



HAL
open science

Étude de l'action d'une bilirubine oxydase sur la lignine Kraft en milieu alcalin : caractérisations et étude de modèles

Lou Delugeau

► **To cite this version:**

Lou Delugeau. Étude de l'action d'une bilirubine oxydase sur la lignine Kraft en milieu alcalin : caractérisations et étude de modèles. Polymères. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0363 . tel-04879715

HAL Id: tel-04879715

<https://theses.hal.science/tel-04879715v1>

Submitted on 10 Jan 2025

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale des sciences chimiques

Spécialité POLYMÈRES

Par Lou DELUGEAU

**Étude de l'action d'une bilirubine oxydase sur la lignine Kraft
en milieu alcalin : caractérisations et étude de modèles.**

Sous la direction du Pr. Stéphane GRELIER et du Dr Frédéric PERUCH

Soutenue le 9 décembre 2024

Membres du jury

M.ALLAIS, Florent
M.POLLET, Éric
Mme BARBE, Sophie
M. MANO, Nicolas
M. GRELIER, Stéphane
M. PERUCH, Frédéric

Professeur à AgroParisTech
Professeur à l'Université de Strasbourg
Directrice de Recherche – INRA Toulouse
Directeur de Recherche – CNRS
Professeur à l'Université de Bordeaux
Directeur de Recherche – CNRS

Rapporteur
Rapporteur
Présidente
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Techniques d'analyse :

ATG – Analyse thermogravimétrique
CD – Dichroïsme circulaire
DSC – Differential scanning calorimetry
(Calorimétrie différentielle à balayage)
DLS – Dynamic Light Scattering
HMBC – Heteronuclear multiple-bond
correlation
HSQC – Heteronuclear Single-Quantum
Correlation
IRTF – Infrarouge à transformée de Fourier
LC-MS – Chromatographie liquide et
spectrométrie de masse
MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser
Desorption Ionization - Time of Flight
RMN – Résonance Magnétique Nucléaire
SEC – Steric Exclusion Chromatography

Solvants :

CDCl₃ – Chloroforme deutéré
DMF – Diméthyl formamide
DMSO – Diméthylsulfoxyde
EtOH – Ethanol
HCl – Acide chlorhydrique
NaOH – Hydroxyde de sodium
THF – Tétrahydrofurane

Autres abréviations :

ABTS – Acide 2,2'-azino-bis(3-
éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
BOD – Bilirubine Oxydase
BTX – Benzène, Toluène, Xylène
DHP – Déhydropolymères

DP – Degré de polymérisation
Đ – Dispersité
ET – Transfert d'électrons
H₂O₂ – Peroxyde d'hydrogène
HAT – Transfert d'atome d'hydrogène
HBT – Hydroxybenzotriazole
HSA – Albumine de sérum humain
Ins – Insoluble
LiP – Lignine Peroxydase
MCO – Oxydases multi-cuivre
Mn – Masse molaire moyenne en nombre
MnP – Peroxydase de manganèse
Mw – Masse molaire moyenne en poids
NHE – Électrode standard à hydrogène
O₂ – Dioxygène
PAN – Polyacrylonitrile
PS – Polystyrène
PSS – Polystyrène Sulfoné
RT – Retention Time
Sol – Soluble
TEMPO – (2,2,6,6-Tétraméthylpipéridin-1-
yl)oxy
Tg – Température de transition vitreuse

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO, UMR 5629) et sont issus du projet LIGNIN financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail et qui se sont déplacés à Bordeaux pour la soutenance, où la discussion fut bienveillante et très riche : Florent Alais, Éric Pollet, Nicolas Mano et Sophie Barbe.

Je tiens à remercier Sébastien Lecommandoux, directeur du LCPO, de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de ce laboratoire. Un grand merci également au personnel administratif : Olivier Fihey, Corinne Gonçalves De Carvalho, Émilie Lalande, Claude Le Pierres, Dominique Richard et Séverine Saint-Drenant qui veillent au bon fonctionnement du laboratoire.

Frédéric et Stéphane, je profite de ces quelques lignes pour vous remercier sincèrement pour votre encadrement durant ces trois années. Je n'aurais pas pu rêver meilleur accompagnement. Vous avez été l'équation parfaite entre une présence régulière sur laquelle j'ai toujours pu compter, avec des points hebdomadaires pendant le dur des manips, mais également une confiance de votre part qui m'a laissé une grande liberté de recherche, pour explorer, me tromper, apprendre. Votre porte a toujours été ouverte, pour regarder un spectre RMN ou écouter mes doutes et me remettre sur la voie de la motivation. Merci pour votre science et votre humanité, j'ai énormément appris de vous.

Merci également aux membres du projet LIGNIN qui font partie du CRPP : Sébastien pour ta grande aide avec la science des enzymes. Louise pour les nombreuses discussions enzyme-related ou non. Olympe, Philippe, Wil pour les échanges riches lors des réunions ANR.

Merci aux ingénieur.e.s et technicien.ne.s du laboratoire, sans qui la science ne se réaliserait pas. Frédérique, maman du N0, merci pour ta présence réconfortante. Sylvain, merci (et désolée ?!) pour la SEC soude, ce ne fut pas de tout repos, et tu as été d'une grande patience. Cédric pour les analyses thermiques, Paul pour la DLS et l'IR, Léna pour la RMN (je pourrais écrire 6 pages de remerciements pour l'aide que tu m'as apportée, que ça soit pour ces fichues HSQC insolubles, ou pour la RMN du bore). Merci également à Florian pour la gestion logistique du laboratoire !

Un grand merci à tous les membres du LCPO, notamment les collègues des équipes 1 et 2, permanents et non-permanents. Karine (you go girl, tu peux être fière de tout ce que tu as accompli), Thomas LP, Sofia, Lucile, Thomas D, Anne-Lise, Emilie (la pro des diapos), Mickael, Zoi, Aurélie, Manon P. (laccase power), Zhengxin, Flo (merci pour la douceur, l'aide sur tous les fronts, les mots réconfortants dans des moments pas oufs, merci d'être un excellent scientifique !!!), Clémi

(from fillot de CPB to collègue de thèse, merci pour ta gentillesse), Alex (partenaire de chasse aux crapauds et prof de basse), Manon (merci pour ta présence calme et bienveillante, hâte de te recroiser bientôt, tu es impressionnante sur beaucoup de points, j'espère que tu as conscience de ta force, en tout cas moi je suis très fière de toi), Zakir (merci pour ton sourire qui réchauffe le cœur dans les couloirs), Romain, Solène, Yelin, Mohammed, Lucie, Alexandre, Agnès, Marie, Nicholas, Bilal, Doha ainsi que les ancien.ne.s : Nadia, Assia, Peter, Dijwar, Péroline, Quentin, Corentin.

Merci au NO gang : les anciens ; Jerem (l'homme le plus gentil du monde, merci pour ton accueil, les blindtests et les rires), Jessie (pattounes), Chloé (l'inspirante, la douce, l'impressionnante Chloé, merci d'avoir été l'exemple que tu as été pour nous, et pour toutes les discussions). Mais également les nouveaux, je pense notamment aux bébous : Val, Bastien, Emile, merci pour les fou-rires (#eauEZ), pour votre présence au labo et dans les couloirs.

Aurèle, ton arrivée au LCPO et dans le projet a été un tournant dans mon expérience de thèse. Merci pour ta douceur, ta rigueur si inspirante, ta présence motivante et pour ton infaillible gentillesse.

Maëva, sœur de lignine, merci pour ces trois ans INTENSES, pour tout ce qu'on a vécu ensemble : au labo avec nos chères SEC SOUDE A PH 10 (soupir) ou en dehors (on a vu JOHN RALPH !!!!! (et Beyoncé aussi, purée) + Koh Lanta, skate, drag show, Moscow mule etc.). Cette expérience n'aurait pas été la même sans toi et je suis extrêmement reconnaissante que nos chemins se soient croisés.

Les pipounes : Léna, je suis obligée de te mentionner deux fois dans ce paragraphe, car tu es loin d'avoir joué l'unique rôle d'ingénieur RMN durant ces 2 dernières années. Merci pour ton soutien, ta lumière, ta douceur, ton écoute et tes conseils, ton talent inspirant, ta créativité débordante, ta capacité à donner tellement aux gens qui t'entourent, miou. Paul (Paulo, Poola, Paulux), pas qu'un ingé spectroscopie, mais également... RESPO INFORMATIQUE hihihii...merci pour ton amitié et tes mots réconfortants, en pause café ou ailleurs. Clémence, merci d'avoir été notre grande sœur pendant 3 ans. Merci pour ta rigueur, tes larmes de rire (ou pas), ton enthousiasme, ta lumière, ton affirmation (#territorialiste). Hannah, brat girl, merci pour les rires et les pleurs, pour la rédaction estivale pendant les JO à Paris, pour les vocaux de 17 min à 4h du mat, pour les griffures de Renette, les verres de début de thèse et ceux plein de paillettes de la fin. Hâte de voir ce que le futur nous réserve.

Simon, merci d'avoir été une oreille calme et attentive, avec qui j'ai traversé à la fois l'aventure de la thèse et celle du chœur. Tu es un super humain, aussi talentueux que rigolo, et je suis heureuse de te compter parmi mes amis proches.

Merci au Chœur Voyageur pour cette folle aventure, mention pour Anne, Lilah, Oliv, JBb, Théo, BK, Julia, Alexis, et Khayat. Merci d'avoir été la bouée de secours, la bouffée d'oxygène, de rire et de vie. Des concerts de Noël dans les églises glacées, aux sommets de montagnes albanaises, en passant par les jeudis soirs au conservatoire (et au BL), au jacuzzi du Clos des Charmes, jusqu'à la scène de l'Arkea Arena, merci.

Une autre bouffée d'oxygène a été l'Amisherie, où je me suis réfugiée à de nombreux moments, que ça soit à Sainte Colombe, à Talence dans votre beau jardin, ou au Space autour de délicieuses bières. Merci Anne So pour ton amitié, tes rires, ton engagement, ton soutien, tout l'amour que tu donnes au quotidien. Merci Mathieu, Martin et Fanny pour la douceur et les rires.

Je pense également aux copines d'école d'ingé, ENSCPB ou ENSMAC on ne sait plus trop : Dr Maïko, Gab, Eva et Aude. Merci pour les escapades aux 4 coins de la France, et au plaisir de voir nos relations continuer d'évoluer. Bisous également à Matheus, rencontré en stage de fin d'étude à Saint Gobain. Merci pour les vocaux et les appels vidéos, pour ta lumière si puissante, pour tes conseils et ta bienveillance. Aussi merci d'avoir été présent pour ma soutenance (#busdenuit).

Un immense merci aux ami.e.s qui sont la famille : Étienne, Nawel, Héloïse, et aussi Adèle, Clara, Fanny et Pauline.

Et enfin, un immense merci à ma famille, les 5lugeaux. Le mot merci semble bien trop faible pour exprimer toute ma gratitude envers votre soutien inconditionnel et votre aide précieuse, qui m'ont accompagnée à chaque étape et ont façonné la personne que je suis aujourd'hui. Vous êtes super +++++.

En écrivant ces remerciements, j'ai une pensée particulière pour Valérie.

Sommaire général

Introduction générale	11
I. Étude bibliographique.....	15
I. La paroi cellulaire : structure et composition	17
II. Caractéristiques de la lignine	21
III. Modèles de lignine	37
IV. Valorisation de la lignine.....	46
V. Enzymes lignolytiques	55
VI. Enzymes alcaliphiles.....	70
VII. Conclusion.....	78
VIII. Références bibliographiques.....	80
II. Chapitre 2 : Traitements enzymatiques de modèles monomères phénoliques	93
I. Introduction.....	95
II. Traitements enzymatiques de l'acétovanillone	96
III. Traitements enzymatiques d'autres composés phénoliques.....	116
IV. Conclusion.....	136
V. Références bibliographiques.....	137
VI. Annexes	138
III. Chapitre 3 : Synthèse et traitement enzymatique de modèles polymères de lignine.....	139
I. Introduction.....	141
II. Polymères modèles de la liaison β -O-4	141
III. Polymères DHPs	149
IV. Conclusion.....	155
V. Références bibliographiques.....	156
VI. Annexes	156
IV. Chapitre 4 : Caractérisation de la lignine Kraft et étude de solubilisations contrôles	157
I. Caractérisation de la lignine Kraft Indulin AT.....	159
II. Influence du solvant sur la solubilité de la lignine Kraft.....	166
III. Références bibliographiques.....	188
V. Chapitre 5 : Étude du traitement enzymatique d'une lignine Kraft	191

I.	Traitement enzymatique dans le tampon borate à pH 10.....	193
II.	Influence des paramètres	206
III.	Traitement dans d'autres tampons.....	215
IV.	Étude d'une BOD désactivée.....	220
V.	Traitement des fractions solubles obtenues.....	224
VI.	Traitement enzymatique d'une lignosulfonate de sodium	228
VII.	Réaction de Dakin sur la lignine Kraft et traitements enzymatiques.....	231
VIII.	Tentative de fractionnement de la lignine Kraft.....	234
IX.	Conclusion.....	238
X.	Références bibliographiques.....	240
XI.	Annexes	241
VI.	Chapitre 6 : Partie expérimentale.....	243
I.	Matériels	245
II.	Méthodes de caractérisation	245
III.	Modes opératoires	252
IV.	Références bibliographiques.....	258
	Conclusion générale.....	261

Introduction générale

Ce sujet de thèse s'inscrit dans le projet ANR (Agence Nationale de la Recherche) appelé LIGNIN. Ce projet regroupe trois partenaires académiques et industriels, le CRPP (Centre de Recherche Paul Pascal), le centre technique CANOË et le LCPO (Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques), tous situés à Pessac (33600).

La nécessité de trouver des alternatives aux polymères pétrosourcés devient de plus en plus pressante dans le contexte actuel de crise environnementale et d'épuisement des ressources fossiles. [1] Les polymères issus de la pétrochimie, bien que largement utilisés, contribuent massivement à la pollution plastique et au changement climatique. [2] La communauté scientifique se penche depuis plusieurs décennies sur des alternatives biosourcées, de par l'utilisation de monomères issus de la biomasse, l'amélioration des voies de synthèse actuelles, ou en réfléchissant à la fin de vie des matériaux produits et à leur recyclabilité. Dans ce contexte, un intérêt particulier a émergé pour la lignine, qui est le biopolymère aromatique le plus abondant sur terre, représentant 30% du carbone organique de la biosphère. [3] La lignine joue le rôle de matrice entre la cellulose et les hémicelluloses qui composent la paroi cellulaire des végétaux. [4] Elle protège ainsi les polysaccharides contre les agressions extérieures telles que la dégradation microbienne. En tant que polymère hydrophobe, la lignine sert également de barrière contre la pénétration de l'eau. [5] Son association intime avec les autres biopolymères des parois végétales nécessite de mettre en œuvre des procédés chimiques qui modifient sa structure chimique plus ou moins profondément. Tous les ans, l'industrie papetière produit entre 50 et 60 millions de tonnes de lignine mais seuls 2% sont utilisés commercialement, le reste étant brûlé pour produire de la vapeur. [6, 7] Avec une structure hétérogène, qui dépend de la source du végétal et de son type, mais également de son procédé d'extraction, cette ressource est peu soluble dans les solvants usuels et difficilement valorisable, bien que de nombreux efforts de la communauté scientifique aient permis de relever plusieurs défis. Au cours des dernières décennies, des recherches importantes ont été consacrées à la valorisation de la lignine, mettant l'accent sur son utilisation en tant que polymère pour des agents dispersants, des additifs, et des adsorbants de métaux. En parallèle, sa dépolymérisation a été étudiée par des voies thermiques, réductrices et oxydantes, dans le but de produire des monomères phénoliques, des produits chimiques de la plateforme BTX (Benzène, Toluène, Xylène), ainsi que des composés comme la vanilline. [8–11]. La structure phénolique plus ou moins prononcée des lignines industrielles permet d'envisager l'utilisation d'un milieu basique pour les solubiliser et réaliser leur modification chimique. Malheureusement, ce milieu basique est souvent contraire à la mise en œuvre de réactions enzymatiques pour assurer ces transformations.

Néanmoins, la modification enzymatique de la lignine est une voie de valorisation prometteuse, car elle s'effectue dans des conditions réactionnelles douces : pas de solvants organiques notamment. La bilirubine oxydase (BOD) est une enzyme multi-cuivre. L'équipe de recherche du CRPP étudie cette enzyme depuis plusieurs années, et a démontré notamment ses propriétés alcaliphiles, thermophiles et halogénophiles. [12, 13] En d'autres termes, la BOD est active et stable à pH basique, à haute température (jusqu'à 80 °C) et tolère la présence de sels dans le milieu réactionnel. Ces propriétés ont été mises à profit en procédant au traitement d'une lignine Kraft Indulin AT en milieu basique. La BOD présente l'avantage d'être active à pH basique, permettant ainsi de traiter des lignines industrielles dans des conditions où elles sont solubles.

Notre partenaire dans ce projet, le CRPP, a donc procédé à des essais de traitement enzymatique de la lignine Kraft en milieu alcalin, grâce à un tampon borate à pH 10. Une fraction de lignine dans le surnageant du milieu réactionnel (« fraction soluble ») solubilisée au cours de la réaction a été obtenue, ainsi qu'un culot qui a précipité (« fraction insoluble »). La fraction soluble, une fois lyophilisée, peut être solubilisée dans de l'eau neutre à jusqu'à plus de 100 g/L. Mano *et al.* ont ensuite obtenu des fibres de carbone en utilisant comme précurseur la fraction de lignine soluble, et ont mis à profit sa solubilité pour utiliser des méthodes de « wet-spinning ». Ce résultat a été breveté en 2019. [14] Aujourd'hui, le partenariat avec le centre technique CANOË permet l'amélioration du processus et des conditions de filage des fibres de carbone.

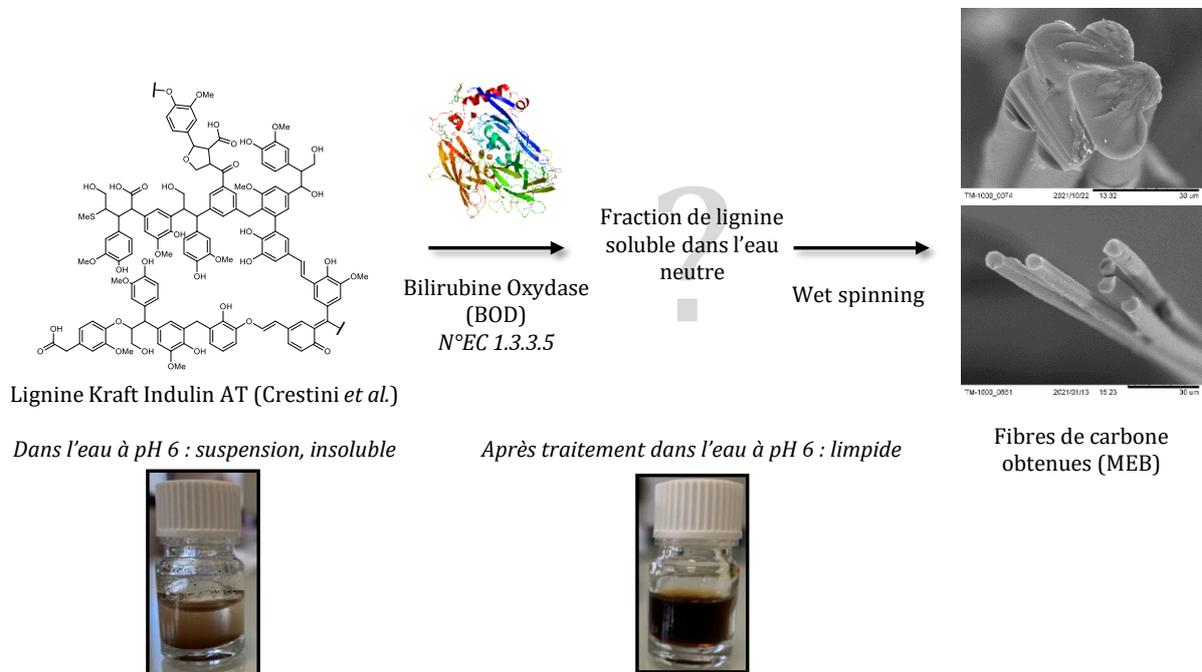


Figure 0-1 : Présentation du projet : traitement de la lignine Kraft Indulin AT avec la BOD : obtention d'une fraction soluble à pH neutre (illustrée en photographie), puis filage de fibres de carbone issues de cette fraction. La fibre de carbone a été produite et analysée par le CRPP.

L'objectif de cette thèse est de comprendre les mécanismes en jeu et les modifications induites par la BOD sur la structure de la lignine. Le projet de thèse dont fait l'objet ce présent manuscrit, représenté en Figure 0-1, a donc pour objectif de comprendre l'action de la BOD sur la structure de la lignine Kraft. Pour ce faire, plusieurs modèles ont été étudiés, allant de monomères phénoliques, à des modèles polymères, pour enfin se concentrer sur la lignine Kraft.

Références bibliographiques

- [1] M. Höök, X. Tang, *Energy Policy*. **2013**, *52*, 797–809. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2012.10.046>.
- [2] T. Stanton, P. Kay, M. Johnson, F. K. S. Chan, R. L. Gomes, J. Hughes, W. Meredith, H. G. Orr, C. E. Snape, M. Taylor, et al., *WIREs Water*. **2021**, *8* (1), e1490. DOI: <https://doi.org/10.1002/wat2.1490>.
- [3] C. Heitner, D. Dimmel, J. Schmidt, *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry* **2016**.
- [4] J. Zakzeski, P. C. A. Bruijninx, A. L. Jongerius, B. M. Weckhuysen, *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3552–3599. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr900354u>.
- [5] F. J. Ruiz-Dueñas, Á. T. Martínez, *Microbial Biotechnology*. **2009**, *2* (2), 164–177. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x>.
- [6] L. P. Christopher, « CHAPTER 1. Integrated Forest Biorefineries: Current State and Development Potential », in *Green Chemistry Series*, Éd., Cambridge: Royal Society of Chemistry, **2012**. doi: 10.1039/9781849735063-00001.
- [7] J. C. Chan, M. Paice, X. Zhang, *ChemCatChem*. **2020**, *12* (2), 401–425. DOI: <https://doi.org/10.1002/cctc.201901480>.
- [8] M. P. Pandey, C. S. Kim, *Chemical Engineering & Technology*. **2011**, *34* (1), 29–41. DOI: <https://doi.org/10.1002/ceat.201000270>.
- [9] A. Eraghi Kazzaz, P. Fatehi, *Industrial Crops and Products*. **2020**, *154*, 112732. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112732>.
- [10] C. Chio, M. Sain, W. Qin, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2019**, *107*, 232–249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.008>.
- [11] Z. Sun, B. Fridrich, A. de Santi, S. Elangovan, K. Barta, *Chemical Review*. **2018**, *118* (2), 614–678. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00588>.
- [12] F. Durand, C. H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R. G. Hadt, E. I. Solomon, N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, *35* (1), 140–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.033>.
- [13] F. Durand, S. Gounel, C. H. Kjaergaard, E. I. Solomon, N. Mano, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2012**, *96* (6), 1489–1498. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3926-2>.
- [14] N. Mano, S. Gounel, W. Neri, A. Derre, P. Poulin, *Modification Enzymatique De La Lignine Pour Sa Solubilisation Et Applications*, **2019**.

I. Étude bibliographique

I.	La paroi cellulaire : structure et composition	17
I.1.	Cellulose.....	18
I.2.	Hémicellulose	18
I.3.	Lignine.....	19
II.	Caractéristiques de la lignine	21
II.1.	Structure de la lignine.....	21
II.2.	Sources d'hétérogénéité des lignines	23
II.3.	Les procédés d'extractions	25
II.4.	Méthodes de caractérisation de la lignine.....	30
III.	Modèles de lignine	37
III.1.	Petites molécules	37
III.2.	Modèles oligomères.....	40
III.3.	Modèles polymères	41
IV.	Valorisation de la lignine.....	46
IV.1.	La lignine en tant que polymère : additifs et agents dispersants	46
IV.2.	Dépolymérisation de la lignine	47
IV.3.	La lignine comme source de fibres de carbone	50
V.	Enzymes lignolytiques	55
V.1.	Peroxydases lignolytiques	55
V.2.	Les oxydases multi-cuivre : généralités	57
V.3.	Laccases (EC 1.10.3.2)	57
V.4.	Actions anaboliques des laccases.....	61
V.5.	Actions cataboliques des laccases.....	62
V.6.	Bilirubine oxydase (EC 1.3.3.5).....	67
VI.	Enzymes alcaliphiles.....	64
VI.1.	Polymérisation de lignines avec des laccases alcaliphiles.....	65
VI.2.	Dépolymérisation de lignines avec des laccases alcaliphiles	66
VI.3.	Polymérisation et dépolymérisation de lignines avec des laccases alcaliphiles	69
VII.	Conclusion.....	78
VIII.	Références bibliographiques.....	80

I. La paroi cellulaire : structure et composition

La biomasse, en particulier le bois, est utilisée depuis des millénaires comme matériau de construction pour de nombreuses applications et comme source de chaleur en tant que combustible. Le bois est une structure complexe qui joue de multiples rôles dans le fonctionnement des arbres en leur fournissant la résistance mécanique nécessaire et en assurant le transport des liquides ainsi que le stockage des réserves alimentaires. [1]

Il existe quatre familles constitutives de la paroi cellulaire des espèces végétales : la cellulose (environ 50 % de la masse totale), les hémicelluloses (entre 30 et 45 %), la lignine (entre 15 et 25 %) et les extractibles, comme les tannins, composés aromatiques (entre 5 et 10 %). Dans la suite de ce manuscrit, le propos sera focalisé sur les biopolymères de la lignocellulose.

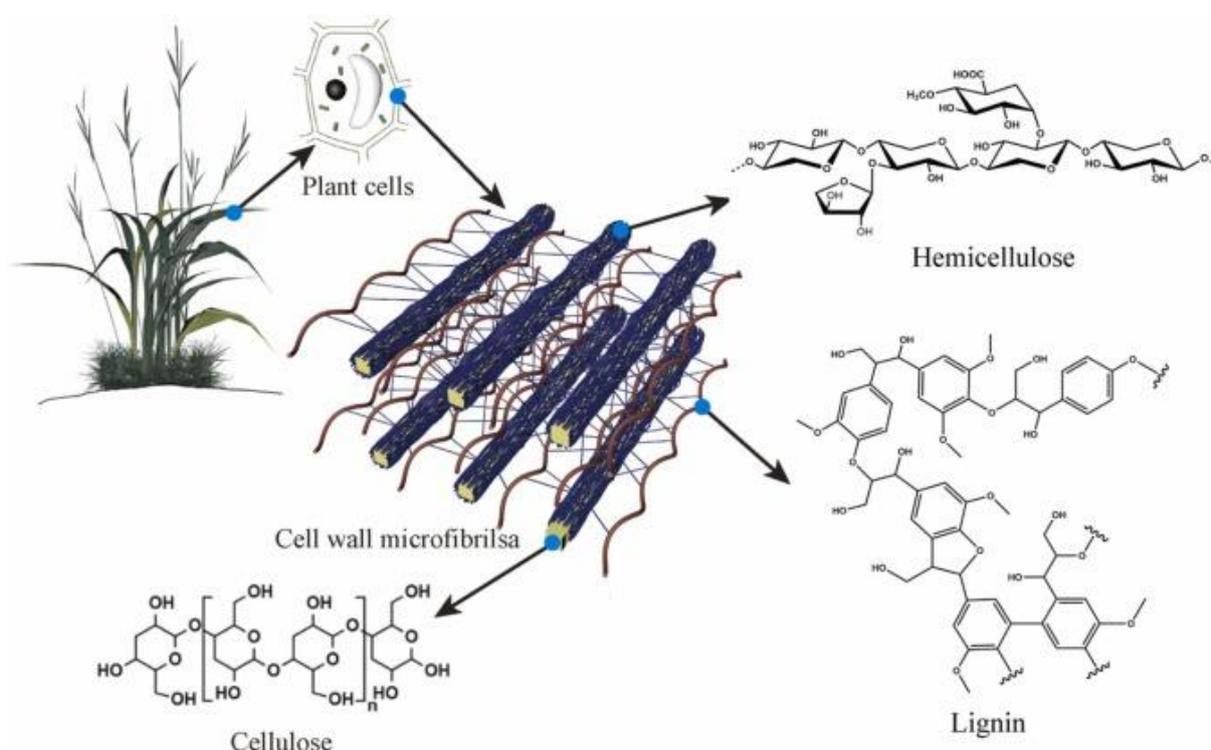


Figure I-1 : Structure de la paroi cellulaire végétale [2]

Ces composants, représentés en Figure I-1, interagissent de manière synergique pour procurer au bois ses propriétés uniques. La cellulose, constituée de longues chaînes de glucose, forme une structure cristalline qui confère résistance et rigidité à la paroi cellulaire. Les hémicelluloses complètent cette structure en assurant une liaison entre les chaînes de cellulose et de lignine, favorisant ainsi la flexibilité. La lignine, polymère de structure complexe, joue un rôle essentiel dans la rigidification de la paroi cellulaire. Sa présence apporte également une résistance accrue aux agents pathogènes et aux agresseurs externes à la cellule.

I.1. Cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant sur Terre, composant majoritaire des espèces lignocellulosiques (50 % de la masse sèche environ). [2]

Cet homopolymère linéaire est doté d'une structure en micro-fibrilles cristallines et son unité de répétition est la cellobiose, dimère du glucose (Figure I-2). Ces unités sont liées entre elles par des liaisons glucosidiques de type $\beta(1\rightarrow4)$. Lors de leur biosynthèse par des complexes multi-enzymatiques dans des complexes terminaux Rosette, les chaînes de cellulose s'associent entre elles *via* des liaisons hydrogène, constituant des micro-fibrilles de cellulose, elles-mêmes regroupées en fibrilles élémentaires ou macro-fibrilles. [3] La cohésion de la fibre est assurée par les interactions hydrogène intra- et intermoléculaires, notamment dues aux nombreux groupements hydroxyle présents sur chaque unité osidique. Cette structure cristalline confère à la cellulose une résistance mécanique exceptionnelle, la rendant ainsi indispensable pour maintenir l'intégrité et la forme des cellules végétales.

Le degré de polymérisation (DP) de la cellulose native peut varier entre 10 000 et 15 000 en fonction de l'espèce considérée. [4] Après extraction et purification, le degré de polymérisation atteint des valeurs inférieures à 3 500. [5]

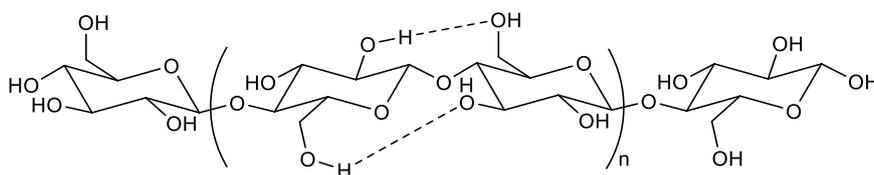


Figure I-2: Structure de la cellulose

Aujourd'hui, c'est le biopolymère lignocellulosique le plus valorisé à l'échelle industrielle, notamment par l'industrie papetière. La production de pâte à papier annuelle est chiffrée à environ 405 millions de tonnes, principalement pour l'emballage papier ou carton, d'après l'organisation WWF ou Fonds mondial pour la nature.

I.2. Hémicellulose

Les hémicelluloses sont des polysaccharides complexes et variés qui jouent également un rôle essentiel dans les parois cellulaires des végétaux. Ce sont des chaînes polysaccharidiques constituées de plusieurs types de sucres, tels que le xylose, l'arabinose, le mannose, le galactose et le glucose, ainsi que d'autres monosaccharides moins courants, représentés en Figure I-3. La chaîne principale des hémicelluloses peut être constituée d'une seule unité (homopolymère ; par exemple, les xylanes) ou de deux unités ou plus (copolymères ; par exemple, les glucomannanes).

Les hémicelluloses forment une famille de polymère amorphes, dont la masse molaire est plus faible que celle de la cellulose avec un DP compris entre 50 et 200. [5] Les liaisons glycosidiques varient entre les différentes unités saccharidiques (liaisons β -1,4 et β -1,3 par exemple), et leur ramification fréquente ajoute encore plus de complexité à la structure des hémicelluloses.

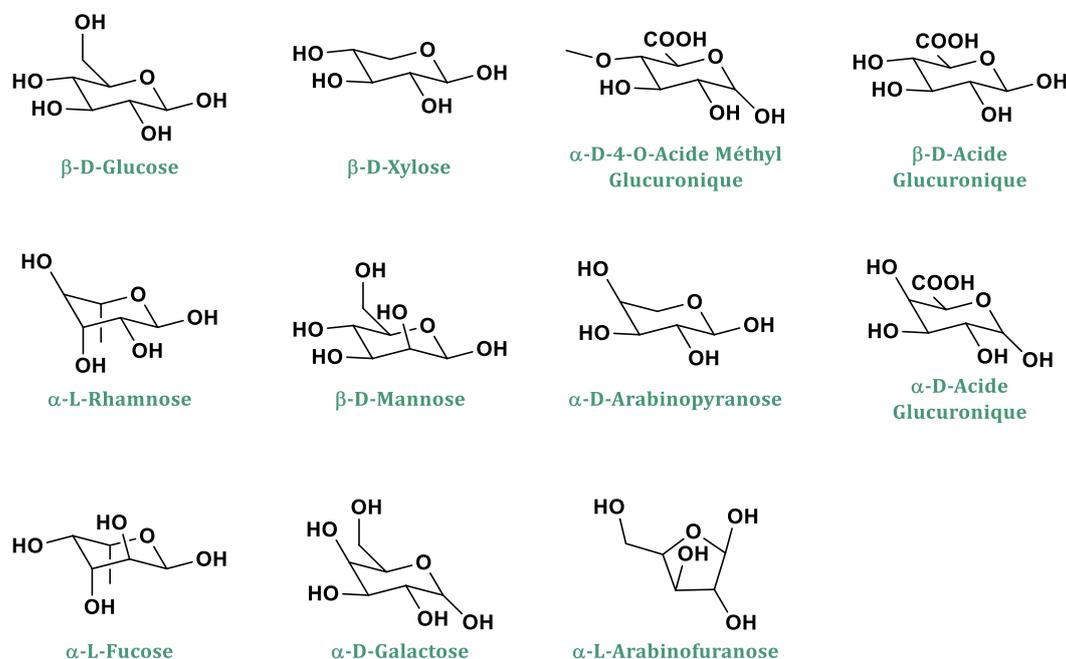


Figure I-3: Unités saccharidiques constituant les hémicelluloses

La diversité de leur composition leur confère un caractère hétérogène et leur permet de s'associer à la cellulose et à la lignine pour former la structure complexe des parois cellulaires. Cette cohésion est favorisée par la multitude de liaisons hydrogène entre les différents constituants. Certains auteurs ont pu mettre en évidence l'existence de liaisons covalentes entre lignine et hémicelluloses, favorisant cette unité compacte au sein de la cellule végétale. [6, 7]

I.3. Lignine

La lignine est un polymère aromatique composé d'unités phénylpropane méthoxylées branchées de façon aléatoire, représenté en Figure I-4. Ce réseau tridimensionnel complexe représente environ 25 % de la biomasse lignocellulosique. [8] La lignine forme une matrice avec les hémicelluloses afin d'assurer la rigidité de l'ensemble de la plante et l'imperméabilité du bois vis-à-vis de l'eau.

De plus, elle renforce la capacité de la plante à faire face aux agressions externes naturelles en bloquant, par exemple, la pénétration d'enzymes destructrices dans les parois cellulaires, assurant ainsi une résistance aux attaques microbiennes. [9]

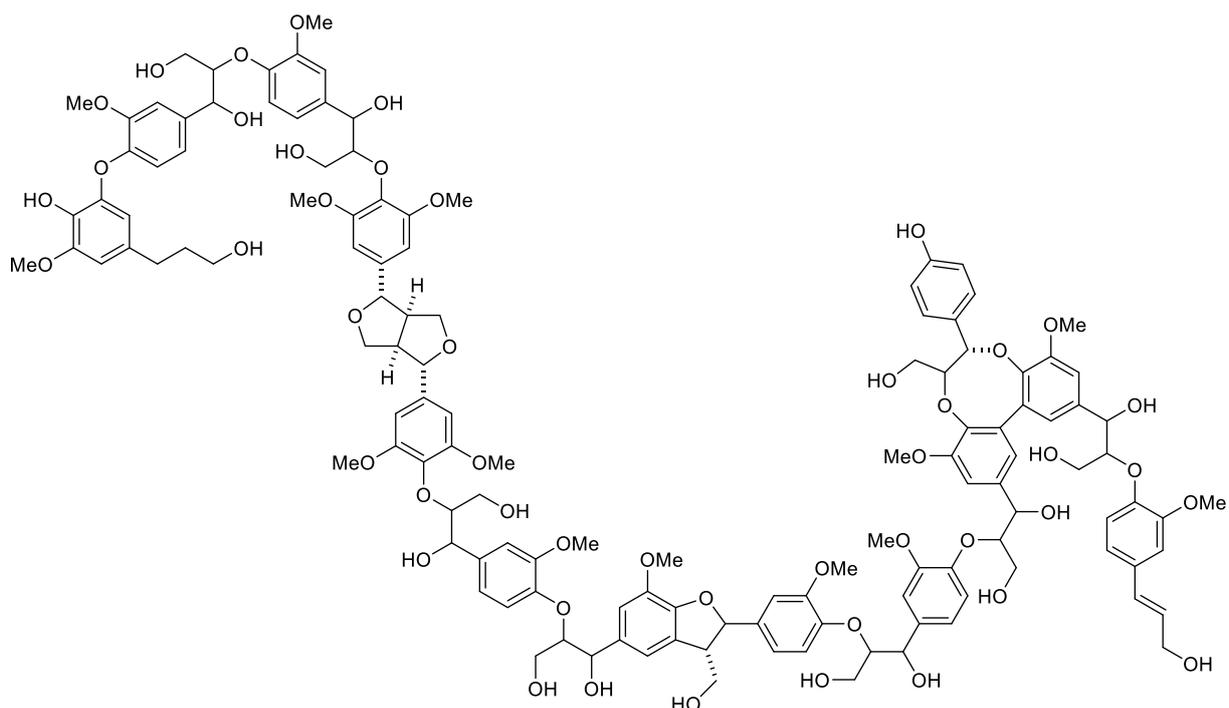


Figure I-4: Exemple de structure d'une molécule de lignine. [10]

Historiquement, l'industrie papetière s'est concentrée sur l'extraction et la valorisation de la cellulose issue des matières végétales, exploitant ainsi les fibres naturelles pour produire du papier et divers produits dérivés. À l'heure actuelle, elle génère 70 millions de tonnes de lignine en tant que sous-produit de son activité, principalement dans les liquides de cuisson Kraft. Environ 95 % de cette lignine est incinérée pour produire de la chaleur et de l'énergie. En brûlant la lignine Kraft, les usines papetières génèrent suffisamment de vapeur et d'électricité pour couvrir une grande partie, voire la totalité, de leurs besoins énergétiques. Ce processus contribue non seulement à réduire la dépendance aux combustibles fossiles mais également à diminuer les émissions de carbone, positionnant ainsi cette industrie comme un modèle d'économie circulaire. La part restante de la lignine est utilisée dans des applications à faible valeur ajoutée, comme agent dispersant dans les ciments.

La complexité substantielle de la lignine, sa nature hétérogène et son caractère insoluble découragent les entreprises industrielles d'investir dans sa valorisation. Pourtant, sa structure aromatique, sa grande fonctionnalité et son abondance en font un candidat idéal pour la synthèse de produits chimiques à haute valeur ajoutée d'origine naturelle. Les travaux entrepris par la communauté scientifique pour surmonter les défis liés à la lignine ont ouvert des horizons prometteurs en ce qui concerne sa transformation en produits d'intérêt.

Les caractéristiques de la lignine, sa modélisation ainsi que les différentes voies actuelles ou potentielles de sa valorisation sont développées dans les prochains paragraphes.

II. Caractéristiques de la lignine

II.1. Structure de la lignine

II.1.1. Biosynthèse de la lignine

Trois monomères phénoliques servent de précurseurs pour la polymérisation de la lignine. Il s'agit des alcools p-coumarylique (dont découlent les unités hydroxyphényle H), coniférylique (unités guaiacyle G), et synapylique (unités syringyle S), tous biosynthétisés à partir de la phénylalanine par une cascade de réactions enzymatiques. Chacun de ces monolignols, représentés en Figure I-5, diffère par le nombre de groupements méthoxyle présents en position 3 et 5 de leur noyau aromatique.

La proportion de chacun de ces précurseurs dépend de l'origine de la plante et influe directement sur les motifs et liaisons présents dans la lignine native.

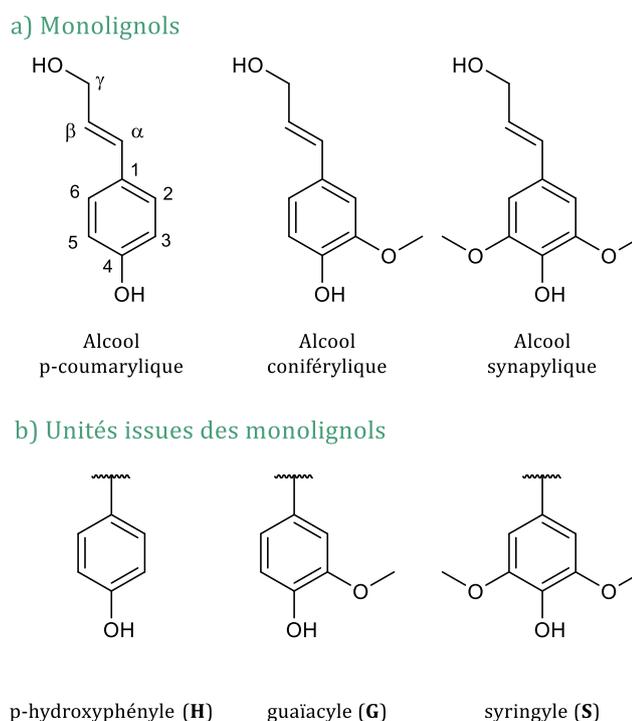


Figure I-5 : a) Les trois précurseurs phénoliques de la lignine b) les unités qui en découlent

La première étape de la biosynthèse de la lignine est la déshydrogénation des monolignols. Cette étape est menée par des enzymes oxydantes de type laccase et/ou peroxydase, conduisant à la formation d'un radical phénolique, lequel est stabilisé par délocalisation électronique dans le système conjugué (Figure I-6). Le couplage intermoléculaire de radicaux conduit à la formation de dimères, qui peuvent être oxydés à nouveau et couplés entre eux pour former des espèces oligomères de plus haute masse molaire. Cette polymérisation radicalaire conduit à un polymère à la structure statistique et fortement ramifiée.

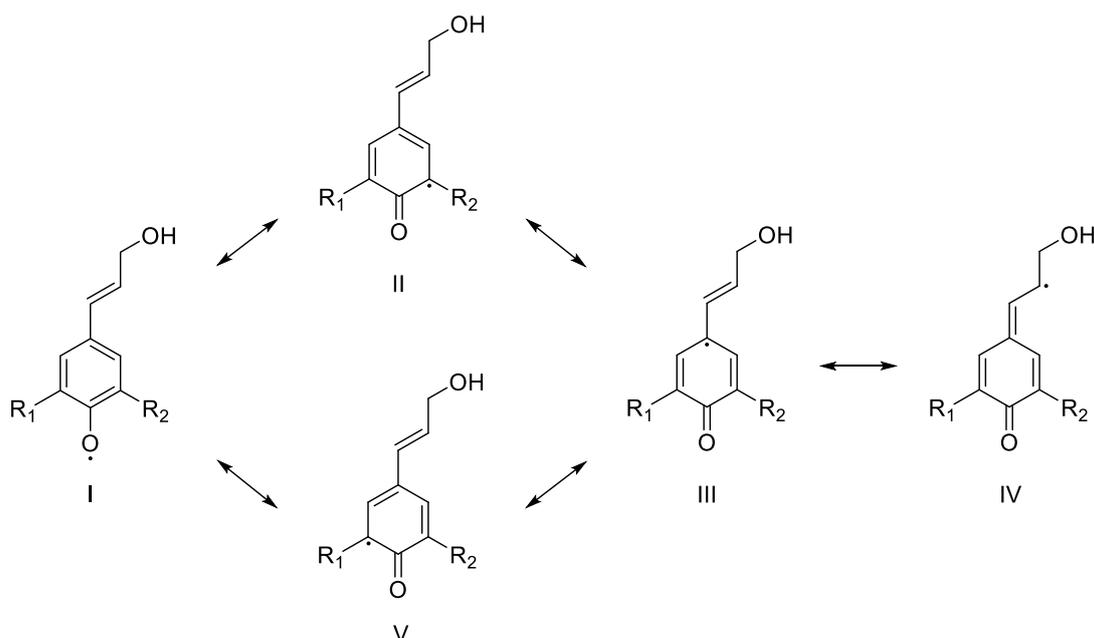


Figure I-6 : Exemples de formes radicalaires à l'origine de la lignification. R_1 et $R_2 = H$ ou OCH_3 .

II.1.2. Structure

Les différents types de liaisons ainsi formées sont classifiés selon une convention bien établie dans la littérature. Les carbones du noyau aromatique sont numérotés de 1 à 6, et les carbones présents sur la chaîne aliphatique sont désignés α , β et γ (Figure I-5).

Ainsi, une liaison de type β -O-4 fait référence à une liaison entre le carbone aliphatique en position β d'un monolignol et un oxygène lié à un carbone en position 4 sur le noyau aromatique d'un autre précurseur. Par ailleurs, on peut noter que les intermédiaires radicalaires les plus stables sont ceux où le radical est porté par l'oxygène phénolique (forme I de la Figure I-6) et par le carbone en position β (forme IV de la Figure I-6). Ainsi, cette liaison β -O-4 est prépondérante dans la lignine native. Dans la suite de la biosynthèse, le couplage des autres dimères va diversifier la structure, et ce couplage β -O-4 se fait moins fréquemment.

Deux familles de liaisons sont communément considérées : d'une part les liaisons éthers, potentiellement hydrolysables, composées des liaisons β -O-4, α -O-4, et 4-O-5 ; d'autre part les liaisons carbone-carbone, dites « condensées », beaucoup plus récalcitrantes à la dégradation. La Figure I-7 présente les principales liaisons inter-unités de la lignine.

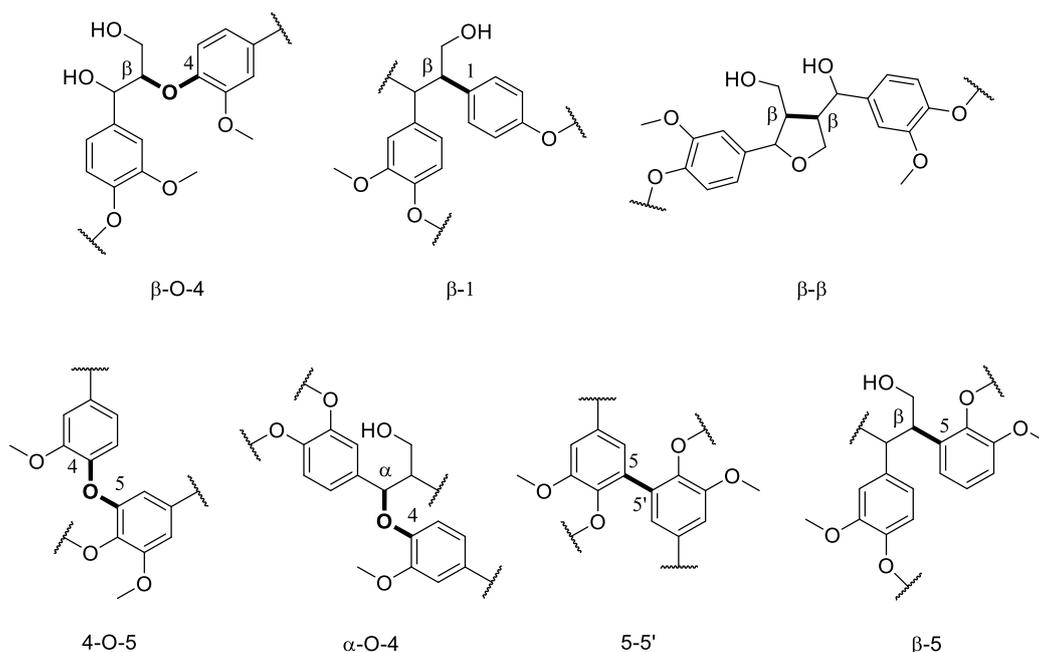


Figure I-7: Principales liaisons inter-unités présentes dans la lignine

La variété de fonctions chimiques présente au sein de ce biopolymère est à relever : groupes hydroxyles phénoliques, aliphatiques, acides carboxyliques, groupes méthoxy, liaisons éther, liaisons carbone-carbone etc.

II.2. Sources d'hétérogénéité des lignines

Un premier facteur d'hétérogénéité des lignines est lié à **l'origine botanique du végétal et à l'état de maturation de la plante**. En effet, la teneur relative en unités H, G et S est spécifique de l'origine végétale des lignines. [11–13] Dans l'histoire de l'évolution, on constate que les résineux sont apparus il y a 350 millions d'années et sont donc nettement plus anciens que les feuillus qui n'existent que depuis 140 millions d'années. De ce fait, leur organisation cellulaire est plus simple et ne comporte principalement qu'un type d'unité.

De manière conventionnelle, les lignines sont regroupées en trois catégories principales : les lignines issues de résineux (gymnospermes, c'est-à-dire de plantes produisant des graines nues non enfermées dans un fruit), celles provenant de feuillus (angiospermes) et les lignines de plantes herbacées. Ces types de lignine se distinguent principalement par la composition de leurs unités répétitives, comme illustré dans le Tableau I-1.

Tableau I-1: Abondance de chaque motif dans les différents types de lignine

	H	G	S
Résineux	0,5 – 3,4 %	90 – 95 %	Traces
Feuillus	Traces	25 – 50 %	50 – 75 %
Herbacées	10 – 25 %	25 – 50 %	25 – 50 %

Ainsi les lignines de résineux sont essentiellement composées de motifs G dans lesquels le carbone aromatique en position 5 est libre. Ces lignines sont donc plus prédisposées aux réactions de couplage, ce qui explique la proportion plus importante de liaisons 5-5' et leur masse molaire généralement plus élevée que celle des feuillus.

Les lignines de feuillus sont essentiellement composées de motifs G et S, leur conférant une structure plus linéaire ; les groupements méthoxy limitant le nombre de couplage et donc de ramifications.

Les herbacées quant à eux comportent les trois motifs H, G et S. Les motifs H ayant une connectivité maximale, ils se retrouvent dans des zones spécifiques des arbres ou plantes comme les nœuds. Cette connectivité est un facteur important car elle est couplée à l'état de réticulation de la lignine (H connectivité de 4 ; G connectivité de 3 ; S connectivité de 2 selon les formes radicalaires illustrées Figure I-6).

Une **multitude de combinaisons entre les différentes formes radicalaires en équilibre est possible**, donnant lieu à de nombreuses liaisons dans des proportions différentes. C'est une seconde source d'hétérogénéité, et les proportions des différentes liaisons varient donc d'une source de lignine à l'autre, comme montré dans le Tableau I-2.

Tableau I-2: Proportion de chaque liaison et groupement fonctionnel dans les lignines de résineux et feuillus.

Type de liaison	Nombre/100 unités	
	Résineux	Feuillus
β -O-4	43 - 50	50 - 65
α -O-4	6 - 8	4 - 8
4-O-5	4	6 - 7
β -1	3 - 7	5 - 7
β - β	2 - 4	3 - 7
β -5	9 - 12	4 - 6

Les précédentes considérations s'appliquent à la lignine native, présente dans les parois des cellules végétales. Il est important de soulever la difficulté de séparer ces lignines des autres constituants de la matière végétale sans altérer la structure de ces molécules, d'autant plus que les hémicelluloses sont souvent liées à la lignine par des liaisons éther ou ester. Pour fractionner sélectivement les polymères composant la matière lignocellulosique, différents procédés d'extraction ont été mis en place par l'industrie papetière. Ces procédés sont des étapes importantes dans l'étude de la biomasse lignocellulosique car ils modifient les fonctions, la masse molaire et la structure de la lignine extraite. C'est l'objet du prochain paragraphe.

II.3. Les procédés d'extractions

La préoccupation principale dans l'industrie papetière est la récupération des fibres de cellulose et par opposition, l'élimination la plus complète de la lignine. Afin de séparer ces différents composants de la biomasse, de nombreux procédés d'extraction ont été développés. Les procédés d'extraction de la lignine reposent principalement sur la rupture des liaisons éther qui relient les unités constitutives de la lignine. En chimie, il existe deux méthodes pour casser ces liaisons : en milieu acide ou en milieu basique. Historiquement, les procédés acides ont d'abord été privilégiés pour l'extraction de la lignine. Cependant, en raison de leur effet trop dégradant sur la cellulose, ces méthodes ont progressivement été supplantées par les procédés basiques.

II.3.1. Lignosulfonates : procédé acide

Les lignosulfonates sont obtenues à partir du procédé bisulfite, issu de l'industrie papetière. Découvert à la fin du 19^e siècle, il consiste à traiter le bois en milieu acide et en présence d'ions hydrogénosulfite (HSO_3^-) et sulfite (SO_3^{2-}) à des températures de l'ordre de 120-140°C. [5]

En milieu acide, un ion oxonium est formé et réagit avec les ions bisulfite pour former des lignosulfonates (Figure I-8). L'ajout de ce nouveau groupe fonctionnel sur le squelette de la lignine lui confère de nouvelles propriétés intéressantes, telles que sa solubilité dans un milieu aqueux à pH acide et basique, ou des propriétés colloïdales inédites.

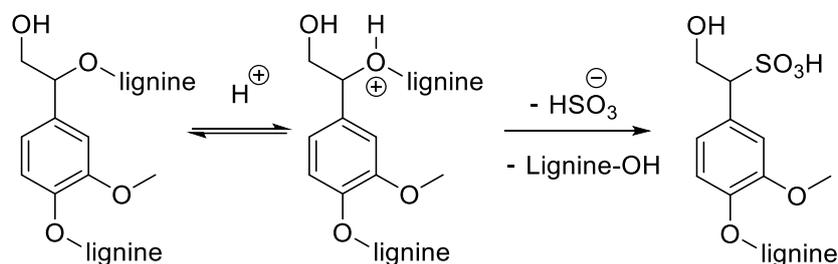


Figure I-8 : Sulfonation de la lignine native lors du procédé bisulfite

La haute solubilité de cette lignine sulfonée permet d'isoler des molécules de haute masse molaire, allant jusqu'à 20 000 g/mol.

Ces propriétés sont mises à profit industriellement, avec l'utilisation des lignosulfonates comme tensioactifs et agents dispersants dans les ciments [14–16], comme résines échangeuses d'ions [17, 18], comme liants dans l'industrie agroalimentaire (préparation de granulés pour l'alimentation du bétail), pour capturer la poussière pour la santé publique (en étant pulvérisées sur les routes, les lignosulfonates deviennent visqueuses lorsque l'eau s'évapore et capturent ainsi la poussière et empêchent la pollution de l'air par les particules) [19, 20] ou dans le domaine des batteries lithium-ion comme dispersants pour contrôler la viscosité des boues d'électrodes (particules solides qui se sont détachées des électrodes ou précipitées de la solution

électrolytique, comme des oxydes métalliques, des sels, des produits de corrosion, ou d'autres matériaux indésirables). [21]

D'autre part, les lignosulfonates sont utilisées comme matière première pour la synthèse de vanilline biosourcée, notamment par l'entreprise Borregaard, en Norvège. Cela fait de la vanilline le phénol mono-aromatique pur le plus disponible actuellement produit à l'échelle industrielle à partir de la lignine. 20 000 tonnes de vanilline environ sont produites par an, dont 15 % à partir de la lignine (environ 3 000 tonnes/an). [22-25]

II.3.2. Lignine Kraft : procédé alcalin

Le principe du procédé Kraft, qui veut dire « solide » en allemand a été breveté en 1884 par le chimiste Dahl. [26] Il consiste à traiter les copeaux de bois à pH élevé, en présence d'une grande quantité d'hydroxyde de sodium aqueux (NaOH) et de sulfure de sodium (Na₂S) à environ 170°C pendant deux heures afin de dégrader la lignine. [27] Les ions hydroxyle et hydrogénosulfure entraînent la rupture des liaisons ester entre lignine et hémicelluloses ainsi que les liaisons alkyle-aryle éther de la lignine. Les liaisons carbone-carbone, plus stables, ont tendance à résister au processus. [28, 29]

C'est aujourd'hui la méthode de production de pâte à papier la plus employée : environ 85 % des lignines techniques produites dans le monde sont des lignines Kraft. Après cuisson, une liqueur noire est obtenue et elle contient environ 40% de lignine, des hémicelluloses, des extractibles du bois et de nombreux composés inorganiques issus du procédé de cuisson.

Le succès du processus Kraft repose sur la recyclabilité des agents inorganiques utilisé pendant la cuisson (Na₂S/NaOH) et, plus récemment, sur la production efficace d'électricité verte par la vapeur issue de la chaudière de récupération Kraft. [30] Dans la chaudière, la liqueur noire obtenue lors de l'étape de cuisson et qui contient la fraction de lignine est incinérée et le Na₂S est régénéré ($Na_2SO_4 + 2C \rightarrow Na_2S + 2CO_2$). Le carbone des lignines est ainsi utilisé comme agent réducteur. De plus, la soude peut être elle aussi régénérée par le four à chaux. En effet, les sels fondus sont dissous dans de l'eau et forment la « liqueur verte », contenant principalement du carbonate de sodium (Na₂CO₃). Cette liqueur est ensuite caustifiée en réagissant avec de la chaux vive (oxyde de calcium, CaO) pour régénérer la soude selon la réaction chimique suivante : $Na_2CO_3 + CaO + H_2O \rightarrow 2NaOH + CaCO_3$.

La chaudière produit de la vapeur à haute pression qui alimente des turbogénérateurs. L'énergie produite par la combustion de la lignine étant excédentaire par rapport au recyclage des réactifs inorganiques, une partie peut être récupérée pour être valorisée.

Afin d'isoler une partie de la lignine de la liqueur noire, une étape de purification est nécessaire. Pour cela, la différence de solubilité de la lignine en fonction du pH est mise à profit. La liqueur noire (pH très basique entre 12 et 14) est acidifiée par ajout de dioxyde de carbone (CO₂), pour

atteindre un pH de 8,5 ce qui permet de protoner les phénolates, provoquant ainsi une diminution de la solubilité de la lignine. Les fonctions acides carboxyliques restent sous forme carboxylates ($pK_a = 4-5$), un acide fort minéral comme l'acide sulfurique (H_2SO_4) ou l'acide chlorhydrique (HCl) peut être utilisé en complément pour faire précipiter la totalité de la lignine. [31]

Lors de la cuisson Kraft, la structure de la lignine est profondément modifiée en raison de conditions réactionnelles dures. Elle subit des réactions de dépolymérisation suivies de réactions de condensation. Les réactions de dégradation conduisent à la libération de fragments de lignine tandis que les réactions de condensation conduisent à la formation de liaisons stables en milieu alcalin. [32]

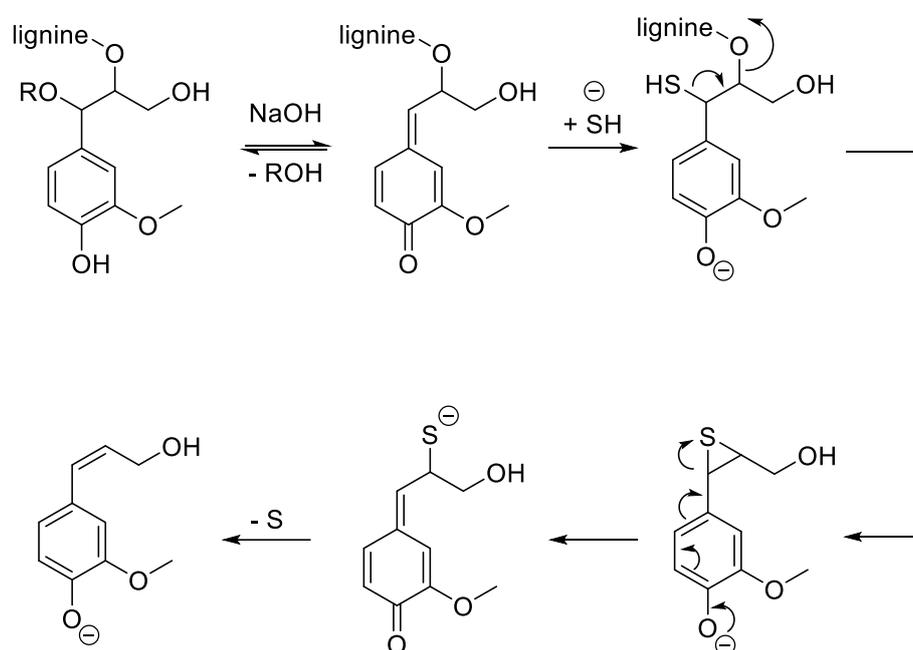


Figure I-9 : Mécanisme de rupture d'une liaison β-O-4 de la lignine native durant le procédé Kraft.

La nature basique du milieu entraîne la déprotonation du phénol, qui se stabilise en éliminant un groupement alkoxy en position α du cycle (intermédiaire méthylène-quinone). La réaction se poursuit par l'ajout de l'ion hydrosulfure qui produit une structure benzylmercaptan. Le thiol attaque ensuite le carbone β pour former un intermédiaire épisulfure et élimine le groupe β-aryloxy comme le résume la Figure I-9. [32] La rupture des liaisons β-O-4 entraîne une forte diminution de la masse molaire de la lignine et une augmentation de la quantité de phénols libres, ce qui rend la lignine Kraft hautement soluble en milieu alcalin.

De plus, lors de cette étape de cuisson, une addition compétitive sur les structures de type quinone par des carbanions peut avoir lieu (Figure I-10).

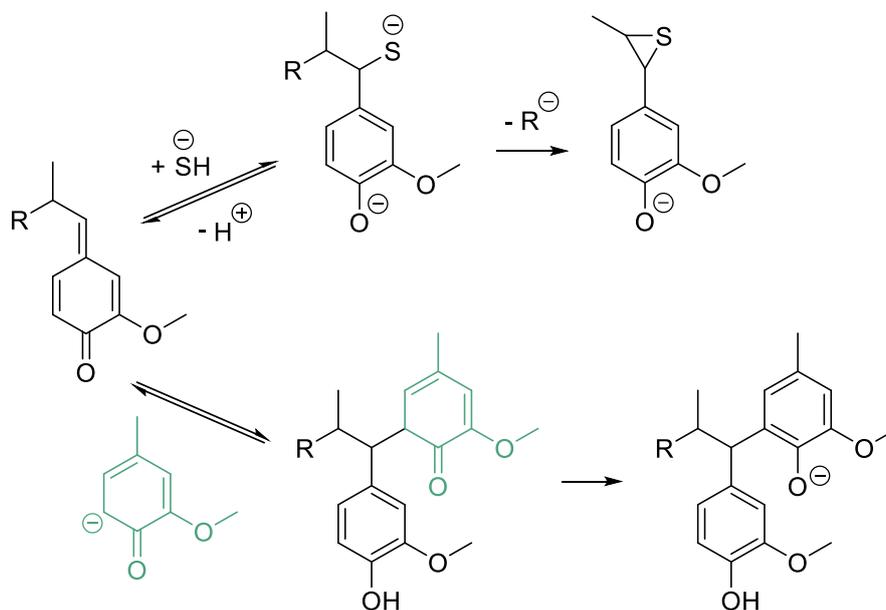


Figure I-10: Addition compétitive de nucléophiles externes et internes à des intermédiaires de type quinone [28]

Elle mène à la formation de nouvelles liaisons, dite condensées, qui sont bien plus robustes que les liaisons aryl-ether. [33]

Finalement, les lignines issues du procédé Kraft sont fortement altérées par rapport aux lignines natives. Elles possèdent généralement une masse molaire assez faible (environ 2 000 à 3 000 g/mol) ; la plupart des liaisons β -O-4 ont été rompues et de nouvelles liaisons dites condensées ont été créées. Une augmentation des liaisons 5-5 entre les sous-unités est observée, ainsi que la formation de nouveaux groupes fonctionnels et de nouvelles liaisons (stilbènes). Le taux de soufre résiduel varie de 1 à 2 %. [27]

À l'échelle industrielle, deux procédés très similaires ont été optimisés pour produire de la lignine ; LignoBoost™ et LignoForce™. L'usine Domtar de Plymouth (États-Unis) et l'usine Stora Enso de Sunila (Finlande) peuvent produire 75 000 tonnes de lignine Kraft par an grâce au procédé LignoBoost™. [34]

Le procédé commercial LignoBoost™ isole la lignine Kraft de la liqueur noire avec une grande pureté par acidification de la liqueur avec du CO₂, puis lavage à l'acide, souvent de l'acide sulfurique dilué, et filtration. Le procédé LignoForce™, diffère du précédent par l'ajout d'une étape d'oxydation à l'oxygène des liqueurs afin d'oxyder les sucres et de diminuer les lavages de la lignine. D'autres lignines Kraft sont commercialisées à grande échelle, dont la Lignine Kraft Indulin qui a été utilisée dans le cadre de notre projet ANR.

II.3.3. Lignine Kraft Indulin AT

Basée sur la précipitation acide, la lignine Kraft Indulin AT est commercialisée depuis les années 1950 par Ingenivity, en Virginie aux États-Unis. Sa grande pureté lui assure d'être totalement exempte d'hémicellulose ou de sucre dégradé, ce qui la rend idéale pour une large gamme d'applications dans le domaine des polymères.

Voici en Tableau I-3 quelques valeurs caractéristiques de cette lignine, fournies par Ingenivity.

Tableau I-3 : Caractéristiques de la lignine Kraft Indulin AT.

Aspect visuel	Poudre marron fluide
Cendres, % (sur base sèche)	3
Densité apparente (kg/L)	En vrac : 0,416 Emballé : 0,513
Point d'éclair (°C)	176
Insolubles, % (NaOH aqueux à 5 % à chaud)	0,05
Teneur en lignine, % (sur base sèche)	97
Tension superficielle, mN/m (1% aqueux)	43

Des analyses moléculaires RMN, IRTF, SEC, etc. de cette matière première ont été réalisées et sont présentées plus loin dans le manuscrit.

II.3.4. Lignines organosolv

Le dernier procédé d'extraction de la lignine présenté dans ce manuscrit est le procédé organosolv qui utilise un solvant organique, tels que des alcools, des cétones et des glycols, comme agent de délignification. [35, 36] Il constitue une alternative prometteuse aux technologies d'extractions existantes. En effet, il fournit de la cellulose et une solution qui, conformément aux désignations traditionnelles, peut être appelée "liqueur" contenant des produits de dégradation de l'hémicellulose et de la lignine dissoute, tous deux exempts de soufre. [37] Parce qu'elle est obtenue par un procédé moins agressif, la lignine organosolv diffère des autres types de lignine fournis par les méthodes chimiques conventionnelles. Structurellement, le processus organosolv permet la préservation d'un grand nombre de liaisons β -O-4 dans la lignine, aboutissant à une structure plus proche de la lignine native. [38] Au lieu d'être hautement phénolique, la lignine organosolv est considérée comme relativement hydrophobe, de faible masse molaire et pure, c'est-à-dire pauvre en cendres, en hydrates de carbone et en soufre. [39, 40]

En outre, les lignines organosolv sont solubles dans les solvants organiques à faible point d'ébullition et leur faible taux de cendres par rapport à d'autres types de lignines industrielles les rend plus facile à brûler. [41]

Cependant, cette technique d'extraction est réservée aux plantes annuelles en raison de leur structure ligneuse moins complexe. Enfin, le coût de récupération des solvants étant très onéreux, il est difficile de la mettre en œuvre à l'échelle industrielle.

II.3.5. Procédés d'extraction : bilan

Le Tableau I-4 regroupe quelques caractéristiques des lignines obtenues à partir de ces différents procédés d'extraction.

Tableau I-4 : Résumé des caractéristiques des différentes méthodes d'extraction de la lignine. [42-47]

Propriétés	Lignines Kraft	Lignosulfonates	Lignines organosolv
Masse molaire (g/mol)	2 000 - 3 000	20 000 – 50 000	500 – 5 000
Dispersité	2 - 4	6 – 8	1,5 – 2,5
Taux de soufre (%)	1 – 1,5	4 – 8	0
Solubilité	Dans l'eau alcaline (pH>10) et certains solvants organiques	Dans l'eau (tout pH)	Dans l'eau alcaline (pH>10) et certains solvants organiques

Il peut être conclu de ce paragraphe sur les procédés d'extraction de la lignine qu'ils représentent eux aussi une **source d'hétérogénéité** dans la structure chimique des lignines. Il est par conséquent critique de mentionner l'origine botanique mais également la nature de la déconstruction de la biomasse pour les lignines industrielles qui seront utilisées.

Enfin, non présentées dans ce manuscrit, il existe des lignines obtenues par explosion à la vapeur, grâce à des solvants eutectiques profonds, des liquides ioniques, ou par hydrolyse enzymatique ou acide. Ces lignines possèdent des propriétés variées, mais ces procédés ne sont pas industriels.

II.4. Méthodes de caractérisation de la lignine

Les avancées et les perfectionnements dans les méthodes de caractérisation moléculaires ont facilité la compréhension et l'analyse des structures complexes des lignines. Des techniques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton, du carbone ou du phosphore, ainsi que les chromatographies d'exclusion stérique (SEC) fournissent des données significatives sur les structures et les motifs de ce biopolymère. De même, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) permet l'identification des fonctions portées par la lignine. Enfin, quelques

méthodes de caractérisation thermique sont employées pour analyser les lignines : l'analyse thermogravimétrique (ATG) et l'analyse enthalpique différentielle (DSC). Ces différentes techniques de caractérisation font l'objet du paragraphe suivant.

