



HAL
open science

Synthèse et caractérisations de matériaux photosensibles à partir de lignines - Vers une utilisation en Traitement Photodynamique Antimicrobien appliqué à l'agronomie

Guillaume Marchand

► To cite this version:

Guillaume Marchand. Synthèse et caractérisations de matériaux photosensibles à partir de lignines - Vers une utilisation en Traitement Photodynamique Antimicrobien appliqué à l'agronomie. Chimie organique. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0108 . tel-02049310

HAL Id: tel-02049310

<https://theses.hal.science/tel-02049310v1>

Submitted on 26 Feb 2019

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

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

Université de Limoges
ED 614 - Chimie, Ecologie, Géosciences, Agrosciences (CEGA)
Laboratoire PEIRENE EA 7500

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Spécialité : Chimie Organique

Présentée et soutenue par
Guillaume MARCHAND

Le 22 novembre 2018

**Synthèse et caractérisations de matériaux photosensibles à partir
de lignines – Vers une utilisation en Traitement Photodynamique
Antimicrobien appliqué à l'agronomie**

Thèse dirigée par Stéphanie LEROY-LHEZ et Nicolas VILLANDIER

JURY :

Rapporteurs :

M. GRELIER Stéphane, Professeur, ENSCPB, UMR 5629,
CNRS, Université de Bordeaux, France
M. KUREK Bernard, Directeur de Recherche, FARE, UMR 614,
INRA, Université de Reims, France

Examineurs :

M. CALLISTE Claude-Alain, Maître de Conférences, PEIRENE,
EA 7500, Université de Limoges, France
Mme LEROY-LHEZ Stéphanie, Maître de Conférences,
PEIRENE, EA 7500, Université de Limoges, France
Mme MATCZYSZYN Katarzyna, Professeur, AMEM Group,
Université de Wroclaw, Pologne
M. VILLANDIER Nicolas, Maître de Conférences, PEIRENE, EA
7500, Université de Limoges, France

*Les progrès de l'humanité se mesurent aux
concessions que la folie des sages fait à la
sagesse des fous.*

Jean Jaurès

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Katarzyna Matczyszyn et Stéphane Grelier ainsi que le Dr Bernard Kurek de l'intérêt dont ils ont fait preuve quant à mon travail en acceptant de l'examiner et de le juger.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Vincent Sol de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de continuer à le faire pour l'année à venir, mais également pour sa bienveillance et ses différents conseils.

Mes remerciements les plus vifs et les plus chaleureux sont bien évidemment destinés à mes deux directeurs de thèse, Stéphanie Leroy-Lhez et Nicolas Villandier. Merci de m'avoir fait confiance pour ce projet, et même depuis le M2 en ce qui te concerne Nicolas, et de m'avoir ainsi permis de vivre cette expérience si enrichissante tant sur le plan scientifique que personnel. Merci pour vos conseils toujours pertinents, pour les nombreuses discussions, pour avoir pris en compte mes idées, pour la rapidité des corrections ... bref, merci pour votre encadrement idéal ! J'espère que de nombreux thésards auront la chance d'être encadrés par votre duo dans le futur.

Je tiens aussi à remercier toutes les autres personnes ayant contribué au projet, à commencer par Claude Calliste. Merci pour ta disponibilité et ta rigueur scientifique. Les nombreuses journées RPE passées en ta compagnie furent toujours particulièrement agréables et enrichissantes, c'est un honneur que de t'avoir eu comme examinateur.

Merci à Catherine Riou et à Veronica Ambrosini pour les mesures d'activité biologique et pour votre bonne humeur communicative. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous. Je tiens également à remercier Pierre Carles pour les nombreuses caractérisations en microscopie électronique et pour m'avoir permis d'utiliser cet outil en « autonomie », ainsi que Yves Champavier pour sa rapidité d'analyse et pour le temps passé à développer la méthode de dosage sur les lignines. Merci également à mes stagiaires : Olympe, Valentin, Camille et Lucas pour leur implication, ainsi qu'au Professeur Williams et à Charlotte McLure pour les mesures de rendement quantique.

Merci aux permanents du laboratoire et plus généralement de l'Université que j'ai côtoyé à travers mes activités de recherche ou d'enseignement. Je ne ferai pas de liste exhaustive car j'oublierais certainement des gens, mais je pense particulièrement à Dorothee Moine : sans ton implication, la vie du laboratoire serait probablement bien différente ! Au professeur Rachida Zerrouki, merci pour votre investissement en tant que présidente de l'école doctorale. Ainsi qu'à Gabin Fabre, Vincent Chaleix, Isabelle Julien, Sylvie Foucaud, Robert Granet, Frédéric Bregier, Fabien Raimondière, Patrick Trouillas, Christelle Pouget, Céline Faugeron, Michèle Constantin, Valentin Robin, Karine Cleries, Thiery Hak, Mireille Verdier, Dominique Pagnou et toute l'équipe du Scientibus ... Merci également à tous les membres de l'entreprise Covertis pour leur sympathie et pour m'avoir permis d'utiliser leur matériel.

Comment ne pas remercier mes compagnons lors du congrès de Coimbra si haut en couleur : Tan, Florent, Mohamad et bien sûr, le Professeur Bertrand Liagre. Bertrand, merci également de me faire confiance pour la suite.

Merci aux différents « intermittents de la science » que j'ai pu croiser durant ces années de thèse, que ce soit à l'Université, à La Rochelle ou aux apéros de l'ADPLim : Zineb, Robin, Soukaina, Pitou, Adrien, Alexandre, Jérémie, Amandine, Martial, Sylvain, Eloi, Oliver, Réda, Mark-Arthur, Tom, Idelette, Amaury, Claire, Nidia ...

Et bien sûr, Matthias, un merci tout particulier pour toi. Encore une nouvelle aventure en ta compagnie ! Comme tu disais : il s'en est passées des choses depuis qu'on est arrivés ici un matin de septembre 2010 ... J'ai également une pensée pour Xavier, Lucien et Marius, aussi arrivés à la FST ce matin-là !

Enfin merci à mes amis présents, par la pensée pour certain, le jour de la soutenance, j'en suis sincèrement touché. Merci à ma famille, tout particulièrement à mes parents, sans qui je n'en serais pas arrivé là. Enfin merci Juliette pour ce que tu m'apportes au quotidien.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de modification 3.0 France »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction générale.....	1
État de l'art.....	5
I. Les lignines : biosynthèse, structures et mécanismes de dégradation.....	7
I.1. Généralités	7
I.2. Biosynthèse	8
I.3. Structure des lignines	12
I.4. Dégradation des lignines.....	16
I.4.1. Dégradation biologique des lignines par les microorganismes.....	16
I.4.2. Dégradation photochimique des lignines	17
I.4.3. Voie des radicaux phénacyl-aryl-éther.....	17
I.4.4. Voie des radicaux phénoxy.....	20
II. Extraction des lignines.....	23
II.1. Introduction	23
II.2. Le procédé Kraft	24
II.3. Le procédé sulfite.....	26
II.4. Le procédé soda	28
II.5. Le procédé organosolv.....	29
II.6. Autres techniques de délignification	31
II.6.1. L'explosion à la vapeur.....	31
II.6.2. Lignines pyrolytiques	31
III. Caractérisation et propriétés des lignines techniques	33
III.1. Caractérisation des lignines techniques	33
III.1.1. Analyse générale de la composition des lignines.....	33
III.1.1.1. Taux de cendres	33
III.1.1.2. Taux de lignine total	34
III.1.1.3. Taux de sucres résiduels	35
III.1.1.4. Analyse élémentaire.....	36
III.1.2. Structure des lignines	38
III.1.2.1. Analyse structurale des lignines par GC-MS	38
III.1.2.2. Analyse structurale des lignines par IRTF	38
III.1.2.3. Analyse structurale des lignines par RMN	40
III.1.3. Masse molaire	42
III.1.4. Caractérisation des espèces radicalaires des lignines.....	43
III.2. Propriétés des lignines techniques.....	46
III.2.1. Pouvoir antioxydant des lignines	47
III.2.2. Autres propriétés biologiques	48
III.2.2.1. Activité antimicrobienne	48
III.2.2.2. Activité protectrice.....	49
IV. Modifications des lignines techniques et applications.....	50
IV.1. Généralités	50
IV.2. Modifications chimiques du polymère	52
IV.2.1. Fonctionnalisation des groupes hydroxyles des lignines	52
IV.2.1.1. Estérification	52
IV.2.1.2. Éthérisation.....	53

IV.2.1.2.1. Alkylation.....	53
IV.2.1.2.2. Hydroalkylation.....	53
IV.2.1.3. Époxydation.....	54
IV.2.1.4. Phénolisation.....	54
IV.2.1.5. Uréthanization.....	55
IV.2.2. Autres fonctionnalisations des lignines.....	56
IV.2.2.1. Hydroxyalkylation.....	56
IV.2.2.2. Amination.....	57
IV.2.2.3. Nitration.....	57
IV.2.2.4. Sulfonation et sulfométhylation.....	58
IV.2.3. Déméthylation des lignines.....	58
V. Synthèse de nanoparticules et applications.....	60
V.1. Introduction.....	60
V.2. Utilisation de nanoparticules de lignines comme antioxydant et antimicrobien.....	61
V.3. Introduction de nanoparticules de lignines dans des matériaux et des cosmétiques..	62
V.4. Préparation de nanoparticules de lignines pour l'encapsulation et le relargage de composés bioactifs.....	63
VI. Utilisations de polymères d'origine naturelle pour le relargage contrôlé de produits phytosanitaires.....	68
VI.1. Généralités.....	68
VI.2. Les polysaccharides.....	69
VI.2.1. Préparation d'hydrogels à base de polysaccharides pour le relargage contrôlé d'agents phytosanitaires.....	69
VI.2.2. Préparation de particules micro ou nanométriques à base de polysaccharides pour le relargage contrôlé d'agents phytosanitaires.....	70
VI.3. Les lignines.....	72
Objectifs du travail.....	75
Résultats et discussions.....	77
I. Caractérisation des lignines de départ.....	79
I.1. Choix et origines des lignines utilisées.....	79
I.2. Composition chimique.....	80
I.3. Masses molaires.....	82
I.4. Analyse structurale des lignines par spectroscopie infrarouge.....	83
I.5. Analyse structurale des lignines par spectroscopie RMN.....	85
I.5.1. RMN du phosphore.....	85
I.5.2. RMN du proton.....	87
I.5.3. Composition élémentaire.....	87
I.6. Conclusion.....	89
II. Étude des propriétés photosensibles des lignines acétylées.....	90
II.1. Introduction.....	90
II.2. Synthèse et caractérisation des lignines acétylées.....	90
II.3. Étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les lignines de départ et acétylées.....	93
II.3.1. Étude de la production d'oxygène singulet.....	94
II.3.2. Production d'anion superoxyde.....	96
II.4. Estérification partielle et méthylation des alcools phénoliques de LK-2.....	98
II.4.1. Synthèse et caractérisation des lignines LK-2 partiellement acétylées.....	98

II.4.2. Méthylation sélective des alcools phénoliques de LK-2	101
II.4.3. Étude des propriétés photosensibles des lignines LK-2 partiellement acétylées et méthylées.....	104
II.5. Conclusion.....	106
III. Préparation et étude de nanoparticules de lignines modifiées	107
III.1. Introduction.....	107
III.2. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées.....	107
III.2.1. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées par ajout d'un contre-solvant	107
III.2.1.1. Principe général de la méthode de préparation	107
III.2.1.2. Détermination de la concentration micellaire critique.....	108
III.2.1.3. Caractérisation des nanoparticules de lignines acétylées obtenues par ajout d'un contre-solvant	109
III.2.2. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées par dialyse	111
III.2.2.1. Principe général de la méthode de préparation	111
III.2.2.2. Caractérisation des nanoparticules de lignines acétylées obtenues par dialyse	112
III.2.3. Comparaison des deux méthodes de préparation	113
III.2.4. Étude de la stabilité des lignines préparées par dialyse.....	114
III.2.5. Influence de la concentration en lignine acétylée de départ.....	115
III.2.6. Influence de la nature du solvant	116
III.2.7. Influence du degré d'acétylation	118
III.3. Préparation de nanoparticules à partir de lignines estérifiées par des chaînes aliphatiques de longueurs différentes.....	119
III.3.1. Synthèse des lignines C ₃ LK-1, C ₄ LK-1, C ₅ LK-1 et C ₁₂ LK-1.....	119
III.3.2. Caractérisation des lignines C ₃ LK-1, C ₄ LK-1, C ₅ LK-1 et C ₁₂ LK-1.....	121
III.3.3. Synthèses de nanoparticules à partir des lignines C ₃ LK-1, C ₄ LK-1, C ₅ LK-1 et C ₁₂ LK-1	124
III.4. Étude de la production d'oxygène singulet par les nanoparticules de lignines acétylées	127
III.5. Conclusion.....	128
IV. Association des nanoparticules de lignines acétylées à un photosensibilisateur	130
IV.1. Introduction.....	130
IV.2. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées fonctionnalisées par un photosensibilisateur	130
IV.2.1. Synthèse du photosensibilisateur.....	132
IV.2.2. Fonctionnalisations du photosensibilisateur P ₁	133
IV.2.2.1. Fonctionnalisation du photosensibilisateur (P ₁) par un bras aliphatique bromé	133
IV.2.2.2. Fonctionnalisation du photosensibilisateur (P ₁) par un bras portant un acide carboxylique terminal	134
IV.2.2.2.1. Fonctionnalisation de P ₁ par le 4-bromobutanoate d'éthyle	134
IV.2.2.2.2. Saponification du photosensibilisateur P ₃	135
IV.2.3. Fonctionnalisation de la lignine LK-2 par le photosensibilisateur P ₂	136
IV.2.4. Fonctionnalisation de la lignine LK-2 par le photosensibilisateur P ₄	138
IV.2.5. Acétylation des matériaux fonctionnalisés LK-2-P ₂ et LK-2-P ₄	139
IV.2.6. Préparation de nanoparticules à partir des matériaux AcLK-2-P ₂ et AcLK-2-P ₄	142

IV.3. Encapsulation d'un principe actif dans des nanoparticules de lignines acétylées	
AcLK-2.....	144
IV.3.1. Préparation des nanoparticules.....	144
IV.3.2. Détermination de la quantité de molécules modèles encapsulées.....	146
IV.4. Conclusion.....	147
Conclusion générale et perspectives.....	149
Matériel et méthodes.....	153
I. Matériel.....	155
I.1. Réactifs et solvants.....	155
I.2. Chromatographie.....	155
I.2.1. CCM.....	155
I.2.2. Chromatographie flash automatisée.....	155
I.3. Spectroscopie.....	155
I.3.1. Spectroscopie RMN.....	155
I.3.2. Spectroscopie RPE.....	156
I.3.3. Spectroscopie Infrarouge.....	157
I.3.4. Spectroscopie d'absorption UV-Visible.....	157
I.3.5. Détermination des rendements quantiques en oxygène singulet.....	157
I.4. Observation des nanoparticules.....	157
I.4.1. DLS.....	157
I.4.2. Microscopie électronique en transmission.....	158
II. Origine, caractérisation et purification des lignines.....	159
II.1. Origine des lignines Kraft LK-1 et LK-2.....	159
II.2. Extraction organosolv de lignine de châtaigner.....	159
II.3. Purification de la lignine LK-1.....	159
II.4. Caractérisation des lignines.....	160
II.4.1. Taux de cendres.....	160
II.4.2. Étude de la composition chimique.....	160
II.4.3. Analyse élémentaire.....	161
II.4.4. Détermination des masses molaires.....	161
II.4.5. Dosage des fonctions alcools des matériaux.....	162
II.4.6. Dosage des fonctions méthoxy.....	162
III. Synthèse.....	164
III.1. Acétylation des lignines.....	164
III.1.1. Acétylation totale des matériaux.....	164
III.1.2. Acétylations partielles de la lignine LK-2.....	164
III.1.3. Tableau récapitulatif des conditions d'acétylation et des rendements massiques obtenus.....	165
III.2. Estérification de la lignine LK-1 par l'anhydride propionique.....	166
III.3. Estérification de la lignine LK-1 par l'anhydride butyrique.....	167
III.4. Estérification de la lignine LK-1 par l'anhydride valérique.....	168
III.5. Estérification de la lignine LK-1 par le chlorure de lauryle.....	169
III.6. Méthylation de la lignine LK-2.....	170
III.7. Synthèse de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P ₁).....	171
III.8. Synthèse de la 5-(4-bromopentoxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P ₂).....	172
III.9. Synthèse de LK-2-P ₂ : Couplage entre la porphyrine P ₂ et la lignine LK-2.....	174

III.10. Synthèse de la 5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P ₃)	175
III.11. Synthèse de la 5-(2[carboxypropoyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P ₄)	177
III.12. Synthèse de LK-2-P ₄ : couplage entre la porphyrine P ₄ et la lignine LK-2	179
IV. Préparation des nanoparticules de lignines	180
IV.1. Préparation des nanoparticules par ajout d'un contre-solvant.....	180
IV.2. Préparation des nanoparticules par dialyse	180
IV.3. Encapsulation de la rhodamine B	180
IV.4. Encapsulation de la 5-10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphényl)-porphyrine (TPPOH)	181
Références bibliographiques	183
Annexes	203
Annexe 1 : Spectre RMN ¹ H de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P ₁)	205
Annexe 2 : Spectre RMN ¹ H de la 5-(4-bromopentoxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P ₂)	206
Annexe 3 : Spectre RMN ¹ H de la 5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P ₃)	207
Annexe 4 : Spectre RMN ¹ H de la 5-(2[carboxypropoyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P ₄)	208
Annexe 5 : Publication	209

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AIL : lignine insoluble dans l'acide

AISL : lignine soluble dans l'acide

Ar : argon

BZL : benzazulène

CCM : chromatographie sur couche mince

CDCl₃ : chloroforme deutéré

CDI : 1,1'-carbonyldiimidazole

CHCl₃ : chloroforme

CMC : concentration micellaire critique

d : doublet

dd : doublet de doublet

DEPMPO : 5-(diethoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde

DIPPMPO : 5-(diisopropoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde

DLS : spectroscopie de diffusion dynamique de la lumière

DMF : N,N-diméthylformamide

DMPO : 5,5-diméthyl-1-pyrroline

DMS : sulfure de diméthyle

DMSO : diméthylsulfoxyde

éq. : équivalent

EtOH : éthanol

IRTF : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

LiP : lignines peroxydase

m : masse

m : multiplet

MET : microscopie électronique en transmission

M_n : masse molaire moyenne en nombre

MnP : manganèse peroxydase

M_w : masse molaire moyenne en masse

p- : para-

PDI : indice de polydispersité

PEG : polyéthylène glycol

PTFE : polytétrafluoroéthylène

quint : quintuplet

Rf : rapport frontal

s : singulet

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RPE : résonance paramagnétique électronique

t : triplet

TEMP : 2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridone

TFA : acide trifluoroacétique

TMDP : 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-dioxaphospholane

TMS : tétraméthylsilane

THF : tétrahydrofurane

UA : unité arbitraire

UV-Visible : ultraviolet-visible

VP : versatiles peroxydases

Φ_{Δ} : rendement quantique de production d'oxygène singulet

Introduction générale

L'augmentation des problèmes environnementaux et la surexploitation des ressources de la planète est aujourd'hui une problématique de premier ordre, et fait du remplacement des sources non renouvelables, d'énergie et de matières premières, l'un des défis majeurs du XXI^e siècle.

Dans cet objectif, la biomasse lignocellulosique apparaît comme l'une des alternatives aux combustibles fossiles pour la production d'énergie et de produits chimiques.^[1] Les lignines représentent une grande part de cette biomasse en étant le biopolymère le plus abondant après la cellulose et la principale source renouvelable de carbone aromatique.^[2]

Cependant, sur les 55 à 70 millions de tonnes de lignines extraites chaque année, 98% sont directement utilisées comme source d'énergie thermique par l'industrie papetière. Seuls les 2% restants sont utilisés pour la production de produits à plus haute valeur ajoutée, que ce soit directement ou après modification chimique. De nombreuses recherches sont donc actuellement menées par les communautés scientifiques et industrielles afin de valoriser davantage cette source de carbone renouvelable.^[3]

De par sa biocompatibilité et sa biodégradabilité, une des voies de valorisation prometteuse du biopolymère semble être le développement de nouveaux systèmes de formulation de pesticides ou de fertilisants.^[4] Ces derniers permettant ainsi de réduire l'emploi de produits phytosanitaires dont l'impact environnemental est, lui aussi, d'une importance majeure.^[5]

C'est dans ce contexte, et en s'appuyant sur son expertise en matière de valorisation d'agroressources et de synthèse de photosensibilisateurs, que le Laboratoire PEIRENE a décidé de mener ce travail de thèse portant sur le développement de nouveaux matériaux photosensibles à partir de lignines modifiées.

Ce manuscrit s'articule en quatre parties : la première présente des rappels bibliographiques sur les propriétés et la valorisation des lignines ainsi que sur leurs méthodes d'extraction et de caractérisation. Elle passe également en revue les différents systèmes de relargage contrôlé de produits phytosanitaires développés à partir de polymères d'origine naturelle.

La seconde partie décrit quant à elle les différents travaux menés au cours de cette thèse sous la forme de quatre chapitres. Le premier d'entre eux est dédié à la caractérisation des lignines utilisées dans le reste de cette étude et le second porte sur l'influence de l'acétylation des lignines sur leur propriétés photosensibles. Différentes préparations de nanoparticules à partir de lignines modifiées sont ensuite détaillées dans un troisième chapitre. Puis, le

quatrième décrit l'association de nanoparticules de lignines acétylées à un photosensibilisateur.

Enfin, la troisième partie de ce manuscrit présente les conclusions et les perspectives qui découlent de ces travaux et la quatrième en détaille le volet expérimental.

État de l'art

I. Les lignines : biosynthèse, structures et mécanismes de dégradation

I.1. Généralités

Avec la cellulose et les hémicelluloses, les lignines sont l'un des trois principaux constituants de la biomasse lignocellulosique. Ces polyphénols représentent le polymère aromatique naturel le plus abondant sur terre, ce qui en fait l'une des principales sources de carbone biosourcé.^[3]

Les lignines sont présentes dans les parois secondaires des cellules végétales. Elles y sont, avec les hémicelluloses, distribuées autour des fibres de cellulose auxquelles elles sont liées de façon covalente (Figure 1).

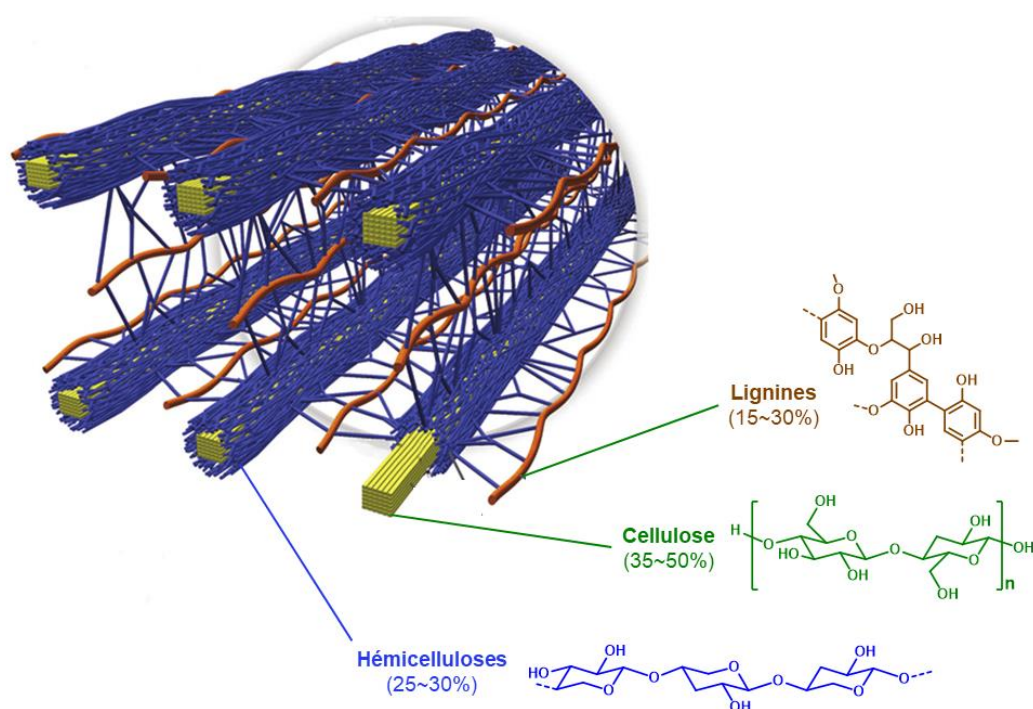


Figure 1 : Distribution des lignines et des hémicelluloses autour de la cellulose.^[6]

De par cette structure, les lignines vont grandement contribuer au maintien structural de la plante en apportant de la rigidité aux parois cellulaires. Elles vont également avoir un rôle de barrière physique contre l'humidité et les différents pathogènes. De plus, elles vont permettre la circulation d'eau et de nutriments à travers l'organisme en apportant de la rigidité au système vasculaire de la plante.^[7] Enfin, le polymère va protéger la paroi cellulaire de la dégradation en protégeant les polysaccharides de l'hydrolyse enzymatique.^[8]

I.2. Biosynthèse

La biosynthèse des lignines débute dans le cytosol de la plante par la formation de trois unités 3-(p-hydroxyphényl)prop-2-énoïl : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique à partir de la phénylalanine. Ces trois alcools, nommés monolignols, sont ensuite exportés dans la paroi cellulaire où ils polymérisent sous l'action d'enzymes, formant ainsi les lignines. Une fois polymérisés, ces trois alcools sont respectivement nommés unité p-hydroxyphényle (H), unité guaïacyle (G) et unité syringyle (S) (Figure 2).^[9]

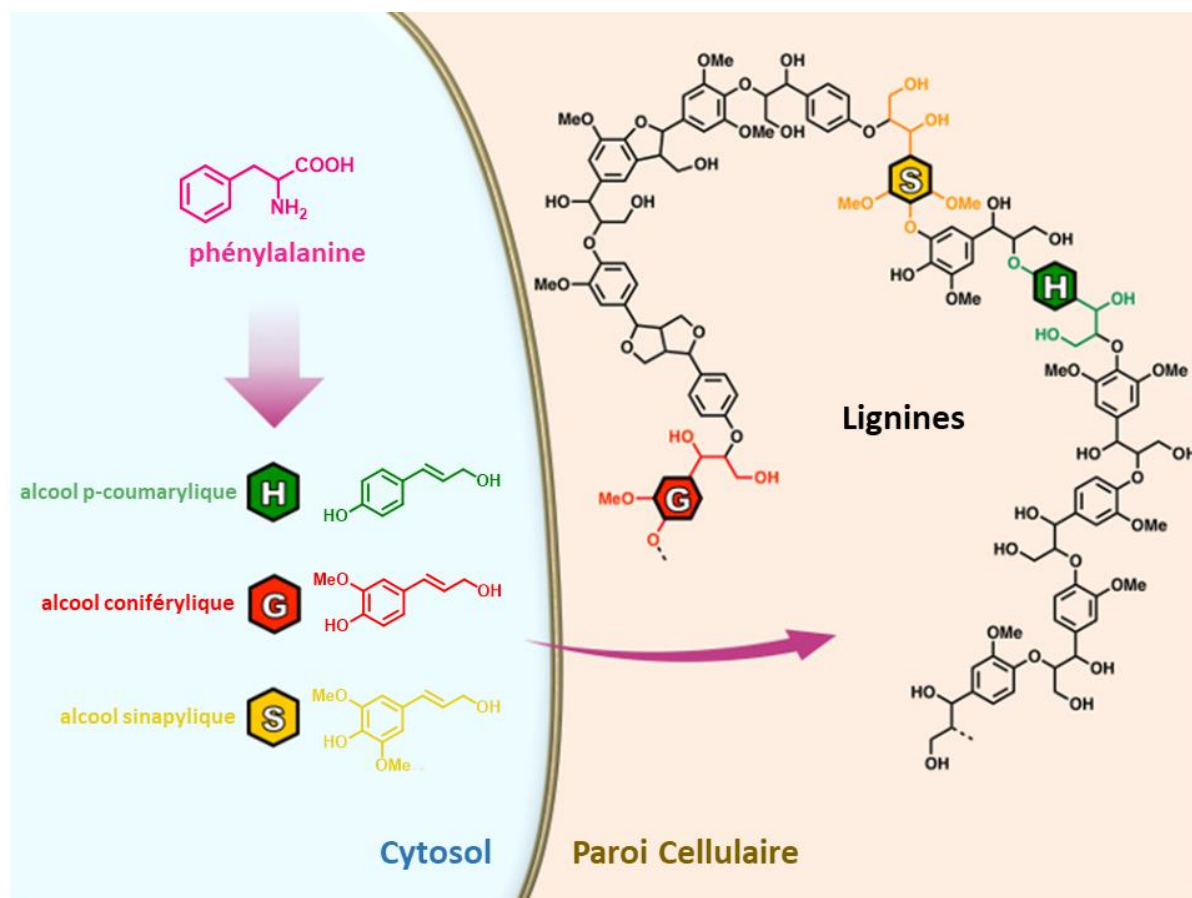


Figure 2 : Biosynthèse des lignines.^[9]

La phénylalanine est obtenue après plusieurs étapes qui ne seront pas développées en détail ici. De façon globale, dans la plante, le glucose est obtenu par photosynthèse, puis converti en précurseurs, tels que le phosphoénolpyruvate ou le chorismate, par la voie métabolique d'Embden-Meyerhof-Parnas, ou glycolyse.^[10] Ensuite, ces molécules vont pouvoir être

converties, par la voie de l'acide shikimique,^[11] en acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine.

C'est cette dernière molécule qui va donc être le point de départ de la synthèse des trois monolignols, monomères de base des lignines (Figure 3).^[12] Tout d'abord, la phénylalanine va subir une réaction de désamination suivie d'une hydroxylation du cycle aromatique en position para pour conduire à l'acide p-coumarique. Ce dernier va ensuite, sous l'action de la coenzyme A, être transformé en p-coumaryl-CoA, à son tour réduit en p-coumaraldéhyde, puis en alcool p-coumarylique sous l'action successive des enzymes Cinnamoyl-CoA Réductase (CCR) et Alcool Cinamyl Déshydrogénase (CAD). Le p-coumaroyl-CoA peut également être hydroxylé et méthylé par quatre réactions enzymatiques successives en présence d'acide shikimique, puis réduit par CCR pour conduire au coniféraldéhyde. Cette molécule peut alors, soit être directement réduite par CAD en alcool p-coniférylique, soit être de nouveau hydroxylé et méthylé sous l'action d'enzymes pour former le sinapaldéhyde. Ce dernier sera également réduit ensuite par CAD en alcool p-sinalpylique.

Il est à noter que ces monolignols se retrouvent dans des proportions différentes en fonction des espèces. En effet, l'alcool coniférylique est essentiellement présent chez les gymnospermes, dont la flore est principalement composée de conifères. Les angiospermes dicotylédones tels que le châtaigner vont, quant à eux, synthétiser principalement les alcools p-coumarylique et coniférylique, alors que les trois monolignols seront retrouvés chez les angiospermes monocotylédones, classe dont les céréales et les graminées font par exemple partie. Cette variabilité dans les proportions de chaque monolignol en fonction de l'espèce va être une des causes de la grande variabilité structurelle des lignines.^[13, 14]

Une fois synthétisés dans le cytosol, les alcools vont ensuite être transportés dans la paroi cellulaire par un mécanisme qui reste encore aujourd'hui discuté.^[12] Il semblerait que les fonctions phénoliques des monolignols soient tout d'abord glycosylées. Les glucosides formés sont ensuite transportés à travers la membrane plasmique par des vésicules issues de l'appareil de Golgi ou par des transporteurs ATP-dépendants.^[15-17]

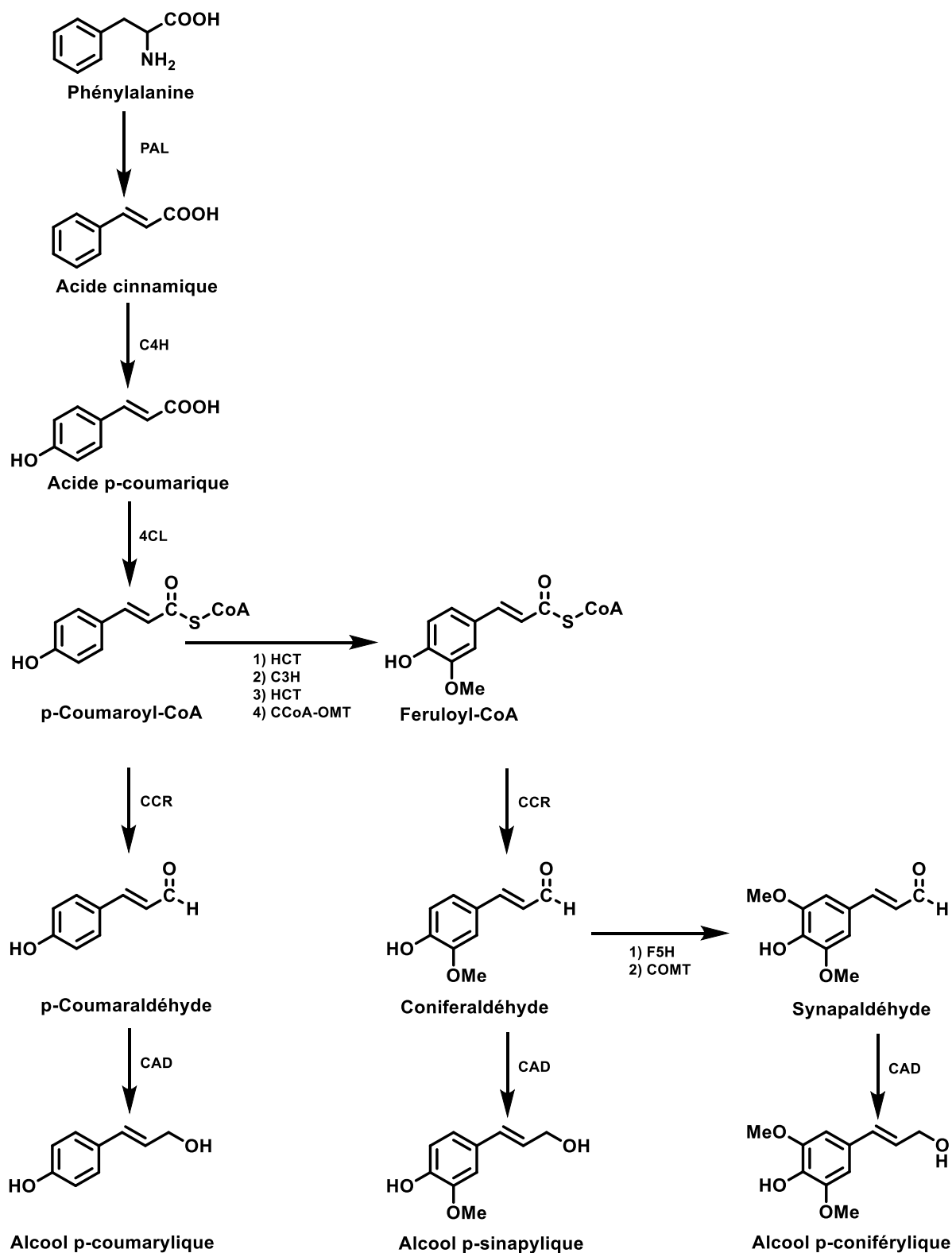


Figure 3 : Biosynthèse des monolignols à partir de la phénylalanine.

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

Une fois déposés dans la paroi cellulaire, les intermédiaires voient leur liaison glycoside clivée par des β -galactosidases. Les alcools ainsi formés vont ensuite polymériser par radicalisation oxydative enzymatique, puis combinaison radicalaire aléatoire pour former la lignine.

Dans un premier temps, les fonctions phénoliques des monolignols vont être oxydées (*i.e.* déshydrogénées) par des peroxydases et/ou des laccases donnant lieu à un radical relativement stable. En effet, l'électron non apparié va pouvoir être délocalisé à l'ensemble du cycle aromatique et de la chaîne carbonée sur les positions 1, 3, 5 et β (Figure 4).

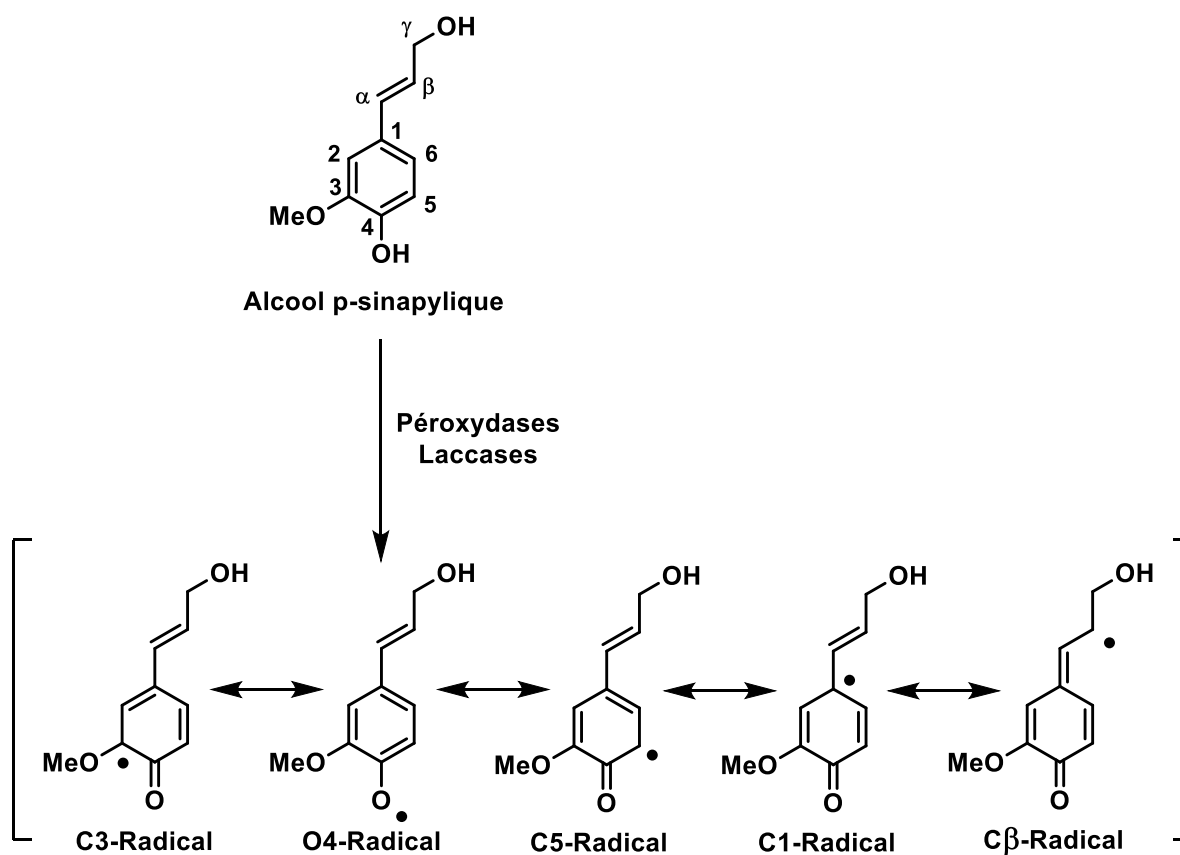


Figure 4 : Déshydrogénation de l'alcool p-sinapylique.

Dans un second temps, une réaction de couplage radicalaire va avoir lieu entre deux monolignols déshydrogénés. Le dilignol formé va à son tour être déshydrogéné et réagir sur un autre radical. Ces réactions de polymérisation vont se poursuivre pour former le polymère que sont les lignines. Différentes liaisons covalentes vont ainsi pouvoir se former en fonction des radicaux engagés, contribuant ainsi à la diversité structurale des lignines, qui sera développée dans le paragraphe I.3.

I.3. Structure des lignines

Du fait de cette biosynthèse, les lignines présentent une structure très complexe qui dépend non seulement de l'espèce végétale dont elles sont issues, mais également du tissu végétal et de la strate pariétale où elles se trouvent. Des facteurs environnementaux tels que la température, le manque d'eau et de nutriments, ou encore les attaques de différents pathogènes, vont aussi pouvoir influencer leurs structures chimiques.^[18] Cependant, malgré cette variabilité, l'évolution des méthodes de caractérisation et le perfectionnement des études biosynthétiques ont permis la proposition de modèles de lignines par la communauté scientifique. Un des modèles les plus courants est celui proposé par Adler en 1977 (Figure 5).^[19]

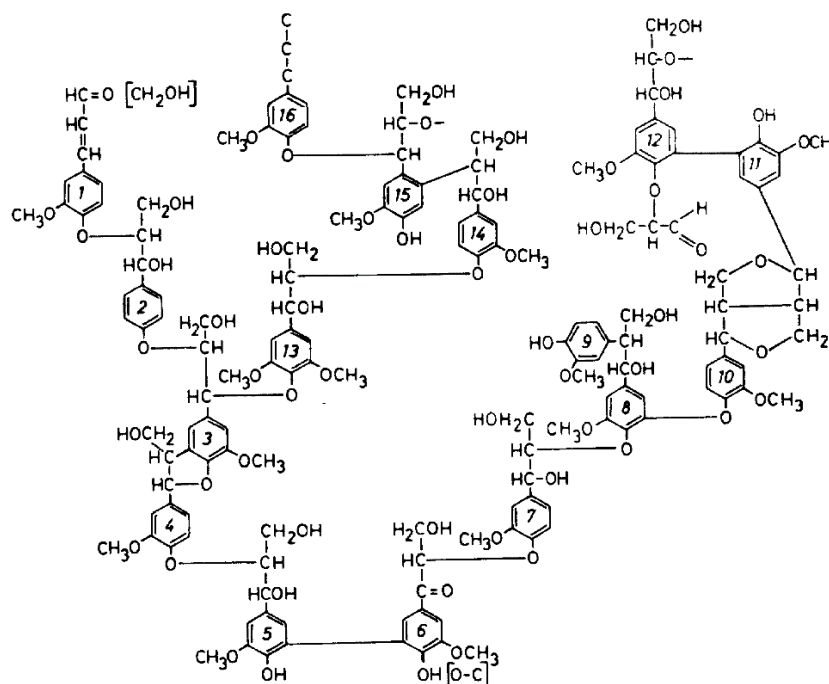


Figure 5 : Structure d'une lignine native de conifère telle qu'Adler l'a présentée en 1977.^[19]

Ces modèles montrent que différentes liaisons unissent les unités H, G et S du polymère. Elles possèdent des propriétés chimiques différentes et peuvent être classées en deux grandes catégories : les liaisons dites « labiles », facilement clivables et donc la cible des processus industriels de délignification, et les liaisons dites « non condensées », plus résistantes aux dégradations chimiques.

Les principales liaisons labiles sont des liaisons éther de type β -O-4. Ces liaisons sont les plus courantes dans les lignines natives. En effet, la forte densité électronique autour des atomes d'oxygène des monolignols va favoriser la formation de radicaux de type $C\beta$ et O4. Le couplage entre ces deux positions (Figure 6) est donc le plus courant, il peut représenter jusqu'à deux tiers des liaisons.^[20] Des liaisons α -O-4, également facilement clivables, sont aussi observées dans les lignines.

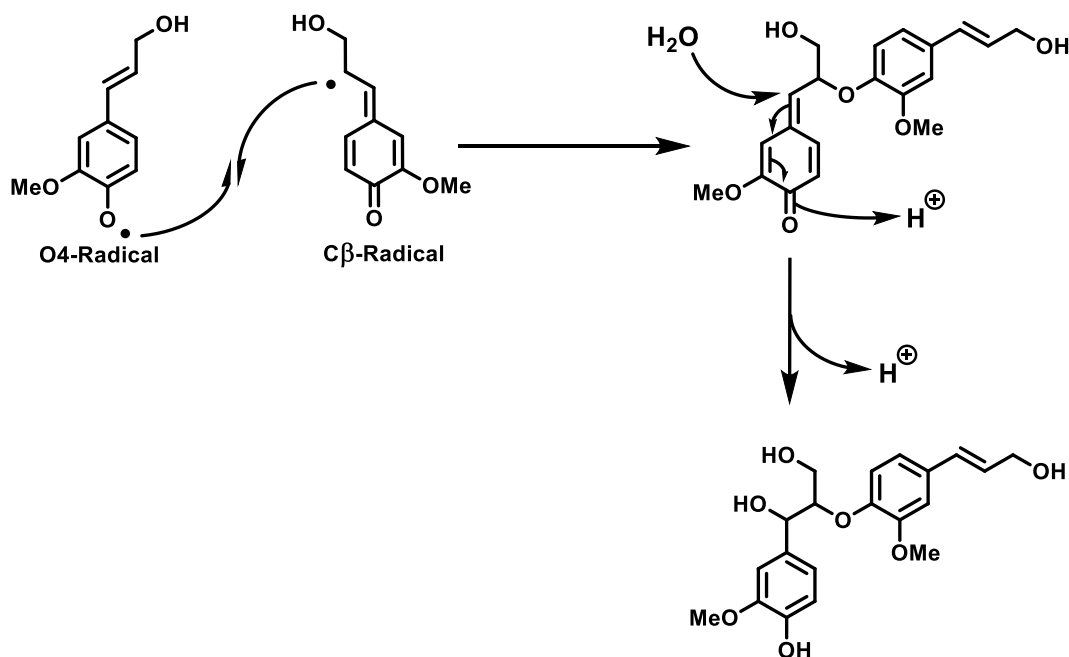
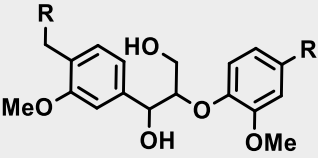
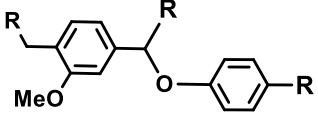
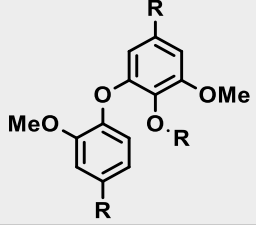
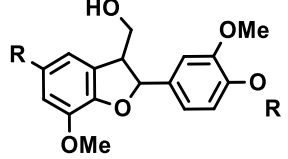
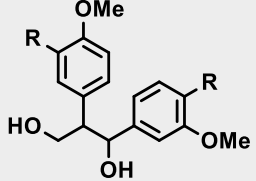
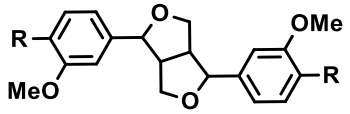
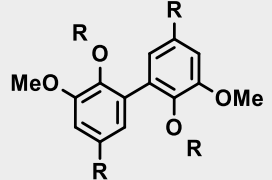
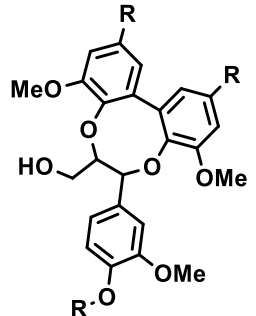


Figure 6 : Formation d'une liaison β -O-4 entre deux unités radicalaires.^[21]

Les liaisons non condensées se présentent essentiellement sous la forme de liaison carbone-carbone (5-5', β -1, β -5 et β - β), diaryl-éther (4-O-5) et dibenzodioxocine (DBDO). Ce dernier motif étant une structure originale propre aux lignines résultant du couplage entre une unité 5-5' et une unité phénylpropane.^[22] Le détail de ces différentes liaisons ainsi que leur occurrence sont présentés dans le Tableau 1 et la Figure 7.

Les lignines sont de plus liées aux unités osidiques de la cellulose et des hémicelluloses dans la plante. Ces liaisons peuvent être de type aryl-éther, aryl-ester ou encore phényl-glycosidique.^[23, 24]

Tableau 1 : Les différents types de liaison dans les lignines.^[25-27] (R = lignine)

Type de liaison	Occurrence dans le bois de feuillus	Occurrence dans le bois de résineux
β-O-4 	60 ~ 62%	45 ~ 50%
α-O-4 	6 ~ 8%	Non Renseigné
4-O-5 	6 ~ 9%	4 ~ 7%
β-5 	3 ~ 11%	9 ~ 12%
β-1 	1 ~ 7%	1 ~ 9%
β-β 	3 ~ 12%	2 ~ 6%
5-5 	3 ~ 9%	20 ~ 25%
DBDO 	0 ~ 2%	5 ~ 7%

La nature des monolignols va pouvoir influencer la façon dont les chaînes de polymère vont s'organiser. En effet, les groupements méthoxy présents sur les alcools p-sinapyliques et p-coniféryliques vont prévenir la formation de liaison de type 5-5' et DBDO. Les lignines de résineux, principalement formées à partir d'alcool p-coniférylique, vont donc présenter un nombre plus important de ramifications que celles des feuillus qui contiennent des unités guaiacyles.^[25]

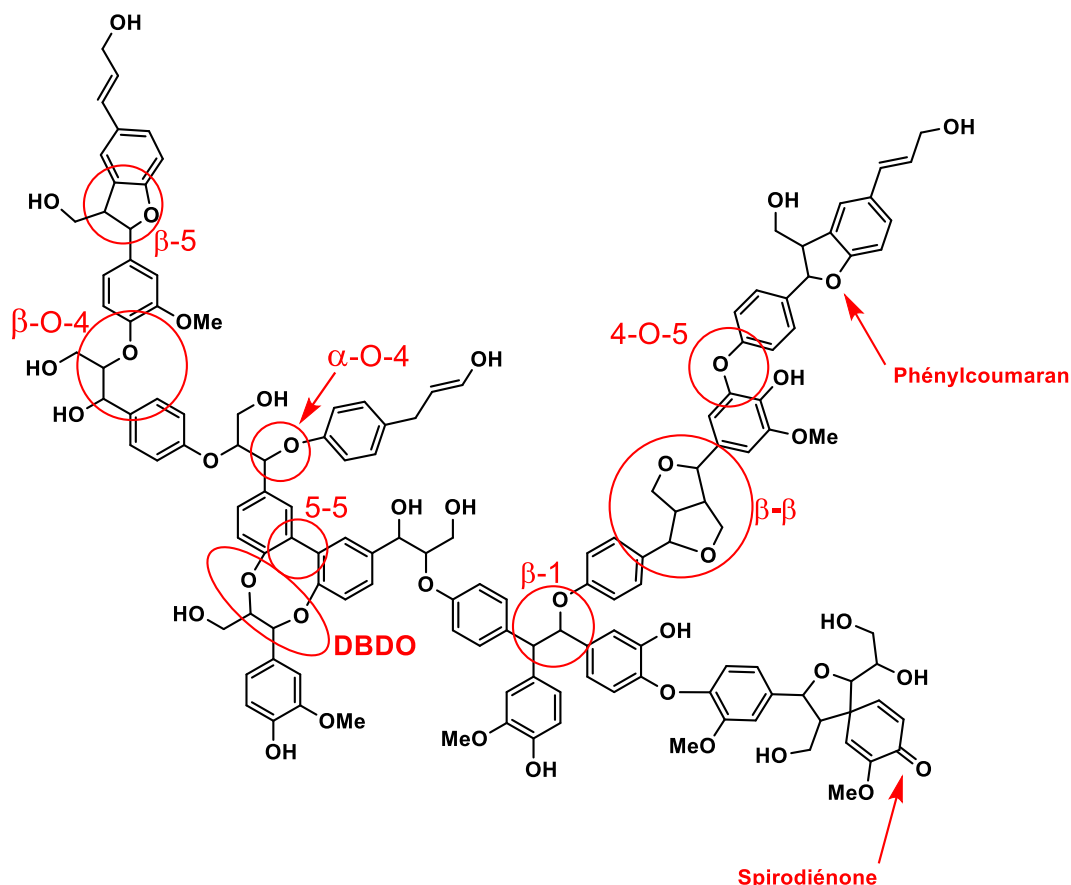


Figure 7 : Représentation des principales liaisons trouvées dans les lignines d'après Weckhuysen et al.^[25]

Enfin, il est aussi à noter que la condensation des monolignols va laisser libres de nombreuses fonctions alcool aliphatique et phénolique à la surface du polymère. D'autres motifs plus oxydés, tels que des spirodiénones, vont également apparaître (Figure 7), ou encore des fonctions acide carboxylique provenant essentiellement de la photodégradation partielle des lignines (cf. paragraphe I.4.3). Ces différentes fonctions chimiques vont être à l'origine de nombreuses propriétés des lignines.

I.4. Dégradation des lignines

Bien que particulièrement résistantes à la dégradation du fait de leurs structures, les lignines peuvent tout de même être naturellement dégradées. Deux principales voies de dépolymérisation ont été identifiées. D'une part, l'attaque du polymère par des microorganismes^[28] et, d'autre part, sa dégradation photochimique.^[29]

I.4.1. Dégradation biologique des lignines par les microorganismes

Les lignines sont insensibles à l'attaque de nombreux microorganismes, cependant, certains champignons vont être capables de dégrader le biopolymère. En effet, des champignons de la pourriture blanche ou brune du bois sont capables de sécréter une combinaison d'enzymes extracellulaires lignolytiques. Ces enzymes sont principalement de deux types. Il s'agit de laccases ou de peroxydases à hème. Elles vont générer des sites radicalaires à la surface du polymère initiant ainsi une cascade de réactions de scission conduisant à sa dépolymérisation en sous-unités aromatiques, en CO₂ et en eau.^[30]

Les laccases sont des oxydoréductases cuivre-dépendantes qui vont utiliser l'oxygène moléculaire pour oxyder des petites molécules présentes dans l'environnement des lignines. Ces médiateurs chimiques vont ensuite être capables d'oxyder à leur tour le polymère, principalement ses sites phénoliques.^[31]

Les peroxydases à hème possèdent toutes un macrocycle tétrapyrrolique. Les trois enzymes lignolytiques de ce type les plus décrites sont les lignines peroxydases (LiP), les manganèses peroxydases (MnP) et les versatiles peroxydases (VP). Les lignines peroxydases sont les premières enzymes qui ont été isolées chez *Phanerochaete chrysosporium*, un des champignons de la pourriture blanche. Elles possèdent un atome de fer penta-coordonné au centre de la protéine. Cet atome va pouvoir s'oxyder en fer IV, espèce capable à son tour d'oxyder les liaisons du biopolymère. Cette enzyme est efficace sur la majorité des liaisons des lignines, y compris sur celles des cycles aromatiques.^[32, 33] Les manganèses peroxydases ont une structure proche de celles des LiP. Comme ces dernières, elles possèdent un macrocycle tétrapyrrolique coordonnant un atome de fer. Cependant, elles agissent par un mécanisme différent. L'enzyme oxyde un atome de manganèse II, engagé dans une liaison cationique à sa surface, en Mn III. Le manganèse oxydé est ensuite libéré sous forme chélatée, oxydant à son

tour les substrats organiques. Les MnP, contrairement aux LiP, bien qu'efficace sur la majorité des liaisons, ne vont pas l'être sur les cycles aromatiques.^[34] Les enzymes versatiles peroxydases, quant à elles, cumulent les activités des deux enzymes précédemment présentées. En effet, elles vont pouvoir oxyder les lignines par le biais d'un manganèse III chélaté, mais également par un mécanisme proche de celui reporté pour les LiP.^[35]

La pourriture blanche et brune du bois va aussi contenir des champignons capables de produire du peroxyde d'hydrogène.^[36] Ce dernier, par réaction de Fenton, va se décomposer par la suite en radicaux hydroxyles qui vont pouvoir participer à la dépolymérisation radicalaire des lignines.

Il a été montré plus récemment que des bactéries pouvaient aussi être impliquées dans la dégradation des lignines. En effet, des études du génome de certaines bactéries à Gram positif, comme *Streptomyces viridosporus*, ont montré que ce dernier contenait des gènes codant pour des protéines lignolytiques telles que des laccases ou des peroxydases. Il a également été montré que des bactéries, comme *Rhodococcus jostii*, pouvaient produire une classe particulière de peroxydases à hème, les « dye-decolorizing peroxydase » (DyPs), dont certaines étaient capables de dégrader des unités non-phénoliques des lignines.^[37] Cependant, ces enzymes d'origines bactériennes se montrent en général moins efficaces que celles sécrétées par les champignons.^[30]

I.4.2. Dégradation photochimique des lignines

L'absorption de radiations dans le domaine du proche ultraviolet (300-400 nm) par les lignines va induire la formation de radicaux libres, point de départ de leur dépolymérisation selon deux voies. La première va engendrer des ruptures de liaison carbone-carbone et l'apparition de fonctions oxydées au sein du polymère. La seconde va conduire à la formation d'autres espèces radicalaires, et par recombinaison, à de nouveaux chromophores, responsables de la dépolymérisation des lignines.^[38]

I.4.3. Voie des radicaux phénacyl-aryl-éther

Lorsqu'elles sont irradiées (300-400 nm), les lignines voient se former à leur surface des fonctions carbonyle par différentes recombinaisons radicalaires. Ces phénomènes sont

favorisés par la présence dans le milieu de radicaux provenant de dégradations enzymatiques ou d'autres dégradations photo-induites (cf. paragraphe I.1.4.2.2). L'apparition de carbonyles en position α est plus particulièrement étudiée. En effet, ces motifs vont être le point de départ de plusieurs mécanismes de dégradation des lignines, détaillés par la suite.

La formation de ces groupements α -carbonylés passe par l'apparition d'un radical carbone-centré à la surface du polymère, puis s'effectue majoritairement selon deux voies. Au cours de la première, une oxydation par l'oxygène conduit, sans rupture de liaison, à la fonction carbonyle. La deuxième passe, quant à elle, par la scission d'une liaison éther et la formation d'une liaison éthylénique (Figure 8).^[39-41]

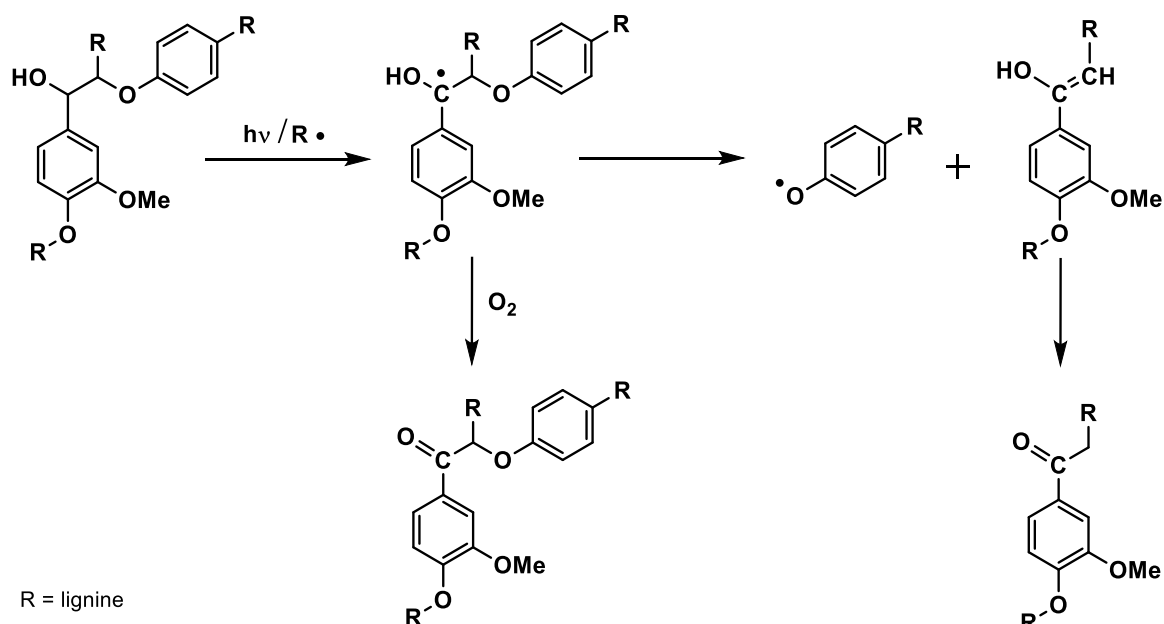


Figure 8 : Formation de composés α -carbonylés pendant la photodégradation des lignines.^[38]

Après absorption d'un photon (300-400 nm), les fonctions carbonyle des lignines sont portées à l'état excité. Leur retour à l'état fondamental en présence d'oxygène moléculaire peut donner lieu à la formation d'oxygène singulet (Figure 9),^[38] qui va être à son tour responsable d'autres mécanismes de dépolymérisation radicalaires. La photoactivation des carbonyles va par ailleurs pouvoir engendrer d'autres modifications des lignines. En effet, consécutivement à cette dernière, un clivage de la liaison entre les carbones α et β va pouvoir s'opérer au pied du carbonyle, générant ainsi deux synthons radicalaires (Figure 9). Celui portant le groupement carbonyle va pouvoir capter un proton pour former un aldéhyde qui pourra être oxydé jusqu'à l'acide carboxylique en présence de dioxygène. L'autre composé radicalaire va,

quant à lui, pouvoir être engagé dans d'autres réactions radicalaires au sein du biopolymère.^[38]

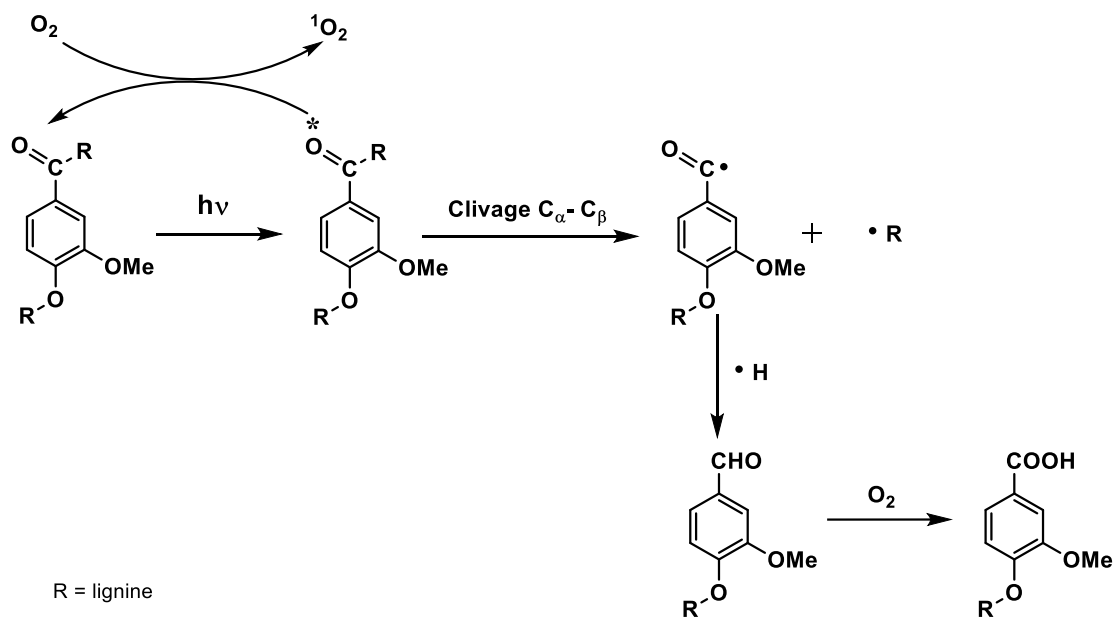


Figure 9 : Réactivité des composés α -carbonylés après activation UV.^[38]

Il est noté que ces réactions vont être dépendantes de l'environnement des lignines comme la présence ou non d'espèces donneuses d'hydrogène. Le type de substituant en α du carbonyle va aussi pouvoir influencer ces mécanismes.

Ces structures α -carbonylées sont aussi à l'origine de mécanismes de recombinaison au sein des lignines. En effet, la rupture homolytique peut également s'effectuer au niveau d'une liaison éther engageant le carbone β . Les deux intermédiaires formés peuvent ensuite se recombiner via une nouvelle liaison entre le carbone β du composé portant le carbonyle et le carbone en position 5 d'un cycle aromatique de l'autre intermédiaire (Figure 10). Ce qui explique qu'une plus grande quantité de ces liaisons soit observés dans des lignines irradiées, que dans des lignines ne l'ayant pas été.^[42, 43]

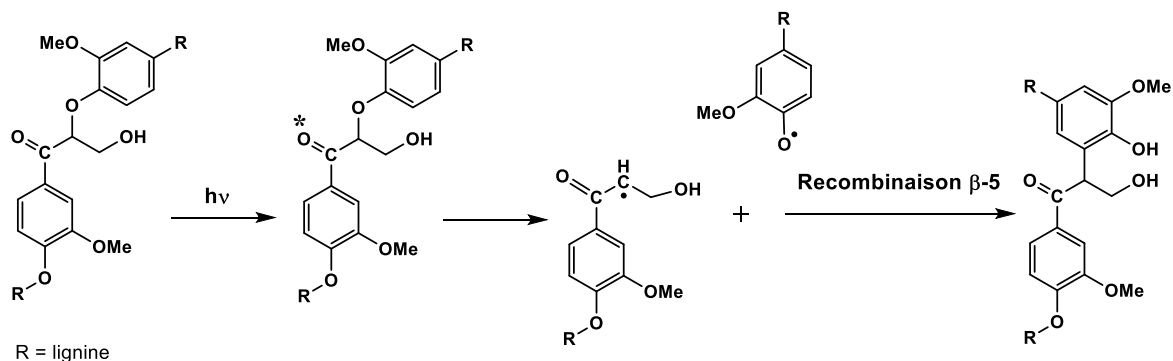


Figure 10 : Mécanisme de recombinaison radicalaire par formation d'une liaison de type β-5 au sein des lignines pendant leur photodégradation.^[38]

1.4.4. Voie des radicaux phénoxy

Les fonctions carbonyle, mais également différentes unités aromatiques des lignines peuvent conduire à la formation d'oxygène singulet après irradiation.^[38] Cette espèce réactive de l'oxygène permet la formation de radicaux phénoxy par déshydrogénation des fonctions phénol libres du polymère. Cette réaction va aussi pouvoir être directement induite, en présence d'oxygène, par un transfert d'hydrogène photo-induit engendrant également la formation de radicaux hydroperoxydes (HOO^\bullet).^[38] Ce transfert photo-induit peut parallèlement être initié par des radicaux hydroxyles provenant d'autres dégradations.^[38] Il est aussi noté que l'absorption directe de rayonnements UV de longueur d'onde de 300 nm par les fonctions phénoliques va pouvoir conduire aux radicaux phénoxy (Figure 11).^[44]

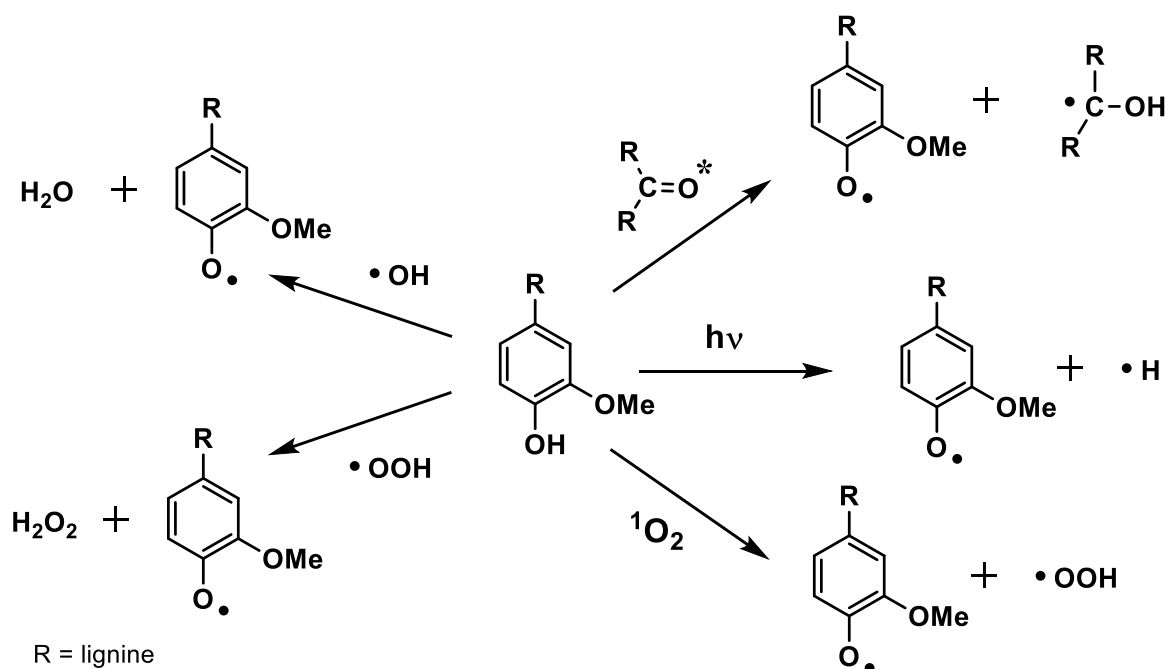


Figure 11 : Différentes voies de déshydrogénation des phénols de la lignine.^[38]

Les radicaux phénoxy ainsi formés vont par la suite être impliqués dans diverses réactions de dépolymérisation des lignines, comme celles de déméthylation par exemple, mais également dans des réactions conduisant à l'obtention de para et ortho-quinones, chromophores en grande partie responsables du photo-jaunissement des matières lignocellulosiques, comme le bois ou le papier journal, au cours du temps. La compréhension de leurs mécanismes de formation intéresse la communauté scientifique depuis le milieu du siècle dernier, en particulier afin de pouvoir proposer des solutions de prévention à ces phénomènes de vieillissement. Ainsi, en 1946, Piell^[45] rapporte qu'après acétylation, une toile de jute ne semble plus subir de photodégradation observable macroscopiquement. Il émet l'hypothèse que les phénomènes de coloration sont dus à la réactivité des groupements phénols des lignines qui, sous irradiation lumineuse, conduisent à la formation de quinones. En bloquant ces fonctions phénoliques par acétylation, le vieillissement est donc prévenu. Dans la continuité de ces travaux, Callow a ensuite montré que le taux de méthylation diminuait dans les matériaux photo-irradiés.^[46] Puis, Rex, avec l'aide de la résonance paramagnétique électronique (RPE), est venu préciser la nature radicalaire des réactions de formation des quinones.^[47] Leary a ensuite précisé le mécanisme en pointant le rôle de l'oxygène dans la formation de ces dernières.^[48] Des études plus récentes, datant des années 2000, ^[49-51] ont permis de détailler encore davantage les mécanismes de formation de ces chromophores (Figure 12).

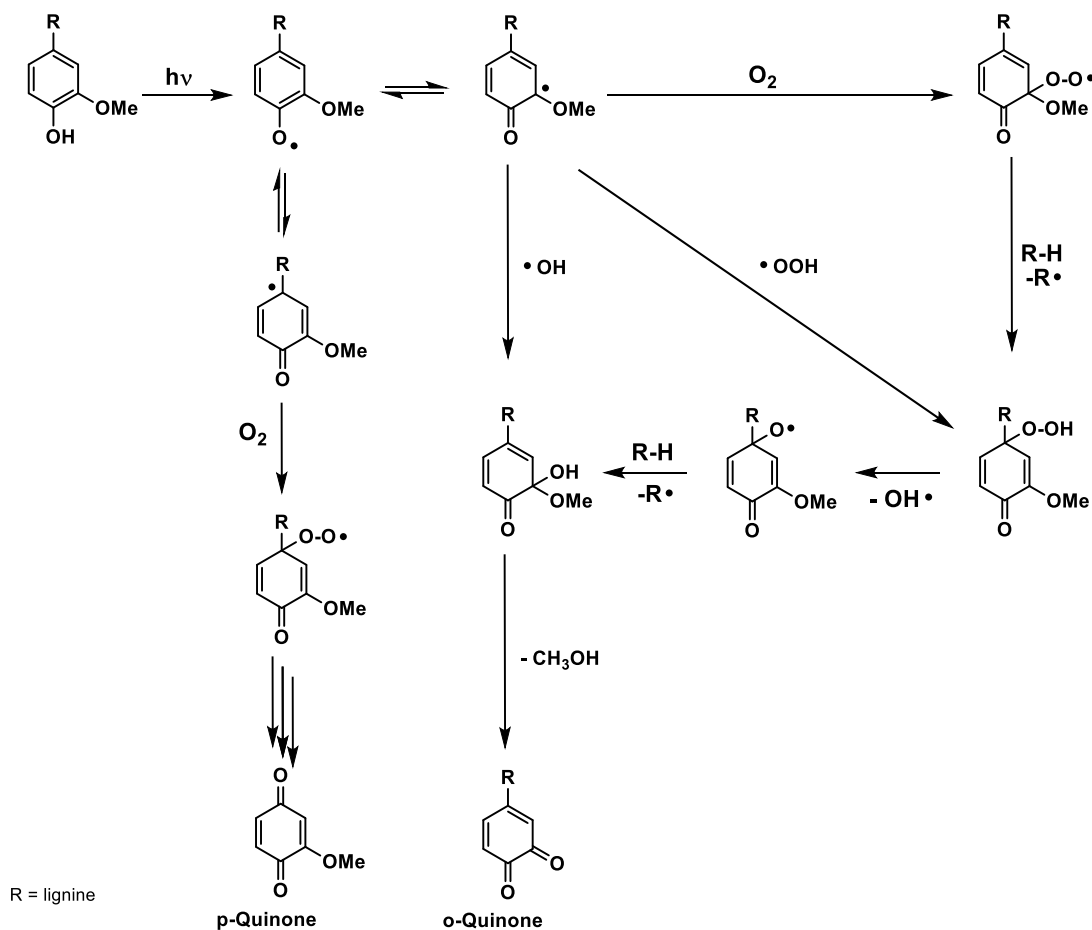


Figure 12 : Formation des p- et o-quinones pendant la photodégradation des lignines.^[49]

Bien que possédant une structure particulièrement résistante, il a été montré au cours de ce chapitre que les lignines peuvent subir des dégradations enzymatiques ou photochimiques. Il est également à noter que le polymère va pouvoir être dégradé sous l'action de différents réactifs chimiques, ces derniers étant employés au cours des processus de délignification industriels présentés par la suite.

