

Oligomérisation enzymatique d'alcools p-hydroxycinnamiques : production de synthons et additifs pour la chimie des polymères

Abdus Samad Jaufurally

▶ To cite this version:

Abdus Samad Jaufurally. Oligomérisation enzymatique d'alcools p-hydroxycinnamiques : production de synthons et additifs pour la chimie des polymères. Polymères. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2016. Français. NNT: 2016IAVF0013 . tel-02196676

HAL Id: tel-02196676 https://theses.hal.science/tel-02196676

Submitted on 29 Jul 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.





THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Sciences végétales

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Abdus Samad JAUFURALLY

Oligomérisation enzymatique d'alcools *p*hydroxycinnamiques : production de synthons et additifs pour la chimie des polymères

Co-directeurs de thèse : Florent ALLAIS et Paul-Henri DUCROT

Thèse présentée et soutenue à la Chaire Agro Biotechnologies Industrielles à Pomacle, le 12 décembre 2016 :

Composition du jury :
M. Olivier DANGLES, Professeur, Université d'Avignon
Mme. Marie-Christine SCHERRMANN, Professeur, Université Paris Sud
M. Stéphane GRELIER, Professeur, Université de Bordeaux
M. Stéphane QUIDEAU, Professeur, Université de Bordeaux
M. Bernard CATHALA, Directeur de recherche, INRA/CNRS
M. Florent ALLAIS, Professeur, Chaire ABI-AgroParisTech
M. Paul-Henri DUCROT, Directeur de recherche, INRA/AgroParisTech

Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur de thèse Directeur de thèse

Chaire Agro Biotechnologies Industrielles (ABI) - AgroParistech 3 rue des Rouges Terres, Route de Bazancourt, 51110 Pomacle

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier mes deux directeurs de thèse, Florent Allais et Paul-Henri Ducrot, pour m'avoir confié ce travail de recherches, ainsi que pour leur disponibilité, leurs investissements et leurs conseils au cours de ces trois années de thèse. Je les remercie pour leur confiance et de m'avoir donné l'opportunité de participer à de prestigieux congrès nationaux et internationaux. Je tiens aussi à les remercier pour la correction de ce manuscrit, les discussions et leurs remarques constructives.

Mes remerciements vont aux Professeurs Marie-Christine Sherrmann et Stéphane Grelier pour avoir accepté de juger mon travail de doctorat en tant que rapporteurs. Je remercie les Professeurs Olivier Dangles, Stéphane Quideau et Docteur Bernard Cathala d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'adresse également mes remerciements à tous les membres de mon comité de thèse pour avoir apporté un avis extérieur et leur regard critique qui m'a permis de prendre du recul sur mon travail.

Je tiens à remercier Andreia Teixeira, membre du comité de thèse mais aussi collègue de travail, de m'avoir aidé pour la partie plan d'expérience et pour ces conseils tout le long de ma thèse.

Je tiens à remercier Armando Reano, camarade de classe depuis la L2 et collègue en thèse, de m'avoir facilité la tâche à mon arrivée à Reims. Surnommé « chef » des doctorants par ses ouailles, il a su me donner des idées (S dans G, G dans S) dans les moments flous de la thèse. Juste pour ça, je pense que tu mérites la chaise dans la salle de RMN...

Je tiens à remercier Louis Hollande, mon premier stagiaire et membre de la « team syringa », pour sa rigueur et son autonomie lors de son stage sur la polymérisation ADMET. Il a su être à l'écoute et a été force de proposition et de persévérance quand il le fallait. Je le remercie grandement d'avoir tout donné pour tenter d'envoyer « la molécule du futur » dans l'espace. Maintenant thésard en première année à la Allais school, je lui souhaite le meilleur pour la suite de sa thèse.

Je remercie également Yixian Chen, mon deuxième et dernier stagiaire, pour son travail sur la polymérisation thiol-ène. Malgré qu'il ait parfumé le labo avec les thiols, il s'est vite adapté à la langue française et aux membres de l'équipe. Un grand merci à Marine Janvier, postdoctorante à la chaire et membre de la « team syringa », pour avoir apporté son soutien pour le co-encadrement du stage de Chen, notamment pour la correction du rapport et la préparation de la soutenance. Je la remercie aussi pour les résultats sur les résines époxy. Je remercie Patrick Balaguer et Marina Grimaldi pour la réalisation des tests d'activité ostrogénique du syringarésinol. Une pensée pour les collègues de l'INRA (Amel, Betty et Oulame) pour leur accueil lors de mes quelques déplacements pour les manips à Versailles.

Merci au département de microbiologie, à commencer par Mathilde Leriche pour ses conseils et explications sur la méthode Folin, Julien Couvreur pour les problèmes de dilutions et Thiphaine Clément pour ses remarques fructueuses lors des réunions. Je remercie Fanny Brunissen pour les analyses faites en GC-MS et les bonbons gratuits dans son bureau, puis Gaëlle Willig pour son sourire. Je remercie également Amandine Flourat et Aurélien Péru (le bricoleur), tous les deux membres du département chimie, pour leur organisation et la bonne tenue du laboratoire. Mes remerciements vont aussi à tous les autres permanents, doctorants, post-doctorants et stagiaires pour l'ambiance au quotidien dans le laboratoire.

Pour finir, un grand merci à toute ma famille en France qui m'a hébergé, soutenu et aidé tout le long de mon parcours universitaire. C'est en partie grâce à eux que je suis arrivé jusque là. Je remercie aussi mon frère pour son aide au quotidien et ses talents culinaires surtout lors des soirées de rédaction de ce manuscrit. Je dédicace ensuite cette thèse à mon oncle qui est décédé lors de la première année de mon doctorat, je pense qu'il serait fier de moi aujourd'hui. Finalement, je tiens à remercier ma famille à l'Ile Maurice, ma mère, mon père et ma sœur, d'être là (malgré la distance) pour me soutenir et tout mon entourage qui a pu participer indirectement à cette réussite.

Merci encore...

Table des matières

Remer	ciements2
Abrévi	ations
Introdu	uction générale 10
Chapit	re 1 : Etat de l'art 14
1. I	ntroduction15
2. L	.es antioxydants15
2.1.	Les antioxydants de synthèse17
2.2.	Les antioxydants naturels
2.3.	Méthode de détermination du pouvoir antioxydant/antiradicalaire
3. L	.es polymères23
3.1.	Les différents modes de polymérisation
3.2.	Polyoléfines
3.3.	Résines époxy
3.4.	Les (poly)phénols végétaux 40
4. L	es lignines : potentielle source de synthons aromatiques pour la chimie42
4.1.	Biosynthèse des lignines
4.2.	Méthode de caractérisation des lignines50
4.3.	Les lignines de synthèse (DHP)53
5. F	Références bibliographiques
Chapit	re 2 : Etude de la polymérisation in vitro des monolignols G et S 69
. I	ntroduction
2. L	Demarche71
3. F	Résultats et discussion74
1.	Etude de l'effet du mode d'ajout et de la température sur la polymérisation des monolignol G
et S	3
2.	Etude de l'effet des liquides ioniques sur la polymérisation
3.	Quantification des phénols libres par Folin-Ciocalteau90
4.	Etude cinétique de la consommation des substrats en présence de la laccase de Trametes
ver	sicolor
4. C	Conclusion

5.	Par	tie expérimentale	105
1	. S	ynthèse de férulate d'éthyle	105
2	2. S	ynthèse de l'alcool coniférylique	105
З	s. S	ynthèse de l'acide sinapique	106
4	. S	ynthèse de sinapate d'éthyle	107
5	i. S	ynthèse de l'alcool sinapylique	107
6	5. S	ynthèse du dimère β -5	108
7	. s	ynthèse du dimère β -5 hydrogéné	109
8	8. S	ynthèse du dimère 5-5 de l'alcool coniférylique	109
g). F	rocédure générale de synthèse des DHP	112
1	0.	Quantification des phénols libres par Folin-Ciocalteu	113
1	1.	Mesure de l'activité de la laccase de Trametes versicolor	114
6.	Réf	érences bibliographiques	116
<u> </u>	- :	2. Ontimination de la comthèse comunations du cominancerácio	-1 -4
Cnap	oitre	3: Optimisation de la synthèse enzymatique du syringaresine	oi et
étud	e de	ses propriétés thermiques et biologiques	. 118
Intro	duc	tion du chapitre	. 119
			420
Réfé	rend	es bibliographiques	120
Réfé Opti	reno miza	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol	and
Réfé Optil Stud	renc miza Iv of	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol	and 121
Réfé Optil Stud	miza ly of	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol	and 121
Réfé Optil Stud 1.	miza Iy of Inti	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities	and . 121 . 122
Réfé Optil Stud 1. 2.	rend miza ly of Inti Res	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities oduction sults and Discussion	and . 121 122 125
Réfé Optin Stud 1. 2. 3.	rend miza ly of Inti Res Col	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities oduction sults and Discussion	and 121 122 125 133
Réfé Optin Stua 1. 2. 3. 4.	rrend miza ly of Inti Res Col Exj	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities roduction sults and Discussion nclusions	and . 121 122 125 133 134
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4.	rrend miza ly of Inti Re: Col Exp	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities roduction sults and Discussion nclusions perimental Section	and . 121 122 125 133 134 135
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2	rend miza ly of Inti Res Col Exp	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities	and .121 122 125 133 134 135 135
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2. 3.	Inti Res Col Exp . E S. S	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities roduction sults and Discussion nclusions berimental Section	and .121 122 125 133 134 135 135 135 135
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2 3. 4.	Inti Res Col Exp San S San S	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities	and .121 122 125 133 135 135 135 135 135 135
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2. 3. 4. 5.	Inti Res Col Exp S S S Acl	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities	and .121 122 125 133 135 135 135 135 136 136
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2. 3. 4. 5.	Inti Re: Col Exp . E . S . S . S . S . S . S . S . S . S . S	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities roduction sults and Discussion nclusions	and .121 122 125 133 135 135 135 136 136 136
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2. 3. 4. 5. 6.	Inti Re: Col Exp Exp S S S Acl Acl	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities	and .121 122 125 133 135 135 135 136 136 141 141
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2. 3. 4. 5. 6. 7.	Inti Res Col Exp Exp S S Acl Acl Acl	tion of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol its Thermal and Antiradical Activities roduction	and .121 122 122 125 133 135 135 135 135 136 141 141 143
Réfé Optin Stud 1. 2. 3. 4. 1 2. 3. 4. 5. 6. 7. Chap	Inti Res Col Exi S S Aci Aci Réf Ditre	<pre>ses bibliographiques</pre>	and 121 122 122 125 133 135 136

ADN	IET polymerization of biobased monomers deriving from syringa	resinol 148
1.	Introduction	149
2.	Experimental	150
3.	Results and discussion	154
1	Conclusions	160
4.		160
5.	Références bibliographiques	161
Cha	pitre 5 : Polymérisation par réaction thiol-ène de monomères	issus du
syriı	ngarésinol	164
1.	Introduction	165
2.	Démarche	166
3.	Résultats et discussions	167
1	. Polymérisation thiol-ène par voir thermique	
2	Polymérisation thiol-ène par voie photochimique	170
3	B. Analyse de la structure de polymère via RMN	174
2	Caractérisations thermiques des polymères: ATG et DSC	175
4.	Conclusion	176
5.	Partie expérimentale	177
1	. Synthèse des monomères α, ω -diènes	177
2	Procédés de polymérisation	177
6.	Références bibliographiques	178
Cha	pitre 6 : Le syringarésinol : une alternative renouvelable au bi	sphénol A
pour	la synthèse des résines époxy-amines	180
1.	Introduction	181
2.	Démarche	182
3.	Résultats et discussions	182
1	. Synthèse du Bis-époxy-O-syringarésinol (SYR-Epo)	182
2	2. Synthèse des monomères bifonctionnels issus du syringarésinol	188
3.	Conclusion	192
4.	Partie expérimentale	194
1	-	
	. Synthèse du Bis-époxy-O-syringarésinol (SYR- <i>Epo</i>)	

3	Synthèse du Bis-méthacrylate-O-syringarésinol (SYR-Méthacrylate) 1	96
2	. Synthèse du Bis-cyclocarbonate-O-syringarésinol (SYR-Cyclo) 1	97
5.	Références bibliographiques1	98
Con	clusion générale et perspectives20	01
Productions scientifiques		05
1.	Publications20	05
2.	Communications orales20	05
3.	Communications par affiches2	05

Abréviations

- ABTS: 2,2'-Azino-Bis(acide 3-éthylbenzoThiozoline-6-Sulphonique)
- AcOEt : Acétate d'éthyle
- ADMET : Acyclic Diene METathesis : Métathèse de diènes acycliques
- AIBN : Azobisisobutyronitrile
- ATG : Analyse thermogravimétrique
- BPA : Bisphénol A
- CAL-B : Candida antarctica Lipase B : Lipase B de Candida antarctica
- CCM : Chromatographie sur couche mince
- Cyclo: Cyclohexane
- DCM : Dichlorométhane
- DGEBA : DiGlycidyl Ether de Bisphénol A
- DHP : DeHydrogenative Polymers : Polymères déhydrogénés
- DIBALH : Diisobutylaluminium hydride : Hydrure de diisobutylaluminium
- DMA : Dynamic Mechanical Analysis : Analyse mécanique dynamique
- DMF : DiMéthylFormamide
- DMPA : 2,2-Diméthoxy-2-phénylacétophénone
- DMSO : Diméthylesulfoxyde
- DP : Degré de polymérisation

DSC : Differential Scanning Calorimetry : Calorimétrie différentielle à balayage

GC-MS : *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* : Chromatographie phase gazeuse – spectrométrie de masse

GPC : Gel Permeation Chromatography : Chromatographie à permeation de gel

HG-II : Hoveyda Grubbs II

HPLC : *High Performance Liquide Chromatography* : Chromatographie liquide à haute performance

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry : Spectrométrie de masse à haute résolution

HRP : HorseRadish Peroxidase : Peroxydase de raifort

- Ip : Indice de polydispersité
- IR : Infrarouge
- IRCM : Institut de Recherche de Cancérologie de Montpellier
- LI : Liquide Ionique
- LTv : Laccase from Trametes versicolor : Laccase de Trametes versicolor
- Mn : Masse molaire moyenne en nombre
- Mw : Masse molaire moyenne en poids
- NIPU : Nonlsocyanate PolyUrethane : Polyuréthane non-isocyanate
- Pd/C : Palladium supporté sur charbon
- REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- T.A : Température ambiante
- *T_d* : Température de dégradation
- TEBAC : TriEthylBenzyl-Ammonium Chloride : Chlorure d'ammonium de triethylbenzyl
- T_f: Température de fusion
- T_g : Température de transition vitreuse
- URCA : Université de Reims Champagne Ardennes
- UV : Ultraviolet

Introduction générale

Un des plus grands problèmes auquel le monde fait face aujourd'hui est la croissance rapide et continue de la population terrestre alors que les ressources de la planète sont limitées. La technologie a largement contribué à maintenir en équilibre l'économie mondiale malgré une augmentation de la population. Le pétrole est une ressource très convoitée et a grandement répondu au besoin de l'Humanité. Une grande partie du pétrole est utilisée pour la production d'énergie dans le domaine du transport, de l'électricité, etc. Son utilisation n'est pas exclusivement énergétique puisqu'il est aussi utilisé comme source de matières premières pour l'industrie chimique. La majeure partie des produits issus de la chimie (e.g., médicaments, polymères, solvants) sont ainsi d'origine pétrolière. Malheureusement, le pétrole est aujourd'hui en cours de raréfaction. L'autre problème majeur est que l'utilisation massive du pétrole, et des autres ressources fossiles, conduit à un déstockage trop important de carbone sous forme de CO₂, responsable du changement climatique. Dans une perspective de pallier le déclin pétrolier et dans le but de protéger l'environnement, d'autres alternatives ont été trouvées afin d'alléger cette dépendance. Parmi ces dernières, on peut citer le nucléaire, les énergies solaires, éoliennes et marémotrices, la géothermie et les agrocarburants.

Un agro-carburant est un carburant produit à partir de matériaux organiques non fossiles, provenant de la biomasse. Il vise à remplacer les carburants provenant de ressources fossiles comme le pétrole. Les deux sources principales d'agro-carburants sont les huiles végétales pour la fabrication du biodiesel et les sucres dont la fermentation produit du bioéthanol. Les bioraffineries sont des structures industrielles en cours de développement qui cherchent à fractionner la biomasse végétale et à convertir la partie saccharidique (i.e., cellulose, hémicellulose) en agro-carburants, mais aussi à générer un grand nombres de molécules à plus ou moins grande valeur ajoutée (e.g., acides organiques, monomères). Lors du raffinage, la lignine est générée comme co-produit. Elle est essentiellement utilisée comme combustible en raison de son haut pouvoir calorifique. Mais, en tant que source potentielle de composés aromatiques, elle mériterait d'être mieux valorisée dans le domaine de la chimie pour la production de produits à forte valeur ajoutée.

De nombreux modes de valorisation des lignines sont envisageables. Notamment, elles peuvent être utilisées directement pour la préparation de matériaux. Cependant, le principal frein lié à la valorisation de cette lignine brute réside dans sa complexité et son hétérogénéité, en grande partie liées aux types de biomasse et de prétraitements utilisés pour sa production. Une autre approche, encore balbutiante, consiste à réaliser une

Introduction générale

dépolymérisation contrôlée de la lignine afin de produire des matières premières aromatiques simples qui se présenteraient sous forme de petits composés phénoliques purs (monomères, dimères). Plusieurs équipes de recherche dédient donc leurs travaux à cette dépolymérisation contrôlée de la lignine par voie biotechnologique ou chimique. Une fois ce type de procédés maitrisé, il sera tout aussi important de trouver des applications à ces petits composés. Les composés aromatiques sont très demandés dans le domaine des matériaux. Leur utilisation comme monomères permettent d'obtenir des polymères avec des propriétés thermiques et mécaniques très intéressantes. Les phénols sont aussi connus pour leur pouvoir antioxydant. Ils sont souvent utilisés comme additifs dans des matrices polymères, mais aussi dans des formulations agro-alimentaires ou cosmétiques. De jour en jour, il y a une demande croissante des ces additifs du fait de l'augmentation de la production de polymères, de cosmétiques... Les travaux de cette thèse reposent sur l'utilisation des monomères phénoliques (alcools *p*-hydroxycinnamiques) comme « building block » pour la production des polymères ou la synthèse d'antioxydants biosourcés dans un but de substituer les additifs/synthons pétro-sourcés.

Objectif de la thèse

Les lignines sont des biopolymères qui sont issus de la copolymérisation enzymatique de trois monomères phénoliques aussi appelés monolignols (i.e., alcools phydroxycinnamiques). Ces monolignols, en présence d'oxydases, sont oxydés en radicaux phénoxy. Grâce au haut degré de conjugaison de ces molécules, les radicaux peuvent se délocaliser pour donner plusieurs espèces radicalaires. Ces espèces formées sont très réactives et se recombinent de façon « aléatoire » donnant une structure de lignine très complexe et polydisperse. Les lignines brutes sont donc obtenues à partir d'une copolymérisation enzymatique non-contrôlée. Selon la nature de la plante et ses conditions de croissance, les structures des lignines brutes sont différentes. La distribution de masses, les proportions en différents types de liaisons et la quantité de phénols libres varient fortement. Comme le pouvoir antioxydant d'une molécule polyaromatique est particulièrement dicté par le nombre de phénols libres présents, il faudra contrôler cette polymérisation afin d'obtenir des composés utilisables en chimie en tant que monomères ou composés antioxydants biosourcés.

Le but des travaux de la thèse est de mettre en place des protocoles de polymérisation d'alcools *p*-hydroxycinnamiques (i.e., monolignols). Plus particulièrement, l'objectif est de contrôler la polymérisation de ces composés phénoliques par les oxydases afin d'aboutir à des composés simples et réguliers (dimères, trimères ou oligomères peu polydisperses) pouvant être utilisés en tant qu'antioxydants ou monomères/synthons pour la chimie des

Introduction générale

polymères. L'étude mécanistique de ces réactions va permettre de mieux comprendre l'oxydation des phénols et ensuite d'orienter les réactions vers les produits voulus. Finalement, une fois que les réactions seront mises au point, le rendement de production seront optimisés.

Cette thèse comporte six chapitres. Le premier chapitre décrira l'état de l'art sur les différents antioxydants, les méthodes de détermination du pouvoir antiradicalaire, les méthodologies de synthèse de différents polymères, la polymérisation des monomères de lignines par les oxydases, les paramètres pouvant influencer la polymérisation et la structure des lignines de synthèse.

Le deuxième chapitre portera sur le mode opératoire mis en place pour réaliser l'étude sur la polymérisation *in vitro* des alcools *p*-hydroxycinnamiques. Les paramètres pouvant influencer la structure de lignines de synthèse (DHPs) tels que la température, l'activité enzymatique, et la nature du co-solvant ont été étudiés. L'originalité du projet est aussi d'associer l'utilisation de liquides ioniques comme co-solvant pour tenter de contrôler la polymérisation de ces alcools *p*-hydroxy cinnamiques.

Le troisième chapitre traitera la dimérisation contrôlée de l'alcool sinapylique pour la production du syringarésinol, un bisphénol présent naturellement dans la lignine. L'optimisation de la synthèse du syringarésinol *via* un plan d'expérience et l'étude mécanistique de la réaction seront aussi décrites. Nous nous intéresserons également au pouvoir antiradicalaire et à la stabilité thermique de cette molécule comparativement aux antioxydants commerciaux du type BHT, BHA et Irganox 1010. Le pouvoir de perturbation endocrinienne du syringarésinol sera également étudié.

Les quatrième et cinquième chapitres porteront respectivement sur la polymérisation par métathèse (ADMET) et thiol-ène (« click-chemistry ») des monomères α,ω -diènes issus du syringarésinol pour la synthèse des nouvelles polyoléfines aromatiques.

Finalement, le dernier chapitre démontrera le haut potentiel du syringarésinol comme substitut du bisphénol A pour la fabrication de résines époxy-amines ainsi que son utilisation comme « building blocks » pour la préparation de polymères aromatiques biosourcés.

Chapitre 1 : Etat de l'art

1. Introduction

Selon l'objectif de la thèse qui a été défini précédemment, des recherches bibliographiques ont été menées sur plusieurs sujets afin de s'appuyer sur les travaux antérieurs menés sur les lignines et de proposer des nouvelles voies de valorisation dans le domaine des antioxydants et polymères. Dans ce chapitre, nous commencerons par nous intéresser aux antioxydants synthétiques et naturels qui existent à ce jour. Puis nous nous focaliserons sur certains types de polymères qu'on essayera de synthétiser dans la suite de la thèse.

Afin de valoriser les composés phénoliques issus de la lignine en tant qu'antioxydants ou monomères/synthons pour la chimie des polymères, on s'intéressera à la biosynthèse des lignines *in planta* et notamment au rôle et au mécanisme d'action des oxydases sur les composés phénoliques. Ensuite, nous décrirons les principales méthodes de caractérisation des lignines qui existent à ce jour.

En se basant sur une méthode biomimétique telle que la synthèse *in vitro* des lignines modèles (DHPs), nous mettrons en évidence l'aspect mécanistique de l'oxydation et la recombinaison des monomères phénoliques. Les paramètres pouvant influencer la polymérisation des phénols et les structures des lignines résultantes seront aussi décrits dans ce chapitre.

En faisant référence à des résultats antérieurs sur l'oxydation des phénols, on essayera par la suite de la thèse de développer de nouvelles approches afin de contrôler la polymérisation des monomères phénoliques. Ainsi, les DHP résultants pourront être valorisés en tant qu'antioxydants ou monomères/synthons pour la chimie des polymères.

2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui inhibent ou ralentissent l'oxydation d'autres substances chimiques. L'oxydation est à l'origine de la détérioration des propriétés mécaniques des matériaux, du rancissement des corps gras alimentaires, ou de diverses pathologies. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. En particulier, on peut citer la réaction d'oxydation de composés organiques en présence de l'oxygène de la manière suivante :

RH + O₂ → ROOH

C'est une réaction radicalaire en chaîne dans laquelle les atomes d'hydrogène les plus labiles du substrat sont transférés à un amorceur. Le mécanisme peut être décomposé en trois étapes :

<u>Amorçage</u> : Les radicaux sont produits par voie thermique ou photochimique.

A + RH $\xrightarrow{T, h_{\upsilon}}$ AH + R

<u>Propagation</u> : Les radicaux libres sont très réactifs et engendrent des réactions très rapides de propagation.



<u>Terminaison</u>: Deux radicaux se recombinent entre eux donnant des produits non radicalaires stables.

Rⁱ + Rⁱ -----→ RR ROOⁱ + Rⁱ -----→ ROOR

Au cours de ces réactions, les espèces radicalaires formées peuvent entrainer des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont des composés qui sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en captant les radicaux formés. Ces derniers peuvent intervenir à deux niveaux dans le mécanisme ci-dessus : dans la phase d'amorçage ou dans la propagation des chaînes. On peut distinguer deux types d'antioxydants selon leur mode d'action. Ce sont les antioxydants primaires et secondaires.

Les antioxydants primaires sont des donneurs d'atomes d'hydrogène. Ils sont capables de convertir les radicaux (R[•] ou ROO[•]) en espèces stables et inactives en initiant des réactions de terminaison. Après avoir donné leur atome d'hydrogène, ils sont transformés en radicaux libres stables moins réactifs que les radicaux porteurs de chaînes. On les appelle aussi antioxydants par rupture de chaîne ou désactivateurs de radicaux libres. Parmi les antioxydants primaires, on peut citer les phénols encombrés (3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), le 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluène (BHT)) et les amines aromatiques secondaires (dérivés des acridines).



Les antioxydants secondaires sont des décomposeurs de peroxydes (sans formation de produits radicalaires) en produit secondaire stable. Ils sont capables de supprimer les peroxydes qui seraient des amorceurs secondaires de l'oxydation et ainsi diminuer la

concentration en ROOH. Ce sont, par exemple, des sulfites, des phosphates ou des thioesters.

Les deux types d'antioxydants, primaire et secondaire, sont nécessaires afin d'apporter une synergie qui permettra de stopper l'oxydation et ainsi augmenter la durée de vie de certains objets. Dans cette thèse, on s'intéressera uniquement à des antioxydants primaires. Ils sont divisés en deux classes : les antioxydants de synthèse et les antioxydants naturels.

2.1. Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants synthétiques ont été employés pour la première fois dans les années 40 pour l'emballage des aliments. Parmi les antioxydants synthétiques communs, on peut citer le BHA, le BHT ou la gamme d'antioxydants appartenant à la famille « Irganox® » (Figure 1). Aujourd'hui, on peut retrouver ces antioxydants un peu partout et dans diverses applications. Par exemple, dans l'industrie alimentaire, le BHA et le BHT sont utilisés pour retarder l'oxydation des lipides et empêcher la détérioration de la qualité des produits¹. On retrouve aussi le BHA et le BHT dans l'alimentation animale, les produits cosmétiques et pharmaceutiques, le caoutchouc et les produits pétroliers. Dans le domaine des matériaux plastiques, nous retrouvons la gamme d'antioxydants de la famille « Irganox® » qui sert à stabiliser et protéger les polymères (e.g., polyoléfines) contre l'oxydation. Il est intéressant de noter que la plupart des antioxydants de synthèse sont des phénols encombrés avec des groupements *tert*-butyle sur le noyau aromatique (Figure 1).



Figure 1 : Exemple d'antioxydants synthétiques

Le pouvoir antioxydant d'une molécule dépend fortement du nombre de phénols libres² mais aussi des groupements présents sur le noyau aromatique et de leur capacité à stabiliser le radical formé. Par exemple, les quatre phénols de l'Irganox 1010® apportent une très haute capacité à capter des radicaux et les groupements *tert*-butyles permettent de stabiliser les radicaux phénoxy formés après le transfert de proton.

Un problème majeur repose sur la toxicité de ces antioxydants synthétiques pour l'Homme due à leur migration des matrices polymères vers les aliments, voire l'Homme lui-même. Du fait de l'augmentation de leur usage, plusieurs études scientifiques ont été menées pour déterminer leurs effets indésirables sur la santé. Le BHT serait ainsi responsable de l'inflammation des poumons chez les souris³ et agirait comme un promoteur de tumeur chez les animaux⁴. Un autre inconvénient des antioxydants synthétiques, c'est qu'ils sont obtenus à partir des composés pétrosourcés. Suite à des impacts environnementaux, plusieurs chercheurs s'intéressent aujourd'hui au développement de nouveaux procédés plus écologiques pour obtenir des antioxydants. Malgré l'efficacité des antioxydants synthétiques pétrosoucés, les regards se sont tournés vers les antioxydants naturels ou à la synthèse d'antioxydants à partir de la biomasse.

2.2. Les antioxydants naturels

Dans la nature, on retrouve divers composés possédant des propriétés antioxydantes. Ces composés peuvent être non-phénoliques ou phénoliques. Parmi les non-phénoliques, on retrouve la vitamine A ou encore la vitamine C (l'acide L-ascorbique). Cette dernière est par exemple utilisée comme additif alimentaire pour protéger les aliments contre l'oxydation. Parmi les antioxydants phénoliques naturels, on trouve des phénols simples (e.g., phloroglucinol, catéchol, acide gallique, acide caféique, eugénol), des phénols compliqués (e.g., catéchine, resvératrol, flavonoïdes, lignanes) et d'autres encore plus complexes (e.g., oligomères de lignines, tanins condensés, oligostilbènes). Quelques exemples de ces antioxydants naturels sont représentés sur la Figure 2.



Figure 2 : Exemple d'antioxydants naturels, des plus simples aux plus compliqués

Malgré l'activité antioxydante avérée de ces composés, un problème majeur réside dans leur extraction qui reste couteuse et dans leur biodisponibilité assez faible pour être utilisés comme potentiel antioxydants dans des matrices polymères, en agro-alimentaire ou en cosmétique. La lignine, qui est un composé polyphénolique, reste cependant un composé d'intérêt grâce à sa grande biodisponibilité. Une grande partie de la lignine issue des industries papetières est brulée pour produire de l'énergie et rendre ainsi la papeterie énergétiquement indépendante⁵. Etant un composé polyphénolique possédant des phénols libres, la lignine peut être utilisée comme antioxydant. Toutefois, la lignine native reste un composé très difficile à étudier du fait de sa structure complexe et de son insolubilité dans des solvants organiques classiques causée par son haut poids moléculaire. Des travaux ont démontré que la lignine native contient majoritairement des liaisons inter monomères impliquant les atomes d'oxygènes phénoliques⁶. La formation de ces liaisons entraine à chaque fois la perte d'une fonction phénol libre ce qui donnera un ratio de phénols libres/masse de lignine native relativement faible. Pour avoir des pouvoirs antioxydants comparable à celui de l'Irganox 1010 par exemple, il faudra donc incorporer beaucoup plus de lignine dans la matrice polymère ce qui entrainera une modification des propriétés thermomécaniques. Dans l'objectif d'avoir un ratio de phénols libres/masse d'antioxydant élevé, il faudra réaliser une dégradation partielle et contrôlée de la lignine par la rupture de ce type de liaisons pour ainsi libérer des phénols. Une autre approche, proposée dans cette

thèse, est de récupérer les produits issus de la dégradation totale de la lignine (e.g., vanilline, syringaldéhyde) et de les transformer en dimères ou oligomères de phénoliques qui pouvront servir d'antioxydants. Comme évoqué précédemment, la migration du BHT des matrices polymères contribue à des effets indésirables sur la santé due à sa présence en quantité non tolérable. Cette migration est souvent liée à la taille de l'antioxydant et à sa compatibilité avec la matrice⁷. Une molécule de petite taille va donc faciliter la migration. En incorporant des oligomères de lignines ayant de poids moléculaires relativement élevés, on peut s'attendre à une restriction de la migration due à des interactions plus importantes entre la matrice et les oligomères. L'utilisation de tels oligomères de lignines comme antioxydants va donc permettre de minimiser le problème de migration au sein d'une matrice (polymère, aliment, formulation). Néanmoins, les tests de compatibilité entre les oligomères et la matrice devraient aussi être réalisés.

2.3. Méthode de détermination du pouvoir antioxydant/antiradicalaire

Le terme « antioxydant » est souvent utilisé mais très peu défini. Il est souvent associé au terme « antiradicalaire », qui ne signifie pas forcément la même chose. Il convient de souligner qu'il existe une différence entre ces deux termes. Selon Burlakova *et al.*⁸, le pouvoir antioxydant est défini par la capacité d'un composé à inhiber le processus d'oxydation d'une deuxième entité initiée par des radicaux libres alors que le pouvoir antiradicalaire caractérise l'aptitude d'un composé à réagir et piéger les radicaux libres. Afin de déterminer les activités antioxydantes réelles d'une molécule par rapport à la stabilisation d'un matériau, il est nécessaire de l'étudier directement sur le matériau.

Les méthodes d'analyse du pouvoir antioxydant d'une molécule sont nombreuses. On peut citer la méthode OIT (Oxidation Induction Time)⁹, ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity)¹⁰ qui se font en présence de l'oxygène. Toutes ces méthodes nécessitent au préalable l'incorporation de l'additif dans le matériau (par exemple l'extrusion) avant de réaliser le test qui s'avère être un processus assez long. Dans le but de gagner de temps, une analyse préliminaire comme le test antiradicalaire peut être réalisée pour faire un screening des potentiels antioxydants.

Au cours des dernières années, plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer le pouvoir antiradicalaire d'un composé. On peut citer la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)^{11,12}.

Méthode TEAC¹³

Cette méthode est basée sur la mesure spectrophotométrique de la décoloration du cationradical ABTS^{+*} (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique). En présence d'un antiradical, la molécule ABTS^{+*} est réduite en ABTS résultant en une décoloration (bleue à incolore) de la solution. Cette décoloration est mesurée à 734 nm puis comparée à celle du Trolox (acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2*H*-1-benzopyran-2carboxylique), une molécule antiradicalaire de référence (Figure 3). Le pouvoir antiradicalaire d'un composé est ainsi exprimé en équivalent de Trolox. Cette méthode ne nécessite pas de contrôle de la température pour obtenir des résultats fiables et avec une bonne répétabilité.



Figure 3 : Structure de la molécule d'ABTS et de Trolox

Méthode FRAP¹⁴

La méthode FRAP est basée sur la réduction du complexe TPTZ de fer (III) (Figure 4) en complexe TPTZ de fer (II) par une molécule antiradicalaire. Lors de cette réduction, l'intensité de la couleur bleue du complexe de fer (II) généré est mesurée par colorimétrie (λ = 593 nm) puis corrélée avec la concentration de la molécule antiradicalaire. L'avantage de la méthode FRAP est la rapidité et la facilité à mettre en place une méthode reproductive pour l'évaluation du pouvoir antiradicalaire d'une molécule. Des équipements de base et des produits chimiques peu onéreux sont utilisés lors de cette méthode. Cependant, elle n'est adaptée qu'à des composés capables de réduire le Fe (III).



Figure 4 : Complexe Fe(III)/TPTZ

Méthode DPPH¹⁵

L'analyse DPPH[•] est une méthode très connue et souvent utilisée pour étudier les antioxydants naturels. D'un point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant des groupements SH⁻, NH⁻ et OH⁻¹⁶. Le DPPH[•] est un radical stable en solution à température ambiante (23 °C – 27 °C)¹⁷. Il possède un électron non apparié sur un atome d'azote (Figure 5). Grâce à la délocalisation de cet électron, le DPPH[•] est stable et reste sous forme de monomère (absence de dimérisation).



Figure 5 : Structure du DPPH*

La délocalisation de cet électron provoque aussi la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH[•]. En présence d'une molécule antiradicalaire, le radical DPPH[•] est réduit. Par exemple, dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de proton sur le DPPH[•], le transformant ainsi en DPPH-H.

$$\mathsf{DPPH}^\bullet + \mathsf{Ph}\text{-}\mathsf{OH} \to \mathsf{DPPHH} + \mathsf{Ph}\text{-}\mathsf{O}^\bullet$$

La mesure du pouvoir antiradical d'une molécule se fait donc en mesurant, par spectroscopie à 519 nm, la diminution d'absorbance due à une réduction des radicaux DPPH[•] (Figure 6).



Figure 6 : Mesure du pouvoir antiradicalaire par la méthode DPPH*

Il existe deux approches pour évaluer l'activité antiradicalaire via ce test. La première consiste à déterminer la quantité d'antiradical nécessaire pour réduire de la moitié la population en DPPH[•] alors que la deuxième approche est basée sur le suivie cinétique de la réduction du DPPH[•].

Pour la première approche, la réactivité d'un antiradical est estimée par la concentration effective EC_{50} . L'indice EC_{50} donne les concentrations de l'antiradical nécessaire pour faire décroitre la concentration initiale du DPPH[•] de 50%. Le pouvoir antiradicalaire d'un composé est donc d'autant plus élevé que son EC_{50} est petit. L' EC_{50} est généralement exprimé en mol d'antiradical/mol DPPH[•] ou en mg d'antiradical/g DPPH[•].

La deuxième approche consiste à introduire les paramètres cinétiques tels que le temps t_{EC50} nécessaire pour atteindre l'équilibre à l' EC_{50} , la constante de vitesse de réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique^{15,18,19}. La première approche de l'analyse DPPH[•] sera utilisée dans cette thèse à l'aide d'une méthode de routine mise en place par l'équipe de la Chaire ABI²⁰.

3. Les polymères

Les polymères sont définis comme étant des macromolécules constituées d'une ou plusieurs unités chimiques (monomères) qui sont répétées tout au long de la chaîne. Les polymères sont aujourd'hui indissociables de notre environnement et de notre vie pratique. On les retrouve dans plusieurs applications telles que les petits objets de la maison, les appareils électroménagers, peintures, colles, emballages, dans les véhicules, les matériaux de construction, etc. Selon leur origine, les polymères sont classifiés comme naturels, artificiels et synthétiques.

Les polymères naturels sont des polymères qui sont produits par la nature ou les organismes vivants (e.g., lignines, cellulose, amidon, protéines, chitosane). Pendant longtemps, les polymères naturels avaient été utilisés par l'Homme sous la forme de matériaux ou de fibres textiles (soie, laine) sans même connaitre la notion de polymère. Le caoutchouc naturel est un exemple de polymère naturel qui est encore utilisé de nos jours pour ses propriétés élastiques. Les polymères naturels possèdent de nombreux avantages. La majorité d'entre eux sont biodégradables, non-toxiques et ne contribuent pas de façon considérable à l'augmentation de l'effet de serre. Cependant, certaines propriétés des polymères naturels sont loin d'être idéales pour leur utilisation directe comme matériaux à cause de leur non-

homogénéité structurelle et leur polydispersité. De plus, leur disponibilité dépend directement des saisons et des conditions climatiques.

Dans les années 1920, les scientifiques comprirent la notion de macromolécule grâce aux travaux d'Hermann Staudinger, ouvrant ainsi la voie à la science et à la technologie des polymères²¹. L'abondance du pétrole à cette époque a permis le développement des polymères artificiels et synthétiques pour obtenir des matériaux avec de bonnes propriétés.

Les polymères dits artificiels sont des polymères obtenus par modification chimique d'un polymère naturel (e.g., nitrate de cellulose, acétate de cellulose..). Quant aux polymères synthétiques, ils sont principalement issus de la chimie du pétrole (e.g., polyesters, polyoléfines, polycarbonates, polyuréthanes). L'intérêt des polymères de synthèse repose surtout sur leurs structures (homogénéité de nature fonctionnelle, de masse moléculaire et de polydispersité).

Les propriétés des polymères varient selon leurs compositions chimiques (e.g., aliphatique, aromatique, groupements fonctionnels) et leurs architectures (e.g., linéaire, ramifiée, réticulée). Les nombreux progrès en chimie ont permis de développer plusieurs types de polymères. Lors de la synthèse des polymères, les compositions chimiques et les architectures peuvent être modulées afin de conférer les propriétés requises au matériau et ainsi étendre son domaine d'application. Les polymères de synthèse peuvent avoir des propriétés thermomécaniques variables et sont souvent classifiés en fonction de ces propriétés. On peut en distinguer quatre types :

- Les thermoplastiques sont des polymères qui ramollissent sous l'effet de la chaleur, puis durcissent à nouveau une fois refroidis. Les chaînes du polymère sont reliées entre elles par des liaisons faibles. En chauffant, ces liaisons sont facilement rompues et les chaînes peuvent prendre une autre forme. Les liaisons faibles entre les chaînes se reforment une fois la matière refroidie et le matériau garde sa nouvelle forme en conservant sa propriété plastique. Des exemples communs de thermoplastiques sont le polyéthylène (PE), le polychlorure de vinyle (PVC), polystyrène (PS), polyéthylène téréphtalate (PET), etc.
- Les thermodurcissables sont des polymères qui ne ramollissent pas après le moulage. Durant la polymérisation, le matériau durçit de façon irréversible. Les liaisons entre les chaînes du polymère sont des liaisons chimiques fortes. Ces liaisons sont si solides qu'elles ne peuvent pas être rompues quand le matériau est chauffé. Le matériau garde donc toujours sa forme initiale. Quelques exemples de thermodurs sont les polyépoxydes, polyuréthanes réticulés, polyesters insaturés, etc.

- Les élastomères sont des polymères qui sont déformables de manière réversible. Ils présentent des propriétés élastiques pouvant supporter des grandes déformations. Ils sont formés par la réticulation des chaînes polymères linéaires qui sont liquides à température ambiante. La réticulation consiste à créer des nœuds d'ancrage entre les chaînes donnant au matériau une structure tridimensionnelle. Parmi les exemples d'élastomères, on retrouve le caoutchouc *cis*-1,4-polyisoprène, le polybutadiène, etc.
- Les élastomères thermoplastiques sont des mélanges de polymères. Comme son nom l'indique, ils sont obtenus par une copolymérisation entre un élastomère et un polymère thermoplastique. Le matériau possède ainsi les propriétés élastiques et thermoplastiques. L'intérêt de copolymériser les élastomères et les thermoplastiques repose sur l'aisance que la partie thermoplastique va apporter lors de la mise en forme du polymère. Quelques exemples sont les élastomères thermoplastiques styréniques, les élastomères thermoplastiques de polyuréthanes, etc.

Bien que les polymères pétro-sourcés possèdent de nombreux avantages et une large gamme d'applications possibles, le procédé de fabrication de la plupart d'entre eux contribue à la dégradation de l'environnement. Aujourd'hui, de nombreux scientifiques se tournent vers la synthèse de polymères issus de ressources renouvelables. Dans cette thèse, on s'intéressera à la synthèse de polymères obtenus à partir des alcools *p*-hydroxycinnamiques.

3.1. Les différents modes de polymérisation

Il existe deux grandes catégories de réactions chimiques permettant la préparation des polymères. Ce sont les polymérisations par étapes (polycondensations) et les polymérisations en chaîne (polyadditions).