II.4.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Initialement, la caractérisation de la lignine était effectuée grâce à la **RMN du proton (^1H)**. Lundquist et ses collaborateurs ont publié de nombreux travaux sur la caractérisation de la lignine par RMN du proton, et ont encouragé l'utilisation de cette technique. [48, 49] Par exemple, le spectre RMN ^1H de la lignine acétylée a longtemps été utilisé pour déterminer la quantité de différents groupes hydroxyle. L'acétylation de la lignine dans un mélange pyridine/anhydride acétique (1/1, v/v) est la méthode communément employée. [50] La lignine acétylée est ainsi soluble dans les solvants organiques tels que le THF ou le CHCl_3 . Une fois acétylés, il est possible de distinguer les protons méthoxyles (3,10 – 4,10 ppm), les protons méthyles des groupements aromatiques acétylés (2,17 – 2,50 ppm), les protons méthyles des groupements aliphatiques acétylés (1,70 – 2,17 ppm) et les protons aromatiques (6,7 – 10 ppm). Une référence interne peut être utilisée pour avoir une quantification des groupements, tel que le *p*-nitrobenzaldéhyde. [51]

Cependant, la nature polymère de la lignine se traduit par une grande diversité de protons appartenant à différentes structures, ce qui est observé lors des analyses. De plus, l'irrégularité des liaisons entre les unités constituant la lignine rend cette technique d'analyse peu aisée et inappropriée.

La **RMN du carbone (^{13}C)** de la lignine présente plusieurs défis à relever. De la même manière que pour la RMN du proton, la diversité et l'hétérogénéité structurelle de la lignine la rend difficilement analysable. Des temps d'acquisition relativement longs (72 h), un grand nombre de scans (minimum entre 8 000-10 000 et parfois jusqu'à 20 000 scans), une acquisition à haute température pour atteindre une solubilité optimale (50-100°C dans le DMSO deutéré) sont nécessaires pour obtenir une résolution des déplacements chimiques suffisante. [52] Cela s'explique par plusieurs raisons [53] :

- La faible abondance de l'isotope ^{13}C (1,1 %, contre 99,98 % pour le ^1H)
- La relaxation lente des spins des carbones de la lignine, qui contient beaucoup de systèmes aromatiques, saturés, et conjugués.
- La solubilité de la lignine dans les solvants d'analyse est souvent imparfaite, et la viscosité de ces derniers peut également diminuer la qualité du signal.

En conséquence, la RMN ^{13}C est une méthode rarement utilisée seule pour tirer des informations structurales sur la lignine, et les spectres ^{13}C sont couplés aux spectres ^1H .

Aujourd'hui, la technique RMN la plus communément employée pour caractériser la lignine est la **RMN 2D HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Correlation). C'est une technique d'analyse RMN bidimensionnelle (RMN 2D) qui corrèle les signaux des protons et des carbones selon un couplage J_1 dans une molécule ou un polymère. C'est l'aimantation du proton qui est prise en compte dans cette analyse, et non celui du carbone qui est beaucoup moins abondant. L'acquisition est donc relativement rapide et la résolution spectrale est fine, offrant ainsi une visualisation détaillée des liaisons entre les atomes de carbone et d'hydrogène dans la structure de la lignine. Les assignations pour les corrélations avec les lignines proviennent de la vaste base de données de composés modèles de lignines construite par Ralph *et al.* [54], ainsi que de données de RMN de lignines isolées et synthétiques. [55–64] Des exemples de différents spectres RMN 2D HSQC de lignines extraites de différents végétaux sont représentés en Figure I-11.

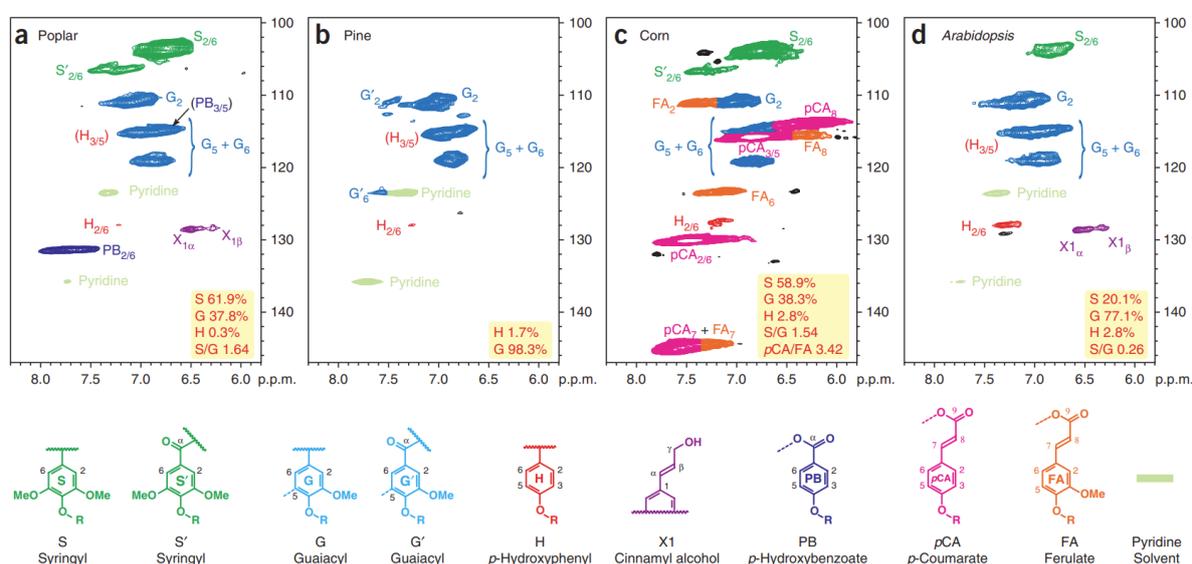


Figure I-11 : Spectres RMN 2D-HSQC montrant la différence de composition selon la source de lignine. [65]

Une limite de cette méthode analytique est son aspect non quantitatif. Plusieurs équipes ont œuvré pour surmonter cet obstacle, en développant des méthodes jouant sur le paramètre T2 des séquences RMN. Récemment, une méthode de RMN 2D quantitative a été mise au point par l'équipe de Luterbacher. [66] L'équipe de Crestini a également mis au point une « Quick Quantitative HSQC : QQ-HSQC » pour quantifier les liaisons inter-unités de la lignine. [67] Ce sont néanmoins des séquences non triviales qui ne sont pas utilisées au premier abord pour étudier la structure de la lignine.

Une méthode incontournable pour caractériser la lignine est la **RMN du phosphore**. Dans les années 1990, Argyropoulos *et al.* ont publié une série d'articles sous le titre général « ^{31}P NMR in Wood Chemistry », axés sur la détermination des groupes hydroxyle dans les composés modèles de la lignine et les lignines dérivées de divers processus d'extraction. [68–72]

Cette méthode consiste à phosphoryler les hydroxyles portant des protons labiles de la lignine avec un agent phosphoré dans une solution de pyridine/ CDCl_3 anhydre (Figure I-12). Depuis l'introduction du 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane (TMDP) en 1995, ce réactif a connu une large application et il est aujourd'hui le réactif de phosphorylation le plus couramment utilisé pour cette analyse. [73]

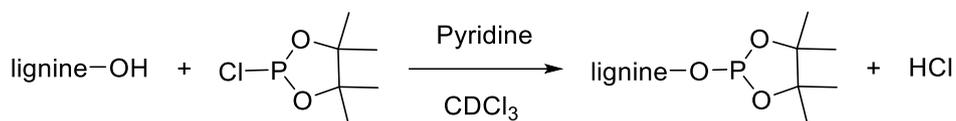


Figure I-12 : Fonctionnalisation de la lignine par le TMDP pour l'analyse de la RMN du ^{31}P

Selon la nature du groupement hydroxyle (aliphatique, unité syringyle, unité guaïacyle et unité p-hydroxyphényle) ou acide carboxylique le déplacement chimique sera différent sur le spectre RMN ^{31}P du produit phosphorylé (Figure I-13). L'ajout d'un agent de relaxation (acétylacétonate de chrome III) est souvent nécessaire et celui d'une référence interne (endo-N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide, NHND) permet de quantifier les différentes fonctions par intégration du signal correspondant. Historiquement, l'acide benzoïque [74], le bisphénol [75] et le cholestérol [76] ont tous été utilisés comme étalons internes. Cependant, ces étalons internes chevauchaient les signaux propres à la lignine dérivatisée, entraînant une résolution incomplète de la ligne de base et conduisant par la suite à une sous-estimation des valeurs des groupes hydroxyle de la lignine. Au début des années 2000, Ragauskas *et al.* ont introduit le NHND comme un étalon interne alternatif prometteur en raison de sa capacité à être complètement résolu par rapport aux résonances dérivées de la lignine. [77]

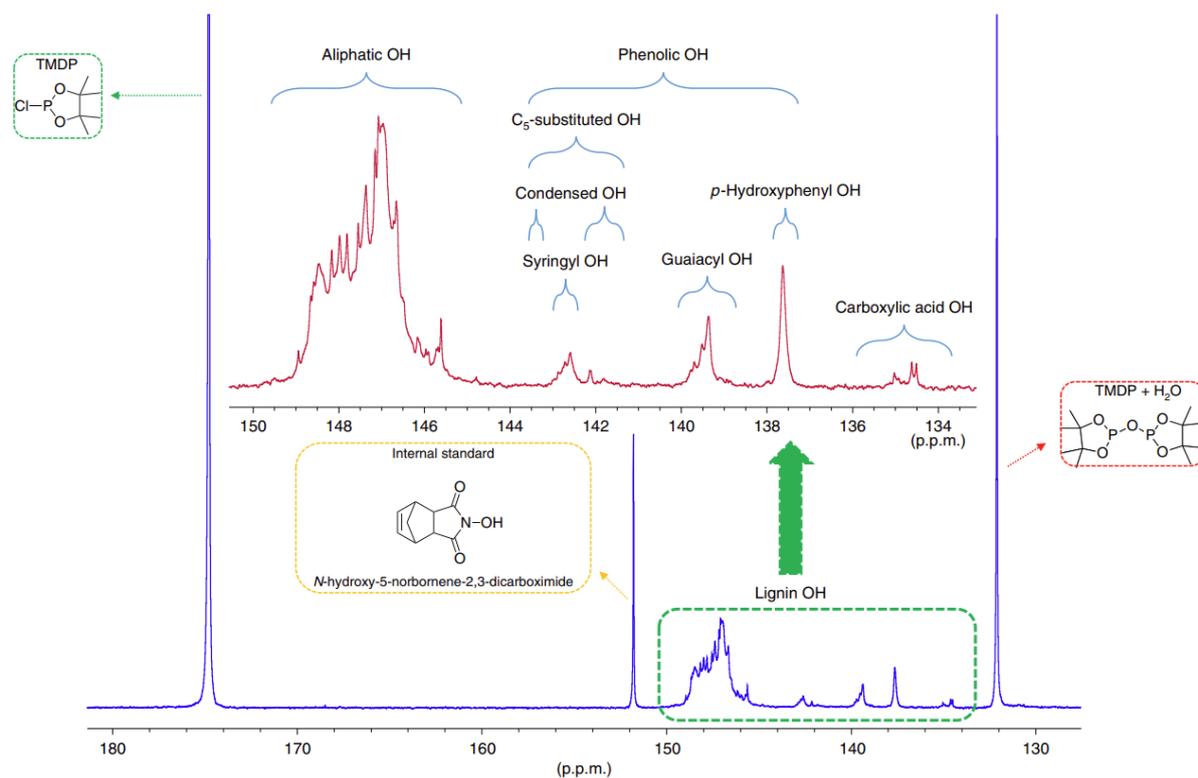


Figure I-13 : Spectre RMN ^{31}P quantitatif d'une lignine de peuplier feuillu dérivatisée avec du TMDP, en utilisant le NHND comme référence interne. [78]

II.4.2. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (Size Exclusion Chromatography en anglais, SEC), est une méthode de chromatographie liquide qui permet de fractionner les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Cette technique est couramment employée dans l'étude des polymères. La lignine est généralement solubilisée dans une solution aqueuse de NaOH à pH 12, ou dans du DMF en présence de LiCl ou bien dans le THF lorsqu'elle est acétylée.

La masse molaire relative est déterminée en utilisant des étalons de masse molaire connue. Pour la SEC aqueuse à pH 12, le polystyrène sulfoné (PSS) est employé comme étalon pour la calibration. On peut noter que la structure du PSS est éloignée des structures complexes des lignines, ce qui introduit une grande incertitude quant aux valeurs numériques obtenues grâce à cette méthode. Certaines études montrent à quel point les masses molaires et la dispersité obtenues dépendent des choix expérimentaux : nature de la phase mobile ou nature de la phase stationnaire (plus ou moins polaire, tailles des pores des colonnes). En effet, des interactions secondaires liées aux charges des chaînes moléculaires peuvent induire une séparation parasite, ou modifier le volume hydrodynamique effectif du polyélectrolyte. [79]

La SEC reste une méthode d'analyse de choix de la lignine qui permet de comparer l'évolution des masses molaires en nombre (M_n) ou en masse (M_w).

II.4.3. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

La technique d'analyse IRTF a l'avantage de ne pas nécessiter la solubilisation du substrat à analyser. Cette méthode repose sur la mesure de l'absorption de la lumière infrarouge par un échantillon, permettant d'obtenir un spectre qui révèle les vibrations moléculaires spécifiques et fournit des informations sur la composition et la structure du matériau analysé. Concernant la lignine, de nombreuses bandes d'absorption ont été référencées et cataloguées, correspondant à ses fonctions caractéristiques (Tableau I-5). [80] Cette technique est rapide à mettre en place et non destructrice. Elle donne des informations globales sur les fonctions présentes dans la structure du polymère.

Tableau I-5 : Signaux IRTF caractéristiques de la lignine

Bande d'absorption (cm ⁻¹)	Groupe fonctionnel
3450 – 3400	Élongation des liaisons alcools O-H
2940 – 2820	Élongation des liaisons C-H (méthoxyles et chaines latérales)
1715 – 1710	Élongation des liaisons C-O non conjuguées
1675 – 1660	Élongation des liaisons C=O conjuguées
1605 – 1600	Élongation des C=C du noyau aromatique
1470 – 1460	Déformations asymétriques des liaisons C-H
1430 – 1425	Vibrations du squelette aromatique
1370 – 1365	Déformation symétrique des liaisons C-H
1330 – 1325	Déformation plane des liaisons C-H (unités syringyles)
1275 – 1270	Déformation plane des liaisons C-H (unités guaïacyles)
1090 – 830	Déformation des liaisons C-H et C-O hors-plan du noyau aromatique

Un autre type d'analyse qui permet d'élucider la structure de la lignine sont les analyses thermiques. Elles permettent de déterminer la stabilité thermique des lignines, et d'avoir accès à des données caractéristiques telles que la valeur de la température de transition vitreuse (Tg) ou d'enthalpie de fusion ou de cristallisation, et sont l'objet des sous paragraphes suivants.

II.4.4. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'Analyse thermogravimétrique (ATG) permet de mettre en évidence la stabilité thermique des lignines, plus précisément leur perte de masse liée à leur dégradation thermique. Il est décrit dans la littérature trois principales étapes de perte de masse pour les lignines :

- le séchage (20-150°C) avec évaporation de l'eau libre et de l'eau liée.

- la pyrolyse (200-600°C) avec, dans un premier temps, la rupture des liaisons C-C et C-O des chaînes latérales [81], suivie de la rupture des liaisons éther et des liaisons condensées inter-unités. [82]
- enfin la carbonisation (600-900°C) conduisant à la formation de résidu amorphe de carbone appelé « char » ou « charcoal ».

II.4.5. Analyse enthalpique différentielle (DSC)

L'analyse enthalpique différentielle (Differential Scanning Calorimetry en anglais, DSC) permet de déterminer la température de transition vitreuse (Tg) et l'enthalpie de fusion ou de cristallisation des lignines due à des changements d'état.

La Tg des échantillons de lignine est souvent difficile à déterminer en raison de la grande hétérogénéité de la structure de la lignine, de la source de la lignine, du processus de fabrication et de la masse molaire. [83] Pour les lignines Kraft, cette température de transition vitreuse est généralement comprise entre 120-175°C. [84]

Le Tableau I-6 récapitule les différentes analyses présentées qui permettent d'obtenir des informations sur la structure des lignines.

Tableau I-6 : Bilan des caractérisations pour élucider la structure de la lignine.

		RMN HSQC	RMN ³¹ P	SEC	IRTF	ATG	DSC
Caractérisation structurale	Fonctions sous-unités	✓			✓		
	Liaisons inter-unité	✓					
	Masse molaire			✓			
	Oxydation du C _α	✓	✓		✓		
	OH phénoliques		✓				
	Estimation résidus					✓	
	Tg						✓
Échantillon	État	Dissous	Dissous	Dissous	Solide	Solide	Solide
	Quantité	20-100 mg	30 mg	2-10 mg	< 5 mg	10 mg	10 mg
	Préparation	Dissolution	Dérivatisation	Dissolution	/	/	/

III. Modèles de lignine

Comme développé précédemment, la lignine, ou plutôt les lignines, sont des entités très complexes de par leur structure, leur caractérisation et leur solubilité. Une méthode a été conçue pour extraire des informations sur ce polymère et ses voies potentielles de valorisation, notamment la dépolymérisation : la synthèse de modèles. Ces modèles de plus petites masses molaires possèdent une ou plusieurs fonctions ou liaisons caractéristiques de la lignine et peuvent être de tailles diverses : composés mono-aromatiques, modèles à liaison di-aromatique, oligomères ou même polymères.

III.1. Petites molécules

Les modèles de lignine les plus simples sont les composés phénoliques. Ils peuvent porter zéro, une ou deux fonctions méthoxy en *ortho* du phénol, et divers substituants en *para*.

Ces monomères phénoliques peuvent être soumis à des réactions modèles, notamment avec des enzymes. Il est ainsi possible d'observer l'influence de leur structure sur leur réactivité potentielle. Cela permet de mettre en évidence la dimérisation 5-5' par la laccase de certains composés phénoliques. Dr. Audrey Llevot a consacré une partie de son travail de thèse à comprendre et valoriser le couplage oxydatif de composés phénoliques grâce à la laccase. [85] En Figure I-14 est illustré l'exemple de la dimérisation de la vanilline par voie enzymatique.

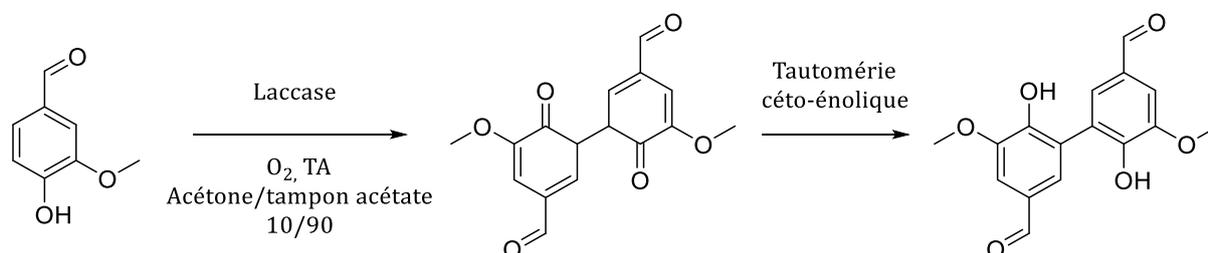


Figure I-14 : Dimérisation de la vanilline catalysée par la laccase, dans un mélange d'acétone et de tampon acétate (10/90), sous oxygène, à température ambiante.

Les résultats concernant l'influence des substituants sur la dimérisation seront présentés plus en détail dans le premier chapitre expérimental : (II.I) Cet exemple montre l'utilité de l'étude des petits composés phénoliques, bien qu'ils soient très éloignés de la structure riche et complexe de la lignine.

La communauté scientifique a développé d'autres modèles dimères qui modélisent mieux les liaisons typiques présentes dans la lignine. C'est l'objet du paragraphe suivant.

III.1.1. Dimères modélisant la liaison β -O-4

Comme le motif de liaison β -O-4 est le motif de liaison le plus abondant dans la lignine native, la majorité des modèles qui ont été développés contiennent ce type de liaison. Leur voie principale de synthèse met en jeu comme intermédiaire les halocétone (Figure I-15).

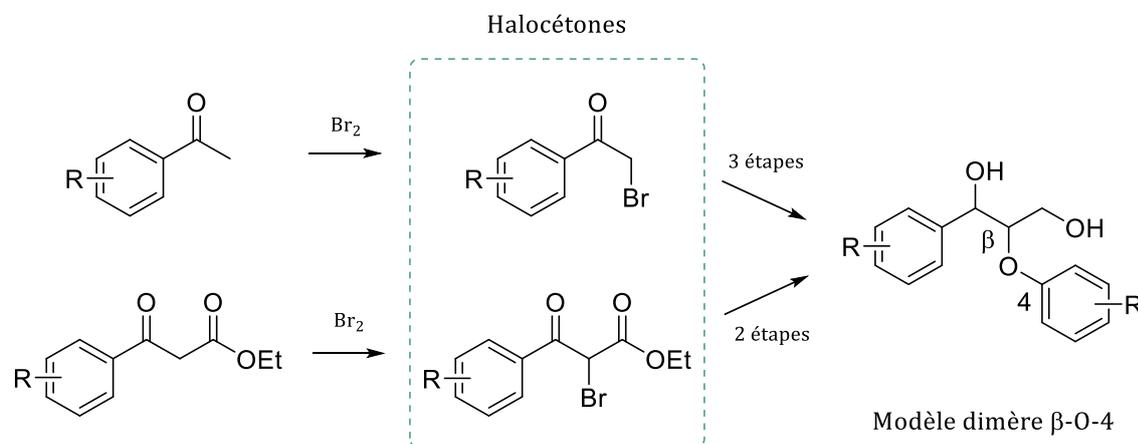


Figure I-15 : Stratégies connues pour la synthèse de modèles de lignine *via* les halocétone. [86].

D'autres voies de synthèse ont récemment été rapportées, notamment par Dias *et al.* [86] Ces stratégies alternatives permettent de limiter l'emploi de composés dangereux tel que le dibrome (Br_2) qui est toxique, corrosif et irritant pour les voies respiratoires, les yeux et la peau. La voie mise en place se base sur la réaction d'insertion dans les liaisons X-H polaires médiée par les diazocétone ou diazocarbonyles, permettant ainsi de fonctionnaliser des α -cétone avec une diversité d'hétéroatomes. La réaction d'insertion O-H a été décrite avec une large gamme d'alcool, bien que peu d'exemples soient dédiés aux nucléophiles faibles comme les phénols. [87–89] Cette méthode présente des temps de réaction plus courts, des rendements élevés, ainsi que des conditions douces et écologiques (Figure I-16).

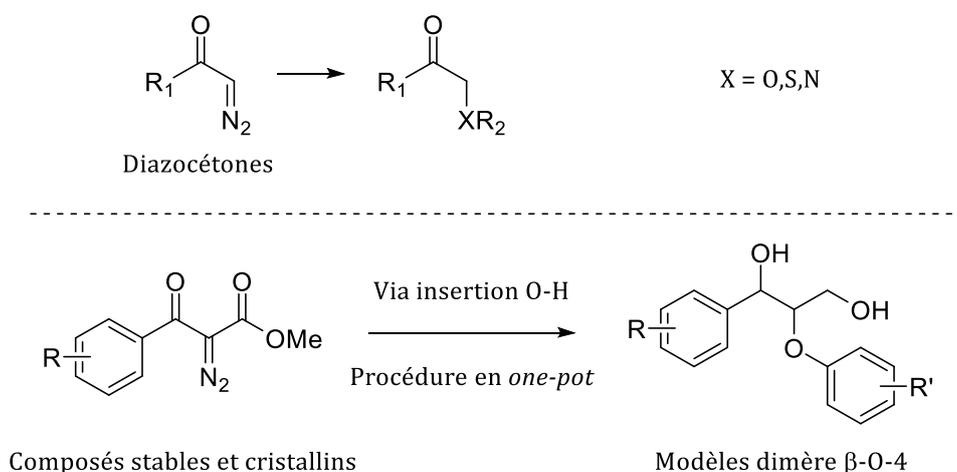


Figure I-16 : Stratégie alternative pour la synthèse de modèles de lignine *via* insertion O-H. [86]

Il est important de noter que la liaison β -O-4 est présente dans la lignine native mais quasiment plus dans la lignine Kraft, une fois qu'elle a été extraite (II.3.1). Les simples dimères β -O-4 ne reflètent pas suffisamment la complexité étendue de la structure de la lignine, c'est-à-dire, les chaînes latérales aliphatiques et les liaisons C-C robustes. Par conséquent, l'étude d'autres composés modélisant les liaisons intermotifs et surtout les liaisons C-C est un défi nécessaire à relever.

III.1.2. Composés modélisant d'autres liaisons

Les liaisons β -5 et β - β sont deux exemples de telles structures importantes. Ces liaisons impliquent une connexion entre une position β et une position 5 ou β respectivement d'un autre motif aromatique, créant une structure plus résistante aux traitements chimiques en raison de la stabilité des cycles aromatiques. Synthétiser des modèles de lignine incluant ces types de liaisons permet de reproduire plus fidèlement la complexité et la diversité structurale de la lignine native. Ces modèles peuvent être utilisés pour des études mécanistiques détaillées, aidant à élucider les voies de dépolymérisation et à identifier des catalyseurs ou des conditions réactionnelles optimales pour la conversion de la lignine en produits chimiques de valeur. En outre, ces modèles peuvent aider à comprendre les différences de réactivité entre les lignines natives et les lignines techniques, facilitant ainsi le développement de processus de valorisation plus efficaces et durables.

Lahive *et al.* ont synthétisé des modèles dimères comportant deux fonctions caractéristiques de la lignine : β -O-4 et β -5. [90] Des exemples de ce type de dimères sont représentés en Figure I-17.

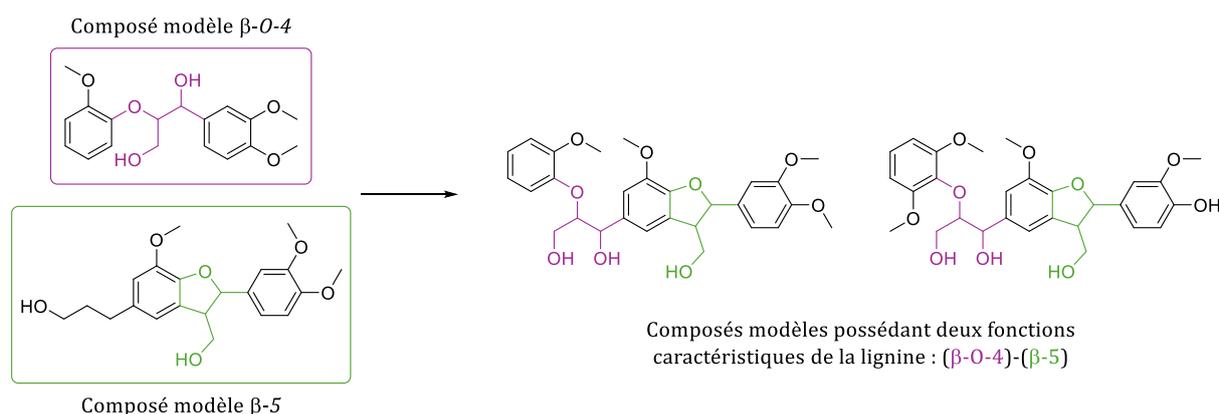


Figure I-17 : Synthèse de composés dimères modélisant les liaisons β -O-4 et β -5. [90]

Une méthodologie a également été développée par Flourat *et al.* pour accéder à des modèles avancés de lignine : des trimères possédant une liaison β -5 robuste et une liaison β -O-4 qui peut être clivée *via* une voie chimio-enzymatique. Les étapes clés sont (1) le couplage C-C par oxydation médiée par la laccase, (2) le couplage C-O par une simple S_N2 entre un phénolate et un bromocétate, et (3) une hydrogénation catalysée par le palladium. Le dihydroxytrimère (β -5)-

(β -O-4) a été obtenu avec un rendement global de 9 %, sur neuf étapes à partir de l'acide férulique. [91]

Les petits modèles dimères présentent plusieurs limites en tant que modèles de lignine, notamment le fait qu'ils ne représentent pas vraiment la structure tridimensionnelle chimiquement diversifiée de la lignine.

III.2. Modèles oligomères

Forsythe *et al.* présentent une méthode de synthèse pour la préparation de modèles de lignine hexamères et octamères, à l'échelle de plusieurs grammes. Ces modèles contiennent trois des motifs inter-unité les plus courants trouvés dans la lignine native, à savoir β -O-4, 5-5 et β -5. Ils ont été utilisés pour approfondir la compréhension mécanistique des processus de dépolymérisation de la lignine. [92]

Un exemple est développé ici, il repose sur la synthèse de l'intermédiaire dibromé appelé « composé 1 ».

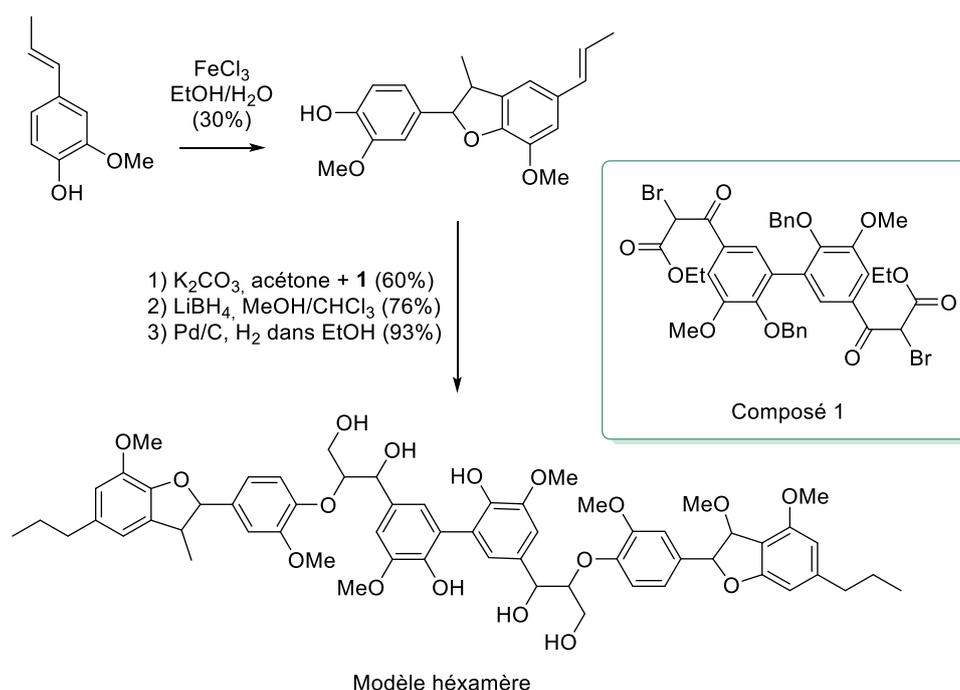


Figure I-18 : Synthèse de l'hexamère via l'isoeugénol et l'intermédiaire dibromé.

L'isoeugénol a été traité avec du chlorure de fer dans de l'éthanol aqueux, ce qui a permis de former un dimère. Ce dimère a ensuite été transformé en trois étapes optimisées par l'équipe de Forsythe en un modèle hexamère, comprenant les liaisons typiques β -5 et β -O-4.

Il existe d'autres exemples, tel qu'un modèle octamère comprenant les liaisons β -5 et β -O-4, ainsi qu'un autre modèle octamère intégrant également une liaison β - β supplémentaire. [93]

III.3. Modèles polymères

III.3.1. Polymères de Kishimoto : modèles de la liaison β -O-4

Kishimoto *et al.* ont publié plusieurs articles concernant la synthèse de polymères modélisant la liaison β -O-4. Ils ont synthétisé et caractérisé des homopolymères modélisant la liaison β -O-4, avec une unité répétitive S, G ou H. Des copolymères G/H ont également été synthétisés. La modélisation de la liaison β -O-4 est variable en termes de complexité. Par exemple, la Figure I-19 présente un motif sans hydroxyle primaire en position β [94], tandis que la Figure I-20 montre des modèles plus complets. [95, 96]

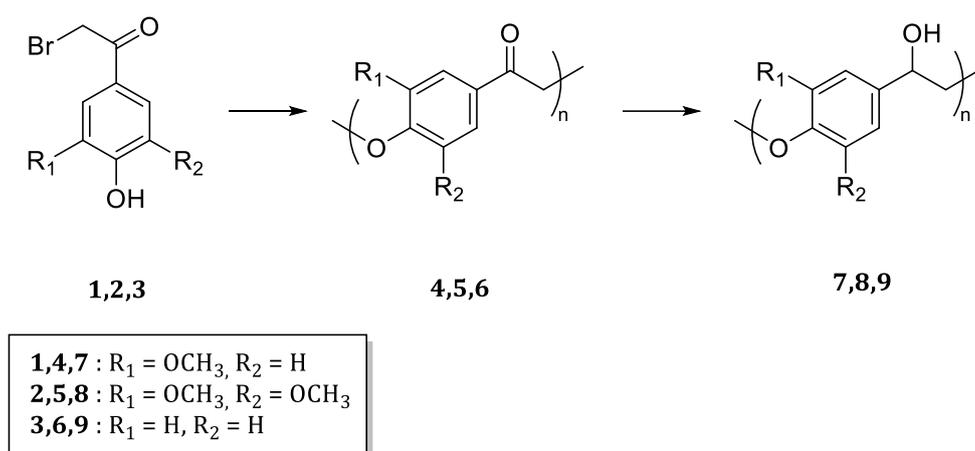


Figure I-19 : Synthèse des polymères 7-9 à partir des monomères 1-3. [94].

Concernant le chemin réactionnel de la Figure I-19, des dérivés de l'acétophénone ont été bromés, polymérisés en présence de K_2CO_3 et réduits avec NaBH_4 pour obtenir les polymères linéaires. Le degré moyen de polymérisation (DP) des polymères acétylés a été déterminé par chromatographie d'exclusion stérique. Le DP des polymères de type G variait de 15 à 21, tandis que la valeur pour le type S était de 11 et pour le type H de 17. Le polymère de type guaiacyle était très soluble dans les solvants usuels de la lignine tels que le mélange 1,4-dioxane-eau (96 : 4, v/v) et le DMSO, mais seulement légèrement soluble dans le mélange acétone-eau (9 : 1, v/v).

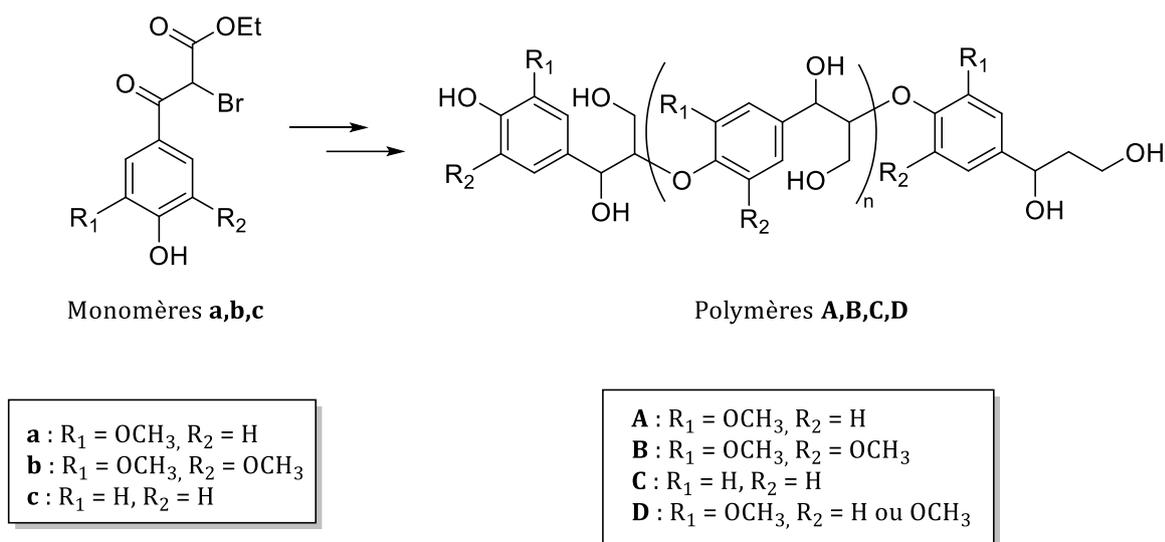


Figure I-20 : Synthèse de polymères modélisant la liaison β -O-4. D'après [95, 96].

La procédure pour synthétiser les modèles plus complexes représentés en Figure I-20 comprend deux étapes clés : 1) polycondensation d'un monomère bromé par réaction de Williamson aromatique ; et 2) réduction de la fonction carbonyle du polymère formé. Les analyses de spectroscopie RMN ^1H , ^{13}C et HSQC des polymères sous leur forme acétylée et non acétylée sont en accord avec les sous-structures β -O-4 de la lignine de bois broyé isolée du bois de sapin japonais. Le degré moyen de polymérisation (DP) varie de 20 à 31, ce qui est comparable au DP de la lignine artificielle synthétisée enzymatiquement (polymère de déshydrogénation, DeHydrogenative Polymers en anglais, DHP) et de certaines lignines isolées.

En complément aux modèles polymères de Kishimoto des liaisons β -O-4, les déshydropolymères (DHP) offrent une perspective supplémentaire en tant qu'homolignines synthétisées *in vitro* avec des enzymes, permettant une analyse plus approfondie des mécanismes de polymérisation de la lignine.

III.3.2. Déshydropolymères -DHPs

III.3.2.a. Généralités

Les lignines de synthèse, ou déshydropolymères (DeHydrogenative Polymers soit DHPs en anglais) sont étudiées depuis des décennies comme modèles oligomères ou polymères de la lignine. Cette étude a été initiée par l'équipe de Freudenberg dans les années 1950. [97] Ce sont de bons outils pour élucider les processus de couplage radicalaire et les paramètres qui gouvernent la fréquence des liaisons inter-unités dans la lignine. En imitant le processus de polymérisation naturelle des précurseurs de la lignine, les DHPs permettent d'explorer comment différentes conditions affectent la structure de la lignine. Ils aident à comprendre la formation et l'agencement des

liaisons caractéristiques de la lignine, telles que les liaisons β -O-4, β -5 et β - β , offrant une image plus claire de l'architecture tridimensionnelle de la lignine.

III.3.2.b. Synthèse des DHPs

Les DHPs sont synthétisés par déshydropolymérisation des précurseurs de la lignine, généralement l'alcool coniférylique, l'alcool synapylique et l'alcool p-coumarylique. Ces précurseurs subissent un couplage oxydatif en présence d'agents oxydants tels que la peroxydase/H₂O₂ ou la laccase/O₂. En utilisant cette approche biomimétique, cette réaction *in vitro* conduit par polymérisation représentée en Figure I-21, à des polymères DHPs dont la structure modélise une « homolignine ».

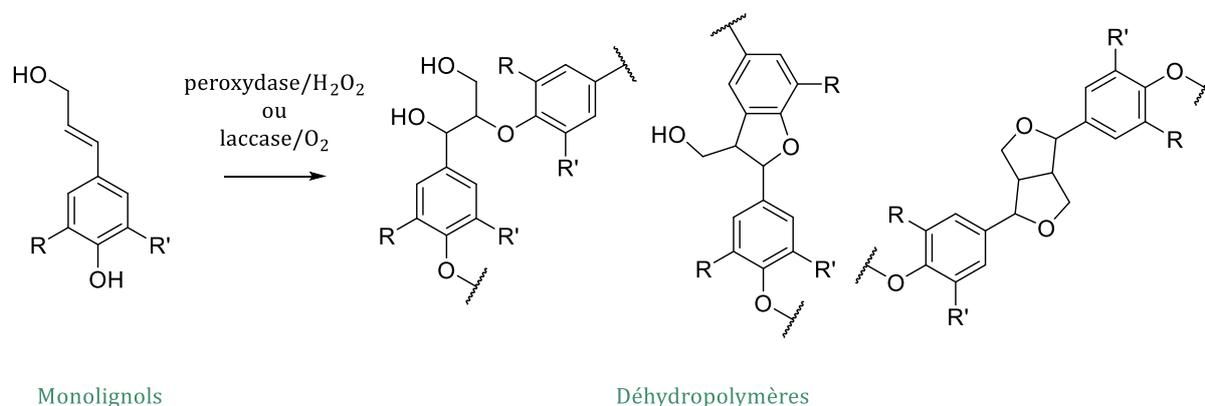


Figure I-21 : Synthèse des déhydropolymères (DHPs)

III.3.2.c. Choix des enzymes

Les premières synthèses de DHP effectuées dans les années 50 par Freudenberg *et al.* ont été effectuées avec des laccases.

Okusa *et al.* ont montré qu'une laccase extraite de l'arbre à laque (*Rhus vernicifera Stokes*) permet d'oxyder l'alcool coniférylique en solution aqueuse en présence d'oxygène à un pH 7,0. La vitesse d'oxydation est très lente (avec une activité enzymatique de 750 unités/mmol de substrat, un temps de réaction de 144 heures est nécessaire pour consommer 2,8 mmol de substrat à la concentration initiale d'environ 0,14 M.). Les auteurs ont réussi à isoler environ 21 mol% de pinorésinol, 26 mol% d'alcool dihydrodiconiférylique et une petite quantité d'éther guaiacylglycerol- β -coniférylique, tous des dimères, mais pas de DHP. [98]

Comparé à la laccase de *Rhus*, les laccases fongiques de *Coriolus versicolor* et de *Pycnoporus coccineus* oxydent plus rapidement l'alcool coniférylique dans les mêmes conditions de réaction et produisent des DHPs avec un rendement allant jusqu'à 98 %.

Les peroxydases oxydent le substrat et produisent des DHPs encore plus rapidement que les laccases fongiques en solution aqueuse en présence de peroxyde d'hydrogène.

Ainsi, au sein d'une même famille d'enzyme, les laccases extraites de différents organismes peuvent différer des laccases fongiques concernant la vitesse d'oxydation et les mécanismes de réaction car l'une permet d'obtenir un DHP et pas l'autre. Ceci est probablement dû à des différences de masses molaires de ces glycoprotéines, ainsi que dans le mode de liaison du ligand des sites de cuivre de type 2 et de type 3.

III.3.2.d. Synthèse

Sarkanen a montré en 1971 que la structure des DHPs est affectée par la méthode et la vitesse d'addition des précurseurs au milieu réactionnel contenant la peroxydase/H₂O₂ ou la laccase/O₂. [99] Deux types d'ajout des réactifs sont envisageables, conduisant à des polymères de structure et propriétés différentes.

- Méthode Zutropf (progressive) : Dans cette méthode, les précurseurs de la lignine sont ajoutés lentement et continuellement à une solution contenant l'agent oxydant. L'ajout progressif permet une polymérisation contrôlée, conduisant à la formation progressive du polymère. Les faibles concentrations en monomère favorisent un couplage croisé entre un radical d'alcool coniférylique et un radical phénoxy généré sur la chaîne polymère en croissance, soit une polymérisation en bout de chaîne selon Sarkanen. Une plus grande proportion de liaisons β -O-4 est observée et un polymère relativement linéaire qui se rapproche davantage de la structure de la lignine native est formé. [100]
- Méthode Zulauf (en masse) : Ici, les précurseurs de la lignine sont ajoutés en une seule fois à la solution oxydante. Cette approche conduit à la formation d'un polymère « bulk » lié à une « prise en masse » des monomères. La concentration élevée en monomères dans le milieu réactionnel favorise la dimérisation. Le polymère « bulk » obtenu est enrichi en β - β et β -5 et contient une faible proportion de liaisons β -O-4.

Ces méthodes synthétiques montrent comment la variation du taux de monomères, de taux de génération de radicaux et de la présence d'autres substances comme les polysaccharides peuvent influencer la structure du polymère résultant.

De nombreuses raisons justifient l'utilisation de DHP plutôt que de lignines naturelles isolées pour l'étude de la lignine. Un DHP est exempt de composants étrangers au bois, tels que les sucres, les tanins et les protéines. Un autre avantage important des DHP est qu'il est relativement simple de les marquer isotopiquement dans des positions spécifiques en utilisant des alcools p-hydroxycinnamiques marqués. [101]

III.3.2.e. Amélioration des modèles DHP

Diverses conditions réactionnelles peuvent être ajustées pour mieux imiter celles de la paroi cellulaire. Cela permet de produire des polymères dont la structure se rapproche de celle des lignines natives. Ces ajustements incluent l'ajout de médiateurs ou la modification du pH, entre autres. [102]

Une première considération importante est la sélection du solvant organique. Travailler avec des enzymes comme la laccase nécessite de maintenir un pH contrôlé, entre 4 et 6 ce qui implique l'utilisation de solvants aqueux pour assurer l'activité optimale de l'enzyme. Ainsi, les solvants organiques utilisés pour la synthèse du modèle de lignine doivent être miscibles dans le tampon et ne pas dénaturer les enzymes. À dispersité égale, la masse molaire d'un DHP est environ la moitié de celui d'une lignine naturelle. Cela s'explique par le fait que les DHPs précipitent dans le solvant pendant la polymérisation, ce qui empêche la poursuite du couplage radicalaire. Hwang *et al.* ont étudié l'effet du co-solvant organique sur la structure du DHP obtenu et montré que le nombre de liaisons β -O-4 était proportionnel à l'ajout de solvant organique (alcool isopropylique, dioxane, acétonitrile entre 0 et 40%). De plus, il a été observé une corrélation positive entre la proportion de solvant organique et la masse molaire du DHP : à mesure que la quantité de solvant organique augmente, la masse molaire en nombre mesurée par chromatographie d'exclusion stérique augmente également. [103]

Enfin, il est possible de former des complexes DHP-paroi cellulaire (DHP-CW pour Cell Wall) *in situ* à l'aide de peroxydases. Whitmore *et al.* ont utilisé pour la première fois cette approche pour étudier les interactions lignine-protéine et lignine-glucide dans les parois cellulaires. [104] Les analyses par spectroscopie IR et UV a suggéré que les complexes DHP-CW étaient structurellement similaires aux parois lignifiées des plantules de *P. elliotii*.

Il existe ainsi de nombreux composés qui peuvent modéliser la lignine. Ils peuvent être de complexité diverse, allant du monomère au polymère en passant par une large gamme d'unité répétitives. Ces modèles peuvent posséder une ou plusieurs liaisons caractéristiques de la lignine, bien que la liaison β -O-4 soit la plus vastement rapportée dans la littérature.

IV. Valorisation de la lignine

La valorisation de la lignine présente un potentiel considérable en chimie des polymères. Cette partie explore deux axes principaux de valorisation : l'utilisation directe de la lignine comme polymère et les diverses méthodes de dépolymérisation pour obtenir des synthons à valeur ajoutée. Ces approches offrent des perspectives innovantes pour l'exploitation de ce biomatériau polyvalent. De nombreuses études et brevets ont proposé des valorisations diverses mettant à profit la bonne résistance thermique de la lignine et ses propriétés uniques dues en particulier à la présence de groupes phénoliques. [105] Seules les valorisations les plus abouties seront présentées dans le paragraphe suivant.

IV.1. La lignine en tant que polymère : additifs et agents dispersants

Il est possible de tirer profit de la lignine en tant **qu'agent de dispersion** dans le béton ou le ciment, ce qui permet d'augmenter la fluidité du matériau. Le ciment devient plus dense et plus résistant grâce aux effets plastifiants et réducteurs d'eau des lignosulfonates (jusqu'à 15%). [106, 15]

Une autre alternative est d'associer la lignine à un polymère comme **charge ou additif** pour améliorer les propriétés du matériau, par exemple lui conférer une stabilité aux UV, un renfort mécanique ou thermique, faire diminuer sa toxicité ou encore augmenter sa biodégradabilité. [107] La lignine peut remplacer les phénols et être employée comme polymère phénolique et former ainsi un réseau avec du formaldéhyde dans l'industrie des panneaux de bois. [108, 109] Afin de maximiser l'incorporation de la lignine dans un mélange polymère, il peut être nécessaire de la modifier structurellement pour la rendre plus soluble dans les solvants organiques usuels et plus compatible avec le polymère du mélange. La modification la plus usuellement utilisée dans la littérature est l'introduction de fonctions alcool, grâce à une éthérification ou une estérification. Cela permet notamment d'améliorer le mélange entre la lignine modifiée et du polyéthylène. [110, 111] Il a également été montré que des couplages entre la lignine et du polyéthylène glycol (PEG) permettent d'augmenter la solubilité dans le méthanol ou le dichlorométhane. [112-114]

De plus, la lignine a été identifiée comme un **adsorbant potentiel pour les métaux lourds** en raison de sa structure tridimensionnelle amorphe et de ses groupes fonctionnels tels que les groupes phénoliques, hydroxyles et carboxyles. [115-121] Diverses études ont montré que les adsorbants à base de lignine présentent une capacité d'adsorption élevée pour les métaux lourds tels que le cuivre, le plomb et le nickel. [117, 118, 121-123] La modification de la lignine, telle que la carboxyméthylation et l'ajout de groupes fonctionnels comme les groupes amino et sulfoniques, a permis d'améliorer significativement sa capacité d'adsorption pour les métaux lourds. Des

matériaux composites (lignine/polyaniline) et la réticulation de la lignine ont également été explorés pour augmenter ses performances d'adsorption. [116]

IV.2. Dépolymérisation de la lignine

Au même titre que la cellulose peut être dépolymérisée pour disposer de glucose, matière première critique pour les bioconversions, la lignine peut être dépolymérisée pour obtenir des molécules aromatiques et ceci par différents procédés. Ces derniers sont classés selon trois catégories : la dépolymérisation thermochimique (pyrolyse et gazéification), la dépolymérisation réductrice et la dépolymérisation oxydante. [124] Elles sont introduites dans les paragraphes suivants.

IV.2.1. Voies de dépolymérisation thermiques

La dépolymérisation thermique de la lignine peut être réalisée par des procédés tels que la pyrolyse ou le traitement hydrothermal. Ces traitements thermiques permettent d'obtenir des huiles combustibles, des vapeurs valorisables et des composés phénoliques. Le processus de dépolymérisation implique la rupture des liaisons β -O-4 et la déméthylation de la lignine, conduisant à la formation de produits phénoliques d'intérêt. Des paramètres tels que la température et le temps de résidence influencent le processus de dépolymérisation, les conditions optimales menant à des rendements plus élevés en huiles et en composés phénoliques monomères. [125–134]

IV.2.2. Voies de dépolymérisation réductrices

La valorisation des lignines par voie réductrice permet d'obtenir des composés phénoliques et benzéniques avec des rendements allant jusqu'à 70% grâce à une pyrolyse en milieu réducteur. [135] L'hydrogène est utilisé en tant qu'agent de réduction en présence d'un catalyseur métallique, sous des hautes pressions (entre 5 et 25 bars) et à hautes températures (entre 250 et 450°C). [136–139] Les catalyseurs les plus amplement employés pour la dépolymérisation réductrice de la lignine sont des métaux nobles : platine, ruthénium, rhodium ou palladium, qui peuvent être supportés sur charbon actif. [135] Cette voie de valorisation de la lignine par dépolymérisation réductrice est notamment étudiée pour la production de benzène, toluène et xylène : plateforme BTX (Figure I-22).

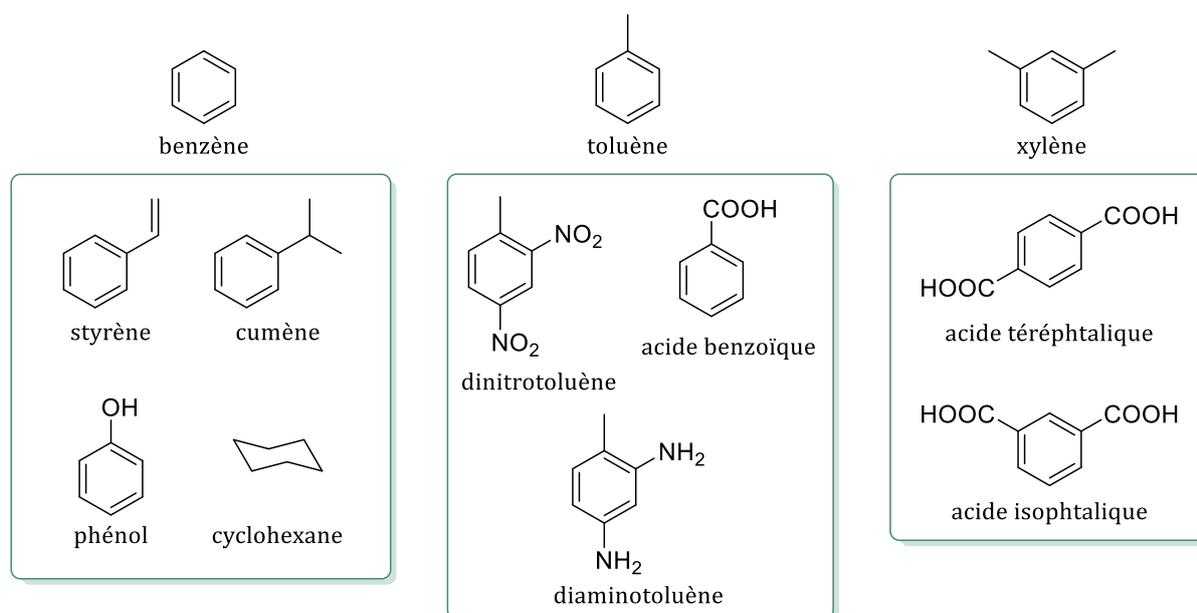


Figure I-22 : Exemples de produits synthétisés à partir de la plateforme BTX.

Ces composés pétrosourcés sont utilisés dans la fabrication de polymères, de fibres synthétiques, de peintures, de solvants, et d'autres applications. La production de ces composés à partir de sources renouvelables offrirait des avantages indéniables en termes de durabilité et de réduction de la dépendance aux ressources fossiles. Les réactions qui permettent la dépolymérisation de la lignine dans des conditions réductrices sont résumées dans le Tableau I-7.

Tableau I-7 : Réactions se produisant lors de la dépolymérisation de la lignine dans des conditions réductrices. [140]

Réaction	Schéma
Hydrogénation	$R-\text{CH}=\text{CH}_2 \xrightarrow{\text{H}_2} R-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
Hydrogénolyse	$R_1-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}_2 \xrightarrow{\text{H}_2} R_1-\text{OH} + \text{H}_3\text{C}-\text{R}_2$
Décarboxylation	$R-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \xrightarrow{\text{H}_2} R-\text{H} + \text{CO}_2$
Déméthylation	$R-\text{O}-\text{CH}_3 \xrightarrow{\text{H}_2} R-\text{OH} + \text{CH}_4$
Déméthoxylation	$R-\text{O}-\text{CH}_3 \xrightarrow{\text{H}_2} R-\text{H} + \text{H}_3\text{C}-\text{OH}$
Hydrodésoxygénation	$R-\text{OH} \xrightarrow{\text{H}_2} R-\text{H} + \text{H}_2\text{O}$

IV.2.3. Voies de dépolymérisation oxydantes

Une dernière voie de dépolymérisation de la lignine est la dépolymérisation oxydante. Cette méthode permet l'obtention de petits composés phénoliques tels que la vanilline, l'acide vanillique et le syringaldéhyde, qui sont des produits hautement valorisés nécessitant des conditions d'oxydation spécifiques et sélectives. Les pressions utilisées sont généralement inférieures à celles nécessaires pour les voies de dépolymérisation réductrice afin de prévenir une dépolymérisation totale de la lignine et de préserver les fonctionnalités présentes sur cette dernière.

Comme mentionné plus tôt dans la partie présentant les lignosulfonates (II.3.1), la société Borregaard s'est spécialisée dans la production de vanilline à partir d'une dépolymérisation oxydante des lignosulfonates. Ce processus implique des conditions spécifiques, notamment une oxydation sous pression d'oxygène en présence d'un catalyseur de sulfate de cuivre dans un milieu alcalin. La production annuelle de vanilline est estimée à environ 3 000 tonnes, avec un rendement de 7%. [141] Après cette industrialisation et la découverte d'un procédé applicable à une matière abondante comme la lignine, jusqu'alors sous-utilisée pour son potentiel chimique, de nouvelles méthodes d'oxydation pour la dépolymérisation de la lignine ont émergé. Tous ces procédés ont en commun l'utilisation d'espèces à fort pouvoir oxydant pour dépolymériser la lignine.

Il existe de nombreuses voies de dépolymérisations oxydantes, étudiées de manière extensive depuis plusieurs dizaines d'années. La plupart des études portent sur des modèles de liaisons standard de lignine, comme la liaison β -O-4 notamment. L'application à la lignine en elle-même représente encore un défi. Peu importe la nature des catalyseurs ou celle du milieu réactionnel, il a été montré que la conversion de la lignine dépend fortement de la nature de la lignine et des méthodes d'extraction. Ainsi, l'extraction organosolv, connue pour conserver plus ou moins la structure d'origine de la lignine native, fournit généralement une lignine plus adaptée à la dépolymérisation en monomères aromatiques et en composés dérivés. En revanche, l'extraction *via* le procédé Kraft, largement utilisée dans l'industrie de la pâte à papier, produit de la lignine réticulée qui est plus réfractaire à la dépolymérisation. [142]

Les polyoxométallates (POM) sont des catalyseurs bien connus pour les réactions d'oxydation, en particulier ceux basés sur les métaux du molybdène ou du vanadium. Les POM ont été utilisés comme catalyseurs d'oxydation dans la délignification pour la production de pâte dans l'industrie papetière depuis les années 1990. Cependant, les rapports abordant leur potentiel pour produire des produits chimiques à partir de la lignine sont plutôt récents. En 2010 Rohr *et al.* ont démontré que les POM sont des catalyseurs d'oxydation efficaces pour convertir la lignine Kraft Indulin en composés aromatiques, principalement en vanilline (Figure I-23). [143] Un intérêt de cette voie

est la réutilisation du milieu réactionnel catalytique récupéré après la filtration de la lignine restante et l'extraction des produits.

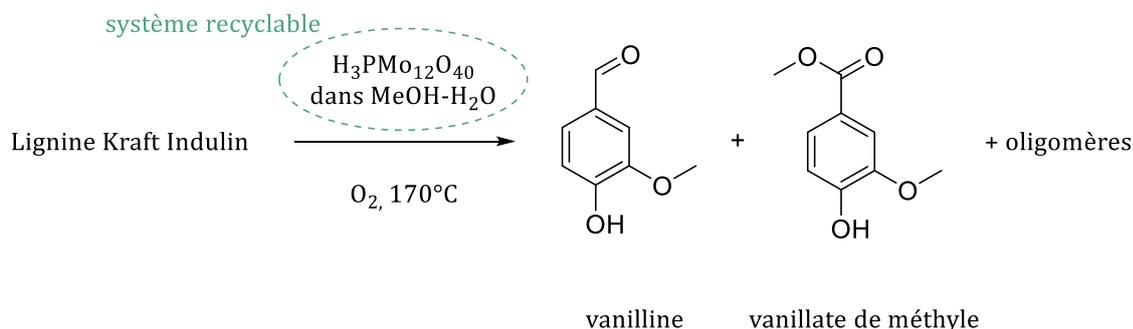


Figure I-23 : Dépolymérisation oxydante d'une lignine avec des polyoxométallates dans le méthanol et l'eau. [144]

Les polyoxométallates sont un des exemples de catalyseurs organométalliques qui permettent la dépolymérisation oxydante de la lignine, il en existe plusieurs autres qui ne seront pas présentés en détails dans ce manuscrit, comme les porphyrines, les pérovskites ou les complexes de SALEN (N,N'-bis(salicylidène)éthane-1,2-diamines). [145]

IV.3. La lignine comme source de fibres de carbone

Les fibres de carbone ont gagné en importance dans de nombreuses applications industrielles en raison de leurs propriétés exceptionnelles, telles que leur légèreté, leur résistance mécanique élevée et leur conductivité thermique. Les fibres de carbone sont synthétisées à partir de plusieurs polymères précurseurs mais le polyacrylonitrile (PAN), représente 96% du marché. [146] La synthèse de fibres de carbone à partir de ce précurseur pétrosourcé est représentée en Figure I-24. Cependant, le PAN est dérivé de ressources non-renouvelables qui nécessitent des étapes de traitement énergivores et coûteuses.

D'après Das *et al.*, les équivalents CO₂ par kilogramme de fibre sont de 31 kg pour la production d'une fibre de carbone PAN et de 24 kg pour une fibre de carbone à base de lignine. [147]

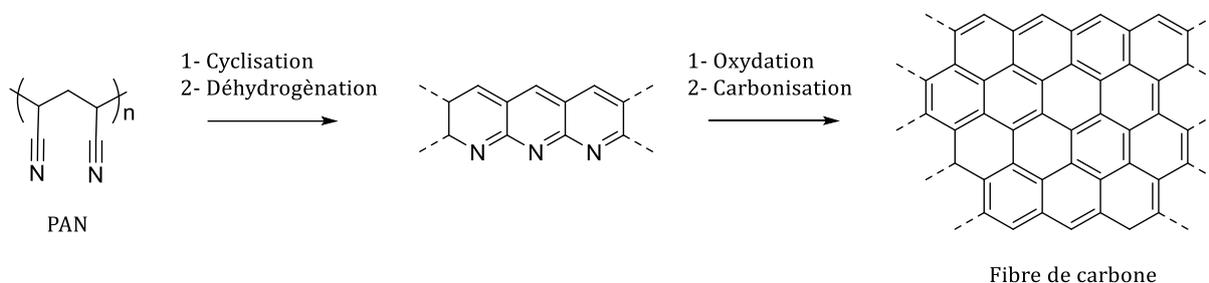


Figure I-24 : Synthèse de fibres de carbone à partir du précurseur PAN.

Dans ce contexte, l'utilisation de la lignine comme matière première pour la production de fibres de carbone, suscite un intérêt croissant. En effet, la structure aromatique et le taux élevé de carbone de la lignine (60 à 65%) en font un candidat de choix comme précurseur de fibres de carbone. La première difficulté est de produire des fibres de lignine avec des propriétés mécaniques suffisantes pour supporter les étapes de pyrolyse dont certaines sous tension. Ces fibres peuvent être préparées par plusieurs méthodes qui permettent la production de fibres de diamètre, de morphologie et de propriétés mécaniques différentes.

IV.3.1. Les processus de filages de la lignine

Les **filages en voie humide et sèche** (wet et dry spinning, représentés en Figure I-25 et Figure I-26) impliquent la dissolution de la lignine et d'un copolymère dans un solvant adapté, suivie de son extrusion dans un bain de coagulation (wet spinning) ou une chambre de séchage (dry spinning), dans lesquels les polymères précipitent pour former une fibre.

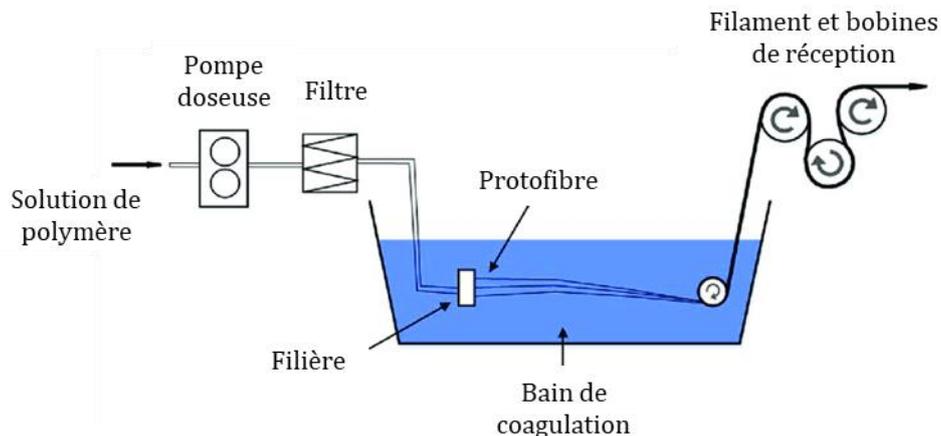


Figure I-25 : Schéma d'un processus typique de filage par voie humide. D'après [148].

L'utilisation de matériaux de fortes masses molaires comme le poly(alcool vinylique) (PVA), le poly(acrylonitrile) (PAN) et la viscose, a été décrite pour le dry spinning. Le wet spinning à partir de solutions contenant de la viscose a également été reporté. Il nécessite alors des solvants dans lesquels la viscose est soluble comme le disulfure de carbone (CS_2). Cependant, le CS_2 rend le processus coûteux et toxique. La plupart des activités de recherche sur le filage en voie humide et le filage en voie sèche ont cessé dans les années 1980, car de nouveaux développements se sont concentrés sur le filage par fusion de fibres de lignine et leur thermostabilisation. [149]

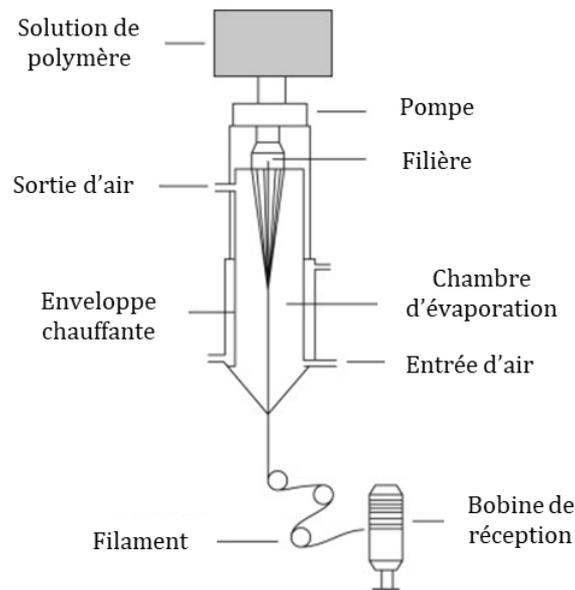


Figure I-26 : Schéma d'un processus typique de filage par voie sèche. D'après [150].

Dans le **filage par fusion** (melt spinning), le polymère est introduit dans une extrudeuse chauffée où il est fondu, puis poussé à travers une filière de filage. La lignine est généralement mélangée à des additifs ou d'autres polymères pour améliorer les propriétés de filage. Les fibres sont ensuite stabilisées thermiquement sous air où la lignine est oxydée. Enfin, les fibres sont pyrolysées sous atmosphère inerte, ce qui entraîne la carbonisation des fibres. [151]

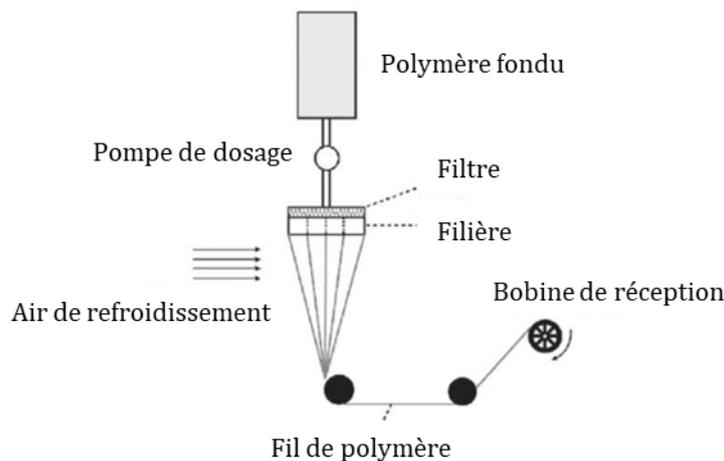


Figure I-27 : Schéma d'un processus typique de filage par fusion. D'après [152].

