharide en utilisant sa propre acidité, apportée par les fonctions carboxyliques présentes par les acides uroniques constitutifs du polymère. Par simple chauffage à l’étuve et sous l’effet de cette acidité intrinsèque, le polymère préalablement activé par une résine échangeuse de proton, est hydrolysé préférentiellement au niveau de liaisons osidiques proches des acides glucuroniques. Cette technique d’hydrolyse douce permet l’obtention de fragments relativement importants, plus caractéristiques de la structure du polymère. Brièvement, après activation par une résine H⁺ et filtration, la solution de xylane (100mg dans 100mL d’eau) est alors introduite dans un flacon étanche et placée à l’étuve à 100 °C. La réaction d’hydrolyse est suivie par CCM et au bout de 24h, les polysaccharides non hydrolysés sont éliminés par précipitation par 3 volumes d’éthanol. (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**89)

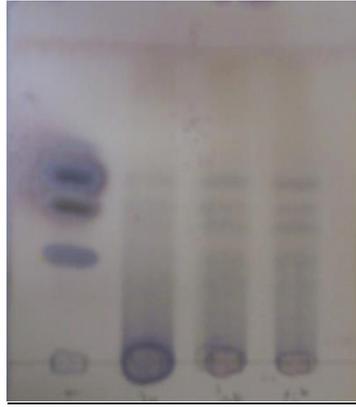


Figure 89: Suivi au cours du temps de la réaction d'autohydrolyse du xylane H₂O à t0, t16h et t24h.
A gauche : les références, de haut en bas : xylose, glucose, acide glucuronique, saccharose

Lorsqu'il s'agit d'hémicelluloses (xylanes) obtenues en conditions classiques, le surnageant est alors généralement passé sur colonne échangeuse d'ions ce qui permet de séparer les produits d'hydrolyse en deux fractions, l'une acide, l'autre neutre. Dans notre cas et compte tenu de la complexité structurale supposée et en particulier de la présence possible sur les groupements phénoliques de fonctions variées et possiblement acide nous avons privilégié une séparation des produits d'hydrolyse en fonction de leur taille, c'est-à-dire par chromatographie d'exclusion stérique. Ainsi, le surnageant issu de l'auto-hydrolyse a été séparé sur colonne P2 afin d'étudier plus finement les oligosaccharides obtenus. La Figure 90, image le chromatographie couche mince réalisées pour l'ensemble des fractions obtenues en sortie de colonne, nous montre la distribution en oligosaccharides du xylane H₂O auto-hydrolysé.

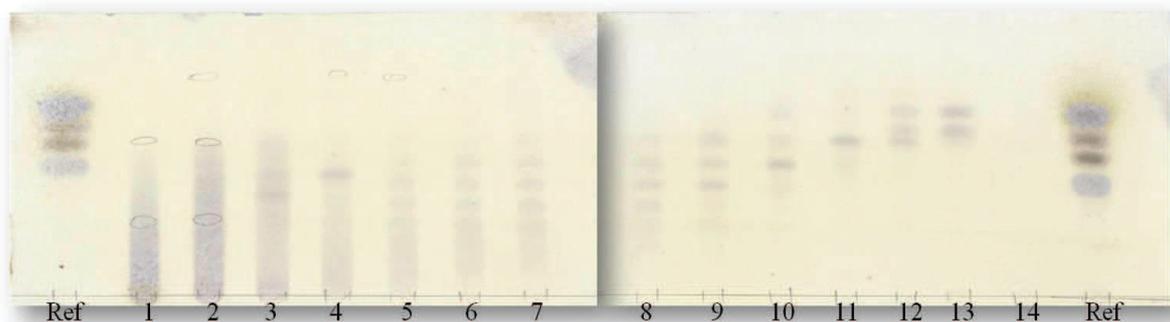


Figure 90: Suivi de sortie de colonne P2 du xylane H₂O autohydrolysé.
Chaque numéro correspond au tube de sortie. A gauche et à droite, les références : de haut en bas : xylose, glucose, acide glucuronique, saccharose

D'une part la révélation à l'orcinol sulfurique permet de mettre en évidence, comme attendu, une production par auto-hydrolyse d'oligosaccharides de tailles variées, les dernières fractions renfermant majoritairement des monosaccharides, et d'autre part une révélation par

exposition à une lampe UV indique la présence de taches souvent diffuses, attribuées à des oligosaccharides porteurs de chromophores absorbants à 254nm et particulièrement dans les toutes premières fractions, c'est-à-dire celles de plus haut poids moléculaire (celles-ci ont été entourées d'un trait de crayon sur la plaque CCM et sont visibles sur la Figure 90). Malheureusement, compte tenu de la complexité moléculaire des fractions, il ne nous a pas été possible de poursuivre ce fractionnement et notamment d'isoler ces composés par les techniques de chromatographie classiques.

II.1.2. Caractérisation structurale

Le produit brut de l'auto-hydrolyse a été analysé en spectrométrie de masse MALDI la Figure 91 présente le spectre obtenu.

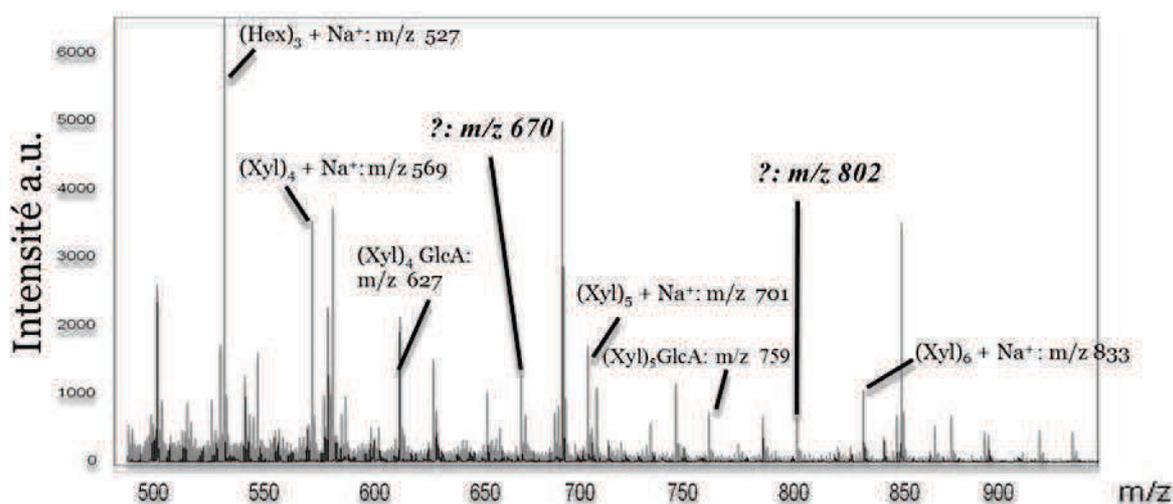


Figure 91: Spectre de masse MALDI du xylane H₂O autohydrolysé

Bien que le profil du spectre de masse soit plus complexe que ceux habituellement enregistrés pour des hydrolysats de 4-*O*-Méthylglucuronoxylanes purs, on remarque néanmoins d'une part la présence de pics de masses caractéristiques d'homo-oligosaccharides composés de 3 à 6 unités xyloses, représentatifs de la fraction neutre et également une série de pic de masse pouvant être associés à des oligoxyloses portant une et une seule unité d'acide glucuronique. C'est par exemple le cas du pic de masse à m/z=627 correspondant au fragment (xyl)₄GlcA ([M+H]⁺) ou encore du pic à m/z=759 attribué au résidu (xyl)₅GlcA ([M+H]⁺)

En plus de l'emprunte classique pour ce type de substrat, apparaissent d'autres pics de rapports masse sur charge non reconnu par les bases de données usuelles de masses d'oligosaccharide. C'est notamment le cas des pics à m/z=671 et m/z=803. En nous basant sur

les données de la littérature,²⁰⁴ mentionnant notamment très souvent l'implication de motifs d'acide férulique aux points de branchement hémicellulose-lignine, il est alors possible et sans doute raisonnable de proposer comme structures pour ces deux fragments les assemblages représentés Figure 92. Bien évidemment, si cette analyse tend à montrer que des acides féruliques seraient greffés sur le squelette osidique, comme cela peut être classique chez les glucuronoarabinoxylanes des parois primaires des monocotylédones (comme les palmiers), elle ne permet pas de préciser les positions des liaisons (C2 ou C3 ou même s'ils sont portés par les acides uroniques).

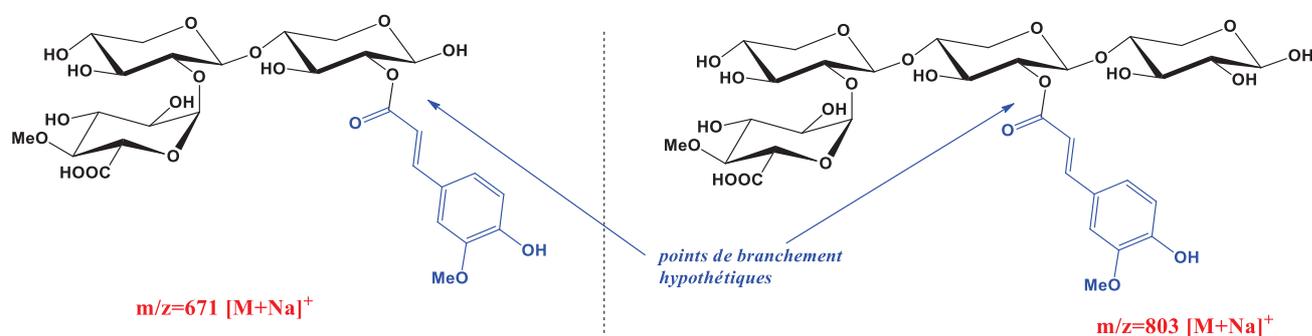


Figure 92: Structures proposées pour deux fragments portant des résidus phénoliques, issus de l'autohydrolyse du xylane H₂O

Afin de réaliser l'hydrolyse du polymère selon un mécanisme différent et donc de produire possiblement des résidus de structures différentes pouvant fournir des renseignements complémentaires sur la structure de la macromolécule natives, nous avons réalisé dans la suite du travail une hydrolyse enzymatique.

II.2. Hydrolyse enzymatique

II.2.1. Optimisation, mise en œuvre et séparation

L'hydrolyse enzymatique a tout d'abord été effectuée avec l'enzyme Shearzyme 2X de Novozymes®. Il s'agit d'une endo-β(1→4)-xylanase, coupant donc spécifiquement les liaisons entre xyloses. Les essais préliminaires effectués n'ayant pas été satisfaisants, (car ne fournissant pas suffisamment d'oligosaccharides) nous avons pour la suite de l'étude utiliser

²⁰⁴ Cui, F. ; Wijesekera, T. ; Dolphin, D., *Journal of Biotechnology*, **1993**, 30, 15-26

une autre endo- $\beta(1\rightarrow4)$ -xylanase disponible au laboratoire issue de *Thermomyces Lanuginosus*.

Nous avons tout d'abord choisi d'optimiser le protocole en effectuant six essais à différentes concentrations en enzyme et à différents temps, sur une solution de xylandes H₂O à 1 mg.mL⁻¹. Ces tests ont tous été effectués à la température de 37 °C, consigne de température indispensable à la bonne réactivité de l'enzyme et assurée par un bain thermostaté. L'activité de l'endo- $\beta(1\rightarrow4)$ -xylanase issue de *Thermomyces Lanuginosus* utilisée correspond à 2500 unités enzymatiques (UE) par gramme. La digestion est arrêtée par ajout de 3 volumes d'éthanol. Les essais effectués sont reportés dans le Tableau 32 ci-dessous :

Tableau 32: Essais d'hydrolyse enzymatique sur le xylane H₂O

Essais	Qté d'enzyme (UE)	Tps de réaction (min)
1	6	2,5
2	6	5
3	3	2,5
4	3	5
5	1,5	2,5
6	1,5	5

A la fin de la réaction, les tubes utilisés pour la réaction sont placés dans une étuve à 40 °C afin d'évaporer l'éthanol. Dans le but de caractériser l'avancement de la réaction d'hydrolyse enzymatique, nous avons effectué une CCM avec une migration de chaque essai en utilisant comme éluant le BAW (Butanol/Acide acétique/Eau 2/1/1). Notons qu'avec un tel éluant, nécessaire pour une bonne séparation des composés formés, il n'est malheureusement pas possible de faire un suivi dans le temps de réactions aussi courtes, les temps de migration pouvant approcher une heure. C'est pour cette raison que l'avancement de la réaction a été étudié en procédant à plusieurs expériences de durée variées. Seuls les temps les plus intéressants pour la suite ont été reportés dans le tableau, c'est-à-dire 2,5 et 5 min. En effet, au-delà de 5 min, quels que soit les autres paramètres, l'hydrolyse ne conduit qu'à des monomères, essentiellement le xylose. Dans un premier temps, nous avons révélé les oligosaccharides grâce à l'orcinol sulfurique (figure 93).

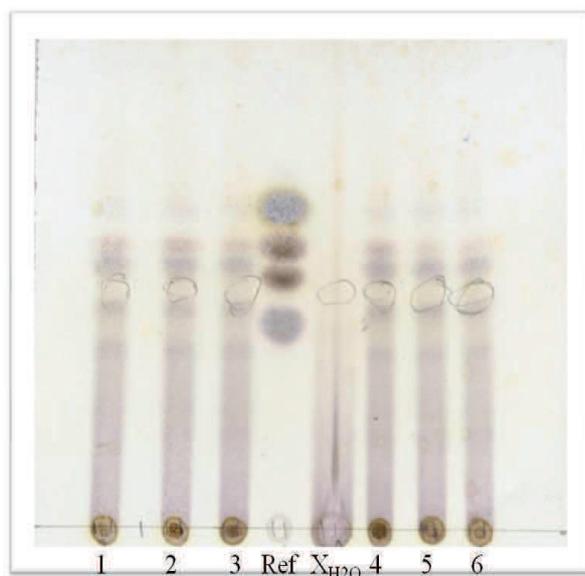


Figure 93: CCM des essais d'hydrolyse enzymatique. Révélation à l'orcinol sulfurique.
 Ref: de haut en bas : xylose, glucose, acide glucuronique, saccharose. X_{H2O}: Xylane H₂O

La migration dans le BAW laisse apparaître très nettement des tâches correspondant à des oligosaccharides. En outre, comme pour les essais d'auto-hydrolyse, certaines tâches, de rapports frontaux différents dans ce cas, sont également révélées par une lampe UV à 254nm suggérant que l'hydrolyse enzymatique préserve, au moins en partie, des liaisons sucre-phénol d'intérêt pour la suite de l'analyse.

Les fragments d'intérêt, c'est-à-dire des oligosaccharides associés à des résidus phénoliques, étant supposés portés l'activité anti-oxydante du polymère natif, nous avons mis au point une méthode complémentaire de révélation basée sur le principe de la bio-autographie et utilisant comme révélateur le radical DPPH[•] dans le but de guider le choix des motifs à analyser. Brièvement, il suffit pour développer la plaque CCM de la plonger dans une solution de radical DPPH[•] de concentration $2 \cdot 10^{-5} M$. Colorée en violet, la présence de composés antioxydant se traduit par une rapide décoloration de la plaque à l'emplacement du composé. Ainsi, l'ensemble de ces systèmes de révélation a permis d'identifier parmi les nombreux motifs présents dans l'hydrolysats, des oligosaccharides répondant aux trois modes de révélation c'est-à-dire des sucres porteurs de motifs aromatiques capables d'inhiber un radical DPPH[•].

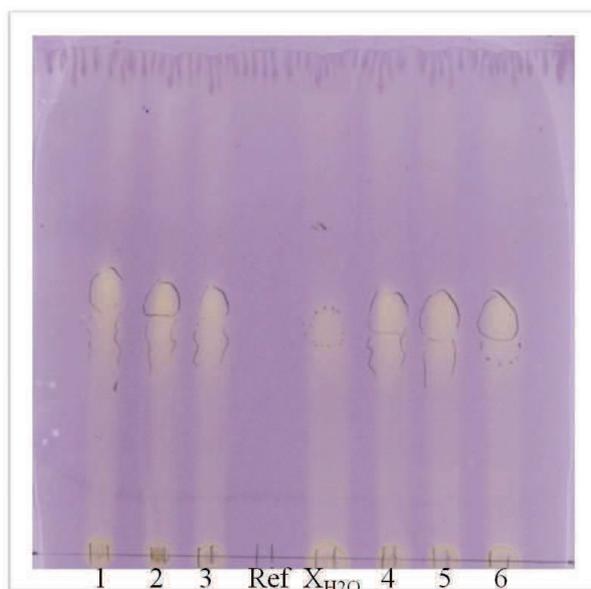


Figure 94: CCM des essais d'hydrolyse enzymatique. Révélation au DPPH.
 Ref: de haut en bas : xylose, glucose, acide glucuronique, saccharose. X_{H_2O} : Xylane H_2O

Comme le montrent les photographies des CCMs Figure 93 et Figure 94, ces produits d'intérêt analytique sont formés dès 2,5min de réaction en utilisant seulement 1,5 unité enzymatique.