Polymérisation par étapes

La polymérisation par étape est une polymérisation dont le mécanisme procède par étapes indépendantes. Les monomères *a minima* bifonctionnels réagissent pour former des dimères, puis des trimères et ainsi de suite. La formation du polymère se fait par des réactions de condensation successives entre les fonctions chimiques des monomères en éliminant des petites molécules. Selon la fonctionnalité des monomères, une polymérisation par étapes peut conduire à des oligomères, à des polymères linéaires à haute masse molaire, à des macromolécules branchées, ou éventuellement à des réseaux tridimensionnels.

Polymérisation en chaîne

La polymérisation en chaîne est une polymérisation dans laquelle le polymère se forme par la réaction entre un monomère et un site réactif de la chaîne polymère. Contrairement à la polymérisation par étapes, la polymérisation en chaîne ne permet pas l'élimination de petites molécules lors de la croissance de la chaîne. A la fin de chaque étape de croissance du polymère, le site actif est régénéré. Le site actif peut être de nature radicalaire, cationique ou anionique. La polymérisation en chaîne comporte généralement trois étapes :

- L'amorçage (étape où l'espèce active se forme)
- Propagation (étape où le monomère réagit sur l'extrémité active du polymère en croissance conduisant à l'allongement de la chaîne)
- Terminaison (étape où l'espèce réactive est désactivée et la croissance s'arrête)

La Figure 7 montre un exemple de ces trois étapes dans le cadre d'une polymérisation radicalaire.



Figure 7 : Schéma d'une polymérisation radicalaire en chaîne

La première étape est l'étape d'amorçage. Dans le cadre d'une polymérisation radicalaire, l'amorceur est un générateur de radicaux, soit par voie thermique sous par voie photochimique. Les générateurs de radicaux sont souvent des peroxydes ou des groupements azo (e.g., azobisisobutyronitrile AIBN). Ces liaisons peuvent subir une coupure homolytique avec la température ou sous rayonnement UV donnant des espèces réactives capables d'initier la polymérisation en réagissant avec un monomère. L'étape suivante est la propagation qui se traduit par des additions successives d'unités monomères sur la chaîne polymère contenant le radical. Cette étape dépend de la réactivité de la chaîne polymère, du radical, du solvant et de la température. Ces facteurs sont donc responsables de la masse molaire du polymère résultant²². La dernière étape est l'étape de terminaison. C'est l'étape où la croissance du polymère est stoppée. Cela peut avoir lieu par recombinaison de deux

radicaux formant une molécule neutre ou par un processus de dismutation par abstraction d'hydrogène donnant deux molécules neutres.

3.2. Polyoléfines

Les polyoléfines sont des polymères aliphatiques saturés, issus de la polymérisation des oléfines. Elles appartiennent à la famille des thermoplastiques. Elles sont produites par exemple de la polymérisation de l'éthylène et de ses dérivés par une réaction de polyaddition formant ainsi la plus importante famille de matières plastiques de commodité. Parmi les plastiques de grande consommation, on peut retrouver le polyéthylène (haute et basse densité, respectivement HDPE et LDPE), le polypropylène (PP), etc. Les polyoléfines sont généralement utilisées dans la fabrication des emballages, films, gobelets, etc. Le procédé de Ziegler-Natta est connu pour la synthèse contrôlée des polymères vinyliques. Mise au point par Karl Ziegler et Giulio Natta au début des années 1950²³, il fait intervenir des catalyseurs métalliques à base de titane ou zirconium. Le procédé est utilisé aujourd'hui au niveau industriel pour la synthèse de polyéthylènes et de polypropylènes. Cependant, ce procédé fait intervenir des branchements sur la chaîne polymère lors de la polymérisation, modifiant ainsi ses propriétés. Afin de palier ce problème, la métathèse des diènes acycliques (ADMET) a été choisie pour synthétiser des polyoléfines strictement linéaires. L'ADMET est aujourd'hui étudiée en laboratoire mais son utilisation à l'échelle industrielle n'est pas encore d'actualité.

Polymérisation par métathèse des diènes acycliques (ADMET)

La première réaction catalysée par métathèse a été découverte dans les années 1950 par les chimistes industriels à DuPont, Standard Oil et Phillips Petroleum²⁴. Depuis, la métathèse est devenue l'une des réactions chimiques les plus importantes dans les stratégies de synthèse organique et des polymères, cela a d'ailleurs valu à Chauvin, Grubbs et Schrock un prix Nobel. La métathèse des oléfines est une réaction organique catalysée par des métaux de transitions. Les transformations chimiques possibles par métathèse sont nombreuses. On peut citer les réactions fréquemment étudiées comme la métathèse par ouverture de cycle (ROM)²⁵, fermeture de cycle (RCM)²⁵, métathèse croisé (CM)²⁶, la polymérisation par métathèse d'ouverture de cycle (ROMP)²⁷ et polymérisation par métathèse de diènes acycliques (ADMET)²⁸ (Figure 8).



Figure 8 : Quelques réactions de métathèse

Le mécanisme de la réaction de métathèse a été proposé en 1971 par Chauvin et Hérisson²⁹. C'est grâce à la compréhension des mécanismes réactionnels que de nouveaux catalyseurs plus efficaces ont été proposés. Parmi les catalyseurs modernes, on retrouve les catalyseurs de Schrock qui sont à base de molybdène ou de tungstène³⁰ et les catalyseurs de Grubbs à base de ruthénium³¹. La polymérisation par ADMET est une polycondensation qui permet la production de polyoléfines linéaires à partir des α, ω -diènes. Le catalyseur Hoveyda-Grubbs de seconde génération (Hoveyda-Grubbs II) est reporté dans la littérature comme étant le catalyseur le plus efficace pour ce type de polymérisation³².



Figure 9 : Catalyseur de Hoveyda-Grubbs 2^{ème} génération

La première étape du mécanisme de l'ADMET est une coordination entre le catalyseur métallique et une insaturation du monomère pour former l'intermédiaire métallocyclobutane 1 (Figure 10). Par la suite, la réaction se dirige vers la formation du complexe de métathèse actif alkyldiène 2. Puis cette espèce active réagit avec un monomère pour donner le cycle métallocyclobutane 3. Le cycle catalytique de l'ADMET continue avec la formation d'une autre espèce métallique active 4 entrainant la formation du polymère. Enfin, l'intermédiaire 4 se coordonne avec un autre monomère pour reformer le complexe de métathèse alkyldiène

2 en libérant de l'éthylène. La force motrice de cette polymérisation est l'élimination de l'éthylène en plaçant, par exemple, le milieu réactionnel sous vide.



Figure 10 : Mécanisme de polymérisation par ADMET

Toutefois, il est à noter que, lors de la polymérisation, la viscosité augmente et l'agitation devient difficile. L'élimination de l'éthylène devient alors moins efficace, limitant ainsi la conversion. Même si la réalisation d'une polymérisation ADMET est préférable en milieu fondu afin d'éviter des oligomères cycliques par RCM, l'utilisation de solvants non-volatiles (toluène, xylène) peut être nécessaire afin d'atteindre des conversions raisonnables²⁸.

Les catalyseurs sont connus pour générer *in situ* des hydrures métalliques pouvant induire des réactions d'isomérisations sur les monomères oléfines³³. L'isomérisation consiste en la migration de la double liaison le long du squelette du polymère ou du monomère pendant la métathèse (Figure 11). Le polymère devient alors irrégulier par rapport à la longueur de la chaîne carbonée et à la position de la double liaison, entraînant une diminution du degré de polymérisation. Plusieurs stratégies ont été développées pour réduire ce phénomène. Grubbs a notamment identifié la *p*-benzoquinone comme additif le plus efficace pour prévenir ces migrations de double liaison³⁴.



Figure 11 : Réactions parasites lors de la polymérisation par ADMET (<u>Gauche</u> : la RCM, <u>Milieu</u> : l'isomérisation suivie de l'ADMET)

L'ADMET permet d'obtenir des polymères strictement linéaires avec des insaturations sur la chaîne polymère. Cette polymérisation est attractive pour sa haute conversion en monomère et les hauts poids moléculaires qui en résultent. Wagener est le premier à décrire cette réaction dans la littérature scientifique. Il a ainsi synthétisé des polyoctenylènes à haut poids moléculaire en utilisant le 1,5-hexadiène et le 1,9 decadiène³⁵. Grâce à son efficacité et à une large tolérance vis-à-vis des substrats, l'ADMET peut être utilisée pour synthétiser une grande gamme de polyoléfines. Par exemple, des copolymères linéaires d'éthylène-acrylates, éthylène-vinyl acétates, etc ont été synthétisés³⁶. Plus récemment, l'ADMET a été employée pour la polymérisation de monomères biosourcés lors des travaux de Llevot³⁷, Firdaus³² et Barbara³⁸ (Figure 12).



Figure 12 : Polymérisation par ADMET de monomères biosourcés^{32,37,38}

L'ADMET peut donc être utilisée pour générer une grande gamme de polymères strictement linéaires à partir des α, ω -diènes avec un contrôle des fonctions sur la squelette du polymère. Après hydrogénation des doubles liaisons, les polymères issus de l'ADMET permettent d'ouvrir la voie à de nouvelles polyoléfines, notamment à base de monomères aromatiques, donnant ainsi accès à de nouvelles propriétés.

Cependant, l'ADMET présente aussi des inconvénients. Cette polymérisation peut être limitée par la présence de certains groupements fonctionnels qui empoisonnent le système catalytique. Un des problèmes majeurs des polyoléfines est le manque de groupements polaires sur la chaîne du polymère qui peut provoquer un manque de compatibilité avec d'autres matériaux. Dans certaines applications, cette compatibilité est primordiale et l'ajout des groupements polaires devient nécessaire. Afin d'obtenir des polyoléfines avec des groupent polaires, la protection du groupe fonctionnel présent sur l' α , ω -diène avant la polymérisation ADMET peut être nécessaire. Par exemple, Wagener *et al.*³⁹ ont du protéger les fonctions acides carboxyliques pendantes sur les monomères α , ω -diènes en esters correspondants pour obtenir des copolymères régulier de poly(éthylène-*co*-acide acrylique) (EAA) à haut poids moléculaires par ADMET (Figure 13).



Figure 13 : Polymérisation par ADMET des monomères α,ω-diènes contenant des fonctions acides carboxyliques protégés

Afin d'obtenir des polyoléfines portant des groupements polaires sans les étapes de protection/déprotection, la chimie thiol-ène peut être utilisée pour introduire ces groupements de façon simple et efficace⁴⁰. Cette chimie simple et robuste consiste à lier par l'intermédiaire d'une liaison thioéther une molécule contenant un groupement thiol à une molécule contenant une fonction alcène. Ainsi, des polyoléfines comportant des groupements polaires peuvent être obtenues.

Polymérisation thiol-ène

Durant les guinze dernières années, il y a eu un intérêt croissant à trouver des réactions rapides qui satisferont aux trois critères principaux d'une synthèse idéale: l'efficacité, la versatilité et la sélectivité. Les réactions qui ont été adaptées pour répondre à ces critères sont appelées réactions de « click-chemistry » ou simplement réactions « click ». Ces réactions ont été classées en quatre catégories : les réactions de cycloadditions (cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, Diels-Alder), les réactions nucléophiles d'ouverture de cycle (époxydes, aziridines), la chimie des carbonyles non-aldoliques (urée, hydrazones) et les additions sur les liaisons carbone-carbone insaturées (dihydroxylation, époxydation ou les réactions de Michael)^{41,42,43}. Parmi ces guatres types de réactions, c'est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen qui est largement utilisée comme réaction « click ». Cette réaction est catalysée par le cuivre (I) entre un azoture et un alcyne terminal formant un cycle triazole. Le cuivre (II) peut aussi être utilisé en présence d'un excès de réducteur, généralement l'ascorbate de sodium, afin de générer in situ le cuivre (I). Plus récemment, la chimie thiol-ène a été présentée comme une nouvelle réaction « click »⁴⁴ grâce à sa haute stéréosélectivité, son bon rendement et une grande force motrice thermodynamique de la réaction.

Les réactions thiol-ènes sont des réactions d'additions d'un thiol sur un alcène pour donner des sulfures d'alkyles (thioéthers). Ces réactions sont connues pour se faire selon deux types de mécanismes, l'addition de thiol-Michael ou addition radicalaire. Catalysée par une base, la réaction d'addition de thiol-Michael se fait particulièrement sur des alcènes activés

par des accepteurs d'éléctrons de type (méth)acrylates, esters fumarates ou encore des dérivés maléimides⁴⁵. Comparée à des réactions de Michael classiques, l'utilisation d'une base faible du type triéthylamine est suffisante pour catalyser la réaction grâce au faible pKa de la plupart des thiols. Une fois le thiol déprotoné, les anions thiolates qui sont de très bons nucléophiles sont formés. L'anion thiolate s'additionne ensuite sur le carbone électrophile en position β formant un intermédiaire énolate. Cet intermédiaire énolate peut ensuite déprotoner un thiol et former le produit thiol-ène avec une régioséléctivité anti-Markovnikov (Figure 14).



Figure 14 : Réaction d'addition thiol-Michael

Les réactions de thiol-ène peuvent aussi être mises en œuvre par des réactions radicalaires entre un thiol et un alcène. Cette fois, la réaction est initiée soit thermiquement en présence d'un amorceur de type AIBN (azobisisobutyronitrile) soit photochimiquement sous rayonnement UV. Le radical formé sur le thiol se propage sur le groupement fonctionnel de l'alcène par l'intermédiaire d'une addition anti-Markovnikov pour former un radical centré sur le carbone en α de R'. Il y a ensuite abstraction d'un atome d'hydrogène sur une nouvelle molécule de thiol. Cette dernière peut ensuite participer à plusieurs étapes de propagation⁴⁶ (Figure 15).





La réaction thiol-ène a ensuite gagné ses lettres de noblesse dans le domaine des polymères^{47,48,49} et des dendrimères⁵⁰. En effet, les additions radicalaires thiol-ène s'avèrent avantageuses dans la synthèse des polymères. Les polymérisations thiol-ène par photoinitiation sont connues pour former rapidement et quantitativement des réseaux polymères hautement uniformes avec des plages de températures de transitions vitreuses (*T_q*) étroites.

Durant ces dernières années, plusieurs travaux ont été réalisés afin de produire des polymères renouvelables capables de substituer ceux pétrosourcés. Meier *et al.* ont par exemple utilisé la chimie thiol-ène pour fonctionnaliser plusieurs monomères biosourcés et synthétiser des polymères. Ils ont pu synthétiser des monomères d'amines fonctionnels

issus d'acides gras (Figure 16 (a)) pour la production des polyamides renouvelables⁵¹ et greffer des groupements fonctionnels sur des polyesters insaturés pour améliorer les propriétés du polymère⁵². Ils ont ensuite utilisé la réaction de thiol-ène comme une réaction de polymérisation pour synthétiser des copolymères aromatiques renouvelables dérivés de la vanillin³² (Figure 16(b)).



Figure 16 : Fonctionnalisation et polymérisation de monomères par réaction thiol-ène^{32, 51}

3.3. Résines époxy

La résine époxy a été découverte en 1936 par Pierre Castan en cherchant un matériau adapté pour l'utilisation en prothèses dentaires⁵³. En mélangeant des époxydes à de l'anhydride d'acide, il a obtenu des plastiques de grande qualité. Cette invention a été brevetée par la Société Trey Frères où travaillait Castan. Ciba SA, à Bâle, achète ensuite la licence et commence des études en recherche & développement avant d'industrialiser les résines époxy en 1946.

Parmi les matières plastiques courantes, les résines époxy sont des thermodurs polyvalents. Elles sont employées comme matériau de structure (matrice de matériaux composites) ou de surface (e.g, revêtement, adhésif). Aujourd'hui ; plus de 75% des résines époxy sont à base de bisphénols pétro-sourcés.

Les bisphénols sont une classe de composés contenant deux noyaux aromatiques phénoliques. Il existe plusieurs dérivés de bisphénols (Figure 17) comme par exemple le bisphénol A (2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane), le bisphénol C (2,2-bis(3-méthyl-4-hydroxyphényl)propane) ou le bisphénol Z (1,1-bis(4-hydroxyphényl)cyclohexane).



Figure 17 : Structures de quelques bisphénols synthétiques
Ce sont des composés pétro-sourcés qui sont synthétisés à partir du phénol⁵⁴. Le plus connu est le bisphénol A (BPA), qui a été synthétisé pour la première fois par Alexander Dianin en 1891. Le BPA est obtenu par une condensation de l'acétone avec deux équivalents de phénol en présence d'un acide concentré comme catalyseur (Figure 18).



Figure 18 : Synthèse du bisphénol A

L'efficacité et la facilité du procédé de synthèse du BPA ont permis son industrialisation notamment dans l'industrie du plastique. Il est utilisé comme additif dans des matrices polymères pour ses propriétés plastifiantes⁵⁵, antioxydantes et sa capacité à améliorer les propriétés thermiques et mécaniques des polymères.

Grâce à la présence des deux phénols, on retrouve son utilisation comme molécule plateforme pour la synthèse des monomères bifonctionnels. Les noyaux aromatiques apportent la rigidité et des bonnes propriétés thermomécaniques lorsqu'ils sont engagés dans des polymères. Un exemple parmi d'autres est son utilisation comme précurseur pour la synthèse des résines époxy⁵⁶ qui sont employées en revêtement et comme adhésif. Le BPA réagit avec de l'épichlorhydrine pour donner le diglycidyl éther de bisphénol A (DGEBA) en milieu basique (Figure 19). Puisque les bisphénols peuvent réagir avec les cycles époxydes, la réaction conduit à un mélange de monomère et d'oligomères dont le degré de polymérisation dépend du rapport molaire entre l'épichlohydrine et le BPA⁵⁶. La molécule est plus ou moins longue suivant le degré de polymérisation, et la viscosité du produit en est alors modifiée. Ainsi, à température ambiante, le produit est sous forme liquide si n = 0, très visqueux si n = 1 et sous forme solide si n ≥ 2 .



Figure 19 : Synthèse du DGEBA et oligomères

Les époxydes sont très réactifs et peuvent être ouverts par des nucléophiles. Afin de transformer le monomère à l'état liquide en résine rigide et résistante, un agent réticulant est ajouté. Cet agent, aussi appelé durcisseur, permet de former un réseau réticulé avec le monomère époxydé. Parmi les durcisseurs on trouve notamment des amines, des anhydrides, des mercaptans, des isocyanates et des phénols. Les réactions avec des amines sont les plus couramment utilisées. Généralement, ce sont des amines polyfonctionnelles de nature aliphatique (DTA), cycloaliphatique (IPDA) ou aromatique (HMDA) (Figure 20).



Figure 20 : Amines utilisées comme durcisseurs

La réaction de réticulation, aussi appelée cuisson, peut être conduite à des températures variables (T.A.-200 °C), catalysée ou pas, en fonction de la réactivité des agents de réticulation⁵⁷. La structure des agents de réticulations impacte très fortement la résine finale. Par exemple, la nature (aliphatique, cycloaliphatique ou aromatique) va gouverner la rigidité, alors que la fonctionnalité (di-, tri- ou tétra-fonctionnel) va contrôler le taux de réticulation. Le choix de l'agent réticulant doit ainsi être fait selon les propriétés souhaitées pour la résine et les conditions de mise en œuvre. Les résines époxy possèdent de bonnes durabilité et résistance chimique. Elles sont employées dans la fabrication des éoliennes, coques de bateaux et dans le domaine aérospatial.

Bien qu'étant un composé important pour la fabrication des matériaux, le BPA est aujourd'hui classifié comme perturbateur endocrinien et substance cancérogène⁵⁸. En effet, le BPA était à l'origine synthétisé pour remplacer les œstrogènes naturels couteux lors des tests pharmacologiques. Dès 1934, il a été identifié comme un œstrogène fonctionnel faible par Dodds et Lawson⁵⁹. Aujourd'hui, il a été démontré qu'il est en effet capable de mimer la fonction des hormones et de causer des anomalies physiologiques de la reproduction⁶⁰. C'est pour cette raison que son utilisation est aujourd'hui interdite ou fortement limitée dans plusieurs pays. De nombreux projets de recherche sont donc aujourd'hui lancés dans le but de trouver un substitut non-toxique à cette molécule très convoitée dans l'industrie des matériaux.

L'isosorbide a été envisagé comme composé pouvant substituer le BPA⁶¹ (Figure 30). Cette molécule est obtenue par la déshydratation du sorbitol qui appartient à la famille des sucres. L'isosorbide est un diol, non toxique, biodégradable et thermiquement stable. Les deux fonctions alcools de l'isosorbide offrent une multitude de fonctionnalisations, cela en fait une molécule plateforme pour les polymères. Sa rigidité, due à son bicycle, confère de bonnes propriétés thermomécaniques mais ces dernières demeurent cependant inférieures à celle de la DGEBA⁶².



Figure 21 : Synthèse de l'isosorbide diépoxydé⁶¹

Cette différence est due à l'absence des noyaux aromatiques sur la molécule. Plusieurs travaux se sont donc portés sur la synthèse de nouveaux bisphénols capables de substituer le bisphénol A pour la fabrication des résines époxy.

On peut citer les travaux de Maiorana *et al.*⁶³ sur la synthèse des esters d'acide diphénolique (esters DPA). Ces esters ont été synthétisés à partir du phénol (pétro-sourcé) et d'acide lévulinique (biosourcé) en deux étapes (Figure 22). La première étape consiste en une condensation de deux équivalents de phénols sur l'acide lévulinique pour donner l'acide diphénolique (DPA). Dans un second temps, cet acide est estérifié par des alcools ayant des chaines carbonées plus ou moins longues. Le rendement global de la synthèse des esters DPA est de l'ordre de 80-85% suivant la nature de l'alcool utilisé.



Figure 22 : Synthèse d'esters de DPA

Il existe d'autres bisphénols synthétisés à partir des composés issus de la biomasse. Par catalyse acide, Hernandez *et al.*⁶⁴ ont synthétisé des bisguaiacols par une condensation du guaiacol sur l'alcool vanillique (Figure 23) alors que Chen *et al.*⁶⁵ ont synthétisé un biscréosol à partir de créosol et de formaldéhyde (Figure 24).



Figure 23 : Synthèse des bisguaiacols



Figure 24 : Synthèse du biscréosol

Des procédés enzymatiques ont aussi été développés pour la synthèse de nouveaux bisphénols. Llevot *et al.*⁶⁶ ont ainsi synthétisé une série de bisphénols à partir de la vanilline et d'autres composés issus de la dégradation de la lignine en utilisant la laccase de *Trametes versicolor* (Figure 25).



 $R = CHO, CN, COCH_3, CO_2Me, CH_3, CH_2CH=CH_2$

Au laboratoire nous avons effectué des travaux sur la synthèse de nouveaux bis/trisphénols biosourcés. Pion *et al.* ont ainsi développé de nouveaux bis/trisphénols à base d'acide férulique (ou vanilline) et de diols biosourcés⁶⁷. Les bisphénols ont été obtenus par un procédé enzymatique (*Candida antarctica* Lipase B (CAL-B)) en milieu fondu avec de bons rendements (Figure 26). Leurs très bonnes propriétés antioxydantes⁶⁸ et antiradicalaires,²⁰ et

Figure 25 : Synthèse enzymatique des bisphénols à partir la vanilline et ses dérivés

leur inocuité vis-à-vis des récepteurs hormonaux ont été déterminées pour démontrer leur capacité à substituer des antioxydants pétrosourcés. Ils ont ensuite été utilisés comme « building block » pour synthétiser des polyesters⁶⁹, des polyoléfines³⁸ et des résines époxy⁷⁰ biosourcés avec des propriétés intéressantes tout en leur apportant un caractère biodégradable lié aux fonctions esters.



Figure 26 : Synthèse enzymatique des bis/trisphénols à partir de l'acide férulique

Dans le cadre de la synthèse des résines époxy, certains de ces macrobisphénols ont été utilisés pour synthétiser des monomères diépoxydés totalement biosourcés en présence de l'épichlorhydrine (Figure 27), cette dernière pouvant provenir de la biomasse par le procédé Epicerol®⁷¹.



Figure 27 : Synthèse de monomères diépoxydés à partir de l'acide férulique

A partir de ces monomères diépoxydés, des résines époxy-amines ont été synthétisées avec de bons rendements (85-90%)⁷⁰. Cependant, les propriétés thermomécaniques de ces résines sont moins bonnes que celles issues du DGEBA. Afin de se rapprocher des propriétés du DGEBA, un bisphénol plus rigide devrait être employé.

Enfin, il existe d'autres possibilités d'exploiter les composés polyphénoliques naturels notamment les polyphénols végétaux. On peut trouver dans la littérature des résultats intéressants lors de travaux sur l'époxydation des lignines brutes pour la fabrication des résines^{72,73,74}. Cependant, la variabilité et l'hétérogénéité de la lignine brute ne permet pas d'avoir des structures reproductibles. Les lignines de synthèse, dont les structures sont moins hétérogènes et plus reproductibles que les lignines brutes, peuvent être une des solutions de la valorisation de la biomasse lignocellulosique dans le domaine des résines époxy.

3.4. Les (poly)phénols végétaux

Les polyphénols sont des composés très répandus dans la nature et notamment dans le règne végétal. Ils forment une gamme étendue de molécules biologiques qui jouent un rôle protecteur chez les plantes. De nos jours, plusieurs composés phénoliques ont été identifiés chez les végétaux. Bien qu'ils possèdent des structures très diverses, ils ont tous en commun un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Les polyphénols ont pris une importance croissante dans le domaine médical, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé pour leurs propriétés antioxydantes. Mis à part ces propriétés biologiques intéressantes, les polyphénols sont une source de composés aromatiques qui peuvent être utilisés dans le domaine des matériaux afin de potentiellement substituer les composés aromatiques pétro-sourcés. La richesse en noyaux aromatiques va pouvoir apporter au matériau une rigidité comparable aux composés pétro-sourcés. Quant aux phénols libres, ils serviront de sites de fonctionnalisations donnant des monomères de différentes natures qui pourront être engagés dans divers types de polymérisations.

Un des monomères phénoliques qui a récemment été utilisé dans le domaine des polymères est la vanilline. Cette molécule, qui est issue de la dégradation de la lignine, a été utilisée pour synthétiser des monomères bifonctionnels pouvant être utilisés en polymérisation^{75,76} (Figure 28).



Figure 28 : Transformation de la vanilline en monomères bifonctionnels

Dans certaines plantes, il existe des motifs de bisphénols aromatiques tels que le curcumin, le resvératrol, le pinorésinol ou le syringarésinol⁷⁷ (Figure 29) qui sont naturellement présents et qui pourraient servir comme monomères bifonctionnels pour la synthèse de polymères. Cependant, ces molécules sont présentes en très faibles quantités. Plusieurs extractions et purifications sont nécessaires pour les récupérer⁷⁸ rendant ainsi le procédé long et couteux. Afin d'accéder à des bisphénols biosourcés économiquement abordables, il faudra les synthétiser à partir de petits monomères phénoliques biosourcés (par exemple vanilline, syringaldéhyde, acide férulique) issus de la dégradation de la lignine ou de la lignocellulose.



Figure 29 : Structure de bisphénols naturellement présents dans les plantes

Dans cette thèse, on consacrera une partie des travaux à la synthèse chimio-enzymatique du syringarésinol, un bisphénol biosourcé issu de l'alcool sinapylique. Ensuite, on évaluera son application comme antioxydant, polymères (polyoléfines, polyuréthanes) et potentiel substitution du bisphénol A (résines époxy).

4. Les lignines : potentielle source de synthons aromatiques pour la chimie

4.1. Biosynthèse des lignines

Les lignines sont des biopolymères présents dans la paroi secondaire des plantes. Après la cellulose, c'est le deuxième biopolymère le plus abondant sur Terre. A elles deux, elles cumulent plus de 70 % de la biomasse totale⁷⁹. Les lignines sont des composés polyphénoliques qui occupent tout l'espace libre laissé par la cellulose et les autres polymères de la paroi secondaire (Figure 30). On peut faire une analogie au béton armé, où les microfibrilles de cellulose correspondent à l'armature en acier et la lignine au béton. Les lignines sont des molécules hydrophobes qui restent mouillables mais qui sont imperméables à l'eau.



Figure 30 : Structure de la paroi végétale (Cellulose, hémicellulose et lignine)⁸⁰

Leurs rôles dans la plante sont nombreux. Elles permettent notamment de rigidifier la plante et d'apporter une résistance mécanique à la compression, elles participent à la protection contre les attaques biologiques, chimiques et physiques, elles permettent le transport de l'eau et des sels minéraux vers les feuilles.

Les lignines sont des composés chimiquement très hétérogènes⁸¹. Leur complexité et leur diversité structurale sont dues à leur biosynthèse permettant la recombinaison de trois dérivés phénylpropane constitutifs principaux. Ces unités phénylpropane sont les alcools *p*-hydroxycinnamiques (ou monolignols) : alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique qui diffèrent par le degré de méthoxylation du noyau aromatique. Ils sont obtenus en plusieurs étapes enzymatiques à partir de la phénylalanine (Figure 31). Les premières étapes de la biosynthèse des monolignols se font dans le cytosol et se divisent en 3 types de réactions⁸²:

- Le premier est une désamination de la chaîne latérale de la phénylalanine formant l'acide cinnamique avec la double liaison. Ensuite, le cycle aromatique subit une hydroxylation en position *para* pour former l'acide *p*-coumarique. Le groupement carbonyle est ensuite thioestérifié par le Coenzyme A pour former du *p*-coumaroyl-CoA.
- Le deuxième est une réduction de la fonction thioester en aldéhyde, puis en alcool.

 La dernière réaction est la formation des groupements méthoxy sur le noyau aromatique pour donner les deux autres alcools *p*-hydroxycinnamiques.



Figure 31 : Schéma simplifié de la biosynthèse des monolignols

Les alcools *p*-hydroxycinnamiques sont ensuite polymérisés et incorporés dans le polymère de lignine comme des unités de lignine connues sous le nom d'unités H, G et S. (Figure 32).



La composition des lignines en chaque monomère varie en fonction du type du végétal. Par exemple dans les conifères, les unités G sont prédominantes. Dans les feuillus, les unités S sont majoritaires alors que dans les graminées il y a autant de G que de S (Tableau 1). Cette composition varie aussi en fonction des tissus (fibres, xylème), de la strate pariétale, de l'âge des cellules et de l'environnement^{83,84}.

Origine végétale	Composition de H/G/S (%)	Caractéristiques
Conifères	2/98/traces	Pauvres en phénols
		libres
Feuillus	-/32/63	Pauvres en phénols
		libres
Graminées	5/49/46	Riche en phénols
		libres

Tableau 1 : Composition des unités H, G et S selon l'espèce végétale

Polymérisation des monolignols

Dans la plante, les monolignols sont oxydés par des oxydases⁸⁵ pour former un radical phénoxy. Ce radical est ensuite délocalisé sur le noyau aromatique et sur la double liaison pour donner, par mésomérie, plusieurs espèces radicalaires (Figure 33). Les radicaux

formés se couplent entre eux pour donner des oligomères. Ces derniers peuvent ensuite être re-oxydés pour donner, après couplages, des polymères de lignines très complexes et ramifiés avec des hauts poids moléculaires⁸⁶.



Figure 33 : Différents espèces radicalaires obtenues après délocalisation

Durant le couplage, deux types de liaisons sont obtenus. Les liaisons de type carbonecarbone (β -5, β - β , 5-5, β -1) et les liaisons éthers de type carbone-oxygène (β -O-4, α -O-4, 5-O-4).

Liaisons condensées :



Liaisons non-condensées (labiles en milieu acide) :



Les oxydases

Les oxydases sont des enzymes qui peuvent catalyser des réactions d'oxydo-réduction en faisant intervenir un accepteur d'électrons externe. Il existe deux grandes familles

d'oxydases présentes dans les plantes et responsables de la lignification. Ce sont les peroxydases et les laccases.

Les peroxydases

Les peroxydases (EC 1.11.1.7) sont des enzymes très importantes qui sont présentes dans la nature. Elles ont été identifiées dans les plantes, les microorganismes et les animaux. La plupart des peroxydases sont des hémoprotéines à base de protoporphyrin de fer ayant des masses molaires de 30 à 150 kDa⁸⁷.



Figure 34 : Structure d'une peroxydase à l'hème montrant le site actif

Les deux grands types de peroxydases sont :

- Les Peroxydases « animales »

- Les Peroxydases présentes chez les plantes, bactéries, levures et champignons

Le dernier type est divisé en trois classes, les membres de la classe 1 sont les Catalase-Peroxydases (CP), les Ascorbates Peroxydases (APx) et les Cytochrome c Peroxydases (CcP). Les peroxydases de classe 2 sont excrétées par les champignons et celles de classe 3 sont des peroxydases sécrétées spécifiques des plantes⁸⁸. Ces peroxydases sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Dans la plante, leur rôle principal est de contribuer à la lignification⁸⁹. Elles sont aussi capables de catalyser l'oxydation d'une grande variété de substrats (les composés phénoliques et les amines aromatiques) en utilisant le plus souvent le peroxyde d'hydrogène comme oxydant. Les peroxydases contiennent un atome de fer dans leur site actif. En présence de peroxyde d'hydrogène, le complexe de fer permet l'oxydation des substrats en passant par un mécanisme à un ou deux électrons en faisant intervenir des complexes de Fe (III) ou Fe (IV).

Les laccases

Les laccases (EC 1.10.3.2 ; *p*-diphenol: O₂ oxidoreductase) sont des enzymes qui ont été isolées pour la première fois en 1883 depuis l'arbre à laque japonais *Rhus venicifera*⁹¹. Ce sont des glycoprotéines ayant des masses molaires d'environ 70 kDa⁹². Ils sont

généralement présents dans des plantes⁹³, des champignons⁹⁴ ou même chez les insectes⁹⁵. L'implication de laccases dans la biosynthèse de la lignine a été discréditée par Nakamura en 1967⁹⁶. Cependant, Sterjiades *et al.*⁹⁷ et Driouich *et al.*⁹⁸ ont montré que les laccases pourraient oxyder les monolignols et leur implication dans la lignification a été finalement confirmée^{99,100}. Les laccases sont de nos jours connues pour leur capacité à polymériser¹⁰¹ et dépolymériser la lignine⁹⁴. Elles sont capables d'oxyder une grande variété de substrats tels que les phénols ou polyphénols, les aryles diamines et l'ascorbate¹⁰². Elles sont aussi capables de catalyser la déméthylation de la lignine^{103,104}.



Figure 35 : Structure d'une laccase

Elles contiennent 4 atomes de cuivre dans leurs sites actifs qui sont responsables d'une succession de réactions d'oxydation à un électron. Contrairement aux peroxydases qui utilisent le peroxyde d'hydrogène, les laccases utilisent de l'oxygène comme co-oxydant pour pouvoir oxyder les substrats phénoliques en radical phénoxy. Les quatre atomes de cuivres sont distribués dans des différents sites : type1 (T1), type2 (T2) et type (T3) (Figure 35). Le site T1, contenant un atome de cuivre, est le site d'oxydation primaire des substrats. Les sites T2 et T3 sont proches et forment un cluster trinucléaire de 3 atomes de cuivre. Ces atomes de cuivres jouent un grand rôle dans le mécanisme catalytique des laccases. Le cuivre type1 est réduit par un substrat tandis que ce dernier est oxydé. L'électron est ensuite transféré du cuivre type1 au cluster trinucléaire contenant les cuivres type2 et type3. A cette étape, l'oxygène de l'air est réduit en eau dans le cluster trinucléaire¹⁰⁵. Le cycle catalytique d'une laccase est montré sur la Figure 36.



Figure 36 : Cycle catalytique d'une laccase

Comme mentionné précédemment, les laccases catalysent des réactions d'oxydation. Ces réactions d'oxydation dépendent de la différence de potentiel entre les atomes de cuivre de la laccase et le substrat. Les laccases sont capables d'oxyder directement des substrats ayant des potentiels redox inférieurs au leur (~800 mV/ESH). L'encombrement stérique des substrats est également un facteur majeur dans la biocatalyse. Les enzymes sont connus pour leur spécificité envers les substrats. Les molécules trop encombrées ne peuvent pas accéder au site actif afin d'être oxydées. Même si les laccases sont capables d'oxyder une large gamme de substrats, des médiateurs sont utilisés afin d'élargir le domaine d'utilisation des laccases. Un médiateur est un agent de transfert qui va permettre l'oxydation d'un substrat n'ayant pas directement accès au site actif de l'enzyme.

Le médiateur est dans un premier temps oxydé par la laccase donnant un radical stable du médiateur. C'est cette espèce qui va permettre l'oxydation du substrat par transfert de radical (Figure 37). Un exemple des médiateurs très connu parmi plusieurs est le 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) et le 1-hydroxybenzotriazole (HBT).



Figure 37 : Oxydation catalysée par une laccase via un médiateur

Les laccases sont très utilisées dans plusieurs applications industrielles^{106,107} grâce à leur faible coût de production, l'utilisation d'un co-oxydant très disponible naturellement (oxygène de l'air), leur robustesse et leur bonne stabilité^{108,109}. La gamme de pH et de température optimaux des laccases est assez large, comprise respectivement entre 3 et 8, et 25 et 60 °C. Ils peuvent tolérer plusieurs co-solvants organiques mais restent quand même très sensibles à des solvants halogénés qui peuvent chélater les atomes de cuivres, modifier la conformation des protéines et inhiber l'enzyme.

Parmi les différentes sources de laccases, c'est la laccase de champignon *Trametes versicolor* qui est la plus utilisée. Son utilisation au niveau industriel est principalement due à son potentiel redox élevé (785 mV par rapport à l'électrode standard d'hydrogène)^{110,111} ce qui lui donne une activité importante^{112,102} par rapport à d'autres laccases. C'est une laccase qui a été très étudiée afin de mieux comprendre son mécanisme d'action pour mieux l'exploiter¹¹³. Dans cette thèse, l'utilisation de la laccase de *Trametes versicolor* va être privilégiée pour la synthèse *in vitro* des lignines grâce aux avantages qu'elle apporte. C'est un enzyme commercial qui oxyde facilement les trois monolignols, ne nécessite pas du peroxyde d'hydrogène et autorise la présence de plusieurs solvants organiques.

4.2. Méthode de caractérisation des lignines

Les méthodes de caractérisation des lignines peuvent être classées en plusieurs catégories :

• La détermination du poids moléculaire des oligomères

Les poids moléculaires des lignines solubles dans les solvants organiques classiques (THF, DMF) sont généralement déterminés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) aussi connue sous le nom de chromatographie par perméation de gel (GPC). La GPC est une technique qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. La phase stationnaire est un gel (e.g., polydextran réticulé¹¹⁴, agarose, cellulose, acrylique¹¹⁵) contenant des pores avec des tailles variables. Quand la phase mobile contenant les macromolécules traverse la colonne contenant le gel, les molécules ayant des petites tailles pénètrent dans les pores du gel tandis que les grosses molécules sont éluées directement à travers la colonne. Cela entraine une séparation du mélange des macromolécules avec les grosses molécules sortant de la colonne en premier et les petites en dernier. Les poids moléculaires sont ensuite déterminés à partir d'une courbe d'étalonnage obtenu avec des standards.

• La détermination du type de liaisons et des groupements fonctionnels

La thioacidolyse est une méthode dégradative qui permet de caractériser les lignines. Cette méthode¹¹⁶, développée par Lapierre et Rolando, consiste à couper les liaisons labiles aryleéther (type β -*O*-4) et ensuite de les quantifier par GC-MS (Figure 38). Les informations sur le pourcentage de liaisons non-condensées peuvent ainsi être obtenues à partir des données de spectrométrie de masse.



Figure 38 : Réaction de thioacidolyse

Bien que la thioacidolyse permette une quantification facile et efficace des liaisons labiles, les autres types de liaisons condensées ne peuvent pas être caractérisés.

Une méthode d'analyse non dégradative et plus rapide pour caractériser les lignines est la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). C'est un outil puissant qui permet une caractérisation structurale globale sans avoir à modifier la structure des lignines. La RMN liquide est aujourd'hui une technique d'analyse largement utilisée dans ce domaine en raison de sa capacité à apporter pleins d'informations sur la structure¹¹⁷. Les noyaux les plus souvent étudiés sont ceux des protons (¹H), carbones (¹³C), phosphores (³¹P) et fluor (¹⁹F).

La RMN du proton (¹H) est capable de quantifier un grand nombre de fonctions chimiques. Elle est notamment utilisée pour caractériser les fonctions acides carboxyliques, aldéhydes, hydroxyles, les protons aromatiques et aliphatiques dans les lignines¹¹⁸. Elle est très sensible et ne nécessite pas beaucoup de matière pour analyser un échantillon. La RMN du carbone (¹³C) est une technique puissante capable de révéler une grande quantité d'informations structurelles des lignines y compris la présence des liaisons aryle éther, les carbones condensés et non-condensés aromatiques et aliphatiques¹¹⁹. L'inconvénient majeur de la RMN ¹³C est sa faible sensibilité. Elle exige une grande quantité de matière pour un échantillon et un temps d'acquisition plus long qu'en proton.

Les lignines sont des composés très peu solubles dans des solvants organiques d'analyses classiques. Le DMSO- d_6 est souvent utilisé pour solubiliser les lignines en amont d'une expérience RMN. Toutefois, toutes les lignines ne sont pas totalement solubles dans le DMSO- d_6 . Les lignines sont souvent acétylées pour leur donner une meilleure solubilité et une meilleure résolution spectrale. L'acétylation est aussi utilisée comme un moyen pour

quantifier les phénols libres des lignines par la différence du déplacement chimique des acétates phénoliques et aliphatiques. Cette méthode reste cependant une estimation car il a été démontré que les signaux des acétates phénoliques des structures biphényles ont des déplacements chimiques proches des acétates aliphatiques¹²⁰. Une quantification des groupements phénoliques libres en utilisant cette technique sera donc qu'une estimation des composés phénoliques totaux.

La RMN du phosphore a été exploitée pour déterminer plus précisément le nombre de phénols libres dans les lignines^{121,122}. La technique implique la dérivatisation avec un agent de phosphorylation, le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane (TMDP). Le TMDP réagit avec les groupes fonctionnels hydroxyle pour donner des phosphites (Figure 39) qui sont caractérisables par RMN ³¹P en donnant des signaux à des déplacements chimiques différents pour les phosphores liés à des d'hydroxyles aliphatiques, phénoliques, ou à des groupes d'acides carboxyliques.



Figure 39 : Dérivatisation des composés phénoliques par le TMDP

La quantification des groupements phénoliques libres

La caractérisation des groupements phénoliques libres présente un grand intérêt si l'on souhaite utiliser les lignines de synthèse (DHP) comme antioxydants. En général, plus le nombre de phénols libres est élevé, plus le pouvoir antioxydant est grand¹²³. Le nombre de phénols s'avère aussi important dans l'utilisation des DHP comme précurseurs dans la synthèse des polymères (polyacrylates, résines époxy,...). Un nombre important de phénols libres sur les DHP donnera plus de possibilités de dérivation en groupement fonctionnel (e.g., acrylates, époxydes) et par la suite un polymère plus ramifié.