II. Extraction des lignines

II.1. Introduction

La délignification du bois est une technique principalement utilisée par l'industrie papetière. En effet, cette dernière a besoin de séparer les fibres de cellulose de la matrice du bois composée des lignines et des hémicelluloses. Pour ce faire, différents procédés chimiques ont été mis au point afin de rompre les liaisons qui unissent ces trois biopolymères.

De nombreux procédés de délignification existent actuellement, ils conduisent généralement à des types de lignines dont les structures et les propriétés diffèrent les unes par rapport aux autres, mais également par rapport à celles des lignines natives. Quatre procédés de délignification sont majoritairement employés, deux d'entre eux, les procédés « Kraft » et « sulfite », utilisent des réactifs soufrés, alors que les deux autres, les procédés « organosolv » et « soda » n'en utilisent pas (Figure 13). Les lignines, une fois isolées, sont généralement dénommées lignines techniques.

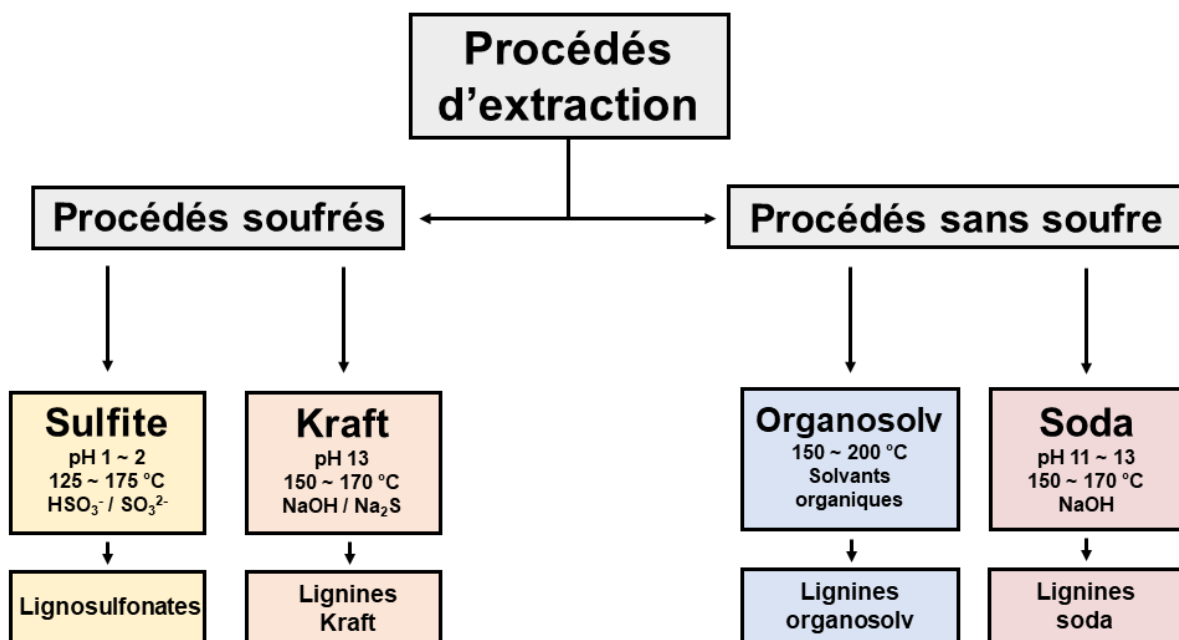


Figure 13 : Schéma des principaux procédés d'extraction des lignines.^[3]

II.2. Le procédé Kraft

Procédé relativement ancien, c'est aujourd'hui le plus utilisé par l'industrie papetière.^[2, 52] Il représente 90% de la production mondiale de lignines, dont l'immense majorité sera utilisée comme combustible. Il est issu de deux brevets déposés entre 1870 et 1871 par Eaton, et a trouvé sa première application en 1879.^[53] Cette technique consiste à traiter des copeaux de bois par une solution de soude (NaOH) et de sulfure de sodium (Na₂S) sous haute pression et à une température généralement comprise entre 150 et 175 °C. Des additifs, tels que l'antraquinone, sont souvent ajoutés pour diminuer la dégradation de la cellulose. Dans ces conditions, les lignines vont se fragmenter essentiellement par rupture des liaisons labiles de type α et β éther. Les liaisons unissant les lignines aux autres polymères du bois vont, elles aussi, être clivées. Les liaisons en α des cycles aromatiques vont être les plus facilement rompues lors de ce processus de délignification. En effet, dans les conditions de pH imposées par la soude en solution, les unités phénoliques des lignines vont être déprotonées. Les groupements phénolates formés vont ensuite pouvoir être convertis en motifs méthyl-quinones par libération d'un intermédiaire alcoolate (Figure 14).

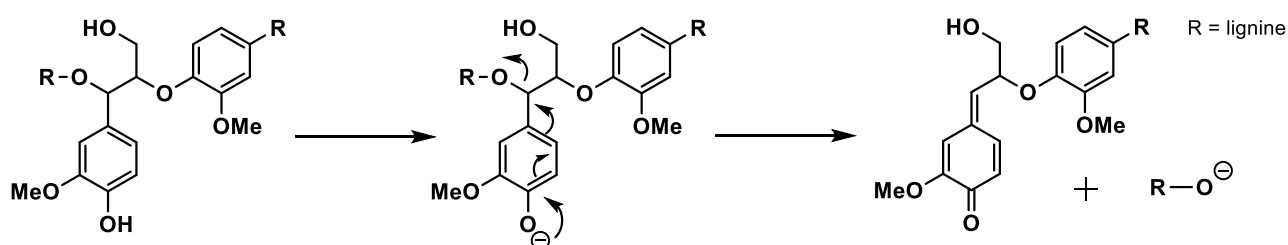


Figure 14 : Clivage des liaisons α -éther lors du procédé Kraft.^[26, 54]

La réaction se poursuit ensuite sous l'action d'ions sulfides ou bisulfides provenant de la décomposition du sulfure de sodium. Ces derniers vont permettre l'addition d'un atome de soufre en position α . Il s'en suivra alors une réaction de substitution nucléophile intramoléculaire qui va induire la rupture des liaisons aryl-éthers et la formation d'intermédiaires de type thiirane. Cet intermédiaire est par la suite converti en structure p-hydroxystyrène par élimination de soufre élémentaire (Figure 15).^[26] Il est à noter que ces différentes ruptures de liaisons vont faire apparaître à la surface des lignines de nouvelles

fonctions phénolate, qui vont augmenter la solubilité du polymère dans le milieu réactionnel basique.^[55]

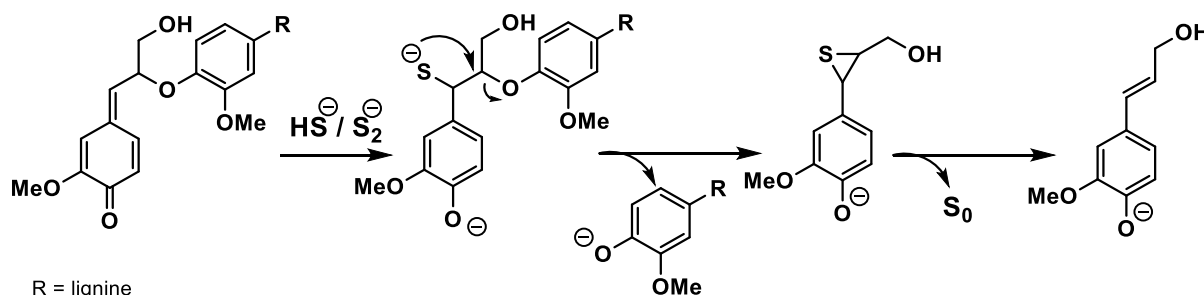


Figure 15 : Clivage des liaisons β-aryléther lors du procédé Kraft.^[26, 54]

Ces conditions, bien que relativement dures, ne permettent de cliver qu'une très faible quantité de liaisons carbone-carbone des lignines. Différents produits de réarrangement vont cependant pouvoir se former, comme, par exemple, des motifs résultant de la condensation de quinones (Figure 16).

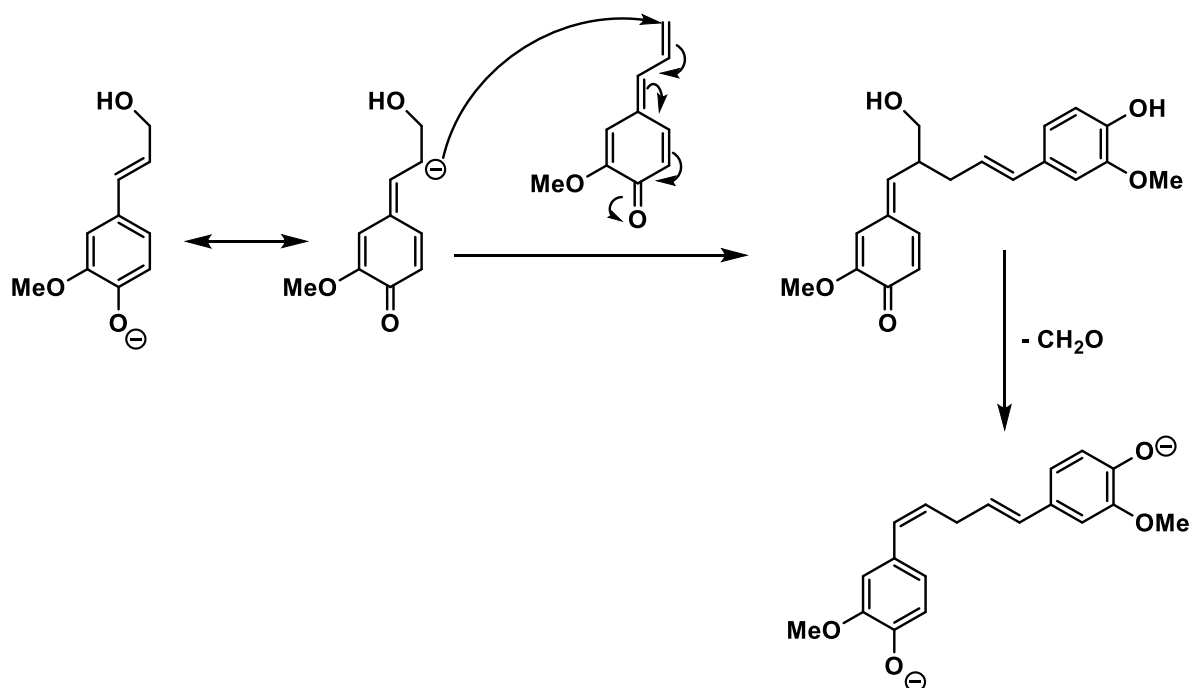


Figure 16 : Condensation de motifs quinone au cours du procédé Kraft.^[54]

Après plusieurs heures de traitement, deux phases sont obtenues : une phase solide composée de cellulose et une phase liquide, appelée liqueur noire, composée des autres constituants du bois en solution. L'acidification de cette phase permet d'en extraire les

lignines par précipitation. Cette étape est le plus souvent réalisée par ajout progressif d'un acide fort tel que l'acide sulfurique. Une technologie alternative, plus respectueuse de l'environnement, a récemment été développée. Cette dernière, nommée LignoBoost, permet de remplacer l'acide fort par du CO₂ pour précipiter les lignines.^[56, 57] L'ultrafiltration peut aussi être employée pour isoler les lignines de la liqueur noire. Après séchage, des lignines insolubles dans l'eau et de poids moléculaires inférieurs à ceux des lignines natives sont obtenues.^[54] Ces lignines vont par ailleurs présenter un taux de soufre supérieur à celui des lignines natives, car des groupements thiol vont pouvoir se former lors de la délignification.

II.3. Le procédé sulfite

Sur les 55 à 70 millions de tonnes de lignines produites par an, environ 1000 d'entre elles le sont par le procédé sulfite.^[58] Il consiste à mettre la pulpe de bois en présence d'acide sulfureux et/ou de ses sels alcalins qui peuvent être des sulfites ou des bisulfites de sodium, de calcium, de magnésium ou d'ammonium. Les lignines ainsi obtenues seront, par conséquent, dénommées lignosulfonates de sodium, de calcium, de magnésium ou d'ammonium en fonction du cation utilisé. La délignification s'opère à des températures généralement comprises entre 125 et 175 °C pendant 3 à 7 h. Les procédés au sulfite acide sont les plus utilisés industriellement dans le but de faciliter la précipitation des lignines.^[3] Les conditions opératoires les plus couramment utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2: Conditions opératoires de différents procédés sulfites.^[2]

Procédé	Réactif(s)	pH	Température (°C)
Au sulfite acide	SO ₂ /HSO ₃ ⁻	1 – 2	125 – 145
Au bisulfite	HSO ₃ ⁻	3 – 4	150 – 175
Au sulfite neutre	HSO ₃ ⁻ /SO ₃ ²⁻	6 – 7	150 – 175
Au sulfite alcalin	Na ₂ SO ₃	9 – 13	50 – 175

Cette méthode de délignification, comme le procédé Kraft, va principalement induire une fragmentation du biopolymère par clivage des liaisons aryl-éthers et la condensation de certains fragments formés.^[59] Au cours du traitement, une sulfonation du polymère, essentiellement sur le carbone α , est aussi observée, ce qui explique la forte teneur en soufre de ces lignines. En effet, en moyenne, les lignines obtenues possèdent de 0,4 à 0,5 groupement sulfonate par unité phénylpropanol, soit environ 5% en masse.^[60] En fin de réaction, les lignines sont généralement extraites de la liqueur noire par ultrafiltration. Une précipitation préalable par ajout d'acide est nécessaire quand des conditions d'extraction basiques sont utilisées. Les délignifications aux sulfites sont moins agressives que le procédé Kraft, rendant les lignines obtenues plus proches des lignines natives en matière de masse molaire. Cependant, elles contiennent un taux de sucres résiduels relativement important.^[61, 62]

La présence de groupements SO₃⁻ à leur surface va non seulement leur conférer un comportement hydrosoluble, mais également des propriétés émulsifiantes. Ces propriétés expliquent que, de toutes les sources de lignines, les lignosulfonates sont celles qui sont les plus largement valorisées chimiquement, notamment comme additif dans l'industrie.^[2] En effet, elles sont capables de stabiliser des émulsions liquides,^[63] et leur incorporation comme liants à des matériaux tels que des plastiques, des céramiques ou des bétons, va également permettre d'améliorer les propriétés de ces composés. Les lignosulfonates peuvent

également agir comme agent dispersant en prévenant l'agrégation de particules non dissoutes dans une suspension, réduisant ainsi la quantité de solvants nécessaire. Il a, par exemple, été montré que des lignosulfonates d'ammonium issues de pin des Landes permettent une dispersion efficace de particules d'alumine lors de la synthèse de céramiques.^[64] Ajoutés aux ciments, ces polymères vont également pouvoir jouer le rôle de retardateur de prise en limitant la disponibilité des ions calcium. Le temps de prise du matériau va ainsi pouvoir être contrôlé par la quantité de lignosulfonates ajoutée.^[65]

Les lignosulfonates sont aussi de bons agents séquestrant pour différents ions métalliques tels que le cuivre, le zinc, le fer ou encore l'aluminium. Cette capacité leur permet d'être employées non seulement pour l'extraction de métaux lourds de sols ou d'effluents contaminés, mais également pour amener des minéraux dans un sol qui en est déficitaire^[66] Enfin, elles peuvent aussi être utilisées pour fixer des particules nocives, telles que les poussières issues de chantier de construction ou encore comme agent déshydratant.^[2]

II.4. Le procédé soda

Ce procédé représente 5% de la production mondiale de lignines.^[67] Il est utilisé sur des sources de biomasse provenant de déchets agricoles comme la bagasse ou la paille, ainsi que sur des plantes annuelles cultivées pour leurs fibres comme le coton ou le chanvre.

Cette biomasse, faiblement lignifiée, est constituée de 10 à 15% de lignine. Sa délignification ne nécessite pas l'utilisation de réactifs soufrés. Les fibres sont uniquement mises en présence d'une solution de soude, ainsi que d'une quantité catalytique d'antraquinone afin de stabiliser les carbohydrates et d'augmenter la solubilité des lignines. Comme les deux procédés précédemment présentés, cette méthode va séparer les lignines des fibres en s'attaquant principalement aux liaisons aryl-éther. Par contre, les phénomènes de recombinaison des produits formés seront minimisés.^[68] Les lignines sont ensuite précipitées par différentes étapes incluant une acidification du milieu, un chauffage et des filtrations.^[69]

Les lignines ainsi extraites vont présenter un taux de pureté supérieur à celui des procédés soufrés, avec notamment un taux de sucres résiduels plus faible. Leurs masses molaires moyennes seront en revanche plus faibles que celles des lignines Kraft ou des lignosulfonates, cela étant principalement lié à leur origine biologique et non au procédé soda en lui-même.^[62]

Il est aussi noté que ces lignines vont présenter un taux de fonction acide carboxylique relativement élevé.^[59]

II.5. Le procédé organosolv

Le terme organosolv désigne les procédés de délignification dont le principe est d'extraire la lignine de la biomasse, généralement de copeaux de bois, par une solution composée d'un solvant organique et d'une phase aqueuse acide ou basique dans des conditions de pression et de températures élevées (180 – 200 °C). Les huit procédés organosolv principaux sont listés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Liste des principaux procédés d'extraction organosolv, d'après Calvo-Flores *et al.*^[2]

Solvant	Type de lignine obtenue
Éthanol/Eau	Alcell
Acide acétique/Eau	Alcetocell
Acide acétique/HCl	Acetosolv
Sulfite alcalin/Anthraquinone/Méthanol	ASAM
Phénol/HCl/Eau	Batelle
Acide acétique/Acide formique/Eau	Formacell
Acide formique/Peroxyde d'hydrogène	Milox
Méthanol/NaOH/Anthraquinone	Organocell

Qu'elle se fasse dans des conditions acides ou alcalines, l'extraction repose sur le clivage des liaisons éther en α ou en β des cycles aromatiques des unités phénylpropanol. Des processus de condensation impliquant des carbocations ou des motifs méthyl-quinones vont être également observés en fonction des conditions utilisées. Les lignines sont ensuite obtenues par précipitation.

Cette technique n'est quasiment pas utilisée par l'industrie papetière, cependant elle reçoit un intérêt croissant de la part des bioraffineries du fait de ses performances environnementales.^[27] De plus, les lignines obtenues par ces différents procédés sont souvent dépourvues de soufre, ce qui en fait de bonnes candidates en tant que matière première pour l'industrie.^[70]

Le procédé organosolv le plus utilisé est le procédé dit Alcell (Figure 17), qui utilise un mélange d'eau et d'éthanol pour extraire les lignines des copeaux de bois par une série d'extractions à 28 bar et à 190 °C.^[71]

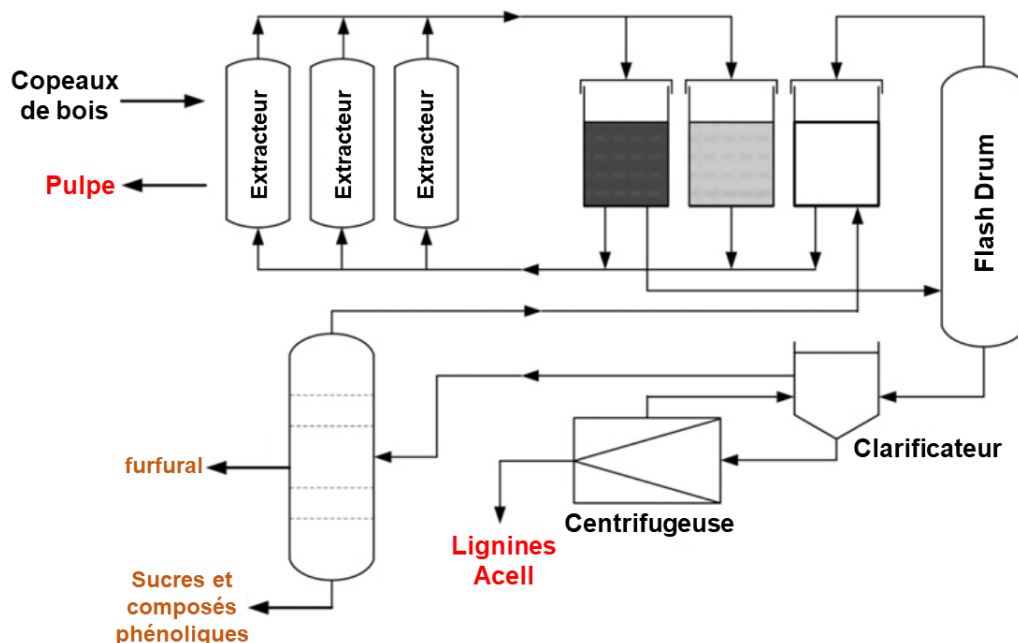


Figure 17 : Schéma simplifié du procédé Alcell.^[27]

Bien que cette technique n'utilise pas d'acides minéraux, le pH de la solution d'extraction se situe autour de 4 du fait de la libération d'acides organiques par les hémicelluloses. La liqueur ainsi obtenue est envoyée vers un séparateur liquide/vapeur (« Flash drum ») où une partie de l'éthanol est évaporée pour être réutilisée sur la chaîne d'extraction. Les lignines sont enfin

récupérées par décantation dans un clarificateur, puis centrifugation. La phase liquide restante est par la suite distillée pour recycler les solvants et en extraire les extractibles valorisables tels que du furfural, des sucres et d'autres composés phénoliques.^[27]

II.6. Autres techniques de délignification

En plus des quatre techniques précédemment décrites et majoritairement utilisées, d'autres méthodes d'extraction des lignines, plus marginales, sont également décrites dans la littérature, comme, par exemple, l'explosion de la biomasse à la vapeur ou sa pyrolyse.

II.6.1. L'explosion à la vapeur

La technique dite de l'explosion à la vapeur est également une méthode de délignification. Le bois est traité à la vapeur (180 – 230 °C) dans des conditions de pression élevées (14 à 25 bar).¹⁶ Ce traitement est suivi d'une décompression rapide, ce qui va induire une hydrolyse partielle de la lignine. Cette technique permet d'obtenir une lignine insoluble et de faible poids moléculaire. Le procédé est souvent couplé avec une hydrolyse enzymatique en vue de produire des sucres destinés à être fermentés pour produire du bioéthanol.¹⁷

II.6.2. Lignines pyrolytiques

Enfin, la pyrolyse de la biomasse permet également d'en extraire les lignines. Durant leur décomposition thermique en l'absence d'oxygène, les matériaux lignocellulosiques vont conduire à la formation de charbon, de gaz et d'une phase liquide appelée huile pyrolytique. Il est possible d'extraire les lignines présentes dans cette dernière. Le plus souvent, cette extraction est réalisée en vue d'améliorer la stabilité de l'huile.^[72] Les lignines ainsi extraites ont subi d'importantes dégradations lors de la pyrolyse. En effet, toutes les liaisons éthers sont rompues et de nombreux réarrangements se sont produits conduisant à un polymère de faible masse molaire, caractérisé par un nombre moyen d'unités monomériques inférieur à 9. Ces lignines vont, par ailleurs, présenter une forte teneur en carbone, leur conférant un pouvoir calorifique intéressant. Leur valorisation sera donc essentiellement énergétique.^[73]

Comme cela vient d'être présenté, les différents procédés de délignification employés vont conduire à des lignines techniques sensiblement différentes. Il apparaît donc nécessaire de connaître précisément la structure et les propriétés de chacune d'entre elles, ce qui est l'objet du chapitre suivant.

III. Caractérisation et propriétés des lignines techniques

III.1. Caractérisation des lignines techniques

L'origine biologique des lignines va influencer leurs structures. En effet, le caractère aléatoire de leur polymérisation et la proportion variable des monolignols en fonction de l'espèce vont, conduire à une grande diversité de liaisons entre les unités phénylpropanol. Les méthodes d'extraction vont également sensiblement impacter la structure et la composition du polymère, que ce soit par les ruptures de liaisons qu'elles vont provoquer ou par les différents contaminants qu'elles vont apporter. Évidemment, une valorisation industrielle des lignines nécessite de connaître le plus précisément possible leurs structures et leurs compositions ainsi que l'impact de la méthode d'isolation sur ces dernières. Ainsi, une stratégie de valorisation la plus efficace possible pour chaque source de lignine pourra être mise en place. Cette partie présentera les principales méthodes d'analyse dont disposent les communautés scientifique et industrielle pour caractériser les lignines.

III.1.1. Analyse générale de la composition des lignines

L'analyse générale de la composition des lignines a pour objectif d'identifier et de quantifier les différentes impuretés présentes dans le matériau. Pour ce faire, le taux d'humidité et les taux de contaminants organiques ou inorganiques sont mesurés par différentes méthodes.

III.1.1.1. Taux de cendres

Le taux de cendres est un des indicateurs de la pureté des lignines le plus simple à obtenir. Le polymère, après séchage, est simplement calciné à 525 °C, puis les cendres restantes sont pesées.^[74] Du fait de l'association d'un cation pour chaque fonction sulfonates, les lignines de type lignosulfonates sont celles décrites dans la littérature comme présentant la fraction minérale la plus importante, et, par conséquent, un taux de cendres élevé.^[61, 62] Lors du procédé Kraft, des sels (Na_2SO_4 , NaCl , etc.) vont se former lors de la neutralisation de la solution d'extraction, ceci expliquant que les lignines extraites par cette méthode présentent également des quantités de cendres relativement élevées. Il est également observé que les

lignines issues de plantes annuelles contiennent un taux de minéraux supérieur à celui de celles issues de bois.^[75] Enfin, la très faible quantité de réactifs inorganiques nécessaire aux procédés organosolv va expliquer que les lignines issues de ces derniers seront celles présentant le moins de contamination minérale. Le dosage de ces différents éléments chimiques minéraux présents dans les cendres est également une donnée intéressante pour l'industrie. En effet, la présence de certains métaux, absorbés par la plante au cours de sa vie ou apportés par les réactifs de délignification, peuvent nuire à d'éventuels processus ultérieurs de valorisation catalytique des lignines (cf. Chapitre IV).^[76]

III.1.1.2. Taux de lignine total

Le taux de lignine total est déterminé selon le protocole NERL/TP-510-42618.^[77] Selon ce dernier, les lignines sont, tout d'abord, mises en présence d'une solution d'acide sulfurique à 72% pendant 1 heure à 30 °C, puis la concentration en acide est ramenée à 4% par l'ajout d'eau et l'ensemble est porté à 121 °C pendant une heure supplémentaire. Deux phases vont résulter de cette hydrolyse, une phase solide, nommée lignine Klason ou lignines insolubles dans l'acide (AIL), et une phase liquide, qui contiendra les lignines dites solubles dans l'acide (ASL) et des impuretés, principalement des sucres.

Le taux de lignine Klason est déterminé de la façon suivante. Pour commencer, la fraction solide résultant de l'hydrolyse est calcinée à 525 °C afin de déterminer la masse de cendres présente dans ce résidu (M_c). Puis, le taux de lignine Klason est exprimé comme un pourcentage massique de la lignine de départ suivant l'équation 1.

$$AIL = \frac{\text{Masse du résidu solide} - M_c}{\text{Masse de lignine de départ}} \times 100$$

Équation 1 : détermination de la quantité de lignines insolubles dans l'acide.^[77]

La quantité de lignine soluble est déterminée en mesurant l'absorbance de la fraction liquide, à une longueur d'onde donnée par le protocole NERL/TP-510-42618 pour chaque type de lignine. Les coefficients d'absorption massique correspondants sont aussi donnés dans ce protocole. Ce taux de lignine soluble est également exprimé comme un pourcentage de la masse de lignine de départ (Équation 2).

$$ASL = \frac{Abs \times V \times K}{\varepsilon \times m_l \times l} \times 100$$

Avec :

- Abs : absorbance de la solution, à la longueur d'onde λ de travail préconisée par le protocole NERL/TP-510-42618 pour le type de lignines étudiées ;
- V : volume de la fraction liquide (L) ;
- K : facteur de dilution ;
- ε : coefficient d'extinction massique des lignines considérées à la longueur d'onde λ . ($L.g^{-1}.cm^{-1}$) ;
- ml : masse de lignine de départ (g) ;
- l : longueur de la cellule UV-Visible (cm).

Équation 2 : détermination de la quantité de lignines insolubles dans l'acide.^[77]

L'addition de ces deux fractions de lignines, solubles (ASL) et insolubles (AIL), correspond au taux de lignine total, valeur qui reflétera la pureté des lignines. Les lignines organosolv sont communément celles qui présentent le plus fort taux de lignine total. Il est à noter que le taux de lignine Klason ne peut pas être déterminé pour les lignosulfonates, car ces dernières sont complètement hydrosolubles. Cependant, leur taux de lignine total peut l'être par dosage en spectrophotométrie UV-Visible.^[78]

III.1.1.3. Taux de sucres résiduels

La quantité de sucres encore présents dans les lignines après extraction peut être déterminée à partir de la fraction liquide résultant de l'hydrolyse décrite précédemment. Cinq sucres (l'arabinose, le galactose, le glucose, le mannose et le xylose) y sont dosés, le plus souvent par chromatographie liquide ou gazeuse.^[79] L'analyse générale de la composition de lignines issues des trois principaux procédés d'extraction est présentée, à titre d'exemple, dans le tableau ci-après (Tableau 4).

Tableau 4 : Composition de trois lignines techniques selon Constant et al.^[75]

Procédés extraction / Nom de la lignine	Taux de cendres (%)	AIL (%)	ASL (%)	Taux de lignine total (%)	Taux de sucres (%)
Lignine soda / « P1000 »	2,5	85,1	5,4	90,5	2,4
Lignine Kraft / « Indulin »	2,6	90,3	1,9	92,2	1,4
Lignine Organosolv / « Acell »	0,1	94,3	1,9	96,2	0,2

Ces oses, simples ou polymérisés, sont présents dans le polymère après extraction, soit parce qu'ils ont été piégés au sein de ce dernier lors de la phase de précipitation acide, soit parce qu'ils y sont encore liés de façon covalente. Leur taux varie en fonction du mode d'extraction employé pour obtenir les lignines. En effet, les lignines issues de procédés alcalins et particulièrement les lignines soda contiennent plus de sucres résiduels que les lignines organosolv. Ces données montrent que ces méthodes alcalines vont avoir plus de difficultés à cliver les liaisons polysaccharides-lignines que les procédés organosolv. Comme pour les métaux, il est intéressant de connaître la quantité de sucres résiduels, il a en effet été montré que ces derniers peuvent inhiber l'hydrodésoxygénation catalytique des lignines.^[80]

III.1.1.4. Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire permet d'avoir accès aux pourcentages massiques de carbone, d'hydrogène, d'azote, de soufre et d'oxygène des lignines. Ces données permettent ensuite de déterminer une formule brute stœchiométrique, dénommée formule empirique. Généralement, la stœchiométrie du carbone est arbitrairement fixée à 9 pour mieux refléter la composition de chaque unité monomérique phénylpropanol, le terme de formule C₉ est alors employé. La quantité de fonction méthoxy, déterminée expérimentalement (cf. paragraphe III.1.2.3), est aussi souvent intégrée à cette formule. Un exemple des différentes formules d'une lignine Kraft est présenté dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Composition élémentaire et formules brutes d'une lignine Kraft de résineux d'après Sameni *et al.*^[81]

Composition élémentaire	C (%)	66,1
	H (%)	6,4
	N (%)	0,7
	S (%)	1,6
	O (%)	25,3
Formule empirique		$C_{5,51}H_{6,37}N_{0,05}O_{1,58}S_{0,05}$
Formule C9		$C_9H_{10,3}N_{0,08}O_{2,6}S_{0,08}$
MeO (%)		17,4
Formule C9 étendue		$C_9H_{8,53}N_{0,08}O_{1,85}S_{0,08}(OCH_3)_{1,02}$

Ces formules vont principalement permettre la comparaison de la composition élémentaire de différentes sources de lignines entre elles et, en particulier, d'évaluer et de comparer les quantités de soufre restantes dans le polymère après son extraction, cet élément pouvant prohiber l'emploi futur de certains catalyseurs.^[82] Les taux de soufre les plus importants sont bien évidemment observés dans le cas des lignosulfonates. Toutefois, les lignines extraites par un procédé Kraft présentent également des taux de soufre relativement importants. En effet, non seulement du soufre élémentaire ou des sels de soufre peuvent rester piégés au sein du polymère, mais des fonctions thiols peuvent également y persister après l'extraction. Dans les lignines extraites par le procédé Soda, les sels formés lors de la phase de neutralisation, si cette dernière est par exemple effectuée à l'acide sulfurique, peuvent amener une quantité

non négligeable de soufre dans le polymère. Il en est aussi décelé, en quantité plus faible, dans les lignines organosolv lorsque cet acide est utilisé comme catalyseur.

III.1.2. Structure des lignines

L'élucidation des structures des lignines a grandement été facilitée ces dernières décennies par l'utilisation de deux principales méthodes d'analyse : la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrographie de masse (GC-MS), et la résonance magnétique nucléaire (RMN). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a également largement été utilisée en complément de ces deux techniques.^[83, 84]

III.1.2.1. Analyse structurale des lignines par GC-MS

Lorsque les lignines sont pyrolysées, lors de leur introduction dans l'injecteur de l'appareil, les différents liens unissant le polymère se clivent libérant ainsi différents fragments caractéristiques des trois unités phénylpropanol. L'analyse des fragments issus de cette pyrolyse par GC-MS permet ainsi de remonter à la composition en monolignols et par extension à l'origine botanique des lignines. Cette technique d'analyse a largement été décrite dans la littérature, preuve de l'intérêt qu'elle suscite.^[85-87] Il a en effet été montré que cette technique d'analyse était une méthode fiable particulièrement adaptée à la détermination du ratio syringyle / guaïacyle, et une bonne alternative aux méthodes plus anciennes de dosages chimiques des lignines.^[84] Certains contaminants des lignines vont également pouvoir être détectés lors de cette analyse. C'est par exemple le cas des sucres résiduels. En effet, lors de la pyrolyse, ces derniers vont être convertis en furfural qui sera détecté en GC-MS. La présence d'acides gras résiduels va également pouvoir être détectée. Constant *et al.* ont observé ce type de composés aussi bien dans des lignines soda qu'organosolv, ce qui prouve que ces molécules, naturellement présentes dans la plante, résistent aux différentes méthodes d'extraction des lignines.^[75]

III.1.2.2. Analyse structurale des lignines par IRTF

Du fait de sa simplicité de mise en œuvre, la spectroscopie infrarouge est souvent utilisée pour caractériser des lignines. En effet, cette technique ne requiert pas la dissolution du matériau

et peut s'appliquer sur de très petites quantités de produit. Le Tableau 6 résume les principales bandes d'absorption infrarouges caractéristiques des lignines.

Tableau 6 : Valeur des bandes d'absorption en spectroscopie IRTF des lignines.^[88]

Bande d'absorption	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
Élongation des liaisons O-H	3450 ~ 3400
Élongation des liaisons C-H	2940 ~ 2820
Élongation des liaisons C=O non conjuguées	1715 ~ 1710
Élongation des liaisons C=O conjuguées	1675 ~ 1660
Vibration des noyaux aromatiques	1605 ~ 1600 1605 ~ 1600 1430 ~ 1425
Déformations asymétriques des liaisons C-H	1470 ~ 1460
Déformations symétriques des liaisons C-H	1370 ~ 1365
Déformation des unités syringyle	1330 ~ 1325
Déformation des unités guaiacyle	1270 ~ 1275
Déformation des liaisons C-H et C-O	1085 ~ 1030

III.1.2.3. Analyse structurale des lignines par RMN

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

La RMN 2D HSQC a apporté de nombreuses précisions sur les différents types de liaisons qui unissent les unités aromatiques. Une librairie des motifs présents dans les lignines est maintenant disponible.^[89] Cette technologie s'est avérée particulièrement efficace pour identifier les différentes unités aromatiques composant le polymère.^[85, 90] Elle est par contre techniquement limitée pour quantifier ces différents motifs. En effet, ce type d'analyse requiert des ratios signal sur bruit que ne permettent pas les appareils actuels. Le développement de séquences de pulses spécifiques destinées à quantifier les monomères syringyle et guaiacyl est cependant à noter.^[90, 91]

La RMN du proton est également utilisée seule pour l'analyse des lignines et peut permettre la quantification de la quantité de groupements méthoxy présents dans le polymère.^[92] Toutefois, cette méthode requiert l'acétylation préalable du matériau.

La RMN du phosphore est, quant à elle, une méthode de choix pour déterminer la quantité de fonctions alcool, phénol et acide carboxylique présentes dans les lignines.

Ce type de dosage nécessite la fonctionnalisation préalable des lignines par un réactif portant un atome de phosphore, le plus souvent du 2-chloro-4,4',5,5'-tetraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane (TMDP), et l'introduction d'un étalon interne dans le milieu pour quantifier les différentes fonctions (Figure 18). Cet étalon possède un groupe hydroxyle libre qui réagira également avec le TMDP. Le cyclohexanol et le cholestérol ont largement été utilisés à ces fins.^[93, 94] Il a cependant été montré récemment que ces derniers pouvaient conduire à une sous-estimation de la quantité de fonctions réellement présentes. L'utilisation du N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide est donc préconisée.^[95] De façon générale, cette méthode, bien que particulièrement efficace, reste donc à optimiser et à standardiser.^[96, 97]

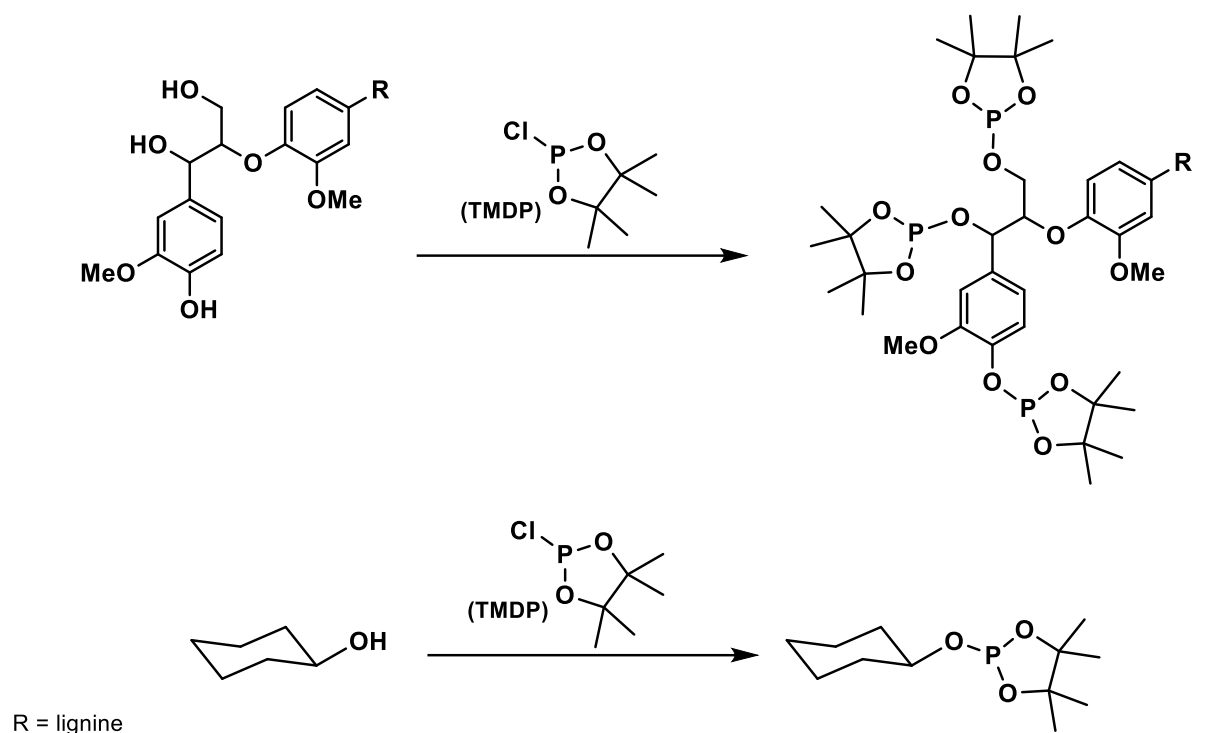


Figure 18 : Réaction du TMDP sur les lignines et sur le cyclohexanol.

Les fonctions alcool et phénol, ainsi que les fonctions acides carboxyliques du polymère, une fois fonctionnalisées par le TMDP, présentent des déplacements chimiques différents en RMN ^{31}P permettant ainsi de les différencier les uns des autres et de les quantifier par rapport à l'étalon interne. Cette méthode permet par ailleurs d'identifier quatre types de groupements phénoliques : les unités para-hydroxyphénoliques, guaiacyle, syringyle et phénoliques condensées (Figure 19).^[93, 98, 99] Ces deux dernières unités sont souvent regroupées sous le terme d'unités phénoliques condensées. En effet, il est, dans les faits, difficile de les différencier sans l'aide de la RMN 2D.^[75, 95]

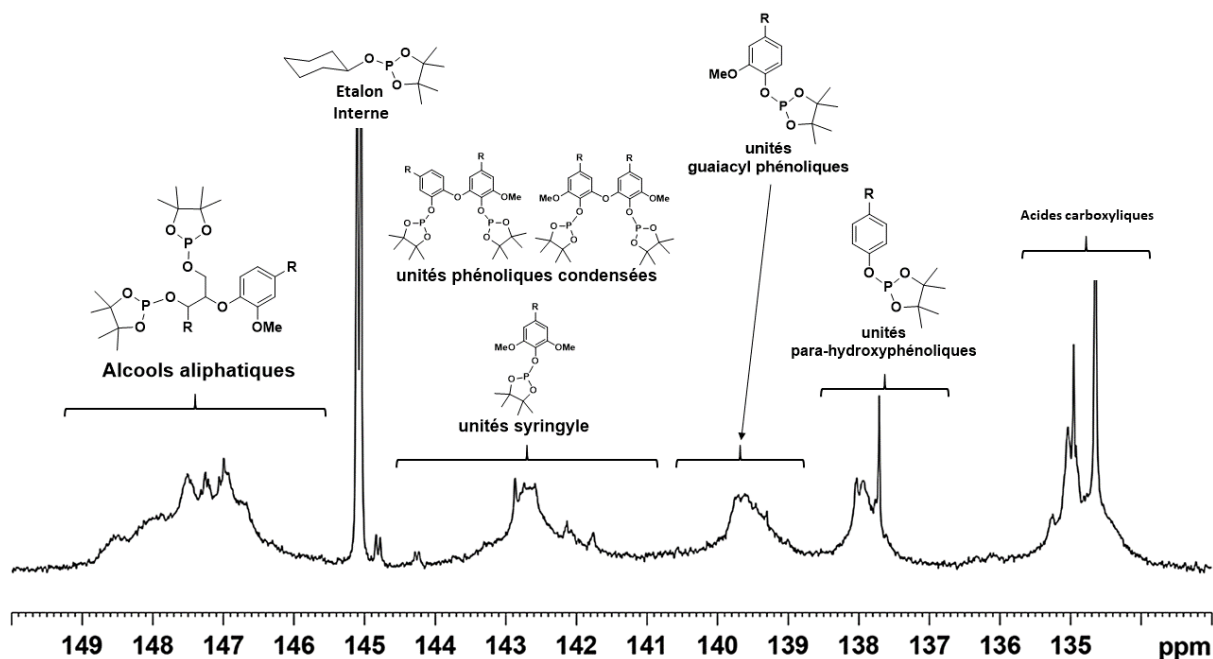


Figure 19 : Localisation des différentes fonctions présentes dans les lignines après réaction avec le TMDP sur le spectre RMN ^{31}P , d'après Yang *et al.*^[100] (R = lignine)

III.1.3. Masse molaire

Comme déjà précisé, la structure des lignines va être largement affectée par le mode d'extraction utilisé pour l'obtenir et, par conséquent, leurs masses molaires vont pouvoir varier de 1000 à 20 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Il est donc primordial de connaître cette caractéristique, en particulier pour une application dans le champ des polymères. Les masses molaires moyennes en nombre et en masse ainsi que la polydispersité sont couramment déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Cependant, les résultats obtenus dépendent fortement de la configuration expérimentale utilisée, ainsi que des méthodes d'étalonnage et des modes de calcul appliqués.^[101, 102] Les valeurs obtenues doivent donc être traitées avec la plus grande précaution et n'être utilisées que pour comparer des masses obtenues par la même technique. Même si une standardisation des méthodes apparaît donc comme nécessaire, certains systèmes chromatographiques courants sont identifiés. Ils sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7). Il est à noter que les systèmes utilisant du THF comme phase mobile vont, dans la plupart des cas, nécessiter une acétylation préalable des lignines afin de les rendre solubles dans le solvant.

Tableau 7 : Systèmes chromatographiques couramment utilisés pour déterminer la masse molaire des lignines.^[101]

Lignine étudiée	Colonne	Éluant	Débit (mL.min ⁻¹)	Standard de calibration
Lignosulfonates, Kraft, soda et organosolv	Toyopearl HW-55, TOSHO	NaOH 0,5 mol.L ⁻¹	1	Polystyrènes-sulfonates
Lignosulfonates, Kraft, soda et organosolv	PSS MCX 1000, mixed bed, 10 µm	NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	0,8	Polystyrènes-sulfonates
Kraft, soda et organosolv	PL Gel, Polymer Laboratories, mixed bed 5 µm	THF	1	Polystyrènes
Kraft, soda et organosolv	Phenomenex Phenogel, Linear, 5 µm	THF	1	Polystyrènes
Kraft, soda et organosolv	PSS 5µm	THF	1	Polystyrènes
Kraft, soda et organosolv	Styragel, Waters, 5 µm	THF	1	Polystyrènes
Kraft, soda et organosolv	GRAM, PSS, 10 µm	DMSO / H ₂ O, LiBr	0,4	Pullulane
Kraft, soda et organosolv	PFG-PRO, PSS, 10 µm	DMAc / LiCl	0,5	Polyéthylène glycol

III.1.4. Caractérisation des espèces radicalaires des lignines

Comme cela a été présenté dans le premier chapitre, les mécanismes de formation et de dégradation des lignines vont faire intervenir une grande variété d'intermédiaires radicalaires. Un certain nombre d'entre eux vont pouvoir persister dans le polymère, influençant de fait sa réactivité. Il est donc primordial de pouvoir caractériser et quantifier ces différentes espèces. La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) est pour cela l'outil le plus adapté. Cette technologie se base sur la propriété qu'ont les électrons non appariés à absorber, l'énergie d'un rayonnement électromagnétique lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Elle est donc toute indiquée pour la détection d'espèces radicalaires. Une de ses premières utilisations sur les lignines a été rapportée par Rex en 1960.^[47] Ce dernier

s'en est servi pour démontrer le caractère radicalaire des mécanismes de photo-oxydation des matériaux lignocellulosiques, présenté dans la partie 1.4.2. Steelink a par la suite montré que toutes les lignines, y compris les lignines natives, présentent un comportement radicalaire (Tableau 8).^[103]

Tableau 8 : Concentration en espèces radicalaire de différentes sources de lignines d'après les travaux de Steelink *et al.*

Source de lignine	Quantité de spin (spin.g ⁻¹) ^a	Quantité de spin calculé (spin.mol ⁻¹) ^b
Lignines d'épicéa natives (extraites par la méthode de Brauns^[104])	0,5.10 ¹⁷	5,0.10 ¹⁹
Lignine Klason d'épicéa	0,4.10 ¹⁷	1,5.10 ²⁰
Lignine Kraft de « Yellow pine »	0,5.10 ¹⁷	1,5.10 ²¹
Lignosulfonate de calcium	1,5.10 ¹⁷	3,0.10 ²¹

^a : Quantité estimée en prenant comme référence le diphénylpicrylhydrazyle solide.

^b : Valeurs calculées par les auteurs en utilisant des masses molaires déterminées par Brauns *et al.*^[105]

La détection directe des radicaux par RPE trouve cependant ses limites dans le cas des lignines. En effet, nombre des intermédiaires radicalaires vont avoir des temps de vie courts, ce qui va rendre difficile leur détection et/ou leur quantification. Afin de pallier ce problème, des composés, appelés piègeurs de radicaux, sont généralement introduits avec les lignines. Ces derniers vont réagir avec les radicaux d'intérêt afin de prolonger la durée de vie des structures radicalaires à analyser. Les plus utilisés vont souvent présenter une fonction nitroxyle tels que le 5-(diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DEPMPO). Ce groupement va induire la relative stabilité (45 minutes environ) de l'adduit nouvellement formé, grâce à la délocalisation électronique sur la liaison N-O et permettre la détection de signaux RPE en fonction du type d'adduit radicalaire formé (Figure 20). Cette méthode d'analyse a ainsi permis de montrer qu'environ 58% des radicaux formés lors de la photodégradation du bois

étaient centrés sur le carbone. Les radicaux hydroxyle et hydroperoxyde représentant respectivement 35% et 6% des espèces radicalaires détectées.^[106]

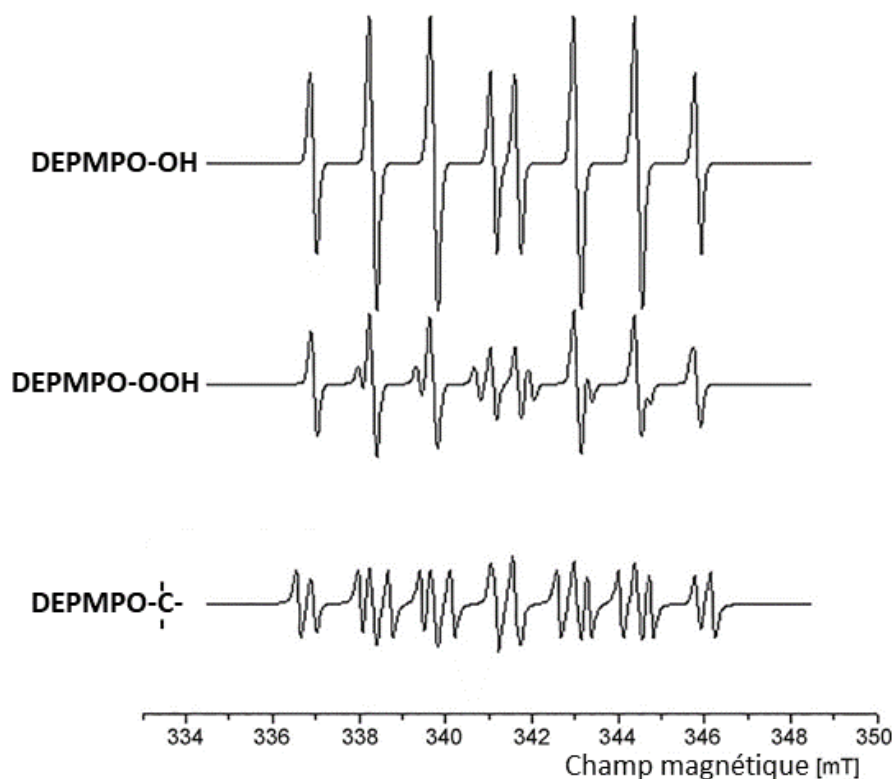


Figure 20 : Signaux RPE de différents adduits résultant du coupage entre un radical des lignines et le DEPMPO.^[29]

Par ailleurs, l'utilisation de piègeurs de radicaux phosphorés a un autre avantage. En effet, les adduits qu'ils forment avec des radicaux issus des lignines peuvent être détectés, et pour certains quantifiés, en RMN du phosphore. Il a par exemple été rapporté l'utilisation prometteuse du 5-(diisopropoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DIPPMPO) (Figure 21). Ce composé, qui a pour l'instant uniquement été utilisé sur des molécules modèles de lignine, s'avère très prometteur pour l'étude du biopolymère.^[29, 107, 108]

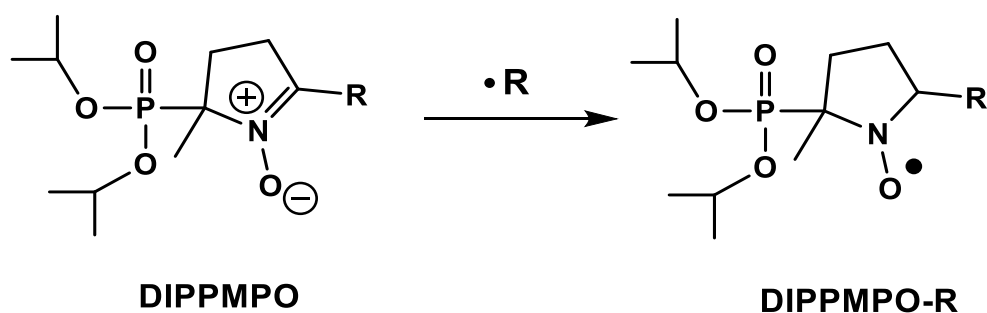


Figure 21 : Réaction d'un radical sur le DIPPMPPO.

III.2. Propriétés des lignines techniques

La variété des fonctions chimiques présentes sur les lignines va leur conférer, en plus de leurs caractéristiques chimiques, différentes propriétés biologiques. La principale et de fait, la plus décrite, est leur pouvoir antioxydant. Le nombre de publications relatives à cette propriété a rapidement augmenté ces dix dernières années témoignant de l'intérêt de la communauté scientifique pour ce sujet (Figure 22).

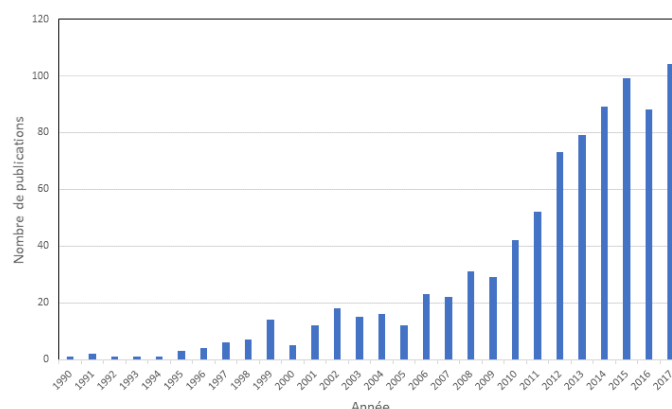


Figure 22 : Statistiques de publication par année (mots-clés : « lignins » et « antioxydant » ; recherche Scopus du 13/07/2018).

En effet, une identification précise de ce type de propriété permet d'envisager des valorisations à haute valeur ajoutée dans les domaines de la cosmétique ou de l'alimentation. Seules les propriétés d'intérêt biologique seront traitées dans cette partie. Les applications d'ordre énergétique ou concernant la production de composés pour l'industrie chimique ou l'utilisation comme agents texturant de matériaux composites seront développées dans le chapitre suivant, traitant des modifications chimiques des lignines techniques.

III.2.1. Pouvoir antioxydant des lignines

Le potentiel effet cancérigène et cytotoxique de certains antioxydants synthétiques a motivé la recherche de composés d'origine naturelle, supposés moins toxiques, pour les remplacer. Les lignines, biodégradables, disponibles en grande quantité et d'un coût modeste, se présentent comme de bonnes candidates. Comme d'autres polyphénols, elles ont des propriétés antioxydantes, cédant facilement un atome d'hydrogène, du fait de leurs structures polyphénoliques, ceci stoppant la propagation des réactions d'oxydation.^[109-111]

L'intervention d'autres mécanismes à l'origine de ce comportement est aussi évoquée dans la littérature. Les lignines, en séquestrant des métaux, pourraient inhiber des réactions de Fenton ou des enzymes responsables de la production d'espèces oxydantes.^[69, 112]

Différents travaux portent sur l'étude détaillée de ce pouvoir antioxydant. Kaur *et al.* ont, par exemple, récemment montré que certaines lignines issues de canne à sucre présentent un pouvoir antioxydant supérieur à celui de l'hydrotoluène butylé (BHT), additif controversé largement utilisé par les industries de la cosmétique et de l'alimentation.^[113] Des films synthétisés à partir de lignine Kraft et de lignine extraite à l'éthanol ont de même dernièrement été décrits comme antioxydants.^[114] C'est également le cas d'autres matériaux incluant des lignines comme des composites de lignosulfonates et de gélatine de peau de poisson qui, de plus, seraient potentiellement utilisables pour l'emballage des aliments.^[115, 116] On peut également citer des travaux portant sur des lignines issues du procédé Lignoboost qui, une fois incluses dans des matériaux tels que des polyuréthanes, des élastomères ou de l'huile de colza, préviennent ces derniers de l'oxydation.^[117]

Ces études mettent, en outre, en évidence que les lignines ne montrent pas toutes le même pouvoir antioxydant, ce dernier étant particulièrement influencé par le procédé d'obtention du polymère.^[118] Il est difficile, au vu de la complexité structurale des lignines, d'établir une relation structure – activité antioxydante précise.^[119] Certaines études ont, cependant, essayé de relier mode de fractionnement des lignines techniques à leurs propriétés antioxydantes.^[120-122] Ce fractionnement a été réalisé de plusieurs façons :

- Par extractions successives à l'aide de solvants organiques ;
- Par ultrafiltration ;
- Par précipitation acide sélective.

Chaque technique présente ses avantages et ses inconvénients propres (e.g. les lignines extraites par ultrafiltration seront plus pures que les lignines extraites par précipitation, mais le coût de l'opération sera plus élevé). Ainsi, dans le cas de lignines extraites à l'éthanol, il a été montré que les fractions présentant le meilleur pouvoir antioxydant sont celles obtenues avec des temps d'extraction longs, à haute température et en utilisant de faibles quantités de solvant. Les lignines ainsi extraites sont celles présentant le taux de phénol le plus important, mais également un poids moléculaire relativement faible et homogène.^[123, 124] De façon générale, les fractions les plus efficaces sont celles qui contiennent des lignines avec des poids moléculaires faibles et des quantités d'alcool aliphatiques réduites.^[69] La présence de sucres dans les lignines semble aussi faire chuter ce pouvoir.^[110]

Les activités cytotoxiques de lignosulfonates et de lignines Kraft, soda et extraites par explosion à la vapeur ont également été évaluées. Ces lignines ont montré une cytotoxicité, mais à une concentration bien supérieure à celle où elles commencent à présenter une activité antioxydante.^[110] De plus, ces sources de lignines ne semblent pas présenter de toxicité pour la peau et les yeux.^[125] Même si d'autres investigations restent nécessaires dans ce domaine, ces résultats confirment la potentielle utilisation des lignines pour leur pouvoir antioxydant.

III.2.2. Autres propriétés biologiques

III.2.2.1. Activité antimicrobienne

Les lignines, principalement du fait de leur pouvoir antioxydant, présentent d'autres activités biologiques comme, par exemple, une activité antimicrobienne. En effet, même si le mécanisme d'action antimicrobien du polymère reste encore à préciser, il est souvent admis que les structures polyphénoliques des lignines causent des dégâts sur la membrane cellulaire des microorganismes, induisant de fait la lyse cellulaire.^[111, 126] Ainsi, dès 1979, il a été montré que la croissance de certains microorganismes, comme des levures (*Saccharomyces cerevisiae*), des bactéries (*Bacillus licheniformis* et *Escherichia coli*) et des champignons (*Aspergillus niger*), pouvait être inhibée par des fragments de lignines de faibles poids moléculaires.^[127] Plus récemment, des études ont démontré que des lignines extraites de tiges de maïs présentent une activité antibactérienne sur des bactéries Gram positif.^[128, 129] D'autres travaux ont mis en évidence que le pouvoir antibactérien des fibres de bambou lui

est conféré par les lignines, et non par des polysaccharides comme il l'avait été proposé auparavant.^[130] Le pouvoir antibactérien des lignines est intimement lié à leur pouvoir antioxydant et comme ce dernier, varie donc en fonction de l'origine botanique et industrielle des lignines.^[111, 131] En effet, alors que des lignines Kraft montrent une activité sur de nombreuses souches bactériennes, les lignines issues des procédés soda ou organosolv présentent uniquement une activité sur les bactéries Gram positif.^[111, 129]

III.2.2.2. Activité protectrice

L'activité protectrice des lignines contre certains composés génotoxiques est également démontrée. En effet, le caractère antioxydant de lignines issues de procédés dessoufrés va leur permettre de protéger l'ADN contre des composés génotoxiques, comme le peroxyde d'hydrogène en captant les radicaux libres, ou encore contre le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) en réduisant son activité alkylante.^[132, 133] La protection de cellules humaines contre les effets cancérigènes de l'azidothymidine (AZT) par une solution de lignines dessoufré hydrosoluble a aussi été montrée.^[134] Il est aussi noté dans la littérature que, de par leur capacité à absorber les rayons UV, les lignines ont montré une activité antimutagène chez une espèce de protiste flagellé (*Euglena gracilis*).^[135]

Enfin, de par leurs propriétés biologiques, les lignines vont également rencontrer des applications potentielles dans le domaine de l'élevage. En effet, l'addition de lignine Alcell dans la nourriture animale s'est révélée avoir des effets probiotiques chez certains animaux monogastriques, en améliorant leur flore intestinale et la morphologie de l'intestin. Certains fragments de lignines semblent avoir la capacité de réguler les germes pathogènes intestinaux des animaux, assainissant ainsi les rejets issus de l'élevage au bénéfice de l'environnement.^[136, 137]

En résumé l'évaluation de l'activité biologique des lignines a permis d'identifier récemment une nouvelle voie de valorisation prometteuse du biopolymère. En outre, de nombreuses autres voies de valorisation innovantes ont été explorées parallèlement par la communauté scientifique et sont présentées au chapitre suivant.

IV. Modifications des lignines techniques et applications

IV.1. Généralités

Comme cela a été évoqué en introduction, les lignines apparaissent comme une alternative aux ressources fossiles attrayante, dans le contexte environnemental actuel. Comme en témoigne le nombre croissant de publications sur le sujet, la valorisation de ce biopolymère est aujourd'hui un enjeu scientifique et industriel de premier plan.^[1, 138-140]

Différentes stratégies coexistent aujourd'hui dans ce domaine, la principale consistant à valoriser énergétiquement les lignines. Dans ce but, elles peuvent être directement brûlées ou préalablement dépolymérisées pour fournir différents carburants, cette dernière méthode se présentant comme une alternative intéressante à l'extraction de produits pétroliers.

La fragmentation du polymère s'effectue généralement par des méthodes thermochimiques dites de pyrolyse^[141-143] ou de gazéification,^[3] et conduit à la transformation des lignines en charbon, en gaz ou en bio-huile. En fonction des conditions opératoires employées (température, temps de réaction, présence d'un catalyseur, etc.), ces différentes phases seront présentes dans des proportions différentes (Figure 23).

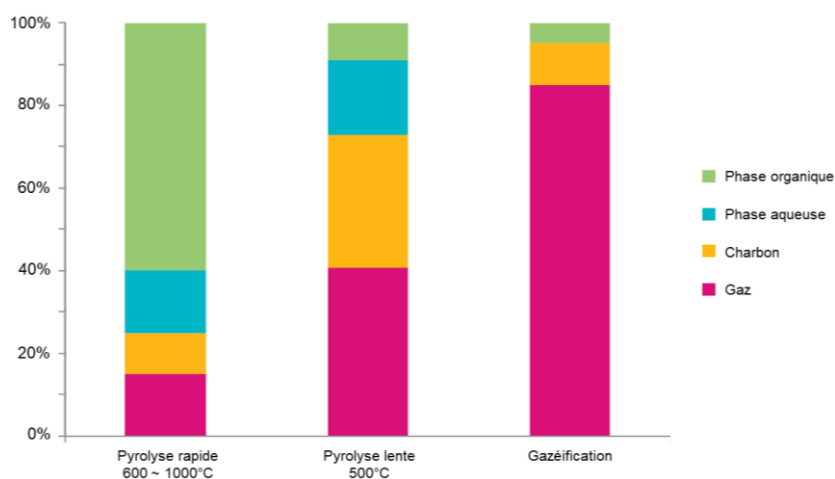


Figure 23 : Produits résultant de fragmentations thermochimiques des lignines.^[3]

Le charbon ainsi formé est le plus souvent brûlé pour fournir de l'énergie.^[27] La synthèse de charbon actif par pyrolyse de lignines Kraft est aussi reportée dans la littérature en utilisant de l'acide phosphorique comme activateur.^[144] La bio-huile, qui est un mélange complexe de

composés aromatiques et non aromatiques, est elle aussi le plus souvent utilisée comme carburant. En effet, la séparation de ses nombreux constituants n'est pas encore économiquement viable.^[145, 146] Les différents gaz produits (CH₄, CO, H₂, etc.) sont également utilisés pour la production d'énergie ou comme molécule plateforme par l'industrie chimique. D'autres techniques de fragmentation des lignines visant à l'obtention de produits à plus haute valeur ajoutée sont par ailleurs présentées dans la littérature. La production de vanilline à partir de lignosulfonates en est le principal exemple. Ce procédé, utilisé par la société Borregaard, lui permet d'être actuellement le principal fournisseur européen de vanilline. Cette méthode de synthèse, encore mal décrite aujourd'hui, fait appel à une oxydation catalysée au cuivre dans des conditions de forte alcalinité et à haute température (Figure 24).^[147, 148]

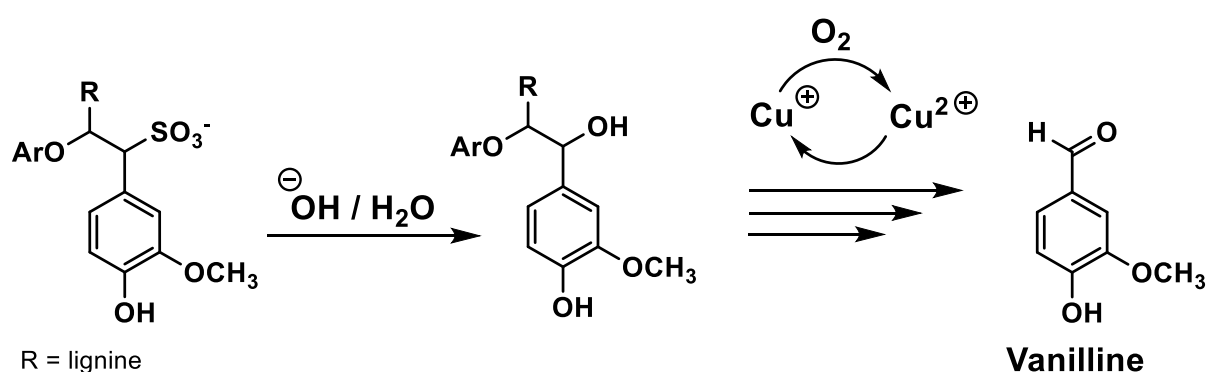


Figure 24 : Synthèse de vanilline par oxydation catalytique de lignosulfonates.

Cette méthode de production est économiquement viable et peut être considérée comme un procédé industriel vert. En effet, au cours de ce dernier, le catalyseur est recyclé. De plus, le bilan carbone de cette synthèse est bien meilleur, avec 90% d'émission de CO₂ en moins, que le procédé utilisant des ressources pétrochimiques.^[149]

Les lignines peuvent également être valorisées comme polymère d'intérêt. Soit, comme cela l'a déjà été présenté pour les lignosulfonates, en tant qu'additif, soit en entrant dans la composition de matériaux composites. En effet, leurs sites hydroxyles réactifs en font de bonnes candidates comme alternative aux composés phénoliques et aux polyols d'origine pétrolière utilisés pour la préparation de résines phénol-aldéhydes^[150, 151], de matériaux polyuréthanes^[152, 153] ou polyesters.^[154, 155]

IV.2. Modifications chimiques du polymère

Les lignines peuvent être également chimiquement modifiées afin d'augmenter leur champ d'application. Ces modifications consistent principalement à modifier ou augmenter la réactivité des groupements hydroxyles ou bien à générer de nouveaux sites actifs sur le polymère. Le nouveau matériau formé va ainsi pouvoir avoir une meilleure réactivité, une meilleure solubilité dans les solvants organiques ou encore des propriétés mécaniques différentes.

IV.2.1. Fonctionnalisation des groupes hydroxyles des lignines

Les groupements hydroxyles, et tout particulièrement les groupements phénoliques, sont à la fois les sites les plus réactifs et les plus nombreux présents sur les lignines. Ils sont de fait la cible de multiples réactions de fonctionnalisation des lignines. Les principales sont présentées ci-dessous (Figure 25).

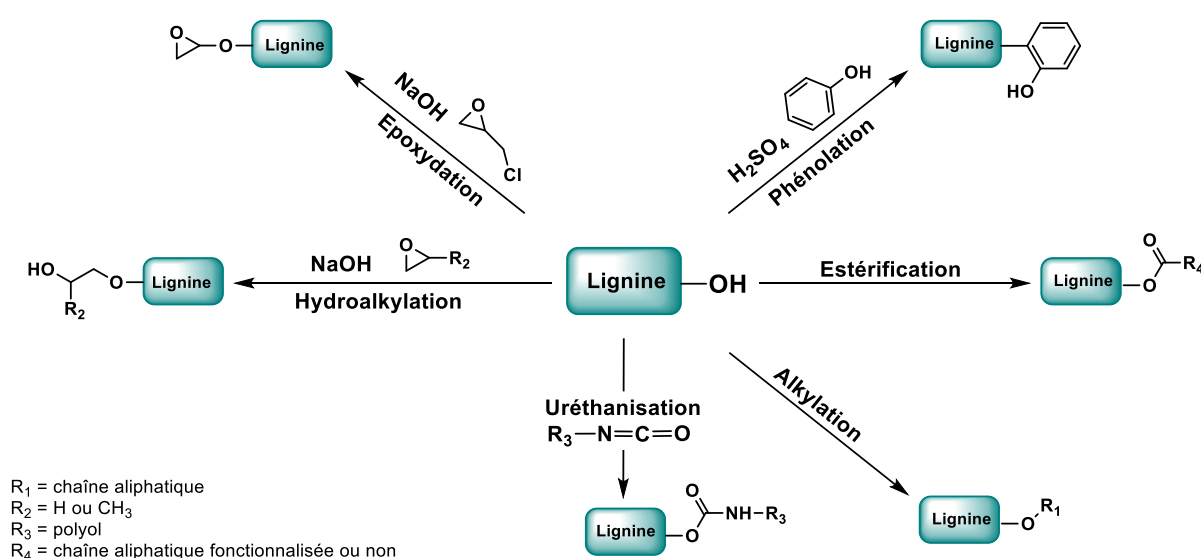


Figure 25 : Fonctionnalisations des groupes hydroxyles des lignines.^[3]

IV.2.1.1. Estérification

L'estérification des groupements hydroxyles des lignines, et en particulier leur acétylation, est pratiquée depuis de nombreuses années pour augmenter leur solubilité dans les solvants organiques et leur compatibilité avec d'autres macromolécules ou encore pour permettre leur

caractérisation.^[156, 157] La lignine peut être estérifiée par diverses réactions, le plus souvent en utilisant des halogénures d'acides^[158] ou des anhydrides.^[159] Parmi ces réactions, l'acétylation avec l'anhydride acétique est de loin la plus décrite.^[160, 161] Elle peut être menée à température ambiante à condition d'utiliser un catalyseur. Le chlorure de zinc, le diméthylformamide, l'acide trifluoroacétique, le trifluorure de bore, l'acétate de sodium, le 1-méthylimidazole ou encore la pyridine, largement utilisée, en sont des exemples.^[162] L'estérification des lignines avec des dérivés à plus longues chaînes carbonées est également décrite dans la littérature.^[159] En outre, de nombreuses réactions d'estérification sont conduites en présence de composés bifonctionnels en vue de synthétiser des matériaux polyesters à base de lignines.^[58]

IV.2.1.2. Éthérification

IV.2.1.2.1. Alkylation

L'alkylation des lignines est souvent utilisée pour modifier les propriétés mécaniques du biopolymère en vue d'applications dans le domaine des matériaux polymériques. Différentes réactions d'alkylation, employant par exemple du bromododécane^[163] ou du sulfate de diéthyle,^[164] sont décrites dans la littérature. Mais l'alkylation la plus décrite est la méthylation, cette dernière peut être réalisée à l'aide d'agents alkylants classiques comme l'iodure de méthyle ou le sulfate de diméthyle. En outre, il est à noter que certains de ces agents, tel que le sulfate de diméthyle, permettent de méthyler sélectivement les alcools phénoliques des lignines.^[165] Il a également récemment été montré qu'un agent alkylant plus respectueux de l'environnement, le carbonate de diméthyle, pouvait aussi être employé pour méthyler les lignines.^[166]

IV.2.1.2.2. Hydroalkylation

Parmi les réactions d'éthérification des lignines, la réaction avec les oxydes d'alkylène et en particulier avec l'oxyde de propylène (PO), « l'oxypropylation », sont les plus connues.^[165, 167] L'oxypropylation a été longuement étudiée et reste l'une des réactions les plus attrayantes pour modifier les lignines, permettant l'obtention de macro-polyols solubles dans différents solvants organiques communs. Dans la plupart des cas, ces lignines modifiées sont, par la

suite, utilisées pour la synthèse de matériaux polyesters ou polyuréthanes biosourcés.^[3] L'oxypropylation repose sur la réaction des groupements alcoolates générés à partir des fonctions alcool des lignines, en présence d'un catalyseur basique, sur l'oxyde de propylène. L'hydroxyde de potassium est largement utilisé pour catalyser cette réaction, néanmoins, le recours à d'autres catalyseurs tels que le polyphosphazénium, la tétraphénylporphine d'aluminium, l'hydroxyde de césium, ainsi que diverses amines tertiaires sont également décrits dans la littérature.^[168] Dans les conditions de températures classiques (80 ~ 200 °C), cette réaction n'est pas sélective et touche les alcools aliphatiques et phénoliques. Cependant, en abaissant cette température au voisinage de 40 °C Sadeghifar *et al.* ont montré qu'il était possible de toucher sélectivement les alcools phénoliques.^[165]

IV.2.1.3. Époxydation

Les résines époxydes à base de lignines peuvent être synthétisées de deux façons. Les lignines peuvent soit être directement intégrées aux résines époxy comme mentionné précédemment (cf. paragraphe IV.1), soit des fonctions époxydes peuvent être préalablement ajoutées à la structure des lignines. La méthode la plus simple et la plus décrite pour effectuer cette fonctionnalisation consiste à faire réagir de l'épichlorhydrine sur les fonctions phénol des lignines en milieu basique. Cette méthode a été initialement publiée par Mikhailov^[169] et Mihailo^[170] en 1962, mais peu de caractérisations des matériaux obtenus avaient été effectuées par les auteurs. Par la suite, El Mansouri *et al.* ont constaté que l'incorporation des lignines préalablement époxydées améliore à la fois la stabilité thermique et l'indice époxy des matériaux.^[171] Okabe *et al.* mettent aussi en lumière l'importance de la masse moléculaire de la lignine utilisée.^[172] En effet, lorsqu'elle est inférieure à 300 g.mol⁻¹, l'effet stabilisant des lignines sur le matériau n'est pas observé et si elle est supérieure à 10 000 g.mol⁻¹, les lignines fonctionnalisées ne sont plus solubles dans les solvants organiques courants.