Dans le but de produire une plus grande quantité d'hydrolysats pour poursuivre son étude structurale, nous avons réalisé après cette phase d'optimisation, l'hydrolyse enzymatique de 80 mg d'hémicelluloses selon les conditions de l'essai n°6, c'est à dire avec 1,5 UE pendant 5 minutes. Plus précisément, la digestion a été réalisée sur 80 mg de xylane solubilisés dans 60 mL d'eau distillée. Après quelques minutes nécessaires pour porter la solution à 37°C, une solution de 48 mg d'enzymes (1,5 UE/mg de xylane) dans 20 mL d'eau est ajoutée à la solution de xylane. De la même manière que pour les essais d'optimisation, l'enzyme est désactivée au bout de 5 min, par ajout de 3 volumes d'éthanol. Cette opération permet de précipiter les plus gros polymères ainsi que l'enzyme. Après refroidissement, le surnageant est séparé du précipité par filtration. Les échantillons sont alors congelés et lyophilisés. Pour la fraction surnageante, celle qui nous intéresse ici, nous avons obtenu une masse de 57,4 mg, soit un rendement massique 72 %.

L'hydrolysats est caractérisé, comme pour les essais d'optimisation, par CCM avec une triple révélation à l'orcinol sulfurique pour identifier les sucres, sous UV et au DPPH pour identifier les composés antioxydants. Les résultats de cette bio-autographie sont présentés Figure 95.

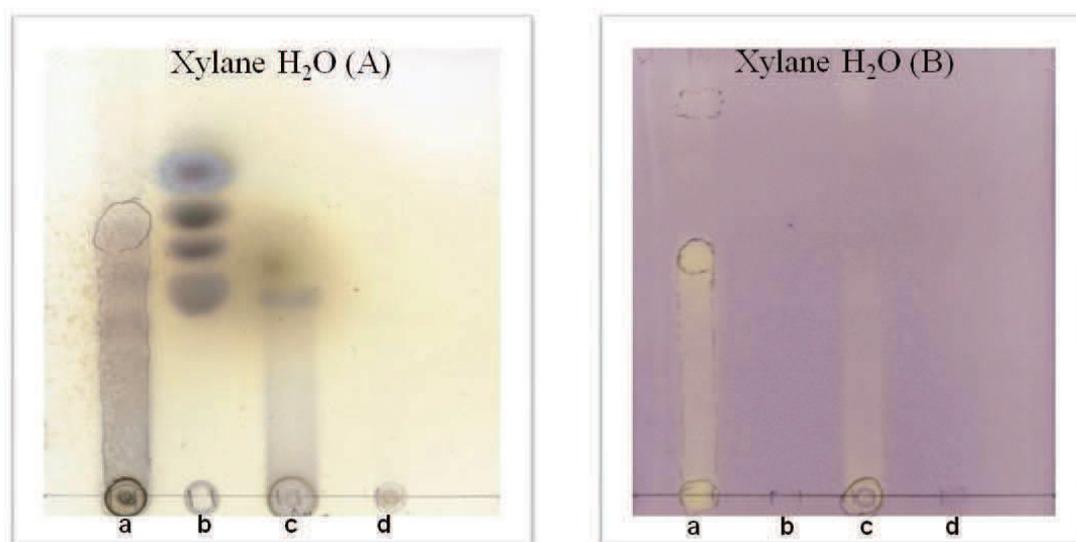


Figure 95: Résultat bio-autographique du xylane H₂O hydrolysé par enzyme.
 (A): Révélation à l'orcinol sulfurique. (B): Révélation au DPPH. (a) : xylane hydrolysé ; (b) : références : de haut en bas : xylose, glucose, acide glucuronique, saccharose ; (c) : xylane non hydrolysé ; (d) : enzyme

Les résultats montrent clairement la reproductibilité de l'hydrolyse sur de plus grosses quantités de substrat et la formation en quantité non négligeable de la fraction d'intérêt décrite précédemment. La récupération de plus de 50mg de composé hydrolysé nous a alors permis d'envisager des analyses complémentaires et pour cela nous avons choisi de caractériser l'extrait par HPLC.

II.2.2. Caractérisation structurale

a. HPLC

Nous avons par conséquent effectué une analyse par HPLC du xylane hydrolysé. Les xylo-oligosaccharides de petite taille (souvent jusqu'à 10 unités) sont solubles dans les alcools comme l'éthanol ou le méthanol. Il en est de même généralement pour les composés phénoliques de faibles poids moléculaires. Afin de simplifier la séparation de l'hydrolysate enzymatique, manifestement de composition complexe, nous avons tout d'abord solubilisé dans le méthanol la fraction du xylane hydrolysé soluble en milieu alcoolique et pour récupérer un maximum de matière en solution, celle-ci a été assistée d'un traitement aux ultrasons pendant 10 min. Par cette méthode, il est possible de s'affranchir des oligosaccharides non substitués de plus hauts poids moléculaires encore présents dans l'échantillon (visibles au point de dépôt des CCM) et également des polyphénols non glycosylés et ainsi de concentrer l'analyse HPLC sur les composés d'intérêt, c'est-à-dire les oligosaccharides phénoliques. La fraction méthanolique a été étudiée dans un premier par un

test bio-autographique utilisant le radical DPPH ce qui nous a permis de vérifier que les xylo-oligosaccharides phénoliques utiles à l'analyse structurale ont été majoritairement extraits au méthanol, comme en témoigne la photographie des CCM présentée Figure 96.

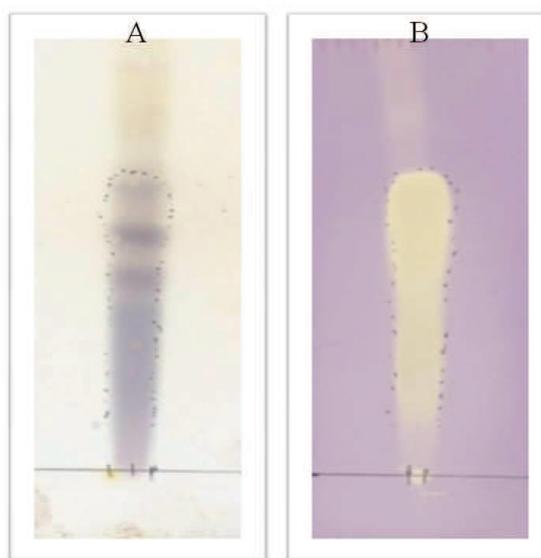


Figure 96: Bio-autographie de la fraction méthanolique du xylane H₂O hydrolysé.
Eluant: BAW. A: révélation aux UV (254nm) et à l'orcinol sulfurique ; B: révélation au DPPH

b. LC-MS

Nous avons par la suite analysé cette fraction par HPLC combinant une détection UV-visible en balayage de longueur d'onde et une détection par spectrométrie de masse haute résolution. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Mr. Cyril Colas de la plateforme de spectrométrie de masse de l'Université d'Orléans.

Les conditions d'analyse mises au point ainsi que le chromatogramme obtenu, par détection de masse, sont présentés Figure 97.

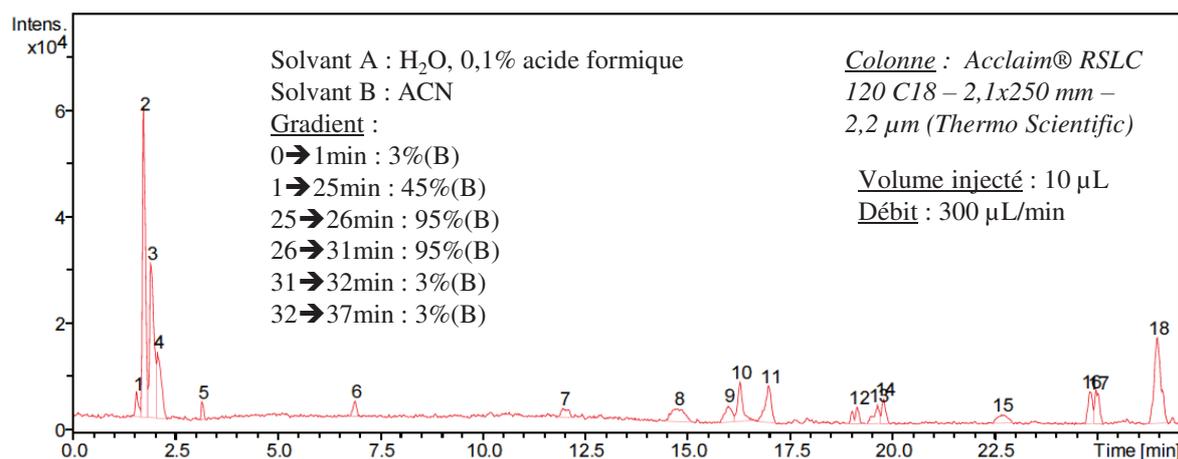


Figure 97: Profil HPLC de la fraction méthanolique du xylane H₂O hydrolysé.
 Système de solvants: eau dans 0,1 % d'acide formique et acétonitrile

Dans notre cas, la double détection, s'avère particulièrement utile pour opérer une sélection à partir des nombreux pics présents sur le chromatogramme et ne conserver que ceux pouvant fournir des renseignements sur les éléments de structures recherchées. En effet, en nous appuyant sur les bases de données de masses d'oligosaccharides, il est relativement aisé d'attribuer des structures à une grande partie des pics observés correspondant à des xylo-oligosaccharides non substitués ou portant des acides uroniques, analogues aux fragments obtenus par autohydrolyse (famille de fragment d'ailleurs facilement observables sur les profils CCM). L'ensemble de ces pics ne donne aucune réponse sur le chromatogramme enregistré par détection par spectroscopie d'absorption UV-Visible (chromatogramme non représenté). En revanche, celui-ci permet d'isoler essentiellement deux pics d'intérêt associés à de forte absorbances, notamment à 254nm reflétant la présence sur ces molécules de cycles aromatiques. Il s'agit des pics numérotés 8 et 11 sur le chromatogramme de la Figure 98. Celle-ci présente pour ces deux composés le spectre d'absorption ainsi que le spectre de masse électrospray haute résolution enregistrés.

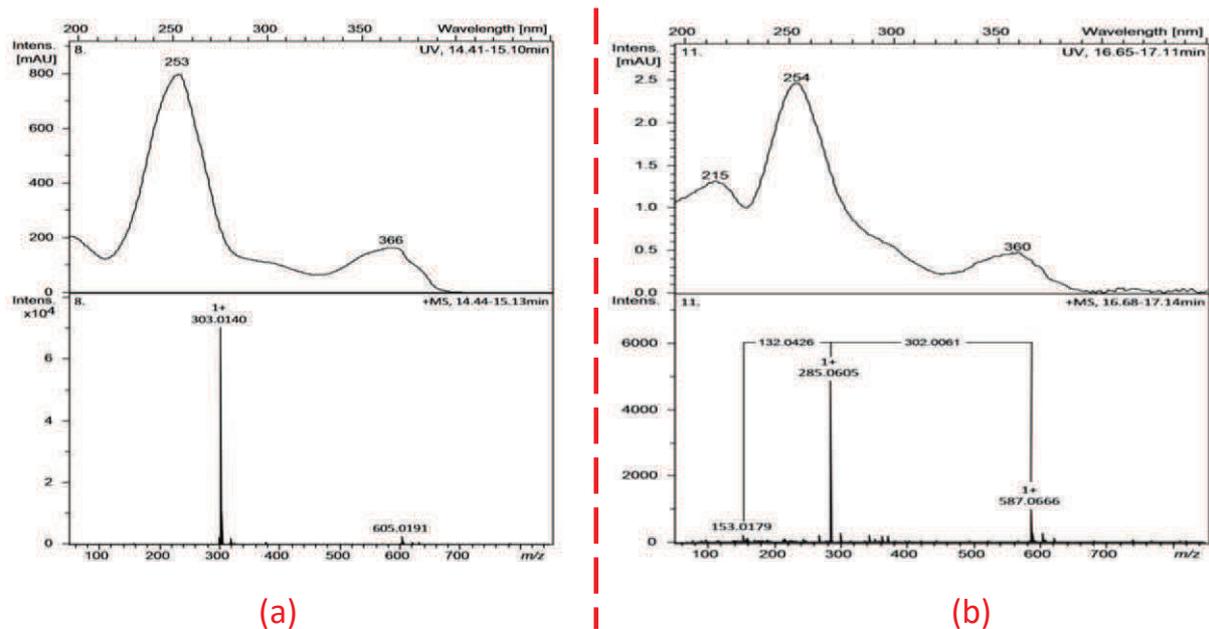


Figure 98: Spectre UV-Visible et Spectre de masse des composés n°8 (a) et n°11 (b)

Le composé 8, s'il ne fournit sur le chromatogramme obtenu par détection de masse qu'un pic d'intensité relative moyenne, il donne sur le chromatogramme issu de la détection UV-Visible un pic de forte intensité, largement majoritaire ce qui suggère pour ce composé un élément de structure caractérisé par un fort coefficient d'extinction molaire. Plus précisément, l'examen de son spectre d'absorption UV-Visible, présentant deux maxima à respectivement 253 et 366nm et sa masse exacte de 303,0135 correspondant à la formule brute $C_{14}H_7O_8$ ($[M+H]^+$) permettent d'associer à ce pic la structure de l'acide éllagique (Figure 99), un antioxydant bien connu et décrit comme étant abondant dans de nombreux fruits et en particulier la châtaigne.²⁰⁵ Toute ambiguïté a pu être levée par l'examen, dans les mêmes conditions, du chromatogramme de l'acide éllagique commerciale pris comme témoin.

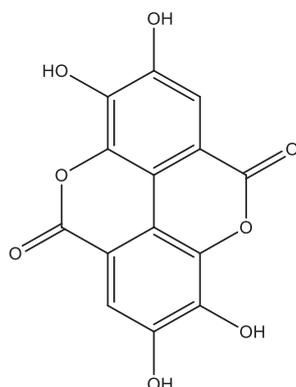


Figure 99: Structure de l'acide éllagique.

²⁰⁵ Dinis, L.T.; Oliveira, M.M.; Almeida, J.; Costa, R.; Gomes-Laranjo, J.; Peixoto, F., *Food Chemistry*, **2012**, 132, 1-8

Bien que ce motif soit assez largement décrit dans la littérature,^{206,207} à la fois pour son implication, lorsqu'il est partiellement ou totalement ouvert, dans la constitution de lignines ou pour l'étude de ces propriétés anti-oxydantes intéressantes, sa présence dans cet échantillon est surprenante : rappelons que le xylane extrait à l'eau, substrat de l'hydrolyse enzymatique a été purifié par ultra filtration avec un seuil de coupure de 1000 Dalton ce qui exclut logiquement de l'échantillon toutes les molécules de faible poids moléculaire comme l'acide ellagique. Ainsi la présence de ce dernier dans l'hydrolysate ne peut s'expliquer que par son relargage dans la solution après coupure d'une ou plusieurs liaisons polysaccharides-acide ellagique pendant la réaction d'hydrolyse suggérant alors qu'il est un des motifs phénoliques portés par le xylane.

Cette hypothèse, particulièrement intéressante du point de vue de l'analyse structurale du polymère, se trouve renforcée par l'étude de la structure du second composé d'intérêt identifié (numéro 11 sur le chromatogramme Figure 98). Comme pour le composé 8, celui-ci présente un spectre UV-Visible caractéristique d'un composé phénolique avec un profil assez similaire à celui de l'acide ellagique laissant supposer des similitudes de structure. Son spectre de masse présente quant à lui trois pics de masse : un pic moléculaire à m/z 587,0667 et deux pics fragment à m/z 285,0605 et m/z 153,0179. On note tout d'abord que la perte de masse entre le pic moléculaire et le premier fragment ($m/z = 285,0605$) correspond à un résidu de masse 302, c'est-à-dire une masse correspondant au motif acide ellagique décrit précédemment. La différence de masse entre les deux fragments de rapport masse sur charge 285,0605 et 153,0179 est de 132uma ce qui correspond à un xylose déshydraté. Le fragment m/z 153,0179 serait donc un motif phénolique et plus précisément un résidu galloyl. Sur la base de cette analyse, nous pouvons proposer une structure très probable pour ce produit d'hydrolyse comportant une unité xylose substituée, sur deux points de branchement, par un motif d'acide gallique lié à un acide ellagique partiellement ouvert.