Dans la littérature, il existe plusieurs méthodes de quantifications de phénols libres. Parmi elles, on retrouve la méthode de Folin-Ciocalteu¹²⁴, bathochrome par spectroscopie UV¹²⁵, titration ClO₂¹²⁶, et comme cité précédemment, le dosage par acétylation/RMN ¹³C^{117,127} ou par phosphorylation/RMN ¹³P¹²¹¹²². La méthode Folin-Ciocalteu sera uniquement utilisée dans cette thèse pour quantifier les phénols libres grâce à la méthode de routine mise en place au laboratoire.

Méthode de Folin-Ciocalteu

Le dosage des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 par Singleton et Rossi¹²⁸. Le réactif est constitué d'un mélange de tungstate de sodium Na₂WO₄.2H₂O), molybdate de sodium (Na₂MoO₄.2H₂O), de l'acide chlorhydrique concentré, de l'acide phosphorique à 85%, d'eau et de sulfate de lithium (Li₂SO₄.4H₂O)¹². Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968)¹²⁹. La coloration produite, dont l'absorption maximum est d'ordre de 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

4.3. Les lignines de synthèse (DHP)

Les lignines modèles ou lignines de synthèse ont été synthétisés pour la première fois de façon *in vitro* par Freudenberg en 1968¹³⁰. Ces lignines de synthèse appelées aussi DHP (DeHydroPolymères) ont été obtenues en mettant les monolignols en présence d'enzymes telles que les laccases ou les peroxydases. Des modes opératoires ont été mis en place afin de synthétiser des lignines proches des lignines natives. Cependant, cette approche « biomimétique » n'a pas permis d'obtenir des lignines comparables aux lignines natives. En revanche, l'étude portée sur les DHP a permis de comprendre en partie la structure, la réactivité et la formation des lignines^{131,132}. En effet, les laccases ou les peroxydases permettent d'oxyder les monolignols en radicaux phénoxy. Ces radicaux se recombinent ensuite entre eux pour aboutir à un polymère avec des liaisons multiples.

Les mécanismes de couplages sont généralement de nature radical-radical entre les deux entités oxydées. Cependant, une hypothèse émergente laisse à penser que certains de ces couplages ne sont pas radicalaires mais ioniques. Ducrot *et al.*¹³³ ont fait l'hypothèse que la formation des liaisons éthers type carbone-oxygène peut passer par un mécanisme cationique contrairement à la formation des liaisons carbone-carbone qui se fait *via* un couplage radicalaire. Afin de confirmer leur hypothèse sur un possible mécanisme ionique lors de la polymérisation des monolignols, ils ont réalisé des travaux sur l'oxydation enzymatique du *trans*-resvératrol, un *p*-vinyl phénol.

Le resvératrol est une molécule à deux cycles aromatiques (notés A et B sur la Figure 40). Le cycle A contient un seul phénol ayant un potentiel redox faible qui peut facilement être oxydé par une oxydase. Le cycle B contient un groupement resorcinol (deux phénols sur le même cycle) avec un potentiel redox élevé¹³⁴ et une densité électronique élevée sur les carbones des groupements méthines qui déstabilise la formation des radicaux. L'oxydation du resvératrol se fait alors beaucoup plus facilement sur le phénol du cycle A avec une

stabilisation du radical formé par mésomérie sur le cycle aromatique et la double liaison vinylique α - α '.



Figure 40 : Structure de la molécule du trans-resvératrol

Dans ces travaux, l'oxydation du *trans*-resvératrol a été réalisée avec deux enzymes différentes, la peroxydase de raifort (HRP) et la laccase de *Trametes versicolor* (LTv) en utilisant deux conditions d'ajout de l'enzyme. Deux types de modes d'ajout ont été développés dans le cadre de la synthèse des DHP. Le mode d'addition à la verse ou « Zulaufverfahren (ZL) » et le mode d'addition goutte à goutte ou « Zutropfverfahren (ZT) »^{135,136}. Dans le premier cas (ZL), l'enzyme et le substrat sont ajoutés rapidement. Dans le deuxième cas (ZT), l'enzyme et le substrat sont ajoutés très lentement. C'est le mode d'ajout ZT qui est décrit comme la méthode la mieux adaptée pour mimer la lignine native car la proportion de liaisons β -O-4 est plus élevée en mode ZT que en ZL¹³⁵.

Les résultats obtenus dans le cadre des travaux de Ducrot *et al.* ont démontré que l'oxydation du resvératrol n'est pas affectée par la nature de l'enzyme. Les mêmes produits de réaction ont été obtenus avec la HRP et la LTv. Néanmoins, deux dimères différents ont été obtenus lors des deux conditions d'ajouts ZL et ZT confirmant l'effet du mode d'ajout sur le couplage des phénols. Le seul produit obtenu dans le cas de l'ajout ZL est le dimère *trans*- δ -viniferin alors que le dimère gnetin C est majoritaire lors de l'ajout ZT. Ces résultats démontrent clairement un impact du mode d'ajout sur le mécanisme mis en jeu lors du couplage entre les monomères phénoliques. Des résultats similaires ont été obtenus lors des travaux réalisés par Méchin *et al.* sur la polymérisation du monolignol G par la peroxydase. Ils ont démontré qu'un faible ratio enzyme/substrat (ZT) permet de mieux contrôler la polymérisation du monolignol G pour donner des polymères non-condensés.



Figure 41 : Les deux dimères de resvératrol obtenus lors des deux modes d'ajout

Dans un point de vue mécanistique, le resvératrol est oxydé par l'enzyme formant un radical centré sur l'oxygène en position 4'. Le radical peut ensuite se délocaliser par mésomérie sur le carbone en positions 3', 1' et β . Deux différents mécanismes réactionnels sont envisageables. Le premier est la formation de la *trans*- δ -viniferin par un mécanisme radicalaire couplant un radical en position β et un radical en position 3' suivi d'une réarromatisation de la molécule. La formation de la gnetin C a été décrite par un mécanisme cationique faisant intervenir la dismutation des radicaux par des interactions π -stacking¹³⁷. L'explication donnée pour les deux différents mécanismes se base sur le ratio resvératrol oxydé/resvératrol non-oxydé.

Le resvératrol est une molécule qui subit de très fortes interactions de π -stacking (Figure 42). En présence d'un ratio élevé resvératrol non-oxydé/resvératrol oxydé (mode ZL), les interactions entre le radical formé et les molécules de resvératrol non-oxydé vont être augmentées en empêchant les interactions de π -stacking. En conséquence, le processus de dismutation entre deux radicaux est fortement diminué. A l'inverse, en mode ZT, la concentration de resvératrol non-oxydé est en baisse. Dans cette condition, la proportion de resvératrol oxydé et resvératrol non-oxydé devient plus ou moins identique. Les interactions

π-stacking entre les molécules de resvératrol sont plus importantes. Les radicaux peuvent alors se dismuter et donnent lieu à des carbocations stabilisés en position β. La dimérisation du resvératrol se fait donc par attaque nucléophile du carbone en position 4 sur le carbocation en position β d'une autre molécule de resvératrol formant la liaison β–4. Puis il y a réaromatisation pour donner la gnetin C. Les deux produits distincts obtenus lors des deux différentes conditions réactionnels confirment que la recombinaison des radicaux n'est pas un processus aléatoire mais reste un paramètre purement chimique qui dépend des modes opératoires et conditions du milieu réactionnel.



Figure 42 : Interactions π-stacking entre les molécules de resvératrol et dismutation des radicaux

Au vu de ces résultats, il faudra prendre en compte et étudier les paramètres qui peuvent impacter le mécanisme de la réaction lors la polymérisation des monolignols. Dans cette thèse, différents modes opératoires seront mis en place afin d'étudier les mécanismes mis en jeu lors des couplages des monolignols. Les paramètres impactant sur la structure des DHP seront également optimisés. Parmi ces paramètres, on peut citer le mode d'ajout (ZL/ZT), la température, le pH et la nature du co-solvant.

Comme décrit précédemment dans les travaux de Ducrot *et al.*, le mode d'ajout (ZL ou ZT) impacte grandement les produits de réaction favorisant soit un mécanisme radicalaire soit cationique. Mis à part le mode d'ajout, la température est aussi un paramètre très important

lors d'une réaction enzymatique. Elle peut affecter directement la constante de vitesse de la réaction ou bien dénaturer l'enzyme en cas de température trop élevée. La laccase de *Trametes versicolor* montre des bonnes activités et stabilités entre 25 et 55 °C pour l'oxydation des composés phénoliques¹³⁸. La température peut non seulement avoir des conséquences directement sur l'enzyme dès le départ (avant l'oxydation des monomères) mais aussi pendant le couplage des monomères oxydés. Comme évoqué précédemment, il peut aussi exister des interactions π entre les noyaux aromatiques des molécules^{139,140}. Ces interactions peuvent alors favoriser certains couplages par rapport à d'autres. La température du milieu réactionnel va sans doute avoir un impact sur les interactions π . Jouer sur la température du milieu réactionnel devrait ainsi permettre d'avoir un certain contrôle sur le couplage.

Un autre paramètre qui peut influencer la structure des DHP est le co-solvant. L'utilisation des enzymes impose l'utilisation d'un tampon afin de contrôler le pH du milieu réactionnel. Un co-solvant devient alors nécessaire pour solubiliser le monolignol et apporter une homogénéité avec l'enzyme. Néanmoins, on reste limité à certains solvants et leur quantité d'utilisation. Il est rapporté que les composés halogénés inhibent fortement les laccases¹⁴¹, ce qui apporte une certaine restriction sur le choix du co-solvant. D'autres solvants organiques sont moins inhibiteurs mais doivent être utilisés en faible proportions. Récemment, des nouveaux solvants, certains compatibles avec des enzymes même en grande quantité, sont utilisé, ce sont les liquides ioniques (LI).

Les liquides ioniques sont des sels constitués de cations organiques (e.g., imidazolium, ammonium, pyrrolidinium) associés avec des anions inorganiques (e.g., Cl⁻, AlCl₄⁻, PF₆⁻, BF₄⁻, NTf₂⁻, DCA⁻) ou organiques (e.g., CH₃COO⁻, CH₃SO₃⁻) possédant des températures de fusion inférieur à 100 °C. Les propriétés physiques et chimiques, notamment la température de fusion ou les propriétés de solubilité et acido-basique d'un liquide ionique dépendent à la fois du cation et de l'anion. En faisant varier le cation ou l'anion, il est possible d'obtenir un solvant avec les propriétés désirées. Les LI sont généralement des bons solvants pour de nombreux composés organiques, inorganiques et les polymères. Dans le cadre de la dépolymérisation enzymatique de la lignine, les LI sont utilisés pour la solubilisation de cette dernière afin de l'accéder au site actif de l'enzyme pour faciliter la dégradation¹⁴². A l'inverse, les LI sont aussi des solvants prometteurs pour apporter une meilleure solubilité des oligomères issus de la polymérisation des monolignols. De plus, certains liquides ioniques ont montré leur capacité à augmenter l'activité de certaines oxydases et à influer sur les mécanismes chimiques impliqués dans la polymérisation des composés phénoliques^{143,144}.

Des études préliminaires ont été faites dans l'équipe IJPB à l'INRA de Versailles (stage d'Enora Poquet) sur la polymérisation de l'alcool coniférylique avec la peroxydase de raifort (HRP II) dans un milieu contenant un mélange de liquide ionique [Bmim.NTf₂] (30%) et du tampon phosphate. Les résultats obtenus par spectrométrie de masse ont démontré, qu'en présence de 30% de [Bmim.NTf₂] (non publiés), il y a formation d'oligomères avec des motifs de répétitions de 303 uma correspondant a un enchaînement de liaison du type β -O-4 ou β -5/ β -O-4. Ces résultats encourageants démontrant qu'il était possible de contrôler, dans une certaine mesure, la polymérisation des monolignols dans un milieu contenant du liquide ionique pour des applications des DHP comme antioxydants et synthons pour la chimie ont constitué la première motivation de cette thèse.

5. Références bibliographiques

- 1. A. Saiga, S. Tanabe, and T. Nishimura, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 3661–3667.
- 2. A. X. Lupea, M. Pop, and S. Cacig, *Rev. Chim.*, 2008, **59**, 309–313.
- 3. A. K. Bauer, L. D. Dwyer-Nield, J. A. Hankin, R. C. Murphy, and A. M. Malkinson, *Toxicology*, 2001, **169**, 1–15.
- 4. K. Yamaki, S. Taneda, R. Yanagisawa, K. Inoue, H. Takano, and S. Yoshino, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007, **223**, 164–172.
- 5. A. Vishtal and A. Kraslawski, *BioRessources*, 2011, **6**, 3547–3568.
- 6. R. Hatfield and W. Vermerris, *Plant Physiol.*, 2001, **126**, 1351–1357.
- 7. A. D. Schwope, D. E. Till, D. J. Ehntholt, K. R. Sidman, R. H. Whelan, P. S. Schwartz, and R. C. Reid, *Food Chem. Toxicol.*, 1987, **25**, 317–326.
- 8. G. Tirzitis and G. Bartosz, Acta Biochim. Pol., 2010, 57, 139–142.
- 9. M. Schmid, A. Ritter, and S. Affolter, J. Therm. Anal. Calorim., 2006, 83, 367–371.
- 10. G. Cao, H. M. Alessio, and R. G. Cutler, *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, **14**, 303–311.
- 11. A. Gramza-michalowska, Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol., 2007, 1, 227–233.
- 12. D. Huang, B. Ou, and R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 1841–1856.
- 13. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231–1237.
- 14. I. F. F. Benzie and J. J. Strain, *Methods Enzymol.*, 1999, **299**, 15–27.
- 15. N. Nenadis and M. Tsimidou, J. Am. Oil Chem. Soc., 2002, 79, 1191–1195.
- 16. N. Salah, N. J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G. P. Bolwell, and C. Riceevans, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **322**, 339–346.
- 17. D. A. Otohinoyi, O. Ekpo, and O. Ibraheem, *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 2014, **8**, 1262–1268.
- 18. R. Scherer and H. T. Godoy, *Food Chem.*, 2009, **112**, 654–658.

- 19. D. Villaño, M. S. Fernández-Pachón, M. L. Moyá, A. M. Troncoso, and M. C. García-Parrilla, *Talanta*, 2007, **71**, 230–235.
- 20. A. F. Reano, J. Chérubin, A. M. M. Peru, Q. Wang, T. Clément, S. Domenek, and F. Allais, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2015, **3**, 3486–3496.
- 21. R. Mülhaupt, Angew. Chemie Int. Ed., 2004, 43, 1054–1063.
- 22. J. A. Pojman, J. Willis, D. Fortenberry, V. Ilyashenko, and A. M. Khan, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 1995, **33**, 643–652.
- 23. J. Chadwick, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 2003, vol. 8, pp. 517–537.
- 24. H. S. Eleuterio, J. Mol. Catal., 1991, 65, 55–61.
- 25. T. Kitamura and M. Mori, Org. Lett., 2001, 3, 1161–1163.
- 26. S. J. Connon and S. Blechert, Angew. Chemie Int. Ed., 2003, 42, 1900–1923.
- 27. S. Sutthasupa, M. Shiotsuki, and F. Sanda, *Polym. J.*, 2010, **42**, 905–915.
- 28. H. Mutlu, L. Montero de Espinosa, and M. a R. Meier, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1404–1445.
- 29. J.-L. Herisson and Y. Chauvin, *Makromol. Chem.*, 1971, **141**, 161–176.
- 30. R. R. Schrock, Acc. Chem. Res., 1986, 19, 342–348.
- R. H. Grubbs and T. M. Trnka, in *Ruthenium-Catalyzed Olefin Metathesis, in Ruthenium in Organic Synthesis (ed S.-I. Murahashi)*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2004, pp. 153–177.
- 32. M. Firdaus and M. A. R. Meier, *Eur. Polym. J.*, 2013, **49**, 156–166.
- 33. P. A. Fokou and M. A. R. Meier, *Macromol. Rapid Commun.*, 2010, **31**, 368–373.
- 34. S. H. Hong, D. P. Sanders, C. W. Lee, and R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc*, 2005, **127**, 17160–17161.
- 35. K. B. Wagener, J. M. Boncella, and J. G. Nel, *Macromolecules*, 1991, **24**, 2649–2657.
- 36. M. D. Watson and K. B. Wagener, *Macromolecules*, 2000, **33**, 5411–5417.
- 37. a. Llevot, E. Grau, S. Carlotti, S. Grelier, and H. Cramail, Polym. Chem., 2015, 6,

7693–7700.

- 38. I. Barbara, A. L. Flourat, and F. Allais, Eur. Polym. J., 2015, 62, 236–243.
- 39. T. Baughman, C. Chan, K. Winey, and K. B. Wagener, *Macromolecules*, 2007, **40**, 6564–6571.
- M. Hong, S. R. Liu, B. X. Li, and Y. S. Li, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 2012, 50, 2499–2506.
- 41. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004–2021.
- 42. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596–2599.
- 43. C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, J. Org. Chem., 2002, 67, 3057–3064.
- 44. A. Dondoni, Angew. Chemie Int. Ed., 2008, 47, 8995–8997.
- 45. D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, and C. N. Bowman, *Chem. Mater.*, 2014, **26**, 724–744.
- 46. C. E. Hoyle and C. N. Bowman, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2010, **49**, 1540–1573.
- 47. A. van der Ende, T. Croce, S. Hamilton, V. Sathiyakumar, and E. Harth, *Soft Matter*, 2009, **5**, 1417–1425.
- 48. G. Chen, S. Amajjahe, and M. H. Stenzel, *Chem. Commun.*, 2009, 1198–1200.
- 49. J. W. Chan, B. Yu, C. E. Hoyle, and A. B. Lowe, *Chem. Commun.*, 2008, 4959–4961.
- 50. K. L. Killops, L. M. Campos, and C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 5062–5064.
- 51. O. Türünç, M. Firdaus, G. Klein, and M. a. R. Meier, *Green Chem.*, 2012, **14**, 2577.
- 52. N. Kolb and M. A. R. Meier, *Eur. Polym. J.*, 2013, **49**, 843–852.
- 53. J. A. Gannon, in *High Performance Polymers: Their Origin and Development*, eds. R.B. Seymour and G. S. Kirshenbaum, 1986, pp. 299–307.
- 54. K. Shimizu, S. Kontani, S. Yamada, G. Takahashi, T. Nihisyama, and A. Satsuma, in *18th Saudi Arabia-Japan Joint Symposium Dhahran, Saudi Arabia, November 16-17*, 2008.

- S. Tamschick, B. Rozenblut-Kościsty, M. Ogielska, D. Kekenj, F. Gajewski, A. Krüger, W. Kloas, and M. Stöck, *Environ. Pollut.*, 2016, **216**, 282–291.
- 56. C. Barrere and F. Dal Maso, *Rev. l'institut français du pétrole*, 1997, **52**, 317–335.
- 57. M. J. Galante, A. Vasquez, and R. J. J. Williams, *Polym. Bull.*, 1991, 27, 9–15.
- 58. B. S. Rubin, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2011, **127**, 27–34.
- A. Gies and A. M. Soto, *Late lessons from early Warn. Sci. precaution, Innov.*, 2013, 2, 215–239.
- J. Peretz, L. Vrooman, W. A. Ricke, P. A. Hunt, S. Ehrlich, R. Hauser, V. Padmanabhan, H. S. Taylor, S. H. Swan, C. A. Vandevoort, and J. A. Flaws, *Environ. Health Perspect.*, 2014, **122**, 775–786.
- 61. J. Lukaszczyk, B. Janicki, and M. Kaczmarek, *Eur. Polym. J.*, 2011, **47**, 1601–1606.
- 62. M. Chrysanthos, J. Galy, and J. P. Pascault, *Polymer (Guildf).*, 2011, **52**, 3611–3620.
- 63. A. Maiorana, S. Spinella, and R. A. Gross, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 1021–1031.
- 64. E. D. Hernandez, A. W. Bassett, J. M. Sadler, J. J. La Scala, and J. F. Stanzione, ACS Sustain. Chem. Eng., 2016, 4, 4328–4339.
- 65. Q. Chen, K. Gao, C. Peng, H. Xie, Z. K. Zhao, and M. Bao, *Green Chem.*, 2015, **17**, 4546–4551.
- 66. A. Llevot, E. Grau, S. Carlotti, S. Grelier, and H. Cramail, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2016, **125**, 34–41.
- 67. F. Pion, A. F. Reano, P.-H. Ducrot, and F. Allais, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 8988.
- 68. A. F. Reano, S. Domenek, M. Pernes, J. Beaugrand, and F. Allais, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2016.
- 69. F. Pion, P. H. Ducrot, and F. Allais, *Macromol. Chem. Phys.*, 2014, **215**, 431–439.
- 70. A. Maiorana, A. F. Reano, R. Centore, M. Grimaldi, P. Balaguer, F. Allais, and R. A. Gross, *Green Chem.*, 2016.
- 71. http://www.solvay.com/en/markets-and-products/featured-products/epicerol.html, .
- 72. C. I. Simionescu, V. Rusan, M. M. Macoveanu, G. Cazacu, R. Lipsa, C. Vasile, A. Stoleriu, and A. Ioanid, *Compos. Sci. Technol.*, 1993, **48**, 317–323.

- 73. L. L. Kosbar, J. D. Gelorme, R. M. Japp, and W. T. Fotorny, *J. Ind. Ecol.*, 2000, **4**, 93–105.
- 74. D. Feldman and M. Khoury, J. Adhes. Sci. Technol., 1988, 2, 107–116.
- 75. A. Llevot, E. Grau, S. Carlotti, S. Grelier, and H. Cramail, *Polym. Chem.*, 2015, **6**, 6058–6066.
- 76. M. Fache, E. Darroman, V. Besse, R. Auvergne, S. Caillol, and B. Boutevin, *Green Chem.*, 2014, **16**, 1987.
- 77. H. Sharp, D. Thomas, F. Currie, C. Bright, Z. Latif, S. D. Sarker, and R. J. Nash, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 325–327.
- 78. W. Monthong, S. Pitchuanchom, and N. N. and W. Pompimon, *Am. J. Appl. Sci.*, 2011, 8, 1268–1271.
- 79. http://www.societechimiquedefrance.fr/lignine, .
- 80. http://swanca.ca/main/index.php/what-we-do/item/10-bio-plastic-from-lignin, .
- 81. K. Monties, B.; Fukushima, Occurence, Function and Biosynthesis of Lignins, in Lignin, Humic Substances and Coal (Biopolymers, Vol. 1), Wiley-VCH, 2001.
- R. Vanholme, B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, and W. Boerjan, *Plant Physiol.*, 2010, 153, 895–905.
- 83. L. Jouanin, in Académie d'Agriculture de France Lignine Biologie moléculaire de la lignification, l'art de faire des lignines à façon, 2010, pp. 1–5.
- 84. R. Whetten and R. Sederoff, *Plant Cell*, 1995, **7**, 1001–1013.
- 85. K V Sarkanen; Charles Heberle Ludwig, *Precursors and their polymerization, in Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Wiley-Interscience, New York, 1971.
- 86. T. Q. Yuan, S. N. Sun, F. Xu, and R. C. Sun, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 10604–10614.
- 87. B. E. G.-A. & M. A. D.-V. Carlos Regalado, *Phytochem. Rev.*, 2004, **3**, 243–256.
- 88. Lab. Rech. en Sci. végétales, https://www.lrsv.ups-tlse.fr/?-Peroxydases-evolution-et-.
- 89. K. Wakamatsu and U. Takahama, *Physiol. Plant.*, 1993, **88**, 167–171.

- 90. J. N. Rodríguez-López, D. J. Lowe, J. Hernández-Ruiz, a N. Hiner, F. García-Cánovas, and R. N. Thorneley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 11838–11847.
- 91. A. Li, Y. Zhu, L. Xu, W. Zhu, and X. Tian, *African J. Biochem. Res.*, 2008, **2**, 181–183.
- A. Sethuraman, D. E. Akin, and K. E. L. Eriksson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52, 689–697.
- G. Benfield, S. M. Bocks, K. Bromley, and B. R. Brown, *Phytochemistry*, 1964, **3**, 79– 88.
- 94. L. Gianfreda, F. Xu, and J.-M. Bollag, *Bioremediat. J.*, 1999, **3**, 1–26.
- 95. N. T. Dittmer, M. J. Gorman, and M. R. Kanost, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2009, **39**, 596–606.
- 96. W. Nakamura, J. Biochem., 1967, 62, 54–61.
- 97. R. Sterjiades, J. F. Dean, and K. E. Eriksson, *Plant Physiol.*, 1992, **99**, 1162–1168.
- 98. A. Driouich, A. Laine, B. Vian, and L. Faye, *Plant J.*, 1992, **2**, 13–24.
- 99. R. R. S. David M. O'Malley, Ross Whetten, Wuli Bao, Chen-Loung Chen, *Plant J.*, 1993, **4**, 751–757.
- S. Berthet, J. Thevenin, D. Baratiny, N. Demont-Caulet, I. Debeaujon, P. Bidzinski, J. C. Leple, R. Huis, S. Hawkins, and L.-D. Gomez, *Lignins Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering*, Elsevier, 2012, vol. 61.
- 101. X. Sun, R. Bai, Y. Zhang, Q. Wang, X. Fan, J. Yuan, L. Cui, and P. Wang, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, **171**, 1673–1680.
- 102. F. Xu, *Biochemistry*, 1996, **35**, 7608–7614.
- 103. C. Crestini and D. S. Argyropoulos, *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, 6, 2161–2169.
- 104. Q. Chen, M. N. Marshall, S. M. Geib, M. Tien, and T. L. Richard, *Bioresour. Technol.*, 2012, **117**, 186–192.
- 105. V. Madhavi and S. S. Lele, *BioResources*, 2009, 4, 1694–1717.
- 106. M. Tišma, P. Žnidaršič-Plazl, D. Vasić-Rački, and B. Zelić, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, **166**, 36–46.
- 107. S. Rodriguez Couto and J. L. Toca Herrera, *Biotechnol. Adv.*, 2006, 24, 500–513.

- 108. S. Kurniawati and J. A. Nicell, *Bioresour. Technol.*, 2008, **99**, 7825–7834.
- 109. A. M. Mayer and R. C. Staples, *Phytochemistry*, 2002, **60**, 551–565.
- 110. H. P. Call and I. Mucke, J. Biotechnol., 1997, 53, 163–202.
- 111. S. D. Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, **49**, 257–280.
- 112. K.-E. L. E. Kaichang LI, Feng XU, Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65, 2654–2660.
- 113. K. Piontek, M. Antorini, and T. Choinowski, J. Biol. Chem., 2002, 277, 37663–37669.
- 114. J. Porath and P. Flodin, *Nature*, 1959, **183**, 1657–1659.
- 115. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/proteomics-and-protein/proteomics/chromatography_gel_filtration.pdf, .
- C. Rolando, B. Monties, and C. Lapierre, in *Methods in Lignin Chemistry*, eds. S.Y. Lin and C. W. Dence, Springer Series in Wood Science, 1992, pp. 334–349.
- 117. J. L. Wen, S. L. Sun, B. L. Xue, and R. C. Sun, *Materials (Basel).*, 2013, 6, 359–391.
- 118. K. Lundquist, Acta Chem. Scand. B, 1981, 35, 497–501.
- 119. G. E. Hawkes, C. Z. Smith, J. H. P. Utley, R. R. Vargas, and H. Viertler, *Holzforschung*, 1993, **47**, 302–312.
- 120. K. Lundquist, Nord. Pulp Pap. Res. J., 1991, 3, 140–146.
- 121. D. S. Argyropoulos, J. Wood Chem. Technol., 1994, 14, 65–82.
- 122. D. S. Argyropoulos, J. Wood Chem. Technol., 1994, 14, 45–63.
- 123. M. Farasat, R. A. Khavari-Nejad, S. M. B. Nabavi, and F. Namjooyan, *Iran. J. Pharm. Res.*, 2014, **13**, 163–170.
- 124. V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, *Methods Enzymol.*, 1999, **299**, 152–178.
- 125. A. R. F. D. C. De Ascensao and I. A. Dubery, *Phytochemistry*, 2003, **63**, 679–686.
- 126. O. Broussard, M. Petit, N. Elie, S. Baumberger, A. Arnaud, P.-H. Ducrot, and F. Allais, *Holzforschung*, 2016, **0**.
- 127. D. R. Robert, M. Bardet, G. Gellerstedt, and E. L. Lindfors, J. Wood Chem. Technol.,

1984, **4**, 239–263.

- 128. V. L. Singleton and J. A. . J. Rossi, Am. J. Enol. Vitic., 1965, 16, 144–158.
- 129. P. Ribéreau-Gayon, Les composés phénoliques des végétaux, Paris, 1968.
- 130. A. C. Freudenberg, Karl, Neish, *Constitution and Biosynthesis of Lignin*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1st edn., 1968.
- 131. O. Faix, *Holzforschung*, 1986, **40**, 273–280.
- 132. O. Faix and O. Beinhoff, J. Wood Chem. Technol., 1988, 8, 505–522.
- B. Cottyn, A. Kollmann, P. Waffo-Teguo, and P. H. Ducrot, *Chem. A Eur. J.*, 2011, 17, 7282–7287.
- 134. M. K. Carter, J. Mol. Struct., 2007, 831, 26–36.
- 135. V. Méchin, S. Baumberger, B. Pollet, and C. Lapierre, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 571–579.
- 136. K. V. Sarkanen and G. H. Ludwig, *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1971.
- 137. A. Olasz, P. Mignon, F. De Proft, T. Veszprémi, and P. Geerlings, *Chem. Phys. Lett.*, 2005, **407**, 504–509.
- 138. I. Stoilova, A. Krastanov, and V. Stanchev, Adv. Biosci. Biotechnol., 2010, 1, 208–215.
- 139. M. O. Sinnokrot, E. F. Valeev, and C. D. Sherrill, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 10887–10893.
- 140. H. Sun, K. Ye, C. Wang, H. Qi, F. Li, and Y. Wang, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 10750–10756.
- 141. K. P. Kepp, Inorg. Chem., 2015, 54, 476–483.
- 142. N. Harwardt, N. Stripling, S. Roth, H. Liu, U. Schwaneberg, and A. C. Spiess, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 17097–17104.
- 143. A. P. M. Tavares, J. A. N. Pereira, and A. M. R. B. Xavier, *Eng. Life Sci.*, 2012, **12**, 648–655.
- 144. O. Rodriguez, A. P. M. Tavares, R. Cristóvão, and E. A. Macedo, *Ionic Liquids: Alternative Reactive Media for Oxidative Enzymes, Ionic Liquids: Applications and*

Perspectives, In Tech, 2011.

Chapitre 2 : Etude de la polymérisation *in vitro* des monolignols G et S

1. Introduction

Ce chapitre porte sur la polymérisation contrôlée des monolignols pour la valorisation des lignines de synthèse en tant qu'antioxydants ou monomères. Utiliser ces composés phénoliques comme synthons pour la chimie verte est un enjeu très important. Dans la plante, l'oxydation *in vivo* des monomères phénoliques (monolignols) en présence des oxydases telles que les laccases ou les peroxydases, donne lieu à des oligomères/polymères phénoliques complexes avec divers types de liaisons entre les monomères. Dans le but de valoriser cette biomasse, il va falloir contrôler cette polymérisation afin d'avoir des structures les plus régulières et monodisperses possible.

Durant ces travaux, nous avons cherché à mettre en place des protocoles expérimentaux pour la réalisation des lignines de synthèse *in vitro* aussi connues sous le nom de DHP (DeHydroPolymers). Plusieurs paramètres ont été étudiés comme la température, le co-solvant, le mode et la vitesse d'ajout des réactifs. Les masses molaires et les polydispersités des DHP résultants ont été déterminées par GPC. La RMN a été utilisée pour la caractérisation structurale partielle des DHP. Ces analyses ont ensuite permis de déterminer l'impact des différents paramètres sur la polymérisation des monolignols.

L'étude a porté sur les monolignols G et S vue leur abondance dans les lignines naturelles. Le monolignol H, moins présent, n'a pas été étudié. La laccase de *Trametes versicolor* a été choisie comme enzyme pour l'oxydation des substrats à cause de son avantage d'utiliser l'oxygène comme co-oxydant mais aussi du fait de sa capacité à oxyder facilement un grand nombre de substrats. Les mécanismes d'oxydation et de recombinaison de ces monomères ne sont pas totalement connus. Une étude des mécanismes mis en jeu lors de la polymérisation des monolignols a été réalisée. Enfin, les phénols libres des DHP ont été ensuite quantifiés *via* le test Folin Ciocalteau pour la valorisation potentielle des DHP en tant qu'antioxydants et synthons pour la chimie.
2. Démarche

Afin de pouvoir synthétiser les DHP, les deux monolignols ont été synthétisés au préalable. Le monolignol G est obtenu à partir de l'acide férulique commercial en deux étapes. La première étape est une estérification de Fischer en présence d'acide chlorhydrique dans l'éthanol à reflux pour donner le férulate d'éthyle avec un rendement de 98%. La deuxième étape est une réduction de l'ester en alcool par l'hydrure de diisobutylaluminium DIBAL-H pour donner le monolignol G avec un rendement de 71% (Figure 43).



Figure 43 : Synthèse du monolignol G

Le monolignol S est synthétisé à partir du syringaldehyde en 3 étapes (Figure 44) dû au cout plus élevé de l'acide sinapique. La première étape est une condensation de Knoevenagel¹ de l'acide malonique sur le syringaldehyde pour donner l'acide sinapique (91%). La deuxième étape est une estérification de Fischer de l'acide sinapique en sinapate d'éthyle (93%). Finalement l'ester est réduit en alcool pour donner le monolignol S avec un rendement global de 59% sur les 3 étapes.



Figure 44 : Synthèse du monolignol S

Une fois les monolignols obtenus, les DHP ont été synthétisés en présence de la laccase de *Trametes versicolor*. La laccase a été préférée à la peroxydase comme enzyme d'oxydation des monolignols pour plusieurs raisons. La laccase permet d'une part l'oxydation des phénols en utilisant un co-facteur facilement accessible, l'oxygène, alors que les peroxydases font intervenir le peroxyde d'hydrogène. Les peroxydases sont d'autre part des enzymes relativement spécifiques de certains substrats phénoliques. Il est démontré dans la littérature qu'elle n'arrive pas à oxyder efficacement le monolignol S dû à l'encombrement

stérique apporté par les deux groupements méthoxy². A l'inverse, la laccase n'est pas spécifique et arrive à oxyder les monolignols G et S de la même façon.

Des modes opératoires ont été mis en place pour la synthèse contrôlée des DHP. Comme décrit dans la partie bibliographique, il existe deux types de modes d'ajout de l'enzyme utilisés en général : Zulauf (ZL) et Zutropf (ZT). Le premier est un ajout rapide où l'enzyme et le substrat sont ajoutés d'un coup dans le milieu réactionnel alors que le deuxième est un ajout goutte à goutte des deux partenaires.

Il est à noter que, dans ce projet, on ne s'intéresse pas à avoir une approche biomimétique de la biosynthèse de lignine mais plutôt à optimiser des modes opératoires permettant de contrôler la polymérisation des monolignols en oligomères le moins polydisperses possible. On a donc voulu simplifier la procédure par rapport à ZL et ZT en ne rajoutant qu'un seul des protagonistes dans le milieu contenant l'autre, soit laccase sur substrat (L/S) soit substrat sur laccase (S/L) en variant la vitesse d'ajout, soit un ajout rapide soit avec un débit contrôlé. On appellera donc ces deux modes d'ajout rapide (R) et lent (L) pour ne pas porter confusion avec les termes plus précis comme ZL et ZT. Ces deux modes d'ajouts vont permettre d'avoir une meilleure compréhension du système, en particulier des concentrations respectives des deux partenaires dans le milieu à l'instant t. Le mode d'ajout lent a été préféré au début de la thèse car il est supposé permettre de mieux contrôler la polymérisation. En mode L/S lent, les monolignols seront oxydés progressivement et la concentration en radicaux sera plus faible qu'en mode rapide. Lors d'une étude sur la polymérisation du monolignol G par la peroxydase, Méchin et al.³ ont en effet démontré qu'un faible ratio enzyme/substrat permet de mieux contrôler la polymérisation donnant des polymères moins condensés.



Figure 45 : Deux différents modes d'ajout (rapide (R) et lent (L))

Nous avons commencé par définir un protocole de polymérisation pour les monolignols G et S. La Figure 46 schématise le dispositif mis en place pour cette étude. Deux solutions ont d'abord été préparées. La première est une solution contenant le substrat (1 g de

monolignol) dissout dans un minimum d'acétone (10 mL pour solubiliser le monolignol), puis diluer dans du tampon citrate/phosphate à pH 4.5 (20% acétone/80% tampon). La deuxième est une solution de laccase de *Trametes versicolor* (0.1 U/mg de substrat) dans le tampon citrate/phosphate (50 mL) à pH 4.5. Une fois les deux solutions préparées, elles ont été mélangées selon les deux modes : mode L/S et mode S/L (Figure 46). Le mode L/S est l'ajout de la solution de laccase dans la solution de substrat et le mode S/L est l'ajout de la solution de laccase dans la solution de substrat et le mode S/L est l'ajout de la solution de substrat dans la solution de laccase. En nous basant sur les travaux de Méchin *et al.*³ concernant les modes ZL et ZT, la vitesse d'ajout des réactifs en mode L/S et S/L a été programmée à 9 mL/h à l'aide d'une pousse-seringue. La durée des réactions a été maintenue à 5h30, correspondant à l'ajout total de la solution de A (50 mL) dans le milieu réactionnel.



Figure 46 : Schéma du mode opératoire de polymérisation des monolignols

A la fin des réactions, des précipités ont été obtenus dans certains cas. Ces derniers ont été séparés du surnageant par centrifugation (Figure 47). Deux fractions ont ainsi été obtenues :

(i) Le surnageant

Les DHP du surnageant ont été extraits avec de l'acétate d'éthyle, séchés à l'étuve et analysés en GPC et RMN liquide. On appellera cette fraction, les DHP solubles (**DHP sol**).

(ii) Le précipité

Les DHP précipités dans le milieu réactionnel ont été lavés à l'eau milliQ et à l'acétate d'éthyle puis séchés à l'étuve. Ces DHP n'étant pas solubles dans l'acétate d'éthyle, on les appellera les DHP insolubles (**DHP insol**). Ces DHP se sont aussi révélés insolubles dans la plupart des solvants organiques classiques (e.g., acétone, DMSO). Ils ont finalement été acétylés afin d'augmenter leur solubilité pour une analyse plus fine en GPC et RMN.



Figure 47 : Traitement de la réaction après polymérisation

Plusieurs paramètres ont été étudiés tels que la température, le mode d'ajout (L/S ou S/L), la nature et le pourcentage de co-solvant. Ces paramètres ont été variés dans le cas de l'oxydation enzymatique des deux monolignols G et S. Comme les conditions de réactions sont des facteurs déterminants influant sur les couplages entre monolignols, nous avons voulu d'abord évaluer le rapport des DHP **sol/insol** d'un point de vue massique. Puis on a cherché à déterminer l'influence et l'impact de ces paramètres sur la structure des DHP résultants par GPC et RMN (masse molaire, polydispersité, nature des liaisons) et les phénols libres présents par Folin Ciocalteu (pour le pouvoir antioxydants).

3. Résultats et discussion

1. Etude de l'effet du mode d'ajout et de la température sur la polymérisation des monolignol G et S

4. Cas du monolignol G

Nous avons commencé par étudier l'effet du mode d'ajout et de la température sur la polymérisation du monolignol G en mode lent. La synthèse des DHP a été réalisée selon les deux protocoles précédemment décrits (Modes L/S et S/L). Deux températures différentes compatibles avec une bonne activité de l'enzyme. Les expériences ont été réalisées à température ambiante (T.A~25 °C) et à 40 °C. Après la réaction, les fractions solubles et insolubles obtenues ont été séchées et pesées. La Figure 48 représente les pourcentages massiques des fractions obtenues pour chaque mode d'ajout à T.A et 40 °C.



Figure 48 : Pourcentage des fractions solubles/insolubles obtenus pour le monolignol G (T.A et 40 °C)

A température ambiante, on peut constater que quelque soit le mode d'ajout (L/S ou S/L), les pourcentages en **DHP sol** sont quasiment les mêmes pour le monolignol G (11-15%). Cependant, en augmentant la température à 40 °C, les DHP obtenus lors du mode d'ajout L/S étaient totalement solubles. Ces résultats montrent que la température a un impact en mode d'ajout L/S pour le monolignol G. Dans tous les cas, sauf pour le mode d'ajout L/S à 40 °C, les **DHP insol** sont majoritaires. La formation de ces insolubles peut provenir des masses molaires plus élevés et/ou des structures différentes des **DHP insol** comparés aux **DHP sol**.

Les **DHP sol** ont donc été analysés en GPC afin de déterminer leurs masses molaires moyennes et leurs polydispersités. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 49.



Figure 49 : Masses molaires moyennes des DHP solubles (T.A et 40 °C), résultats évalués par GPC calibrée polystyrène

A T.A, on peut observer que les M_n des fractions solubles obtenues sont légèrement plus hautes pour le mode d'ajout L/S que pour le mode S/L. Néanmoins, des DHP un peu plus polydisperses ont été obtenus pour le mode L/S. A 40 °C, la tendance des M_n est inversée. En effet, des degrés de polymérisation légèrement plus importants ont été obtenus pour le mode S/L. Globalement, les valeurs de M_n obtenues pour la partie soluble sont faibles et ne sont pas très différentes suivant les différentes conditions réactionnelles étudiées (mode d'ajout, température).

Les analyses RMN ont été réalisées sur les **DHP sol** obtenus pour l'ajout L/S (T.A et 40 °C) afin de déterminer les structures et types de liaisons présents. Figure 50 représente les spectres RMN ¹H.



Figure 50 : RMN ¹H des DHP solubles issus du monolignol G en mode L/S (T.A et 40 °C)

La RMN démontre que globalement les structures des **DHP sol** sont les mêmes avec la présence des liaisons β - β et β -5 en quantité majoritaire. Selon l'intégration des pics à 5,55 et 4,65 ppm, plus de liaisons β -5 ont été observées à 40 °C qu'à T.A (mode L/S). Deux fois plus de liaison β -5 a été obtenu par rapport aux liaisons β - β à 40 °C contre 1.4 fois à T.A. Dans les deux cas, on n'observe que très peu de liaisons β -O-4 (signaux à 4,85 ppm) et l'intégration de la région oléfinique (6,2-6,6 ppm) est en accord avec les faibles degrés de polymérisation.

N'ayant pas de masses molaires élevées pour les **DHP sol**, notre attention s'est ensuite portée sur les **DHP insol**. Ces fractions n'étant pas solubles dans des solvants organiques classiques, l'acétylation des **DHP insol** a été nécessaire pour augmenter la solubilité avant les analyses. La réaction d'acétylation a été réalisée en présence de pyridine et d'anhydride acétique à température ambiante pendant 16 h.