IV.2.1.4. Phénolisation

La phénolisation, ou phénolyse, consiste à ajouter des fonctions phénol sur les lignines en faisant réagir ces dernières sur du phénol en milieu acide, le plus souvent dans le méthanol ou l'éthanol. Cette réaction est couramment utilisée pour augmenter la réactivité des

lignosulfonates.^[3, 173] Elle est généralement effectuée avant la réaction de condensation des lignines sur le formaldéhyde lors de la synthèse de résines lignines-phénol-formaldéhyde ou avant la réaction d'époxydation des lignines décrite précédemment (cf. paragraphe IV.2.1.3). Le temps de polymérisation, la capacité d'adhésion et la viscosité des résines obtenues sont comparables à ceux des résines phénol-formaldéhyde commerciales, permettant leur utilisation dans la fabrication de panneaux de particules.^[173, 174] Cette réaction est aussi employée pour greffer sur les lignines du cardanol, un composé phénolique d'origine naturelle muni d'une longue chaîne carbonée. Les lignines peuvent ensuite entrer dans la composition de films polyuréthanes afin d'en améliorer la flexibilité.^[175]

IV.2.1.5. Uréthanization

Les lignines, possédant une forte densité en fonction hydroxyle, sont apparues comme une alternative aux polyols pétrosourcés employés pour la synthèse de matériaux polyuréthanes.^[152, 153] De plus, l'incorporation du biopolymère dans ces matériaux permet d'en augmenter la biodégradabilité.^[176] Deux stratégies existent pour synthétiser ces matériaux à base de lignine. La première nécessite une seule étape au cours de laquelle les lignines sont mises en présence d'un composé diisocyanate et d'un diol comme co-monomère (Figure 26). La synthèse directe de films polyuréthanes à partir de lignines, de diisocyanate de 4,4-diphénylméthane et de polyéthylène glycol (PEG) a par exemple été reportée.^[177] La deuxième fait appel à deux étapes. Au cours de la première étape, un prépolymère isocyanate est synthétisé par condensation d'un diisocyanate et d'un polyol. Puis la lignine réagit sur ce prépolymère dans une seconde étape pour former le matériau polyuréthane. Par sa complexité, cette dernière stratégie présente l'inconvénient de réduire la compétitivité du produit final face à des matériaux pétrosourcés.^[3]

Les propriétés mécaniques du matériau final peuvent être modulées en fonction des différents monomères employés. L'utilisation de macro diisocyanates va, par exemple, conduire à la formation de gel,^[178] alors, qu'à l'inverse, des films ont été réalisés en combinant des lignines Alcell avec du polyéthylène glycol et du méthyl-diisocyanate.^[177] La synthèse de différentes mousses polyuréthanes contenant des lignines est également reportée. Xue *et al.* présentent par exemple la synthèse de mousses incorporant jusqu'à 40% de lignines, ces

mousses présentent cependant pour l'instant des propriétés isolantes moins bonnes que des mousses polyuréthanes classiques.^[179]

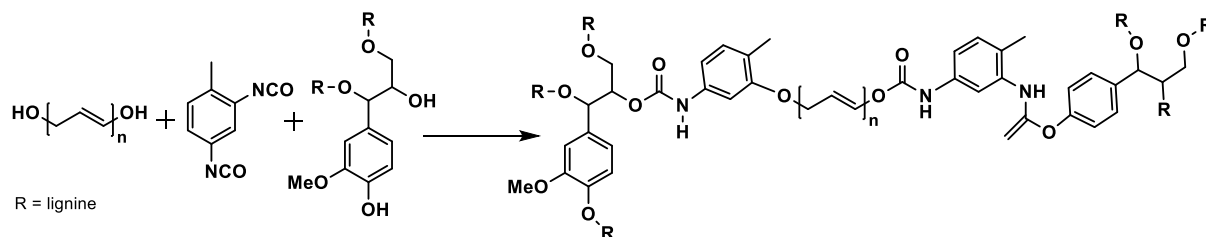


Figure 26 : Synthèse de polyuréthanes à partir de lignines.^[58]

IV.2.2. Autres fonctionnalisations des lignines

En complément des fonctionnalisations des groupements hydroxyles présentées précédemment, d'autres modifications permettent d'incorporer de nouveaux sites réactifs à la structure des lignines. Les plus courantes, l'hydroxylation, la sulfonation, la sulfométhylation, l'amination et la nitration sont présentées ci-dessous (Figure 27).

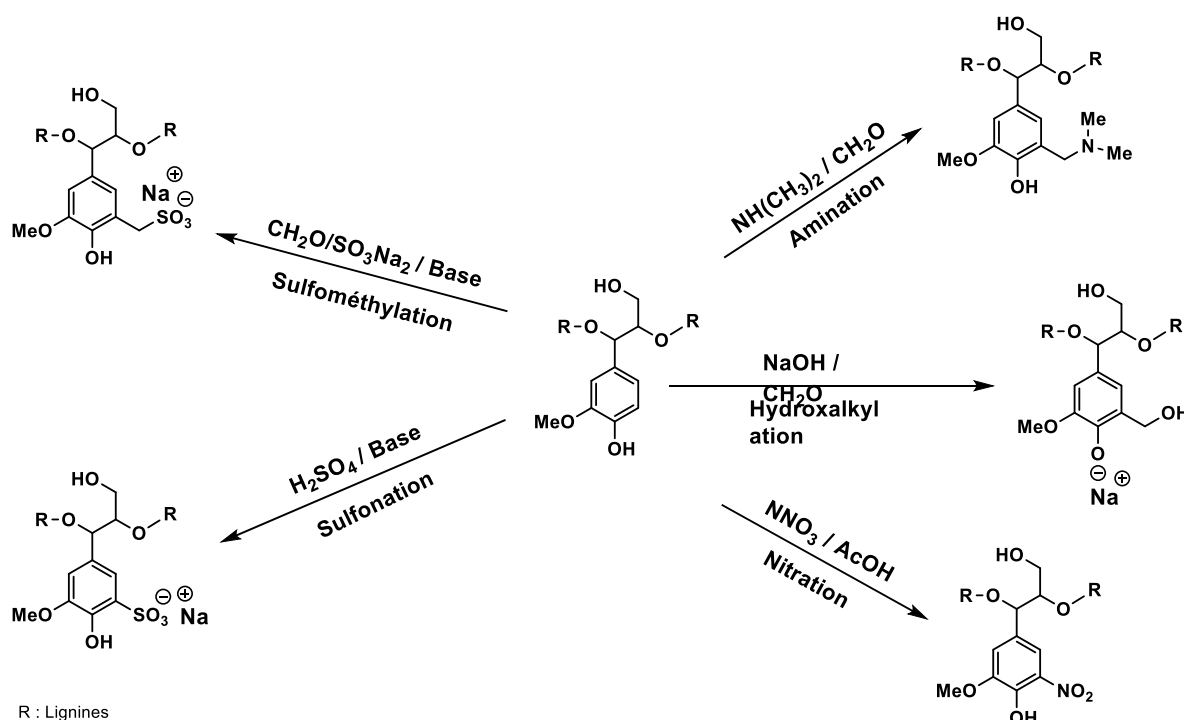


Figure 27 : Réactions de fonctionnalisation des lignines.^[3]

IV.2.2.1. Hydroxyalkylation

Cette réaction a été développée, comme la phénolation, dans le but d'améliorer la réactivité des lignines en augmentant la quantité de groupements hydroxyles présents sur ces dernières.

Cette réaction est le plus souvent mise en œuvre en faisant réagir du formaldéhyde sur les structures aromatiques des lignines en milieu basique. D'autres composés, moins toxiques et moins volatiles que le formaldéhyde, comme le glutaraldéhyde ou le glyoxal ont également été employés.^[180, 181] Ces lignines modifiées ont la plupart du temps été développées pour la préparation de colle à bois de type lignines-phénol-aldéhydes.^[3, 175]

IV.2.2.2. Amination

L'amination des lignines est réalisée en présence d'une amine et de formaldéhyde selon la réaction de Mannich. L'amine va dans un premier temps réagir sur le formaldéhyde pour former un ammonium puis un iminium par réarrangement. Ce dernier va alors pouvoir s'ajouter en ortho des hydroxyles phénoliques des lignines. L'amination des lignines est le plus souvent réalisée en employant la diéthylamine.^[182, 183] Il a, par exemple, été montré que ces lignines modifiées peuvent réagir avec du diphénylméthanediisocyanate et du PEG en présence d'eau pour préparer des mousses polyuréthanes.^[184] Ces réactions ont également été mises en œuvre sur un composé modèle de lignine, le 1-guaiacyl-l-p-hydroxyphényléthane. Les produits de synthèse ont pu être utilisés comme émulsifiants, surfactants cationiques ou encore pour augmenter l'hydrophobicité du matériau auquel ils ont été incorporés.^[3]

IV.2.2.3. Nitration

La nitration de la lignine est généralement effectuée dans des solvants non aqueux par des agents de nitration, tels que les mélanges acide nitrique/anhydride acétique ou acide acétique concentré/acide nitrique/acide sulfurique. Le polymère obtenu est de faible masse moléculaire, entre 600 et 2000 g.mol⁻¹ et possède une teneur en azote qui varie entre 6 et 7%. Ces nitro-lignines ont notamment été incluses à des films polyuréthanes pour en améliorer la température de transition vitreuse et la résistance à la traction.^[185, 186]

IV.2.2.4. Sulfonation et sulfométhylation

La sulfométhylation et la sulfonation ont pour objectif commun d'introduire des groupements sulfonates sur le biopolymère pour augmenter sa capacité à former des liaisons ioniques.

La sulfométhylation s'effectue en mettant les lignines, préalablement solubilisées à chaud dans une phase aqueuse basique, en présence de sulfites alcalins et de méthanol en quantité équimolaire.^[187] Il est en outre possible de contrôler le degré de substitution des lignines en changeant les conditions de réaction et les rapports des réactifs utilisés.^[188] Ces produits peuvent, par exemple, être utilisés pour la dispersion de colorants.^[189]

La sulfonation va, elle, s'effectuer en présence d'acide sulfurique ou de sulfite de sodium, les lignosulfonates ainsi formées peuvent, entre autres, être utilisées comme dispersant pour les ciments en raison de leur haut potentiel zêta.^[175]

IV.2.3. Déméthylation des lignines

La déméthylation des lignines a retenu l'attention de la communauté scientifique. En effet, suite à cette modification, le taux d'alcool présent sur les lignines se trouve être plus important qu'à l'origine, augmentant ainsi la valeur ajoutée du matériau en lui permettant, par exemple, d'entrer dans la composition de colle sans formaldéhyde.^[190] Cette réaction présente de plus l'intérêt de former des sous-produits pouvant eux aussi être valorisés. La société Gaylord Chemical propose en particulier la production de diméthylsulfoxyde (DMSO) par cette réaction (Figure 28).^[2] Pour ce faire, le sulfure de diméthyle (DMS), résultant de la déméthylation de lignine par des sels de soufre fondus en milieu alcalin, est oxydé dans une seconde étape afin de produire du DMSO.

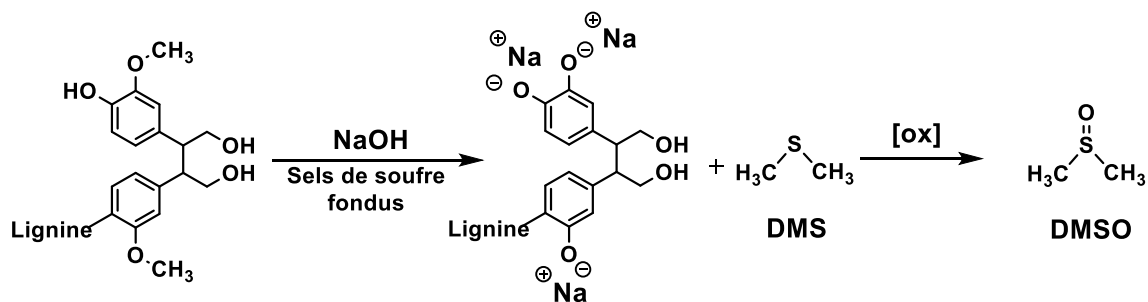


Figure 28 : Synthèse du DMSO à partir de lignine.

En résumé, de nombreuses modifications chimiques des lignines ont été développées, le plus souvent en vue de valorisations innovantes du polymère dans le domaine des matériaux polymériques. Il est également à noter que certaines de ces modifications telles que l'acétylation ou l'uréthanisation ont également permis l'obtention de nano-objets à base de lignines dont les différentes applications sont présentées en détail au chapitre suivant.

V. Synthèse de nanoparticules et applications

V.1. Introduction

La préparation de nanomatériaux à partir de lignines est une voie de valorisation du biopolymère actuellement en développement. Contrairement à la cellulose qui a largement été étudiée en ce sens, cette technologie n'en est qu'à ses débuts pour les lignines. En effet, à l'instar d'autres voies de valorisations, la variabilité structurale du polymère va être un frein au développement de méthodes de préparation de nano-objets, impliquant souvent un mode de synthèse différent en fonction de l'origine industrielle du polymère.

Les lignines présentent cependant de nombreux avantages pour le développement de nanomatériaux. En effet, elles ne semblent pas présenter de toxicité et possèdent une bonne aptitude à la biodégradation.^[191] Ces caractéristiques, ajoutées au fait que le biopolymère soit disponible en grande quantité pour un faible coût, font des lignines une alternative potentielle aux nanostructures de carbone et d'oxydes métalliques aujourd'hui largement controversées.^[192, 193] Par ailleurs, leurs propriétés antioxydantes intrinsèques et les nombreux groupes hydroxyles, faciles à moduler, qu'elles portent élargissent leurs domaines d'applications.^[175]

De nombreuses méthodes de préparation de nanomatériaux à base de lignines ont été décrites dans la littérature. Cependant, les interactions qui gouvernent l'association des chaînes de polymère entre elles pour former ces nano-objets restent mal comprises. Il semble que des liaisons hydrogène, des interactions intermoléculaires de Van der Waals, des interactions entre orbitales π non liantes, des interactions hydrophobes ou encore des interactions ioniques peuvent toutes contribuer à l'association des molécules de lignine ; leurs contributions étant plus ou moins importantes en fonction de la structure du polymère ainsi que du mode de préparation utilisé.^[194-196]

Une des méthodes couramment utilisées pour la préparation de nanoparticules de lignines consiste à dissoudre le polymère dans un solvant organique, puis à ajouter graduellement à cette solution un autre solvant dans lequel les lignines sont insolubles. L'ajout de ce dernier, communément nommé anti-solvant, leur permet de s'organiser sous forme de nanoparticules. Les lignines en solution dans un solvant organique peuvent également être

organisées en nanoparticules en échangeant progressivement ce solvant par de l'eau, pour ce faire une dialyse peut être mise en œuvre.^[197]

La préparation de nanoparticules de lignines par précipitation acide est aussi une méthode décrite dans la littérature : une solution d'acide est ajoutée graduellement à une solution organique ou aqueuse basique de lignines, conduisant ainsi à la formation de nanoparticules de lignines.^[198]

Des nanoparticules ont également été préparées par émulsion d'une phase aqueuse et d'une phase organique. Cette dernière est généralement obtenue par sonification du milieu en présence d'un tensioactif. Les lignines, organisées dans les nano-cavités induites par l'émulsion, réagissent avec un agent de réticulation ou un copolymère préalablement introduit dans l'une des phases, formant ainsi des nanoparticules.^[199] Différentes autres méthodes de préparation ont été décrites dans la littérature.^[194, 200] Ainsi, des nanomatériaux de lignine ont été mis en forme au moyen de traitements mécaniques (sonification, broyage et homogénéisation mécanique), d'électrofilage, de procédés aérosol ou cryogénique et de synthèses sur matrice. Ces nano-objets peuvent prendre la forme de capsule, de particule solide, de tube, de fibre ou de feuillet et se révèlent avoir des applications dans de nombreux domaines allant du traitement de surface à l'encapsulation de composés bioactifs.

Cette partie présente les principales applications de ces nano-objets à base de lignines.

V.2. Utilisation de nanoparticules de lignines comme antioxydant et antimicrobien

Les lignines, sous forme de nanoparticules, présentent un meilleur pouvoir antioxydant que des lignines non organisées. Yearla *et al.* ont par exemple montré que des nanoparticules préparées par ajout d'eau sur une solution de lignines dans l'acétone possèdent une meilleure activité antioxydante et protectrice contre les rayons UV que les lignines initiales.^[201] Cette observation peut s'expliquer par le fait que les lignines sont nettement plus concentrées sous forme de nanoparticules, induisant de fait une meilleure activité anti-radicalaire. Lu *et al.* ont en effet montré que la concentration en polymère était 12,4 fois plus importante dans le cas d'une suspension de nanoparticules obtenues par ajout de CO₂ supercritique, que dans celui d'une solution de lignine dans sa forme classique.^[202]

Récemment, Yang *et al.* ont montré que des nanoparticules, préparées par ajout d'acide sur une solution de lignine soda dans l'éthylène glycol, présentent des activités antioxydantes et antibactériennes particulièrement intéressantes.^[203] En effet, ces nanoparticules montrent non seulement une forte capacité à piéger des radicaux libres, mais se comportent également comme des agents antibactériens efficaces envers les phytopathogènes bactériens Gram négatif *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*, et *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*. Les auteurs proposent deux mécanismes pour expliquer cette activité. Les nanoparticules vont d'une part pouvoir induire la lyse de la paroi cellulaire des bactéries en relarguant des espèces réactives de l'oxygène. D'autre part, les nano-objets peuvent s'infiltrer dans la membrane plasmique et modifier le pH intracellulaire, induisant ainsi la dégradation des molécules d'adénosine triphosphate et par conséquent la mort cellulaire. Ces nanoparticules de lignines apparaissent donc comme une stratégie prometteuse de lutte contre les différents pathogènes des plantes.

V.3. Introduction de nanoparticules de lignines dans des matériaux et des cosmétiques

Lorsqu'elles y sont intégrées, les nanoparticules de lignines peuvent améliorer la biocompatibilité ou les propriétés mécaniques de certaines matrices polymériques ou de matériaux composites.

Il a, par exemple, été décrit que l'introduction de 1,5% en masse de nanoparticules, obtenues par ajout d'acide chlorhydrique sur des lignines en solution dans l'éthylène glycol, améliore les propriétés d'un polytéréphtalate.^[204] En effet, le polymère ainsi obtenu présente une meilleure résistance à la traction ainsi qu'à la dégradation. Nevarez *et al.* présentent des constatations similaires en incorporant des nanoparticules à base de lignines Kraft et organosolv, acétylées ou non, à du triacétate de cellulose. Ils observent, qu'à de rares exceptions, cet ajout augmente considérablement les propriétés mécaniques du matériau.^[205] Qian *et al.* ont, par ailleurs, préparé des nanoparticules par ajout de cyclohexane sur des lignines soda solubilisées dans le dioxane.^[206] Les nano-objets ainsi formés montrent une bonne compatibilité avec des plastiques hydrophobes et ont ainsi pu être intégrés à du polyéthylène haute densité. Une augmentation de la capacité du polymère à absorber les rayons UV est aussi reportée par les auteurs. Cette capacité à absorber les UV des

nanoparticules de lignines a également été utilisée par Tian *et al.* Les auteurs ont ainsi incorporé des nanoparticules de lignines organosolv, obtenues par échange de solvant, à des films d'alcool polyvinylique. Ils observent que le composite ainsi formé est capable d'absorber 80% d'un rayonnement à 400 nm lorsqu'il y est soumis.^[207] Cette propriété a aussi été utilisée par Qian *et al.* pour améliorer l'efficacité de crèmes solaires commerciales.^[208-210] Il a en effet été montré que le facteur de protection solaire augmentait de 15 à 92 lorsque 10% en masse de nanoparticules de lignines de différentes sources sont ajoutés à la crème.

Par ailleurs, Salas *et al.* ont préparé des nanofibres d'un diamètre compris entre 120 et 400 nm par électro-spinning d'une solution alcaline de lignines et de protéines de soja.^[211] Du PEG a également été ajouté comme adjuvant pour faciliter le déploiement des protéines de soja et ainsi faciliter leurs interactions avec les lignines conduisant à des fibres de meilleure qualité. Les nanofibres obtenues présentent des caractéristiques techniques et environnementales intéressantes et ont donc été jugées appropriées pour le développement de nouveaux composites biosourcés.

Les nanoparticules peuvent aussi être incorporées à des matériaux en vue d'exploiter leurs propriétés antioxydantes précédemment décrites, Yang *et al.* ont, par exemple, renforcé l'activité antioxydante d'hydrogels composés d'alcools polyvinyliques et de chitosan en y intégrant des nanoparticules de lignines (entre 1 et 3% en masse).^[212] Ces nanoparticules ont été préparées par précipitation acide à partir de lignines obtenues par explosion à la vapeur suivie d'une dégradation enzymatique. Les propriétés antioxydantes de nanoparticules ont également été exploitées par Rahman *et al.*^[213] Les auteurs ont en effet développé un film composé de nanoparticules de lignines, obtenues par précipitation acide, et de résine époxy permettant de prévenir de la corrosion des alliages métalliques.

V.4. Préparation de nanoparticules de lignines pour l'encapsulation et le relargage de composés bioactifs

Le faible coût et les bonnes performances environnementales des lignines leur permettent de se présenter comme un matériau d'avenir pour la production de nanostructures destinées à l'encapsulation de composés bioactifs, tant pour des applications pharmaceutiques que phytosanitaires. Le nombre de publications traitant du sujet ces cinq dernières années témoignent de l'intérêt porté au sujet.^[175]

Frangeville *et al.* proposent par exemple la préparation de nanoparticules par ajout d'acide chlorhydrique à une solution de lignine dans l'éthylène glycol.^[198] Les auteurs montrent que des tailles de particules allant de 100 nm au micron sont obtenues en fonction des concentrations de lignine et d'acide utilisées. Ces nanoparticules ne présentent pas de toxicité sur les microorganismes, ce qui en font de potentiels véhicules pour des principes actifs pharmaceutiques. Il a également été montré que de telles nanoparticules peuvent adsorber à leur surface des ions argent. Ces nanoparticules ainsi fonctionnalisées présentent alors une activité antimicrobienne particulièrement intéressante, permettant de présenter ces dernières comme une alternative aux nanoparticules métalliques.^[214]

De même, Ten *et al.* ont reporté l'utilisation d'alumine nanoporeuse fonctionnalisée pour la fabrication de nanotubes de lignines.^[215] Les lignines sont d'abord déposées par couches successives sur la surface des nanopores de la membrane d'alumine. Puis, la matrice inorganique est dissoute avec de l'acide phosphorique afin d'obtenir les nanotubes. Les propriétés physicochimiques de ces nanotubes dépendent de la méthode d'extraction de la lignine, qui influence la masse molaire et la réactivité de la lignine. Ces nanotubes montrent une bonne biocompatibilité et une forte capacité de liaison à l'ADN, de plus ils sont observables directement, sans recours à aucun marquage, du fait des propriétés d'émission de fluorescence propres aux lignines. Ces qualités font d'eux un véhicule potentiel pour la délivrance de gènes dans les cellules humaines.

Qian *et al.* reportent par ailleurs une méthode de préparation de nanosphères à base de lignine. Elle s'effectue en ajoutant graduellement de l'eau à une solution de tétrahydrofurane (THF) dans laquelle sont solubilisées les lignines de blé préalablement acétylées.^[216, 217] Suite à cet ajout, les lignines s'organisent sous la forme de sphères d'une taille moyenne de 100 nm par interactions hydrophobes (Figure 29). Cette structuration est observable à partir d'une concentration en eau représentant 44% du volume de la solution et prend fin quand elle atteint 67%. Les nanoparticules ainsi formées peuvent potentiellement être utilisées dans des systèmes de vectorisation de composés pharmaceutiques mais également pour la micro-encapsulation de pesticides afin de contrôler leur relargage dans l'environnement. L'acétylation présente l'inconvénient d'ajouter une étape par rapport à d'autres méthodes de préparation, cependant elle permet en contrepartie d'utiliser toutes les sources de lignines techniques. Il est également noté dans la littérature que cette méthode de préparation

s'applique à des lignines non acétylées quand elles sont solubles par nature dans un solvant organique.^[197, 201, 218]

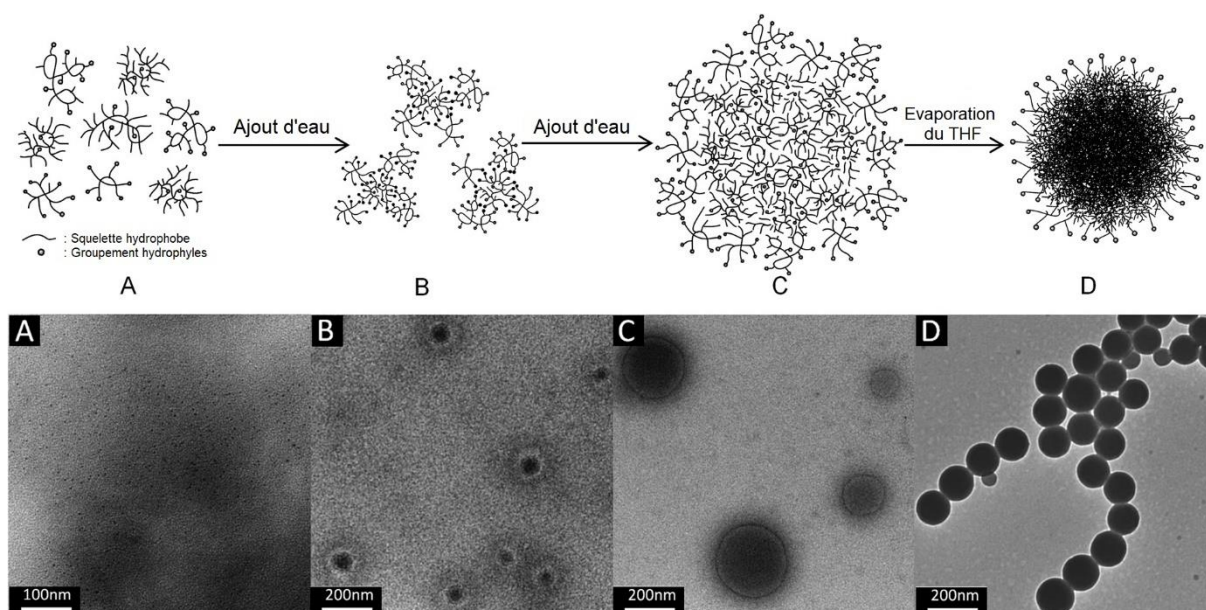


Figure 29 : Nanoparticules de lignines acétylées préparées par la méthode de Qian *et al.*^[216]

L'utilisation de nanoparticules de lignines apparaît également comme une stratégie prometteuse en matière de lutte contre le cancer. En effet, Figueiredo *et al.* ont montré que des nanoparticules, composé de lignines et d'oxydes de fer, préparées par dialyse ne présentaient non seulement pas de cytotoxicité, mais étaient aussi capables d'encapsuler et de délivrer des substances actives aussi bien hydrophobes qu'hydrophiles telles que le sorafenib, le benzazulène (BZL) ou la capécitabine.^[219] Ces nano-objets contenant du fer, ils rencontrent aussi une application potentielle en imagerie par résonance magnétique. Les mêmes auteurs présentent aussi des résultats intéressants en encapsulant du BZL dans des nanoparticules préparées à partir de lignines préalablement carboxylées et, par la suite, fonctionnalisées par du PEG, de la poly-histidine et des agents peptidiques de pénétration membranaire.^[220] Les nano-objets ainsi formés montrent des capacités antiprolifératives encourageantes sur différentes lignées cellulaires cancéreuses en permettant une libération pH-dépendante du composé bioactif. De plus, Dian *et al.* ont également obtenu des résultats très prometteurs en utilisant des nanoparticules de lignines et de Fe₃O₄ préparées par échange de solvant, pour encapsuler et délivrer un agent antitumoral, le resvératrol (RSV).^[221] En effet, l'utilisation de ce système a permis d'obtenir non seulement une meilleure réduction

de tumeurs murines, mais également des effets secondaires moindres qu'avec l'utilisation du RSV seul.

Des nanocapsules de lignine, sensibles aux variations de pH et permettant l'encapsulation de composés hydrophobes, ont aussi été préparées par réticulation.^[222] Une émulsion est, dans un premier temps, obtenue entre une phase organique contenant de l'acétate de butyle, de l'hexadécane (co-stabilisant), du azobisisobutyronitrile (initiateur liposoluble) et un agent de réticulation (triméthylolpropane tri(3-mercaptopropionate)) et une solution aqueuse de lignosulfonates de sodium par ultra-sonication. L'agent de réticulation réagit, dans un second temps, avec les lignines à l'interface des nano-cavités pour former des nanocapsules. Ces nanocapsules ont également été préparées en introduisant de la coumarine-6 dans la phase organique en vue de l'encapsuler. Les nano-objets ainsi obtenus ont des tailles de 50 à 300 nm. La libération de la coumarine-6 peut ensuite être contrôlée par la variation du pH grâce aux liaisons de réticulations β -thiopropionate, labiles en milieu acide. Ces nanocapsules de lignine apparaissent donc comme des véhicules prometteurs pour l'administration et la libération contrôlée de molécules hydrophobes telles que des médicaments, des huiles essentielles ou des antioxydants.

Dans une autre étude, Yiamsawas *et al.* proposent également la préparation de nanocapsules par réticulation.^[223] Pour ce faire, les lignines sont solubilisées dans une solution aqueuse de chlorure de sodium, puis cette solution est mise en présence de cyclohexane et d'un surfactant. Une microémulsion est ensuite produite par ultrasonication et du toluène diisocyanate est ajouté, induisant une réaction de polyaddition. Les nanoparticules obtenues ont des diamètres compris entre 310 et 390 nm dans l'eau. Ce mode de préparation permet de plus l'encapsulation de composés hydrophiles tels que des composés pharmaceutiques, des engrais ou des pesticides qui peuvent, par la suite, être libérés par dégradation enzymatique des lignines, rendant ces nano-conteneurs particulièrement attractifs pour des applications dans les domaines de la santé et de l'agronomie.

Comme cela vient d'être évoqué, du fait de leurs propriétés d'encapsulation et antibactérienne couplées avec leur faible coût et leur disponibilité, les nanoparticules de lignines ont un fort potentiel pour des applications en agronomie en ligne avec les enjeux environnementaux actuels liés à l'emploi des produits phytosanitaires. Toutefois, dans ce domaine, de nombreuses autres stratégies, faisant appel aux lignines, mais aussi à d'autres

polymères d'origine naturelle, existent, notamment pour la délivrance de produits phytosanitaires. C'est l'objet du chapitre suivant.

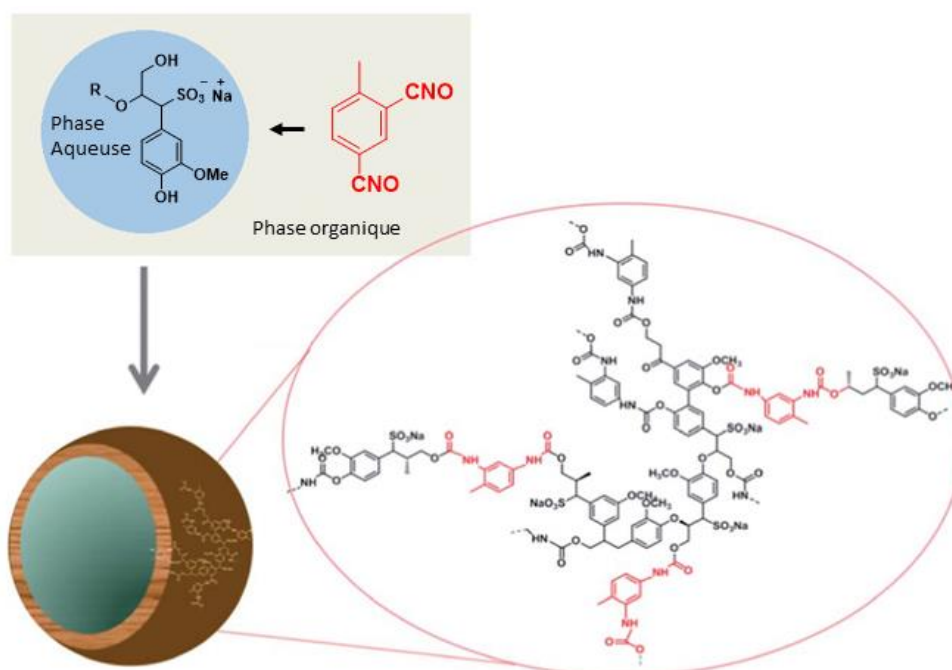


Figure 30 : Nanocapsules mixtes de lignines-toluène diisocyanate synthétisées par Yiamsawas *et al.*[223]

VI. Utilisations de polymères d'origine naturelle pour le relargage contrôlé de produits phytosanitaires

VI.1. Généralités

Les produits phytosanitaires jouent un rôle clé dans la réponse à la demande mondiale croissante en nourriture. Cependant, leur effet néfaste sur l'environnement, la biodiversité et la santé humaine limitent leurs usages et en font des composés de plus en plus controversés. Afin de faciliter et de sécuriser leur manipulation ainsi que de rendre plus efficace leur épandage, ces composés bioactifs sont généralement mélangés avec d'autres matériaux inertes.

Cependant, ces formulations présentent souvent l'inconvénient de libérer immédiatement l'agent actif, l'exposant ainsi à différents phénomènes de dégradation. En effet, sans protection, ce dernier peut rapidement être photodégradé, hydrolysé, soumis aux attaques de différents microorganismes ou encore éliminé par évaporation ou lixiviation. En conséquence, la concentration en produit phytosanitaire sur le terrain passe rapidement en dessous de la concentration minimale nécessaire au maintien de l'activité biologique de ce dernier. Afin de pallier ce problème, les produits phytosanitaires sont appliqués à plusieurs reprises au cours de l'année, ce qui aggrave les problèmes environnementaux et de santé publique liés à leur utilisation. Cet épandage répété, en particulier de pesticides, peut également induire une phytotoxicité.

De nouvelles formulations sont donc développées afin de réduire l'impact de ces composés sur l'environnement.^[224, 225] Ces formulations ont pour objectif de libérer lentement et de façon continue les substances chimiques actives tout en résistant aux différentes dégradations environnementales, permettant ainsi de réduire le nombre d'épandage nécessaire au maintien de l'activité biologique des produits phytosanitaires. Ces dernières années, de nombreux travaux ont été effectués en vue de développer des systèmes de libération contrôlée à base de différents matériaux comme des polymères, des cires ou encore des argiles.^[226] Dans cet objectif, les polymères d'origine naturelle semblent être une alternative intéressante aux polymères synthétiques non seulement en raison de leur caractère

biodégradable, mais également, car ils sont disponibles en grande quantité pour un faible coût.^[227]

Ce chapitre présentera donc les principales utilisations de ces polymères biosourcés dans le cadre d'applications phytosanitaires.

VI.2. Les polysaccharides

L'immense majorité des polymères naturels sont des polysaccharides, ils ont donc naturellement été abondamment étudiés dans le but de préparer des systèmes de relargages d'agents phytosanitaires respectueux de l'environnement.^[228]

VI.2.1. Préparation d'hydrogels à base de polysaccharides pour le relargage contrôlé d'agents phytosanitaires

Les hydrogels sont des réseaux polymériques tridimensionnels capables de retenir de grandes quantités d'eau sans se dissoudre. Leur structure est assurée par des liaisons de réticulation covalentes ou plus faibles telles que des liaisons ioniques, hydrogène ou de van der Waals. Ils ont largement été étudiés pour la formulation de fertilisants, d'herbicides ou de pesticides. En effet, ils vont, non seulement permettre un relargage progressif de la substance active, mais également d'augmenter ou de conserver l'hygrométrie du sol. De plus, par cette méthode de formulation, plusieurs principes actifs peuvent être distribués simultanément dans l'environnement.^[229]

Les hydrogels à base de polysaccharides naturels, bien que possédant des propriétés mécaniques plus difficiles à contrôler, présentent l'avantage d'être plus respectueux de l'environnement que leurs homologues synthétiques,^[226] ce qui fait d'eux des composés de choix pour une utilisation future dans le domaine phytosanitaire.

Les alginates, polysaccharides linéaires extraits des algues brunes, de par leur structure, vont se présenter comme de bons candidats pour le développement d'hydrogels biosourcés. En effet, le polymère peut être mis sous forme d'hydrogel par un simple procédé de gélification ionotropique. Ce dernier consiste à déposer une solution d'alginate de sodium sur une solution contenant un ion métallique agissant comme agent de réticulation. Lorsqu'un composé actif est présent dans la solution d'alginates, ce dernier va se retrouver intégré au

réseau polymérique de l'hydrogel et sera par la suite relargué plus ou moins rapidement dans l'environnement. Isiklan *et al.* ont par exemple proposé, par cette méthode, la formulation de l'insecticide carbaryl en l'intégrant à des hydrogels d'alginate de sodium et de nickel.^[230] Ces systèmes se montrent également capables de ralentir le relargage de différents herbicides comme l'atrazine,^[231] la métribuzine^[232] ou encore l'isoproturon^[233] par rapport à leurs formulations commerciales.

Il a, en outre, été montré que la nature de l'ion métallique utilisé pour la réticulation de l'hydrogel a une influence sur la vitesse de relargage des composés bioactifs. En effet, Isiklan *et al.* ont, par exemple, montré que des hydrogels d'alginate réticulés par du calcium relarguaient plus lentement le carbaryl que des hydrogels réticulés par du nickel.^[234]

La vitesse de relargage des hydrogels peut également être modulée en y intégrant d'autres matériaux. L'ajout d'argile, comme de la bentonite, aux alginate se montre notamment être un moyen efficace pour améliorer le relargage de certains composés bioactifs.^[235] L'ajout d'autres polymères d'origine naturelle tel que l'amidon^[236] ou l'agar^[237] permet de ralentir davantage le relargage du composé bioactif en densifiant le réseau polymérique. Il est également à noter que l'amidon est, lui aussi, largement étudié comme polymère de base pour développer des hydrogels destinés au relargage contrôlé de substances phytosanitaires.^[226, 238]

VI.2.2. Préparation de particules micro ou nanométriques à base de polysaccharides pour le relargage contrôlé d'agents phytosanitaires

Les polysaccharides d'origine naturelle peuvent également être utilisés pour préparer des particules de taille micro ou nanométriques dans le but d'encapsuler ou d'adsorber à leur surface des composés phytosanitaires afin d'en contrôler le relargage futur dans l'environnement. De nombreux travaux ont ainsi été menés afin de développer ce type de systèmes.^[239]

Comme pour la préparation d'hydrogels, un des polymères largement étudiés pour ce faire sont les alginate. Guan *et al.* proposent par exemple la synthèse de microsphères d'alginate de sodium obtenues par gélification pour l'encapsulation d'une hormone d'insecte modèle : l'ecdysone.^[240] Les auteurs ont montré que ce système permettait d'une part de moduler le

relargage de l'hormone mais, également, d'autre part, de la protéger des dégradations photochimiques.

Afin d'améliorer leur capacité de relargage, différents composés peuvent être ajoutés aux alginates lors de la préparation des particules. Flores Céspedes *et al.* ont ainsi présenté, il y a une dizaine d'années, la préparation de microsphères composées d'alginates et de différents adsorbants tels que la bentonite, l'antracite ou encore des charbons actifs pour la libération contrôlée de deux herbicides : la métribuzine et le chloridazone.^[241] Les auteurs ont logiquement montré que le caractère hydrophobe du principe actif ainsi que le type d'agent adsorbant gouvernaient la libération du composé. Des alginates ont également été utilisés en combinaison avec de l'amidon et du chlorure de calcium,^[242] ainsi qu'avec du glutaraldéhyde et de l'huile de margousier (arbre originaire d'Inde),^[243, 244] afin d'encapsuler respectivement du chlorpyrifos et de l'azadirachtine. Dans les deux cas, les auteurs ont observé une libération plus progressive, donc plus efficace, du principe actif. Parallèlement, un mélange d'alginates et de chitosan a été utilisé pour préparer des microcapsules destinées à encapsuler un insecticide, l'imidaclopride.^[245] Cette étude a montré que l'insecticide, sous cette forme, restait actif huit fois plus longtemps que sous sa forme libre. Ces observations s'expliquent non seulement par le fait que la molécule active est lentement distribuée dans l'environnement, mais également par le fait qu'elle soit protégée de la photodégradation sous sa forme encapsulée.

Comme cela a été évoqué, le chitosan, polysaccharide azoté issu de la désacétylation de la chitine, composant de l'exosquelette des crustacés et des céphalopodes, a également été utilisé pour former des particules destinées au relargage contrôlé de produits phytosanitaires. Wu *et al.* l'ont associé à du polyacrylamide pour la préparation de particules destinées au relargage d'engrais minéraux (azote, phosphore et potassium).^[246] Ce système pourrait être utilisé pour la remédiation de sols arides. En effet, non seulement les granules formées permettent un relargage progressif des fertilisants, mais ils augmentent également la capacité de rétention du sol en eau. Quinones *et al.* ont aussi utilisé ce biopolymère, réticulé par de l'acide dicarboxylique, pour la formulation de microsphères destinées au relargage de composés bioactifs.^[247]

Par ailleurs, d'autres polysaccharides biosourcés ont été étudiés. Zhong *et al.* ont en particulier développé des microparticules super-absorbantes d'amidon de maïs sulfoné et

d'acide polyacrylique afin d'y intégrer de la phosphorite.^[248] Le système ainsi formé se révèle capable de libérer de façon prolongée des phosphates dans l'environnement et présente une excellente capacité à retenir l'eau, le rendant donc potentiellement utilisable à plus grande échelle.

Différents systèmes similaires ont également été élaborés en utilisant la cellulose. Il est cependant à noter que dans la grande majorité des cas, la cellulose utilisée est préalablement modifiée chimiquement.^[226] Ces modifications altèrent grandement les performances environnementales du polymère d'origine, réduisant ainsi son intérêt face à ces différents concurrents synthétiques. El Bahri *et al.* ont par exemple préparé différentes microcapsules à base d'éthylcellulose et de différents esters de cellulose afin d'encapsuler un pesticide modèle, le benzoate d'éthyle.^[249] L'éthylcellulose a par ailleurs aussi été utilisée par Ni *et al.* pour élaborer des particules destinées à contrôler de relargage de molécules d'urée.^[250] Les auteurs ont obtenu par cette méthode des temps de relargage dépassant les 30 jours.

Des particules de tailles nanométriques ont également été préparées à partir de polysaccharides d'origine naturelle. Dos Silva *et al.* reportent par exemple la préparation de nanoparticules composées d'alginate et de chitosan destinées à encapsuler et à relarguer l'herbicide Paraquat.^[251] Les nano-objets ainsi formés présentent une taille homogène autour de 600 nm et une capacité de relargage prometteuse du principe actif. Des nanosphères composés de chitosan modifié et d'acide ricinoléique ont aussi été préparées par Feng *et al.* Ces particules comprises entre 200 et 500 nm se montrent capables de relarguer sur 11 jours l'azadirachtine.^[252]

VI.3. Les lignines

Les lignines, comme les autres biopolymères, peuvent servir à la formulation de systèmes de relargage contrôlé de produits phytosanitaires. Les différentes études proposent leur utilisation, seules ou en complément d'autres polymères, en tant que matrice support de différents pesticides.

Garrido-Herrera *et al.* rapportent, par exemple, la formulation de trois pesticides, l'isoproturon, l'imidaclopride et la cyromazine, sous forme de granules composées pour moitié de lignines Kraft.^[4] La préparation des granules s'effectue en introduisant dans un

réacteur des quantités équivalentes en masse de lignines Kraft de pin et de composé bioactif à formuler. L'ensemble est ensuite porté à une température légèrement supérieure à celle du point de fusion de la molécule active. Après refroidissement et précipitation du produit de synthèse, les particules sont tamisées pour obtenir des granules de 0,5 à 3 mm de diamètre. Les auteurs observent non seulement des taux de relargage réduit par rapport à la formulation industrielle, mais qui dépendent aussi de la taille des granules. En effet, plus les particules sont de taille importante, plus le relargage est lent. Le relargage contrôlé du fluométuron par des granules de lignines organosolv fractionnés de faible poids moléculaire a également été décrit.^[253] Les auteurs obtiennent avec ce matériau des durées de relargage dans l'environnement qui sont jusqu'à 50% plus longues qu'avec la formulation industrielle.

Par ailleurs, Fernandez-Perez *et al.* présentent un système de relargage efficace de la métribuzine, permettant une réduction de 15% de la quantité de produit nécessaire.^[254] L'herbicide est dans ce cas inclus dans une matrice mixte de taille micrométrique composée de lignines Kraft de pin et de polyéthylène glycol. Il est également noté dans la littérature que la plastification de la surface de telles granules peut permettre un contrôle plus fin du relargage d'un autre herbicide, le chloridazone.^[255] Dans ce domaine, le choix de la source de lignine mérite encore d'être étudié. En effet, du fait de leur variabilité structurale, les lignines ne vont pas toutes interagir de la même façon avec le composé bioactif, influençant par conséquent le relargage de ce dernier.^[256]

Yingxin *et al.* proposent parallèlement la préparation de microsphères, composées de lignosulfonates de sodium et de bromure de cétrimonium, destinées au relargage contrôlé d'un pesticide photosensible : l'ivermectine.^[257] Les auteurs montrent que ce système de relargage est particulièrement prometteur. En effet, après 70 h, seuls 50% de la quantité de composé bioactif de départ ont été distribués. Un autre système de microcapsules, composées d'une alternance de couches de lignosulfonates de sodium et de chitosan, a aussi été développé par Wang *et al.*^[258] en vue d'encapsuler et de relarguer un herbicide, le piclorame. Logiquement, les auteurs montrent que les temps de relargage et la photostabilité du composé bioactif augmentent avec l'augmentation du nombre de couches de polymères constituant la capsule. Par ailleurs, ces résultats démontrent que ces microcapsules multicouches à base de lignines sont également une approche prometteuse pour la libération contrôlée de composés phytosanitaires ayant une durée de vie courte dans l'environnement.

Comme cela a déjà été présenté (cf. paragraphe V.4), les lignines peuvent également potentiellement être utilisées pour la préparation de nanoparticules destinées à l'encapsulation ou au relargage de composés phytosanitaires.

Des hydrogels à base de lignines ont également été développés pour des applications agricoles, là aussi, dans le but de contrôler la libération de produits phytosanitaires. Flores-Céspedes *et al.* proposent ainsi la préparation d'hydrogels composés d'alginate et de lignines.^[259] Ce composé s'est révélé posséder une capacité de piégeage de l'azadirachtine élevée permettant ainsi une libération lente de l'insecticide dans l'environnement. De plus, l'ajout de lignine à la formulation permet également une meilleure stabilité photochimique du composé bioactif. Peng *et al.* ont parallèlement préparé des hydrogels par copolymérisation de lignines organosolv et de composés isocyanates.^[260] Les auteurs montrent que la stabilité thermique des hydrogels ainsi préparés est améliorée et que leur taux de gonflement peut être modulé en fonction du pH. La capacité du matériau à libérer du sulfate d'ammonium permet également d'envisager son utilisation pour contrôler la libération de produits phytosanitaires comme des engrais.

Objectifs du travail

Ainsi qu'en témoigne l'étude bibliographique, les lignines, par leur capacité à générer des radicaux sous irradiation lumineuse, semblent être de bonnes candidates pour le développement de nouveaux systèmes photodynamiques de lutte contre les phytopathogènes. Systèmes qui présenteraient, grâce à la non-toxicité du biopolymère, l'avantage d'être plus respectueux de l'environnement que les traitements actuellement disponibles.

De plus, les multiples fonctions alcool présentes à la surface du polymère permettent d'envisager différentes modifications chimiques des lignines en vue d'augmenter leur champ d'application. L'une des plus décrites dans la littérature est l'acétylation. Cependant, l'impact de cette réaction sur le comportement photosensible des lignines nécessite d'être plus largement décrit.

Enfin, ce biopolymère présente également l'avantage de pouvoir être mis sous forme de nanoparticules facilitant ainsi sa formulation en milieu aqueux. De plus, l'acétylation permet d'envisager la préparation de ces nanoparticules sans se soucier de l'origine des lignines.

Dans ce contexte, ce travail de thèse, en étant le premier au sein du Laboratoire PEIRENE à porter sur la synthèse de matériaux photosensibles à base de lignines, a des objectifs multiples :

- Caractériser les lignines employées lors de cette étude ;
- Étudier l'influence de l'acétylation des lignines sur leurs propriétés photosensibles ;
- Développer des méthodes de préparation de nanoparticules à partir de lignines acétylées ;
- Développer des méthodes permettant d'associer des nanoparticules de lignines à un photosensibilisateur.

Résultats et discussions

I. Caractérisation des lignines de départ

I.1. Choix et origines des lignines utilisées

Dans le cadre de ce travail, il a été choisi d'étudier deux lignines Kraft, car, provenant du procédé le plus utilisé par l'industrie papetière, elles sont disponibles en grande quantité. Une lignine organosolv a également été choisie, car cette technique de délignification présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre au laboratoire, et ainsi de prévenir toutes contaminations extérieures lors des différentes étapes d'extraction. La diversité des lignines employées permettra par ailleurs de discuter de l'influence du mode d'extraction et de l'origine biologique du polymère sur ses caractéristiques structurales.

Les deux lignines Kraft sont toutes deux issues de résineux et industriellement extraites de la liqueur noire par acidification. La première (**LK-1**) l'est par l'addition classique d'une solution d'acide, alors que la seconde (**LK-2**) l'est en employant le procédé Lignoboost.^[56, 57] Ce dernier mode d'extraction diffère principalement des autres procédés Kraft par la technique employée pour acidifier la liqueur noire. Dans ce cas, l'acidification est réalisée en y injectant du gaz carbonique. Cette méthode de précipitation plus récente (cf. paragraphe II.2) présente l'avantage d'être plus respectueuse de l'environnement en limitant l'utilisation et donc les rejets de composés acides.

La troisième lignine (**OSL**) a été extraite, au laboratoire, de sciures de châtaignier par un procédé organosolv classique employant un mélange de solvant (Figure 31).^[123, 261] Pour ce faire, les sciures sont dans un premier temps mises en présence d'une solution d'extraction composée d'éthanol et d'eau (65/35 ; v/v), à laquelle de l'acide sulfurique est ajouté en quantité catalytique. Ce mélange est ensuite porté à 160 °C pendant 2 h dans un réacteur scellé. Puis, après refroidissement, la pulpe de bois solide est séparée par filtration de la liqueur noire contenant les lignines en solution. Ces dernières sont enfin précipitées par l'ajout d'un grand volume d'eau à la solution et extraites du milieu par centrifugation.

La pureté et les caractéristiques structurales de ces trois lignines ont été déterminées par différentes méthodes chimiques, chromatographiques et spectroscopiques.

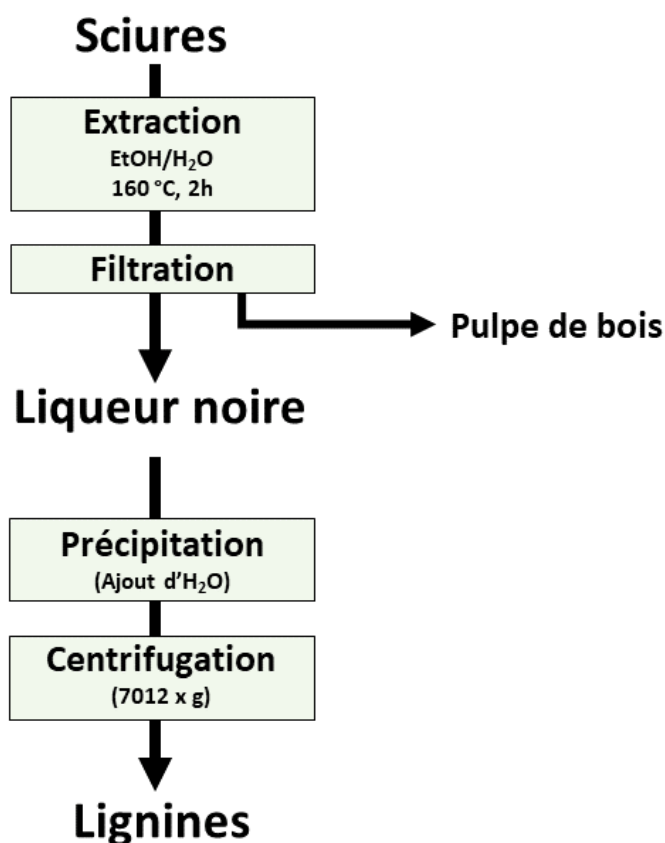


Figure 31 : Diagramme d'extraction de la lignine **OSL**.

I.2. Composition chimique

Tout d'abord, le taux de cendres de chaque lignine de départ a été déterminé. Pour ce faire, chaque échantillon a été calciné à une température de 575 °C selon le protocole NERL/TP-510-44622^[74] afin de déterminer la masse de la fraction minérale qu'il renferme. Parallèlement, le taux de lignines totales contenues dans chaque échantillon a été mesuré par la méthode chimique du dosage de Klason, normalisé selon le protocole NERL/TP-510-42618.^[77] Selon cette procédure, les lignines sont hydrolysées par une solution d'acide sulfurique. Puis, les quantités de biopolymères présentes dans chacune des phases résultant de ce traitement chimique sont déterminées. Les lignines contenues dans la phase solide sont nommées « lignines insolubles dans l'acide » (AIL), tandis que les lignines contenues dans la phase aqueuse sont définies comme « lignines solubles dans l'acide » (ASL). La quantité totale de lignines est quant à elle exprimée comme la somme des lignines solubles et insolubles.

La composition chimique des différentes lignines utilisées dans cette étude est résumée dans le Tableau 9. Ces résultats sont, dans leur ensemble, conformes à ceux décrits dans la littérature pour chaque type de lignine extraite.^[57, 78]

Tableau 9 : Composition chimique des lignines de départ.

Lignine	AIL (%) ^a	ASL (%) ^b	Taux de cendres (%)	Taux de lignines totales (%) ^c	Total (%) ^d
LK-1	87,97	4,83	2,53	92,80	95,33
LK-2	92,60	2,33	0,38	94,93	95,31
OSL	74,99	7,40	1,65	82,39	84,04

^a : Taux de lignines insolubles dans l'acide ;

^b : Taux de lignines solubles dans l'acide ;

^c : AIL + ASL ;

^d : AIL + ASL + taux de cendres.

LK-1 et **LK-2** présentent toutes deux des taux de lignines totaux similaires, mais supérieurs d'environ 10% à ceux de la lignine organosolv **OSL**. Il est également à noter que la répartition de la lignine **OSL** dans les phases solide et liquide est différente de celle des deux autres lignines. En effet, elle présente non seulement un pourcentage plus élevé de lignines ASL, mais également un taux de lignines AIL plus faible que ceux observés pour les lignines Kraft. Cette différence semble donc indiquer que ces deux dernières lignines contiennent moins de fragments de faible poids moléculaire que la lignine **OSL**.

En ce qui concerne le taux de cendres des lignines étudiées, **LK-2** présente un très faible taux de composés inorganiques (0,38% en masse), tandis que des taux de 2,53% et de 1,65% en masse ont été respectivement déterminés pour **LK-1** et **OSL**. La différence de taux de cendres entre les deux lignines kraft est essentiellement due à la méthode de délignification employée. En effet, dans le cas des lignines obtenues par le procédé Lignoboost (**LK-2**), aucun composé inorganique n'est ajouté lors de la précipitation alors que dans le cas des lignines **LK-1**, la précipitation est provoquée par l'ajout d'un acide minéral.

Enfin, ces analyses révèlent que l'échantillon **OSL** contient une fraction organique non ligneuse plus élevée que celle de **LK-1** et de **LK-2**. Ici, la méthode d'extraction utilisée est probablement également responsable de cette différence.

I.3. Masses molaires

Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) et en masse (M_w) des trois lignines utilisées ont été déterminées d'après les chromatogrammes de chaque polymère, obtenus par chromatographie d'exclusion stérique (Figure 32). Les indices de polydispersité ($PDI = M_w / M_n$) de chacune des lignines ont également été calculés, et l'ensemble de ces résultats est regroupé dans le Tableau 10. Il est primordial de noter que ces analyses ont été effectuées sur des matériaux préalablement acétylés, selon le protocole décrit dans le chapitre suivant (paragraphe II.2), afin de permettre leur solubilisation dans le solvant d'élution, le THF.^[101]

Tableau 10 : Masses molaires et indices de polydispersité des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** après acétylation.

Lignine	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	PDI
LK-1	4300	13 100	3,1
LK-2	4200	9900	2,3
OSL	3900	7700	1,5

La lignine **OSL** présente une masse molaire M_n de 3900 g.mol⁻¹ et une masse molaire M_w de 7700 g.mol⁻¹, valeurs proches de celles décrites par Constant *et al.*^[261] bien qu'inférieures à celles des deux autres lignines Kraft. Ces résultats, en accord avec la littérature,^[75] confirment les observations précédemment faites suite au dosage de Klason. En effet, les lignines obtenues par les procédés Kraft affichent généralement de plus hauts poids moléculaires que leurs homologues obtenues par des procédés organosolv. Cette caractéristique structurale est

directement liée à la sévérité de ce type de prétraitement, ceux-ci pouvant engendrer une plus grande fragmentation du polymère que les procédés alcalins.

Bien que des valeurs de masse molaire similaires aient déjà été rapportées pour des lignines Kraft de résineux acétylées,^[262] il est à noter que **LK-1** et **LK-2** affichent toutes deux des masses molaires M_n et M_w relativement plus élevées, que celles généralement décrites dans la littérature pour ce type de polymère.^[101]

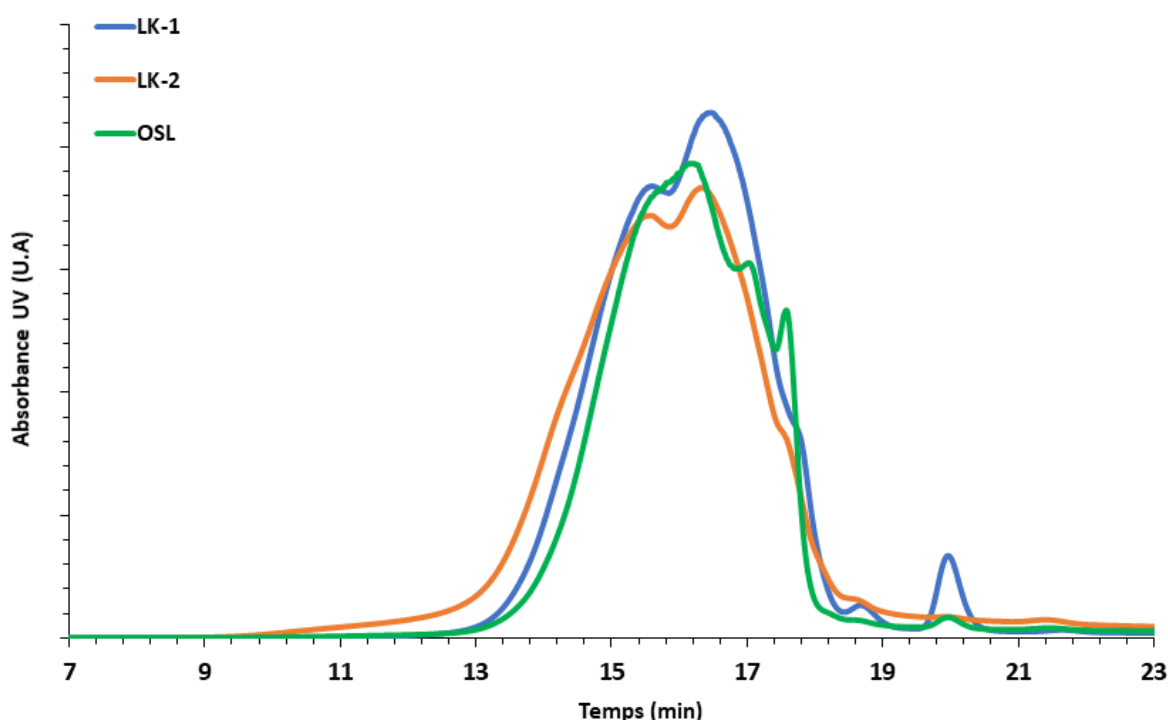


Figure 32 : Chromatogrammes des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** après acétylation obtenues par chromatographie d'exclusion stérique.

I.4. Analyse structurale des lignines par spectroscopie infrarouge

Afin d'obtenir davantage d'informations sur la structure des trois lignines de départ, ces dernières ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Les spectres obtenus sont présentés en Figure 33.

Comme attendu, toutes les lignines présentent sur leur spectre respectif des bandes d'absorption caractéristiques des lignines,^[88] avec notamment une large bande correspondant aux vibrations de valence des liaisons O-H entre 3650 et 3100 cm^{-1} et des bandes plus fines entre 3000 et 2800 cm^{-1} , caractéristiques de l'élongation des liaisons C-H aliphatiques. Les signaux situés à 1592 , 1508 et 1420 cm^{-1} et ceux observés à 1420 cm^{-1}

correspondent respectivement aux vibrations des cycles aromatiques et à la déformation des liaisons C-H aliphatiques.

Certaines de ces bandes reflètent également les différences de composition monomérique entre les trois lignines étudiées, induites par leurs différences d'origine botanique. En effet, la bande à 1266 cm^{-1} , caractéristique des vibrations de déformation des cycles gaïacyles, bien qu'observée pour les trois lignines est cependant de plus faible intensité dans le cas de la lignine **OSL**, ce qui laisse penser que cette lignine contient une plus faible proportion de ce motif que **LK-1** et **LK-2**. Par ailleurs, l'absence de bande sur les spectres de **LK-1** et de **LK-2** à 1325 cm^{-1} , caractéristique des vibrations de déformation des cycles syringyles, révèle l'absence de ce motif dans ces lignines, contrairement à **OSL** qui présente cette bande sur son spectre.

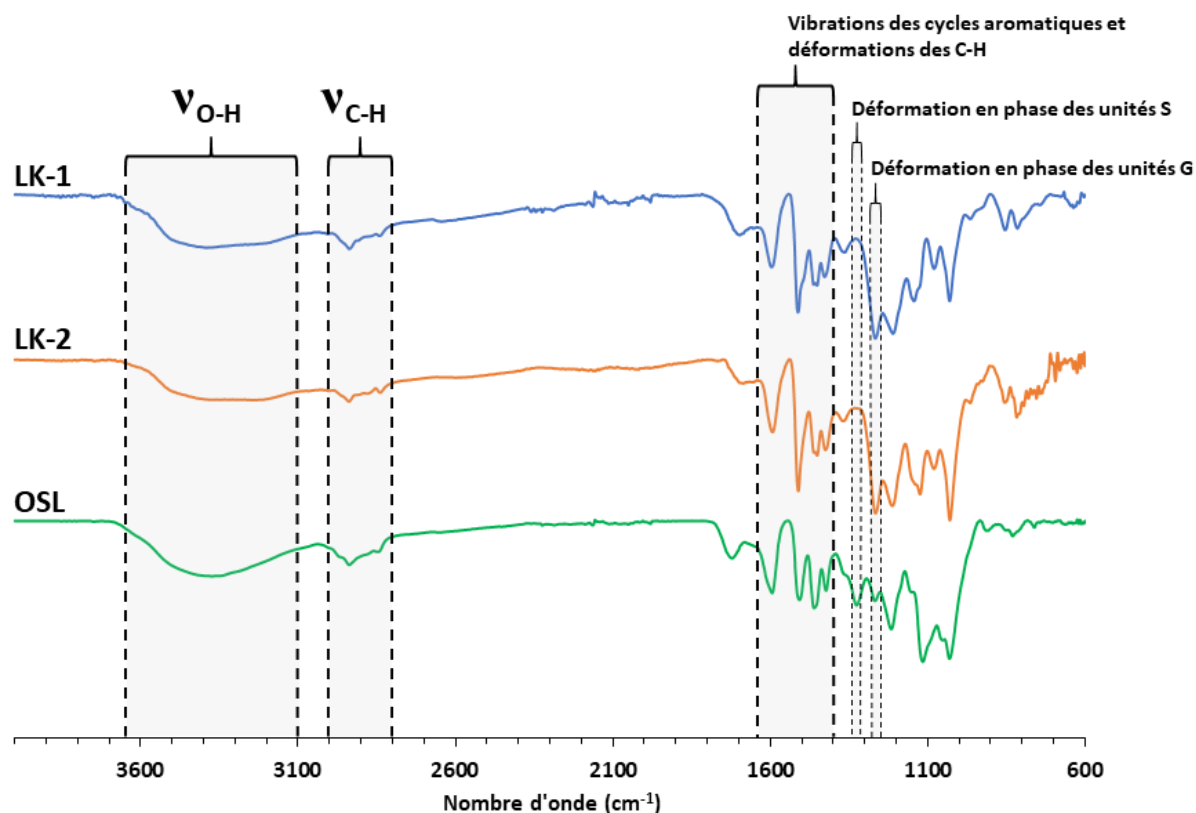


Figure 33 : Spectres IRTF des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL**.

I.5. Analyse structurale des lignines par spectroscopie RMN

I.5.1. RMN du phosphore

Les alcools aliphatiques et phénoliques, ainsi que les acides carboxyliques présents au sein de la structure des trois lignines d'intérêt ont été caractérisés et quantifiés par spectroscopie RMN du phosphore.

Afin de permettre leur analyse, les polymères ont dû subir une phosphorylation préalable. Cette dernière a été réalisée en employant du 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane selon la méthode développée par Granata et Argyropoulos.^[263] Afin de quantifier les différentes fonctions chimiques, du cyclohexanol a été utilisé comme étalon interne. L'ensemble des résultats obtenus, présentés dans le Tableau 11, sont cohérents avec la littérature.^[75] Comme attendu, les spectres des différentes lignines (Figure 34), présentent tous les signaux typiques des fonctions alcool et acide carboxylique phosphorylée par le TMDP entre 134 et 150 ppm.

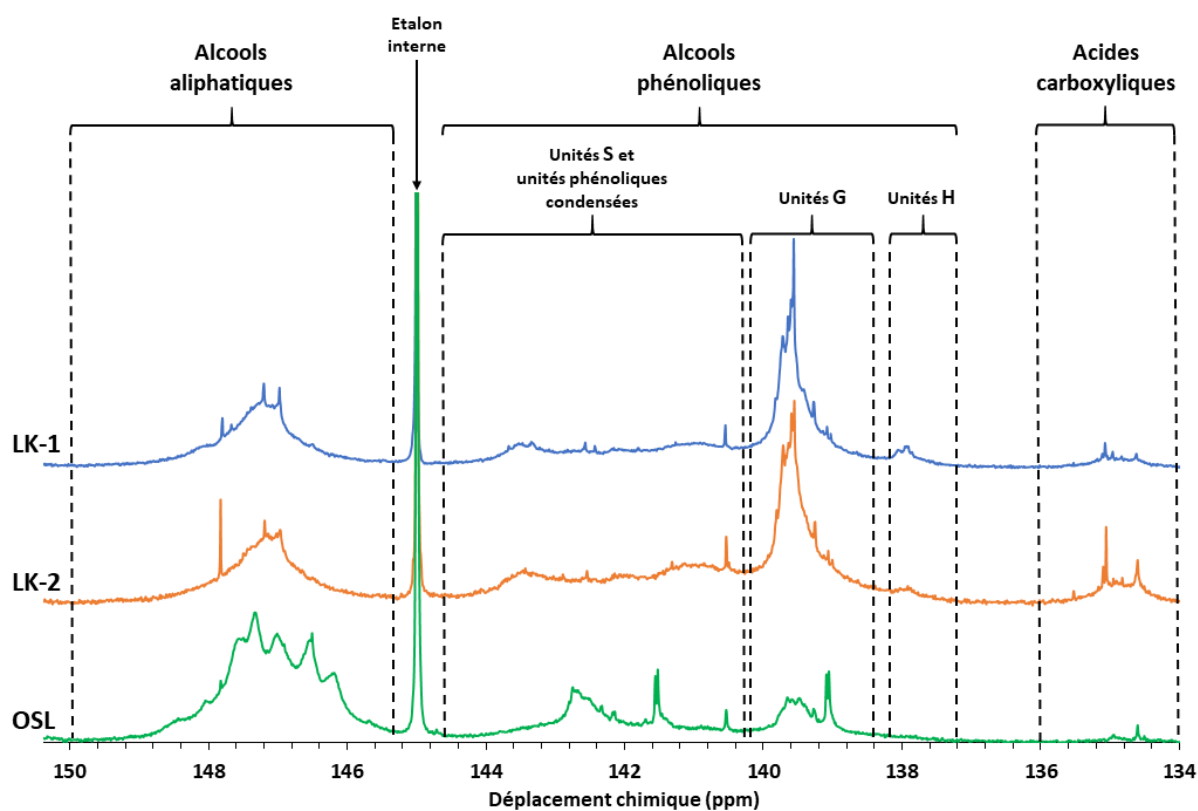


Figure 34 : Spectres RMN ^{31}P des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** fonctionnalisées par le TMDP.

Il est à noter que les trois lignines étudiées présentent des ratios d'alcools aliphatiques / phénoliques différents. Cette variabilité, déjà décrite dans la littérature,^[75, 81, 264] est principalement due à la différence de sévérité des procédés de délignification employés pour l'obtention de chacun des polymères.

La spectroscopie RMN ³¹P met également clairement en évidence le fait, qu'en fonction de leurs origines botaniques, les lignines présentent différents types d'alcools phénoliques dans des proportions variables (Tableau 11).

Tableau 11 : Quantité de fonctions alcool et acide carboxylique présentes dans les lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL**.

Fonction	LK-1	LK-2	OSL	Zone d'intégration (ppm)
COOH (mmol.g⁻¹)	0,21	0,07	0,30	134,0 – 136,0
OH_(S) (mmol.g⁻¹)	1,57	1,90	1,70	140,1 - 144,5
OH_(G) (mmol.g⁻¹)	1,83	1,81	0,71	138,2 – 140,1
OH_(H) (mmol.g⁻¹)	0,25	0,21	0,08	136,9 – 138,2
Total OH_(Ph) (mmol.g⁻¹)	3,65	3,02	2,49	138,2 - 144,5
OH_(Al) (mmol.g⁻¹)	1,93	1,32	2,61	150,0 – 145,5
Total OH (mmol.g⁻¹)	5,58	4,34	5,14	-

OH_(S): Fonction alcool portée par les unités syringyles ;

OH_(G): Fonction alcool portée par les unités guaiacyles ;

OH_(H): Fonction alcool portée par les unités p-hydroxyphényles ;

OH_(Ph): Fonction alcool phénolique ;

OH_(Al): Fonction alcool aliphatique.

En effet, les lignines de résineux **LK-1** et **LK-2** présentent un plus fort taux d'alcools porté par les unités guaiacyles (OH_(G)) et un plus faible taux d'alcool porté par les unités syringyles (OH_(S))

que les lignines de châtaignier **OSL**. Cette observation est par ailleurs en accord avec celle faite précédemment à la suite de l'interprétation des spectres infrarouge des lignines. Il est aussi à noter que les protolignines des résineux ne contenant pas d'unité syringyle, caractéristique également observable sur les spectres IRTF présentés précédemment, les signaux observés sur les spectres des lignines **LK-1** et **LK-2** entre 140,1 et 144,5 ppm sont donc à attribuer à des motifs phénoliques condensés. L'analyse des spectres RMN ^{31}P révèle également que les trois lignines ne présentent que de faibles proportions d'alcools phénoliques portées par les unités p-hydroxyphényles ($\text{OH}_{(\text{H})}$), ce qui est logique puisque de fortes proportions de ces alcools ne sont essentiellement observés que chez les angiospermes monocotylédones.^[13] Enfin, ces analyses montrent également que les lignines, aussi bien Kraft qu'organosolv, contiennent toutes une quantité non négligeable de fonctions acide carboxylique.

I.5.2. RMN du proton

En parallèle des analyses précédentes, la quantité de groupes méthoxy présents sur chaque lignine a été évaluée par RMN du proton. Ces analyses ont été effectuées selon la méthode proposée par Abreu et Freire^[92] sur des matériaux préalablement acétylés.

Le taux de méthoxy le plus important, 18,80% en masse, est logiquement obtenu pour la lignine **OSL**. En effet, cette lignine de feuillus est, comme cela a été montré par les spectroscopies RMN ^{31}P et IRTF, celle qui contient le plus grand nombre d'unités syringyles, et donc par conséquent le plus grand nombre de groupements méthoxy. **LK-1** et **LK-2** présentent quant à elles respectivement des taux de groupement méthoxy de 10,70%, et 15,30% en masse.

I.5.3. Composition élémentaire

La caractérisation des lignines utilisées a été complétée par l'analyse élémentaire de ces dernières. Les lignines **LK-1** et **LK-2** présentent des compositions élémentaires très proches, à l'exception de leur taux de carbone. En effet, **LK-2** présente un pourcentage massique de carbone plus élevé (69,5%) que celui de **LK-1** (59,1%). Cette différence s'explique principalement par le fait que ces deux biopolymères contiennent des proportions de groupements méthoxy différentes (cf. paragraphe I.2 de l'état de l'art). Ainsi, **LK-2**, en en

contenant le plus grand nombre, possède logiquement une fraction massique de carbone plus importante. **OSL**, quant à elle, présente une composition élémentaire relativement différente de celle des deux autres lignines avec, en particulier, un taux de carbone plus faible et un taux d'oxygène plus élevé. Ces différences s'expliquent par sa composition en monolignol sensiblement différente de celle des deux autres lignines. En effet, en incluant une part plus importante d'unités syringyles dans sa composition, la lignine **OSL** contient par conséquent une plus forte proportion d'oxygène, et donc de fait une proportion moindre en carbone, que ses homologues issues de résineux.