²⁰⁶ Gil, M.; Tomas-Barberan, F.A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.M.; Kader, A.A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 4581-4589.

²⁰⁷ Mämmelä, P.; Savolainen, H.; Lindroos, L. ; Kangas, J. ; Vartiainen, T., *Journal of Chromatography A*, **2000**, 891, 75-83

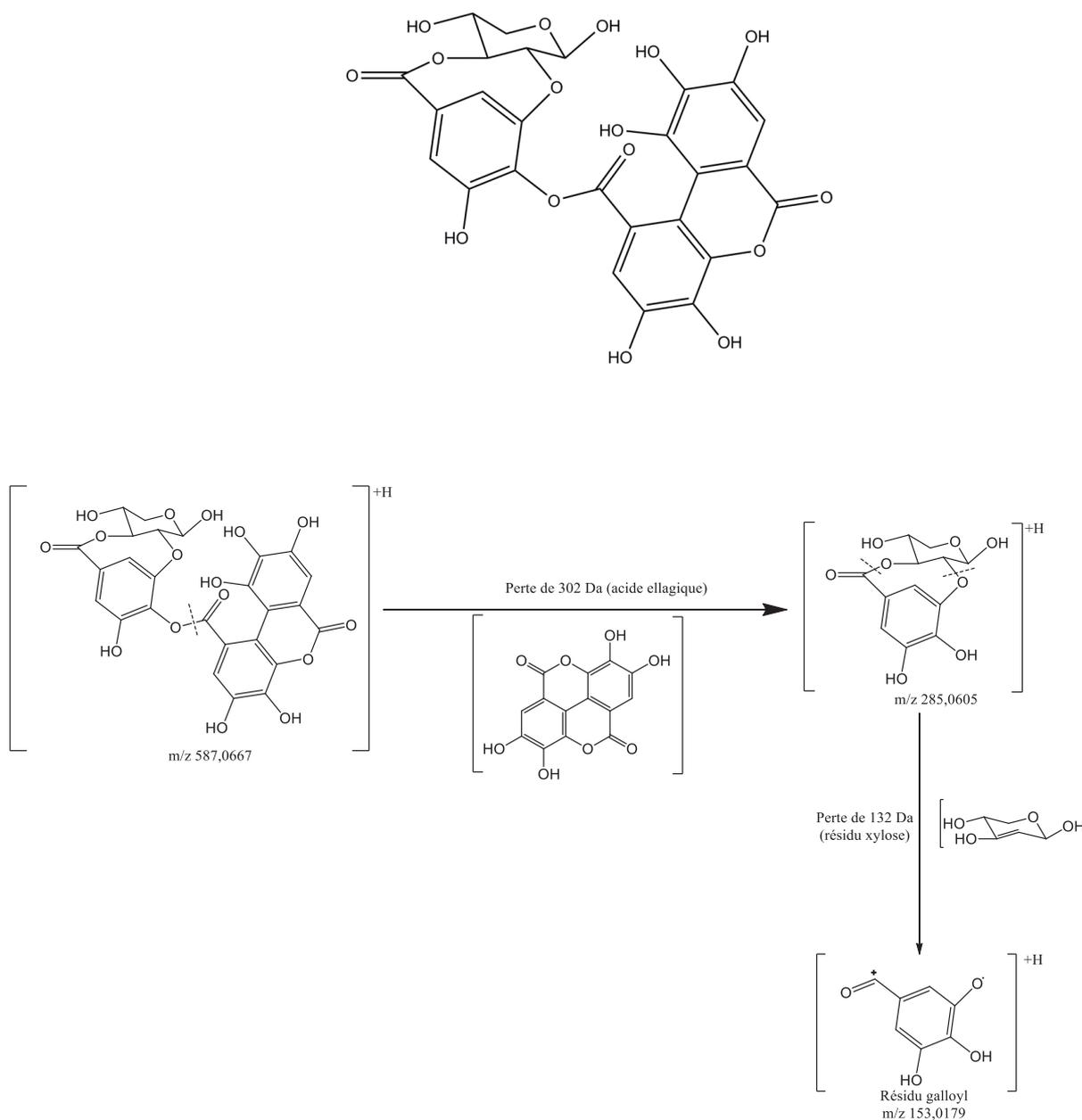


Figure 100: Structure proposée pour le composé 11. Mécanisme de fragmentation.

Brièvement, le mécanisme de fragmentation débute par la perte de l'unité acide ellagique pour conduire à l'ion $[M+H]^+=285,0605$, qui correspond au pic de base. Ce fragment fils se coupe à son tour pour conduire à la perte d'un résidu anhydroxylose amenant au composé galloyl avec un pic à m/z 153,0179.

Ce type de structure est original. Il est toutefois possible de trouver dans la littérature des enchainements proches comme par exemple un acide ellagique glycosylé, récemment décrit

par Del Bubba *et al.*²⁰⁸ dans le cadre d'une étude visant à caractériser des composés polyphénoliques extraits de fraises des bois et pour lequel les auteurs suggèrent un mécanisme de fragmentation en électrospray similaire, conduisant notamment à la libération d'un motif acide ellagique après coupure et recyclisation dans la source de l'appareil.

En conclusion, l'activité anti-radicalaire remarquable de ce polysaccharide est bien portée par des résidus de type phénolique greffés sur la chaîne osidique démontrant ainsi au-delà de cette relation structure/activité l'étroite corrélation qui existe entre procédés d'extraction et propriétés biologiques. Par ailleurs, comme nous l'avons déjà mentionné, l'étude structurale de telles molécules est grandement conditionnée par les stratégies d'analyses employées : alors que l'autohydrolyse renseigne sur la présence de motifs feruliques, comme dans bon nombre de polymères de ce type décrits dans la littérature, un hydrolyse enzymatique contrôlée a permis de mettre en évidence des fragments d'intérêt de structure plus originale.

²⁰⁸ Del Bubba, M.; Checchini, L.; Chiuminatto, U.; Doumett, S.; Fibbi, D.; Giordani, E., *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, *47*, 1207-1220.

Conclusion générale

Est-il possible d'extraire sélectivement des hémicelluloses d'une matière lignocellulosique comme le bois de châtaignier, en vue de les valoriser industriellement ?

La question posée renvoie d'une part vers l'efficacité et le potentiel de transfert des méthodologies d'extraction pouvant reposer sur des principes physiques, chimique ou biologiques et même des combinaisons de ces derniers et d'autre part vers l'organisation structurale des parois secondaires des cellules végétales reposant sur des interactions moléculaires multiples tant par le nombre que par la nature des liaisons chimiques. Ainsi, le taux de lignification élevé des parois secondaires s'oppose habituellement à l'extractibilité des hémicelluloses dans l'eau et impose donc la mise en œuvre d'une délignification préalable des sciures.

Dans une première partie, pour tenter de contourner l'utilisation de dérivés chlorés dans l'étape de délignification, nous avons mis en œuvre de nouvelles méthodes de délignification respectant les principaux critères d'une chimie plus respectueuse de l'environnement en nous intéressant au pouvoir catalytique, en milieu oxydant, de macrocycles tétrapyrroliques. Dans une première phase d'essais, l'utilisation d'une phtalocyanine de fer hydrosoluble, déjà en partie étudiée pour cette application au laboratoire s'est avérée intéressante. Les résultats les plus significatifs ont été observés lorsque son action est conjuguée à des prétraitements physiques de la biomasse conduisant à des pertes de masse pouvant atteindre 30% de la masse initiale correspondant à une atteinte plutôt sélective des lignines. Toutefois, la fraction polysaccharidique est également affectée en partie par le traitement. En outre la relative instabilité du catalyseur nous a conduits à synthétiser puis tester des structures de porphyrines métallées au fer ou au manganèse. Globalement et quel que soit le métal utilisé, ces catalyseurs se sont révélés nettement plus stables et plus actifs que la phtalocyanine. En revanche nous avons pu montrer par l'analyse des résidus que ce procédé ne conduit qu'à une très faible sélectivité pour les lignines. Ainsi, si ces catalyseurs semblent décevants au regard des objectifs initiaux qui étaient, rappelons-le, d'atteindre par une méthode de chimie verte une délignification complète et sélective pouvant se substituer aux procédés classiques, la délignification partielle obtenue nous a tout de même permis d'étudier l'extraction des hémicelluloses.

Dans une seconde partie, nous avons donc réalisé l'extraction en milieu alcalin d'une part et par l'eau chaude d'autre part des hémicelluloses contenues dans les résidus délignifiés par le procédé aux phtalocyanines de fer.

Ces essais ont permis de démontrer que lorsqu'on s'affranchit du traitement agressif aux chlorites de sodium, l'extractibilité en milieu alcalin est plus faible mais le polymère extrait a un degré de polymérisation beaucoup plus grand, ce qui fournit des renseignements précieux d'un point de vue fondamental sur la structure de cette hémicellulose à l'état natif. L'extraction à l'eau chaude, procédé plus doux dont le principal objectif était de préserver l'intégrité de la structure des hémicelluloses mais également de proposer une méthodologie respectueuse de l'environnement, permet d'isoler un xylane de structure proche d'un 4-*O*-Méthylglucuronoxylane. L'analyse de sa structure démontre qu'il est substitué par des unités phénoliques, résultat d'un processus de délignification incomplet, dont nous avons pu établir la structure de certains motifs et qui constitue une intéressante observation des interactions existantes entre la lignine et les hémicelluloses. Il illustre aussi la relative solidité de certaines liaisons existantes entre polysaccharides et polyphénols du bois.

La présence de fragments polyphénoliques sur le MGX extrait à l'eau chaude lui confère une activité anti-oxydante particulièrement intéressante puisque nous avons obtenu une $CI_{50}=225\mu\text{g.mL}^{-1}$, seulement 10 fois inférieure à la vitamine E, et presque 20 fois supérieure au BHT, deux composés références démontrant ainsi son potentiel de valorisation dans les domaines des industries agroalimentaires ou cosmétiques. Ces résultats, très encourageants ont fait l'objet d'une publication.²⁰⁹

Du point de vue de l'analyse structurale, il conviendrait pour donner une suite à ce travail de mettre au point des conditions de purification des oligosaccharides formés par hydrolyse enzymatique, indispensable pour une caractérisation plus fine des motifs et notamment des points de branchement phénol-sucre.

De plus, nous l'avons vu, la structure des catalyseurs tétrapyrroliques influence grandement l'efficacité de la délignification. Il serait pertinent dans une prochaine étude de tester des porphyrines de structures plus proches des noyaux pyrroliques des enzymes et en particulier de développer des porphyrines portant un groupement imidazole *via* un bras espaceur capable de se recourber et complexer le métal centrale mimant ainsi le complexe actif protéine-hème des enzymes.

Pour conclure, si l'on revient vers la question posée en préambule de cette conclusion, ce travail démontre qu'il ne peut y avoir de solution unique : le champ d'application de

²⁰⁹ Renault, E. ; Barbat-Rogéon, A. ; Chaleix, V. ; Calliste, C-A. ; Colas, C. ; Gloaguen, V., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2014**, 70, 373-380.

l'hémicellulose est dépendant de sa structure elle-même déterminée par la méthodologie mise en œuvre pour la mobiliser. Situé à l'interface des disciplines chimiques et biologiques que porte le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, ce travail s'inscrit dans un objectif de participation à la valorisation des coproduits de la filière bois. Il peut être une base de travaux ultérieurs académiques et/ou finalisés portant sur des stratégies toujours plus efficaces de délignification de la matière ligno-cellulosique.

Partie Expérimentale

I. Réactifs et solvants

Réactif	Pureté	Fournisseur
2,2-diphényl-1-picrylhydrazine		Sigma
2-6-dichlorobenzaldéhyde	99%	Sigma-Aldrich
Acétate de Manganèse	98%	Aldrich
Acide 4-sulfophtalique	50%	Acros
Acide acétique	Glacial	Carlo Erba
Acide chlorhydrique (normadose)	0,05 N	Alfa Aesar
Acide Chlorosulfonique	97%	Acros
Acide gallique	98%	Aldrich
Acide glucuronique	97%	Fluka
Acide sulfurique	95%	VWR
Bicarbonate de sodium	>99,5%	Aldrich
Borohydrure de sodium	98%	Sigma
BSTFA, TMSCI	1%	Alltech
Butanol	99,5%	Prolabo
Chlorite de sodium	80%	ACROS
Chloroforme	99%	SDS
Chlorure de fer II tétrahydraté	98%	Alfa Aesar
Chlorure de sodium	99,50%	Prolabo
D ₂ O	100%	SDS
Diazote	Alphagaz	Air Liquide
Ethanol	absolut	VWR
Ether de pétrole	98%	VWR
Hydroxyde de potassium	85%	Acros
Hydroxyde de sodium	98,50%	Acros
Hydroxyde de sodium (normadose)	0,1 N	Alfa Aesar
Hydroxytoluène butylé (BHT)	99%	Alfa Aesar
Iodure de potassium	99%	Acros
Méso-inositol	98%	Acros
Méthanol	>99,5%	VWR
Méthanol/HCl	3 N	Supelco
MHDP	90%	Aldrich
Molybdate d'ammonium	>99%	Sigma
Nitrobenzène	99%	Acros
Oxalate d'ammonium	98%	Prolabo
PABAH	97%	Fluka
Permanganate de potassium	pur	Prolabo
Peroxyde d'hydrogène	30%	VWR

Phénol	99%	Acros
Pyridine	99,8%	Aldrich
Pyrrole	98%	Acros
Réactif de Folin-Ciocalteu		Sigma Aldrich
Résine H⁺		Amberlite
Sulfate de fer heptahydraté	98%	Prolabo
Sulfate de magnésium	pur	Carlo Erba
Tétrasulfophtalocyanine de fer (sel de sodium)		Aldrich
Thiosulfate de sodium	99,5%	Acros
Urée	99%	Acros
Vitamine E (α-tocophérol)	>98%	Sigma
Xylanase <i>Thermomyces Lanuginosus</i>	3500 UE/g	Sigma-Aldrich
Xylose	99%	Sigma

II. Analyses physico-chimiques

II.1. Analyses spectroscopiques

II.1.1. Spectroscopie Infrarouge

Les spectres infrarouge ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 1310 à transformée de Fourier, piloté par le logiciel informatique Spectrum pour une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4 000 cm^{-1} . Les échantillons sont déposés sur pastilles de KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} .

II.1.2. Spectroscopie RMN

Les analyses RMN ont été réalisées par Yves Champavier à la plate-forme SCRABL de l'Université de Limoges sur un appareil Bruker DPX-400 à une fréquence de 400,13 MHz pour le proton. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm ; le tétraméthylsilane étant pris comme référence interne (δ_0 ppm). Les constantes de couplages J sont exprimées en Hz.

II.1.3. Spectroscopie Ultraviolet-Visible

Les densités optiques des dosages colorimétriques sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à double faisceau Shimadzu UV-1700 series. Elles sont effectuées dans des cellules en polystyrène (PS) de 1 cm de trajet optique. Les spectres des macrocycles tétrapyrroliques ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Analytikjena SPECORD 210, piloté par le logiciel WinAspect dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique à une concentration voisine de $0,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Les longueurs d'onde correspondantes aux absorbances maximales sont exprimées en nm et les coefficients d'absorption molaire ϵ , en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II.1.4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les spectres de masse MALDI-TOF des oligosaccharides ont été réalisés par David Ropartz à la plateforme de spectrométrie de masse de l'INRA de Nantes (UR 1268 BIA). Les échantillons hydrolysés ont été dissous dans l'eau à une concentration de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre MALDI-LR (Waters, Manchester, UK) dont le laser émet dans l'UV à 337 nm (fréquence 5 HZ) pour désorber et ioniser un mélange de matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. La matrice utilisée est l'acide 2,5- dihydroxybenzoïque (DHB), dissoute à $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans l'eau contenant 0,1% de TFA.

Les spectres des composés tétrapyrroliques ont été enregistrés par le Dr. Nicolas Villandier (LCSN), à l'aide d'un appareil « 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer » de la plateforme de spectrométrie de masse de l'unité de pharmacologie de la faculté de médecine et de pharmacie de Limoges.