Les DHP insolubles acétylés ainsi obtenus ont été analysés en GPC. Figure 51 montre les résultats des masses molaires obtenus pour les deux modes d'ajouts à T.A et 40 °C.



Figure 51 : Masses molaires moyennes des DHP insolubles-acétylés (T.A et 40 °C), résultats évalués par GPC calibrée polystyrène

Sur la Figure 51, on peut constater que les **DHP insol** sont plus polydisperses que les **DHP sol** (Ip > 2.0). De plus, les M_n sont plus élevées sauf pour l'ajout mode L/S à T.A où une M_n similaire a été obtenue. En comparant les différentes conditions pour les **DHP insol**, les résultats montrent que la M_n la plus importante est obtenue à 40 °C et en utilisant l'ajout mode S/L. En se basant sur les résultats des **DHP insol**, un meilleur rapport M_n /basse polydispersité des DHP issus du monolignol G est obtenu dans les conditions d'ajout mode S/L à T.A.

A priori, la différence de solubilité peut être expliquée par la différence des masses molaires entre les **DHP sol** et **insol**. Les **DHP insol** issus du mode d'ajout S/L (40 °C) possèdent des masses molaires plus élevées que les **DHP sol** (mode S/L, 40 °C). Dès lors, les **DHP insol** précipitent logiquement dans le milieu réactionnel et la croissance des chaînes s'arrête. Cependant, les **DHP sol** et **insol** obtenus lors de l'ajout mode L/S à T.A, possèdent des masses molaires assez proches. La différence de solubilité ne peut donc pas être uniquement reliée à la masse molaire des DHP. On a donc fait l'hypothèse que cette différence de solubilité doit aussi être due à des différences de structure (type de liaisons) des **DHP sol** et **insol**. Afin de vérifier notre hypothèse, les **DHP insol acétylés** (mode L/S, T.A) (Figure 52).



Figure 52 : RMN ¹H des DHP solubles et insolubles issus du monolignol G après acétylation (mode L/S, T.A)

Les RMN démontrent que les DHP solubles et insolubles semblent avoir des structures, en termes de types de liaisons intermonomères dans l'oligomère, relativement comparables. Il faut donc supposer, en attendant des études plus poussées permettant d'avoir une idée des séquences des liaisons dans les différents DHP, que ces séquences sont le paramètre crucial influant sur la conformation globale des DHP, leurs capacités d'auto-agrégation et donc, au final, leur solubilité.

Les RMN ¹H des **DHP insol acétylés** en mode S/L (T.A et 40 °C) ont ensuite été comparées afin de déterminer un éventuel impact de conditions réactionnelles sur les structures des **DHP insol** (Figure 53).



Figure 53 : RMN ¹H des DHP insolubles issus du monolignol G en mode L/S (T.A et 40 °C)

Les RMN des **DHP insol** montrent globalement les mêmes absences de différences significatives quelques soient les conditions réactionnels utilisées. Les liaisons β - β et β -5 ont encore une fois été identifiées comme majoritaires. Les spectres des **DHP insol** en mode S/L (40 °C et T.A) sont moins résolutifs comparés aux **DHP insol** issus du mode L/S à T.A. Cette observation donne une indication de plus haut DP des oligomères en mode S/L et suit les mêmes tendances observées en GPC.

Pour résumer cette partie, les masses molaires des **DHP sol** obtenues sont assez faibles (0.6-0.8 KDa). Les différentes conditions réactionnelles n'ont pas eu un réel impact ni sur le degré de polymérisation ni sur la structure des DHP. Les masses molaires de ces DHP étaient quasiment les mêmes. L'analyse RMN a aussi démontré des structures assez similaires avec des liaisons β - β et β -5 majoritaires. Les **DHP insol** obtenus ont des masses molaires plus élevés que les solubles (~1.5 KDa). Comme pour les **DHP sol**, les insolubles composait essentiellement des liaisons β - β et β -5 en quantités majoritaires.

Il est néanmoins notable que le mode L/S à 40°C ne donne qu'une fraction soluble, certes de poids moléculaire moyen relativement faible, présentant une faible polydispersité (autour de DP 3) et une homogénéité de structure assez forte. Cette fraction de DHP solubles pourrait être un bon candidat pour des études ultérieures en tant qu'additif dans des matériaux polymères (faute de temps, ces études n'ont pas été amorcées au cours de cette thèse)

5. Cas du monolignol S

On a ensuite voulu également étudier l'impact de ces mêmes paramètres (mode d'ajout et température) sur la polymérisation du monolignol S. Le même protocole que dans le cas du monolignol G a été appliqué. Les pourcentages massiques des DHP obtenus pour chaque mode d'ajout sont représentés sur la Figure 54.



Figure 54 : Pourcentage des fractions solubles/insolubles obtenus pour le monolignol S (T.A et 40 °C)

En comparant les DHP obtenus à T.A, le mode d'ajout a démontré un impact significatif sur la proportion des **DHP sol/insol**. Aucun insoluble n'a été obtenu lors de l'ajout mode L/S (T.A) tandis que la majeure partie (98%) était des insolubles en mode S/L. Lors de l'augmentation de la température, des DHP totalement solubles ont été obtenus quelque soit le mode d'ajout. Ces résultats démontrent l'impact du mode d'ajout et de la température sur la proportion des **DHP sol** et **insol**.

Afin de déterminer un éventuel impact de ces paramètres sur la polymérisation du monolignol S, les masses molaires de ces DHP ont été caractérisées en GPC. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 55.



Figure 55 : Masses molaires moyennes des DHP solubles (T.A et 40 °C), résultats évalués par GPC calibrée polystyrène

Globalement, on peut constater que les M_n obtenus pour les **DHP sol** sont légèrement plus faibles que dans le cas du monolignol G ($M_n < 0.5$ KDa). Pour l'ajout mode S/L à T.A., un produit ayant une masse molaire inférieure à celui du monolignol S a été obtenu en quantité majoritaire. Ce composé se trouve être un produit de dégradation de la réaction et a été identifié en RMN comme étant la 2,6-diméthoxybenzoquinone (2,6-DMBQ). La RMN a démontré que les **DHP sol** en mode L/S à T.A. sont essentiellement composés des liaisons β -O-4, des produits de dégradation venant de la déshydratation des liaisons β -O-4 et des produits de suroxydation. La 2,6-DMBQ est quant à elle un produit spécifique de la dégradation des liaisons β -O-4.

A 40 °C, les M_n sont identiques quelque soit le mode d'ajout. Selon les résultats de GPC, les DHP à 40 °C étaient majoritairement composés de dimères. Les analyses RMN ont été réalisées sur les **DHP sol** obtenus à 40 °C afin de déterminer leurs structures. La Figure 56 représente les spectres RMN ¹H des deux fractions.



Figure 56 : RMN ¹H des DHP solubles issus du monolignol S à 40 °C (Modes L/S & S/L)

L'analyse RMN a confirmé la présence d'un dimère en quantité majoritaire dans les **DHP sol** à 40 °C (modes L/S & S/L). Ce dimère a été identifié comme étant le syringarésinol (issus d'un couplage β - β). Le monolignol S possède deux groupements méthoxy sur le noyau aromatique, limitant ainsi le nombre de couplage. Lors de l'oxydation du monolignol S, seulement deux types de couplages sont donc possibles, le couplage β - β et β -O-4 (Figure 57). La formation du syringarésinol en quantité majoritaire représente un résultat intéressant car ils permettent de démontrer que la température peut apporter une certaine sélectivité au niveau du couplage du monolignol S. Les impacts du mode d'ajout (plus de liaisons β -O-4 en mode S/L) et de l'effet de la température (moins de β -O-4 à 40 °C) montrent respectivement l'importance du ratio radical/substrat non oxydé et des interactions intermoléculaires sur la formation des différents types de liaison dans les DHP et confirment par là même les résultats obtenus par Cottyn *et al.*⁴ sur la dimérisation du resvératrol et leur généralisation possible à l'oxydation des monolignols.



Figure 57 : Les deux types de couplage possibles lors de l'oxydation enzymatique du monolignol S

Le syringarésinol est d'autre part une molécule d'intérêt. C'est un bisphénol rigide, qui peut être envisagé comme une substitution des bisphénols pétro-sourcés tels que le bisphénol A. Il peut donc être valorisé comme antioxydant ou synthon pour synthétiser des nouveaux monomères aromatiques biosourcés. L'optimisation de la synthèse du syringarésinol ainsi que ses propriétés biologiques seront réalisées dans le chapitre 3 ; ce sont ses potentialités et l'optimisation de son obtention qui nous ont amenés à développer les différents approches dans le domaine de la synthèse de polymères à base de syringarésinol qui seront décrites dans les chapitres suivants.

Les DHP obtenus dans un milieu tampon/acétone n'ayant pas atteint des masses molaires assez élevées, nous nous sommes donc focalisés, afin de les améliorer, sur l'utilisation de liquides ioniques pour la synthèse des DHP.

2. Etude de l'effet des liquides ioniques sur la polymérisation

Les liquides ioniques sont des sels constitués de cations organiques associés avec des anions inorganiques ou organiques possédant des températures de fusion inférieure à 100 °C. Suivant le choix du cation et l'anion, des propriétés physicochimiques différentes peuvent être obtenues. Les liquides ioniques sont généralement connus pour être des bons solvants des composés organiques. Ils sont largement utilisés en polymérisation notamment pour leur propriété de solubilité. Bien que certains liquides ioniques diminuent de manière notable l'activité des oxydases, il a été démontré que certains sont compatibles avec une activité enzymatique suffisante suivant la quantité utilisée⁵. Comme les liquides ioniques sont constitués uniquement par des ions, ces derniers sont susceptibles d'interagir avec les acides aminés ou le site actif pour désactiver l'enzyme. Les propriétés spécifiques des

liquides ioniques affectent également la stabilité enzymatique, telle que la polarité et la viscosité. Il est donc important de faire un choix approprié de liquides ioniques avant de les utiliser pour une réaction enzymatique donnée.

Le choix des liquides ioniques a d'abord été fait en se basant sur les résultats préliminaires obtenus au cours du stage d'Enora Poquet dans l'équipe IJPB à l'INRA de Versailles. Les résultats ont démontré que certains liquides ioniques sont capables d'augmenter l'activité de certaines oxydases et d'influer sur les mécanismes chimiques impliqués dans la polymérisation des composés phénoliques. En effet, lors de leur étude sur la polymérisation du monolignol G avec la peroxydase de raifort (HRP II) dans un milieu contenant un mélange de liquide ionique [Bmim.NTf₂] (30%) et du tampon phosphate, des oligomères avec des motifs de répétitions de 303 uma (GC-MS) correspondant a un enchainement de liaison du type β-O-4 ou β-5/β-O-4 ont été obtenues. Ces résultats encourageants avaient donc démontré qu'il était possible de contrôler dans une certaine mesure la polymérisation et le type de couplage des monolignols. Néanmoins, ces expériences avaient été réalisées à petite échelle (10 mg de monolignol G) et avec une peroxydase. Nous avons donc tenté de transposer ces expériences à plus grande échelle (500 mg de monolignol G) en continuant néanmoins à utiliser la laccase de Trametes versicolor comme enzyme pour avoir des résultats comparables à ceux obtenus précédemment. L'augmentation de l'échelle va mieux permettre de caractériser les DHP résultants par plusieurs méthodes d'analyses (RMN, GPC, quantification des phénols libres,...), puis de réaliser des tests (DPPH, OIT, polymérisation) pour les valoriser en tant qu'antioxydants et synthons pour la chimie.

1. Le liquide ionique [Bmim.NTf₂]

Avant de procéder à la synthèse des DHP dans le [Bmim.NTf₂], l'activité enzymatique a été testée pour vérifier s'il existe un effet inhibiteur de ce liquide ionique sur la laccase. Le test a révélé une activité légèrement supérieure (10.9 U/mg) en présence de 30% de [Bmim.NTf₂] qu'à celle obtenue dans le tampon seul (9.1 U/mg). Suite à ce résultat, la première expérience a donc été réalisée sur le monolignol G dans un milieu contenant 30% de liquide ionique [Bmim.NTf₂] et 70% de tampon citrate/phosphate à pH 4.5. La solution de laccase a été ajoutée dans le milieu contenant le substrat et le liquide ionique selon l'ajout mode L/S. La Figure 58 schématise le montage réactionnel. Après 5h30min de réaction, la fraction insoluble obtenue a été séparée par centrifugation. Le [Bmim.NTf₂] étant un liquide ionique hydrophobe, deux phases ont été obtenues pour le surnageant. Les DHP présents dans la phase aqueuse ont été extraits à l'acétate d'éthyle (**Aq ext**) et ceux présents dans la phase LI ont été extraits au toluène (**LI ext**).



Figure 58 : Montage réactionnel de la polymérisation du monolignol G en présence de 30% Bmim NTf2

Les fractions **Aq ext** et **LI ext** ont été analysées en GPC. Figure 59 montre les chromatogrammes obtenus pour les deux fractions.



Figure 59 : Superposition des chromatogrammes GPC issus de l'extraction de la phase aqueuse (vert) et liquide ionique (violet)

Des M_n de 0.5 KDa et 0.8 KDa ont été obtenues pour les DHP présents dans la phase aqueuse et la phase LI respectivement. On peut constater que les deux fractions **Aq ext** et **LI ext** contiennent des dimères (t_R ~14 min), des oligomères, du monolignol G non-réagit et de la vanilline issue de la dégradation des DHP. Les masses molaires obtenues ne sont pas très supérieures à celles obtenues dans le milieu tampon/acétone. De plus, des problèmes de récupération du LI ont étaient rencontrés. Le chromatogramme GPC de la fraction **LI ext** a montre qu'il y a présence d'un pic correspondant au LI résiduel. L'analyse RMN ¹H a par la suite confirmé la présence du [Bmim.NTf₂] dans la fraction **LI ext**.

Le coût du [Bmim.NTf₂] étant assez élevé, la récupération du LI après les réactions est nécessaire. D'autres solvants d'extractions tels que l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle ont été testés pour palier ce problème mais ont malheureusement donné les mêmes résultats. Suite aux problèmes de récupération du [Bmim.NTf₂] et des faibles masses molaires obtenues lors de la polymérisation, nous avons fait le choix de changer de LI.

2. Le liquide ionique Bmim.Br

Afin de trouver un LI compatible avec la laccase de *Trametes versicolor* et en même temps miscible à l'eau dans le but d'avoir une phase homogène, une étude bibliographique sur les LI a été réalisée. Selon les travaux de Shipovskov *et al.*⁶, la laccase de *Trametes versicolor* est active dans un milieu pouvant contenir jusqu'à 20% de Bmim.Br. De plus, étant un LI hydrophile, le mélange avec le tampon citrate/phosphate donnera un milieu homogène pour la polymérisation. Sa forte affinité à l'eau et son immisciblilité à l'acétate d'éthyle rendra sa récupération après la réaction encore plus efficace. Notre choix s'est donc porté sur le Bmim.Br.

Nous avons réalisé la polymérisation du monolignol G suivant le même protocole que dans le cas du [Bmim.NTf₂]. Bien qu'il soit référencé⁶ comme affectant notablement l'activité enzymatique à concentrations élevées (à partir de 30%), les polymérisations ont été réalisées en utilisant différents pourcentages de Bmim.Br (10, 20, 30 et 50 % v/v). En effet, en utilisant plus de LI, on espère avoir une meilleure solubilité des DHP dans le milieu et au final des masses molaires plus élevées.

Après les réactions, aucun insoluble n'a été obtenu. Les DHP présents dans la phase aqueuse (contenant aussi le Bmim.Br) ont été extraits à l'acétate d'éthyle, puis analysés en GPC. Afin de récupérer le Bmin.Br, l'eau a été évaporée sous vide à 45 °C. Du dichlorométhane a été ajouté pour solubiliser le Bmim.Br et les sels de citrate/phosphate ont été éliminés par simple filtration. Le Bmim.Br a donc pu être récupéré à la fin de chaque réaction.

La Figure 60 montre les chromatogrammes GPC obtenus pour la polymérisation du monolignol G en présence de 10, 20, 30 et 50% de Bmim.Br.



Figure 60 : Chromatogrammes GPC issus de l'extraction de la phase aqueuse

Les M_n obtenues pour les DHP sont compris entre 0,4 KDa et 0,6 KDa. On peut constater sur le chromatogramme que la conversion du monolignol G est meilleure dans le cas de 10 % Bmim.Br, probablement grâce à une activité enzymatique plus élevée. Une moins bonne conversion et une dégradation accrue (présence de vanilline) ont été observées en augmentant le pourcentage de Bmim.Br. Bien que les M_n des DHP soient globalement les mêmes pour les différents pourcentages en Bmim.Br, la plus haute M_n obtenue en affinant les résultats correspond à 30 % de Bmim.Br (0,6 KDa). Ce résultat démontre qu'il y a probablement une compétition entre la solubilité apportée par le Bmim.Br (plus haute M_n) et l'inhibition enzymatique (présence du monolignol G non réagit).

Les analyses RMN ont été réalisées sur les DHP obtenus avec 10% et 50% Bmim.Br afin de vérifier si le pourcentage en liquide ionique permet de favoriser certains types de liaisons. Figure 61 représente les résultats obtenus en RMN ¹H.



Figure 61 : RMN ¹H des DHP solubles issus du monolignol G en mode L/S (avec 10% et 50% Bmim.Br)

Les spectres RMN ¹H démontrent que, quelque soit le pourcentage en Bmim.Br, les mêmes types de liaisons sont obtenus, à savoir les liaisons β - β et β -5. Une quantité légèrement plus importante de liaisons β -5 a été identifiée par intégration dans le cas de 10% par rapport à 50% de Bmim.Br. Les résultats RMN ont aussi confirmé la présence da la vanilline (identifiée en GPC) en quantité plus importante dès que le pourcentage de Bmim.Br augmente et la diminution de la résolution des spectres est en accord avec l'augmentation de la polydispersité.

Pour conclure, l'utilisation de [Bmim.NTF₂] comme co-solvant pour la polymérisation n'a pas été efficace due à des problèmes de récupération du liquide ionique en fin de réaction. Le Bmim.Br a été utilisé comme substitut de [Bmim.NTf₂] pour palier ce problème. Les polymérisations réalisées à différents pourcentages de Bmim.Br n'ont malheureusement pas permis d'améliorer les masses molaires des DHP comparés à ceux des milieux tampon/acétone. De plus, la RMN a démontré que la vanilline, un produit de dégradation, se forme à des hauts pourcentages en Bmim.Br. N'ayant pas des résultats concluants avec les liquides ioniques, nous avons essayé d'évaluer les proportions des phénols libres par le test

Folin-Ciocalteu dans le but de valoriser ces oligomères comme antioxydants ou synthon/monomère.

3. Quantification des phénols libres par Folin-Ciocalteau

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 par Singleton et Rossi⁷. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses. Nous avons utilisé cette méthode pour quantifier les phénols libres des **DHP sol** obtenus dans le cadre du monolignol G.

Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'oxydes de couleur jaune, constitué d'acide phosphotungstique ($H_3 PW_{12} O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3 PM_{02} O_{40}$). Lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange bleu de dérivés du tungstène et du molybdène. L'intensité du changement de coloration, dont l'absorption maximum se situe autour de 765 nm est proportionnelle à la quantité de phénols présents au départ dans l'échantillon étudié.

Mise en œuvre du dosage :

Une courbe d'étalonnage a d'abord été réalisée afin d'exprimer le nombre de phénols libres des DHP en fonction d'un phénol standard connu. Le monolignol G a été utilisé comme étant le phénol standard. Six concentrations différentes (0 à 1,16 g/L) en monolignol G ont été utilisées pour obtenir la gamme d'étalon. Pour réaliser le dosage, les différentes concentrations en monolignol G ont été ajoutées au réactif de Folin-Ciocalteu. Le carbonate de sodium a été utilisé comme base pour déprotoner les phénols libres et faciliter leur oxydation. Le mélange a été incubé à 40 °C pendant 30 minutes puis l'absorbance des échantillons a été mesurée à 765 nm sous spectrophotomètre à microplaque (Voir partie expérimentale). Une fois la courbe d'étalonnage obtenue, quelques DHP solubles précédemment synthétisés à partir du monolignol G ont été étudiés par cette méthode. A partir des absorbances obtenues pour les **DHP sol**, les concentrations en phénols (exprimées en équivalents concentration en monolignol G) ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus pour les différents DHP sont représentés cidessous (Figure 62).



Figure 62 : Quantification des phénols libres dans le cas du monolignol G (à gauche : milieu tampon/acétone, à droite : milieu tampon/Bmim.Br)

En comparant les résultats en milieu tampon/acétone, on peut constater que les DHP obtenus à 40 °C contiennent un rapport de phénols libres supérieur comparés aux DHP à T.A. L'impact du mode d'ajout sur la structure des DHP est aussi observé. En effet, lors du mode d'ajout L/S, un meilleur rapport de phénols libres a été obtenu comparé au mode d'ajout S/L. Quant aux DHP issus des milieux tampon/Bmim.Br, le nombre de phénols libres sont supérieurs à ceux des DHP issus des milieux tampon/acétone. La concentration de phénols libres la plus élevée est observée pour le milieu contenant 30% Bmim.Br, mais, dans ce cas, les valeurs obtenues sont probablement légèrement surévaluées du fait de la présence de vanilline et de monolignol n'ayant pas réagi. Il est significatif que la fraction L/S à 40 °C dans l'acétone donne des résultats relativement comparables à ceux obtenus avec le liquide ionique, prouvant, là aussi, son intérêt potentiel.

Afin de valoriser les oligomères comme antioxydants, d'autres tests devront être réalisés pour compléter cette étude en comparant les propriétés antiradicalaires de ces DHP. Le test DPPH, qu'il était prévu de mettre en œuvre, n'a pas été réalisé à ce jour pour faute de temps.

4. Etude cinétique de la consommation des substrats en présence de la laccase de *Trametes versicolor*

Le rôle des laccases dans la plante n'est pas très clair. Son action sur les différents substrats phénoliques n'est pas totalement maitrisée. Les laccases sont connues pour prendre part à la polymérisation⁸ ainsi qu'à la dépolymérisation⁹ des lignines. Comme observé lors de la synthèse de nos DHP, des produits de dégradation tels que la vanilline ou la 2,6diméthoxybenzoquinone ont été obtenus. Afin d'étudier l'action de la laccase sur les monomères phénoliques, des suivies cinétiques ont été réalisés sur les monolignols G et S et le dimère β -5 du monolignol G en présence de la laccase de *Trametes versicolor*. Ainsi, les résultats sur la vitesse de consommation des substrats et les produits de réactions donneront des informations sur la spécificité de la laccase envers les différents substrats phénoliques.

Synthèse du dimère β -5

Avant de démarrer les études cinétiques, le dimère β -5 a d'abord été synthétisé par oxydation du monolignol G par la laccase de *Trametes versicolor* dans un mélange (1:1) acétate d'éthyle et tampon citrate phosphate pH 4.5. La solution de laccase a été ajoutée dans la solution biphasique du monolignol G à 9 mL/h (ajout mode L/S). Après purification sur chromatographie flash, 38% du dimère β -5, 16% du dimère β - β (pinorésinol) ont été isolés (Figure 63).



Figure 63 : Synthèse du dimère β-5

Une fois le dimère obtenu, les cinétiques des réactions ont été réalisées indépendamment sur les trois composés phénoliques (G, S et β -5) en utilisant le mode d'ajout L/S (9 mL/h). Les quantités d'enzyme utilisées ont été déterminées afin d'avoir une activité enzymatique de 0,1 U/mg pour les trois réactions. À intervalle de temps régulier, 300 µL de milieu réactionnel ont été prélevés à la micropipette puis rapidement mélangés avec 100 µL d'une

solution (100 mM) d'azoture de sodium pour stopper l'activité enzymatique. Le prélèvement a été vortexé puis dilué dans 200 µL d'acétonitrile (dilution finale x 2). L'échantillon est filtré dans un vial pour être analysé en HPLC. La Figure 64 montre les profils des cinétiques obtenus.



Figure 64 : Cinétique des monolignols G et S et du dimère β-5 à T.A en mode d'ajout 1 à 9 mL/h. Réactions faites sur 500 mg de substrats. (HPLC : colonne Thermoscientific Syncronis aQ à 40 °C, 1.0 mL/min eau/acétonitrile)

On peut remarquer que dans les trois cas, les profils de cinétiques se traduisent par des intersections de deux droites (cas G et S) ou d'une droite et une courbe (cas β -5). Les premières droites (en pointillés) correspondent simplement à une diminution de la concentration du milieu réactionnel due à l'ajout de la solution d'enzyme (ajout à 9 mL/h de la solution de laccase) et non pas par la consommation des substrats par la laccase. En effet, le début de la consommation effective des substrats a lieu à l'intersection de chaque droite. Le point d'intersection correspond donc à la quantité minimum en laccase nécessaire pour oxyder significativement les substrats phénoliques. La quantité d'enzyme minimale nécessaire est sensiblement la même pour les deux monolignols S et G mais est par contre nettement moins importante pour l'oxydation du dimère β -5. Cette différence est probablement due à l'absence chez le dimère β -5 d'insaturation conjuguée avec le noyau aromatique conduisant à une plus grande réactivité du phénate. Dans le cas des deux

monolignols la cinétique d'oxydation est raisonnablement simulée par une cinétique d'ordre 0, comme souvent en catalyse enzymatique, avec cependant une constante de vitesse supérieure dans le cas de l'alcool sinapylique. Dans le cas du dimère β-5, la cinétique est d'ordre supérieur, ce qui peut être le signe de la coexistence de plusieurs réactions compétitives lors de l'oxydation. La quantité minimum de laccase a été calculée dans chacun des cas puis utilisée pour réaliser de nouveau les cinétiques sur les trois substrats en utilisant cette fois ci un ajout rapide de la laccase dans le milieu réactionnel. Les profils de cinétiques obtenus sont représentés sur la Figure 65.



Figure 65 : Cinétique des monolignols G et S et du dimère β-5 à T.A en mode d'ajout rapide de la laccase. Réactions faites sur 500 mg de substrats. (HPLC : colonne Thermoscientific Syncronis aQ à 40 °C, 1,0 mL/min eau/acétonitrile)

On peut constater que l'allure des cinétiques est différente. Celle du monolignol G est toujours linéaire alors que pour le monolignol S et le dimère β -5, des courbes sont obtenues. Comme précédemment, les vitesses de consommation des substrats sont approximativement similaires à celles observées dans l'expérience précédentes, le dimère β-5 étant plus vite consommé que le monolignol S, lui-même l'étant plus rapidement que le G. La différence de vitesse de consommation des substrats peut être expliquée par plusieurs facteurs : le nombre de phénols libres sur la molécule et l'encombrement stérique de la molécule¹⁰.

D'un point de vue cinétique, l'oxydation de G n'est clairement pas affectée par l'utilisation d'une quantité minimale d'enzyme. Dans le cas du S, le changement de la courbe pourrait montrer que l'absence d'apport régulier d'enzyme, et donc la diminution potentielle de la concentration en radicaux phénoxy, induit une réactivité différente des substrats potentiels de l'enzyme.

Dans notre cas, le nombre de phénols libres des trois molécules est identique. La différence de réactivité ne peut donc provenir de ce facteur. Dans la littérature, les potentiels d'oxydoréductions du monolignol G et du dimère β -5 sont donnés pour 170 ± 19.6 mV et 279 ± 11.1 mV respectivement¹⁰. La consommation du monolignol G devrait donc être plus rapide que le dimère β -5 grâce à son plus faible potentiel d'oxydoréduction. Cependant, des résultats inverses sont obtenus. Il existe probablement un autre facteur tel que l'implication de la laccase dans l'oxydation de différents substrats issus de l'oligomérisation (ou de la dégradation) du substrat initial, qui permettra d'expliquer ces résultats. Les expériences demandent toutefois à être répétées afin de pouvoir tirer une conclusion.

Après 24 h de réaction du dimère β -5 avec la laccase, un précipité a été obtenu dans le milieu réactionnel. Ce précipité étant soluble dans le THF a été analysé en GPC pour donner une masse molaire moyenne en nombre de 1,9 KDa et un faible indice de polydispersité de 1,5. En théorie, le dimère β -5 peut uniquement se dimériser (DP 2) en formant la liaison 5-5 selon le mécanisme réactionnel décrit sur la Figure 66.



Figure 66 : Mécanisme de dimérisation du dimère β -5 par oxydation de la laccase

Le fait d'avoir des oligomères (DP~5), nécessite d'envisager d'autres types de mécanismes d'oligomérisation. On peut envisager une possible oligomérisation par (i) la double liaison α - β , (ii) une déméthylation des méthoxys formant ainsi des phénols libres pouvant être oxydés par la laccase ou (iii) ouverture du cycle furane du dimère β -5 (Figure 67).



Figure 67 : Les trois sites probables de l'oligomérisation du dimère β-5

Une analyse RMN a donc été réalisée afin d'étudier la structure de l'oligomère. Figure 68 montre la superposition des spectres RMN ¹H du dimère β -5 pur et l'oligomère résultant. En comparant les deux spectres, on constate que les doubles liaisons α - β sont encore présentes sur l'oligomère.



Figure 68 : RMN ¹H du dimère β -5 pur et de l'oligomère du β -5 après réaction avec la laccase

L'analyse RMN ¹H a démontré la présence de doubles liaisons α - β dans la structure des oligomères du β -5, démontrant ainsi que l'oligomérisation ne se fait pas par ces insaturations. Malgré cette observation, nous avons voulu confirmer ce résultat en vérifiant en GPC l'impact sur la M_n des oligomères potentiels formés en absence de la double liaison α - β du β -5 a donc été hydrogénée (H₂, Pd/C), puis le dihydrodimère β -5 est mis à réagir en présence de la laccase dans les conditions décrites précédemment. Les résultats obtenus en GPC démontrent que le β -5 et le β -5 hydrogéné ont les mêmes réactivités avec la laccase. Le même profil de GPC a été obtenu donnant des masses molaires identiques (Figure 69). On peut donc finalement conclure que la double liaison n'a pas d'impact sur les masses molaires des oligomères de β -5 et conséquemment sur l'oligomérisation.



Figure 69 : Chromatogrammes GPC de l'oligomérisation du dimère β-5 (violet) et du β-5 hydrogéné (vert)

Une autre possibilité pour former des oligomères est d'invoquer une déméthylation des groupements méthoxys du dimère β -5- β -5 par la laccase (on exclu *a priori* une dimérisation par attaque du radical potentiellement délocalisé sur le carbone en position para du groupement phénol, très rarement observé dans le cas des lignines naturelles et conduisant de façon préférentielle à des produits de dégradation plutôt qu'a des produits

d'oligomérisation). Des phénols libres seront générés par contre par déméthylation et pourront être impliquées dans l'oligomérisation subséquente du dimère β-5.

Afin de vérifier cette hypothèse, on a voulu faire réagir le dimère syringarésinol avec la laccase. En effet, alors que le dimère β -5 de G peut conduire à des réactions de dimérisation *via* le carbone en *ortho* du phénol libre, le dimère syringarésinol n'a théoriquement aucune possibilité de former des liaisons avec lui même. Son oxydation avec la laccase ne devrait donc *a priori* donner aucun oligomère sauf dans le cas d'une déméthylation.

Etant donné que la synthèse du syringarésinol à partir du monolignol S est maintenant maîtrisée dans les conditions précédemment décrites (40 °C et ajout mode L/S), on a pu obtenir, après purification sur chromatographie flash, du syringarésinol pur pour réaliser cette étude. La réaction du syringarésinol en présence de la laccase a été poursuivie dans les mêmes conditions que précédemment (cas du dimère β -5 et dimère β -5 hydrogéné). Après 24 h de réaction, les produits obtenus ont été analysés en GPC (Figure 70).



Figure 70 : Chromatogramme GPC du syringarésinol pur (bleu) et le produit de la réaction (rouge)

On peut voir sur le chromatogramme que des oligomères sont formés lors de la réaction, montrant ainsi une possible déméthylation par la laccase. Le produit de dégradation 2,6diméthoxybenzoquinone (2,6-DMBQ) a aussi été identifié. Bien que les cycles furanes du syringarésinol soient stables et ne participent pas dans l'oligomérisation, nous avons voulu confirmer ces résultats avec un autre dimère ne portant pas de cycle furane afin de lever l'ambigüité à une éventuelle ouverture de cycle. On s'est donc intéressé à reproduire la même expérience avec le dimère 5-5 hydrogéné. Ce dimère, tout comme le syringarésinol, ne possède théoriquement aucune possibilité de former des liaisons avec lui même.

Synthèse du dimère 5-5

Nous avons donc développé une stratégie pour synthétiser le dimère 5-5 hydrogéné en six étapes à partir de la vanilline (Figure 71). La première étape consiste en une dimérisation de la vanilline en bisvanilline en présence de la laccase. La réaction se fait en ajoutant la laccase rapidement dans la solution de vanilline. Au cours de la réaction, la bisvanilline formée précipite. Cette dernière est récupérée par simple filtration puis engagée dans l'étape suivante. Afin d'éviter les problèmes de solubilité pour la suite des réactions, la bisvanilline a été acétylée à température ambiante en présence d'anhydride acétique dans la pyridine (étape 2). La bisvanilline acétylée a ensuite été engagée directement dans l'étape suivante sans purification. L'étape 3 est une condensation de Knoevenagel entre la bisvanilline acétylée et l'acide malonique en présence d'aniline comme catalyseur pour donner le diacide 5-5 acétylé. La quatrième étape est une estérification de Fischer dans l'éthanol en présence d'acide chlorhydrique concentré pour donner le diester 5-5 acétylé. Les quatre premières étapes n'ont pas nécessité de purification car les puretés (déterminées par RMN) des produits obtenus étaient suffisamment élevées. Le rendement brut global des guatre premières étapes est de 68%. L'étape 5 est une réduction du diester 5-5 acétylé en dialcool 5-5. Pour cette étape, 6.3 équivalents de réducteur DIBALH sont utilisés à 0 °C permettant à la fois la réduction des esters et des acétates phénoliques. Le rendement de cette étape est relativement faible du à des problèmes rencontrés lors de l'extraction. En effet, la neutralisation de l'excès de réducteur utilisé provoque une mousse qui complique l'extraction du produit. La dernière étape est la réduction des doubles liaisons α-β par hydrogénation en présence de palladium sur charbon comme catalyseur sous flux d'hydrogène pour donner le dimère 5-5 hydrogéné. Le rendement global obtenu lors des 6 étapes est de 15%.



Figure 71 : Synthèse du dimère 5-5 hydrogéné de l'alcool coniférylique

Une fois que le dimère 5-5 hydrogéné a été synthétisé, son oxydation en présence de laccase a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Apres 24 h de réaction, le produit a été analysé en GPC. La Figure 72 montre le chromatogramme obtenu.



Figure 72 : Chromatogramme GPC du dimère 5-5 hydrogéné pur (violet) et le produit de la réaction (vert)

On peut constater sur le chromatogramme que le dimère 5-5 hydrogéné a été consommé par la laccase donnant des oligomères. Ce résultat confirme encore une fois que la laccase provoque une déméthylation de nos substrats. Il est référencé dans la littérature que la laccase est capable de déméthyler les composés phénoliques¹¹. La déméthylation dépend

de l'activité de la laccase ainsi que la présence d'éventuels médiateurs Red-Ox¹². Afin de déterminer à quel stade la déméthylation a lieu, la structure des oligomères devra être analysée en RMN à des temps réactionnels différents.

Pour expliquer ce phénomène de déméthylation, le mécanisme que nous privilégions est soit une dismutation du radical phenoxy formé, soit un transfert électronique à partir d'une autre espèce oxydée, conduisant à la régénération possible du produit de départ d'une part et à la formation d'un produit de degré d'oxydation supérieur, équivalent de cation aromatique qui peut subir l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur le carbone portant un groupement méthoxy, conduisant à un hémiacétal d'orthoquinone dont l'hydrolyse conduit par perte d'une molécule de méthanol à l'ortho quinone correspondante qui peut conduire ensuite facilement à des réactions d'oligomérisation (additions 1,4 ou 1,6) (Figure 73).



Figure 73 : Mécanisme envisagé pour la déméthylation

En l'état de nos études, c'est la coexistence de ces différents mécanismes, favorisés dans le cas de substrats possédant un phénol libre *ortho* disubstitué, aucune insaturation en position *para* et ne pouvant pas directement entrer en jeu dans des réactions de polymérisation, que nous privilégions comme explication des différences de cinétiques observées suivant le substrat de départ et les conditions (quantité d'enzyme) de réaction.

4. Conclusion

Afin de proposer des modes de valorisation des lignines de synthèse (DHP) notamment en tant qu'antioxydants ou monomères, nous avons tenté de contrôler la polymérisation *in vitro* des monolignols G et S indépendamment dans le but d'obtenir des DHP les plus réguliers et monodisperses possible. Les polymérisations ont été réalisées en présence de la laccase de *Trametes versicolor*. Lors de la polymérisation, nous avons étudié l'impact de plusieurs paramètres tels que la température, le co-solvant, le mode et la vitesse d'ajout des réactifs.

On a démontré que les différents paramètres étudiés n'ont pas eu des influences significatives sur la polymérisation du monolignol G. Les DHP résultants ont démontré par GPC des masses molaires quasi identiques. Les RMN ont aussi démontré que les DHP possèdent plus ou moins les mêmes types de liaison en quantité majoritaires (β - β et β -5). Néanmoins, pour le monolignol S, des résultats différents ont été obtenus. La température et

le mode et vitesse d'ajout de la laccase joue un rôle important sur le type de couplage. En effet, à 40 °C et à vitesse d'ajout lent de la laccase, le couplage β - β est favorisé alors qu'à T.A, plus de liaisons β -O-4 sont formées. Ces résultats démontrent ainsi une sélectivité de la réaction en jouant sur la température et le mode d'ajout de la laccase.

Les réactions dans les liquides ioniques n'ont pas été concluantes. Les problèmes rencontrés pour la récupération du [Bmim.NTF₂] après la réaction nous ont poussé à choisir un autre liquide ionique. En nous basant de la littérature, le Bmim.Br a été choisi comme cosolvant pour les polymérisations. Les polymérisations réalisées à différents pourcentages de Bmim.Br n'ont malheureusement pas permis d'améliorer les masses molaires des DHP par rapport à ceux des milieux tampon/acétone.

Dans le but de valoriser ces oligomères comme antioxydants ou synthon/monomère, nous avons essayé d'évaluer les proportions des phénols libres par le test Folin-Ciocalteu. Les résultats ont démontré que les DHP obtenus lors du mode d'ajout L/S ont un meilleur rapport de phénols libres comparé au mode d'ajout S/L. De plus, les DHP issus des milieux tampon/Bmim.Br se sont avérés d'être plus riche en phénols libres qu'aux DHP issus des milieux tampon/acétone. Afin de valoriser les oligomères comme antioxydants, l'étude doit être complétée par le test DPPH pour évaluer les propriétés antiradicalaires des DHP.

Nous avons ensuite tenté d'étudier l'action de la laccase sur les monomères phénoliques afin de comprendre le fonctionnement de la laccase sur nos substrats. Des suivis cinétiques ont donc été réalisés sur les monolignols G et S et le dimère β -5 du monolignol G en présence de la laccase de *Trametes versicolor*. Les profils de cinétiques et les vitesses de consommation obtenus pour chaque substrats ne sont pas les mêmes. Les vitesses de réaction sont dans l'ordre β -5 S > G..

Les produits issus de la cinétique du β-5 ont été analysés en GPC et RMN. Les résultats ont démontrés que la laccase peut possiblement déméthyler les groupements méthoxy. Les mêmes résultats ont été obtenus en étudiant l'oligomérisation du syringarésinol et le dimère 5-5 hydrogéné du monolignol G avec la laccase.

Globalement, deux produits ressortent quand même nettement du lot :

- la fraction de DHP formée à partir de l'alcool coniférylique en mode L/S à 40 °C, dont la structure et les activités antioxydantes et antiradicalaires mériteront d'être étudiées plus en détail

- le syringarésinol, dont l'optimisation de l'obtention devrait pouvoir être optimisée par un contrôle précis des conditions expérimentales

Les chapitres suivants seront consacrés à l'étude des potentialités du syringarésinol dans le domaine de la chimie des polymères

5. Partie expérimentale

1. Synthèse de férulate d'éthyle



40 g (1 éq, 210 mmol) d'acide férulique sont dissouts dans 400 mL d'éthanol absolu (C=0,5 M) à température ambiante. 3 mL d'acide chlohydrique concentré sont ajoutés et le milieu est agité à reflux pendant 48h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le solvant est évaporé et le produit est dissout dans 400 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée deux fois avec une solution saturée de NaHCO₃ (2*100 mL) puis deux fois avec une solution saturée de NaHCO₃ (2*100 mL) puis deux fois avec une solution saturée de NaHCO₃ (2*100 mL) puis deux fois avec une solution saturée de NaCl (2*100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 80/20). 44 g de férulate d'éthyle pur sont obtenus (94%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 1,31 (t, 3H, J = 7,2 Hz, H₉), 3,93 (s, 3H, H₇), 4,22 (quad, 2H, J = 7,2 Hz, H₈), 5,90 (s, 1H, H_{OHphénol}), 6,26 (d, 1H, J = 15,9 Hz, H₆), 6,90-7,09 (m, 3H, H₂, H₅ et H₆), 7,59 (d, 1H, J = 15,9 Hz, H_α)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 14,5 (C₉), 56,0 (C₇), 60,5 (C₈), 109,4 (C₂), 114,8 (C_β), 115,7 (C₅), 123,2 (C₆), 127,1 (C₁), 144,8 (C_α), 146,9 (C₄), 148,0 (C₃), 167,5 (C_γ)

2. Synthèse de l'alcool coniférylique



10 g (1 éq, 45 mmol) de l'éthyle férulate sont dissouts dans 76 mL de DCM sous azote à température ambiante. La solution est ensuite refroidit à 0 °C et 149 mL (3,3 éq, 149 mmol) du DIBAL-H (1M dans le DCM) sont ajoutés goutte à goutte. Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant 4h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). 30 mL de méthanol sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C puis dilué avec 200 mL de DCM. Le

milieu réactionnel est acidifié avec une solution d'acide citrique à 0,5 M jusqu'à pH~2 puis agité pendant 2h. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (2*200 mL), séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 60/40). 5,7 g d'alcool coniférylique pur sont obtenus (71%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 3,91 (s, 3H, H₇), 4,28 (m, 2H, H_γ), 5,64 (s, 1H, H_{OHphénol}), 6,18 (d,t, 1H, J = 6 Hz et 15,6 Hz, H_β), 6,51 (d, 1H, J = 15,9 Hz, H_α), 6,88-6,92 (m, 3H, H₂, H₅ et H₆)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 56,0 (C₇), 64,0 (C_γ), 108,5 (C₂), 114,6 (C₅), 120,5 (C₆), 126,3 (C_β), 129,4 (C₁), 131,5 (C_α), 145,7 (C₄), 146,8 (C₃)

3. Synthèse de l'acide sinapique



20 g (1 éq, 110 mmol) de syringaldehyde et 17,1 g (1,5 éq, 165 mmol) d'acide malonique sont dissouts dans 55 mL de pyridine (C=2 M) à température ambiante. 1 mL (0,1 éq, 11 mmol) d'aniline sont ajoutés et le milieu est agité à 60 °C sous azote pendant 24h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le milieu réactionnel est ensuite versé dans un mélange eau/glace puis acidifié avec de HCI (3M) jusqu'à pH~3. Le précipité formé est filtré, lavé avec de l'eau milliQ puis séché à l'étuve sous vide. 20,2 g de produit brut sont obtenus. Le produit est directement engagé dans la réaction suivante sans purification.