Les teneurs en soufre des lignines **LK-1** et **LK-2** sont similaires, de l'ordre de 1,4% en masse, alors qu'aucune trace de soufre n'est détectée pour la lignine organosolv. Cette différence reflète ici clairement l'utilisation de réactifs de délignification soufrés par les procédés Kraft. Enfin, de faibles quantités d'azote ont été détectées dans les lignines **LK-1** et **OSL**, tandis que **LK-2** ne semble pas en contenir, ces dernières observations s'expliquant par les origines végétales différentes des lignines.

À partir de ces données et des taux de groupements méthoxy obtenus par RMN du proton, la formule en C₉ des lignines, formule brute dont la stœchiométrie du carbone est fixée à 9 (cf. paragraphe III.1.1.4 de l'état de l'art), a été calculée. Ces formules, ainsi que les résultats détaillés des analyses centésimales de chaque échantillon, sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Composition élémentaire et formule C₉ des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL**.

Lignine	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)	S (%)	Formule C ₉
LK-1	59,1	5,4	27,0	0,8	1,4	C ₉ H _{8,5} O _{2,6} N _{0,1} S _{0,1} (OMe) _{0,7}
LK-2	69,5	5,8	26,5	0,0	1,4	C ₉ H _{7,3} O ₂ S _{0,1} (OMe) _{0,8}
OSL	55,4	5,7	33,2	0,2	0,0	C ₉ H _{8,5} O ₃ N _{0,03} (OMe) _{1,4}

I.6. Conclusion

Les résultats des analyses effectuées sur les trois lignines d'intérêt reflètent clairement leurs différences d'origines biologique et industrielle. En effet, étant toutes deux issus de résineux, **LK-1** et **LK-2** présentent logiquement des compositions monomériques similaires. En outre, du fait de la différence de mode de précipitation employé pour extraire chacune d'elles, **LK-1** affiche un taux de cendres beaucoup plus élevé que son homologue **LK-2**.

Par ailleurs, étant non seulement issue de bois de feuillus, mais l'étant également par un procédé de délignification différent de celui des lignines Kraft, les caractéristiques de la lignine **OSL** diffèrent, comme attendu, plus sensiblement de celle des deux autres lignines. Les spectroscopies RMN ^{31}P et IRTF révèlent clairement la différence d'origine botanique, tandis que le taux de soufre et les masses molaires de cette lignine sont des marqueurs clairs du procédé d'extraction organosolv.

II. Étude des propriétés photosensibles des lignines acétylées

II.1. Introduction

Une des modifications chimiques des lignines les plus largement décrite dans la littérature est leur acétylation (cf. paragraphe IV.2.1.1 de l'état de l'art) ; cette fonctionnalisation étant généralement menée en vue d'intégrer par la suite le biopolymère dans une matrice plastique^[265-267] ou dans le cadre d'analyses structurales.^[92, 101, 268] En conséquence, la synthèse et les propriétés physicochimiques de ces biomatériaux modifiés ont largement été étudiées.^[52, 269, 270] Par ailleurs, leurs propriétés photochimiques le sont sensiblement moins. Certaines études,^[38, 49] plus largement présentées en partie I.4 de l'état de l'art, ont cependant montré qu'après la protection des groupements hydroxyles des lignines par acétylation, le polymère ainsi modifié ne produit plus de radicaux de type quinone. De plus, une étude récente montre que les lignines non modifiées possèdent une activité antioxydante plus importante que celles ayant subi une acétylation.^[113]

Il semble donc que l'acétylation modifie le comportement radicalaire des lignines. Suite à cette constatation, il a été décidé d'étudier plus en détail le caractère photosensible des lignines acétylées et plus particulièrement leur capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sous irradiation lumineuse. Les résultats de ces travaux sont présentés dans ce chapitre.

II.2. Synthèse et caractérisation des lignines acétylées

Les trois lignines de départ **LK-1**, **LK-2** et **OSL** ont été acétylées par une méthode classiquement décrite dans la littérature.^[160, 267] Les lignines sont, dans un premier temps, introduites dans un mélange équivolumique de pyridine et d'anhydride acétique à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 48 h (Figure 35). Puis, en fin de réaction, les lignines modifiées sont récupérées par précipitation dans l'eau glacée, et par filtration. Après lavage et séchage, les matériaux finaux, respectivement nommés **AcLK-1**, **AcLK-2** et **AcOSL**, sont obtenus avec des rendements massiques de 108, 105 et 96%.

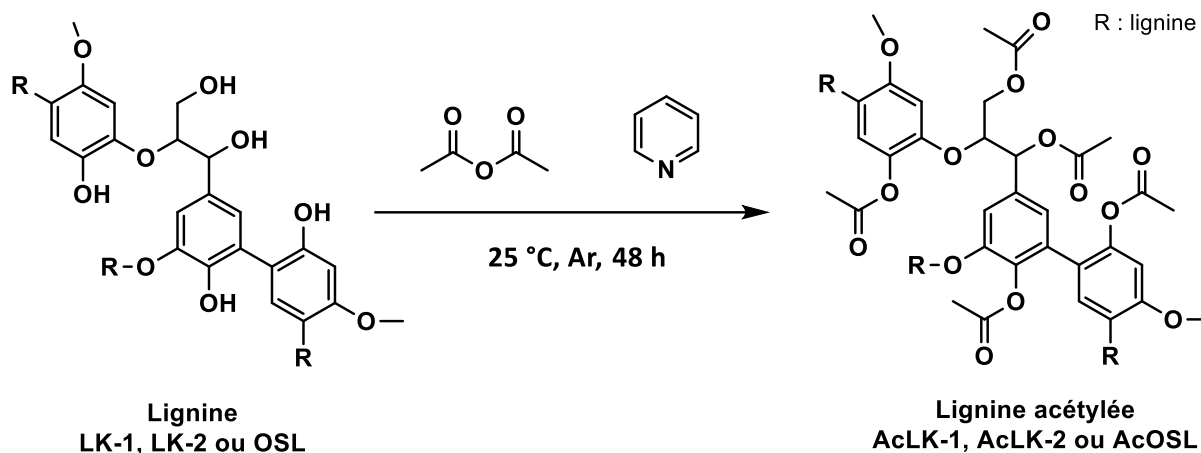


Figure 35 : Acétylation des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL**.

L'analyse des spectres IRTF des produits **AcLK-1**, **AcLK-2** et **AcOSL** (Figure 36) montre des signes non équivoques d'acétylation avec notamment l'apparition de trois nouvelles bandes majeures à 1761, 1739 et 1190 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations de valence des liaisons C=O des esters aromatiques, aux vibrations de valence des liaisons C=O des esters aliphatiques et aux vibrations de valence des liaisons C-O ester nouvellement formées.^[271]

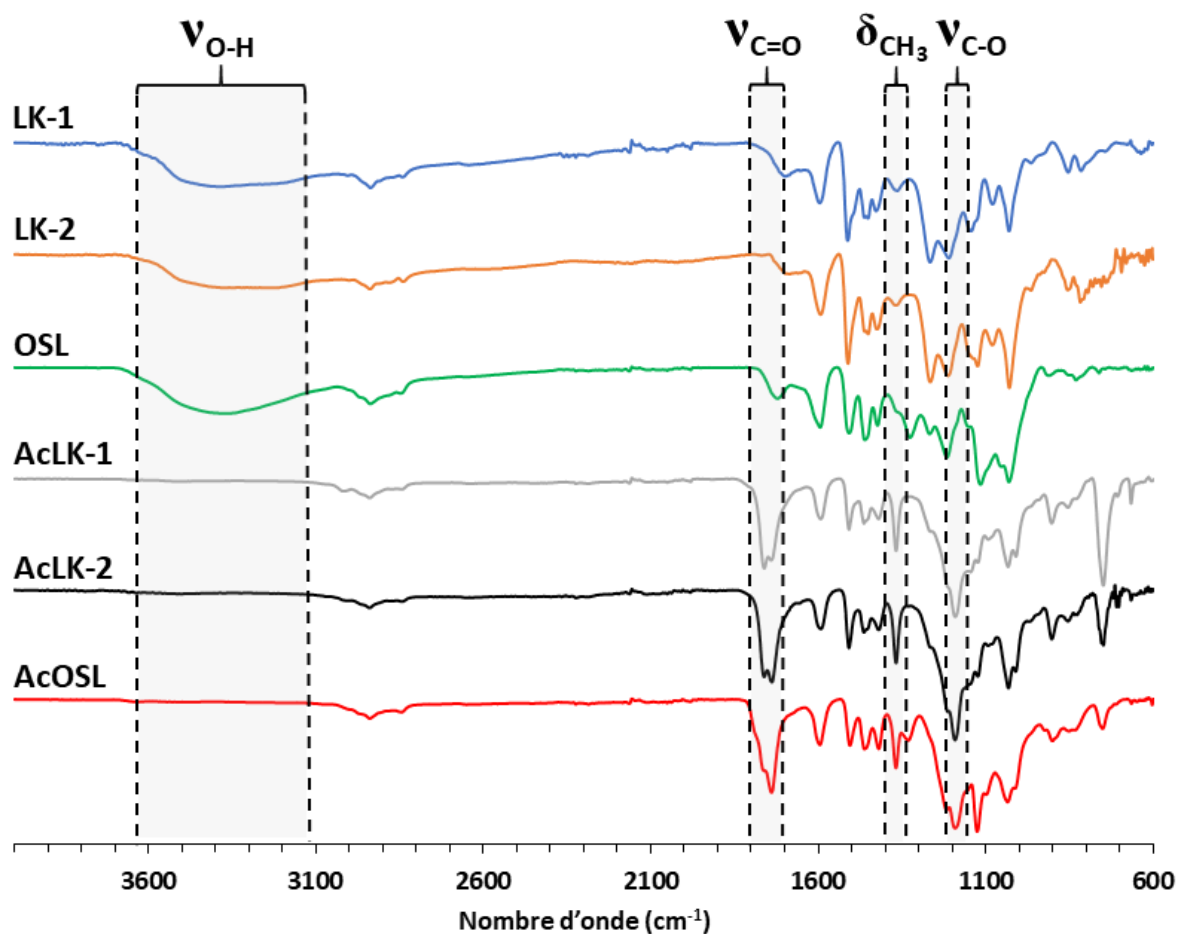


Figure 36 : Spectres IRTF des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** avant et après acétylation.

De plus, la disparition de la large bande caractéristique des liaisons O-H entre 3100 et 3600 cm^{-1} , ainsi que l'augmentation de l'intensité de la bande correspondant aux vibrations de déformation des liaisons C-H des CH_3 à 1370 cm^{-1} sur les spectres des lignines modifiées, mettent également clairement en évidence l'estérification des fonctions hydroxyle des lignines.

Par ailleurs, aucun signal correspondant aux fonctions alcools phosphorylés n'est observé sur les spectres RMN ^{31}P des produits **AcLK-1**, **AcLK-2** et **AcOSL** (Figure 37). Ces observations, déjà décrites dans la littérature,^[83, 162] confirment que tous les groupements hydroxyles aliphatiques et phénoliques présents à l'origine sur les lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** ont bien été fonctionnalisés. Ces résultats sont en outre cohérents avec la quantité d'anhydride acétique utilisée (24 équivalents). En effet, cette dernière est sensiblement plus élevée que la quantité minimale de trois équivalents nécessaire à l'acétylation totale des lignines, récemment décrite par Buono *et al.*^[83]

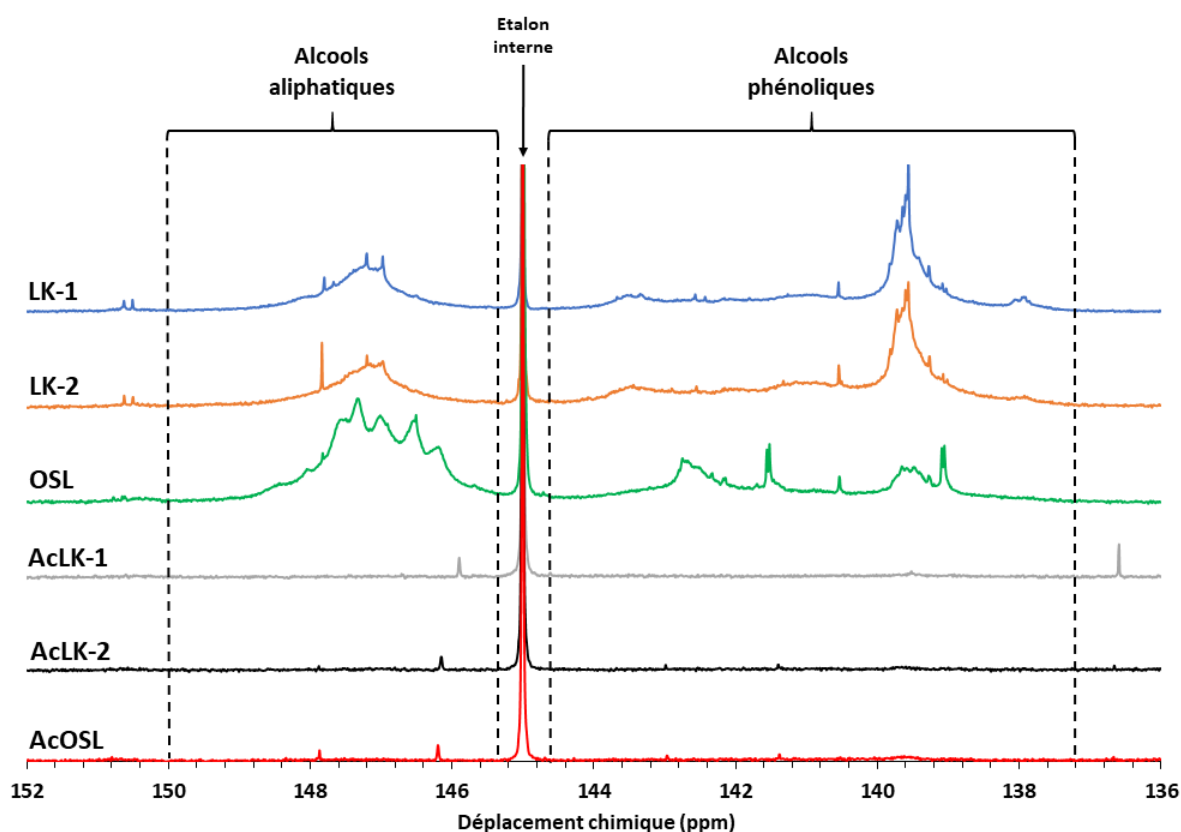


Figure 37 : Spectres RMN ^{31}P des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** fonctionnalisées par le TMDP avant et après acétylation.

II.3. Étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les lignines de départ et acétylées

La capacité des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** à produire des espèces réactives de l'oxygène, ainsi que celle de leurs homologues acétylées, a été évaluée dans des conditions d'obscurité et d'exposition à la lumière. En effet, cette capacité, si elle est avérée, ferait des matériaux étudiés des composés photosensibles, ceci ouvrant tout un champ des possibles quant à leurs applications futures.

De manière générale, les composés dits photosensibles peuvent, suite à leur photoactivation, subir un croisement inter-système vers l'état triplet (T_1), puis revenir à l'état fondamental (S_0) suite à une interaction particulière avec leur environnement selon deux voies (Figure 38). La première implique un transfert d'électron photoinduit (nommé transfert de type I) mettant en jeu des substrats présents dans l'environnement comme des molécules de dioxygène. Ce transfert génère des radicaux tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou le radical hydroxyle ($\bullet OH$). La seconde voie implique, quant à elle, un transfert d'énergie avec le dioxygène (transfert de type II) conduisant à la production d'oxygène singulet (1O_2).^[272] Ces deux types de transferts sont représentés dans la figure ci-dessous.

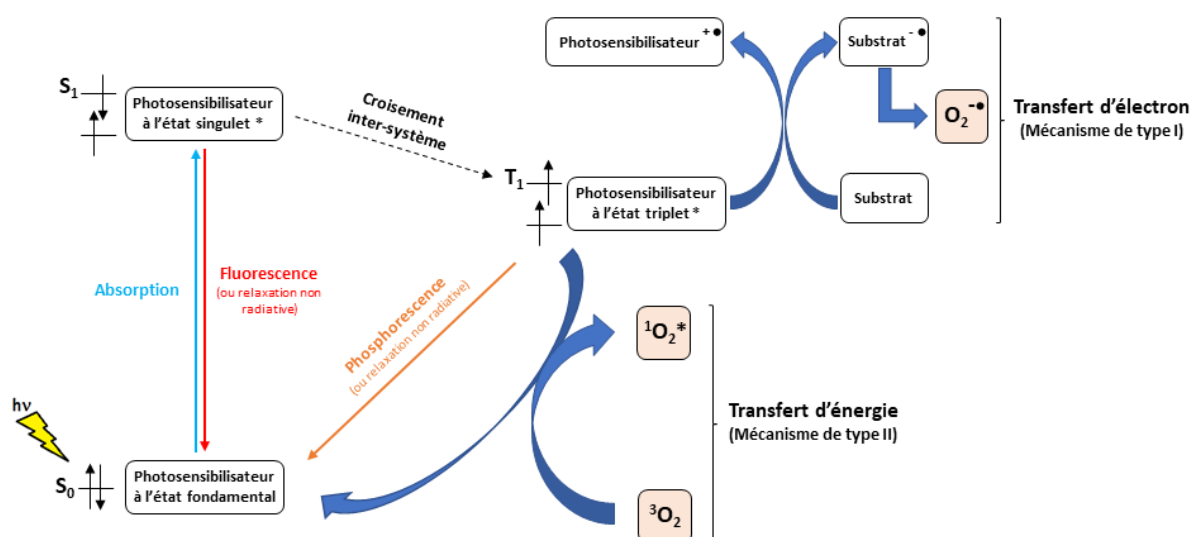


Figure 38 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié et interactions avec leur environnement de molécules photosensibles.

Pour détecter la production d' $O_2^{\bullet-}$ (révélatrice du transfert de type I) et celle d'oxygène singulet (caractéristique du transfert de type II), la spectroscopie de résonance

paramagnétique électronique (RPE) a été utilisée. Cependant, la nature non radicalaire de l'oxygène singulet et la faible durée de vie de l'anion superoxyde empêchent leur observation directe par cette technique d'analyse. Des piègeurs spécifiques à ces deux molécules, la 2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridone (TEMP) pour $^1\text{O}_2$ et la 5,5-diméthyl-1-pyrroline (DMPO) pour $\text{O}_2^{\cdot-}$, ont donc été employés. La concentration des adduits résultant de l'association de ces piègeurs avec les espèces à détecter, respectivement nommés TEMPO (Figure 39) et DMPO-OOH (Figure 40), peut alors être suivie au cours du temps.

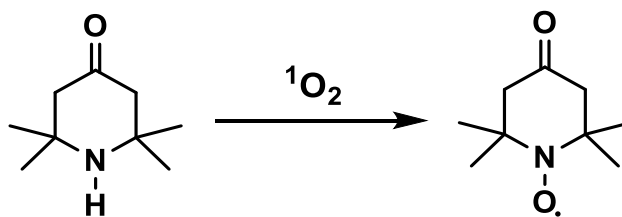


Figure 39 : Réaction de piégeage de $^1\text{O}_2$ par la TEMP.

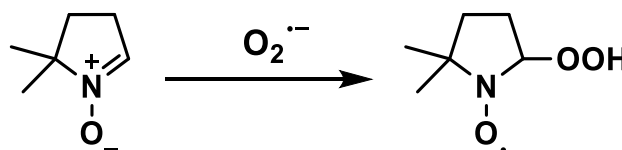


Figure 40 : Réaction de piégeage de $\text{O}_2^{\cdot-}$ par la DMPO.

II.3.1. Étude de la production d'oxygène singulet

La production d'oxygène singulet par les différentes lignines a été mesurée selon un protocole adapté de celui mis au point par Riou *et al.*^[272] En effet, pour des raisons de solubilité des matériaux, le N,N-diméthylformamide (DMF) a dû être utilisé comme solvant. Pour chaque lignine, une solution contenant 4 g.L^{-1} de matériau, ainsi qu'une solution à 25 mM de TEMP dans le même solvant ont été préparées. Juste avant la mesure, un mélange équimolaire des deux solutions est réalisé et placé dans un tube de mesure scellé qui sera ensuite, soit placé à l'obscurité, soit irradié sous une lumière blanche (lampe halogène). La quantité de TEMPO, et donc d'oxygène singulet, a ensuite été régulièrement mesurée par spectroscopie RPE. L'ensemble des résultats est reporté en Figure 41.

En absence d'irradiation lumineuse, aucun signal RPE caractéristique de la production d'oxygène singulet n'est détecté, que ce soit pour les lignines **LK-1**, **LK-2** ou **OSL** ou pour leurs

homologues acétylés. Cette expérience sert essentiellement de contrôle, la production d'oxygène singlet par mécanisme de type II ne pouvant se faire que suite à une excitation lumineuse.

À l'inverse, lorsque les lignines de départ **LK-1**, **LK-2** et **OSL** sont exposées à la lumière, une production d'oxygène singlet est détectée. Ces observations sont en accord avec celles déjà reportées dans la littérature (cf. paragraphe I.4.3 de l'état de l'art), selon lesquelles les lignines sont capables de subir un mécanisme de type II après irradiation lumineuse.^[273, 274]

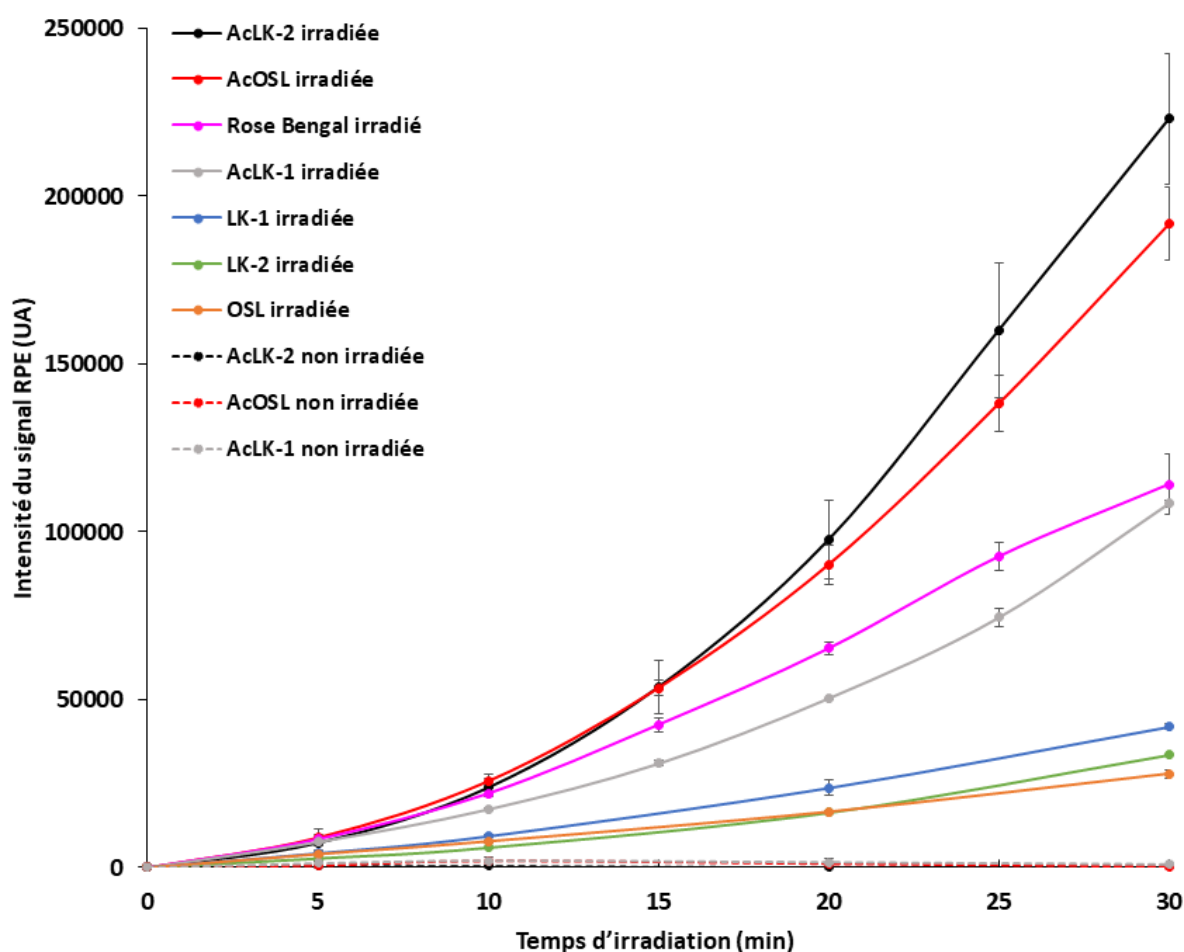


Figure 41 : Évolution du signal RPE du radical TEMPO en fonction du temps d'irradiation en présence ou non d'une source lumineuse pour les composés **LK-1**, **LK-2**, **OSL**, **AcLK-1**, **AcLK-2**, **AcOSL**, en solution dans le DMF à $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, et pour le rose Bengale en solution dans le DMF à $1,5\ \mu\text{M}$.

De façon plus surprenante, une augmentation importante du signal RPE de TEMPO et, par conséquent, de la production d'oxygène singlet, est enregistrée dans le cas des biopolymères acétylés. En effet, cette production est dix fois plus importante pour les matériaux **AcLK-2** et **AcOSL** que celles respectivement observées pour **LK-2** et **OSL**. En ce qui concerne **AcLK-1**, cette

production est, certes, moins importante que les deux précédemment citées, mais reste quand même cinq fois supérieure à celle détectée pour **LK-1**.

Ces résultats mettent en évidence la capacité des lignines modifiées à produire de l'oxygène singulet à la suite d'une photoactivation. Ces matériaux sont donc photosensibles au même titre que des photosensibilisateurs largement décrits dans la littérature comme le rose Bengale.^[275, 276] Une solution de rose Bengale à 1,5 μM a en outre été soumise au même protocole et présente une capacité à produire de l'oxygène singulet analogue à celle des solutions de lignines acétylées à 2 g.L^{-1} (Figure 41).

Par ailleurs, le rendement quantique de production d'oxygène singulet, Φ_{Δ} , a été déterminé pour le matériau **AcOSL** dans le DMF en collaboration avec le Dr M. Williams (HIMS, Université d'Amsterdam), par observation directe de l'émission de phosphorescence de $^1\text{O}_2$ à 1270 nm après excitation à 350 nm. Une valeur de 0,17 +/- 0,03 a ainsi pu être mesurée, en utilisant une phtalocyanine zinguée (No CAS : 14320-04-8) comme référence ($\Phi_{\Delta} = 0,55$ dans le DMF). L'acétylation semble donc avoir un rôle clé dans la production d'oxygène singulet. Cette différence dans la capacité des lignines natives et acétylées à produire de l'oxygène singulet peut probablement être expliquée par l'activité antioxydante du biopolymère. En effet, grâce à leurs fonctions phénol, les lignines non modifiées **LK-1**, **LK-2** et **OSL** sont capables de piéger une grande partie de l'oxygène singulet formé avant même qu'il puisse être piégé par la TEMP et donc détecté par spectroscopie RPE. En revanche, dans le cas des matériaux modifiés, les fonctions phénoliques sont bloquées par des groupements acétyles, l'oxygène singulet généré va donc pouvoir être piégé par la TEMP et ainsi être détecté par spectroscopie RPE.

II.3.2. Production d'anion superoxyde

La production d'anion superoxyde par les différentes lignines a également été suivie au cours du temps selon le protocole mis au point par Riou *et al.*^[272] Pour chaque lignine, une solution contenant 4 g.L^{-1} de matériau, ainsi qu'une solution à 450 mM de DMPO dans le même solvant, un mélange DMSO/ H_2O (90/10 ; v/v), ont été préparées. Juste avant la mesure, un mélange équimolaire des deux solutions est réalisé et placé dans un tube de mesure scellé qui sera ensuite, soit placé à l'obscurité, soit irradié sous une lumière blanche (lampe halogène). La quantité de DMPO-OOH, et donc d'anion superoxyde, a ensuite été régulièrement mesurée par spectroscopie RPE. L'ensemble des résultats est reporté en Figure 42.

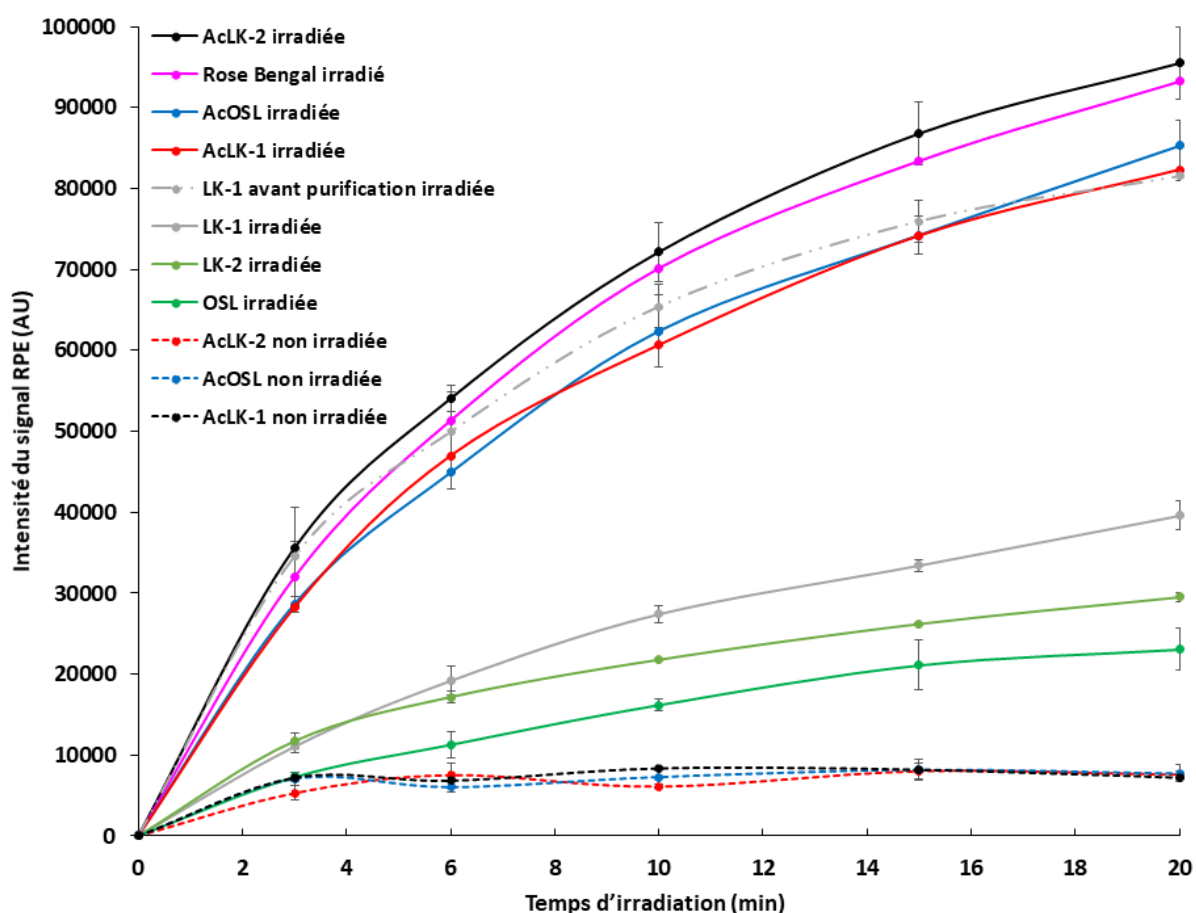


Figure 42 : Évolution du signal RPE du radical DMPO-OOH en fonction du temps d'irradiation en présence ou non d'une source lumineuse pour les composés **LK-1**, **LK-2**, **OSL**, **AcLK-1**, **AcLK-2**, **AcOSL**, en solution dans un mélange DMSO/H₂O (90/10 ; v/v) à 2 g.L⁻¹, et pour le rose Bengale en solution dans un mélange DMSO/H₂O (90/10 ; v/v) à 10 μM.

Une augmentation de la production d'anion superoxyde a été observée pour les six lignines étudiées, acétylées ou non, sous irradiation lumineuse par rapport à leur production respective à l'obscurité. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, la formation de radicaux libres lors de la photodégradation de matériaux contenant des lignines y est déjà bien décrite.^[49] Humar *et al.*^[106] ont plus précisément montré, en utilisant la spectroscopie RPE, que des anions hydroxydes et hydroperoxydes, espèces formées à partir de l'anion superoxyde, sont générés lorsque des lignines sont exposées à une irradiation lumineuse. Il est cependant à noter que la production d'anion superoxyde est trois fois plus élevée dans le cas des matériaux acétylés que dans le cas des lignines de départ, à l'exception du couple **AcLK-1** / **LK-1**. En effet, dans ce cas, la lignine de départ affiche une production aussi importante que celle totalement acétylée. Afin de vérifier si ce comportement original est dû à une impureté provenant du procédé de délignification, la lignine **LK-1** a été purifiée par

précipitation acide (cf. partie matériel et méthodes), puis sa production d'anion superoxyde de nouveau mesurée. L'intensité du signal RPE obtenu fut alors comparable à celui des deux autres lignines de départ **LK-2** et **OSL**, confirmant donc que la production précédemment observée était en partie causée par une pollution industrielle.

En outre, comme le montre la Figure 42 la production des lignines acétylées est comparable à celle d'une solution à 10 μM de rose Bengale. Comme dans le cas de l'oxygène singulet, l'acétylation des fonctions antioxydantes des lignines, en prévenant le piégeage des espèces radicalaires, semble grandement faciliter la diffusion de l'anion superoxyde dans le milieu environnant.

De plus, sans irradiation lumineuse, aucun signal RPE correspondant à l'anion superoxyde n'est détecté pour les lignines non acétylées, alors que de faibles signaux le sont dans le cas des matériaux **AcLK-1**, **AcLK-2** et **AcOSL**. Ces observations confirment l'hypothèse selon laquelle la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ semble ici principalement photoinduite. En effet, à l'obscurité, des radicaux organiques stables persistent dans les lignines pouvant, par conséquent, entraîner une faible production d'anion superoxyde.^[29] Dans le cas des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL**, ces radicaux sont probablement, comme pour l' $^1\text{O}_2$, piégés par les phénols présents sur le polymère, expliquant ainsi leur non-détection en spectroscopie RPE. En revanche, dans le cas des lignines acétylées, ce piégeage des espèces radicalaires n'est plus possible, ce qui explique le signal détecté, même à l'obscurité.

Afin de valider cette hypothèse et pour étudier l'impact du degré d'acétylation sur les propriétés photosensibles des matériaux, la lignine **LK-2** a également été partiellement acétylée et les fonctions phénol ont été méthylées spécifiquement.

II.4. Estérification partielle et méthylation des alcools phénoliques de LK-2

II.4.1. Synthèse et caractérisation des lignines LK-2 partiellement acétylées

L'acétylation partielle de LK-2 a été menée en employant différentes quantités d'anhydride acétique. Les conditions opératoires sont les mêmes que celles décrites précédemment, à l'exception des quantités d'anhydride acétique utilisées. Ces dernières ont été déterminées d'après les travaux de Buono *et al.*^[83] et sont présentées dans le Tableau 13. Après

précipitation dans l'eau distillée, lavage et séchage, les matériaux **Ac₁₀LK-2**, **Ac₄₀LK-2** et **Ac₆₀LK-2** sont obtenus avec des rendements massiques respectivement de 95, 96 et 103%.

Tableau 13 : Quantité d'anhydride acétique employées et rendements massiques obtenus lors de la synthèse des matériaux **Ac₁₀LK-2**, **Ac₄₀LK-2** et **Ac₆₀LK-2**.

Matériau	Quantité d'anhydride acétique ajoutée (éq.)	Rendement massique (%)
Ac₁₀LK-2	0,22	95
Ac₄₀LK-2	0,57	96
Ac₆₀LK-2	0,85	103

L'analyse IRTF des produits montre des signes clairs d'acétylation partielle (Figure 43). Notamment avec l'apparition, d'autant plus marquée que la quantité d'anhydride utilisée est importante, des bandes correspondant aux vibrations de valence des liaisons C=O des esters aromatiques et aliphatiques (respectivement à 1761 et 1739 cm^{-1}) et des liaisons C-O ester (à 1190 cm^{-1}). De même, la disparition de la bande de valence des liaisons O-H entre 3100 et 3600 cm^{-1} et l'augmentation de la bande située à 1370 cm^{-1} , correspondant aux vibrations de déformation des liaisons C-H des CH_3 , sont d'autant plus marquées que la quantité d'anhydride employée est importante.

La spectroscopie RMN a, par ailleurs, permis de confirmer ces observations en montrant sur les spectres RMN ^{31}P des produits partiellement acétylés une réduction progressive des signaux correspondant aux différentes fonctions alcool fonctionnalisées par le TMDP (Figure 44).

De plus, il a également été possible de quantifier par cette technique les quantités d'alcools aliphatiques et phénoliques restants sur chacune des lignines. Il a ainsi été déterminé que respectivement 10, 40 et 60% des groupements hydroxyles des lignines **Ac₁₀LK-2**, **Ac₄₀LK-2** et **Ac₆₀LK-2** avaient été acétylés. Les résultats détaillés de ces observations sont présentés dans le Tableau 14.

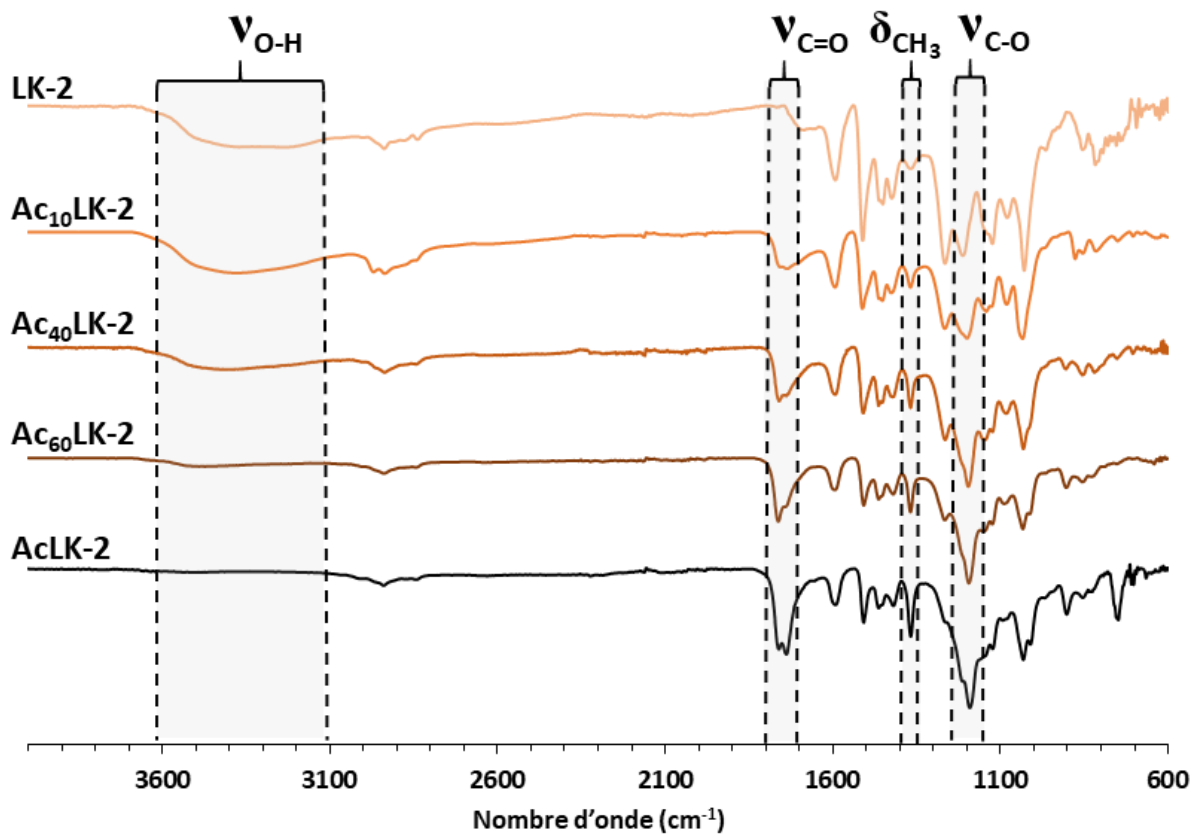


Figure 43 : Spectres IRTF des lignines **LK-2** avant et après acétylation totale ou partielle.

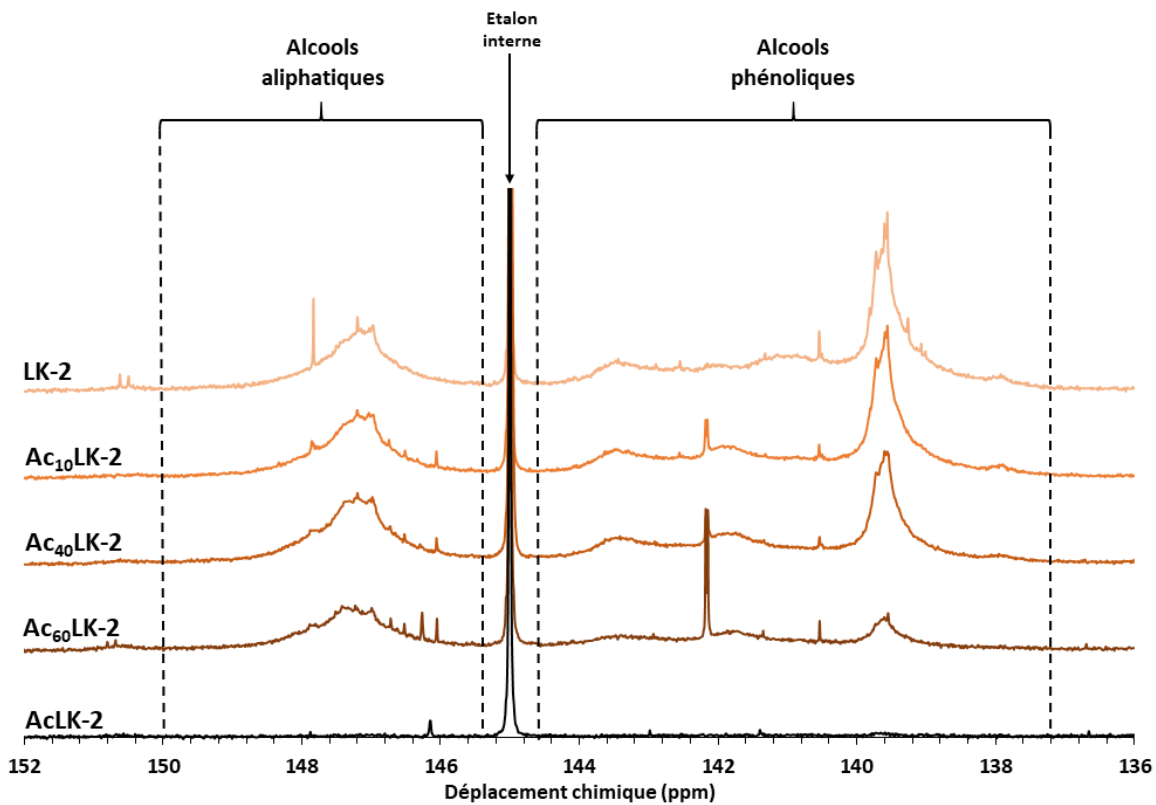


Figure 44 : Spectres RMN ^{31}P des lignines **LK-2** phosphorylées avant et après acétylation totale ou partielle.

Tableau 14 : Résumé des caractéristiques des lignines partiellement acétylées.

Matériau	Quantité d'anhydride acétique ajoutée (éq.)	OH _(Ph) résiduels (mmol.g ⁻¹)	OH _(Al) résiduels (mmol.g ⁻¹)	OH _(Total) résiduels (mmol.g ⁻¹)	Taux d'acétylation (%)
Ac ₁₀ LK-2	0,22	1,34	2,71	4,05	10
Ac ₄₀ LK-2	0,57	1,08	1,76	2,83	40
Ac ₆₀ LK-2	0,85	0,82	0,95	1,78	60

II.4.2. Méthylation sélective des alcools phénoliques de LK-2

Dans le but d'étudier la contribution de chaque type d'alcool, aliphatique et phénolique, aux propriétés photosensibles du biopolymère, les phénols des lignines **LK-2** ont été sélectivement protégés. Pour ce faire, la réaction de méthylation sélective proposée par Sadeghifar *et al.*^[165] a été mise en œuvre (Figure 45). Celle-ci consiste, dans un premier temps, à ajouter du diméthyle sulfate (Me₂SO₄) à une solution de lignines solubilisées dans une solution aqueuse de soude à 0,7 M. La réaction est ensuite agitée à 25 °C pendant 30 min avant d'être chauffée 2 h à 80 °C. En fin de réaction, la lignine modifiée est précipitée par l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée puis récupérée par filtration et lavée. Le matériau nommé **MeLK-2** est obtenu avec un rendement massique de 80%.

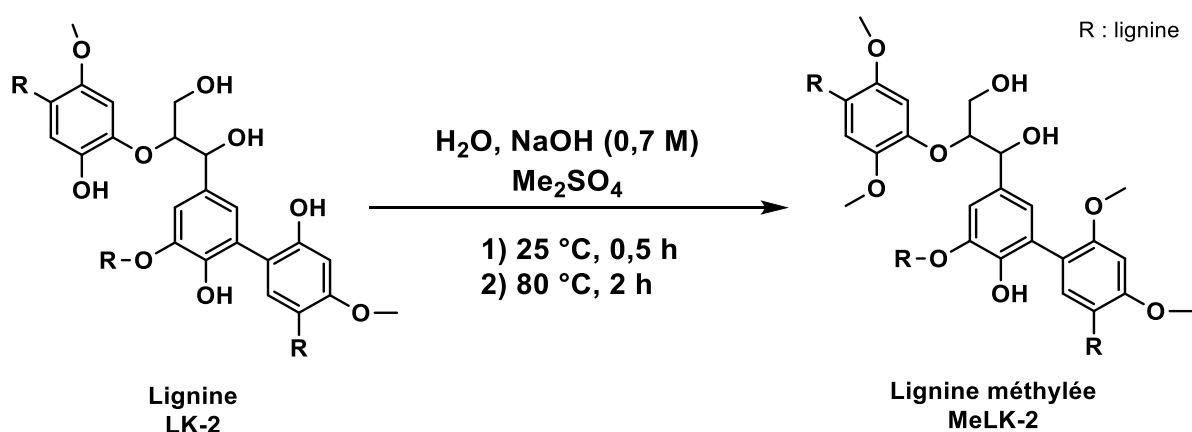


Figure 45 : Méthylation de la lignine LK-2.

L'analyse IRTF du produit **MeLK-2** montre des signes clairs de méthylation avec l'augmentation des bandes correspondant aux vibrations de valence des liaisons C-H des groupements O-CH₃ à 2836 cm⁻¹ et de la bande correspondant aux vibrations de déformation des liaisons C-H aliphatique 1462 cm⁻¹ (Figure 46).

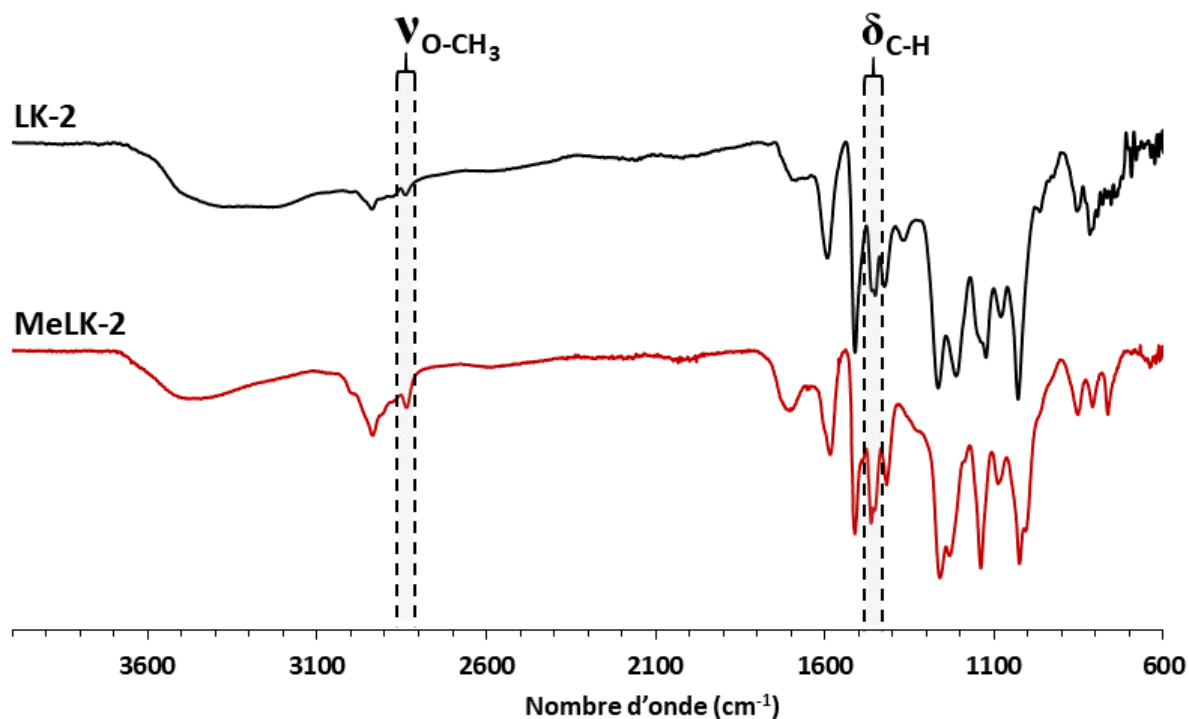


Figure 46 : Spectres IRTF des lignines **LK-2** avant et après méthylation.

Par ailleurs, l'étude du spectre RMN ³¹P de **MeLK-2** après phosphorylation par le TMDP a permis de confirmer la sélectivité de la réaction (Figure 47). En effet, non seulement la disparition des signaux entre 138,2 et 144,5 ppm, correspondant aux alcools phénoliques fonctionnalisés, est bien observée, mais de plus les signaux des alcools aliphatiques entre 145,5 et 150 ppm sont toujours présents. Le taux d'alcool aliphatique présent à la surface du polymère a été estimé à 1,35 mmol.g⁻¹. Cette valeur indique que les alcools aliphatiques n'ont pas été substitués, comme attendu, lors de la réaction de méthylation.

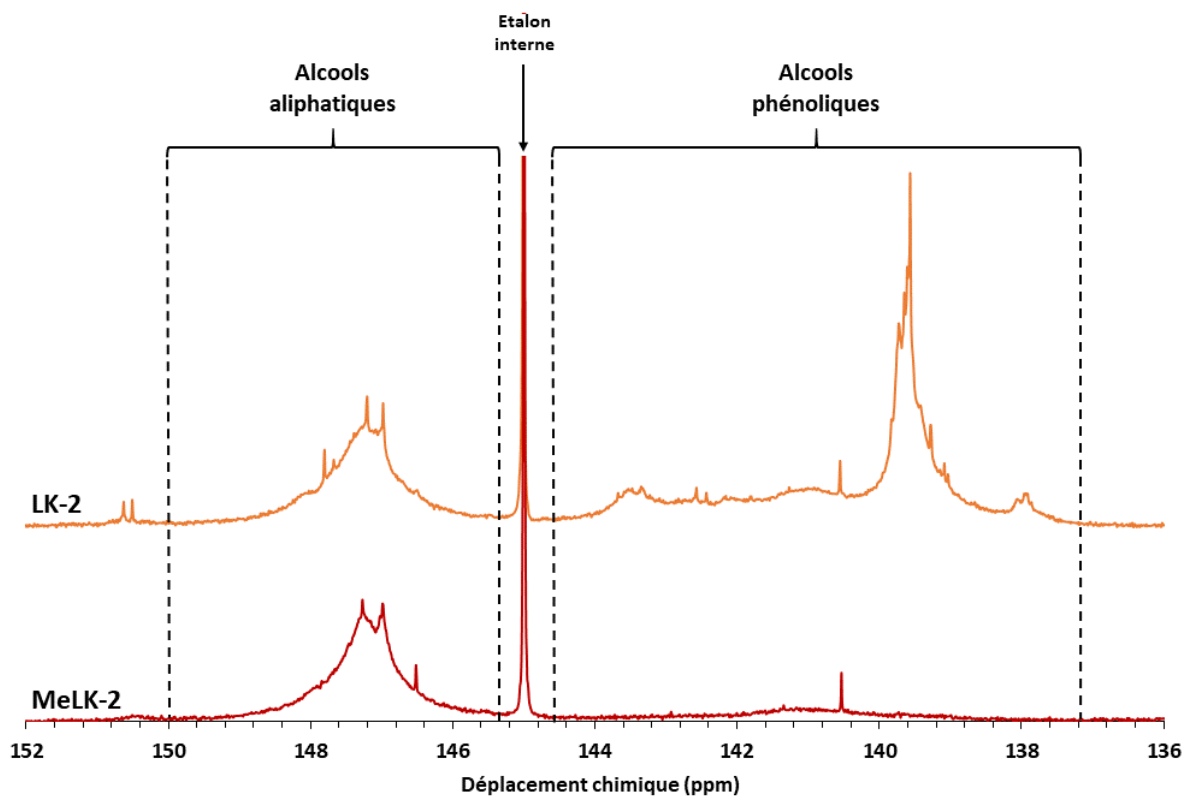


Figure 47 : Spectres RMN ^{31}P des lignines **LK-2** avant et après méthylation.

II.4.3. Étude des propriétés photosensibles des lignines LK-2 partiellement acétylées et méthylées

Les productions d'oxygène singulet sous irradiation lumineuse des composés **Ac₁₀LK-2**, **Ac₄₀LK-2** et **Ac₆₀LK-2** ont été évaluées par spectroscopie RPE en utilisant la méthode décrite pour les lignines totalement acétylées. Les résultats obtenus confirment que l'acétylation contrôle la production d'oxygène singulet des lignines (Figure 48). En effet, plus les lignines présentent un taux d'acétylation élevé, plus leur production d'¹O₂ est importante. De plus, il est à noter qu'à partir d'un taux de fonctionnalisation de 60%, les lignines modifiées semblent avoir une capacité de production d'oxygène singulet comparable à celle observée lorsque l'acétylation est totale.

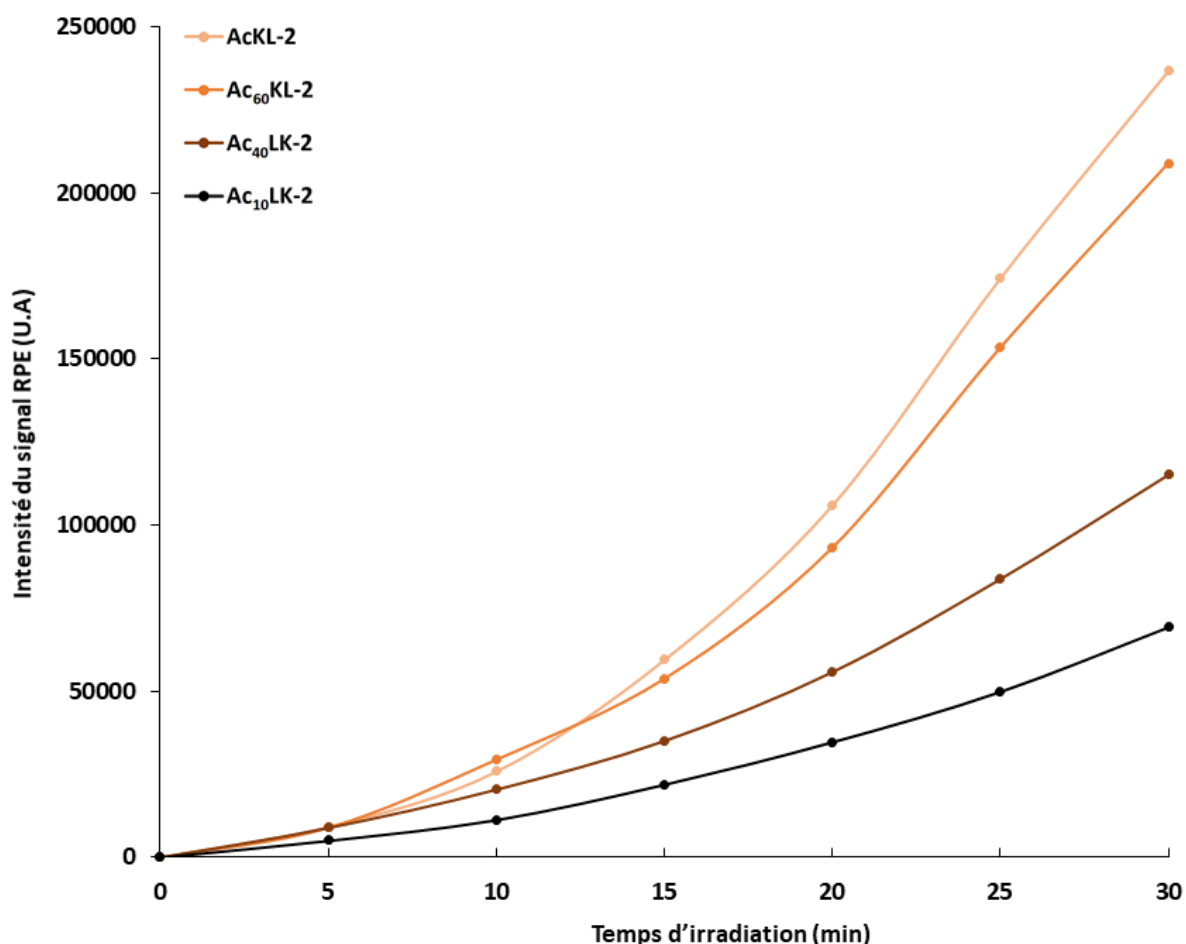


Figure 48 : Évolution du signal RPE du radical TEMPO en fonction du temps d'irradiation en présence d'une source lumineuse pour **Ac₁₀LK-2**, **Ac₄₀LK-2**, **Ac₆₀LK-2** et **AcLK-2**.

Parallèlement, l'implication des groupements phénoliques des lignines dans le piégeage de l'oxygène singulet a été confirmée par l'étude de la production d'oxygène singulet de la lignine

MeLK-2 sous irradiation lumineuse. Ainsi, cette lignine, dont les groupements phénoliques ont été sélectivement protégés par méthylation, s'est montrée capable de produire des quantités d' $^1\text{O}_2$ comparables à celles produites par des lignines ayant toutes leurs fonctions alcools protégées par des groupements acétyles (Figure 49). Ces observations sont de plus conformes à celles précédemment faites par Barclay *et al.*^[277] et Fischer *et al.*^[274, 278] Ces auteurs ont en effet montré que la 1-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(2-méthoxyphénoxy)-1-propanone, un modèle moléculaire de lignines présentant des fonctions phénoliques méthylées, était capable de produire de l'oxygène singulet sous irradiation lumineuse.

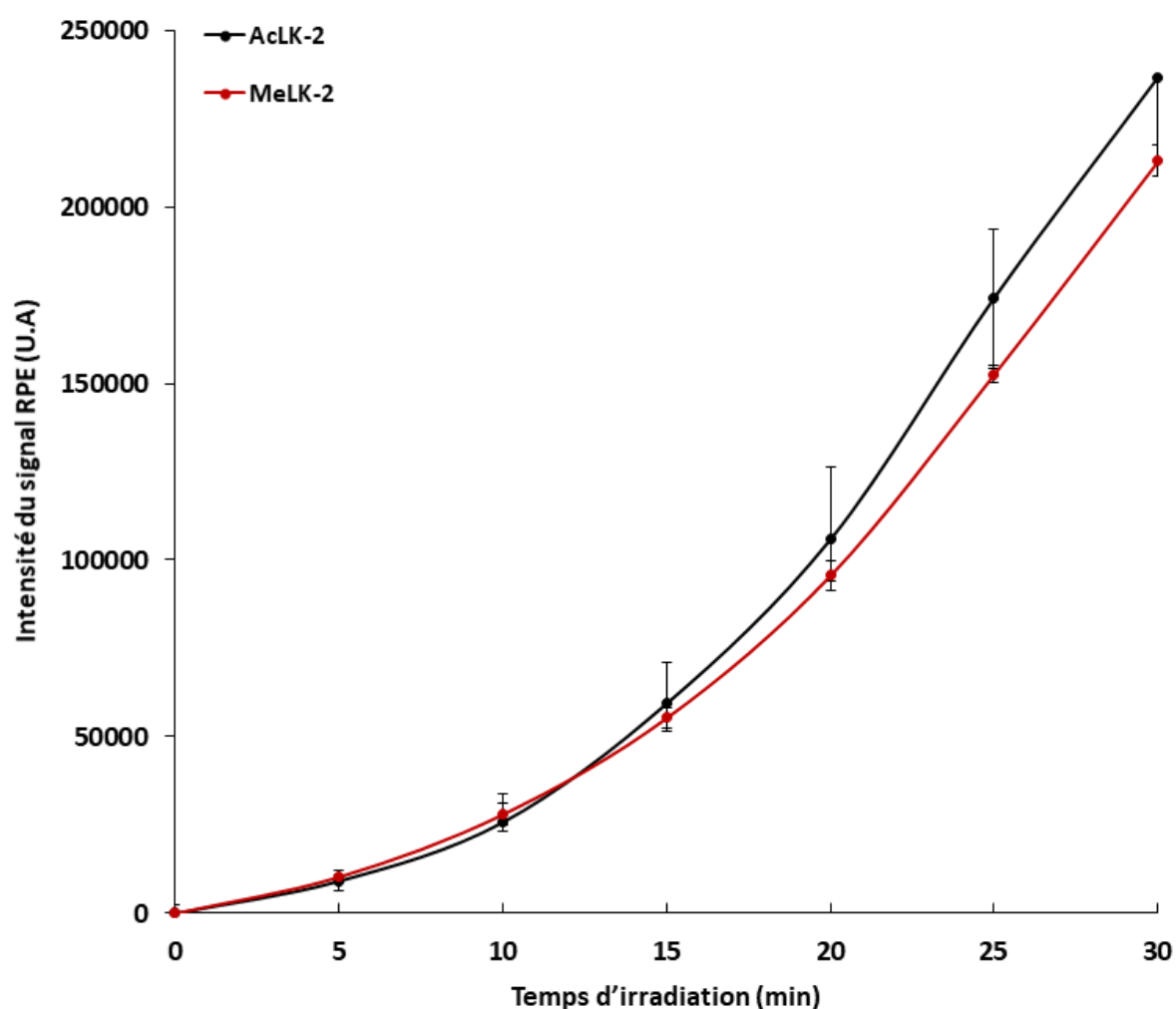


Figure 49 : Évolution du signal RPE du radical TEMPO en fonction du temps d'irradiation en présence d'une source lumineuse pour **AcLK-2** et **MeLK-2**.

II.5. Conclusion

Le blocage des fonctions antioxydantes des lignines augmente considérablement la quantité d'espèces radicalaires qu'elles vont pouvoir libérer. De plus, compte tenu de ces différents résultats,^[279] cette propriété semble n'être que très peu affectée par l'origine botanique et / ou industrielle des matériaux utilisés. En effet, **AcLK-2** et **AcOSL**, bien que différentes par leurs origines biologiques et leurs méthodes d'extraction, produisent des quantités semblables d'oxygène singulet sous irradiation lumineuse. En ce qui concerne la production d'anion superoxyde, toutes les lignines acétylées **AcLK-1**, **AcLK-2** et **AcOSL** ont un comportement très similaire.

Les lignines acétylées apparaissent donc comme un potentiel photosensibilisateur, ouvrant ainsi la porte de leur utilisation dans de nombreux domaines, tels que le traitement photodynamique antimicrobien (APDT) à l'instar d'autres photosensibilisateurs, comme différents dérivés des porphyrines ou encore le bleu de méthylène.^[272, 280-282] Le polymère pourrait ainsi être utilisé en milieux organiques ou encore en milieux aqueux, grâce à sa capacité à former des nanoparticules hydrodispersibles

III. Préparation et étude de nanoparticules de lignines modifiées

III.1. Introduction

Comme cela a été présenté au cours du chapitre précédent, les lignines acétylées semblent présenter un comportement photosensible prometteur au vu de leur capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène. Cependant, les différentes observations préalablement menées l'ont toutes été sur des polymères en solution dans un solvant organique.

Afin d'amplifier le champ d'action du biopolymère modifié et en particulier de permettre son utilisation dans le domaine agricole, il est nécessaire d'étudier son comportement en milieu aqueux. Pour ce faire, il a déjà été montré dans la littérature qu'il était possible de rendre les lignines acétylées hydrodispersibles en les mettant sous forme de nanoparticules.^[216, 217] Dans ce but, des nanoparticules ont été préparées à partir des lignines modifiées **AcLK-1** et **AcLK-2** selon deux méthodes différentes : par ajout d'un contre-solvant et par dialyse. L'influence de différents paramètres expérimentaux sur la structure finale de ces nano-objets ainsi que leur stabilité ont également été étudiées.

Parallèlement, des nanoparticules ont été préparées à partir de lignines estérifiées par des chaînes alkyles de longueurs différentes et caractérisées.

Enfin, l'évaluation de la capacité des nanoparticules formées à partir d'**AcLK-2** (matériau le plus efficace dans le DMF) à produire de l'oxygène singulet est présentée dans ce chapitre.

III.2. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées

III.2.1. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées par ajout d'un contre-solvant

III.2.1.1. Principe général de la méthode de préparation

Cette méthode de préparation s'appuie sur les travaux de Qian *et al.*^[216, 217] Les lignines acétylées sont, dans un premier temps, solubilisées dans le tétrahydrofurane à une concentration de 1 g.L⁻¹. Afin de permettre une bonne dispersion du polymère, et ainsi une bonne structuration ultérieure des nanoparticules, la solution est agitée pendant 20 minutes, puis elle est laissée au repos pendant trois jours.

De l'eau ultrapure, environ deux fois la quantité initiale de THF, est ensuite ajoutée sous agitation à la solution de lignine acétylée à un débit de 18 mL.h⁻¹. Une fois cet ajout effectué, la solution est filtrée à l'aide d'un filtre nylon d'une porosité de 0,45 µm, puis de l'eau ultrapure, sept fois le volume initial de THF y est ajoutée. La solution est enfin laissée sous agitation à l'air libre pendant une nuit afin de permettre au THF qu'elle contient de s'évaporer. Les nanoparticules ainsi obtenues, **NP(AcLK-1)** et **NP(AcLK-2)**, ont ensuite été caractérisées.

III.2.1.2. Détermination de la concentration micellaire critique

Cette méthode de préparation repose sur l'hydrophobicité des lignines modifiées. En effet, lors de l'ajout progressif d'eau à la solution de lignine, la proportion de THF dans le solvant diminue. En réaction, les lignines commencent donc à s'associer sous la forme de sphères, afin de minimiser les interactions hydrophobes, jusqu'à former des particules de tailles nanométriques, lorsque le solvant est majoritairement composé d'eau.

Cette association progressive peut être mise en évidence en mesurant l'intensité de la lumière diffusée par une solution organique de polymères en fonction du volume d'eau ajouté. Les résultats ainsi obtenus pour **AcLK-1** et **AcLK-2** sont présentés en Figure 50. Comme le montre le graphique, l'intensité de la lumière diffusée augmente brusquement, signe que les chaînes de polymères commencent à s'agréger, à partir d'une proportion d'eau de 30%, pour les deux solutions de lignines acétylées **AcLK 1** et **AcLK-2**. Il est par ailleurs à noter que l'intensité de la lumière diffusée croît plus rapidement dans le cas du matériau **AcLK-2** que dans celui d'**AcLK-1**, signifiant que l'association des lignines se fait plus lentement dans ce dernier cas.

Cette proportion en eau, à partir de laquelle les nanoparticules commencent à se structurer, est définie comme la concentration micellaire critique (CMC).^[283] Cette concentration, bien qu'étant la même pour les deux lignines étudiées, est inférieure de 10% à celle obtenue par Qian *et al.*^[216] La CMC d'une solution de polymère étant fonction de la masse molaire de ce dernier, ces résultats ne sont pas surprenants puisque les auteurs utilisent une lignine d'une M_w de 4200 g.mol⁻¹ contre 13 100 et 9900 g.mol⁻¹ pour **AcLK-1** et **AcLK-2**, respectivement.

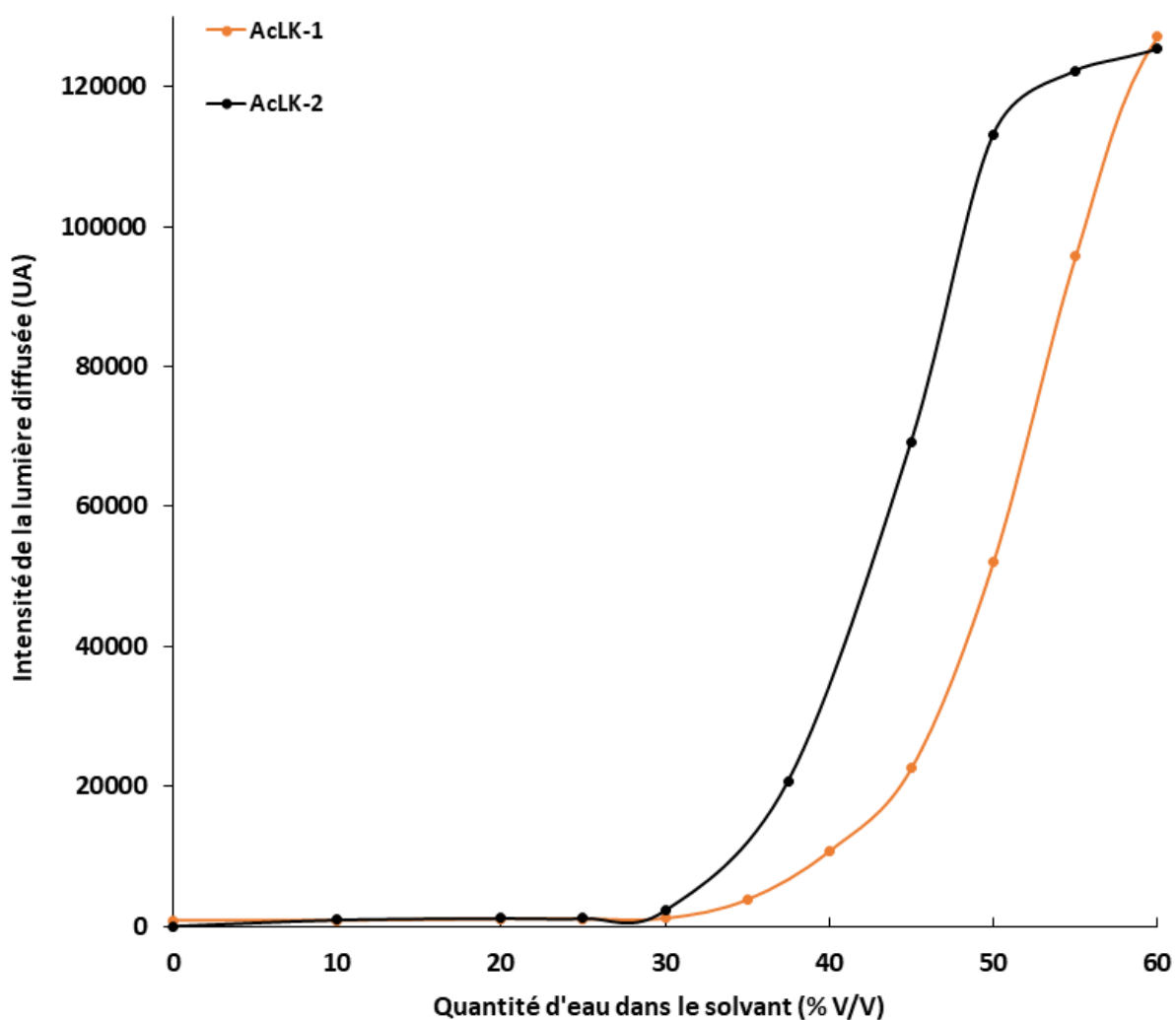


Figure 50 : Évolution de l'intensité de la lumière diffusée par les solutions de lignines acétylées **AcLK-1** et **AcLK-2** dans le THF en fonction de la quantité d'eau ajoutée.

III.2.1.3. Caractérisation des nanoparticules de lignines acétylées obtenues par ajout d'un contre-solvant

Dix lots de nanoparticules ont été réalisés pour chaque source de lignine (**AcLK-1** et **AcLK-2**), et pour chacun d'entre eux, la distribution en taille des nanoparticules obtenues a été estimée par spectroscopie de diffusion dynamique de la lumière (DLS). La moyenne de ces distributions est présentée en Figure 51. Des caractérisations en microscopie électronique sont également venues compléter ces observations.