Caractéristiques d'analyse:

- Plaque métallique (de type 384 Opti-TOF 123x81 mm) où les échantillons sont déposés et qui est chargée dans une chambre à vide ;
- Chambre de vide : pression : $5 \cdot 10^{-7}$ Torr
- Laser : type ND:YAG, longueur d'onde 355 nm, pulsation : 3 à 7 ns
- Mode d'ionisation : positif
- Mode de détection : réflecteur
- Gamme de masse analysées : 500 à 1500 m/z
- Acquisition : 900 coups de laser, 30 sous-spectres et acquisition du spectre moyen
- Puissance réglable du laser : 2000 à 5000 (unités arbitraires)

Une quantité d'échantillon de 1 µL à une concentration en porphyrine à analyser de 1 mg/mL est ajoutée à 10 µL d'une matrice à une concentration de 3 mg/mL. Si l'échantillon est soluble dans le dichlorométhane, la matrice utilisée est le dithranol dans le dichlorométhane, s'il est soluble dans l'eau, la matrice est dans ce cas l'acide cyano-hydroxycinnamique (CHCA) dans un mélange acétonitrile/eau/TFA (50/50/0,1).

II.1.5. UHPLC/DAD/HRMS

La séparation des composés issus de l'hydrolysate enzymatique et extraits au méthanol a été effectuée par Cyril Colas de l'Université d'Orléans et utilise un système UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Germering, Allemagne) équipé d'une pompe binaire et d'un détecteur à photodiode (DAD). La colonne est une Acclaim RSLC 120 C18 de 250x2,1 mm avec une taille de particules de 2,2 µm (Thermo Scientific) possédant un filtre de garde (Phenomenex) C18 SecurityGuard Ultra (2,1 mm). La phase mobile consiste en un mélange d'eau et d'acide formique à 0,1% (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le programme de gradient suivant a été utilisé pour la séparation: augmentation linéaire de 3 à 45% B de 1 à 25 min et 45 à 95% B en 1 min, et enfin constant à 95% B pendant 5 min. La colonne est thermostatée à 40 °C. Le flux est fixé à 300 µL/min. Enfin, le volume d'injection est de 10,0 µL.

L'analyse SM a été effectuée sur un spectromètre de masse maXis UHR-Q-TOF (Bruker, Bremen, Allemagne) en mode positif selon un mode d'ionisation par électrospray. Le voltage capillaire est fixé à 4.5 kV. La pression et le flux des gaz nébulisateur et sec (azote) sont fixés à 1,1 bar et 9,0 L/min et le gaz sec est chauffé à 200 °C. Les spectres de masse sont enregistrés à 1 Hz entre m/z 50 et 1650.

II.2. Chromatographie

II.2.1. Chromatographie sur couche mince

Des plaques de silice Kieselgel 60F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur (Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale.

La révélation des plaques se fait par :

- Observation sous ultraviolet à 254 nm
- Vaporisation par une solution d'orcinol sulfurique²¹⁰ (0,1 % d'orcinol dans de l'acide sulfurique à 20 %) puis chauffage, dans le cas des composés glycosidés.

²¹⁰ Miller, G.; Golder, R.; Miller, E. *Analytical Chemistry*, **1951**, 23, 903–905

- Vaporisation d'une solution de 2,2-diphényl-1,1-picrylhydrazine (DPPH) à 5.10^{-4} M dans l'éthanol pour les composés anti-oxydants.

Les divers éluants utilisés sont précisés après chaque protocole expérimental de synthèse. Les proportions de solvant constituant les éluants indiquées sont volumiques.

II.2.2. Chromatographie flash automatisée

Le combi-flash® utilisé est de la marque "Teledyne Isco", il permet l'utilisation de solvants à des débits allant de 5 à 100 mL/min ($\pm 5\%$), avec une pression maximale de 3,45 bar. L'usage du combi-flash® permet de réguler en temps réel les proportions de chacun des solvants. Cet appareil permet également la détection UV instantanée ainsi qu'une séparation des produits en fonction de leur absorbance. Dans notre cas, il est utilisé à une longueur d'onde de 254 (± 5 nm).

II.2.3. Chromatographie en phase gazeuse

Un système Perichrom PR-2100 a été utilisé pour l'analyse des méthylglycosides triméthylsilylés. Il est équipé d'une colonne capillaire CP-SIL-5CB (Chrompack ; L = 50 m, $\varnothing_{int} = 0,32$ mm ; phase : diméthylpolysiloxane) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est l'azote sous pression de 75 kPa. La température de l'injecteur et du détecteur est fixée à 260°C. Le chromatographe est piloté par ordinateur et les chromatogrammes traités par le logiciel Winilab v.3 de Perichrom.

II.2.4. Chromatographie sur Biogel P2

Les séparations par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne en basse pression, ont été réalisées sur colonnes de Biogel P2. Les colonnes sont équilibrées dans le système d'élution. L'élution se fait grâce à une pompe péristatique dont le débit est fixé à 10 mL.h⁻¹ et les différentes fractions sont recueillies à l'aide d'un collecteur (Redifrac Pharmacia-Biotech).

II.3. Tests RPE :

Le spectre RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) caractéristique du radical DPPH est mesuré à l'aide du spectromètre ESP300E Bruker. Les paramètres de mesures sont les suivants :

- modulation de fréquence : 100 kHz
- fréquence micro-onde : 9,78 GHz
- puissance micro-onde : 4 mW
- modulation d'amplitude : 1,97 G
- temps de conversion : 5,12 msec
- constante de temps : 10,24 msec

Le gain doit être modifié en fonction des solvants utilisés. Les mesures sont effectuées à température ambiante. Le spectre obtenu correspond à la somme de deux balayages successifs, ceci afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

III. Procédés de délignification

III.1. Matériel biologique

Les sciures utilisées pour nos expérimentations sont des sciures de châtaignier, arbre appartenant à la catégorie des bois durs dits de feuillus. Elles nous ont été fournies par l'établissement Mazières de la Chapelle Montbrandeix (87). Ces sciures ont été séchées à l'étuve ventilée durant trois jours à la température de 40 °C. Elles ont par la suite été broyées puis tamisées (granulométrie inférieure à 250 µm).

III.2. Protocole d'extraction

III.2.1. Extraction à l'éthanol

Cette première étape permet d'éliminer les sucres circulants et les tannins solubles. L'extraction a été réalisée à partir de 22,5 g de sciures de châtaignier préalablement tamisées à 250 µm dans 800 mL d'éthanol à 80% à 80 °C pendant 7 h. Le résidu obtenu après filtration à chaud est alors refroidi à température ambiante avant d'être mis à sécher une nuit à l'étuve ventilée à 40 °C.

III.2.2. Extraction des pectines

Le résidu est dépectinisé dans 800 mL d'une solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 1% à 80°C pendant 2 heures. La solution est refroidie à température ambiante avant d'être filtrée sur fritté de porosité 3. Le résidu R_{Dép} est, quant à lui, rincé à l'eau distillée.

III.2.3. Délicnification

III.2.3.1. Par le chlorite de sodium

De façon à extraire les hémicelluloses plus facilement, la délicnification de R_{Dép} est essentielle. Elle est réalisée à partir de R_{Dép} placé dans 800 mL d'une solution acide de chlorite de sodium (0,47 g/g de sciures brutes + 0,2 mL l'acide acétique glacial par g de sciures brutes). La solution est portée à 80°C pendant 1h, refroidie à température ambiante et filtrée sur verre fritté de porosité 3. Le résidu est rincé à l'eau distillée jusqu'à neutralisation du filtrat.

III.2.3.2. Par les macrocycles tétrapyrroliques

La délicnification par les macrocycles tétrapyrroliques s'effectue à partir de R_{Dép} placé dans un volume de 50 mL/g(R_{Dép}) d'eau distillée. Le catalyseur (porphyrine ou phtalocyanine selon le cas) et le peroxyde d'hydrogène sont ajoutés à la solution en quantité variables. Les solutions sont placées sous agitation magnétique à température ambiante pendant un temps variable. A la fin de la réaction, le résidu est filtré sur fritté porosité 3 et rincé à l'eau distillée puis placé à l'étuve ventilée à 40 °C afin de les sécher.

III.2.3.3. Prétraitements

i. Ultra-sons

Les traitements ultra-sons sont réalisés à l'aide d'une sonde à ultra-sons Sonifier Cell Disrupto B-30 durant des temps variables et selon un fonctionnement discontinu à 50, 75 et 100% de la puissance maximale et à une fréquence de 20 kHz.

ii. Micro-ondes

Les traitements micro-ondes ont été réalisés dans un four micro-onde de laboratoire Milestone, modèle microSynth., piloté par un logiciel permettant un control du temps de la température et de la puissance d'activation. Plusieurs temps d'activation, selon un

fonctionnement discontinu à des puissances de 100 W, 150W et 200W à la température de consigne imposée ont été testés.

iii. Sous vide

Les traitements d'imprégnation sous vide ont été réalisés à partir de 4g de sciures dépectinisées, placées dans un réacteur bicol et recouvertes d'une solution aqueuse contenant 18,8mg de FePcS. Le vide est effectué à l'aide d'une pompe à palette pendant 2h.

III.2.1. Evaluation du nombre kappa

La méthode de détermination du nombre kappa est adaptée du protocole normé TAPPI T 236 cm-85, et a été effectuée comme suit : 30 mg de sciures sont pesées dans un bécher et dispersée dans 8 mL d'eau distillée. Le résidu est agité fortement à l'aide d'un barreau aimanté. Le permanganate de potassium (1mL d'une solution $0,1M \pm 0,0005 M$) et 1 mL d'acide sulfurique (4,0 M) sont mélangés puis ajoutés au résidu défibré au temps t_0 . On laisse agiter le mélange pendant 10 minutes, puis on arrête la réaction en ajoutant 200 μ L d'iodure de potassium (1,0 M) qui réagit avec le permanganate de potassium restant. La consommation de permanganate de potassium est déterminée par titrage en retour de l'iode libéré, par une solution de thiosulfate de sodium ($0,1M \pm 0,0005 M$). On calcule ensuite la quantité de lignine initialement contenue dans les fibrilles et on détermine l'indice kappa qui mesure l'efficacité du blanchiment des sciures.

Calcul de l'indice kappa :

$$K = (b-a)M/0,1w$$

K = indice kappa

w = masse du spécimen en gramme

b = volume de thiosulfate consommé dans la détermination du blanc, mL

a = volume de thiosulfate consommé par le spécimen, mL

M = concentration du thiosulfate

IV. Extraction des xylanes

IV.1. Extraction alcaline

Cinq grammes d'holocellulose sont ajoutés à 250 mL d'une solution de KOH 4,3 M et de 3 mg.mL⁻¹ de NaBH₄ (agent réducteur). La solution est placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24 h. A la fin de la réaction, la solution est filtrée et le résidu est rincé à l'eau distillée puis lyophilisé. Le pH du filtrat est ajusté à 5,5 par ajout d'acide acétique glacial. Il est ensuite placé en dialyse 48h dans une membrane Spectrapor dont le seuil de coupure est compris entre 6000 et 8000 Da. Après concentration, les hémicelluloses sont précipitées par 3 volumes d'éthanol puis centrifugées pendant 20 minutes à 1860 g (2000 rpm). Le surnageant éthanolique est éliminé et le culot est repris dans de l'eau distillée. La solution est finalement concentrée puis lyophilisée.

IV.2. Extraction à l'eau chaude

Le résidu délignifié par les macrocycles tétrapyrrolique est dispersé dans 50 mL/g de R_{Dep} et porté à reflux pendant 1h. Après refroidissement, le résidu est filtré et rincé à l'eau distillée. Le filtrat est alors récupéré et traité par ultrafiltration avec une membrane de 1kDa, concentré et lyophilisé.

IV.3. Extraction des xylanes aux ultrasons

Dans un bécher, 50mL d'eau distillée sont ajoutées à 1g d'holocellulose. La sonde d'ultrasons et de température sont plongées dans le bécher et placé dans l'enceinte de l'ultrason. La consigne de température est de 100°C pour l'eau. La réaction d'extraction est effectuée durant des temps variables et selon un fonctionnement discontinu à 50, 75 et 100% de la puissance maximale et a une fréquence de 20kHz.

IV.4. Caractérisations chimiques des xylanes

IV.4.1. Etude de la composition centésimale

IV.4.1.1. Dosage des sucres totaux ou dosage de Dubois

Les solutions de polysaccharides à doser, de concentrations comprises entre 5 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ainsi que des solutions de xylose et d'acide glucuronique constitutives de la gamme étalon sont préparées simultanément. A 200 μL des solutions à doser ou de gamme étalon, sont ajoutés 200 μL d'une solution aqueuse de phénol à 5 %. Le mélange est homogénéisé au vortex et 1 mL d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit à la pipette dans le milieu réactionnel. Après homogénéisation au vortex, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 min. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace et placés 30 minutes à l'obscurité. Les densités optiques sont par la suite mesurées à 492 nm sur un spectrophotomètre UV-visible.

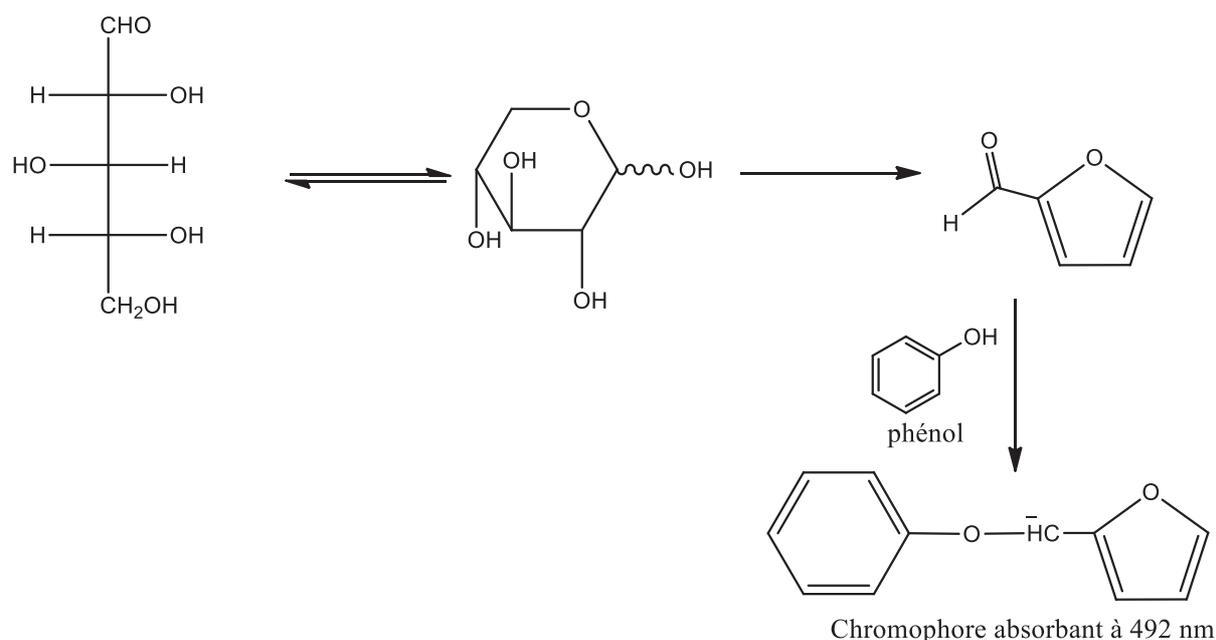


Figure 101: Principe du dosage de Dubois

IV.4.1.2. Dosage des acides uroniques ou dosage de Blumenkrantz

Les solutions de polysaccharides à doser sont préparées simultanément avec une gamme étalon composée de solutions d'acide glucuronique à 25, 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et de xylose à 50, 100, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A 200 μL des solutions à doser, on ajoute 1,2 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 0,0125 M dans de l'acide sulfurique concentré. Le

mélange est homogénéisé au vortex puis refroidi dans de la glace. Les tubes sont ensuite portés à 100 °C au bain-marie durant 5 min. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace puis on ajoute 20 µL d'une solution de MHDP (*mé*ta-hydroxydiphényle) à 0,15% dans NaOH 0,5 %. Les contenus des tubes sont homogénéisés au vortex, une coloration rose apparaît. Les densités optiques sont par la suite mesurées à 520 nm. Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques sont obtenues en utilisant la méthode de calcul décrite par Montreuil *et al.*¹²³