RMN ¹**H** : (300 MHz, dmso-*d6*) δ (ppm) : 3,79 (s, 6H, H₅), 6,39 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz, H_β), 6,98 (s, 2H, H₂), 7,46 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz, H_α), 8,91 (s, 1H, H_{OHphénol}), 12,13 (s, 1H, H_{acide})

RMN ¹³**C** : (75 MHz, dmso-*d6*) δ (ppm) : 56,1 (C₅), 106,1 (C₂), 116,1 (C_β), 124,6 (C₁), 138,1 (C₄), 144,9 (C_α), 148,1 (C₃), 168,0 (C_γ)

3,79 (s, 6H, H₅), 6,39 (d, 1H, *J*=15,9 Hz, H_{β}), 6,98 (s, 2H, H₂), 7,46 (d, 1H, *J*=15,9 Hz, H_{α}), 8,92 (s, 1H, OH_{phenol}), 12,14 (s, 1H, OH_{acide})
4. Synthèse de sinapate d'éthyle



20,2 g (1 éq, 90 mmol) d'acide sinapique sont dissouts dans 300 mL d'éthanol absolue (C=0,3 M) à température ambiante. 6 mL d'acide sulfurique concentré (0,05 éq, 4,5 mmol) sont ajoutés et le milieu est agité à reflux pendant 48h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le solvant est évaporé et le produit est dissout dans 300 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau milliQ (200 mL), avec une solution saturée de NaHCO₃ (2*100 mL), puis une solution saturée de NaCl (2*100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 80/20). 21,5 g de sinapate d'éthyle pur sont obtenus (95%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 1,31 (t, 3H, J = 6,9 Hz, H₇), 3,92 (s, 6H, H₅), 4,22 (quad, 2H, J = 7,2 Hz, H₆), 5,76 (s, 1H, H_{OHphénol}), 6,28 (d, 1H, J = 15,9 Hz, H_β), 6,77 (s, 2H, H₂), 7,57 (d, 1H, J = 15,9 Hz, H_α)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 14,4 (C₇), 56,3 (C₅), 60,4 (C₆), 105,0 (C₂), 116,0 (C_β), 126,0 (C₁), 137,0 (C₄), 144,9 (C_α), 147,2 (C₃), 167,2 (C_γ)

5. Synthèse de l'alcool sinapylique



5 g (1 éq, 19,8 mmol) de l'éthyle sinapate sont dissouts dans 38 mL de DCM sous azote à température ambiante. La solution est ensuite refroidit à 0 °C et 65 mL (3,3 éq, 65,3 mmol) du DIBAL-H (1M dans le DCM) sont ajoutés goutte à goutte. Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant 4h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). 15 mL de méthanol sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C puis dilué avec 100 mL de DCM. Le milieu réactionnel est acidifié avec une solution d'acide citrique à 0,5 M jusqu'à pH~2, dilué au méthanol (20 mL), puis agité pendant 2h. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (2*100 mL), séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant est

évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 60/40). 3,3 g d'alcool sinapylique pur sont obtenus (81%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 3,90 (s, 6H, H₅), 4,31 (m, 2H, H_{γ}), 5,58 (s, 1H, H_{OHphénol}), 6,19 (d,t, 1H, *J* = 6 Hz et 15,9 Hz, H_{β}), 6,49 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz, H_{α}), 6,63 (s, 2H, H₂)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 56,3 (C₅), 63,8 (C_γ), 103,3 (C₂), 126,6 (C_β), 128,2 (C_α), 131,5 (C₁), 134,8 (C₄), 147,1 (C₃)

6. Synthèse du dimère β -5



5,6 g (1 éq, 31,1 mmol) d'alcool coniférylique sont dissouts dans 280 mL d'AcOEt à température ambiante. 280 mL de tampon citrate/phosphate à pH 4.5 sont ajoutés dans le milieu. Une solution contenant 49,3 mg de laccase de *Trametes versicolor* (0,1 U/mg de substrat) dans 50 mL de tampon citrate/phosphate à pH 4,5 est ajoutée goutte à goutte (9 mL/h) avec une pousse seringue à la solution d'alcool coniférylique. Le milieu réactionnel biphasique est agité vivement pendant 7h en présence d'air. La réaction est suivie par CCM (Cyclo/AcOEt : 20/80). La phase aqueuse est séparée puis extraite avec 100 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont réunies, lavé avec une solution saturée de NaCl (2*200 mL) et séchée sur MgSO₄ anhydre. La phase organique est filtrée puis le solvant est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 50/50 à 20/80). 2,15 g de dimère β-5 pur sont obtenus (38%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, acétone-*d6*) δ (ppm) : 3,37 (quad, 1H, J = 6,3 Hz, H_β), 3,65-3,74 (m, 7H, H₇, H₇, H_{γ1}), 3,96-4,09 (m, 3H, H_{γ2}, H_{γ1}', H_{γ2}'), 5,42 (d, 1H, J = 6,6 Hz, H_α), 6,07 (d,t, 1H, J = 5,4 Hz et 15,9 Hz, H_β), 6,37 (d, 1H, J = 15,9 Hz, H_α), 6,67-6,91 (m, 5H, H₂, H₅, H₆, H₂' et H₆), 7,50 (s, 1H, H_{OHphénol})

RMN ¹³**C** : (75 MHz, acétone-*d6*) δ (ppm) : 53,9 (C_β), 55,4 (C₇), 55,5 (C₇), 62,5 (C_Y), 63,7 (C_Y), 87,6 (C_α), 109,5 (C₂), 110,4 (C₂), 114,8 (C₆), 115,2 (C₅), 118,7 (C₆), 127,5 (C_β), 129,5 (C_α), 129,6 (C₅), 131,0 (C₁), 133,5 (C₁), 144,3 (C₃), 146,4 (C₄), 147,5 (C₃), 148,1 (C₄)

7. Synthèse du dimère β-5 hydrogéné



600 mg (1 éq, 1,7 mmol) de dimère β -5 sont dissouts dans 17 mL d'éthanol [0,1 M] à température ambiante. Le milieu est ensuite placé sous atmosphère d'azote. 60 mg (10% w) de Palladium sur charbon (Pd/C) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité sous flux d'hydrogène pendant 7h. La réaction est suivie par RMN en observant la disparition de la double liaison. Le milieu est filtré sur célite puis le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 20/80). 465 mg de dimère pur de β -5 hydrogéné sont obtenus (78%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, acétone-*d6*) δ (ppm) : 1,63 (m, 2H, H_{β'}), 2,46 (m, 2H, H_{α'}), 3,36-3,52 (m, 3H, H_β, H_γ), 3,68 (m, 8H, H₇, H₇ et H_γ), 5,38 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz, H_α), 6,49-6,91 (m, 5H, H₂, H₅, H₆, H_{2'} et H_{6'}), 7,48 (s, 1H, H_{OHphénol})

8. Synthèse du dimère 5-5 de l'alcool coniférylique

a) Synthèse du bis-vanillin



Une solution de vanillin (10 g, 65,8 mmol) dans l'acétone (133 mL) est ajoutée dans un tampon acétate (1200 mL, 0,1 M) à pH 5. 82,7 mg de laccase de *Trametes versicolor* (20 U) sont ajoutés à la solution. Le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à température ambiante en présence de l'air. Le précipité formé est filtré, lavé avec de l'eau et au DCM puis séché à l'étuve à vide à 60 °C. 9,58 g de produit brut sont obtenus (96%). Le produit est directement engagé dans la réaction suivante.

RMN ¹**H** : (300 MHz, dmso-*d6*) δ (ppm) : 3,93 (s, 6H, H₇), 7,43 (s, 4H, H₂ et H₆), 9,81 (s, 2H, H_α)

RMN ¹³**C** : **(75 MHz, dmso-***d6***)** δ (ppm) : 56,4 (C₇), 109,6 (C₂), 125,0 (C₆), 128,2 (C₅), 128,7 (C₁), 148,6 (C₃), 150,9 (C₄), 191,7 (C_α)

b) Acétylation du bis-vanillin



9,5 g (1 éq, 31,5 mmol) de bis-vanillin sont dissouts dans 53 mL de pyridine (C=0,6 M) à température ambiante. 53 mL d'anhydride acétique sont ajoutés et le milieu est agité à température ambiante sous azote pendant 24h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le milieu réactionnel est ensuite versé dans un mélange eau/glace puis acidifié avec de HCI (3M) jusqu'à pH~3. La phase aqueuse est extraite avec du DCM (2*100 mL) et de l'AcOEt (2*100 mL). Les phases organiques sont ensuite réunies, lavée avec une solution saturée de NaCI (2*200 mL) et séchée sur MgSO₄ anhydre. La phase organique est filtrée puis le solvant est évaporé sous vide. 11,5 g de produit brut sont obtenus (95%). Le produit est directement engagé dans la réaction suivante sans purification.

RMN ¹**H** : (300 MHz, dmso-*d6*) δ (ppm) : 2,07 (s, 6H, H_{acétate}), 3,92 (s, 6H, H₇), 7,46 (s, 2H, H₂), 7,70 (s, 2H, H₆), 9,99 (s, 2H, H_α)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, dmso-*d6*) δ (ppm) : 20,0 (C_{CH3 acétate}), 56,4 (C₇), 111,8 (C₂), 124,7 (C₆), 130,6 (C₅), 134,5 (C₁), 141,8 (C₄), 151,9 (C₃), 167,5 (C_{C=O acétate}), 191,8 (C_α)

c) Synthèse du diacide bis-férulique 5-5 acétylé



11,4 g (1 éq, 29,5 mmol) de bis-vanillin acétylé et 9,2 g (3 éq, 88,5 mmol) d'acide malonique sont dissouts dans 15 mL de pyridine (C=2 M) à température ambiante. 256 μ L (0,1 éq, 3 mmol) d'aniline sont ajoutés et le milieu est agité à 60 °C sous azote pendant 24h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le milieu réactionnel est ensuite versé

Etude de la polymérisation in vitro des monolignols G et S

dans un mélange eau/glace puis acidifié avec de HCI (3M) jusqu'à pH~3. Le précipité formé est filtré, lavé avec de l'eau milliQ puis séché à l'étuve sous vide. 13,2 g de produit brut sont obtenus (95%). Le produit est directement engagé dans la réaction suivante sans purification.

RMN ¹**H** : (300 MHz, dmso-*d6*) δ (ppm) : 2,03 (s, 6H, H_{acétate}), 3,86 (s, 6H, H₇), 6,38 (d, 2H, J = 15,9 Hz, H_β), 7,11 (s, 2H, H₂), 7,32 (s, 2H, H₆), 7,55 (d, 2H, J = 15,9 Hz, H_α)

d) Synthèse du diéthyle bis-férulate 5-5 acétylé



13,2 g (1 éq, 28,1 mmol) du diacide bis-férulique 5-5 acétylé sont dissouts dans 94 mL d'éthanol absolue (C=0,3 M) à température ambiante. 3 mL d'acide chlohydrique concentré (cat.) sont ajoutés et le milieu est agité à reflux pendant 48h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le solvant est évaporé et le produit est dissout dans 200 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée deux fois avec une solution saturée de NaHCO₃ (2*100 mL) puis avec une solution saturée de NaCl (2*100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant est évaporé sous vide. 11,7 g de produit brut sont obtenus (79%). Le produit est directement engagé dans la réaction suivante sans purification.

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 1,23 (t, 6H, J = 7,2 Hz, H₉), 2,05 (s, 6H, H_{acétate}), 3,98 (s, 6H, H₇), 4,22 (quad, 4H, J = 7,2 Hz, H₈), 6,18 (s, 2H, OH_{phénol}), 6,30 (d, 2H, J = 15,9 Hz, H₈), 7,07 (s, 2H, H₂), 7,14 (s, 2H, H₆), 7,62 (d, 2H, J = 15,9 Hz, H_α)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 14,3 (C₉), 20,4 (C_{CH3 acétate}), 56,1 (C₇), 60,6 (C₈), 110,7 (C₂), 119,0 (C_β), 122,9 (C₆), 131,4 (C₅), 132,8 (C₁), 139,2 (C_α), 143,5 (C₃), 151,7 (C₄), 166,7 (C_γ), 168,3 (C_{C=O acétate})

e) Synthèse du dimère 5-5 de l'alcool coniférylique



Etude de la polymérisation in vitro des monolignols G et S

7,33 g (1 éq, 13,9 mmol) du diéthylé bis-férulate acétylé sont dissouts dans 51 mL de DCM sous azote à température ambiante. La solution est ensuite refroidit à 0 °C et 88 mL (6,3 éq, 87,6 mmol) du DIBAL-H (1M dans le DCM) sont ajoutés goutte à goutte. Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant 4h. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 0/100). 20 mL de méthanol sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C puis dilué avec 200 mL de DCM. Le milieu réactionnel est acidifié avec une solution d'acide citrique à 0,5 M jusqu'à pH~2 puis agité pendant 2h. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (2*100 mL), séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 30/70 à 0/100). 1,4 g d'alcool sinapylique pur sont obtenus (28%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, acétone-*d6*) δ (ppm) : 3,88 (s, 6H, H₇), 4,16 (d, 4H, J = 4,8 Hz, H_{γ}), 6,19 (d,t, 2H, J = 5,7 Hz et 15,6 Hz, H_{β}), 6,48 (d, 2H, J = 15,9 Hz, H_{α}), 6,88-7,05 (m, 4H, H₂ et H₆)

f) Synthèse du dimère 5-5 hydrogéné de l'alcool coniférylique



410 mg (1 éq, 1,2 mmol) de dimère 5-5 sont dissouts dans 12 mL d'éthanol [0,1 M] à température ambiante. Le milieu est ensuite placé sous atmosphère d'azote. 41 mg (10% w) de Palladium sur charbon (Pd/C) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité sous flux d'hydrogène pendant 7h. La réaction est suivie par RMN en observant la disparition des doubles liaisons. Le milieu est filtré sur célite puis le solvant est évaporé. 333 mg de dimère pur de 5-5 hydrogéné sont obtenus (79%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, acétone-*d6*) δ (ppm) : 1,76-1,92 (m, 4H, H_β), 2,71 (m, 4H, H_α), 3,67 (m, 4H, H_γ), 3,94 (s, 6H, H₇), 6,68-7,10 (m, 4H, H₂ et H₆)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, acétone-*d6*) δ (ppm) : 33,3 (C_a), 36,6 (C_b), 57,1 (C₇), 62,6 (C_y), 112,5 (C₂), 123,5 (C₆), 127,2 (C₅), 134,9 (C₁), 143,5 (C₃), 149,4 (C₄)

9. Procédure générale de synthèse des DHP

Préparation des solutions :

Solution de monolignol : Une solution de monolignol (1 g) dans du co-solvant (20% v/v acétone) est diluée dans du tampon citrate/phosphate (80% v/v) à pH 4,5.

Solution de laccase de Trametes versicolor: 4,2 mg dissouts dans 50 mL de tampon citrate/phosphate à pH 4,5.

Mode opératoire :

L'ajout se fait en deux façons. La solution de laccase est ajoutée dans la solution de monolignol (ajout L/S) ou inversement (ajout S/L).

Les solutions sont ajoutées goutte à goutte à 9 mL/h lors de l'ajout L/S et S/L. Le mélange est agité pendant 5h30min. Le culot, si présent, est récupéré après centrifugation, lavé à l'eau milliQ et à l'acétate d'éthyle puis sécher à l'étuve à vide. Le surnageant est extrait avec de l'acétate d'éthyle (2*200 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant est ensuite évaporé.

10. Quantification des phénols libres par Folin-Ciocalteu

Préparation des réactifs :

• Solution de Na₂CO₃ (200g/L)

200 g de Na₂CO₃ sont dissouts dans 800 mL d'eau milliQ à température ambiante. La solution est mise au sonicateur pendant 10 minutes pour aider la dissolution, puis agitée pendant la nuit. La solution est ensuite filtrée sur membrane de cellulose (Whatman 0,45 μ m) puis complétée à 1 litre avec l'eau milliQ.

• Préparation de la gamme de monolignol G

Une solution mère de monolignol G est préparée (5,8 g/L dans l'acétone). Cette solution a ensuite été diluée (Tableau 2) afin d'avoir une gamme de concentration (0 à 1,16 g/L) ayant une absorbance entre 0 et 1.

Entrée	Vol. solution mère (µL)	Vol. d'acétone (µL)	Concentration (g/L)
1	0	5000	0
2	50	4950	0,06
3	100	4900	0,12
4	200	4800	0,23
5	500	4500	0,58
6	1000	4000	1,16

Tableau 2 : Gamme de dilution de la solution mère du monolignol G

• Réalisation du dosage

Etude de la polymérisation in vitro des monolignols G et S

650 μL d'eau milliQ sont distribuées dans des tubes eppendorf. 125 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (chez Merck) sont ajoutés dans chaque tube. Les différents échantillons du monolignol G sont ajoutés suivie de 1000 μL de la solution de Na₂CO₃. Le mélange est ensuite agité puis incubé à 40 °C pendant 30 minutes. Les absorbances sont mesurées sur un spectrophotomètre à microplaque (*Microplate reader Thermo Scientific 357*). La courbe d'étalonnage est ensuite tracée en fonction de l'absorbance à 765 nm et la concentration en monolignol G (Figure 74).



Figure 74 : Courbe d'étalonnage du monolignol G

Une fois la courbe d'étalonnage obtenue, les solutions de DHP sont préparées dans l'acétone (1,16 g/L). Les réactions de dosage des phénols sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment décrites. Les concentrations des phénols, en équivalence du monolignols G, ont été déterminées grâce à la droite de la courbe d'étalonnage selon l'équation suivante :

11. Mesure de l'activité de la laccase de Trametes versicolor

L'activité de la laccase de *Trametes versicolor* a été déterminée en mesurant la cinétique d'oxydation de l'ABTS en ABTS^{+•} sous spectromètre UV à 420 nm.

Etude de la polymérisation in vitro des monolignols G et S



Figure 75 : Oxydation de l'ABTS en ABTS^{+•} par la laccase

Préparation d'une solution d'ABTS (1 mmol) :

• 5,0 mg d'ABTS sont dissouts dans 10 mL de tampon citrate/phosphate à pH 4,5

Préparation de la solution de laccase de Trametes versicolor :

 5,0 mg de laccase sont dissouts dans 100 mL d'eau milliQ, puis 250 µL de cette solution dans 25 mL de tampon citrate/phosphate à pH 4,5

Dans une cuve de 3 mL, on introduit dans l'ordre :

- 2,0 mL de tampon citrate/phosphate à pH 4,5
- 0,9 mL de la solution d'ABTS
- 0,1 mL de la solution de laccase de *Trametes versicolor*

Le suivi cinétique de la réaction est enregistré sur le spectromètre UV à 420 nm pendant 1 minute.

L'activité enzymatique est calculée par l'équation suivante :

$\Delta A \times Vmilieu \times facteur de dilution$

 $\epsilon ABTS \times V$ solution enzymatique diluée \times Concentration solution mère de laccase

 $\Delta A = A_{max} - A_{min}$

6. Références bibliographiques

- 1. C. S. Lancefield and N. J. Westwood, *Green Chem.*, 2015, 4980–4990.
- T. Kobayashi, H. Taguchi, M. Shigematsu, and M. Tanahashi, J. Wood Sci., 2005, 51, 607–614.
- 3. V. Méchin, S. Baumberger, B. Pollet, and C. Lapierre, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 571–579.
- B. Cottyn, A. Kollmann, P. Waffo-Teguo, and P. H. Ducrot, *Chem. A Eur. J.*, 2011, 17, 7282–7287.
- 5. A. P. M. Tavares, J. a. N. Pereira, and A. M. R. B. Xavier, *Eng. Life Sci.*, 2012, **12**, 648–655.
- 6. S. Shipovskov, H. Q. N. Gunaratne, K. R. Seddon, and G. Stephens, *Green Chem.*, 2008, **10**, 806–810.
- 7. V. L. Singleton and J. A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, **16**, 144–158.
- 8. V. Madhavi and S. S. Lele, *BioResources*, 2009, **4**, 1694–1717.
- 9. Q. Chen, M. N. Marshall, S. M. Geib, M. Tien, and T. L. Richard, *Bioresour. Technol.*, 2012, **117**, 186–192.
- 10. Y. Matsushita, C. Ko, D. Aoki, and S. Hashigaya, *J. Wood Sci.*, 2015, **61**, 608–619.
- 11. C. Crestini and D. S. Argyropoulos, *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, **6**, 2161–2169.
- 12. R. Bourbonnais and M. G. Paice, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **36**, 823–827.

Introduction du chapitre

Dans le chapitre 2, nous avons démontré que, indépendamment du degré de méthoxylation, le monolignol S possède une réactivité différente de celle du monolignol G. Ainsi, les conditions réactionnelles telles que la température et le mode d'addition de la laccase ont un impact significatif sur le degré de polymérisation de l'alcool sinapylique. Le couplage β - β du monolignol S menant au dimère syringarésinol, un bisphénol rigide, peut être envisagé comme synthon de choix pour remplacer les bisphénols pétro-sourcés tels que le bisphénol A.

L'optimalisation de la formation du syringarésinol lors de l'oxydation enzymatique du monolignol S est nécessaire afin d'avoir des quantités suffisantes pour pouvoir l'utiliser comme synthon dans la chimie des polymères. En effet, le syringarésinol naturellement présent dans les plantes ne peut être obtenu qu'en faible quantité et qu'après de multiples et coûteuses extractions et purifications. Des synthèses chimiques du syringarésinol à partir de l'alcool sinapylique sont aussi décrites dans la littérature. Néanmoins ces dernières nécessitent des oxydants tels que les peracides¹, l'oxyde d'argent² et le ferricyanure de potassium³ en quantité stœchiométrique pour donner des rendements respectifs de 20%, 3% et 88%. La peroxydase de raifort a aussi été utilisée, mais ne donne pas un rendement de plus de 25% après des étapes de purifications^{4,5}.

Au vu de ces inconvénients, nous nous sommes tout d'abord attachés à développer une méthode de synthèse efficace et sélective du syringarésinol à partir du syringaldéhyde par voie biocatalytique avec la laccase de *Trametes versicolor*. Dans ce chapitre, nous présentons le développement et l'optimisation de la synthèse enzymatique du syringarésinol permettant de favoriser le couplage β - β et ainsi d'obtenir le composé de manière sélective avec des rendements élevés, tout en évitant des étapes de purification grâce à une pureté du brut suffisamment élevée. Pour ce faire, un plan d'expérience où plusieurs paramètres réactionnels sont été variés (température, pH, nature du co-solvant, concentration en substrat, quantité d'enzyme et vitesse d'addition) a été établi. Une fois le mode opératoire optimisé, les propriétés thermiques, antiradicalaires et endocriniennes du syringarésinol sont évaluées.

Les phénols encombrés étant utilisés comme antioxydants (e.g., BHT, Irganox 1010) dans des matrices polymères grâce à leur capacité à stabiliser des radicaux formés dans la

matrice grâce aux groupements encombrés en position *ortho* du phénol, le syringarésinol peut ainsi être envisagé comme antioxydant du fait de la présence des deux groupements méthoxys en *ortho* du phénol sur les noyaux aromatiques.

Possédant deux groupements hydroxyles fonctionnalisables, ce bisphénol peut être également valorisé comme synthon pour accéder à de nouveaux monomères aromatiques biosourcés. Les chapitres 4, 5 et 6 se consacrent à la valorisation du syringarésinol comme « building block » pour la synthèse des polymères.

Références bibliographiques

- K. V. S. G. Krishna, M.P.S.M.; Moses, G.S.; Krishna, Asian J. Chem. 2009, 21, 11–
 22.
- T. Kishimoto, N. Takahashi, M. Hamada, and N. Nakajima, *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 2277–2283.
- [3] Patent : JP2010150152, 2010. Yshihide. S.; Seiichi. K.; Junichi. H.; Hironaga. M.;Hironaga. M
- Y. Fukuhara, N. Kamimura, M. Nakajima, S. Hishiyama, H. Hara, D. Kasai, Y. Tsuji,
 S. Narita-yamada, S. Nakamura, Y. Katano, N. Fujita, Y. Katayama, M. Fukuda, S. Kajita, and E. Masai, *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *52*, 38–43.
- [5] K. Syrjänen and G. Brunow, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 Org. Bio-Organic Chem. 1998, 3425–3430.

Optimization of the Laccase-Catalyzed Synthesis of (±)-Syringaresinol and Study of its Thermal and Antiradical Activities

<u>Abdus S. Jaufurally</u>, Dr. Andreia R. S.Teixeira, Louis Hollande, Pr. Florent Allais* and Dr. Paul-Henri Ducrot*

Abstract:

We report herein an optimized biocatalytic oxidative process for the synthesis of syringaresinol from sinapyl alcohol at a multigram scale (93% yield) in very high yield. Syringaresinol thereby obtained is of sufficient chemical purity and exhibits good thermal and antiradical activities to be used without further purification in many applications related to polymer synthesis as an alternative to bisphenol A. Different mechanistic pathways were discussed to better understand the impact of reaction conditions on the type of linkage formed during the oxidative process. Antiradical activity (DPPH analysis) and thermal properties of syringaresinol are also discussed.

Article publié dans ChemistrySelect, 2016, 1 (16), 5165–5171

1. Introduction

Lignins form the second most abundant family of natural polymers found in plants that provide them rigidity, in association with cellulose and hemicelluloses, and protection against microbial attacks. Due to their aromatic structure, they are considered as the main natural source of phenolic molecules and could be thereby an alternative to fossil-oil based aromatics. Lignins are biosynthesized through oxidative polymerization of three *p*-hydroxycinnamic alcohols (aka monolignols) initiated by oxidative enzymes such as laccases and peroxidases.^[1]

Thirty years ago, peroxidases were considered to be the exclusive plant enzymes involved in the oxidative polymerization of lignin precursors and laccase involvement in lignin biosynthesis was discredited by Nakamura in 1967.^[2] However, Sterjiades *et al.* and Driouich *et al.* showed that laccases could oxidized monolignols^[3,4] and their involvement in lignification was thereafter confirmed.^[5,6]



Scheme 1: Radical species issued from monolignols oxidation.

Laccases are multicopper oxidases found in plants, fungi and microorganisms.^[7] They contain four copper atoms allowing the reduction of oxygen to water and leading to monoelectronic oxidation of various substrates.^[8] During the first step of lignin formation, *p*-hydroxycinnamic alcohols are oxidized into the corresponding phenoxy radicals that can further be delocalized along the unsaturated backbone leading to different resonance forms involving carbon atoms (Scheme 1). Different mechanistic pathways thereafter lead to the

formation of oligomers, where linkages between subunits may involve either C-C or C-O bonds.

We recently showed in the case of flavonols^[9] and resveratrol,^[10] natural phenolic compounds that are also good substrates of laccases, leading to similar polymerization processes, that C-C bonds where indeed formed upon direct radical-radical coupling but C-O bonds (or C-C bonds involving nucleophilic aromatic carbons of resorcinol or phloroglucinol type) resulted from a first dismutation of two radicals leading to a reduced phenate ion and a carbocation that is thereafter trapped through nucleophilic addition of a nucleophilic species. Further experiments (work under publication) showed the oxidative oligomerization of monolignols to occur in the same way involving either radicals or cations derived from monolignols, β -O-4 linkages mainly resulting from the dismutation/nucleophilic addition pathway (See scheme 2 for the description of both pathways in the case of sinapyl alcohol). In *in vitro* experiments,^[10] balance between these two different mechanisms depends on the ratio between radicals and non-oxidized starting material and therefore on the experimental procedure.

Although laccases and peroxidases may oxidize phenolic compounds, either *in vivo* or *in vitro*, according to the same mechanistic pathways, the former exhibit less substrate selectivity and do not require the use of hydrogen peroxide as co-oxidant but only air oxygen. Therefore laccases may be considered more suitable catalysts at an industrial scale for the obtention of dimers or oligomers of *p*-hydroxycinnamic alcohols and the mechanistic considerations discussed above could allow a fine tuning of the experimental conditions in order to not only control the structure of the reaction products but also optimize their yield.



Figure 76 : Structures of some phenolic antioxydants

In this paper, we focus on syringaresinol (Figure 1), a symmetric lignan issued from the dimerization of sinapyl alcohol, being present either in its racemic or enantiopure form

depending on the biosynthetic pathways. Syringaresinol is known for its medical properties. For example, it has been found that syringaresinol β -D-monoglucoside contribute towards quick healing of wound damage^[16] and (+)-syringaresinol inhibits *Helicobacter pylori* motility which is responsible for gastric cancer.^[17] Beside its potential medical uses, syringaresinol, with its two phenols and its rigid *cis*-fused bis-furanic moiety, can also be seen as a potent substitute of bisphenol A (BPA), a petro-based bisphenolic compound used as monomer in resins like polycarbonate plastics^[18] and epoxy resins. The rigidity of the BPA molecule justified its use to form polymers having good mechanical and thermal properties.^[19] However, today, BPA is classified as endocrine disruptor^[20] and prohibited for many uses.

Natural syringaresinol can be obtained from plants such as Syringa patula,^[21] Aquilaria sinensis^[22] or Magnolia Thailandica^[23] by several solvent extractions and purifications on column chromatography. However, these processes require large amounts of solvents and only yield small quantities of syringaresinol. Chemical synthesis of racemic syringaresinol from sinapyl alcohol using stoichiometric amounts of oxidizing agents such as peracids,^[24] silver oxide^[25] and potassium ferricyanide^[26] have been reported, providing the desired compound in ca. 20%, 3% and 88% yields, respectively. Horseradish peroxidase-mediated synthesis of syringaresinol has also been investigated, but yields never exceeded 25% and purification steps were needed.^[27,28] More recently, Ozawa et al.^[29] reported the use of hematin-appended-6-amino-6-deoxycellulose/H₂O₂ as biocatalyst for the milligram-scale production of syringaresinol from sinapyl alcohol in 83% yield after purification on silica gel and without asymmetric induction. To our knowledge, the better yield (67% after recrystallization) has been obtained through copper catalysis.^[30] Although some of the above synthetic procedures provide the target compound in good to very good yields, they have drawbacks in terms of potential toxicity of the reagents used, cost (reagents and purification steps) and poor scalability at a multigram scale.

In the present paper, we report an optimized biocatalytic oxidative process for the synthesis of syringaresinol from sinapyl alcohol at a multigram scale. The different mechanistic pathways discussed above were used to better understand the impact of reaction conditions (e.g., temperature, pH, enzyme addition mode) on the type of linkage formed during the oxidative process. Finally, as syringaresinol could be regarded, due to its peculiar chemical structure, exhibiting two hindered phenols as an alternative to other antiradical and/or antioxidant synthetic molecules,^[31] its antiradical properties have been evaluated by DPPH analysis^[32] and compared to commercial antioxidants such as BHT, BHA and Irganox 1010 (Figure 1).

2. Results and Discussion

In sinapyl alcohol, due to the presence of the two methoxy groups on the aromatic ring in ortho position of the phenol group, only two different linkages are observed upon oxidation (β - β and β -O-4 bonds). The formation of the β - β bond leading to syringaresinol results from the radical-radical coupling of two radicals centered on the β carbons leading to a bis methylene quinone intermediate, further giving the bis-furanic system upon 1,6-nucleophilic addition of the hydroxyl groups in γ position and rearomatization (Scheme 2). It is noteworthy to mention that syringaresinol can form higher oligomers, but only as acting as nucleophile for the formation of a β -O-4 bond with a sinapyl alcohol monomer. An appropriate synthesis of syringaresinol through oxidative coupling of two sinapyl alcohol molecules therefore requires finding experimental conditions that will favor radical-radical coupling *vs* dismutation/nucleophilic addition, thereby avoiding the formation of higher oligomers.



Scheme 77 : Mechanisms of formation of inter-unit linkages issued from the oxidation of sinapyl alcohol

Sinapyl alcohol was reacted in a standard procedure with *Trametes versicolor* laccase (0.1 U/mg of substrate) in acetone (20% v/v) and citrate/phosphate buffer solution at pH 4.5, the optimal pH for laccase from *Trametes versicolor* activity and stability.^[33] However, in order to favor the radical-radical process, according to mechanistic considerations, two main features

have been used. Firstly, the rate of introduction of the reagents will have a direct impact on the ratio between oxidized and non-oxidized monomers and thus on the ability of the dismutation process to occur. Impact of the mode of introduction of the substrate and of the reagent has indeed been demonstrated to have an important influence on the structure of the oligomers formed in the course of the reaction.^[10,34] Two modes of addition of the enzyme in the reaction mixture were therefore designed: either a rapid (R) addition of the enzyme in a buffer solution to a solution of the substrate in a buffer/co-solvent solution or a slow addition (S) of the enzyme at a given rate via a syringe pump. Secondly, the temperature of the reaction will play an important role, as an increase of the temperature would disfavored the π - π stacking interactions required for a dismutation process. After extraction (dichloromethane and ethyl acetate) crude products were subsequently analyzed by gel permeation chromatography (GPC) without further purification.

Figure 2 shows the GPC chromatograms of the reactions performed with the two addition modes at 40 °C. Higher amount of oligomers were obtained in the rapid mode than in slow mode indicating that β -O-4 bonds were favored in the rapid mode since oligomers of sinapyl alcohol must involve mostly β -O-4 coupling even if incorporating syringaresinol substructures. The major dimer formed in rapid mode was estimated to be β -O-4 dimer from GPC results. In the slow mode, syringaresinol was identified as the major dimer by NMR. Indeed, in the slow mode, the concentration of phenoxy radical is lowered, so that π - π stacking interactions between the phenoxy radical with non-oxidized phenol is favored against those between two phenoxy radicals that would allow dismutation to occur.



Figure 2 : GPC chromatograms of the oligomerization of sinapyl alcohol with laccase from *Trametes versicolor* in continuous rapid and slow methods at 40 °C (20% v/v acetone as co-solvent, reaction time: 5h30min)



Figure 78 : GPC chromatograms of the oligomerization of sinapyl alcohol with laccase from *Trametes* versicolor at 25 °C and 40 °C in slow mode (20% v/v acetone as co-solvent, reaction time: 5h30min)

The influence of temperature was also investigated in order to have a better understanding of the parameters affecting the production of syringaresinol. The same experiment was done as before but at only 25 °C (room temperature) using S addition mode in 20% v/v acetone as co-solvent. Even such a small change in experimental conditions drastically affected the course of the reaction. Indeed, as shown in Figure 3, performing the reaction at 25 °C resulted in the production of a mixture of dimers (syringaresinol (β - β) and β -O-4), oligomers, and 2,6-dimethoxybenzoquinone (2,6-DMBQ), an undesired product which has been isolated from the mixture by silica gel flash chromatography and characterized by NMR spectroscopy. 2,6-DMBQ can be assumed to come from the further fragmentation of the β -O-4 bonds leading to smaller molecules such as syringaldehyde, the latter being, upon auto oxidation, transformed into 2,6-DMBQ. At 40 °C, dimers were obtained as predominant products, syringaresinol being the major dimer, whereas very little 2,6-DMBQ was formed.

The increase in temperature thus selectively favors formation of syringaresinol, while decreasing the amounts of oligomers and 2,6-DMBQ. Since the amount of oligomers was decreased, we can conclude that β -O-4 bonds were not favored during the oxidative coupling at higher temperatures. Indeed, π - π stacking interactions required for the dismutation process being disfavored at a higher temperature (40 °C),^[35, 36] lower amounts of β -O-4 bonds are formed. These results further confirm the mechanistic discrepancy proposed between β - β and β -O-4 bond formation. In these conditions, syringaresinol was obtained in 76% yield but needed a careful purification to be used for further transformations.

As we aimed at avoiding any purification step, optimization of the reaction conditions was explored through design of experiment with temperature, pH, enzyme loading, co-solvent,

enzyme addition rate and substrate concentration as variables (see supporting information). A fractional factorial design method^[37] was employed for the maximization of the syringaresinol yield. This procedure allowed determining the effect of each variable and their interactions on the syringaresinol yield. Even though 40 °C was the optimal temperature range reported for laccase activity and stability,^[33] the temperature was varied in order to determine its potential impact on the yield. However, only a short range of temperature was chosen (from 40 to 50 °C) to prevent any enzyme denaturation. The variation ranges of pH was fixed taking into account the stability and activity of laccase reported by Stoilova et al.^[32] Acetone and acetonitrile were chosen as co-solvent as they proved suitable for laccase mediated polymerization.^[38] Finally, substrate concentrations and enzyme solution addition rates were chosen in such a way that the minima were the values used in the previously non-optimized conditions. The other conditions were fixed based on the results already reported:^[34] citrate/phosphate buffer volume added in slow mode (50 mL), initial volume of substrate solution (50 mL), ratio of co-solvant (20% v/v of the initial volume) and reaction time (5.5 hours, corresponding the time needed to add 50 mL of enzyme solution at 9 mL/h).



Figure 79 : Impact factor of each parameter on syringaresinol yield, (Temp: temperature; Enz: enzyme loading; Flow: laccase addition flow rate; Sub: initial substrate concentration)

Analysis of variance indicates that second-order polynomial model (see supporting informations) is adequate to represent the relationships between the syringaresinol yield and the significant variables. The graphical representation of the scaled and centered coefficients of the model allows an easier interpretation of the model (Figure 4). In the experimental

region, results showed that there is no contribution of the temperature for values higher than 40 °C, and that is possible to obtain high values of yield using both acetonitrile and acetone. The most significant coefficients are the substrate concentration (Sub) and its respective quadratic term (Sub*Sub). Their positive values showed that both have a synergetic effect on the yield. The pH also contributes positively to the yield which is in accordance with higher enzyme stability for pH between 5 and 8.^[39] On the other hand, the enzyme loading (Enz) and the enzyme solution flow (Flow) presented antagonistic effects on the syringaresinol yield, confirming the previous experimental observations related to the production of undesired products (oligomers and 2,6-DMBQ) for high enzyme loading inherent to a R mode. Although temperature has been shown to be an important factor in the increase of the yield of syringaresinol, it did not appear to be a significant factor between 40 and 50 °C due to small temperature variation. The optimal flow (9 mL/h) indicates that the reaction time should be at least 5.5 hours, however, a further optimization for this parameter is required. Furthermore, there is an inhibition due to the interaction of the enzyme loading and the substrate (Enz:Sub). Interactions between these two parameters are largely reported in literature. [40]

The optimal conditions to obtain at least 80% of syringaresinol yield were found to be: pH=5, 0.1 U/mg of substrate for the enzyme loading (Enz), a low addition rate of the laccase solution (Flow=9 mL/h) and 10 mg/mL for the sinapyl alcohol initial concentration (Sub). For the non-significant factors (i.e., temperature and co-solvent nature), 50 °C and acetonitrile were chosen to validate externally the model. Three replicates were done in these conditions giving a mean syringaresinol yield of 88.0% by HPLC analysis. Taking into account the confidence intervals at 95% level (±4.8), this value is in accordance with the one predicted by the model (83.2%).

After the optimization of the reaction parameters, the reaction time has then been considered in order to monitor the formation of syringaresinol and the consumption of sinapyl alcohol. The reaction kinetic was done on a larger scale (4 g) of sinapyl alcohol (Figure 5).



Figure 80 : Reaction kinetics of sinapyl alcohol and syringaresinol at 50 °C in slow addition mode (9 mL/h). Reaction performed on 4 g of sinapyl alcohol. (HPLC conditions: Thermoscientific Syncronis aQ column at 40 °C, flow rate at 1.0 mL/min with water/acetonitrile)

The optimal reaction time was found to be 470 minutes resulting to a maximum amount of syringaresinol and a total consumption of sinapyl alcohol. Beyond this time, syringaresinol was found to be engaged in further transformations. In summary, the optimization all these parameters allowed us to synthesize syringaresinol in very good yield (93%) and with a purity high enough to avoid any further purification step. The ¹H NMR spectra and the HPLC chromatogram of the crude product show the presence of syringaresinol with a high purity (See Supporting Informations).

Several easy and quick methods based on the capacity of a potential antioxidant to scavenge free radicals in liquid media have been developed over years^[41,42] to determine the antioxidant activity of organic compounds. The DPPH analysis,^[32] mostly used today, is based on the capacity of a potential antioxidant to scavenge free DPPH radicals in liquid media providing the antiradical activity, correlation of which with the antioxidant activity is generally accepted. DPPH analysis was performed on pure syringaresinol in order to determine its antioxidant property. The EC₅₀ value is defined as the amount of antiradical molecule needed to reduce 50% of the amount of DPPH radicals. The lower the EC₅₀ value, the higher the antiradical activity. The EC₅₀ value of syringaresinol was compared to that of

sinapyl alcohol, sinapic acid, and three commercially available antioxidants, BHT, BHA and Irganox 1010.



Figure 81 : EC₅₀ values obtained from DPPH analysis

Data reported in Figure 6 demonstrate that syringaresinol exhibits better antiradical activity than its monomer (i.e., sinapyl alcohol), BHT and BHA. The EC₅₀ value of syringaresinol was half that of sinapyl alcohol. This can be explained by the fact that syringaresinol has twice the number of phenolic group than sinapyl alcohol. However, syringaresinol is more than twice efficient than sinapyl alcohol, clearly indicating the influence of its chemical structure on the antiradical activity. No significant difference was noticed between methoxylated (sinapic acid) and butylated phenols (BHT). Even when benchmarked with Irganox 1010, an antioxidant used in polymer matrices such as polyolefins because of its high antiradical activity given by the stabilization of the four di-2,6-*t*-butyl substituted phenols stabilizing the phenoxy radical formed after H-transfer, syringaresinol is more antiradical (EC₅₀ = 4.3 nmol) than Irganox 1010 (EC₅₀ = 2.7 nmol) with four phenolic groups when EC₅₀ are expressed on a phenol molar basis.

Finally, the antiradical activity of syringaresinol was compared to that of novel biobased bisphenols previously synthesized in our lab from ferulic, coumaric and sinapic acid (Figure 7). ^[43] We showed that the methoxylation degree of the aromatic rings influences the antiradical activity, the higher the methoxylation degree, the higher the antiradical activity. Herein, antiradical activity of syringaresinol is compared to sinapic acid–based bisphenols: saturated 1,4-butanediol-bis dehydrosinapate (**BDS sat**) and isosorbide-bis dehydrosinapate (**IDS sat**) (Figure 8).