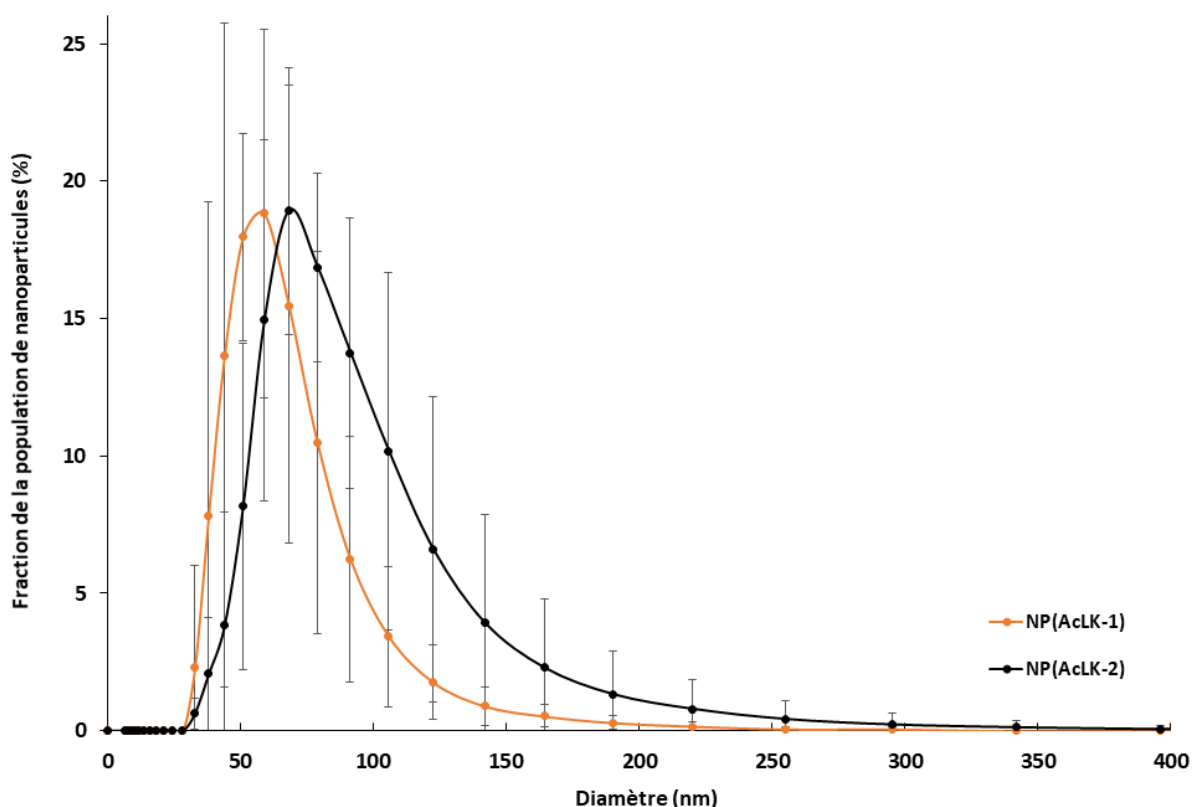


Figure 51 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-1)** et **NP(AcLK-2)** obtenues à partir des lignines acétylées **AcLK-1** et **AcLK-2** par ajout d'un contre-solvant (moyenne sur 10 mesures indépendantes).

L'analyse de la répartition en taille des nanoparticules obtenues montre que des particules d'un diamètre inférieur à 100 nm sont en moyenne obtenues pour les deux matériaux. Cependant, une légère variation de ce diamètre moyen est relevée en fonction du matériau de départ employé. En effet, 90% des particules **NP(AcLK-1)** ont une taille moyenne comprise entre 40 et 90 nm, tandis que pour les nanoparticules **NP(AcLK-2)** la distribution de taille s'effectue sur une plage plus large. En effet, 80% des particules affichent dans ce dernier cas un diamètre moyen compris entre 40 et 110 nm. Ces observations ont été confirmées par des analyses en microscopie électronique à transmission (Figure 52).

Cependant, ces résultats sont à nuancer au regard de la faible répétabilité de cette méthode de production de nanoparticules. En effet, de forts écarts par rapport aux diamètres moyens des particules, de l'ordre de 100 nm, ont pu être observés au cours des différentes synthèses réalisées et ce, indépendamment du matériau de départ employé.

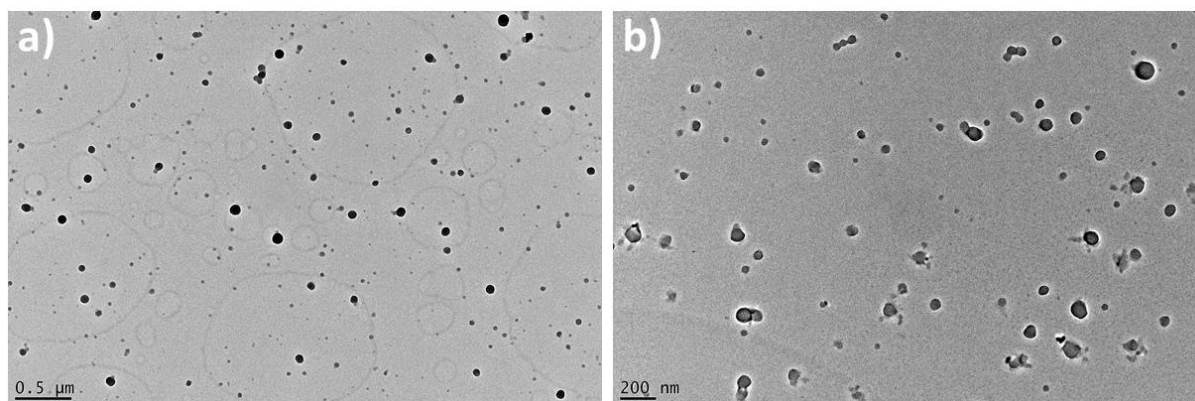


Figure 52 : Clichés MET des nanoparticules a) NP(AcLK-1) et b) NP(AcLK-2) obtenues à partir des lignines AcLK-1 et AcLK-2 par ajout d'un contre-solvant.

III.2.2. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées par dialyse

III.2.2.1. Principe général de la méthode de préparation

Cette deuxième méthode de préparation s'appuie sur différentes préparations de nanoparticules déjà reportées dans la littérature.^[218, 219, 284] Les matériaux sont, dans un premier temps, solubilisés dans un solvant organique miscible avec l'eau comme dans le cas de la méthode de préparation par ajout d'un contre-solvant. Cependant, dans ce cas, la solution est simplement agitée pendant une vingtaine de minutes et n'est pas laissée au repos pendant trois jours. En effet, différents essais ont montré que cette étape n'était pas nécessaire à une bonne structuration future des nanoparticules.

La solution de polymère est ensuite introduite dans une membrane de dialyse de porosité comprise entre 12 000 et 14 000 Da, puis dialysée contre un grand volume d'eau (10 L) pendant 24 h sous agitation mécanique légère. Durant cette phase, le solvant organique présent initialement à l'intérieur de la membrane va progressivement être échangé par de l'eau, engendrant l'agrégation des chaînes de polymères acétylés et conduisant ainsi à la formation de nanoparticules.

La solution de nanoparticules contenue à l'intérieur de la membrane de dialyse est ensuite centrifugée, puis le surnageant est éliminé. Les nanoparticules peuvent alors ensuite être redispersées dans le volume d'eau désiré.

III.2.2.2. Caractérisation des nanoparticules de lignines acétylées obtenues par dialyse

Cette méthode a été utilisée pour préparer des nanoparticules à partir des lignines acétylées **AcLK-1** et **AcLK-2** préalablement solubilisées dans le THF à la concentration de 2 g.L^{-1} . Cinq préparations ont été effectuées pour chaque source de lignine, puis la distribution en taille des nanoparticules obtenues a été estimée pour chaque cas par spectroscopie DLS. La moyenne de ces distributions est présentée en Figure 53.

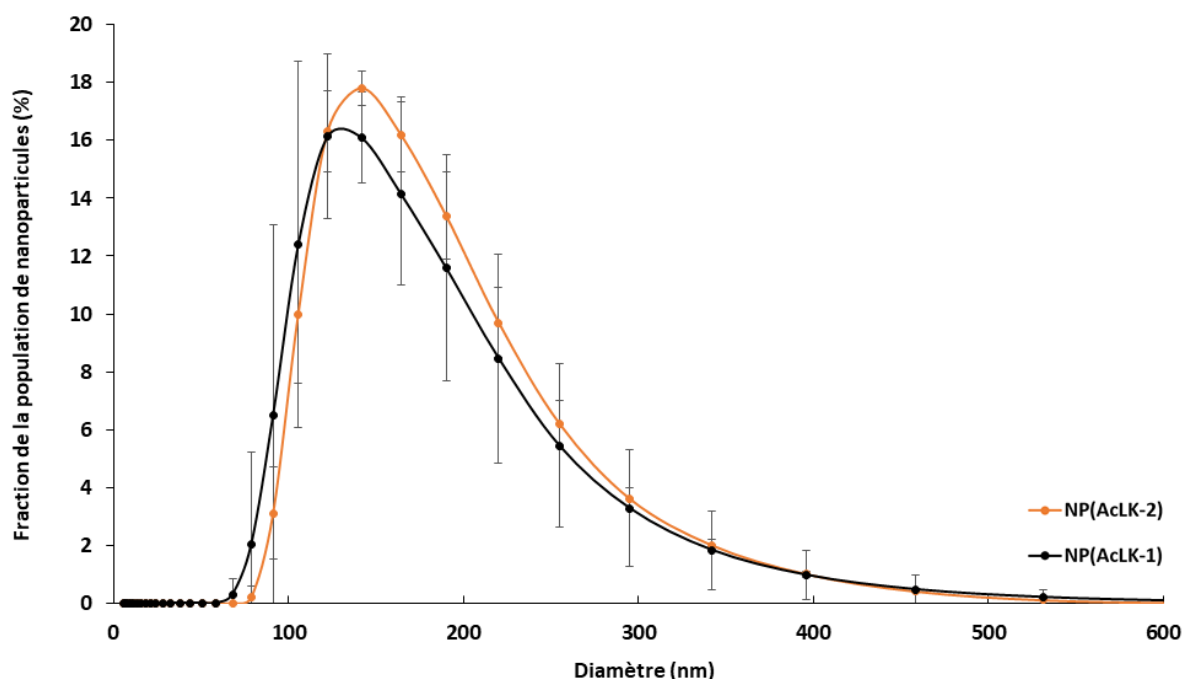


Figure 53 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-1)** et **NP(AcLK-2)** obtenues à partir des lignines **AcLK-1** et **AcLK-2** par dialyse (moyenne sur 5 mesures indépendantes).

L'analyse de la répartition en taille des nanoparticules obtenues par dialyse montre qu'environ 85% des particules formées ont des diamètres compris en 90 et 220 nm pour les deux sources de lignines étudiées. Cependant, dans le cas des particules **NP(AcLK-2)**, la distribution de taille de ces dernières se resserre davantage autour de 130 nm, alors que dans le cas de **NP(AcLK-1)**, elle est légèrement plus uniformément répartie entre 100 et 200 nm. Ces observations ont été confirmées par des analyses en microscopie électronique à transmission (Figure 54).

Par ailleurs, il est important de noter que les diamètres de particules obtenues au cours des différentes synthèses l'ont été avec une bonne répétabilité contrairement aux particules obtenues par ajout d'un contre-solvant.

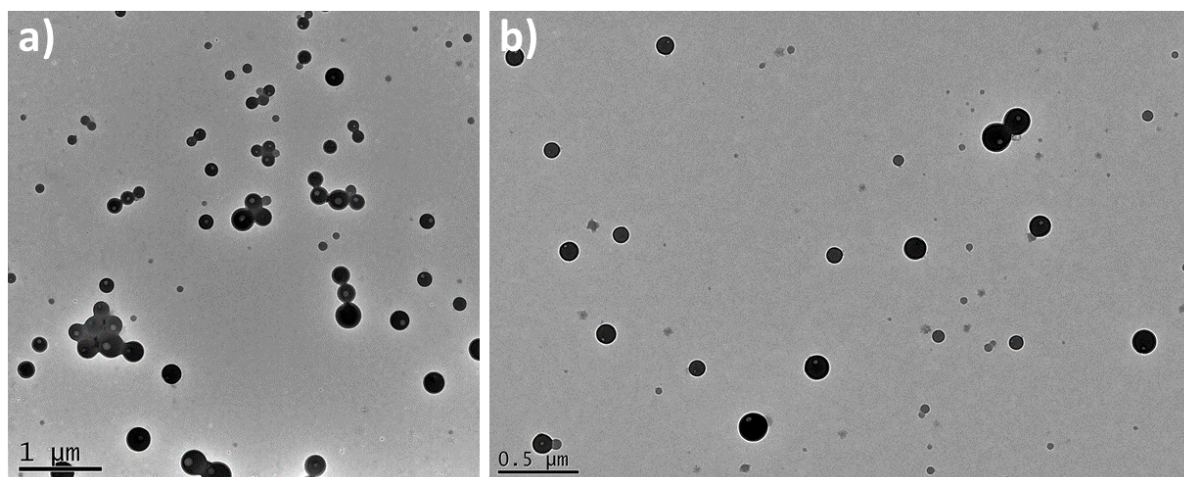


Figure 54 : Clichés MET des nanoparticules a) **NP(AcLK-1)** et b) **NP(AcLK-2)** obtenues à partir des lignines **AcLK-1** et **AcLK-2** par dialyse.

III.2.3. Comparaison des deux méthodes de préparation

Les deux méthodes précédemment décrites ont été comparées, afin de choisir la plus adaptée à la préparation de nanoparticules, en vue d'étudier ultérieurement leur comportement photosensible.

Même si l'ajout d'un contre-solvant permet d'obtenir des particules ayant une taille moyenne inférieure à celles obtenues par dialyse, cette première méthode présente de nombreux inconvénients par rapport à la dialyse, le premier étant sa faible répétabilité. En effet, les tailles observées pour les nanoparticules produites par ajout d'un contre-solvant varient de façon significative entre les différentes synthèses, alors que, dans le cas de celles produites par dialyse, cette variabilité est tout à fait acceptable. Cette dernière méthode permet donc de travailler sur des populations de nanoparticules présentant des tailles relativement constantes.

De plus, la méthode par ajout d'un contre-solvant passe par une étape de filtration, étape au cours de laquelle de nombreuses nanoparticules sont retenues sur le filtre. Il en résulte une concentration massique de lignine non seulement faible, mais également complexe à déterminer. Ceci rend la production de nanoparticules pour des mesures d'activité biologique, donc en quantité suffisante et connue, difficilement envisageable. En revanche, la dialyse permet, quant à elle, non seulement de préparer des nanoparticules en quantité suffisante, mais également d'en estimer la concentration massique en solution. En effet, aucune perte significative de matériau n'est observée par cette méthode de préparation. Afin de s'en

assurer, des solutions de nanoparticules de lignines **NP(AcLK-1)** et **NP(AcLK-2)** ont été lyophilisées, puis la masse de chaque résidu a été déterminée. Ces masses se sont montrées être sensiblement identiques aux masses de lignines initialement introduites dans les membranes de dialyse, permettant ainsi de confirmer l'hypothèse préalablement formulée. La production de nanoparticules par dialyse présente enfin l'avantage d'être expérimentalement la plus simple des deux méthodes. En effet, cette dernière requiert moins d'étapes que celle par ajout d'un contre-solvant.

En conclusion, la dialyse, en permettant l'obtention de nanoparticules de façon simple et répétable, apparaît comme la mieux adaptée pour la préparation de nanoparticules de lignines acétylées.

III.2.4. Étude de la stabilité des lignines préparées par dialyse

Avant de valider la dialyse comme méthode de choix pour la production de nanoparticules à base de lignines acétylées, il a également fallu s'assurer de la stabilité des nano-objets préparés par cette méthode, que ce soit dans le temps ou lors de l'étape finale de centrifugation, conditions toutes deux nécessaires à d'éventuelles analyses ou applications ultérieures.

Afin d'observer une éventuelle dégradation des nanoparticules lors de la centrifugation, la distribution en taille de nanoparticules de lignines acétylées **AcLK-1** et **AcLK-2** a été mesurée avant et après centrifugation à 2740 x g. Aucune modification du profil de distribution de la taille des particules n'a été observée après centrifugation, permettant ainsi d'affirmer que les nanoparticules ne sont pas dégradées lors de cette étape. Des observations en microscopie électronique à transmission ont également confirmé que les nanoparticules n'avaient pas subi de dégradation lors de la centrifugation (Figure 55).

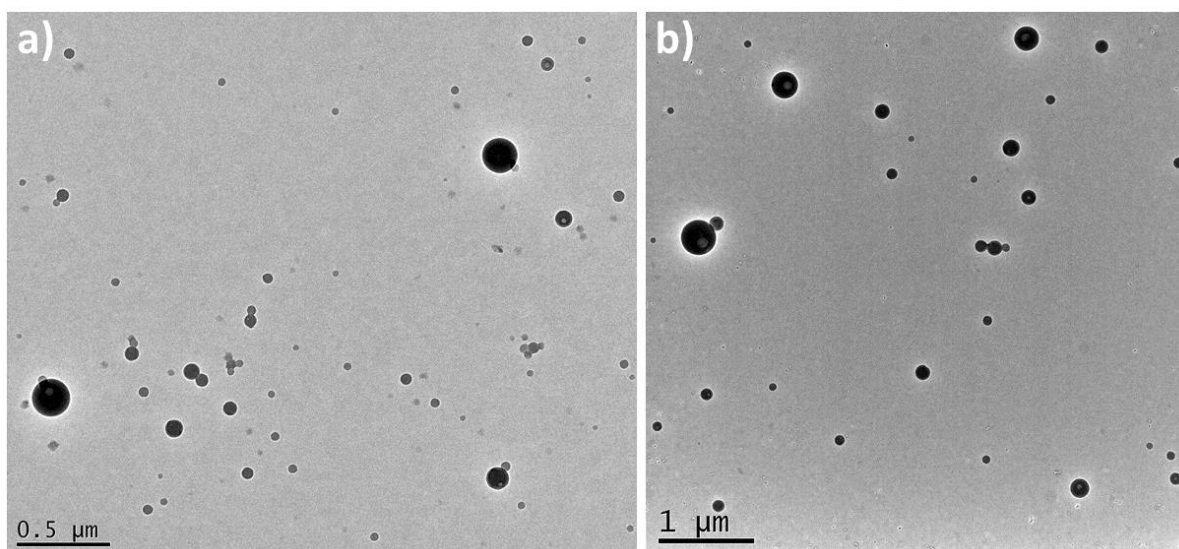


Figure 55 : Clichés MET des nanoparticules **NP(AcLK-2)** a) avant et b) après centrifugation et redispersion dans l'eau distillée.

Enfin, la stabilité des nanoparticules dans le temps a été évaluée. Pour ce faire, la distribution en taille des nanoparticules **NP(AcLK-2)** a été mesurée régulièrement par spectroscopie DLS pendant 36 jours. L'analyse des résultats n'a pas révélé de déstructurations des nanoparticules sur cette période. À la suite de ces constatations et compte tenu des avantages soulignés au paragraphe III.2.3, la dialyse a donc été retenue comme méthode de choix pour la préparation de nanoparticules de lignines acétylées dans la suite de ce travail.

Afin de compléter l'étude sur cette méthode de préparation, différents facteurs pouvant influencer la structuration des nanoparticules de lignines acétylées ont été étudiés et sont présentés dans la suite de ce chapitre.

III.2.5. Influence de la concentration en lignine acétylée de départ

L'influence de la concentration massique des lignines acétylées dans la solution de départ a été étudiée. Pour ce faire, le matériau **AcLK-2** a été solubilisé à 1 et 4 g.L⁻¹ dans le THF. Ces solutions ont ensuite été mises en dialyse contre de l'eau pendant 24 h. Puis, les distributions en taille des nanoparticules formées, respectivement nommées **NP(AcLK-2)-1** et **NP(AcLK-2)-4**, ont été analysées en spectroscopie DLS, puis moyennées afin de les comparer à la distribution moyenne obtenue lorsque la concentration initiale du matériau dans le THF est de 2 g.L⁻¹ (**NP(AcLK-2)**), (cf. paragraphe III.2.2.2). Pour les concentrations initiales à 1 et 4 g.L⁻¹, trois préparations ont été réalisées. Tous ces résultats sont reportés en Figure 56.

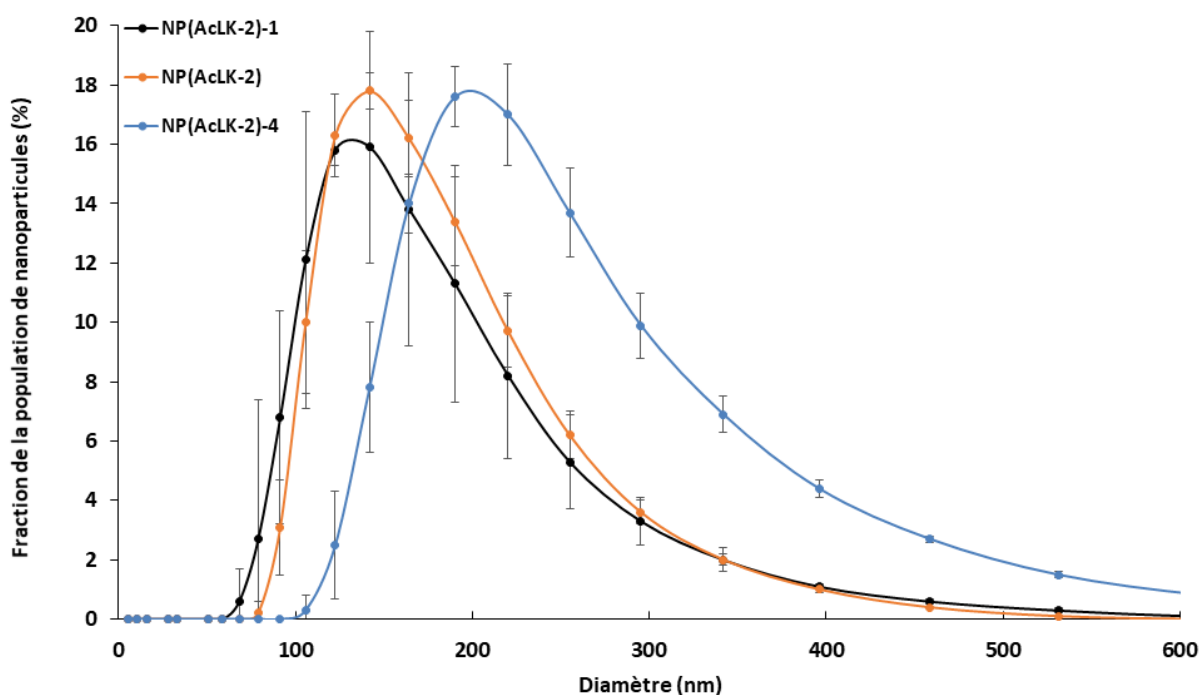


Figure 56 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-2)**, **NP(AcLK-2)-1** et **NP(AcLK-2)-4** (moyenne sur 3 mesures indépendantes).

Il est tout d'abord à noter que l'augmentation de la concentration initiale semble induire une augmentation du diamètre moyen des particules. Cette observation est particulièrement vérifiée dans le cas de **NP(AcLK-2)-4**, ces nanoparticules présentent effectivement un diamètre moyen de 320 nm nettement supérieur à celui des nanoparticules **NP(AcLK-2)-1** et **NP(AcLK-2)**, respectivement de 200 et de 220 nm. De plus, la distribution en taille des particules **NP(AcLK-2)-4** s'étend sur une plage beaucoup plus large. En effet, seulement 60% des nanoparticules **NP(AcLK-2)-4** présentent une taille comprise entre 90 et 220 nm, alors que c'est le cas d'environ 85% des nanoparticules **NP(AcLK-2)-1** et **NP(AcLK-2)**. Enfin, il est à noter que même si le diamètre moyen des nanoparticules **NP(AcLK-2)-1** est légèrement inférieur à celui des nanoparticules **NP(AcLK-2)**, une meilleure reproductibilité a été observée dans ce dernier cas. La concentration retenue pour la suite de ce travail est donc de 2 g.L^{-1}

III.2.6. Influence de la nature du solvant

L'influence de la nature du solvant dans lequel les lignines acétylées sont initialement solubilisées a également été étudiée. Pour ce faire, le matériau **AcLK-2** a été solubilisé à la concentration de 2 g.L^{-1} dans trois solvants organiques miscibles avec l'eau autre que le THF :

l'acétone, le DMF et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Puis la solution obtenue a été mise en dialyse contre de l'eau pendant 24 h. Dans chaque cas, trois préparations similaires ont été réalisées.

Au vu des résultats obtenus, le solvant employé semble avoir une grande importance. En effet, aucune nanoparticule n'est formée en solubilisant préalablement les lignines acétylées dans le DMF ou le DMSO. En revanche, en utilisant de l'acétone, des nanoparticules, nommées **NP(AcLK-2)-Atn**, ont bien été obtenues. La moyenne de leur distribution en taille est présentée en Figure 57 et comparée à celle des nanoparticules **NP(AcLK-2)** obtenues lorsque le THF est utilisé comme solvant.

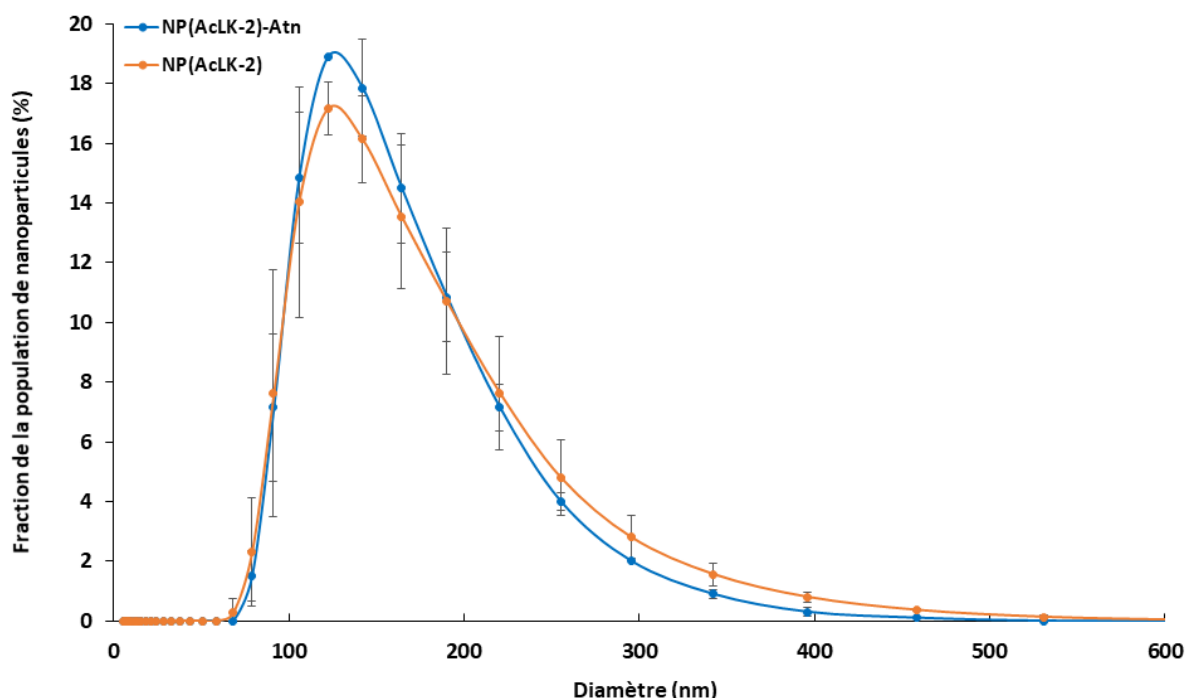


Figure 57 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-2)** et **NP(AcLK-2)-Atn** (moyenne sur 3 mesures indépendantes).

L'analyse par spectroscopie DLS des nanoparticules **NP(AcLK-2)-Atn** montre que ces dernières affichent une distribution en taille légèrement plus resserrée que celles obtenues en utilisant du THF. En effet, 90% des nanoparticules ont un diamètre compris entre 90 et 220 nm. Une répétabilité comparable a par ailleurs été observée. Ces différentes constatations ont été confirmées par microscopie électronique (Figure 58), et permettent donc de valider l'emploi de l'acétone et du THF comme solvants pour la préparation de nanoparticules de lignines acétylées.

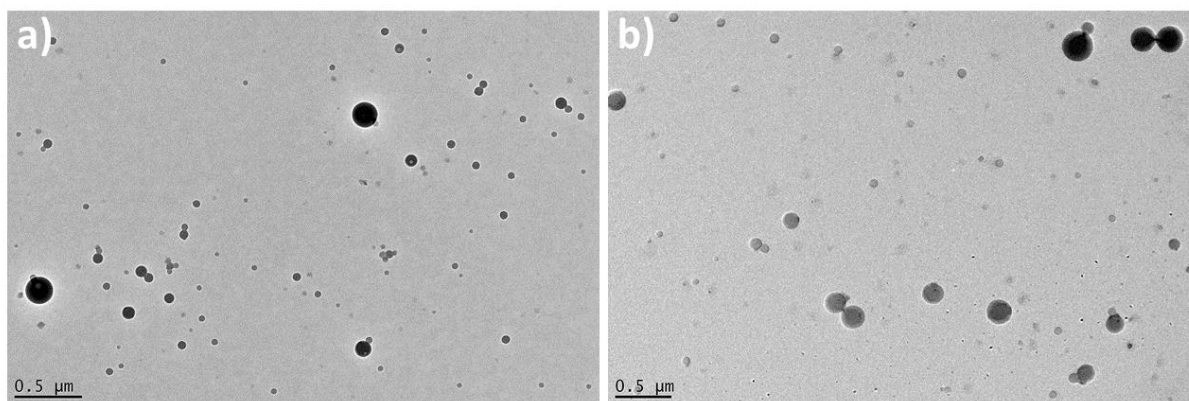


Figure 58 : Clichés MET des nanoparticules a) **NP(AcLK-2)** et b) **NP(AcLK-2)-Atn**.

III.2.7. Influence du degré d'acétylation

L'influence du degré d'acétylation des matériaux employés pour former les nanoparticules a été étudiée. Pour ce faire, les lignines partiellement acétylées **Ac₁₀LK-2**, **Ac₄₀LK-2** et **Ac₆₀LK-2** ont été solubilisées dans le THF à la concentration de 2 g.L⁻¹. Trois préparations similaires ont été réalisées pour chaque matériau. Les solutions ont ensuite été dialysées contre de l'eau pendant 24 h. Puis, les distributions en taille des nanoparticules formées, respectivement nommées **NP(Ac₁₀LK-2)**, **NP(Ac₄₀LK-2)** et **NP(Ac₆₀LK-2)** ont été analysées par spectroscopie DLS et moyennées, afin de les comparer à celles des nanoparticules préparées à partir de lignines totalement acétylées **NP(AcLK-2)** (Figure 59).

Les résultats obtenus montrent que les nanoparticules formées à partir des matériaux partiellement acétylés possèdent des diamètres moyens similaires et nettement inférieurs, d'une centaine de nanomètres, à ceux des particules **NP(AcLK-2)**. La distribution de ces diamètres est également plus resserrée que dans le cas des nanoparticules **NP(AcLK-2)**. En effet, environ 80% des particules ont des tailles comprises entre 70 et 140 nm. L'acétylation incomplète des polymères semble donc favoriser la formation de nanoparticules de taille plus petite. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Qian *et al.*^[216] Les auteurs ont en effet obtenu des particules ayant des morphologies similaires en les préparant par ajout d'un contre-solvant à partir de lignines acétylées à 82 et à 94%.

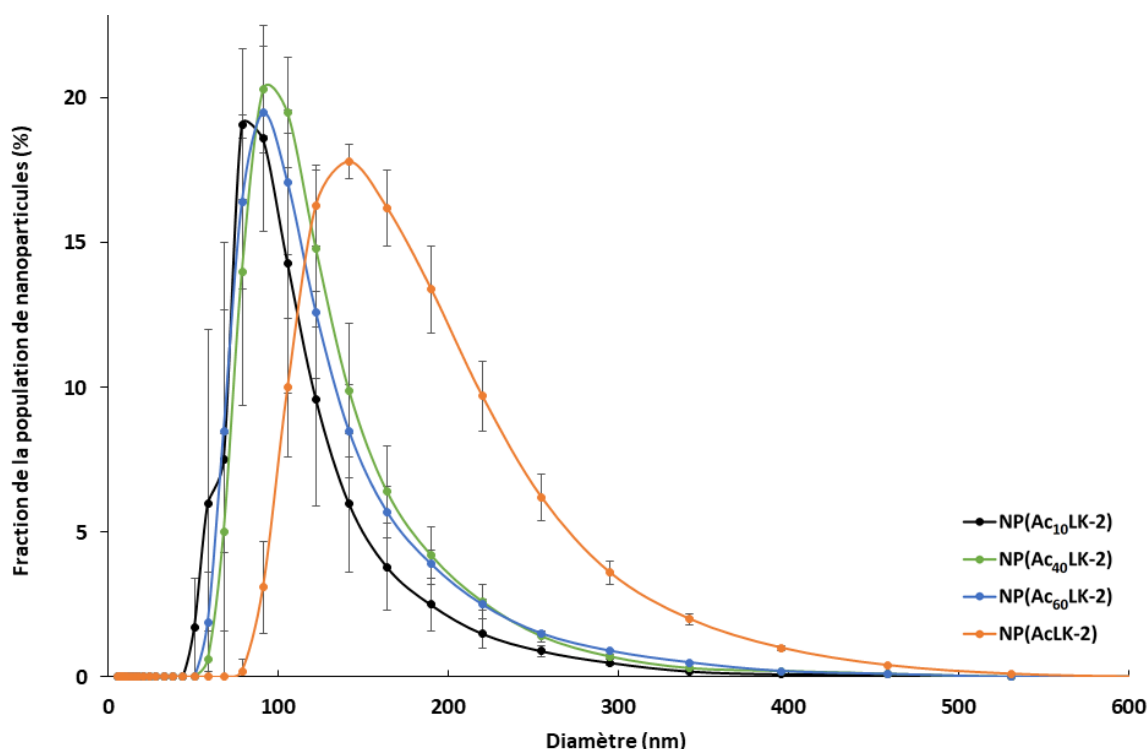


Figure 59 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-2)**, **NP(Ac₁₀LK-2)**, **NP(Ac₄₀LK-2)** et **NP(Ac₆₀LK-2)** (moyenne sur 2 mesures indépendantes).

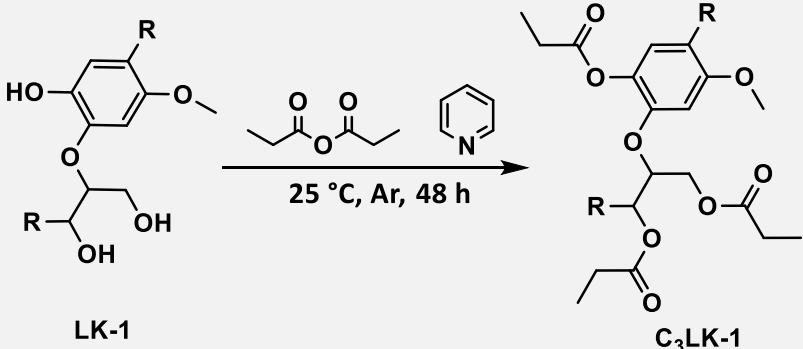
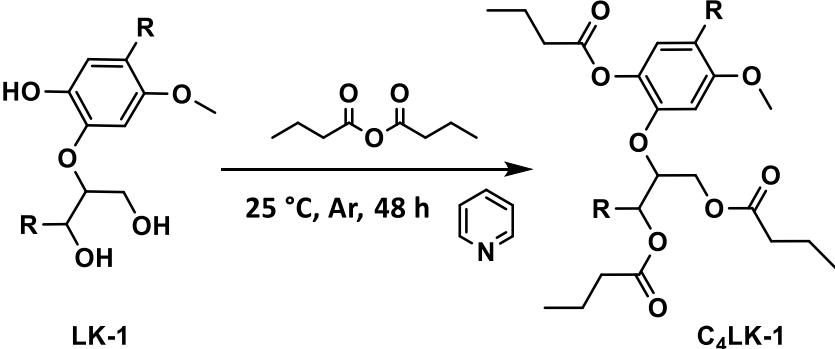
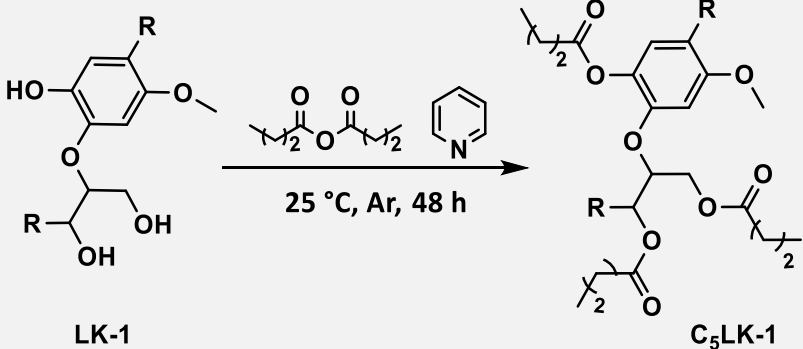
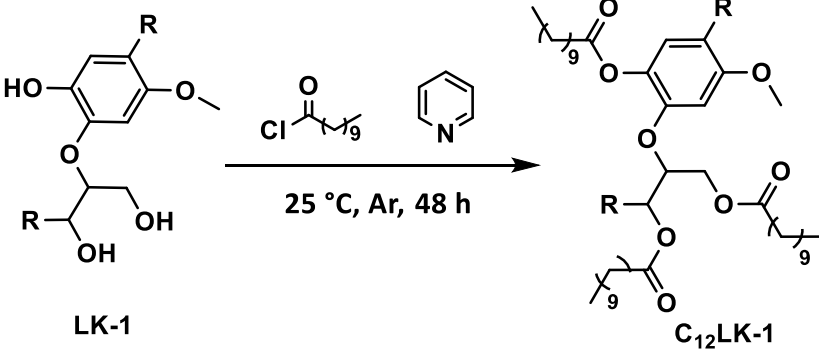
III.3. Préparation de nanoparticules à partir de lignines estérifiées par des chaînes aliphatiques de longueurs différentes

L'influence de la longueur de la chaîne aliphatique introduite à la surface du matériau par estérification sur la morphologie des nanoparticules a également été étudiée. Pour ce faire, les fonctions hydroxyle de la lignine **LK-1** ont été estérifiées par les anhydrides propionique, butyrique et valérique, ainsi que par le chlorure de lauryle, afin d'introduire des chaînes aliphatiques de longueurs variables à la surface du polymère. Les matériaux ainsi obtenus, respectivement nommés **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1**, ont été caractérisés, puis mis sous la forme de nanoparticules.

III.3.1. Synthèse des lignines **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1**

Les procédures d'estérification par les différents anhydrides sont très similaires à celles décrites pour l'acétylation (cf. paragraphe II.2) et sont présentées dans le Tableau 15 ainsi que les rendements massiques obtenus pour chaque synthèse.

Tableau 15 : Estérification de la lignine **LK-1** en présence de différents anhydrides d'acides et du chlorure de lauryle (R : Lignine).

Réaction d'estérification		Rendement massique (%)
 <p>LK-1</p> <p>$25\text{ }^{\circ}\text{C}$, Ar, 48 h</p> <p>C₃LK-1</p>	113,5%	
 <p>LK-1</p> <p>$25\text{ }^{\circ}\text{C}$, Ar, 48 h</p> <p>C₄LK-1</p>	65,5%	
 <p>LK-1</p> <p>$25\text{ }^{\circ}\text{C}$, Ar, 48 h</p> <p>C₅LK-1</p>	115%	
 <p>LK-1</p> <p>$25\text{ }^{\circ}\text{C}$, Ar, 48 h</p> <p>C₁₂LK-1</p>	74%	

D'une manière générale, la lignine **LK-1** est introduite dans un mélange équimolaire de pyridine et de l'anhydride souhaité, puis, la réaction est conduite à 25 °C sous atmosphère inerte pendant 48 h. En fin de réaction, les lignines modifiées sont récupérées par précipitation et filtration. La précipitation des lignines fonctionnalisées par les anhydrides propionique et butyrique est réalisée en employant une solution à 1% en masse de carbonate de sodium, alors que pour celles fonctionnalisées par l'anhydride valérique, de l'eau distillée est utilisée. La réactivité du chlorure de lauryle implique un protocole d'estérification légèrement différent. Dans ce cas, le réactif est ajouté goutte à goutte sous argon à 0 °C sur la lignine préalablement solubilisée dans la pyridine. La réaction est ensuite conduite pendant 48 h à 25 °C. En fin de réaction, la lignine modifiée est précipitée dans l'eau distillée puis récupérée par filtration.

III.3.2. Caractérisation des lignines **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1**

Les différentes estérifications ont été confirmées par spectroscopie RMN et IRTF. Comme pour les réactions d'acétylation, les spectres IRTF des matériaux estérifiés (Figure 60) présentent les bandes caractéristiques des vibrations de valence des liaisons C=O des esters aromatiques et aliphatiques, respectivement à 1761 et 1739 cm⁻¹.

La diminution importante de la bande de valence des liaisons O-H entre 3100 et 3600 cm⁻¹ sur les spectres des lignines modifiées met également en évidence le caractère quasi quantitatif des réactions de fonctionnalisation. On observe également, sur les spectres des produits **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1**, une augmentation de l'intensité des bandes situées entre 3000 et 2800 cm⁻¹, caractéristiques des vibrations de valence des liaisons C-H aliphatiques. Cette dernière étant, logiquement, d'autant plus importante que la chaîne greffée est longue. L'analyse de ces composés par spectroscopie RMN ³¹P (Figure 61) a permis, quant à elle, de montrer qu'une très faible fraction d'alcools aliphatiques des composés **C₃LK-1** et **C₅LK-1**, ainsi qu'une fraction légèrement plus importante d'alcools aliphatiques et phénoliques de **C₁₂LK-1**, sont toujours présents après la réaction d'estérification, corroborant les observations faites en IRTF. Les taux d'alcool résiduel détaillés de chaque composé sont présentés dans le Tableau 16.

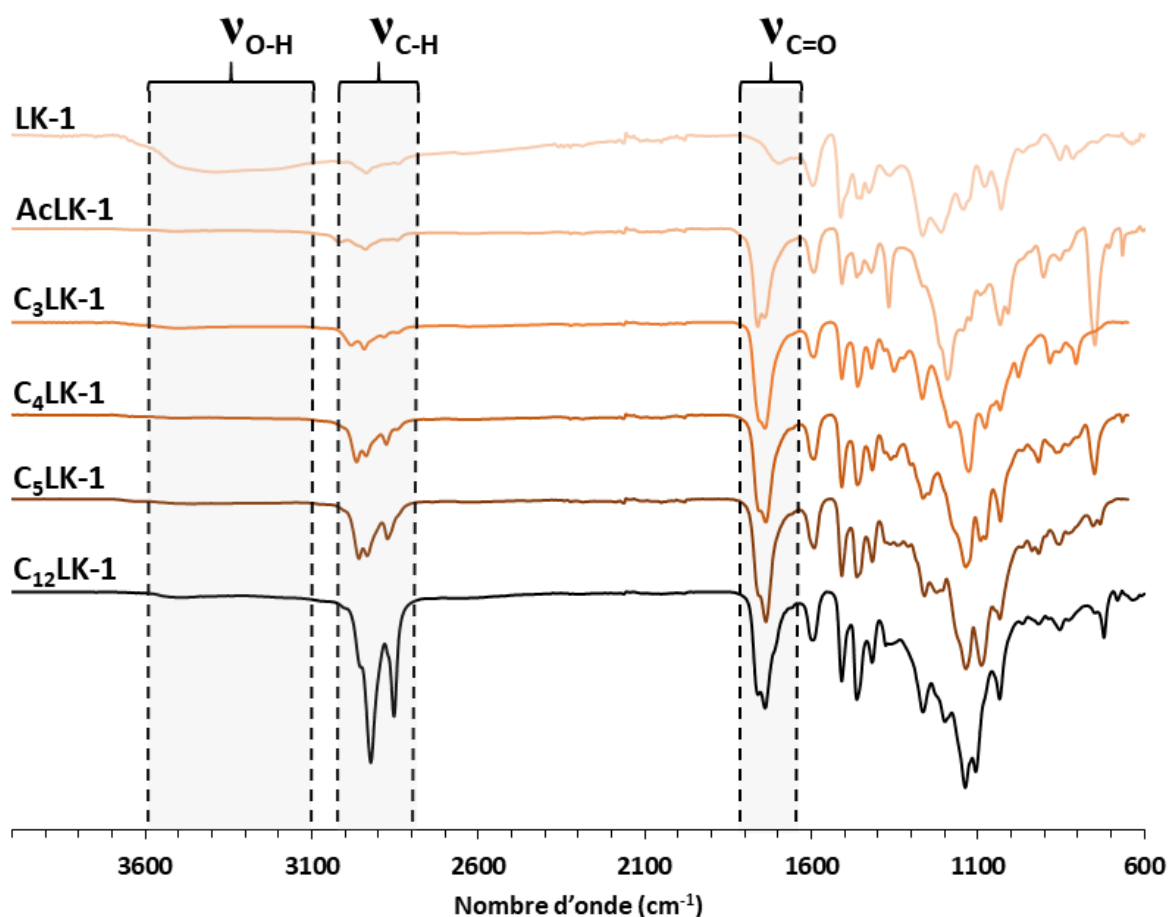


Figure 60 : Spectres IRTF des composés LK-1, AcLK-1, C₃LK-1, C₄LK-1, C₅LK-1 et C₁₂LK-1.

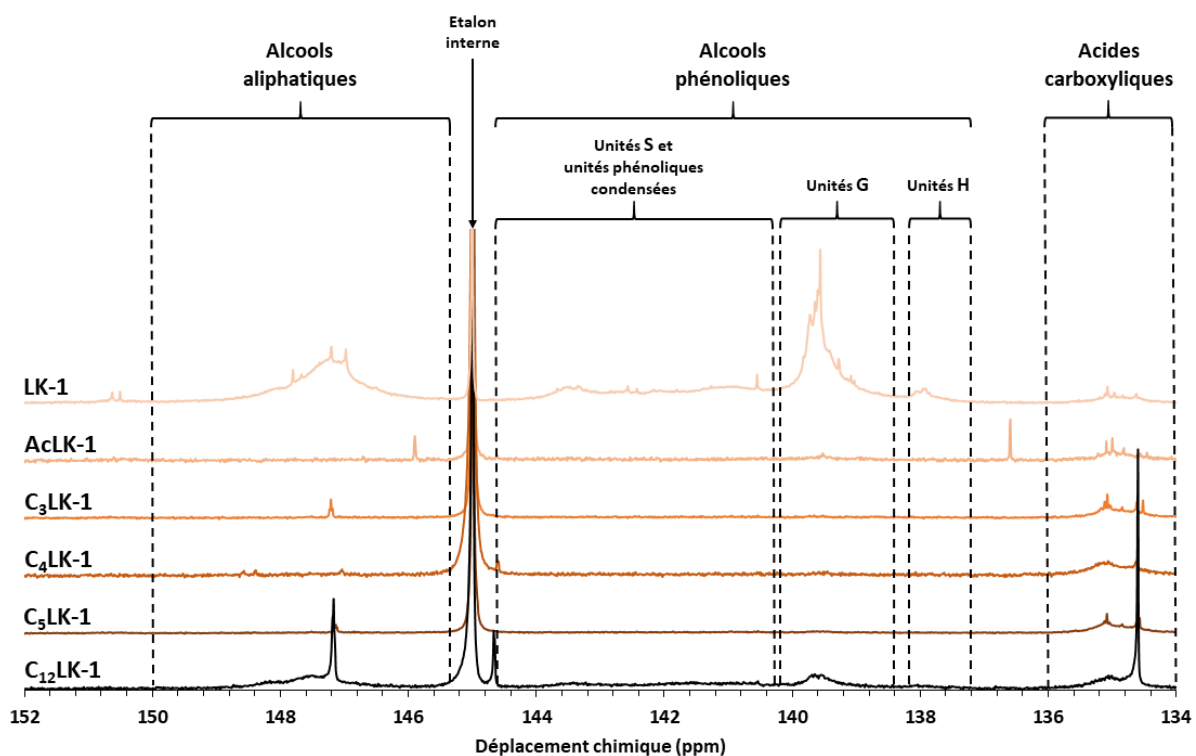


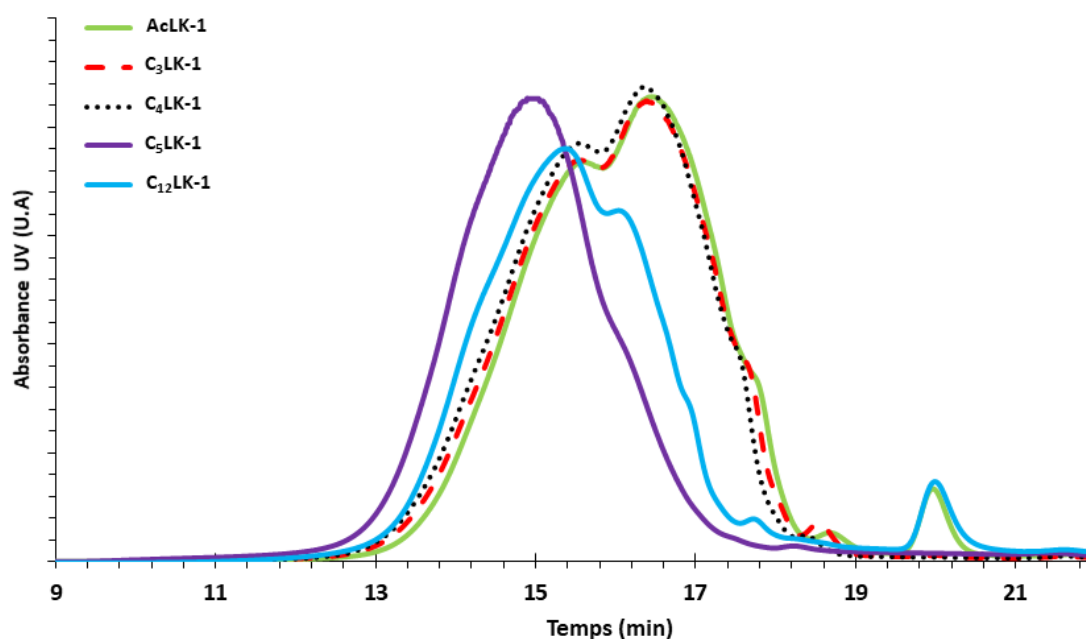
Figure 61 : Spectres RMN ³¹P des composés LK-1, AcLK-1, C₃LK-1, C₄LK-1, C₅LK-1 et C₁₂LK-1.

La caractérisation de ces matériaux a également été complétée par des analyses en chromatographie d'exclusion stérique. Les masses molaires moyennes en nombre et en masse ainsi que les PDI ont été calculées à partir des chromatogrammes de chaque composé (Figure 62). Les résultats de ces analyses sont résumés dans le Tableau 16). De façon générale, il est à noter que, comme attendu, les masses molaires moyennes augmentent avec la longueur de la chaîne aliphatique greffée.

 Tableau 16 : Résumé des caractéristiques des composés **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1**.

Matériau	OH _(Ph) résiduels (mmol.g ⁻¹)	OH _(Al) résiduels (mmol.g ⁻¹)	OH _(Total) résiduels (mmol.g ⁻¹)	M _n (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	PDI
C₃LK-1	0	0,01	0,01	4100	10 840	2,6
C₄LK-1	0	0	0	4630	11 120	2,4
C₅LK-1	0	0,01	0,01	5440	11 990	2,2
C₁₂LK-1	0,14	0,20	0,34	5640	16 280	2,9

OH_(Ph) : Fonction alcool phénolique ;
 OH_(Al) : Fonction alcool aliphatique ;
 M_n : Masse molaire moyenne en nombre ;
 M_w : Masse molaire moyenne en masse ;
 PDI : Indice de polydispersité.


 Figure 62 : Chromatogrammes des lignines **AcLK-1**, **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1** obtenus par analyse SEC.

III.3.3. Synthèses de nanoparticules à partir des lignines **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1**

Les lignines estérifiées **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1** ont été mises sous la forme de nanoparticules par les deux méthodes de préparation décrites au paragraphe III.2. Les procédures expérimentales utilisées sont les mêmes que celles décrites pour les nanoparticules formées à partir des lignines acétylées, à la seule exception qu'aucune étape de filtration n'a été réalisée pour la méthode par ajout d'un contre-solvant. Les matériaux ont été préalablement mis en solution dans le THF à des concentrations de 1 g.L⁻¹ pour les préparations par ajout d'un contre-solvant et de 2 g.L⁻¹ pour les préparations par dialyse. Si des nanoparticules ont bien été formées à partir des solutions de lignines **C₃LK-1**, **C₄LK-1** et **C₅LK-1**, aucune nanoparticule ne l'a été à partir du matériau **C₁₂LK-1**, et ce quelle que soit la méthode de préparation employée.

Les distributions en taille des différentes nanoparticules ainsi préparées (**NP(C₃LK-1)**, **NP(C₄LK-1)** et **NP(C₅LK-1)**), obtenues par spectroscopie DLS, sont présentées et comparées à celles des nanoparticules de lignines acétylées (**NP(AcLK-1)**) en Figure 63.

Des résultats sensiblement différents ont été obtenus en fonction de la méthode de préparation utilisée. En effet, dans le cas des nanoparticules préparées par dialyse, des populations présentant des distributions en taille comparables ont été obtenues, quelle que soit la longueur de chaîne (Figure 63 a). La longueur de la chaîne carbonée ne semble donc pas avoir de réels impacts sur la structuration des nanoparticules dans ce cas. Cette constatation est cependant à nuancer, car elle semble ne pouvoir être faite que dans le cas de chaînes carbonées relativement courtes. En effet, comme cela l'a été souligné précédemment, aucune particule n'a été formée à partir de **C₁₂LK-1**. Ces observations ont par ailleurs été confirmées par microscopie électronique à transmission (Figure 64).

Dans le cas des nanoparticules préparées par ajout d'un contre-solvant, la longueur de la chaîne carbonée présente à la surface des lignines semble, en revanche, influencer la structuration des particules obtenues (Figure 63 b). En effet, plus la taille de la chaîne carbonée greffée sur le matériau est importante, plus la nanoparticule obtenue est volumineuse. Ces observations ne semblent pouvoir être faites également que pour des longueurs de chaînes carbonées modérées, puisque aucune nanoparticule n'a pu être

obtenue à partir du matériau **C₁₂LK-1**. Ces résultats ont également été confirmés par microscopie électronique à transmission (Figure 65).

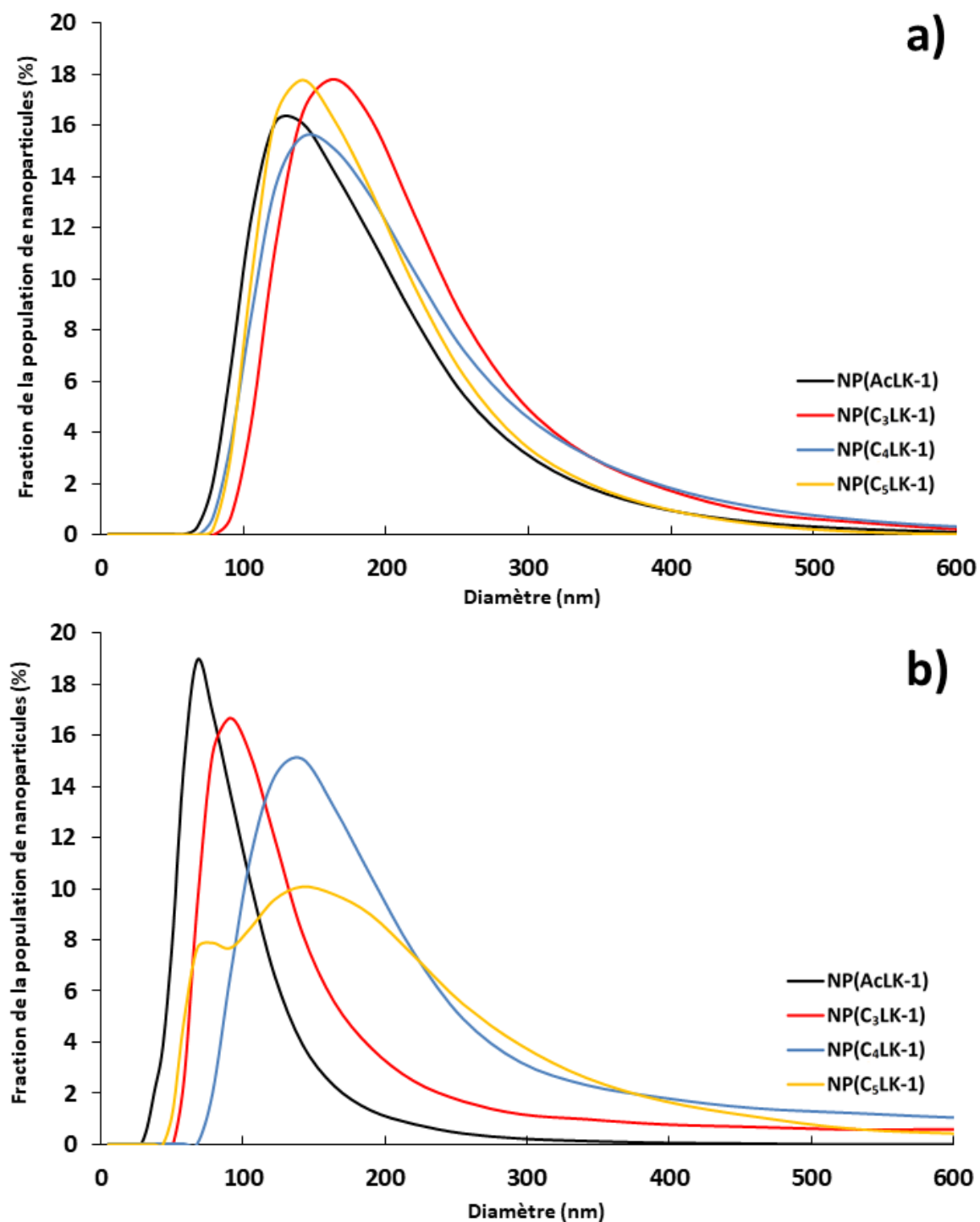


Figure 63 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-1)**, **NP(C₃LK-1)**, **NP(C₄LK-1)** et **NP(C₅LK-1)** obtenues a) par dialyse ou b) ajout d'un contre-solvant.

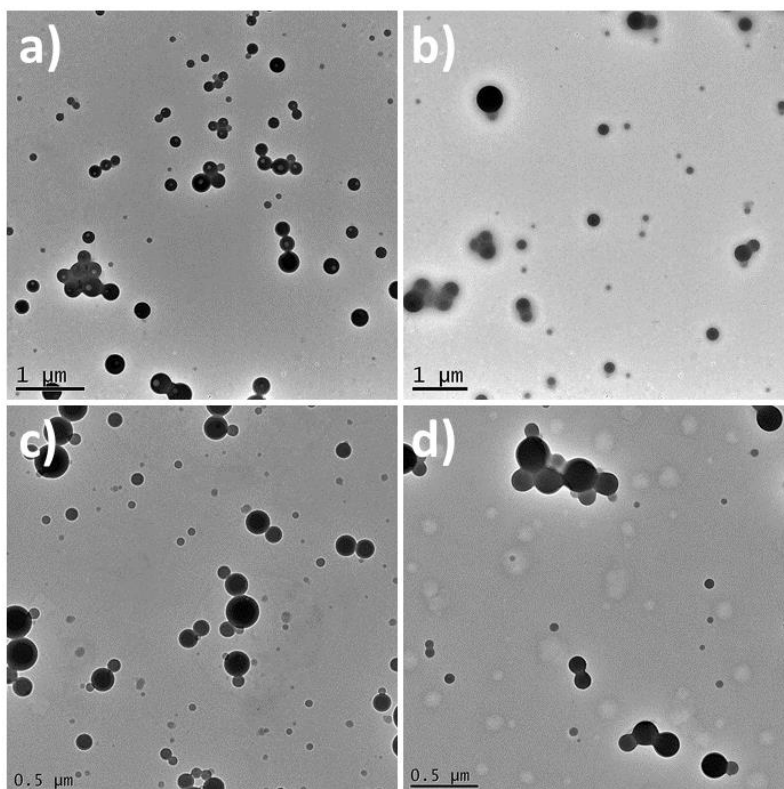


Figure 64 : Clichés MET des nanoparticules a) **NP(AcLK-1)**, b) **NP(C₃LK-1)**, c) **NP(C₄LK-1)** et d) **NP(C₅LK-1)** obtenues par dialyse.

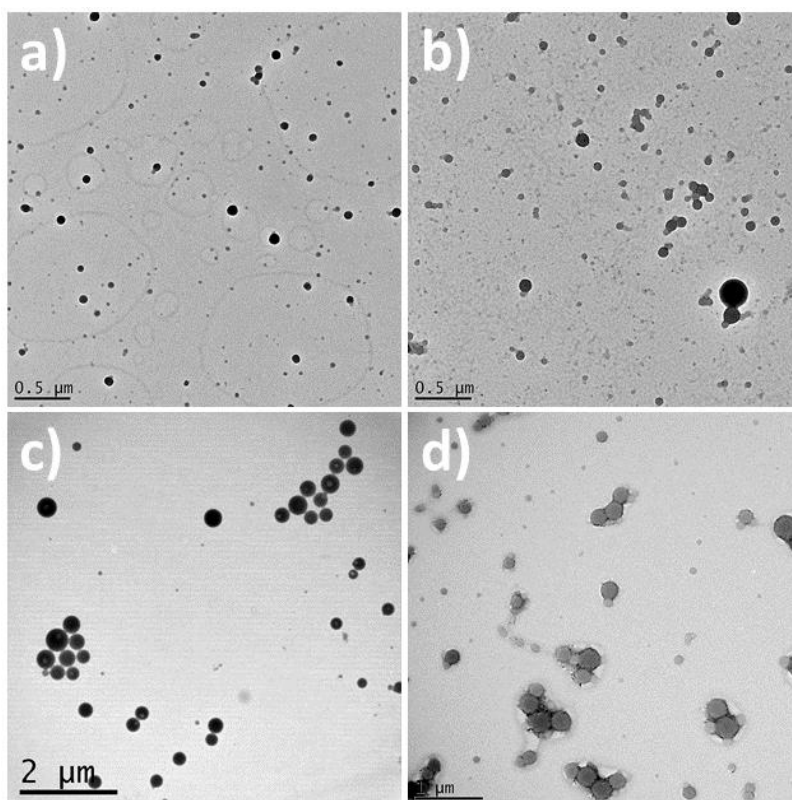


Figure 65 : Clichés MET des nanoparticules a) **NP(AcLK-1)**, b) **NP(C₃LK-1)**, c) **NP(C₄LK-1)** et d) **NP(C₅LK-1)** obtenues par ajout d'un contre-solvant.

En conclusion, il semble que l'influence de la longueur de la chaîne carbonée greffée à la surface des lignines dépende fortement de la méthode de préparation employée pour former les nanoparticules et confirme l'intérêt de la méthode par dialyse. Ces résultats restent cependant à confirmer en réalisant d'autres expérimentations, en particulier afin d'évaluer la répétabilité de ces différentes préparations. En effet, seul un essai a pu être effectué pour chaque matériau.

III.4. Étude de la production d'oxygène singulet par les nanoparticules de lignines acétylées

Afin d'évaluer le comportement photosensible des lignines sous la forme de nanoparticules, leur capacité à produire de l'oxygène singulet a été étudiée. Pour ce faire, des nanoparticules ont été préparées par dialyse à partir du matériau **AcLK-2**, préalablement solubilisé dans le THF à 2 g.L⁻¹, comme décrit au paragraphe III.2.2.1. En fin de dialyse, la solution de nanoparticules contenue dans la membrane a été centrifugée à 2740 x g. Puis les nanoparticules ont été redispersées dans un volume d'eau permettant d'obtenir une concentration massique de particules de 2 g.L⁻¹. Une partie de cette solution a également été diluée au demi afin d'obtenir une deuxième solution de particules concentrées à 1 g.L⁻¹. La capacité à produire de l'oxygène singulet de ces deux solutions a ensuite été évaluée par spectroscopie RPE.

Les résultats obtenus montrent que les lignines acétylées sont bien toujours capables de produire de l'oxygène singulet une fois sous la forme de nanoparticules (Figure 66). Cependant, cette production est nettement moins importante que celle observée lorsque les lignines sont en solution dans le DMF. Le signal observé pour les lignines sous la forme de nanoparticules est effectivement divisé par cinq par rapport à celui des lignines en solution dans le solvant organique à la même concentration massique. Toutefois, ces résultats sont difficilement comparables directement puisque des solvants différents ont été employés pour les deux études, la durée de vie de l'oxygène singulet dans l'eau, notamment, étant connue pour être plus courte que dans des solvants organiques.^[285]

Par ailleurs, cette diminution peut s'expliquer par différents facteurs. La taille nanométrique des particules de lignine va effectivement engendrer des phénomènes de diffusion rendant l'irradiation du polymère moins aisée que lorsqu'il est solubilisé dans le DMF.

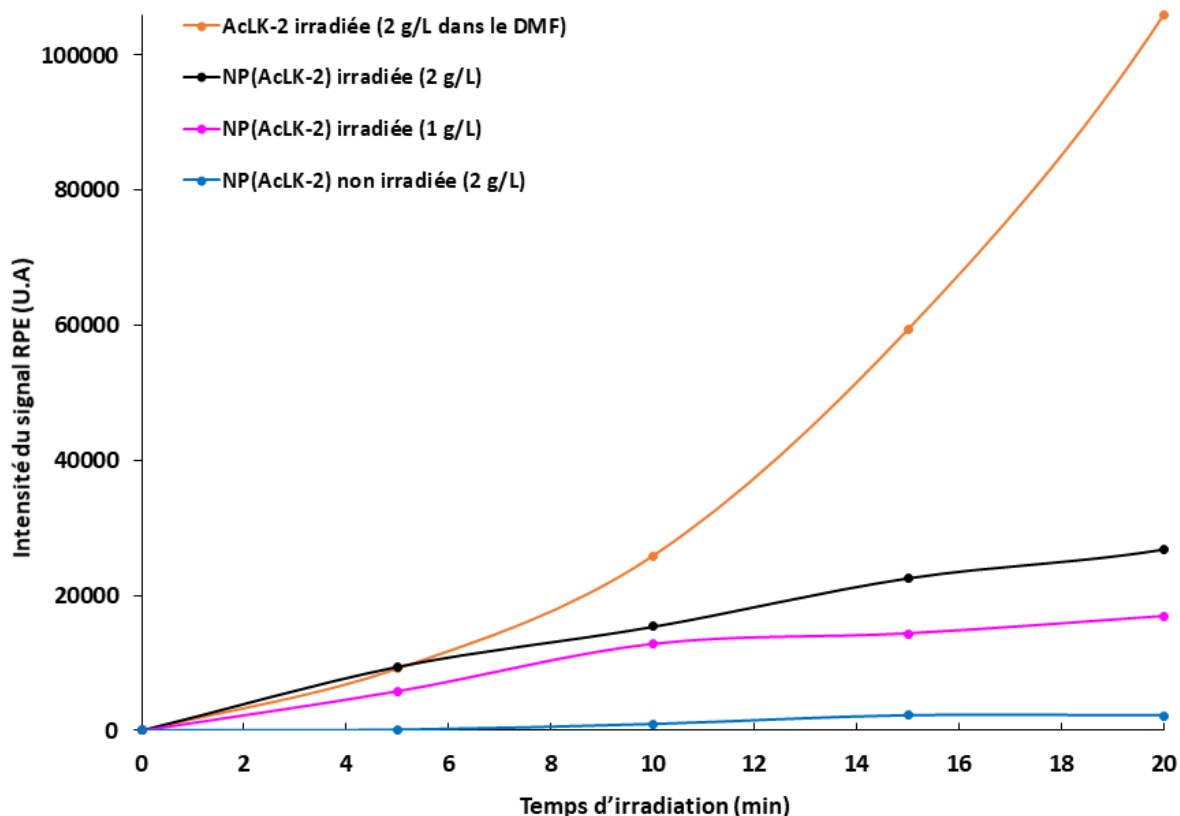


Figure 66 : Évolution de l'intensité du signal RPE du radical TEMPO en fonction du temps d'irradiation en présence ou non d'une source lumineuse pour les nanoparticules **NP(AcLK-2)**.

De plus, il est aussi possible que les lignines sous la forme de nanoparticules puissent subir des phénomènes d'auto-désexcitation conduisant donc à une production plus faible d'oxygène singulet. Il est également probable que l'oxygène singulet généré au sein de la particule ne puisse pas être diffusé dans le milieu environnant, prévenant de ce fait son piégeage par la TEMP et sa détection. Ces phénomènes expliquent que, pour une même concentration massique de lignine, une production d'oxygène singulet plus faible est observée lorsque le polymère est sous la forme de nanoparticules.

III.5. Conclusion

Au vu des différents résultats obtenus, la dialyse apparaît comme une méthode de choix pour la préparation de nanoparticules de lignines acétylées. En effet, cette technique permet de préparer de façon simple et répétable des nanoparticules stables en quantités relativement importantes.

De plus, il a été démontré que ces nanoparticules, une fois dispersées dans l'eau, étaient capables de générer de l'oxygène singulet. Cette activité qui n'a, à notre connaissance, jamais été reportée dans la littérature reste cependant assez restreinte et nécessite donc d'être améliorée.

Pour ce faire, il pourrait être envisagé de réduire la taille des nanoparticules employées afin, non seulement de faciliter leur pénétration membranaire, mais également d'augmenter leur production d'oxygène singulet. En effet, des nanoparticules de tailles plus petites pourraient permettre une irradiation plus efficace du polymère les constituant ainsi qu'une meilleure diffusion de l'oxygène singulet dans l'environnement. Dans cet objectif, des nanoparticules de lignines partiellement acétylées, telles que **NP(Ac₆₀LK-1)**, semblent être de bonnes candidates. Ces lignines, tout en possédant des capacités de production d'oxygène singulet comparables aux lignines entièrement acétylées, semblent en effet pouvoir s'organiser sous la forme de nanoparticules de taille sensiblement inférieures à celles formées à partir du polymère entièrement fonctionnalisé.

Par ailleurs, la source d'irradiation lumineuse est également à optimiser puisque la lampe halogène utilisée n'émet que très peu dans le proche UV, domaine dans lequel les lignines présentent leur maximum d'absorbance. Afin de corriger ce problème et de mimer des applications environnementales, l'emploi d'un simulateur solaire est envisagé.

Enfin, l'association des nanoparticules de lignines acétylées avec un photosensibilisateur permettrait d'augmenter le domaine du spectre solaire permettant leur photoactivation. C'est l'objet du chapitre suivant.

IV. Association des nanoparticules de lignines acétylées à un photosensibilisateur

IV.1. Introduction

Afin d'élargir encore le champ d'application des nanoparticules de lignines acétylées, notamment en augmentant le domaine du spectre solaire permettant une photoactivation du matériau final, l'association de ces dernières avec un photosensibilisateur, au spectre d'absorption UV-Visible complémentaire, a été étudiée. Dans ce but, deux stratégies différentes ont été mises en œuvre.

La première consiste à lier de façon covalente la lignine à un photosensibilisateur puis à mettre ce matériau nouvellement formé sous la forme de nanoparticules. La seconde, quant à elle, a consisté à encapsuler une molécule active photosensible dans les nanoparticules de lignines. La lignine retenue dans le cadre de ces deux stratégies est la lignine **LK-2**, cette dernière s'étant avérée être celle qui produit le plus d'espèces radicalaires de l'oxygène après acétylation (cf paragraphe II.3.1). Les résultats obtenus dans le cadre de ces deux approches sont détaillés dans ce chapitre.

IV.2. Préparation de nanoparticules de lignines acétylées fonctionnalisées par un photosensibilisateur

Le photosensibilisateur (**P₁**) choisi dans le cadre de cette stratégie est la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine. En effet, cette porphyrine dont la méthode de préparation est bien maîtrisée au laboratoire, possède une fonction alcool facilement post-fonctionnalisable par substitution nucléophile et permettant l'accroche sur la lignine. À cet effet, un bras aliphatique bromé (**P₂**) et un bras acide carboxylique (**P₄**) ont été choisis. Ce dernier est obtenu par la saponification d'un ester éthylique (**P₃**). Le couplage entre le photosensibilisateur et la lignine s'effectuera donc sur les fonctions hydroxyles du polymère selon deux stratégies de couplages différentes. La première par substitution nucléophile de Williamson (**LK-2-P₂**) et la seconde par estérification (**LK-2-P₄**). Il est cependant à noter que dans le cas de la réaction de Williamson, seuls les alcools phénoliques sont engagés, alors que l'ensemble des alcools, aliphatiques comme phénoliques, sont impliqués dans la réaction d'estérification. Une fois

couplé aux photosensibilisateurs, le matériau verra l'ensemble de ces fonctions hydroxyles restées libres acétylées, (**AcLK-2-P₂**) et (**AcLK-2-P₄**), puis sera mis sous la forme de nanoparticules par dialyse. Ces différentes étapes de synthèses sont résumées dans la Figure 67 ci-dessous.

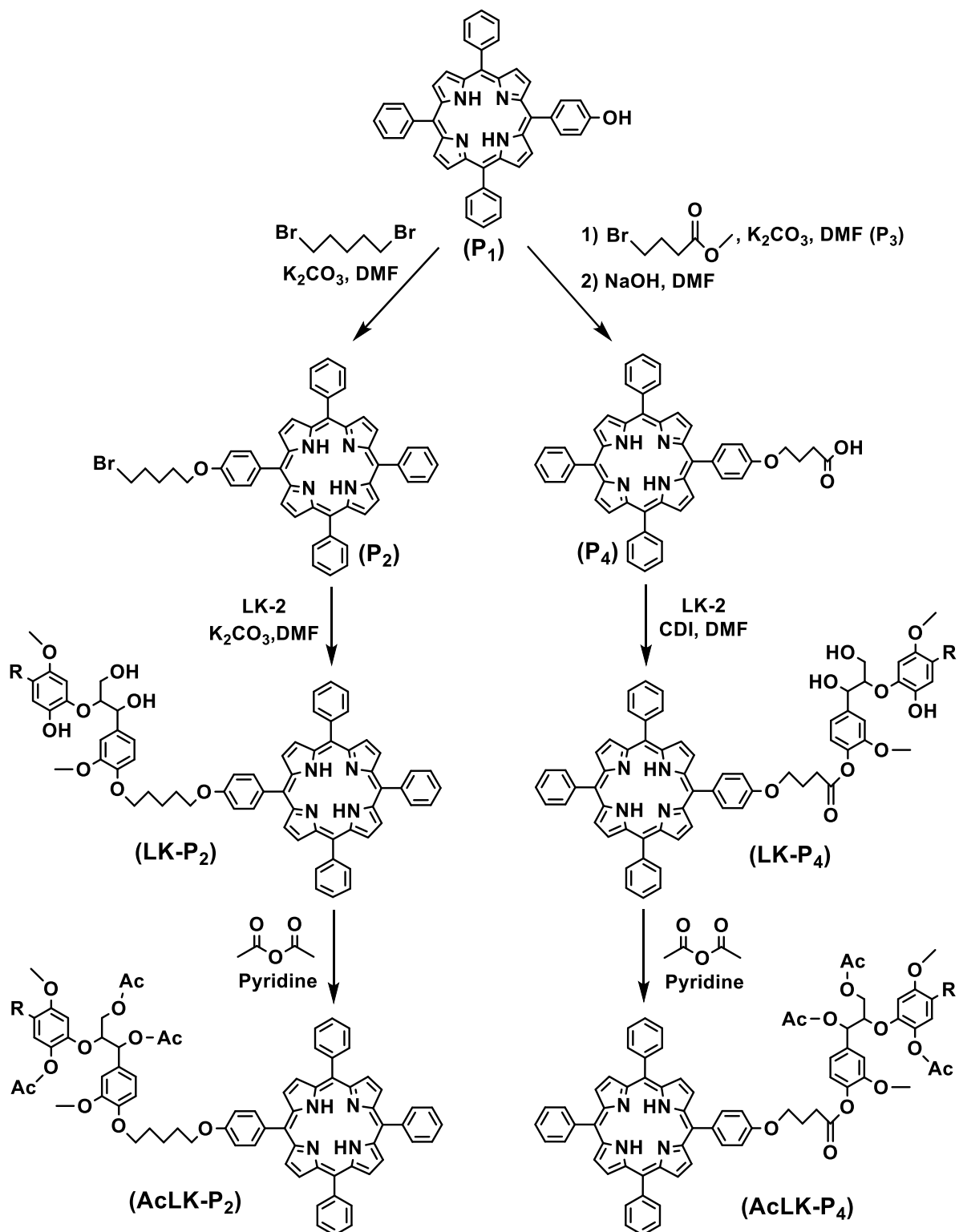


Figure 67 : Voies de synthèse des matériaux **AcLK-2-P₂** et **AcLK-2-P₄** (R : lignine).