Le processus de filage par fusion de la lignine, schématisé en Figure I-27 est étudié depuis les années 1980, notamment par Sudo *et al.* [153] Les auteurs ont par exemple décrit le filage par fusion d'une lignine de feuillus isolée par un traitement à la vapeur sous haute pression et température. Pour optimiser les rendements de carbonisation des fibres obtenues, ils ont ajouté un traitement dans un solvant phénolique suivi d'une thermostabilisation sous atmosphère inerte avant le filage par fusion. Les travaux ultérieurs sur le filage par fusion se sont concentrés sur la

combinaison de la lignine avec différents polymères en tant qu'agents plastifiants tels que le polyéthylène (PE) [154], le poly(oxyde d'éthylène) (PEO) [155], le polypropylène (PP) [154] ou le polyuréthane (PU), plus précisément un polyuréthane élastomère thermoplastique (TPU) [156]. Des nanoparticules servant de renfort de fibres peuvent également être incluses dans le mélange de polymères pour augmenter les résistances à la traction des fibres et leurs modules. [157] Malgré ces développements, le filage par fusion reste délicat car l'utilisation de plastifiants rend l'étape de carbonisation plus difficile et moins efficace. De plus, cette méthode de filage requiert l'utilisation d'une lignine fusible, ce qui nécessite une étape de stabilisation longue et coûteuse avant la carbonisation. En effet, les lignines fusibles vont avoir une tendance à s'agglutiner et à fondre lorsqu'elles sont chauffées. Enfin, l'hétérogénéité des lignines a un impact sur les propriétés des fibres de carbones obtenues par fusion. Il a en effet été montré que la lignine syringyle est plus facile à fondre que la lignine à base de gâicol. [97] Cela s'explique car des structures condensées peuvent facilement être formées au sein des unités G qui présentent un carbone aromatique (C₅) disponible pour du couplage. Ces structures condensées sont dues à la formation de liaisons β-5' et 5-5', qui limitent la rotation de la molécule selon l'axe C₅-C₅. [158, 159]

Quel que soit le processus de filage, la lignine est souvent mélangée avec des co-précurseurs, pour des questions de solubilité. Quelques articles mentionnent la synthèse de fibres de carbone entièrement composées de lignine. Récemment, Luo *et al.* ont montré un filage en voie humide possible avec une lignine organosolv, mais pas avec la lignine Kraft Indulin AT. La lignine Kraft doit être mélangée à l'organosolv pour pouvoir créer des fibres de carbones correctes. Lorsque la proportion de lignine Kraft dépasse les 20 % le mélange n'est plus filable. [160]

IV.3.2. Fibres de carbones de lignines modifiées enzymatiquement

En 2019, Li *et al.* ont rapporté un exemple de fibres de carbone fabriquées à partir de lignine traitée enzymatiquement par des laccases. Dans leur système, un mélange de lignine-PAN dans du DMF à 60°C a été injecté dans un bain de coagulation de méthanol/DMF à -20°C. Après thermostabilisation et carbonisation, des fibres de carbone avec un module de Young de 38 GPa et une résistance à la traction de 352 MPa ont été obtenues. [161] En comparaison, une fibre de carbone issue de ressources pétrochimiques présente un module de Young d'environ 420 GPa et une résistance à la traction avoisinant les 4 350 MPa, ce qui lui confère des propriétés mécaniques bien supérieures à celles de son équivalent biosourcé. [162]

Mikkilä *et al.* ont modifié enzymatiquement en 2020 une lignine Kraft en l'incubant avec le champignon à pourriture blanche *Obba rivulosa*. Il a été postulé que des réactions d'oxydation radicalaire enzymatiques pourraient induire la condensation de la lignine, augmentant ainsi la quantité de cycles aromatiques reliés par des liaisons carbone-carbone. Cette modification est

supposée être bénéfique lorsqu'on vise des matériaux graphitiques tels que les fibres de carbone. Expérimentalement, le ratio d'hydroxyles aliphatiques restants par rapport aux hydroxyles phénoliques a effectivement été augmenté, rendant la structure plus favorable à la production de fibres de carbone. Lorsque la lignine modifiée a été mélangée avec de la cellulose, le mélange a pu être filé en fibres par la technique de filage wet spinning. Ils observent que la lignine modifiée coule moins dans le bain de filage par rapport à la lignine non modifiée, facilitant le recyclage des solvants du bain de filage. L'analyse de composition, la thermogravimétrie et les essais mécaniques ont confirmé l'incorporation plus forte de la lignine modifiée dans les fibres finales. [163]

En 2017, Li *et al.* ont fractionné une lignine Kraft et l'ont traité enzymatiquement grâce à un système laccase-médiateur, ce qui a conduit au développement de fibres de carbone à base de lignine présentant des performances mécaniques améliorées, comparables à celles des fibres de carbone traditionnelles à base de PAN. Leurs résultats suggèrent que la masse molaire plus élevée, la diminution de la quantité de groupes hydroxyles et une structure plus linéaire peuvent contribuer à l'amélioration de la cristallisation et des performances mécaniques des fibres de carbone à base de lignine. [164]

Ces résultats concernant le filage de lignines modifiées enzymatiquement sont intéressants. La structure de la lignine, son extraction et son hétérogénéité, ainsi que sa modélisation et ses voies de valorisation ont été explorées. Un second axe indispensable de la veille bibliographique concerne les enzymes lignolytiques. En effet, comme indiqué dans l'introduction générale, ce projet de thèse en collaboration avec le Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP) consiste à comprendre l'action moléculaire et les conséquences macroscopiques, comme la solubilité d'une lignine Kraft après son traitement enzymatique. Il est donc nécessaire d'introduire les enzymes qui jouent un rôle essentiel dans les parois cellulaires des végétaux, leurs actions anaboliques et cataboliques, ainsi que les applications industrielles qui en découlent.

V. Enzymes lignolytiques

Les enzymes sont des protéines, présentes notamment dans les cellules végétales, qui agissent comme des catalyseurs biologiques. Par définition, les enzymes accélèrent les réactions chimiques nécessaires à la vie sans être consommées. La communauté scientifique a tiré parti de ces propriétés naturelles pour développer des méthodes de catalyse enzymatique. Comparés aux catalyseurs chimiques, ces catalyseurs naturels présentent plusieurs avantages cruciaux. Premièrement, les enzymes opèrent dans des conditions douces, souvent à des températures modérées et à des pH neutres en milieu aqueux, ce qui réduit la consommation d'énergie et évite la formation de sous-produits non-désirés. De plus, les enzymes sont hautement spécifiques, ce qui signifie qu'elles ciblent sélectivement les liaisons chimiques à modifier, minimisant ainsi les déchets indésirables.

Les champignons de pourriture blanche sont connus pour leur capacité à dégrader la lignine présente dans le bois. Des études ont été menées sur ces champignons afin de comprendre leurs mécanismes d'action, mettant en évidence la présence de plusieurs enzymes agissant de manière synergique. Certaines de ces enzymes ont été isolées et utilisées *in vitro* pour la modification de la lignine. Les paragraphes suivants détaillent les caractéristiques de ces enzymes lignolytiques ainsi que les recherches les plus significatives sur leur action envers la lignine.

V.1. Peroxydases lignolytiques

Les peroxydases représentent une classe d'enzymes présentes dans de nombreux organismes vivants, notamment les champignons de pourriture du bois. Ces enzymes, classées comme oxydases, catalysent des réactions d'oxydoréduction en présence de peroxyde d'hydrogène. Deux types de peroxydases, la lignine peroxydase (LiP) et la manganèse peroxydase (MnP), ont été isolés et identifiés comme des acteurs clés de la dégradation de la lignine (Figure I-28). Leur extraction et leur étude ont permis de mieux comprendre les mécanismes biochimiques impliqués dans la décomposition naturelle de la lignine et ouvrent la voie à de nombreuses applications biotechnologiques.

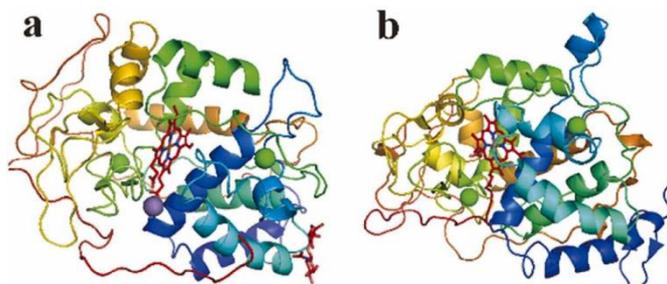


Figure I-28 : Structures moléculaires tridimensionnelles de (a) MnP, et de (b) LiP présentées à l'aide de l'outil de visualisation graphique moléculaire PyMOL (PDB ID : 1MNP et 1B85).

V.1.1. Lignine Peroxydase (EC 1.11.1.14)

La lignine peroxydase (LiP) est une des enzymes responsable de la ligninolyse fongique, et est donc également appelée ligninase. Elle se trouve dans le champignon de pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium*, qui a fait l'objet de nombreuses études. [165, 166]

Le centre actif de cette enzyme est constitué de l'hème, un complexe ferreux. En raison d'un potentiel redox élevé, autour de 1,2 V, la LiP peut oxyder les espèces phénoliques et non phénoliques de la lignine en présence de H₂O₂ (Figure I-29). [167, 168]

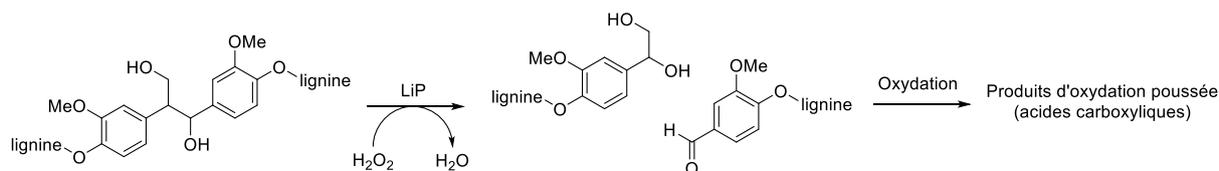
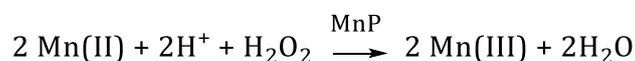


Figure I-29 : Mécanisme de clivage homolytique dans la lignine le plus largement accepté de la liaison C α -C β par la LiP (lignine peroxydase). [169]

De nombreux modèles monomères à tétramères ont été oxydés et dégradés par la LiP. [170, 171] L'application de ces travaux à la lignine n'est pas aisée. En effet, face à un système polymère, cette enzyme catalyse à la fois des réactions de dépolymérisation oxydante et de repolymérisation. L'un des moyens d'éviter la repolymérisation du système consiste à réduire les radicaux phénoxy réactifs ou les quinones formées lors de la décomposition de la lignine afin de les convertir en molécules plus stables. [172, 173]

V.1.2. Peroxydase de manganèse (EC 1.11.1.13)

Certaines espèces de pourriture blanche peuvent dégrader efficacement la lignine en absence de LiP. Ces champignons dépendent des Peroxydases de Manganèse (MnPs), enzymes omniprésentes parmi les champignons de la pourriture blanche. Comme présenté dans l'équation suivante, les MnP oxydent le Mn²⁺ en Mn³⁺, en présence de H₂O₂.



Le Mn³⁺ résultant est diffusé au sein du milieu pour oxyder les sous-unités phénoliques. Il a été démontré que les enzymes MnP peuvent également dégrader les sous-unités non phénoliques lorsqu'elles agissent avec des médiateurs, vraisemblablement des lipides, bien que la nature et le rôle exact de ces médiateurs restent controversés. [174–176] Cette dépolymérisation est représentée en Figure I-30.

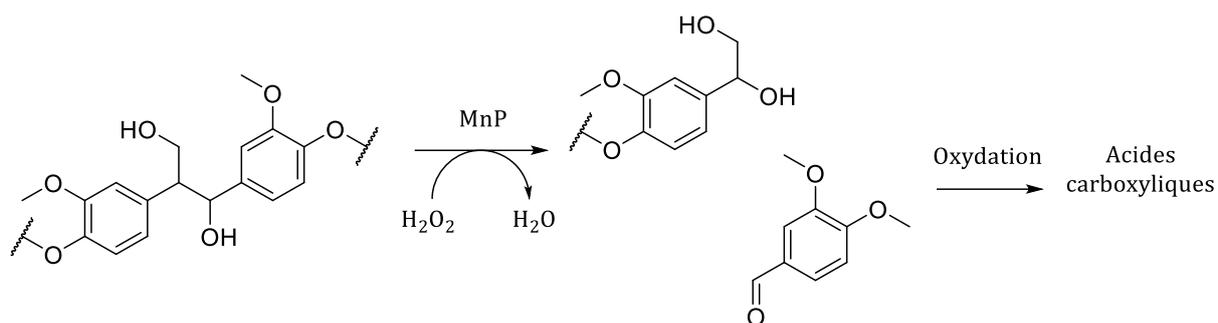


Figure I-30 : Dépolymérisation d'une lignine par le manganèse peroxydase. [177]

Après avoir examiné les mécanismes des enzymes lignolytiques de type peroxydase, il convient maintenant de se pencher sur les oxydases multi-cuivre, qui seront utilisées dans la partie expérimentale de ce travail.

V.2. Les oxydases multi-cuivre : généralités

Les oxydases multi-cuivre (MCO) sont une famille d'enzyme contenant du cuivre, divisées en plusieurs sous-groupes tels que les laccases (EC 1.10.3.2), l'ascorbate oxydase (EC 1.10.3.3), la ferroxidase (EC 1.16.3.1), la nitrite réductase (EC 1.7.2.1), ou encore la bilirubine oxydase (EC 1.3.3.5). [178]

Une caractéristique générale des oxydases multi-cuivre est la présence de quatre atomes de cuivre qui permettent l'oxydation des substrats tout en réduisant l'oxygène en eau sans produire d'intermédiaires toxiques. [179–182] Une schématisation du centre actif de ces enzymes est représentée en Figure I-31.

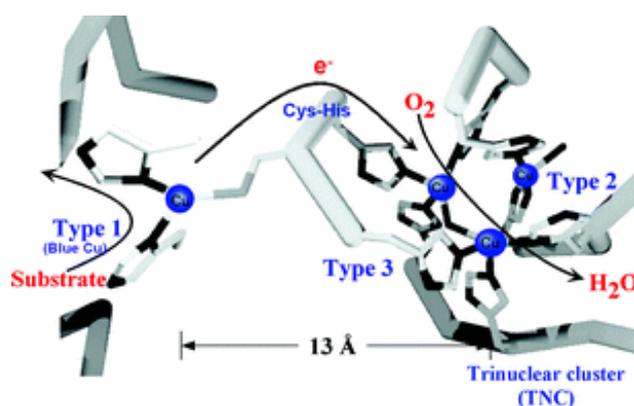
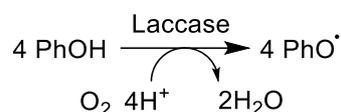


Figure I-31 : Schématisation du centre actif des oxydases multi-cuivre. Représentation du flux des substrats, des électrons (e^-) et de l'oxygène. [183]

V.3. Laccases (EC 1.10.3.2)

Les laccases sont une classe bien connue des oxydases multi-cuivre. Elles ont été découvertes pour la première fois par l'équipe de Yoshida en 1883 dans l'arbre japonais *Rhus verniciflua*. [184] Plus d'un siècle après cette découverte, il est maintenant connu que les laccases sont largement

répandues dans les plantes, les animaux, les insectes, les champignons et les bactéries. Ces oxydases multi-cuivre peuvent oxyder des substrats d'origine phénolique et non phénolique avec une réduction de l'oxygène en eau selon l'équation suivante [185] :



Les laccases sont des glycoprotéines composées de 500 à 550 acides aminés dont la masse molaire se situe entre 50 et 70 kDa. Cette variation dépend de l'organisme d'origine et du degré de glycosylation de la protéine. En effet, la masse molaire de certaines laccases hautement glycosylées peut atteindre jusqu'à 140 kDa. [186]

V.3.1. Cycle catalytique

La laccase catalyse la réaction à un électron de formation du substrat sous sa forme radicalaire réactive. Le procédé est initié et catalysé par le centre métallique. L'atome de cuivre présent dans la laccase native sous sa forme d'oxydation la plus élevée (Cu^{2+}) est réduit lors de l'oxydation du substrat et oxydé à nouveau par l'oxygène de l'air. Le cycle catalytique global implique donc la réduction d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau, permettant à l'atome de cuivre réduit au sein de la laccase (Cu^+) de revenir à sa forme oxydée native (Cu^{2+}).

Les cuivres contenus dans la laccase sont classés en 3 catégories en fonction de leur structure géométrique et électronique (Figure I-32). Les sites T1 (centre de cuivre bleu, accepteur primaire

d'électrons) et T2 (cuivre normal) contiennent tous deux un atome de cuivre, tandis que le site T3 (centres de cuivre binucléaires couplés) contient deux atomes de cuivre. [187–189]

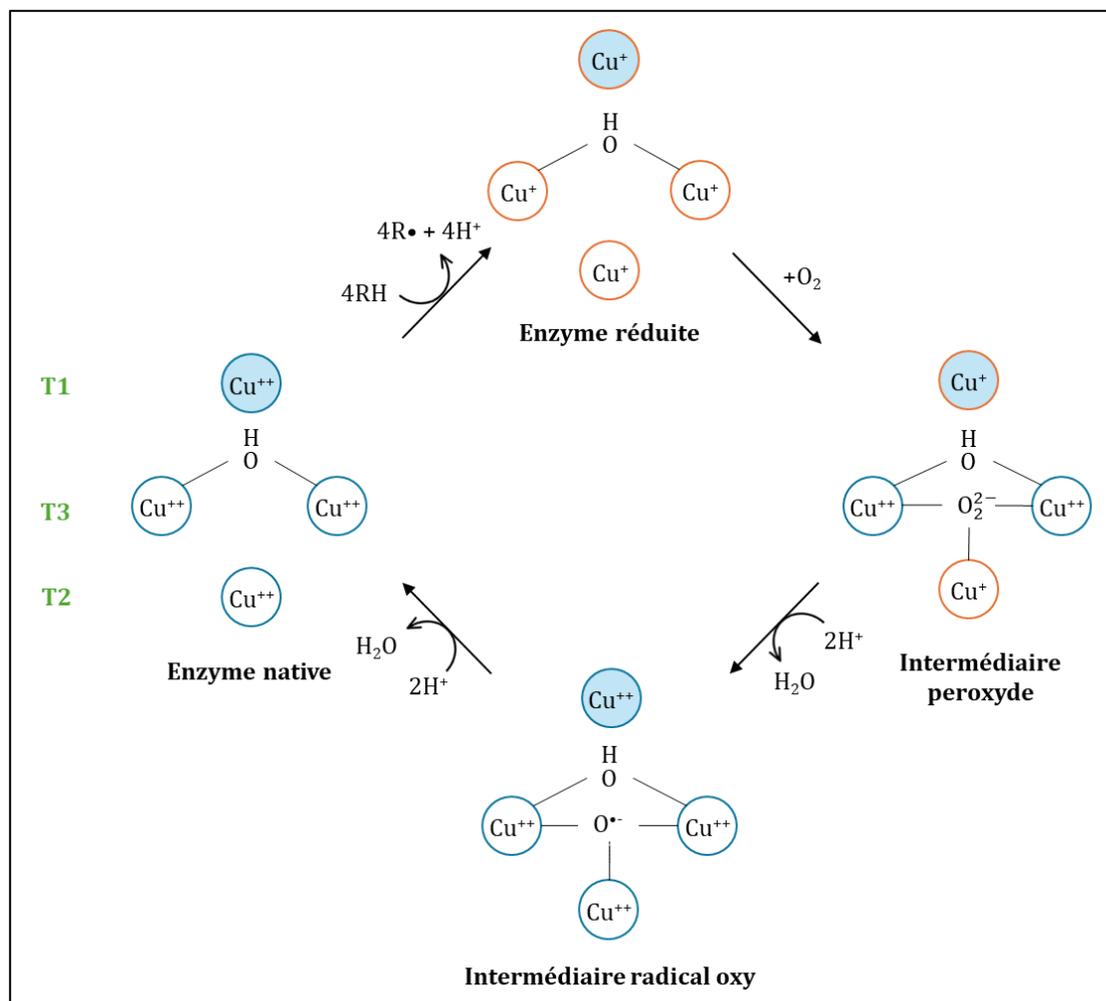


Figure I-32 : Cycle catalytique de la laccase.

C'est le cuivre du site T1 qui gouverne le potentiel redox de l'enzyme, car c'est là que les électrons des substrats vont être transférés. Après l'oxydation successive de quatre molécules de substrat, l'enzyme se trouve sous sa forme réduite. Dans un second temps, une molécule d'oxygène est insérée entre les deux cuivres du site T3 et celui du site T2, formant un intermédiaire peroxyde. L'oxygène y est réduit en eau selon deux étapes impliquant chacune deux électrons. L'étape suivante implique un transfert d'atome d'hydrogène (HAT), où les protons du substrat oxydé sont transférés vers l'intermédiaire peroxyde. Ce processus permet le couplage des électrons et des protons, permettant la conversion efficace de l'oxygène en eau. Le transfert d'atome d'hydrogène se produit souvent de manière concertée, où l'atome d'hydrogène (un proton et un électron) est simultanément transféré du substrat à l'enzyme. Ainsi, à la fin du cycle, les quatre atomes de cuivre du site actif sont sous leur forme oxydée (Cu^{2+}), l'enzyme est régénérée sous sa forme native, prête pour un nouveau cycle catalytique.

V.3.2. Diversité des laccases

En fonction de sa source biologique, la structure moléculaire de la laccase est différente et, par conséquent, son activité catalytique et son potentiel redox diffèrent également. Les enzymes à faible potentiel redox, principalement présentes chez les bactéries, les plantes et les insectes (340-490 mV), sont limitées à l'utilisation des substrats phénoliques ; les laccases fongiques possèdent un potentiel redox plus élevé sur le site T1 (500-800 mV) et peuvent fonctionner avec une plus grande variété de substrats. [190] Le Tableau I-8 rassemble les potentiels d'oxydoréduction de plusieurs types de laccases.

La classe d'enzymes la plus étudiée à ce jour est d'origine fongique. Parmi celle-ci, les laccases des champignons à pourriture blanche tels que *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Coprinus cinereus*, etc. sont les plus fréquemment décrites et rapportées. [191]

Tableau I-8 : Potentiels d'oxydoréduction de laccases de différentes sources.

Source de la laccase	E° (mV vs NHE)
<i>Rhus vernicifera</i> [192]	430
<i>Mytheliophthora thermophila</i> [192]	465
<i>Melanocarpus albomyces</i> [193]	470
<i>Pleurotus ostreatus</i> [194]	650
<i>Aspergillus oryzae</i> [195]	750
<i>Trametes hirsuta</i> [196]	780
<i>Trametes versicolor</i> [192]	790

Ces laccases fongiques peuvent ainsi oxyder les sous-unités phénoliques de la lignine, qui ont des potentiels redox suffisamment bas, mais l'oxydation des sous-unités non phénoliques ayant des potentiels redox allant jusqu'à 1500mV est plus difficile. [197]

Il est important de distinguer les différentes actions de la laccase : une action anabolique et une catabolique, et ce dans la nature ainsi qu'à une échelle industrielle.

L'anabolisme est le processus métabolique par lequel les cellules construisent des molécules complexes à partir de précurseurs plus simples. Pendant l'anabolisme, les cellules créent des macromolécules comme les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques à partir de leurs constituants de base. L'anabolisme est essentiel pour la croissance, la réparation des tissus et le stockage d'énergie à long terme des organismes vivants.

Le **catabolisme** est le processus métabolique par lequel les cellules décomposent des molécules complexes en molécules plus simples, généralement avec libération d'énergie.

V.4. Actions anaboliques des laccases

V.4.1. Rôles anaboliques des laccases dans la nature

Dans les réactions anaboliques typiques, les composés phénoliques de faible masse molaire (monolignols) sont oxydés en intermédiaires radicalaires ou quinones, qui réagissent pour donner plusieurs types de produits dimères. Comme ces dimères contiennent encore des fonctions phénoliques, ils peuvent former à nouveau des radicaux dimères, produisant ainsi des trimères, des oligomères allant jusqu'à des polymères. [198] Ainsi, les laccases favorisent la biosynthèse d'une variété de dimères, ainsi que de produits polymères tels que la lignine, les polymères flavonoïdes, les mélanines ou encore les quinones réticulées aux protéines cuticulaires (pour la solidification de la cuticule chez les insectes). [199]

V.4.2. Rôles anaboliques des laccases en industrie

Le principal mécanisme d'action des processus de synthèse qui utilisent les laccases est le couplage oxydant. L'homo-couplage de petits composés organiques ou le couplage croisé avec différents composés organiques aboutit respectivement à des homo ou hétérodimères, qui mènent ensuite à la synthèse d'homo ou copolymères. Des produits structurellement diversifiés peuvent être obtenus grâce à la délocalisation des électrons des radicaux organiques avant les actions de couplage. Comme c'est le cas pour la synthèse d'autres polymères synthétiques, les masses molaires des produits sont contrôlables en variant les types de solvants organiques utilisés pendant la polymérisation enzymatique. [200] Les réactions de greffage ou de conjugaison radicalaire enzymatique avec d'autres matériaux polymères sont également possibles : selon la petite molécule organique utilisée pour le greffage, de nouvelles fonctionnalités, telles que des propriétés antibiotiques et antioxydantes, peuvent être facilement introduites dans les produits polymères ciblés. [201–203] De nombreux domaines d'applications industrielles ont pris parti de ce couplage oxydant catalysé par les laccases.

Industrie pharmaceutique : Une large partie des produits générés par les laccases sont antimicrobiens ou détoxifiants. Il a donc été montré que les laccases peuvent être utilisées dans la synthèse de composés médicaux complexes tels que des anesthésiques, anti-inflammatoires, antibiotiques ou sédatifs. [204, 205] Il est également intéressant de noter que les laccases peuvent oxyder l'iodure I^- pour produire de l'iode I_2 , largement utilisé comme désinfectant. [206–209] Récemment, la synthèse catalysée par les laccases de l'anhydrovinblastine, de la mitomycine et de composés anticancéreux structurellement similaires a été rapportée. [210, 211]

Un domaine d'application novateur pour les laccases est la **cosmétique**. La catalyse par les laccases peut être utilisée pour synthétiser des colorants textiles ou des pigments cosmétiques. Les teintures capillaires à base de laccases sont moins irritantes que celles couramment disponibles, car les laccases remplacent le peroxyde d'hydrogène comme agent oxydant dans la formulation des teintures. Jeon *et al.* ont étudié la polymérisation de phénols naturels catalysée par une laccase de *T. versicolor* pour former des produits pour la teinture des cheveux. Trois combinaisons de deux monomères phénoliques pour la teinture des cheveux gris ont été développées, à savoir l'acide gallique/acide syringique, la catéchine/catéchol et l'acide férulique/acide syringique, générant respectivement des colorations brunes, noires et rouges. [212]

Parmi les domaines industriels explorés, les laccases ont trouvé des applications dans plusieurs secteurs de **l'industrie textile**, où ces enzymes ont été intégrées dans des processus déjà existants tels que le blanchiment et la teinture des fibres. Le blanchiment, qui consiste à éliminer les pigments naturels, autres matières non cellulosiques et impuretés des matériaux cellulosiques avant la teinture et la finition des fibres, est une étape obligatoire dans le traitement textile. Les laccases ont émergé comme une alternative préservant les fibres au réactif de blanchiment le plus couramment utilisé, le peroxyde d'hydrogène. [213, 214] En oxydant le colorant indigo sur les vêtements en denim en composés incolores, le traitement à la laccase a permis d'obtenir l'effet délavé souhaité sur les jeans en denim bleu sans utiliser d'agents oxydants agressifs tels que l'hypochlorite de sodium. L'utilisation des laccases pour le traitement du denim remonte à 1996, lorsque la première préparation commerciale de laccase, Denilite™, a été lancée sur le marché par Novozyme. Depuis lors, des formulations personnalisées de laccases ont été développées pour cibler des conditions spécifiques de traitement humide des vêtements, comme l'a largement examiné Rodriguez-Couto. [215]

Il a ainsi été montré la polyvalence de la mise à profit du rôle anabolique des laccases, *in vivo* comme en industrie.

V.5. Actions cataboliques des laccases

V.5.1. Rôles cataboliques des laccases dans la nature

Les processus cataboliques médiés par les laccases *in vivo* comprennent la dépolymérisation de la lignine et la dégradation de l'humus. La dégradation de la lignine est considérée comme un processus complexe impliquant différentes classes d'enzymes, comme les peroxydases présentées précédemment.

Ce paragraphe démontre la nécessité de la présence de la laccase pour la dégradation de la lignine.

Eggert *et al.* [216] et Bermerk *et al.* [217] ont décrit en 1997 et 1998 respectivement un mutant de *Pycnoporus cinnabarinus* (espèce de champignon) dépourvu de laccase, qui n'a pas la capacité de produire de la lignine peroxydase (LiP) ni la manganèse peroxydase (MnP). Ces mutants sans laccase étaient inefficaces ou incapables de dégrader des modèles polymères de lignine (DHP) ou de blanchir la pâte Kraft. Cependant, lorsque de la laccase purifiée est ajoutée au dispositif expérimental dans une quantité équivalente à celle trouvée dans le champignon sauvage, ces mutants sont parvenus à décomposer le DHP ou blanchir la pâte Kraft. Ces résultats montrent le rôle indéniable que tient la laccase dans la dégradation des liaisons présentes dans la lignine. Youn *et al.* ont prouvé quelques années auparavant que la laccase est capable de dégrader plusieurs composés modèles de lignine. [218] Enfin, Xie *et al.* ont fourni des preuves génétiques quant au rôle de la laccase dans la dégradation des matières lignocellulosiques. Pour cela, le rôle dans le développement et la dégradation de la biomasse végétale de neuf laccases appartenant à trois sous-familles différentes et d'une oxydase multi-cuivre a été étudié par délétion ciblée de gènes. [219]

Tous ces résultats expérimentaux confirment le rôle joué par la laccase dans la dégradation de la lignine. Cependant, la plupart des connaissances actuelles sur l'action de la laccase sur la lignine ont été obtenues sur des lignines techniques, des dérivés de lignine ou des composés modèles diversement traités. Ceci, associé à une méthodologie analytique quantitative limitée sur la lignine intacte insoluble dans l'eau, constitue un obstacle important à surmonter pour améliorer la compréhension de l'action de la laccase sur la biomasse native.

V.5.2. Rôles cataboliques des laccases en synthèse organique

L'association de petites molécules jouant le rôle de médiateur redox à des laccases permet d'élargir leur spectre d'action. Le système laccase-médiateur (Laccase Mediator System en anglais, LMS) permet l'oxydation des composés non phénoliques. Ainsi, comme montré en Figure I-33, l'enzyme oxyde le médiateur qui, à son tour, oxyde le substrat. Les médiateurs ont des potentiels redox plus élevés que la laccase et, une fois oxydés, forment des composés stables capables d'oxyder non seulement des groupes chimiques non phénoliques mais aussi des groupes spatialement inaccessibles pour l'enzyme. [220]

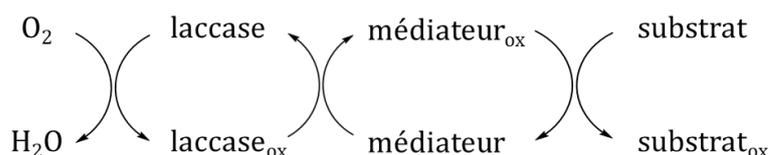


Figure I-33 : Illustration du fonctionnement du système laccase-médiateur (LMS).

Au cours de la première étape de la réaction, la laccase oxyde le médiateur en intermédiaires stables à forts potentiels d'oxydoréduction. Ensuite, suivant une cinétique de réaction contrôlée

par la diffusion, le médiateur oxydé se diffuse loin de l'enzyme et, en raison de sa petite taille, est capable d'atteindre le substrat cible. En conséquence, le substrat (lignine, composés aromatiques, etc.) est oxydé tandis que le médiateur oxydé est réduit à sa forme initiale. [221]

Le médiateur idéal est une molécule de petite taille, capable d'être oxydée en un radical stable, puis recyclée. De plus, la forme radicalaire du médiateur ne doit pas être un inhibiteur de l'enzyme. Enfin, étant donné les applications ciblées des laccases et du système laccase-médiateur, principalement à des fins environnementales dans les industries, les médiateurs doivent être respectueux de l'environnement et bon marché. Les médiateurs de la laccase peuvent être divisés en deux groupes : les médiateurs naturels et les médiateurs synthétiques.

Les médiateurs naturels de laccase sont définis comme des molécules d'origine naturelle que l'on peut trouver dans les biomasses lignocellulosiques et qui sont les médiateurs habituels des laccases lignolytiques des champignons lignivores. Ainsi, au cours de la biodégradation de la lignine par les champignons, des produits de dépolymérisation tels que des fragments de radicaux phénoxyles ou des monomères phénoliques sont générés et peuvent oxyder des composés non phénoliques, ce qui explique la capacité des laccases fongiques à dégrader la lignine en dépit de leur potentiel redox plutôt faible. [222] Les médiateurs naturels comprennent par exemple le syringaldéhyde, la vanilline, l'acétosyringone, l'acétovanillone, l'acide sinapique et l'acide férulique, qui sont des monomères dérivés de la biodégradation de la lignine.

Contrairement aux médiateurs naturels, les médiateurs synthétiques sont ceux qui sont synthétisés chimiquement. Ils comprennent par exemple l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), l'hydroxybenzotriazole (HBT ou HOBt) et le (2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-yl)oxyl (TEMPO).

Les structures de plusieurs médiateurs naturels et synthétiques des laccases sont représentées en Figure I-34.

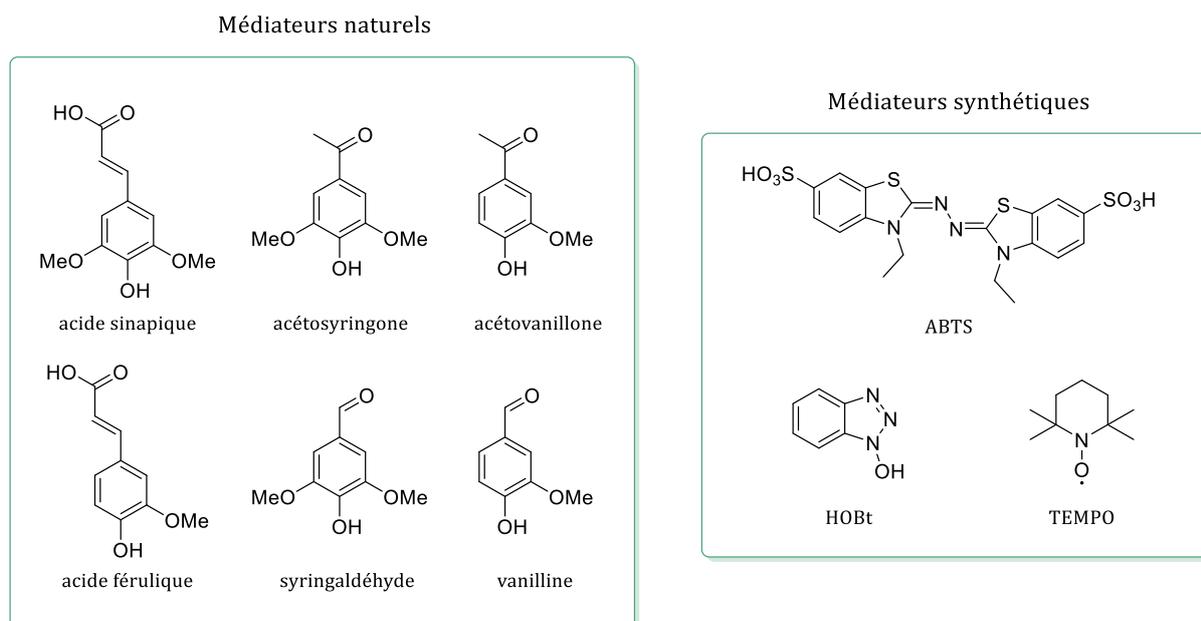


Figure I-34 : Représentation de plusieurs médiateurs de la laccase.

Après avoir examiné les différents types de médiateurs disponibles, il est essentiel de comprendre les mécanismes d'oxydation qu'ils catalysent. Les mécanismes diffèrent en fonction des médiateurs, et sont représentés en Figure I-35. Il existe deux mécanismes principaux permettant aux médiateurs d'oxyder différents composés : le transfert d'électron (ET) et le transfert d'atome d'hydrogène (HAT) (Figure I-35). [223] L'ET se distingue du HAT par le fait que, dans l'ET, seul un électron est transféré d'une espèce à une autre, tandis que dans le HAT, c'est un atome d'hydrogène complet, incluant à la fois un électron et un proton, qui est transféré.

L'oxydation des substrats par la laccase *via* le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (HAT) est l'un des processus les plus courants. [224, 225] Dans ce mécanisme, la laccase catalyse l'oxydation des substrats en arrachant un atome d'hydrogène, générant ainsi des radicaux libres. Le HAT est particulièrement efficace pour les substrats dont l'hydrogène est labile, c'est-à-dire facilement accessible et arrachable. Par exemple, les phénols et certains composés azotés comme le HOBt sont bien adaptés à ce mécanisme car ils possèdent des hydrogènes que la laccase peut facilement arracher pour générer des radicaux, Ph-O^\bullet et N-O^\bullet , respectivement. Ces radicaux peuvent ensuite réagir avec d'autres molécules, conduisant à des réactions de couplage ou de fragmentation.

Le mécanisme de transfert d'électron (ET) est une autre voie d'oxydation catalysée par la laccase. [224, 226] Dans ce processus, l'ABTS est un médiateur couramment utilisé, qui subit deux oxydations successives pour former l'ion ABTS^{2+} . Cet ion ABTS^{2+} est une espèce oxydante qui peut transférer des électrons à divers substrats, facilitant alors leur oxydation. Le mécanisme ET dépend principalement du potentiel redox du substrat, c'est-à-dire de sa capacité à perdre des

électrons. Les substrats avec un potentiel redox élevé sont plus facilement oxydés *via* ce mécanisme.

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

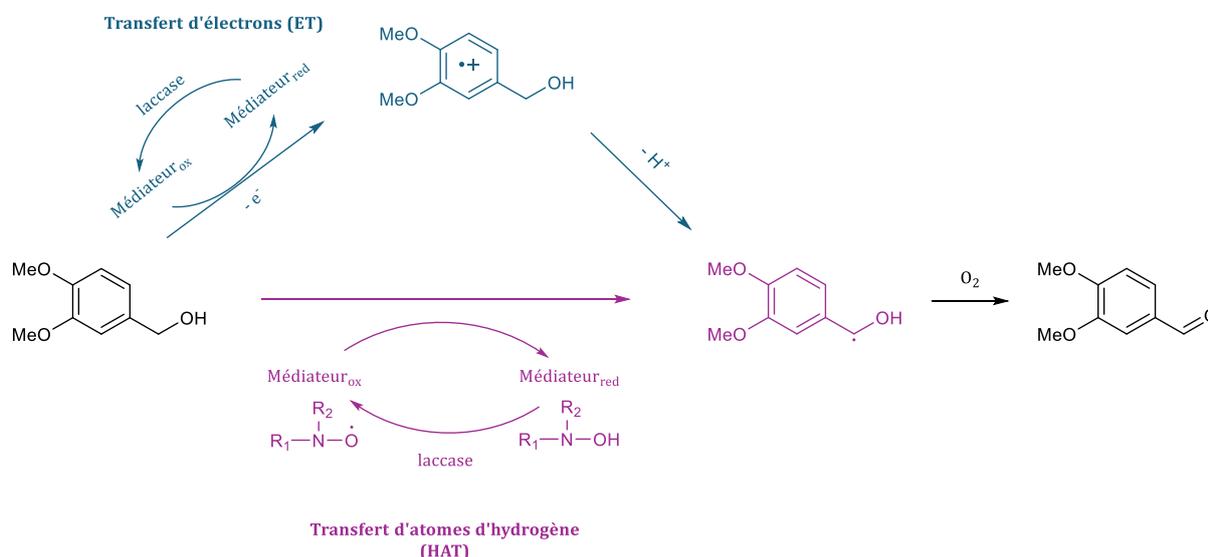


Figure I-35 : Mécanismes possibles pour l'oxydation d'un modèle de lignine (l'alcool de vératryle) par le système laccase-médiateur. Adapté de [227]

Bourbonnais *et al.* [185] ont associé une laccase de *Trametes versicolor* à deux médiateurs (ABTS et HOBt) afin de réaliser la délignification de la pâte Kraft. Ils ont également testé d'autres laccases brutes provenant de différents champignons de la pourriture blanche et en ont déduit qu'aucune d'entre elles ne pouvait délignifier efficacement la pâte Kraft sans médiateur. De nombreuses autres études vont dans le même sens. [228–231]

V.5.3. Conclusion sur l'action des laccases

Il est pertinent de se demander quelle est l'action de la laccase sur les liaisons de la lignine. Il est communément admis que la laccase joue un double rôle au sein des parois cellulaires des plantes :

- La laccase permet la lignification radicalaire dans les parois cellulaires, en association avec d'autres enzymes telle que la peroxydase.
- La laccase semble aussi impliquée dans des phénomènes de dépolymérisation de la lignine. Il a été montré que la laccase seule n'est pas réellement efficace pour dégrader la lignine, et que la présence d'un médiateur est requise.

Ces deux phénomènes anaboliques et cataboliques ont été utilisés dans l'industrie des polymères pour synthétiser des nouveaux composés ou apporter des propriétés intéressantes à des composés déjà existants. La Figure I-36 schématise les différentes actions de la laccase.

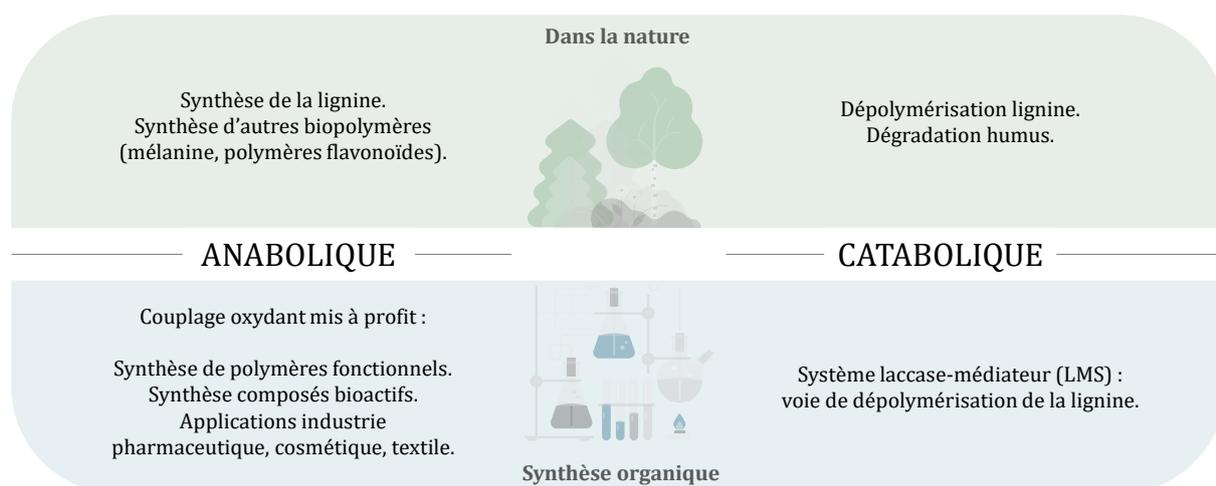


Figure I-36 : Récapitulatif des actions anaboliques et cataboliques de la laccase dans la nature et des emplois qui en ont été tirés en synthèse organique.

Même lorsque ces travaux n'ont pas eu les conséquences escomptées sur la délignification des matériaux lignocellulosiques, ils ont montré qu'un grand nombre de facteurs influencent les réactions : la présence ou non d'un médiateur, la structure et le potentiel redox de la laccase, la structure et le potentiel redox du substrat, le pH du tampon, la température d'incubation, la présence de solvant organique et sa concentration, et enfin l'activité de la laccase utilisée. Pour que la catalyse enzymatique oxydative des composés phénoliques soit efficace, une condition doit être remplie : le potentiel redox de la laccase doit être supérieur à celui d'une sous-unité phénolique de la lignine. Par conséquent, plus le potentiel redox de la laccase est élevé, plus la gamme de substrats qui peuvent être oxydés est large. Les défis futurs pour l'évolution moléculaire des laccases peuvent inclure l'ajustement du potentiel redox de la laccase pour permettre l'oxydation des sous-unités non phénoliques de la lignine sans l'utilisation d'un médiateur.

Le paragraphe suivant introduit une nouvelle enzyme oxydase multi-cuivre : la Bilirubine Oxydase.

V.6. Bilirubine oxydase (EC 1.3.3.5)

V.6.1. Identification et propriétés structurales

Les Bilirubines Oxydases (BOD) ont été découvertes en 1981 par Tanaka et Muraio. [232] Dès lors, l'intérêt de ces enzymes n'a fait qu'augmenter en partie grâce à leurs caractéristiques observées : activité à pH neutre et alcalin, résistance aux ions chlorures et thermostabilité. [233]

Elles appartiennent, comme la laccase, à la famille des oxydases multi-cuivre, et possèdent ainsi 4 atomes de cuivre. D'une manière générale, ces enzymes sont monomères [234] et possèdent une masse molaire entre 50 et 66 kDa. [235] L'analyse des séquences protéiques entre les laccases et

les BODs n'a pas permis de différencier les deux familles. [236] Néanmoins, seulement 8 BODs ont été décrites à ce jour contre plus de 200 laccases.

La Bilirubine Oxydase catalyse l'oxydation de la bilirubine en biliverdine, comme représenté en Figure I-37. [237, 238]

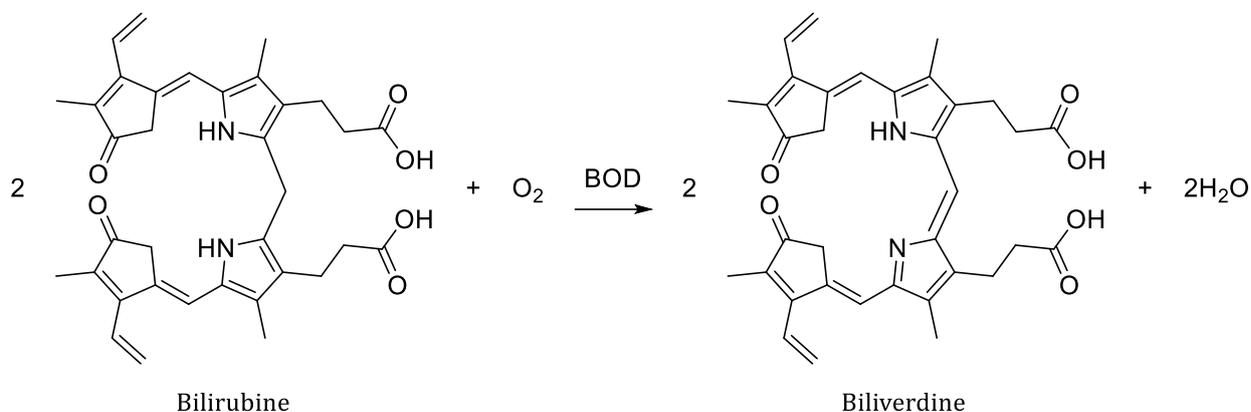


Figure I-37: Oxydation de la bilirubine en biliverdine par la Bilirubine Oxydase (BOD).

Il a été montré, par les équipes de Tanaka et Murao notamment, que les BODs peuvent oxyder d'autres substrats organiques, tels que l'acide ascorbique ou la *p*-phénylènediamine. [239]

Reiss *et al.* ont étudié l'action de différentes MCOs d'origine fongique, végétale et bactérienne sur 91 substrats. Ils utilisent notamment une BOD de *B. Pumilus* d'origine bactérienne. Parmi les composés testés, on peut citer des substrats traditionnels de la laccase tels que l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), ou le 2,6-diméthoxyphénol, ainsi que de nombreux alcools, cétones, amines, esters, acide carboxyliques tous aromatiques, ou encore des benzonitriles ou naphthalènes. Il est observé une oxydation de la part de la BOD *B. Pumilus* de 56% des 91 composés testés, là où la laccase fongique de *Trametes Versicolor* en oxyde 77%. [240]

L'inhibition des oxydases multi-cuivre par l'urée ou le chlore est souvent observée. Les laccases sont connues pour être inhibées par les ions Cl⁻, probablement parce que ces anions se lient au cuivre de type 2, ce qui conduit ensuite à l'inhibition du transfert d'électrons du type 1 vers le type 3. Cependant, l'activité de la BOD ne dépend pratiquement pas de la concentration en ions chlorure. [241]. C'est une des différences entre les laccases et les BODs.

Deux types de BODs existent : fongiques ou bactériennes. Deux d'entre elles ont été particulièrement étudiées dans la littérature : la BOD bactérienne de *Bacillus pumilus* [242, 243] et la BOD fongique de *Magnaporthe oryzae* [244]. Leurs principales caractéristiques sont représentées dans le Tableau I-9.

Tableau I-9 : Comparaisons des caractéristiques des BODs de *B. pumilus* et *M. oryzae*.

BOD	<i>B. pumilus</i>	<i>M. oryzae</i>
Organisme d'origine	Endospore Cota	Pyriculariose du riz
Production	Bactérie <i>Escherichia coli</i>	Levure <i>Pichia pastoris</i>
Masse molaire	59 kDa	63,7 kDa
Thermostabilité (activité après 300 min d'incubation à 37°C)	100%	70 %
Résistance au chlore (activité après ajout de 150 mM NaCl)	100%	40%
Potentiel redox à pH 7	360 mV vs Ag/AgCl	400 mV vs Ag/AgCl

V.6.2. Applications

V.6.2.a. Capteurs médicaux et bio-batteries

La première utilisation de la BOD a été de détecter la présence de bilirubine dans l'organisme. La bilirubine est un pigment jaune, produit lors de la destruction des globules rouges par la dégradation de l'hémoglobine. Un taux élevé de bilirubine dans le sang peut avoir des conséquences graves telles que des maladies cardiovasculaire, jaunisse, hépatite et même un type de lésion cérébrale appelé kernicterus. [245] L'utilisation de BOD pour la détection électrochimique de la bilirubine a été rapportée. [246]

Pour fabriquer des dispositifs médicaux personnels, il faut des technologies biocompatibles, portables et implantables, car ils entrent en contact avec le corps humain ou y sont insérés. Cela signifie que les dispositifs ont besoin de leur propre source d'énergie pour fournir de l'électricité en continu. À cet égard, les piles à biocarburant enzymatique peuvent être considérées comme une source d'énergie appropriée pour les dispositifs médicaux implantables ou les capteurs autoalimentés. Ces appareils mettent à profit la chimiosélectivité, régiosélectivité et stéréosélectivité des enzymes qui peuvent se lier spécifiquement à un substrat donné. [247–249] C'est pourquoi la détection électrochimique de la bilirubine à l'aide de la BOD en tant que biocapteur a été étudiée dans le domaine médical. [234, 235, 250]

V.6.2.b. Décoloration

L'industrie textile utilise une énorme quantité d'eau pour le traitement et la fabrication des tissus, avec 100 à 180 litres d'eau pour produire 1 kg de tissu. [251, 252] Cette eau usée contient des colorants qui constituent des polluants toxiques et souvent cancérigènes. Selon la nature du colorant, entre 2 % et 50 % de son poids total utilisé dans le processus se retrouve dans les eaux

usées. [253–255] Alors que la capacité de différentes espèces de laccases à décolorer les colorants synthétiques est bien documentée, seul un nombre limité d'études sur les BODs rapportent leur utilisation pour de telles applications. [256–260] Ces articles montrent comment les BODs ont une efficacité élevée pour décolorer des composés tels que le bleu de Trypan et le bleu R Remazol brillant dans des conditions de pH neutres à légèrement basiques. Les BODs pourraient donc être une alternative intéressante aux laccases, jusqu'à présent limitées à la décoloration des effluents acides.

V.6.3. BOD et lignine

À notre connaissance, un seul article mentionne le traitement de la lignine avec la BOD : « Protéines similaires à la bilirubine-oxydase de *Podospora anserina* : enzymes thermostables prometteuses pour la transformation de la biomasse végétale » par Xie *et al.* (2015)

Les auteurs ne travaillent pas avec des enzymes recombinantes, c'est-à-dire produites en laboratoire avec un microorganisme modèle, mais avec des versions mutées (délétion de différents gènes). La croissance des mutants a été évaluée sur des matériaux contenant de la lignine (copeaux de bois ou poudre de lignine), en les inoculant sur le milieu à 27°C. La perte de poids du milieu a été mesurée. Néanmoins, les conclusions et les discussions de l'article restent incertaines et discutables, car les protéines sont appelées « bod1 » et « bod2 » mais ils concluent que ce ne sont pas des BOD mais plutôt des laccases.

VI. Enzymes alcaliphiles

Un des freins principaux pour explorer le traitement enzymatique de la lignine par la laccase est le pH de travail. En effet, les laccases ont une activité maximale aux alentours de pH 4-6, en fonction de leur origine. Cependant, à de tels pH, la lignine Kraft ainsi que la majorité des lignines industrielles sont très peu solubles. La modification des enzymes offre une voie prometteuse pour adapter leurs propriétés catalytiques à des conditions spécifiques. En effet, les enzymes peuvent être mutées pour fonctionner dans des environnements inhabituels, tels que des pH basiques, où la lignine est soluble. Cette adaptation nécessite souvent des modifications ciblées au niveau des acides aminés fonctionnellement importants, permettant ainsi aux enzymes de maintenir leur activité catalytique dans des conditions alcalines, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles applications dans le domaine de la dépolymérisation de la lignine.

L'existence d'enzymes, et plus spécifiquement de laccases modifiées ayant une activité accrue envers les composés phénoliques tels que le 2,6-diméthoxyphénol ou le gaiacol dans des conditions alcalines (pH \geq 8,0) a été rapportée. [261] Il existe notamment une vingtaine d'études intéressantes et récentes qui discutent du traitement enzymatique de lignines avec des laccases alcaliphiles.

Une première partie d'entre elles montre un résultat de polymérisation de différentes lignines, et c'est l'objet du prochain paragraphe.

VI.1. Polymérisation de lignines avec des laccases alcaliphiles

Tableau I-10 : Aperçu des études scientifiques concernant la polymérisation induite par des laccases alcaliphiles de différentes sources de lignines, ou modèles de lignine, dans diverses conditions.

*Composés aromatiques de l'étude de Renfeld : acide férulique, alcool coniférylique, acide caféique, gaïacol, 3-méthoxycatécol.

(f) fongique and (b) bactérienne ; AL : Lignine Alkali; KL : Lignine Kraft; MWL : Lignine Milled Wood (de bois moulu) ; OSL : Lignine Organosolv ; GGGE : guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether ; SW et HW : soft wood and hard wood ; WS : wheat straw (paille de blé).

Substrat	Laccase	pH	Source
Dimère GGGE	CtLac (<i>Caldalkalibacillus thermarum</i> TA2.A1) (b)	8	Ghatge (2018) [262]
Composés aromatiques*	Oxydases de <i>Ascomycete Curvularia geniculata</i> VKM F-3561 (f)	7,2	Renfeld (2023) [263]
SW et HW KL	<i>M. albomyces</i> (MaL) (f) <i>S. ipomoea</i> (SiLA) (b)	7-10	Moya (2011) [264]
HW KL	<i>Myceliophthora thermophila</i> de Novozymes (b)	7,3	Gouveia (2013) [265]
KL / KL fractionnée	CotA (b)	9	Mayr (2021) [266]
AL	<i>Bacillus ligniniphilus</i> L1 (b)	7,9	Morales (2020) [267]
AL	Ms-Lac (f)	10	Qiu (2008) [268]
WS AL explosée à la vapeur	MSLac (<i>Mycelia Sterilia</i> YY-5) (f)	10	Weihua (2008) [269]
AL fractionnée	MetZyme® (MetGen) (b)	10	Wang (2021) [270]
AL fractionnée	MetZyme® de (MetGen) (b)	10,5	Lu (2024) [271]

Ghatge *et al.* ont examiné l'action d'une laccase bactérienne alcaliphile, CtLac, dérivée de la souche TA2.A1 de *Caldalkalibacillus thermarum* sur le modèle dimère de la lignine guaiacylglycérol- β -guaiacyl éther (GGGE). Après traitement dans un tampon citrate-phosphate (pH 8; 1 mM CuCl₂) à 70°C pendant 12h, le produit principal était un produit de couplage 5-5', indiquant le potentiel de CtLac à procéder au couplage oxydant dans des conditions alcalines et à haute température. [262] Renfeld *et al.* ont exploré une nouvelle laccase fongique active à pH 6,8-7,5 (considéré comme légèrement alcalin par les auteurs). Ils ont montré que l'acide férulique, l'acide caféique, le gaïacol et le 3-méthoxycatécol formaient des bi-, tri- ou tétramères, voire des polymères dans le cas de l'alcool coniférylique. [263] Moya *et al.* ont étudié la polymérisation des lignines Kraft de résineux (Indulin AT) et de feuillus avec deux laccases : MaL (fongique) et SiLA (bactérienne). Les réactions ont été effectuées dans un tampon phosphate (pH 7-8) et un tampon glycine-NaOH (pH 9-10) à 30-50°C. La polymérisation a été confirmée par une augmentation des masses molaires

déterminée par spectrométrie de masse. MaL a permis la polymérisation la plus importante avec la lignine Kraft de résineux (de 3 700 à 9 400 g/mol à pH 8), tandis que SilA a provoqué une augmentation de masse molaire maximale avec la lignine d'écicéa (augmentation de plus de 2 300 g/mol). [264]

Gouveia et Mayr ont investigué la modification de la lignine Kraft sous différents traitements par laccases bactériennes. Gouveia *et al.* ont utilisé une laccase *Myceliophthora thermophila* de l'entreprise Novozyme pour polymériser la lignine Kraft de feuillus dans un tampon phosphate (pH 6-8) à 60-80°C pendant 2-6h, conduisant à une augmentation de 69 fois de la masse molaire. [265] Mayr *et al.* ont utilisé la laccase CotA en conditions alcalines (NaOH, pH 9, pendant la nuit) sur de la lignine Kraft pure et fractionnée. Ils observent une réduction de 95 % de la fluorescence, jusqu'à 65 % de diminution des phénols, et des augmentations significatives de la viscosité et de la masse molaire. [266] Morales *et al.* ont démontré que le traitement de la lignine alcaline avec la laccase bactérienne *Bacillus ligninophilus* dans un tampon MM63 à pH 7,9 a conduit à une augmentation de la masse molaire d'un facteur 6,75, indiquant une polymérisation significative. [267] De même, Qiu et Weihua ont utilisé la laccase fongique MS-Lac à pH 10 sur de la lignine alcaline de paille de blé exposée à la vapeur, entraînant une augmentation de la masse molaire et une réduction de la polydispersité. [268]

Wang et Lu ont utilisé une enzyme bactérienne MetGen® pour modifier des lignines alcalines fractionnées. L'étude de Wang a consisté à fractionner la lignine avec de l'isopropanol, de l'éthanol et du méthanol, suivie d'une polymérisation avec une laccase alcaliphile dans NaOH (pH 10). Ce traitement a entraîné une augmentation de 13,1 fois de la masse molaire après 6h, avec des masses molaires initiales plus faibles montrant un couplage plus important. [270] Lu *et al.* ont étudié la polymérisation de la lignine alcaline de bouleau fractionnée dans de l'isopropanol, dans NaOH (pH 10,5) à 40°C pendant 3h. La copolymérisation avec des tanins a également été explorée, formant des liaisons C-C et C-O-C entre la lignine et les tanins, démontrant la polyvalence des laccases dans la formation de structures polymères complexes. [271]

Toutes ces études montrent une augmentation de la masse molaire et une diminution de la dispersité, grâce à la SEC. Quelques une d'entre elles utilisent la spectroscopie RMN afin d'élucider la structure de la lignine issue de la polymérisation : la RMN du phosphore montre une chute des groupements hydroxyles phénoliques, et la RMN 2D-HSQC montre une condensation lignine-lignine en positions C₂, C₅ et C₆.

VI.2. Dépolymérisation de lignines avec des laccases alcaliphiles

Bien que la modification de la lignine par les laccases alcaliphiles se soit principalement concentrée sur la polymérisation, plusieurs études dans la littérature mettent également en

évidence des cas de dépolymérisation de la lignine dans des conditions alcalines. Ces études sont présentées dans le Tableau I-11.

Tableau I-11 : Aperçu des études scientifiques concernant la dépolymérisation induite par des laccases alcaliphiles de différentes sources de lignines dans diverses conditions.

(f) fongique et (b) bactérienne; AL : lignine Alkaline ; KL : Lignine Kraft ; MWL : Lignine Milled Wood (de bois moulu) ; OSL : Lignine Organosolv ; SW et HW : soft wood and hard wood ; WS : wheat straw (paille de blé).

Substrat	Laccase	pH	Source
AL	<i>Bacillus ligniniphilus</i> L1 (b)	9	Zhu (2017) [272]
AL	<i>Chitinophaga</i> sp. CB10 : Lac_CB10 (b)	10,5	Buzzo (2024) [273]
AL	<i>Sutcliffiella</i> sp. NC1 (b)	11	Xu (2023) [274]
SW pâte bisulfite	SN4 laccase (b)	9	Sondhi (2015) [275]
METNIN macro (Metgen Oy)	MetZyme® LIGNO™ (b)	9,5	Towle (2024) [276]
OSL et KL	CtLac (from <i>Caldalkalibacillus thermarum</i> strain TA2.A1) (b)	8	Yang (2019) [277]
Paille de riz	CtLac (from the <i>Caldalkalibacillus thermarum</i> strain TA2.A1) (b)	8	Yang (2023) [278]
¹³ C-DHP	LacOST51 (b)	8	Levy-Booth (2022) [279]
Céréales de maïs, peupliers et pins prétraités à la vapeur d'eau	sLac (from <i>Myxomatosia</i> sp. 75iv3) (b)	8	Singh (2017) [280]
Lignine de bioraffinerie HW (fractionnée à l'éthanol)	<i>C. cinerea</i> (rCcLcc9) (f)	7	Kontro (2021) [281]

Buzzo *et al.* ont montré que 52 % du matériau initial était dégradé en 32 h grâce à l'absorbance UV-vis. De plus, ils ont estimé la dégradation grâce à la microscopie électronique à balayage (SEM), montrant que la morphologie de la lignine non traitée était largement altérée après traitement, sans confirmation de changements structurels au niveau du polymère. [273] Sondhi *et al.* ont évalué les capacités de blanchiment de la laccase SN4 sur la lignine à pH 9. Ils ont observé une diminution du nombre kappa et une augmentation de la blancheur, confirmant la capacité de blanchiment du système. [275] Xu *et al.* ont traité de la lignine alcaline avec une laccase bactérienne à pH 11 pendant 48 h à 30 °C. Le clivage des cycles aromatiques a été observé par RMN 2D-HSQC, ainsi qu'une diminution de la taille des particules de lignine par DLS, dans des conditions aqueuses à pH 11. [274] Récemment, Towle *et al.* ont développé une nouvelle méthode d'analyse : la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique à transformée de Fourier (ESI-FT-ICR MS). Dans leur étude, ils ont traité une macrolignine METNIN fournie par Metgen avec

MetZyme® dans une solution d'acétate d'ammonium 200 mM à pH 9,5, pendant 24 h à 25 °C. La RMN 2D-HSQC a montré une perte de 50 % des signaux liés aux liaisons β - β . L'ESI-FT-ICR MS a révélé que le syringarésinol était une structure ciblée par la laccase MetZyme®, avec une diminution de 95 %. [276]

Zhu, Yang, Levy-Booth, Singh, et Kontro ont montré que le traitement enzymatique de la lignine avec leurs laccases alcaliphiles bactériennes (à l'exception de Kontro qui a utilisé une laccase fongique de *C. cinerea*) produisait des composés aromatiques. L'utilisation de la SEC ou de la GC-MS leur a permis de détecter la production de monomères de lignine de valeur, tels que la vanilline, le p-hydroxybenzaldéhyde ou le syringaldéhyde. Les produits obtenus ainsi que leurs proportions lorsqu'indiquées, sont résumés en Figure I-38.

%	Zhu (2017)	Yang (2019) OSL	Yang (2019) KL	Yang (2023)	Levy-Booth (2022)	Singh (2017)	Kontro (2021)
2,6-dimethoxy benzoquinone					nd		
2,6-dimethoxybenzene-1,4-diol						nd	
3-Ethoxy-4-hydroxymandelic acid	1,5						
4-(3-Hydroxybutyl)-2-methoxyphenol	3,6						
4-Allyl-2-methoxyphenol	2,7						
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	0,9						
4-Hydroxyacetophenone	14,5						
4-Hydroxybenzaldehyde	0,9						
4-Hydroxy-benzoic acid	4,4					nd	
4-hydroxyphenylacetic acid	7,2						
Benzaldehyde	0,9						
Benzene	0,7						
Benzoic acid	4,7						
Guaiacol	1,7						
Homosyringaldehyde		27,7		5,9			
Homovanillyl aldehyde			26				
Palmitic acid						nd	
p-Coumaric acid				38,5			
Phenylacetic acid	3,5						
p-Hydroxybenzaldehyde		34,4	21,2	31,7			
p-Hydroxybenzoic acid							nd
Stearic acid						nd	
Syringaldehyde		5,8	8	12,1	nd		nd
Syringic acid							nd
Vanillic acid	44,2			3			nd
Vanillin	8,7	32	44,7	8,8	nd	nd	nd
Vanillyl mandelic acid						nd	

Figure I-38 : Produits issus de la dépolymérisation de plusieurs lignines par des laccases alcaliphiles. [272, 277-281]. Nd : non défini. Les chiffres représentent une proportion (%) des produits identifiés. Aucun rendement global n'a été rapporté.

Zhu *et al.* ont identifié 15 composés via GC-MS, en rapportant les pourcentages dans la Figure I-38, et ont observé une dégradation de 39 % de la lignine par diminution d'absorbance, bien qu'aucun rendement global des produits de dépolymérisation n'ait été fourni. [272]

De manière similaire, Yang *et al.* (2019, 2023) n'ont pas rapporté de rendements, présentant les changements sous forme de pourcentages d'aire EIC (chromatogrammes d'ions extraits) par HPLC-MS, par rapport aux échantillons non traités. [277, 278] Pour ce présent manuscrit, les pourcentages des produits obtenus ont été standardisés pour totaliser 100 %. Levy-Booth et Singh ont détecté des produits par HPLC sans indication de rendement, tandis que Kontro a trouvé un rapport syringyle/guaiacyl de 3:1 en utilisant l'HPLC. [279–281]

D'après les résultats résumés dans le tableau, la vanilline et le p-hydroxybenzaldéhyde sont les composés phénoliques les plus fréquemment détectés. On peut se demander si les laccases utilisées présentent une capacité de sélectivité. L'étude de Levy-Booth n'a identifié que trois produits de dégradation, mais il est important de noter que le matériau de départ était du DHP, qui ressemble à une homolignine et possède une structure plus simple comparée aux lignines industrielles plus complexes. Cela pourrait expliquer la diversité limitée des produits observés.

VI.3. Polymérisation et dépolymérisation de lignines avec des laccases alcaliphiles

Enfin, certaines études ont montré que la polymérisation et la dépolymérisation se produisent simultanément lors du traitement de la lignine avec des laccases alcaliphiles (Tableau I-12).

Tableau I-12 : Aperçu des études scientifiques concernant la polymérisation et la dépolymérisation induite par des laccases alcaliphiles de différentes sources de lignines dans diverses conditions.

(f) fongique and (b) bactérienne ; KL : Lignine Kraft ; OSL : Lignine Organosolv ; HW : hard wood ; WS : wheat straw (paille de blé).

Substrat	Laccase	pH	Source
KL d'eucalyptus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (f)	6	Pardo (2018) [282]
KL d'eucalyptus	Li10, Li11 and C-LeB (enzyme-directed evolution & rational design) (f)	9-10	Rodríguez-Escribano (2022) [283]
KL d'eucalyptus	Li10, Li11, and C-LeB (f)	9-10	Rodríguez-Escribano (2023) [284]
HW lignine (fraction alcaline soluble)	MetZyme® lignO™ (b)	10,5	Hämäläinen (2018) [285]
WS or OS lignine (fractions solubles dans l'acétone)	MetZyme® (b)	10,6	Pajer (2024) [286]

Deux études clés portent sur le traitement enzymatique de la lignine Kraft d'eucalyptus à l'aide de laccases alcaliphiles fongiques, chacune offrant des méthodologies et des résultats distincts. Rodríguez-Escribano *et al.* ont mené en 2022 une étude complète sur la lignine Kraft d'eucalyptus dans un tampon B&R (20 mM, pH 9-10) à 30 °C pendant des périodes allant de 2 à 24 h. Le traitement initial de 2 h a montré une augmentation des groupes phénoliques libres, indicatrice de dépolymérisation. Cependant, après 24 h, une diminution de la teneur en hydroxyles phénoliques, associée à une augmentation des masses molaires, suggère une repolymérisation. Les auteurs ont également suggéré que l'utilisation de conditions alternatives, comme l'utilisation de membranes de séparation qui pourraient empêcher la repolymérisation en séparant du milieu réactionnel les petites molécules formées, favorisant ainsi le phénomène de dépolymérisation. Dans une étude ultérieure de Rodríguez-Escribano (2023), la lignine Kraft d'eucalyptus a été traitée de manière similaire dans un tampon B&R à pH 9-10, 30°C pendant 24 h. À pH 9, une diminution de la teneur en phénols, accompagnée d'une augmentation de la teneur en carbonyles, a conduit à une augmentation significative des masses molaires. À pH 10, les contenus phénoliques et carbonyles ont légèrement augmenté, et la SEC a révélé de nouveaux signaux de faible masse molaire. Ainsi, ils ont montré qu'en intégrant un système de séparation par membrane, l'étude a réussi à atténuer la repolymérisation.

Pajer *et al.* ont exploré très récemment (2024) la fractionnement par solvant, afin de travailler avec une fraction de lignine moins dispersée et plus homogène en masse et en fonctionnalité, suivi d'un traitement oxydant utilisant la laccase MetZyme®. Cette approche a permis l'isolation sélective de composés monomères de valeur et de matériaux polymérisés avec une masse molaire et une hydrophobicité considérablement accrues. Le traitement oxydant a été réalisé sur des fractions solubles dans l'acétone de lignine Kraft (KL) et de lignine organosolv de paille de blé (WSL) dans un tampon de glycinate de sodium, à pH 10,6, et la réaction a été menée à 40 °C pendant 2 h. L'étude a révélé que l'équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation est influencé par plusieurs facteurs critiques, notamment la concentration de l'enzyme, le type de substrat et la durée de la réaction. À de faibles concentrations de laccase, la dépolymérisation est favorisée grâce à la capacité de l'enzyme à cliver les liaisons phénoliques, tandis que des concentrations plus élevées favorisent la repolymérisation des fragments résultants. Les caractéristiques du substrat jouent également un rôle, les unités phénoliques terminales étant plus susceptibles de subir une dépolymérisation, tandis que les fragments plus petits de lignine ont tendance à se repolymériser. De plus, des temps de réaction prolongés augmentent la probabilité de repolymérisation après une dépolymérisation initiale.

De manière intéressante, les paramètres établis dans l'étude de Pajer *et al.* ne correspondent pas à ceux observés dans les traitements antérieurs utilisant des laccases alcaliphiles. Morales *et al.* et

Zhu *et al.* ont discuté du traitement de la lignine alcaline avec la même laccase bactérienne *Bacillus ligniniphilus*, dans des conditions alcalines, à pH 7,9 et 9, respectivement. Leurs résultats révèlent cependant des effets opposés : Morales a observé une polymérisation significative, avec une augmentation de 6,75 fois de la masse molaire en nombre, tandis que Zhu a rapporté une dépolymérisation, produisant 15 composés aromatiques distincts. Cela met en évidence l'ambivalence des laccases alcaliphiles sur le même substrat et souligne la complexité de prédire des tendances claires dans leur action enzymatique.