Figure 82 : Sinapic alcohol/acid-based macrobisphenols

Results showed that **BDS sat** and **IDS sat** have lower EC_{50} values (2.88 and 2.99 respectively) than syringaresinol. This may be explained by the fact that **BDS sat** has a C4 alkyl chain allowing more flexibility of the molecule and better radical scavenging activity^[43]. The higher EC_{50} value of syringaresinol compared to **IDS sat** and **BDS sat** can again be explained by the rigidity of the molecule. The absence of flexible alkyl chains between the aromatic rings increases the rigidity of syringaresinol. As a result, poorer radical scavenging is obtained due to lack of flexibility.



Figure 83 : EC₅₀ values of novel biobased bisphenols synthesized by Reano et al.

The thermal stability of syringaresinol and commercial phenolic antioxydants was evaluated by thermogravimetry (TGA). Data revealed that syringaresinol exhibits a high thermostability (342 °C) similar to that of Irganox 1010 (353°C) and significantly higher than those of BHT (144°C) or BHA (155°C), that confirms its potential for polymer application either as building block or as additive.

3. Conclusions

We have shown that the outcome of the dimerization of sinapyl alcohol ^[44] in presence of laccase from *Trametes versicolor* is significantly affected by the temperature and laccase addition mode and rate. When laccase solution was added in rapid mode, less β - β bonds (i.e., less syringaresinol) were identified by GPC. However, in slow mode, the amount of β - β bonds was increased forming overwhelming quantity of syringaresinol. At room temperature (25 °C), a mixture of oligomers, 2,6-DMBQ, β - β and β -O-4 dimers was formed. When the temperature was increased to 40 °C, there was a considerable decrease in the amount of 2,6-DMBQ, oligomers and β -O-4 dimer, favoring the formation of syringaresinol (β - β dimer). With regards to the potentialities of syringaresinol as functional additive (e.g., antiradical/antioxidant) or synthon/monomer, its biocatalyzed synthesis was successfully optimized through design of experiments, yielding syringaresinol in yields up to 93% with no

need of purification. DPPH and TGA analyses revealed, respectively, good antiradical activity and thermal stability with respect to commercial phenolic compounds (BHT, BHA, Irganox 1010) and novel promising biobased bisphenols. These results demonstrate the great potentiality of syringaresinol as a biobased platform for the synthesis of renewable and nontoxic alternatives to BPA-based monomers. Further work, dealing with the use of syringaresinol as building block for polymer synthesis has been recently published.^[45]

4. Experimental Section

Sinapic acid, diisobutylaluminum hydride (1M in methylene chloride) and laccase from Trametes versicolor were purchased from Sigma Aldrich and used without purification. Citric acid and sodium phosphate dibasic were purchased from Merck. Pure syringaresinol standard was produced by silica gel flash chromatography using cyclohexane and ethyl acetate as eluant (50/50). Ultra-pure laboratory grade water (MilliQ, 18.2 MQ, 25 °C) was used to prepare buffer solutions. Ethyl acetate, cyclohexane, dichloromethane and acetonitrile (HPLC grade) were purchased from Thermofisher Scientific and used as received. Evaporations were conducted under reduced pressure at temperature less than 37 °C. FT-IR spectra were recorded on Agilent Cary 630. ¹H and ¹³C spectra were recorded in chloroform-d (CDCl₃ 99.8%) and DMSO-d₆ on a Bruker Fourier 300 MHz instrument. Chemical shifts are shown as δ -values given in ppm and J in Hz using CDCl₃ (7.26 ppm in ¹H, 77.16 ppm in ¹³C) and DMSO- d_6 (2.50 ppm in ¹H) as reference. GPC analysis was performed on an Agilent 1260 Infinity GPC/SEC system equipped with a UV detector (280 nm). Samples were prepared at concentrations of about 3 mg/mL in THF GPC grade. A PLgel 5 µm, 100 Å (0-5000 g/mol range) column (600 x 7.5 mm) was used under the following conditions: injection 20 µL at 1 mL/min of THF GPC grade, 20 min run time. Conventional calibration was done with seven polystyrene standards from Agilent. HPLC analyses were performed on a Thermofisher Ultimate 3000 equipped with DAD detector (210 nm) and a Thermoscientific Syncronis aQ (250 x 4.6 mm, 5 µm) column. Samples were prepared at concentrations of about 3 mg/mL in acetonitile HPLC grade. The following conditions were then applied: injection 10 µL, column oven temperature 40 °C, flow rate at 1.0 mL/min with water/acetonitrile as eluant (0-12 min from 90/10 to 80/20, 12-30 min isocratic 80/20, 30-35 min from 80/20 to 60/40, 35-40 min isocratic 60/40, 40-42 min from 60/40 to 90/10, 42-47 min isocratic 90/10). Retention times: $t_{\rm f}$ (Syringaresinol) = 36.82 min, $t_{(2,6-DMBQ)} = 8.65$ min. The antiradical activities of all phenolic compounds have been evaluated by DPPH analysis according to Brand-Williams and co-workers.³¹ 190 µL of

homogenate DPPH solution (200 μ M) in ethanol was added to a well containing 10 μ L of antiradical molecule solution in ethanol at different concentrations (1115 μ M to 3.1 μ M). The DPPH test was carried out in a microplate Multiscan FC system performing 1 scan every 5 min for 7.5 hours. 42 nmol of DPPH and 0.6 to 223 nmol of antioxydant were used for the reaction. EC₅₀ values were obtained using different amounts of antioxidant and were expressed in nmol. DPPH analysis was performed at least three times for each antioxidant. TGA were recorded under inert atmosphere (N₂) at 10 °C.min⁻¹ on a Q500 from TA Instrument. HRMS were recorded by the PLANET platform at URCA on a Micromass GC-TOF.

1. Ethyl sinapate: Ethyl (E)-3-(4-hydroxy-3, 5-dimethoxyphenyl) acrylate

To a solution of sinapic acid (1 g, 4.5 mmol, 1 eq) in 15 mL of ethanol (0.3M) at room temperature, concentrated sulphuric acid (0.3 mL) were added dropwise. The mixture was stirred with a magnetic stirrer under reflux at 80 °C for 23 hours. The reaction mixture was allowed to cool and the solvent was evaporated under reduced pressure. The product was then dissolved in 400 mL of ethyl acetate, washed with a saturated solution of NaHCO₃ (2*60 mL) and brine (50 mL). The organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. 93% of crude ethyl sinapate was obtained as a white powder and used without further purification. m.p. = 69 °C. ¹H NMR $\delta_{\rm H}$ (300 MHz, CDCl₃): 1.36 (t, 3H, *J*=7.2 Hz, H₇), 3.92 (s, 6H, H₅), 4.29 (quad, 2H, *J*=7.2 Hz, H₆), 5.76 (s, 1H, OH_{phenol}), 6.33 (d, 1H, *J*=15.9 Hz, H_β), 6.77 (s, 2H, H₂), 7.62 (d, 1H, *J*=15.9 Hz, H_α)

2. Sinapyl alcohol:⁴⁴ (E)-4-(3-hydroxyprop-1-en-1-yl)-2, 6dimethoxyphenol

To a solution of ethyl sinapate (5 g, 20 mmol, 1 eq) in 100 mL of dichloromethane (0.2M) under nitrogen, 66 mL (66 mmol, 3.3 eq) of diisobutylaluminium hydride (1M in dichloromethane) were added dropwise at 0 °C. The mixture was then stirred with a magnetic stirrer at room temperature for three hours. A saturated solution of sodium potassium tartrate was added dropwise to the mixture at 0 °C until precipitation. 100 mL of dichloromethane and 100 mL of water were added for dissolution. The reaction media was acidified with a solution of HCI (2M) until pH 4. The mixture was then stirred vigorously for 12 hours. The organic phase was separated, washed, dried over anhydrous magnesium

sulphate, filtered and the solvent evaporated at reduced pressure. The crude product was then purified on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate as eluant (50/50). 70% of pure product (viscuous oil) was obtained. ¹H NMR δ_{H} (300 MHz, CDCl₃): 3.90 (s, 6H, H₅), 4.31 (d, 2H, J = 6.0 Hz, H_Y), 5.58 (s, 1H, OH_{phenol}), 6.19 (dt, 1H, J = 6.0 Hz and 15.9 Hz, H_β), 6.49 (d, 1H, J = 17.7 Hz, H_α), 6.63 (s, 2H, H₂). ¹³C NMR δ_{C} (75 MHz, CDCl₃): 56.3 (C₅), 63.8 (C_Y), 103.3 (C₂), 126.6 (C_β), 128.2 (C_α), 131.5 (C₁), 134.8 (C₄), 147.1 (C₃).

3. Syringaresinol: 4,4'-(tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4diyl)bis(2,6-dimethoxyphenol)

Sinapyl alcohol (4 g, 19 mmol, 1 eq) was dissolved in acetonitrile (80 mL) in a triple-neck round bottom flask equipped with a cooling system and citrate/phosphate buffer (320 mL) at pH 5 were added [C=0.05M]. A solution containing 35.2 mg of laccase from Trametes Versicolor (0.1 U/mg of substrate) in 50 mL of citrate/phosphate buffer was added dropwise to the sinapyl alcohol solution at a rate of 9 mL/hour with a syringe pump. The reaction mixture was stirred vigorously with a magnetic stirrer in the presence of O_2 (air) at 50 °C for 470 min in darkness. At the end of the reaction, the product was extracted with 2*150 mL of dichloromethane and 2*150 mL of ethyl acetate. The organic phases were combined, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. 3.7 g of pure syringaresinol was obtained as a white powder (93% yield) and no further purification was needed (see Supporting Information). m.p. = 169 °C, $T_d(5\%)$ = 281 °C. FT-IR (v_{max} cm⁻¹): 3424 (OH), 1400-1600 (aromatics), 1000-1300 (C-O-C). UVλ_{max} = 210 nm. HRMS: calculated *m/z* C₂₂H₂₆O₈Na: 441.1525; found: 441.1516. ¹H NMR δ_H (300 MHz, $CDCI_3$): 3.10 (m, 2H, H_B), 3.90 (s, 12H, H₅), 3.90 (m, 2H, H_{v1}), 4.29 (dd, 2H, J = 6.9 Hz and 9.0 Hz, H_{v2}), 4.73 (d, 2H, J = 4.2 Hz, H_a), 5.51 (s, 2H, OH_{phenol}), 6.59 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR δ_{C} (75 MHz, CDCl₃): 54.4 (C_β), 56.4 (C₅), 71.8 (C_y), 86.1 (C_α), 102.7 (C₂), 132.1 (C₁), 134.3 (C₄), 147.2 (C₃). Higher purity may be obtained through recrystallization³⁰ but didn't enhance syringaresinol reactivity in further transformations.⁴⁵

4. Experimental design and statistical analysis

A fractional factorial design Resolution IV was employed to determine the parameters and their interactions affecting the yield of syringaresinol dimer production. Table 1 presents the independent variables (x_i), levels and experimental design in terms of uncoded and coded (transformation of each real value into coordinates inside a scale with dimensionless values).

Table 1 – Independent variables and levels used for the fractional factorial design Resolution IV

Variables (<i>x_i</i>)	Level			
S	-1	0	1	
Temperature (°C)	40	45	50	
рН	3	4	5	
Enzyme loading (U/mg substrate)	0.1	0.55	1	
Co-Solvent	Acetonitrile		Acetone	
Flow of enzyme solution (ml/h)	9	14.5	20	
Substrate (mg/ml)	2	6	10	

Factorial designs have the advantage in being able to determine interactions between parameters with a minimal number of experiments (16 runs, 3 central points). This design was later updated to determine the quadratic terms (30 runs). To avoid bias, all runs were carried-out in a totally random order. Six additional runs were performed for model refining – Table 2. The variable levels (X_i) were scaled and centered (coded) according to the equation:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$
 i=1, 2, 3, ...,k (1)

where x_i is the dimensionless value of an independent variable, X_i is the real value of an independent variable, X_0 is the real value of an independent variable at the center point, and ΔX_i is the step change.

Modde v.11 software (Umetrics AB, Sweden) was used to generate the designs and analyze statistically the experimental data. In order to find a suitable approximation for the true functional relationship between independent variables and maximize the yield of syringaresinol dimer production, a second-order polynomial equation (2) was used, being expressed as:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{kii} x_i x_j$$
(2)

where Y represents the yield of syringaresinol dimer production, x_i are the independent variables, β_0 is a constant coefficient, and β_{ki} , β_{kii} and β_{kj} are the linear, quadratic and interaction coefficients, respectively.

Regression coefficients were determined by multiple linear regression (MLR). The significant model parameters were found by their p-value. Model validation was based on the variance (ANOVA) for each response, namely, by the analysis of R^2 , Q^2 and *lack of fit* test (LOF).

The optimal conditions were determined using a Nelder-Mead Simplex algorithm. This method computes the variable values that minimize simultaneously the normalized distance to target values of responses and DPMO (Defects Per Million Opportunities outside specifications). DPMO gives information about robustness to small disturbances introduced by the precision specified for the factors.

Table 2 – Experimental yield for syringaresinol production (determined by HPLC, for method see experimental section) obtained in the fractional factorial design Res. IV (1-19 runs), its complement for quadratic terms determination (20-30 runs) and additional runs for model refining (31-36 runs). Outliers (excluded from the data, point distant from other observations) are gray highlighted.

Run	Temperature (°C)	рН	Enzyme Ioading (U/mg substrate)	Co-Solvent	Flow (mL/h)	Substrate (mg/mL)	Yield (%)	
1	40	3	0.1	Acetonitrile	9	2	24.9	
2	50	3	0.1	Acetonitrile	20	2	78.4	
3	40	5	0.1	Acetonitrile	20	10	71.9	
4	50	5	0.1	Acetonitrile	9	10	87.9	
5	40	3	1	Acetonitrile	20	10	41.7	
6	50	3	1	Acetonitrile	9	10	38.1	
7	40	5	1	Acetonitrile	9	2	0.0	
8	50	5	1	Acetonitrile	20	2	0.0	
9	40	3	0.1	Acetone	9	10	83.5	
10	50	3	0.1	Acetone	20	10	70.9	
11	40	5	0.1	Acetone	20	2	0	
12	50	5	0.1	Acetone	9	2	0	
13	40	3	1	Acetone	20	2	0	
14	50	3	1	Acetone	9	2	0	
15	40	5	1	Acetone	9	10	52.7	
16	50	5	1	Acetone	20	10	44.2	
17	45	4	0.55	Acetonitrile	14.5	6	0.40	
18	45	4	0.55	Acetonitrile	14.5	6	0.70	
19	45	4	0.55	Acetonitrile	14.5	6	0.50	
Complementary runs for quadratic terms determination								

20	40	4	0.55	Acetonitrile	Acetonitrile 14.5		0.0	
21	50	4	0.55	Acetone	Acetone 14.5		0.0	
22	45	3	0.55	Acetonitrile	14.5	6	0.0	
23	45	5	0.55	Acetone	14.5	6	0.0	
24	45	4	0.55	Acetonitrile	9	6	0.0	
25	45	4	0.55	Acetone	20	6	0.0	
26	45	4	0.55	Acetonitrile	14.5	2	0.0	
27	45	4	0.55	Acetone	14.5	10	13.3	
28	45	4	0.1	Acetonitrile	14.5	6	1.7	
29	45	4	1	Acetone	14.5	6	0.0	
30	45	4	0.55	Acetonitrile	14.5	6	0.0	
Additional runs for model refining								
31	40	4	1	Acetonitrile	9	2	0.0	
32	40	5	1	Acetonitrile	9	10	58.1	
33	45	5	1	Acetonitrile	9	10	32.3	
34	45	3	0.1	Acetonitrile	9	10	67.9	
35	45	3	0.1	Acetonitrile	9	10	75.8	
36	50	5	0.1	Acetonitrile	9	10	87.0	

Analysis of variance (ANOVA, Table 3) indicates that second-order polynomial model (Eq. 2, Experimental Section) is adequate to represent the relationships between the syringaresinol yield and the significant variables (p-value < 0.05). Satisfactory coefficient of determination ($R^2 > 0.5$, using least squares method) and coefficient of cross-validation ($Q^2 > 0.5$, using the leave-one-out cross validation) were obtained, showing the goodness of fit and the goodness of prediction, respectively. Moreover, F-tests performed in ANOVA assessing the significance of the regression model (p-value<0.05) and the *lack of fit* (p-value>0.05) showed statistical significance of both models and a similar magnitude of replicate errors (*no lack of fit*).

Table 3– Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic polynomial fitted to the yield of syringaresinol production

	Degree of Freedom	Sum of Square s	Mean Squares	Standard Deviation	Significanc e
Regression	6	36091	6015	77.6	0.000 ^a
Residuals	26	638	23.6	4.9	
<i>Lack of fit</i> (model error)	23	606	25.3	5.0	0.254 ^b
Pure error (replicate error)	3	31.3	10.4	3.2	
R²/R²adj.℃	0.983/0.979				
Q ²	0.970				

^a Significant at the level 95%

^b No lack of fit

^c R² adjusted for degree of freedom

The fitting of a second-order polynomial equation (2) to the experimental data, allows determining the significant coefficients for the yield. The standard approach for selecting significant coefficients is based on their p-value (a p-value lower than 0.05 means that the coefficient is significant). Table 3 shows the significant coefficients (centered and scaled, SC, Eq. 1 in experimental section) as well as their standard error (Std. Err.), p-value and confidence interval (CI) at 95%.

Table 4 – Model coefficients (centered and scaled (SC), their standard error (Std. Err.), p-value and confidence interval at 95% ($CI_{95\%}$) for the yield of syringaresinol.

Yield	Coeff. SC	Std Err.	p-value	Cl _{95%} (±)
Constant	0.79	1.36		
рН	3.59	1.10	0.003	2.25
Enzyme loading	-6.12	1.04	2.64E-06	2.12
Flow of enzyme solution	-2.37	1.08	0.04	2.21
Substrate	32.5	1.17	2.11E-21	2.40
Substrate x Substrate	28.8	1.77	1.89E-15	3.64
Enzyme loading x Substrate	-9.01	1.24	7.67E-08	2.54

5. Acknowledgements

The authors would like to thank Région Champagne-Ardenne, Conseil Général de la Marne and Reims Métropole for their financial support.

Keywords: antioxidant activity, Trametes versicolor laccase, sinapyl alcohol, syringaresinol

6. Activité œstrogénique du syringarésinol

Dans l'objectif de substituer le bisphénol A par le syringarésinol, nous avons d'abord cherché à déterminer son activité œstrogénique avant de nous engager dans la synthèse des polymères. Cette étude⁴⁶ a été réalisée par le Dr. Patrick Balaguer et Marina Grimaldi de l'IRCM (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier), tous deux spécialistes de la perturbation endocrinienne. Lors de cette étude, l'interaction du syringarésinol avec le récepteur Erα a été évaluée et comparée à celles du bisphénol A et du 17β-estradiol (Figure 84).



Figure 84 : Activité œstrogénique du bisphénol A et du syringarésinol

Le 17 β -estradiol est une hormone sexuelle œstrogène présente dans le corps humain et se fixe sur le récepteur Er α . Son activité est donc considérée à 100% vis-à-vis de ce récepteur. Les activités des bisphénols sont alors exprimées relativement au 17 β -estradiol. Les résultats démontrent que le bisphénol A possède une activité de 60%, ce qui correspond à une fixation forte de la molécule sur le récepteur Er α confirmant que la molécule est un perturbateur endocrinien. Le syringarésinol, quant à lui, n'a qu'une activité de 10%, activité similaire à celle du blanc (ne contenant aucun bisphénol). Selon ces résultats, nous pouvons

conclure que le syringarésinol ne possède pas d'activité œstrogénique vis-à-vis du récepteur Erα. Le syringarésinol peut donc être envisagé comme une alternative non-toxique au bisphénol A.
7. Références bibliographiques

- 1. Y. Tobimatsu, T. Takano, H. Kamitakahara, and F. Nakatsubo, *Holzforschung* **2008**, 62, 495–500.
- 2. W. Nakamura, J. Biochem. **1967**, 62, 54–61.
- 3. R. Sterjiades, J. F. Dean, and K. E. Eriksson, *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 1162–1168.
- 4. A. Driouichit, A. Lainel and L. Faye, *Plant J.* **1992**, **2**, 13–24.
- 5. R. R. S. David M. O'Malley, Ross Whetten, Wuli Bao, Chen-Loung Chen, *Plant J.*, **1993**, *4*, 751–757.
- S. Berthet, J. Thevenin, D. Baratiny, N. Demont-Caulet, I. Debeaujon, P. Bidzinski, J. C. Leple, R. Huis, S. Hawkins, and L.-D. Gomez, *Lignins Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering*, Elsevier, 2012, vol. 61.
- 7. M. Lahtinen, K. Kruus, H. Boer, M. Kemell, M. Andberg, L. Viikari, and J. Sipilä, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *57*, 204–210.
- 8. K. Piontek, J. Biol. Chem. 2002, 277, 37663–37669.
- 9. S. Ghidouche, N-E Es-Safi and P.-H. Ducrot, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 619–623.
- 10. B. Cottyn, A. Kollmann, P. Waffo-Teguo, and P. H. Ducrot, *Chem. A Eur. J.* **2011**, *17*, 7282–7287.
- 11. M. R. and A. Z. M. DellaGreca, M. R. Iesce, L. Previtera, R. Purcaro, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, *7*, 28–32.
- 12. S. S. Norman G. Lewis, Laurence B. Davin, *Lignin Lignan Biosynth.* **1998**, *697*, 96–108
- 13. L. B. D. and N. G. Lewis, *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 453–461.
- 14. C. L. Heald, M. R. Ritchie, C. Bolton-Smith, M. S. Morton, and F. E. Alexander, *Br. J Nutr.* **2007**, *98*, 388–396.
- 15. M. Imran, N. Ahmad, F. M. Anjum, M. K. Khan, Z. Mushtaq, M. Nadeem, and S. Hussain, *Nutr. J.* **2015**, *14*, 71.

Optimisation de la synthèse enzymatique du syringarésinol et étude de ses propriétés thermiques et biologiques

- 16. A. A. Semenov, A. G. Enikeev, V. B. Khobrakova, Y. G. Razuvayeva, and S. M. Nikolayev, *Int. J. Biomed.* **2013**, *3*, 287–290.
- 17. M. Miyazawa, H. Utsunomiya, K.-I. Inada, T. Yamada, Y. Okuno, H. Tanaka, and M. Tatematsu, *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 172–173.
- 18. O. Haba, I. Itakura, M. Ueda, and S. Kuze, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1999**, 37, 2087–2093.
- 19. B. a. Sweileh, Y. M. Al-Hiari, M. H. Kailani, and H. a. Mohammad, *Molecules* **2010**, *15*, 3661–3682.
- 20. B. S. Rubin, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2011, 127, 27–34.
- 21. S. K. El-Desouky and A. M. Gamal-Eldeen, *Pharm. Biol.* 2009, 47, 872–877.
- 22. P.-F. Tu and D. Chen, J. Chinese Pharm. Sci. 2012, 21, 88–92.
- 23. W. Monthong, S. Pitchuanchom, and N. N. and W. Pompimon, *Am. J. Appl. Sci.* **2011**, *8*, 1268–1271.
- 24. K. V. S. G. . Krishna, M.P.S.M.; Moses, G.S.; Krishna, *Asian J. Chem.* **2009**, *21*, 11–22.
- 25. T. Kishimoto, N. Takahashi, M. Hamada, and N. Nakajima, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 2277–2283.
- 26. Patent : JP2010150152, **2010**. Yshihide. S.; Seiichi. K.; Junichi. H.; Hironaga. M.; Hironaga. M
- Y. Fukuhara, N. Kamimura, M. Nakajima, S. Hishiyama, H. Hara, D. Kasai, Y. Tsuji,
 S. Narita-yamada, S. Nakamura, Y. Katano, N. Fujita, Y. Katayama, M. Fukuda, S. Kajita, and E. Masai, *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *52*, 38–43.
- 28. K. Syrjänen and G. Brunow, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 Org. Bio-Organic Chem. **1998**, 3425–3430.
- 29. M. Ozawa, A. Fukutome, Y. Sannami, H. Kamitakahara, and T. Takano, *J. Wood Chem. Technol.* **2014**, *34*, 262–272.
- 30. B. Vermes, O. Seligmann, and H. Wagner, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3087-3089.

Optimisation de la synthèse enzymatique du syringarésinol et étude de ses propriétés thermiques et biologiques

- 31. D. V Aref, I. S. Belostotskaya, V. B. Vol, and N. S. Domnina, *Russ. Chem. Bull.* **2007**, *56*, 781–790.
- 32. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
- 33. I. Stoilova, A. Krastanov, and V. Stanchev, Adv. Biosci. Biotechnol. 2010, 1, 208–215.
- 34. V. Mechin, S. Baumberger, B. Pollet, and C. Lapierre, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 571–579.
- 35. H. Sun, K. Ye, C. Wang, H. Qi, F. Li, and Y. Wang, *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 10750–10756.
- 36. M. O. Sinnokrot, E. F. Valeev, and C. D. Sherrill, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 10887–10893..
- 37. L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström, and S. Wold, *Design of Experiments: Principles and Applications*, **2008**.
- F. A. Reano, F. Pion, S. Domenek, P. H. Ducrot, and F. Allais, *Green Chem.* 2016, 18, 3334-3345.
- 39. S. Kurniawati and J. A. Nicell, *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 7825–34.
- 40. F. D'Acunzo, C. Galli, and B. Masci, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5330–5335.
- 41. W. Pryor, J. Cornicelli, and L. Devall, J. Org. Chem. 1993, 58, 3521–3532.
- 42. M. N. Peyrat-Maillard, M. E. Cuvelier, and C. Berset, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80*, 1007–1012.
- 43. A. F. Reano, J. Chérubin, A. M. M. Peru, Q. Wang, T. Clément, S. Domenek, and F. Allais, ACS Sustain. Chem. Eng. **2015**, *3*, 3486–3496.
- 44. S. Quideau, and J. Ralph, J. Agric. Food Chem. **1992**, 40, 1108-1110.
- 45. L. Hollande, A. S. Jaufurally, P.-H. Ducrot, and F. Allais, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 44297-44304.
- 46. V. Delfosse, M. Grimaldi, J. Pons, A. Boulahtouf, A. le Maire, V. Cavailles, G. Labesse, W. Bourguet, and P. Balaguer, *PNAS*, 2012, **109**, 14930–14935.

Chapitre 4 : Polymérisation par ADMET de monomères issus du syringarésinol

ADMET polymerization of biobased monomers deriving from syringaresinol

Louis Hollande, Abdus Samad Jaufurally, Paul-Henri Ducrot*, Florent Allais*

Abstract: Renewable α, ω -dienes have been prepared from syringaresinol, a naturally occurring bisphenol deriving from sinapyl alcohol, and further studied as monomers in ADMET polymerizations. Polymerization was optimized according to catalyst loading and reaction conditions (in mass vs. in solvent), and led to polymers with molecular weight up to 14.1 kDa. Thermal analyses of these new polymers showed excellent thermal stabilities (257-360 °C) and tunable T_g (18-70 °C) depending on the structure of the starting α, ω -diene monomer.

KEYWORDS: ADMET polymerization, syringaresinol, bisphenol

Article publié dans RSC Advances 2016, 6, 44297-44304

1. Introduction

The collapse of fossil resources and rising prices may have been the first trigger for a biobased economy. Nevertheless, today, industries, customers and regulators (e.g., REACH) are increasingly demanding for eco-friendly and bio-based chemicals issued from sustainable industrial processes. In this context, the production of new platform chemicals from biomass through green processes is an alluring strategy for a sustainable development. Indeed, biomass offers a wide range of molecules that can be used to access valuable as synthons such polyols, furans, fatty acids, aliphatic alkanes/alkenes or aromatics/phenolics to name a few.ⁱ Out of these sustainable and valuable chemical feedstocks, sinapic acid, from the ancient greek σιναπι (sinapi), a major compound isolated from Brassicaceae seeds and also one of the three major p-hydroxycinnamic acids found in lignocellulosic biomass, is one of the most promising substitute to fossil phenolics. It is present in relatively large quantities in the form of sinapine (choline ester of sinapic acid) in the seeds of oil plants from the *Brassicaceae* family.²

In order to offer some new opportunities of valorization of this compound, and having dedicated ourselves to the synthesis and valorization of lignin-derived phenolics and more particularly *p*-hydroxycinnamic acids and derivatives,³⁻¹⁴ we recently optimized a chemo-enzymatic synthetic pathway allowing the synthesis of syringaresinol from sinapic acid (or syringaldehyde) in very high yield and purity.¹⁵ The work reported here presents the use of syringaresinol as precursor for the synthesis of novel α, ω -dienes monomers incorporating the two aromatic rings of syringaresinol linked through a *cis*-fused bisfuranic moiety. These monomers were then submitted to acyclic diene metathesis (ADMET) polymerization.

Indeed, thanks to the ease of handling and high functional group tolerance of the Ru-based catalysts used in ADMET, this method is a very useful approach for the construction of well defined polymer architectures¹⁶ and allowed the synthesis of renewable polymers, such as polyesters, polyethers, polyamides and many others, very promising for commercial applications.^{12,17-27} In spite of extensive research to develop commercial ferulic acid-,^{12,17} eugenol-,²² vanillin-²³ and bisvanillin-²⁴ renewable polymers, to the best of our knowledge, there is no example of ADMET polymerization involving sinapic acid derivatives (i.e., syringaresinol, syringaldehyde) as diene substrates.

The structure and thermal properties of these novel polymers were thereafter studied in order to evaluate their potential in industrial applications.

2. Experimental

Materials and methods

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich or Tokyo Chemical Industry Co and used as received. Solvents were purchased from ThermoFisher Scientific, DMF was dried on a mBraun SPS 800 system. Deuterated chloroform (CDCl₃) was purchased from Euriso-top. Evaporations were conducted under reduced pressure at temperature below 40 °C. Column chromatographies were carried out with an automated flash chromatography (PuriFlash 4100, Interchim) and pre-packed INTERCHIM PF-30SI-HP (30 µm silica gel) columns. FT-IR and UV analyses were performed on Cary 630 FTIR and Cary 60 UV-Vis from Agilent technologies, respectively. NMR analyses were recorded on a Bruker Fourier 300. ¹H NMR spectra of samples were recorded in CDCl₃ at 300 MHz (residual CHCl₃ signal at δ = 7.26 ppm). ¹³C NMR spectra of samples were recorded at 75 MHz (CDCl₃ signal at δ = 77.16 ppm). Thermo-gravimetric analyses (TGA) were recorded on a Q500, from TA. Around 5 mg of each sample was heated at 10 °C.min⁻¹ from 50 to 500 °C under nitrogen flow (60 mL.min⁻¹ ¹). Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms were obtained using a DSC Q20, from TA, under inert atmosphere (N_2). Around 5 mg were weighed in a pan which was then sealed and submitted to the following heat/cool/heat cycle: equilibration at -60 °C and hold for 5 min, heating from -60 °C to 200 °C at 10 °C.min⁻¹ and hold for 5 min, cooling from 200 °C to -60 °C at 10 °C.min⁻¹. Gel Permeation Chromatography (GPC) was performed at 40 °C on an Infinity 1260 system from Agilent Technologies with a quadruple detection (IR, UV, MALS, viscosimetry) and two PL-Gel 5 mm Mixed D column (300 mm × 7.5 mm) in THF (flow rate 1 mL.min⁻¹) using polystyrene calibration. HRMS were recorded by the PLANET platform at URCA on a Micromass GC-TOF.

Synthesis of (+/-)-syringaresinol

Sinapyl alcohol (4 g, 19 mmol, 1 eq) was dissolved in acetonitrile (80 mL) in a triple-neck round bottom flask equipped with a cooling system and citrate/phosphate buffer (320 mL) at pH 5 were added (0.05 M). A solution containing 35.2 mg of laccase from *Trametes versicolor* (0.1 U/mg of substrate) in 50 mL of citrate/phosphate buffer was added dropwise to the monolignol solution at a rate of 9 mL/hour with a syringe pump. The reaction mixture was stirred with a magnetic stirrer in the presence of O_2 (air) at 50 °C for 470 min in darkness. At the end of the reaction, the product was extracted with dichloromethane (2 x 150 mL) and ethyl acetate (2 x 150 mL). The organic phases were combined, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure and no further purification was needed.

White powder (93%). Mp: 169 °C. FT-IR (neat): v_{max} 3424 (OH), 1400-1600 (Ar), 1000-1300 (C-O-C). HRMS: (TOF MS, ES+): *m/z* calcd for $C_{22}H_{26}O_8Na$: 441.1525; found: 441.1516. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 3.10 (m, 2H, H_β), 3.90 (s, 12H, H₅), 3.90 (m, 2H, H_γ), 4.27 (dd, 2H, *J*=6.9 Hz and 9.0 Hz, H_γ), 4.73 (d, 2H, *J*=4.2 Hz, H_α), 5.51 (s, 2H, H_{phenol}), 6.59 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 54.4 (C_β), 56.4 (C₅), 71.8 (C_γ), 86.1 (C_α), 102.7 (C₂), 132.1 (C₁), 134.3 (C₄), 147.2 (C₃)

General procedure for the synthesis of α,ω -diene monomers

Syringaresinol (1 equiv) and K_2CO_3 (5 equiv) were dissolved in dry DMF (2 M) under nitrogen. Bromo-alkene (4 equiv) was then added, and the mixture was stirred and heated at 80 °C for 12 h. Reaction was quenched with water (v(H₂O) = v(DMF)) and the aqueous layer was extracted three times with ethyl acetate (3 x v(H₂O)). Organic layers were combined, washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. Crude product was purified by flash chromatography on silica gel Cyclohexane:AcOEt (from 95/5 to 50/50) to yield the corresponding α, ω -diene monomer.

• Bis-Allyl-O-syringaresinol (SYR-All)



White powder (75%). FTIR (neat): v_{max} : 1501 (C=C Ar). HRMS: (TOF MS, ES⁺): *m/z* calcd for C₂₈H₃₄O₈Na [MNa]⁺: 521.2151; found: 521.2142. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 3.10 (m, 2H, H_β), 3.85 (s, 12H, H₅), 3.91 (dd, 2H, *J* = 3.6 Hz H_γ), 4.33 (m, 2H, H_γ), 4.48 (d, 4H, *J* = 7 Hz, H₆), 4.73 (d, 2H, *J*= 4 Hz, H_α), 5.15 (m, 2H, H₈), 5.32 (m, 2H, H₈), 6.10 (m, 2H, H₇), 6.58 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 54.6 (C_β), 57.3 (C₅), 71.9 (C₆), 74.2 (C_{γ,γ}), 85.9 (C_α), 102.87 (C₂), 117.7 (C₈), 134.5 (C₇), 136.1 (C₁), 136.7 (C₄), 153.63 (C₃).

• Bis-Butene-O-syringaresinol (SYR-But)



Viscous oil (78%). FTIR (neat): v_{max} : 1501 (C=C Ar). HRMS: (TOF MS, ES⁺): *m/z* calcd for $C_{30}H_{38}O_8Na$ [MNa]⁺: 549.2464; found: 549.2474. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 2.49 (q, 4H, *J* = 6.9 Hz and 13.8 Hz, H₇), 3.10 (m, 2H, H_β), 3.84 (s, 12H, H₅), 3.90 (m, 2H, *J* = 3.6 Hz, H_γ), 3.99 (t, 4H, *J* = 7,2 Hz, H₆), 4.30 (m, 2H, H_γ), 4.72 (d, 2H, *J* = 4 Hz, H_α), 5.09 (m, 4H, H₉), 5.87 (m, 2H, H₈), 6.6 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 34.5 (C₇), 54.3 (C_β), 56.2 (C₅), 71.9 (C₆), 72.4 (C_{γ,γ}), 86.0 (C_α), 102.9 (C₂), 116.4 (C₉), 134.9 (C₈), 136.6 (C_{4,1}), 153.6 (C₃).

• Bis-Hexene-O-syringaresinol (SYR-Hex)



Viscous oil (71%). FTIR (neat): v_{max} : 1501 (C=C Ar). HRMS: (TOF MS, ES⁺): *m/z* calcd for C₃₄H₄₆O₈Na [MNa]⁺: 605.3090; found: 605.3098. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.54 (m, 4H, H₈), 1.7 (qt, 4H, *J* = 6.9 Hz, H₇), 2.1 (q, 4H, *J* = 7.2 Hz, H₉), 3.11 (m, 2H, H_β), 3.84 (s, 12H, H₅), 3.84 (m, 2H, H_γ), 3.93 (m, 4H, H₆), 4.31 (m, 2H, H_γ), 4.73 (d, 2H, *J* = 4.2 Hz, H_α), 4.94 – 5.04 (m, 4H, H₁₁), 5.84 (m, 2H, H₁₀), 6.58 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 25.1 (C₈), 29.5 (C₇), 33.5 (C₉), 54.3 (C_β), 56.2 (C₅), 71.9 (C₆), 73.21(C_{γ,γ}), 86.0 (C_α), 103.0 (C₂), 114.41 (C₁₁), 136.4 (C₁), 136.8 (C₄), 138.9 (C₁₀), 153.7 (C₃).

• Bis-Decene-O-syringaresinol (SYR-Dec)



Viscous oil (77%). FTIR (neat): v_{max} : 1502 (C=C Ar). HRMS: (TOF MS, ES⁺): *m/z* calcd for $C_{42}H_{62}O_8Na$ [MNa]⁺: 717.4342; found: 717.4351. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.30 – 1.44 (m, 20H, H _{8,9,10,11,12}), 1.73 (qt, 4H, *J* = 7.8 Hz, H₇), 2.02 (q, 4H, *J* = 7.1 Hz, H₁₃), 3.1 (m, 2H, H_β), 3.83 (s, 12H, H₅), 3.92 (m, 6H, H_{γ,6}), 4.29 (m, 2H, H_γ), 4,72 (d, 2H, *J* = 4.2 Hz, H_α), 4.89 – 5.28 (m, 4H, H₁₅), 5.75 (m, 2H, H₁₄), 6.55 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 25.8 (C₈), 28.9 – 30.1 (C_{7,9,10,11,12}), 33.8 (C₁₃), 54.3 (C_β), 56.1 (C₅), 71.9(C₆), 73.51 (C_{γ,γ}), 86.0 (C_α), 103.0 (C₂), 114.1 (C₁₅), 136.3 (C₁), 136.9 (C₄), 139.2 (C₁₄), 153.7 (C₃).

General Procedure for ADMET polymerizations

Mass polymerizations

Monomer (500 mg) and p-benzoquinone (2 eq. relative to Hoveyda-Grubbs II catalyst) were stirred at 100 °C, under vacuum for 5 min. Hoveyda-Grubbs II catalyst (0.1-10 mol%) was added and the reaction was continued, under vacuum, for 4 h at 100 °C. Reaction was quenched with 1 mL of THF and 4 drops of vinyl ethyl ether. Product was concentrated and further dissolved in THF (1 mL) and precipitated in cold methanol (50 mL).

Solvent polymerization

Monomer (1 eq.) and p-benzoquinone (2 eq. relative to Hoveyda-Grubbs II catalyst) were dissolved in dry DCM (2 M). Hoveyda-Grubbs II catalyst (1-10 mol%) was added and the reaction was stirred, under nitrogen, at 40 °C for 4 h. Reaction was quenched with 1 mL of THF and 4 drops of vinyl ethyl ether. Product was concentrated and a sample was taken for GPC analyses. The remainder was dissolved in THF (1 mL) and precipitated in cold methanol (50 mL).

Polymer obtained from **SYR**-*All* (P1) (1 mol% HG-II, 2 mol% 1,4-benzoquinone, 100 °C): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 3.10 (m, 2H, H_β), 3.84 (s, 12H, H₅), 3.90 (m, 2H, H_γ), 4.30 (m, 2H, H_γ), 4.49 (m, 4H, H₆), 4.74 (m, 2H, H_α), 6.05 (m, 2H, H₇), 6.58 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 54.7 (C_β), 56.6 (C₅), 72.3 (C₆), 73.5 (C_γ), 86.3 (C_α), 103.2 (C₂), 130.2 (C₇), 136.6 (C₁), 137.1 (C₄), 153.9 (C₃).

Polymer obtained from **SYR**-*But* (P2) (1 mol% HG-II, 2 mol% 1,4-benzoquinone, 100 °C): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 2.47 (m, 4H, H₇), 3.10 (m, 2H, H_β), 3.83 (s, 12H, H₅), 3.95 (m, 6H, H_{γ,6}), 4.29 (m, 2H, H_γ), 4.72 (d, 2H, *J* = 2.7 Hz, H_α), 5.60 (m, 2H, H₈), 6.55 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 34.4 (C₇), 54.3 (C_β), 56.2 (C₅), 71.9 (C₆), 72.9 (C_γ), 86.0 (C_α), 102.9 (C₂), 128,2 (C₈), 136.6 (C_{4,1}), 153.6 (C₃).

Polymer obtained from **SYR**-*Hex* (P3) (1 mol% HG-II, 2 mol% 1,4-benzoquinone, 100 °C): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.50 (m, 4H, H₈), 1.71 (m, 4H, H₇), 2.03 (m, 4H, H₉), 3.10 (m, 2H, H_β), 3.83 (s, 12H, H₅), 3.95 (m, 6H, H_{Y,6}), 4.29 (m, 2H, H_Y), 4.73 (d, 2H, *J* = 3,9 Hz, H_α), 5.43 (m, 2H, H₁₀), 6.55 (s, 4H, H₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 25.9 (C₈), 29.7 (C₇), 32.4 (C₉), 54.4 (C_β), 56.4 (C₅), 72.0 (C₆), 73.4 (C_Y), 86.1 (C_α), 103.1 (C₂), 130.4 (C₁₀), 136.5 (C₁), 137.0 (C₄), 153.7 (C₃).

Polymer obtained from **SYR**-*Dec* (P4) **P4** being slightly soluble, we were not able to get acceptable ¹H and ¹³C NMR spectrum.



Scheme 85 : Synthesis and ADMET polymerization of the four syringaresinol derived α, ω -diene monomers

3. Results and discussion

 α,ω -diene monomers **SYR**-*All*, **SYR**-*But*, **SYR**-*Hex* and **SYR**-*Dec* were prepared by conducting Williamson etherification of syringaresinol with four bromo-alkenes (3-bromoprop-1-ene, 4, bromobut-1-ene, 6-bromohex-1-ene and 10-bromodec-1-ene) in DMF at 80 °C, for 12 hours under nitrogen, in presence of potassium carbonate (Scheme 1). These four α,ω diene monomers were used to study the impact of the chain length of the olefin on the polymerizations and the thermal properties of the resulting polymers.