IV.2.1. Synthèse du photosensibilisateur

La synthèse de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (**P₁**) a été réalisée selon la méthode dite des « aldéhydes mixtes » décrite par Little *et al.*^[286] Cette dernière s'effectue par condensation du pyrrole et de deux aldéhydes différents dans l'acide propionique à reflux. Afin de former majoritairement la porphyrine mono-hydroxylée, 3 équivalents de benzaldéhyde, 1 équivalent de 4-hydroxybenzaldéhyde et 4 équivalents de pyrrole ont été utilisés (Figure 68).

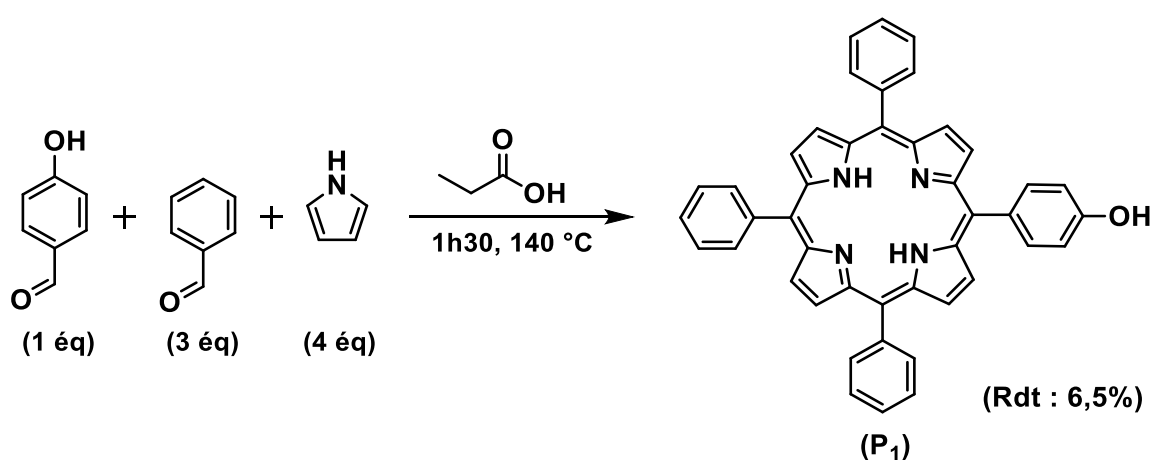


Figure 68 : Synthèse de la porphyrine **P₁**.

Le produit d'intérêt **P₁** est obtenu avec un rendement de 6,5% en accord avec la littérature.^[287, 288] Sa structure a été confirmée par spectroscopie RMN ¹H et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN ¹H du composé **P₁**, les signaux des deux groupes de protons β-pyrroliques à 8,87 (d, 2H) et à 8,83 ppm (sel, 6H) sont en effet caractéristiques d'une porphyrine mono-substituée. De plus, la présence d'un signal à -2,00 ppm confirme que cette porphyrine est bien sous sa forme base libre. Le spectre d'absorption UV-Visible présente le profil attendu pour une porphyrine base libre avec une bande de Soret à 419 nm, ainsi que quatre bandes Q I, II, III et IV respectivement à 647, 592, 550 et 516 nm.

IV.2.2. Fonctionnalisations du photosensibilisateur P₁

Préalablement aux réactions de couplage, il est nécessaire de munir le photosensibilisateur d'un bras aliphatique bromé ou d'un bras aliphatique portant un acide carboxylique terminal, afin de pouvoir greffer ensuite ce photosensibilisateur sur la lignine. Pour ce faire, les composés respectivement nommé P₂ et P₄ ont été synthétisés.

IV.2.2.1. Fonctionnalisation du photosensibilisateur (P₁) par un bras aliphatique bromé

La fonctionnalisation du photosensibilisateur P₁ par un bras aliphatique bromé a été réalisée, selon la réaction de Williamson, par substitution nucléophile du 1,5-dibromopentane par le groupement hydroxyle de la porphyrine mono-hydroxylée.^[289] Ce couplage a été effectué en présence de carbonate de potassium (K₂CO₃) dans le DMF en condition anhydre pendant une heure (Figure 69). Après extraction liquide-liquide et purification par chromatographie automatisée sur gel de silice, la 5-(4-(3-bromopentoxo)phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P₂) est obtenue avec un rendement de 88%.

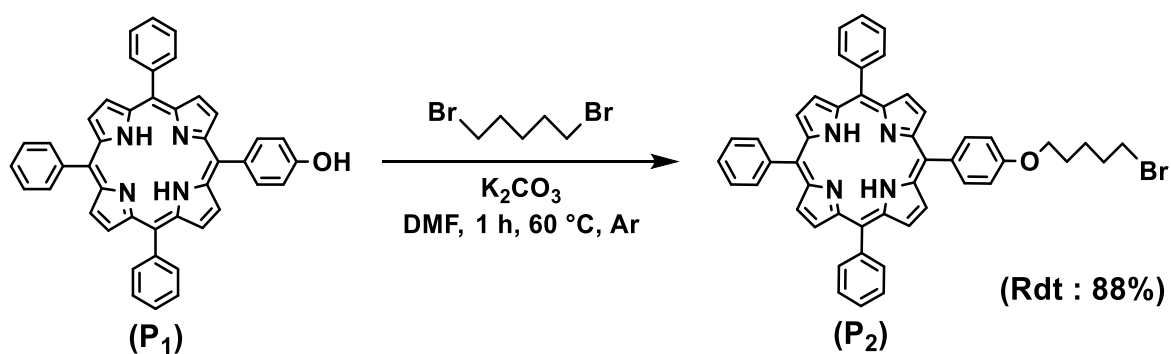


Figure 69 : Synthèse de la porphyrine P₂.

La structure du produit de couplage P₂ a été confirmée par spectroscopies RMN ¹H et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN ¹H, les signaux à 4,25 ppm (t, 2H, J = 6,5 Hz, H_{O-CH₂}), 3,53 ppm (t, 2H, J = 6,5 Hz, H_{Br-CH₂}), 2,06 ppm (m, 2H, H_{CH₂-CH₂-Br}), 2,00 ppm (m, 2H, H_{O-CH₂-CH₂}), 1,79 ppm (m, 2H, H_{CH₂-CH₂-CH₂}) sont en effet caractéristiques du bras alcane greffé. Le spectre d'absorption UV-Visible est comme attendu similaire à celui de la porphyrine de départ, P₁ avec une bande de Soret à 419 nm et quatre bandes Q I, II, III et IV respectivement

à 646, 590, 552 et 516 nm ; l'influence d'un bras bromopentyle sur l'état fondamental étant faible.

IV.2.2.2. Fonctionnalisation du photosensibilisateur (P_1) par un bras portant un acide carboxylique terminal

La fonctionnalisation du photosensibilisateur P_1 par un bras aliphatique portant une fonction acide carboxylique terminale a été réalisée en deux étapes. Dans une première étape, la porphyrine mono-hydroxylée est fonctionnalisée par le 4-bromobutanoate d'éthyle pour conduire au produit P_3 , puis cet ester nouvellement formé est saponifié dans une deuxième étape pour conduire au composé d'intérêt P_4 .

IV.2.2.2.1. Fonctionnalisation de P_1 par le 4-bromobutanoate d'éthyle

La fonctionnalisation du photosensibilisateur P_1 par le bras aliphatique ester a été également réalisée selon la réaction de Williamson, par substitution nucléophile du 4-bromobutanoate d'éthyle par le groupement hydroxyle de la porphyrine P_1 . Ce couplage a été effectué en présence de K_2CO_3 dans le DMF anhydre et sous atmosphère inerte pendant 90 min (Figure 70). Après extraction liquide-liquide et purification par chromatographie automatisée sur gel de silice, la 4-(4-(10,15,20-triphénylporphyrin-5-yl)phénoxy)butanoate d'éthyle (P_3) est obtenue avec un rendement de 95%.

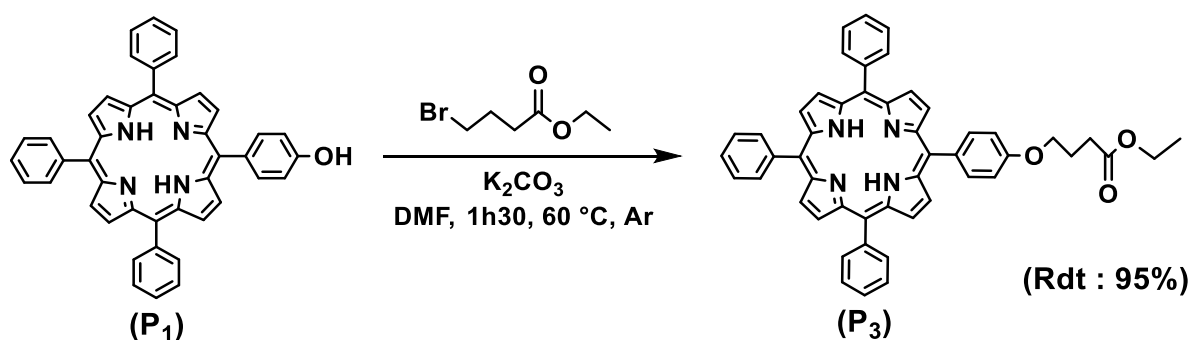


Figure 70 : Synthèse de la porphyrine P_3 .

La structure du produit de couplage P_3 a été confirmée par spectroscopies RMN 1H et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN 1H , les signaux à 4,25 ppm (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, H_O -

CH_2), 4,23 ppm (quad, 2H, $J = 7,3$ Hz, $\text{H}_{\text{O-CH}_2\text{-CH}_3}$), 2,67 ppm (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-CO}}$), 2,28 ppm (quint, 2H, $J = 6,5$ Hz, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}}$) et à 1,33 ppm (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, H_{CH_3}) sont en effet caractéristiques du bras organique greffé. Le spectre d'absorption UV-Visible, est comme attendu là encore similaire à celui de la porphyrine de départ, P_1 avec une la bande de Soret à 419 nm ainsi que quatre bandes Q I, II, III, et IV respectivement à 646, 591, 553 et 517 nm ; l'influence du bras greffé étant là aussi minime sur les propriétés de l'état fondamental du photosensibilisateur.

IV.2.2.2. Saponification du photosensibilisateur P_3

Afin d'obtenir l'acide 4-(4-(10,15,20-triphénylporphyrin-5-yl)phénoxy)butanoïque, (P_4), l'ester obtenu précédemment a été saponifié par un large excès (89 éq.) d'hydroxyde de sodium (NaOH). Cette réaction a été conduite pendant 4 h dans le DMF à 140°C (Figure 71).

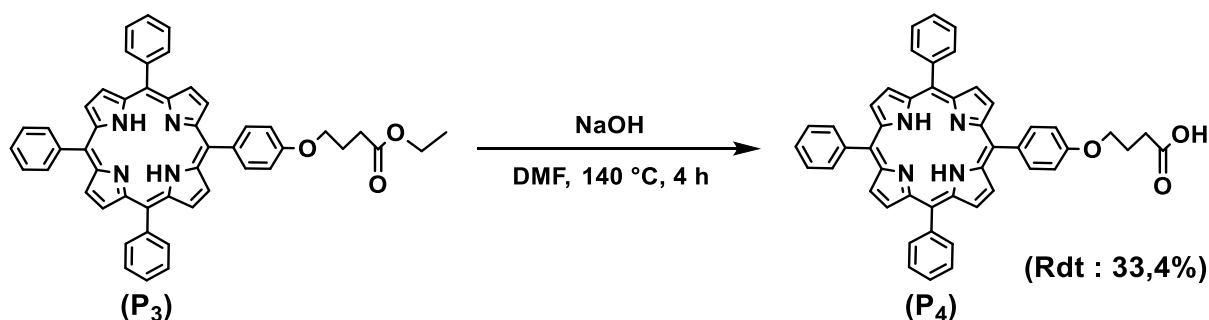


Figure 71 : Synthèse de la porphyrine P_4 .

Après extraction liquide-liquide et purification par chromatographie automatisée sur gel de silice, le produit d'intérêt P_4 a été obtenu avec un rendement de 33,4 %. La structure de ce dernier a été confirmée par spectroscopies RMN ^1H et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN ^1H , la disparition des signaux caractéristiques de l'ester éthylique atteste du succès de la saponification. Le spectre UV-Visible reste proche de celui des composés précédents, avec une bande de Soret à 419 nm et quatre bandes Q I, II, III et IV respectivement à 643, 591, 552 et 516 nm.

IV.2.3. Fonctionnalisation de la lignine LK-2 par le photosensibilisateur P₂

La réaction de couplage entre la porphyrine P₂ et la lignine LK-2 a été effectuée par substitution nucléophile de Williamson du bras aliphatique bromé du composé P₂ par les phénols de la lignine (Figure 72).

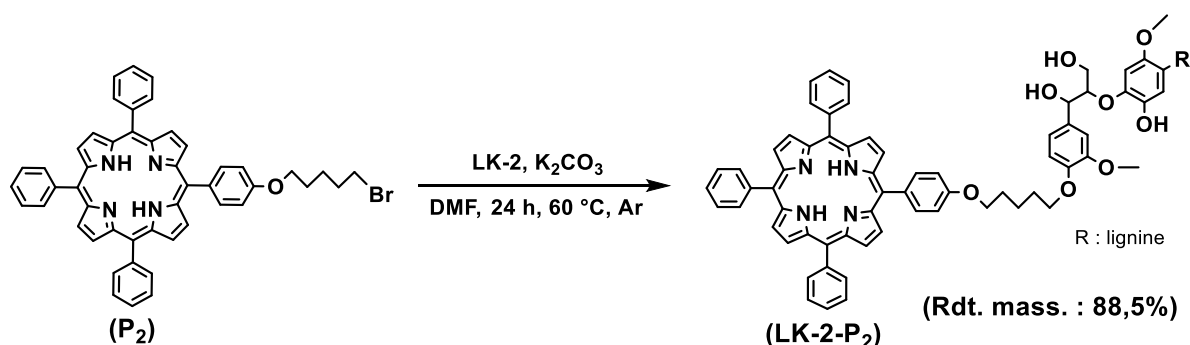


Figure 72 : Fonctionnalisation de LK-2 par P₂.

Pour ce faire, la réaction a été conduite en présence de carbonate de potassium dans le DMF et en condition anhydre. Du fait de l'encombrement stérique des alcools phénoliques de la lignine, le temps de réaction a été porté à 24 h. Il a par ailleurs été choisi d'introduire les réactifs dans des proportions de 1 mmol de photosensibilisateur par gramme de lignine.

En fin de réaction, le matériau fonctionnalisé est précipité dans l'éther diéthylique puis purifié par dialyse. Après lyophilisation, le composé LK-2-P₂ a été obtenu avec un rendement massique de 88,5% et caractérisé par spectroscopie d'absorption UV-Visible. Cette analyse a permis de confirmer le couplage entre la lignine et le photosensibilisateur P₂ (Figure 73). En effet, non seulement les signaux caractéristiques du composé P₂, à savoir la bande de Soret à 419 nm et les quatre bandes Q à 516, 550, 589 et 649 nm, apparaissent sur le spectre d'absorption UV-Visible, mais également celui de la lignine entre 270 et 370 nm. Compte tenu du nombre de lavages effectués, il semble fortement improbable que le photosensibilisateur P₂ ne soit qu'adsorbé à la surface de la lignine. Une analyse par spectroscopie RMN du phosphore du matériau LK-2-P₂ permettrait d'en être certain, cependant la trop faible quantité de matériau disponible ne l'a pas permise.

Parallèlement, l'analyse du spectre d'absorption UV-Visible a permis de déterminer un taux de fonctionnalisation de 0,2 mmol de photosensibilisateur par gramme de lignine. Ce dernier

a été déterminé à partir de l'absorbance à 419 nm d'une solution de matériaux **LK-2-P₂** dans le DMF et du coefficient d'extinction molaire du composé **P₂**, considérant que le greffage à la lignine ne modifie pas fortement ce coefficient. Ce coefficient, d'une valeur de 426 500 L.mol⁻¹.cm⁻¹ a, quant à lui, été calculé à partir de solutions étalons du composé **P₂** dans le DMF, de concentration en **P₂** comprise entre 5,6.10⁻⁷ et 2,5.10⁻⁶ mol.L⁻¹.

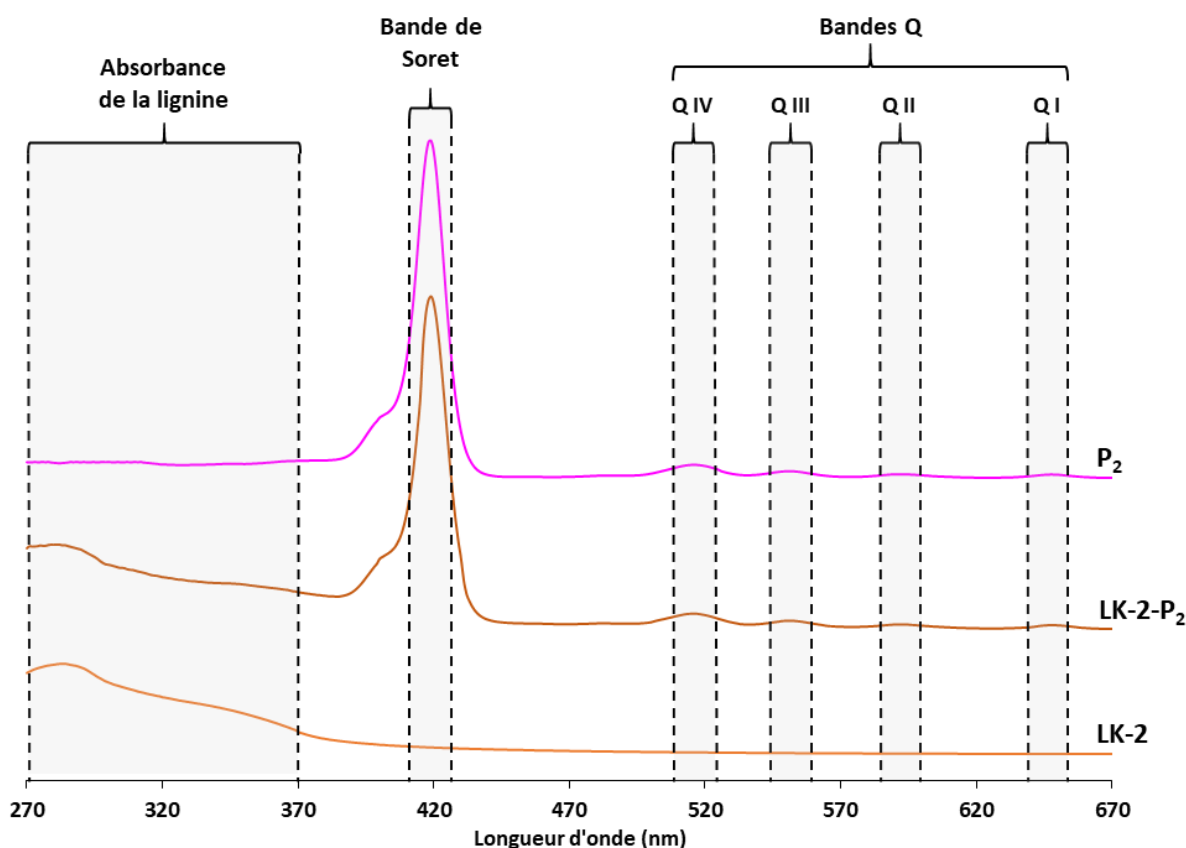


Figure 73 : Superposition des spectres d'absorption UV-Visible des composés **P₂**, **LK-2-P₂** et **LK-2**.

De plus, l'analyse élémentaire du composé **LK-2-P₂** a révélé un taux d'azote de 0,89%. La lignine **LK-2** ne contenant pas d'azote (cf. paragraphe 1.5.3), l'azote détecté provient donc exclusivement de la porphyrine greffée et correspond à une quantité d'environ 0,2 mol de porphyrine par gramme de lignine. Ce résultat est en accord avec celui déterminé par le dosage spectrophotométrique UV-Visible effectué précédemment.

IV.2.4. Fonctionnalisation de la lignine LK-2 par le photosensibilisateur P₄

La réaction de couplage entre la porphyrine P₄ et la lignine LK-2 a été effectuée selon une réaction d'estérification mettant en jeu les fonctions hydroxyle de la lignine et le motif acide carboxylique porté par le composé P₄ (Figure 74).

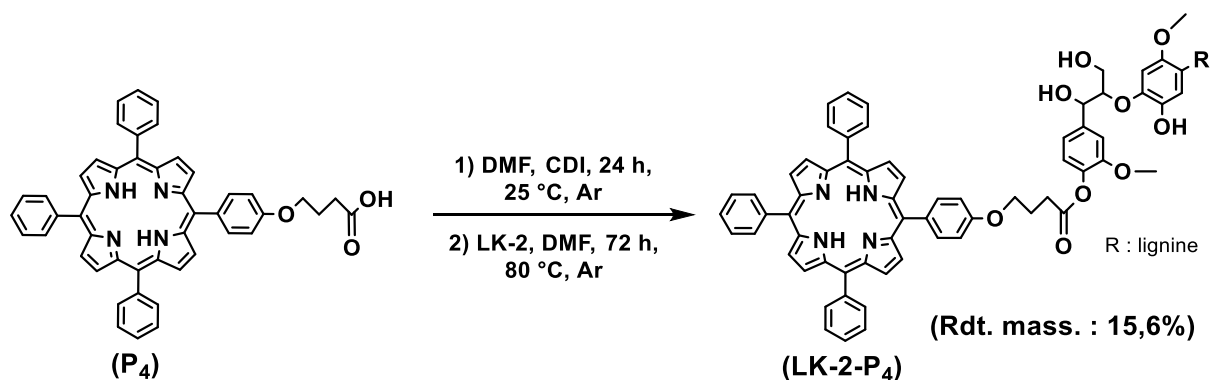


Figure 74 : Fonctionnalisation de LK-2 par P₄.

Dans un premier temps, la fonction acide carboxylique de P₄ est activée par le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) pendant 24 h dans le DMF à 25 °C et sous atmosphère d'argon.^[290] Puis, dans un second temps, la lignine LK-2, préalablement solubilisée dans le DMF, est ajoutée au milieu réactionnel dans les mêmes proportions que celles décrites au paragraphe IV.2.3 (P₄/LK-2 : 1 mmol / 1 g). Le couplage a ensuite été conduit pendant 72 h à 80 °C. En fin de réaction, le matériau fonctionnalisé est précipité dans l'éther diéthylique, puis purifié par dialyse. Après lyophilisation, le composé LK-2-P₄ a été obtenu avec un rendement massique de 15,6%.

Compte tenu de la faible quantité de produit obtenu lors de cette étape, il a été décidé d'acétyler directement l'ensemble du matériau LK-2-P₄ disponible. Le succès de la réaction de greffage du photosensibilisateur sera donc confirmé ultérieurement par l'analyse du matériau acétylé AcLK-2-P₄. Ces résultats sont présentés au paragraphe suivant.

IV.2.5. Acétylation des matériaux fonctionnalisés LK-2-P₂ et LK-2-P₄

Les fonctions alcool et phénol restées libres sur les matériaux LK-2-P₂ et LK-2-P₄ ont été acétylées, afin de permettre l'obtention ultérieure de nanoparticules. Dans les deux cas, la procédure d'acétylation utilisée est la même que celle décrite pour les lignines non fonctionnalisées (cf. chapitre II.2). Les matériaux LK-2-P₂ et LK-2-P₄ ont été introduits dans un mélange équimolaire de pyridine et d'anhydride acétique à 25 °C et sous atmosphère inerte pendant 48 h (Figure 75 et Figure 76), puis récupérés en fin de réaction par précipitation et filtration. Les produits d'intérêt, respectivement nommés AcLK-2-P₂ et AcLK-2-P₄, ont été obtenus avec des rendements massiques respectifs de 93 et 46 % et caractérisés en spectroscopie d'absorption UV-Visible.

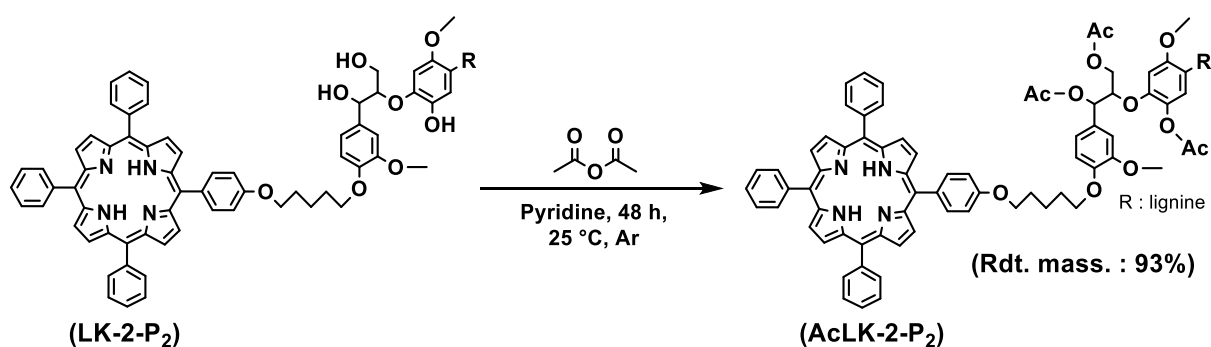


Figure 75 : Synthèse du matériau AcLK-2-P₂.

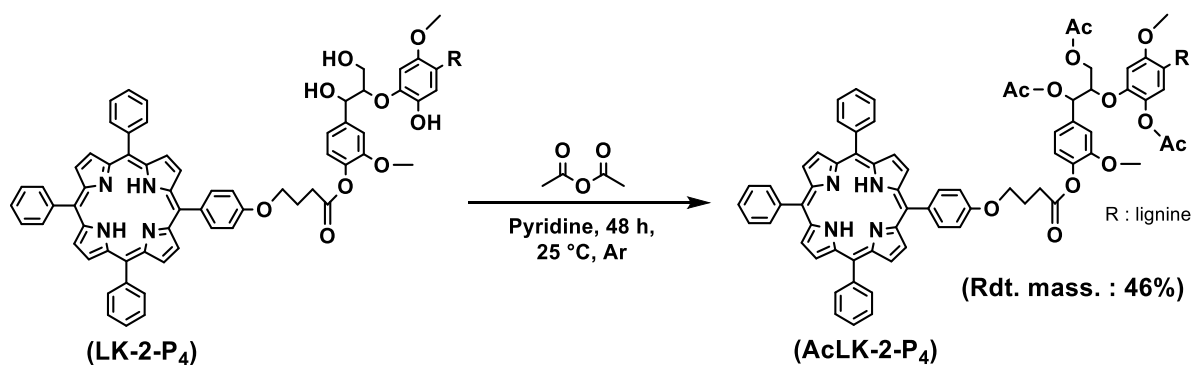


Figure 76 : Synthèse du matériau AcLK-2-P₄.

L'étude de l'absorption UV-Visible du matériau AcLK-2-P₂ a permis de montrer que le taux de photosensibilisateur présent sur les lignines n'avait pas évolué par rapport à celui déterminé

pour le matériau **LK-2-P₂** (Figure 77), permettant ainsi de vérifier que la réaction d'acétylation ne dégradait pas le photosensibilisateur greffé. Il est également à noter que cette analyse renforce l'hypothèse, selon laquelle l'ensemble des porphyrines est bien greffé de façon covalente à la lignine et non simplement adsorbé à sa surface, puisque des taux de fonctionnalisation identiques sont observés avant et après la réaction d'acétylation.

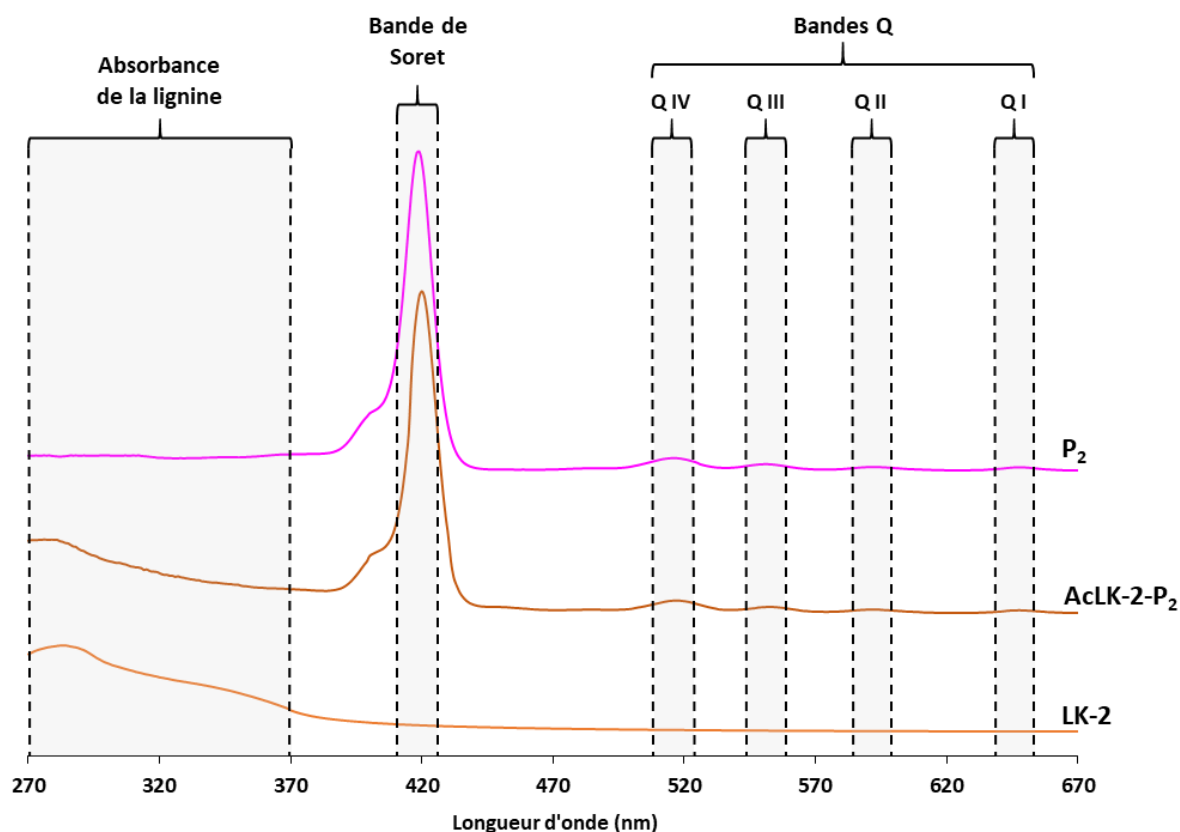


Figure 77 : Superposition des spectres d'absorption UV-Visible des composés **LK-2**, **LK-2-P₂** et **AcLK-2-P₂**.

Pour le matériau **AcLK-2-P₄**, un taux de fonctionnalisation de 0,08 mmol de photosensibilisateur par gramme de lignine a pu être déterminé (Figure 78). Ce dernier l'a été à partir de l'absorbance à 419 nm d'une solution de matériaux **AcLK-2-P₄** dans le DMF et du coefficient d'extinction molaire du composé **P₃**. Ce coefficient, d'une valeur de 431 800 L.mol⁻¹.cm⁻¹ a, quant à lui, été calculé à partir de solutions étalons du composé **P₃** dans le DMF, de concentration en **P₃** comprise entre 5,6.10⁻⁷ et 2,7.10⁻⁶ mol.L⁻¹.

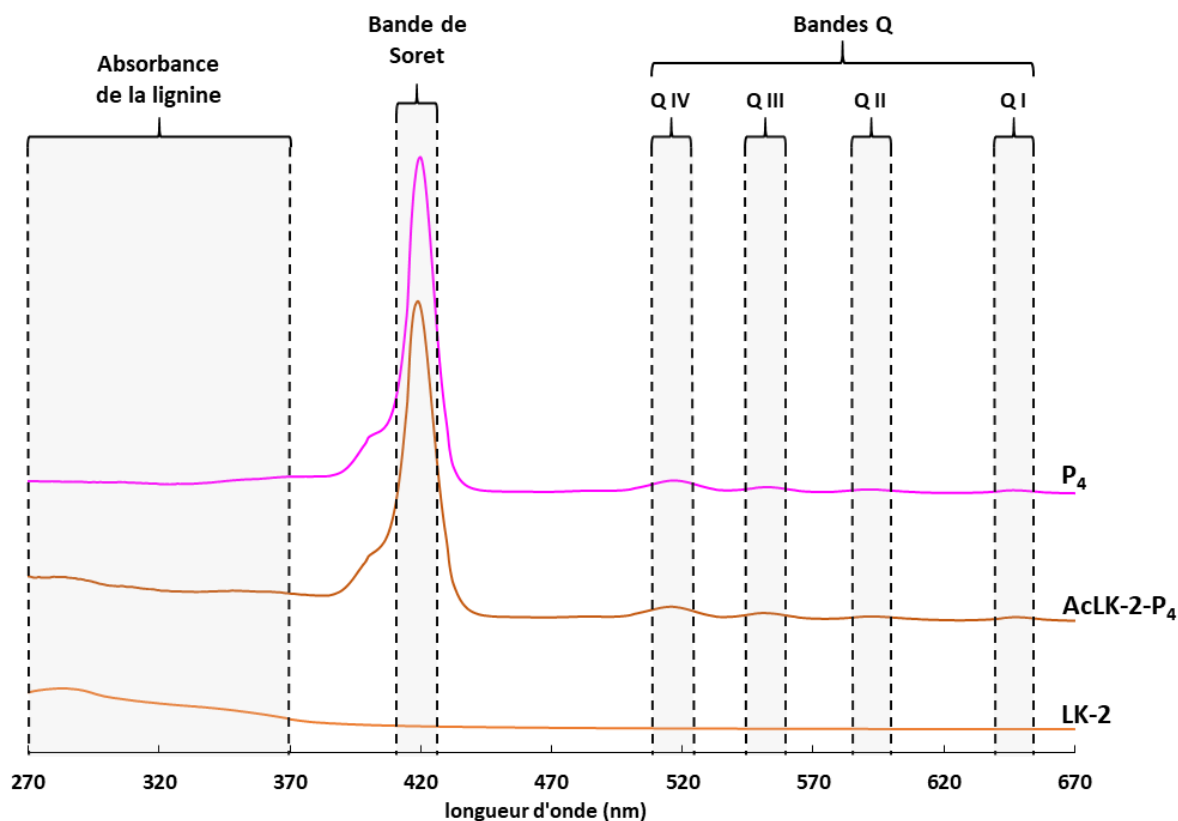


Figure 78 : Superposition des spectres d'absorption UV-Visible des composés **LK-2**, **LK-2-P₄** et **AcLK-2-P₄**.

Par ailleurs, le succès de la réaction d'estérification a été vérifié pour le matériau **AcLK-2-P₂** par spectroscopie IRTF (Figure 79). En effet, cette analyse montre des signes non équivoques d'acétylation avec notamment l'apparition de trois nouvelles bandes majeures à 1761, 1739, 1370 et 1190 cm^{-1} , correspondant respectivement aux vibrations de valence des liaisons C=O des esters aromatiques, aux vibrations de valence des liaisons C=O des esters aliphatiques, aux vibrations de déformation des liaisons C-H des CH_3 et aux vibrations de valence des liaisons C-O ester nouvellement formées.^[271] De plus, la diminution de la bande observable entre 3600 et 3100 cm^{-1} sur le spectre du matériau acétylé met également en évidence l'estérification des groupements hydroxyles des lignines. Il est en outre à noter que la bande restante est la signature des vibrations de valence des liaisons N-H de la porphyrine. En raison de la faible quantité de produit disponible, la confirmation de l'acétylation par spectroscopie infrarouge n'a pu être faite dans le cas du produit **AcLK-2-P₄**.

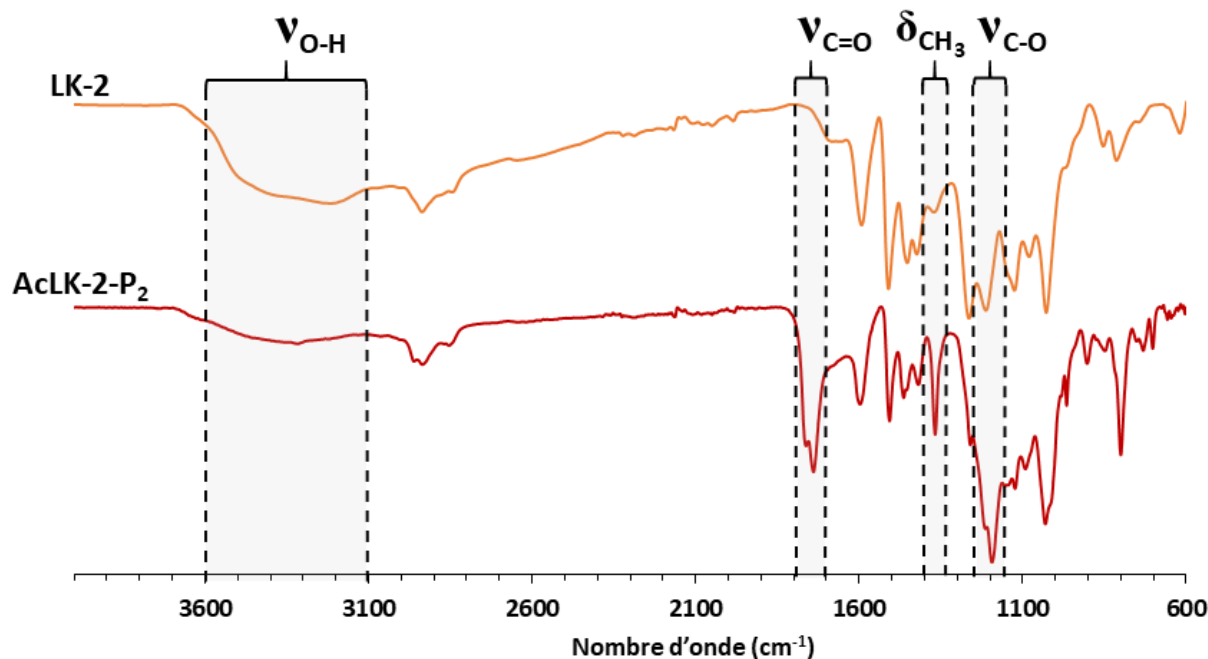


Figure 79 : Superposition des spectres IRTF des matériaux **LK-2** et **AcLK-2-P₂**.

IV.2.6. Préparation de nanoparticules à partir des matériaux **AcLK-2-P₂** et **AcLK-2-P₄**

La mise sous forme de nanoparticules des matériaux fonctionnalisés a été effectuée par dialyse selon la méthode décrite au paragraphe III.2.2.1. Les lignines **AcLK-2-P₂** et **AcLK-2-P₄** ont été solubilisées à la concentration de 2 g.L⁻¹ dans le THF, puis mises en dialyse contre de l'eau pendant 24 h. La distribution en taille des nanoparticules formées, nommées respectivement **NP(AcLK-2-P₂)** et **NP(AcLK-2-P₄)**, a ensuite été mesurée par spectroscopie DLS (Figure 80) et par microscopie électronique à transmission (Figure 81).

L'analyse de la répartition en taille des nanoparticules obtenues montre qu'une légère variation du diamètre moyen des particules obtenues est observable en fonction du matériau de départ employé. En effet, la majorité des nanoparticules (80%) préparées à partir du matériau **AcLK-2-P₂** ont une taille moyenne comprise entre 60 et 160 nm, alors que dans le cas de celles formées à partir d'**AcLK-2-P₄**, 80% d'entre elles affichent un diamètre moyen compris entre 90 et 220 nm.

Il est par ailleurs à noter que les particules **NP(AcLK-2-P₂)** présentent des tailles moyennes inférieures d'environ 40 nm à celles obtenues à partir de la lignine acétylée **AcLK-2**. Les particules **NP(AcLK-2-P₄)** présentent, quant à elles, des tailles similaires aux nanoparticules de

lignines acétylées **AcLK-2**, laissant donc supposer que le taux de fonctionnalisation du matériau en porphyrine joue un rôle sur la structuration des nanoparticules. Ces observations méritent cependant d'être confirmées par l'étude d'un plus grand nombre de préparations de nanoparticules.

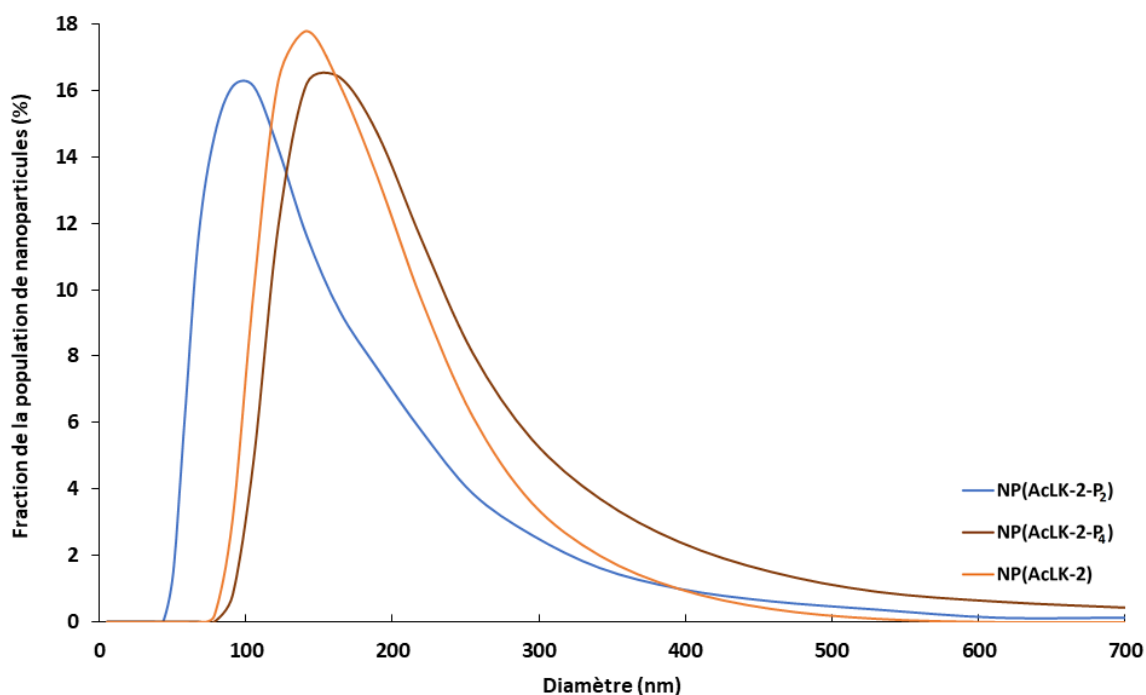


Figure 80 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-2-P₂)**, **NP(AcLK-2-P₄)** et **NP(AcLK-2)**.

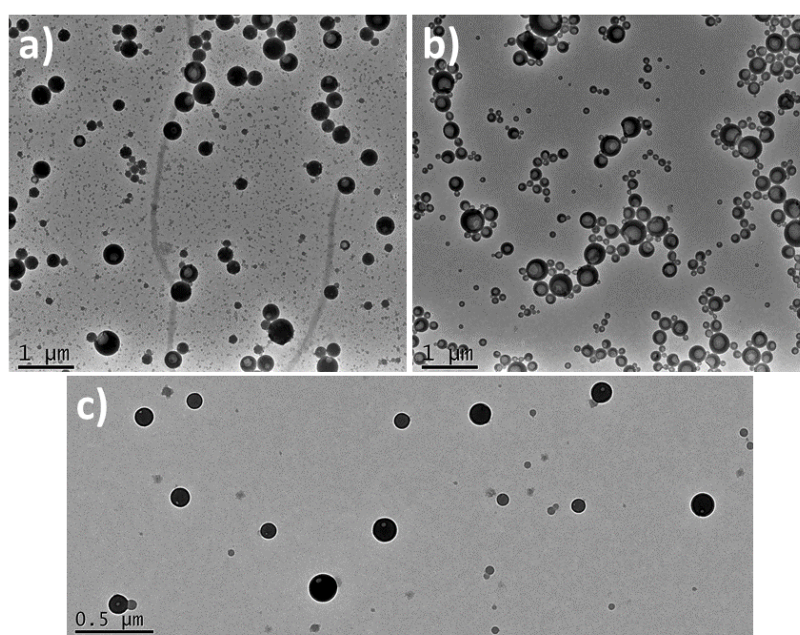


Figure 81 : Clichés MET des nanoparticules a) **NP(AcLK-2-P₂)**, b) **NP(AcLK-2-P₄)** et c) **NP(AcLK-2)**.

IV.3. Encapsulation d'un principe actif dans des nanoparticules de lignines acétylées AcLK-2

Afin de valider la faisabilité de l'encapsulation de composés bioactifs dans des nanoparticules de lignines acétylées, deux composés photosensibles modèles, l'un hydrosoluble : la rhodamine B, et l'autre hydrophobe : la 5-10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphényl)-porphyrine, respectivement abrégée **RhB** et **TPPOH** (Figure 82) ont été encapsulées. Ces composés ont par ailleurs été choisis, car ils présentent une signature UV-Visible nettement différente de celle de la lignine, facilitant ainsi le suivi de leur encapsulation.

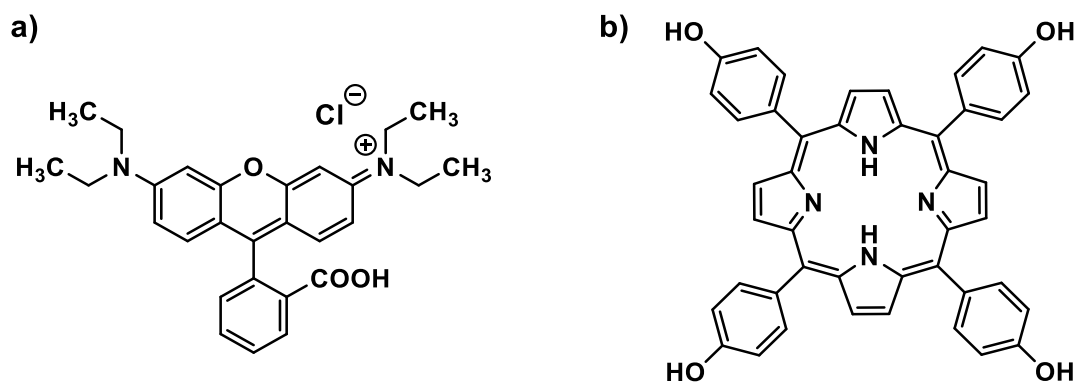


Figure 82 : Structure a) de la rhodamine B (**RhB**) et b) de la 5-10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphényl)-porphyrine (**TPPOH**).

IV.3.1. Préparation des nanoparticules

L'encapsulation des molécules modèles a été effectuée par dialyse. Dans chaque cas, la lignine **AcLK-2** a été solubilisée dans l'acétone à une concentration de 2 g.L⁻¹ en présence du principe actif, **TPPOH** ou **RhB**, introduit à la concentration de 0,2 g.L⁻¹. De l'acétone a été utilisé pour ces préparations, car **RhB** et **TPPOH** ne sont pas solubles dans le THF. Le ratio entre les concentrations massiques de lignine acétylée et de composé à encapsuler a été choisi conformément aux travaux d'encapsulation de molécules bioactives, telles que le sorafénib et la capécitabine, par des nanoparticules de lignines, décrits par Figueiredo *et al.*^[219] La solution ainsi obtenue a ensuite été dialysée contre de l'eau pendant 24 h. Les nanoparticules obtenues, nommées **NP(AcLK-2-RhB)**, dans le cas de l'encapsulation de la rhodamine B, et **NP(AcLK-2-TPPOH)**, dans le cas de l'encapsulation de la **TPPOH**, ont ensuite été caractérisées par spectroscopie DLS (Figure 83) et microscopie électronique à transmission (Figure 84).

L'analyse de la répartition en taille des nanoparticules obtenues montre qu'une légère variation du diamètre moyen des particules obtenues est observable en fonction de la molécule encapsulée. En effet, 90% des nanoparticules encapsulant de la rhodamine B ont une taille moyenne comprise entre 70 et 160 nm, alors que dans le cas de celles encapsulant la porphyrine, 90% d'entre elles ont un diamètre moyen compris entre 50 et 140 nm, proche de celui des nanoparticules **NP(AcLK-2-P₂)**.

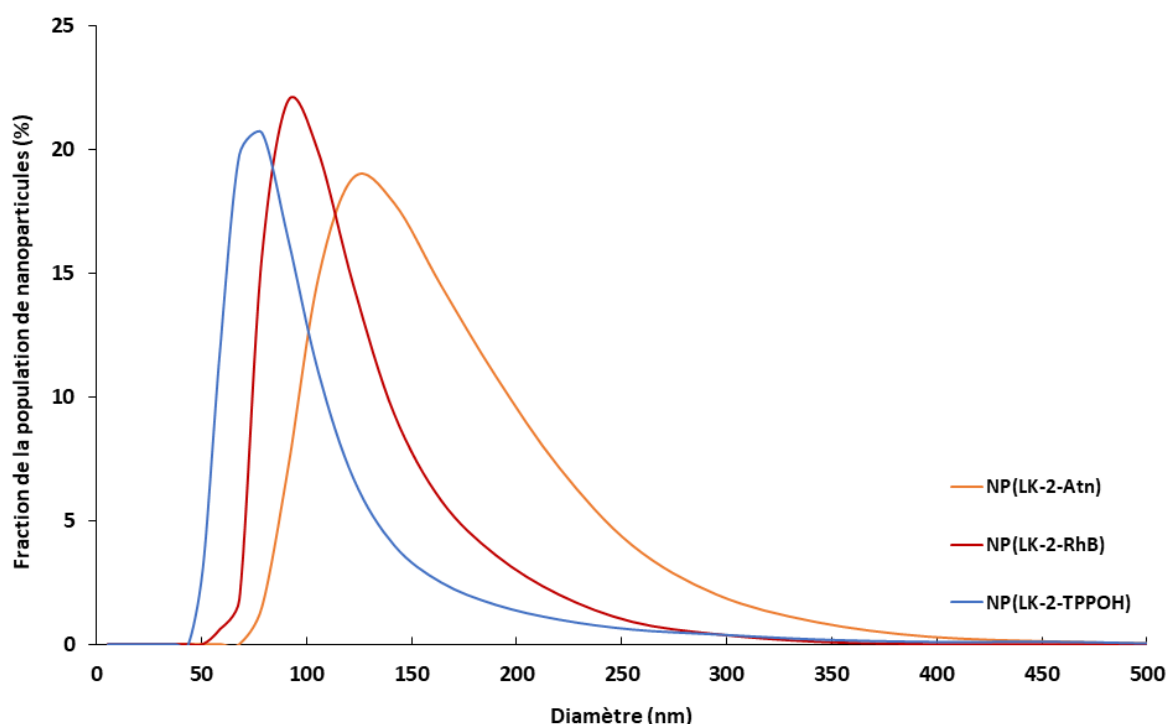


Figure 83 : Distribution de taille des nanoparticules **NP(AcLK-2-Atn)**, **NP(AcLK-2-RhB)** et **NP(AcLK-2-TPPOH)**.

Il est par ailleurs à noter que les particules **NP(AcLK-2-RhB)** et **NP(AcLK-2-TPPOH)** présentent toutes deux des tailles moyennes inférieures d'environ 100 nm aux nanoparticules **NP(AcLK-2-Atn)**, particules obtenues lorsque aucun principe actif n'est encapsulé, ainsi que des profils de distribution plus resserrés que celui de ces dernières. Ces observations, qui méritent par ailleurs d'être confirmées par l'étude d'un plus grand nombre de préparations de nanoparticules, semblent donc indiquer que la molécule encapsulée favorise la structuration des lignines acétylées sous forme de particules de taille réduite.

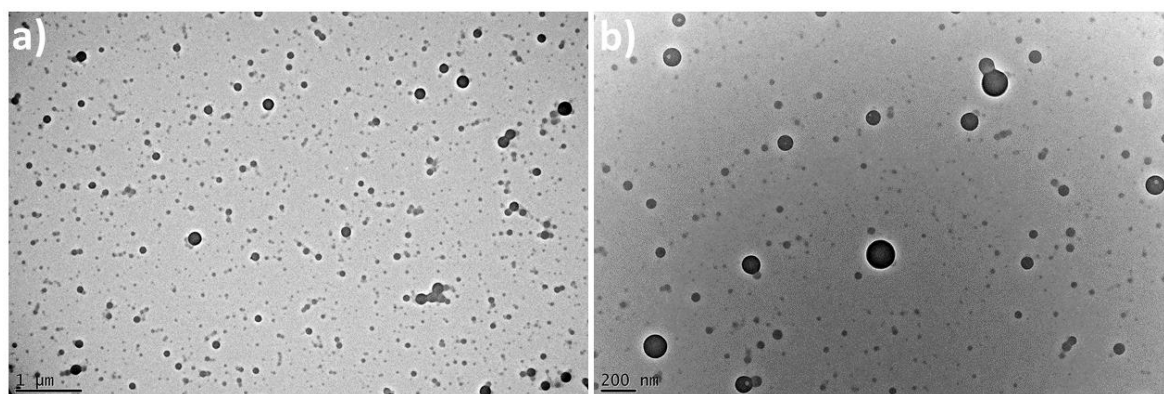


Figure 84 : Clichés MET des nanoparticules a) **NP(AcLK-2-RhB)** et b) **NP(AcLK-2-TPPOH)**

IV.3.2. Détermination de la quantité de molécules modèles encapsulées

Afin d'évaluer la quantité de principe actif encapsulé dans les nanoparticules, le contenu des membranes de dialyse a été centrifugé sitôt les dialyses terminées. Puis, les culots obtenus après élimination du surnageant ont été solubilisés dans un volume connu d'acétone, afin de libérer les molécules encapsulées en déstructurant les nano-objets. La quantité de chaque principe actif en solution dans l'acétone, et donc à l'origine encapsulée dans les nanoparticules de lignine, a ainsi pu être par la suite déterminée par dosage par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

Des taux d'encapsulation de 0,06 et de 0,15 mmol de principe actif encapsulé par gramme de lignine ont été respectivement obtenus pour la rhodamine B et la porphyrine tétra-hydroxylée. Ces taux sont cependant difficiles à comparer entre eux au vu de la différence de structure des deux principes actifs encapsulés.

Dans le cas de la rhodamine B, ce taux a été déterminé à partir de l'absorbance à 554 nm d'une solution de nanoparticules **NP(AcLK-2-RhB)** dissoutes dans l'acétone et du coefficient d'extinction molaire de la rhodamine B. Ce coefficient, d'une valeur de $4200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a, quant à lui, été calculé à partir de solutions étalons de rhodamine B dans l'acétone dont la concentration en **RhB** est comprise entre $9,5\cdot 10^{-6}$ et $2,1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans le cas de la porphyrine, ce taux a été déterminé à partir de l'absorbance à 419 nm d'une solution de nanoparticules **NP(AcLK-2-TPPOH)** dissoutes dans l'acétone et du coefficient d'extinction molaire de la **TPPOH**. Ce coefficient, d'une valeur de $388\ 500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a, quant à lui, été calculé à partir de solutions étalons de **TPPOH** dans l'acétone, de concentration en **TPPOH** comprise entre $7,7\cdot 10^{-7}$ et $2,7\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

IV.4. Conclusion

Au vu des résultats obtenus, il semble donc possible de préparer des nanoparticules de lignine supportant des photosensibilisateurs par l'une ou l'autre des stratégies employées, restant par ailleurs pour chacune d'elles à optimiser. En effet, l'encapsulation, bien que présentant une plus grande facilité de mise en œuvre par rapport au couplage covalent, ne semble néanmoins pas capable d'associer autant de photosensibilisateur à la lignine que ce dernier. Il serait donc intéressant d'augmenter la concentration initiale en principe actif afin d'observer si cette augmentation permet d'obtenir une plus grande quantité de molécules encapsulées en fin de dialyse.

En ce qui concerne la fonctionnalisation des lignines par un photosensibilisateur, le couplage par la réaction de Williamson semble être le plus adapté. En effet, cette stratégie est, non seulement la plus simple techniquement, mais également celle qui a permis d'obtenir le taux de fonctionnalisation le plus important. Dans le cadre de cette stratégie, il serait maintenant intéressant de faire varier le taux de substitutions du polymère en faisant varier la quantité de photosensibilisateur employée.

Les caractéristiques de l'ensemble des nanoparticules présentées dans ce chapitre sont résumées dans le tableau suivant. En outre, leur capacité à produire des espèces radicalaires de l'oxygène ainsi que leur activité biologique reste à évaluer.

Tableau 17 : Résumé des caractéristiques des nanoparticules associées à un photosensibilisateur.

Matériau	Taux de fonctionnalisation ou d'encapsulation (mmol.g ⁻¹)	Répartition de la population de nanoparticules
NP(AcLK-2)	-	85% entre 90 et 220 nm
NP(AcLK-2-P₂)	0,20	80% entre 60 et 160 nm
NP(AcLK-2-P₄)	0,08	80% entre 90 et 220 nm
NP(AcLK-2-RhB)	0,06	90% entre 70 et 160 nm
NP(AcLK-2-TPPOH)	0,15	90% entre 50 et 140 nm

Conclusion générale et perspectives

Ce travail, le premier sur le sujet au laboratoire, a été mené avec l'objectif de développer de nouveaux matériaux photoactivables à base de lignines en vue d'applications phytosanitaires. Dans ce but, deux lignines Kraft de résineux, ainsi qu'une lignine de châtaignier extraite par un procédé organosolv, ont été acétylées. L'étude par spectroscopie RPE de ces trois biopolymères modifiés a révélé que le blocage des fonctions antioxydantes des lignines augmente considérablement la quantité d'espèces réactives de l'oxygène que le polymère est capable de générer sous irradiation lumineuse. De plus, compte tenu des différents résultats obtenus, cette propriété semble n'être que très peu affectée par l'origine des matériaux utilisés. En effet, la lignine issue du châtaignier et une des lignines Kraft se sont montrées capables de produire des quantités similaires d'oxygène singulet, bien qu'étant d'origines botanique et industrielle différentes. Par ailleurs, une production d'anion superoxyde comparable a été observée pour les trois lignines modifiées. Il est également à noter que les quantités d'espèces réactives de l'oxygène générées par ces lignines sont comparables à celles observées pour un photosensibilisateur courant, le rose Bengale, permettant ainsi d'envisager leur utilisation dans de nombreux domaines tels que le traitement photodynamique antimicrobien (APDT).

Afin de les rendre hydrodispersibles et ainsi permettre leur emploi futur dans un contexte environnemental, ces matériaux aux propriétés photosensibles prometteuses ont été mis sous forme de nanoparticules. Pour ce faire, deux méthodes de préparation couramment décrites dans la littérature, la dialyse et l'ajout d'un contre-solvant, ont été comparées. Les différentes caractérisations effectuées sur les nano-objets obtenus ont permis de faire apparaître la dialyse comme une méthode de choix pour la préparation de nanoparticules de lignines acétylées. En effet, cette technique permet de préparer de façon simple et répétable des nanoparticules stables en quantités relativement importantes. Afin de compléter cette étude, le comportement photosensible des nanoparticules préparées par cette dernière méthode a également été évalué par spectroscopie RPE. Il a ainsi été démontré que les lignines acétylées, dispersées dans l'eau sous forme de nanoparticules, étaient toujours capables de produire de l'oxygène singulet. Cette activité, qui n'a pas encore été reportée dans la littérature à notre connaissance, reste cependant assez restreinte et nécessite donc d'être améliorée.

Pour ce faire, l'association de ces nanoparticules à un photosensibilisateur a été envisagée par deux stratégies différentes, afin d'augmenter le domaine du spectre solaire permettant leur

photoactivation. La première a consisté à lier de façon covalente, par le biais d'une liaison éther ou ester, la lignine à un photosensibilisateur, puis à mettre ce matériau sous la forme de nanoparticules après acétylation. La seconde, quant à elle, a consisté à encapsuler une molécule active photosensible dans les nanoparticules de lignines acétylées. La caractérisation des matériaux préparés a montré qu'il était possible d'associer les nanoparticules de lignines à des photosensibilisateurs en utilisant l'une ou l'autre des stratégies. Le meilleur résultat a été obtenu lorsque le photosensibilisateur est fixé à la lignine par l'intermédiaire d'une fonction éther. L'encapsulation, bien que présentant une plus grande facilité de mise en œuvre, n'a pas permis, pour l'instant, d'associer autant de photosensibilisateur à la lignine. Cette méthode est en cours d'optimisation. En effet, les résultats obtenus constituent la base des travaux menés dans le cadre d'une nouvelle thèse débutée en septembre dans le cadre d'un projet européen. Cette étude porte sur l'encapsulation de phtalocyanines dans des nanoparticules de lignines estérifiées en vue d'applications bactéricides.

De nombreuses autres perspectives découlent de ces travaux de thèse. Il est en particulier envisagé de réduire la taille des nanoparticules préparées afin, non seulement de faciliter leur pénétration membranaire, mais également d'augmenter leur production d'oxygène singulet. En effet, des nanoparticules de taille plus petite pourraient permettre une irradiation plus efficace du polymère les constituant, ainsi qu'une meilleure diffusion de l'oxygène singulet dans l'environnement. Dans cet objectif, des nanoparticules préparées à partir de lignines partiellement acétylées apparaissent comme de bonnes candidates. En effet, ces lignines, tout en possédant des capacités de production d'oxygène singulet comparables aux lignines entièrement acétylées, semblent pouvoir s'organiser sous la forme de nanoparticules de taille sensiblement inférieures à celles formées à partir du polymère entièrement fonctionnalisé. En outre, la source d'irradiation lumineuse est également à optimiser puisque la lampe halogène utilisée n'émet que très peu dans le proche UV, domaine dans lequel les lignines présentent leur maximum d'absorbance. Afin de corriger ce problème et de mimer des applications environnementales, l'emploi d'un simulateur solaire est envisagé. Par ailleurs, une évaluation préliminaire du comportement cytotoxique photoinduit des nanoparticules de lignines acétylées sur des cellules de tabac TbY-2 est en cours au laboratoire.

Enfin, les résultats de ces travaux permettent également d'envisager le développement de systèmes à base de nanoparticules de lignines acétylées en vue d'applications dans le domaine pharmaceutique, notamment en photothérapie dynamique.

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Réactifs et solvants

Tous les réactifs, autres que les lignines, et les solvants utilisés proviennent de divers fournisseurs : Alfa Aesar, Sigma-Aldrich, Fischer, Acros et TCI. Ils ont été utilisés sans purification préalable.

I.2. Chromatographie

I.2.1. CCM

Les CCM ont été réalisées sur des plaques de gel de silice Kieselgel 60 F254 de 0,2 mm d'épaisseur (Merck). La révélation des plaques se fait par observation directe à 254 nm.

I.2.2. Chromatographie flash automatisée

Un Combiflash Rf 100[®] de marque "Teledyne Isco" a été utilisé. Il permet l'emploi d'éluant à des débits variants entre 5 et 100 mL.min⁻¹ avec une pression maximale de 3,5 bars dont la composition peut être réglée en temps réel. Ce dispositif est équipé d'une détection par absorption UV-Visible instantanée permettant la séparation des produits en fonction de leur absorbance. Une longueur d'onde de 254 nm a été utilisée. La phase stationnaire est constituée de silice (35 - 70 µm) préconditionnée en colonne de 40 ou 80 g. Afin d'être purifiés, les produits bruts sont fixés sur Florisil[®] (60-100 mesh) à raison de 1 g de produit pour 4 g de Florisil[®], puis déposés dans une pré-colonne.

I.3. Spectroscopie

I.3.1. Spectroscopie RMN

Les spectres de RMN ont été réalisés au sein de la plate-forme SCRABL de l'Université de Limoges sur un appareil Bruker DPX-500 à une fréquence de 500,15 MHz. Les déplacements

chimiques δ sont exprimés en ppm en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne pour les spectres RMN ^1H et l'acide phosphorique pour les spectres RMN ^{31}P .

I.3.2. Spectroscopie RPE

L'évaluation de la production d'oxygène singulet et d'anion superoxyde par les lignines, les différents matériaux et le rose de Bengal a été réalisée par spectroscopie RPE. Les mesures ont été effectuées avec un spectromètre Bruker ESP300E fonctionnant à 25°C. Une lampe halogène de 20 W a été utilisée pour les irradiations lumineuses. L'intensité de cet éclairage a été mesurée par un luxmètre Digital Lux Tester YF-1065. Pour la détection de l'oxygène singulet, la 2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridone (TEMP) a été utilisée comme piègeur de radicaux. Dans le cas des mesures effectuées sur les matériaux en solution dans le N,N-diméthylformamide, 50 μL d'une solution fraîche de TEMP à 25 mM dans le N,N-diméthylformamide ont été ajoutés à 50 μL d'une solution du matériau étudié à 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dans le même solvant. Dans le cas des mesures effectuées sur les suspensions aqueuses des nanoparticules **NP(AcLK-2)**, 50 μL d'une solution aqueuse de TEMP à 25 mM fraîchement préparée ont été additionnés à 50 μL d'une suspension de nanoparticules **NP(AcLK-2)** à 1 ou 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau distillée. La solution ou la suspension obtenue ont ensuite été immédiatement transférées dans un capillaire en quartz de 100 μL et irradiée avec une intensité lumineuse de 270 $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Les spectres RPE ont été réalisés dans les conditions suivantes : fréquence de modulation : 100 kHz ; fréquence micro-ondes : 9,78 GHz ; puissance micro-ondes : 0,51 mW ; amplitude de modulation : 0,987 G ; constante de temps : 10,24 ms. Pour la détection de l'anion superoxyde, le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO) est utilisé comme piègeur de radicaux. Ainsi, 50 μL d'une solution fraîche de DMPO à 450 mM dans le diméthylesulfoxyde ont été ajoutés à 50 μL d'une solution du matériau étudié à 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dans un mélange diméthylesulfoxyde/eau (90/10 ; v/v). La solution obtenue a ensuite été immédiatement transférée dans un capillaire en quartz de 100 μL et irradiée avec une intensité lumineuse de 68 $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Les conditions d'analyse étaient les mêmes que ci-dessus à l'exception de la puissance micro-ondes qui était de 20 mW.

I.3.3. Spectroscopie Infrarouge

Les spectres IRTF ont été réalisés sur un spectromètre ATR Frontier de marque Perkin Elmer entre 500 et 4500 cm^{-1} . Les spectres ont été enregistrés avec un nombre d'acquisition de 16 scans et une résolution de 4 cm^{-1} .

I.3.4. Spectroscopie d'absorption UV-Visible

L'acquisition des spectres d'absorption UV-Visible a été réalisée entre 300 et 800 nm sur un spectrophotomètre du type Specord 210 Lambda double faisceau de marque Analytik Jena.

I.3.5. Détermination des rendements quantiques en oxygène singulet

L'acquisition des spectres d'absorption UV-Visible a été réalisée sur un spectrophotomètre à barrettes de diodes du type Agilent 8453 de marque Hewlett-Packard. La concentration des échantillons et des solutions de référence utilisées a été adaptée, afin que l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation ($\lambda = 350 \text{ nm}$) soit égale à 0,1. Pour enregistrer l'émission de l'oxygène singulet à 1270 nm, un détecteur InGaAs haute sensibilité refroidi à l'azote liquide a été couplé à un spectrofluoromètre Jobin Yvon Spex Fluorolog-3 de marque Horiba. Des temps d'intégration de 10 secondes ont été utilisés. Un filtre (seuil de coupure 850 nm) a été utilisé pour éliminer la fluorescence des échantillons et des références.

I.4. Observation des nanoparticules

I.4.1. DLS

L'acquisition des distributions en taille des nanoparticules a été réalisée au laboratoire sur un appareil du type Zetasizer Nano-ZS de marque Malvern Instrument. Trois mesures ont été effectuées sur chaque échantillon. Elles l'ont été à 20 °C en utilisant un angle de diffusion de la lumière de 173° et un indice de réfraction de 1,59 pour les lignines.

I.4.2. Microscopie électronique en transmission

Les analyses par microscopie électronique en transmission ont été réalisées au sein de la plateforme SerMiEL de l'Université de Limoges sur deux appareils, un microscope 100 kV de type JEOL 100CX2 et un microscope de 200 kV de type JEM-2100F. Une goutte de solution contenant le matériau à observer est déposée, immédiatement après dispersion par ultrasons, sur une grille en cuivre 400 mesh avec une membrane carbone de 12 nm d'épaisseur avant analyse. Aucune métallation préalable des échantillons n'est effectuée.

II. Origine, caractérisation et purification des lignines

II.1. Origine des lignines Kraft LK-1 et LK-2

Les deux lignines Kraft, **LK-1** et **LK-2**, sont toutes deux issues de résineux. Elles ont été industriellement précipitées à partir de liqueurs noires alcalines par acidification. La lignine **LK-1** a été obtenue auprès du fournisseur Sigma-Aldrich (référence fournisseur : 80068-05-1). La lignine **LK-2**, obtenue par le procédé Lignoboost,^[57] a généreusement été donnée par l'Université du Québec à Trois-Rivières. Excepté lors de la détection d'anion superoxyde produit par **LK-1**, ces lignines ont été utilisées sans purifications préalables.

II.2. Extraction organosolv de lignine de châtaigner

La lignine organosolv **OSL** a été extraite au laboratoire à partir de sciures de châtaigner fournies par l'établissement Mazières de la Chapelle-Montbrandeix en Haute-Vienne. Ces sciures sont séchées à l'étuve ventilée durant trois jours à 40 °C, puis broyées et tamisées (granulométrie inférieure à 250 µm). L'extraction est réalisée suivant la méthode décrite par Constant *et al.*^[261] Dans un bécher, 3,2 g de sciures sont mis en présence de 100 mL d'une solution alcoolique éthanol/eau (65/35 ; v/v) et de 44 µL d'acide sulfurique (98%), ajoutés comme catalyseur. Le mélange est ensuite porté à 160 °C pendant 2 h sous agitation dans un réacteur scellé de 150 mL. Après refroidissement complet, un filtre en nylon de porosité 47 µm est utilisé pour séparer la liqueur noire de la pulpe. La pulpe est ensuite lavée trois fois avec 25 mL d'éthanol à 60 °C. Les filtrats alcooliques et la liqueur noire sont ensuite combinés, et 525 mL d'eau désionisée sont alors ajoutés pour précipiter la lignine. La solution est ensuite centrifugée (7012 x g) pendant 20 min à 25 °C et filtrée sous vide sur du papier filtre. Le solide obtenu est lavé avec de l'eau désionisée et séché à 50 °C pendant 72 h. En moyenne, 80 mg de lignine **OSL** sont obtenues par gramme de sciure de châtaigner.

II.3. Purification de la lignine LK-1

Afin d'éliminer les impuretés responsables du signal observé lors du suivi RPE de la production d'anion superoxyde par la lignine **LK-1**, cette dernière est purifiée. Dans un bécher, 2 g de lignine **LK-1** sont solubilisés dans 800 mL d'une solution aqueuse de soude à 0,04 mol.L⁻¹. La

solution de lignine ainsi formée est ensuite agitée par ultrasons pendant 1 min, puis placée sous agitation magnétique. Après 15 min d'agitation, une solution d'acide sulfurique à 98% est progressivement ajoutée à la solution de lignine jusqu'à pH 3 afin de reprotoner le polymère et de le faire précipiter. La suspension est ensuite centrifugée pendant 20 min (2740 x g). Une fois le surnageant éliminé, le polymère est redispersé dans 30 mL d'eau déionisé, puis de nouveau centrifugé à 2740 x g pendant 20 min. Cette dernière opération est renouvelée trois fois supplémentaires, puis la lignine purifiée est obtenue avec un rendement quantitatif, après séchage pendant 48 h à 105 °C.

II.4. Caractérisation des lignines

II.4.1. Taux de cendres

Le taux de cendres de chacune des lignines est déterminé selon le protocole NERL/TP-510-44622.^[74] Les lignines, après séchage à 105 °C, sont pesées à 0,10 mg près, puis placées dans des creusets préalablement tarés. L'ensemble est alors porté à 575 °C pendant 24 h. Une fois la calcination terminée la masse de résidu inorganique présent dans chaque creuset est déterminée. Le taux de cendres est alors exprimé comme le ratio de cette masse sur la masse de lignine sèche. Chaque échantillon est analysé en tripliquât.