L'identification de tendances claires dans le traitement enzymatique alcalin de la lignine est difficile en raison de l'interaction complexe de facteurs influençant la polymérisation et la dépolymérisation. Dans cette partie, nous avons compilé, à notre connaissance, tous les articles pertinents sur ce sujet et tenté d'identifier des tendances clés et de tirer des conclusions. La comparaison entre les études conduisant à la polymérisation et à la dépolymérisation de la lignine révèle des tendances distinctes en fonction du type de substrat, de la source de l'enzyme et des conditions de réaction. Les études sur la polymérisation impliquent la lignine Kraft (KL), la lignine alcaline fractionnée (AL) et les lignines de résineux/feuillus, avec des réactions favorisant des pH alcalins (7-10,5) et des températures allant de 30 °C à 70 °C. Des laccases bactériennes et fongiques sont utilisées, mais des enzymes bactériennes comme *Bacillus ligniniphilus* et MetZyme® jouent un rôle clé, aux côtés d'enzymes fongiques telles que *Myceliophthora thermophila*. Ces conditions favorisent généralement le couplage oxydant, conduisant à une augmentation des masses molaires. En revanche, les études sur la dépolymérisation utilisent principalement des substrats de plus faible masse molaire comme la pâte au bisulfite et les lignines exposées à la vapeur, souvent traitées avec des laccases bactériennes dans des conditions alcalines plus extrêmes (pH 9-11). Ici, l'accent est mis sur la dégradation des structures de lignine en petits composés aromatiques, facilitée par des laccases bactériennes comme *Chitinophaga sp* et CtLac.

L'utilisation de lignines non traitées ou prétraitées à la vapeur dans la dépolymérisation, par opposition aux lignines fractionnées utilisées dans la polymérisation, souligne le rôle du prétraitement du substrat sur l'action de l'enzyme à son égard. Ces résultats mettent en évidence l'équilibre complexe entre les voies de polymérisation et de dépolymérisation, déterminé par le type d'enzyme, le temps de réaction, le pH et la spécificité du substrat.

VII. Conclusion

Cette étude bibliographique a mis en lumière deux domaines de recherche : la lignine, sa structure, son hétérogénéité et les voies de sa valorisation ; et les enzymes, leur rôle ambivalent dans la déconstruction/polymérisation de la lignine, ainsi que leur utilisation pour valoriser la lignine.

La lignine se situe dans les parois des cellules végétales et confère au bois sa rigidité et sa perméabilité. Sa structure dépend de la source du végétal, des conditions de croissance de la plante et du procédé d'extraction utilisé. De cette hétérogénéité de structure découle une variation des propriétés telles que la solubilité des lignines, et de nombreux défis d'analyse. Une grande quantité de lignine issue de l'industrie papetière, qui valorise la cellulose, est actuellement obtenue sous forme de liqueur noire et brûlée pour fournir de l'énergie aux infrastructures.

L'abondance de la lignine et la richesse de sa structure polyphénolique font de sa valorisation un axe de recherche prometteur.

Pour mieux comprendre la structure complexe de ce biopolymère, des recherches ont été consacrées à la création de modèles simplifiés. Qu'ils soient monomères, oligomères ou polymères, ces modèles permettent d'étudier comment les différentes liaisons présentes dans la structure de la lignine sont synthétisées par voie enzymatique, ou bien modifiées par divers traitements souvent orientés vers sa déconstruction. En effet, la lignine peut être valorisée en étant utilisée en tant qu'additif ou charge, mais la majorité des recherches se tourne vers les voies de dépolymérisation pour obtenir des synthons biosourcés alternatifs à des équivalents pétrosourcés. Bien que de nombreuses stratégies aient été mises en place, comme des voies encourageantes de dépolymérisation thermiques, réductrices ou oxydantes, très peu de méthodes ne permettent à ce jour de dépolymériser des lignines à l'échelle industrielle. La dépolymérisation des lignosulfonates en vanilline par l'entreprise norvégienne Borregaard est un exemple de transformation en produit à haute valeur ajoutée d'un déchet industriel. Une autre option de valorisation de la lignine est la production de fibres de carbone biosourcées. Cependant, ces fibres de carbone ne sont généralement pas composées uniquement de lignine ; elles sont mélangées avec d'autres précurseurs polymères. Par conséquent, les propriétés mécaniques des fibres issues de lignine sont généralement inférieures à celles des fibres de carbone traditionnelles fabriquées à partir de PAN (polyacrylonitrile).

Il a également été discuté de l'action ambivalente des enzymes sur la structure de la lignine. Bien que des informations contradictoires soient présentes dans la littérature, il semblerait que les enzymes multi-cuivre, dont la laccase, permettent la dépolymérisation de la lignine en présence de médiateur. Ces mêmes laccases sont également à l'origine de la biosynthèse de la lignine à

partir des monolignols. Ces deux phénomènes ont été exploités, autant à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle.

Enfin, la description de la Bilirubine Oxydase (BOD), utilisée dans notre projet ANR, a été faite. Cette enzyme multi-cuivre a l'avantage d'être active et stable à des hautes températures (60°C) et des pH alcalins (pH 10). Cet aspect a ouvert la possibilité de traiter la lignine Kraft soluble en milieu alcalin, avec la BOD.

Plusieurs partenaires participent à ce projet ANR : le CRPP est responsable de produire et de fournir l'enzyme BOD, tandis que le centre technique CANOË collabore avec le CRPP sur le filage de fibres de carbone à partir d'une fraction de lignine soluble dans l'eau neutre, obtenue grâce au traitement de la lignine Kraft par la BOD. L'objectif de ce travail de thèse est de comprendre l'action de la BOD sur la structure d'une lignine Kraft Indulin AT. La première partie de ce manuscrit présente un travail préliminaire qui a été mené sur le traitement enzymatique des modèles monomères phénoliques avec la BOD. L'action de la BOD a été comparée à celle de la laccase sur ces phénols. Dans un second temps, des modèles polymères ont subi le traitement enzymatique dans l'objectif de mieux comprendre l'action de la BOD sur des liaisons typiques de lignine. Dans une troisième partie, la lignine Kraft a été caractérisée, et l'étude de sa solubilisation dans différents solvants, y compris le tampon borate à pH 10 initialement utilisé pour le traitement enzymatique a été menée. Pour finir, les fractions solubles dans l'eau neutre obtenues après traitement enzymatique de la lignine Kraft ont été analysées et leur structure investiguée.

VIII. Références bibliographiques

- [1] E. Sjöström, *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. **1997**. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-03289-9>
- [2] Delmer, D.P. (1977). The Biosynthesis of Cellulose and Other Plant Cell Wall Polysaccharides. In: Loewus, F.A., Runeckles, V.C. (eds) *The Structure, Biosynthesis, and Degradation of Wood. Recent Advances in Phytochemistry*, vol 11. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8873-3_2
- [3] M. S. Doblin, I. Kurek, D. Jacob-Wilk, D. P. Delmer, *Plant Cell Physiol.* **2002**, 43 (12), 1407–1420. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf164>.
- [4] M. Ioelovich, *BioResources.* **2008**, 3 (4), 1403–1418. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.3.4.Ioelovich>.
- [5] H. Sixta, *Handbook of Pulp*, Wiley-VCH, Weinheim **2006**. DOI:10.1002/9783527619887
- [6] S. Aminzadeh, L. Zhang, G. Henriksson, *Wood Science and Technology.* **2017**, 51 (6), 1365–1376. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00226-017-0941-6>.
- [7] O. M. Terrett, P. Dupree, *Current Opinion in Biotechnology.* **2019**, 56, 97–104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.010>.
- [8] R. Rinaldi, R. Jastrzebski, M. T. Clough, J. Ralph, M. Kennema, P. C. A. Bruijninx, B. M. Weckhuysen, *Angewandte Chemie International Edition.* **2016**, 55 (29), 8164–8215. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201510351>.
- [9] C. P. Vance, T. K. Kirk, R. T. Sherwood, *Annual Review of Phytopathology.* **1980**, 18 (1), 259–288. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.001355>.
- [10] C. W. Lahive, P. C. J. Kamer, C. S. Lancefield, P. J. Deuss, *ChemSusChem.* **2020**, 13 (17), 4238–4265. DOI: <https://doi.org/10.1002/cssc.202000989>.
- [11] O. Faix, C. Grünwald, O. Beinhoff, **1992**, 46 (5), 425–432. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforschung.1992.46.5.425>.
- [12] C. Lapierre, B. Monties, C. Rolando, **1986**, 40 (2), 113–118. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforschung.1986.40.2.113>.
- [13] S. Constant, H. L. J. Wienk, A. E. Frissen, P. de Peinder, R. Boelens, D. S. van Es, R. J. H. Grisel, B. M. Weckhuysen, W. J. J. Huijgen, R. J. A. Gosselink, et al., *Green Chemistry.* **2016**, 18 (9), 2651–2665. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5GC03043A>.
- [14] A. Colombo, M. Geiker, H. Justnes, R. A. Lauten, K. De Weerd, *Cement and Concrete Research.* **2018**, 107, 188–205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2018.02.021>.
- [15] A. Colombo, M. R. Geiker, H. Justnes, R. A. Lauten, K. De Weerd, *Cement and Concrete Research.* **2017**, 100, 435–444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2017.06.009>.
- [16] S. Xie, Q. Li, P. Karki, F. Zhou, J. S. Yuan, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* **2017**, 5 (4), 2817–2823. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b03064>.
- [17] F.-B. Liang, Y.-L. Song, C.-P. Huang, Y.-X. Li, B.-H. Chen, *Industrial & Engineering Chemistry Research.* **2013**, 52 (3), 1267–1274. DOI: <https://doi.org/10.1021/ie301863e>.
- [18] X. Chen, S. Sun, X. Wang, J. Wen, Y. Wang, X. Cao, T. Yuan, S. Wang, Q. Shi, R. Sun, *Bioresource Technology.* **2020**, 295, 122297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122297>.
- [19] J. D. Garguiak, S. E. Lebo, in *Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives*, Vol. 742, American Chemical Society **1999**.
- [20] J. B. Nelson, R. A. Northey, *Journal of Environmental Management.* **2004**, 73 (4), 333–338. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.07.009>.
- [21] J. Jeon, J.-K. Yoo, S. Yim, K. Jeon, G. H. Lee, J. H. Yun, D. K. Kim, Y. S. Jung, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* **2019**, 7 (21), 17580–17586. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b01924>.
- [22] H.-R. Bjørsvik, F. Minisci, *Organic Process Research & Development.* **1999**, 3 (5), 330–340. DOI: <https://doi.org/10.1021/op9900028>.
- [23] J. E. Holladay, J. F. White, J. J. Bozell, D. Johnson, *Top Value-Added Chemicals from Biomass - Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin* **2007**.
- [24] M. Fache, B. Boutevin, S. Caillol, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* **2016**, 4 (1), 35–46. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01344>.

- [25] G. Zhang, Y. Wen, Z. Liu, S. Zhang, G. Li, *Applied Catalysis A: General*. **2017**, *542*, 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2017.05.004>.
- [26] C. F. Dahl, *Process of manufacturing cellulose from wood, Do.*, US296935A, **1884**.
- [27] J. E. Holladay, J. F. White, J. J. Bozell, D. Johnson, *Top Value-Added Chemicals from Biomass - Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin* **2007**.
- [28] F. S. Chakar, A. J. Ragauskas, *Industrial Crops and Products*. **2004**, *20* (2), 131–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.016>.
- [29] M. N. Belgacem, A. Gandini, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier **2011**. ISBN: 978-0-08-056051-9
- [30] M. Ragnar, G. Henriksson, M. E. Lindström, M. Wimby, J. Blechschmidt, S. Heinemann, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany **2014**. ISBN: 978-3-527-30673-2
- [31] G. Gellerstedt, *Industrial Crops and Products*. **2015**, *77*, 845–854. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.040>.
- [32] J. Gierer, *Wood Science and Technology*. **1985**, *19* (4), 289–312. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00350807>.
- [33] J. Gierer, « The Chemistry of Delignification. A General Concept », vol. 36, n° 1, p. 43-51. **1982**. DOI: 10.1515/Holzforschung.1982.36.1.43.
- [34] L. G. Covinich, M. C. Area, *BioResources*. **2023**, *19* (1), 6–9. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.19.1.6-9>.
- [35] E. Saberikhah, J. M. Rovshandeh, P. Rezayati-Charani, *Cellulose Chemistry Technology*. **2011**, *45*, 67–75.
- [36] L. Jiménez, M. J. de la Torre, J. L. Ferrer, J. C. García, *Process Biochemistry*. **1999**, *35* (1), 143–148. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00045-X).
- [37] A. Rodríguez, A. Moral, R. Sánchez, L. Jiménez, *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*. **2009**, *66* (539).
- [38] M. E. Eugenio, R. Martín-Sampedro, J. I. Santos, B. Wicklein, J. A. Martín, D. Ibarra, *International Journal of Biological Macromolecules*. **2021**, *181*, 99–111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.093>.
- [39] D. S. Zijlstra, A. de Santi, B. Oldenburger, J. de Vries, K. Barta, P. J. Deuss, *J Vis Exp*. **2019**, (143). DOI: <https://doi.org/10.3791/58575>.
- [40] S. Bauer, H. Sorek, V. D. Mitchell, A. B. Ibáñez, D. E. Wemmer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, *60* (33), 8203–8212. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf302409d>.
- [41] A. Rodríguez, L. Serrano, A. Moral, L. Jiménez, *Biochemical Engineering Journal*. **2008**, *42* (3), 243–247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.07.001>.
- [42] A. Ekielski, P. K. Mishra, *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, *22* (1), 63. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010063>.
- [43] H. Hatakeyama, Y. Tsujimoto, M. Ja. Zarubin, S. M. Krutov, T. Hatakeyama, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **2010**, *101* (1), 289–295. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-010-0698-8>.
- [44] R. El Hage, N. Brosse, L. Chrusciel, C. Sanchez, P. Sannigrahi, A. Ragauskas, *Polymer Degradation and Stability*. **2009**, *94* (10), 1632–1638. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.007>.
- [45] X. Erdocia, R. Prado, M. Á. Corcuera, J. Labidi, *Biomass and Bioenergy*. **2014**, *66*, 379–386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.021>.
- [46] L. An, G. Wang, H. Jia, C. Liu, W. Sui, C. Si, *International Journal of Biological Macromolecules*. **2017**, *99*, 674–681. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.015>.
- [47] S.-C. Sun, Y. Xu, J.-L. Wen, T.-Q. Yuan, R.-C. Sun, *Green Chemistry*. **2022**, *24* (15), 5709–5738. DOI: <https://doi.org/10.1039/D2GC01503J>.
- [48] K. Lundquist, A. J. Aasen, K. Daasvatn, B. Forsgren, J.-Å. Gustafsson, B. Högberg, J. Becher, *Acta Chemica Scandinavica*. **1980**, *34b*, 21–26. DOI: <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.34b-0021>.
- [49] K. Lundquist, V. D. Parker, C. Rømming, H.-P. Husson, U. Örn, *Acta Chemica Scandinavica*. **1981**, *35b*, 497–501. DOI: <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.35b-0497>.

- [50] N.-E. E. Mansouri, J. Salvadó, *Industrial Crops and Products*. **2006**, 24 (1), 8–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.10.002>.
- [51] C. Mancera, F. Ferrando, J. Salvadó, N. E. El Mansouri, *Biomass and Bioenergy*. **2011**, 35 (5), 2072–2079. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.001>.
- [52] E. A. Capanema, M. Y. Balakshin, J. F. Kadla, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2004**, 52 (7), 1850–1860. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf035282b>.
- [53] C.-L. Chen, D. Robert, in *Methods in Enzymology*, Vol. 161, Elsevier **1988**.
- [54] S. Ralph, L. Landucci, et J. Ralph, « NMR Database of Lignin and Cell Wall Model Compounds ». **2004**. DOI: 10.11578/2409191
- [55] J.-L. Wen, B.-L. Xue, F. Xu, R.-C. Sun, A. Pinkert, *Industrial Crops and Products*. **2013**, 42, 332–343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.041>.
- [56] A. Zhang, F. Lu, R.-C. Sun, J. Ralph, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58 (6), 3446–3450. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf903998d>.
- [57] P. Karhunen, P. Rummakko, J. Sipilä, G. Brunow, I. Kilpeläinen, *Tetrahedron Letters*. **1995**, 36 (25), 4501–4504. DOI: [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)00769-9](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)00769-9).
- [58] P. Karhunen, P. Rummakko, J. Sipilä, G. Brunow, I. Kilpeläinen, *Tetrahedron Letters*. **1995**, 36 (1), 169–170. DOI: [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(94\)02203-N](https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)02203-N).
- [59] M.-F. Li, S.-N. Sun, F. Xu, R.-C. Sun, *Chemical Engineering Journal*. **2012**, 179, 80–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.060>.
- [60] T.-Q. Yuan, S.-N. Sun, F. Xu, R.-C. Sun, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59 (19), 10604–10614. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf2031549>.
- [61] J.-L. Wen, Z. Sun, Y.-C. Sun, S.-N. Sun, S.-N. Sun, F. Xu, R.-C. Sun, *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. **2010**, 4 (4), 408–425. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbmb.2010.1111>.
- [62] J. C. del Río, J. Rencoret, G. Marques, J. Li, G. Gellerstedt, J. Jiménez-Barbero, Á. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57 (21), 10271–10281. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf900815x>.
- [63] Á. T. Martínez, J. Rencoret, G. Marques, A. Gutiérrez, D. Ibarra, J. Jiménez-Barbero, J. C. del Río, *Phytochemistry*. **2008**, 69 (16), 2831–2843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.09.005>.
- [64] S. D. Mansfield, H. Kim, F. Lu, J. Ralph, *Nature Protocols*. **2012**, 7 (9), 1579–1589. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.064>.
- [65] S. D. Mansfield, H. Kim, F. Lu, J. Ralph, *Nature Protocols*. **2012**, 7 (9), 1579–1589. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.064>.
- [66] M. Talebi Amiri, S. Bertella, Y. M. Questell-Santiago, J. S. Luterbacher, *Chemical Science*. **2019**, 10 (35), 8135–8142. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9SC02088H>.
- [67] M. Sette, R. Wechselberger, C. Crestini, *Chemistry – A European Journal*. **2011**, 17 (34), 9529–9535. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.201003045>.
- [68] Y. Archipov, D. S. Argyropoulos, H. I. Bolker, C. Heitner, *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1991**, 11 (2), 137–157. DOI: <https://doi.org/10.1080/02773819108050267>.
- [69] D. S. Argyropoulos, H. I. Bolker, C. Heitner, Y. Archipov, **1993**, 47 (1), 50–56. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforschung.1993.47.1.50>.
- [70] D. S. Argyropoulos, H. I. Bolker, C. Heitner, Y. Archipov, *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1993**, 13 (2), 187–212. DOI: <https://doi.org/10.1080/02773819308020514>.
- [71] D. S. Argyropoulos, C. Heitner, **1994**, 48 (s1), 112–116. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforschung.1994.48.s1.112>.
- [72] D. S. Argyropoulos, *Research on Chemical Intermediates*. **1995**, 21 (3), 373–395. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03052265>.
- [73] A. Granata, D. S. Argyropoulos, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43 (6), 1538–1544. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00054a023>.
- [74] D. S. Argyropoulos, *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1994**, 14 (1), 65–82. DOI: <https://doi.org/10.1080/02773819408003086>.
- [75] L. G. Akim, D. S. Argyropoulos, L. Jouanin, J.-C. Leplé, G. Pilate, B. Pollet, C. Lapierre, **2001**, 55 (4), 386–390. DOI: <https://doi.org/10.1515/HF.2001.064>.
- [76] K. P. Chan, D. S. Argyropoulos, D. M. White, G. W. Yeager, A. S. Hay, *Macromolecules*. **1994**, 27 (22), 6371–6375. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma00100a021>.

- [77] M. Zawadzki, A. Ragauskas, **2001**, *55* (3), 283–285. DOI: <https://doi.org/10.1515/HF.2001.047>.
- [78] X. Meng, C. Crestini, H. Ben, N. Hao, Y. Pu, A. J. Ragauskas, D. S. Argyropoulos, *Nature Protocols*. **2019**, *14* (9), 2627–2647. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0191-1>.
- [79] A. A. Andrianova, N. A. Yeudakimenka, S. L. Lilak, E. I. Kozliak, A. Ugrinov, M. P. Sibi, A. Kubátová, *Journal of Chromatography A*. **2018**, *1534*, 101–110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.051>.
- [80] F. Xu, J.-X. Sun, R. Sun, P. Fowler, M. S. Baird, *Industrial Crops and Products*. **2006**, *23* (2), 180–193. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.05.008>.
- [81] J. Cao, G. Xiao, X. Xu, D. Shen, B. Jin, *Fuel Processing Technology*. **2013**, *106*, 41–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.06.016>.
- [82] Q. Liu, S. Wang, Y. Zheng, Z. Luo, K. Cen, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **2008**, *82* (1), 170–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2008.03.007>.
- [83] S. Laurichesse, L. Avérous, *Progress in Polymer Science*. **2014**, *39* (7), 1266–1290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>.
- [84] W. G. Glasser, in *Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives*, Vol. 742, American Chemical Society **1999**.
- [85] A. Llevot, *Dimères d'acides Résiniques et de Dérivés de La Lignine : Nouveaux Précurseurs Pour La Synthèse de Polymères Bio-Sourcés*, Thèse de doctorat, Bordeaux **2014**.
- [86] R. M. P. Dias, G. P. de Oliveira, A. C. B. Burtoloso, *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2020**, *18* (25), 4815–4823. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0OB00800A>.
- [87] P. Yates, *Journal of the American Chemical Society*. **1952**, *74* (21), 5376–5381. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01141a047>.
- [88] T. Ye, M. A. McKervey, *Chemical Reviews*. **1994**, *94* (4), 1091–1160. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr00028a010>.
- [89] A. Ford, H. Miel, A. Ring, C. N. Slattery, A. R. Maguire, M. A. McKervey, *Chemical Reviews*. **2015**, *115* (18), 9981–10080. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00121>.
- [90] C. W. Lahive, P. J. Deuss, C. S. Lancefield, Z. Sun, D. B. Cordes, C. M. Young, F. Tran, A. M. Z. Slawin, J. G. de Vries, P. C. J. Kamer, et al., *Journal of the American Chemical Society*. **2016**, *138* (28), 8900–8911. DOI: <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04144>.
- [91] A. L. Flourat, A. A. M. Peru, A. Haudrechy, J.-H. Renault, F. Allais, *Frontiers in Chemistry*. **2019**, *7*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00842>.
- [92] W. G. Forsythe, M. D. Garrett, C. Hardacre, M. Nieuwenhuyzen, G. N. Sheldrake, *Green Chemistry*. **2013**, *15* (11), 3031–3038. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3GC41110A>.
- [93] C. S. Lancefield, N. J. Westwood, *Green Chemistry*. **2015**, *17* (11), 4980–4990. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5GC01334H>.
- [94] T. Kishimoto, Y. Uraki, M. Ubukata, *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2005**, *3* (6), 1067–1073. DOI: <https://doi.org/10.1039/B416699J>.
- [95] T. Kishimoto, Y. Uraki, M. Ubukata, *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2006**, *4* (7), 1343–1347. DOI: <https://doi.org/10.1039/B518005H>.
- [96] T. Kishimoto, Y. Uraki, M. Ubukata, *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2008**, *6* (16), 2982. DOI: <https://doi.org/10.1039/b805460f>.
- [97] K. Freudenberg, *Science*. **1965**, *148* (3670), 595–600. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.148.3670.595>.
- [98] K. Okusa, T. Miyakoshi, C.-L. Chen, *Holzforchung*. **1996**, *50* (1), 15–23. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforchung.1996.50.1.15>.
- [99] H. Erdtman, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*. **1972**, *10* (3), 228–230. DOI: <https://doi.org/10.1002/pol.1972.110100315>.
- [100] B. Cathala, B. Saake, O. Faix, B. Monties, *Polymer Degradation and Stability*. **1998**, *59* (1–3), 65–69. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00161-4).
- [101] J. Newman, R. N. Rej, G. Just, N. G. Lewis, **1986**, *40* (6), 369–373. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforchung.1986.40.6.369>.
- [102] Y. Tokunaga, T. Watanabe, *Holzforchung*. **2023**, *77* (1), 51–62. DOI: <https://doi.org/10.1515/hf-2022-0129>.
- [103] H. Hwang, S.-J. Moon, K. Won, Y. H. Kim, J. W. Choi, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **2015**, *26*, 390–395. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.12.014>.

- [104] F. W. Whitmore, *Phytochemistry*. **1978**, *17* (3), 421–425. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89329-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89329-2).
- [105] G. T. Beckham, *Lignin Valorization: Emerging Approaches*, Royal Society Of Chemistry **2018**.
- [106] D. Areskog, J. Li, G. Gellerstedt, G. Henriksson, *Biomacromolecules*. **2010**, *11* (4), 904–910. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm901258v>.
- [107] E. A. Agustiany, M. Rasyidur Ridho, M. Rahmi D. N., E. W. Madyaratri, F. Falah, M. A. R. Lubis, N. N. Solihat, F. A. Syamani, P. Karungamye, A. Sohail, et al., *Polymer Composites*. **2022**, *43* (8), 4848–4865. DOI: <https://doi.org/10.1002/pc.26824>.
- [108] W. Su, P. Li, X. Zhao, Z. Luo, W. Wu, *Chung-kuo Tsao Cih/China Pulp and Paper*. **2022**, *41* (10), 96–103. DOI: <https://doi.org/10.11980/j.issn.0254-508X.2022.10.014>.
- [109] H. Paananen, T. T. Pakkanen, *Holzforchung*. **2020**, *74* (7), 663–672. DOI: <https://doi.org/10.1515/hf-2019-0147>.
- [110] L. Dehne, C. Vila, B. Saake, K. U. Schwarz, *Journal of Applied Polymer Science*. **2017**, *134* (11). DOI: <https://doi.org/10.1002/app.44582>.
- [111] L. Dehne, C. Vila Babarro, B. Saake, K. U. Schwarz, *Industrial Crops and Products*. **2016**, *86*, 320–328. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.005>.
- [112] K. M. Perkins, C. Gupta, E. N. Charleson, N. R. Washburn, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2017**, *530*, 200–208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.061>.
- [113] S. Kusumoto, T. Higashi, Y. Matsumoto, T. Yamada, K. Nozaki, *Polymer Journal*. **2024**. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41428-023-00867-5>.
- [114] C. Gioia, G. Lo Re, M. Lawoko, L. Berglund, *Journal of the American Chemical Society*. **2018**, *140* (11), 4054–4061. DOI: <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13620>.
- [115] Z. Zhang, Y. Chen, D. Wang, D. Yu, C. Wu, *Industrial Crops and Products*. **2023**, *193*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116119>.
- [116] Y. Ge, Z. Li, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2018**, *6* (5), 7181–7192. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01345>.
- [117] M. Abdollahi, A. G. Motaie, *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*. **2021**, *34* (5), 359–371. DOI: <https://doi.org/10.22063/IJPST.2021.2843.2049>.
- [118] P. J. Ratri, D. R. Nainggolan, N. T. Berghuis, *Materials Science Forum*. **2022**, *1076*, 119–132. DOI: <https://doi.org/10.4028/p-6uf3yi>.
- [119] J. Cheng, S. Zhang, C. Fang, L. Ma, J. Duan, X. Fang, R. Li, *Molecules*. **2023**, *28* (13). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28135031>.
- [120] N. Ahadyani, M. Abdollahi, *Polymer Bulletin*. **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00289-023-05103-x>.
- [121] H. Chen, X. Qu, N. Liu, S. Wang, X. Chen, S. Liu, *Chemical Engineering Research and Design*. **2018**, *139*, 248–258. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.09.028>.
- [122] J. A. Sirviö, M. Visanko, *Journal of Hazardous Materials*. **2020**, *383*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121174>.
- [123] E. Ungureanu, C. Samuil, D. C. Țopa, O. C. Ungureanu, B.-M. Tofanică, M. E. Fortună, C. O. Brezuleanu, *Crystals*. **2024**, *14* (4). DOI: <https://doi.org/10.3390/cryst14040381>.
- [124] D. Damayanti, Y. R. Wulandari, H.-S. Wu, *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis*. **2020**, *15* (2), 432–453. DOI: <https://doi.org/10.9767/bcrec.15.2.7249.432-453>.
- [125] A. Jensen, J. B. Nielsen, A. D. Jensen, C. Felby, *RSC Energy and Environment Series*. **2018**, *2018-January* (19), 74–107. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781788010351-00074>.
- [126] A. Ahlbom, M. Maschietti, R. Nielsen, M. Hasani, H. Theliander, *Holzforchung*. **2023**, *77* (3), 159–169. DOI: <https://doi.org/10.1515/hf-2022-0146>.
- [127] N. A. Bobrova, I. I. Mishanin, A. E. Koklin, V. I. Bogdan, *Russian Journal of Physical Chemistry B*. **2022**, *16* (7), 1200–1203. DOI: <https://doi.org/10.1134/S199079312207003X>.
- [128] R. Roy, B. Jadhav, M. S. Rahman, D. E. Raynie, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. **2021**, *4*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100052>.
- [129] J.-Y. Kim, H. Hwang, S. Oh, Y.-S. Kim, U.-J. Kim, J. W. Choi, *International Journal of Biological Macromolecules*. **2014**, *66*, 57–65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.013>.

- [130] T. Ročník, B. Likozar, E. Jasiukaitytė-Grojzdek, M. Grilc, *Chemical Engineering Journal*. **2022**, 448. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137309>.
- [131] X. Erdocia, R. Prado, M. Á. Corcuera, J. Labidi, *Frontiers in Energy Research*. **2014**, 2 (APR). DOI: <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00013>.
- [132] B. Palianytsia, T. Kulik, O. Dudik, T. Cherniavska, O. Tonkha, *Springer Proceedings in Physics*, Vol. 155, **2014**. DOI: 10.1007/978-3-319-05521-3_3.
- [133] D. Forchheim, U. Hornung, A. Kruse, T. Sutter, *Waste and Biomass Valorization*. **2014**, 5 (6), 985–994. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9307-6>.
- [134] A. Diop, K. Jradi, C. Daneault, D. Montplaisir, *BioResources*. **2015**, 10 (3), 4933–4946. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.10.3.4933-4946>.
- [135] J. Zakzeski, P. C. A. Bruijninx, A. L. Jongerius, B. M. Weckhuysen, *Chemical Reviews*. **2010**, 110 (6), 3552–3599. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr900354u>.
- [136] Y. Shao, Q. Xia, L. Dong, X. Liu, X. Han, S. F. Parker, Y. Cheng, L. L. Daemen, A. J. Ramirez-Cuesta, S. Yang, et al., *Nature Communications*. **2017**, 8 (1), 16104. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms16104>.
- [137] D. Meier, R. Ante, O. Faix, *Bioresource Technology*. **1992**, 40 (2), 171–177. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90205-C](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90205-C).
- [138] A. Oasmaa, R. Alén, D. Meier, *Bioresource Technology*. **1993**, 45 (3), 189–194. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90111-N](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90111-N).
- [139] A. Oasmaa, A. Johansson, *Energy Fuels*. **1993**, 7 (3), 426–429. DOI: <https://doi.org/10.1021/ef00039a015>.
- [140] D. Bourbiaux, J. Pu, F. Rataboul, L. Djakovitch, C. Geantet, D. Laurenti, *Catalysis Today*. **2021**, 373, 24–37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2021.03.027>.
- [141] Borregaard, “Biovanillin,” <https://www.borregaard.com/product-areas/biovanillin/> (Accessed on July 19, 2022), **n.d.**
- [142] D. Bourbiaux, J. Pu, F. Rataboul, L. Djakovitch, C. Geantet, D. Laurenti, *Catalysis Today*. **2021**, 373, 24–37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2021.03.027>.
- [143] T. Voithl, P. R. von Rohr, *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **2010**, 49 (2), 520–525. DOI: <https://doi.org/10.1021/ie901293p>.
- [144] D. Bourbiaux, J. Pu, F. Rataboul, L. Djakovitch, C. Geantet, D. Laurenti, *Catalysis Today*. **2021**, 373, 24–37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2021.03.027>.
- [145] J. Zakzeski, P. C. A. Bruijninx, A. L. Jongerius, B. M. Weckhuysen, *Chemical Reviews*. **2010**, 110 (6), 3552–3599. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr900354u>.
- [146] S. Das, J. Warren, D. West, S. M. Schexnayder, *Global Carbon Fiber Composites Supply Chain Competitiveness Analysis*, National Renewable Energy Lab. (NREL), Golden, CO (United States) **2016**.
- [147] S. Das, *The International Journal of Life Cycle Assessment*. **2011**, 16 (3), 268–282. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11367-011-0264-z>.
- [148] A. Bengtsson, A. Landmér, L. Norberg, S. Yu, M. Ek, E. Brännvall, M. Sedin, *Fibers*. **2022**, 10 (12), 108. DOI: <https://doi.org/10.3390/fib10120108>.
- [149] J. M. Rosas, R. Berenguer, M. J. Valero-Romero, J. Rodríguez-Mirasol, T. Cordero, *Frontiers in Materials*. **2014**, 1. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmats.2014.00029>.
- [150] Y. Imura, R. M. C. Hogan, M. Jaffe, in *Advances in Filament Yarn Spinning of Textiles and Polymers*, Elsevier **2014**.
- [151] Uraki, S. Kubo, N. Nigo, Y. Sano, et T. Sasaya, *Holzforchung* vol. 49, n° 4, p. 343-350, **1995**, DOI: 10.1515/hfsg.1995.49.4.343.
- [152] H. Qu, M. Skorobogatiy, in *Electronic Textiles*, Elsevier **2015**.
- [153] K. Sudo, K. Shimizu, *Journal of Applied Polymer Science*. **1992**, 44 (1), 127–134. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.1992.070440113>.
- [154] S. Kubo, J. F. Kadla, *Journal of Polymers and the Environment*. **2005**, 13 (2), 97–105. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-005-2941-0>.
- [155] J. F. Kadla, S. Kubo, R. A. Venditti, R. D. Gilbert, A. L. Compere, W. Griffith, *Carbon*. **2002**, 40 (15), 2913–2920. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6223\(02\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6223(02)00248-8).

- [156] M. Culebras, A. Beaucamp, Y. Wang, M. M. Clauss, E. Frank, M. N. Collins, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2018**, *6* (7), 8816–8825. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01170>.
- [157] S. Wang, Z. Zhou, H. Xiang, W. Chen, E. Yin, T. Chang, M. Zhu, *Composites Science and Technology*. **2016**, *128*, 116–122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2016.03.018>.
- [158] O. Hosseinaei, D. P. Harper, J. J. Bozell, T. G. Rials, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2016**, *4* (10), 5785–5798. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01828>.
- [159] E. Jakab, O. Faix, F. Till, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **1997**, *40–41*, 171–186. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(97\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(97)00046-6).
- [160] Y. Luo, M. E. A. Razzaq, W. Qu, A. A. B. A. Mohammed, A. Aui, H. Zobeiri, M. M. Wright, X. Wang, X. Bai, *Green Chemistry*. **2024**, *26* (6), 3281–3300. DOI: <https://doi.org/10.1039/D3GC04288J>.
- [161] Q. Li, C. Hu, H. Clarke, M. Li, P. Shamberger, W. Wu, J. S. Yuan, *Chemical Communications*. **2019**, *55* (84), 12655–12658. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9CC05016G>.
- [162] J. Lu, W. Li, H. Kang, L. Feng, J. Xu, R. Liu, *Polymer Testing*. **2020**, *81*, 106267. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106267>.
- [163] J. Mikkilä, M. Trogen, K. A. Y. Koivu, J. Kontro, J. Kuuskeri, R. Maltari, Z. Dekere, M. Kemell, M. R. Mäkelä, P. A. Nousiainen, et al., *ACS Omega*. **2020**, *5* (11), 6130–6140. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00142>.
- [164] Q. Li, S. Xie, W. K. Serem, M. T. Naik, L. Liu, J. S. Yuan, *Green Chemistry*. **2017**, *19* (7), 1628–1634. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6gc03555h>.
- [165] T. K. Kirk, M. Tien, P. J. Kersten, M. D. Mozuch, B. Kalyanaraman, *Biochemical Journal*. **1986**, *236* (1), 279–287. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2360279>.
- [166] K. E. Hammel, D. Cullen, *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, *11* (3), 349–355. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.02.003>.
- [167] V. Sáez-Jiménez, J. Rencoret, M. A. Rodríguez-Carvajal, A. Gutiérrez, F. J. Ruiz-Dueñas, A. T. Martínez, *Biotechnology for Biofuels*. **2016**, *9* (1), 198. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0615-x>.
- [168] T. Mester, K. Ambert-Balay, S. Ciofi-Baffoni, L. Banci, A. D. Jones, M. Tien, *Journal of Biological Chemistry*. **2001**, *276* (25), 22985–22990. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M010739200>.
- [169] P. Zucca, A. Rescigno, A. C. Rinaldi, E. Sanjust, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. **2014**, *388–389*, 2–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.09.010>.
- [170] T. Umezawa, T. Higuchi, *FEBS Letters*. **1986**, *205* (2), 293–298. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80915-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80915-2).
- [171] T. Mester, K. Ambert-Balay, S. Ciofi-Baffoni, L. Banci, A. D. Jones, M. Tien, *Journal of Biological Chemistry*. **2001**, *276* (25), 22985–22990. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M010739200>.
- [172] M.-Q. Ai, F.-F. Wang, Y.-Z. Zhang, F. Huang, *Process Biochemistry*. **2014**, *49* (12), 2191–2198. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.001>.
- [173] B. M. Majeke, F.-X. Collard, L. Tyhoda, J. F. Görgens, *Bioresource Technology*. **2021**, *319*, 124152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124152>.
- [174] H. Nishimura, M. Sasaki, H. Seike, M. Nakamura, T. Watanabe, *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2012**, *10* (31), 6432–6442. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2ob25415h>.
- [175] A. N. Kapich, K. A. Jensen, K. E. Hammel, *FEBS Letters*. **1999**, *461* (1), 115–119. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01432-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01432-5).
- [176] A. N. Kapich, T. V. Korneichik, A. Hatakka, K. E. Hammel, *Enzyme and Microbial Technology*. **2010**, *46* (2), 136–140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.014>.
- [177] A. Hatakka, T. Lundell, M. Hofrichter, P. Maijala, in *Applications of Enzymes to Lignocellulosics*, Vol. 855, American Chemical Society **2003**.
- [178] L. G. Rydén, L. T. Hunt, *Journal of Molecular Evolution*. **1993**, *36* (1), 41–66. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02407305>.
- [179] A. Messerschmidt, *Multi-Copper Oxidases*, World Scientific **1997**.
- [180] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chemical Reviews*. **1996**, *96* (7), 2563–2606. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr950046o>.

- [181] A. C. Mot, R. Silaghi-Dumitrescu, *Biochemistry Moscow*. **2012**, 77 (12), 1395–1407. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297912120085>.
- [182] N. Mano, A. de Poulpiquet, *Chemical Reviews*. **2018**, 118 (5), 2392–2468. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00220>.
- [183] E. I. Solomon, A. J. Augustine, J. Yoon, *Dalton Transactions*. **2008**, (30), 3921. DOI: <https://doi.org/10.1039/b800799c>.
- [184] H. Yoshida, *Journal of the Chemical Society, Transactions*. **1883**, 43 (0), 472–486. DOI: <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>.
- [185] R. Bourbonnais, M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, S. Borneman, *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**, 63 (12), 4627–4632. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4627-4632.1997>.
- [186] R. M. Berka, P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, F. Xu, *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**, 63 (8), 3151–3157. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3151-3157.1997>.
- [187] A. Messerschmidt, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi, A. Finazzi-Agró, *Journal of Molecular Biology*. **1992**, 224 (1), 179–205. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90583-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90583-6).
- [188] A. J. Vila, *FEBS Letters*. **1994**, 355 (1), 15–18. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01141-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01141-9).
- [189] M. D. Allendorf, D. J. Spira, E. I. Solomon, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1985**, 82 (10), 3063–3067. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3063>.
- [190] I. M. Pisacha, T. A. B. Perkasa, T. Amnelia, M. Miranti, F. Puspita, Y. Nurulita, T. T. Nugroho, *Journal of Physics: Conference Series*. **2020**, 1655 (1), 012039. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1655/1/012039>.
- [191] P. Baldrian, *FEMS Microbiology Reviews*. **2006**, 30 (2), 215–242. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.
- [192] M. Alcalde, in *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, J. Polaina et A. P. MacCabe, Éd., Dordrecht: Springer Netherlands, **2007**, p. 461–476. DOI: 10.1007/1-4020-5377-0_26.
- [193] L.-L. Kiiskinen, K. Kruus, M. Bailey, E. Ylösmäki, M. Siika-aho, M. Saloheimo, *Microbiology*. **2004**, 150 (9), 3065–3074. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27147-0>.
- [194] O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev, A. I. Yaropolov, *Biochemistry Moscow*. **2007**, 72 (10), 1136–1150. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>.
- [195] C. Sigoillot, E. Record, V. Belle, J. L. Robert, A. Levasseur, P. J. Punt, C. A. M. J. J. van den Hondel, A. Fournel, J. C. Sigoillot, M. Asther, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2004**, 64 (3), 346–352. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1468-3>.
- [196] S. V. Shleev, O. V. Morozova, O. V. Nikitina, E. S. Gorshina, T. V. Rusinova, V. A. Serezhnikov, D. S. Burbaev, I. G. Gazaryan, A. I. Yaropolov, *Biochimie*. **2004**, 86 (9), 693–703. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.08.005>.
- [197] S. Rodríguez Couto, J. L. Toca Herrera, *Biotechnology Advances*. **2006**, 24 (5), 500–513. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>.
- [198] T. Kudanga, B. Nemadziva, M. Le Roes-Hill, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2017**, 101 (1), 13–33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7987-5>.
- [199] N. T. Dittmer, M. R. Kanost, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **2010**, 40 (3), 179–188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.006>.
- [200] R. Ikeda, H. Uyama, S. Kobayashi, *Macromolecules*. **1996**, 29 (8), 3053–3054. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma951810b>.
- [201] T. Kudanga, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, S. Burton, *Enzyme and Microbial Technology*. **2011**, 48 (3), 195–208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.007>.
- [202] C. Silva, T. Matamá, S. Kim, J. Padrão, E. Nugroho Prasetyo, T. Kudanga, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, M. Casal, A. Cavaco-Paulo, *Reactive and Functional Polymers*. **2011**, 71 (7), 713–720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2011.03.011>.

- [203] P. Widsten, C. Heathcote, A. Kandelbauer, G. Guebitz, G. S. Nyanhongo, E. N. Prasetyo, T. Kudanga, *Process Biochemistry*. **2010**, 45 (7), 1072–1081. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.022>.
- [204] S. Nicotra, M. R. Cramarossa, A. Mucci, U. M. Pagnoni, S. Riva, L. Forti, *Tetrahedron*. **2004**, 60 (3), 595–600. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.10.117>.
- [205] S. Thakur, H. Patel, S. Gupte, A. Gupte, in *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology* (Eds: T. Satyanarayana, B. N. Johri), Springer Netherlands, Dordrecht **2012**.
- [206] M. Seki, J. Oikawa, T. Taguchi, T. Ohnuki, Y. Muramatsu, K. Sakamoto, S. Amachi, *Environmental Science & Technology*. **2013**, 47 (1), 390–397. DOI: <https://doi.org/10.1021/es303228n>.
- [207] F. Xu, *Method of Producing Iodine by Use of a Copper Containing Oxidase Enzyme*, United States US5766896A, **1998**.
- [208] J. Ihssen, M. Schubert, L. Thöny-Meyer, M. Richter, *PLOS ONE*. **2014**, 9 (3), e89924. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089924>.
- [209] J. Kulys, I. Bratkovskaja, R. Vidziunaite, *Biotechnology and Bioengineering*. **2005**, 92 (1), 124–128. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.20610>.
- [210] G. Fontana, E. Baldelli, S. Riva, B. Danieli, *Process for the Preparation of Bisindole Alkaloid Derivatives*, European Union EP2135872A1, **2009**.
- [211] F. Sagui, C. Chirivì, G. Fontana, S. Nicotra, D. Passarella, S. Riva, B. Danieli, *Tetrahedron*. **2009**, 65 (1), 312–317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.10.064>.
- [212] J.-R. Jeon, E.-J. Kim, K. Murugesan, H.-K. Park, Y.-M. Kim, J.-H. Kwon, W.-G. Kim, J.-Y. Lee, Y.-S. Chang, *Microbial Biotechnology*. **2010**, 3 (3), 324–335. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00153.x>.
- [213] L. Pereira, C. Bastos, T. Tzanov, A. Cavaco-Paulo, G. M. Guebitz, *Environmental Chemistry Letters*. **2005**, 3 (2), 66–69. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-005-0004-3>.
- [214] T. Tzanov, C. Basto, G. M. Gübitz, A. Cavaco-Paulo, *Macromolecular Materials and Engineering*. **2003**, 288 (10), 807–810. DOI: <https://doi.org/10.1002/mame.200300100>.
- [215] S. Rodriguez-Couto, *TOTEXTILEJ*. **2012**, 5 (1), 1–7. DOI: <https://doi.org/10.2174/1876520301205010001>.
- [216] C. Eggert, U. Temp, K.-E. L. Eriksson, *FEBS Letters*. **1997**, 407 (1), 89–92. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00301-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00301-3).
- [217] H. Bermek, K. Li, K. E.-L. Eriksson, *Journal of Biotechnology*. **1998**, 66 (2), 117–124. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00091-1).
- [218] H.-D. Youn, Y. C. Hah, S.-O. Kang, *FEMS Microbiology Letters*. **1995**, 132 (3), 183–188. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00315-V](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00315-V).
- [219] N. Xie, F. Chapeland-Leclerc, P. Silar, G. Ruprich-Robert, *Environmental Microbiology*. **2014**, 16 (1), 141–161. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12253>.
- [220] K. Li, F. Xu, K.-E. L. Eriksson, *Applied and Environmental Microbiology*. **1999**, 65 (6), 2654–2660.
- [221] H. P. Call, I. Mücke, *Journal of Biotechnology*. **1997**, 53 (2–3), 163–202. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01683-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01683-0).
- [222] A. I. Cañas, S. Camarero, *Biotechnology Advances*. **2010**, 28 (6), 694–705. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.002>.
- [223] L. P. Christopher, B. Yao, Y. Ji, *Frontiers in Energy Research*. **2014**, 2. DOI: 10.3389/fenrg.2014.00012
- [224] P. Baiocco, A. M. Barreca, M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2003**, 1 (1), 191–197. DOI: <https://doi.org/10.1039/B208951C>.
- [225] F. d’Acunzo, P. Baiocco, C. Galli, *New Journal of Chemistry*. **2003**, 27 (2), 329–332. DOI: <https://doi.org/10.1039/B210978F>.
- [226] G. Cantarella, C. Galli, P. Gentili, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2003**, 22 (3), 135–144. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00014-6).
- [227] E. Martin, P. Dubessay, E. Record, F. Audonnet, P. Michaud, *Enzyme and Microbial Technology*. **2023**, 110373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110373>.
- [228] D. Moldes, M. Díaz, T. Tzanov, T. Vidal, *Bioresource Technology*. **2008**, 99 (17), 7959–7965. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.002>.

- [229] V. Vivekanand, P. Dwivedi, A. Sharma, N. Sabharwal, R. P. Singh, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2008**, 24 (12), 2799–2804. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9809-0>.
- [230] K. Knutson, A. Ragauskas, *Biotechnology Progress*. **2004**, 20 (6), 1893–1896. DOI: <https://doi.org/10.1021/bp049833+>.
- [231] M. M. Iracheta-Cárdenas, M. A. Rocha-Peña, L. J. Galán-Wong, K. Arévalo-Niño, O. E. Tovar-Herrera, *Journal of Environmental Management*. **2016**, 177, 93–100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.008>.
- [232] S. Murao, N. Tanaka, *Agricultural and Biological Chemistry*. **1981**, 45 (10), 2383–2384. DOI: <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864896>.
- [233] N. Mano, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2012**, 96 (2), 301–307. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4312-9>.
- [234] V. Hooda, A. Gahlaut, A. Gothwal, V. Hooda, *Biotechnology Letters*. **2017**, 39 (10), 1453–1462. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2396-0>.
- [235] N. Mano, L. Edembe, *Biosensors and Bioelectronics*. **2013**, 50, 478–485. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.014>.
- [236] F. Durand, S. Gounel, N. Mano, *Protein Expression and Purification*. **2013**, 88 (1), 61–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.11.016>.
- [237] L. Weaver, A. Hamoud, D. E. Stec, T. D. Hinds, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **2018**, 314 (6), G668–G676. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00026.2018>.
- [238] S. Koikeda, K. Ando, H. Kaji, T. Inoue, S. Murao, K. Takeuchi, T. Samejima, *Journal of Biological Chemistry*. **1993**, 268 (25), 18801–18809. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46699-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46699-3).
- [239] N. Tanaka, S. Murao, *Agricultural and Biological Chemistry*. **1983**, 47 (7), 1627–1628. DOI: <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10865827>.
- [240] R. Reiss, J. Ihssen, M. Richter, E. Eichhorn, B. Schilling, L. Thöny-Meyer, *PLoS One*. **2013**, 8 (6), e65633. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065633>.
- [241] F. Durand, C. H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R. G. Hadt, E. I. Solomon, N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, 35 (1), 140–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.033>.
- [242] R. Reiss, J. Ihssen, L. Thöny-Meyer, *BMC Biotechnology*. **2011**, 11, 9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-9>.
- [243] F. Durand, C. H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R. G. Hadt, E. I. Solomon, N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, 35 (1), 140–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.033>.
- [244] F. Durand, S. Gounel, C. H. Kjaergaard, E. I. Solomon, N. Mano, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2012**, 96 (6), 1489–1498. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3926-2>.
- [245] M. Kaplan, C. Hammerman, *Clinica Chimica Acta*. **2005**, 356 (1), 9–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.01.008>.
- [246] B. Thangavel, G. Venkatachalam, J. H. Shin, *ACS Applied Bio Materials*. **2024**, 7 (3), 1381–1399. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c01215>.
- [247] Y. Chung, J. Ji, Y. Kwon, *Journal of Materials Chemistry C*. **2019**, 7 (37), 11597–11605. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9TC03071A>.
- [248] K. Hyun, S. Kang, J. Kim, Y. Kwon, *ACS Applied Materials and Interfaces*. **2020**, 12 (20), 23635–23643. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05564>.
- [249] S. Kang, K. Hyun, Y. Chung, Y. Kwon, *Applied Surface Science*. **2020**, 507, 145007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.145007>.
- [250] A. Fortuney, G. G. Guilbault, *Electroanalysis*. **1996**, 8 (3), 229–232. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.1140080306>.
- [251] B. A. Agana, D. Reeve, J. D. Orbell, *Journal of Environmental Management*. **2013**, 114, 445–460. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.047>.
- [252] P. Senthil Kumar, K. Grace Pavithra, in *Water in Textiles and Fashion*, Elsevier **2019**. DOI: [10.1016/B978-0-08-102633-5.00002-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102633-5.00002-6)

- [253] Y. Fu, T. Viraraghavan, *Bioresource Technology*. **2001**, 79 (3), 251–262. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00028-1).
- [254] T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, *Bioresource Technology*. **2001**, 77 (3), 247–255. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00080-8).
- [255] S. Gupta, Y. Mittal, P. Tamta, P. Srivastava, A. K. Yadav, in *Integrated Microbial Fuel Cells for Wastewater Treatment* **2020**.
- [256] Y. Liu, J. Huang, X. Zhang, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **2009**, 108 (6), 496–500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.06.001>.
- [257] L. Pereira, A. V. Coelho, C. A. Viegas, M. M. C. dos Santos, M. P. Robalo, L. O. Martins, *Journal of Biotechnology*. **2009**, 139 (1), 68–77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.09.001>.
- [258] F. Durand, C. H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R. G. Hadt, E. I. Solomon, N. Mano, *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, 35 (1), 140–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.033>.
- [259] F. Durand, S. Gounel, C. H. Kjaergaard, E. I. Solomon, N. Mano, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2012**, 96 (6), 1489–1498. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3926-2>.
- [260] V. Brissos, L. Pereira, F.-D. Munteanu, A. Cavaco-Paulo, L. O. Martins, *Biotechnology Journal*. **2009**, 4 (4), 558–563. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.200800248>.
- [261] M. Gunne, V. B. Urlacher, *PLOS ONE*. **2012**, 7 (12), e52360. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052360>.
- [262] S. Ghatge, Y. Yang, W.-Y. Song, T.-Y. Kim, H.-G. Hur, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2018**, 102 (9), 4075–4086. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8898-4>.
- [263] Z. V. Renfeld, A. M. Chernykh, B. P. Baskunov, A. S. Gaidina, N. M. Myasoedova, A. D. Egorova, O. V. Moiseeva, S. Y. Gorina, M. P. Kolomytseva, *Microorganisms*. **2023**, 11 (11), 2698. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112698>.
- [264] R. Moya, P. Saastamoinen, M. Hernández, A. Suurnäkki, E. Arias, M.-L. Mattinen, *Bioresource Technology*. **2011**, 102 (21), 10006–10012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.046>.
- [265] S. Gouveia, C. Fernández-Costas, M. A. Sanromán, D. Moldes, *Bioresource Technology*. **2013**, 131, 288–294. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.155>.
- [266] S. A. Mayr, R. Subagia, R. Weiss, N. Schwaiger, H. K. Weber, J. Leitner, D. Ribitsch, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22 (23), 13161. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222313161>.
- [267] G. M. Morales, S. S. Ali, H. Si, W. Zhang, R. Zhang, K. Hosseini, J. Sun, D. Zhu, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2020**, 8, 671. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00671>.
- [268] W. Qiu, H. Chen, *Bioresource Technology*. **2008**, 99 (13), 5480–5484. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.014>.
- [269] Q. Weihua, C. Hongzhang, *Bioresource Technology*. **2008**, 99 (13), 5480–5484. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.014>.
- [270] L. Wang, L. Tan, L. Hu, X. Wang, R. Koppolu, T. Tirri, B. van Bochove, P. Ihalainen, L. S. Seleenmary Sobhanadhas, J. V. Seppälä, et al., *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2021**, 9 (26), 8770–8782. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01576>.
- [271] Z. Lu, J. Tienaho, P. Kilpeläinen, L. Wang, H. Zhang, L. Hu, R. Liu, H. Brännström, E. Halmemies, X. Wang, et al., *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2024**, 12 (23), 8765–8779. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c01611>.
- [272] D. Zhu, P. Zhang, C. Xie, W. Zhang, J. Sun, W.-J. Qian, B. Yang, *Biotechnology for Biofuels*. **2017**, 10 (1), 44. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0735-y>.
- [273] B. B. Buzzo, N. S. M. Lima, P. A. M. Pereira, E. S. Gomes-Pepe, C. C. F. Sartini, E. G. D. M. Lemos, *Microbiology Spectrum*. **2024**, 12 (6), e04013-23. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.04013-23>.
- [274] Z. Xu, J. Li, P. Li, C. Cai, S. Chen, B. Ding, S. Liu, M. Ge, M. Jin, *Journal of Bioresources and Bioproducts*. **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2023.09.004>.
- [275] S. Sondhi, P. Sharma, N. George, P. S. Chauhan, N. Puri, N. Gupta, *3 Biotech*. **2015**, 5 (2), 175–185. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0207-z>.

- [276] Z. Towle, F. Cruickshank, C. L. Mackay, D. J. Clarke, L. E. Horsfall, *Analyst*. **2024**, *149* (8), 2399–2411. DOI: <https://doi.org/10.1039/D4AN00124A>.
- [277] Y. Yang, W.-Y. Song, H.-G. Hur, T.-Y. Kim, S. Ghatge, *International Journal of Biological Macromolecules*. **2019**, *124*, 200–208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.144>.
- [278] Y. Yang, S. Ghatge, H.-G. Hur, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2023**, *107* (1), 273–286. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12311-4>.
- [279] D. J. Levy-Booth, L. E. Navas, M. M. Fetherolf, L.-Y. Liu, T. Dalhuisen, S. Renneckar, L. D. Eltis, W. W. Mohn, *The ISME Journal*. **2022**, *16* (8), 1944–1956. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01241-8>.
- [280] R. Singh, J. Hu, M. R. Regner, J. W. Round, J. Ralph, J. N. Saddler, L. D. Eltis, *Scientific Reports*. **2017**, *7* (1), 42121. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep42121>.
- [281] J. Kontro, C. Lyra, M. Koponen, J. Kuuskeri, M. A. Kähkönen, J. Wallenius, X. Wan, J. Sipilä, M. R. Mäkelä, P. Nousiainen, et al., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2021**, *9*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.767139>.
- [282] I. Pardo, D. Rodríguez-Escribano, P. Aza, F. de Salas, A. T. Martínez, S. Camarero, *Scientific Reports*. **2018**, *8* (1), 15669. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34008-3>.
- [283] D. Rodríguez-Escribano, R. Pliego-Magán, F. de Salas, P. Aza, P. Gentili, P. Ihalainen, T. Levée, V. Meyer, M. Petit-Conil, S. Tapin-Lingua, et al., *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. **2022**, *15* (1), 149. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02247-2>.
- [284] D. Rodríguez-Escribano, F. de Salas, R. Pliego, G. Marques, T. Levée, A. Suonpää, A. Gutiérrez, Á. T. Martínez, P. Ihalainen, J. Rencoret, et al., *Polymers*. **2023**, *15* (22), 4433. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym15224433>.
- [285] V. Hämäläinen, T. Grönroos, A. Suonpää, M. W. Heikkilä, B. Romein, P. Ihalainen, S. Malandra, K. R. Birikh, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2018**, *6*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00020>.
- [286] N. Pajer, M. Gigli, C. Crestini, *ChemSusChem*. **2024**, *17* (15), e202301646. DOI: <https://doi.org/10.1002/cssc.202301646>.
- [287] F. d’Acunzo, P. Baiocco, M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, *European Journal of Organic Chemistry*. **2002**, *2002* (24), 4195–4201. DOI: [https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200212\)2002:24<4195::AID-EJOC4195>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1099-0690(200212)2002:24<4195::AID-EJOC4195>3.0.CO;2-X).
- [288] Y. Tobimatsu, T. Takano, H. Kamitakahara, F. Nakatsubo, *Journal of Wood Science*. **2010**, *64* (2), 183–192. DOI: <https://doi.org/10.1515/hf.2010.027>.
- [289] S. Sasaki, T. Nishida, Y. Tsutsumi, R. Kondo, *FEBS Letters*. **2004**, *562* (1–3), 197–201. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00224-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00224-8).

II. Chapitre 2 : Traitements enzymatiques de modèles monomères phénoliques

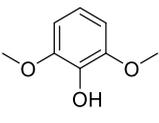
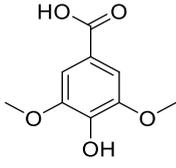
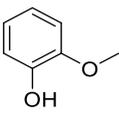
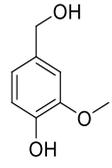
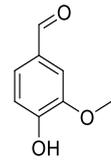
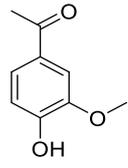
I.	Introduction.....	95
II.	Traitements enzymatiques de l'acétovanillone.....	96
II.1.	Actions de l'enzyme sur l'acétovanillone.....	96
II.1.1.	Traitement enzymatique avec la laccase.....	96
II.2.	Investigation : nature de la fraction soluble.....	103
II.3.	Changement de système de solvant.....	115
II.4.	Conclusion.....	115
III.	Traitements enzymatiques d'autres composés phénoliques.....	116
III.1.	Couplage enzymatique de phénols <i>ortho</i> mono-substitués.....	117
III.2.	Couplage enzymatique de phénols <i>ortho</i> non-substitués.....	130
III.3.	Couplage enzymatique de phénols <i>ortho</i> bi substitués.....	131
IV.	Conclusion.....	136
V.	Références bibliographiques.....	137
I.	Annexes.....	138

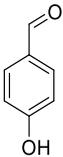
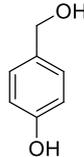
I. Introduction

Dans le but de mieux comprendre l'action de la bilirubine oxydase, celle-ci a été comparée à une enzyme plus étudiée dans la littérature : la laccase. Ainsi, les traitements enzymatiques de composés phénoliques avec une laccase d'*Aspergillus sp* et avec la Bilirubine Oxydase de *B. Pumillus* ont été comparés.

La communauté scientifique s'est déjà penchée en détail sur l'action de la laccase sur des composés monomères phénoliques. Llevot *et al.* ont notamment montré que la sélectivité du couplage de phénols *ortho* mono- ou bi-substitués dépend du substituant en position *para*. Les résultats obtenus sont résumés en Tableau II-1. Un groupe carboxylique ou un groupe alcool en position *para* conduit à un mélange de dimères et d'oligomères en raison d'un mécanisme de décarboxylation et de la présence d'atomes d'hydrogène en position benzylique, respectivement. Certains substituants en position *para*, tels que l'aldéhyde, la cétone, le méthyle, le nitrile, l'ester et la double liaison non conjuguée, permettent la synthèse de dimères purs. Les phénols non substitués en position *ortho* portant des groupes électroattracteurs en position *para* ne se sont pas couplés, tandis que ceux portant des groupes électrodonneurs produisent des oligomères. [1]

Tableau II-1 : Produits de la réaction enzymatique entre la laccase et des phénols *ortho* di-mono- ou non-substitués.

	Phénols <i>ortho</i> di-substitués		Phénols <i>ortho</i> mono-substitués			
Nom	2,6-dimethoxy phénol	Acide syringique	Gaïacol	Alcool vanillique	Vanilline	Acétovanillone
Structure						
Produit(s)	Dimère pur	Oligomères bien définis (10 unités)	Oligomères (jusqu'à 9 unités)	Mélange de dimères et tétramères	Dimère pur	Dimère pur
Position de couplage / mécanisme	<i>Para</i>	Décarboxylation Poly(oxyde de phénylène)	Phénolique, <i>para</i> et <i>ortho</i> , formation de C-O et C-C	Non défini	<i>Ortho</i>	<i>Ortho</i>

	Phénols <i>ortho</i> non-substitués	
Nom	Hydroxy-benzaldéhyde	Alcool 4-hydroxy-benzylique
Structure		
Produit(s)	/	Polymère, 50 unités répétitives
Position de couplage / mécanisme	/	nd

Ce chapitre présente une étude qui se focalise dans un premier temps sur le traitement enzymatique de l'acétovanillone avec la BOD. Dans le domaine pharmaceutique, l'acétovanillone est connue pour son utilisation potentielle en tant qu'inhibiteur de la NADPH oxydase, ce qui lui confère des effets anti-inflammatoires et cardioprotecteurs. [2-4] Le dimère de l'acétovanillone ou apocynine est également connue sous l'appellation diapocynine.

II. Traitements enzymatiques de l'acétovanillone

Des traitements enzymatiques ont été conduits sur l'acétovanillone. Une laccase d'*Aspergillus sp.* et la bilirubine oxydase (BOD) produite par le CRPP ont été utilisées. Les réactions sont conduites dans un tampon borate à pH 10 pour le traitement avec la BOD et dans un mélange tampon acétate à pH 5 et d'acétone (20 %v) pour la laccase. Les deux enzymes étant des enzymes multi-cuivre (MCO), il est attendu que la BOD dimérise l'acétovanillone de la même manière que la laccase.

II.1. Actions de l'enzyme sur l'acétovanillone

II.1.1. Traitement enzymatique avec la laccase

L'acétovanillone est traitée enzymatiquement par la laccase d'*Aspergillus sp.* Il est produit 100 % d'une poudre beige insoluble dans l'eau neutre. L'analyse par spectroscopie RMN présentée en Figure II-1 confirme la formation du dimère diacétovanillone.

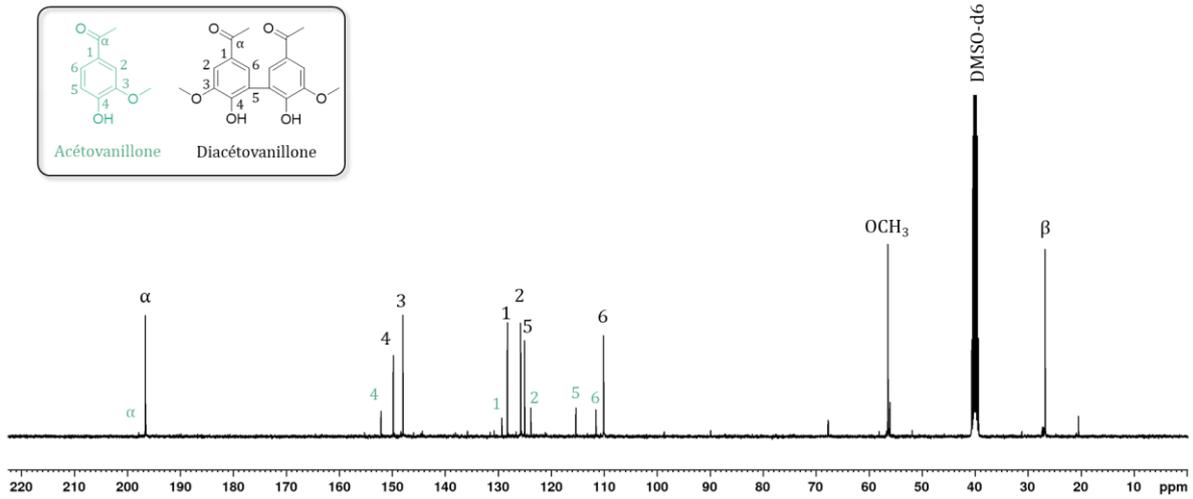


Figure II-1 : Spectre RMN ^{13}C du produit de l'acétovanillone avec la laccase ; dans le DMSO-d $_6$.

Ici, la spectroscopie RMN du carbone permet de mieux discriminer les signaux correspondant à l'espèce acétovanillone ou à son dimère. Le spectre RMN ^{13}C montre que le dimère a bien été formé, et qu'il reste de l'acétovanillone n'ayant pas réagi (8 % d'après l'intégration des signaux H5 en RMN du proton).

II.1.2. Traitement enzymatique avec la BOD

L'acétovanillone est ensuite confrontée à l'action de la BOD.

II.1.2.a. Réactions de contrôle

Dans un premier temps, une réaction de contrôle a été effectuée, dans les mêmes conditions qu'un traitement enzymatique, mais sans ajout d'enzyme. Après solubilisation dans le tampon borate à

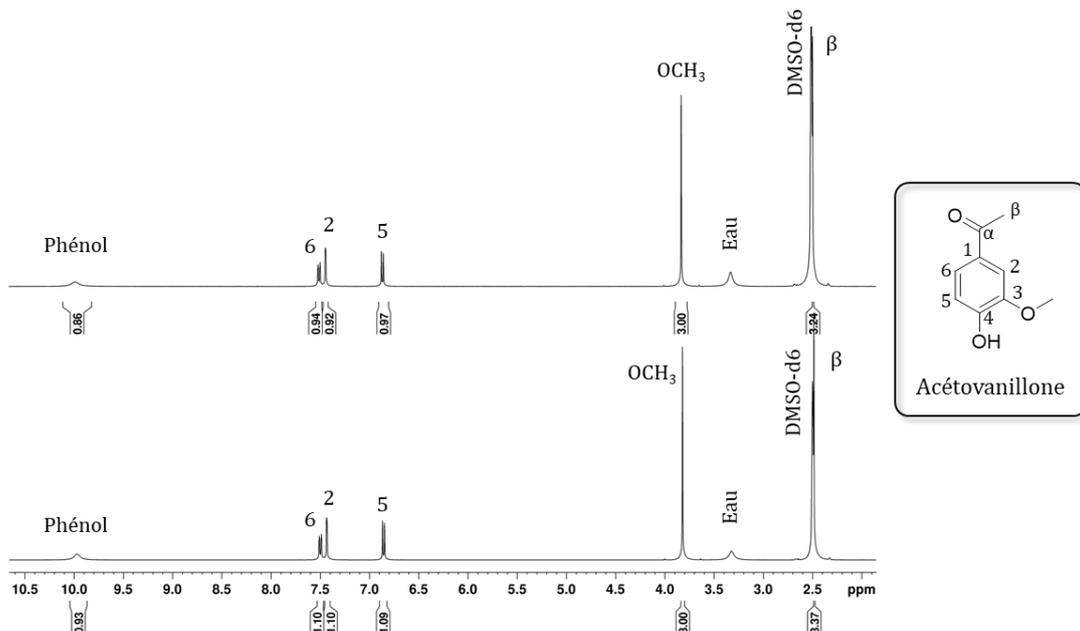


Figure II-2 : Spectres RMN ^1H de la solubilisation contrôle de l'acétovanillone dans le tampon borate à pH 10 dans le DMSO-d $_6$. En haut : fraction soluble ; en bas : fraction insoluble.

pH 10 (à température ambiante, bullage d'oxygène pendant 16 heures), dialyse, centrifugation et séchage par lyophilisation, il est obtenu 80 % de fraction soluble et 20 % de culot insoluble. Les spectres RMN du proton montrent en Figure II-2 qu'il s'agit d'acétovanillone dans les deux cas.

La formation du précipité a lieu lors de l'étape de dialyse. En effet, c'est à cette étape que les ions présents dans le tampon sont éliminés et que le pH du milieu revient à une valeur neutre. Or, l'acétovanillone n'est pas soluble dans l'eau à température ambiante à pH neutre, ce qui explique la précipitation partielle du composé.

D'autres manipulations de contrôle sans enzyme ont été conduites :

- Le bullage d'oxygène a été remplacé par un bullage d'azote.
- La réaction a été conduite à l'abri de la lumière visible, afin de vérifier l'absence de potentielles réactions secondaires d'oxydation, de formation de radicaux qui mèneraient à la formation de quinones.

Il est à nouveau obtenu 80 % d'une fraction soluble et 20 % d'une fraction insoluble pour les contrôles avec bullage d'azote, en présence ou non de lumière. L'acétovanillone est retrouvée intacte dans toutes les fractions de ces manipulations de contrôle. Il est possible de conclure que ce résultat est l'illustration de la limite de solubilité de l'acétovanillone dans l'eau neutre qui conditionne la quantité de fraction précipitée.