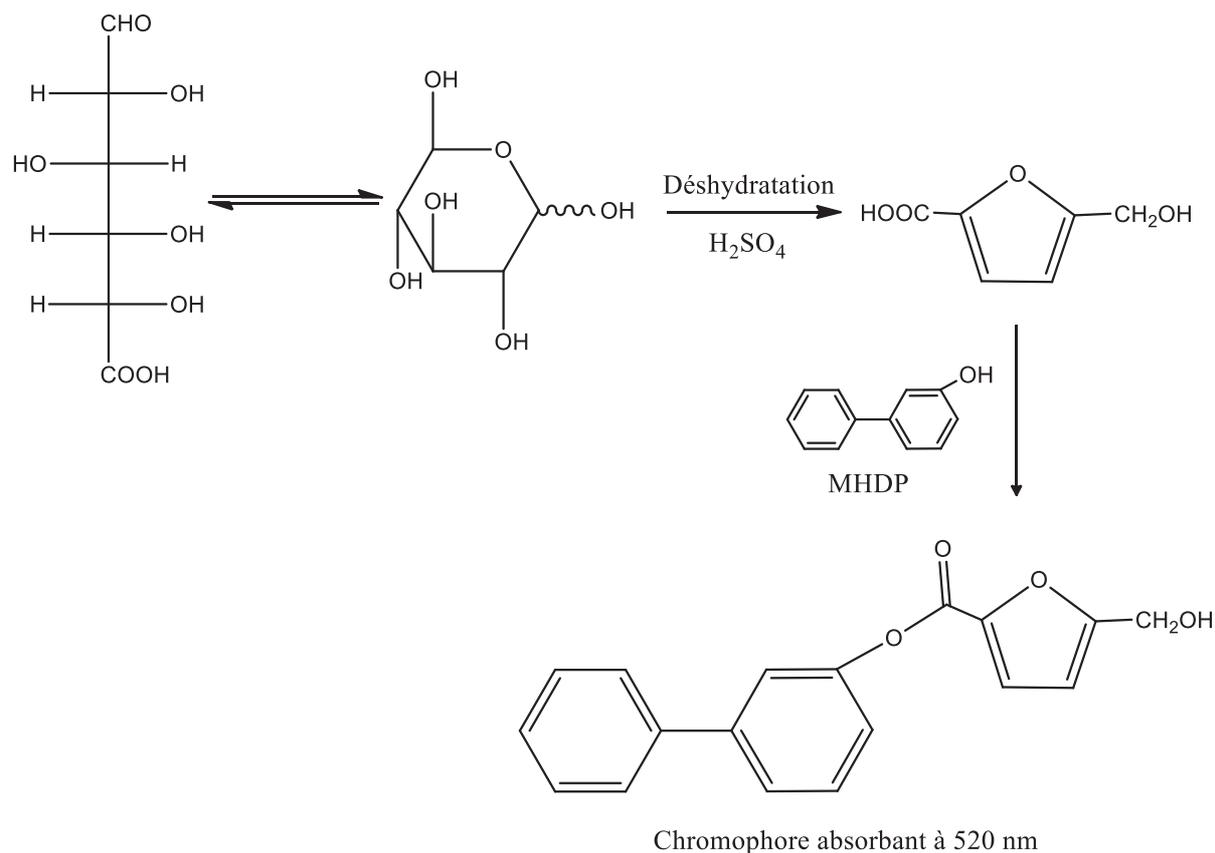


Figure 102: Principe du dosage de Blumenkrantz

En raison de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres, il est nécessaire de corriger les calculs par la méthode établie par Montreuil et Spick. A l'aide des solutions d'oses neutres (Xyl) et d'acides uroniques (GlcA) témoins, on détermine la pente de chaque droite étalon :

- Dosage au phénol : pente= α pour le Xyl
Pente= β pour le GlcA
- Dosage au MHDP : pente= α' pour le Xyl
Pente= β' pour le GlcA

A partir de ces pentes et en fonction des densités optiques (D.O) obtenues selon les dosages, les concentrations en acides uroniques (AU) et en oses neutres (ON) sont déterminées grâce aux formules suivantes :

$$\bullet D.O_{\text{phénol}} = \alpha[\text{ON}] + \beta[\text{AU}]$$

$$\bullet D.O_{\text{MHDP}} = \alpha'[\text{ON}] + \beta'[\text{AU}]$$

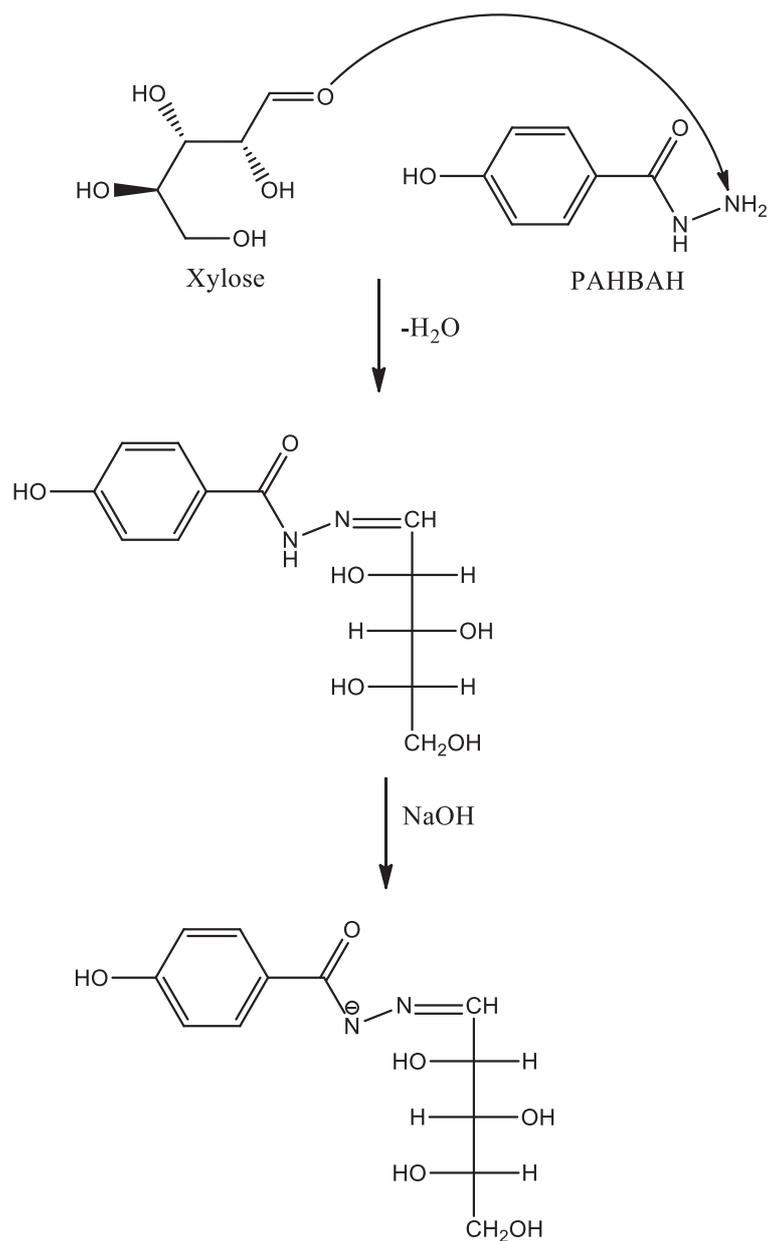
On a alors :

$$\bullet [\text{ON}] = [D.O_{\text{phénol}} - \beta'[\text{AU}]] / \alpha$$

$$\bullet [\text{AU}] = [D.O_{\text{MHDP}} - \alpha'[\text{ON}]] / [(\alpha\beta' - \alpha'\beta) / \alpha]$$

IV.4.1.3. Evaluation du DP : dosage des oses réducteurs ou dosage de Lever

Les solutions de polysaccharides à doser sont préparées simultanément avec une gamme étalon composée de solutions de xylose à 10, 25 et 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A 333 μL de solution à doser, on ajoute 1000 μL d'une solution de PAHBAH (acide hydrazide para-hydroxybenzoïque) à 5% dans HCl 0,5 M, fraîchement dilué au 1/5 par NaOH 0,5 M. Le mélange est homogénéisé au vortex et porté à 100 °C au bain-marie durant 5 min, puis refroidi. La lecture des densités optiques est réalisée à 410 nm.



Composé jaune absorbant à 410 nm

Figure 103: Mécanisme pour la réaction de Lever

IV.4.2. Dosage des hydroxyles phénoliques totaux

Un millilitre d'une solution de xylane à 1 mg.mL^{-1} est mélangé à 2 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 75 g.L^{-1} . Le mélange est aussitôt additionné à 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois puis placé au bain-marie à 50°C pendant 5 minutes avant d'être placé dans un bain d'eau froide. Les mesures d'absorbance sont effectuées au spectromètre UV-visible (Shimadzu) à 760 nm. Les concentrations en hydroxyles phénoliques sont

estimées par référence à une droite étalon d'acide gallique de concentrations comprises entre 20 et 100 mg.L⁻¹.

IV.4.3. Etude de la composition mono-saccharidique par CPG

Le principe de cette méthode repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation des monosaccharides libérés.

IV.4.3.1. Préparation des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés

Les monosaccharides neutres et les acides uroniques sont identifiés et analysés sous forme de méthylglycosides *O*-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling modifiée par Montreuil, dont le principe est décrit dans le chapitre 1. Deux cents à cinq cents microgrammes de polysaccharides, auxquels on ajoute un témoin interne, le méso-inositol (MI), à raison de 50% de la quantité de polysaccharide, sont traités.

a. Méthanolyse

Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides par ajout de 1 mL d'une solution de méthanol chlorhydrique 1 M sur 200 µg d'un échantillon polysaccharidique anhydre contenant 20 µg d'un étalon interne, le méso-inositol (MI). La méthanolyse est stoppée après 24 h de réaction à 80°C par évaporation du méthanol chlorhydrique sous un flux d'azote.

b. Triméthylsilylation

Les méthylglycosides sont triméthylsilylés pendant 2 h à température ambiante par 200 µL d'un mélange V/V pyridine/BSTFA (*N,O*-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide) à 1 % de triméthylchlorosilane (TMCS) avant de pouvoir être injectés en CPG.

IV.4.3.2. Analyse des dérivés TMS en CPG

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont ensuite identifiés et dosés par CPG sur un chromatographe Perichrom PR-2100 en comparaison avec des échantillons témoins. L'élévation de la température du four est programmée de 130 à 210°C à raison de 2°C.min⁻¹, avec un palier de 5 min à 190°C puis de 210 à 260°C à raison de 5°C.min⁻¹. Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics.

V. Oxydation des xylanes

V.1. Protocoles

V.1.1. Par le système phtalocyanine/H₂O₂

L'oxydation des xylanes de hêtre commerciaux de chez Sigma-Aldrich a été effectuée avec des concentrations de réactifs variées selon les essais. Dans un bicol de 50mL, la phtalocyanine est ajoutée à une quantité donnée de xylane commercial. Quelques mL d'eau sont versés afin d'homogénéiser le mélange jusqu'à former une pâte. Le mélange est alors mis sous agitation et chauffé à environ 50°C. Le peroxyde d'hydrogène est alors ajouté. A la fin de la réaction, le mélange est repris dans l'eau, purifié par ultrafiltration, concentré puis lyophilisé.

V.1.2. Par le *periodate* de sodium

Dans un ballon, une solution de 200 mL à 0,077 mol.L⁻¹ de *periodate* de sodium dans l'eau distillée est ajoutée à 1 g de xylanes commerciaux de chez Sigma-Aldrich préalablement dissous dans 40 mL d'eau distillée. Cette solution est placée sous agitation pendant 24 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'ajout de 5 mL d'éthylène glycol. Les xylanes sont alors précipités repris dans l'eau, purifiés par ultrafiltration, concentrés puis lyophilisés.

V.2. Caractérisation de l'oxydation

V.2.1. Dosage des fonctions acides carboxyliques

Vingt milligrammes d'échantillon sont mis en solution dans 50 mL d'eau distillée auxquels est ajouté 1 mL de soude 0,1 M. L'excès de soude est dosé par HCl à 0,02 M en utilisant une électrode de verre et un pHmètre. Un blanc est réalisé à partir du polysaccharide non oxydé. Le nombre de moles de fonctions carboxyliques créées est calculé selon la formule suivante :

$$n_{\text{COOH}}(\text{échantillon}) = (V_{\text{éq}}(\text{blanc}) - V_{\text{éq}}(\text{échantillon})) * [\text{HCl}]$$

V.2.2. Dosage des fonctions aldéhydes (réaction de Cannizzaro)

Cinquante milligrammes d'échantillon sont mis en solution dans 10 mL de soude à 0,1 M. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 10 minutes sous agitation magnétique. L'excès de soude est alors titré en retour par HCl 0,02 M en utilisant une électrode de verre et un pHmètre. Un blanc est réalisé à partir du polysaccharide non oxydé. Le nombre de moles de fonctions aldéhyde créés est calculé selon la formule suivante :

$$n_{\text{CHO}}(\text{échantillon}) = 2 * ((V_{\text{éq}}(\text{blanc}) - V_{\text{éq}}(\text{échantillon})) * [\text{HCl}] - n_{\text{COOH}}(\text{échantillon}))$$

VI. Détermination de l'activité anti-DPPH

Pour les xylanes, une solution à 1 mg.mL⁻¹ dans l'eau distillée est préparée. Pour la vitamine E, la solution mère est préparée à la concentration de 0,1 mg.mL⁻¹. Enfin, dans le cas du BHT, la concentration de la solution mère est de 22,5 mg.mL⁻¹ dans le méthanol. Pour chaque composé analysé, une gamme de dilution est réalisée selon des dilutions au 1/2, 1/4, 1/8 et enfin 1/16.

Dans le cas des xylanes, ils sont préalablement soumis à 10 min d'activation ultra-sons, puis placés 30 min au bain-marie à 40°C et enfin ils sont laissés 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière.

Pour chaque échantillon, 50 µL sont prélevés et additionnés à 50 µL d'une solution de DPPH dissout dans l'éthanol, à 2,5.10⁻⁴ M, puis le mélange est homogénéisé au vortex pendant 5 secondes, introduit dans un microtube en quartz de 100 µL et enfin placé dans la cavité de mesure de l'appareil RPE. Les mesures sont alors effectuées après 5 min de mise en contact avec le DPPH. Pour chaque composé, la mesure est effectuée sur trois pesées indépendantes et en triplicat pour chaque concentration de la gamme de dilution

La propriété anti-oxydante est définie par un pourcentage d'inhibition qui est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{inhibition} = \frac{\text{ref} - \text{extrait}}{\text{ref} - \text{bdf}}$$

Avec bdf= bruit de fond.

VII. Procédures d'hydrolyse

VII.1. Autohydrolyse

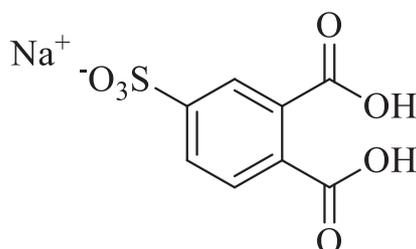
Dans un bécher, 100 mg de xylanes sont dissous dans 100 mL d'eau. Après passage sur une résine Amberlite H⁺, la solution est placée dans un flacon étanche à 100 °C pendant 24h. A la fin de la réaction, la solution est précipité à par 6 volumes d'éthanol et le surnageant et le précipité sont alors lyophilisé. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant BAW (Butanol/Acide acétique/Eau 2/1/1).

VII.2. Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des xylanes a été effectuée avec une endo- β (1 \rightarrow 4)-xylanase extrait de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma Aldrich, 3500 EU/g). Dans un ballon, 80 mg de xylanes sont dissous dans 60 mL d'eau distillée, auxquels on ajoute une solution de 20 mL d'enzyme à 1,5 UE par gramme de xylane. La solution est alors agitée et placée dans un bain thermostaté à 37 °C pendant 5 minutes. La digestion est arrêtée par addition de 3 volumes d'éthanol. Le surnageant et le précipité sont alors séparés par filtration et chaque échantillon est lyophilisé. La réaction est suivie par CCM dans l'éluant BAW (Butanol/Acide acétique/Eau 2/1/1).