II.4.2. Étude de la composition chimique

Les fractions de lignines solubles (ASL) et insolubles (AIL) dans l'acide ont été déterminées selon le protocole NERL/TP-510-42618.^[77] Dans un tube à essai, 300 mg de lignines ont été agités à 30 °C pendant 1 h dans 3 mL d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 72% en masse. Après addition de 84 mL d'eau déionisée, l'échantillon a été scellé et autoclavé pendant 1 h à 121 °C. La solution a ensuite été filtrée et rincée sur creuset filtrant par un volume d'eau déionisée connu. Une fois que le filtrat a été mis de côté, les creusets ainsi que les résidus qu'ils contenaient ont été séchés à 105 °C, puis pesés à 0,10 mg près. Enfin, la masse de cendres (M_c) de ces résidus a été déterminée par une calcination à 575 °C pendant 24 h. Le pourcentage de lignine insoluble dans l'acide (AIL) a été exprimé comme un pourcentage massique de la lignine de départ suivant l'équation suivante.

$$AIL = \frac{\text{Masse du résidu solide} - M_c}{\text{Masse de lignine de départ}} \times 100$$

L'absorbance du filtrat, précédemment mis de côté, à 240 nm a été ramenée entre 0,7 et 1 par une dilution appropriée à l'aide d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 4% en masse (servant également de blanc). À partir de cette mesure d'absorbance, le pourcentage de lignine soluble dans l'acide (ASL) a été exprimé comme un pourcentage de la masse de lignine de départ selon l'équation suivante.

$$ASL = \frac{Abs \times V \times K}{\varepsilon \times m_l \times l} \times 100$$

avec :

Abs : Absorbance du filtrat après dilution à 240 nm ;

V : Volume de filtrat avant la dilution (L) ;

K : Facteur de dilution du filtrat ;

ε : Coefficient d'extinction massique des lignines considérées à 240 nm (12 L.g⁻¹.cm⁻¹) ;

mL : Masse de lignine de départ (g) ;

l : Longueur de la cellule UV-Visible (cm).

II.4.3. Analyse élémentaire

Les pourcentages massiques de carbone, d'hydrogène, d'azote, de soufre et d'oxygène des lignines et des matériaux préparés ont été obtenus avec un analyseur élémentaire de marque Thermoscientific Flashsmart.

Dans le cas de la détection du soufre, de l'oxyde de vanadium a été ajouté comme catalyseur aux échantillons pour permettre une détection optimale de l'élément.

II.4.4. Détermination des masses molaires

Les masses molaires moyennes en masse (Mw) et en nombre (Mn), ainsi que les indices de polydispersité (Mw/Mn) des lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** et des matériaux **C₃LK-1**, **C₄LK-1**, **C₅LK-1** et **C₁₂LK-1** ont été déterminés par chromatographie d'exclusion stérique à 25 °C. Avant

l'analyse, les lignines **LK-1**, **LK-2** et **OSL** ont été préalablement acétylées selon la procédure décrite au paragraphe III.1. Un appareil de chromatographie liquide haute pression Agilent 1100 series muni d'une colonne PLgel MIXED-D 5 μm 300 x 7,5 mm et d'un détecteur d'absorption UV-Visible à barrette de diodes a été utilisé. Du tétrahydrofurane a été utilisé comme phase mobile avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Pour chaque analyse, 20 mg de matériau à analyser sont au préalable solubilisés dans 2 mL de tétrahydrofurane, puis filtrés via un filtre PTFE de 0,45 μm avant d'être injectés dans la colonne via une boucle d'injection de 20 μL . La calibration de l'instrument a été effectuée avec huit polystyrènes de masse moléculaire allant de 580 à 1 074 000 g.mol⁻¹.

II.4.5. Dosage des fonctions alcools des matériaux

Les groupes hydroxyles des différents composés ont été quantifiés par RMN du phosphore selon la méthode décrite par Granata et Argyropoulos.^[263] Pour chaque analyse, 30 mg du composé sont pesés à 0,10 mg près et introduits dans un tube de Schlenk, puis l'ensemble est séché à 105 °C pendant 24 h. Un mélange composé de pyridine anhydre deutéré et de chloroforme anhydre deutéré (1,6/1 V/V) est préparé et stocké sur tamis moléculaire (Solution A). Une solution composée d'acétylacétonate de chrome (III) à 5,00 g.L⁻¹, servant d'agent de relaxation, et de cyclohexanol à 1,45 g.L⁻¹, utilisé comme étalon interne, dans la solution A est également préparée (Solution B). Ensuite, 400 μL de la solution A et 150 μL de la solution B sont ajoutés sous argon au composé à analyser. Le mélange est agité par ultrasons jusqu'à dissolution complète, puis, toujours sous argon, 75 μL de 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-dioxaphospholane sont ajoutés. Enfin, l'ensemble est transféré dans un tube RMN muni d'un insert contenant de l'acide phosphorique, utilisé comme référence. Les spectres RMN ³¹P sont acquis en utilisant les paramètres suivants : phosphore découplé du proton avec une impulsion de 30° et un temps de relaxation de 2 s.

II.4.6. Dosage des fonctions méthoxy

Les groupes méthoxy des lignines ont été quantifiés par RMN du proton après acétylation selon la méthode décrite par Abreu et Freire.^[92] Les acquisitions ont été effectuées en utilisant 25 mg de lignines acétylées dissous dans 1 mL de chloroforme deutéré avec du TMS comme

référence interne. Le pourcentage massique des fonctions méthoxy a été directement calculé à partir de la formule proposée par les auteurs et présentée ci-dessous :

$$\%_{\text{OMe}} = 28,28436 - A \times 19,750047$$

Ou « A » correspond au rapport entre les valeurs d'intégration des protons aromatiques ($H_{(\text{ph})}$) et des protons méthoxy ($H_{(\text{OMe})}$).

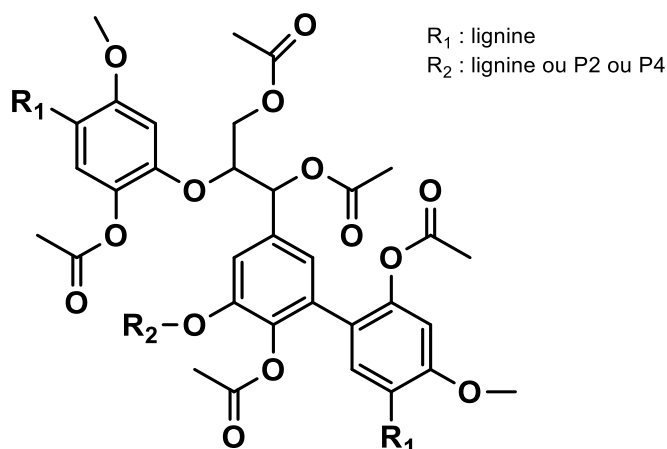
Ces valeurs ont été déterminées en normalisant préalablement la valeur de l'intégrale entre 0,3 et 10 ppm comme étant égale à 1. Les zones ainsi que valeurs d'intégrations utilisées pour chaque lignine sont détaillées dans le tableau suivant.

Matériaux	AcLK-1	AcLK-2	AcOSL
Zone d'intégration des $H_{(\text{ph})}$ (ppm)	7,19 - 6,22	7,19 – 6,20	7,20 – 6,19
Valeur de l'intégration des $H_{(\text{ph})}$ ^a	0,110	0,135	0,160
Zone d'intégration des $H_{(\text{OMe})}$ (ppm)	4,00 – 3,53	4,10 – 3,20	4,06 – 3,56
Valeur de l'intégration des $H_{(\text{OMe})}$ ^a	0,230	0,205	0,180
Valeur de A	0,478	0,659	0,889
Quantité de groupements OMe (% m/m)	10,7	15,3	18,8

a : Moyenne obtenue sur trois mesures.

III. Synthèse

III.1. Acétylation des lignines



III.1.1. Acétylation totale des matériaux

Dans un bicol, les matériaux, préalablement séchés à 105 °C pendant 48 h, sont mis en présence d'un mélange de pyridine anhydre et d'anhydride acétique (1/1, v/v).^[160, 267] L'ensemble est ensuite agité pendant 48 h à 25 °C sous argon. En fin de réaction, le milieu réactionnel est transféré dans une ampoule de coulée, puis versé goutte à goutte sur un volume d'eau glacée 10 fois supérieur à celui du milieu réactionnel. Le précipité formé est ensuite récupéré par filtration sous vide et lavé sur fritté (Porosité 3) par 200 mL d'eau glacée, puis le solide obtenu est dissous dans 100 mL de chloroforme. Cette phase organique est alors lavée trois fois avec 100 mL d'eau déionisée et séchée sur sulfate de magnésium. Les matériaux acétylés sont enfin obtenus sous la forme d'un solide par évaporation sous vide du solvant.

III.1.2. Acétylations partielles de la lignine LK-2

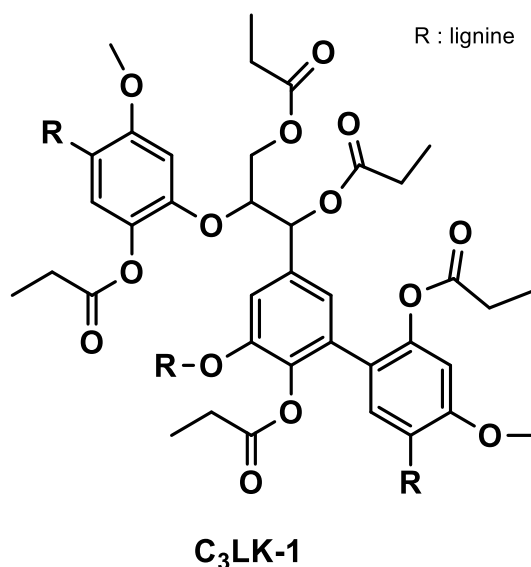
Dans un bicol, 2,00 g de lignine **LK-2**, préalablement séchée à 105 °C pendant 48 h, sont mis en présence d'un mélange composé de 10 mL de pyridine anhydre et d'un volume d'anhydride acétique ayant été déterminés à partir des travaux de *Buono et al.*^[83] Ces volumes sont détaillés dans tableau présenté en partie III.1.3. L'ensemble est ensuite agité pendant 48 h à 25 °C sous argon.

En fin de réaction, le milieu réactionnel est transféré dans une ampoule de coulée, puis versé goutte à goutte sur 200 mL d'eau glacée. Le précipité formé est ensuite récupéré par filtration sous vide, puis lavé sur fritté (Porosité 3) avec 200 mL d'eau glacée. Les matériaux partiellement acétylés sont enfin séchés à 105 °C pendant 48 h.

III.1.3. Tableau récapitulatif des conditions d'acétylation et des rendements massiques obtenus

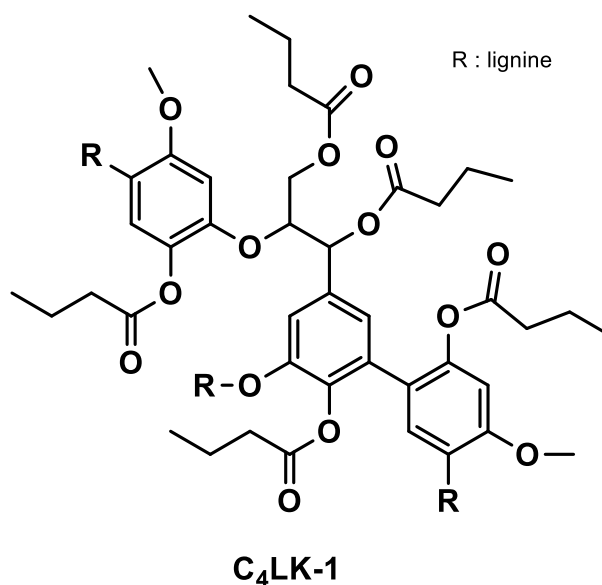
Matériau	Masse de produit de départ (g)	Volume d'anhydride acétique introduit (mL)	Quantité d'anhydride acétique introduit (éq.)	Volume de pyridine introduit (mL)	Rendement massique (%)	Aspect du produit final
AcLK-1	2	20	24	20	108	Poudre marron
AcLK-2	2	20	24	20	105	Poudre marron
AcOSL	2	20	24	20	96	Poudre marron
AcLK-2-P₂	0,1	2	48	2	93	Poudre rosée
AcLK-2-P₄	0,004	2	1200	2	46	Poudre rosée
Ac₁₀LK-2	2	0,180	0,22	10	95	Poudre marron
Ac₄₀LK-2	2	0,472	0,57	10	96	Poudre marron
Ac₆₀LK-2	2	0,700	0,85	10	103	Poudre marron

III.2. Estérification de la lignine LK-1 par l'anhydride propionique



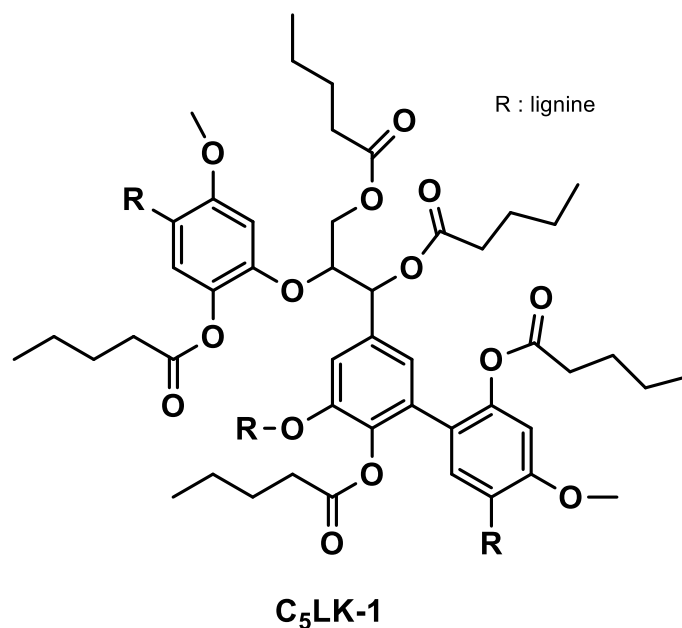
Dans un bicol de 50 mL, 2,00 g de lignine **LK-1**, préalablement séchée à 105 °C pendant 48 h, sont dissout dans 40 mL d'un mélange de pyridine anhydre et d'anhydride propionique (1/1, v/v). La solution obtenue est agitée pendant 48 h à 25 °C sous argon. En fin de réaction, le milieu réactionnel est versé goutte à goutte dans 600 mL d'une solution aqueuse à 1% en masse de carbonate de sodium. Le précipité formé est récupéré par filtration sous vide, puis lavé sur fritté avec de l'eau déionisée. Le solide est ensuite dissous dans 150 mL de chloroforme. La phase organique est alors lavée trois fois avec 250 mL d'eau distillée. Lors du dernier lavage, un temps de repos de 18 h est nécessaire pour obtenir une bonne séparation des différentes phases. Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation sous vide du solvant, 2,27 g de matériau **C₃LK-1** sont obtenus sous la forme d'une poudre marron, soit un rendement massique de 113,5%.

III.3. Estérification de la lignine LK-1 par l'anhydride butyrique



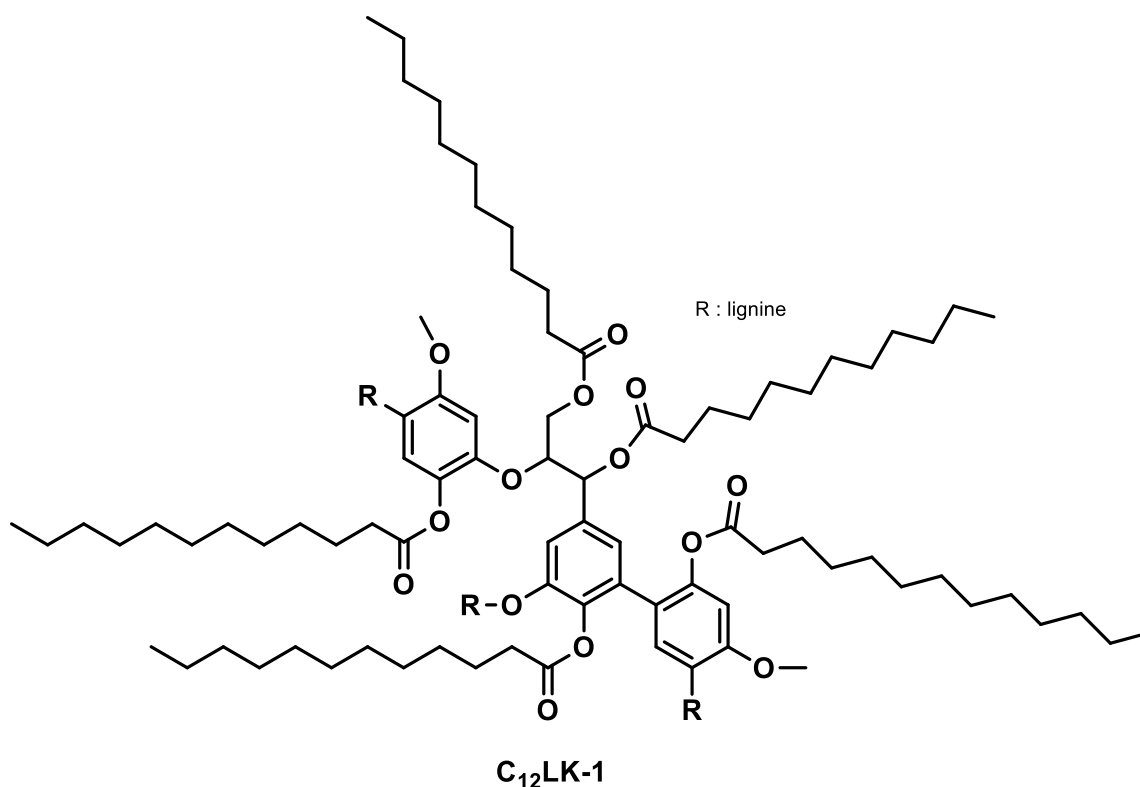
Dans un bicol de 50 mL, 2,00 g de lignine **LK-1**, préalablement séchée à 105 °C pendant 48 h, sont introduits dans 40 mL d'un mélange de pyridine anhydre et d'anhydride propionique (1/1, v/v). La réaction est conduite pendant 48 h à température ambiante sous argon et sous agitation magnétique. En fin de réaction, le milieu réactionnel est versé goutte à goutte dans 600 mL d'une solution aqueuse à 1% en masse de carbonate de sodium. Le précipité formé est récupéré par filtration sous vide, puis lavé sur fritté avec de l'eau déionisée. Le solide est ensuite dissout dans 150 mL de chloroforme. La phase organique obtenue est alors lavée avec trois fois 250 mL d'eau distillée. Lors du dernier lavage, 18 h sont nécessaires pour avoir une bonne séparation des différentes phases dans l'ampoule à décanter. Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation sous vide du solvant, 1,31 g de matériau **C₄LK-1** sont obtenus sous la forme d'une poudre marron, soit un rendement massique de 65,5%.

III.4. Estérfication de la lignine LK-1 par l'anhydride valérique



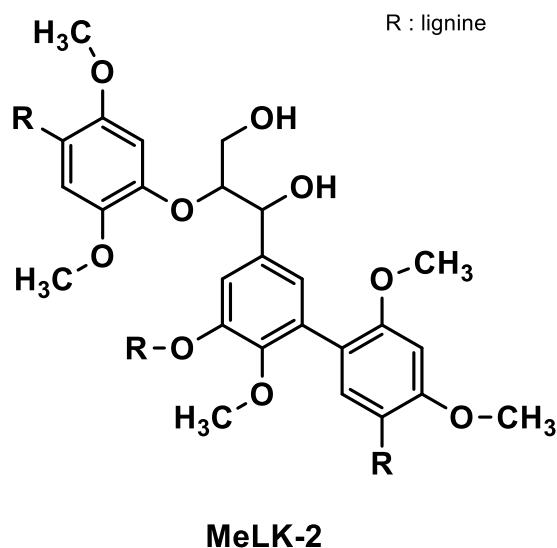
Dans un bicol de 100 mL, 2,00 g de lignine **LK-1**, préalablement séchée à 105 °C pendant 48 h, sont introduits dans 40 mL d'un mélange de pyridine anhydre et d'anhydride valérique (1/1, v/v). Puis, la réaction est conduite pendant 48 h à 25 °C sous argon et sous agitation magnétique. En fin de réaction, le milieu réactionnel est versé goutte à goutte dans 2 L d'eau distillée. Le précipité formé est récupéré par filtration sous vide, puis lavé sur fritté avec de l'eau déionisée. Le solide est ensuite dissout dans 150 mL de chloroforme. La phase organique obtenue est alors lavée avec trois fois 250 mL d'eau distillée. Lors du dernier lavage, 18 h sont nécessaires pour avoir une bonne séparation des différentes phases dans l'ampoule à décanter. Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation sous vide du solvant, 2,30 g de matériau **C₅LK-1** sont obtenus sous la forme d'une poudre marron, soit un rendement massique de 115 %.

III.5. Estérification de la lignine LK-1 par le chlorure de lauryle



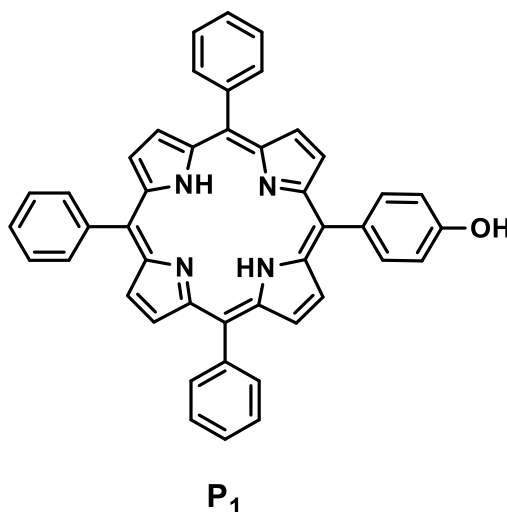
Dans un bicol de 100 mL équipé d'une ampoule de coulée, 5,00 g de lignine **LK-1**, préalablement séchée à 105 °C pendant 48 h, et 25 mL de pyridine anhydre sont introduits. Le mélange est placé sous argon et 10 mL de chlorure de lauryle sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 48 h à 25 °C sous argon. En fin de réaction, le milieu réactionnel est versé goutte à goutte dans 500 mL d'eau distillée. Le précipité formé est récupéré par filtration sous vide, puis lavé sur fritté (porosité 3) avec de l'eau désionisée. Le solide est ensuite dissout dans 100 mL de chloroforme. La phase organique est alors lavée trois fois avec 300 mL d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium et séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant sous vide, 3,70 g du matériau **C₁₂LK-1** sont obtenus sous la forme d'une pâte noire, soit un rendement massique de 74%.

III.6. Méthylation de la lignine LK-2



La méthylation sélective des alcools phénoliques des lignines a été effectuée selon la méthode décrite par Sadeghifar *et al.*^[165] Dans un ballon de 50 mL, 1,00 g de lignine **LK-2** est solubilisé à 25°C par 15 mL d'une aqueuse solution de soude à 0,7 M. Ensuite, 700 µL de sulfate de diméthyle (2,5 mol par mol d'alcool phénolique présent sur la lignine) sont ensuite ajoutés et la solution placée sous agitation magnétique. Après 30 min d'agitation, le milieu réactionnel est porté à 80 °C pendant 2 h supplémentaires, puis, en fin de réaction, il est acidifié par ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 2 M jusqu'à pH = 2,5. Le précipité formé est récupéré par filtration sous vide, puis lavé sur fritté (porosité 3) avec de l'eau désionisée et séché à 105 °C pendant 48 h. Après séchage, 795 mg du matériau **MeLK-2** sont obtenus sous la forme d'une poudre grise, soit un rendement massique de 80%.

III.7. Synthèse de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (**P₁**)



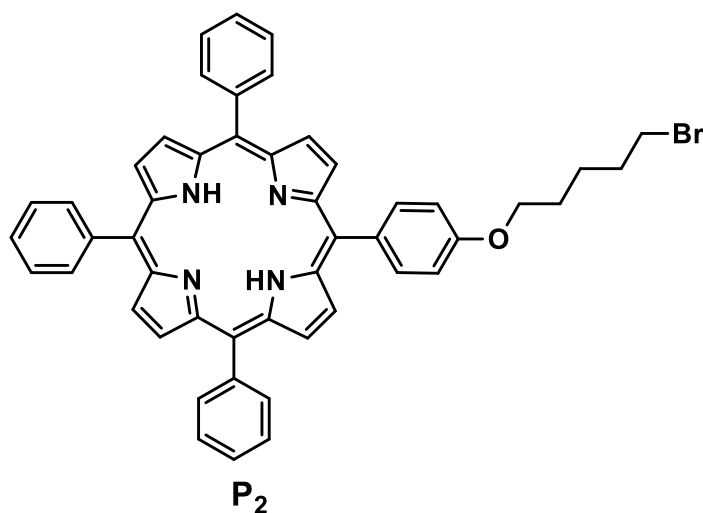
Dans un bicol de 500 mL, 8,8 mL de benzaldéhyde (86,7 mmol, 3 éq.), 3,50 g de 4-hydroxybenzaldéhyde (28,6 mmol, 1 éq.) et 300 mL d'acide propionique sont portés à reflux (140 °C) pendant 30 min avant l'ajout de 8 mL de pyrrole (115,5 mmol, 4 éq.). Après 1 h 30 de réaction sous agitation magnétique, le milieu réactionnel est refroidi à 25 °C et 70 mL de méthanol froid sont ajoutés. Après une nuit à 4 °C, le brut est filtré sur Célite® et lavé au méthanol froid. 1,69 g de produit brut sont obtenus après reprise dans le chloroforme, séchage sur sulfate de magnésium et évaporation du solvant. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne automatisée (phase stationnaire : gel de silice, éluant : chloroforme / éther de pétrole (80 / 20)). Après évaporations sous vide du solvant, 1,18 g du produit **P₁** sont obtenus sous la forme d'une poudre violette, soit un rendement de 6,5%.

R_f = 0,33 (éluant : CHCl₃).

UV-Vis (CHCl₃) ; λ_{max} (nm) ; (ε, L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 420 (310 000), 517 (11 000), 552 (5600), 593 (3300), 648 (3600).

RMN ¹H (CDCl₃, 500,15 MHz) ; δ (ppm) : 8,87 (d, 2H, J = 4,8 Hz, H_βpyrrolique) ; 8,83 (sel, 6H, H_βpyrrolique) ; 8,21 (d, 6H, J = 7,5 Hz, H_{2,6}-phenyl) ; 8,04 (d, 2H, J = 8,3 Hz, H_{2,6}-aryl) ; 7,75 (m, 9H, H_{3,4,5}-phenyl) ; 7,16 (m, 2H, H_{3,5}-aryl) ; -2,74 (s, 2H, H_{NH}int).

III.8. Synthèse de la 5-(4-bromopentoxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (**P₂**)



Dans un bicol de 50 mL, 200 mg de **P₁** (0,32 mmol, 1 éq.), 870 mg de carbonate de potassium (6,3 mmol, 20 éq.) et 15 mL de N,N-diméthylformamide anhydre sont agités pendant 30 min à 60 °C sous argon, puis 174 μ L de 1,5-dibromopentane (1,28 mmol, 4 éq.) sont ajoutés. La réaction est poursuivie pendant 3 h dans les mêmes conditions, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Après être repris dans du dichlorométhane (70 mL), le brut réactionnel est lavé à l'eau distillée (3 fois 70 mL) jusqu'à pH neutre. Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation du solvant, une masse de 235 mg de produit brut est obtenue. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne automatisée (phase stationnaire : gel de silice, éluant : chloroforme avec un gradient d'éther de pétrole de 10 à 0%). Après évaporation sous vide du solvant, 220 mg du produit **P₂** sont obtenus sous la forme d'un solide violet, soit un rendement de 88%.

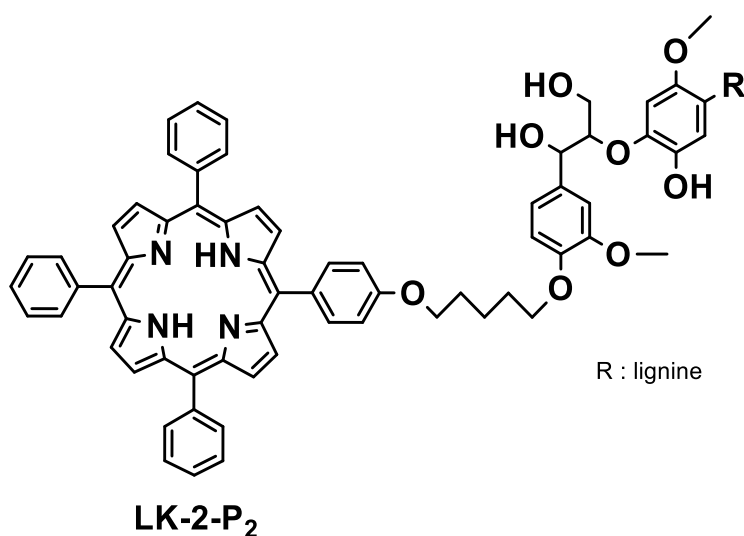
R_f = 0,89 (éluant CHCl₃)

UV-Vis (DMF) ; λ_{\max} (nm) (ϵ , L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 419 (426 000), 516 (15 500), 552 (8000), 590 (4500), 646 (4300).

RMN ¹H (CDCl₃, 500,15 MHz) ; δ (ppm) : 8,87 (d, J = 4,5 Hz, 2H, **H _{β}** -pyrroliques) ; 8,83 (s_{el}, 6H, **H _{β}** -pyrroliques) ; 8,21 (d, 6H, J = 8,0 Hz, **H_{2,6}**-phenyl) ; 8,11 (d, 2H, J = 8,5 Hz, **H_{2,6}**-aryl) ; 7,75 (m, 9H, **H_{3,4,5}**-

phenyl) ; 7,25 (m, 2H, $H_{3,5\text{-aryl}}$) ; 4,25 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, $H_{O\text{-CH}_2}$) ; 3,53 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, $H_{Br\text{-CH}_2}$) ; 1,79 (m, 2H, H_{CH_2}) ; 2,00 (m, 2H, H_{CH_2}) ; 2,06 (m, 2H, H_{CH_2}) ; -2,76 (s, H, $H_{NH\text{int}}$).

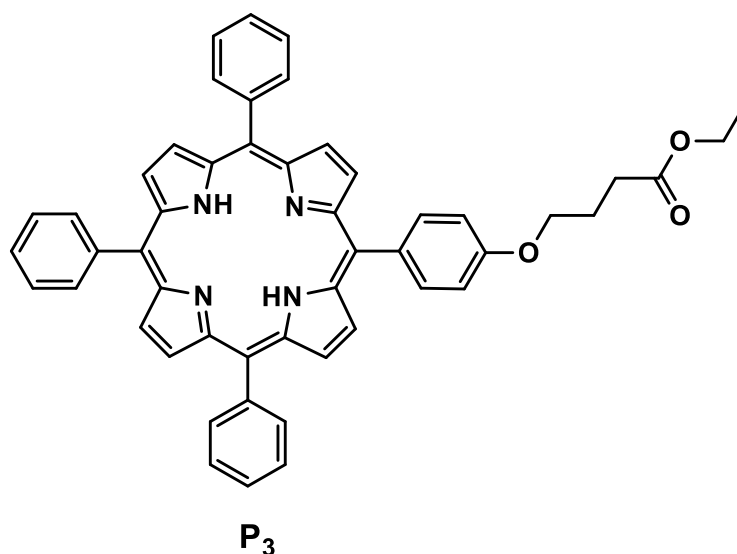
III.9. Synthèse de LK-2-P₂ : Couplage entre la porphyrine P₂ et la lignine LK-2



Dans un ballon de 100 mL, 146,60 mg de P₂ (0,188 mmol, 1 éq.), 188,60 mg de lignine LK-2, préalablement séchée à 105 °C pendant 48 h, et 104,09 mg de carbonate de potassium (0,759 mmol, 4 éq.), sont dissouts dans 30 mL de N,N-diméthylformamide anhydre. La solution obtenue est agitée sous argon pendant 24 h à 25 °C. En fin de réaction, 500 mL d'éther diéthylique sont ajoutés au milieu pour faire précipiter le matériau. Ce dernier est récupéré par filtration sur un fritté de porosité 3 et lavé à l'éther diéthylique. Le solide (180 mg) est ensuite repris dans environ 40 mL d'eau désionisée et dialysé (membrane de cellulose régénérée Spectrum Laboratories® de porosité 1000 Da). Après lyophilisation, 167 mg du matériau LK-2-P₂ sont obtenus sous la forme d'une poudre rosée, soit avec un rendement massique de 88,5%.

UV-Vis (DMF) ; λ_{\max} (nm) : 419, 516, 550, 589, 649.

III.10. Synthèse de la 5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (**P₃**)



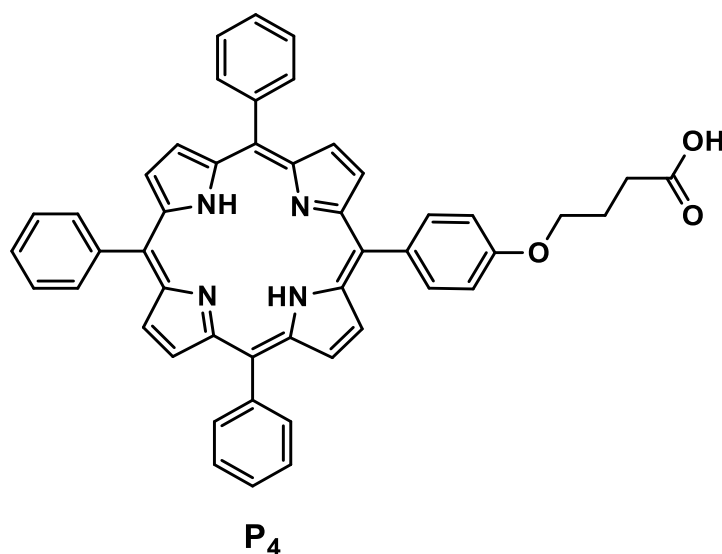
Dans un bicol de 50 mL, 200 mg ($3,175 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 éq.) de 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine et 840 mg ($6,087 \cdot 10^{-3}$ mol, 19 éq.) de carbonate de potassium sont solubilisés sous argon dans 15 mL de N,N-diméthylformamide anhydre. Après 30 min d'agitation à 60 °C, 190 μ L ($1,262 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 éq.) de 4-bromobutanoate d'éthyle à 95% sont ajoutés. Après 90 min supplémentaires d'agitation, la réaction est stoppée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est ensuite repris dans 50 mL de dichlorométhane, puis lavé trois fois avec 50 mL d'eau distillée. Après séchage sur sulfate de magnésium de la phase organique et évaporation du solvant, une masse de produit brut de 230 mg est obtenue. Une purification par chromatographie sur colonne automatisée (phase stationnaire : gel de silice, éluant : dichlorométhane 100%) permet d'obtenir 226 mg de produit **P₃**, sous la forme d'un solide violet, soit un rendement de 95%.

R_f = 0,71 (éluant : éther de pétrole/chloroforme (20/80 ; v/v))

UV-Vis (DMF) ; λ_{\max} (nm) ; (ϵ , L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 419 (431 000), 517 (16 700), 553 (8600), 591 (4800), 646 (4500).

RMN ^1H (CDCl_3 , 500,15 MHz) ; δ (ppm) : 8,87 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,83 (sel, 6H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,20 (d, 6H, $J = 8,0$ Hz, $\text{H}_{2,6\text{-phenyl}}$) ; 8,11 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{2,6\text{-aryl}}$) ; 7,74 (m, 9H, $\text{H}_{3,4,5\text{-phenyl}}$) ; 7,22 (m, 2H, $\text{H}_{3,5\text{-aryl}}$) ; 4,25 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, $\text{H}_{\text{O-CH}_2}$) ; 4,23 (quad, 2H, $J = 7,4$ Hz, $\text{H}_{\text{O-CH}_2\text{-CH}_3}$) ; 2,67 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-C=O}}$) ; 2,28 (quint, 2H, $J = 6,5$ Hz, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}}$) ; 1,33 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, H_{CH_3}) ; -2,74 (s, 2H, H_{NHint}).

III.11. Synthèse de la 5-(2[carboxypropoyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (**P₄**)



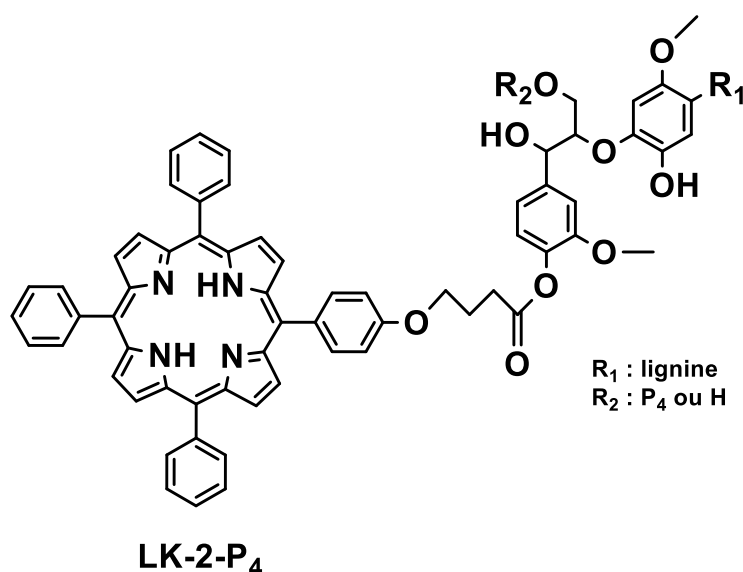
Dans un ballon de 50 mL, 136 mg ($1,828 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 éq.) de porphyrine **P₃**, et 65 mg d'hydroxyde de sodium (0,016 mol, 89 éq.) sont dissouts dans 10 mL de N,N-diméthylformamide anhydre. La solution obtenue est laissée sous agitation magnétique durant 4 h à 140 °C. En fin de réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut réactionnel est repris dans 50 mL de chloroforme. La phase organique est ensuite lavée avec 50 mL d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, puis avec 2 x 50 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L⁻¹. Enfin, un dernier lavage avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium est effectué jusqu'à pH neutre. Après séchage de la phase organique sur sulfate de magnésium, filtration et évaporation du solvant, 180 mg de produit brut sont obtenus. Une purification par chromatographie sur colonne automatisée (phase stationnaire : gel de silice, éluant : chloroforme avec un gradient d'éthanol de 2 à 15%) permet d'obtenir 45 mg de produit **P₄**, sous la forme d'un solide violet, soit un rendement de 33,4%.

R_f = 0,77 (éluant : éthanol/chloroforme (10/90 ; v/v))

UV-Vis (CHCl₃) ; λ_{max} (nm) : 419, 516, 552, 591, 643.

RMN ^1H (CDCl_3/TFA ; 90/10, 500,15 MHz) ; δ (ppm) : 8,73 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,67 (SeI , 6H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,54 (d, 6H, $J = 8,0$ Hz, $\text{H}_{2,6\text{-phenyl}}$) ; 8,51 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{2,6\text{-aryl}}$) ; 8,03 (m, 9H, $\text{H}_{3,4,5\text{-phenyl}}$) ; 7,56 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{3,5\text{-aryl}}$) ; 4,44 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O}}$) ; 2,87 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-C=O}}$) ; 2,05 (quint, 2H, $J = 6,5$ Hz, $\text{H}_{\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2}$).

III.12. Synthèse de LK-2-P₄ : couplage entre la porphyrine P₄ et la lignine LK-2



La lignine LK-2 est préalablement séchée à 105 °C pendant 48 h. Puis, dans un bicol de 25 mL, 25 mg de P₄ ($3,492 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 éq.) sont mis en présence de 7 mg de 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) ($4,321 \cdot 10^{-5}$ mol, 1,2 éq.), dans 5 mL de N,N-diméthylformamide anhydre. L'activation par le CDI est conduite sous argon pendant 24 h sous agitation magnétique et à 25°C. Ensuite, une solution composée de 35 mg de lignine LK-2 séchée (1 g de lignine pour 1 mmol de porphyrine) solubilisés dans 5 mL de N,N-diméthylformamide anhydre est ajoutée au milieu réactionnel. Après 72 h de réaction à 80 °C, 500 mL d'éther diéthylique sont ajoutés au milieu réactionnel afin de faire précipiter les lignines. Le matériau est ensuite récupéré par filtration sous vide et lavé à l'éther. Après dialyse et lyophilisation, 3,9 mg du matériau LK-2-P₄ sont obtenus sous la forme d'une poudre rosée, soit un rendement massique de 15,6%.

UV-Vis (DMF) ; λ_{\max} (nm) : 419, 516, 549, 589, 647.

IV. Préparation des nanoparticules de lignines

IV.1. Préparation des nanoparticules par ajout d'un contre-solvant

Dans un pilulier, 10 mg de lignines estérifiées sont dissouts dans 10 mL de tétrahydrofurane. Après avoir fermé le pilulier, la solution obtenue est placée sous agitation magnétique pendant 20 min et elle est laissée au repos pendant 72 h. Puis, 18 mL d'eau ultrapure sont alors ajoutés, sous agitation, avec un débit de 18 mL.h⁻¹ à l'aide d'une pompe péristaltique *Pump P-1* de marque General Electric. Une fois l'ajout d'eau terminé, la solution est filtrée sous vide sur millipore® (membrane nylon 0,45 µm), puis 70 mL d'eau ultrapure sont ajoutés au filtrat. Cette solution est enfin laissée sous agitation magnétique dans un bécher sous la hotte pendant 24 h, afin d'évaporer le tétrahydrofurane restant.

IV.2. Préparation des nanoparticules par dialyse

Dans un pilulier, 20 mg de lignines estérifiées sont dissouts dans 10 mL de tétrahydrofurane ou d'acétone. Après avoir fermé le pilulier, la solution obtenue est laissée sous agitation magnétique pendant 20 min. Cette solution est ensuite introduite dans une membrane de dialyse (membrane en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 12 – 14 000 Da de marque Fisherbrand). La solution est par la suite dialysée contre de l'eau distillée pendant 24 h sous agitation mécanique. La solution de nanoparticules contenue à l'intérieur de la membrane de dialyse est ensuite centrifugée (2740 x g), puis le surnageant est éliminé. Les nanoparticules sont alors redispersées dans un volume d'eau permettant d'obtenir la concentration massique désirée.

IV.3. Encapsulation de la rhodamine B

Dans un pilulier, 20 mg du matériau **AclK-2** et 2 mg de rhodamine B sont dissouts dans 10 mL d'acétone. Après avoir fermé le pilulier, la solution obtenue est placée dans un bain à ultrasons pendant 20 min. Cette solution est ensuite introduite dans une membrane de dialyse (membrane en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 12 – 14 000 Da de marque Fisherbrand). La solution est par la suite dialysée contre de l'eau distillée pendant 24 h sous agitation mécanique.

En fin de dialyse, le contenu de la membrane est transféré dans un tube de centrifugation, puis la suspension est centrifugée à 7012 x g pendant 1 h. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot obtenu est dissout dans 10 mL d'acétone. La quantité de rhodamine B présente dans ce dernier est déterminée par dosage UV-Vis à 554 nm à partir du coefficient d'extinction molaire de la rhodamine B dans l'acétone. Ce coefficient, d'une valeur de 4200 L.mol⁻¹.cm⁻¹, quant à lui, été calculé à partir de solutions étalons de rhodamine B dans l'acétone dont la concentration est comprise entre 9,5.10⁻⁶ et 2,1.10⁻⁵ mol.L⁻¹.

IV.4. Encapsulation de la 5-10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphényl)-porphyrine (TPPOH)

Dans un pilulier, 20 mg de lignines **AcLK-2** et 2 mg de 5-10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphényl)-porphyrine (**TPPOH**) sont dissouts dans 10 mL d'acétone. Après avoir fermé le pilulier, la solution est placée dans un bain à ultrasons pendant 20 min. Cette solution a ensuite été introduite dans une membrane de dialyse (membrane en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 12 – 14 000 Da de marque Fisherbrand). La solution a par la suite été dialysée contre de l'eau distillée pendant 24 h sous agitation mécanique.

En fin de dialyse, le contenu de la membrane est transféré dans un tube de centrifugation, puis la suspension est centrifugée à 7012 x g pendant 1 h. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot obtenu est dissout dans 10 mL d'acétone. La quantité de **TPPOH** présente dans ce dernier est déterminée par dosage UV-Vis à 419 nm à partir du coefficient d'extinction molaire de la **TPPOH** dans l'acétone. Ce coefficient, d'une valeur de 388 500 L.mol⁻¹.cm⁻¹, quant à lui, été calculé à partir de solutions étalons de **TPPOH** dans l'acétone, de concentrations comprises entre 7,7.10⁻⁷ et 2,7.10⁻⁶ mol.L⁻¹.

Références bibliographiques

- [1] Huber G W, Iborra S, Corma A. Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical Reviews*. **2006**; 106 : 4044-4098.
- [2] Calvo-Flores F G, Dobado J A. Lignin as renewable raw material. *ChemSusChem*. **2010**; 3 : 1227-1235.
- [3] Laurichesse S, Avérous L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in Polymer Science*. **2014**; 39 : 1266-1290.
- [4] Garrido-Herrera F J, Daza-Fernández I, González-Pradas E, Fernández-Pérez M. Lignin-based formulations to prevent pesticides pollution. *Journal of Hazardous Materials*. **2009**; 168 : 220-225.
- [5] Rasmussen J J, Wiberg-Larsen P, Baattrup-Pedersen A, Cedergreen N, McKnight U S, Kreuger J, Jacobsen D, Kristensen E A, Friberg N. The legacy of pesticide pollution: an overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. *Water Research*. **2015**; 84 : 25-32.
- [6] Espro C, Gumina B, Paone E, Mauriello F. Upgrading lignocellulosic biomasses: Hydrogenolysis of platform derived molecules promoted by heterogeneous Pd-Fe catalysts. *Catalysts*. **2017**; 7 : 78.
- [7] Liu C-J. Deciphering the enigma of lignification: Precursor transport, oxidation, and the topochemistry of lignin assembly. *Molecular Plant*. **2012**; 5 : 304-317.
- [8] Grabber J H. How do Lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*. **2005**; 45 : 820-831.
- [9] Simon C, Spriet C, Hawkins S, Lion C. Visualizing lignification dynamics in plants with click chemistry: Dual labeling is BLISS! *Journal of Visualized Experiments*. **2018**; : 56947.
- [10] Plaxton W C. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Biology*. **1996**; 47 : 185-214.
- [11] Herrmann K M, Weaver L M. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Biology*. **1999**; 50 : 473-503.
- [12] Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin Biosynthesis and Structure1. *Plant Physiology*. **2010**; 153 : 895-905.
- [13] Higuchi T, Ito Y, Shimada M, Kawamura I. Chemical properties of milled wood lignin of grasses. *Phytochemistry*. **1967**; 6 : 1551-1556.
- [14] Hedges J I, Mann D C. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1979**; 43 : 1803-1807.
- [15] Whetten R, Sederoff R. Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell*. **1995**; 7 : 1001-1013.
- [16] Li X, Chapple C. Understanding lignification: Challenges beyond monolignol biosynthesis. *Plant Physiology*. **2010**; 154 : 449-452.
- [17] Miao Y-C, Liu C-J. ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2010**; 107 : 22728-22733.
- [18] Silva M J C M, Valencise B C A, Juliana D O F V, Carnier D M, Paulo M. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. **2010**; 52 : 360-376.
- [19] Adler E. Lignin chemistry-Past, present and future. *Wood Science and Technology*. **1977**; 11 : 169-218.
- [20] Ek M, Gellerstedt G, Henriksson G, Henriksson G. Lignin. *Pulp and Paper Chemistry and Technology*. **2009**; 1 : 121-124.

- [21] Davin L B, Jourdes M, Patten A M, Kim K-W, Vassão D G, Lewis N G. Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. *Natural Product Reports*. **2008**; 25 : 1015-1090.
- [22] Crestini C, Melone F, Sette M, Saladino R. Milled wood lignin: A linear oligomer. *Biomacromolecules*. **2011**; 12 : 3928-3935.
- [23] Lawoko M. Unveiling the structure and ultrastructure of lignin carbohydrate complexes in softwoods. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2013**; 62 : 705-713.
- [24] Zhenfu J, S. K K, Tuyet L T B, Kenji I. Covalent linkages between cellulose and lignin in cell walls of coniferous and nonconiferous woods. *Biopolymers*. **2006**; 83 : 103-110.
- [25] Zakzeski J, Bruijninx P C A, Jongerius A L, Weckhuysen B M. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chemical Reviews*. **2010**; 110 : 3552-3599.
- [26] Chakar F S, Ragauskas A J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products*. **2004**; 20 : 131-141.
- [27] Azadi P, Inderwildi O R, Farnood R, King D A. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2013**; 21 : 506-523.
- [28] Bugg T D, Ahmad M, Hardiman E M, Rahmanpour R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*. **2011**; 28 : 1883-1896.
- [29] Patil S V, Argyropoulos D S. Stable Organic Radicals in Lignin: A Review. *ChemSusChem*. **2017**; 10 : 3284-3303.
- [30] Brown M E, Chang M C Y. Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2014**; 19 : 1-7.
- [31] de Gonzalo G, Colpa D I, Habib M H, Fraaije M W. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*. **2016**; 236 : 110-119.
- [32] Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1984**; 81 : 2280-2284.
- [33] Khindaria A, Yamazaki I, Aust S D. Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase. *Biochemistry*. **1995**; 34 : 16860-16869.
- [34] Glenn J K, Gold M H. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of biochemistry and biophysics*. **1985**; 242 : 329-341.
- [35] Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas F J, Martínez M a J, Martínez Á T. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry*. **1999**; 274 : 10324-10330.
- [36] Forney L J, Reddy C A, Tien M, Aust S. The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*. **1982**; 257 : 11455-11462.
- [37] Ahmad M, Roberts J N, Hardiman E M, Singh R, Eltis L D, Bugg T D. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry*. **2011**; 50 : 5096-5107.
- [38] Paulsson M, Parkås J. Review: Light-induced yellowing of lignocellulosic pulps – Mechanisms and preventive methods. *BioResources*. **2012**; 7 : 5995-6040.

- [39] Scaiano J, Netto-Ferreira J, Wintgens V. Fragmentation of ketyl radicals derived from α -phenoxyacetophenone: An important mode of decay for lignin-related radicals? *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **1991**; 59 : 265-268.
- [40] Schmidt J A, Heitner C. Light-Induced Yellowing of Mechanical and Ultrahigh Yield Pulps. Part 2. Radical-Induced Cleavage of Etherified Guaiacylglycerol- β -Arylether Groups is the Main Degradative Pathway. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1993**; 13 : 309-325.
- [41] Fabbri C, Bietti M, Lanzalunga O. Generation and reactivity of ketyl radicals with lignin related structures. On the importance of the ketyl pathway in the photoyellowing of lignin containing pulps and papers. *The Journal of Organic Chemistry*. **2005**; 70 : 2720-2728.
- [42] Li C, Ragauskas A J. Brightness reversion of mechanical pulps Part XIII: Photoinduced degradation of lignin on cellulose matrix. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1999**; 19 : 43-60.
- [43] Ragauskas A J, Beckham G T, Biddy M J, Chandra R, Chen F, Davis M F, Davison B H, Dixon R A, Gilna P, Keller M, Langan P, Naskar A K, Saddler J N, Tschaplinski T J, Tuskan G A, Wyman C E. Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science*. **2014**; 344 : 709-719.
- [44] Jaeger C, Nourmamide A, Castellan A. Photodegradation of lignin: A photochemical study of phenolic coniferyl alcohol lignin model molecules. *Holzforschung*. **1993**; 47 : 375-390.
- [45] Peill P L D. Permanent bleaching of ligno-cellulosic materials. *Nature*. **1946**; 158 : 554.
- [46] Callow H J. Action of light upon jute. *Nature*. **1947**; 159 : 309.
- [47] Rex R. Electron paramagnetic resonance studies of stable free radicals in lignins and humic acids. *Nature*. **1960**; 188 : 1185.
- [48] Leary G. Photochemical production of quinoid structures in wood. *Nature*. **1968**; 217 : 672-673.
- [49] Grelier S, Castellan A, Kamdem D P. Photoprotection of copper-amine-treated pine. *Wood and Fiber Science*. **2000**; 32 : 196-202.
- [50] Hon D N-S, Feist W C. Hydroperoxidation in photoirradiated wood surfaces. *Wood and Fiber Science*. **1992**; 24 : 448-448.
- [51] Paulsson M, Simonson R. Acetylation of lignin and photostabilization of lignin-rich mechanical wood pulp and paper: Kluwer Academic/Plenum, New York, USA; **2002**.
- [52] Wang C, Kelley S S, Venditti R A. Lignin-based thermoplastic materials. *ChemSusChem*. **2016**; 9 : 770-783.
- [53] Kleppe P J. Kraft pulping. *Tappi Journal*. **1970**; 53 : 35-47.
- [54] Gierer J. Chemical aspects of kraft pulping. *Wood Science and Technology*. **1980**; 14 : 241-266.
- [55] Gratzl J S, Chen C-L. Chemistry of Pulping: Lignin Reactions. Lignin: Historical, biological, and materials perspectives: American Chemical Society; **1999**. p. 392-421.
- [56] Nagy M, Kosa M, Theliander H, Ragauskas A J. Characterization of CO₂ precipitated Kraft lignin to promote its utilization. *Green Chemistry*. **2010**; 12 : 31-34.
- [57] Zhu W, Westman G, Theliander H. Investigation and characterization of lignin precipitation in the LignoBoost process. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **2014**; 34 : 77-97.
- [58] Upton B M, Kasko A M. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective. *Chemical Reviews*. **2016**; 116 : 2275-2306.

- [59] Doherty W O S, Mousavioun P, Fellows C M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*. **2011**; 33 : 259-276.
- [60] Vishtal A G, Kraslawski A. Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources*. **2011**; 6 : 3547-3568.
- [61] Ahvazi B, Cloutier É, Wojciechowicz O, Ngo T-D. Lignin profiling: A guide for selecting appropriate lignins as precursors in biomaterials development. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2016**; 4 : 5090-5105.
- [62] El Mansouri N-E, Salvadó J. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Industrial Crops and Products*. **2006**; 24 : 8-16.
- [63] Browning W. Lignosulfonate stabilized emulsions in oil well drilling fluids. *Journal of Petroleum Technology*. **1955**; 7 : 9-15.
- [64] Marie J, Bourret J, Geffroy P-M, Smith A, Chaleix V, Chartier T. Eco-friendly alumina suspensions for tape-casting process. *Journal of the European Ceramic Society*. **2017**; 37 : 5239-5248.
- [65] Wetzel S, Duchesne L C, Laporte M F. Biochemicals. Bioproducts from Canada's forests: New Partnerships in the Bioeconomy: Springer; **2006**. p. 61-69.
- [66] Agrawal A, Kaushik N, Biswas S. Derivatives and applications of lignin—an insight. *The SciTech Journal*. **2014**; 1 : 30-36.
- [67] Patt R, Kordsachia O, Süttinger R. Pulp. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Wiley-VCH; **2012**.
- [68] Venica A D, Chen C-L, Gratzl J S. Soda–AQ delignification of poplar wood. Part 1: Reaction mechanism and pulp properties. *Holzforschung*. **2008**; 62 : 627-636.
- [69] Espinoza-Acosta J L, Torres-Chávez P I, Ramírez-Wong B, López-Saiz C M, Montaño-Leyva B. Antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic properties of technical lignins and their applications. *BioResources*. **2016**; 11 : 5452-5481.
- [70] Lora J, Glasser W. Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*. **2002**; 10 : 39-48.
- [71] Pye E K, Lora J H. The Alcell process: a proven alternative to kraft pulping. *Tappi Journal*. **1991**; 74 : 113-118.
- [72] Jiang G, Nowakowski D J, Bridgwater A V. A systematic study of the kinetics of lignin pyrolysis. *Thermochimica Acta*. **2010**; 498 : 61-66.
- [73] Mohan D, Pittman C U, Steele P H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. *Energy & Fuels*. **2006**; 20 : 848-889.
- [74] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Ash in Biomass. *Report No NREL/TP-510-42622, Laboratory Analytical Procedure*. **2008**.
- [75] Constant S, Wienk H L J, Frissen A E, Peinder P d, Boelens R, van Es D S, Grisel R J H, Weckhuysen B M, Huijgen W J J, Gosselink R J A, Bruijnincx P C A. New insights into the structure and composition of technical lignins: A comparative characterisation study. *Green Chemistry*. **2016**; 18 : 2651-2665.
- [76] Patwardhan P R, Satrio J A, Brown R C, Shanks B H. Influence of inorganic salts on the primary pyrolysis products of cellulose. *Bioresource Technology*. **2010**; 101 : 4646-4655.
- [77] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Report No NREL/TP-510-42618, Laboratory Analytical Procedure*. **2008**.

- [78] Mansouri N-E E, Salvadó J. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Industrial Crops and Products*. **2006**; 24 : 8-16.
- [79] Duval A, Molina-Boisseau S, Chirat C. Comparison of Kraft lignin and lignosulfonates addition to wheat gluten-based materials: Mechanical and thermal properties. *Industrial Crops and Products*. **2013**; 49 : 66-74.
- [80] Dwiatmoko A A, Lee S, Ham H C, Choi J-W, Suh D J, Ha J-M. Effects of carbohydrates on the hydrodeoxygenation of lignin-derived phenolic compounds. *ACS Catalysis*. **2014**; 5 : 433-437.
- [81] Sameni J, Krigstin S, Sain M. Characterization of lignins isolated from industrial residues and their beneficial uses. *BioResources*. **2016**; 11 : 8435-8456.
- [82] Lange J P. Renewable feedstocks: the problem of catalyst deactivation and its mitigation. *Angewandte Chemie International Edition*. **2015**; 54 : 13186-13197.
- [83] Buono P, Duval A, Verge P, Averous L, Habibi Y. New insights on the chemical modification of lignin: Acetylation versus silylation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2016**; 4 : 5212-5222.
- [84] Lupoi J S, Singh S, Parthasarathi R, Simmons B A, Henry R J. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2015**; 49 : 871-906.
- [85] Del Río J C, Rencoret J, Prinsen P, Martínez A n T, Ralph J, Gutiérrez A. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**; 60 : 5922-5935.
- [86] Modugno F, Ribechini E, Calderisi M, Giachi G, Colombini M. Analysis of lignin from archaeological waterlogged wood by direct exposure mass spectrometry (DE-MS) and PCA evaluation of mass spectral data. *Microchemical Journal*. **2008**; 88 : 186-193.
- [87] Bule M V, Gao A H, Hiscox B, Chen S. Structural modification of lignin and characterization of pretreated wheat straw by ozonation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**; 61 : 3916-3925.
- [88] Calvo-Flores F G, Dobado J A, García J I, Martin-Martinez F J. Lignin and lignans as renewable raw materials: Chemistry, technology and applications. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; **2015**.
- [89] Ralph S A, Ralph J, Landucci L, Landucci L. NMR database of lignin and cell wall model compounds.
https://www.glbrc.org/databases_and_software/nmrdatabase/NMR_DataBase_2009_Complete.pdf. Consulté le 08-10-2018
- [90] Heikkinen H, Elder T, Maaheimo H, Rovio S, Rahikainen J, Kruus K, Tamminen T. Impact of steam explosion on the wheat straw lignin structure studied by solution-state nuclear magnetic resonance and density functional methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**; 62 : 10437-10444.
- [91] Sette M, Wechselberger R, Crestini C. Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR. *Chemistry-A European Journal*. **2011**; 17 : 9529-9535.
- [92] H. D. S. Abreu, M. D. F. I. Freire. Methoxyl content determination of lignin by H NMR. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **1995**; 67 : 379-382.

- [93] Crestini C, Argyropoulos D S. Structural Analysis of Wheat Straw Lignin by Quantitative ^{31}P and 2D NMR Spectroscopy. The Occurrence of Ester Bonds and α -O-4 Substructures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997**; 45 : 1212-1219.
- [94] Argyropoulos D S. Quantitative phosphorus-31 NMR analysis of six soluble lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1994**; 14 : 65-82.
- [95] Balakshin M, Capanema E. On the quantification of lignin hydroxyl groups with ^{31}P and ^{13}C NMR spectroscopy. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **2015**; 35 : 220-237.
- [96] Santos R B, Capanema E A, Balakshin M Y, Chang H-m, Jameel H. Lignin structural variation in hardwood species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**; 60 : 4923-4930.
- [97] Bouxin F P, McVeigh A, Tran F, Westwood N J, Jarvis M C, Jackson S D. Catalytic depolymerisation of isolated lignins to fine chemicals using a Pt/alumina catalyst: part 1—impact of the lignin structure. *Green Chemistry*. **2015**; 17 : 1235-1242.
- [98] Pu Y, Cao S, Ragauskas A J. Application of quantitative ^{31}P NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization. *Energy & Environmental Science*. **2011**; 4 : 3154-3166.
- [99] Huijgen W J J, Telysheva G, Arshanitsa A, Gosselink R J A, de Wild P J. Characteristics of wheat straw lignins from ethanol-based organosolv treatment. *Industrial Crops and Products*. **2014**; 59 : 85-95.
- [100] Yang S, Zhang Y, Yue W, Wang W, Wang Y-Y, Yuan T-Q, Sun R-C. Valorization of lignin and cellulose in acid-steam-exploded corn stover by a moderate alkaline ethanol post-treatment based on an integrated biorefinery concept. *Biotechnology for Biofuels*. **2016**; 9 : 238.
- [101] Baumberger S, Abächerli A, Fasching M, Gellerstedt G, Gosselink R, Hortling B, Li J, Saake B, de Jong E. Molar mass determination of lignins by size-exclusion chromatography: Towards standardisation of the method. *Holzforschung*. **2007**; 61 : 459-468.
- [102] Gosselink R, Abächerli A, Semke H, Malherbe R, Käuper P, Nadif A, Van Dam J. Analytical protocols for characterisation of sulphur-free lignin. *Industrial Crops and Products*. **2004**; 19 : 271-281.
- [103] Steelink C, Reid T, Tollin G. On the nature of the free-radical moiety in lignin. *Journal of the American Chemical Society*. **1963**; 85 : 4048-4049.
- [104] Brauns F. The isolation and methylation of native lignin. *Journal of the American Chemical Society*. **1939**; 61 : 2120-2127.
- [105] Brauns F E, Brauns D A. The chemistry of lignin: Academic Press New-York and London; **1960**.
- [106] Humar M, Sentjurc M, Petrič M. EPR spin trapping - A new technique for observation and characterisation of free radicals during photodegradation of wood. *Drvna Industrija*. **2002**; 53 : 197-202.
- [107] Zoia L, Perazzini R, Crestini C, Argyropoulos D S. Understanding the radical mechanism of lipoxygenases using ^{31}P NMR spin trapping. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2011**; 19 : 3022-3028.
- [108] Argyropoulos D S, Li H, Gaspar A R, Smith K, Lucia L A, Rojas O J. Quantitative ^{31}P NMR detection of oxygen-centered and carbon-centered radical species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2006**; 14 : 4017-4028.

- [109] Lu F J, Chu L H, Gau R J. Free radical-scavenging properties of lignin. *Nutrition and Cancer*. **1998**; 30 : 31-38.
- [110] Ugartondo V, Mitjans M, Vinardell M P. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresource Technology*. **2008**; 99 : 6683-6687.
- [111] Dizhbite T, Telysheva G, Jurkjane V, Viesturs U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants. *Bioresource Technology*. **2004**; 95 : 309-317.
- [112] Perez-Perez E, Rodríguez-Malaver A J. Antioxidant capacity of Kraft black liquor from the pulp and paper industry. *Journal of Environmental Biology*. **2005**; 26 : 603-608.
- [113] Kaur R, Uppal S K, Sharma P. Antioxidant and antibacterial activities of sugarcane bagasse lignin and chemically modified lignins. *Sugar Tech*. **2017**; 19 : 675-680.
- [114] Espinoza Acosta J L, Torres Chávez P I, Ramírez-Wong B, Bello-Pérez L A, Vega Ríos A, Carvajal Millán E, Plascencia Jatomea M, Ledesma Osuna A I. Mechanical, thermal, and antioxidant properties of composite films prepared from durum wheat starch and lignin. *Starch-Stärke*. **2015**; 67 : 502-511.
- [115] Núñez-Flores R, Giménez B, Fernández-Martín F, López-Caballero M, Montero M, Gómez-Guillén M. Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. *Food Hydrocolloids*. **2012**; 27 : 60-71.
- [116] Núñez-Flores R, Giménez B, Fernández-Martín F, López-Caballero M, Montero M, Gómez-Guillén M. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids*. **2013**; 30 : 163-172.
- [117] Ponomarenko J, Dizhbite T, Lauberts M, Viksna A, Dobele G, Bikovens O, Telysheva G. Characterization of softwood and hardwood LignoBoost kraft lignins with emphasis on their antioxidant activity. *BioResources*. **2014**; 9 : 2051-2068.
- [118] García A, Toledano A, Andrés M Á, Labidi J. Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochemistry*. **2010**; 45 : 935-940.
- [119] Sakagami H, Hashimoto K, Suzuki F, Ogiwara T, Satoh K, Ito H, Hatano T, Takashi Y, Fujisawa S-i. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*. **2005**; 66 : 2108-2120.
- [120] Toledano A, García A, Mondragon I, Labidi J. Lignin separation and fractionation by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. **2010**; 71 : 38-43.
- [121] Toledano A, Serrano L, Garcia A, Mondragon I, Labidi J. Comparative study of lignin fractionation by ultrafiltration and selective precipitation. *Chemical Engineering Journal*. **2010**; 157 : 93-99.
- [122] dos Santos P S, Erdocia X, Gatto D A, Labidi J. Characterisation of Kraft lignin separated by gradient acid precipitation. *Industrial Crops and Products*. **2014**; 55 : 149-154.
- [123] Pan X, Gilkes N, Kadla J, Pye K, Saka S, Gregg D, Ehara K, Xie D, Lam D, Saddler J. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: Optimization of process yields. *Biotechnology and Bioengineering*. **2006**; 94 : 851-861.
- [124] El Hage R, Perrin D, Brosse N. Effect of the pre-treatment severity on the antioxidant properties of ethanol organosolv *Miscanthus x giganteus* lignin. *Natural Resources*. **2012**; 3 : 29-34.
- [125] Vinardell M, Ugartondo V, Mitjans M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial Crops and Products*. **2008**; 27 : 220-223.

- [126] Cybulska I, Brudecki G, Rosentrater K, Julson J L, Lei H. Comparative study of organosolv lignin extracted from prairie cordgrass, switchgrass and corn stover. *Bioresource Technology*. **2012**; 118 : 30-36.
- [127] Zemek J, Košíková B, Augustin J, Joniak D. Antibiotic properties of lignin components. *Folia Microbiologica*. **1979**; 24 : 483-486.
- [128] Nada A, El-Diwany A, Elshafei A. Infrared and antimicrobial studies on different lignins. *Engineering in Life Sciences*. **1989**; 9 : 295-298.
- [129] Dong X, Dong M, Lu Y, Turley A, Jin T, Wu C. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Industrial Crops and Products*. **2011**; 34 : 1629-1634.
- [130] Afrin T, Tsuzuki T, Kanwar R, Wang X. The origin of the antibacterial property of bamboo. *Journal of the Textile Institute*. **2012**; 103 : 844-849.
- [131] Sláviková E, Košíková B. Inhibitory effect of lignin by-products of pulping on yeast growth. *Folia Microbiologica*. **1994**; 39 : 241-243.
- [132] Slamenová D, Horváthová E, Košíková B, Ružeková L u, Lábaj J. Detection of lignin biopolymer-and vitamin e-stimulated reduction of DNA strand breaks in H₂O₂-and MNNG-treated mammalian cells by the comet assay. *Nutrition and Cancer*. **1999**; 33 : 88-94.
- [133] Ebringer L, Krizkova L, Polónyi J, Dobias J, Lahitová N. Antimutagenicity of lignin in vitro. *Anticancer Research*. **1999**; 19 : 569-572.
- [134] Košíková B, Lábaj J, Gregorová A, Slameňová D. Lignin antioxidants for preventing oxidation damage of DNA and for stabilizing polymeric composites. *Holzforschung*. **2006**; 60 : 166-170.
- [135] Belicová A, Krajčovič J, Křížková L, Ebringer L, Košíková B. Anti-UV activity of lignin biopolymers on *Euglena gracilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2000**; 16 : 91-93.
- [136] Baurhoo B, Ferket P R, Zhao X. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poultry Science*. **2009**; 88 : 2262-2272.
- [137] Baurhoo B, Ruiz-Feria C A, Zhao X. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals - A review. *Animal Feed Science and Technology*. **2008**; 144 : 175-184.
- [138] Huber G W, Corma A. Synergies between bio - and oil refineries for the production of fuels from biomass. *Angewandte Chemie International Edition*. **2007**; 46 : 7184-7201.
- [139] Luterbacher J S, Alonso D M, Dumesic J A. Targeted chemical upgrading of lignocellulosic biomass to platform molecules. *Green Chemistry*. **2014**; 16 : 4816-4838.
- [140] Alonso D M, Wettstein S G, Dumesic J A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chemical Society Reviews*. **2012**; 41 : 8075-8098.
- [141] Demirbas A. Biorefineries: Current activities and future developments. *Energy Conversion and Management*. **2009**; 50 : 2782-2801.
- [142] Joffres B, Laurenti D, Charon N, Daudin A, Quignard A, Geantet C. Thermochemical conversion of lignin for fuels and chemicals: A review. *Oil & Gas Science and Technology—Revue d'IFP Energies nouvelles*. **2013**; 68 : 753-763.
- [143] Pandey M P, Kim C S. Lignin depolymerization and conversion: A review of thermochemical methods. *Chemical Engineering & Technology*. **2011**; 34 : 29-41.

- [144] Guo Y, Rockstraw D A. Physical and chemical properties of carbons synthesized from xylan, cellulose, and Kraft lignin by H₃PO₄ activation. *Carbon*. **2006**; 44 : 1464-1475.
- [145] French R, Czernik S. Catalytic pyrolysis of biomass for biofuels production. *Fuel Processing Technology*. **2010**; 91 : 25-32.
- [146] Fang Z, Smith Jr R L. Production of biofuels and chemicals from lignin: Springer; **2016**.
- [147] Bjørsvik H-R, Minisci F. Fine chemicals from liginosulfonates. 1. Synthesis of vanillin by oxidation of liginosulfonates. *Organic Process Research & Development*. **1999**; 3 : 330-340.
- [148] Pacek A W, Ding P, Garrett M, Sheldrake G, Nienow A W. Catalytic conversion of sodium liginosulfonate to vanillin: engineering aspects. Part 1. Effects of processing conditions on vanillin yield and selectivity. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2013**; 52 : 8361-8372.
- [149] Silva E A B d, Zabkova M, Araújo J D, Cateto C A, Barreiro M F, Belgacem M N, Rodrigues A E. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chemical Engineering Research and Design*. **2009**; 87 : 1276-1292.
- [150] Danielson B, Simonson R. Kraft lignin in phenol formaldehyde resin. Part 1. Partial replacement of phenol by kraft lignin in phenol formaldehyde adhesives for plywood. *Journal of Adhesion Science and Technology*. **1998**; 12 : 923-939.
- [151] Danielson B, Simonson R. Kraft lignin in phenol formaldehyde resin. Part 2. Evaluation of an industrial trial. *Journal of Adhesion Science and Technology*. **1998**; 12 : 941-946.
- [152] Zhang C, Wu H, Kessler M R. High bio-content polyurethane composites with urethane modified lignin as filler. *Polymer*. **2015**; 69 : 52-57.
- [153] Homma H, Kubo S, Yamada T, Koda K, Matsushita Y, Uraki Y. Conversion of technical liginins to amphiphilic derivatives with high surface activity. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **2010**; 30 : 164-174.
- [154] Guo Z-X, Gandini A. Polyesters from lignin 2. the copolyesterification of kraft lignin and polyethylene glycols with dicarboxylic acid chlorides. *European Polymer Journal*. **1991**; 27 : 1177-1180.
- [155] Thanh Binh N T, Luong N D, Kim D O, Lee S H, Kim B J, Lee Y S, Nam J-D. Synthesis of lignin-based thermoplastic copolyester using kraft lignin as a macromonomer. *Composite Interfaces*. **2009**; 16 : 923-935.
- [156] Lewis H, Brauns F, Buchanan M, Brookbank E. Lignin esters of mono-and dibasic aliphatic acids. *Industrial & Engineering Chemistry*. **1943**; 35 : 1113-1117.
- [157] Meister J. Polymer modification: Principles, techniques, and applications: CRC Press; **2000**.
- [158] Hult E-L, Koivu K, Asikkala J, Ropponen J, Wrigstedt P, Sipilä J, Poppius-Levlin K. Esterified lignin coating as water vapor and oxygen barrier for fiber-based packaging. *Holzforchung*. **2013**; 67 : 899-905.
- [159] Fox S C, McDonald A G. Chemical and thermal characterization of three industrial liginins and their corresponding lignin esters. *BioResources*. **2010**; 5 : 990-1009.
- [160] Lundquist K, Lin S Y, Dence C W. Proton (1H) NMR Spectroscopy. *Methods in Lignin Chemistry*: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany; **1992**. p. 242-249.
- [161] Glasser W G, Jain R K. Lignin derivatives. I. Alkanoates. *Holzforchung*. **2009**; 47 : 225-233.
- [162] Monteil-Rivera F, Paquet L. Solvent-free catalyst-free microwave-assisted acylation of lignin. *Industrial Crops and Products*. **2015**; 65 : 446-453.