II.1.2.b. Réactions avec la bilirubine oxydase (BOD)

Le traitement enzymatique de l'acétovanillone avec la BOD produit une fraction insoluble qui précipite au cours de la réaction pour former un solide jaune qui représente quasiment 80 % de la masse de monomère introduite initialement.

Tableau II-2 : Présentation des fractions obtenues lors du traitement contrôle et enzymatique de l'acétovanillone.

	Fraction soluble	Fraction insoluble	Modification structurale
Contrôle	78 %	22 %	✘
Avec BOD	21 %	79 %	✓

En comparant la manipulation contrôle au traitement enzymatique, il est notable qu'un solide insoluble est formé avec l'ajout de la BOD. L'analyse structurale de ces fractions est présentée dans le paragraphe suivant. La spectroscopie RMN montre des modifications structurales. Les spectres RMN du proton sont présentés en Figure II-3.

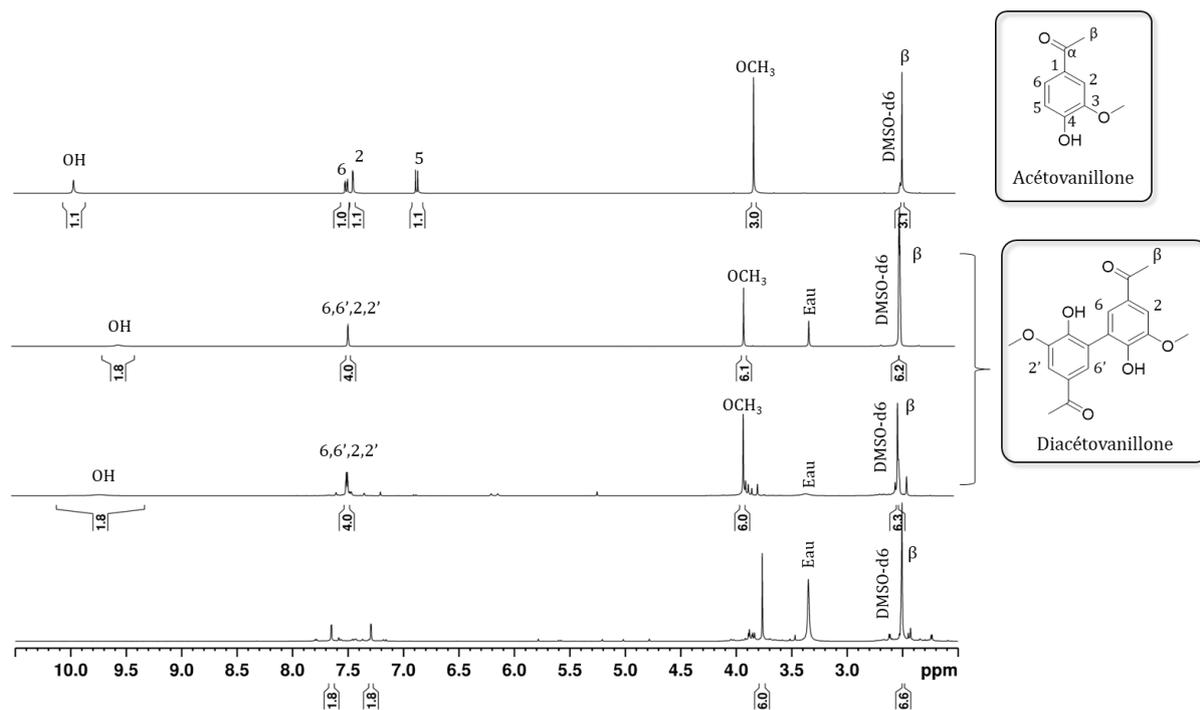


Figure II-3 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 de l'acétovanillone, la diacétovanillone, la fraction insoluble du traitement enzymatique, la fraction soluble du traitement enzymatique (de haut en bas).

Le précipité insoluble formé au cours du traitement enzymatique correspond à la diacétovanillone. Ainsi, la BOD semble avoir le même effet que la laccase : une dimérisation de l'acétovanillone. Le dimère non soluble dans l'eau neutre précipite lors de l'étape de dialyse.

Le spectre RMN ^1H de la fraction soluble ressemble à celui de la diacétovanillone concernant les intégrations des signaux et leur déplacement chimique. Cependant, on peut noter que le signal des phénols disparaît. Cela pourrait être dû à la présence d'une impureté dans le milieu, avec laquelle les protons des phénols auraient réagi (échange de protons avec l'eau, par exemple). Il est aussi possible que l'environnement chimique des phénols ait changé et que la différence de densité électronique affecte le signal en spectroscopie RMN. De plus, un espacement des signaux correspondant aux protons aromatiques est observé. Cet écartement est d'autant plus visible en Figure II-4 où la fenêtre a été agrandie entre 7,1 ppm et 7,8 ppm. L'écart entre les deux doublets de la fraction soluble est de 0,35 ppm.

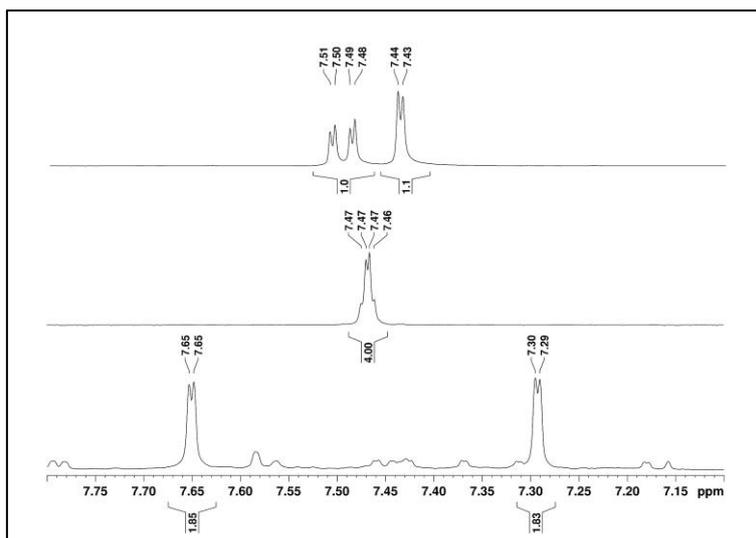


Figure II-4 : Zoom des spectres RMN 1H de l'acétovanillone, la diacétovanillone et la fraction soluble (de haut en bas).

L'analyse RMN du ^{13}C de la fraction soluble a été réalisée et est comparée à celle du dimère diacétovanillone en Figure II-5. La grande correspondance des signaux est remarquable. La seule différence est le signal correspondant au C4 aromatique portant le phénol, qui est décalé de 149,5 ppm à 159,5 ppm.

Afin d'avoir plus d'informations sur la structure des fractions formées lors du traitement enzymatique, une analyse de RMN HSQC a été réalisée. En attribuant les signaux de la fraction soluble aux carbones de la diacétovanillone, le spectre présenté en Figure II-6 est obtenu.

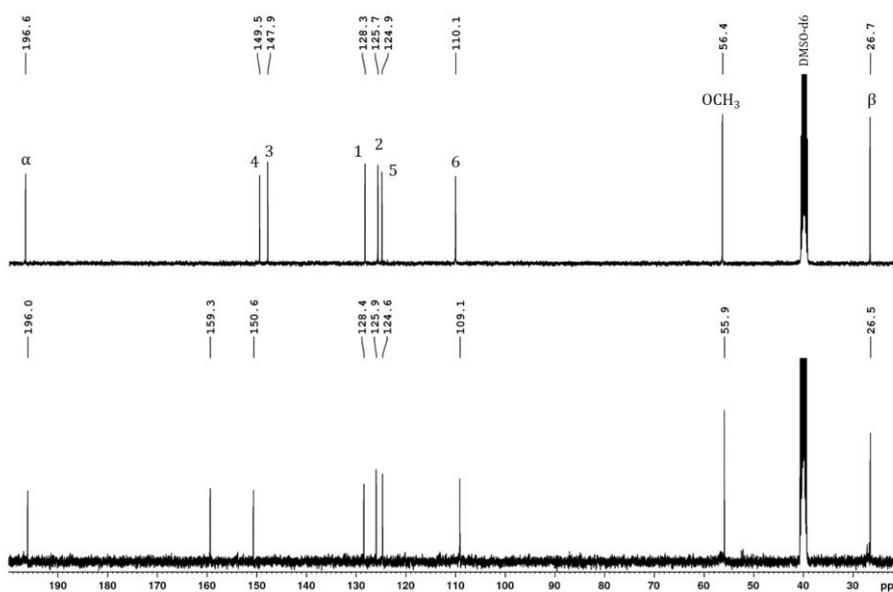


Figure II-5 : Spectres ^{13}C de la diacétovanillone et de la fraction soluble (de haut en bas).

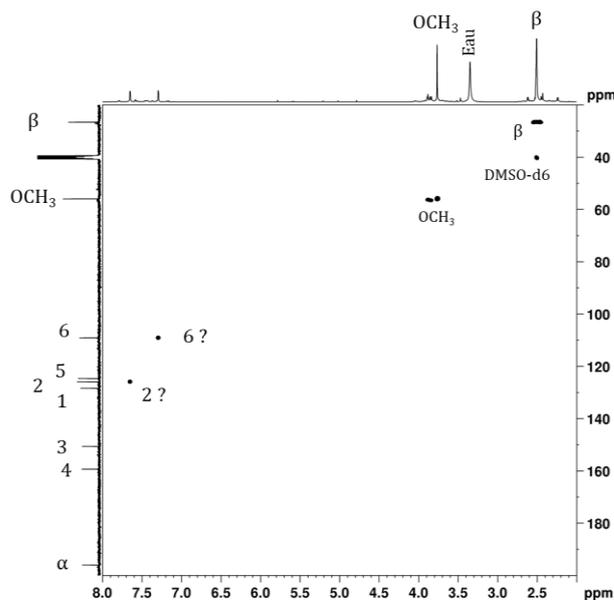


Figure II-6 : Spectre 2D-HSQC de la fraction soluble du traitement enzymatique de l'acétovanillone ; dans le DMSO-d₆.

Une forme de diacétovanillone serait donc formée, où les signaux des protons portés par les carbones des aromatiques C2 et C6 sont espacés de 0,35 ppm. Cet espacement des signaux aromatiques était inattendu et ne s'explique pas facilement. Ce phénomène d'écartement est également observé dans d'autres solvants organiques : THF, DMF, EtOD (Annexe II-1).

La formation du précipité insoluble a été suivie au cours du temps, et elle est représentée en Figure II-7. Plusieurs traitements enzymatiques alimentés avec un bullage d'air ont été interrompus à des temps plus ou moins avancés, et traités avec la méthode habituelle de dialyse, centrifugation puis lyophilisation.

La production de fraction insoluble augmente avec le temps. Au bout de 24 heures, 77 % de fraction insoluble est formée, correspondant au dimère. C'est un résultat intéressant car il montre que la BOD reste active plusieurs heures dans le milieu réactionnel et continue à provoquer le couplage radicalaire de l'acétovanillone en diacétovanillone.

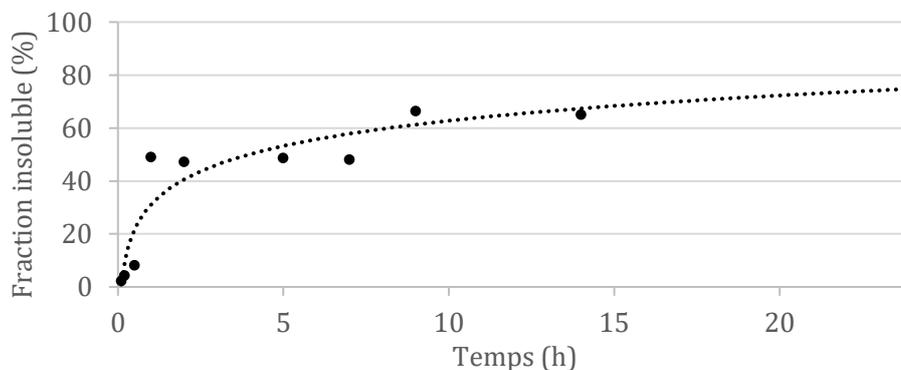


Figure II-7 : Cinétique de la production de fraction insoluble au cours du temps de réaction.

Il est à souligner que la formation du dimère se déroule plus lentement en présence d'un bullage d'air comparé à un bullage d'oxygène pur. En effet, sous bullage d'oxygène pur, 79 % de dimère est formé en seulement 16 heures de réaction, ce qui illustre le rôle crucial de la disponibilité en oxygène. L'oxygène est réduit en eau par l'enzyme lors de l'oxydation de l'acétovanillone, et sa quantité limite la vitesse de formation du dimère.

La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse est une méthode utilisée pour déterminer la masse des différentes espèces composant un mélange. Des spectres de masse en mode négatif de l'acétovanillone, de la diacétovanillone et des fractions solubles et insolubles du traitement ont été réalisés. Ils sont présentés en Figure II-8.

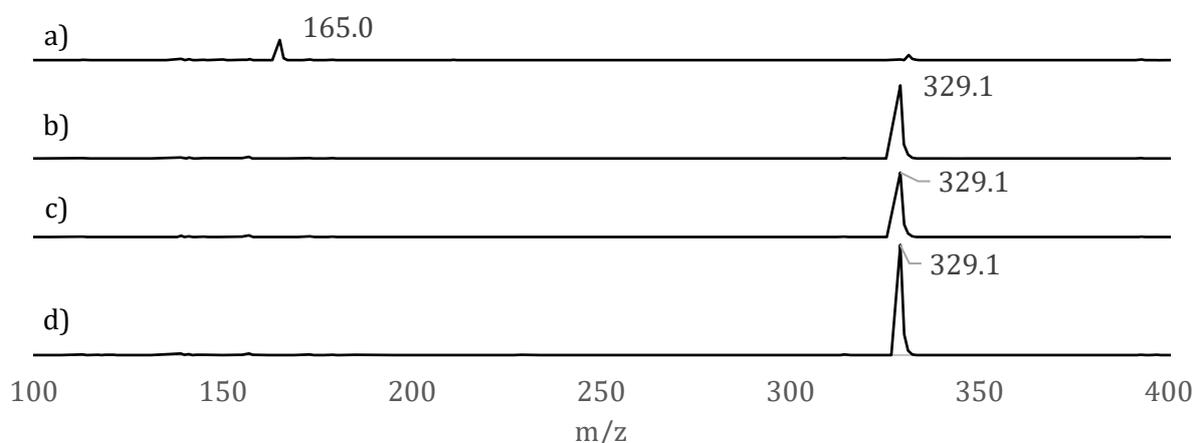


Figure II-8 : Spectres de masse en mode négatif de a) acétovanillone b) diacétovanillone c) fraction soluble d) fraction insoluble.

L'acétovanillone, avec une masse molaire de 166 g/mol, et la diacétovanillone, avec une masse molaire de 330 g/mol, sont identifiées par des signaux m/z de 165 et 329 respectivement. Ce résultat s'explique par l'utilisation du mode négatif pour l'acquisition des spectres de masse. La présence du dimère est observée dans les deux fractions : soluble et insoluble.

Ces résultats ne semblent pas en accord avec les quelques différences structurales observées lors de l'analyse de la fraction soluble. Il est possible que l'espèce formée se fragmente lors de l'ionisation, et qu'uniquement le dimère soit détecté.

Des inhibiteurs radicalaires ont été ajoutés au traitement enzymatique pour s'assurer du mécanisme radicalaire de la BOD. L'isopropanol et la N-acétylcystéine ont été employés (Figure II-9). L'isopropanol est un solvant couramment utilisé comme un piège à radicaux en réagissant avec les radicaux phénoliques pour former des produits stables comme l'acétone. [5] La N-acétylcystéine (NAC) est un dérivé de la cystéine, un acide aminé, et est souvent utilisée comme complément alimentaire ou comme médicament. La NAC agit comme un antioxydant et piège les radicaux grâce à sa fonction thiol. [6, 7]

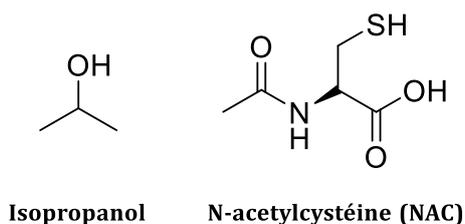


Figure II-9 : Molécules utilisées comme pièges à radicaux.

Dans les deux cas, l'acétovanillone est récupérée inchangée, montrant l'inhibition de l'action de la BOD sur ce petit modèle phénolique. Cela confirme l'action radicalaire de la BOD.

L'hypothèse formulée initialement a été confirmée : la BOD forme le dimère diacétovanillone *via* un mécanisme radicalaire. Le dimère n'est pas soluble en milieu aqueux neutre, il précipite donc au cours de la réaction en formant le culot insoluble. Cependant, la nature de la fraction soluble qui n'a pas été entièrement comprise sera investiguée dans la suite de ce chapitre.

II.2. Investigation : nature de la fraction soluble

L'écartement inhabituel du signal des protons aromatiques est étudié dans cette partie. Plusieurs hypothèses ont été émises. La première suggère que la fraction soluble récupérée est le dimère diacétovanillone, dont la conformation spatiale aurait changé. La seconde hypothèse explore la potentielle interaction entre l'enzyme et le dimère biphenyle. Enfin, la dernière hypothèse implique la possible formation d'un complexe de bore.

II.2.1. Possibilité d'une interaction BOD-dimère

Plusieurs articles de Venturini *et al.* évoquent la possibilité d'une interaction enzyme-dimère qui induirait une chiralité dans la molécule de dimère.

L'interaction divanilline-albumine de sérum bovin (BSA pour Bovin Serum Albumin) a été étudiée et il a été démontré qu'en interagissant avec les cavités chirales de la protéine, la divanilline est devenue un biphenyle atropos, c'est-à-dire que la rotation libre autour de la liaison simple reliant les cycles aromatiques est bloquée. Ce phénomène peut s'expliquer en considérant les interactions de la divanilline avec les acides aminés des sites de liaison de la protéine. [10]

Venturini *et al.* ont fait une analyse détaillée de l'interaction entre la diacétovanillone et l'albumine de sérum humain (HSA pour Human Serum Albumin). Ils ont constaté que la diacétovanillone se lie au site actif de la protéine HSA, et la constante de liaison entre les deux est presque 100 fois plus élevée que celle entre l'acétovanillone et la protéine. L'interaction de la diacétovanillone avec ce site chiral de la protéine induirait une chiralité dans la molécule. Pour vérifier cette hypothèse, des analyses de dichroïsme circulaire ont été effectuées. La chiralité axiale a été théoriquement

confirmée en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) pour déterminer les conformations les plus stables adoptées par la diacétovanillone. [11]

II.2.1.a. Fluorescence

L'approche analytique que Venturini *et al.* ont utilisée pour mesurer l'interaction entre une protéine (la HSA dans leur cas) et la diacétovanillone est l'extinction de fluorescence. C'est un phénomène associé à la diminution de l'intensité de fluorescence causée par la formation d'un complexe.

Pour notre étude, la même démarche a été reproduite, en utilisant la diacétovanillone et la BOD dans les mêmes conditions expérimentales que leur équipe. Les résultats présentés dans la Figure II-10 montrent que l'intensité de fluorescence de la BOD diminue fortement avec l'ajout de diacétovanillone.

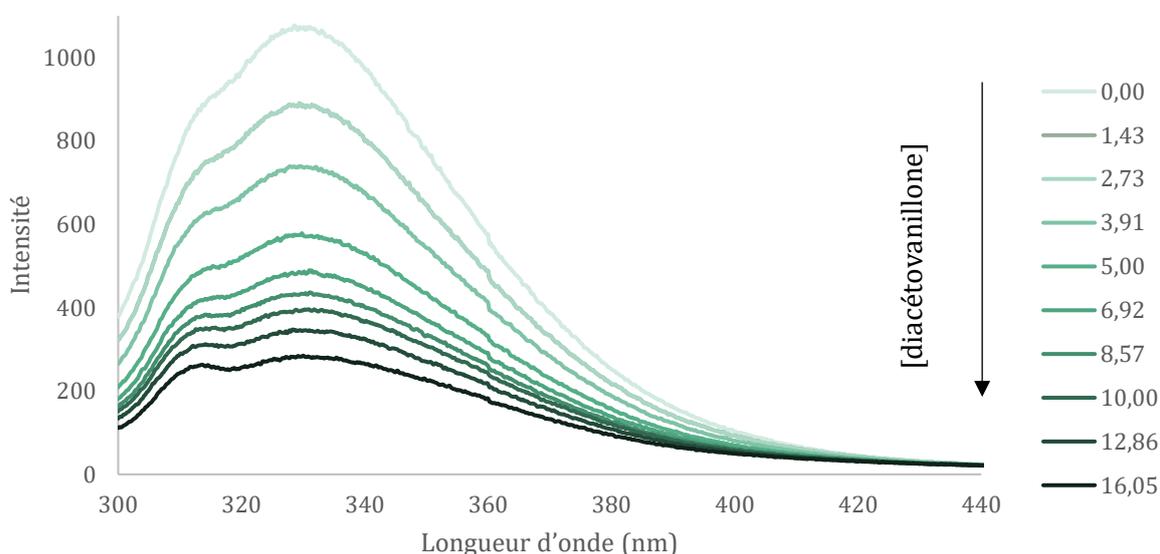


Figure II-10 : Spectres d'émission de la BOD 5 mM en absence ou en présence de diacétovanillone (0-16 mM) dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,0.

Cette diminution d'intensité pourrait être causée par la formation d'un complexe qui quencherait le signal de fluorescence. Un doute demeure quant à la méthode employée, car une dilution du milieu a lieu lors de l'ajout du dimère, qui pourrait également justifier de la diminution d'intensité.

II.2.1.b. Dichroïsme

Le dichroïsme circulaire (CD pour Circular Dichroism), est une analyse de spectroscopie qui mesure la différence d'absorption entre les lumières polarisées circulaires droite et gauche. Pour mesurer une différence d'absorption, les molécules analysées doivent être asymétriques, donc chirales. Ainsi, cette technique est appropriée pour déterminer les conformations structurales des protéines. [12] L'UV lointain (190-260 nm) apporte des informations sur les types de structures

secondaires (hélices α , feuillets β ou encore structures aléatoires) constituant les protéines et l'UV proche (250-330 nm) renseigne sur le repliement tertiaire des protéines.

D'après l'équipe de Venturini, la diacétovanillone est un ligand puissant de la protéine HSA. Ils ont donc examiné si cette interaction pouvait altérer la structure secondaire de la protéine. Ainsi, les spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de la protéine ont été mesurés en présence ou en absence de diacétovanillone. Ils montrent la bande d'absorption UV de la diacétovanillone, mais aucun signal CD n'est observé, comme attendu pour une molécule achirale. La bande typique de l'HSA est présente seule en dessous de 300 nm. Cependant, lorsqu'une quantité équimolaire de diacétovanillone est ajoutée à l'HSA, une nouvelle bande CD apparaît, dépendant de la présence à la fois de l'HSA et de la diacétovanillone. D'après eux, ce nouveau signal de CD peut être attribué à une chiralité induite dans la diacétovanillone provoquée par sa liaison à la protéine. En d'autres termes, la diacétovanillone achirale deviendrait chirale lorsqu'elle est complexée avec la protéine. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'attachement d'une molécule optiquement inactive à l'intérieur de l'environnement chiral formé par les sites de liaison de la protéine.

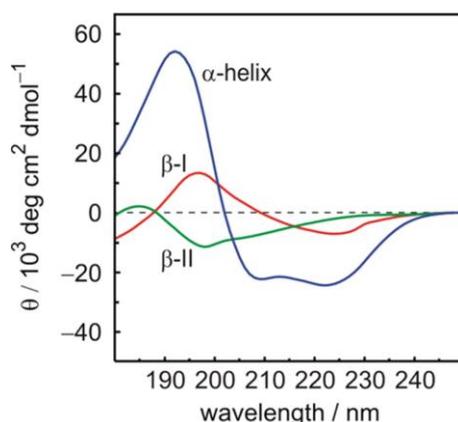


Figure II-11 : Spectres CD pour les structures secondaires des protéines : α -hélice en bleu, feuillet β (β I) en rouge, et protéines désordonnées ainsi que hélices polyproline II gauches (β II) en vert. D'après [13].

Il a été reproduit les expériences de l'article, avec la BOD comme enzyme et la diacétovanillone comme dimère (Figure II-12). Les spectres CD de référence présentés en Figure II-11 ont été utilisés pour conclure quant à l'allure des spectres obtenus.

Le signal simple de la BOD à 238 nm qui représente des feuillets bêta-parallèles est modifié en présence de diacétovanillone. Un second signal apparaît autour de 225 nm, ce qui peut être assimilé à la formation de structures non conformées. Il est ainsi montré qu'il existe une interaction entre le dimère et l'enzyme BOD. La diacétovanillone est intrinsèquement achirale, et il est très peu plausible que la présence d'un nouveau signal dans les analyses spectroscopiques indique une chiralité induite par l'interaction avec la BOD. Il est plus probable que ce signal émergent reflète une altération structurale de la BOD elle-même, induite par son interaction avec le dimère.

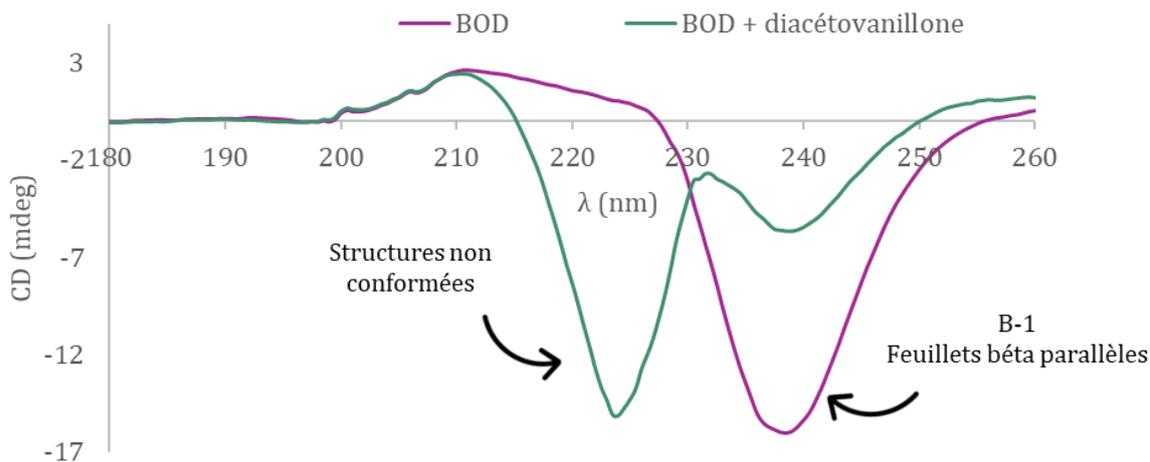


Figure II-12 : Spectres de dichroïsme circulaire de la bilirubine oxydase (BOD) et du mélange BOD + diacétovanillone.

Cependant, compte tenu de la quantité infime d'enzyme introduite dans le milieu par rapport à la quantité de substrat (3 mg de BOD pour 1 g de substrat), cette hypothèse semble peu fiable pour justifier le résultat que l'on cherche à expliquer : la structure de la fraction soluble qui semble être constituée du dimère.

II.2.2. Formation du dimère mais conformation spatiale différente

La diacétovanillone est un système biphenyle *ortho*-substitué et, en tant que tel, il est raisonnable de suspecter l'existence d'une chiralité axiale pour ce composé, c'est-à-dire l'existence d'une barrière énergétique qui pourrait entraver la rotation autour de la liaison simple centrale qui relie les noyaux aromatiques. La conséquence serait l'existence de stéréoisomères axiaux stables. Ce phénomène est connu sous le nom d'atropisomérisation ou de chiralité axiale et divise le système biaryle en deux catégories : les systèmes atropos, lorsque la rotation est restreinte en raison d'un obstacle stérique ; et les systèmes tropos, lorsque la racémisation est observée en raison d'une faible barrière énergétique. [8] Pour l'acétovanillone, deux configurations spatiales ont été imaginées, représentées en Figure II-13.

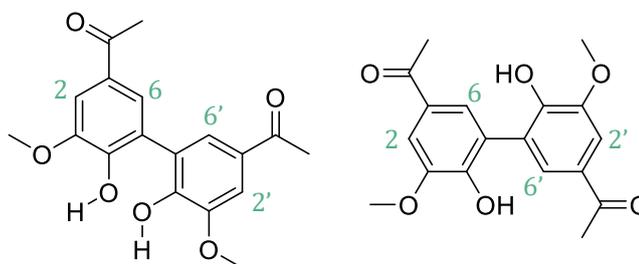


Figure II-13 : Deux configurations spatiales possibles pour la diacétovanillone.

Plusieurs analyses ont été réalisées afin d'essayer de détecter la présence d'une de ces deux formes.

II.2.2.a. RMN en température

Des changements de température peuvent affecter la mobilité et la dynamique des molécules, ce qui pourrait faire passer le dimère d'une conformation spatiale à l'autre. C'est pourquoi une RMN du proton à 80 °C a été effectuée. Les deux spectres RMN du proton sont représentés en Figure II-14.

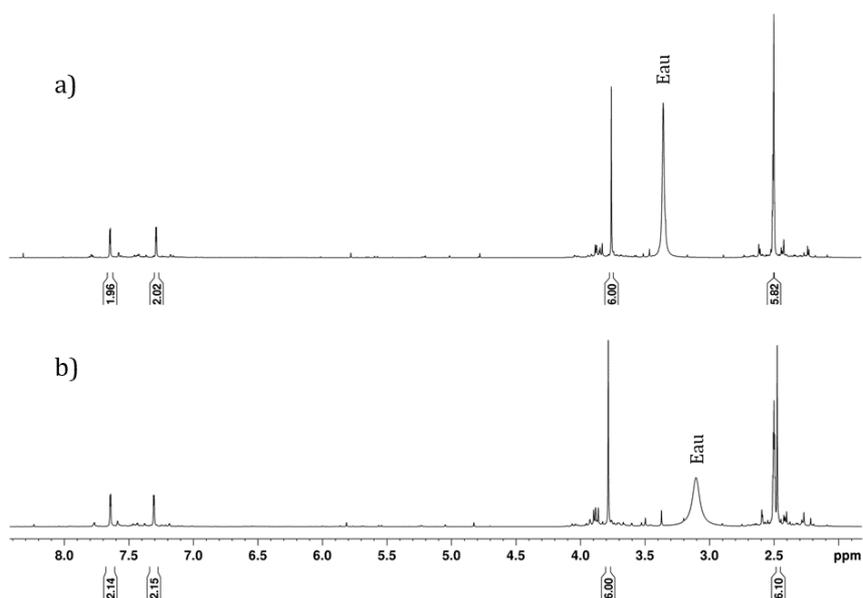


Figure II-14 : Spectres RMN ^1H de la fraction soluble dans le DMSO- d_6 a) à température ambiante (25 °C) b) à 80 °C.

Aucune différence n'est observée lorsque la fraction soluble est chauffée à 80 °C, mis à part le décalage du signal de l'eau. Étant donné que les spectres ont été acquis dans du DMSO- d_6 , une analyse à basse température n'est pas envisageable, car le solvant se solidifierait.

II.2.2.b. RMN NOESY

La RMN NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) est une technique de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire utilisée pour détecter les interactions spatiales entre les protons dans une molécule. Dans une expérience de RMN NOESY, deux types de signaux sont observés : les signaux diagonaux et les signaux NOE (Nuclear Overhauser Effect). Les couplages hors diagonale représentent des protons qui interagissent dans l'espace. Pour les petites molécules, une NOE peut être observée entre des protons séparés jusqu'à 4 Å, tandis que la limite supérieure pour les molécules de plus grande taille est d'environ 5 Å. [9] Les RMN NOESY de la diacétovanillone et de la fraction soluble ont été réalisées et sont présentées en Figure II-15. Si le dimère était dans la première conformation (cf Figure II-13), H6 et H6' interagiraient uniquement avec les protons β , et H2 et H2' interagiraient à la fois avec les protons β et les OCH₃. Si le dimère était dans la seconde conformation (cf Figure II-13), H2 et H2' interagiraient à nouveau avec les

protons β et les OCH_3 , et les H_6 et H_6' avec les protons β ainsi qu'avec les phénols. Ici, en, Figure II-15 b), le proton à 7,65 ppm interagit avec le proton β , et celui à 7,30 ppm interagit avec le proton β ainsi que les méthoxy. Il s'agirait donc plutôt de la première conformation. Le signal à 7,65 ppm correspondrait aux protons 6 et 6' et celui à 7,30 ppm aux protons 2 et 2'. C'est un résultat étonnant car en terme de gêne stérique la première conformation n'est pas favorisée.

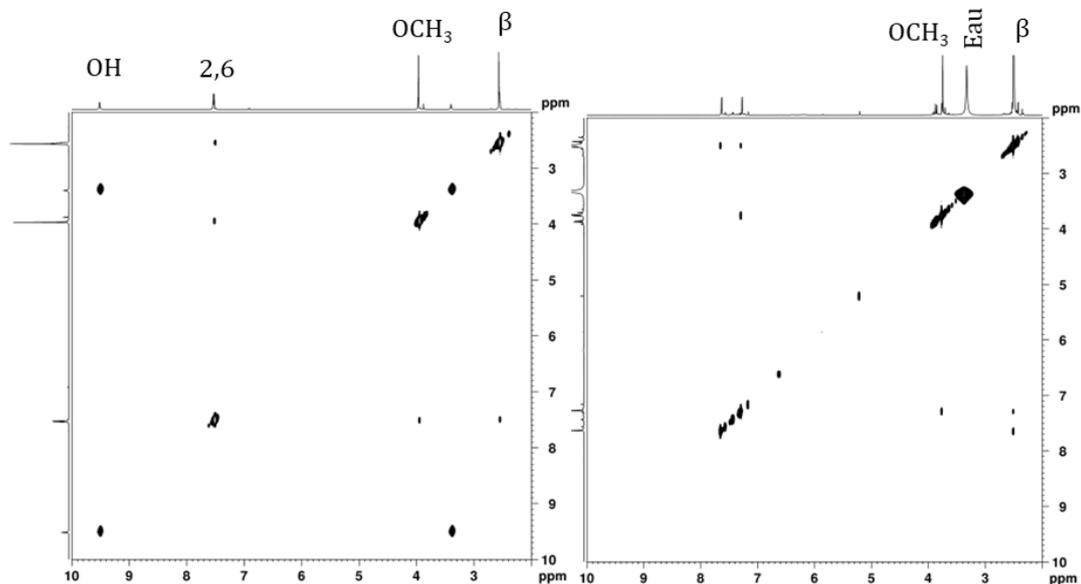


Figure II-15 : Spectres RMN NOESY de la diacétovanillone (gauche) et de la fraction soluble (droite) ; dans le DMSO-d_6 .

II.2.3. Formation d'un complexe avec l'acide borique

En milieu aqueux, le bore existe principalement sous forme d'acide borique, qui se comporte comme un acide de Lewis faible selon la réaction de l'hydrolyse : (Équation II-1) $\text{pK}_a = 9,23$. L'acide borique est donc principalement présent à des pH inférieurs à 9,23 tandis qu'à des pH plus élevés, les ions borates sont dominants.

Équation II-1 : Hydrolyse de l'acide borique.



La Figure II-16 montre que l'acide borique et l'ion borate peuvent réagir avec des composés polyhydroxylés pour produire des complexes. La complexation, qui augmente l'acidité de l'acide borique, est utilisée depuis de nombreuses années comme base de l'analyse quantitative de l'acide borique, qui ne peut pas être réalisée par titrage direct. [15] La complexation du bore avec les polyols implique deux mécanismes distincts : l'acide borique avec le polyol (équations (1) et (2)) et l'ion borate avec le polyol (équations (3) et (4)). La contribution de chaque mécanisme dans la complexation globale dépend du pH de la solution où soit l'acide borique, soit l'ion borate est dominant.

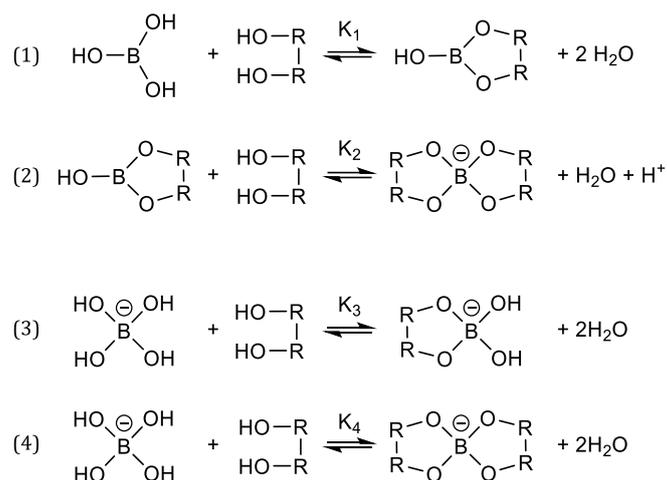


Figure II-16 : Réactions de l'acide borique et de l'ion borate avec des composés polyhydroxylés. [14]

La RMN ^{11}B constitue un outil analytique approprié pour la détermination quantitative et l'élucidation de la structure des différents composés borés en milieu aqueux.

II.2.3.a. RMN du bore : détermination des conditions d'acquisition.

Des premiers spectres de l'acide borique ont été générés avec l'expérience standard de RMN ^{11}B de Bruker, avec un pulse program appelé « zg ». Le résultat est inexploitable en raison d'un bruitage du signal excessif. Ce bruit provient des composants internes de la sonde de l'instrument lui-même qui contiennent du bore. Ces signaux parasites étaient plus forts que ceux du composé étudié, créant ainsi un bruit important connu sous le nom de « bosse de bore », qui couvre généralement une gamme de -30 à 30 ppm.

Un premier axe d'amélioration a été d'utiliser des tubes de RMN en quartz au lieu de borosilicate. En effet, la transparence supérieure du quartz dans la gamme spectrale nécessaire permet la réduction des interférences et améliore la qualité des spectres obtenus. De plus, Macho *et al.* ont mis au point une séquence d'impulsion (pulse program) qui annule les bruits parasites émis par les composants de la sonde interne. Ils ont appelé cette séquence d'impulsions « zgbs » et elle est facilement accessible dans la bibliothèque de séquences d'impulsions de Bruker. Il est observé en Figure II-17 que le signal d'une molécule modèle comme l'acide borique est nettement amélioré. Finalement, le spectre de la fraction soluble est acquis dans un tube en quartz avec la séquence d'impulsion « zgbs », et son spectre est représenté en Figure II-18.

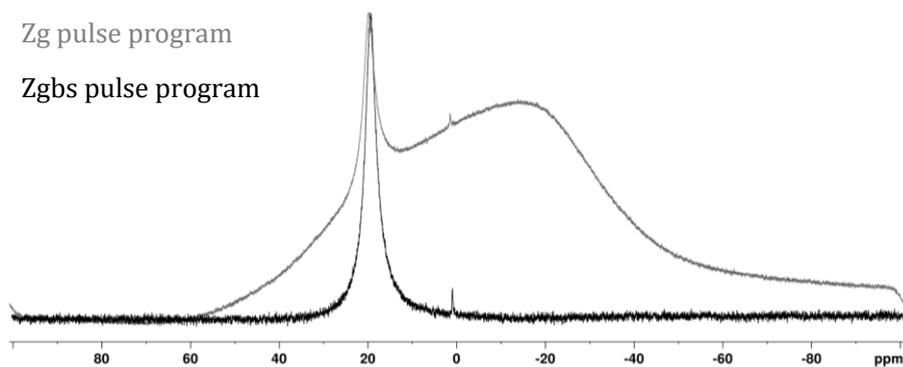


Figure II-17 : Spectres RMN ^{11}B de l'acide borique dans le DMSO-d $_6$: comparaison des séquences d'impulsion « zg » et « zgbs ».

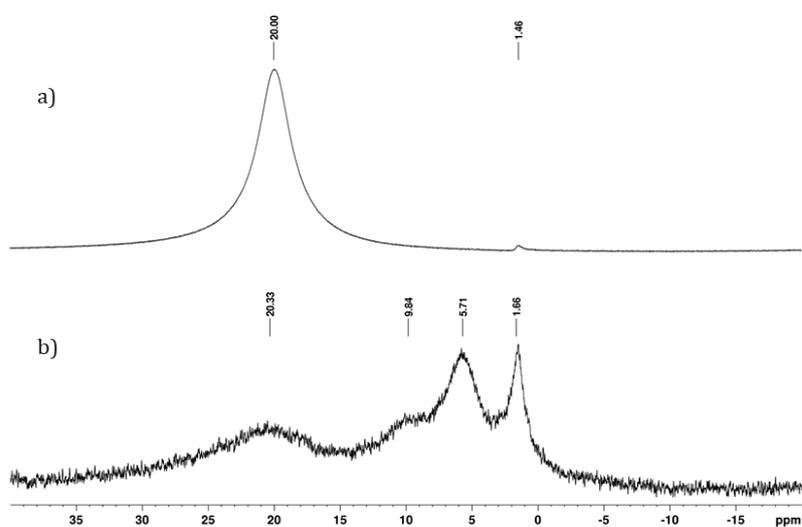


Figure II-18 : Spectres RMN ^{11}B dans le DMSO-d $_6$ de a) l'acide borique b) la fraction soluble du traitement enzymatique de l'acétovanillone.

Il est retrouvé dans la fraction soluble les signaux de l'acide borique (20 ppm) en équilibre avec la forme borate (vers 1,5 ppm). Deux nouveaux signaux sont identifiables à 5,7 et 9,8 ppm. Les espèces tétravalentes présentent souvent des déplacements chimiques allant de -10 à +20 ppm en raison de leur environnement plus symétrique et de leur forte coordination. Il pourrait donc s'agir d'espèces biphénoliques avec un atome de bore qui pont, comme représenté en Figure II-19.

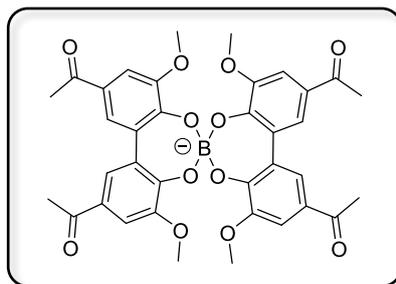


Figure II-19 : Structure proposée pour le complexe au bore de la diacétovanillone.

Ce résultat est en accord avec la conclusion qui avait été tirée de l'expérience de NOESY (II.II.2.2.b). En effet, le pontage du bore force le dimère à être dans une conformation non favorisée initialement.

Pour conclure cette section, il a été établi que des traces de bores sont présentes dans la fraction soluble du traitement enzymatique de l'acétovanillone. Il semblerait que l'étape de dialyse ne soit pas suffisante pour éliminer tous les atomes de bore présents dans le tampon, et que ceux-ci complexent avec les phénols du dimère formé enzymatiquement.

II.2.3.b. Présence de bore : analyses thermiques

Les résultats obtenus grâce à la RMN du bore ont été corrélés aux résultats d'analyse thermogravimétrique (ATG). L'ATG des deux fractions solubles et insolubles sont représentées en Figure II-20. À partir de 800 °C, un flux d'air remplace l'atmosphère inerte, provoquant la combustion des composés organiques et ne laissant qu'un résidu inorganique. Les courbes d'ATG révèlent des différences entre les fractions solubles et insolubles issues du traitement enzymatique de l'acétovanillone par la BOD. Une stabilité thermique plus élevée est constatée pour la fraction soluble jusqu'à environ 400 °C, suivie d'une dégradation un peu plus rapide. Pour la fraction insoluble, une dégradation thermique marquée est mise en évidence avec une chute de masse atteignant son pic de rapidité à 290 °C.

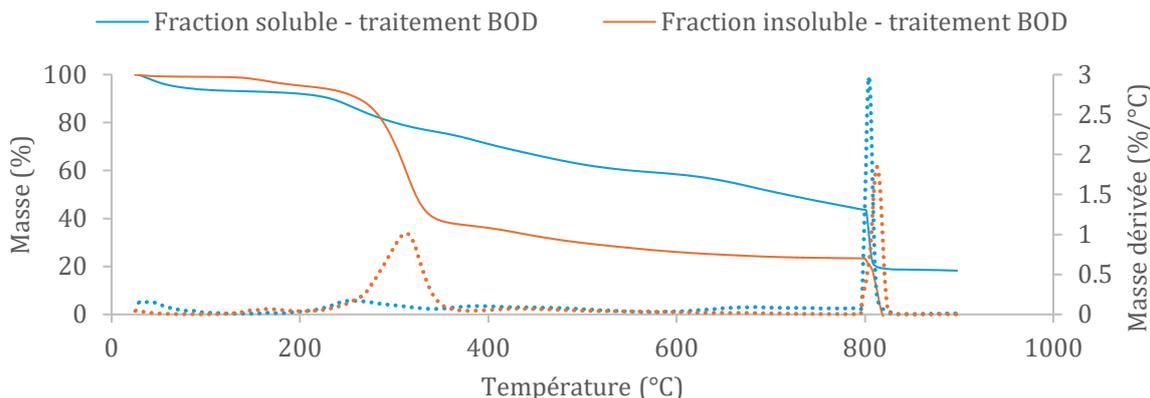


Figure II-20 : Stabilité thermique des fractions solubles et insolubles du traitement enzymatique de l'acétovanillone par analyse thermo gravimétrique. Traits pleins : masses ; traits pointillés : masses dérivées selon la température.

Le Tableau II-3 rassemble les valeurs des taux de résidus des deux fractions.

Tableau II-3 : Taux de résidus inorganiques des fractions solubles et insolubles du traitement enzymatique de l'acétovanillone.

	Résidus d'ATG
Fraction soluble	18 %
Fraction insoluble	< 0 %

La fraction soluble présente une grande quantité de résidus inorganiques : 18 %. Il en est conclu que des sels résiduels sont présents. D'après le paragraphe précédent et la RMN ¹¹B, il s'agit sûrement de bore, mais aussi possiblement du sodium présent dans la soude utilisée pour amener le tampon à pH 10.

II.2.4. Effet du tampon borate sur le dimère

On peut se demander quel serait l'effet du tampon borate sur le spectre RMN du dimère déjà formé. Pour cela, une expérience contrôle consistant à mettre la diacétovanillone dans le tampon borate avec un bullage d'oxygène pendant une nuit, puis dialyse, centrifugation et lyophilisation a été réalisée. Il est obtenu 50 % de fraction soluble après solubilisation du dimère dans le tampon borate à pH 10. En comparaison, aucune fraction soluble n'est obtenue dans l'eau à pH neutre. Le spectre RMN du proton de cette fraction est représenté en Figure II-21.

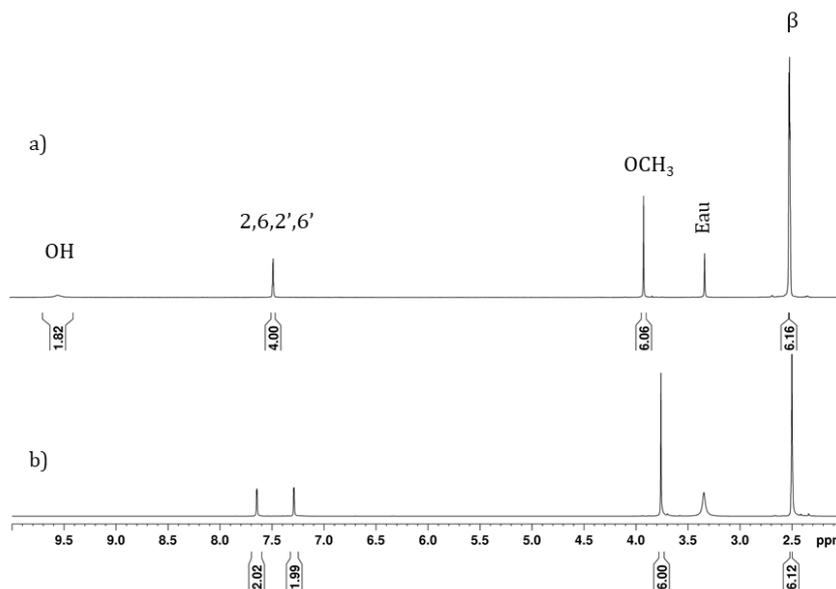


Figure II-21 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 de : a) diacétovanillone b) fraction soluble de la solubilisation de la diacétovanillone dans un tampon borate à pH 10.

Le même écartement des signaux aromatiques est retrouvé : ainsi, les signaux {diacétovanillone dans tampon borate} = signaux {acétovanillone + BOD dans tampon borate}.

La BOD dimériserait donc l'acétovanillone comme la laccase, et le tampon borate aurait ensuite un effet sur le dimère formé.

II.2.5. Traitement enzymatique dans un tampon phosphate

Un dernier contrôle a été effectué afin d'élucider au mieux la nature de la fraction soluble du traitement enzymatique de l'acétovanillone. L'acétovanillone a été dissous dans un tampon phosphate à pH 8,5. La BOD a été ajoutée et la solution saturée en oxygène pendant une nuit. Le milieu réactionnel est ensuite dialysé, le surnageant soluble est séparé du culot insoluble par centrifugation, puis ils sont lyophilisés. Il est obtenu 86 % de fraction insoluble qui, comme attendu, correspond à la diacétovanillone. Il est produit 14 % de fraction soluble. Son spectre RMN du proton est représenté en Figure II-22, et contre toute attente, l'espacement des signaux des protons aromatiques est à nouveau visible.

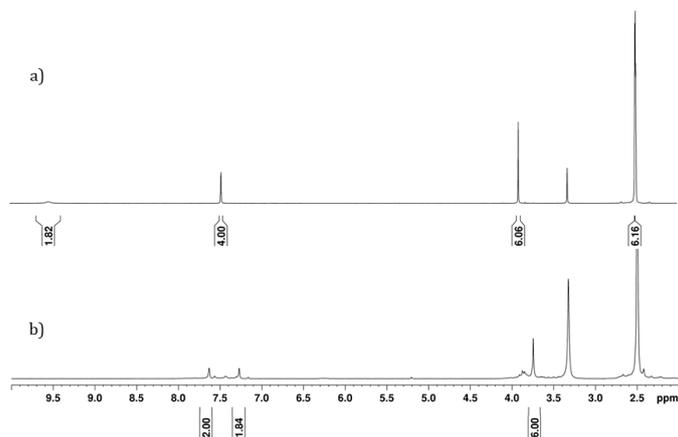


Figure II-22 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO- d_6 de : a) diacétovanillone b) fraction soluble de la solubilisation de la diacétovanillone dans un tampon phosphate à pH 10.

Le signal de la cétone à 2,5 ppm n'a pas été intégré en Figure II-22 car il est trop confondu au signal du DMSO- d_6 . Il est conclu que l'espacement des signaux aromatiques ne serait pas entièrement lié au bore mais également à une variation de pH.

II.2.6. Effet du pH sur les signaux des protons aromatiques

La diacétovanillone a été ajoutée dans de l'eau à différents pH, contrôlé par ajout de NaOH. Le mélange a ensuite été lyophilisé puis ressolubilisé dans du DMSO- d_6 et les spectres RMN du proton ont été acquis. Ils sont présentés en Figure II-23.

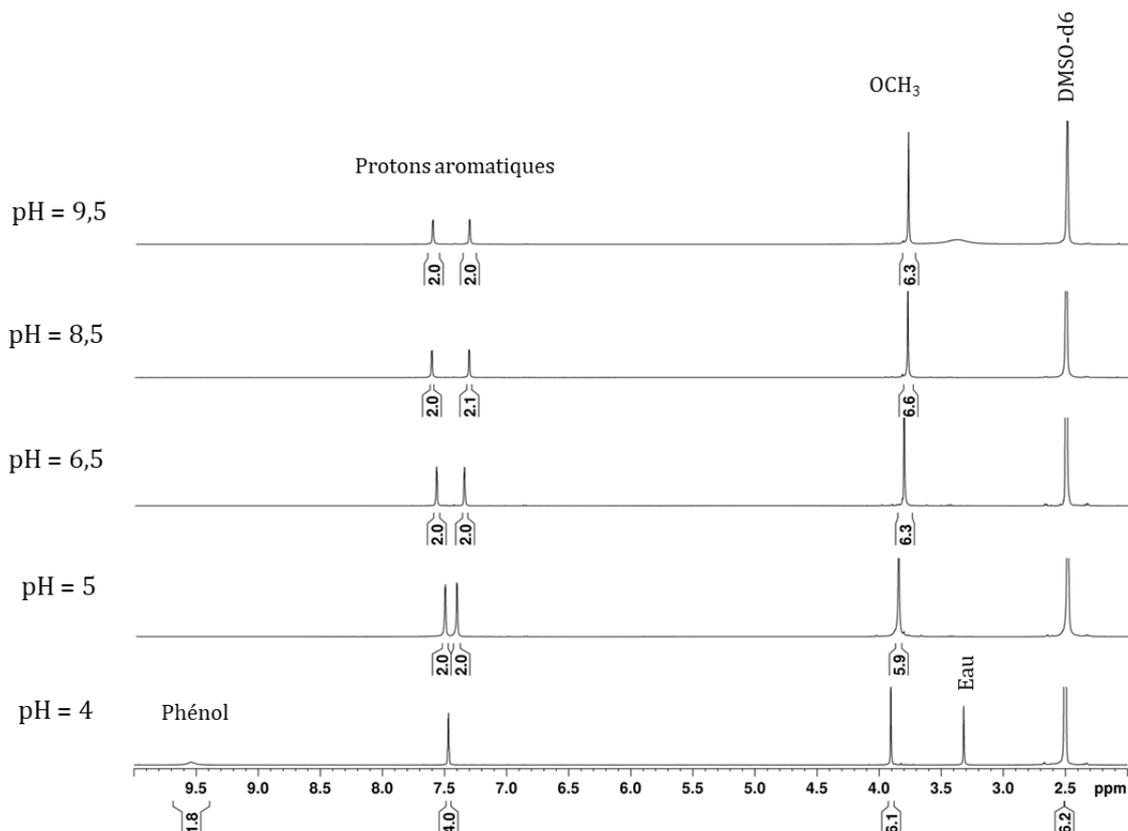


Figure II-23 : Spectre RMN ^1H de la diacétovanillone dans le DMSO- d_6 à pH = [4 ; 5 ; 6,5 ; 8,5 ; 9,5]

Un écartement des signaux des protons aromatiques croissant en fonction de l'augmentation du pH est observé. En examinant plus en détail la zone 7,1 – 7,8 ppm, il est clair que l'écartement des signaux est fonction du pH de solubilisation. Cet écartement est reporté en Figure II-24. Il atteint 0,31 ppm pour un pH de 9,5.

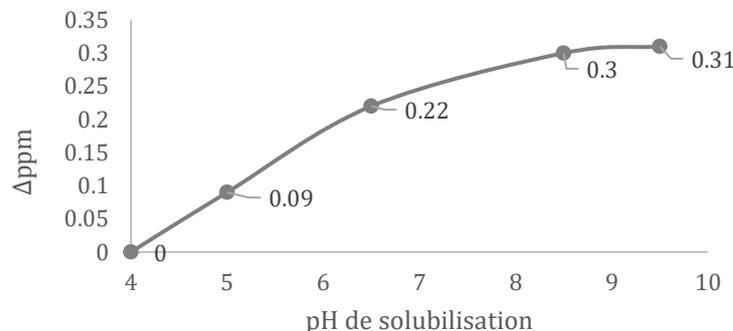


Figure II-24 : Écartement des signaux des protons aromatiques de la diacétovanillone en fonction du pH.

L'analyse de ce résultat n'est pas évidente. Il est difficile de comprendre pourquoi les signaux s'écartent de part et d'autre d'un axe de symétrie. Dans le cas où l'environnement chimique des protons aromatiques change, il est attendu un blindage ou un déblindage du signal. Ici, les deux phénomènes sont observés.

Une hypothèse serait la déprotonation asymétrique d'un des phénols du dimère, modifiant ainsi la densité électronique des protons aromatiques. Néanmoins, cette hypothèse ne justifie pas toutes les modifications observées.

II.3. Changement de système de solvant

Afin de pallier le problème de l'écartement des signaux lié aux variations de pH, un nouveau protocole de traitement enzymatique est mis en place. Ce protocole s'affranchit de tampon alcalin et consiste à solubiliser l'acétovanillone dans un mélange eau/acétone (20 %v). L'enzyme est ajoutée et la réaction est conduite à température ambiante pendant 16 heures avec bullage d'oxygène. A la fin du traitement, l'acétone est évaporée puis le mélange réactionnel est centrifugé et lyophilisé. Un solide blanc précipite au cours de la réaction, et un rendement de 100 % de dimère est obtenu en 16 heures. Cette fois-ci, le signal du dimère est celui attendu, avec le signal des protons classique. Ce protocole est celui qui sera privilégié dans la suite de l'étude du traitement enzymatique des modèles monomères phénoliques.

II.4. Conclusion

Le traitement enzymatique de l'acétovanillone a été étudié. Il a été montré que la bilirubine oxydase procède à un couplage oxydant radicalaire du phénol, et produit de la même manière que la laccase le dimère diapocynine. Cependant, une anomalie dans le spectre proton de la fraction soluble a mené à une investigation poussée. Il a été montré que le signal des protons aromatiques

du dimère s'écarte. Plusieurs hypothèses ont été émises, et il a été montré que du bore était présent dans cette fraction soluble malgré une étape de dialyse qui devait éliminer les sels. Il a été montré qu'un complexe est formé entre l'espèce borate et les phénols du dimère.

Enfin, l'écartement des signaux a été corrélé à l'augmentation du pH. Ce phénomène n'est toujours pas expliqué. Un changement de protocole, en procédant au traitement enzymatique dans de l'eau avec 20 % en volume d'acétone, a conduit à une production de 100 % de dimère qui précipite au cours de la réaction et dont les signaux en RMN ^1H sont ceux attendus.

Dans la partie suivante, les traitements enzymatiques de plusieurs composés monomères phénoliques avec des substitutions en *ortho* et en *para* variées sont étudiés.

III. Traitements enzymatiques d'autres composés phénoliques

Afin de mieux comprendre la différence d'action entre la BOD et la laccase, deux oxydases multi-cuivre, leur effet sur plusieurs substrats phénoliques ont été comparés. Ces substrats sont *ortho* mono-, non- ou bi-substitués, et leur fonctionnalisation en position *para* varie de la cétone à l'aldéhyde ou à l'acide carboxylique.

Dans les prochains paragraphes, tous les traitements enzymatiques avec la laccase ont été réalisés à température ambiante dans un mélange tampon acétate à pH 5 / acétone (20 %v); et les réactions avec la BOD ont été conduites dans un mélange eau distillée / acétone (20 %v). Les substrats sont concentrés à 10 mg/mL. Un bullage d'oxygène est inséré dans le milieu et les réactions sont conduites pendant 16 h.

La nomenclature *ortho* et *para* utilisée dans cette section correspond pour tous les composés aux positions phénoliques *ortho* et *para*.

III.1. Couplage enzymatique de phénols *ortho* mono-substitués

III.1.1. Traitement enzymatique du gaïacol

III.1.1.a. Gaïacol et laccase

La réaction du gaïacol avec la laccase conduit à un précipité avec un rendement de 98 %. Ce précipité est analysé par SEC dans le THF (Figure II-25). On constate la présence d'oligomères avec une Mw de 1 250 g/mol et une dispersité de 1,6 d'après la calibration PS. Ainsi, la laccase semble polymériser le gaïacol en oligomère d'un DPw d'environ 10 (la masse molaire du gaïacol étant 124 g/mol).

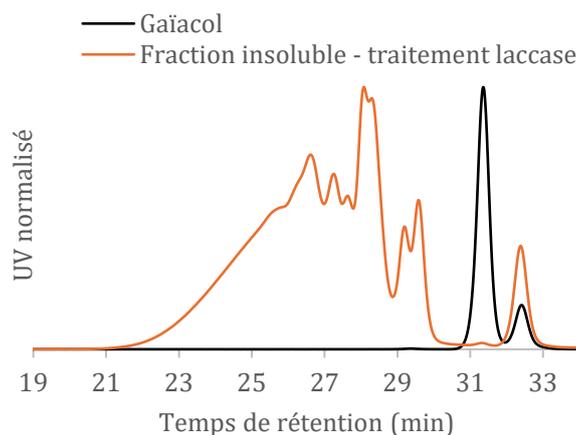


Figure II-25 : Chromatogrammes SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes.

La spectroscopie RMN ^1H en Figure II-26 fournit un spectre avec de nombreux signaux et globalement bruité. Les signaux multiples à environ 3,8 ppm et 7 ppm sont respectivement attribués aux protons méthoxy et aromatiques. Ce signal est caractéristique d'un mélange d'espèces de masses molaires plus ou moins élevées : multiplicité, étalement et chevauchement des signaux.

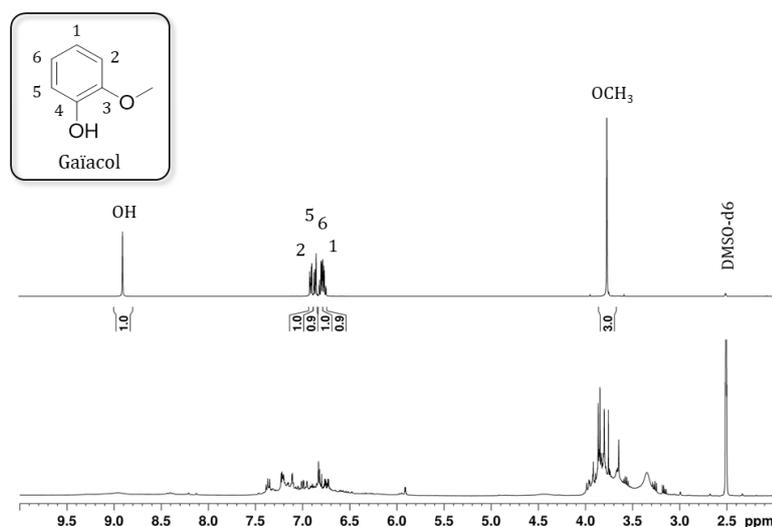


Figure II-26 : Spectres RMN ^1H du gaïacol et de la fraction insoluble de son traitement enzymatique avec la laccase (de haut en bas).

Les positions de couplage semblent multiples ; les carbones C5 et C1 étant disponibles ainsi que le radical phénoxy (selon l'équilibre des formes radicalaires dans le cycle aromatique). Un mélange de plusieurs structures issues d'un couplage radicalaire entre plusieurs espèces en équilibre est observé. C'est un résultat cohérent avec les travaux de A. Llevot qui avait constaté le même phénomène.

III.1.1.b. Gaïacol et BOD dans eau/acétone

La réaction du gaïacol avec la BOD conduit à l'obtention de deux fractions : un surnageant représentant 13 % : la fraction soluble, et un culot représentant 87 % : la fraction insoluble. Ces deux fractions ont été analysées en RMN du carbone et en SEC THF, les résultats sont présentés en Figure II-27. La formation d'un mélange d'oligomères est cohérente avec la RMN du carbone des deux fractions qui montre l'apparition de nombreux signaux. Iwahara *et al.* ont travaillé sur l'élucidation structurale des polygaïacols formés grâce à la manganèse peroxydase (MnP). Ils ont montré la présence de liaisons C-C et C-O, ainsi qu'une structure quinone dans le polyguaiacol. [16] Dans le cas de la réaction avec la BOD, un signal à 180-181 ppm en ^{13}C est retrouvé, qui peut être attribué à une structure de type benzoquinone. Le signal à 30 ppm correspond à des traces d'acétone.

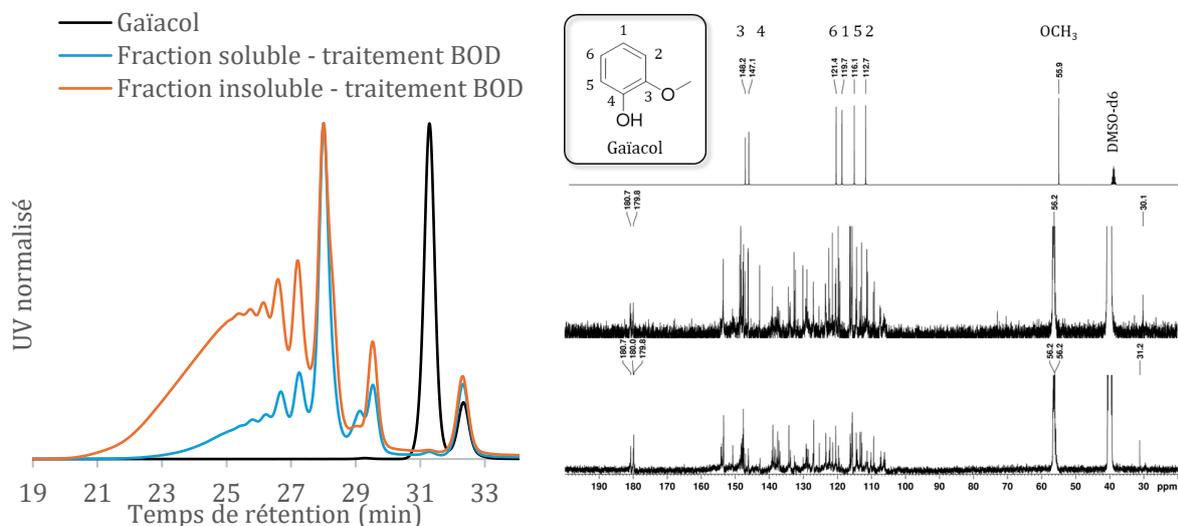


Figure II-27 : À gauche - Chromatogramme SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes. À droite - Spectres RMN ^{13}C du gaïacol (en haut) et des fractions soluble (au milieu) et insoluble (en bas) issues de la réaction entre le monomère et la BOD.

Les profils de SEC montrent la formation d'oligomères. Des traces de gaïacol non consommé sont présentes dans la fraction soluble. La calibration PS permet d'obtenir des estimations de Mw et de dispersités, présentées en Tableau II-4.

Tableau II-4 : Masses molaires en nombre et dispersité des fractions soluble et insoluble issues du traitement du gaïacol avec la BOD. Estimation grâce à une calibration PSS.

	Mw (g/mol)	Đ
Fraction soluble – gaïacol + BOD	700	1,6
Fraction insoluble – gaïacol +BOD	1 020	1,7

Les mécanismes réactionnels menant à plusieurs formes de dimères ou trimères sont représentés en Figure II-28. Il est montré les variations de structures possibles en fonction de la place du radical sur le cycle aromatique. D'après le chromatogramme SEC et le spectre RMN ¹³C obtenus, il est fort probable que les fractions soient composées d'un mélange de toutes ces espèces, jusqu'à un DPw de 7 ou 8.

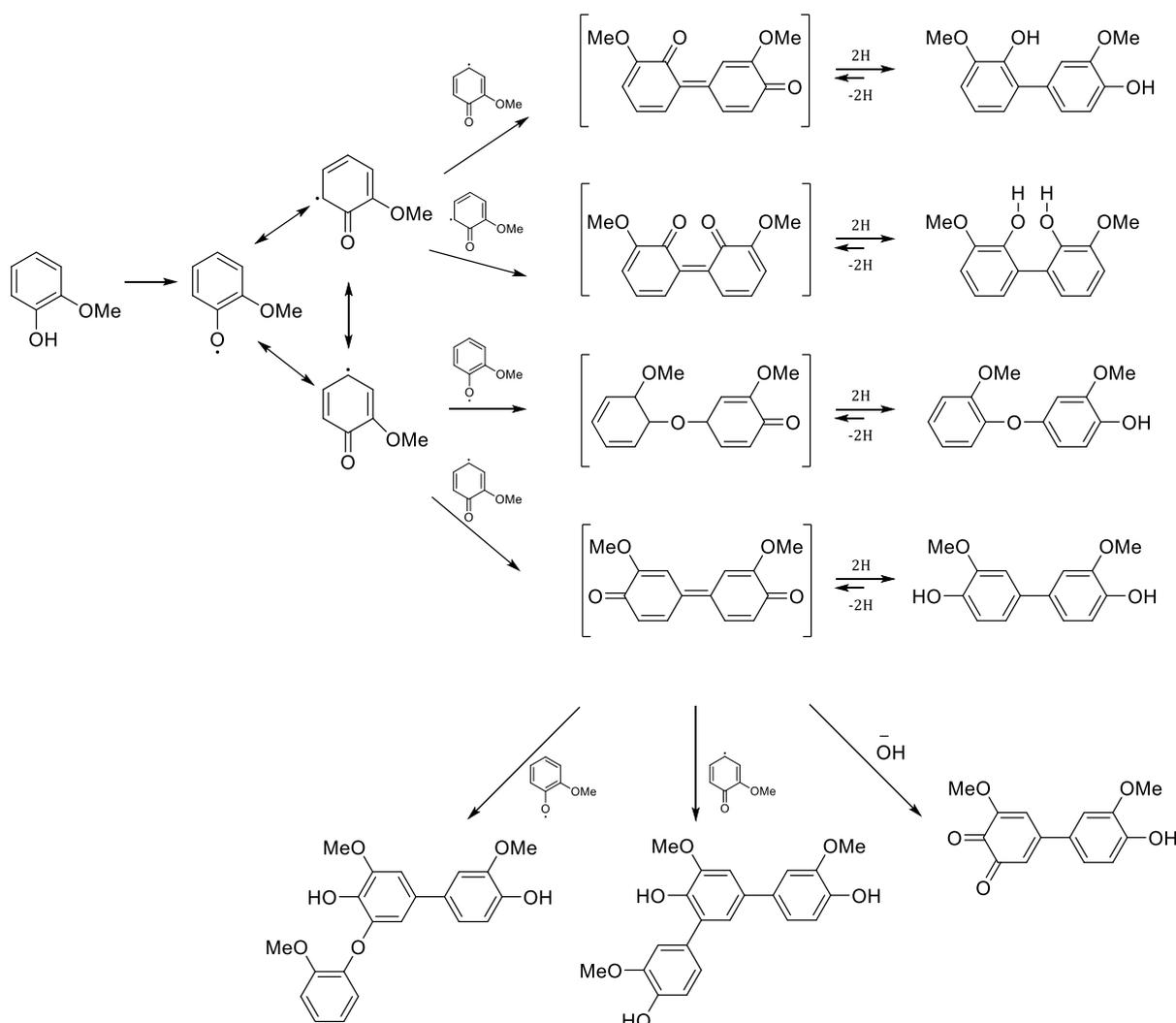


Figure II-28 : Polymérisation du gaïacol par la peroxydase de manganèse. [17]

Ainsi, de la même manière que pour la laccase, la BOD oligomérisé le gaïacol par une réaction de couplage radicalaire de plusieurs formes oxydées du substrat. Les masses molaires obtenues sont similaires pour les deux enzymes. Des chaînes de taille diverse sont obtenues, et le phénomène de couplage s'arrête vraisemblablement lorsque les oligomères précipitent.