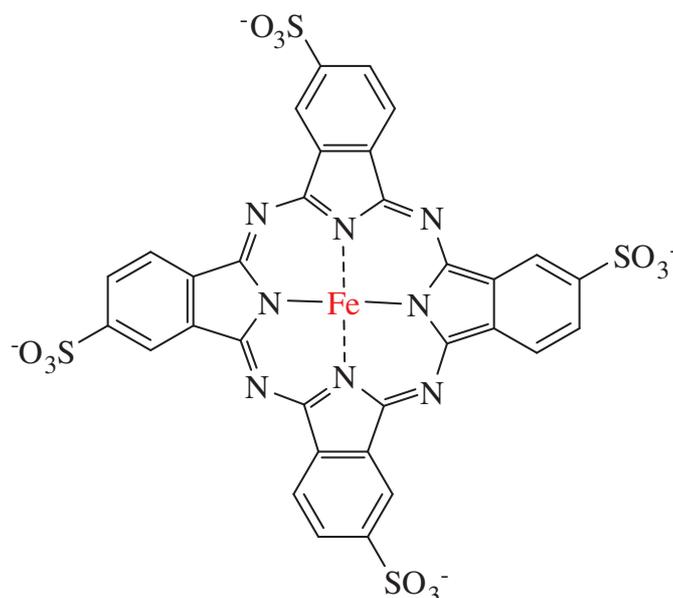
VIII. Synthèses

VIII.1. 3,4-dicarboxylbenzènesulfonate de sodium



Dans un erlenmeyer, on place 77,5 mL d'une solution aqueuse (50%) d'acide sulfophtalique puis on ajoute 20 mL d'une solution contenant 8,2 g de NaOH. Après 5 min de réaction, contrôlée au pH-mètre, l'eau est évaporée. Le produit est repris dans l'éthanol, filtré sur fritté, lavé puis séché à l'étuve à 40 °C pendant 24 h. On obtient 42,4 g de produit pur avec un rendement de 78%.

VIII.2. Tétrasulfophthalocyanine de fer

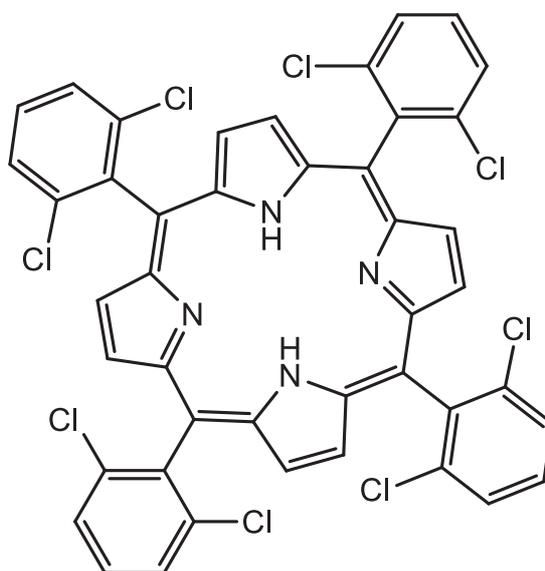


Dans un mortier sont broyés 17,2 g ($6,4 \cdot 10^{-2}$ mol, 1 eq) de 3,4-dicarbonylbenzènesulfonate de sodium, 23,2 g d'urée (0,387 mol, 6 eq), 247 mg de molybdate d'ammonium hydraté ($1,92 \cdot 10^{-4}$ mol, 0,003 eq), 1,87 mg de chlorure d'ammonium ($3,2 \cdot 10^{-2}$ mol, 0,5 eq) et 3,34 g de sulfate de fer ($1,28 \cdot 10^{-2}$ mol, 0,2 eq). La poudre obtenue est mise dans un erlenmeyer que l'on chauffe à 200°C pendant 2 heures dans un bain de sable. Le produit brut obtenu a été partiellement purifié selon Weber et Bush.²⁰ protocole permettant de recueillir une masse de 14,1 g. La quantité de phthalocyanine contenue dans ce produit impur, estimée par dosage UV-Visible est de 5,45 g correspondant à un rendement de 35%.

UV-Visible (H₂O) : λ_{\max} en nm (ϵ en mol.L⁻¹.cm⁻¹) : 326 (55700) ; 632 (65000)

SM (MALDI) : C₃₂H₁₂FeN₈O₁₂S₄ ; masse attendue: m/z 884,59 ; masse mesurée: m/z= 220,9 [M]⁴⁻

VIII.3. 5, 10, 15, 20-tétra-2,6-dichlorophénylporphyrine :



Dans un bicol de 500 mL, on introduit 7,5g de 2,6-dichlorobenzaldéhyde (43 mmol 1eq) en que l'on solubilise dans 140 mL d'acide acétique et 70 mL de nitrobenzène. Grâce à une ampoule de coulée, 3mL de pyrrole (1eq, 43 mmol) sont alors ajoutés goutte à goutte. La solution est portée à 120 °C pendant 1h sous agitation magnétique. Après refroidissement, 50 mL de méthanol sont introduit dans le réacteur afin de précipiter la porphyrine. Après filtration et plusieurs lavages au méthanol, la porphyrine est obtenue pure, sous la forme d'une poudre violette avec un rendement maximal de 6,9 % (657 mg).

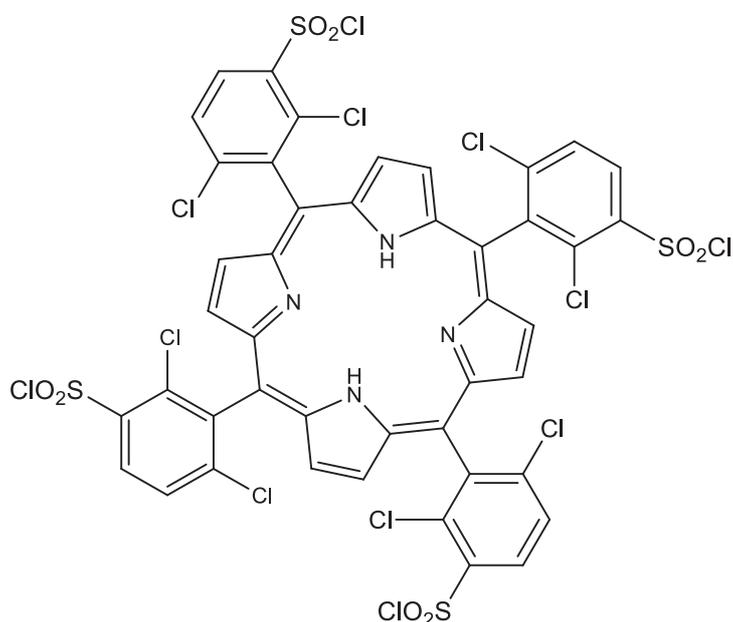
Rf= 0,90 (CHCl₃ 100%)

UV-Visible (CHCl₃), λ_{\max} en nm (ϵ en mol.L⁻¹.cm⁻¹): 418 (138163) ; 514 (8354) ; 546 (1248) ; 589 (2766) ; 659 (680).

RMN ¹H: (400,13 MHz, CDCl₃): 8,66 ppm (s, 8H, H _{β} -pyrroliques), 7,78 ppm (d, J=7,68 Hz, 8H, H_{meta}), 7,69 ppm (t, J= 7,28 Hz, 4H, H_{para}), -2,53 ppm (s, 2H, N-H).

SM (MALDI): C₄₄H₂₂Cl₈N₄; masse attendue: m/z 890,30 ; masse mesurée: m/z: 891,05 [M+H]⁺

II.3. 5,10,15,20-tétra-2,6-dichloro-3-chlorosulfo-phénylporphyrine:



Dans un ballon, 657 mg de 2,6-dichlorophénylporphyrine ($7,4 \cdot 10^{-4}$ mol), sont mis à réagir avec 10 mL d'acide chlorosulfonique pur (en excès). Le mélange est porté à 100 °C pendant 3 heures sous agitation magnétique. Après refroidissement, la solution est reprise dans une solution de 100 mL de chloroforme et des lavages successifs sont effectués à l'eau puis avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Ensuite, la solution organique est séchée sur $MgSO_4$ puis le chloroforme évaporé. Une flash-chromatographie utilisant comme éluant le chloroforme pur permet de purifier la porphyrine et de l'obtenir sous la forme d'une poudre violette-rouge avec un rendement de 90 % (860 mg), soit un rendement global de 6,2 % par rapport à la porphyrine de départ.

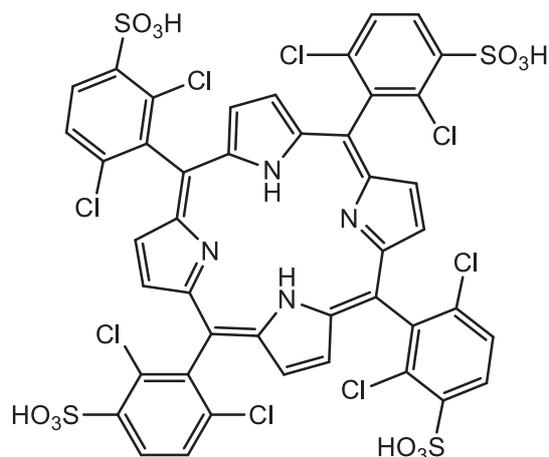
Rf= 0,92 ($CHCl_3$ /Ether de Pétrole 9/1)

UV-Visible : ($CHCl_3$), λ_{max} en nm (ϵ en $mol.L^{-1}.cm^{-1}$) : 421 (103780) ; 513 (6661) ; 589 (2244).

RMN 1H : (400,13 MHz, $CDCl_3$): 8,65-8,63 ppm (m, 12H, H_{β} -pyrroliques et H_{para}), 8,07 ppm (m, 4H, H_{meta}), -2,50 ppm (s, 2H, N-H).

SM : $C_{44}H_{18}Cl_{12}N_4O_8S_4$; masse attendue : m/z 1284,33 ; masse mesurée : m/z 1284,63 [M] $^+$

VIII.4. 5,10,15,20-tétra-2, 6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine :



- A partir de la 2,6-dichlorophénylporphyrine :

Dans un ballon, 200 mg de 2,6-dichlorophénylporphyrine ($2,25 \cdot 10^{-4}$ mol) sont mis à réagir dans 10 mL d'acide sulfurique pur. La solution est portée à 180 °C, au moyen d'un bain d'huile, pendant 6 heures sous agitation magnétique. Après refroidissement, la solution est reprise dans 100 mL d'eau puis neutralisée par une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium. Après évaporation, les sels sont précipités au méthanol et filtrés pour récupérer en solution la porphyrine. Afin d'optimiser la purification de la porphyrine, une dialyse est effectuée pendant 48 heures avec une membrane de 500 Da. La 5,10,15,20-tétra-2,6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine est obtenue avec un rendement modeste de 21%.

- A partir de la 2,6-dichloro-3-chlorosulfophénylporphyrine :

Dans un ballon, la porphyrine issue de la synthèse de la 2,6-dichloro-3-chlorosulfophénylporphyrine (860 mg, $6,7 \cdot 10^{-4}$ mol) est mise en suspension dans 50 mL d'eau distillée. La solution est portée à reflux pendant 1 nuit. Après refroidissement, l'eau est évaporée pour obtenir la porphyrine avec un rendement quantitatif par rapport à la porphyrine chlorosulfonée, soit un rendement global de 6,2% par rapport à la porphyrine de départ.

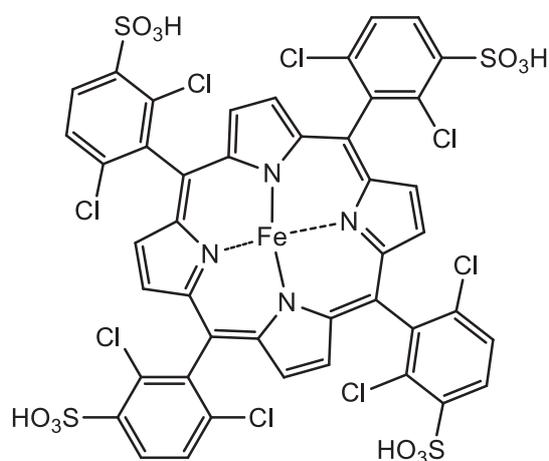
Rf : 0,43 (Butanol/Acide acétique/eau 2/1/1)

UV-Visible : (MeOH), λ_{\max} en nm (ϵ en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) : 415 (264976) ; 511 (14804) ; 588 (5009).

RMN ^1H : (400,13 MHz, D_2O) : 8,99 (s, 8H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$), 8,5-8,2 ppm (m, 4H, H_{para}), 8,1-7,9 ppm (m, 4H, H_{meta}).

SM (MALDI) : $\text{C}_{44}\text{H}_{22}\text{Cl}_8\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}_4$; masse attendue : m/z 1210,55 ; masse calculée : m/z 1210,72 $[\text{M}]^+$

VIII.5. 5,10,15,20-tétra-2,6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine de fer:



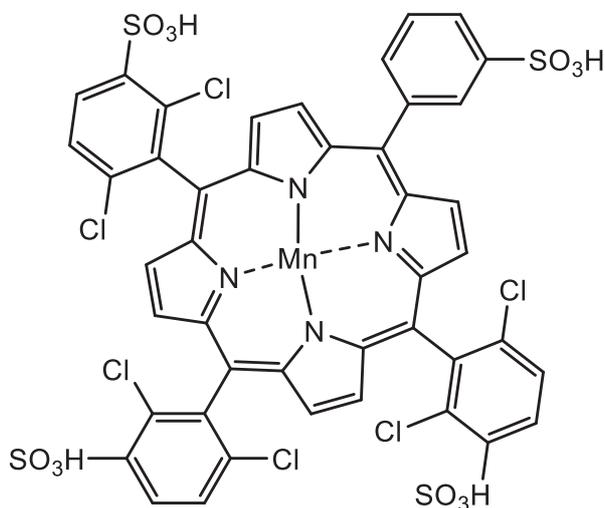
Dans un ballon, 155 mg de 2,6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine ($1,3 \cdot 10^{-4}$ mol, 1eq) sont mis à réagir avec 213 mg de FeCl_2 ($1,7 \cdot 10^{-3}$, 13 eq) dans 100 mL d'eau distillée. La solution est portée à 80 °C pendant 24 h. Après refroidissement, les sels sont précipités dans le méthanol et centrifugés à 8000 rpm pendant 20 minutes. Le méthanol est alors évaporé et la porphyrine est mise en dialyse 48 h avec une membrane de 500 Da afin d'éliminer tous les sels. La porphyrine est obtenue sous la forme d'une poudre marron foncé avec un rendement de 49% (103 mg).

Rf: 0,64 (Butanol/Acide acétique/Eau 2/1/1)

UV-Visible : (MeOH), λ_{max} en nm (ϵ en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) : 413 (47146) ; 511 (5294) ; 580 (3012).

SM(MALDI) : $\text{C}_{44}\text{H}_{20}\text{Cl}_8\text{FeN}_4\text{O}_{12}\text{S}_4$; masse attendue : m/z 1264,38 ; masse mesurée : m/z 1263,65 $[\text{M}-\text{H}]^+$

VIII.6. 5,10,15,20-tétra-2,6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine de manganèse:



Dans un ballon, 200 mg de 2,6-dichloro-3-sulfophénylporphyrine ($1,7 \cdot 10^{-4}$ mol, 1eq) sont mis à réagir avec 417 mg d'acétate de manganèse ($1,7 \cdot 10^{-3}$ mol, 10 eq) dans 100 mL d'eau distillée. La solution, sous agitation, est portée à 80 °C pendant une nuit. Après refroidissement, les sels sont précipités dans le méthanol et centrifugés à 8000 rpm pendant 20 minutes. Le méthanol est alors évaporé et la porphyrine est mise en dialyse 48 h avec une membrane de 500 Da afin d'éliminer tous les sels. La porphyrine est obtenue sous la forme d'une poudre marron-bordeaux avec un rendement de 37 % (78 mg).

Rf: 0,62 (Butanol/Acide acétique/Eau 2/1/1)

UV-Visible : (MeOH), λ_{\max} en nm (ϵ en $\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) : 464 (87596) ; 508 (4621) ; 562 (8466).