- [163] Chen F, Dai H, Dong X, Yang J, Zhong M. Physical properties of lignin-based polypropylene blends. *Polymer Composites*. **2011**; 32 : 1019-1025.
- [164] Li Y, Sarkanen S. Alkylated kraft lignin-based thermoplastic blends with aliphatic polyesters. *Macromolecules*. **2002**; 35 : 9707-9715.
- [165] Sadeghifar H, Cui C, Argyropoulos D S. Toward thermoplastic lignin polymers. Part 1. Selective masking of phenolic hydroxyl groups in kraft lignins via methylation and oxypropylation chemistries. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2012**; 51 : 16713-16720.
- [166] Sen S, Patil S, Argyropoulos D S. Methylation of softwood kraft lignin with dimethyl carbonate. *Green Chemistry*. **2015**; 17 : 1077-1087.
- [167] Wu L C F, Glasser W G. Engineering plastics from lignin. I. Synthesis of hydroxypropyl lignin. *Journal of Applied Polymer Science*. **1984**; 29 : 1111-1123.
- [168] Ionescu M. Chemistry and technology of polyols for polyurethanes: iSmithers Rapra Publishing; **2005**.
- [169] Mikhailov M, Budevskia K. Preparation of epoxy resins from lignin. *Izvestiya na Institutite po Obshta i Neorganichna Khimiya i po Organichna Khimiya, Bulgarska Akademiya na Naukite*. **1962**; 9 : 187-196.
- [170] Mihailo M, Budevskia C. Epoxy resins from lignin. *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*. **1962**; 15 : 155-158.
- [171] El Mansouri N E, Yuan Q, Huang F. Synthesis and characterization of kraft lignin-based epoxy resins. *BioResources*. **2011**; 6 : 2492-2503.
- [172] Okabe Y, Kagawa H. Biomass-derived epoxy resin composition. *US8420766B2*. **2013**.
- [173] Effendi A, Gerhauser H, Bridgwater A V. Production of renewable phenolic resins by thermochemical conversion of biomass: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2008**; 12 : 2092-2116.
- [174] Cetin N S, Özmen N. Use of organosolv lignin in phenol-formaldehyde resins for particleboard production: II. Particleboard production and properties. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. **2002**; 22 : 481-486.
- [175] Figueiredo P, Lintinen K, Hirvonen J T, Kostianen M A, Santos H A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*. **2018**; 93 : 233-269.
- [176] Zhang Q, Zhang G, Xu J, Gao C, Wu Y. Recent advances on lignin-derived polyurethane polymers. *Reviews on Advanced Materials Science*. **2015**; 40 : .
- [177] Thring R, Ni P, Aharoni S. Molecular weight effects of the soft segment on the ultimate properties of lignin-derived polyurethanes. *International Journal of Polymeric Materials*. **2004**; 53 : 507-524.
- [178] Gandini A, Belgacem M N, Guo Z-X, Montanari S. Lignins as macromonomers for polyesters and polyurethanes. *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin*: Springer; **2002**. p. 57-80.
- [179] Hou X-D, Li N, Zong M-H. Facile and simple pretreatment of sugar cane bagasse without size reduction using renewable ionic liquids–water mixtures. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2013**; 1 : 519-526.
- [180] El Mansouri N-E, Yuan Q, Huang F. Study of chemical modification of alkaline lignin by the glyoxalation reaction. *BioResources*. **2011**; 6 : 4523-4536.
- [181] Navarrete P, Pizzi A, Pasch H, Delmotte L. Study on lignin–glyoxal reaction by MALDI-TOF and CP-MAS 13C-NMR. *Journal of Adhesion Science and Technology*. **2012**; 26 : 1069-1082.

- [182] Arend M, Westermann B, Risch N. Modern variants of the Mannich reaction. *Angewandte Chemie International Edition*. **1998**; 37 : 1044-1070.
- [183] Matsushita Y, Yasuda S. Reactivity of a condensed-type lignin model compound in the Mannich reaction and preparation of cationic surfactant from sulfuric acid lignin. *Journal of Wood Science*. **2003**; 49 : 166-171.
- [184] Huo S P, Nie M C, Kong Z W, Wu G M, Chen J. Crosslinking kinetics of the formation of lignin-aminated polyol-based polyurethane foam. *Journal of Applied Polymer Science*. **2012**; 125 : 152-157.
- [185] Huang J, Zhang L. Effects of NCO/OH molar ratio on structure and properties of graft-interpenetrating polymer networks from polyurethane and nitrolignin. *Polymer*. **2002**; 43 : 2287-2294.
- [186] Zhang L, Huang J. Effects of hard-segment compositions on properties of polyurethane–nitrolignin films. *Journal of Applied Polymer Science*. **2001**; 81 : 3251-3259.
- [187] He W, Fatehi P. Preparation of sulfomethylated softwood kraft lignin as a dispersant for cement admixture. *RSC Advances*. **2015**; 5 : 47031-47039.
- [188] Madzhidova V, Dalimova G, Abduazimov K A. Sulfomethylation of lignins. *Chemistry of Natural Compounds*. **1998**; 34 : 179-181.
- [189] Pang Y-X, Qiu X-Q, Yang D-J, Lou H-M. Influence of oxidation, hydroxymethylation and sulfomethylation on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2008**; 312 : 154-159.
- [190] Liu Y, Li K. Preparation and characterization of demethylated lignin-polyethylenimine adhesives. *The Journal of Adhesion*. **2006**; 82 : 593-605.
- [191] Duval A, Lawoko M. A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials. *Reactive and Functional Polymers*. **2014**; 85 : 78-96.
- [192] Shvedova A, Castranova V, Kisin E, Schwegler-Berry D, Murray A, Gandelsman V, Maynard A, Baron P. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. **2003**; 66 : 1909-1926.
- [193] Simon-Deckers A. Effets biologiques de nanoparticules manufacturées: Influence de leurs caractéristiques [Thèse de doctorat]. Institut national agronomique Paris-Grignon. **2008**.
- [194] Zhao W, Simmons B, Singh S, Ragauskas A, Cheng G. From lignin association to nano/micro-particle preparation: Extracting higher value of lignin. *Green Chemistry*. **2016**; 18 : 5693-5700.
- [195] Contreras S a, Gaspar A R, Guerra A, Lucia L A, Argyropoulos D S. Propensity of lignin to associate: Light scattering photometry study with native lignins. *Biomacromolecules*. **2008**; 9 : 3362-3369.
- [196] Guerra A, Gaspar A R, Contreras S, Lucia L A, Crestini C, Argyropoulos D S. On the propensity of lignin to associate: A size exclusion chromatography study with lignin derivatives isolated from different plant species. *Phytochemistry*. **2007**; 68 : 2570-2583.
- [197] Lievonen M, Valle-Delgado J J, Mattinen M-L, Hult E-L, Lintinen K, Kostianen M A, Paananen A, Szilvay G R, Setälä H, Österberg M. Simple process for lignin nanoparticle preparation. *Green Chemistry*. **2016**; 18 : 1416-1422.

- [198] Frangville C, Rutkevičius M, Richter A P, Velez O D, Stoyanov S D, Paunov V N. Fabrication of Environmentally Biodegradable Lignin Nanoparticles. *ChemPhysChem*. **2012**; 13 : 4235-4243.
- [199] Tortora M, Cavalieri F, Mosesso P, Ciaffardini F, Melone F, Crestini C. Ultrasound driven assembly of lignin into microcapsules for storage and delivery of hydrophobic molecules. *Biomacromolecules*. **2014**; 15 : 1634-1643.
- [200] Beisl S, Miltner A, Friedl A. Lignin from micro to nanosize : Production methods. *International Journal of Molecular Sciences*. **2017**; 18 : 1244.
- [201] Yearla S R, Padmasree K. Preparation and characterisation of lignin nanoparticles : Evaluation of their potential as antioxidants and UV protectants. *Journal of Experimental Nanoscience*. **2016**; 11 : 289-302.
- [202] Lu Q, Zhu M, Zu Y, Liu W, Yang L, Zhang Y, Zhao X, Zhang X, Zhang X, Li W. Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin. *Food Chemistry*. **2012**; 135 : 63-67.
- [203] Yang W, Fortunati E, Gao D, Balestra G M, Giovanale G, He X, Torre L, Kenny J M, Puglia D. Valorization of acid isolated high yield lignin nanoparticles as innovative antioxidant/antimicrobial organic materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2018**; 6 : 3502-3514.
- [204] Gupta A K, Mohanty S, Nayak S K. Synthesis, characterization and application of lignin nanoparticles (LNPs). *Materials Focus*. **2014**; 3 : 444-454.
- [205] Nevárez L A M, Casarrubias L B, Celzard A, Fierro V, Muñoz V T, Davila A C, Lubian J R T, Sánchez G G. Biopolymer-based nanocomposites: effect of lignin acetylation in cellulose triacetate films. *Science and technology of advanced materials*. **2011**; 12 : 045006.
- [206] Qian Y, Qiu X, Zhong X, Zhang D, Deng Y, Yang D, Zhu S. Lignin reverse micelles for UV-absorbing and high mechanical performance thermoplastics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2015**; 54 : 12025-12030.
- [207] Tian D, Hu J, Bao J, Chandra R P, Saddler J N, Lu C. Lignin valorization : Lignin nanoparticles as high-value bio-additive for multifunctional nanocomposites. *Biotechnology for Biofuels*. **2017**; 10 : 192-203.
- [208] Qian Y, Zhong X, Li Y, Qiu X. Fabrication of uniform lignin colloidal spheres for developing natural broad-spectrum sunscreens with high sun protection factor. *Industrial Crops and Products*. **2017**; 101 : 54-60.
- [209] Qian Y, Qiu X, Zhu S. Sunscreen performance of lignin from different technical resources and their general synergistic effect with synthetic sunscreens. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2016**; 4 : 4029-4035.
- [210] Qian Y, Qiu X, Zhu S. Lignin : A nature-inspired sun blocker for broad-spectrum sunscreens. *Green Chemistry*. **2015**; 17 : 320-324.
- [211] Zhong X, Qian Y, Huang J, Yang D, Deng Y, Qiu X. Fabrication of liginosulfonate vesicular reverse micelles to immobilize horseradish peroxidase. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2016**; 55 : 2731-2737.
- [212] Yang W, Fortunati E, Bertoglio F, Owczarek J S, Bruni G, Kozanecki M, Kenny J M, Torre L, Visai L, Puglia D. Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. **2018**; 181 : 275-284.

- [213] Rahman O, Shi S, Ding J, Wang D, Ahmad S, Yu H. Lignin nanoparticles : Synthesis, characterization and corrosion protection performance. *New Journal of Chemistry*. **2018**; 42 : 3415-3425.
- [214] Richter A P, Brown J S, Bharti B, Wang A, Gangwal S, Houck K, Cohen Hubal E A, Paunov V N, Stoyanov S D, Velev O D. An environmentally benign antimicrobial nanoparticle based on a silver-infused lignin core. *Nature Nanotechnology*. **2015**; 10 : 817-823.
- [215] Ten E, Ling C, Wang Y, Srivastava A, Dempere L A, Vermerris W. Lignin nanotubes as vehicles for gene delivery into human cells. *Biomacromolecules*. **2013**; 15 : 327-338.
- [216] Qian Y, Deng Y, Qiu X, Li H, Yang D. Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor. *Green Chemistry*. **2014**; 16 : 2156-2163.
- [217] Qian Y, Deng Y, Li H, Qiu X. Reaction-free lignin whitening via a self-assembly of acetylated lignin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **2014**; 53 : 10024-10028.
- [218] Salentinig S, Schubert M. Softwood lignin self-assembly for nanomaterial design. *Biomacromolecules*. **2017**; 18 : 2649-2653.
- [219] Figueiredo P, Lintinen K, Kiriazis A, Hynninen V, Liu Z, Bauleth-Ramos T, Rahikkala A, Correia A, Kohout T, Sarmento B, Yli-Kauhaluoma J, Hirvonen J, Ikkala O, Kostianen M A, Santos H A. In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells. *Biomaterials*. **2017**; 121 : 97-108.
- [220] Figueiredo P, Ferro C, Kemell M, Liu Z, Kiriazis A, Lintinen K, Florindo H F, Yli-Kauhaluoma J, Hirvonen J, Kostianen M A, Santos H A. Functionalization of carboxylated lignin nanoparticles for targeted and pH-responsive delivery of anticancer drugs. *Nanomedicine*. **2017**; 12 : 2581-2596.
- [221] Dai L, Liu R, Hu L-Q, Zou Z-F, Si C-L. Lignin nanoparticle as a novel green carrier for the efficient delivery of resveratrol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2017**; 5 : 8241-8249.
- [222] Chen N, Dempere L A, Tong Z. Synthesis of pH-responsive lignin-based nanocapsules for controlled release of hydrophobic molecules. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2016**; 4 : 5204–5211.
- [223] Yiamsawas D, Baier G, Thines E, Landfester K, Wurm F R. Biodegradable lignin nanocontainers. *RSC Advances*. **2014**; 4 : 11661-11663.
- [224] Campos E V R, de Oliveira J L, Fraceto L F. Applications of controlled release systems for fungicides, herbicides, acaricides, nutrients, and plant growth hormones: A review. *Advanced Science, Engineering and Medicine*. **2014**; 6 : 373-387.
- [225] Scher H B. Controlled-release delivery systems for pesticides: CRC Press; **1999**.
- [226] Campos E V R, De Oliveira J L, Fraceto L F, Singh B. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agronomy for Sustainable Development*. **2015**; 35 : 47-66.
- [227] Azwa Z, Yousif B, Manalo A, Karunasena W. A review on the degradability of polymeric composites based on natural fibres. *Materials & Design*. **2013**; 47 : 424-442.
- [228] Chen J, Lü S, Zhang Z, Zhao X, Li X, Ning P, Liu M. Environmentally friendly fertilizers : A review of materials used and their effects on the environment. *Science of the Total Environment*. **2018**; 613 : 829-839.

- [229] Johnson R M, Pepperman A B. Release of atrazine and alachlor from clay-oxamide controlled-release formulations. *Pesticide Science*. **1998**; 53 : 233-240.
- [230] Işiklan N. Controlled release of insecticide carbaryl from sodium alginate, sodium alginate/gelatin, and sodium alginate/sodium carboxymethyl cellulose blend beads crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Applied Polymer Science*. **2006**; 99 : 1310-1319.
- [231] Pfister G, Bahadir M, Korte F. Release characteristics of herbicides from Ca alginate gel formulations. *Journal of Controlled Release*. **1986**; 3 : 229-233.
- [232] Pepperman A B, Kuan J-C W. Slow release formulations of metribuzin based on alginate-kaolin-linseed oil. *Journal of Controlled Release*. **1993**; 26 : 21-30.
- [233] Villafranca-Sánchez M, González-Pradas E, Fernández-Pérez M, Martínez-López F, Flores-Céspedes F, Ureña-Amate M D. Controlled release of isoproturon from an alginate–bentonite formulation: water release kinetics and soil mobility. *Pest Management Science*. **2000**; 56 : 749-756.
- [234] Işiklan N. Controlled release study of carbaryl insecticide from calcium alginate and nickel alginate hydrogel beads. *Journal of Applied Polymer Science*. **2007**; 105 : 718-725.
- [235] Céspedes F F, García S P, Sánchez M V, Pérez M F. Bentonite and anthracite in alginate-based controlled release formulations to reduce leaching of chloridazon and metribuzin in a calcareous soil. *Chemosphere*. **2013**; 92 : 918-924.
- [236] Singh B, Sharma D, Gupta A. A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch–alginate beads to control environmental and health hazards. *Journal of Hazardous Materials*. **2009**; 161 : 208-216.
- [237] Singh B, Sharma D, Dhiman A. Environment friendly agar and alginate-based thiram delivery system. *Toxicological & Environmental Chemistry*. **2013**; 95 : 567-578.
- [238] Singh B, Sharma D, Gupta A. Controlled release of thiram fungicide from starch-based hydrogels. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. **2007**; 42 : 677-695.
- [239] Kah M, Hofmann T. Nanopesticide research : current trends and future priorities. *Environment International*. **2014**; 63 : 224-235.
- [240] Guan H, Chi D, Yu J, Li H. Encapsulated ecdysone by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability. *Chemical Engineering Journal*. **2011**; 168 : 94-101.
- [241] Céspedes F F, Sánchez M V, Garcia S P, Pérez M F. Modifying sorbents in controlled release formulations to prevent herbicides pollution. *Chemosphere*. **2007**; 69 : 785-794.
- [242] Roy A, Bajpai J, Bajpai A. Dynamics of controlled release of chlorpyrifos from swelling and eroding biopolymeric microspheres of calcium alginate and starch. *Carbohydrate Polymers*. **2009**; 76 : 222-231.
- [243] Kulkarni A R, Soppimath K S, Aminabhavi T M, Dave A M, Mehta M H. Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *Journal of Controlled Release*. **2000**; 63 : 97-105.
- [244] Jerobin J, Sureshkumar R, Anjali C, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers*. **2012**; 90 : 1750-1756.
- [245] Guan H, Chi D, Yu J, Li X. A novel photodegradable insecticide : Preparation, characterization and properties evaluation of nano-imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **2008**; 92 : 83-91.

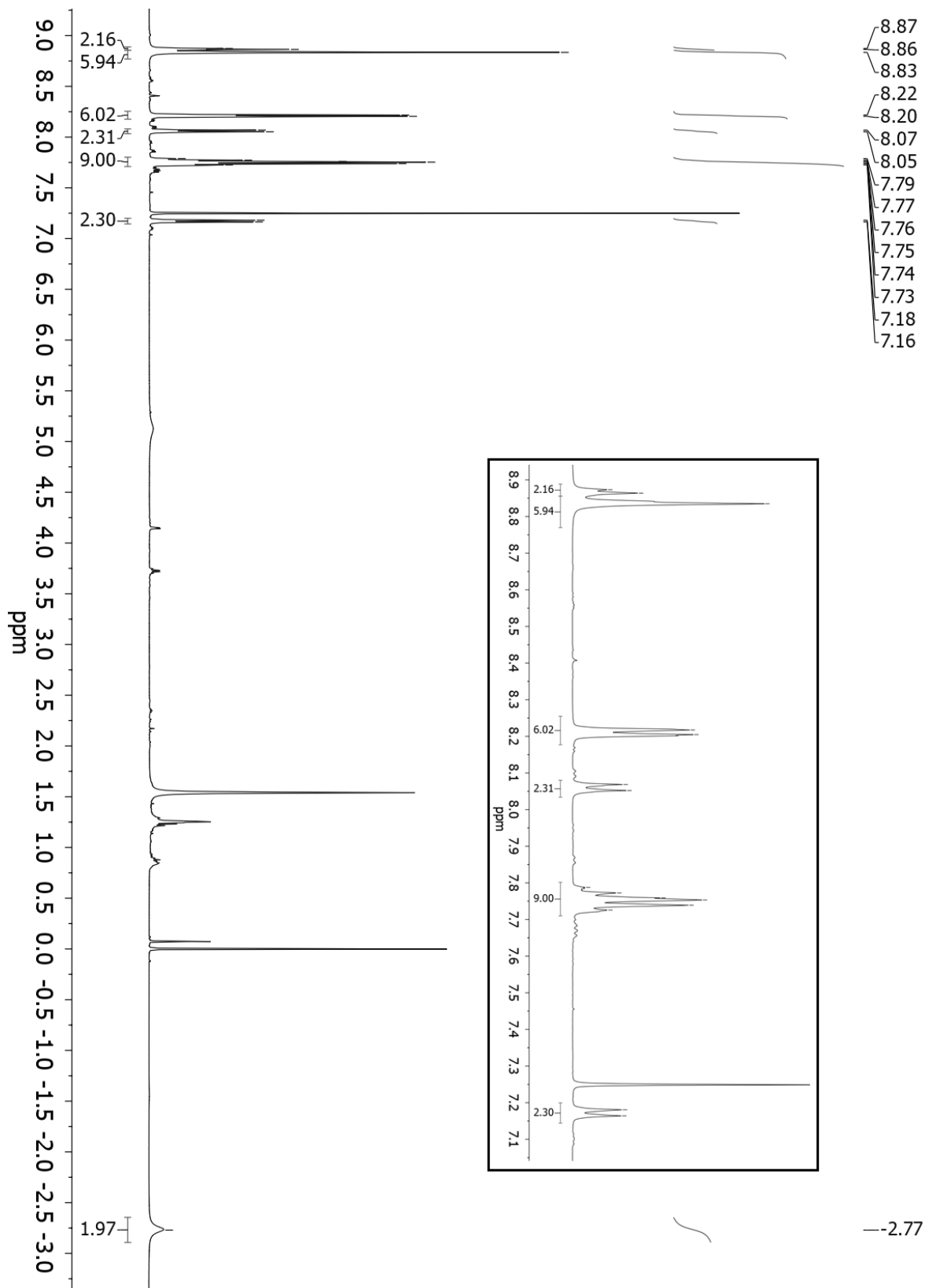
- [246] Wu L, Liu M. Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. *Carbohydrate Polymers*. **2008**; 72 : 240-247.
- [247] Quiñones J P, García Y C, Curiel H, Covas C P. Microspheres of chitosan for controlled delivery of brassinosteroids with biological activity as agrochemicals. *Carbohydrate Polymers*. **2010**; 80 : 915-921.
- [248] Zhong K, Lin Z-T, Zheng X-L, Jiang G-B, Fang Y-S, Mao X-Y, Liao Z-W. Starch derivative-based superabsorbent with integration of water-retaining and controlled-release fertilizers. *Carbohydrate Polymers*. **2013**; 92 : 1367-1376.
- [249] El Bahri Z, Taverdet J-L. Elaboration and characterisation of microparticles loaded by pesticide model. *Powder Technology*. **2007**; 172 : 30-40.
- [250] Ni B, Liu M, Lü S. Multifunctional slow-release urea fertilizer from ethylcellulose and superabsorbent coated formulations. *Chemical Engineering Journal*. **2009**; 155 : 892-898.
- [251] dos Santos Silva M, Cocenza D S, Grillo R, de Melo N F S, Tonello P S, de Oliveira L C, Cassimiro D L, Rosa A H, Fraceto L F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of Hazardous Materials*. **2011**; 190 : 366-374.
- [252] Feng B-H, Peng L-F. Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan carrying ricinoleic functions as an emulsifier for azadirachtin. *Carbohydrate Polymers*. **2012**; 88 : 576-582.
- [253] Zhao J, Wilkins R M. Controlled release of the herbicide, fluometuron, from matrix granules based on fractionated organosolv lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**; 51 : 4023-4028.
- [254] Fernández-Pérez M, Villafranca-Sánchez M, Flores-Céspedes F, Daza-Fernández I. Lignin-polyethylene glycol matrices and ethylcellulose to encapsulate highly soluble herbicides. *Journal of Applied Polymer Science*. **2015**; 132 : 41422-41431.
- [255] Fernández-Pérez M, Villafranca-Sánchez M, Flores-Céspedes F, Daza-Fernández I. Ethylcellulose and lignin as bearer polymers in controlled release formulations of chloridazon. *Carbohydrate Polymers*. **2011**; 83 : 1672-1679.
- [256] Chowdhury M A. The controlled release of bioactive compounds from lignin and lignin-based biopolymer matrices. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2014**; 65 : 136-147.
- [257] Li Y, Zhou M, Pang Y, Qiu X. Lignin-based microsphere : preparation and performance on encapsulating the pesticide avermectin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2017**; 5 : 3321-3328.
- [258] Wang X, Zhao J. Encapsulation of the herbicide picloram by using polyelectrolyte biopolymers as layer-by-layer materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**; 61 : 3789-3796.
- [259] Flores-Céspedes F, Martínez-Domínguez G P, Villafranca-Sánchez M, Fernández-Pérez M. Preparation and characterization of azadirachtin alginate-biosorbent based formulations: water release kinetics and photodegradation study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2015**; 63 : 8391-8398.
- [260] Peng Z, Chen F. Synthesis and properties of lignin-based polyurethane hydrogels. *International Journal of Polymeric Materials*. **2011**; 60 : 674-683.
- [261] Constant S, Basset C, Dumas C, Di Renzo F, Robitzer M, Barakat A, Quignard F. Reactive organosolv lignin extraction from wheat straw : Influence of Lewis acid

- catalysts on structural and chemical properties of lignins. *Industrial Crops and Products*. **2015**; 65 : 180-189.
- [262] Tejado A, Peña C, Labidi J, Echeverria J M, Mondragon I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technology*. **2007**; 98 : 1655-1663.
- [263] Granata A, Argyropoulos D S. 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1995**; 43 : 1538-1544.
- [264] El Hage R, Brosse N, Chrusciel L, Sanchez C, Sannigrahi P, Ragauskas A. Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polymer Degradation and Stability*. **2009**; 94 : 1632-1638.
- [265] Gordobil O, Delucis R, Egüés I, Labidi J. Kraft lignin as filler in PLA to improve ductility and thermal properties. *Industrial Crops and Products*. **2015**; 72 : 46-53.
- [266] Vila C, Santos V, Saake B, Parajó J C. Manufacture, characterization, and properties of poly-(lactic acid) and its blends with esterified pine lignin. *BioResources*. **2016**; 11 : 5322-5332.
- [267] Gordobil O, Egüés I, Llano-Ponte R, Labidi J. Physicochemical properties of PLA lignin blends. *Polymer Degradation and Stability*. **2014**; 108 : 330-338.
- [268] Brunow G. Methods to reveal the structure of lignin. *Biopolymers Online: Wiley-VCH*; **2005**.
- [269] Lewis H F, Brauns F E. Esters of lignin material. *US Patent 2,429,102*. **1947**.
- [270] Sameni J, Krigstin S, Sain M. Solubility of lignin and acetylated lignin in organic solvents. *BioResources*. **2017**; 12 : 1548-1565.
- [271] Dehne L, Vila Babarro C, Saake B, Schwarz K U. Influence of lignin source and esterification on properties of lignin-polyethylene blends. *Industrial Crops and Products*. **2016**; 86 : 320-328.
- [272] Riou C, Calliste C A, Silva A D, Guillaumot D, Rezazgui O, Sol V, Leroy-Lhez S. Anionic porphyrin as a new powerful cell death inducer of Tobacco Bright Yellow-2 cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **2014**; 13 : 621-625.
- [273] Barclay L R, Basque M C, Vinqvist M R. Singlet-oxygen reactions sensitized on solid surfaces of lignin or titanium dioxide : Product studies from hindered secondary amines and from lipid peroxidation. *Canadian Journal of Chemistry*. **2003**; 81 : 457-467.
- [274] Fischer K, Beyer M. Comparison of light-induced and heat-induced yellowing of pulp. *Lenzinger Berichte*. **2000**; 79 : 25-31.
- [275] Neckers D C. Rose Bengal. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **1989**; 47 : 1-29.
- [276] Theodossiou T, Hothersall J S, Woods E A, Okkenhaug K, Jacobson J, MacRobert A J. Firefly luciferin-activated Rose Bengal. *Cancer Research*. **2003**; 63 : 1818-1821.
- [277] Barclay L R C, Grandy J K, MacKinnon H D, Nichol H C, Vinqvist M R. Peroxidations initiated by lignin model compounds: investigating the role of singlet oxygen in photo-yellowing. *Canadian Journal of Chemistry*. **1998**; 76 : 1805-1816.
- [278] Fischer K, Beyer M, Koch H. Photo-induced yellowing of high yield pulps. *Holzforschung*. **2009**; 49 : 203-210.

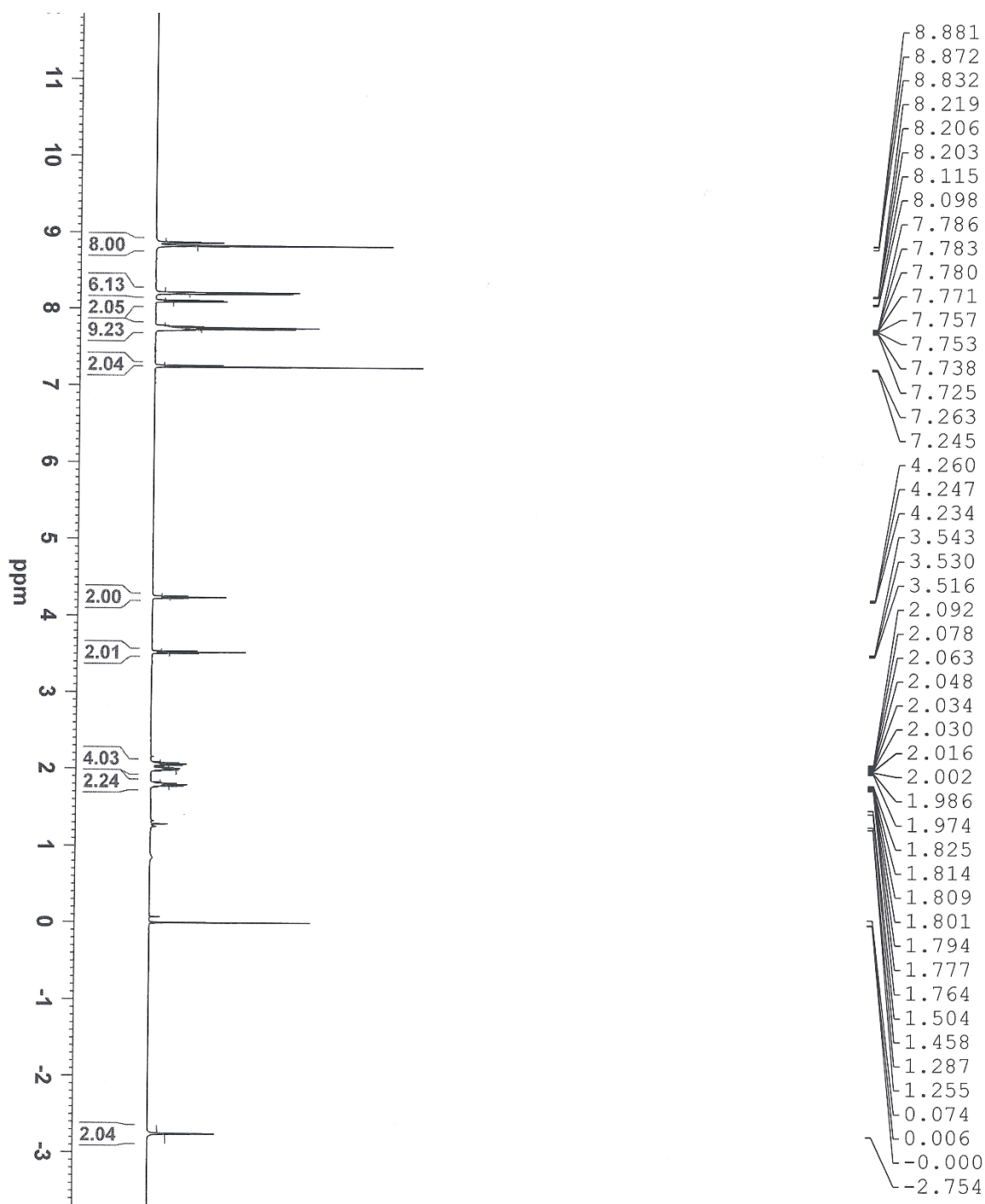
- [279] Marchand G, Calliste C A, Williams R M, McLure C, Leroy-Lhez S, Villandier N. Acetylated lignins : A potential bio-sourced photosensitizer. *ChemistrySelect*. **2018**; 3 : 5512-5516.
- [280] Mathai S, Smith T A, Ghiggino K P. Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **2007**; 6 : 995-1002.
- [281] Ormond A, Freeman H. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*. **2013**; 6 : 817-840.
- [282] Gonzales J C, Brancini G T P, Rodrigues G B, Silva-Junior G J, Bachmann L, Wainwright M, Braga G Ú L. Photodynamic inactivation of conidia of the fungus *Colletotrichum abscissum* on *Citrus sinensis* plants with methylene blue under solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **2017**; 176 : 54-61.
- [283] Zhang L, Eisenberg A. Formation of crew-cut aggregates of various morphologies from amphiphilic block copolymers in solution. *Polymers for Advanced Technologies*. **1998**; 9 : 677-699.
- [284] Lievonen M, Valle-Delgado J J, Mattinen M-L, Hult E-L, Lintinen K, Kostianen M A, Paananen A, Szilvay G R, Setälä H, Osterberg M. A simple process for lignin nanoparticle preparation. *Green Chemistry*. **2016**; 18 : 1416-1422.
- [285] Bregnhøj M, Westberg M, Jensen F, Ogilby P R. Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes : temperature effects implicate tunneling and charge-transfer interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2016**; 18 : 22946-22961.
- [286] Little R G, Anton J A, Loach P A, Ibers J A. The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1975**; 12 : 343-349.
- [287] Monti D, Venanzi M, Mancini G, Marotti F, La Monica L, Boschi T. Synthesis and complexation properties of an oligooxaethylene-spacerd porphyrin dimer—toward the construction of a new switchable porphyrin array. *European Journal of Organic Chemistry*. **1999**; 1999 : 1901-1906.
- [288] Taniguchi M, Du H, Lindsey J S. Virtual libraries of tetrapyrrole macrocycles. Combinatorics, isomers, product distributions, and data mining. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2011**; 51 : 2233-2247.
- [289] Rioux B, Pouget C, Fidanzì-Dugas C, Gamond A, Laurent A, Semaan J, Pinon A, Champavier Y, Leger D Y, Liagre B. Design and multi-step synthesis of chalcone-polyamine conjugates as potent antiproliferative agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2017**; 27 : 4354-4357.
- [290] Hussain M A, Liebert T, Heinze T. Acylation of cellulose with N, N'-carbonyldiimidazole-activated acids in the novel solvent Dimethylsulfoxide/tetrabutylammonium fluoride. *Macromolecular Rapid Communications*. **2004**; 25 : 916-920.

Annexes

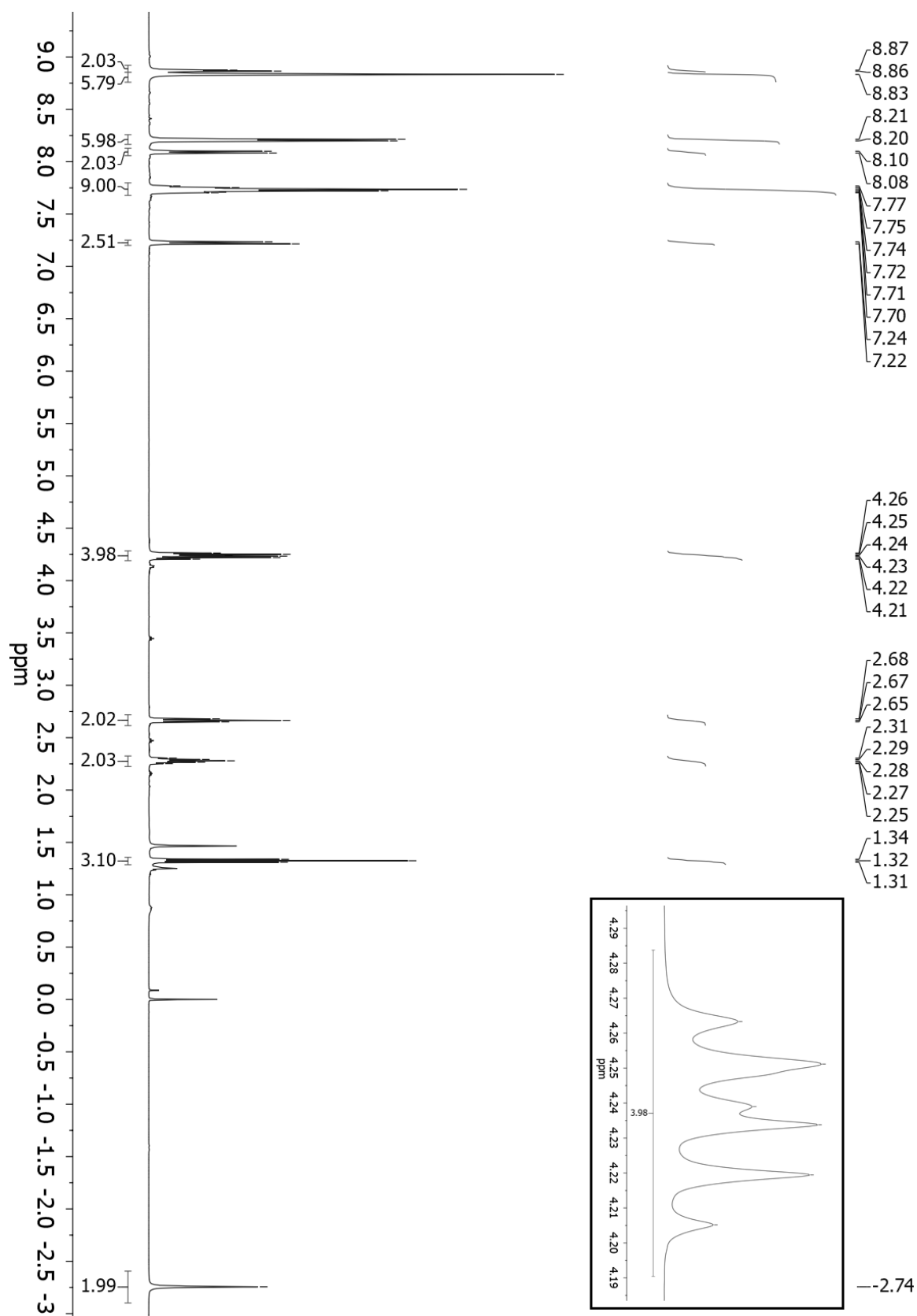
Annexe 1 : Spectre RMN ^1H de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P₁)



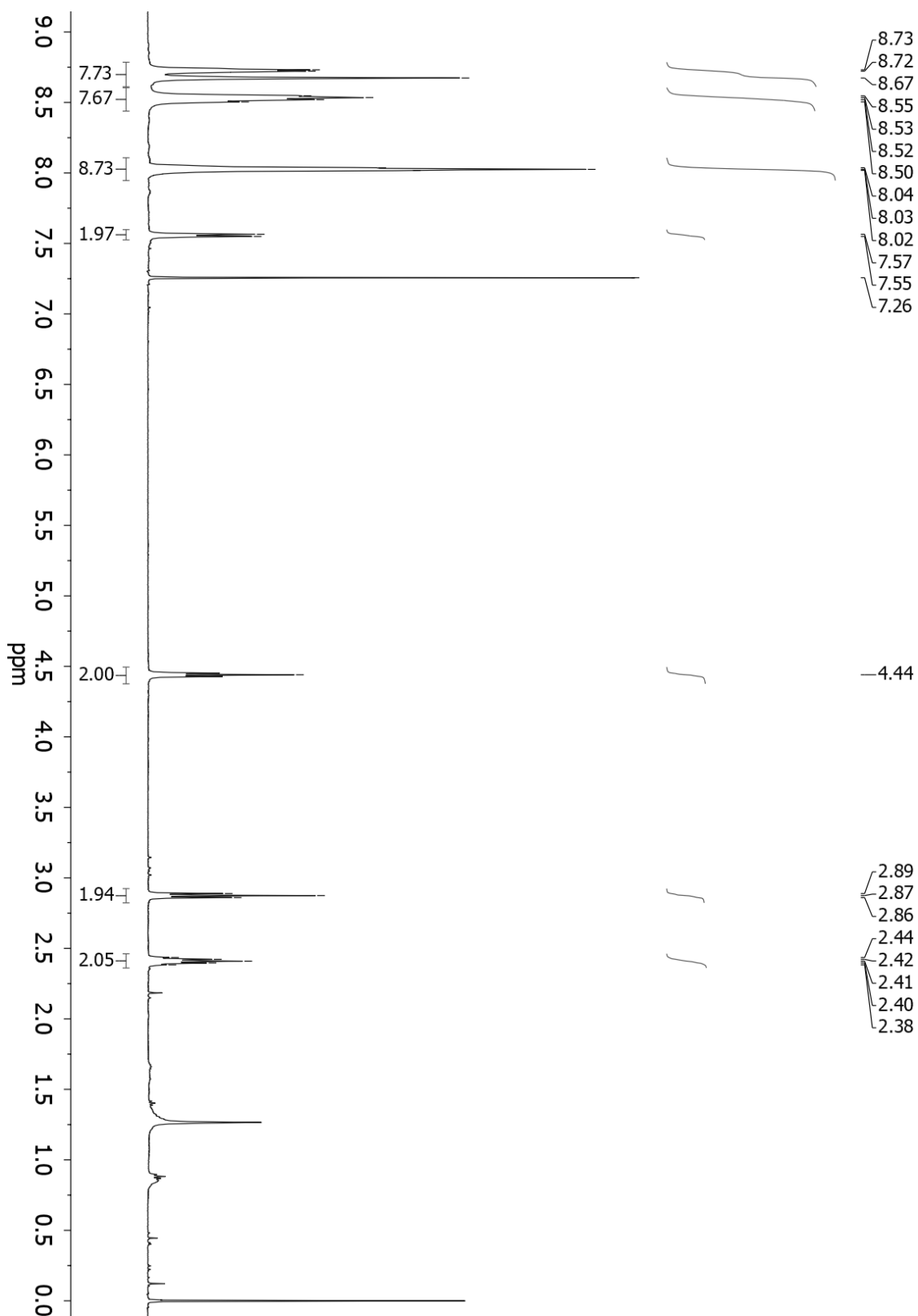
Annexe 2 : Spectre RMN ^1H de la 5-(4-bromopentoxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P₂)



Annexe 3 : Spectre RMN ¹H de la 5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P₃)



Annexe 4 : Spectre RMN ¹H de la 5-(2[carboxypropoyloxy]phényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (composé P₄)



Electro, Physical & Theoretical Chemistry

Acetylated Lignins: A Potential Bio-Sourced Photosensitizer

Guillaume Marchand,^[a] Claude A. Calliste,^[a] René M. Williams,^[b] Charlotte McLure,^[b] Stéphanie Leroy-Lhez,^[a] and Nicolas Villandier^{*[a]}

Nowadays, lignins are receiving an increasing interest from the scientific community. Indeed, this biopolymer, formerly considered a waste-product of the paper industry, appears today as an interesting oil equivalent in many fields. In this context, many chemical modifications of lignins have been presented to valorize this attractive feedstock. However, spectroscopic properties of these modified materials remain poorly studied, in particular their capacity to produce reactive oxygen species (ROS) under light irradiation. Thus, the purpose of this work is to monitor the production of singlet oxygen and superoxide anion under light irradiation of three different acetylated lignins. The results obtained show that those modified lignins can generate ROS levels, allowing to consider a use of these materials as photosensitizers for applications such as photo-dynamic treatments.

The increase of global environmental problems and over-exploitation of the planet's resources is of growing concern. The replacement of non-renewable sources of energy and raw material by more sustainable options is therefore one of the major challenges of the 21st century. In this context, lignocellulosic biomass appears as one of the most attractive alternative to fossil fuels in the production of energy^[1] and chemicals.^[2] Lignins represent a large part of this biomass being the highly abundant biopolymer after cellulose and the main aromatic renewable source.^[3]

However, out of the 55–70 million tons of lignins extracted annually, 98% are directly combusted for energy production.^[4] Only the remaining 2% are used for the production of value-added products, either directly, (as binder, filler, additive, dispersant, adsorbent, surfactant or precursors for carbon materials)^[5b,5] or after chemical modification. Indeed, the presence of aliphatic and phenolic hydroxyl groups on the polymer's surface allows multiple functionalizations of the material thanks to various chemical modifications.^[3b,5b,6] One of

the most commonly described in the literature is their acetylation, usually to integrate subsequently the modified biopolymer into a plastic matrix^[7] or for structural analysis.^[8] Therefore, the synthesis and the study of the physicochemical properties of acetylated lignins are very well described,^[6a,9] whereas spectroscopic properties, and in particular radical production capacity and processes undergone after the photo-activation of this esterified biopolymer, have received very little attention.

Indeed, the antioxidant properties of lignins are widely described by many works,^[10] and a significant amount of studies have also shown that lignins are able to photochemically generate stable organic radicals responsible for the degradation and thus the aging of lignin-based materials.^[11] Contrariwise, the excited state properties of acetylated lignins are poorly described, especially the consequence of acetylation on radical production under light irradiation.


However, since the mid-40's, works on photo-yellowing of wood and wood-based materials have focused on the radical behavior of acetylated lignins.^[12] Authors have shown that after protection of their alcohol functions by acetyl groups, lignins no longer produce quinone-type radicals, thus preventing the material containing them (wood or paper) from photo-yellowing. These observations were later confirmed by further works.^[13] Moreover, a recent study shows that raw lignins were found to have a higher antioxidant activity than acetylated ones.^[10a] It therefore seems that lignins' acetylation significantly modifies its radical behavior.

Taking into account these results, and in line with our previous work on the one hand the design of photosensitizers,^[14] and on the other hand biopolymers' valorization,^[15] we wonder if acetylated lignins could be considered as a new bio sourced photosensitive material that could be used in photo-dynamic treatment for eradication of bacteria, fungi and so on. Special focus will thus be given to their reactive oxygen species (ROS) production under and without light irradiation.

For that purpose, three different lignins were used. Each one was obtained from a different process. The two first were both Kraft softwood lignins industrially removed from alkaline black liquors by acidification. The first one (KL-1) was obtained by classical addition of an acidic solution and the second one (KL-2) by using the Lignoboost process.^[16] The third one (OL) were extracted from chestnut tree sawdust by a classical ethanol/water organosolv process.^[17] Two Kraft lignins were used because they are obtained from the most used process by the paper industry and therefore available in large quantities.

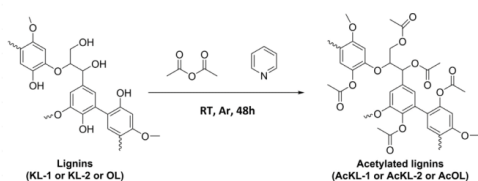
[a] G. Marchand, Dr. C. A. Calliste, Dr. S. Leroy-Lhez, Dr. N. Villandier
Laboratoire PEIRENE, EA7500, Faculté des Sciences et Techniques, 123
avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France
E-mail: nicolas.villandier@unilim.fr

[b] Dr. R. M. Williams, C. McLure
Molecular Photonics group, Van't Hoff Institute for Molecular Sciences
(HIMS), Universiteit van Amsterdam, Science Park 904, 1098 XH Am-
sterdam, Netherlands

 Supporting information for this article is available on the WWW under
<https://doi.org/10.1002/slct.201801039>

An organosolv lignin has also been chosen because this delignification technique takes advantage of being used in the laboratory, thus making it possible to ensure no external pollution during the various extraction steps. The influence of the extraction mode and of the biological origin of lignins can thus be discussed.

These three raw lignins were then conventionally acetylated according to the literature (Scheme 1).^[18] Acetylated lignins were respectively named AcKL-1, AcKL-2 and AcOL.



Scheme 1. Lignins acetylation.

Firstly, these three lignins were widely characterised, following this, the structure of the acetylated lignins was confirmed by different physical-chemical characterizations, the results of which will be displayed below. Secondly, the capacity of ROS production by these different compounds will be discussed.

The elemental compositions of KL-1, KL-2 and OL are shown in Table 1. KL-2 was found to contain the higher amount of

	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)	S (%)	C9 formulae
KL-1	59.14	5.41	27.04	0.80	1.39	C ₉ H _{8.5} O _{2.6} N _{0.1} S _{0.1} (OMe) _{0.7}
KL-2	69.49	5.80	26.54	0.00	1.40	C ₉ H _{7.3} O ₂ S _{0.1} (OMe) _{0.8}
OL	55.35	5.65	33.20	0.21	0.00	C ₉ H _{8.5} O ₃ N _{0.03} (OMe) _{1.4}

carbon with 69.49%. Both Kraft lignins contain similar oxygen and sulfur rates whereas in OL samples, no sulfur was detected and a higher oxygen percentage was observed. Low amounts of nitrogen were detected in KL-1 and OL, while KL-2 are nitrogen-free lignins. In parallel, the quantity of methoxy groups present on each initial lignin was evaluated.^[19] The methoxy content is of 10.7%, 15.30% and 18.80% in KL-1, KL-2 and OL samples, respectively. KL-1 and KL-2 therefore differ mainly in their methoxy rates, and consequently in their carbon rate, whereas OL are relatively different from the other two Kraft lignin by their elementary compositions. These variations observed can be explained by the differences in the plant origin of lignins and/or by the extraction protocols used. From all these data, the C9 formula of each lignin was calculated (Table 1).

The chemical composition of the starting lignins used is presented in Table 2. KL-1 and KL-2 exhibit similar total lignin

	AIL ^[a] (%)	ASL ^[b] (%)	Ash Content (%)	Total lignins ^[c] (%)	Total ^[d] (%)
KL-1	87.97	4.83	2.53	92.8	95.33
KL-2	92.60	2.33	0.38	94.9	95.31
OL	74.99	7.40	1.65	82.4	84.04

[a] Acid Insoluble Lignin. [b] Acid Soluble Lignin. [c] AIL + ASL. [d] AIL + ASL + Ash Content

levels and about ten percent higher than OL ones. According to results, OL shows a lower amount of acid insoluble lignins (AIL) than KL-1 and KL-2. On the other hand, acid insoluble lignins (ASL) are more important in organosolv sample than in Kraft lignins. KL-2 exhibits a very low level of inorganics (0.38%, w/w) whereas a low level (2.53 and 1.65%, w/w) were determined respectively for KL-1 and OL. These results being in line with those described in the literature for each kind of extracted lignin.^[16a,20] These analyses consequently reveal that OL sample contains a higher non-lignin organic fractions than in both KL-1 and KL-2. Here, the extraction method used is probably responsible for this difference.

The weight-average (M_w), number-average (M_n) molecular weights, and polydispersity indexes (PDI, M_w/M_n) of previously acetylated KL-1, KL-2 and OL lignins were measured by gel permeation chromatography (GPC) and calculated from the GPC curves (relative values related to polystyrene).^[21] AcOL has a M_n of 3900 g mol⁻¹ and a M_w of 7700 g mol⁻¹ (PDI=1.5) which is rather close to the value described by Constant et al. (2015).^[17b] The M_n of AcKL-1 (4300 g mol⁻¹) is comparable to that of AcKL-2 (4200 g mol⁻¹). AcKL-1 has a M_w and PDI of 9900 g mol⁻¹ and 2.3 respectively, which is lower than AcKL-1 ($M_w=13\,100$ g mol⁻¹, and PDI=3.1). These values are quite high but close^[22] and upper values^[21a] have already been reported in the literature on acetylated Kraft softwood lignins.

Fourier transform infrared (FT-IR) spectra of OL, AcOL, KL-1, AcKL-1, KL-2 and AcKL-2 were also recorded (Figure 1) in order

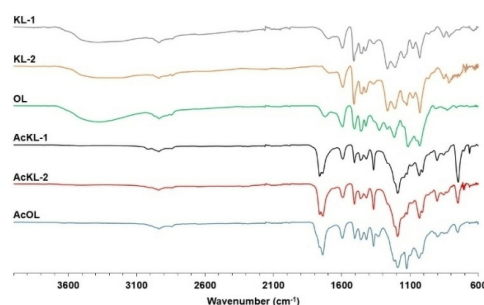


Figure 1. FT-IR spectra of lignins before and after acetylation.

to further characterize these materials and to monitor their acetylation. As expected, OL, like KL-1 and KL-2 lignins, present typical lignin bands that are characteristic of O-H bond stretching ($3650\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$), of C-H bond stretching ($3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$), of aromatic skeleton vibrations (1592 , 1508 , 1460 and 1420 cm^{-1}) and of guaiacyl ring breathing (1266 cm^{-1}).^[23] Unambiguous evidence of acetylation appears in the spectra of AcOL, AcKL-1 and AcKL-2 with new major bands at 1761 , 1739 and 1190 cm^{-1} which correspond respectively to C=O aromatic ester bond stretching, C=O aliphatic ester bond stretching and C-O ester bond bending.^[24] Moreover, the disappearance of the O-H stretching band on the spectra of modified lignins was observed, evidencing the esterification of hydroxyl groups in lignins.

Aliphatic and phenolic alcohol groups were quantified on starting and acetylated lignins by quantitative ^{31}P NMR analysis after phosphitylation with 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane (TMDP) according to the method described by Granata and Argyropoulos.^[25] As shown in Figure 2,

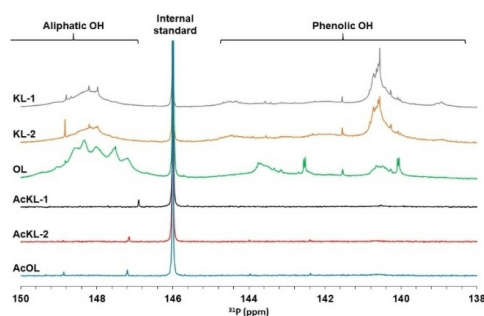


Figure 2. Quantitative ^{31}P NMR spectra of TMDP-derivatized lignins before and after acetylation with signal assignments.

unmodified Kraft and organosolv lignin's spectra exhibit typical signals of phosphitylated aliphatic and phenolic alcohols. Both KL-1 and KL-2 have a higher phenolic hydroxyl content (respectively 3.65 and 3.20 mmol g^{-1}) and a lower aliphatic hydroxyl content (respectively 1.93 and 1.22 mmol g^{-1}) than OL which exhibit 1.83 mmol g^{-1} of phenolic alcohols and 2.61 mmol g^{-1} of aliphatic alcohols. On AcKL-1, AcKL-2 and AcOL spectra no corresponding signals were observed. These results, already described in the literature^[26] confirm that all the alcohol groups originally present on OL, KL-1 and KL-2 have been acetylated. This result is consistent with the amount of acetic anhydride used (24 equiv.). Indeed it is much higher than the minimum amount needed to fully acetylate lignins as recently described by Buono et al.^[26b]

The ability of KL-1, KL-2, OL, AcKL-1, AcKL-2 and AcOL lignins to produce ROS was then investigated under dark and light exposure. Indeed, under light irradiation, so-called photosensitizer compounds might undergo either a photoinduced

electron transfer (Type I process) implying surrounding molecular oxygen or other substrate species, generating radicals such as the superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), or energy transfer to dioxygen (Type II process), producing singlet oxygen ($^1\text{O}_2$).^[14a] To detect $\text{O}_2^{\cdot-}$ (type I process) and $^1\text{O}_2$ (type II process), electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used. But, as the non-radical nature of singlet oxygen and small lifetime of both ROS studied prevented their direct observation, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (TEMPO) and 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) were used as specific scavengers of $^1\text{O}_2$ (giving TEMPO) and $\text{O}_2^{\cdot-}$ (giving DMPO-OOH), respectively. The production of TEMPO and DMPO-OOH can then be monitored by EPR over time. The influence of acetylation and light irradiation on ROS production of the different lignins' sources was investigated. Results are summarized in Figure 3.

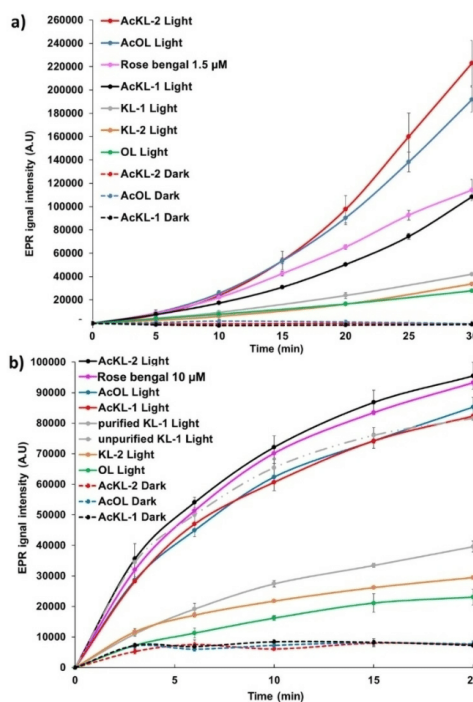


Figure 3. a) EPR signal of TEMPO generation under and without light irradiation for KL-1, KL-2, OL, AcKL-1, AcKL-2, AcOL and Rose bengal. b) EPR signal of DMPO-OOH generation under and without light irradiation for KL-1, KL-2, OL, AcKL-1, AcKL-2, AcOL and Rose bengal.

Concerning the production of $^1\text{O}_2$ (Figure 3a), under dark conditions, no EPR signal was detected neither for KL-1, KL-2 and OL nor for AcKL-1, AcKL-2 and AcOL, which is not surprising as the formation of singlet oxygen can only be

photoinduced. According to previous studies, lignins KL-1, KL-2 and OL are able to undergo a type II mechanism and thus generate singlet oxygen under light exposure.^[27] More surprisingly, and even if a signal was also observed for starting lignin, an important increase in singlet oxygen production was recorded in the case of acetylated analogues. Indeed, this production is ten times higher for AcKL-2 and AcOL and five times higher for AcKL-1 than the one obtained for KL-1, KL-2 or OL. Acetylation thus appears to have a key role here. Indeed, lignins are known to possess antioxidant activity, especially thanks to their phenol groups. KL-1, KL-2 and OL are therefore capable to trap a large part of the singlet oxygen formed, thus preventing its detection by EPR. On the other hand, as AcKL-1, AcKL-2 and AcOL have their phenolic functions blocked by the acetyl groups, $^1\text{O}_2$ can diffuse without hindrance into the environment. These observations are in accordance with those previously made by Barclay et al.^[28] and Fischer et al.^[27b,29] Indeed, these authors have shown that 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1-propanone, a molecular model of lignins with methylated phenolic functions, is able to generate singlet oxygen under light irradiation. The singlet oxygen production of acetylated lignins was compared with that obtained in the presence of Rose bengal which is a well-described photosensitizer.^[30]

As shown on Figure 3a, the acetylated lignins produce a quantity of singlet oxygen similar to a Rose bengal solution at 1.5 μM . For the sake of comparison, this result makes the acetylated lignins suitable for Antimicrobial PhotoDynamic Treatment (APDT) applications as other well-known photosensitizers,^[14a,31] in addition to Rose bengal, such as porphyrin derivatives or methylene blue.

In order to get further insight, the capacity of acetylated lignins to produce ROS, the direct observation of $^1\text{O}_2$ luminescence was also monitored for AcOL (as well as UV-Visible absorption and emission for this compound, see ESI). This allowed to determine the quantum yield of singlet oxygen emission (Φ_{Δ}) at 1270 nm due to $^1\text{O}_2$ formation upon acetylated lignins excitation to be $\Phi_{\Delta} = 0.17 \pm 0.03$ in DMF ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm). Zinc phthalocyanine (ZnPC) in DMF was used as a reference ($\Phi_{\Delta} = 0.55$ in DMF).^[32] Upon excitation at 603 or 669 nm however, no singlet oxygen emission was observed (see ESI).

Concerning the production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figure 3b), i.e. the capacity of lignins to undergo a photoinduced radical process, an increase in signal was observed for all compounds under light irradiation. This is not a surprising result as free radical formation during the photodegradation of lignin-based material is already well described in the literature.^[1,3b] More specifically, Humar et al.^[33] have shown, thanks to EPR, that hydroxy and hydroperoxide anions, species that can be formed from superoxide anion, are generated when lignins are exposed under light irradiation. Whatever, it should be noted that the superoxide anion radical production is three times higher in the case of acetylated lignins than in the case of the starting ones, except for AcKL-1 / KL-1. Indeed, in this case, the initial lignin shows a signal as high as the acetylated one. To rule out that this behavior could be due to impurities from the industrial

extraction process, this compound was purified. Then the production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ was monitored once again. The EPR signal intensity was then comparable to that of the other non-acetylated lignins (KL-2 and OL), evidencing that the previous production was partly due to a pollution of the material. As shown on the Figure 3b, this production of superoxide anion by acetylated lignins is comparative to a 10 μM solution of Rose bengal. Here, like for singlet oxygen, the acetylation of lignins' antioxidant functions prevents the trapping of radical species and so seems to greatly facilitate the diffusion of $\text{O}_2^{\cdot-}$ in the surrounding environment. Moreover, for non-acetylated lignins, without light irradiation, no EPR signal corresponding to superoxide anion was detected whereas low EPR signals are detected for AcKL-1, AcKL-2 and AcOL. This supports the theory that the formation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ seems here mostly photoinduced. Indeed, under dark conditions, stable organic radicals persist in lignins^[11] and so are able to lead to a low amount of $\text{O}_2^{\cdot-}$ production/detection. In the case of initial lignins, KL-1, KL-2, and OL, these radicals are probably trapped by reaction with phenolic groups, which explains the absence of $\text{O}_2^{\cdot-}$ EPR signal. But, for AcKL-1, AcKL-2 and AcOL this radical quenching path is no longer possible, explaining the dark signal recorded.

In conclusion, blocking the antioxidant functions of lignins by acetylation greatly increases the amount of ROS that they will be able to release under light irradiation. Given the results, this property seems to be very little impacted by the lignins' origin and/or their extraction process. Indeed AcKL-2 and AcOL, which were obtained from a different biological origin and a different extraction method, have a very similar singlet oxygen production. However, AcKL-1 exhibits a lower singlet oxygen production. Concerning the superoxide anion production, all acetylated lignins (AcKL-1, AcKL-2 and AcOL) have very similar behavior. Acetylated lignins therefore appear as a potential photosensitizer, which opens the scope of their use in many areas such as, for instance, the eradication of harmful microorganisms. It represents a breakthrough in photodynamic treatment domains. Indeed, as it could be used alone in organic media or, thanks to its capacity to form nanoparticles,^[22b] in aqueous ones. Moreover, as for lignin-based nanospheres,^[34] these nanoparticles should be able to encapsulate active compounds. Covalent bonds through further chemical modifications can also be envisaged.

Supporting Information Summary

More information on the origin, acetylation and characterization of lignins are given in the supporting information. Details on the EPR analyses and the determination of quantum yield of singlet oxygen are also provided.

Acknowledgements

We thank the "Conseil Régional du Limousin" and European Union for their financial support. Indeed, this work is a part of the ITN-EJD-2017 project POLYTHEA which has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement

n°764837. The authors are indebted to Dr. Yves Champavier for NMR analysis. The authors gratefully acknowledge Pr Daniel Montplaisir for lignins donation and Dr. Yves Champavier for NMR analysis.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: Acetylated lignins · EPR spectroscopy · Photosensitizer · Singlet oxygen · Superoxide anion

- [1] a) G. W. Huber, S. Iborra, A. Corma, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4044–4098; b) G. W. Huber, A. Corma, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7184–7201.
- [2] a) J. S. Luterbacher, D. M. Alonso, J. A. Dumesic, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4816–4838; b) F. H. Isikgor, C. R. Becer, *Polymer Chemistry* **2015**, *6*, 4497–4559; c) D. M. Alonso, S. G. Wettstein, J. A. Dumesic, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 8075–8098.
- [3] a) R. J. A. Gosselink, E. de Jong, B. Guran, A. Abächerli, *Ind. Crop. Prod.* **2004**, *20*, 121–129; b) F. G. Calvo-Flores, J. A. Dobado, *ChemSusChem* **2010**, *3*, 1227–1235.
- [4] a) S. Salentinig, M. Schubert, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 2649–2653; b) J. Zakzeski, P. C. A. Bruijninx, A. L. Jongerius, B. M. Weckhuysen, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3552–3599; c) T. Aro, P. Fatehi, *ChemSusChem* **2017**, *10*, 1861–1877.
- [5] a) A. Naseem, S. Tabasum, K. M. Zia, M. Zuber, M. Ali, A. Noreen, *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 296–313; b) A. Duval, M. Lawoko, *React. Funct. Polym.* **2014**, *85*, 78–96.
- [6] a) C. Wang, S. S. Kelley, R. A. Venditti, *ChemSusChem* **2016**, *9*, 770–783; b) S. Sen, S. Patil, D. S. Argyropoulos, *Green Chem.* **2015**, *17*, 4862–4887; c) D. Kai, M. J. Tan, P. L. Chee, Y. K. Chua, Y. L. Yap, X. J. Loh, *Green Chem.* **2016**, *18*, 1175–1200; d) S. Laurichesse, L. Avérous, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1266–1290.
- [7] a) H. Jeong, J. Park, S. Kim, J. Lee, N. Ahn, H.-g. Roh, *Fibers Polym* **2013**, *14*, 1082–1093; b) H. Jeong, J. Park, S. Kim, J. Lee, J. W. Cho, *Fibers Polym* **2012**, *13*, 1310–1318; c) O. Gordobil, R. Delucis, I. Egués, J. Labidi, *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *72*, 46–53; d) C. Vila, V. Santos, B. Saake, J. C. Parajó, *BioResources* **2016**, *11*, 5322–5332; e) Y. Teramoto, S.-H. Lee, T. Endo, *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* **2009**, *41*, 219; f) Y. Teramoto, S.-H. Lee, T. Endo, *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *125*, 2063–2070; g) O. Gordobil, I. Egués, R. Llano-Ponte, J. Labidi, *Polym. Degrad. Stab.* **2014**, *108*, 330–338.
- [8] G. Brunow, in *Biopolymers Online*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2005**.
- [9] a) S. C. Fox, A. G. McDonald, *BioResources* **2010**, *5*, 990–1009; b) J. Sameni, S. Krigstin, M. Sain, *BioResources* **2017**, *12*, 1548–1565; c) H. F. Lewis, F. E. Brauns, US Patent 2,429,102, **1947**.
- [10] a) R. Kaur, S. K. Uppal, P. Sharma, *Sugar Tech* **2017**, *19*, 675–680; b) G. L. Catignani, M. E. Carter, *J. Food Sci.* **1982**, *47*, 1745–1745; c) J. L. Espinoza-Acosta, P. I. Torres-Chávez, B. Ramírez-Wong, C. M. López-Saiz, B. Montaño-Leyva, *BioResources* **2016**, *11*, 5452–5481.
- [11] S. V. Patil, D. S. Argyropoulos, *ChemSusChem* **2017**, *10*, 3284–3303.
- [12] a) P. L. D. Peill, *Nature* **1946**, *158*, 554; b) H. J. Callow, *Nature* **1947**, *159*, 309; c) G. Leary, *Nature* **1968**, *217*, 672–673.
- [13] a) M. Paulsson, J. Parkäs, *BioResources* **2012**, *7*, 5995–6040; b) S. Grelrier, A. Castellán, D. P. Kamdem, *Wood Fiber Sci.* **2000**, *32*, 196–202; c) M. Paulson, R. Simonson, in *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin* (Ed.: T. Q. Hu), Springer-Verlag, New York, USA, **2002**, pp. 221–243.
- [14] a) C. Riou, C. A. Calliste, A. D. Silva, D. Guillaumot, O. Rezagui, V. Sol, S. Leroy-Lhez, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 621–625; b) A. Jiblaoui, J. Brevier, G. Ducourthial, H. González-Núñez, C. Baudequin, V. Sol, S. Leroy-Lhez, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 2428–2434; c) A. Jiblaoui, S. Leroy-Lhez, T.-S. Ouk, K. Grenier, V. Sol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 355–362.
- [15] a) C. Klein-Koerkamp, R. Granet, R. Zerrouki, N. Villandier, F. Jérôme, J. Barrault, P. Krausz, *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 938–944; b) C. Martias, N. Villandier, E. Thune, A. Glomot, V. Gloaguen, A. Smith, *Appl. Clay Sci.* **2015**, *114*, 609–616; c) N. Villandier, A. Corma, *ChemSusChem* **2011**, *4*, 508–513.
- [16] a) W. Zhu, G. Westman, H. Theliander, *J. Wood Chem. Technol.* **2014**, *34*, 77–97; b) M. Nagy, M. Kosa, H. Theliander, A. J. Ragauskas, *Green Chem.* **2010**, *12*, 31–34.
- [17] a) X. Pan, N. Gilkes, J. Kadla, K. Pye, S. Saka, D. Gregg, K. Ehara, D. Xie, D. Lam, J. Saddler, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *94*, 851–861; b) S. Constant, C. Basset, C. Dumas, F. Di Renzo, M. Robitzer, A. Barakat, F. Quignard, *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *65*, 180–189.
- [18] K. Lundquist, in *Methods in Lignin Chemistry* (Eds.: S. Y. Lin, C. W. Dence), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, **1992**, pp. 242–249.
- [19] H. D. S. Abreu, M. D. F. I. Freire, *An. Bras. Ci.* **1995**, *67*, 379–382.
- [20] N.-E. E. Mansouri, J. Salvadó, *Ind. Crop. Prod.* **2006**, *24*, 8–16.
- [21] a) F. Kong, S. Wang, J. T. Price, M. K. R. Konduri, P. Fatehi, *Green Chem.* **2015**, *17*, 4355–4366; b) S. Baumberger, A. Abaecherli, M. Fasching, G. Gellerstedt, R. Gosselink, B. Hortling, J. Li, B. Saake, E. de Jong, *Holzforchung* **2007**, *61*, 459–468.
- [22] a) A. Tejado, C. Peña, J. Labidi, J. M. Echeverria, I. Mondragon, *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 1655–1663; b) Y. Qian, Y. Deng, X. Qiu, H. Li, D. Yang, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2156–2163.
- [23] F. G. Calvo-Flores, J. A. Dobado, J. I. García, F. J. Martín-Martínez *Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials: Chemistry, Technology and Applications*, Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK, **2015**.
- [24] L. Dehne, C. Vila Babarro, B. Saake, K. U. Schwarz, *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *86*, 320–328.
- [25] A. Granata, D. S. Argyropoulos, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1538–1544.
- [26] a) F. Monteil-Rivera, L. Paquet, *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *65*, 446–453; b) P. Buono, A. Duval, P. Verge, L. Averous, Y. Habibi, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4*, 5212–5222.
- [27] a) L. R. Barclay, M. C. Basque, M. R. Vinqvist, *Can. J. Chem.* **2003**, *81*, 457–467; b) K. Fischer, M. Beyer, *Lenzinger Ber.* **2000**, *79*, 25–31.
- [28] L. R. C. Barclay, J. K. Grandy, H. D. MacKinnon, H. C. Nichol, M. R. Vinqvist, *Can. J. Chem.* **1998**, *76*, 1805–1816.
- [29] K. Fischer, M. Beyer, H. Koch, *Holzforchung* **2009**, *49*, 203–210.
- [30] a) D. C. Neckers, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1989**, *47*, 1–29; b) T. Theodossiou, J. S. Hotherhall, E. A. Woods, K. Okkenhaug, J. Jacobson, A. J. MacRobert, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1818–1821.
- [31] a) S. Mathai, T. A. Smith, K. P. Ghiggino, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 995–1002; b) A. Ormond, H. Freeman, *Materials* **2013**, *6*, 817; c) J. C. Gonzales, G. T. P. Brancini, G. B. Rodrigues, G. J. Silva-Junior, L. Bachmann, M. Wainwright, G. Ú. L. Braga, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *176*, 54–61.
- [32] W. Spiller, H. Kliesch, D. Wöhrle, S. Hackbarth, B. Röder, G. Schnurpfeil, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1998**, *02*, 145–158.
- [33] M. Humar, M. Sentjurc, M. Petrič, *Drvna Industrija* **2002**, *53*, 197–202.
- [34] a) M. Tortora, F. Cavalieri, P. Mosesso, F. Ciuffardini, F. Melone, C. Crestini, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1634–1643; b) P. Figueiredo, K. Lintinen, A. Kiriazis, V. Hynninen, Z. Liu, T. Bauleth-Ramos, A. Rahikkala, A. Correia, T. Kohout, B. Sarmento, J. Yli-Kauhaluoma, J. Hirvonen, O. Ikkala, M. A. Kostianen, H. A. Santos, *Biomaterials* **2017**, *121*, 97–108.

Submitted: April 9, 2018

Revised: May 9, 2018

Accepted: May 13, 2018

La surexploitation des ressources de la planète est aujourd'hui une problématique de premier ordre, et fait du remplacement des sources non renouvelables, d'énergie et de matières premières, l'un des défis majeurs du XXI^e siècle. Dans cet objectif, les lignines, par leur disponibilité et leur biocompatibilité, apparaissent comme l'une des alternatives aux ressources fossiles. C'est dans ce contexte que le Laboratoire PEIRENE a décidé de mener ce travail de thèse portant sur le développement de nouveaux matériaux photosensibles à base de lignines modifiées. Dans ce but, trois lignines d'origines différentes ont été acétylées. Leur étude par spectroscopie RPE a révélé que le blocage de leurs fonctions antioxydantes augmente considérablement la quantité d'espèces réactives de l'oxygène qu'elles sont capables de générer sous irradiation lumineuse, permettant ainsi d'envisager l'utilisation de ce biopolymère modifié dans de nombreux domaines tels que le traitement photodynamique antimicrobien. Afin de les rendre hydrodispersibles et d'élargir ainsi leur champ d'applications, ces matériaux aux propriétés prometteuses ont été mis sous forme de nanoparticules puis, leur comportement photosensible a été lui aussi évalué par spectroscopie RPE. Il a ainsi été démontré qu'une fois dispersées dans l'eau sous la forme de nanoparticules, les lignines acétylées étaient toujours capables de produire de l'oxygène singulet sous irradiation lumineuse. Cette activité, qui n'a pas encore été reportée dans la littérature à notre connaissance, reste cependant assez restreinte et nécessite donc d'être améliorée. Afin d'élargir le domaine du spectre solaire permettant leur activation, un photosensibilisateur a par ailleurs été associé à ces nano-objets par encapsulation et par greffage covalent. L'ensemble des résultats découlant de ces travaux permettent d'envisager le développement de systèmes à base de nanoparticules de lignines acétylées dans de nombreux domaines, notamment pharmaceutique et phytosanitaire.

Mots-clés : Lignines acétylées, Nanoparticules, Photosensibilisateur, Oxygène singulet, Anion superoxyde Spectroscopie RPE

The overexploitation of the planet's resources is nowadays a major problem and makes the replacement of non-renewable sources of energy and raw materials, one of the major challenges of the XXI^e century. For this purpose, lignins, by their availability and their biocompatibility, appear as one of the alternatives to fossil resources. In this context, the PEIRENE Laboratory decided to carry out this PhD work on the development of new photosensitive materials based on modified lignins. For this purpose, three lignins from different origin were acetylated. Their study by EPR spectroscopy revealed that blocking their antioxidant functions considerably increases the quantity of reactive oxygen species they are able to generate under light irradiation. Thus it is possible to envisage the use of this modified biopolymer in many areas such as antimicrobial photodynamic therapy. In order to make them water-dispersible and thus to widen their field of applications, these materials with promising properties were put in the form of nanoparticles. Their photosensitive behavior has been also valuated by EPR spectroscopy. It has been demonstrated that once dispersed in water in the form of nanoparticles, the acetylated lignins were still capable of producing singlet oxygen under light irradiation. This activity, which has not yet been reported in the literature to our knowledge, however, remains quite limited and therefore needs to be improved. In order to widen the range of the solar spectrum allowing their activation, a photosensitizer has also been associated with these nano-objects by encapsulation and covalent grafting. The results of these studies make possible to envisage the development of systems based on acetylated lignins nanoparticles in in many field, in particular pharmaceutical and phytosanitary.

Keywords : Acetylated lignins, Nanoparticles, Photosensitizer, Singlet oxygen, Superoxide anion, EPR spectroscopy