III.1.2. Traitement enzymatique du créosol

Le 2-methoxy-4-methylphenol, également appelé créosol, a ensuite été traité enzymatiquement avec la laccase et la BOD.

III.1.2.a. Créosol et laccase

La réaction du créosol avec la laccase conduit à un précipité avec un rendement supérieur à 98 %. Ce précipité a été analysé par RMN du proton et du carbone, et les signaux caractéristiques du dicréosol sont retrouvés, en Figure II-29.

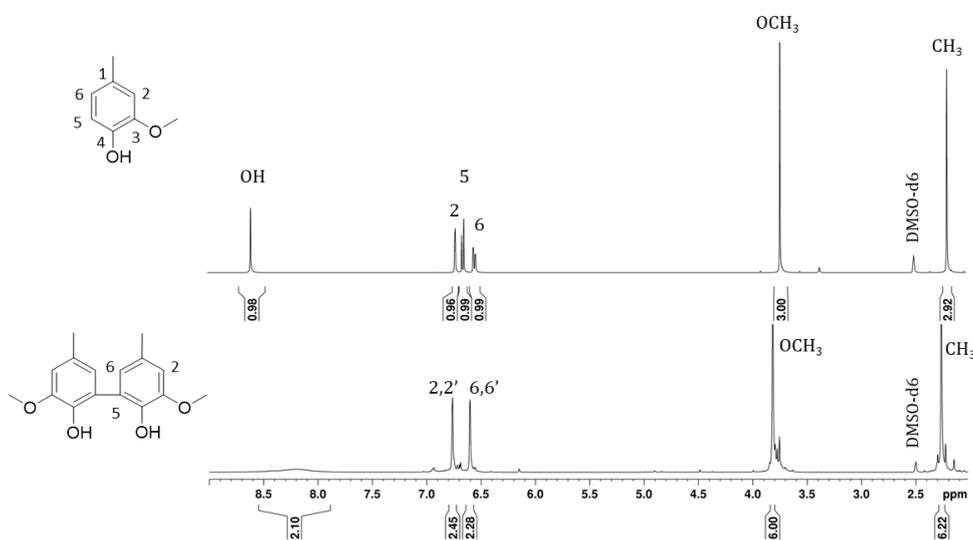


Figure II-29 : Spectres RMN ^1H du créosol et de la fraction insoluble produite par son traitement enzymatique avec la laccase.

Ainsi, comme attendu, la laccase dimérise le créosol en dicréosol par couplage oxydant radicalaire.

III.1.2.b. Créosol et BOD dans eau/acétone

La réaction du créosol avec la BOD conduit à la formation de 100 % de fraction insoluble. Cette fraction est analysée par spectroscopie RMN, et le spectre de RMN du ^{13}C est représenté en Figure II-30. La spectroscopie RMN du carbone est présentée ici plutôt que le proton car elle permet de mieux discriminer les deux espèces présentes dans le mélange, le créosol et son dimère, comparée à la RMN du proton qui présente des signaux multiples élargis qui se chevauchent.

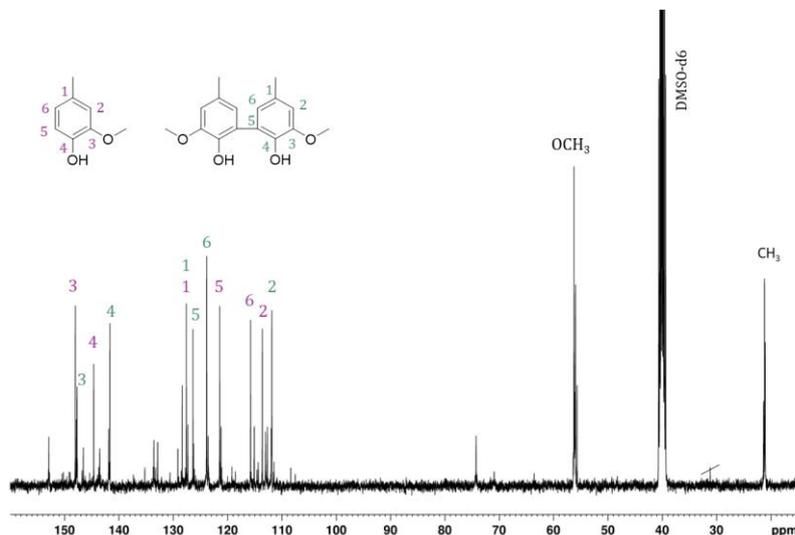


Figure II-30 : Spectre RMN ^{13}C de la fraction insoluble du traitement enzymatique du créosol avec la BOD.

Dans la fraction insoluble, un mélange comprenant le créosol et son dimère, le dicrésol, a été identifié. Ainsi, la BOD a dimérisé le créosol, et la solubilité limitée du monomère dans le mélange eau/acétone a conduit à sa précipitation. Une hypothèse expliquant cette précipitation pourrait être une évaporation de l'acétone entraînée par le flux d'oxygène, provoquant la précipitation d'une partie du créosol dans l'eau.

III.1.3. Traitement enzymatique de la vanilline

III.1.3.a. Vanilline et laccase

La réaction de la vanilline avec la laccase conduit à un précipité avec un rendement supérieur à 98 %. Ce précipité a été analysé par RMN du proton et du carbone, et on retrouve les signaux caractéristiques de la divanilline, en Figure II-31.

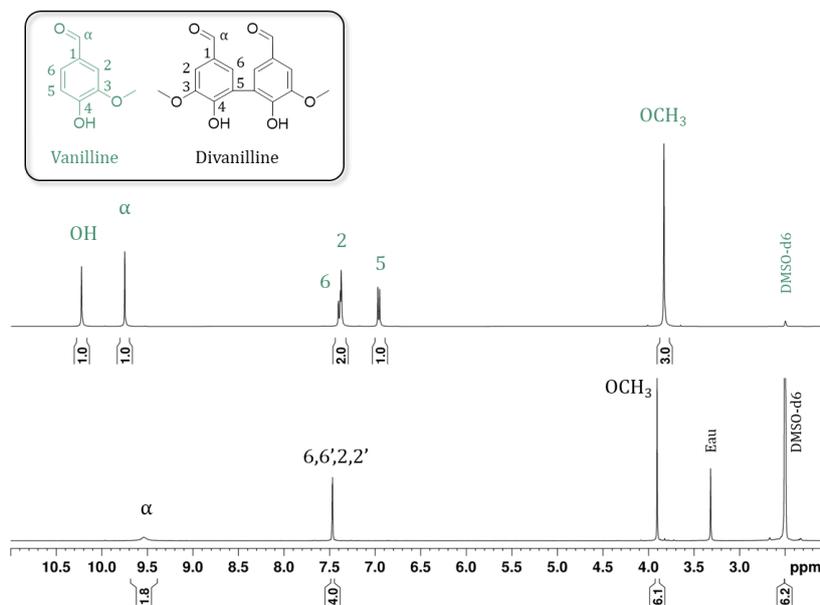


Figure II-31 : Spectre RMN ^1H de la vanilline et de la fraction insoluble produite par son traitement enzymatique avec la laccase.

Par conséquent, la laccase dimérise la vanilline en divanilline par réaction de couplage oxydant.

III.1.3.b. Vanilline et BOD dans eau/acétone

La réaction de la vanilline avec la BOD conduit à la production d'un précipité avec un rendement de 80 %. La spectroscopie RMN ^1H présenté en Figure II-32 a permis d'identifier la formation du dimère divanilline, ainsi que des traces de vanilline non consommée.

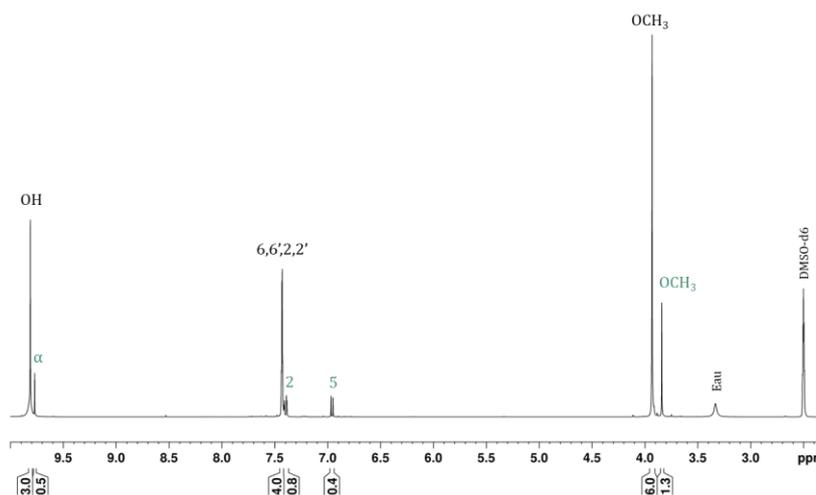


Figure II-32 : Spectre RMN 1H de la fraction insoluble produite par la réaction de la vanilline avec la BOD. En noir les signaux de la divanilline formée et en vert les signaux de la vanilline résiduelle.

Comme attendu, la BOD dimérise également la vanilline. Une cinétique de la formation du dimère en fonction du temps de réaction a été conduite, elle est présentée en Figure II-33. Il est montré que la quantité de divanilline produite augmente au cours du temps, en passant de 14 % en deux heures de réaction à 61 % au bout de dix heures.

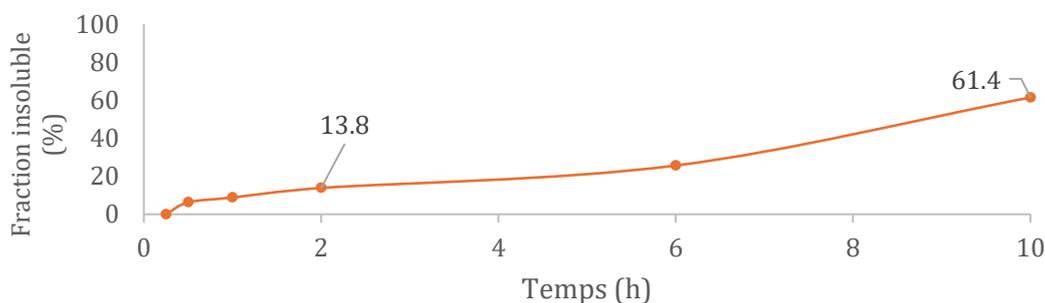


Figure II-33 : Cinétique de la production de divanilline insoluble au cours du temps de réaction.

III.1.4. Traitement enzymatique de l'alcool vanillique

L'alcool vanillique a été synthétisé par réduction de la vanilline et purifié.

III.1.4.a. Alcool vanillique et laccase

La réaction de l'alcool vanillique avec la laccase conduit à la production d'un précipité. Aucune fraction soluble n'est obtenue. Les analyses de SEC dans le THF et la spectroscopie RMN ¹³C de la fraction insoluble obtenue sont représentées en Figure II-34.

La SEC montre une augmentation des masses molaires, avec la formation d'oligomères de petites tailles. La calibration PS indique une Mw de 770 g/mol, soit un DPw d'environ 5 (la masse molaire de l'alcool vanillique valant 154 g/mol). Une incertitude demeure sur la position du couplage, car

le spectre de RMN ^{13}C montre des signaux très semblables à ceux du substrat de départ, mis à part un bruitage beaucoup plus important.

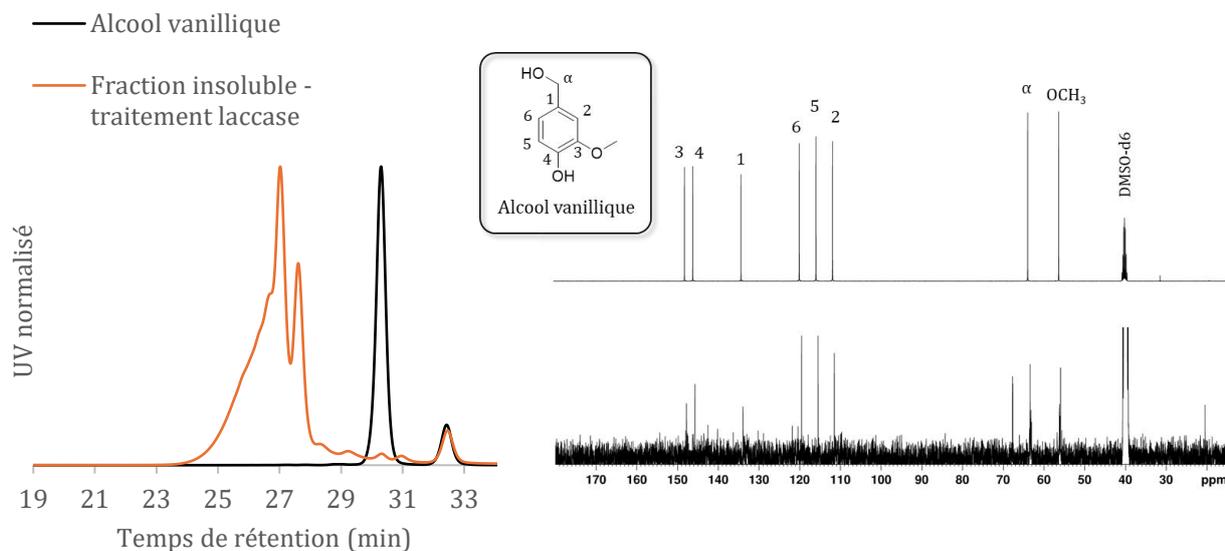


Figure II-34 : À gauche - Chromatogramme SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes. À droite - Spectres RMN ^{13}C de l'alcool vanillique et de la fraction insoluble produite par la réaction entre le monomère et la laccase.

En se référant au Tableau II-1 qui récapitule les résultats de A. Llevot avec la laccase, il est noté qu'un mélange de petits oligomères était obtenu, avec une incertitude sur la position de couplage, ce qui est cohérent avec les résultats reproduits ici.

III.1.4.b. Alcool vanillique et BOD dans eau/acétone

La réaction de l'alcool vanillique avec la BOD conduit à la formation d'une fraction soluble (50 %) et d'une fraction insoluble (50 %). D'après la SEC dans le THF présentée en Figure II-35, des composés de masse molaire plus importante sont obtenus dans la fraction insoluble. D'après la calibration PS, il s'agirait d'oligomères de 625 g/mol soit un DPw d'environ 4 (la masse molaire de l'alcool vanillique étant 154 g/mol). Il pourrait s'agir de produits d'un couplage en *ortho*. La fraction soluble semble être composée d'espèces oligomères mais également d'une population de plus faible masse y compris l'alcool vanillique résiduel. Les limites de séparation des colonnes de SEC sont atteintes avec des composés de si faibles masses molaires, ce qui met en question les signaux observés.

La RMN ^{13}C de la fraction soluble montre un nouveau signal à 192 ppm, qui n'apparaissait pas lors de la réaction avec la laccase, et qui correspond à un carbone oxydé d'une cétone ou d'un aldéhyde. Ce signal d'oxydation est également présent dans le spectre de la fraction insoluble. Un second signal déblindé apparaît à 178 ppm. Les nombreux signaux présents sur les spectres ^{13}C laissent supposer la présence d'un mélange d'espèces, plus ou moins oxydées et couplées.

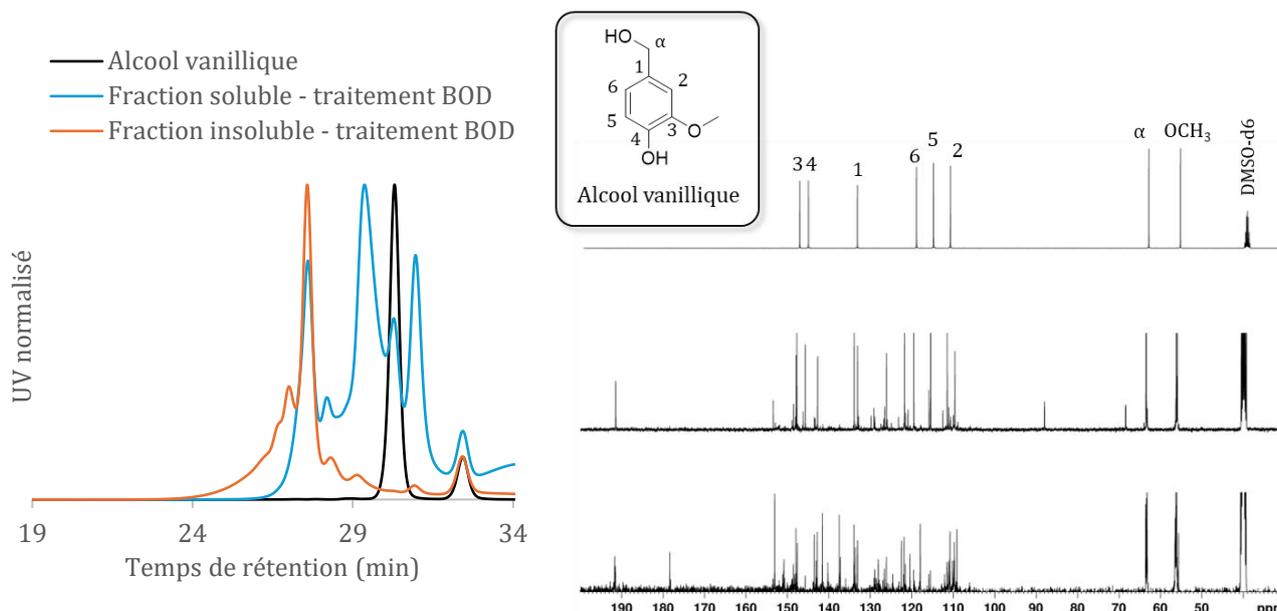


Figure II-35 : À gauche - Chromatogramme SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes. À droite - Spectres RMN ¹³C de l'alcool vanillique et des fractions soluble et insoluble issues de la réaction entre le monomère et la BOD.

Ainsi, il semblerait que la BOD, de la même manière que la laccase, produit des dimères et des oligomères d'alcool vanillique. La BOD semble produire un mélange de formes réduites et oxydées, tandis que l'oxydation n'était pas visible avec la laccase. Ce résultat est surprenant, car la laccase utilisée possède un potentiel redox plus élevé que celui de la BOD (750 mV contre 557 mV vs NHE), ce qui devrait lui permettre d'oxyder sans difficulté les substrats que la BOD peut oxyder. Il serait donc intéressant de reproduire la réaction de l'alcool vanillique avec la laccase pour clarifier ces observations.

III.1.5. Traitement enzymatique de l'acide vanillique

III.1.5.a. Acide vanillique et laccase

La réaction de l'acide vanillique avec la laccase conduit à la formation de 70 % de fraction insoluble, dont le chromatogramme SEC et le spectre RMN ¹H sont représentés en Figure II-36.

Aucun spectre RMN exploitable n'a été obtenu pour la fraction soluble. De nombreux essais ont été réalisés dans plusieurs solvants deutérés, mais aucun signal n'était obtenu. Un profil de polymère est obtenu pour la fraction insoluble issue de la réaction de l'acide vanillique avec la laccase, qui se remarque également sur le spectre RMN du proton par des signaux étalés.

Ainsi, la laccase procède à un couplage de l'acide vanillique et produit des chaînes de plus grandes tailles.

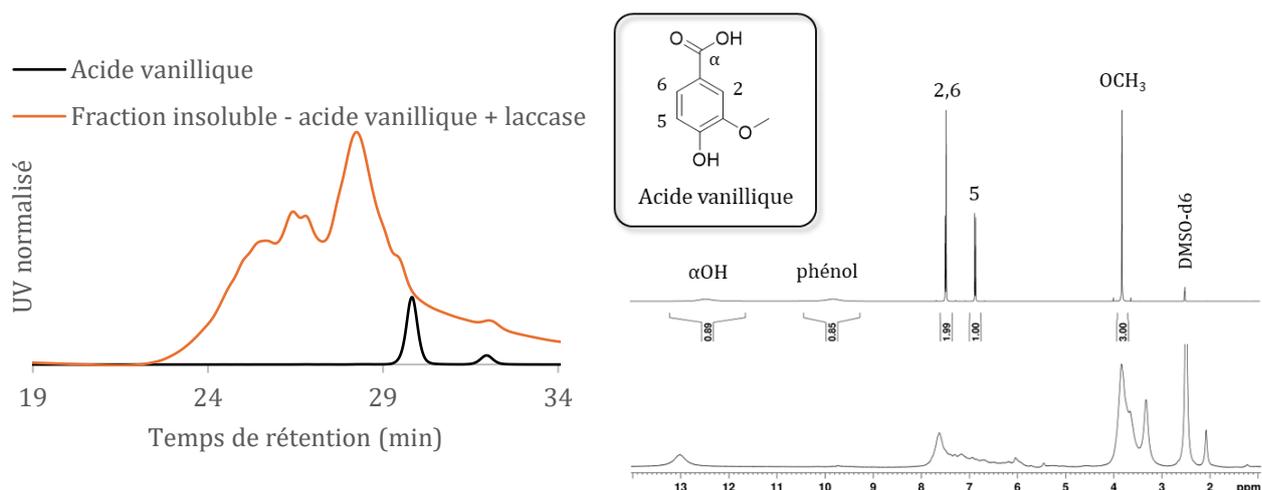


Figure II-36 : À gauche - Chromatogramme SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes. À droite - Spectres RMN ¹³C de l'acide vanillique et de la fraction insoluble issue de sa réaction avec la laccase.

III.1.5.b. Acide vanillique et BOD dans eau/acétone

Lors du traitement enzymatique de l'acide vanillique avec la BOD, l'intégralité du substrat est récupérée inchangé dans la fraction soluble. Cette différence d'action entre la laccase et la BOD peut s'expliquer par la différence de leur potentiel redox. En effet, la laccase utilisée possède un haut potentiel redox autour de 750 mV vs NHE tandis que la BOD fournie par le CRPP a un potentiel de 557 mV DSCNHE. [18–20] Ainsi, la BOD ne serait pas capable d'oxyder certains substrats que la laccase peut modifier.

III.1.6. Traitement enzymatique d'un modèle β -O-4 réduit

La synthèse du modèle β -O-4 réduit n'a pas été synthétisée dans le cadre de cette thèse, mais plusieurs voies de synthèses sont reportées dans la littérature, notamment par Zhao *et al.* [21]

III.1.6.a. Modèle β -O-4 réduit et laccase

Le modèle a été solubilisé pendant 4 heures dans le mélange tampon acétate à pH 5 / acétone (20 %v) afin de s'assurer de sa solubilité complète avant d'ajouter l'enzyme. Le traitement du modèle β -O-4 réduit avec la laccase produit 36 % de fraction soluble et 64 % de fraction insoluble. Aucun spectre RMN exploitable n'a été obtenu pour la fraction soluble. De nombreux essais ont été réalisés dans plusieurs solvants deutérés, mais aucun signal n'était obtenu.

Le profil de SEC dans le THF pour la fraction insoluble révèle une augmentation des masses molaires qui atteint 1 680 g/mol d'après la calibration PS, soit un DPw entre 5 et 6 (la masse molaire du dimère valant 290 g/mol). Le spectre RMN ¹³C présente un signal à 200 ppm, indiquant une oxydation en position α . D'après la littérature, le signal de la cétone en α du modèle β -O-4 oxydé se trouve entre 193 et 195 ppm dans le CDCl₃ [22][23], valeurs assez proches de celle

obtenue avec le traitement laccase. La laccase aurait ainsi polymérisé et oxydé le modèle β -O-4 réduit.

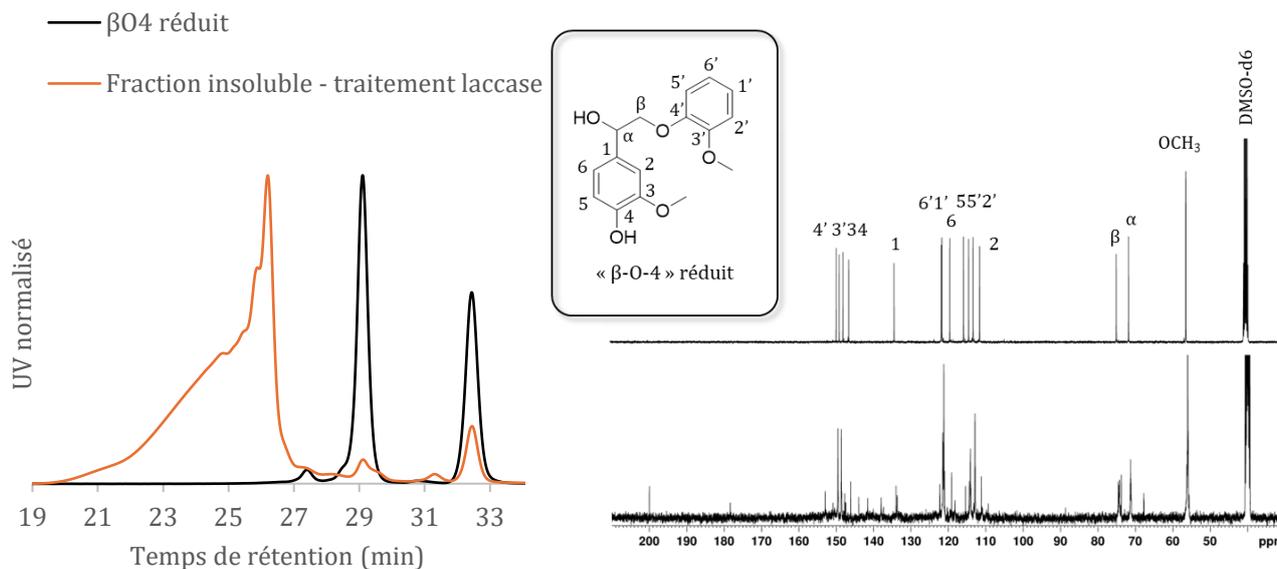


Figure II-37 : À gauche - Chromatogramme SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes. À droite - Spectres RMN ^{13}C du modèle β -O-4 et de la fraction insoluble produite par sa réaction avec la laccase.

III.1.6.b. Modèle β -O-4 réduit et BOD dans eau/acétone

Le traitement du modèle β -O-4 réduit avec la BOD produit 24 % de fraction soluble et 76 % de fraction insoluble. Une polymérisation a lieu dans les deux fractions, comme le montrent les profils de SEC dans le THF (Figure II-38). La calibration PS donne une valeur de 1 115 g/mol atteinte pour les deux fractions. Il est notable que le signal du réactif de départ est présent dans les deux fractions obtenues, surtout dans la fraction soluble. Ces fractions ont été analysées par RMN du ^{13}C et leurs spectres sont représentés en Figure II-38.

Les signaux de la fraction insolubles sont semblables à ceux du substrat de départ. Le spectre de la fraction soluble montre un bruitage augmenté, bien que les zones caractéristiques des signaux du réactif soient conservées : aromatiques, carbones α et β , et signal du méthoxy. Un signal apparaît à 30,5 ppm qui est attribué à des traces d'acétone.

Finalement, il a été montré que la BOD permet la polymérisation d'un modèle β -O-4 réduit. En comparaison avec la laccase, qui oxyde et polymérise ce dimère β -O-4 réduit, il est montré que la

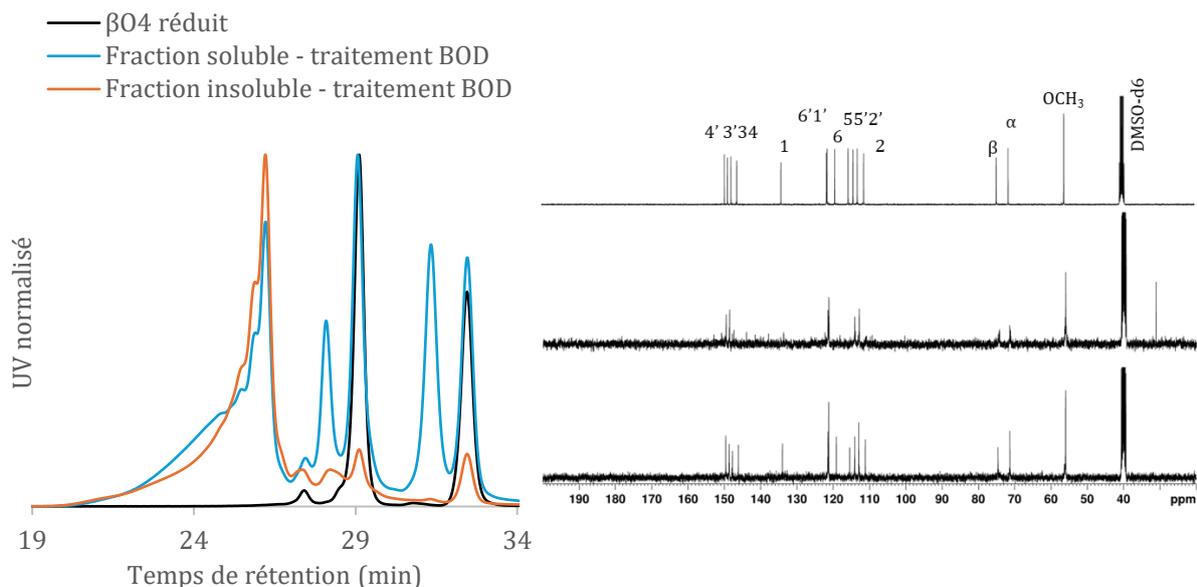


Figure II-38 : À gauche - Chromatogramme SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes. À droite - Spectres RMN ^1H du modèle $\beta\text{-O-4}$ et des fractions soluble (au milieu) et insoluble (en bas) issues de la réaction avec la BOD.

différence de potentiel redox entre les deux enzymes limite probablement l'action de la BOD. En effet, ayant un potentiel redox plus faible, la BOD ne peut pas oxyder l'hydroxyle en α du modèle.

III.1.7. Traitement de l'acétovanillone méthylée et réduite

Dans les paragraphes précédents, il a été déterminé qu'un substrat phénolique qui porte un substituant en position *para* est couplé par la BOD (acétovanillone, créosol, vanilline). Le couplage oxydant se produit grâce à l'oxydation du phénol. Qu'en est-il si le phénol est protégé ?

Le phénol de l'acétovanillone (1) a été méthylée (2) et le composé a ensuite été réduit (3) (Figure II-39).

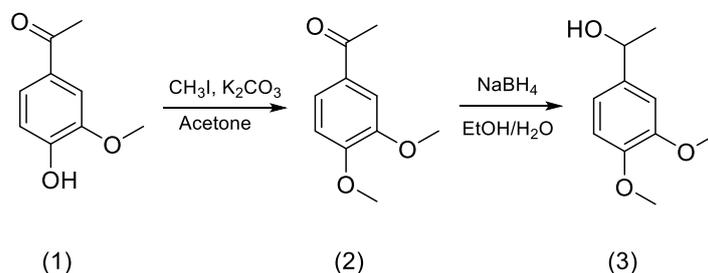


Figure II-39 : Méthylation et réduction de l'acétovanillone (1).

Il a été montré que ni la BOD ni la laccase n'ont une action sur l'acétovanillone méthylée protégée (3). Cette expérience confirme la nécessité de la présence d'un phénol libre qui permet le couplage radicalaire oxydant enzymatique.

III.1.8. Conclusion

Cette première sous-partie a présenté les réactions de la laccase *d'Aspergillus sp.* et de la BOD de *B. Pumilus* sur des substrats phénoliques *ortho* mono méthoxylés. Il a été montré que l'action de la BOD est semblable à celle de la laccase dans la plupart des cas (Figure II-40).

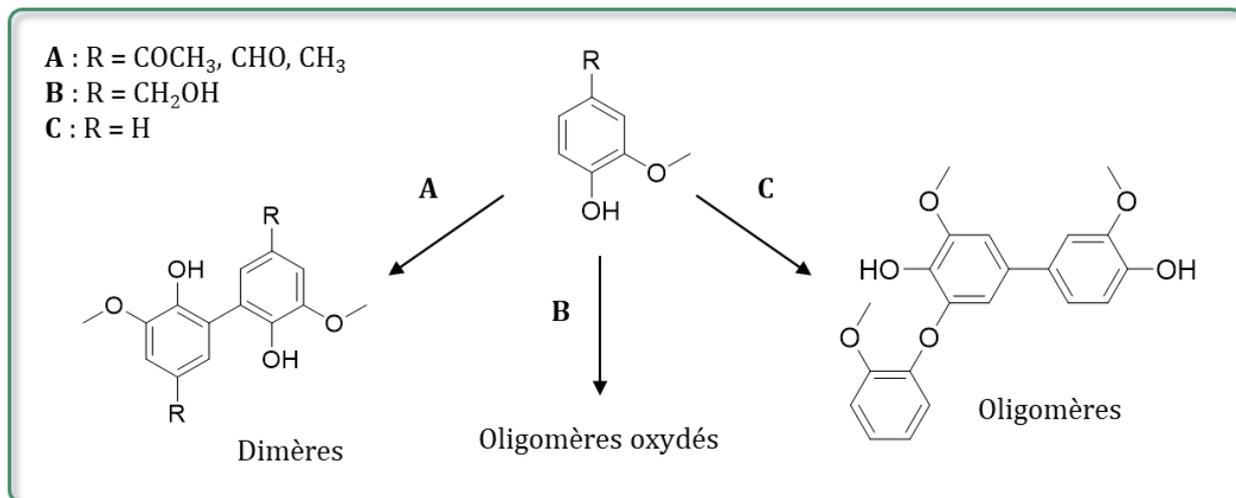


Figure II-40 : Récapitulatif de l'action de la BOD sur des monomères phénoliques *ortho*-substitués.

Une différence a été observée dans le traitement enzymatique de l'alcool vanillique : il est oxydé par la BOD (voie B de la Figure II-40), tandis qu'aucune oxydation n'a été détectée dans les fractions traitées avec la laccase. C'est un résultat étonnant, car la laccase utilisée possède un potentiel redox compris autour de 750 mV, nettement supérieur au potentiel redox de la BOD (557 mV). Il est donc nécessaire de répéter les expériences pour confirmer la fiabilité de cette observation.

Le traitement d'un dimère β -O-4 réduit avec la laccase et la BOD a révélé une différence : bien que la polymérisation soit observée dans les deux cas, une oxydation supplémentaire apparaît avec l'utilisation de la laccase. C'est ce qui est récapitulé en Figure II-41. Une fois de plus, cette différence est compréhensible au regard des potentiels redox respectifs de la laccase et de la BOD.

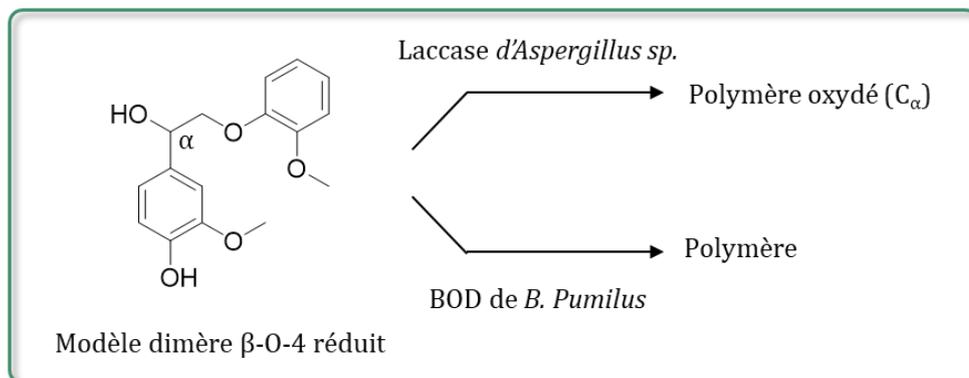


Figure II-41 : Comparaison de l'action d'une laccase et d'une BOD sur un modèle dimère β -O-4 réduit.

Lors de la production d'oligomères, la laccase permet l'obtention des tailles de chaînes légèrement plus élevées que la BOD, comme résumé en Tableau II-5

Tableau II-5 : Récapitulatif des Mw obtenues lors de la production d'oligomères par la laccase ou la BOD.

	Laccase	BOD
Gaïacol	1 250 g/mol	1 020 g/mol
Alcool vanillique	770 g/mol	620 g/mol
β -O-4	1 680 g/mol	1 110 g/mol

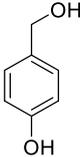
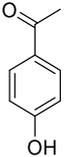
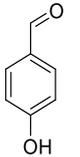
Une fois de plus, ce résultat peut être expliqué par le potentiel redox de la laccase supérieur à celui de la BOD, ce qui va permettre à l'enzyme d'oxyder et de coupler plus efficacement des substrats en un temps imparti.

La partie suivante présente les traitements enzymatiques de composés phénoliques non substitués en *ortho*.

III.2. Couplage enzymatique de phénols *ortho* non-substitués

Le traitement enzymatique de composés phénoliques non-substitués en *ortho* a été réalisé. L'alcool 4-hydroxybenzylique, la 4-hydroxyacétophénone ainsi que le 4-hydroxybenzaldéhyde ont été traités par la laccase et la BOD. Les résultats des réactions avec la laccase et la BOD sont présentés dans le Tableau II-6. Aucune des deux enzymes n'a d'effet sur ces composés *ortho* non méthoxylés, à l'exception de la BOD, qui agit sur l'alcool 4-hydroxybenzylique.

Tableau II-6 : Récapitulatif des traitements de phénols non méthoxylés en *ortho*. Les « / » indiquent qu'il n'y a eu aucune modification de la structure du substrat.

Nom	alcool 4-hydroxybenzylique	4-hydroxyacétophénone	4-hydroxybenzaldehyde
Structure			
Effet traitement laccase	/	/	/
Effet traitement BOD	Soluble (70 %) = produit de départ Insoluble (30 %) = polymère	/	/

Le traitement de l'alcool 4-hydrobenzylique avec la BOD produit 30 % d'un polymère dont la chromatographie d'exclusion stérique est représentée en Annexe II-2, avec une Mw atteinte de 1 050 g/mol d'après la calibration PS.

Le travail d'A. Llevot montrait que les phénols non substitués en position *ortho* portant des groupes électroattracteurs en position *para* ne se sont pas couplés, tandis que ceux portant des groupes électrodonneurs produisent des oligomères. Ce phénomène de polymérisation du 4-hydroxybenzaldéhyde n'a pas été observé ici, ni avec la laccase ni avec la BOD. Le travail d'A. Llevot a été conduit avec une laccase de *Trametes versicolor*, qui possède un potentiel redox de 790 mV, soit dans la gamme haute des valeurs. Ainsi, il serait possible que la laccase d'*Aspergillus sp.* ne soit pas capable de procéder au couplage oxydant de ce phénol à cause d'une valeur trop basse de son potentiel redox.

La partie suivante présente les traitements enzymatiques de composés phénoliques bi-substitués en *ortho*.

III.3. Couplage enzymatique de phénols *ortho* bi substitués

III.3.1. Traitement enzymatique de l'acétosyringone

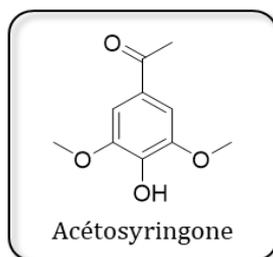


Figure II-42 : Structure de l'acétosyringone.

Ni la laccase ni la BOD n'ont modifié l'acétosyringone qui est retrouvée intacte après les traitements enzymatiques.

III.3.2. Traitement enzymatique du 2,6 diméthoxyphénol.

III.3.2.a. 2,6 diméthoxyphénol et laccase

La réaction du 2,6 diméthoxyphénol avec la laccase produit 33 % de fraction soluble qui correspond au substrat de départ inchangé. La fraction insoluble qui représente donc 67 % du produit est une poudre violet foncé. D'après la RMN ¹H présentée en Figure II-43, elle correspond au dimère en *para* du 2,6 diméthoxyphénol sous sa forme quinone.

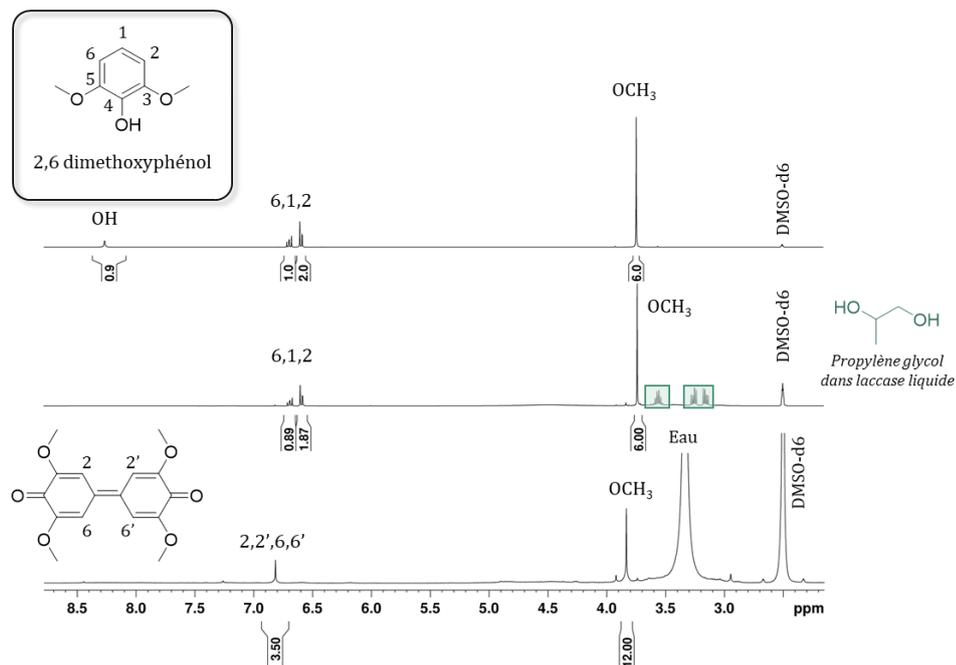


Figure II-43 : Spectres RMN ^1H du 2,6 diméthoxyphénol et des fractions solubles et insolubles produites par sa réaction avec la laccase (de haut en bas).

III.3.2.b. 2,6 diméthoxyphénol et BOD dans eau/acétone

La réaction du 2,6 diméthoxyphénol avec la BOD produit 17 % de fraction soluble qui correspond au substrat de départ inchangé. Les 83 % restants représentent une poudre violet foncé. Elle est

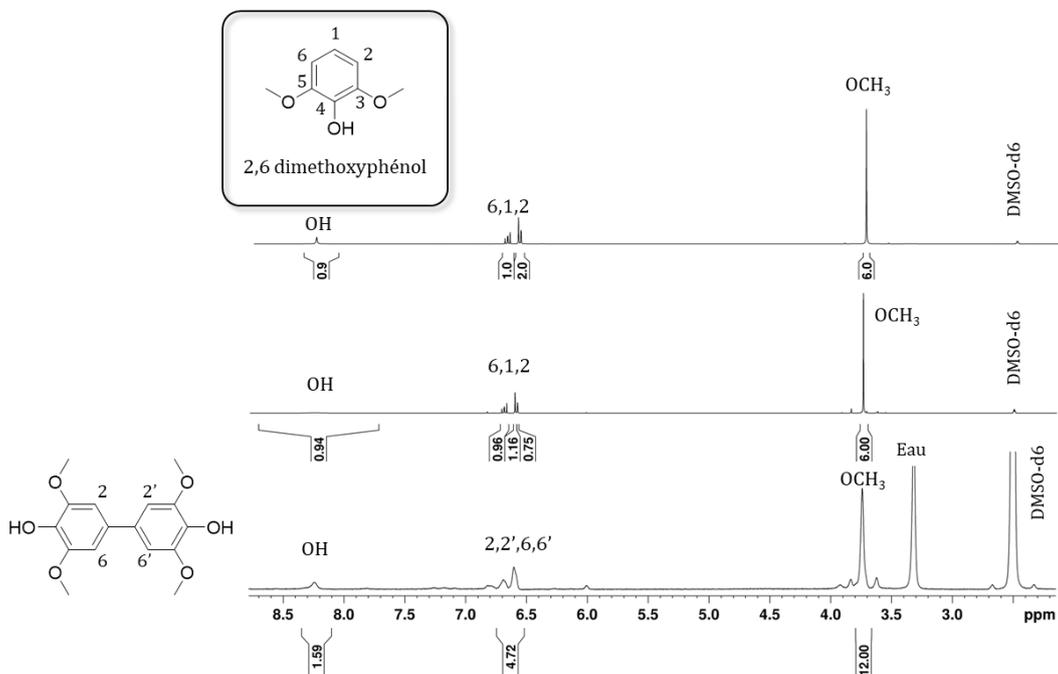


Figure II-44 : Spectres RMN ^1H du 2,6 diméthoxyphénol et des fractions solubles et insolubles produites par sa réaction avec la BOD (de haut en bas).

analysée par spectroscopie RMN ^1H et les spectres obtenus sont représentés en Figure II-44. La fraction insoluble correspond au dimère en *para* du 2,6 diméthoxyphénol sous sa forme bisphénol. En effet, le signal des deux phénols est visible à 8,25 ppm. La raison pour laquelle la laccase produit le dimère sous forme quinone et la BOD le dimère sous forme bisphénol n'est pas expliquée à ce jour.

III.3.3. Traitement enzymatique de l'acide syringique

III.3.3.a. Avec la laccase et la BOD

Ce paragraphe regroupe les résultats pour le traitement avec la laccase et avec la BOD car ils ont donné des résultats similaires. La réaction de l'acide syringique avec la laccase produit 72 % de fraction insoluble et la BOD produit 80 % de fraction insoluble qui sont analysées par SEC dans le THF et par spectroscopie RMN. Les SEC dans le THF présentées en Figure II-45 montre une augmentation des masses molaires des deux fractions insolubles, avec une augmentation plus flagrante pour le traitement avec la laccase. Il est notable qu'un signal correspondant au réactif est présent dans les deux chromatogrammes. La calibration PS indique une Mw de 1 020 g/mol et une dispersité de 1,2 pour le traitement avec la laccase ; une Mw 500 g/mol et une dispersité de 1,19 pour le traitement avec la BOD.

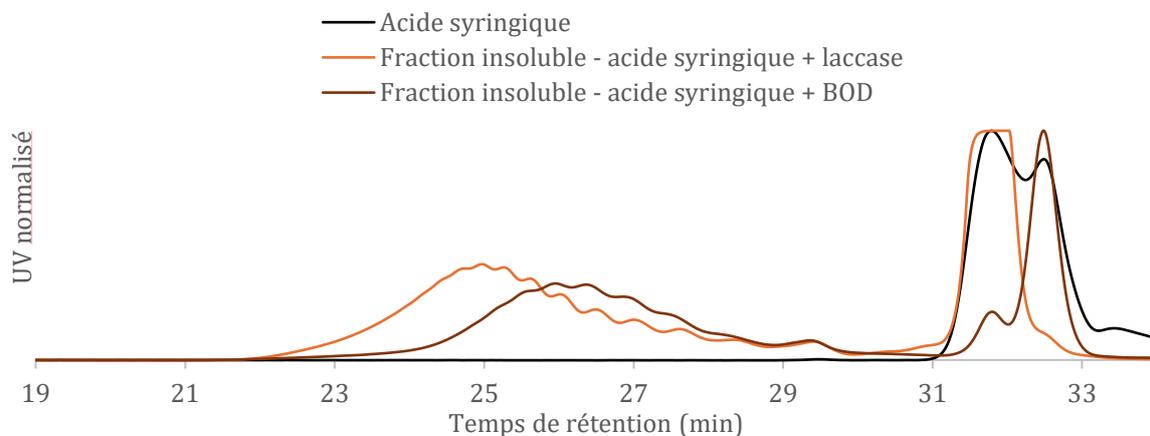


Figure II-45 : Chromatogrammes SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes.

Un seul spectre RMN ^{13}C est présenté en Figure II-46, il s'agit de la fraction insoluble issue du traitement avec la BOD mais il est le même pour les deux traitements enzymatiques, et montre les signaux caractéristiques d'un poly(oxyde de phénylène). L'acide syringique serait donc décarboxylé et polymérisé en *para*.

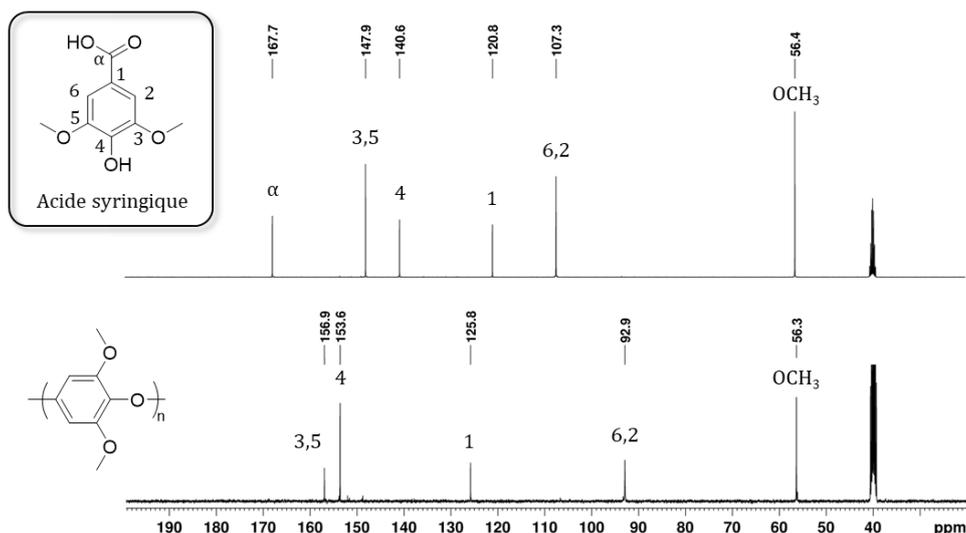


Figure II-46 : Spectres RMN ^{13}C dans le DMSO- d_6 de l'acide syringique et du produit insoluble formé par sa réaction avec la BOD et la laccase.

Le polymère issu de la réaction avec la BOD a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight). Le spectre obtenu est représenté en Figure II-47. Il montre une masse molaire qui atteint jusqu'à 2 700 g/mol. Cette valeur est bien plus élevée que l'estimation selon la calibration en SEC THF. Ce n'est pas étonnant, car le polymère est difficilement solubilisable dans les solvants organiques classiques, et la valeur obtenue en SEC est donc sûrement sous-évaluée. Cette analyse permet de déterminer les bouts de chaîne des populations. Le motif de répétition qui sépare deux signaux est de 152 g/mol. Cette valeur correspond bien à la structure proposée pour le poly(oxyde de phénylène) dont le motif est $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$. Un détail de calcul de m/z est présenté en Figure II-48.

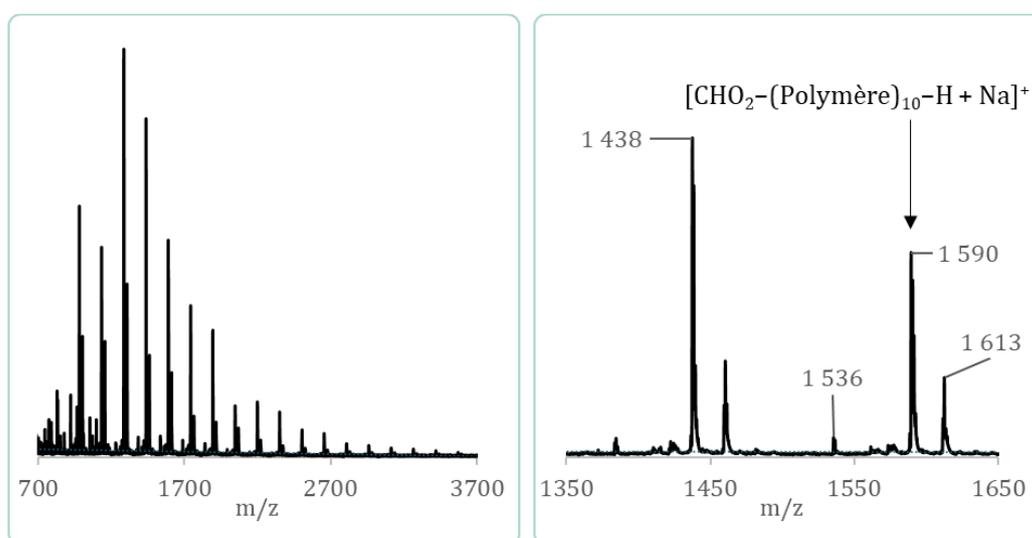


Figure II-47 : Spectres de masse MALDI TOF du polymère obtenu lors de la réaction entre l'acide syringique et la BOD.

Ce détail montre que le pic de m/z 1590 identifiable sur le spectre MALDI TOF correspond à un polymère constitué de 10 unités répétitives de 152 g/mol, un bout de chaîne composé d'un acide CHO₂ et l'autre d'un proton H, ainsi que d'un adduit Na⁺.

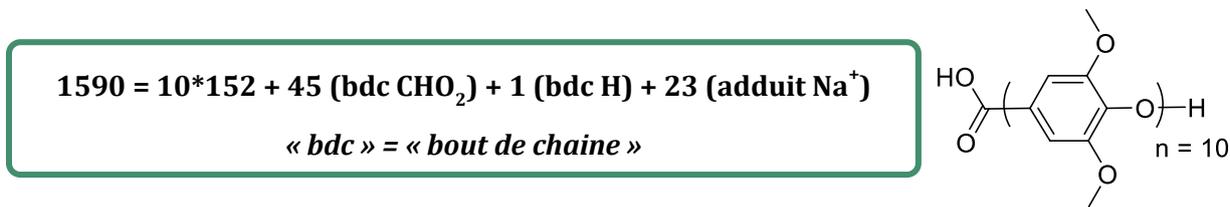


Figure II-48 : Détail du calcul de m/z pour un DP = 10, et structure correspondante.

Deux autres populations sont présentes dans le polymère, dont la masse du motif répétitif vaut également 152 g/mol. Cependant, les bouts de chaîne correspondants n'ont pas pu être déterminés.

On peut conclure que la laccase et la BOD permettent la décarboxylation de l'acide syringique et sa polymérisation en poly(oxyde de phénylène).

III.3.4. Traitement enzymatique de l'alcool syringique

Les réactions de l'alcool syringique avec la laccase et la BOD donnent le même résultat : une oxydation totale de l'alcool en aldéhyde. Un seul spectre RMN ¹³C est représenté en Figure II-49.

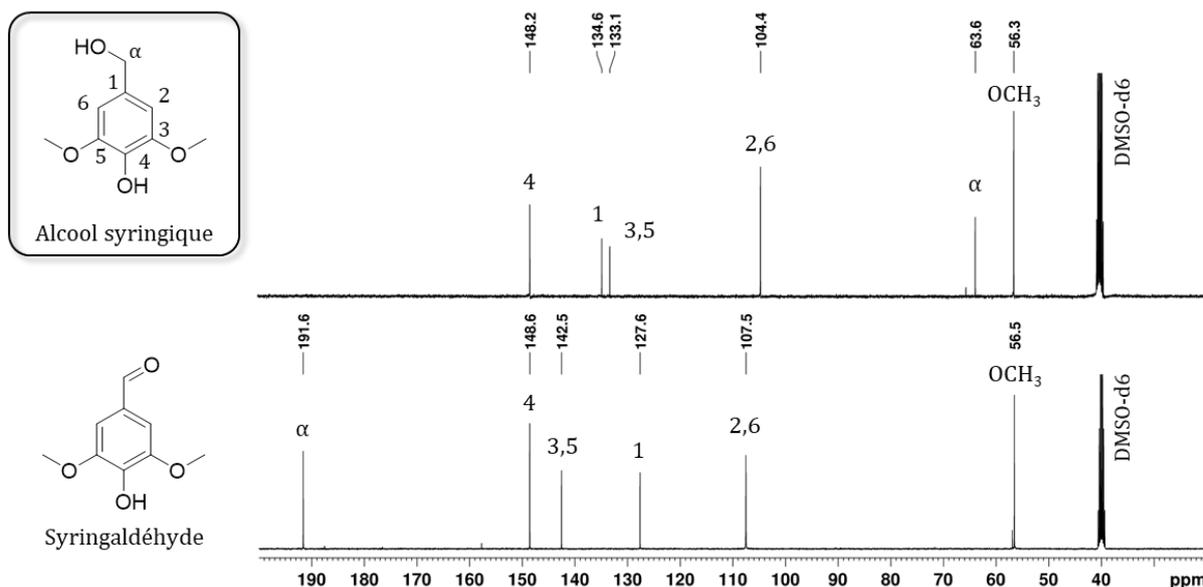


Figure II-49 : Spectres RMN ¹³C dans le DMSO-d₆ de l'alcool syringique et du produit formé par sa réaction avec la BOD et la laccase : la syringaldéhyde.

Il montre bien l'apparition d'un signal à 192 ppm, signe de l'oxydation en α. Le spectre de la syringaldéhyde est ainsi retrouvé post traitement enzymatique.

III.3.5. Conclusion

Dans cette partie, le traitement enzymatique de plusieurs phénols diméthoxylés a été comparé. Plusieurs comportements ont été observés : une inertie vis-à-vis des enzymes multi-cuivre (acétosyringone), une dimérisation (2,6 diméthoxy phénol), une polymérisation (acide syringique) ou une oxydation en α (alcool syringique). Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau II-7.

Tableau II-7 : Récapitulatif du traitement enzymatique de plusieurs phénols diméthoxylés par une laccase ou une BOD.

	Laccase	BOD
Acétosyringone	/	/
2,6 diméthoxy phénol	Dimérisation : forme quinone	Dimérisation : forme biphenyle
Acide syringique	Polymérisation en poly(oxyde de phénylène)	Polymérisation en poly(oxyde de phénylène)
Alcool syringique	Oxydation en syringaldéhyde	Oxydation en syringaldéhyde

La laccase et la BOD semblent avoir la même action sur les phénols diméthoxylés auxquels elles ont été confrontées. Une dimérisation différente a lieu pour le 2,6 diméthoxy phénol, ce qui n'est pas expliqué à ce jour. Les deux enzymes ont la même action sur l'acide et l'alcool syringique, produisant un poly(oxyde de phénylène) et la syringaldéhyde respectivement.

Deux composés qui possèdent des substituants accepteurs d'électrons, la cétone et l'acide carboxylique, ont deux comportements différents face aux enzymes. Une tendance semble ainsi difficile à faire émerger quant aux traitements enzymatiques de ces phénols diméthoxylés avec des enzymes multi-cuivre.

IV. Conclusion

Ce chapitre a mis en évidence plusieurs éléments. Premièrement, la BOD procède au couplage oxydant de l'acétovanillone, de la même manière que la laccase. Une investigation de la nature de la fraction soluble a mené à plusieurs observations : le tampon borate à pH 10 utilisé lors du traitement enzymatique forme un complexe avec les diphenols produits lors de la synthèse enzymatique du dimère. De plus, le signal des protons aromatiques se sépare et s'écarte à mesure que le pH du milieu d'analyse est augmenté.

Dans un second temps, l'action de la BOD a été comparée à celle de la laccase sur un certain nombre de phénols mono-, bi- ou non-*para* substitués. Des résultats similaires sont observés, soit le couplage oxydant menant à une dimérisation, une oligomérisation, une polymérisation ou une oxydation du composé phénolique. Le potentiel redox plus élevé de la laccase lui permet de modifier une plus large gamme de substrat.

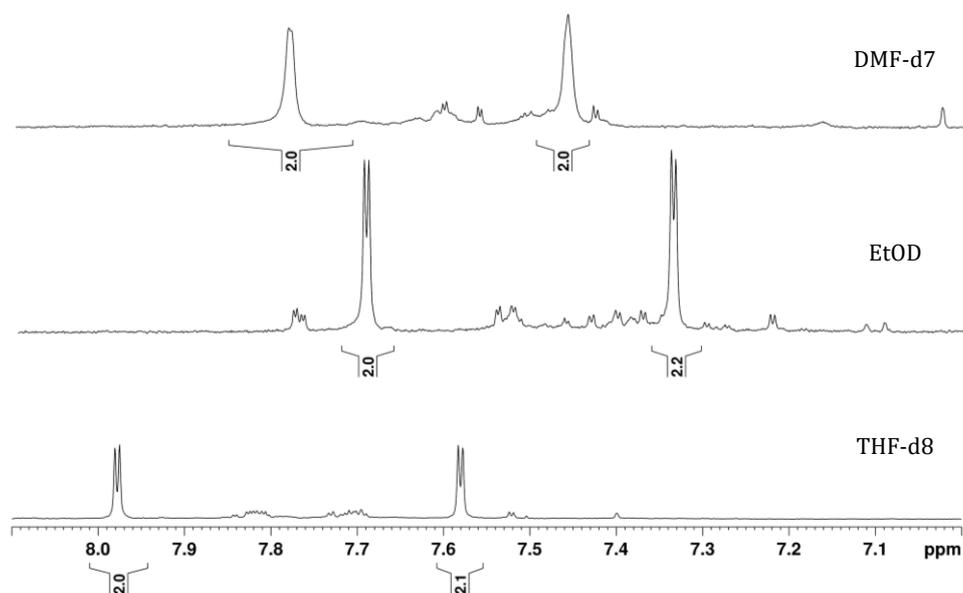
Il pourrait être intéressant de comparer l'action de la BOD sur ces mêmes substrats en ajoutant un médiateur, qui pourrait servir de navette aux électrons et permettre ainsi à l'enzyme de modifier plus de modèles phénoliques.

V. Références bibliographiques

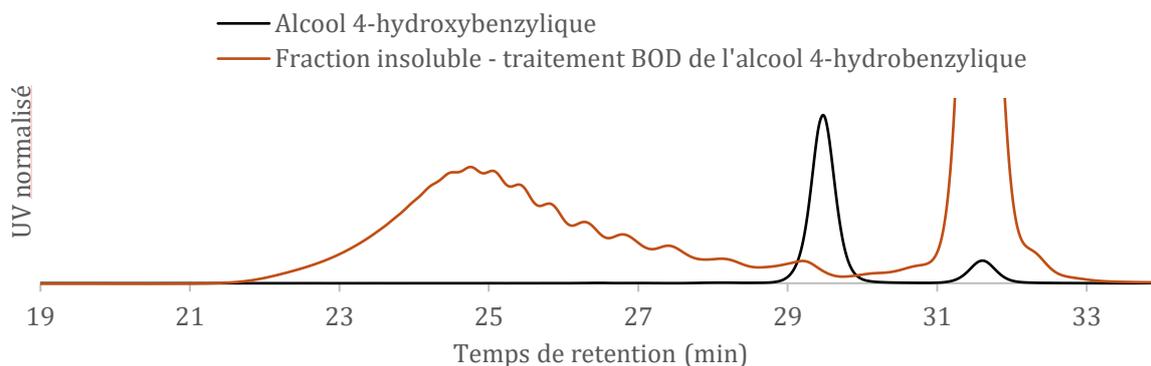
- [1] A. Llevot, *Dimères d'acides Résiniques et de Dérivés de La Lignine : Nouveaux Précurseurs Pour La Synthèse de Polymères Bio-Sourcés*, Thèse de doctorat, Bordeaux **2014**.
- [2] J. Stefanska, R. Pawliczak, *Mediators of Inflammation*. **2008**, *2008*, e106507. DOI: <https://doi.org/10.1155/2008/106507>.
- [3] D. K. Johnson, K. J. Schillinger, D. M. Kwait, C. V. Hughes, E. J. McNamara, F. Ishmael, R. W. O'Donnell, M.-M. Chang, M. G. Hogg, J. S. Dordick, et al., *Endothelium*. **2002**, *9* (3), 191–203. DOI: <https://doi.org/10.1080/10623320213638>.
- [4] B. A. 't Hart, S. Copray, I. Philippens, *BioMed Research International*. **2014**, *2014*, e298020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/298020>.
- [5] R. I. Bickley, G. Munuera, F. S. Stone, *Journal of Catalysis*. **1973**, *31* (3), 398–407. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9517\(73\)90311-4](https://doi.org/10.1016/0021-9517(73)90311-4).
- [6] N. Agnihotri, P. C. Mishra, *Journal of Physical Chemistry. B*. **2009**, *113* (35), 12096–12104. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp903604s>.
- [7] A. Zhitkovich, *Chemical Research in Toxicology*. **2019**, *32* (7), 1318–1319. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00152>.
- [8] G. Bringmann, A. J. Price Mortimer, P. A. Keller, M. J. Gresser, J. Garner, M. Breuning, *Angewandte Chemie International Edition*. **2005**, *44* (34), 5384–5427. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200462661>.
- [9] "NOESY and ROESY - Columbia University / noesy-and-roesy-columbia-university.pdf / PDF4PRO," <https://pdf4pro.com/view/noesy-and-roesy-columbia-university-228173.html>
- [10] D. Venturini, A. R. De Souza, I. Caracelli, N. H. Morgon, L. C. Da Silva-Filho, V. F. Ximenes, *PLoS ONE*. **2017**, *12* (6), e0178597. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178597>.
- [11] D. Venturini, B. Pastrello, M. L. Zeraik, I. Pauli, A. D. Andricopulo, L. C. Silva-Filho, V. S. Bolzani, N. H. Morgon, A. R. da Souza, V. F. Ximenes, *RSC Advances*. **2015**, *5* (76), 62220–62228. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA10960D>.
- [12] B. Ranjbar, P. Gill, *Chemical Biology & Drug Design*. **2009**, *74* (2), 101–120. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x>.
- [13] S. S. Andrews, J. Tretton, *Journal of Chemical Education*. **2020**, *97* (12), 4370–4376. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01061>.
- [14] K. L. Tu, A. R. Chivas, L. D. Nghiem, *Desalination*. **2013**, *310*, 115–121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.08.017>.
- [15] R. Belcher, G. W. Tully, G. Svehla, *Analytica Chimica Acta*. **1970**, *50* (2), 261–267. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(70\)80065-4](https://doi.org/10.1016/0003-2670(70)80065-4).
- [16] K. Iwahara, Y. Honda, T. Watanabe, M. Kuwahara, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2000**, *54* (1), 104–111. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530000340>.
- [17] K. E. Simmons, R. D. Minard, J. Bollag, *Soil Science Society of America Journal*. **1988**, *52* (5), 1356–1360. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj1988.03615995005200050028x>.
- [18] S. Wiikee, J. Hatton, A. Turbé-Doan, Y. Mathieu, M. Daou, A. Lomascolo, A. Kumar, S. Lumyong, G. Sciarra, C. B. Faulds, et al., *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**, *20* (8), 1864. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20081864>.

- [19] J. Yang, X. Xu, T. B. Ng, J. Lin, X. Ye, *Molecules*. **2016**, *21* (8), 1017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21081017>.
- [20] C. Sigoillot, E. Record, V. Belle, J. L. Robert, A. Levasseur, P. J. Punt, C. A. M. J. J. van den Hondel, A. Fournel, J. C. Sigoillot, M. Asther, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2004**, *64* (3), 346–352. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1468-3>.
- [21] C. Zhao, J. Huang, L. Yang, F. Yue, F. Lu, *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **2019**, *58* (14), 5707–5714. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00499>.
- [22] M. Dawange, M. V. Galkin, J. S. M. Samec, *ChemCatChem*. **2015**, *7* (3), 401–404. DOI: <https://doi.org/10.1002/cctc.201402825>.
- [23] A. Wu, B. O. Patrick, E. Chung, B. R. James, *Dalton Transactions*. **2012**, *41* (36), 11093–11106. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2DT31065A>.

VI. Annexes



Annexe II-1 : Spectres RMN du ¹H de la fraction soluble issue du traitement de l'acétovanillone avec la BOD dans différents solvants deutérés : zoom sur la zone des aromatiques (entre 7 et 8,1 ppm).



Annexe II-2 : Chromatogrammes SEC dans le THF. Flow Marker : signal à RT = 32,2 minutes.

III. Chapitre 3 : Synthèse et traitement enzymatique de modèles polymères de lignine

I.	Introduction.....	141
II.	Polymères modèles de la liaison β -O-4.....	141
II.1.	Synthèse des monomères.....	141
II.2.	Polymérisation.....	142
II.3.	Réduction.....	144
II.4.	Traitement enzymatique des modèles polymères.....	145
II.5.	Conclusion.....	148
III.	Polymères DHPs.....	149
III.1.	Synthèse de l'alcool coniférylique.....	149
III.2.	Polymérisation.....	150
III.3.	Traitement enzymatique des polymères DHPs.....	153
III.4.	Conclusion.....	154
IV.	Conclusion.....	155
V.	Références bibliographiques.....	156
VI.	Annexes.....	156

I. Introduction

Comme abordé dans la partie bibliographique (I.III), une approche pour étudier les changements de structure de la lignine consiste à créer des modèles intégrant une ou plusieurs de ses liaisons caractéristiques. Ce chapitre se concentre sur la synthèse de deux types de modèles polymères : des homopolymères représentant une version simplifiée de la liaison β -O-4, ainsi que des déhydropolymères (DHPs) obtenus par voie enzymatique. La synthèse de ces modèles, depuis la préparation des monomères jusqu'à la caractérisation des polymères obtenus, sera décrite, avant d'examiner leur traitement enzymatique par la BOD.

II. Polymères modèles de la liaison β -O-4

II.1. Synthèse des monomères

Trois molécules ont été sélectionnées en tant que précurseur de monomère : le 4-hydroxy-3-méthoxyacétophénone aussi appelé l'acétovanillone (1), le 4-hydroxyacétophénone (2) et le 4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl appelé acétosyringone (3). Ces trois molécules représentent les unités guaïacyle (G), p-hydroxyphényle (H) et syringyle (S) de la lignine, et vont servir de point de départ à la synthèse de modèle de lignine.