SM (MALDI): $\text{C}_{44}\text{H}_{20}\text{Cl}_8\text{MnN}_4\text{O}_{12}\text{S}_4$; masse attendue : m/z 1263,47 ; masse mesurée : m/z 1262,64 $[\text{M-H}]^+$

Bibliographie

1. Barbat, A. ; Gloaguen, V. ; Sol, V. ; Krausz, P., *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, 6538-6544
2. Moine, C.; Krausz, P.; Chaleix, V.; Sainte-Catherine, O.; Kraemer, M.; Gloaguen, V. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 60-66.
3. Barbat, A.; Gloaguen, V.; Moine, C.; Sainte-Catherine, O.; Kraemer, M.; Rogniaux, H.; Ropartz, D.; Krausz, P., *Journal of Natural Products*, **2008**, *71*, 1404-1409.
4. Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E., *Biologie végétale*, Ed. De Boeck, **1999**, Freeman and Company/Worth Publishers.
5. Natterer, J.; Sandoz, J.L.; Rey, M., *Traité de Génie Civil : Construction en bois*, **2004**, *13*, 20.
6. Arnaud DAY. *Vers une compréhension moléculaire de la qualité des fibres de lin (Linum usitatissimum L.)*. Colloque annuel du GDR « Assemblages des macromolécules végétales », Draveil. **2004**.
7. SAFOU-TCHIAMA Rodrigue. *Caractérisation physico-chimique, stabilité supramoléculaire et réactivité chimique de quelques essences tropicales*. Thèse de doctorat : Sciences du bois. Bordeaux : Université de Bordeaux 1, Université de Masuku (Gabon), Bordeaux. **2005**
8. GOVIN Alexandre. *Aspects physico-chimiques de l'interaction bois-ciment – Modification de l'hydratation du ciment du bois*. Thèse de doctorat : Génie des procédés. Saint-Etienne: Ecole Nationale Supérieure des Mines, **2004**.
9. Berlioz Sophie. *Etude de l'estérification de la cellulose par une synthèse sans solvant. Application aux matériaux nanocomposites*. Thèse de doctorat : Sciences des Polymères. Grenoble: Université Joseph Fourier, **2007**.
10. Elchinger P.H.; Faugeras P.A.; Zerrouki C.; Montplaisir D.; Brouillette F.; Zerrouki R. *Green Chemistry* **2012**, *14*, 3126-3131
11. Swatloski, R.P.; Spear, S.R.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 4974–4975.
12. Krouit, M.; Granet, R.; Krausz, P., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, *16*, 10091-10097
13. Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T., *Advances in Polymer Sciences* **2005**, *186*, 1-67.
14. Brauns, F.E.; *The chemistry of lignin*, The institute of paper chemistry, Appleton Wisconsin, **1962**, Academic press Inc, publishers- New York
15. Jarvis, M.C., *Plant, Cell and Environment*, **1984**, *7*, 153-164
16. Vincken, J.P.; Schols, H.A.; Oomen, R.J.F.J.; McCann, M.C.; Ulvskov, P.; Voragen, A.G.J.; Visser, R.G.F., *Plant Physiology*, **2003**, *32*, 1761-1789
17. Powell, D.A.; Moris, E.R.; Gidley, M.J.; Rees, D.A., *Journal of Molecular Biology*, **1982**, *155*, 517-531.
18. Bakary TRAORE. *Influence de la structure anatomique et des métabolites secondaires sur les propriétés physiques et la qualité acoustique du bois de vègne (Pterocarpus Erinaceus poir) provenant du Mali*. Thèse de doctorat : Sciences du bois. Laval (Québec) : Université de Laval Québec, Agroparistech Nancy. **2009**.
19. ELCHINGER Pierre-Henri. *Réticulation de fibres lignocellulosiques et d'amidon - Vers de nouveaux matériaux pour l'industrie papetière*. Thèse de doctorat: chimie appliquée - chimie des substances naturelles. Limoges: Université de Limoges / Université du Québec à Trois-Rivières (Canada), **2013**.
20. Gorshkova, T.A. ; Mikshima, P.V.; Gurjanov, O.P.; Chemiksova, S.B., *Biochemistry (Moscow)*, **2010**, *75*, 159-172
21. <http://botablog2.unblog.fr/2011/01/>
22. Iiyama, K.; Lam, T.B.-T. ; Stone, B.A., *Plant Physiology*, **1994**, *104*, 315-320
23. Vanholme, R.; Demedts, B.; Moreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W., *Plant Physiology*, **2010**, *153*, 895-905
24. Crestini, C.; Taglisatesta, P., *In The Porphyrin Handbook*, **2003**, *Volume 11*, Ed. Elsevier Science (USA), p. 161-203.
25. Zakzeski J.; Bruijninx P. C. A.; Jongerius A. L.; B. M. Weckhuysen B. M., *Chemical Reviews*, **2010**, *110*, 3552-3599
26. Lawoko, M., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2013**, *62*, 705-713
27. Rubio-Senent, F.; Lama-Muñoz, A. ; Rodriguez-Gutierrez, G. ; Fernandez-Bolaños, J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, *61*, 1235-1248.
28. Fiol, M.; Adermann, S.; Neugart, S.; Rohn, S.; Mügge, C.; Schreiner, M.; Krumbein, A.; Kroh, L.W., *Food Research International*, **2012**, *47*, 80-89.
29. Delcambre, A.; Saucier, C., *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, *47*, 727-736.
30. Adams G. A., *Carbohydrate chemistry*, Press, A., Ed. New York, **1965**; *Vol. V*, 170-175.
31. Sun X.-F. ; Fowler P. ; Rajaratnam M. ; Zhang G., *Photochemical Analysis*, **2010**, *21*, 406-415
32. Hergert H. L., *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper Industry*, Young R.A, Akhtar M Ed.; Wiley: New York, **1998**, 5-67
33. Simon, M.; Brostaux, Y.; Vanderghem, C. ; Jourez, B. ; Paquot, M. ; Richel A., *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2013**, *89*, 128-136
34. Pipon G., Chirat C., Lachenal D., Rapport d'activité du Laboratoire de Génie des Procédés Papetiers - UMR 5518: Grenoble. **2006**.
35. Lyse T. E. *A Study on ozone modification of lignin in alkali-fiberized wood*. Lawrence, Thèse de Doctorat, Appleton, Wisconsin, **1979**, p. 212
36. Bussemaker, M. ; Zhang, D., *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2013**, *52*, 3563-3580
37. Li M.F.; Sun S.N.; Xu F.; Sun R.C., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2012**, *19*, 243-249
38. Sun J.X; Xu F.; Sun R.C.; Wu S.B., *Polymer International*, **2004**, *53*, 1711-1721
39. Garcia A.; Gonzalez Alriols M.; Labidi J., *Bioresource technology*, **2012**, *108*, 155-161

40. Garmakhany, A.D.; Kashaninejad, M.; Aalami, M.; Maghsoudlou, Y. ; Khomieri, M. ; Tabil, L.G., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2013**, *94*, 1607-1613
41. Yang, B.; Wyman, C.E., *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, **2008**, *2*, 26–40.
42. Zhou, S.; Liu, L.; Wang, B. ; Xu, F. ; Sun, R., *Process Biochemistry*, **2012**, *47*, 1799-1806
43. Zhu, S. ; Wu, Y.; Yu, Z. ; Wang, C. ; Yu, F. ; Jin, S. ; Ding, Y. ; Chi, R. ; Liao, J. ; Zhang, Y., *Biosystems Engineering*, **2006**, *93*, 279–283.
44. Martinez A. T. ; Ruiz-Duelas F. J.; Martinez M. J.; Del Rio J. C. ; Gutierrez A.; *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, *20*, 348-357
45. Johjima T.; Itoh N. ; Kabuto M. ; Tokimura F. ; Nakagawa T. ; Wariishi H. ; Tanaka H., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1999**, *96*, 1989-1994.
46. Hammel K. E.; Cullen D., *Current Opinion in Plant Biology*, **2008**, *11*, 349-355
47. Kuan I. C.; Tien M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1993**, *90*, 1242-1246.
48. Hofrichter M., *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, *30*, 454-466
49. Zucca, P.; Rescigno, A.; Rinaldi, A.C.; Sanjust, E., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2014**, 388-389, 2-34
50. Fujii, H., *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, *226*, 51-60
51. Shimida M.; Habe T. ; Umezawa T. ; Higuchi T. ; Okamoto T., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1984**, *122*, 1247-1252
52. Crestini, C.; Saladino, R.; Tagliatesta, P. ; Boschi, T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **1999**, *7*, 1897-1905
53. Meunier, B., *Chemical Reviews*, **1992**, *92*, 1411-1456
54. Zakavi, S. ; Ghanbelanie Mojarrad, A.; Rayati, S., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2012**, 363-364, 153-158
55. Bartoli, J.F.; Battioni, P.; De Foor, W.R. ; Mansuy, D., *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, **1994**, 23-24.
56. Hadash, A.; Sorokin, A.; Rabion, A.; Meunier, B., *New Journal of Chemistry*, **1998**, *22*, 45-51
57. Zucca, P.; Sollai, F.; Garau, A. ; Rescigno, A. ; Sanjust, E., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2009**, *306*, 89-96
58. Zucca, P.; Mocci, G.; Rescigno, A. ; Sanjust, E., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2007**, *278*, 220-227
59. Adam, F.; Ooi, W.T., *Applied Catalysis A: General*, **2012**, 445-446, 252-260
60. Araghi, M.; Bokaei, F., *Polyhedron*, **2013**, *53*, 15-19
61. Silva, E.; Pereira, M.M. ; Burrows, H.D.; Azenha, M.E.; Sarakha, M.; Bolte, M., *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2004**, *3*, 200-204
62. Shiragami, T.; Matsumoto, J.; Inoue, H.; Yasuda, M., *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **2005**, *6*, 227-248.
63. Rothemund P.J., *Journal of the American Chemical Society*, **1939**, *61*, 2912-2915.
64. Rothemund P.J., Menotti A.R., *Journal of the American Chemical Society*, **1941**, *63*, 267-270
65. Adler A.D., Longo F.R., Finarelli J.D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L., *Journal of Organic Chemistry*, **1967**, *32*, 476
66. Little R.G., Anton J.A., Loach P.A., Ibers J.A., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1975**, *12*, 343-349
67. Gonsalves A.M.A.R., Pereira M.M., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1985**, *22*, 931-933
68. Lindsey J.S., Hsu H.C., Schreiman I.C., *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 4969-4970
69. Little B. J., Ciringh Y., Lindsey J. S., *Journal of Organic Chemistry*, **1999**, *64*, 2864-2872
70. Vignaud Y., Granet R., Krausz P., *Journal of Porphyrins and Phtalocyanines*, **10**, 2006, 937-941
71. Benson Getenga ONGARORA. *Syntheses and characterization of water-soluble phtalocyanines for diagnosis and treatment of cancer*. Thèse de doctorat: chimie. Université de l'Etat de Louisiane. **2012**
72. Morgan B. ; Dolphin D. ; *Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands I : Structure and Bonding*, **1987**, *64*, 115-203
73. Chang C. K. ; Traylor T. G., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1973**, *70*, 2647–2650
74. Van der Heiden A. ; Peer H. G. ; Van der Oord A. H. A., *Journal of the Chemical Society: Chemical Communications*, **1971**, 369-370
75. Momenteau M. ; Rougee M. ; Loock B., *European Journal of Biochemistry*, **1976**, *71*, 63-76
76. Traylor T. G. ; Mincey T. C. ; Berzini A. P., *Journal of the American Chemical Society*, **1981**, *103*, 7084-7089
77. Wasielewski, M.R.; Niemczyk, M.P.; Svec, W.A.; Pewitt, E.B., *Journal of the American Chemical Society*, **1985**, *107*, 1080-1082
78. Hashimoto Y., Lee C-H. ; Shudo K. ; Okamoto T., *Tetrahedron Letters*, **1983**, *24*, 1523-1526
79. Collman J. P. ; Gagne R. R. ; Reed C. ; Halbert T. R. ; Lang G. ; Robinson W. T., *Journal of the American Chemical Society*, **1975**, *96*, 1427-1439
80. Almog J. ; Baldwin J. E. ; Dyer R. L. ; Peters M., *Journal of the American Chemical Society*, **1975**, *97*, 226-227
81. Ogoshi H. ; Sugimoto H. ; Yoshida Z., *Tetrahedron Letters*, **1977**, *18*, 1515-1518
82. Collman J. P.; Fu L.; Herrmann P. C.; Zhang X., *Science*, **1997**, *275*, 949-951
83. Gouterman; M., *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1961**, *6*, 138-163
84. Ringot Cyril. *Elaboration de nouveaux matériaux celluloses photobactéricides*. Thèse de doctorat: Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles. Limoges : Université de Limoges, **2010**.
85. Pereira, H., Dosage des tanins de Quercus suber L. Anais Inst. Sup. Agronomia XL, **1981**, 9-15.
86. Pilo-Veloso, D. ; De Nascimento, E. A. ; Morais S. A. L., *Quimica Nova*, **1993**, *16*, 435-448.
87. Takeda K.; Moriki M.; Oshiro W.; Sakugawa H., *Marine Chemistry*, **2013**, *157*, 208-215
88. Rumiyati; Jayasena V.; James A.P., *Plant Foods for Human Nutrition*, **2013**, *68*, 352-357
89. Cömert Önder F.; Ay M.; Sarker S.D., *Journal of agricultural and food chemistry*, **2013**, *61*, 10498-10506

90. Wang X.; Xu M.; Liu Z.; Cao Y., *Bioresources*, **2013**, 8(2), 2558-2567
91. Mansouri S.; Khiari R.; Bendouissa N.; Saadallah S.; Mhenni F.; Mauret E., *Industrial Crops and Products*, **2012**, 36, 22-27
92. Gellerstedt G.; Li J., *Carbohydrate Research*, **1996**, 294, 41-51
93. Du S.; Li J.; Gellerstedt G.; Rencoret J.; Del Rio J.C.; Martinez A.T.; Gutierrez A., *Biomacromolecules*, **2013**, 14, 3073-3080
94. Martin-Sampedro R.; Martin J.A.; Eugenio Maria E.; Revilla E.; Villar J.C., *BioResources*, **2011**, 6, 4922-4935
95. Ebringerová A.; Hromádková A.; Heinze T., *Advances in Polymer Science*, **2005**, 186, 1-67
96. Ebringerova A.; Hromadkova Z., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2002**, 9, 225-229
97. Habibi, Y.; Vignon, M. R., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 1431-1436
98. Aman P.; Bengtsson S., *Carbohydrate Polymers*, **1991**, 15, 405-414
99. Cyran M.R., *Carbohydrate Research*, **2010**, 345, 899-907
100. Jacobs A.; Palm M.; Zacchi G.; Dahlman O., *Carbohydrate Research*, **2003**, 338, 1869-1876
101. Garcia J.C.; Diaz M.J.; Garcia M.T.; Feria M.J.; Gomez D.M.; Lopez F., *Biochemical Engineering Journal*, **2013**, 71, 127-133
102. MOINE Charlotte, Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois-Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. Thèse de doctorat: Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles. Limoges : Université de Limoges, **2005**.
103. Gröndahl M., Gatenholm P., *Polysaccharides*, **2005**, 509-514.
104. Mazeau, K.; Moine, C.; Krausz, P.; Gloaguen, V., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 2752-2760
105. Lawther, J.M.; Sun, R., *Industrial Crops and Products*, **1996**, 5, 87-95
106. Bochicchio, R.; Reicher, F., *Carbohydrate Polymers*, **2003**, 53, 127-136
107. Johansson, M.H.; Samuelson, O., *Wood Science and Technology*, **1977**, 11, 251-263
108. Ebringerová, A.; Heinze, T., *Macromolecular Rapid Communications*, **2000**, 21, 542-556
109. Prozil, S.O.; Costa, E.V.; Evtuguin, D.V.; Cruz Lopes L.P.; Domingues, M.R.M., *Carbohydrate Research*, **2012**, 356, 252-259
110. Immerzeel, P.; Falck, P.; Galbe, M.; Adlercreutz, P.; Nordberg Karlsson, E.; Stalbrand, H., *LWT-Food Science and Technology*, **2014**, 56, 321-327.
111. Hromádková, Z.; Kováčiková, J.; Ebringerová, A., *Industrial Crops and Products*, **1999**, 9, 101-109.
112. Sun, X.F.; Sun, R.C.; Fowler, P.; Baird, M.S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 860-870
113. Krawczyk, H.; Persson, T.; Andersson, A.; Jönsson, A.J., *Food and Bioproducts Processing*, **2008**, 86, 31-36.
114. Wang, K.; Xu, F.; Sun, R.C.; Jones, G.L., *Industrial and Engineering Chemical Research*, **2010**, 49, 8797-8804
115. Korte, H.E.; Offermann, W.; Puls, J., *Holzforschung*, **1991**, 45, 419-424.
116. Hromádková, Z.; Kostálová, H.; Ebringerová, A., *Ultrasonics Sonochemistry* **2008**, 15, 1062-1068.
117. Teleman, A.; Lundqvist, J.; Tjenneld, F.; Stalbrand, H.; Dahlman, O., *Carbohydrate Research*, **2000**, 329, 807-815.
118. Panthapulakkal, S.; Pakhareenko, V.; Sain, M., *Journal of Polymers and the Environment*, **2013**, 21, 917-929
119. Wang, L.; Liu, X.; Weng, M.; Wu, F.; Li, Z.; Wang, S., *Advanced Materials Research*, **2013**, 634-638, 975-980
120. Dubois M.; Gilles K.A.; Hamilton J.K.; Rebers P.A.; Smith F. *Analytical Chemistry* **1986**, 28, 350-356.
121. Lever M. *Analytical Biochemistry* **1972**, 47, 273-279.
122. Blumentkrantz N.; Asboe-Hansen G.; *Analytical Biochemistry* **1973**, 54, 484-489.
123. Montreuil, J.; Spik, G.; Chosson, A.; Segard, E.; Shepler N., *Journal de Pharmacie de Belgique* **1963**, 18, 529-546.
124. Blakeney, A. B.; Harris, P. J.; Henry, R. J.; Stones, B. A., *Carbohydrate Research*, **1983**, 113, 219-299.
125. Huang, Y.Z.; Indrarti, L.; Azuma, J.; Okamura, K., *Mokuzai Gakkaishi*, **1992**, 38, 1168-1171.
126. Bleton J.; Mejanelle P.; Sansoulet J.; Goursaud S.; Tchaplá A., *Journal of Chromatography A*, **1996**, 720, 27-49.
127. Kamerling J. P.; Gerwing G. J.; Vliegthant J. F. G.; Clamp J. R., *Biochemical Journal*, **1975**, 151, 491-495.
128. Biermann C. J., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton **1989**, 1-17.
129. Englmaier P., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 127-141.
130. Black G. E., Fox A., *Journal of Chromatography A*, **1996**, 720, 51-60.
131. McGinnis G. D., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 19-26.
132. Neeser J. R., Schweiser T. F., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 143-155.
133. Montreuil J.; Bouquelet S.; Debray H.; Fournet B.; Spick G.; Strecker G., *Glycoproteins*. Chaplin M.F and Kennedy Ed.; IRL Press: Oxford, Washington D.C, **1986**, 143-204.
134. Garozzo D.; Spina E.; Cozzolino R.; Cescutti P.; Fett W.F., *Carbohydrate Research*, **2000**, 323, 139-46.
135. Bonnin E.; Renard C.; Thibault J. F.; Ducroo P., *Enzymes en agroalimentaire*, Ed. Techniques et documentation Lavoisier: Paris, **1997**, 169-197.
136. Carvalho, A.F.A.; De Oliva Neto, P.; Fernandes Da Silva, D.; Pastore, G.M., *Food Research International*, **2013**, 51, 75-85.
137. Nishitani K.; Nevins D. J., *Journal of Biological Chemistry*, **1991**, 266, 6539-6543.
138. Siika-Aho M.; Tenkanen M.; Buchert J.; Puls J.; Viikari L., *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, 16, 813-819.
139. Biely P.; MacKenzie C. R.; Puls J.; Schneider H., *BioTechnology* **1986**, 4, 731-733.
140. Timell T. E., *Wood Science and Technology* **1965**, 1, 45-70.
141. Bemiller J. N., *Advances in Carbohydrates Chemistry*, **1967**, 22, 25-108.
142. Ciancia M.; Cerezo A.S., *Ciencia e cultura*, **1993**, 45, 54-61.
143. Xiao, X.; Bian, J.; Peng, X.P.; Xu, H.; Xiao, B.; Sun, R.C., *Bioresource Technology*, **2013**, 138, 63-70
144. Chen, M.H.; Browman, M.J.; Dien B.S.; Rausch, K.D.; Tumbleson, M.E.; Singht, V., *Bioresource Technology*, **2014**, 155, 359-365
145. Moure, A.; Gullon, P.; Dominguez, H.; Parajo, J.C., *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 1913-1923.

146. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/learning-center/qc-qa/qc-analysis-by-mass-spectrometry.html>
147. HARAKAT Dominique. *Etudes mécanistiques par ESI-MS de réactions palladocatalysées*. Thèse de doctorat : Sciences, Technolgies, Santé : Chimie Organique. Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne, **2011**.
148. Whitehouse, C.M. ; Dreyer, R.N.; Yamashita, M.; Fenn, J.B., *Analytical Chemistry*, **1985**, *57*, 675-679
149. Deutschmann, R.; Dekker, R.F.H., *Biotechnology Advances*, **2012**, *30*, 1627-1640
150. Holmbom, B., *Actualité chimique*, **2002**, *11-12*, 52-53.
151. Gandini, A. ; Belgacem, M.N.; *Actualité Chimique*, **2002**, *11-12*, 56-61.
152. Popa; V. I., In *Polysaccharides in Medicinal Applications*, **1996**, 107-124
153. Saad, N.; Delattre, C.; Urdaci, M.; Schmitter, Bressolier, P., *LWT-Food Science and Technology*, **2013**, *50*, 1-16
154. Vázquez, M. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, *11*, 387-393.
155. Hughes, S.A.; Shewry, P.R.; Li, L.; Gibson, G.R.; Sanz, M.L.; Rastall, R.A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, *55*, 4589-4595
156. Grootaert, C.; Delcour, J.A. ; Courtin, C.M.; Broekaert, W.F.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T., *Food Science & Technology*, **2007**, *18*, 64-71
157. Gröndahl, M. ; Eriksson, L. ; Gatenholm, P., *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 1528-1535.
158. Escalante, A.; Gonçalves, A.; Bodin, A.; Stepan, A.; Sandström, C.; Toriz, G.; Gatenholm, P., *Carbohydrate Polymers*, **2012**, *87*, 2381-2387.
159. Ibn Yaich, A. ; Edlund, U.; Albertsson, A.C., *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 466-473.
160. Höjje, A.; Stermalm, E.; Heikkinen, S.; Tenkanen, M.; Gatenholm, P., *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 2042-2047
161. Sarossy, Z. *Production and utilization of hemicelluloses from renewable resources for sustainable advanced products*. Thèse de doctorat. Roskilde: Université du Danemark (Danemark), **2011**.
162. Mikkonen, K.S.; Tenkanen, M., *Food Science and Technology*, **2012**, *28*, 90-102
163. Moine, C. ; Gloaguen, V. ; Gloaguen, J.M. ; Granet, R. ; Krausz, P., *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **2004**, *39*, 627-240
164. Fredon, E.; Granet, R.; Zerrouki, R. ; Krausz, P. ; Saulnier, L. ; Thibault, J.F.; Rosier, J.; Petit, C., *Carbohydrate Polymers*, **2002**, *49*, 1-12.
165. Hashi, M.; Takeshita, T.; Ibaraki, F. *Agricultural. Bioogical Chemistry* **1979**, *43*, 951-959.
166. Ghoneum, M.; Badr El-Din, N.K.; Ali, D.A.; Alaa El-Dein, M., *Anticancer Research*, **2014**, *34*, 81-88.
167. Ghoneum, M., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1998**, *243*, 25-29.
168. Maeda, R.; Ida, T.; Ihara, H. ; Sakamoto, T., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **2012**, *76*, 1032-103.
169. Hromádková, Z.; Paulsen, B.S.; Polovka, M. ; Košťálová, Z.; Ebringerová, A., *Carbohydrate Polymers*, **2013**, *93*, 22-30.
170. Veenashri, B.R.; Muralikrishna, G., *Food Chemistry*, **2011**, *128*, 1475-1481.
171. BARBAT Aline. *Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de châtaignier : développement de nouveaux procédés de délignification*. Thèse de doctorat: Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles. Limoges: Université de Limoges, **2009**.
172. Weber, J.H.; Bush, D.H.; *Inorganic Chemistry* **1965**, *4*, 469-471.
173. Blagrove, R.J.; Gruen, L.C., *Australian Journal of Chemistry*, **1972**, *25*, 2553-2558
174. Sorokin, A.B. ; Kudrick, E.V., *Catalysis Today*, **2011**, *159*, 37-46
175. Neu, H.M.; Yusubov, M.S.; Zhdankin, V.V.; Nemykin, V.N., *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2009**, *351*, 3168-3174.
176. D'alessandro, N.; Tonucci, L.; Bressan, M. ; Dragani, L.K. ; Morvillo, A., *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2003**, 1807-1814
177. Cui, F.; Wijesekera, T.; Dolphin, D.; Farrell, R.; Skerker, P., *Journal of Biotechnology*, **1993**, *30*, 15-26
178. Monteiro, C.J.P.; Pereira, M.M.; Azeha, M.E. ; Burrows, H.D. ; Serpa, C. ; Arnaut, L.G. ; Tapia, M.J. ; Sarakha, M. ; Wong-Wah-Chung, P. ; Navaratnam, S., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2005**, *4*, 617-624
179. Gonsalves, A.M.A.R.; Johnstone, R.A.W.; Pereira, M.M.; De SantAna, A.M.P.; Serra, A.C.; Sobral, A.J.F.N.; Stocks, P.A., *Heterocycles*, **1996**, *43*, 829-838
180. Luna, M.A.; Moyano, F. ; Sereno, L.; D'Eramo, F., *Electrochimica Acta*, **2014**, *135*, 301-310
181. Rebelo, S.L.H.; Pereira, M.M.; Simões, M.M.Q.; Neves, G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S., *Journal of Catalysis*, **2005**, *234*, 76-87
182. Hergert, H.L., *Journal of Organic Chemistry*, **1960**, *25*, 405-413
183. Hergert, H.L. ; Kurth, E.F., *Journal of the American Chemical Society*, **1953**, *75*, 1622-1625
184. Kudzin, S.F. ; Nord, F.F., *Journal of the American Chemical Society*, **1951**, *73*, 690-693
185. Durie, R.A. ; Lynch, B.M. ; Sternhell, S., *Australian Journal of Chemistry*, **1960**, *13*, 156-168
186. Lindberg, J.J., *Paperi ja Puu*, **1961**, *43*, 672-678
187. Whistler, R.L.; Richards, E.L., *Hemicelluloses*, Academic Press, New York, **1970**, 447-469.
188. Whistler, R.L.; BeMiller, J.N., *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **1958**, *13*, 289-329.
189. Toman, R. ; Kohn, R. ; Malovikova, A. ; Rosik, J., *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1981**, *46*, 1405-1412
190. Jacobs, A. ; Larsson, P.T. ; Dahlman, O., *Biomacromolecules*, **2001**, *2*, 979-990
191. Bowering, W.D.S. ; Marchessault, R.H. ; Timell, T.E., *Svensk Papperstidning*, **1961**, *64*, 191-194
192. Kachkarova-Sorokina, S.L.; Gallezot, P.; Sorokin, A.B., *Chemical communications*, *24*, **2004**, 2844-2845
193. KLEIN-KOERKAMP Carmen. *Elaboration de nouveaux tensioactifs à partir de polysaccharides*. Thèse de doctorat : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles. Limoges : Université de Limoges, **2009**.
194. Pommerening, K.; Rein, H.; Bertram, D.; Müller R. *Carbohydrate Research* **1992**, *233*, 219-233.

195. Buslov, D.K; Kaputski, F.N.; Sushko N.I., Torgashev, V.; Soloveva, L.V.; Tsarenkov, V.M.; Zubets, O.V.; Larchenko, L.V., *Journal of Applied Spectroscopy*, **2009**, *76*, 801-805
196. Gupta, S.; Madan, R.N.; Bansal, M.C., *Tappi Journal*, **1987**, *70*, 113-114.
197. Bigaud, V.; Pinel, C.; Da Silva Perez, D. ; Rataboul, F. ; Petit-Conil, Huber, P., *BioResources*, **2013**, *8*, 2118-2134
198. Calliste, C.A.; Trouillas, P.; Allais, D.P. ; Duroux, J.L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, *53*, 282-288
199. Cao, Y.; Ikeda, I., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2009**, *45*, 231-235.
200. Hromádková, Z.; Paulsen, B.S.; Polovka, M. ; Košťálová, Z.; Ebringerová, A., *Carbohydrate Polymers*, **2013**, *93*, 22-30.
201. Bolumar, T. ; Andersen, M.L.; Orlien, V., *Food Chemistry*, **2014**, *150*, 422-428.
202. Stajner, D. ; Popovic, B.M. ; Canadanovic-Brunet, J.; Dilas, S. ; Cetkovic, G., *LWT-Food Science and Technology*, **2014**, *55*, 408-413.
203. Pérez-Cruz, F. ; Villamena, F.A. ; Zapata-Torres, G. ; Das, A. ; Headley, C.A. ; Quezada, E. ; Lopez-Alarcon, C.; Olea-Azar, C., *Journal of Physical Organic Chemistry*, **2013**, *26*, 773-783.
204. Cui, F. ; Wijesekera, T. ; Dolphin, D., *Journal of Biotechnology*, **1993**, *30*, 15-26
205. Dinis, L.T.; Oliveira; M.M.; Almeida, J.; Costa, R.; Gomes-Laranjo, J.; Peixoto, F., *Food Chemistry*, **2012**, *132*, 1-8
206. Gil, M.; Tomas-Barberan, F.A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.M.; Kader, A.A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, *48*, 4581-4589.
207. Mämmelä, P.; Savolainen, H.; Lindroos, L. ; Kangas, J. ; Vartiainen, T., *Journal of Chromatography A*, **2000**, *891*, 75-83
208. Del Bubba, M.; Checchini, L.; Chiuminatto, U.; Doumett, S.; Fibbi, D.; Giordani, E., *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, *47*, 1207-1220.
209. Renault, E. ; Barbat-Rogéon, A. ; Chaleix, V. ; Calliste, C-A. ; Colas, C. ; Gloaguen, V., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2014**, *70*, 373-380.
210. Miller, G.; Golder, R.; Miller, E. *Analytical Chemistry*, **1951**, *23*, 903-905

Résumé

Le fractionnement du bois, indispensable pour la valorisation de ses constituants moléculaires, comporte généralement des étapes non éco-compatibles. L'étape clé de ce fractionnement, la délignification, repose généralement sur la mise en œuvre de conditions agressives, utilisant des réactifs nocifs, en particulier chlorés. Dans ce travail, nous avons développé un procédé original de délignification des sciures de bois de châtaignier, espèce emblématique de la région Limousin, utilisant des catalyseurs de type phtalocyanine ou porphyrine et l'eau oxygénée comme oxydant. La dégradation des lignines a été caractérisée par différentes techniques, notamment par spectroscopie FT-IR, d'absorption UV-Visible et par la mesure du nombre Kappa. Nous avons alors montré que l'utilisation de phtalocyanine, moins efficace que les porphyrines en terme de rendements massiques de dégradation de la matière ligno-cellulosique sont en revanche plus sélectives de l'oxydation des lignines. Il a alors été possible, à partir de résidus seulement partiellement délignifiés d'extraire simplement à l'eau chaude une hémicellulose de structure proche des 4-O-Méthylglucuronoxylanes classiquement extrait des bois de feuillus. Ce polysaccharide se caractérise par la présence de résidus phénoliques lui conférant un pouvoir antioxydant intéressant, mesuré face au radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) et dont la IC_{50} est estimée à $225\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cette valeur, comparée à des produits de référence comme la vitamine E, permet de classer ce composé parmi les bons candidats pour une valorisation comme agent de conservation naturel pour les industries des secteurs agroalimentaire ou encore cosmétique.

Mots-clés : Lignine, délignification, phtalocyanine, porphyrine, xylanes, hémicelluloses, extraction, structure, valorisation, propriétés anti-oxydantes.

Abstract

Fractionation of wood, essential for the development of its molecular constituents, generally includes non eco-friendly steps. The key-step of the fractionation, the delignification, is generally based on the implementation of aggressive conditions, using harmful reagents, particularly chlorinated. In this work, we developed a novel method of delignification of sawdust chestnut, emblematic species of the Limousin region, using phthalocyanine or porphyrin as a catalyst and hydrogen peroxide as the oxidant. Lignin degradation was characterized by various techniques, including FT-IR spectroscopy, UV-visible absorption and by measuring the kappa number. Then we showed that the use of phthalocyanine, less effective than porphyrins in terms of degradation mass yields of lignocellulosic material are however more selective to lignin oxidation. Consequently, it was possible, from residues only partially delignified to extract simply with hot water a hemicellulose similar structure to the 4-O-Méthylglucuronoxylanes classically extracted from hardwood. This polysaccharide is characterized by the presence of phenolic residues providing it an interesting antioxidant activity, measured against the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) by Electron Spin Resonance (ESR) and its IC_{50} is estimated at $225\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. This value, compared to reference products such as vitamin E, allows classifying this compound among good candidates for development as a natural preservative for food or cosmetic industries.

Key-words: Lignin, delignification, phthalocyanin, porphyrin, xylans, hemicelluloses, extraction, structure, valorization, antioxidant properties.