Entry	ADMET conditions	HG-II (mol%)	Monomer	Polymer	M _n (kDa)	M _w (kDa)	DPn	ÐM	Conversion ^c (%)	<i>T_d</i> ^{5%} (°C)	<i>T</i> _d ^{50%} d (°C)	<i>Т</i> _g ^е (°С)
1	In mass [⊳]	1	SYR-All		2.0	2.6	4	1.3	59	283	352	65
2	In mass ^b	5	SYR-All	P1	2.2	2.9	4	1.3	73	266	327	70
3	In mass ^b	10	SYR-All		2.8	3.9	6	1.4	80	263	343	68
4	In solvent ^a	1	SYR-All		1.4	1.6	2	1.1	/	/	/	/
5	In solvent ^a	5	SYR-All	P1	1.6	2.1	3	1.3	/	/	/	/
6	In solvent ^a	10	SYR-All		2.2	2.8	4	1.2	/	/	/	/
7	In mass [⊳]	1	SYR-But	P2	4.5	7.7	9	1.7	93	283	376	58
8	In mass [⊳]	5	SYR-But		5.1	8.5	10	1.7	88	274	369	60
9	In mass [⊳]	10	SYR-But		6.7	13.1	13	1.9	89	272	339	61
10	In mass [⊳]	1	SYR-Hex		8.9	18.3	15	2.1	94	308	392	39
11	In mass [⊳]	5	SYR-Hex	P3	8.3	15.5	14	1.9	90	268	342	40
12	In mass [⊳]	10	SYR-Hex		8.9	16.8	15	1.9	86	257	324	38
13	In solvent ^a	1	SYR-Hex		1.4	1.5	2	1.1	/	/	/	/
14	In solvent ^a	5	SYR-Hex	P3	8.4	30	14	3.6	/	/	/	/
15	In solvent ^a	10	SYR-Hex		8.2	26.1	14	3.2	/	/	/	/
16	In mass ^⁵	1	SYR-Dec		13.0	25.5	19	2.0	97	360	393	20
17	In mass [⊳]	5	SYR-Dec	P4	12.7	28.6	19	2.2	95	349	392	19
18	In mass [⊳]	10	SYR-Dec		14.1	32.0	21	2.3	82	347	394	18

Table 3 : Analytical data (GPC, TGA and DSC) of the synthesized polymers via ADMET

^a **HG-II** (1, 5 or 10 mol%), 1,4-benzoquinone (2 equivalent relative to **HG-II**), DCM (2 M), 40 °C, 4 hours; ^b **HG-II** (1, 5 or 10 mol%), 1,4-benzoquinone (2 equivalent relative to **HG-II**), vacuum, 100 °C, 4 hours; ^c Calculated with the residual monomer amounts determined from the corresponding peak area on SEC traces of crude reaction mixtures prior precipitation; ^d TGA data recorded at 10 °C.min⁻¹ under nitrogen (60 mL.min⁻¹); ^e DSC data recorded at 10 °C.min⁻¹ under nitrogen (60 mL.min⁻¹), value determined at the 2nd heating scan

ADMET polymerization

We first studied the reactivity of the four syringaresinol-derived α,ω -diene in ADMET polymerization. Though it has been reported that ADMET polymerizations are favored when carried out under bulk conditions (aka in mass),^{28,12} we also performed polymerizations in solvent to verify if this also applied to syringaresinol-based α, ω -diene monomers (Scheme 1). For ADMET reactions conducted in mass at 100 °C, continuous vacuum (ca. 20 mbar) was applied to guarantee the efficient removal of ethylene and thus shift the equilibrium towards polymerization. The latter temperature was chosen as it has been already shown that, in the ADMET polymerization of rigid **IDF**-based α, ω -dienes¹² incorporating two dihydroferulate esters of isosorbide, heating the reaction mixture at 100 °C significantly improves the molecular weights by lowering the viscosity of the reaction medium thus facilitating both ethylene removal and stirring. Dichloromethane, previously reported as a suitable solvent for ADMET,²⁹ was used for in solvent polymerizations. Solvent reactions were performed at 40 °C under a low and steady nitrogen flow to remove ethylene but not dichloromethane. In both reaction conditions, 1,4-benzoquinone (2 eq. relative to catalyst) was used to limit olefin isomerization.³⁰ Finally, Hoveyda-Grubbs second generation catalyst (HG-II), with loadings varying from 0.1 to 10 mol%, was the only catalyst tested in this study as previous works by Abbas,³¹ Firdaus²³ and Barbara¹² have shown **HG-II** to be the most active towards the cross

metathesis of acrylates-, vanillin- and ferulic acid-based α, ω -dienes, respectively. All ADMET reactions were run for 4 hours and followed by GPC in order to identify the best conditions (nature of the α, ω -diene monomer, in mass vs. in solvent, catalyst loading) (Fig. 2). Table 1 summarizes the results of these polymerizations. The ¹H and ¹³C NMR spectra of all polymers are displayed in the Supporting Information.



Figure 1 : ¹H NMR spectra of SYR-*All*, SYR-*But*, SYR-*Hex* and SYR-*Dec* and their corresponding oligomers and polymers (P1, P2, P3 and P4)



Figure 86 : GPC traces of P1, P2, P3 and P4 (10 mol% catalyst)

Structural analysis

In addition to GPC, ¹H NMR spectrometry of the resulting crude polymerization mixtures was also performed not only to confirm the polymers structures but also to reveal potential

undesired side reactions such as ring-closing metathesis (RCM) or olefin isomerization (Figure 1). ¹H NMR spectra of monomers (**SYR**- *All* (A), **SYR**-*But* (B), **SYR**-*Hex* (C), **SYR**-*Dec* (D)) and their corresponding polymers obtained in mass reveal the decrease of intensity of the signals at 5.0-5.2 and 5.8-5.9 ppm corresponding to the terminal olefin protons along with the formation of the internal double bound whose signal is at 5.5 ppm (See Supporting Information). ADMET polymerizations performed in solvent led to short oligomers (Table 1, Entries 4-6 and 13-15) and higher dispersity (Table 1, Entries 14 and 15), whereas in mass ADMET polymerizations gave higher molecular weights as proven by the GPC results (Table 1, Fig. 2). Detailed analyses of ¹H and ¹³C NMR spectra show no evidence of isomerization of the double bond (Electronic supporting information).



Scheme 2 : Syringaresinol- and ferulic acid-derived¹² polymers via ADMET

On the basis of the results reported in Table 1 and Figure 1, it was concluded that in mass procedure with 1 mol% **HG-II**, at 100 °C for 4hours was the best procedure for ADMET polymerization for all monomers. In such conditions, syringaresinol-based polymers were obtained with M_n in the range of 4.5-14.1 kDa.

It is also noteworthy that ADMET polymerization of monomers bearing allyl moieties only provides low molecular weight oligomers. Furthermore, no RCM product was observed in the case of **SYR**-*All*, probably because of the ring strain of syringaresinol that prevents intramolecular ring closing metathesis.

Because in solvent ADMET conditions proved unsuitable for our monomers, only results for polymers obtained in mass are being considered in the following discussion (Table 1, Entries 1-3, 7-12 and 16-18). As previously observed in the case of isosorbide based α, ω -dienes,¹²

the rigid bicyclic structure of syringaresinol and its relatively high viscosity restricts the polymerization to a degree of polymerization (DP_n) up to *ca*. 20 (Table 1, Entries 16-18). As expected, because of decreasing viscosity, the longer the α , ω -dienes the higher the M_n (Table 1, Entries 3, 9, 12 and 18). Interestingly, while molecular weights (M_n) of polymers increase by 98% when but-1-ene was replaced by hex-1-ene (**P3** vs. **P2**, Table 1, Entries 10 vs. 7), they increase only by 46% when hex-1-ene is replaced by dec-1-ene (**P4** vs. **P3**, Table 1, Entries 16 vs. 10). Increasing the catalyst loading above 1 mol% resulted in similar to slightly higher molecular weights. In the other hand, lower catalyst loadings (e.g., 0.1-0.5 mol%) did not lead to higher molecular weight, neither did longer reactions times (8 hours vs. 4 hours).

In terms of reactivity, syringaresinol-based α, ω -diene proves as efficient as recently published **IDF**-*Hex* and **IDF**-*Dec* α, ω -dienes which give similar molecular weights when submitted to ADMET polymerization with **HG-II** (Scheme 2).¹²

Thermal properties

The thermal properties of monomers and polymers described in Table 1 were investigated by thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC).

Monomer	SYR-All	SYR -But	SYR-Hex	SYR-Dec
<i>T_{d 5%}</i> (°C)	220	273	300	328
<i>T_{d 50%}</i> (°C)	333	334	358	392

Table 4 : Thermostability of syringaresinol-based monomers

TGA analyses of the monomers revealed a thermostability ($T_{d 50\%}$) in the range of 333-392 °C (Table 2). Furthermore, the nature of the alkene impacts the degradation temperature ($T_{d 50\%}$). Indeed replacing but-1-ene by dec-1-ene strongly increases their thermostability by 58 °C (Table 2).

Thermal analyses of polymers **P1-P4** showed significant differences in $T_{d(5\%)}$ and glass transition temperature (T_g) depending on the alkene length (C_4 , C_6 and C_{10}) (Figure 3 & 4). Because of the presence of aromatic moieties and the rigidity of syringaresinol, all polymers exhibit a thermostability in the range of 257-360 °C ($T_{d(5\%)}$), the dec-1-ene based ones being the most stable (Table 1, Entries 16, 17 and 18).



Figure 87 : TGA analyses for polymers P1, P2, P3, and P4 (under nitrogen, 10 °C.min⁻¹)



DSC analyses also reveal that a decrease of the alkene chain length (from decene to butene) results in an inversely proportional increase of the T_g (P4<P3<P2<P1). Varying the nature of the α,ω -diene monomers thus provides T_g in the range of 18 to 70 °C (Fig. 4 & 5). Compared to IDF-*Hex* α,ω -diene monomer-based polymer¹² that exhibits a T_g of 18 °C, that

of **P3** deriving from **SYR**-*Hex* monomer is of 39 °C (Scheme 2). Such an increase could be explained by not only the shorter distance between the two phenols in the α, ω -diene monomer (12 atoms vs. 4 carbon atoms), but also by the presence of extra methoxy groups on the aromatic rings that increases the conformational barriers for chain motion.³² Finally, it is noteworthy to mention that all polymers are amorphous and do not show melting points (*T_m*) on DSC.



Figure 89 : Alkene chain-length dependence of the glass transition temperature (T_q)

4. Conclusions

In summary, syringaresinol-based α, ω -diene monomers were obtained in very good yields through a chemo-enzymatic synthetic pathway and were successfully polymerized via ADMET in presence of second generation Hoveyda-Grubbs catalyst. Mass polymerization resulted in polymers with M_n as high as 14.1 kDa. Thermal analyses through TGA and DSC demonstrated that these polymers are thermostable up to 257-360 °C and, more importantly, that their T_g can be easily tuned by adjusting the alkene length of the α, ω -diene monomers (from 18 to 70 °C). Prepared from renewable feedstocks, these polymers could be envisaged as sustainable substitutes to conventional petro-based polyesters.

SUPPORTING INFORMATION

The electronic supporting information (ESI) is available free of charge via the internet at http://pubs.acs.org (DOI: 10.1039/c6ra06348a)

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Region Champagne-Ardenne, the Conseil Général de la Marne and Reims Métropole for their financial support.

5. Références bibliographiques

- a) J. J. Bozell, J. O. Hoberg, et al. In Green Chemistry Frontiers in Benign Chemical Synthesis and Processes, Oxford University, 1998, p. 27-45; b) C. Okkerse, H. van Bekkum, *Green Chem.* 1999, 1, 107; c) D. L. Klass In Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals - Academic Press, 1998, p. 91-157, p. 495-542
- 2. N. Niciforovic, H. Abramovi, Comp. Rev. Food Sci. F. 2014, 13, 34-51.
- M. Quentin, V. Allasia, A. Pegard, F. Allais, P.-H. Ducrot, B. Favery, C. Levis, S. Martinet, C. Masur, M. Ponchet, D. Roby, L. Schlaich, L. Jouanin, H. Keller, *PLoS Pathog.* 2009, 5(1) doi: 10.1371/journal.ppat.1000264
- 4. F. Allais, M. Aouhansou, A. Majira, P.-H. Ducrot, Synthesis 2010, 16, 2787
- 5. F. Allais, P.-H. Ducrot, Synthesis 2010, 16, 1649
- L. M. M. Mouterde, A. L. Flourat, M. M. M. Cannet, P.-H Ducrot, F. Allais, *Eur. J. Org. Chem.* 2013, *1*, 173
- 7. B. Cottyn, A. Kollman, P. Waffo Teguo, P.-H. Ducrot, Chem. Eur. J. 2011, 17, 7282
- a) J. C. Dean, R. Kusaka, P. S. Walsh, F. Allais, T. S. Zwier, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, **136**, 14780; b) L. A. Baker, M. D. Horbury, S. E. Greenough, F. Allais, P. S. Walsh, S. Habershon, and V. G. Stavros, *J. Phys. Chem. Lett.* 2016, **7**, 56-61.
- 9. F. Pion, A. F. Reano, P.-H. Ducrot and F. Allais, RSC Adv. 2013, 3, 8988
- 10. F. Pion, P.-H. Ducrot and F. Allais, Macromol. Chem. Phys. 2014, 215, 431
- 11. M. Z. Oulame, F. Pion, P.-H. Ducrot, F. Allais, Eur. Polym. J. 2015, 63, 186-193
- 12. I. Barbara, A. L. Flourat, F. Allais, Eur. Polym. J. 2015, 62, 236-243
- A. F. Reano, J. Cherubin, A. M. M. Peru, Q. Wang, T. Clément, S. Domenek, F. Allais ACS Sust. Chem. Eng. 2015, 3, 3486-3496
- 14. A. F. Reano, F. Pion, S. Domenek, P.-H-Ducrot, F. Allais, *Green Chem.* 2016, DOI: 10.1039/C6GC00117C
- 15. A. S. Jaufurally, A. R. S. Teixeira, L. Hollande, F. Allais, P.-H. Ducrot, *Chem. Select,* 2016, *1* (16), 5165–5171
- 16. H. Mutlu, L. M. de Espinosa, M. A. R. Meier, Chem. Soc. Rev. 2011, 40, 1404
- 17. O. Kreye, T. Tóth, M. A. R. Meier, Eur. Polym. J. 2011, 47, 1804
- 18. H. Mutlu, M. A. R. Meier, Macromol. Chem. Phys. 2009, 210, 1019
- 19. L. M. de Espinosa, M. A. R. Meier, J. C. Ronda, M.Galià, V. Cadiz, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2010, *48*, 1649
- 20. T. W. Baughman; K. B. Wagener, Adv. Polym. Sci. 2005, 176, 1
- 21. O. Türünç, L. M. de Espinosa, M. A. R. Meier, *Macromol. Rapid. Commun.* 2011, **32**, 1357
- 22. S. Günther, P. Lamprecht, G. A. Luinstra, Macromol. Symp. 2010, 293, 15

- 23. M. Firdaus, M. A. R. Meier, Eur. Polym. J. 2013, 49, 156
- 24. A. Llevot, E. Grau, S. Carlotti, S. Grelier, H. Cramail, Polym. Chem. 2015, 6, 7693-7700
- 25. T. Lebarbé, A. S. More, P. S. Sane, E. Grau, C. Alfos, and H. Cramail, *Macromol. Rapid Commun.* 2014, **35**, 479-483
- 26. T. Lebarbé, M. Neqal, E. Grau, C. Alfos and H. Cramail, *Green Chem.* 2014, **16**, 1755-1758
- 27. A. Llevot, E. Grau, S. Carlotti, S. Grelier and H. Cramail, *Eur. Polym. J.* 2015, **67**, 409-417
- 28. M. D. Watson, K. B. Wagener, Macromolecules 2000, 33, 8963
- 29. M. D. Schulz, K. B. Wagener, ACS Macro Lett. 2012, 1, 449
- 30. S. H. Hong, D. P. Sanders, C. W. Lee, R. H. Grubb, J. Am. Chem. Soc. 2005, 31, 368
- 31. M. Abbas, C. Slugovc, Tetrahedron Lett. 2011, 52, 2560
- 32. H. T. H. Nguyen, M. H. Reis, P. Qi and S. A. Miller, Green Chem. 2015, 17, 4512.

Chapitre 5 : Polymérisation par réaction thiol-ène de monomères issus du syringarésinol

1. Introduction

La polymérisation thiol-ène est considérée comme une réaction de « click-chemistry » car elle peut être effectuée dans des conditions douces et donner de bons rendements^{1,2}. De nouveaux biomatériaux sont aujourd'hui synthétisés par polymérisation thiol-ène en raison d'une polymérisation rapide et régiosélective. C'est aussi une réaction propre et sans danger pour l'environnement qui permet d'améliorer les propriétés mécaniques et de dégradabilité des polymères^{3,4}. Quelques études rapportent des applications biomédicales des polymères thiol-ènes notamment dans la préparation de résines de restauration dentaire^{5,6}, d'hydrogels pour le transport des médicaments⁷ et la régénération des tissus⁸.

La polymérisation thiol-ène se fait comme une polymérisation radicalaire classique entre un dithiol et un diène. Elle comporte ainsi les trois étapes : amorçage, propagation et terminaison. La première étape I est la décomposition du dithiol en radical thiyle **A** par abstraction d'hydrogène (Figure 90). L'étape d'amorçage peut se faire par voie photochimique ou thermique en présence ou non d'initiateurs. Dans un second temps, l'étape de propagation se fait par l'attaque du radical thiyle sur la double liaison de l'alcène pour donner l'espèce **B** avec le radical centré sur le carbone (étape II). Enfin, cet électron est transféré à un autre dithiol pour régénérer un autre radical thiyle capable de réinitialiser le cycle de polymérisation (étape III). Ainsi, le polymère résultant de la polymérisation thiol-ène consiste en une alternance de monomère dithiol et d'oléfine².



Figure 90 : Etapes d'amorçage et de propagation de la polymérisation thiol-ène

Selon Carlson et Knight, la réaction de terminaison se fait préférentiellement par recombinaison plutôt que par dismutation des radicaux⁹. Les trois réactions de recombinaison possibles sont le couplage thiyle/thiyle, le couplage entre un thiyle et un radical centré sur le carbone et le couplage entre deux radicaux centrés sur le carbone (Figure 91).



Figure 91 : Etapes de terminaison de la polymérisation thiol-ène

2. Démarche

Dans ce chapitre, les monomères α, ω -diènes de syringarésinol précédemment synthétisés dans le chapitre 4, ont été engagés en polymérisation thiol-ène *via* « click-chemistry ». Les polymérisations ont été réalisées en présence de dithiols de structures différentes (flexibles et rigides) (Figure 92). Deux modes de polymérisation ont été testés, la polymérisation par voie thermique et celle par voie photochimique. Les conditions de polymérisation (e.g., initiateurs, durée de réaction, solvant) ont été optimisées afin d'obtenir les meilleures conversions et les plus hautes masses molaires. Le suivi de la polymérisation a été fait par RMN ¹H et GPC. Les impacts des différents dithiols sur la polymérisation thiol-ène et sur les propriétés thermiques des polymères obtenus ont ensuite été étudiés.



Figure 92 : Polymérisation thiol-ène des monomères α,ω-diènes de syringarésinol en présence des différents dithiols

3. Résultats et discussions

1. Polymérisation thiol-ène par voir thermique

Dans ce projet, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés par Meier *et al.*¹⁰ sur la polymérisation de dérivés de vanilline portant deux fonctions diène en présence de différentes dithiols (Figure 93). Le diène dérivé de la vanilline et le dithiol sont mis en réaction en quantité stœchiométrique. Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) obtenues pour ce type de polymérisation sont comprises entre 9 et 16 kDa. Les polymères obtenus présentent des températures de transition vitreuse comprises entre -22 °C et -38 °C, et les températures de fusion entre 36 °C et 69 °C.



Figure 93 : Un exemple de polymérisation par amorçage thermique entre le butanedithiol et un diène dérivé de la vanilline¹⁰

La polymérisation radicalaire est activée thermiquement par un amorceur. Les amorceurs les plus couramment utilisés sont les peroxydes ou les composés azoïques. Sous l'action de la chaleur, ces composés se dissocient en radicaux libres. Les températures de réaction mises en jeu le plus souvent sont comprises entre 60 et 110 °C. L'un des amorceurs azoïques le plus souvent utilisé est l'azobis-isobutyro-nitrile (AIBN) de 60 à 80 °C. A ces températures, la formation des radicaux est suffisamment lente pour garantir un bon déroulement de la polymérisation. Notre choix s'est donc porté sur cet amorceur. Selon Meier *et al.* la polymérisation a été réalisée en masse par voie thermique.

Dans notre cas, une étude préliminaire a été réalisée en polymérisant le monomère **SYR-***All* dans les mêmes conditions avec les différents dithiols (Tableau 5). Après analyse par GPC, de faibles conversions sont observées, ainsi que des DPn allant seulement jusqu'à 3.

Polymérisation par réaction thiol-ène de monomères issus du syringarésinol

Entrée	Dithiol	conversion* (%)	Mn* (kDa)	Mw* (kDa)	lp*	DPn				
1	1,2-éthanedithiol	20	1,4	1,4	1,1	2				
2	1,4-butanedithiol	12	1,4	1,5	1,1	2				
3	1,6-hexanedithiol	16	1,6	1,7	1,1	3				
4	1,4-benzènedithiol	48	1,2	1,3	1,1	2				
Conditions réactionnelles : SYR-All (1 éq), dithiol (1 éq), AIBN non recristallisé (2.5 %), 80 °C, N ₂ , 3 h										
*	* valeurs obtenues par GPC : colonne PL Gel MIXED-D, THF (1 mL/min), 40 °C									

Tableau 5 : Résultats préliminaires pour la synthèse de polymères en masse par voie thermique

Les résultats obtenus dans ces conditions étant peu satisfaisants, une optimisation des conditions réactionnelles a été réalisée (Tableau 6). L'éthanedithiol a été choisi pour l'optimisation, dans un souci d'économie. Plusieurs facteurs peuvent influencer le processus d'une polymérisation radicalaire : l'amorceur AIBN (la quantité et la pureté), la nature du solvant et la flexibilité du monomère.

	monomère	n _{AIBN} (mol%)	Solvant		durée	conv.* ^a	Mn* ^a	Mw* ^a			
Entrée			nom	V (ml)	(h)	(%)	(kDa)	(kDa)	lp*ª	DPn	
				(mL)							
1* ^b	SYR-All	2,5	Sans	solvant	3	20 %	1,4	1,5	1,1	2	
2* ^b	SYR-All	2,5	Sans solvant		5	20%	1,3	1,5	1,1	2	
3* ^b	SYR-All	2,5	Sans solvant		7	20%	1,4	1,5	1,1	2	
4* ^b	SYR-All	25	Sans solvant		3	55 %	1,6	2,0	1,3	3	
5* ^c	SYR-All	2,5	Sans solvant		3	28 %	1,3	1,5	1,1	2	
6* ^c	SYR-All	2,5	THF	1	3	22 %	1,3	1,4	1,1	2	
7* ^c	SYR-All	2,5	DMF	1	3	26 %	1,3	1,4	1,1	2	
8* ^c	SYR-But	2,5	Sans	solvant	3	55 %	1,5	1,8	1,2	3	
9* ^c		2,5	THF	1	3	77 %	1,8	2,3	1,3	3	
C	onditions réaction	onnelles : n	nonomèi	re (1 éq),	éthaned	ithiol (1 éq)	, AIBN, s	solvant, 8	0 °C, N ₂	2	
	* ^a valeurs obtenues par GPC : colonne PL Gel MIXED-D, THF (1 mL/min), 40 °C										
	* ^c en présence d'AIBN non recristallise										
	* ^c en présence d'AIBN fraîchement recristallisé										

Tableau 6: Optimisation des conditions de polymérisation par voie thermique

Les entrées 1-5 correspondent à la polymérisation en masse. L'augmentation de la durée de réaction de 3 à 7 h (Tableau 6, entrées 1-3) n'a pas abouti à de meilleures conversions ou DPn. L'augmentation de la charge d'AIBN de 2.5 à 25% molaire (Tableau 6, entrées 1 et 4) a permis une augmentation de la conversion de 20 à 55%. La pureté de l'AIBN a eu seulement un faible impact sur la conversion (Tableau 6, entrées 1 et 5).

A 80 °C, le mélange diène/dithiol constituant le milieu réactionnel est assez visqueux, ce qui peut être un paramètre limitant pour la conversion. L'utilisation d'un solvant adapté permettrait de solubiliser le monomère et le polymère formé, et ainsi d'homogénéiser le milieu réactionnel pour favoriser les échanges interchaînes. La polymérisation en solution a donc été envisagée, avec des solvants classiquement employés (DMF, THF). Avec le

Polymérisation par réaction thiol-ène de monomères issus du syringarésinol

monomère **SYR-***All*, l'utilisation de solvants (Tableau 6, entrées 6 et 7) permet une très légère augmentation de la conversion. Avec le monomère **SYR-***But*, l'utilisation de THF (Tableau 6, entrées 8 et 9) permet une nette amélioration de la conversion de 55 à 77%.

Pour conclure sur la polymérisation thiol-ène par voie thermique, les conditions optimisées sont les suivantes : en solvant THF, 2,5% mol AIBN fraichement recristallisé, 3h de réaction. Cette optimisation des conditions réactionnelles a permis une bonne augmentation de la conversion, sans pour autant augmenter la tailles des oligomères formés (DPn ~ 2-3). La conversion et le DPn des polymères obtenus étant encore faibles, nous nous sommes tournés vers la polymérisation thiol-ène par voie photochimique.

2. Polymérisation thiol-ène par voie photochimique

Les réactions de polymérisation déclenchées sous irradiation UV sont aussi très répandues. Elles impliquent en général l'utilisation de photoamorceurs. Ces photoamorceurs sont excités par le rayonnement UV produisant des radicaux qui peuvent initier la polymérisation des monomères multifonctionnels. Ce mode de polymérisation a été largement utilisé dans la fabrication de matériaux polymères. Cette technologie apporte de nombreux avantages tels qu'une consommation moindre d'énergie, une grande vitesse de polymérisation, une limitation d'émission de composés organiques volatils grâce à un système sans solvants¹¹. Ces avantages ont conduit à un développement croissant de cette technologie dans divers domaines d'applications, notamment pour la fabrication de revêtements protecteurs, de vernis, d'encres UV, de colles et d'adhésifs¹². Ce mode de polymérisation a été employé récemment dans la fonctionnalisation^{13,14} et la polymérisation¹⁵ de monomères renouvelables tels que les dérivés de la vanilline et d'acide gras et les acides phénoliques.

L'équipe de Lluch a décrit la polymérisation par voie photochimique de dérivés allyl ester de l'acide 10-undécanoïque (UDA) en présence d'un dithiol et d'un photoamorceur, le DMPA¹⁶. Dans cette étude, le diène est introduit en excès par rapport au dithiol afin de s'assurer d'avoir la terminaison éthylénique, permettant ainsi la post-fonctionnalisation des chaînes. Une série des polymères est obtenue avec des Mn entre 1,0 et 3,0 KDa (soit un DPn maximum de 13).



R = -OH, -COOH, ou -CH₂-Si(OCH₃)₃

Figure 94 : Un exemple de polymérisation thiol-ène par voie photochimique¹⁶

Dans notre étude, le dithiol est introduit en excès par rapport au diène pour avoir la fonction thiol en bout de chaîne, et nous avons étudié l'influence de différents paramètres sur la polymérisation : nature du solvant, concentration, temps de réaction, longueur d'onde. Nous avons fait varier la taille du « linker » du dérivé α, ω -diène et la nature du dithiol afin de faire varier la flexibilité des monomères et d'étudier l'impact sur la polymérisation thiol-ène et sur les propriétés thermique du polymère.

a) Optimisation des conditions de polymérisation

Comme précédemment, l'éthanedithiol a été choisi pour optimiser les conditions réactionnelles, en présence de DMPA. Le réacteur photochimique ne permettant pas de chauffer au cours de la réaction, l'emploi d'un solvant s'est avéré nécessaire pour homogénéiser le milieu réactionnel. Les paramètres étudiés (Tableau 7) sont la longueur d'onde et le solvant (nature et concentration).

Comme dans le cas de la polymérisation par voie thermique, le THF et le DMF ont été choisis comme solvant de réaction. A 253 nm, quelque soit le monomère (SYR-AII ou SYR-

Polymérisation par réaction thiol-ène de monomères issus du syringarésinol

But), une légère augmentation du DPn est observée lorsque le DMF est utilisé à la place du THF (Tableau 7, entrées 1 et 2; 5 et 6). Le volume du solvant utilisé n'a pas démontré une influence significative sur le DPn. Cependant, comme attendu, les conversions sont bien meilleures dans un faible volume de solvant (Tableau 7, entrées 2-4).

Entráo	monomàra	λ	Solvant		conversion*	Mn*	Mw*	ln*	DDn
Entree	monomere	(nm)	nom	V (mL)	(%)	(kDa)	(kDa)	ιþ	DFII
1	SYR-All		THF	0,5	85 %	1,8	2,8	1,5	3
2		253	DMF	0,5	82 %	2,1	3,6	1,7	4
3			DMF	1	44 %	1,8	2,6	1,4	3
4			DMF	2	33 %	1,8	2,6	1,4	3
5	SVR-But	253	THF	0,5	87 %	3,1	6,1	2	6
6	••••		DMF	0,5	85 %	4,3	10,9	2,6	8
7	SYR-All	300	THF	0,5	90%	3,4	7	2,1	6
8			ACN	0,5	87%	3,4	7	2,1	6
Conditions réactionnelles : monomère (1 éq), éthanedithiol (1,5 éq), DMPA, solvant, T _{ambiante} , N ₂ , 3 h * valeurs obtenues par SEC : colonne PL Gel MIXED-D, THF (1 mL/min), 40 °C									

Tableau 7: Optimisation des conditions de polymérisation par voie photochimique

L'impact de la longueur d'onde (253 nm vs 300 nm) sur la polymérisation a ensuite été étudié. A 300 nm, le DMF n'a pas pu être utilisé car le solvant absorbe à cette longueur d'onde. Le THF et l'acétonitrile ont donc été employés comme solvants de réaction. On constate qu'il n'y a pas d'impact de la nature du solvant sur la polymérisation à 300 nm (Tableau 7, entrées 7 et 8). Les masses molaires sont identiques en utilisant le THF et l'acétonitrile. Cependant, la polymérisation est nettement améliorée à 300 nm, le degré de polymérisation étant doublé et la conversion meilleure (Tableau 7, entrées 1 et 7).

Pour résumer, les conditions réactionnelles ont été optimisées en utilisant le **SYR-***All* et le **SYR-***But* comme monomères en présence d'un photoinitiateur (DMPA) à deux longueurs

Polymérisation par réaction thiol-ène de monomères issus du syringarésinol

d'ondes différentes. Parmi les deux longueurs d'ondes testées, celle à 300 nm a permis d'avoir des meilleurs degrés de polymérisation dans le cas du **SYR-AII**. Les conditions optimales qui ont été maintenues pour la suite pour la polymérisation par voie photochimique sont : 0,5 mL de THF, longueur d'onde de la lampe UV à 300 nm et 3h de réaction.

b) Polymérisation avec les différents dithiols

La polymérisation par photochimie s'est avérée plus efficace que la polymérisation par voie thermique en termes de masses molaires et de conversions. Ce mode de polymérisation a donc été ensuite appliqué sur les différents dithiols ci-dessous dans les conditions optimales trouvées précédemment (Figure 95).



Le Tableau 8 montre les résultats des polymérisations qui ont été obtenus avec les différents dithiols en présence du photoinitiateur DMPA. Les valeurs de dispersité obtenues sont comprises entre 1,5 et 2,5 et les masses molaires moyennes sont comprises entre 2,6 et 5,7 kDa. Cette méthode est applicable à la polymérisation avec les différentes dithiols sauf le 1,4-benzènedithiol.

Entrée	monomère	dithiol	Conversion	Mn* (kDa)	Mw* (kDa)	lp*	DPn		
1		1,2-éthanedithiol	90%	3,4	7,0	2,1	6		
2	SYR-All	1,4-butanedithiol	n.c	2,6	4,2	1,6	4		
3		1,6-hexanedithiol	n.c	3,0	4,6	1,5	4		
4		1,4-Benzènedithiol	42 %	1,3	1,3	1,0	2		
5		1,2-éthanedithiol	92 %	4,2	10,5	2,5	7		
6	SVD_Dut	1,4-butanedithiol	88 %	4,9	10,1	2,1	7		
7		1,6-hexanedithiol	85 %	5,7	11,1	2,0	8		
8		1,4-Benzènedithiol	39 %	1,3	1,4	1,1	2		
Conditions réactionnelles : monomère (1 éq), dithiol (1,5 éq), DMPA, solvant, T _{amb} , N ₂ , 3 h * valeurs obtenues par SEC : colonne PL Gel MIXED-D, THF (1 mL/min), 40 °C									

 Tableau 8 : application des conditions optimales à la polymérisation de SYR-All et SYR-But en présence des différents thiols

On peut conclure que les monomères avec les chaines alkyles les plus longues polymérisent un peu mieux. En effet, les polymérisations avec **SYR-But** atteignent des M_n supérieures à 4,2 kDa alors qu'avec le **SYR-AII** elles ne dépassent pas 3,4 kDa. Ce phénomène peut être expliqué par la différence de flexibilité qu'il existe entre ces monomères : le **SYR-But** étant plus flexible, les rencontres interchaînes sont facilitées et le degré de polymérisation augmente.

3. Analyse de la structure de polymère via RMN

L'étude par RMN des polymères permet de compléter les analyses SEC. Elle permet de confirmer la structure du polymère obtenu. Par exemple, la Figure 96 atteste de la disparition des signaux caractéristiques de la double liaison du **SYR-***All* et de la formation des fonctions thioéthers sur le polymère. Nous constatons la disparition totale des pics correspondant aux protons des doubles liaisons (b et c) à 5,3 ppm et 6,1 ppm, et l'apparition des nouveaux signaux, situés entre 1,8 et 1,9 ppm, correspondant aux protons c' et d' se situant en α de

l'atome de soufre, De plus, le signal H_a (en α de l'atome d'oxygène) est décalé de 4,5 ppm pour le **SYR-***All* à 4,1 ppm pour le polymère.





4. Caractérisations thermiques des polymères: ATG et DSC

Pour compléter la caractérisation du matériau polymère, il faut réaliser les caractérisations thermiques des polymères en analyse thermogravimétrique (ATG) et calorimétrie

Polymérisation par réaction thiol-ène de monomères issus du syringarésinol

différentielle à balayage (DSC). L'ATG permet d'évaluer leur stabilité thermique. Les mesures de DSC permettent de déterminer la température de transition vitreuse T_g , de fusion T_f et de cristallisation T_c des différents polymères préparés.

Pour réaliser ces analyses, le polymère doit être pur (sans trace d'excès de réactif) et solide. Cependant, la précipitation des polymères obtenus pose problème pour le moment : la reprise dans le méthanol ou l'eau à froid mène à un solide trop visqueux pour être filtré. A l'heure actuelle, la précipitation est encore en cours, et les analyses DSC et ATG seront réalisées par la suite.

4. Conclusion

Les monomères α, ω -diènes synthétisés ont été engagés dans des polymérisations par addition thiol-ène avec une série de dithiols de rigidité variable. Une première étude de polymérisation par voie thermique en présence d'AIBN a mené à des faibles taux de conversions et M_n . La polymérisation par voie photochimique en présence de DMPA a permis une meilleure conversion et des DPn plus élevés. Après optimisation, les meilleures conditions sont : 0,5 mL de THF, longueur d'onde de la lampe UV à 300 nm et 3h de réaction. Dans ces conditions, les polymères obtenus présentent des Mn comprises entre 2,6 et 5,7 kDa avec une diperisité supérieure à 1,5. Les chaînes polymères les plus longues ont été obtenues avec le diène le plus flexible (**SYR-But**), il serait donc intéressant de tester des dérivés α, ω -diènes plus long (décène par exemple).

La difficulté de précipitation des polymères dans les solvants classiques (méthanol, eau) reste un point crucial sur lequel nous concentrons nos efforts actuellement. Après précipitation, les polymères pourront être caractérisés par DSC et ATG.

5. Partie expérimentale

1. Synthèse des monomères α,ω-diènes

La synthèse des α, ω -diènes a été réalisée selon le même protocole décrit dans le chapitre 4.

2. Procédés de polymérisation

Purification des réactifs

L'AIBN est purifié par recristallisation dans le méthanol puis filtré et stocké au réfrigérateur.

Polymérisation par la réaction thiol-ène

Polymérisation par voie thermique (amorceur AIBN)

En masse

La procédure générale pour la réaction d'addition thiol-ène en masse est la suivante : le monomère α, ω -diène (0,29 mmol, 1 éq), le monomère dithiol (0,43 mmol, 1 éq) et l'AIBN (2,5% mol) ont été introduits dans un ballon de 10 mL sous N₂ équipé d'un réfrigérant. Le mélange réactionnel a été porté à 80 °C et maintenu sous agitation à cette température. Les réactions ont ensuite été réalisées à des temps différents.

En solvant

Le monomère α, ω -diène utilisé est dissout dans 1 mL de solvant (THF, DMF, toluène...), puis le dithiol et l'AIBN sont introduit dans le ballon. Le milieu réactionnel est ensuite agité à 80 °C à des temps de réactions différents.

En fin de réaction, 1 mL de THF est ajouté pour dissoudre le polymère. Une partie du milieu réactionnel brut est prélevée pour l'analyse en SEC et la quantité restante du polymère est précipité dans du méthanol à froid.

Polymérisation par voie photochimique (amorceur DMPA)

Le monomère α,ω -diène (0,29 mmol, 1 éq) est dissout dans 0,5 mL de solvant (DMF, THF...) dans un tube en quartz. Le dithiol (0,43 mmol, 1,5 éq) et le DMPA (5% mol) sont ensuite introduits. Le tube est fermé avec un septum puis saturé sous azote. La solution est ensuite irradiée à des longueurs d'ondes différentes et des temps de réactions différents. Une partie de brut réactionnel est prélevé et évaporé pour des caractérisations SEC. La quantité restante du polymère est précipitée dans le méthanol à froid.

6. Références bibliographiques

- 1. C. E. Hoyle, T. Y. Lee, and T. Roper, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 2004, **42**, 5301–5338.
- 2. C. E. Hoyle and C. N. Bowman, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2010, **49**, 1540–1573.
- 3. S. K. Reddy, K. S. Anseth, and C. N. Bowman, *Polymer (Guildf).*, 2005, **46**, 4212–4222.
- 4. A. E. Rydholm, S. K. Reddy, K. S. Anseth, and C. N. Bowman, *Polymer (Guildf).*, 2007, **48**, 4589–4600.
- 5. J. A. Carioscia, H. Lu, J. W. Stanbury, and C. N. Bowman, *Dent. Mater.*, 2005, **21**, 1137–1143.
- H. Lu, J. A. Carioscia, J. W. Stansbury, and C. N. Bowman, *Dent. Mater.*, 2005, 21, 1129–1136.
- 7. A. Storha, E. A. Mun, and V. V Khutoryanskiy, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 12275–12279.
- 8. C. S. Ki, T. Y. Lin, M. Korc, and C. C. Lin, *Biomaterials*, 2014, **35**, 9668–9677.
- 9. D. D. Carlson and A. R. Knight, *Can. J. Chem.*, 1973, **51**, 1410–1415.
- 10. M. Firdaus and M. A. R. Meier, *Eur. Polym. J.*, 2013, **49**, 156–166.
- 11. Y. Cai and J. L. P. Jessop, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 2004, vol. 10, pp. 807–837.
- 12. T. O. Machado, C. Sayer, and P. H. H. Araujo, *Eur. Polym. J.*, 2016.
- 13. M. Fache, E. Darroman, V. Besse, R. Auvergne, S. Caillol, and B. Boutevin, *Green Chem.*, 2014, **16**, 1987.
- 14. O. Türünç, M. Firdaus, G. Klein, and M. a. R. Meier, *Green Chem.*, 2012, **14**, 2577.
- 15. G. Yang, S. L. Kristufek, L. A. Link, K. L. Wooley, and M. L. Robertson, *Macromolecules*, 2015, **48**, 8418–8427.
- C. Lluch, J. C. Ronda, M. Galiá, G. Lligadas, and V. Cádiz, *Biomacromolecules*, 2010, 11, 1646–1653.
1. Introduction

Parmi les polymères thermodurcissables, les résines époxy constituent un des domaines d'application les plus importants grâce à leurs excellentes propriétés mécaniques, leurs résistances thermique et chimique et leurs faibles densités. On les retrouve donc dans plusieurs domaines d'applications comme matériau de structure (matrice de matériaux composites) ou de surface (e.g, revêtement, adhésif)¹. Néanmoins, ces thermodurcissables souffrent aujourd'hui de plusieurs inconvénients. En effet, la plupart de ces résines sont fabriqués à partir du diglycidyl éther de bisphénol A (DGEBA), un monomère issu du bisphénol A. Le bisphénol A (BPA) est un composé pétro-sourcé reconnu comme perturbateur endocrinien et substance cancérogène. En raison de sa structure similaire à celle des œstrogènes, il est capable d'induire une diminution de la fertilité et potentiellement causer le cancer². Récemment, l'utilisation d'emballages à base de BPA pour les produits destinés aux enfants a été interdite aux États-Unis³.

Malgré les excellentes propriétés obtenues pour les matériaux à base de BPA, sa toxicité a soulevé une demande de son remplacement. De nombreux projets de recherche sont donc aujourd'hui lancés dans le but de trouver un substitut non-toxique à cette molécule très convoitée dans l'industrie des matériaux. Dans un contexte environnemental et de raréfaction du pétrole, il y a eu un intérêt croissant de développer des monomères époxy à partir de la biomasse. Dans la littérature, il existe de nombreux précurseurs qui ont été utilisés pour remplacer le BPA. On peut citer les terpènes⁴, les dérivés de l'huile de lin⁵ ou encore l'isosorbide⁶. Cependant, ces composés aliphatiques manquent de rigidité par rapport au BPA et induisent des propriétés mécaniques inférieures aux résines. Dans ce contexte, des résines à bases de composés phénoliques (e.g., vanilline⁷, guaiacaol⁸, acide férulique⁹) ont été synthétisés pour augmenter les propriétés mécaniques.

Grâce à l'optimisation de sa synthèse biocatalysée, à sa bonne stabilité thermique et à son innocuité vis-à-vis des récepteurs endocriniens, décrites dans le chapitre 3, le syringarésinol apparaît comme un synthon de choix pour de potentielles applications dans le domaine de la chimie des polymères. En effet, le syringarésinol est un bisphénol qui peut être utilisé comme alternative biosourcée et non-toxique au bisphénol A ou autres monomères pétrosourcés pour la synthèse des polymères (e.g., résines époxys, résines acryliques, polyuréthanes). Son bicycle hétérocyclique et ses deux noyaux aromatiques apportent une rigidité permettant de conférer des propriétés thermiques et mécaniques intéressantes aux matériaux. D'autre part, les deux hydroxyles terminaux offrent des possibilités de

fonctionnalisation permettant ainsi d'utiliser le syringarésinol comme « building block » pour plusieurs types de polymérisations.