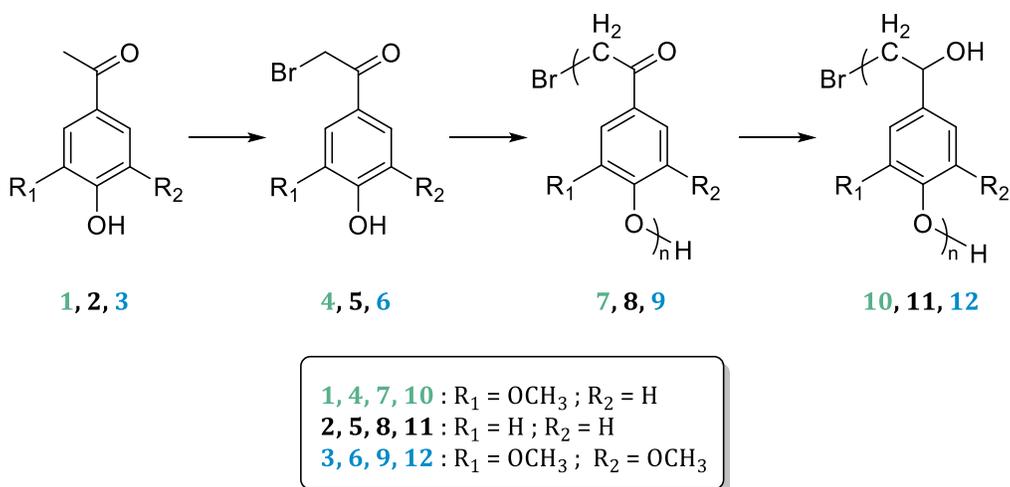


Figure III-1 : Synthèse de modèles polymères oxydés (7,8,9) et réduits (10,11,12).

Dans la suite du manuscrit, seuls les résultats obtenus à partir de l'acétovanillone, soit le composé (1) qui modélise l'unité G, seront discutés en détail. La première étape est la bromation de l'acétovanillone (1) en β de la cétone à l'aide du bromure de cuivre (II), selon le protocole de Joy *et al.* et le mécanisme suggéré Figure III-2. [1]

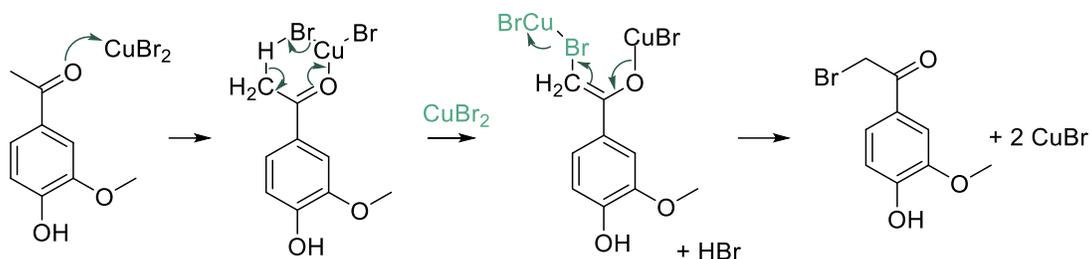


Figure III-2 : Mécanisme de bromation de l'acétovanillone par CuBr_2 .

Le suivi de la réaction est réalisé par spectroscopie RMN du proton, représentée en Figure III-3.

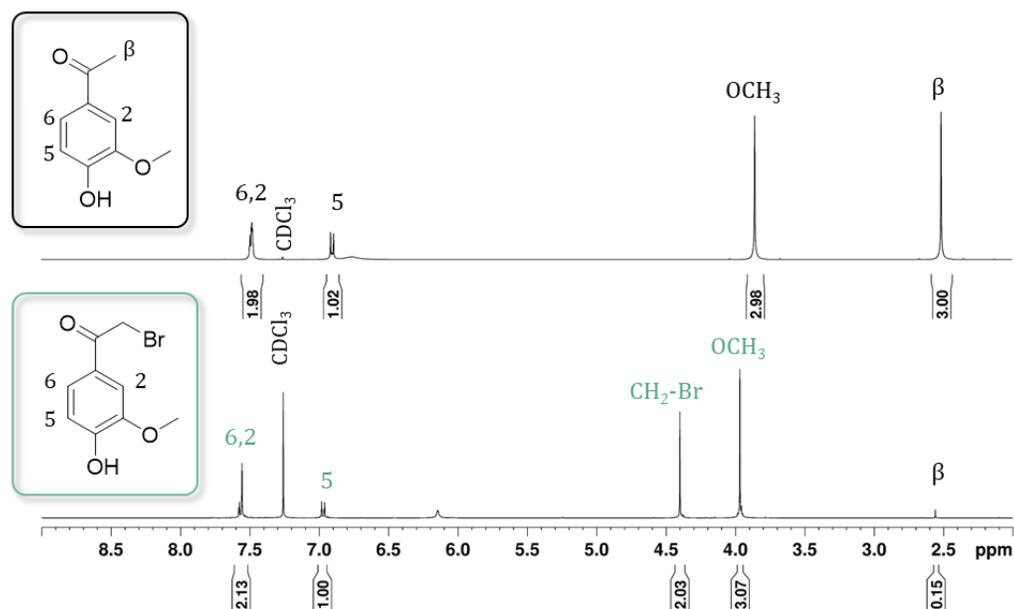


Figure III-3 : Spectres RMN ^1H de l'acétovanillone (en haut) et de sa version bromée (en bas) ; solvant CDCl_3 .

Un signal apparaît à 4,4 ppm pour les protons vicinaux du brome, et le signal à 2,5 ppm correspondant aux protons méthyle (β) de l'acétovanillone disparaît quasi complètement. Néanmoins, il reste environ 5 % d'acétovanillone de départ qui n'a pas réagi. Les monomères n'ont pas été purifiés.

II.2. Polymérisation

Dans un second temps, les monomères bromés obtenus ont été polymérisés par voie anionique. La polymérisation de l'acétovanillone bromée présentée en Figure III-4 est amorcée par K_2CO_3 dans le DMF anhydre, en prenant les précautions nécessaires pour éviter toute trace d'eau éventuelle. Les conditions de réaction sont similaires à celles utilisées par Kishimoto *et al.* [2] Néanmoins, le temps de polymérisation a été augmenté, à environ 24 h de réaction. En effet, après 3 h de polymérisation,

les masses molaires obtenues d'après l'analyse SEC étaient relativement faibles, 1 500 g/mol contre 4 400 g/mol après 24 h, et des traces de monomère qui n'avaient pas réagi étaient observées.

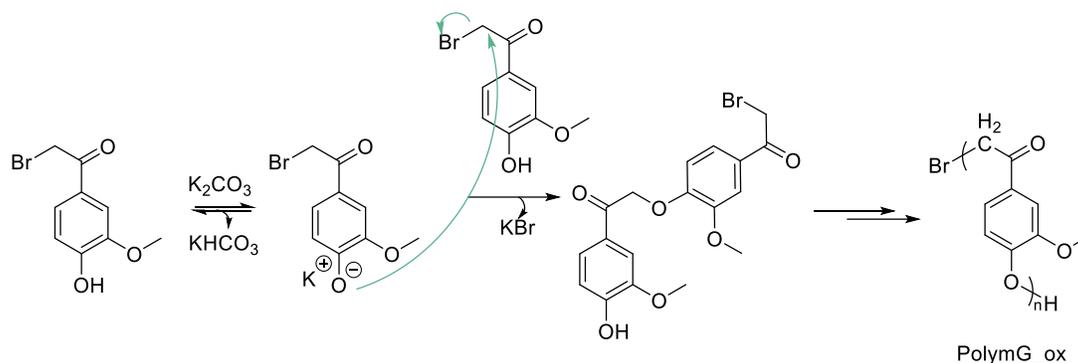


Figure III-4 : Mécanisme de polymérisation de l'acétovanillone bromée.

Le spectre RMN du ^{13}C du polymère G oxydé (7) issu de la polymérisation de l'acétovanillone bromée est présenté en Figure III-5. Les signaux observés montrent que la structure attendue a bien été obtenue.

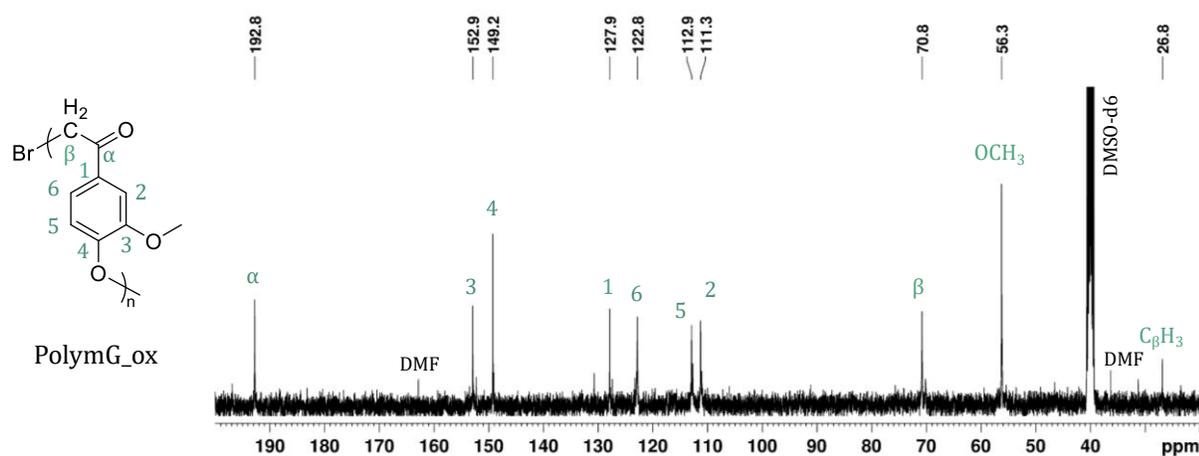


Figure III-5 : Spectre RMN du ^{13}C du polymère obtenu : polymG_ox.

La présence de 5 % d'acétovanillone non bromée dans le mélange réactionnel se remarque dans le polymère final par la présence du signal à 26,8 ppm qui correspond à un bout de chaîne $C_{\beta}H_3$ au lieu de $C_{\beta}H_2Br$. Ainsi, l'impureté du monomère est à prendre en compte car elle limite la taille des chaînes polymères obtenues.

Le polymère formé a ensuite été analysé par spectroscopie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight). Le spectre obtenu est présenté en Figure III-6. Il montre trois populations, toutes séparées d'un écart de 164 g/mol. Cette valeur correspond bien à la structure proposée pour le PolymG_ox dont le motif est $C_9H_8O_3$.

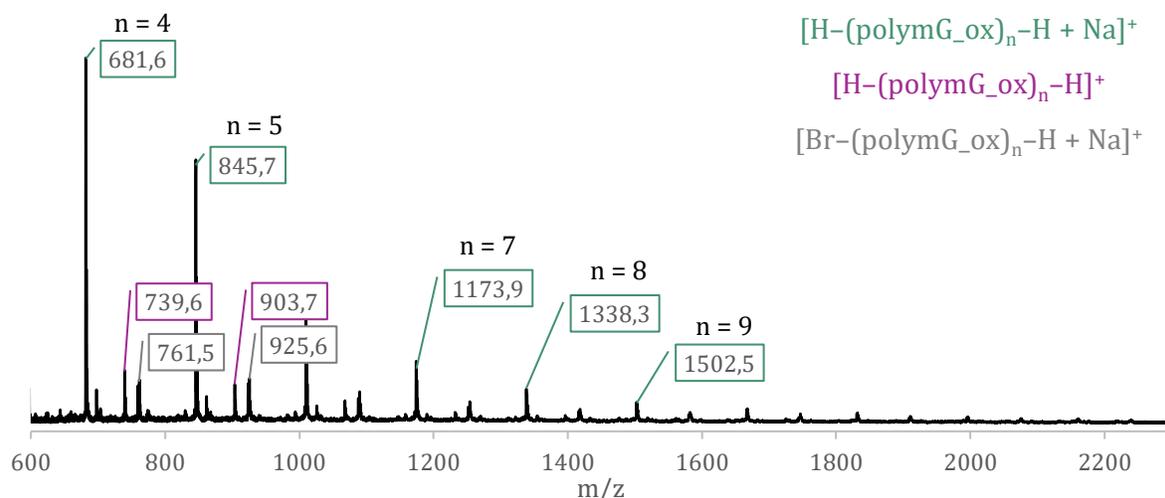
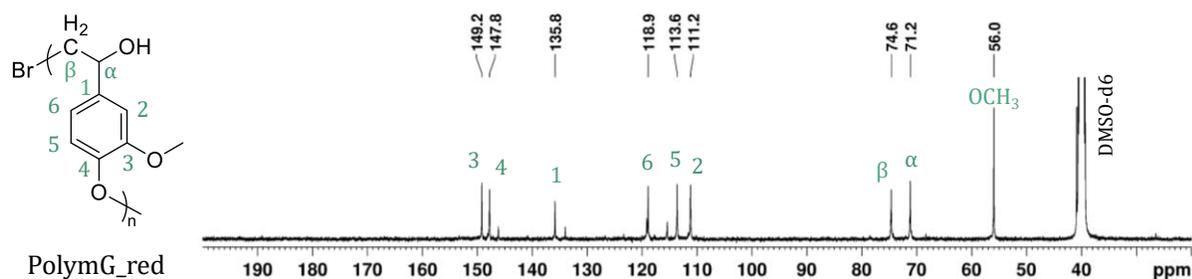


Figure III-6 : Spectre de masse MALDI-TOF du polymG_ox.

Deux populations comportent des adduits de sodium : la première possède des bouts de chaîne proton (en vert), dû à la polymérisation du monomère non bromé ; quant à la deuxième population, elle comporte le brome (+79,9 g/mol) en β du carbonyle et un proton (en gris). La dernière population (en violet) concerne le polymère bromé en β mais sans l'adduit de sodium (- 23 g/mol).

II.3. Réduction

Une étape de réduction est ensuite réalisée dans le DMSO avec du $NaBH_4$ à 50°C durant 24 h, afin de réduire la cétone en alcool secondaire. Le spectre RMN ^{13}C présenté en Figure III-7 du polymère G réduit montre que le signal correspondant au carbonyle à 193 ppm a été déplacé à 71 ppm, ce qui atteste de la réduction.


 Figure III-7 : Spectre RMN du ^{13}C du polymère obtenu : polymG_red.

La chromatographie d'exclusion stérique dans le DMF est utilisée afin d'évaluer les masses molaires relatives des polymères formés, et les chromatogrammes sont présentés en Figure III-8.

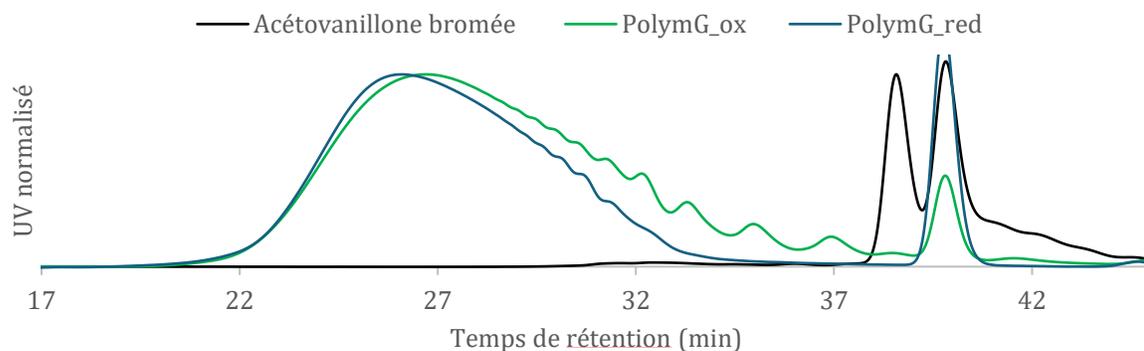


Figure III-8 : Chromatogrammes SEC dans le DMF ; RT(Flow Marker) = 40,2 min

Ces chromatogrammes attestent de la polymérisation de l'acétovanillone bromée. L'allure des chromatogrammes des polymères oxydés et réduits est similaire. La formation d'oligomères de plusieurs tailles est révélée par des petites oscillations visibles sur le spectre du polymère oxydé entre 29 et 38 min. Ce phénomène est moins visible pour la forme réduite, dont la dispersité semble plus étroite. Les valeurs des M_w et des dispersités obtenues d'après une calibration PS sont résumées en Tableau III-1.

Tableau III-1 : Masses molaires en nombre et dispersité des polymères modèles synthétisés.

	M_w (g/mol)	\mathcal{D}
PolymG_ox	4 390	6,9
PolymG_red	6 700	2,6

Ainsi, la synthèse de polymères modélisant la liaison β -O-4 sous une forme oxydée et une forme réduite a été réalisée.

II.4. Traitement enzymatique des modèles polymères

Les différents modèles polymères de la liaison β -O-4 de la lignine sont ensuite traités avec la BOD de *B. Pumilus*. Pour cela, ils sont solubilisés dans un solvant à 60 °C avec un flux d'oxygène, et l'enzyme est ajoutée. La réaction est conduite pendant 16 h, puis le mélange est dialysé (si présence de tampon avec des sels à éliminer), centrifugé et le surnageant soluble est lyophilisé séparément du culot insoluble.

II.4.1. Traitement du polymG_ox avec la BOD

Dans un premier temps, la BOD est mise en présence du polymère sous sa forme oxydée dans un tampon borate à pH 10. Le mélange du polymère dans le tampon n'était pas entièrement limpide et soluble, même après plusieurs heures d'agitation et un chauffage à 60 °C. Sur quatre répétitions de la

réaction, il est obtenu 16 ± 8 % de fraction soluble après 16 h de réaction. Une grande variabilité de la quantité obtenue est observée, bien que les conditions expérimentales soient les mêmes. Les fractions solubles et insolubles ont été analysées par spectroscopie RMN. Les spectres obtenus ne révèlent aucune différence par rapport au polymère de départ. De même, les chromatographies d'exclusion stérique réalisées dans le DMF ainsi que les analyses MALDI-TOF montrent des signaux identiques à ceux du polymère initial. Ces résultats indiquent que la BOD n'a aucun effet sur le polymère modèle de la liaison β -O-4 sous sa forme oxydée dans le tampon borate à pH 10. L'apparition des fractions soluble et insoluble semble donc résulter uniquement de la solubilisation partielle, sans action de l'enzyme.

Ces résultats pourraient venir du fait que le polymère oxydé n'est pas parfaitement soluble dans le tampon borate à pH 10. Sa solubilisation incomplète rend certainement les fonctions du polymère difficilement accessibles à l'enzyme. Afin de tenter de s'affranchir de ce problème de solubilité, un essai de traitement enzymatique a été conduit dans un autre système de solvant : eau et acétone (20 %v). Une quantité quasiment semblable de fraction soluble est obtenue : 17 %. Les fractions sont analysées par spectroscopie RMN, et les spectres 2D-HSQC sont présentés en Figure III-9.

Il est notable que la fraction insoluble majoritaire (83 %) correspond au polymère de départ inchangé.

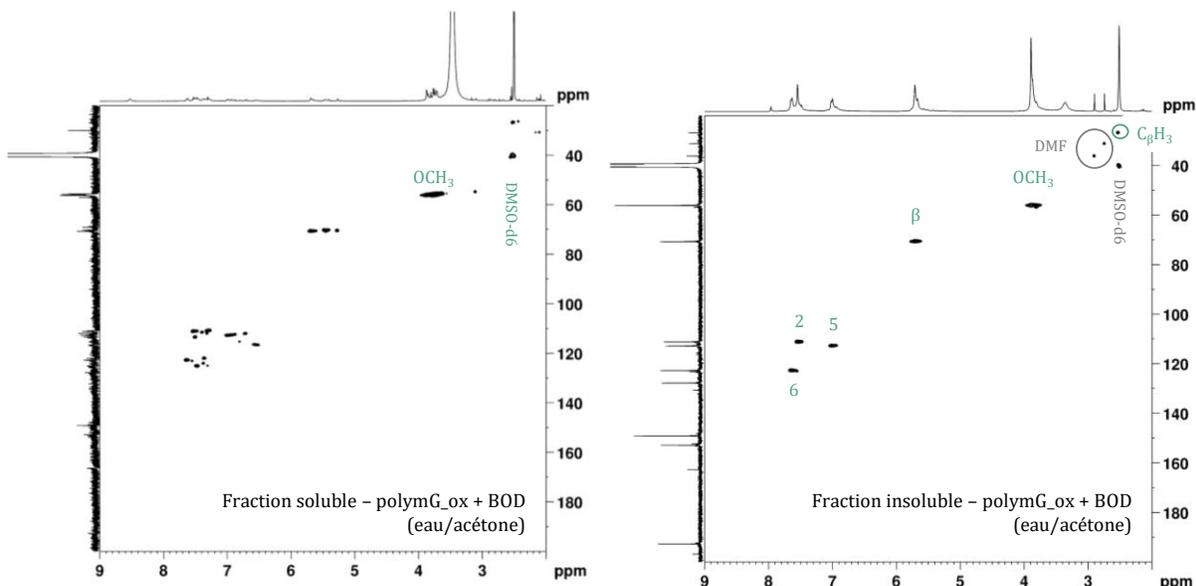


Figure III-9 : Spectres RMN 2D-HSQC des fractions solubles et insolubles issues du traitement enzymatique du polymG_ox avec la BOD dans eau/acétone.

En revanche, la fraction soluble présente des différences, avec l'apparition d'une multitude de signaux dans la zone des signaux aromatiques (δ_H entre 6 et 8 ppm et δ_C entre 100 et 130 ppm). Le signal autour de ($\delta_H = 5,7$ ppm et $\delta_C = 71$ ppm) attribué précédemment au carbone β est triplé dans la

fraction soluble. Cela laisse supposer l'apparition de plusieurs populations de polymères de structures voisines. La SEC dans le DMF est employée afin de caractériser les deux fractions obtenues et leurs chromatogrammes sont tracés en Figure III-10.

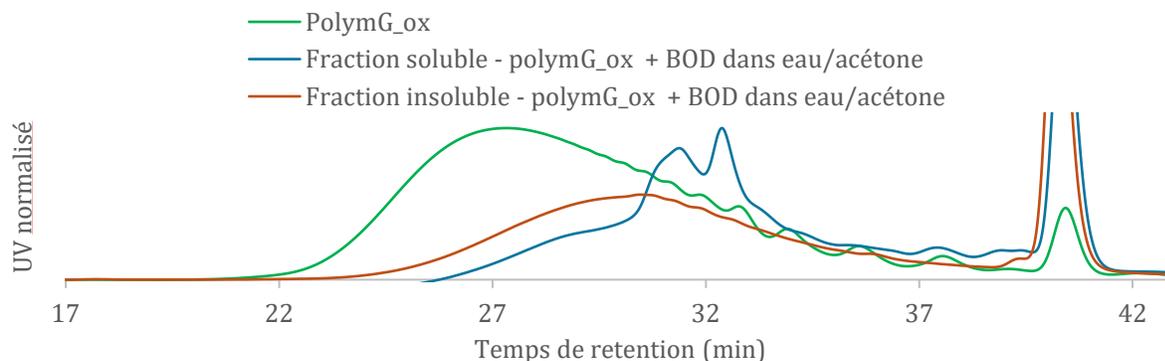


Figure III-10 : Chromatogrammes SEC dans le DMF des fractions solubles et insolubles issues du traitement du polymG_ox avec la BOD dans eau/acétone. RT(Flow Marker) = 40,2 min.

Le signal de la fraction insoluble diffère légèrement du polymère oxydé de départ, malgré la spectroscopie RMN qui montrait une structure semblable pour les deux. Ainsi, les liaisons inter-unités sont inchangées, mais la taille du polymère qui a précipité est légèrement diminuée. Le signal de la fraction soluble révèle plusieurs populations, toutes ayant des masses molaires inférieures à celles du polymère oxydé. Bien qu'un couplage 5-5' induit par la BOD ait pu être attendu, aucune augmentation des masses molaires n'est observée. Cela suggère que l'enzyme tend à dépolymériser le polymère en plusieurs populations de tailles inférieures, ce qui pourrait également expliquer la multiplication des signaux en spectroscopie RMN.

II.4.2. Traitement du polymG_red avec la BOD

Le polymère sous sa forme réduite est ensuite confronté au traitement enzymatique avec la BOD. De la même manière que le polymère oxydé, il était peu soluble dans le tampon borate à pH 10. Après 16 h de réaction, la quasi-totalité du polymère a précipité, et il est récupéré moins de 1 % de fraction soluble. La fraction insoluble récupérée est analysée par spectroscopie RMN et par chromatographie d'exclusion stérique dans le DMF. Les deux analyses montrent que le polymère précipité correspond au polymère réduit de départ inchangé. La BOD n'aurait ainsi aucune action sur le polymère modèle d'une liaison β -O-4 sous forme réduite dans un tampon borate à pH 10.

Le système de solvant a été changé afin de tenter une meilleure solubilisation du polymère qui permettrait un meilleur accès de la BOD aux fonctions caractéristiques. Le traitement enzymatique avec la BOD a été mené dans un mélange eau et acétone (20 %v). La formation d'un précipité collant

non soluble dans le milieu est observée. Ainsi, une fraction insoluble dans l'eau représente 45 % et une fraction collée au barreau aimanté qui a été récupérée dans de l'acétone représente 55 %. Ces deux fractions, appelées respectivement « fraction insoluble » et « fraction acétone » ont été analysées par spectroscopie RMN, et leurs spectres de RMN ^{13}C sont présentés en Figure III-11.

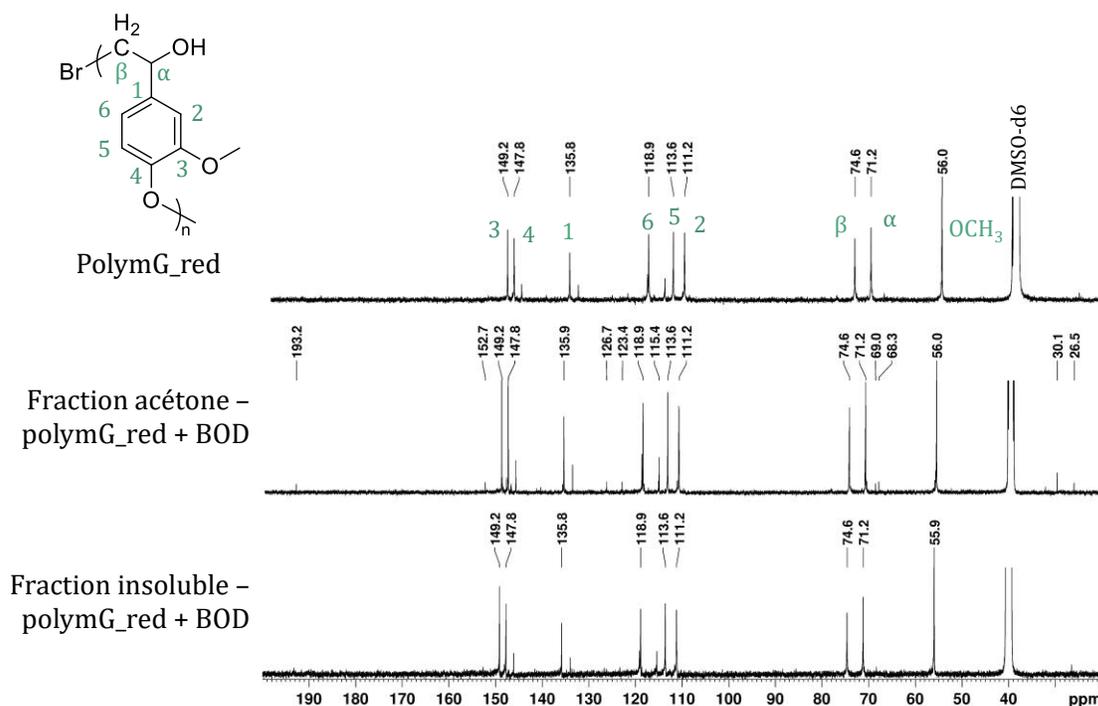


Figure III-11 : Spectres RMN ^{13}C des fractions issues du traitement du polymG_red avec la BOD dans eau/acétone.

Les signaux de la fraction insoluble correspondent à ceux du polymère de départ : cette fraction de polymère a précipité sans être modifiée par la BOD. En revanche, l'apparition de plusieurs signaux est observée sur le spectre de la fraction acétone, notamment un signal à 193 ppm qui correspond à la forme oxydée du polymère modèle étudié. Les SEC dans le THF ne montrent pas de variation de masse molaire entre les différentes fractions (Annexe III-1).

Ainsi, la BOD a la capacité d'oxyder le polymère réduit en sa forme oxydée, mais le système de solvant utilisé n'est pas optimal. Il reste essentiel de trouver un solvant où le polymère est soluble et où la BOD conserve son activité.

II.5. Conclusion

Cette 1^{ère} partie a présenté la synthèse de polymères modélisant la liaison β -O-4 simplifiée sous forme oxydée et réduite. Le traitement enzymatique avec la BOD de *B. Pumilus* a été réalisé et des difficultés

de solubilité ont été rencontrées dans le tampon borate à pH 10. Ainsi, aucune modification structurale n'a été observée lors des traitements dans ce solvant. En passant à une solubilisation dans un système eau/acétone, la meilleure solubilisation a semblé permettre à la BOD de modifier les polymères modèles, comme indiqué dans le Tableau III-2.

Tableau III-2 : Récapitulatif de l'action de la BOD sur des modèles polymères de la liaison β -O-4 simplifiée dans différents solvants.

Tampon borate pH 10		Eau/acétone (20 %v)
PolymG_ox	/	Fraction soluble de plus faible masse molaire
PolymG_red	/	Traces d'oxydation dans la fraction qui n'a pas précipité

Face aux difficultés de solubilité rencontrées, les polymères H et S sous forme oxydée et réduite n'ont pas été traités avec la BOD. Cette étude mériterait d'être approfondie pour trouver un solvant compatible à la solubilisation des polymères synthétisés et à l'activité de la BOD.

III. Polymères DHPs

Les déhydropolymères modèles sont des lignines synthétisées *in vitro* à partir de l'alcool coniférylique, un monolignol utilisé comme monomère. Cet alcool est le précurseur naturel de la lignine dans la paroi cellulaire des végétaux. La synthèse de ce monomère sera présentée dans un premier temps, puis sa polymérisation enzymatique dans différentes conditions, et enfin le traitement enzymatique du polymère modèle obtenu avec la BOD de *B. Pumilus*.

III.1. Synthèse de l'alcool coniférylique

L'alcool coniférylique a été synthétisé en deux étapes à partir de l'acide férulique, disponible commercialement, selon le chemin réactionnel présenté en Figure III-12. Les conditions expérimentales sont celles de Quideau et Ralph. [3] Des rendements corrects de 95 % pour la synthèse du férulate d'éthyle et de 64 % pour l'alcool coniférylique sont obtenus.

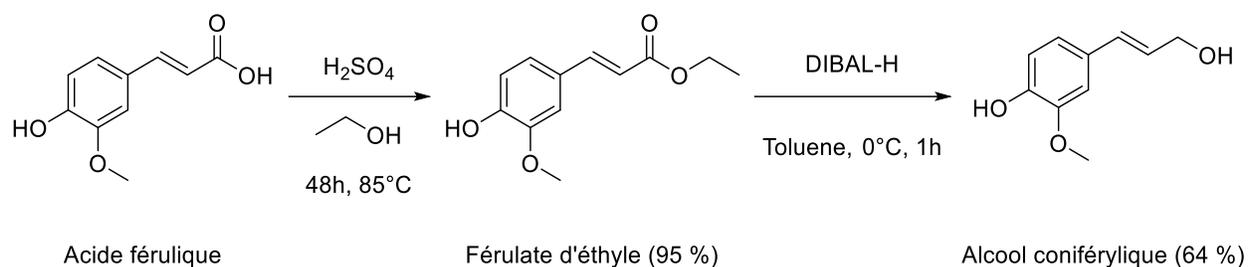


Figure III-12 : Schéma réactionnel de la synthèse de l'alcool coniférylique à partir de l'acide férulique.

Chaque étape a été contrôlée par spectroscopie RMN et les spectres RMN ^1H des trois produits sont présentés en Figure III-13.

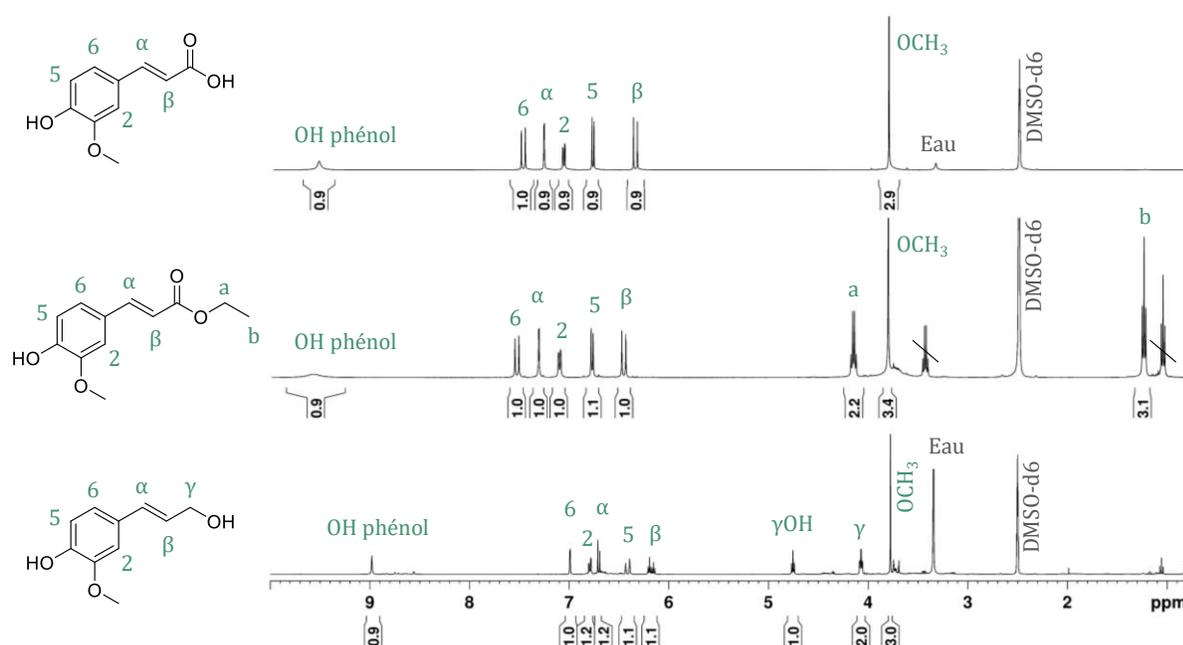


Figure III-13 : Spectres RMN ^1H de l'acide férulique (en haut), du férulate d'éthyle (au milieu) et de l'alcool coniférylique (en bas).

Il est bien observé l'apparition des protons a et b de l'ester, puis des signaux caractéristiques du proton γ et de l'alcool primaire correspondant pour l'alcool coniférylique.

III.2. Polymérisation

Après la synthèse de l'alcool coniférylique, celui-ci est soumis à l'action d'enzymes multi-cuivre pour réaliser un couplage oxydant, conduisant à la formation d'un polymère de déshydrogénation.

Deux protocoles ont été employés : le premier utilise une peroxydase et du peroxyde d'hydrogène dans un tampon phosphate à pH 6 [4] ; le second utilise une laccase d'*Aspergillus sp.* dans un mélange

tampon phosphate à pH 6 / acétone (20 %v) [5]. Trois synthèses seront présentées dans ce manuscrit (Tableau III-3).

Tableau III-3 : Présentation des synthèses de trois DHPs dans des conditions différentes.

	Solvant	Enzyme, réactifs	Temps de réaction	Rendement en polymère
DHP_1	Tampon phosphate pH 6 (33 mM)	HRP (Horseradish peroxydase) + H ₂ O ₂	42 h	38 %
DHP_2	Tampon phosphate pH 6 / acétone (20 %v)	Laccase <i>d'Aspergillus sp</i> + O ₂	24 h	55 %
DHP_3	Tampon phosphate pH 6 / acétone (20 %v)	Laccase <i>d'Aspergillus sp</i> (deux ajouts) + O ₂	48 h	67 %

Dans tous les cas, la méthode Zutropf (ZT) a été employée, c'est-à-dire un ajout goutte à goutte du monomère alcool coniférylique dans une solution contenant les enzymes. La partie I.III.3.2 de l'étude bibliographique résume les caractéristiques de cette méthode. Des rendements supérieurs ont été obtenus avec la laccase et le dioxygène comme agents oxydants. Procéder à deux ajouts de laccase à 24 h d'intervalle permet de passer d'un rendement de 55 % à 67 %. Les polymères obtenus ont été analysés par SEC dans le THF, et leurs chromatogrammes sont représentés en Figure III-14.

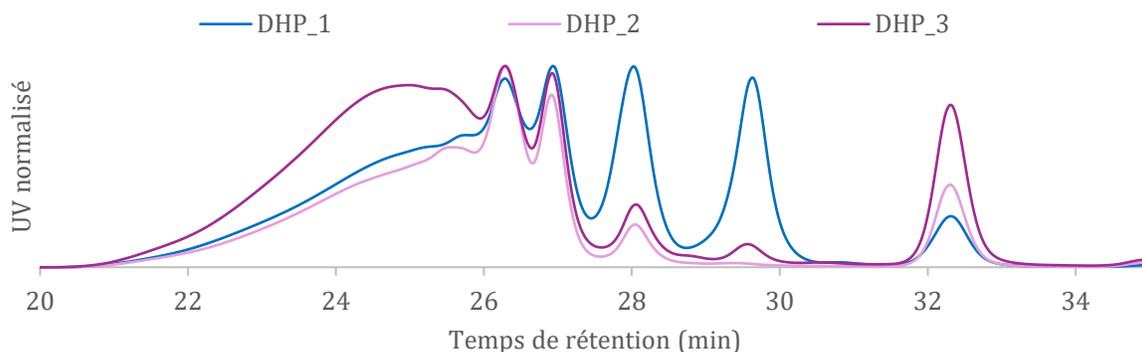


Figure III-14 : Chromatogrammes SEC dans le THF des déhydropolymères obtenus ; RT(Flow Marker) = 32,2 min.

Il est montré qu'indépendamment de la méthode employée, un polymère a été formé. Deux ajouts successifs de laccase (DHP_3) conduit à un polymère avec la quantité de chaînes de grandes tailles la plus importante. Les profils de SEC obtenus montrent plusieurs populations de tailles différentes. Des populations éluent à RT = 29,6 min, RT = 28 min, RT = 26,9 min, RT = 26,2 min et autour de RT = 24,7 min. C'est le signe de la formation de dimères et oligomères. En ne considérant que ce dernier signal

correspondant aux masses molaires les plus élevées, la calibration PS indique les masses molaires répertoriées en Tableau III-4.

Tableau III-4 : Mw et dispersité des déhydropolymères synthétisés, d'après SEC dans le THF et calibration PS.

	Mw (g/mol)	Đ
DHP_1	1630	1,2
DHP_2	1700	1,2
DHP_3	1690	1,1

Les valeurs des masses molaires obtenues sont très proches pour les trois polymères. En faisant l'hypothèse que le polymère est composé d'une unité répétitive β -O-4, de structure $C_{10}H_9O_4$, soit de masse molaire de 193 g/mol, les DHPs obtenus seraient composés d'un DPw de 8-9 environ.

Le spectre RMN 2D-HSQC du polymère DHP_3 est représenté en Figure III-15. Les mêmes signaux sont obtenus pour les autres polymères.

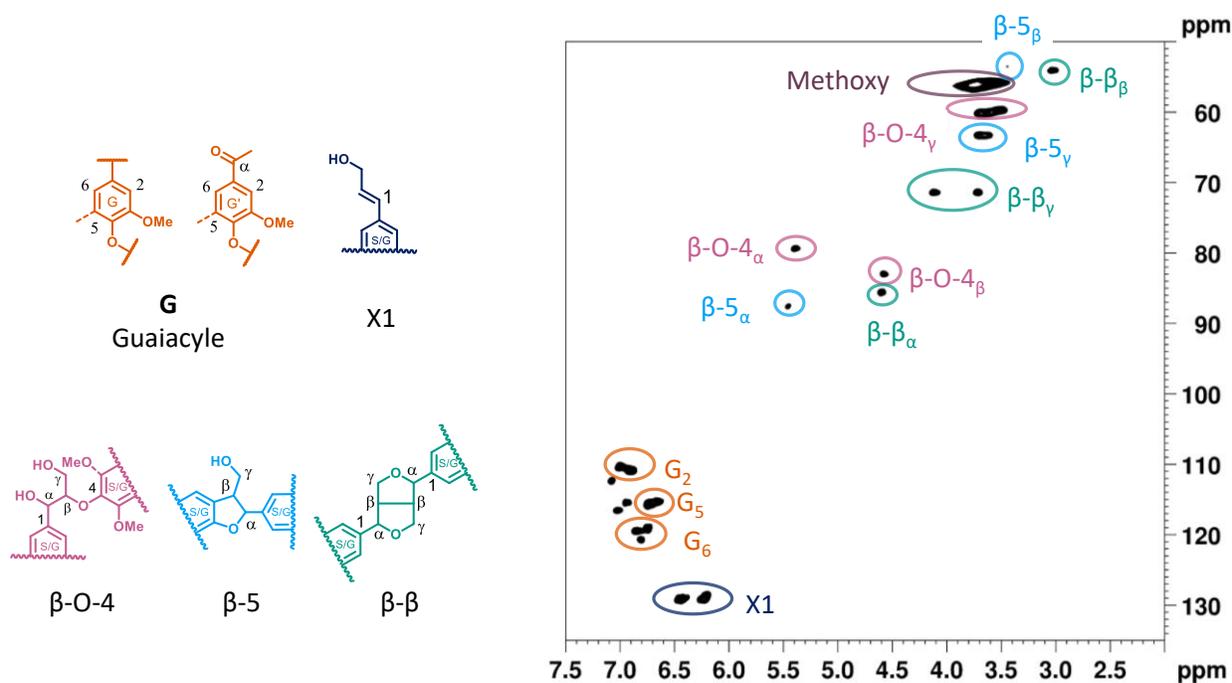


Figure III-15 : Spectre RMN 2D-HSQC du déhydropolymère DHP_3.

L'attribution des signaux a été réalisée en s'appuyant sur l'article de Amiri *et al.*, et sur les travaux de l'équipe de Deuss. [6] Ainsi, une structure globalement linéaire possédant un mélange de liaisons inter-unités β -O-4, β -5 et β - β est obtenue, ce qui est cohérent avec la composition d'une lignine native.

III.3. Traitement enzymatique des polymères DHPs

Dans la dernière partie de ce chapitre, les DHPs synthétisés sont traités avec la BOD de *B. Pumillus*.

Dans un premier temps, le traitement a été réalisé dans le tampon borate à pH 10, à 60 °C, avec un bullage d'oxygène pendant 16 h. Le milieu réactionnel est ensuite dialysé pour éliminer les sels présents dans le tampon, centrifugé et lyophilisé. Il est obtenu entre 35 et 46 % de fraction soluble. Les fractions obtenues étaient insolubles dans le chloroforme, le THF et partiellement solubles dans le DMSO. Des SEC en phase aqueuse à pH 12 ont été réalisées, et les chromatogrammes sont représentés en Figure III-16.

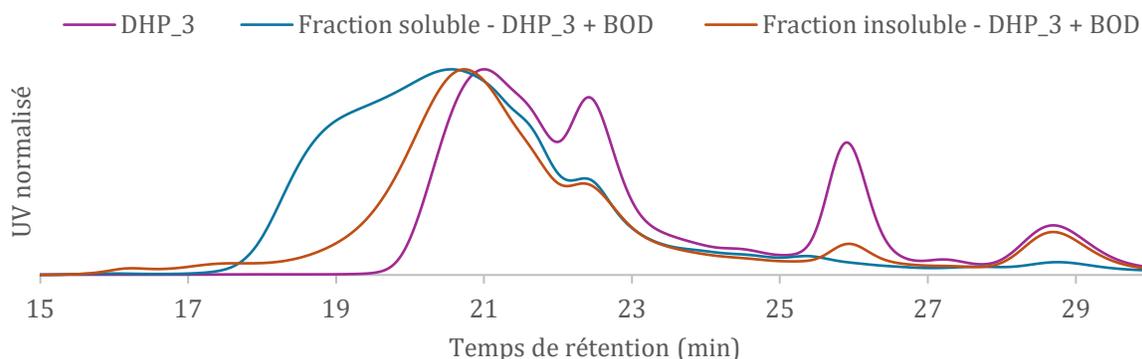


Figure III-16 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles issues de la réaction du DHP_3 avec la BOD.

Il est observé une diminution du temps de rétention, soit une augmentation des masses molaires pour les fractions issues du traitement enzymatique du DHP avec la BOD dans le tampon borate à pH 10. Une calibration PSS permet d'accéder à des valeurs de Mw et de dispersités, présentées en Tableau III-5.

Tableau III-5 : Valeurs de Mw et de dispersité des fractions issues de la réaction du DHP_3 avec la BOD. SEC aqueuse à pH 12, calibration PSS.

	Mw	Dispersité Đ
DHP_3	2 600	3,6
Fraction soluble : DHP_3 + BOD	13 700	10
Fraction insoluble : DHP_3 + BOD	6 300	7,6

Il est intéressant de noter ici la différence numérique de la masse molaire du DHP_3 calculée à partir d'une SEC dans le THF et d'une SEC en phase aqueuse à pH 12 : 1 690 contre 2 600 g/mol.

Une forte augmentation de la masse molaire de la fraction soluble est confirmée, avec une augmentation parallèle de sa dispersité, ce qui suppose la présence de nombreuses populations de tailles diverses. En comparaison, la fraction insoluble montre une masse molaire de 6 300 g/mol avec une dispersité de 7,6, indiquant une distribution plus large et une augmentation des tailles de molécules par rapport au déhydropolymère de départ. Ce phénomène d'augmentation des masses molaires des fractions de DHP traitées enzymatiquement par la BOD s'est répété sur le traitement des différents DHPs testés.

En revanche, des difficultés d'analyses ont été rencontrées, notamment en spectroscopie RMN, où les fractions obtenues ne se solubilisait pas dans les solvants deutérés usuels, rendant impossible l'acquisition de leurs signaux. Une analyse IRTF-ATR a été réalisée, et les spectres obtenus sont présentés en Figure III-17.

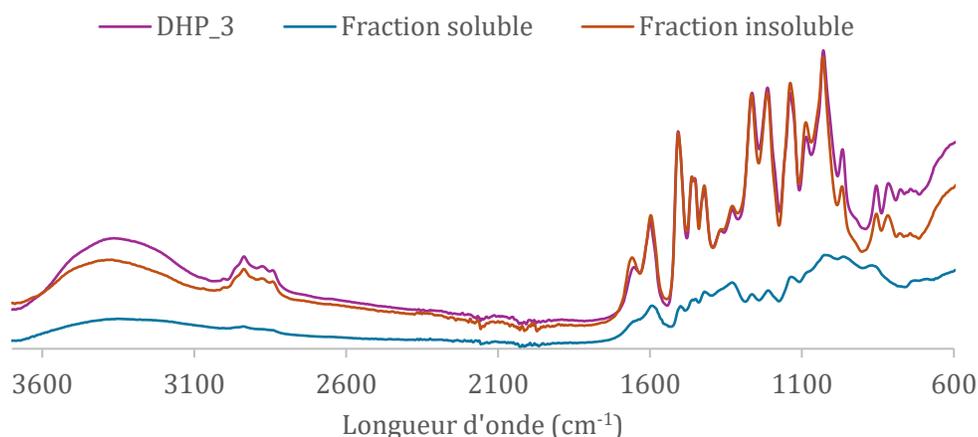


Figure III-17 : Spectroscopie infra-rouge des fractions issues de la réaction du DHP_3 avec la BOD.

Les spectres de la fraction insoluble et du DHP de départ sont similaires. Le spectre de la fraction soluble semble contenir les mêmes signaux, mais des variations d'intensité rendent une conclusion difficile.

Un essai de traitement par la BOD a également été réalisé dans un mélange d'eau avec 20 % v/v d'acétone. Cependant, cet essai s'est avéré infructueux, le polymère étant resté insoluble dans ce système de solvant, même après l'ajout d'une quantité supplémentaire d'acétone.

III.4. Conclusion

Cette 2nde partie a présenté la synthèse du monolignol alcool coniférylique, et de sa polymérisation par voie enzymatique en déhydropolymère. Ces modèles de lignine ont été traités par la BOD. Dans le tampon borate à pH 10, une augmentation des masses molaires a été observée. L'analyse structurale

via la spectroscopie RMN n'a pas pu être réalisée dû à une insolubilité de la fraction modifiée par l'enzyme. Une hypothèse de couplage 5-5' peut être émise, considérant les résultats obtenus avec les modèles monomères dans le chapitre précédent.

IV. Conclusion

En conclusion, ce chapitre a exploré la synthèse et le traitement enzymatique de modèles polymères de lignine, en se concentrant particulièrement sur les homopolymères de la liaison β -O-4 et les déhydropolymères (DHPs).

La synthèse des modèles polymères a permis de reproduire des structures simplifiées de la liaison β -O-4 de la lignine, tant sous forme oxydée que réduite. Les résultats obtenus montrent que la solubilité des polymères dans les solvants utilisés est un facteur déterminant pour l'efficacité du traitement enzymatique par la BOD. En effet, les difficultés de solubilisation dans le tampon borate à pH 10 ont limité l'action de l'enzyme, tandis que l'utilisation d'un système solvant eau/acétone a permis d'observer une faible trace d'oxydation de l'alcool secondaire en cétone.

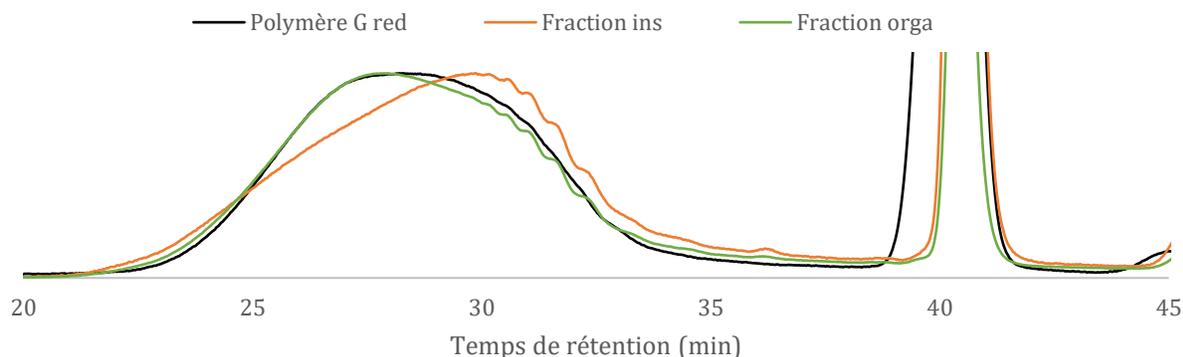
En parallèle, la synthèse des déhydropolymères (DHPs) a été réalisée avec succès en utilisant deux enzymes, une peroxydase combinée à du peroxyde d'hydrogène ou une laccase, produisant des polymères de tailles relativement semblables, confirmées par des analyses par SEC et RMN. Le traitement enzymatique des DHPs avec la BOD a révélé une augmentation significative de la masse molaire, suggérant un potentiel couplage enzymatique, bien que des améliorations dans les conditions de réaction soient encore nécessaires pour optimiser ces résultats.

Ainsi, ce chapitre souligne l'importance des conditions expérimentales, en particulier la solubilité des polymères, pour assurer le succès du traitement enzymatique des modèles de lignine. Les résultats obtenus ouvrent la voie à des futures études visant à optimiser les systèmes de solvants et les conditions de réaction pour améliorer le traitement de modèles polymères de lignine par la BOD. Finalement, le pouvoir oxydant de la BOD sur des liaisons types de lignine a été démontré.

V. Références bibliographiques

- [1] A. Joy, S. Sun, *Substituted Phenacyl Molecules and Photoresponsive Polymers*, United States Patent : US9353214B2, **2016**.
- [2] T. Kishimoto, Y. Uraki, M. Ubukata, *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2005**, 3 (6), 1067–1073. DOI: <https://doi.org/10.1039/B416699J>.
- [3] Stephane. Quideau, John. Ralph, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40 (7), 1108–1110. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00019a003>.
- [4] B. Cathala, B. Saake, O. Faix, B. Monties, *Polymer Degradation and Stability*. **1998**, 59 (1–3), 65–69. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00161-4).
- [5] K. Okusa, T. Miyakoshi, C.-L. Chen, *Holzforschung*. **1996**, 50 (1), 15–23. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforschung.1996.50.1.15>.
- [6] M. T. Amiri, S. Bertella, Y. M. Questell-Santiago, J. S. Luterbacher, *Chemical Science*. **2019**, 10 (35), 8135–8142. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9SC02088H>.

VI. Annexes



Annexe III-1 : Chromatogrammes SEC dans le DMF ; RT(Flow Marker) = 40,2 min.

IV. Chapitre 4 : Caractérisation de la lignine Kraft et étude de solubilisations contrôles

I.	Caractérisation de la lignine Kraft Indulin AT.....	159
I.1.	Chromatographie d'exclusion stérique.....	159
I.2.	Spectroscopie infrarouge	160
I.3.	Analyse de la lignine Kraft par spectroscopie RMN	161
I.4.	Analyses thermiques	164
I.5.	Conclusion intermédiaire.....	166
II.	Influence du solvant sur la solubilité de la lignine Kraft.....	166
II.1.	Contrôle dans le tampon borate pH 10 (50 mM).....	166
II.2.	Contrôle dans d'autres solvants pour élucider le mécanisme	175
II.3.	Conclusion de cette partie.....	185
III.	Références bibliographiques.....	188

I. Caractérisation de la lignine Kraft Indulin AT

Les travaux décrits dans cette thèse ont principalement été menés sur une lignine Kraft Indulin AT. Comme développé précédemment, la structure et les propriétés d'une lignine dépendent de nombreux facteurs tels que l'origine et l'âge du végétal, ainsi que le type de procédé utilisé pour son extraction. Par conséquent, les caractéristiques d'un échantillon de lignine sont uniques et spécifiques à chaque lot. Il est donc nécessaire, avant toute étude impliquant la lignine, de procéder à une série d'analyses pour déterminer les propriétés de l'échantillon étudié. C'est l'objet de ce paragraphe, qui se concentre sur la caractérisation de la lignine Kraft Indulin AT. Les caractérisations comme la détermination de la pureté en lignine par la méthode de Klason et « Acid Soluble Lignin » (normes Tappi) ou les analyses élémentaires n'ont pas été réalisées dans cette étude.

I.1. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une méthode employée pour séparer les polymères selon leur masse molaire, ou plus justement selon leur volume hydrodynamique, et déterminer leur dispersité. La masse molaire de la lignine Kraft a été évaluée SEC dans l'eau basique à pH 12. L'éthylène glycol a été employé comme marqueur de débit (FM pour Flow Marker) et une courbe de calibration a été établie avec des étalons de poly(styrène sulfoné) (PSS) afin de déterminer les masses molaires relatives des échantillons. Les chromatogrammes de la lignine Kraft et des étalons PSS sont représentés en Figure IV-1.

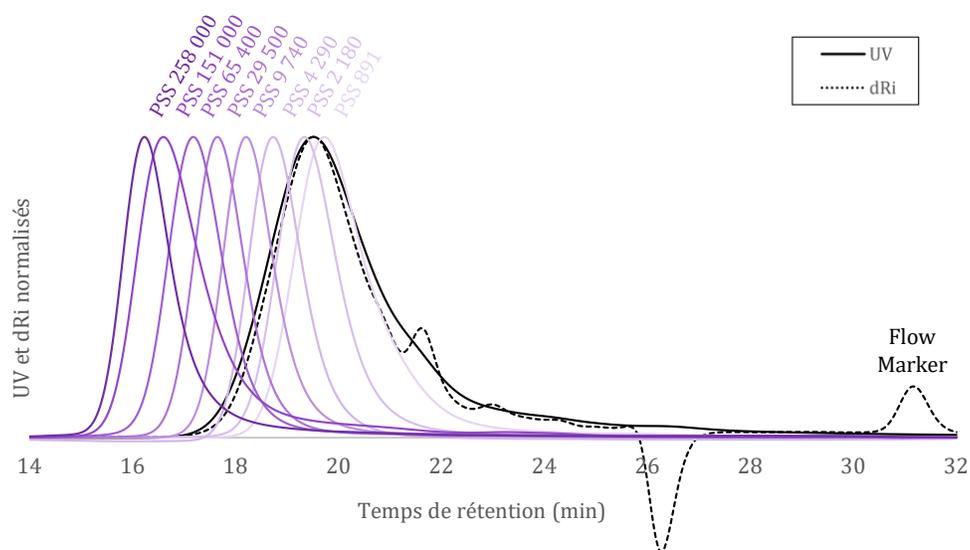


Figure IV-1 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des étalons PSS.

Un profil monomodal est observé en détection UV, avec une population éluant à un temps de rétention (RT) de 19,6 minutes. La trace dRi du signal montre l'éthylène glycol (marqueur de débit) qui élué autour de 31 minutes, bien loin des zones d'exclusion des polymères étudiés. Le signal négatif autour de 26,2 minutes correspond à une bulle d'air qui se forme lors de l'injection des échantillons. Il est retrouvé sur toutes les courbes.

La masse molaire obtenue pour la lignine Kraft étudiée est de 2 800 g/mol avec une dispersité de 6,4. Ces valeurs sont comparées à celles trouvées dans la littérature en Tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Masses molaires en masse (Mw) et dispersités (Đ) de la lignine Kraft Indulin AT selon plusieurs études.

	Cette étude	Constant <i>et al.</i> [1]	Hu <i>et al.</i> [2]	Jacobs <i>et al.</i> [3]	Goldmann <i>et al.</i> [4]	Gaugler <i>et al.</i> [5]
Méthode	SEC NaOH pH 12	SEC NaOH pH 12	Acétylation puis SEC THF	SEC THF	SEC DMF + LiBr	SEC DMF + LiBr
Mw (g/mol)	2 800	4 300	6 550	3 000	4 700	1 630
Đ = Mw/Mn	6,4	8,1	9,9	2,5	3,5	2,8

La masse molaire déterminée dans notre étude est du même ordre de grandeur que les valeurs rapportées dans la littérature, bien qu'elle soit légèrement inférieure. Une large gamme de valeurs est observée en fonction du solvant d'éluion utilisé. Cette méthode est donc très dépendante des conditions expérimentales. Une fois la méthode expérimentale fixée, il est intéressant de comparer l'évolution des masses molaires avant et après traitement. Les masses molaires au pic sont fournies à titre indicatif pour offrir des ordres de grandeur, mais elles doivent être interprétées avec prudence.

I.2. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge permet d'identifier les groupements fonctionnels présents dans la lignine. La Figure IV-2 présente le spectre IR de la lignine Kraft obtenu par analyse IRTF-ATR.

On y retrouve les groupements typiques de la lignine. On observe notamment la large bande caractéristique des fonctions hydroxyles à 3360 cm⁻¹. Le signal à 1696 cm⁻¹ correspond aux

groupements carboxyle de la lignine et les bandes à 1600, 1510 et 1460 cm^{-1} sont dues aux élongations et aux vibrations du noyau aromatique.

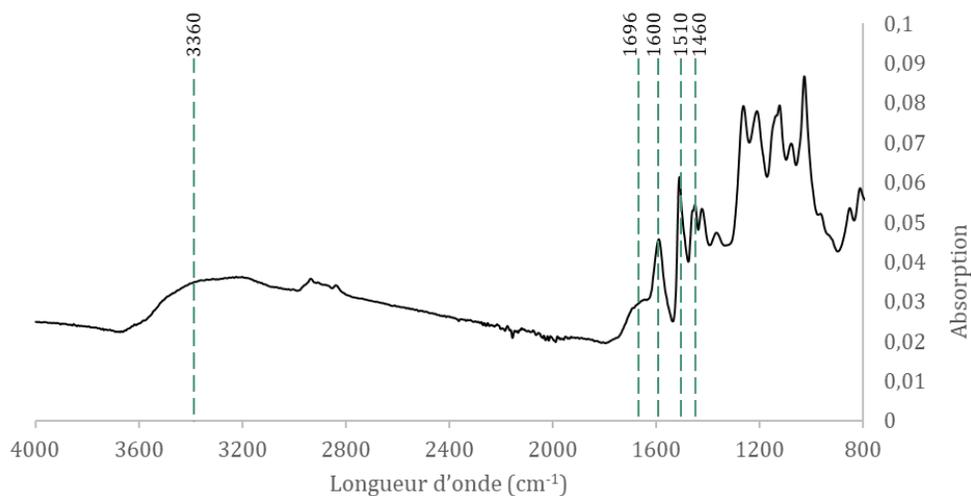


Figure IV-2 : Spectre infra-rouge de la lignine Kraft étudiée.

Les conclusions obtenues à partir des analyses IRTF ne sont pas toujours suffisantes et des compléments d'informations sont nécessaires pour une meilleure élucidation structurale. Pour une caractérisation plus approfondie et détaillée de la structure de la lignine, la spectroscopie RMN est employée.

I.3. Analyse de la lignine Kraft par spectroscopie RMN

I.3.1. RMN 2D-HSQC

La lignine Kraft a été analysée en spectroscopie RMN 2D-HSQC dans le DMSO- d_6 . Lors de cette analyse, les signaux des protons ^1H sont corrélés avec ceux des carbones ^{13}C qui les portent. L'étude des régions aliphatique et aromatique (Figure IV-3) montre les signaux attendus des différentes unités de la lignine.

Le spectre RMN-2D HSQC de la lignine Kraft peut être séparé en deux régions distinctes : la zone aromatique (δ_{H} entre 5,5 et 8 ppm et δ_{C} entre 100 et 140 ppm) et la zone aliphatique (δ_{H} entre 2 et 6 ppm et δ_{C} entre 40 et 90 ppm). En s'aidant de spectres de modèles qui ont été étudiés dans la littérature, notamment par Ralph, il est possible d'identifier des signaux correspondant à des liaisons typiquement présentes dans la lignine. [6] Par exemple, les signaux aromatiques caractéristiques des unités G qui sont rapportées dans la littérature pour être les principales unités de la lignine Kraft Indulin AT sont observés. Dans la zone des aliphatiques, les signaux caractéristiques des liaisons β -O-4, α -O-4 ou β - β ont pu être attribués.

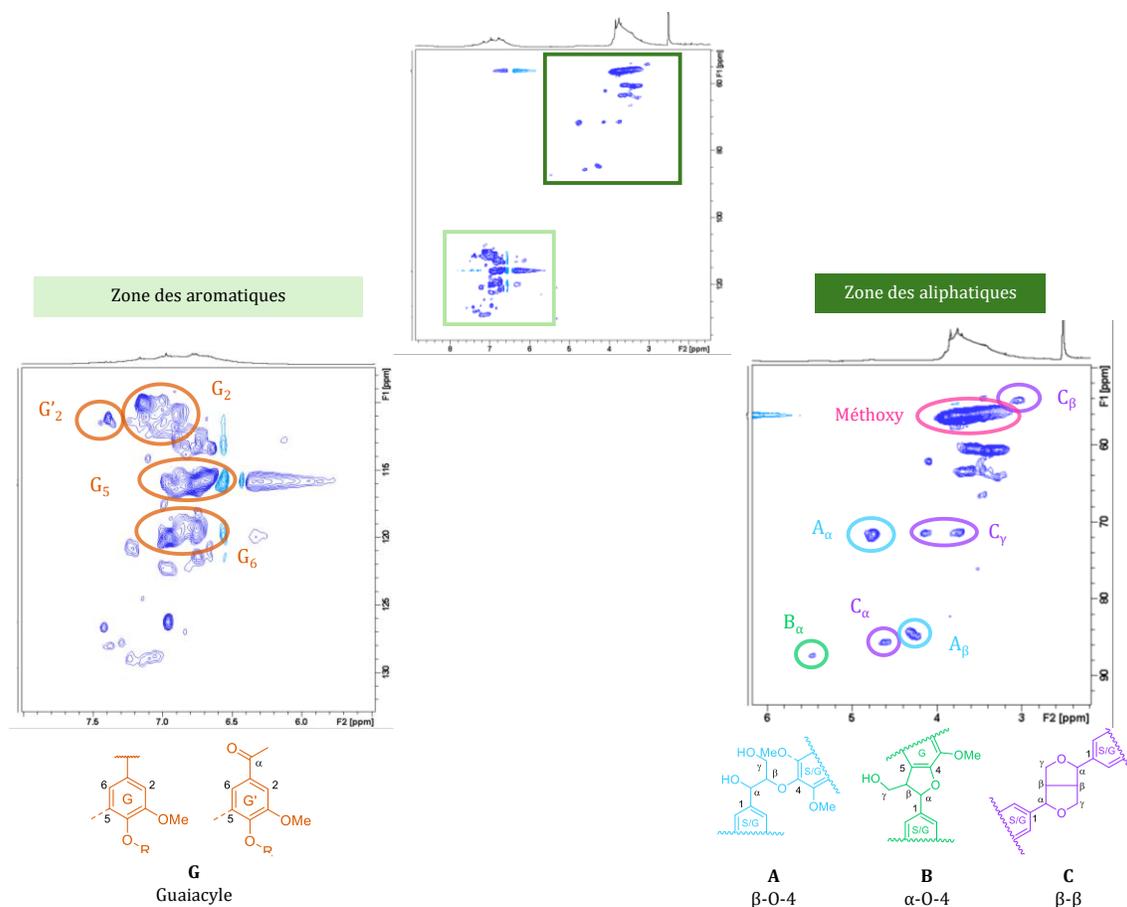


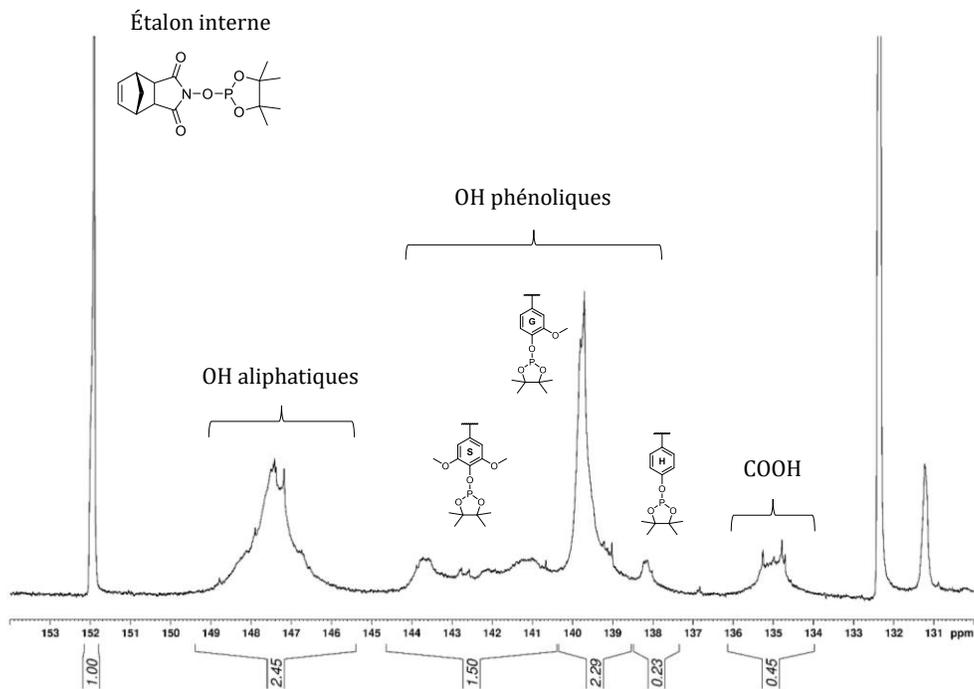
Figure IV-3 : Spectre RMN 2D-HSQC de la lignine Kraft - zone aliphatique et zone aromatique.

Un des objectifs de ce travail est de suivre les modifications induites par le traitement enzymatique de cette lignine Kraft par RMN 2D-HSQC.

I.3.2. RMN quantitative du phosphore (³¹P)

Comme présenté dans l'introduction bibliographique (I.II.4.1), la RMN quantitative du phosphore est une méthode classiquement utilisée par la communauté scientifique travaillant avec la lignine depuis les travaux d'Argyropoulos. [7]

Après dérivatisation de tous les hydroxyles de la lignine grâce à un agent phosphorylé, le spectre RMN ³¹P est acquis. L'ajout d'un étalon interne permet de quantifier en mmol/g les différentes fonctions hydroxyles présentes dans l'échantillon. Le spectre RMN du phosphore de la lignine Kraft est présentée en Figure IV-4.


 Figure IV-4 : Spectre RMN ^{31}P quantitative de la lignine Kraft.

Cette analyse a été répétée cinq fois, et les moyennes et écarts-types de la quantification des différents types d'hydroxyle sont présentés en Tableau IV-2.

 Tableau IV-2 : Taux de fonctions hydroxyles (aliphatiques, acides carboxyliques et phénols) obtenus par spectroscopie RMN ^{31}P de la lignine Kraft.

	OH aliphatiques	COOH	OH phénoliques (total)	Phénoliques S	Phénoliques G	Phénoliques H
Quantification (mmol/g)	$1,96 \pm 0,12$	$0,39 \pm 0,04$	$3,17 \pm 0,17$	$1,20 \pm 0,06$	$1,78 \pm 0,10$	$0,19 \pm 0,02$

Ces valeurs sont cohérentes avec plusieurs sources dans la littérature qui ont étudié des lignines Kraft Indulin (Tableau IV-3). Ngo *et al.* rapportent (en mmol/g) : 3,27 pour les OH aliphatiques ; 3,20 pour les OH phénoliques ; 0,21 pour les acides carboxyliques. Crestini *et al.* évaluent (en mmol/g) : 2,58 pour les OH aliphatiques ; 3,81 pour les OH phénoliques ; 0,46 pour les acides carboxyliques. Sameni *et al.* obtiennent une valeur pour la quantification des hydroxyles encore plus élevée. L'article de Constant *et al.* rapporte des valeurs proches de celles obtenues dans notre étude (en mmol/g) : 1,79 pour les OH aliphatiques ; 0,33 pour les acides ; 2,77 pour les OH phénoliques. Ces résultats sont résumés en Tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Taux de fonctions hydroxyles de la lignine Kraft Indulin AT selon plusieurs études.