2. Démarche

Dans ce chapitre, l'utilisation du syringarésinol comme synthon pour la synthèse des résines époxy-amines est décrite. Le syringarésinol a d'abord été dérivatisé en monomère diépoxyde puis ce dernier à été réticulés avec différents durcisseurs. Les propriétés thermomécaniques et de dégradabilité des nouvelles résines époxy-amines ainsi obtenues ont ensuite été déterminées et comparées à celles dérivés du bisphénol A (i.e., DGEBA). Enfin, d'autres monomères fonctionnels biscyclocarbonates et bis(méth)acrylates à base de syringarésinol ont été synthétisés. La polymérisation de ces derniers (actuellement en cours d'études au laboratoire) ouvriront des perspectives dans le domaine des polyuréthanes non isocyanates (NIPU) et des résines acryliques.

3. Résultats et discussions

1. Synthèse du Bis-époxy-O-syringarésinol (SYR-Epo)

Suite aux résultats obtenus sur l'absence d'activité endocrinienne du syringarésinol, nous l'avons dérivatisé en monomère diépoxy (**SYR-***Epoxy*) afin de proposer une alternative nontoxique au DGEBA. De nouvelles résines époxy-amines ont ainsi été préparées dans le projet post-doctoral du Dr. Marine Janvier. Ces résines ont été caractérisées et comparées à celles dérivés du DGEBA.



Figure 97 : Epoxydation du syringarésinol

La glycidylation du syringarésinol se fait avec un excès d'épichlorhydrine en présence d'une solution de soude. La réaction ne nécessite pas de solvant car l'épichlorhydrine est utilisé comme un solvant réactif. Un agent de transfert de phase comme le chlorure de triméthylbenzylammonium (TEBAC) est utilisé pour permettre le passage du phénate formé dans la phase organique¹⁰. Le phénate peut ensuite réagir sur l'épichlorhydrine selon un mécanisme réactionnel SN₂ faisant intervenir des étapes successives différentes¹¹. L'épichlorhydrine possédant plusieurs sites électrophiles, plusieurs attaques nucléophiles sont possibles. La première est la réaction du phénate directement sur le carbone portant le chlore (Figure 98, équation 2a) pour donner le syringarésinol époxydé (SYR-*Epo*). On peut aussi envisager l'attaque du phénate sur les carbones de l'époxyde (mécanisme SN₂') permettant l'ouverture du cycle oxirane pour donner les alcoolates chlorés correspondants (Figure 98, équation 2b et 2c). Les deux alcoolates réagissent ensuite par une réaction SN₂ intramoléculaire sur le carbone électrophile portant l'atome de chlore pour donner le syringarésinol époxydé (SYR-*Epo*) ou un dérivé oxétane, un produit indésirable. Un rendement de 88% en SYR-*Epo* a été obtenu.



Figure 98 : Mécanisme réactionnel d'époxydation en présence d'un agent de transfert de phase

Cet époxyde est actuellement valorisé dans le cadre du projet post-doctoral du Dr. Marine Janvier où des époxy-amines ont été synthétisées à partir de la réaction du **SYR-***Epo* avec des diamines flexibles ou rigides. Les trois amines utilisées étaient la 1,10-décanediamine **DA10** (aliphatique), l'isophorondiamine **IPDA** (cycloaliphatique) et la difurfuryl amine **DIFFA** (aromatique) (Figure 99). Lors de la formulation, un ratio de 2:1 de diépoxyde/diamine a été

utilisé. Les cuissons ont été réalisées à 160 °C et la réticulation totale des fonctions époxydes a été vérifiée par spectroscopie infrarouge et DSC.



Figure 99 : Les trois amines utilisées pour les résines époxy-amines

Les trois résines obtenues (SYR-Epo-DA10, SYR-Epo-DIFFA et SYR-Epo-IPDA) ont ensuite été comparées avec la résine commerciale DGEBA-IPDA. Au niveau de l'aspect, la résine DGEBA-IPDA est une résine rigide et translucide. Les résines à base du SYR-Epo étaient toutes rigides et translucides sauf pour la SYR-Epo-DIFFA où une coloration marron a été obtenue (Figure 100).



Figure 100 : Comparaison de l'aspect des résines à base du SYR-Epoxy et celle du DGEBA

Les propriétés thermiques des résines ont ensuite été déterminées par analyse thermogravimétrique ATG (Figure 101) et calorimétrie différentielle à balayage DSC (Figure 102). Les résines à base du **SYR-***Epo* ont démontré des hautes stabilités thermiques ($T_{d5\%}$) allant jusqu'à 309 °C pour le **SYR-***Epo***-DA10**, 278 °C pour **SYR-***Epo***-DIFFA** et 298 °C pour **SYR-** *Epo*-IPDA. Cependant, le **SYR-***Epo***-IPDA** était moins stable thermiquement que la **DGEBA-IPDA** (298 °C vs. 326 °C).



Figure 101 : Température de dégradation (Td5%) des résines époxy-amines

Des températures de transition vitreuse (T_g) variables ont été obtenues allant de 73 °C pour le **SYR-Epo-DA10**, à 102 °C pour **SYR-Epo-DIFFA** et 126 °C pour **SYR-Epo-IPDA**. Cette différence en T_g peut être expliquée par la structure de l'agent réticulant. La **DA10** possède une chaîne aliphatique linéaire à dix carbones, le rendant ainsi plus flexible que la **DIFFA** qui possède deux furanes entre les deux groupements amines. Quant à l'**IPDA**, c'est le moins flexible des trois agents réticulants. En effet, ce dernier possède un groupement amine directement lié sur le cycle limitant ainsi la flexibilité.

La T_g observée pour le **DGEBA-IPDA** (150 °C) était plus haute que pour le **SYR-***Epo*-**IPDA** (126 °C). Cette différence de T_g peut se traduire par la différence de structure entre le syringarésinol et le bisphénol A. Contrairement au bisphénol A, la présence des groupements méthoxys sur le syringarésinol permet un encombrement stérique plus important. Cet encombrement stérique diminue alors la compacité de la résine **SYR-***Epo*-**IPDA**. Il faut alors apporter moins d'énergie pour permettre la transition qui a lieu à plus basse température (diminution de la T_g).



Figure 102 : Température de transition vitreuse (T_g) des résines époxy-amines

Les résines ont ensuite été analysées par analyse mécanique dynamique (DMA). La DMA permet d'enregistrer les propriétés viscoélastiques en fonction de la température et de déterminer le module d'élasticité et les valeurs d'amortissement en appliquant une force oscillante sur l'échantillon. Ainsi, le module de conservation en élongation de chaque résine a été déterminé par cette méthode. La Figure 103 montre les résultats obtenus pour les quatre résines. On peut constater qu'à une température inférieure à 80 °C, la résine **SYR**-*Epo*-DIFFA possède un meilleur module de conservation en élongation. A 120 °C, c'est les deux résines réticulées par l'IPDA qui possèdent les meilleurs modules de conservation en élongation. Cependant, à des températures plus élevées (150 °C), la résine DGEBA-IPDA est plus résistante à la déformation que le **SYR**-*Epo*-IPDA. L'ordre des températures de transition vitreuses des résines ont aussi été vérifiées par rapport aux résultats de DSC par les valeurs de températures de transitions mécaniques (T_a) obtenues en DMA (**SYR**-*Epo*-**DA10** (102 °C) < **SYR**-*Epo*-**DIFFA** (108 °C) < **SYR**-*Epo*-**IPDA** (157 °C) < **DGEBA-IPDA** (166 °C)).



Figure 103 : Thermogramme DMA des différentes résines

Des tests de dégradabilité des résines **SYR-Epo-IPDA** et **DGEBA-IPDA** ont ensuite été réalisés en milieux basique et acide. Les tests ont été faits séparément sur plusieurs échantillons de chaque résine en présence de soude (3 M) ou d'acide chlorhydrique (3 M). Les deux figures (Figure 104 et Figure 105) montrent les résultats obtenus. Chaque valeur sur les graphes correspond à un échantillon unique à un temps donné. Après chaque temps d'exposition à la solution basique ou acide, les résines ont été lavées à l'eau, séchées puis pesées. Aucune baisse en poids n'a été observée pour les deux résines. Ces résultats démontrent une similarité assez proche des deux résines en termes de non-dégradabilité dans ces conditions.



Figure 104 : Test de dégradabilité en milieu basique (NaOH 3M)



Figure 105 : Test de dégradabilité en milieu acide (HCI 3M)

2. Synthèse des monomères bifonctionnels issus du syringarésinol

Le syringarésinol a ensuite été dérivatisé en monomères bifonctionnels (cyclocarbonates, acrylates et (méth)acrylates). La Figure 106 présente les différents monomères qui ont été synthétisés. Ces monomères pourront être utilisés pour synthétiser des polyuréthanes non isocyanates (NIPU) et des résines (méth)acrylates.



Figure 106 : Différents monomères issus du syringarésinol

a) Synthèse du Bis-cyclocarbonate-O-syringarésinol (SYR-Cyclocarbonate)

Aujourd'hui, l'industrie des polymères fait face à des défis majeurs dus à la raréfaction des ressources fossiles et la hausse des prix des matières premières. De plus, les organisations de réglementation (ex. REACH) sont plus exigeantes sur la toxicité des matières premières et le procédé de fabrication. Dans un contexte de développement durable, des procédés écologiques ont été développés afin de convertir la biomasse en synthons pour la chimie. Les polyuréthanes sont des polymères qui sont utilisés dans la fabrication des colles, peintures, élastomères (« caoutchoucs »), mousses et fibres. Ils sont obtenus par la réaction entre des diisocyanates et divers polyols. Les diisocyanates (e.g., méthylène diisocyanate MDI ou toluène diisocyanate TDI), généralement utilisés, sont toxiques. Afin de substituer ces composés dans le procédé de fabrication, on peut recourir à des monomères possédant des fonctions cyclocarbonates^{12,13}.

En effet, les cyclocarbonates sont des composés qui sont utilisés dans la synthèse des polyuréthanes non-isocyanates (NIPUs)¹⁴. Récemment, il y a un intérêt croissant pour la synthèse des NIPUs dans l'industrie chimique grâce à la possibilité de faire abstraction des isocyanates qui sont des composés toxiques et cancérigènes. Les cyclocarbonates peuvent être synthétisés par plusieurs méthodes^{15,13}, mais le plus connue et la plus efficace est l'addition du dioxyde de carbone sur les époxydes (carbonatation). Le principal avantage de cette réaction est l'utilisation du dioxyde de carbone (CO₂) comme réactif conduisant à sa séquestration dans les matériaux obtenus, limitant ainsi son impact sur l'effet de serre. Cependant la réaction doit être catalysée et sous pression de CO₂ afin d'avoir de bons rendements¹⁶.



Figure 107 : Réaction de carbonatation du syringarésinol époxydé

La carbonatation a aussi été réalisée à partir du **SYR-***Epo* à 80 °C en présence de CO₂ sous pression de 20 bars. La Figure 108 montre le mécanisme d'addition du CO₂ sur le cycle de l'époxyde en présence de bromure de lithium. Le bromure de lithium (LiBr) est utilisé comme catalyseur (acide de Lewis) afin de faciliter l'ouverture du cycle époxy et ainsi l'addition du CO₂. La conversion du **SYR-***Epo* a été suivie par RMN ¹H. Un rendement de 81% du biscyclocarbonate **SYR-***Cyclo* a été obtenu après 24 h de réaction.



Figure 108 : Mécanisme de carbonatation de l'époxyde en présence de LiBr

Aujourd'hui, il existe un besoin croissant de composés aromatiques dans le domaine des polyuréthanes notamment pour améliorer certaines propriétés. Afin de substituer les composés aromatiques pétrosourcés toxiques existants, l'utilisation du **SYR-***Cyclo* est une solution à la synthèse des NIPUs aromatiques biosourcés. La présence des noyaux aromatiques et du bisfurane du syringarésinol va apporter la rigidité et par là-même de très bonnes propriétés thermomécaniques. En jouant sur la nature des polyamines (ou polyalcools) utilisées lors de l'étape de polymérisation (aliphatiques, cycloaliphatiques et aromatiques) et leur fonctionnalité (bis-, tris- et polyfonctionnels), nous pourrons moduler à façon la température de transition vitreuse (T_g) des polymères thermoplastiques et thermodurs obtenus. Le Dr. Marine Janvier travaille actuellement sur la synthèse et la caractérisation de ces nouveaux NIPUs.

b) Synthèse des Bis-(méth)acrylates-O-syringarésinol (SYR-(Méth)acrylates)

Les monomères (méth)acrylates sont composés d'une double liaison terminale C=C en α d'un ester (donc conjuguées). Ce sont des composés très réactifs. Ces monomères sont utilisés pour la fabrication des poly(méth)acrylates aussi connus sous le nom plus commun de « résines acryliques ». Les poly(méth)acrylates sont obtenus par polymérisation radicalaire de la double liaison par voie thermique ou par voie photochimique. La voie thermique fait intervenir des amorceurs (type AIBN ou peroxydes) qui se décomposent avec la température formant ainsi des radicaux libres. Ces radicaux peuvent ainsi amorcer la polymérisation. La voie photochimique fait intervenir des amorceurs (type AIBN ou peroxydes) qui se décomposent sous rayonnement UV formant ainsi des radicaux libres capables d'initier la polymérisation des monomères (méth)acrylates.

En présence de monomères monofonctionnels (e.g., acrylate de méthyle), des chaines linéaires sont obtenues lors de la polymérisation, donnant ainsi des thermoplastiques. Les monomères acrylates polyfonctionnels quant à eux, conduisent après réticulation à des thermodurs tridimensionnels. Dans le but de synthétiser des poly(méth)acrylates thermodurs biosourcés, nous avons dérivatisé le syringarésinol en monomère bis(méth)acrylate **SYR-bis(méth)acrylates** (Figure 109).



Figure 109 : Estérification du syringarésinol en SYR-bis(meth)acrylate

Afin d'avoir des conversions maximales dans des conditions douces (pression et température ambiantes), nous avons choisi d'utiliser les chlorures d'acyles pour la dérivatisation. La réaction a été réalisée en présence du chlorure de (méth)acryloyle (dérivé d'acide acrylique biosourcé) et de la triéthyle amine. Des rendements de 77% et de 47% ont été obtenus respectivement dans le cas de la synthèse du SYR-bisméthacrylate et SYR-bisacrylate.

Les bis(méth)acrylates de syringarésinol ainsi obtenus peuvent être polymérisés par voie thermique ou photochimique pour obtenir des thermodurs de poly(meth)acrylates aromatiques après réticulation.

3. Conclusion

Le syringarésinol n'étant pas un perturbateur endocrinien et ayant une stabilité thermique élevée, nous avons souhaité démontrer la pertinence de son utilisation comme un substituant non-toxique du bisphénol A pour la synthèse des résines époxy-amines. Ainsi, nous avons d'abord synthétisé le diglycidyl éther de syringarésinol **SYR-***Epo* avec un bon rendement (88%). Des études portées sur la synthèse de différentes résines époxy-amines à base de **SYR-***Epo* ont été réalisées dans le cadre du projet post-doctoral du Dr. Marine Janvier. Trois diamines de natures différentes (aliphatique, aromatique et cycloaliphatique) ont été utilisées (DA10, DIFFA, IPDA) comme agents réticulants. Les résines obtenues ont démontrées des hautes stabilités thermiques (jusqu'à 309 °C) et des T_g variables (73 °C à 126 °C) suivant le type de diamine choisi. Des analyses de DMA ont démontré une bonne propriété mécanique de la résine **SYR-***Epo*-IPDA, compétitive à celle du **DGEBA-IPDA**. Des tests de dégradabilité en milieux acides et basiques réalisés sur le **SYR-***Epo*-IPDA et **DGEBA-IPDA** ont mis en évidence la non-dégradabilité des deux résines.

Le syringarésinol a ensuite été dérivatisé en monomères bifonctionnels (cyclocarbonates, acrylates et (méth)acrylates). Le monomère biscyclocarbonate du syringarésinol **SYR-**

Cyclocarbonate a été synthétisé avec un bon rendement (81%) par la carbonatation du diglycidyl éther de syringarésinol (**SYR-***Epoxy*). La réaction a été réalisée en présence de CO₂, un réactif renouvelable, présent en grande quantité et peu onéreux. L'utilisation du **SYR-***Cyclocarbonate* comme monomère pour la synthèse des NIPUs biosourcés est en cours d'étude dans même projet post-doctoral.

Les monomères (méth)acrylates, quant à eux, ont été synthétisés dans des conditions de température et de pression ambiantes à partir des chlorures de (méth)acryloyles. Un bon rendement a été obtenu dans le cas du **SYR-bisméthacrylate** (77%). A partir de ces bis(méth)acrylates, des thermodurcs peuvent être obtenus après polymérisation par voie radicalaire ou anionique.

4. Partie expérimentale

1. Synthèse du Bis-époxy-O-syringarésinol (SYR-Epo)



Mode opératoire :

3 g (1 éq, 11,9 mmol) de syringaresinol sont dissouts dans 11,3 mL d'épichlohydrine (20 éq, 239 mmol). 327 mg de chlorure de benzyl triéthyle ammonium (TEBAC) (0,2 éq, 2,39 mmol) sont ensuite ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à 80 °C pendant 2 h. Le milieu réactionnel est refroidit et 11.4 mL de NaOH (8 éq, 95,6 mmol) à 5M sont ajoutés. La solution biphasique est agitée vigoureusement pendant 2 h. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3*100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaCl (80 mL), puis séchées sur MgSO₄ anhydre. Après filtration et évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 40/60). 3,3 g de **SYR-***Epo* pur sont obtenus (88%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,64 (dd, 2H, J = 2,7 and 4,8 Hz, H_{8a}, H_{8a'}), 2,82 (t, app., 2H, J = 4,8 Hz, H_{8b}, H_{8b'}), 3,11 (m, 2H, H₆, H_{6'}), 3,38 (m, 2H, H₇, H_{7'}), 3,87 (s, 12H, H₅, H_{5'}), 3,91-4,02 (m, 4H, H_{Y1}, H_{Y1'}, H_{6a}, H_{6a'}), 4,14 (dd, 2H, J = 1,1 Hz and 4,0 Hz, H_{6b}, H_{6b'}), 4,31 (m, 2H, H_{Y2}, H_{Y2'}), 4,76 (d, 2H, J = 4,2 Hz, H_a, H_{a'}), 6,55 (s, 4H, H₂, H_{2'})

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 44,8 (C₈, C_{8'}), 50,6 (C₇, C_{7'}), 54,4 (C_β, C_{β'}), 56,3 (C₅, C_{5'}), 72,1 (C_γ, C_{γ'}), 74,3 (C₆, C_{6'}), 86,0 (C_α, C_{α'}), 102,9 (C₂, C_{2'}), 136,3 (C₁, C_{1'}), 137,2 (C₄, C_{4'}), 153,5 (C₃, C_{3'})

FTIR (neat) : ν_{max} (cm⁻¹): 1587 (C=C Aromatique), 1228 (C-O-C époxyde)

HRMS: (TOF MS, ES⁺) : m/z calculée pour C₂₈H₃₄O₁₀Na [MNa]⁺: 553,2050; trouvée: 553,2059

2. Synthèse du Bis-acrylate-O-syringarésinol (SYR-Acrylate)



Mode opératoire :

1 g (1 éq, 2,39 mmol) de syringarésinol est dissouts dans 1,2 mL (C=2 M) de DCM anhydre sous azote à température ambiante. Le milieu est refroidit à 0 °C et 743 μ L (2,2 éq, 5,3 mmol) de triéthylamine sont ajoutés. 424 μ L (2,2 éq, 5,2 mmol) de chlorure d'acryloyle sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 18h à température ambiante. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le milieu réactionnel est dilué avec du DCM (5 mL) et quenchée avec de l'eau (5 mL). La phase organique est séparée, lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur MgSO₄ anhydre puis filtrée. Le solvant est ensuite évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 60/40). 592 mg de **SYR-Acrylate** pur sont obtenus (47%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 3,11 (m, 2H, H_β et H_{β'}), 3,90 (s, 12H, H₅ et H_{5'}), 3,96 (d,d, 2H, J = 7 Hz et 8,7 Hz, H_{γa} et H_{γ'a}), 4,31 (dd, 2H, J = 8,1 et 14,4 Hz, H_{γb} et H_{γ'b}), 4,78 (d, 2H, J = 3 Hz, H_α et H_{α'}), 6,02 (d, 2H, J = 10 Hz, H_{8a} et H_{8'a}), 6,39 (m, 2H, H₇ et H_{7'}), 6,48 (d, 2H, J = 17 Hz, H_{8b} et H_{8'b}), 6,61 (s, 4H, H₂, H_{2'}),

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 54,6 (C_β) , 56,4 (C₅) , 72,3 (C_γ) , 86,1 (C_α) , 102,5 (C₂) , 127,6 (C₇) , 127,9 (C₁) , 132,9 (C₈) , 140,0 (C₄) , 152,5 (C₃) , 164,1 (C₆)

Point de fusion : 192,9 °C

FTIR (neat) : ν_{max} (cm⁻¹): 1504 (C=C Aromatique) ; 1742 (C=O)

HRMS: (TOF MS, ES⁺) : m/z calculée pour C₂₈H₃₀O₁₀Na [MNa]⁺: 549,1737; trouvée: 549,1742

3. Synthèse du Bis-méthacrylate-*O*-syringarésinol (SYR-*Méthacrylate*)



Mode opératoire :

1 g (1 éq, 2,39 mmol) de syringarésinol est dissouts dans 1,2 mL (C=2 M) de DCM anhydre sous azote à température ambiante. Le milieu est refroidit à 0 °C et 1 mL (3 éq, 7,2 mmol) de triéthylamine sont ajoutés. 500 μL (2,2 éq, 5,2 mmol) de chlorure de méthacryloyle sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 18h à température ambiante. La réaction est vérifiée par CCM (Cyclo/AcOEt : 50/50). Le milieu réactionnel est dilué avec du DCM (5mL) et quenchée avec de l'eau (5 mL). La phase organique est séparée, lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur MgSO₄ anhydre puis filtrée. Le solvant est ensuite évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclo/AcOEt : 60/40). 1,02 g de **SYR-Méthacrylate** pur sont obtenus (77%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 2,07 (s, 6H, H₁₁ et H₁₁), 3,10 (m, 2H, H_β et H_β), 3,82 (s, 12H, H₅ et H₅), 3,96 (dd, 2H, *J* = 7 Hz et 8,7 Hz, H_{γa} et H_{γa}), 4,29 (dd, 2H, *J* = 8,1 et 14,4 Hz, H_{γb} et H_{γb}), 4,77 (d, 2H, *J* = 3 Hz, H_α et H_α), 5,74 (s, 2H, H_{8a} et H_{8'a}), 6,38 (s, 2H, H_{8b} et H_{8'b}), 6,60 (s, 4H, H₂, H₂)

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 18,5 (C₉) , 54,4 (C_β) , 56,2 (C₅) , 72,3 (C_γ) , 85,9 (C_α) , 102,3 (C₂) , 127,3 (C₇) , 128,1 (C₁) , 135,4 (C₈) , 139,5 (C₄) , 152,4 (C₃) , 165,3 (C₆)

Point de fusion : 214,3 °C

FTIR (neat) : ν_{max} (cm⁻¹): 1504 (C=C Aromatique), 1731 (C=O)

HRMS: (TOF MS, ES⁺) : m/z calculée pour C₂₈H₃₀O₁₀Na [MNa]⁺: 577,2041 ; trouvée: 577,2050

4. Synthèse du Bis-cyclocarbonate-O-syringarésinol (SYR-Cyclo)



Mode opératoire :

5,05 g de **SYR-Epo** (1 éq, 9,52 mmol) et 41,7 mg de bromure de lithium (0,05 éq, 0,48 mmol) sont dissouts dans 19 mL de DMF (0,5 M) dans un autoclave de 100 mL. Le système est agité pendant 24 h à 80 °C sous une pression de 20 bars de dioxyde de carbone. Le système est ensuite dégazé et refroidit. Le solvant est éliminé par distillation. Le produit brut obtenu est solubilisé dans l'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec l'eau distillée et une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre puis filtrée. Le solvant est ensuite évaporé sous vide. 4,75 g de **SYR-Cyclo** sont obtenus (81%).

RMN ¹**H** : (300 MHz, CDCI₃) δ (ppm) : 3,07 (m, 2H, H_β, H_{β'}), 3,83 (s, 12H, H₅, H_{5'}), 3,89-3,94 (d,d, 2H, J = 6 Hz and 12 Hz, H_{γ1}, H_{γ1'}), 4,15 (d, 4H, J = 3 Hz, H_{6a}, H_{6a}, H_{6b}, H_{6b'}), 4,26 (m, 2H, H_{γ2}, H_{γ2'}), 4,53 (t app,, 2H, J = 9 Hz, H_{8a}, H_{8a'}), 4,72 (d, 2H, J = 3 Hz, H_α, H_{α'}), 4,75 (t app,, 2H, J = 9 Hz H_{8b}, H_{8b'}), 4,86 (m, 2H, H₇, H_{7'}), 6,54 (s, 4H, H₂, H_{2'})

RMN ¹³**C** : (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 54,4 (C_β) , 56,2 (C₅) , 66,4 (C₈) , 71,3 (C₆) , 72,1 (C_γ) , 75,0 (C₇) , 85,9 (C_α) , 102,6 (C₂) , 135,7 (C₄) , 137,7 (C₁) , 153,1 (C₃) , 155,1 (C=O)

FTIR (neat) : ν_{max} (cm⁻¹): 1589 (C=C Aromatique), 1786 (C=O)

5. Références bibliographiques

- 1. I. Hamerton, *Polym. Int.*, 1996, **41**, 101–102.
- 2. M. V. Maffini, B. S. Rubin, C. Sonnenschein, and A. M. Soto, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006, **254–255**, 179–186.
- Food Additives & Ingredients. Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm 064437.htm, .
- 4. G. M. Wu, D. Liu, G. F. Liu, J. Chen, S. P. Huo, and Z. W. Kong, *Carbohydr. Polym.*, 2015, **127**, 229–235.
- 5. N. Supanchaiyamat, A. J. Hunt, P. S. Shuttleworth, C. Ding, J. H. Clark, and A. S. Matharu, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 23304–23313.
- 6. J. Lukaszczyk, B. Janicki, and M. Kaczmarek, *Eur. Polym. J.*, 2011, **47**, 1601–1606.
- M. Fache, A. Viola, R. Auvergne, B. Boutevin, and S. Caillol, *Eur. Polym. J.*, 2015, 68, 526–535.
- 8. E. D. Hernandez, A. W. Bassett, J. M. Sadler, J. J. La Scala, and J. F. Stanzione, ACS Sustain. Chem. Eng., 2016, **4**, 4328–4339.
- 9. R. Menard, S. Caillol, and F. Allais, *Ind. Crops Prod.*, 2017, **95**, 83–95.
- 10. M. Fache, E. Darroman, V. Besse, R. Auvergne, S. Caillol, and B. Boutevin, *Green Chem.*, 2014, **16**, 1987.
- 11. P. Y. Kuo, D. A. L. Barros, M. Sain, J. S. Y. Tjong, and N. Yan, ACS Sustain. Chem. Eng., 2016, **4**, 1016–1024.
- 12. J. W. Hill and W. H. Carothers, J. Am. Chem. Soc., 1933, 55, 5039–5043.
- 13. V. Besse, G. Foyer, R. Auvergne, S. Caillol, and B. Boutevin, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 2013, **51**, 3284–3296.
- 14. G. Rokicki, P. G. Parzuchowski, and M. Mazurek, *Polym. Adv. Technol.*, 2015, **26**, 707–761.
- 15. S. Benyahya, B. Boutevin, S. Caillol, V. Lapinte, and J. Habas, Polym. Int., 2012, 61,

918–925.

 L. Maisonneuve, O. Lamarzelle, E. Rix, E. Grau, and H. Cramail, *Chem. Rev.*, 2015, 115, 12407–12439.

Conclusion générale et perspectives

Beaucoup de polymères sont fabriqués à partir de composés aromatiques issus du pétrole. Ces derniers sont utilisés pour conférer de bonnes propriétés thermomécaniques aux polymères pour ainsi étendre leur gamme d'application. Due à une utilisation accrue des polymères dans la vie quotidienne, les additifs sont aussi très demandés. Les antioxydants sont des additifs qui sont utilisés pour protéger les polymères de l'oxydation. Ces antioxydants sont également produits à partir du pétrole. La raréfaction et la fluctuation du prix du pétrole nous obligent aujourd'hui à trouver d'autres alternatives pour remplacer les molécules pétro-sourcés pour la fabrication des polymères et antioxydants. De plus, la réglementation REACH exige que certaines molécules potentiellement toxiques soient remplacées. On peut notamment évoquer les problèmes du bisphénol A soupçonné de causer des dérèglements hormonaux et provoquer des cancers. Face à ces problèmes, on observe depuis plusieurs années un développement de la chimie verte et de la chimie du végétal pour la fabrication de produits non-toxiques à partir de la biomasse. La lignine apparait ainsi comme un composé intéressant capable de répondre à ces besoins. En effet, c'est un polyphénol capable à la fois d'apporter des propriétés thermomécaniques intéressantes et d'agir comme un additif antioxydant grâce à la présence de phénols libres au sein de sa structure. Cependant, le principal frein lié à la valorisation de la lignine brute réside dans sa complexité et son hétérogénéité, en grande partie liées aux types de biomasse et de prétraitements utilisés pour sa production.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à mettre en place des protocoles de polymérisation *in vitro* d'alcools *p*-hydroxycinnamiques (monomères de lignine). Plus particulièrement, nous avons tenté de contrôler la polymérisation de ces composés phénoliques par les oxydases afin d'aboutir à des composés simples et réguliers (dimères, trimères ou oligomères peu polydisperses) pouvant être utilisés en tant qu'antioxydants ou en tant que monomères/synthons pour la chimie des polymères.

Nous avons, dans un premier temps, étudié la polymérisation enzymatique des monolignols G et S par la laccase de *Trametes versicolor* en faisant varier les conditions réactionnelles (température, mode et vitesse d'ajout de l'enzyme). Ces différentes conditions n'ont pas eu d'effet sur la structure des lignines de synthèse (DHP) issues de la polymérisation du monolignol G, les masses molaires et types de liaisons étant quasiment les mêmes. L'utilisation des liquides ioniques n'ont malheureusement pas permis d'améliorer les masses molaires. La quantité de phénols libres, caractérisée par la méthode de Folin Ciocalteu, s'est

Conclusion générale et perspectives

révélée supérieure pour les DHP synthétisés en milieu tampon/liquide ionique. Contrairement à ce qui avait été observé avec le monolignol G, nous avons démontré que la polymérisation du monolignol S est significativement affectée par la température, et le mode et la vitesse d'ajout de la laccase. A température ambiante (25 °C), un mélange d'oligomères, de 2,6-DMBQ, et de dimères β - β et β -O-4 a été formé. Lorsque la température a été augmentée à 40 °C, une diminution considérable de la quantité de 2,6-DMBQ, des oligomères et du dimère β -O-4 a été observée. Le couplage β - β a donc été favorisé pour donner le syringarésinol comme produit majoritaire. Ainsi, une sélectivité a pu être obtenue pour le couplage du monolignol S.

Le syringarésinol est un bisphénol rigide qui peut être envisagé comme additif (antiradicalaire/antioxydant) ou synthon/monomère pour la chimie des polymères. Sa synthèse a donc été optimisée avec succès à l'aide d'un plan expérience pour donner un rendement de 93% sans besoin d'étape de purification. Les analyses DPPH et ATG ont révélé respectivement une bonne activité antiradicalaire et une très bonne stabilité thermique du syringarésinol par rapport aux composés phénoliques commerciaux (e.g., BHT, BHA, Irganox 1010). L'activité œstrogénique a également été déterminée en étudiant la fixation du syringarésinol sur le récepteur Era. Cette étude, réalisée par Patrick Balaguer et Marina Grimaldi de l'IRCM (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier), a démontré que le syringarésinol ne possède pas d'activité œstrogénique vis-à-vis du récepteur Era. Ces résultats démontrent ainsi son fort potentiel comme une alternative renouvelable et nontoxique au bisphénol A.

Suite à ces résultats prometteurs, le syringarésinol a été utilisé comme monomère pour la synthèse de différents polymères. Dans un premier temps, il a été dérivé en différents monomères α, ω -diènes pour la synthèse de nouvelles polyoléfines aromatiques. Ces différents α, ω -diènes de longueurs de chaînes variables ont été polymérisés par ADMET en présence du catalyseur de Hoveyda-Grubbs de deuxième génération. Les polymères ainsi obtenus possèdent des M_n jusqu'à 14,1 kDa. Les analyses thermiques par DSC et ATG ont révélé une thermostabilité jusqu'à 257-360 °C et des T_g modulables selon la longueur des monomères α, ω -diène (de 18 à 70 °C).

Dans un second temps, deux de ces mêmes monomères α, ω -diènes (**SYR-***All* et **SYR-***But*) ont été engagés dans des polymérisations par addition thiol-ène avec une série de dithiols de rigidité variable. Une première étude de polymérisation par voie thermique en présence d'AIBN a mené à de faibles taux de conversions et M_n . La polymérisation par voie photochimique en présence de DMPA a, quant à elle, permis une meilleure conversion et l'obtention de degrés de polymérisation plus élevés. Après optimisation des conditions

réactionnelles, les polymères obtenus présentent des M_n comprises entre 2,6 et 5,7 kDa avec une dispersité supérieure à 1,5. Les chaînes polymères les plus longues ont été obtenues avec le diène le plus flexible (**SYR-But**).

Enfin, nous avons souhaité démontrer la pertinence de l'utilisation du syringarésinol comme une substituant du bisphénol A pour la synthèse des résines époxy-amine. Ainsi, nous avons d'abord synthétisé le diglycidyl éther de syringarésinol **SYR-***Epo* avec un bon rendement (88%). Des études portées sur la synthèse de différentes résines époxy-amines à base de syringarésinol ont été réalisées dans le cadre du projet post-doctoral du Dr. Marine Janvier. Trois diamines de natures différentes (aliphatique, aromatique et cycloaliphatique) ont été utilisées (DA10, DIFFA, IPDA) comme agents réticulants. Les résines obtenues ont possèdent de hautes stabilités thermiques (jusqu'à 309 °C) et des *T_g* variables (73 °C à 126 °C) suivant le type de diamine choisi. Des analyses de DMA ont démontré une bonne propriété mécanique de la résine **SYR-***Epo*-IPDA, compétitive à celle à base de **DGEBA-IPDA** et la **DGEBA-IPDA** ont démontré la non-dégradabilité des deux résines. Selon les diverses analyses effectuées, les résultats obtenus pour le **SYR-***Epo*-IPDA sont quasi similaires à ceux de la **DGEBA-IPDA**, démontrant que le syringarésinol est un candidat à fort potentiel pour le remplacement du bisphénol A.

A l'issue de ce projet, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Par exemple, l'utilisation d'autres types de liquides ioniques, de solvants eutectiques profonds ou cosolvant organique peuvent être étudiés pour la synthèse des DHP à partir du monolignol G. L'analyse antiradicalaire des DHP précédemment synthétisés doit encore être déterminée par la méthode DPPH. En cas d'activité satisfaisante, les DHP pourront être incorporés dans des matrices polymères pour les protéger de l'oxydation. Comme le syringarésinol a démontré une activité radicalaire prometteuse, son incorporation dans des matrices polymères est actuellement étudiée dans le cadre de la thèse de Louis Hollande. Ainsi, la dispersion, le taux d'incorporation et l'activité antioxydante du syringarésinol pourront être évaluées et comparées à ceux des antioxydants commerciaux. Les études de cinétiques réalisées sur les différents substrats doivent être répétées afin de tirer une conclusion sur la réactivité et la spécificité de la laccase envers ces différents substrats.

Concernant la polymérisation thiol-ène, les chaînes polymères les plus longues ont été obtenues avec le diène le plus flexible (**SYR-But**). Il serait donc intéressant de tester des dérivés α, ω -diènes plus longs (décène par exemple). Des difficultés de précipitations des polymères dans des solvants classiques (méthanol, éther,..) ayant été rencontrées, la

précipitation de ces polymères devra aussi être optimisée afin de réaliser les caractérisations thermiques par DSC et ATG.

Nous avons aussi synthétisé des monomères bifonctionnels (cyclocarbonates, acrylates et méthacrylates) à partir du syringarésinol avec des bons rendements. Ainsi, des nouveaux polyuréthanes non-isocyanates, mais aussi des poly(méth)acrylates aromatiques rigides pourront être synthétisés à partir de ces monomères.

Les travaux de cette thèse ont démontré que les composés aromatiques issus de la biomasse peuvent être efficacement utilisés pour la synthèse de nouveaux antioxydants et polymères par un procédé biocatalytique. Ces antioxydants et polymères possèdent des propriétés intéressantes et sont capables de rivaliser avec ceux pétrosourcés. Cependant, les travaux décrits dans cette thèse sont à l'heure actuelle limités à l'échelle du laboratoire et sont encore des preuves de concept. Afin que ces antioxydants et polymères trouvent des applications à l'échelle industrielle, la production des alcools *p*-hydroxycinnamiques ou de leurs dérivés (e.g., vanilline, syringaldehyde, acide sinapique) doit être effective à grande échelle. A l'heure actuelle, plusieurs équipes de recherche travaillent sur la dépolymérisation contrôlée de la lignine afin de pouvoir fournir ces molécules en quantités suffisantes pour les valoriser dans le futur.

Productions scientifiques

1. Publications

A. S. Jaufurally, A. R. S. Teixeira, L. Hollande, F. Allais and P.-H. Ducrot, Optimization of the laccase-catalyzed synthesis of (±)-syringaresinol and study of its thermal and antiradical activities, *ChemistrySelect*, **2016**, *1*, 5165 – 5171

L. Hollande, **A. S. Jaufurally**, P.-H. Ducrot, and F. Allais, ADMET polymerization of biobased monomers deriving from syringaresinol, *RSC Advances*, **2016**, *6*, 44297- 44304.

M. Janvier, L. Hollande, **A. S. Jaufurally**, M. Pernes, R. Ménard, M. Grimaldi, P. Balaguer, P.-H. Ducrot and F.Allais, Syringaresinol: a renewable and safer alternative to bisphenol-A for epoxy-amine resins, *Polymer Chemistry*, **2016**, Submitted

2. Communications orales

Chemo-enzymatic synthesis and functionalization of syringaresinol : A promising biobased antiradical additive and platform for bisphenolic monomers – 252nd American Chemical Society national meeting, Philadelphia, USA (Août 2016)

Chemo-enzymatic synthesis of a renewable lignin-derived bisphenol: Promising biobased antioxidant additive and phenolic monomers – Catalysis Applied to Biomass, Compiègne, France (Mars 2016)

Synthesis and polymerizations of new biobased macrobisphenols derived from ferulic acid – 3rd Biopolymers International Conference, Nantes, France (Dec 2015)

3. Communications par affiches

ADMET polymerization of biobased monomers deriving from syringaresinol - 252nd American Chemical Society national meeting, Philadelphia, USA (selected for polymer and Sci-Mix poster sessions) (Août 2016)

L. Hollande, A. S. Jaufurally, P.-H. Ducrot, and F. Allais

Productions scientifiques

Chemo-enzymatic synthesis and functionalization of a renewable lignin-derived bisphenol: Promising biobased antiradical additive and phenolic monomers - 32nd International Conference of the Polymer Processing Society, Lyon, France (Jul 2016)

A. S. Jaufurally, A. R. S. Teixeira, L. Hollande, F. Allais and P.-H. Ducrot

Synthesis and polymerizations of new biobased macrobisphenols derived from ferulic acid - 3rd Biopolymers International Conference, Nantes, France (Dec 2015)

A. F. Reano, F. Pion, M. Z. Oulame, I. Barbara, A. L. Flourat, S. Domenek, P.-H. Ducrot, F. Allais

Synthesis of syringaresinol via an optimized enzymatic oxidation of sinapyl alcohol - 3rd International Symposium on Green Chemistry, La Rochelle, France (Mai 2015)

A. S. Jaufurally, A. R. S. Teixeira, F. Allais and P.-H. Ducrot

Enzymatic polymerization of phenolic compounds in ionic liquids - Journées des doctorants GMPA-INRA, Grignon, France (Fev 2014)

A. S. Jaufurally, F. Allais and P.-H. Ducrot

Enzymatic oxidation of monolignols - Journées GDRs LIPs et Biomatpro, Sophia-Antipolis, France (Avril 2014)

A. S. Jaufurally, F. Allais and P.-H. Ducrot





Titre : Oligomérisation enzymatique d'alcools p-hydroxy cinnamiques : production de synthons et additifs pour la chimie des polymères

Mots-clés : Oligomérisation enzymatique, Polymères, Antioxydants, Bisphénol, Liquides ioniques

Résumé :

Le but des travaux de cette thèse a été de mettre en place des protocoles de synthèse et de polymérisation de composés phénoliques.

Le premier objectif a été de développer et optimiser des modes opératoires robustes et reproductibles permettant de polymériser de manière contrôlée ces derniers en présence d'oxydases, et particulièrement de laccase. Les études mécanistiques menées dans le cadre de ces nouveaux procédés ont mené à une meilleure compréhension de la réactivité des phénols (oxydation, dismutation) et à de nouveaux modes de valorisation de ces composés. Ainsi, ces procédés nous ont permis d'accéder sélectivement à des composés phénoliques de complexité structurale et fonctionnalité variées (dimères, trimères ou oligomères peu polydisperses) pouvant être utilisés en tant qu'antioxydants ou encore monomères/synthons pour la chimie des polymères. Pour illustrer le potentiel de ces composés phénoliques dans le domaine des polymères, ils ont été mis en jeu dans des réactions de polymérisation par métathèse (ADMET) et polymérisation radicalaire (thiol-ène).

Title : Enzymatic oligomerisation of p-hydroxy cinnamic alcohols for the production of monomers and additives for polymer chemistry

Keywords : Enzymatic oligomerization, Polymers, Antioxidants, Bisphenol, Ionic liquids

Abstract :

The purpose of this thesis was to develop experimental protocols for the polymerization of phenolic compounds.

The first objective was to develop and optimize robust and reproducible procedures to control the polymerization of phenolic compounds in the presence of oxidases, such as laccase. Mechanistic studies were conducted during these new processes in order to have a better understanding of the reactivity of phenols (oxidation, dismutation) and find new ways of valorization of such compounds. Thus, these methods have enabled us to selectively access phenolic compounds of structural complexity and variable functionalities (dimers, trimers or oligomers) that can be used as antioxidants or monomers for the polymer chemistry. To illustrate the potential of these phenolic compounds in the field of polymers, they have been involved in polymerization reactions such as ADMET and radical polymerizations (thiol-ene).