	Quantification (mmol/g)				
	Cette étude	Ngo <i>et al.</i> [8]	Crestini <i>et al.</i> [9]	Sameni <i>et al.</i> [10]	Constant <i>et al.</i> [1]
OH aliphatiques	1,96	3,27	2,58	2,59	1,79
OH phénoliques	3,17	3,20	3,81	4,00	2,77
COOH	0,39	0,21	0,46	0,20	0,33

Toutes les valeurs ont été obtenues par quantification grâce à la RMN du phosphore ^{31}P . Les différences entre les valeurs présentées peuvent être attribuées à plusieurs facteurs. La pureté de la lignine, influencée par des impuretés ou des contaminants, peut affecter les résultats de la quantification. Les conditions de séchage, telles que l'humidité résiduelle, peuvent modifier la structure chimique de la lignine, influençant la mesure des groupes hydroxyles. De même, si les solvants utilisés pour dissoudre la lignine ne sont pas complètement secs, ils peuvent modifier la quantification des hydroxyles en hydrolysant l'agent de dérivatisation. De plus, les variations de température lors de la préparation ou de l'analyse des échantillons peuvent affecter les groupes fonctionnels présents dans la lignine. Les modèles de calibration utilisés pour interpréter les données peuvent varier entre les études, entraînant des différences dans les résultats. Enfin, la présence de bruit de fond ou d'interférences dans les mesures peut également affecter la précision des quantifications.

I.4. Analyses thermiques

Les analyses thermogravimétriques (ATG) et par calorimétrie différentielle (DSC) fournissent des informations respectivement sur le comportement thermique du composé (température de dégradation) ou ses changements d'état (température de transition vitreuse).

I.4.1. ATG

Une analyse thermogravimétrique de la lignine Kraft a été réalisée, et est représentée en Figure IV-5. Une chauffe à $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ par minute sous atmosphère inerte jusqu'à $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ a permis de mettre en avant deux phénomènes. Une faible perte de masse est observée aux alentours de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, illustrant l'élimination de l'eau libre et de l'eau liée présente dans la poudre. C'est une étape de **séchage**. La dégradation de la lignine Kraft commence vers $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, avec une vitesse maximale de perte massique à $327\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pendant la phase de **pyrolyse**, entre 200 et $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, une formation de gaz est attendue (notamment CO , CO_2 , CH_4), résultant de la rupture des liaisons C-C et C-O des chaînes latérales. [11, 12] L'étape de pyrolyse est également caractérisée par l'élimination d'unités phénoliques de

différentes natures entre 400 et 500 °C : à ces températures se produisent les ruptures des liaisons éther et des liaisons condensées inter-unités. [13] À partir de 800 °C, l'atmosphère inerte est remplacée par un flux d'air : c'est l'étape de **carbonisation**. Elle conduit à la formation de résidus amorphes de carbone et de composés inorganiques qui peuvent être appelés « char ». La lignine Kraft étudiée possède un taux de résidu de 0,96 %.

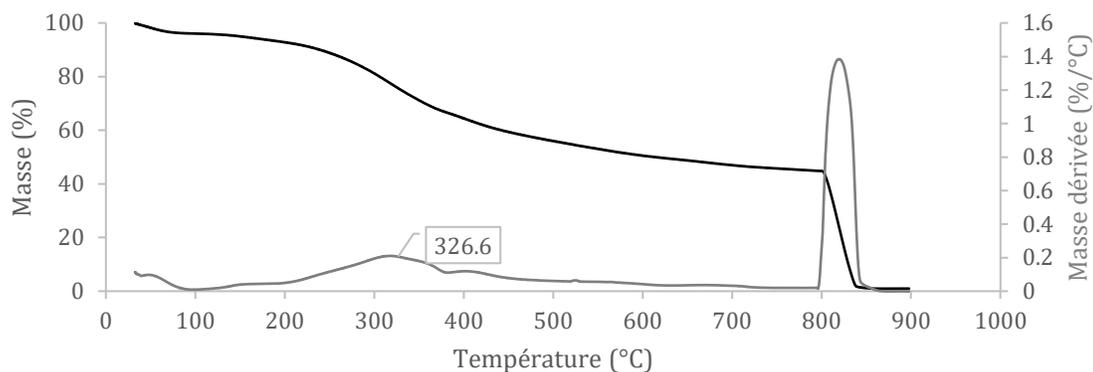


Figure IV-5 : Stabilité thermique de la lignine Kraft par analyse thermo gravimétrique.

I.4.2. DSC

La lignine Kraft est ensuite analysée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), présentée en Figure IV-6.

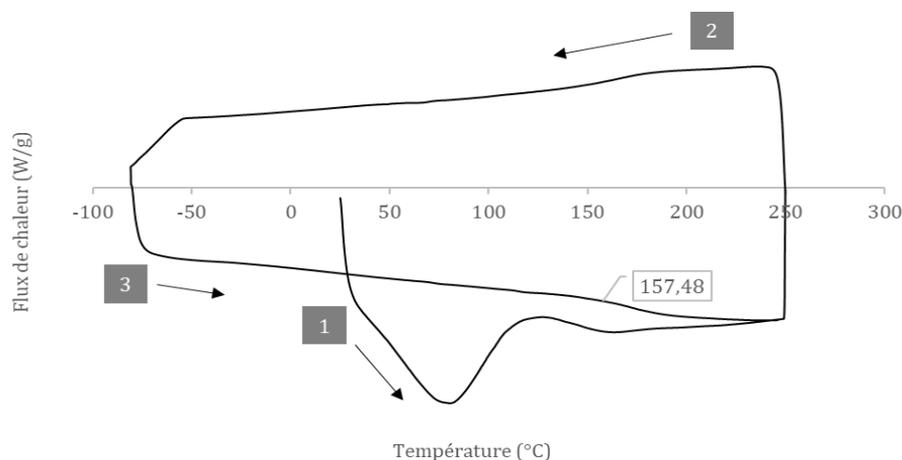


Figure IV-6 : Analyse DSC de la lignine Kraft. Exo up.

Pour cela, un équilibrage est effectué dans un premier temps à 25 °C. Puis une chauffe de 10 °C par minute est effectuée jusqu'à une température de 250 °C pour évaporer l'eau résiduelle (Phase 1). En se référant à l'ATG du précédent paragraphe, il est remarqué qu'à cette température, la lignine commence tout juste à se dégrader. L'échantillon est ensuite refroidi jusqu'à -80 °C (Phase 2), puis chauffé à nouveau jusqu'à 250 °C (Phase 3). On remarque l'apparition d'une transition vitreuse,

autour de 157,5 °C. Cette valeur semble en accord avec la littérature, où sont rapportées des Tg généralement autour de 140-155 °C (Tableau IV-4). Aucune fusion de la lignine n'est observée.

Tableau IV-4 : Comparaison de la température de transition vitreuse de plusieurs lignines Kraft.

	Ayoub <i>et al.</i> [14]	Pe <i>et al.</i> [15]	Li <i>et al.</i> [16]	Kubo <i>et al.</i> [17]	Bridson <i>et al.</i> [18]
Type de lignine	Kraft	Kraft	Kraft Ind AT	Kraft Ind AT	Kraft Ind AT
Température de transition vitreuse (°C)	148	149	147	155	140

I.5. Conclusion intermédiaire

Dans la première partie de ce chapitre, la lignine Kraft Indulin AT a été caractérisée. Il a été déterminé qu'elle possède une masse molaire de 2 800 g/mol et une dispersité de 6,4 selon une calibration PSS en SEC aqueuse à pH 12. Les fonctions caractéristiques de la lignine ont été observées par IRTF et RMN 2D-HSQC, tandis que son taux de fonctions hydroxyles a été déterminé par RMN du phosphore. Enfin, les propriétés thermiques ont été déterminées, incluant le taux de résidu, évalué à 0,96 % par ATG, et la température de transition vitreuse évaluée par DSC à 157 °C.

Après avoir caractérisé la lignine Kraft, l'influence du solvant sélectionné sur sa solubilité et sa structure a été examinée. C'est l'objet de la partie suivante.

II. Influence du solvant sur la solubilité de la lignine Kraft

Avant d'introduire des enzymes dans le milieu réactionnel, des systèmes contrôlés ont été étudiés. Ces contrôles impliquent la dissolution de la lignine Kraft dans divers milieux aqueux, en reproduisant les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées lors des traitements enzymatiques, mais sans l'ajout d'enzymes. Les proportions de fractions solubles et insolubles récupérées, ainsi que leur masse molaire, dispersité, et si possible leur quantification par RMN du phosphore sont analysées et discutées.

II.1. Contrôle dans le tampon borate pH 10 (50 mM)

Le premier milieu examiné est celui employé par le partenaire du projet pour la production de lignine soluble destinée à la fabrication de fibres de carbone. Ce solvant est un tampon borate contenant 50 mM d'acide borique et ramené à pH 10 avec de la soude. Il est attendu une solubilisation quasiment totale de la lignine dans ce tampon, en raison du pH basique du milieu. Lors de l'étape de dialyse suivant la solubilisation, afin d'éliminer les sels du milieu réactionnel et ramener le pH à un pH neutre,

une précipitation devrait être observée. En effet, à un pH neutre, les phénols de la lignine (pKa 9-10) sont protonés et le polymère précipite. Quant aux masses molaires, aucun changement n'est attendu puisqu'aucune enzyme n'est présente dans le milieu. Le bullage d'oxygène pourrait éventuellement provoquer des oxydations, mais rien qui ne change drastiquement la structure de la lignine Kraft.

Après 16 h de solubilisation avec bullage d'oxygène, le milieu réactionnel est dialysé, centrifugé et lyophilisé. Après toutes ces étapes, il est récupéré 60 % d'une fraction de lignine soluble dans l'eau neutre. Il s'agit d'une quantité non négligeable de fraction soluble, ce qui n'était pas attendu.

Une nouvelle solubilisation contrôle a été réalisée pendant 2 semaines, en utilisant les mêmes conditions réactionnelles et en suivant le même procédé de traitement. Cela a permis d'obtenir 80 % de fraction soluble. Ce résultat suggère une solubilisation lente et progressive de la lignine dans le tampon borate à pH 10. Les potentiels changements structuraux de la fraction soluble obtenue sera investigués dans la suite de ce chapitre.

II.1.1. SEC en phase aqueuse à pH=12

Les chromatogrammes en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des fractions solubles et insolubles issues de la solubilisation contrôle sont représentés en Figure IV-7.

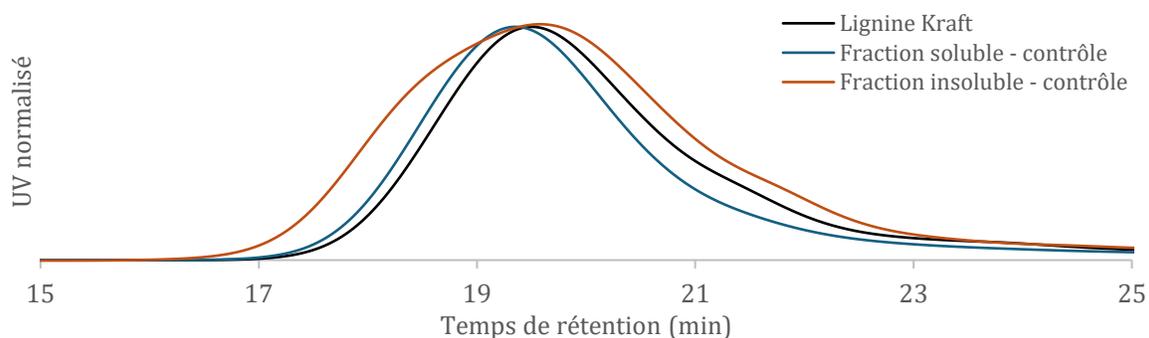


Figure IV-7 : Chromatogramme SEC en phase aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles du contrôle dans le tampon borate à pH 10.

Le Tableau IV-5 récapitule les proportions de fractions solubles et insolubles obtenues ainsi que leurs masses molaires et dispersité déterminées avec un étalonnage PSS de la SEC. Les masses molaires semblent modifiées par la solubilisation de la lignine Kraft dans le tampon borate à pH 10. En effet, une augmentation des masses molaires est observée dans la fraction soluble, qui passe de 2 800 à

4 400 g/mol. De plus, l'augmentation de la dispersité de la fraction insoluble indique l'apparition de populations de plus grandes et petites tailles.

Tableau IV-5 : Rendement des fractions solubles et insolubles du contrôle dans le tampon borate à pH 10, leurs masses molaires en nombre (Mw) et dispersité (Đ).

	Lignine Kraft	Fraction soluble - contrôle	Fraction insoluble - contrôle
Rendement (%wt)	-	60	40
Mw (g/mol)	2 800	4 400	7 300
Đ = Mw/Mn	6,4	9,4	14,2

II.1.2. Cinétique

Une cinétique a été menée sur ce système contrôle : des traitements dans le tampon borate à pH 10, avec un bullage d'oxygène ont été arrêtés à 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours. Le pH du milieu réactionnel a été mesuré, puis le milieu réactionnel a été dialysé, centrifugé et lyophilisé. Le rendement en fraction soluble est également reporté, en Figure IV-8.

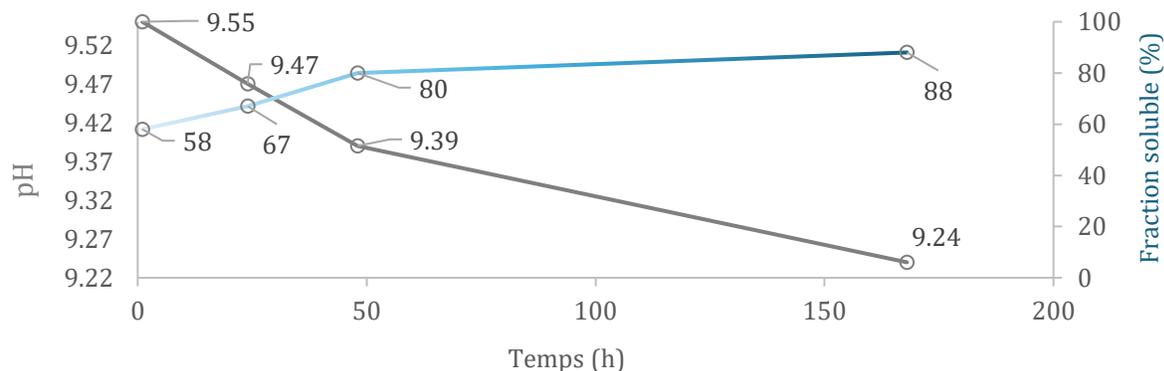


Figure IV-8 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans un tampon borate à pH 10.

Une diminution du pH au cours du temps de la solubilisation est observée. Le surnageant passe d'un pH de 9,55 à 9,24, ce qui semble non significatif. En revanche, la quantité de fraction soluble passe de 58 % en 1 h de solubilisation à presque 90 % en une semaine.

Ces échantillons lyophilisés ont été ensuite analysés par SEC en phase aqueuse à pH 12, et leurs chromatogrammes sont tracés en Figure IV-9.

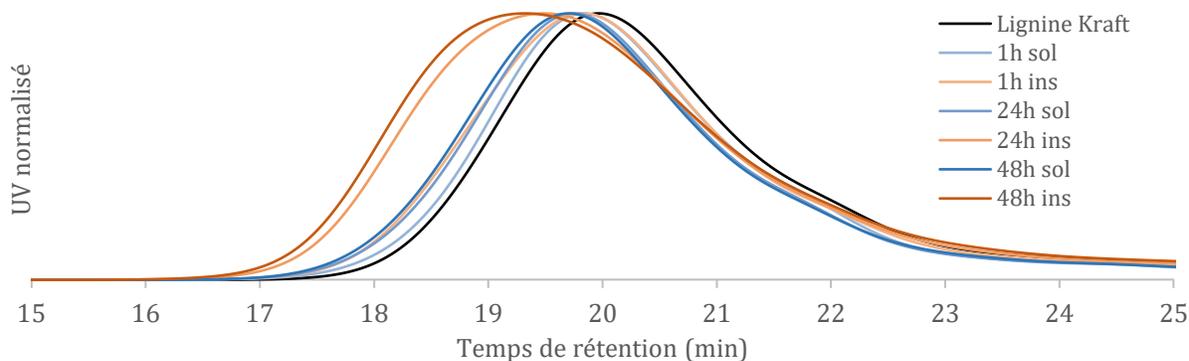


Figure IV-9 : Chromatogramme SEC dans la soude aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles du contrôle dans le tampon borate à pH 10 à plusieurs temps de réaction.

Le Tableau IV-6 présente une comparaison des M_w et des dispersités entre les fractions solubles et insolubles issues du contrôle de la lignine Kraft dans le tampon borate à pH 10, estimées à l'aide d'une calibration PSS.

Tableau IV-6 : Comparaison des masses molaires en nombre et des dispersités des fractions solubles et insolubles issues de la solubilisation de la lignine Kraft dans le tampon borate à pH 10.

		1 h	24 h	48 h
Fractions solubles contrôle	M_w (g/mol)	2 350	2 900	3 770
	\mathcal{D}	13,8	19,0	14,2
Fractions insolubles contrôle	M_w (g/mol)	3 160	5 760	7 000
	\mathcal{D}	10,6	13,6	18,4

Une augmentation des masses molaires est observée pour les fractions solubles et insolubles au cours du temps. L'augmentation des masses molaires des fractions insolubles est particulièrement flagrante. En effet, la masse molaire moyenne passe de 3 160 g/mol à 7 000 g/mol en 48 h, soit plus du double. De plus, la polydispersité de ces fractions augmente également, passant de 10,6 à 18,4, indiquant une distribution de taille de polymères de plus en plus large. L'augmentation significative des masses molaires dans la partie insoluble, qui représente une fraction de plus en plus petite, soit observée, semble cohérente si l'on considère que plus la masse molaire est élevée plus le temps de solubilisation est long. Les chaînes de masse molaire de plus en plus élevée sont donc solubilisées progressivement. En fin de processus, seules les chaînes de très grande taille restent non solubilisées.

Concernant les fractions solubles, une augmentation progressive de la masse molaire est également observée. La M_w passe de 2 350 g/mol à 3 770 g/mol sur la même période de 48 h. Cette augmentation, bien que moins marquée que celle des fractions insolubles, montre un enrichissement en molécules de plus grande taille dans la fraction soluble. La polydispersité, après une hausse significative à 24 h ($\mathcal{D} = 19,0$), redescend légèrement à 14,2 après 48 h, ce qui pourrait indiquer une certaine homogénéisation des molécules dans cette fraction au fil du temps.

Ce résultat était inattendu et sera investigué dans la suite de ce paragraphe.

II.1.3. RMN du phosphore

Les analyses RMN du ^{31}P des fractions solubles et insolubles après 16 h de solubilisation dans le tampon borate ont été réalisées. Ces spectres ont permis la quantification des taux d'hydroxyles présents dans les différentes fractions. Les résultats de la quantification sont présentés en Figure IV-10.

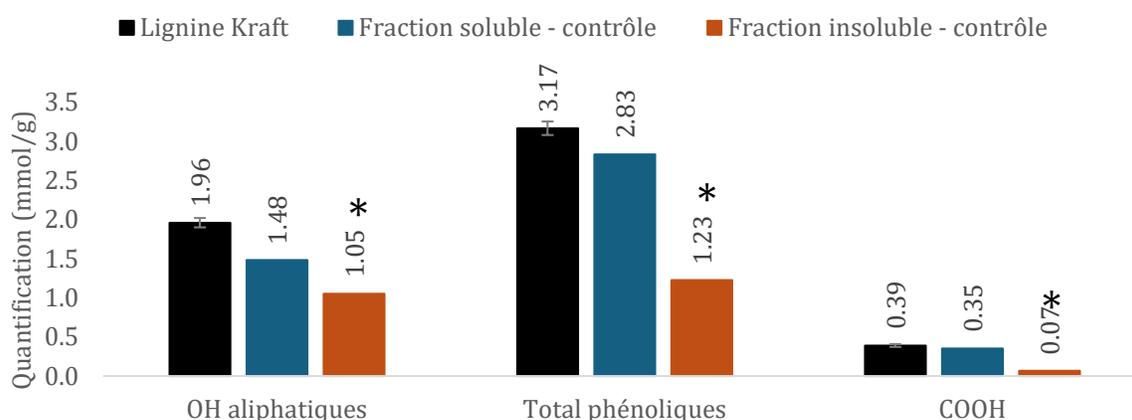


Figure IV-10 : Quantification par RMN ^{31}P des fonctions hydroxyles des fractions solubles et insolubles du contrôle. Les résultats indiqués d'une * pour la fraction insoluble sont sous-estimés.

La fraction insoluble n'était pas totalement soluble dans le mélange de dérivatisation. Elle a précipité dans le tube RMN, faussant ainsi sa quantification. Quant à la fraction soluble, on peut estimer que la variation du taux d'acides carboxyliques est non significative. En revanche, une perte de 0,48 mmol/g d'hydroxyles aliphatiques est observée, soit une baisse de 24 % ; et une perte de 0,34 mmol/g d'hydroxyles phénoliques, soit une perte de 11 %. Ainsi, des OH aliphatiques et phénoliques ont été engagés lors de la solubilisation de la lignine Kraft dans le tampon borate à pH 10, et ont provoqué l'augmentation des masses molaires du système, ou du moins du volume hydrodynamique. Afin de mieux comprendre ce phénomène, d'autres analyses ont été menées sur les fractions obtenues.

II.1.4. Spectroscopie RMN 2D-HSQC

La seconde analyse RMN qui permettrait d'avoir des informations sur les potentiels changements structuraux des fractions de lignine est la RMN 2D-HSQC. Elle a été réalisée dans le DMSO-d₆ et les spectres sont présentés en Figure IV-11.

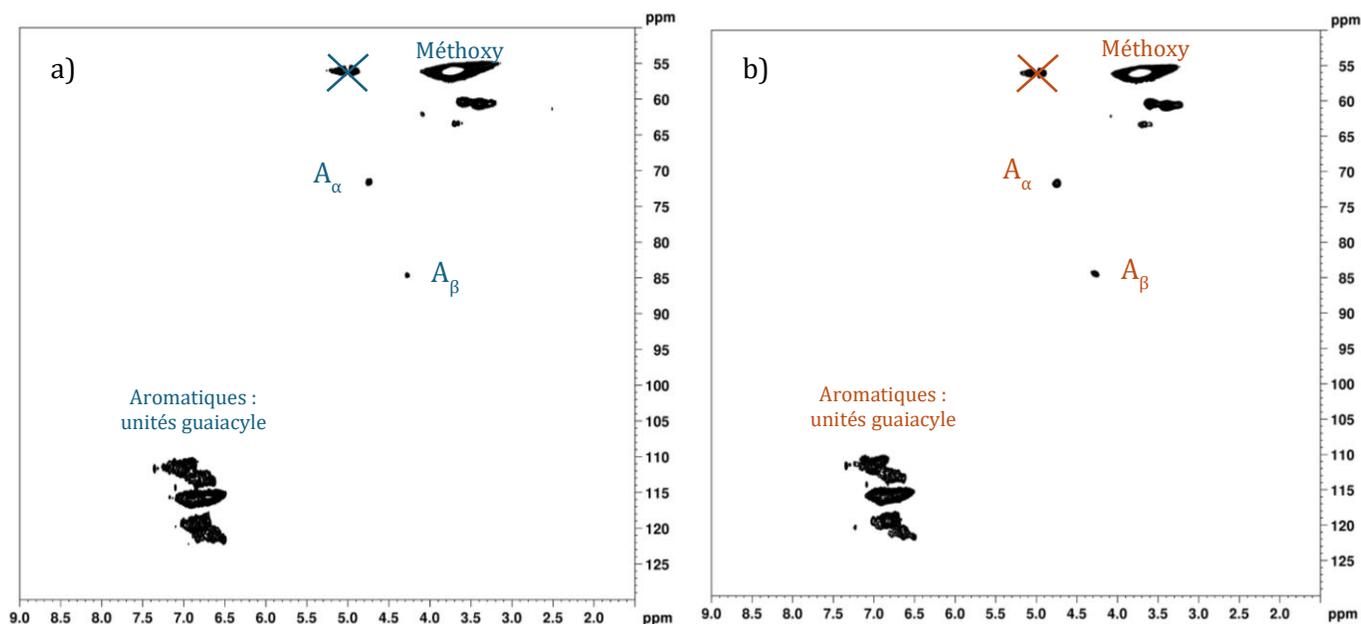


Figure IV-11 : Spectres RMN 2D-HSQC de a) fraction soluble du contrôle b) fraction insoluble du contrôle ; dans le DMSO-d₆.

Les signaux de la lignine Kraft sont retrouvés dans la zone des aromatiques et des aliphatiques : les unités guaiacyles ainsi que les signaux des aliphatiques α et β de la liaison β -O-4 ($A_{\alpha/\beta}$). Le seul signal qui semble changer est barré sur les spectres, car il s'agit d'un artefact lié à la forte intensité du signal des méthoxy ($\delta_H = 3,8$ ppm ; $\delta_C = 56$ ppm). En conclusion, aucune différence structurale entre la lignine Kraft et les fractions solubles et insolubles n'est observée par cette analyse.

II.1.5. IRTF

L'analyse IRTF des fractions de lignine vise à identifier les groupes fonctionnels présents et à évaluer les modifications structurales post-traitement. Les spectres des différentes fractions sont présentés en Figure IV-12.

Les spectres ont été normalisés sur le signal à 1515 cm^{-1} qui représente la déformation des C-C aromatiques. Il est supposé que ces liaisons ne sont pas impactées par la solubilisation contrôlée. La fraction soluble du contrôle et la lignine Kraft brute ne présentent pas de différence notable qui témoignerait d'une oxydation enzymatique ou autre modification structurale.

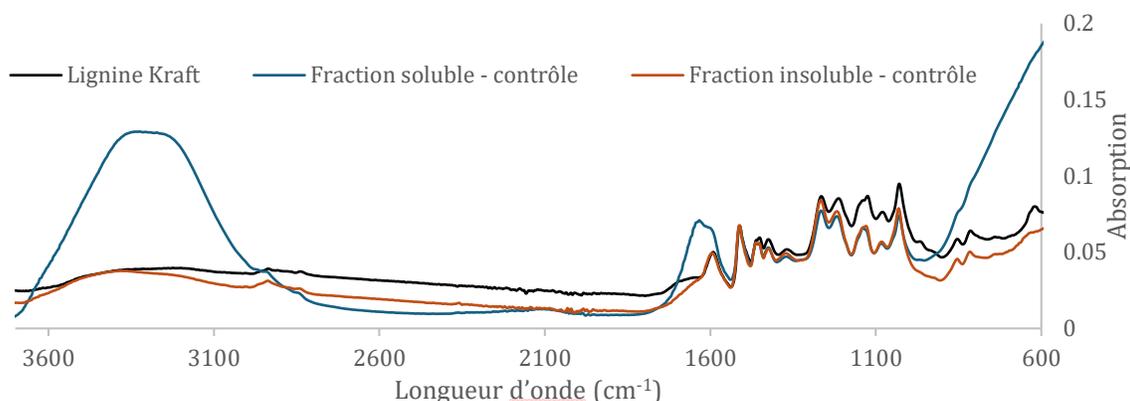


Figure IV-12 : Spectres infra-rouge des fractions solubles et insolubles du contrôle.

En revanche, une nette augmentation de l'intensité des groupements hydroxyles (dans la zone des $3\ 400\text{ cm}^{-1}$) est observée pour la fraction insoluble. L'allure atypique de ce signal a été comparé aux spectres infra-rouge de l'acide borique et du borate tracés en Figure IV-13. La ressemblance entre les spectres IR de la fraction insoluble du contrôle de la lignine Kraft et du borate suggère la présence de borate ou de ses dérivés dans cette fraction soluble.

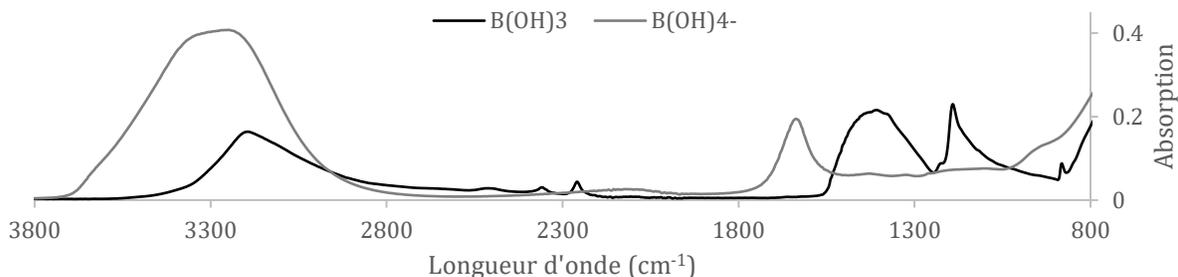


Figure IV-13 : Spectres infra-rouge de l'acide borique (solide) et de l'ion borate (mis en solution à pH 12).

Une forte augmentation de la bande autour de 1690 cm^{-1} est également observée. C'est la zone des groupements carboxyles de la lignine. Cela confirme que la RMN quantitative du phosphore de la fraction insoluble était erronée.

II.1.6. ATG et résidus

Les thermogrammes obtenus par ATG de la lignine Kraft et des différentes fractions de la manipulation contrôle sont représentés en Figure IV-14.

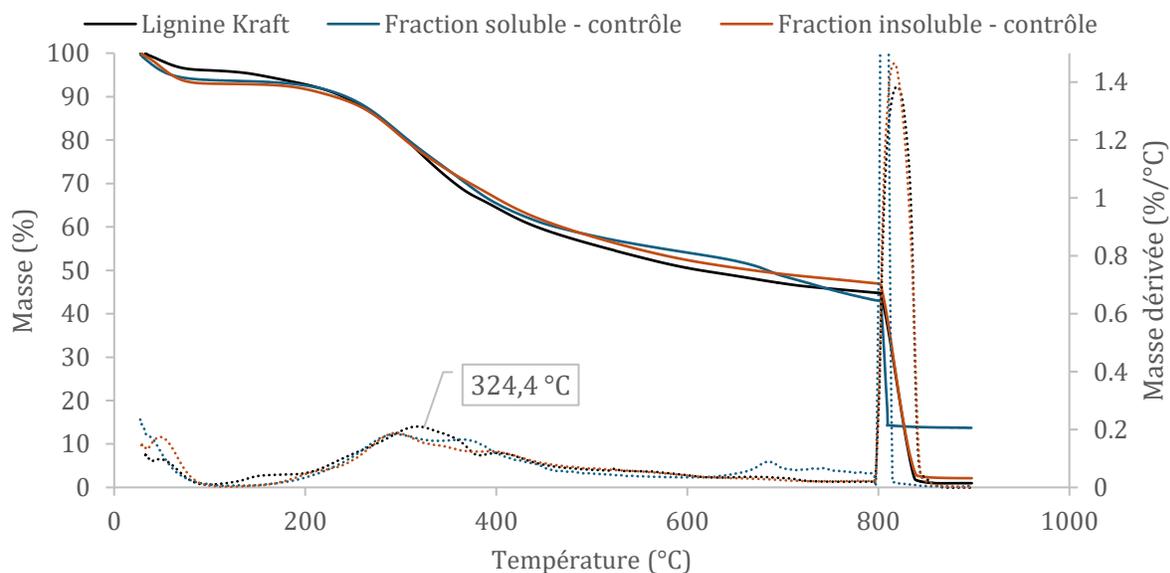


Figure IV-14 : Stabilité thermique des fractions solubles et insolubles du contrôle par analyse thermogravimétrique.

Ces analyses thermogravimétriques sous azote (20-800 °C) puis sous air (800-900 °C) révèlent une dégradation similaire des différents échantillons, autour de 324 °C. En revanche, une grande différence est observée concernant les résidus obtenus après pyrolyse, comme indiqué dans le Tableau IV-7. Là où la lignine Kraft et la fraction insoluble du contrôle présentent un faible taux de résidu (0,9 et 2,1 % respectivement), la fraction soluble présente 13,7 % de résidu.

Tableau IV-7 : Taux de résidus des fractions solubles et insolubles du contrôle.

	Résidu (%)
Lignine Kraft	0,9
Fraction soluble - contrôle	13,7
Fraction insoluble - contrôle	2,1

Cette valeur anormalement haute laisse supposer que des sels seraient présents dans la fraction soluble du contrôle. On peut émettre l'hypothèse que des sels de bore seraient encore présents dans le milieu malgré l'étape de dialyse. Afin de le vérifier, une RMN du bore est effectuée.

II.1.7. RMN du bore

Les RMN du bore ^{11}B de l'acide borique $\text{B}(\text{OH})_3$, de l'anion borate $\text{B}(\text{OH})_4^-$, de la lignine Kraft et de la fraction soluble du contrôle ont été réalisées dans le DMSO- d_6 et les spectres sont présentés en Figure IV-15.

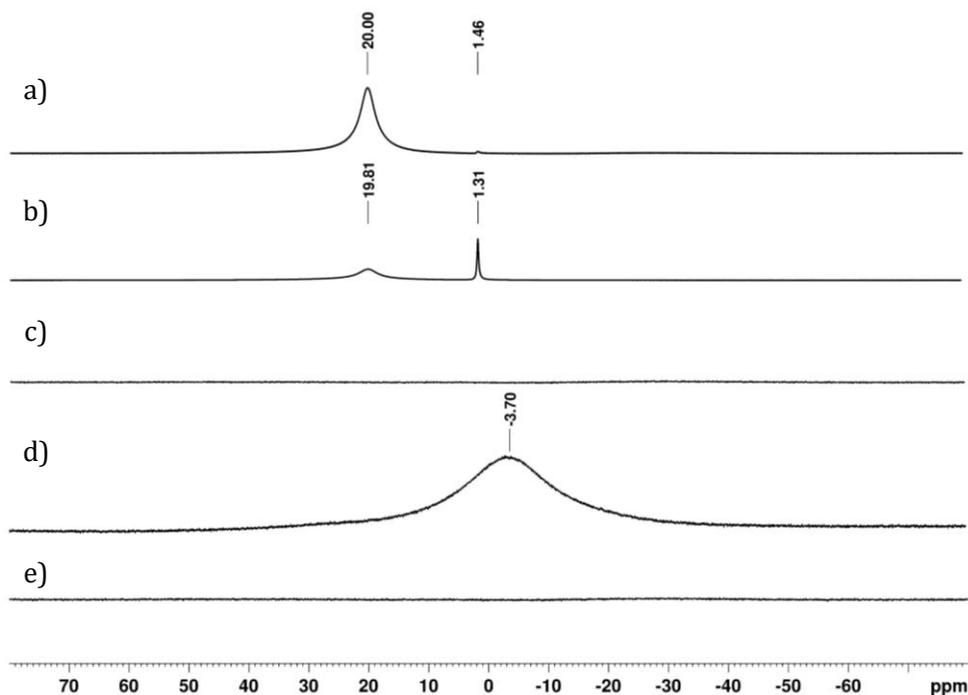


Figure IV-15 : Spectres de RMN ^{11}B de a) $\text{B}(\text{OH})_3$ b) $\text{B}(\text{OH})_4^-$ c) lignine Kraft d) fraction soluble du contrôle e) fraction insoluble du contrôle. Spectres acquis avec le pulse program « zgbs ».

Le spectre de l'acide borique sous sa forme acide H_3BO_3 présente un signal à 20 ppm. En raison de l'environnement électronique non sphérique autour de $\text{B}(\text{OH})_3$, le gradient de champ électrique résultant entraîne une relaxation rapide du noyau de bore quadripolaire, ce qui provoque un élargissement du signal. Étant donné que le noyau est sensible à son environnement électronique local, les atomes de bore dans $\text{B}(\text{OH})_3$ et $\text{B}(\text{OH})_4^-$ peuvent facilement être distingués par leurs signaux RMN séparés. Du NaOD a été ajouté pour passer en milieu alcalin. Ce spectre simule le tampon borate utilisé pour la solubilisation de la lignine, soit l'anion borate $\text{B}(\text{OH})_4^-$. En raison de la coordination plus élevée et de la charge négative, le noyau de bore de $\text{B}(\text{OH})_4^-$ est davantage protégé par une densité électronique accrue par rapport au noyau de bore de $\text{B}(\text{OH})_3$. Son déplacement chimique en RMN du ^{11}B se situe à 1,31 ppm. Étant donné que $\text{B}(\text{OH})_4^-$ possède un environnement électronique sphérique et plus symétrique, le signal est assez étroit. [19]

La lignine Kraft ne présente aucun signal, indiquant l'absence de bore, et il en est de même pour la fraction insoluble. Enfin, la fraction soluble présente un signal distinct de ceux de l'acide borique et du borate (H_3BO_3 et $B(OH)_4^-$), à -3,70 ppm. La zone de [10 ; -130] ppm correspond à des atomes de bore tétravalents. [20-22] Le signal à -3,7 ppm est très élargi, témoignant d'une mauvaise relaxation liée à un environnement encombré. Cette analyse confirme la présence de bore dans la fraction soluble du contrôle, avec un signal différent de celui des espèces borées du tampon. Par conséquent, une nouvelle forme de bore est présente dans la fraction soluble du contrôle. C'est un résultat cohérent avec la proportion de résidus inorganiques détectée en ATG.

II.1.8. Conclusion intermédiaire

Les analyses qui ont été conduites sur les fractions solubles et insolubles semblent mener à plusieurs points de conclusion. La masse molaire de la fraction soluble du contrôle augmente et son taux d'hydroxyles aliphatiques diminue. De plus, de nouvelles espèces borées, probablement tétraédriques, sont trouvées dans cette fraction soluble. Le bore jouerait donc un rôle non négligeable dans la solubilisation de la lignine Kraft, et semble même altérer sa structure.

Afin d'essayer de mieux comprendre ce phénomène, d'autres contrôles ont été effectués dans d'autres solvants aqueux. Leurs résultats et analyses font l'objet de la partie suivante.

II.2. Contrôle dans d'autres solvants pour élucider le mécanisme

II.2.1. Contrôle dans l'eau distillée

La lignine Kraft a été mise en solution à 10 g/L dans de l'eau distillée, avec un bullage d'oxygène, à 60 °C pendant 16 h. Il est obtenu **10 % d'une fraction soluble** beige clair et 90 % de fraction insoluble marron plus clair que la lignine Kraft de départ (Figure IV-16)

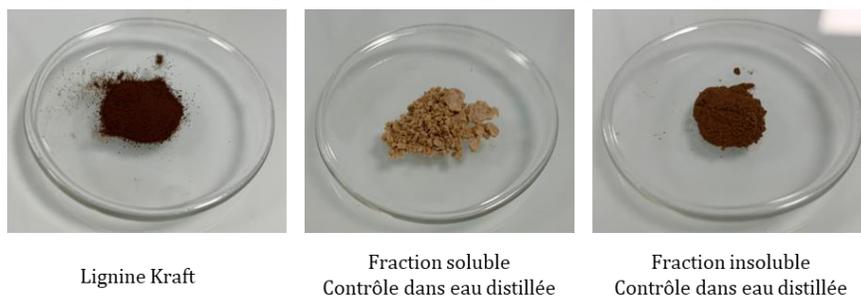


Figure IV-16 : Photographies de la lignine Kraft brute et des fractions solubles et insolubles obtenues après contrôle dans l'eau distillée.

Dans la littérature, il est reporté plusieurs exemples d'un changement de couleur de lignines suite à un fractionnement. Par exemple, Zhan *et al.* ont fractionné une lignine Kraft à l'aide de solutions de méthanol/eau et ont obtenu deux fractions : une beige (faible Mw) et une marron foncé (haute Mw).

Dans la fraction de haute masse molaire, sont identifiées des structures condensées et des doubles liaisons conjuguées. [23] La présence de structures condensées ou de quinones augmente le degré de conjugaison et d'insaturation de la lignine, et provoque ainsi un assombrissement. [24]

Dans le cas de cette étude, ce n'est pas la différence d'affinité de la lignine avec des solvants de polarités différentes qui la fractionne. Le fractionnement pourrait plutôt être attribué au passage en solution des plus petites masses molaires, et/ou des fractions riches en hydroxyles. Les profils de SEC des fractions sont représentés en Figure IV-17. La fraction insoluble majoritaire est identique à la lignine Kraft de départ. En revanche, il est observé une diminution de la masse molaire de la fraction soluble.

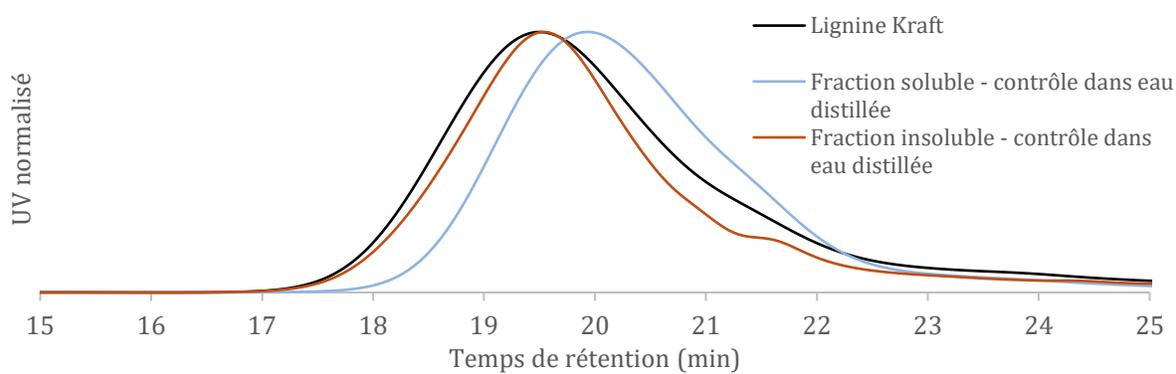


Figure IV-17 : Chromatogramme SEC dans la soude aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles du contrôle dans l'eau distillée.

Quelques études dans la littérature traitent de la dépolymérisation de la lignine en présence de NaOH aqueux, mais les conditions sont dures : hautes températures et pressions (260 °C, 2000 kPa de N₂), ajout de catalyseurs métalliques (à base de ruthénium par exemple), dans des mélanges aqueux/solvants organiques (éthanol) et pour des longs temps de réaction. [25–30] Ils montrent des délignifications allant de 42,3 à 85 % selon les conditions, mais restent très éloignés des conditions douces employées dans notre travail.

Une hypothèse qui expliquerait la diminution apparente de la masse molaire de la fraction soluble serait que la normalisation des pics fausse le jugement. En effet, la fraction soluble ne représente que 10 % de la masse totale de lignine. De plus, la trace SEC de la fraction insoluble ne couvre pas entièrement celle de la lignine Kraft initiale. Sa dispersité est plus faible, et une différence notable existe aux longs temps d'élution. Ainsi, les 10 % de fraction soluble seraient composés des plus faibles masses molaires qui sont séparées de la fraction insoluble. Le fractionnement serait alors uniquement basé sur la taille des chaînes.

Enfin, la RMN quantitative du phosphore est réalisée pour ces fractions. Seule la fraction soluble est interprétable dans le mélange de dérivatisation pour l'analyse RMN. La quantification des taux d'hydroxyles est présentée en Figure IV-18. Il est remarqué une baisse significative du taux d'hydroxyles aliphatiques et phénoliques. En revanche, le taux d'acides carboxyliques passe de 0,39 à 0,52 mmol/g.

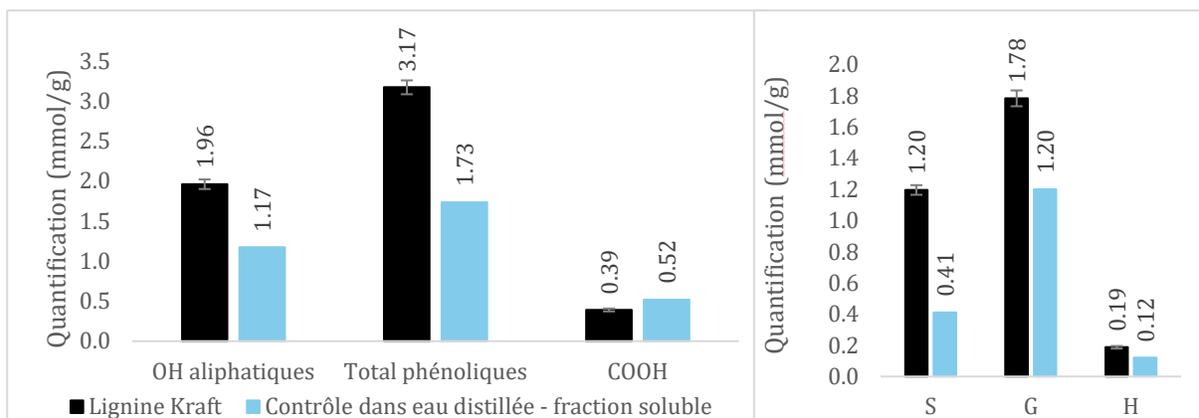


Figure IV-18 : Quantification par RMN ^{31}P des fonctions hydroxyles de la fraction soluble issue du contrôle dans l'eau distillée.

Il n'est pas expliqué pourquoi les taux d'hydroxyles aliphatiques et phénoliques diminuent autant alors que la solubilité de cette fraction est augmentée par rapport à la lignine de départ.

II.2.2. Contrôle dans une solution de soude sans ajustement de pH

La lignine Kraft a été solubilisée à 10 g/L dans une solution aqueuse de soude à pH 10 et agitée pendant 16 h sous bullage d'oxygène. Au bout de 30 min, le pH de la solution a chuté à 7,5. À la fin de la réaction, il est récupéré **15 % de fraction soluble** contre 85 % de fraction insoluble. Ces deux fractions sont analysées par SEC, et leurs chromatogrammes sont représentés en Figure IV-19.

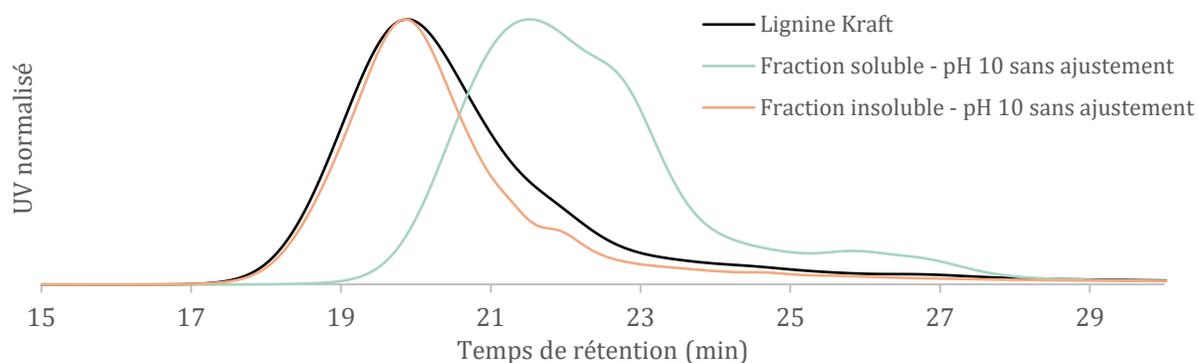


Figure IV-19: Chromatogramme SEC dans la soude aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles du contrôle dans l'eau à pH 10, sans ajustement de pH au cours de la solubilisation.

La fraction insoluble semble quasiment inchangée par rapport à la lignine Kraft de départ. Une perte des plus faibles masses molaires de la lignine Kraft peut être notée. Quant à la fraction soluble, une diminution de sa masse molaire est observée, parallèlement à une augmentation de sa dispersité. Un profil presque bimodal se dessine, et des populations de très faibles masses molaires semblent éluer autour de 26 min. Une fois de plus, l'hypothèse la plus probable pour expliquer cette diminution de masse molaire est de se ramener à la quantité représentée. Ici encore, la fraction soluble ne représente que 15 % de la masse totale de lignine. La fraction insoluble quant à elle, a perdu les plus petites masses molaires de la lignine Kraft. Un fractionnement selon les masses molaires aurait donc eu lieu.

II.2.3. Contrôle dans une solution de soude à pH constant

La lignine Kraft est solubilisée à 10 g/L dans une solution de soude à pH 10 et agitée pendant 16 h avec un bullage d'oxygène. Cette fois ci, le pH est contrôlé en fonction du temps (Figure IV-20) et des ajouts de soude à 1 M sont effectués régulièrement pour revenir à un pH constant de 10. Les ajouts sont arrêtés lorsque le pH de la solution est fixe à la valeur cible de 10. Au total, il a été ajouté 670 μL de solution de NaOH à 1M, ce qui correspond à 0,67 mmol d'ions OH^- pour 0,2 g de lignine. Cela revient à **3,35 mmol d'ions hydroxyles par g de lignine**, soit une valeur très proche de la quantité de phénols et d'acides carboxyliques présents dans la lignine Kraft utilisée : 3,56 mmol/g (cf Figure IV-10).

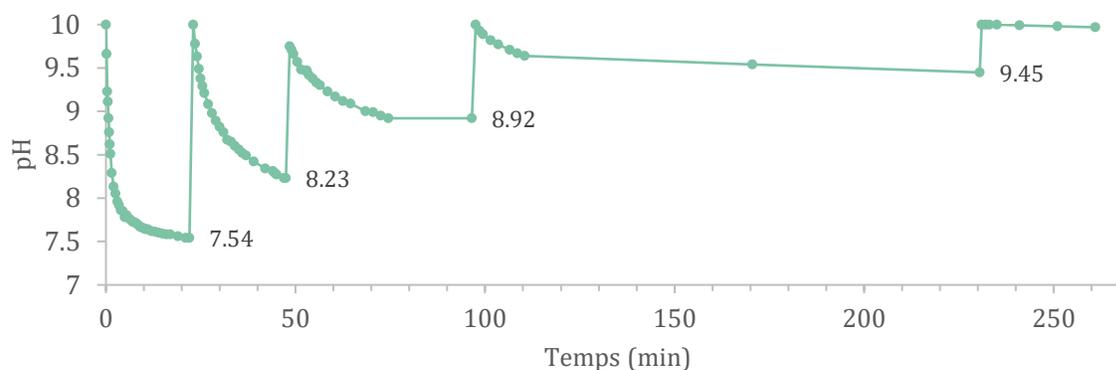


Figure IV-20 : Évolution du pH au cours du temps de solubilisation. Un ajout de soude à 1M est effectué régulièrement pour revenir au pH désiré de 10.

Il est obtenu 100 % de fraction soluble. Les masses molaires et les dispersités sont représentées en Figure IV-21 et rassemblées dans le Tableau IV-8.

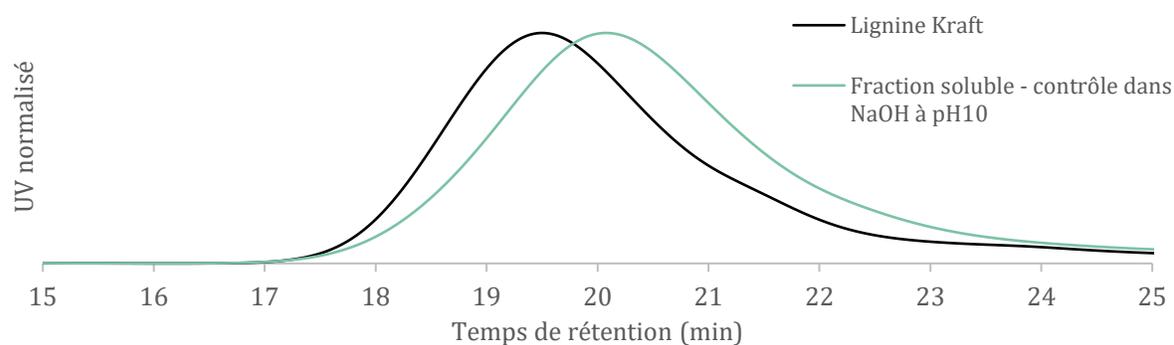


Figure IV-21 : Chromatogramme SEC en phase aqueuse à pH 12 de la fraction soluble du contrôle dans l'eau à pH 10. Une diminution de la masse molaire de cette fraction obtenue est observée en SEC soude. La masse molaire de la lignine diminue de 2 800 à 1 800 g/mol.

Tableau IV-8 : Masses molaires et dispersités de la lignine Kraft et de la fraction soluble du contrôle dans l'eau à pH 10.

	Lignine Kraft	Fraction soluble - contrôle dans NaOH à pH 10
Rendement (%wt)	-	100
Mw (g/mol)	2 800	1 800
Đ = Mw/Mn	6,4	9,5

Il est observé une modification des masses molaires moyennes, mais pas de l'étendue ou de la distribution de cette dernière. Ainsi, la diminution des masses molaires observée pourrait être attribuée soit à des conformations de chaînes différentes, qui modifient les volumes hydrodynamiques, soit à des associations ou répulsions entre molécules, qui altèrent les propriétés des objets en solution, voire aux deux phénomènes combinés.

Enfin, la RMN quantitative du phosphore est réalisée, les résultats des taux d'hydroxyles sont résumés en Figure IV-22.

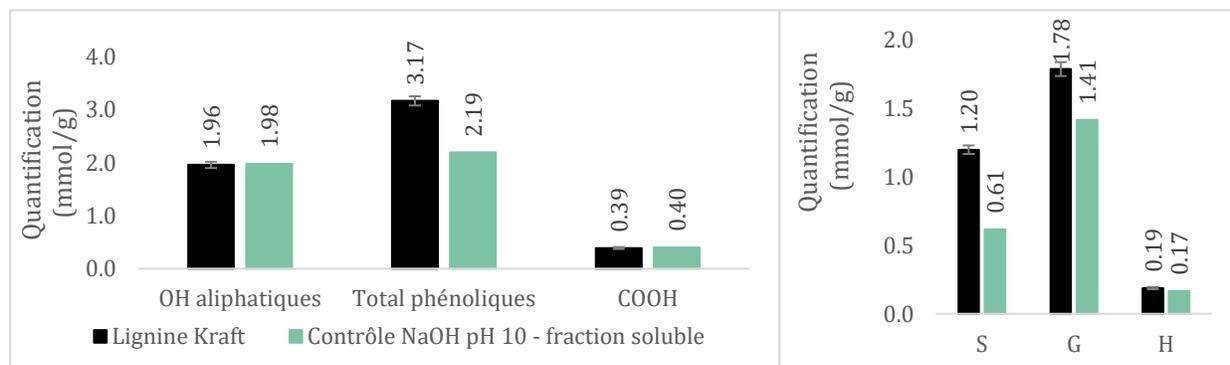


Figure IV-22 : Quantification par RMN ^{31}P des fonctions hydroxyles des fractions solubles et insolubles du contrôle dans l'eau à pH 10.

La quantité d'hydroxyles aliphatiques et des acides reste constante. En revanche, la quantité de phénol diminue, plus particulièrement les phénols d'unité S et G, tandis que les unités H restent inchangées.

Toutefois, la RMN 2D-HSQC de cette fraction ne montre aucune différence avec le spectre de la lignine Kraft. Pour conclure sur ce contrôle dans de la soude aqueuse à pH constant de 10, il a été démontré que 100 % de la lignine est solubilisée, avec une diminution de sa masse molaire. Une fois de plus, il est difficile d'établir la cause précise de ce comportement, bien que la piste de la dépolymérisation ait été écartée.

II.2.4. Contrôle dans un tampon carbonate à pH 10

La lignine Kraft a été solubilisée à 10 g/L dans un tampon carbonate à pH 10 avec un bullage d'oxygène pendant 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours. Le mélange a été dialysé afin d'éliminer les sels et d'atteindre un pH neutre. Ensuite, il a été centrifugé et le surnageant soluble a été lyophilisé séparément du culot insoluble. L'évolution du pH du milieu réactionnel pendant la solubilisation et de la quantité de fraction soluble produite, pesée après séchage est représentée en Figure IV-23.

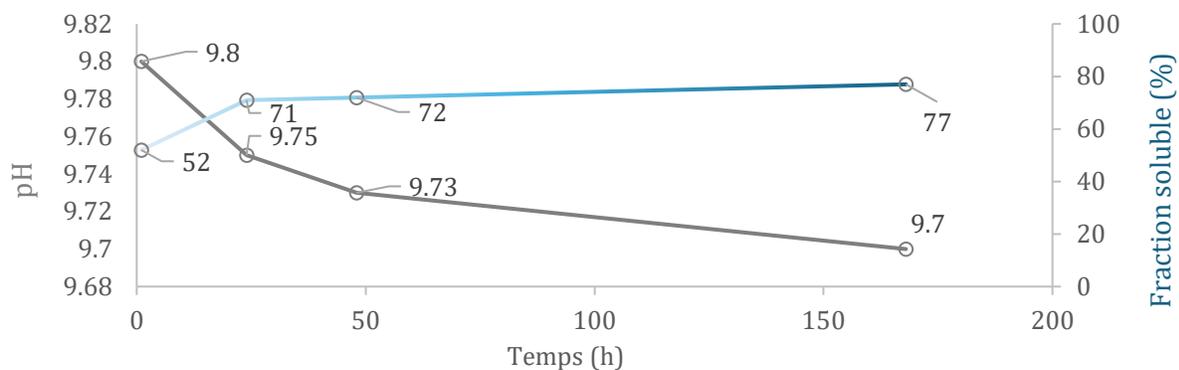


Figure IV-23 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans un tampon carbonate à pH 10.

Le pH du milieu reste relativement constant, atteignant 9,7 après une semaine. La proportion de fraction soluble augmente progressivement, atteignant 77 % après 7 jours de réaction. Les chromatogrammes SEC des fractions solubles sont représentés en Figure IV-24.

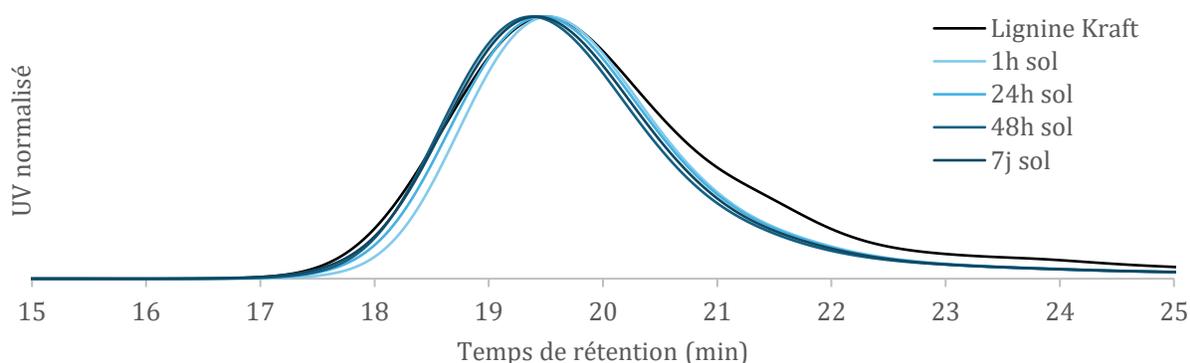


Figure IV-24 : Chromatogramme SEC en phase aqueuse à pH 12 des fractions solubles du contrôle dans un tampon carbonate à pH 10.

Il a été impossible de solubiliser les fractions insolubles dans de la soude à pH 12. Cela pourrait être dû à une agrégation irréversible lors de la lyophilisation. On remarque que les masses molaires des fractions solubles sont constantes au cours du temps, et restent semblables à la masse molaire de la lignine Kraft de départ.

II.2.5. Contrôle dans un tampon phosphate à pH 8

La lignine Kraft a été solubilisée à 10 g/L dans un tampon phosphate à pH 8 avec un bullage d'oxygène pendant 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours. Le mélange a été dialysé afin d'éliminer les sels et d'atteindre un pH neutre. Ensuite, il a été centrifugé et le surnageant soluble a été lyophilisé séparément du culot insoluble. L'évolution du pH du milieu réactionnel pendant la solubilisation et de la quantité de fraction soluble produite, pesée après séchage est représentée en Figure IV-25.

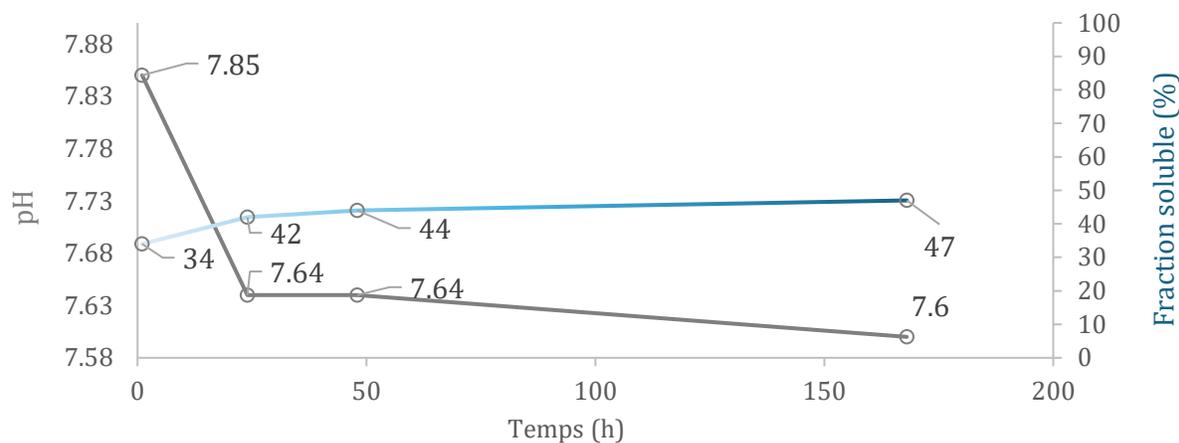


Figure IV-25 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans un tampon phosphate à pH 8.

Une diminution du pH est observée au cours de la solubilisation de la lignine dans le tampon phosphate à pH 8, lequel atteint un pH de 7,6 après une semaine de solubilisation. La quantité de fraction soluble augmente avec le temps, bien qu'elle n'atteigne pas des valeurs aussi élevées qu'avec les tampons borate (jusqu'à 88 %) ou carbonate (jusqu'à 77 %) à pH 10. La valeur du pH du solvant est moins favorable à la solubilisation de la lignine. En effet, à un tel pH, la totalité des hydroxyles phénoliques sont protonés, réduisant ainsi considérablement la solubilité du polymère. Cela expliquerait les valeurs moins élevées de fraction soluble produite.

Les chromatogrammes de SEC en phase aqueuse à pH 12 sont représentés en Figure IV-26. Les traces UV montrent des fractions insolubles de masses molaires proches de celle de la lignine Kraft pour tous les temps de solubilisation. En revanche, les fractions solubles présentent des plus faibles masses molaires, et un profil bimodal qui laisse supposer la présence de petites populations qui éluent vers 21 min. Dans ce cas, il est utile de considérer le spectre de SEC en détection par réfractométrie différentielle (dRi). Cette détection repose sur la mesure de la différence d'indice de réfraction entre l'éluant pur (ici la phase aqueuse à pH 12) et l'échantillon en solution dans ce solvant. Pour des systèmes dilués, le signal dRi est proportionnel à la concentration des échantillons analysés. Ainsi, on peut observer en Figure IV-26 b) dans les fractions solubles des faibles masses éluant à 21 min qui

correspondent à une masse molaire évaluée à 1 700 g/mol (et une dispersité $\bar{D} = 2$) d'après l'étalonnage PSS. Ces petites populations présentent une intensité dRi plus élevée que celle du signal autour de 19 min, correspondant à des chaînes de la taille de la lignine Kraft de départ. Ainsi, il semble que la fraction soluble soit composée majoritairement de ces fragments de petite taille.

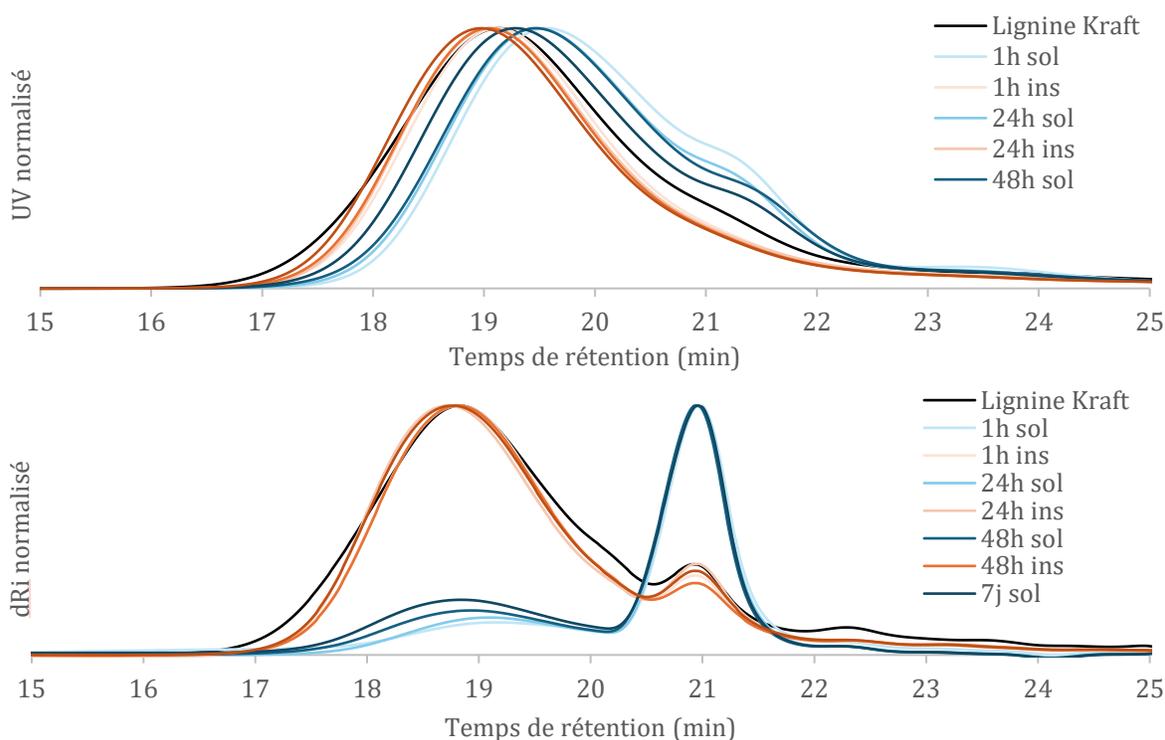


Figure IV-26 : Chromatogramme SEC en phase aqueuse à pH 12 de la fraction soluble du contrôle dans le tampon phosphate à pH 8. Traces (a) UV et (b) dRi.

En conséquence, il apparaît que le tampon phosphate à pH 8 fractionne la lignine Kraft en une fraction insoluble dont les masses molaires sont semblables à la lignine de départ, et une fraction soluble composée de fragments de plus petites tailles.

II.2.6. Contrôle dans un tampon ammoniacal à pH 10

La lignine Kraft a été solubilisée à 10 g/L dans un tampon ammoniacal à pH 10 avec un bullage d'oxygène pendant 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours. Trois bains de dialyse dans de l'eau distillée à 4 °C, d'une durée de 16 h chacun, ont été nécessaires pour que le dialysat atteigne un pH neutre. Le pH dans la poche de dialyse est alors de 8,91. Ce mélange est ensuite centrifugé et le surnageant soluble est lyophilisé séparément du culot insoluble.

L'évolution du pH du milieu réactionnel pendant la solubilisation et de la quantité de fraction soluble produite, pesée après séchage, est résumée en Figure IV-27. Le pH n'évolue pas et reste à 10 tout au long de la solubilisation. La quantité de fraction soluble produite augmente au cours du temps. En revanche, les valeurs atteintes sont très faibles : 25 % de fraction soluble après 7 jours de solubilisation.

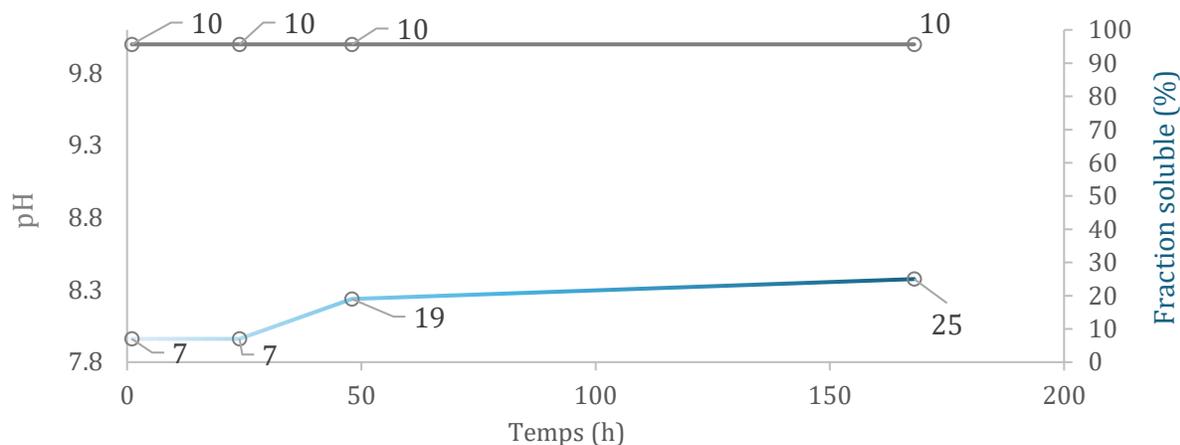


Figure IV-27 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans un tampon ammoniacal à pH 10.

Dans la littérature, il est mentionné plusieurs fois le traitement de la biomasse avec de l'ammoniaque. Par exemple, l'ammoniaque est utilisée depuis plusieurs décennies comme agent de gonflement de la cellulose ainsi que pour modifier sa morphologie. L'ammoniaque pénètre à la fois dans les régions amorphes et cristallines de la cellulose et interagit avec les groupes hydroxyles, entraînant le gonflement de la cellulose en remplaçant les liaisons hydrogène OH--O par des liaisons OH--N pour former une structure désordonnée appelée complexe ammonia-cellulose. Lorsque l'ammoniaque s'évapore, un réarrangement des liaisons hydrogène au sein du réseau de cellulose se produit, aboutissant à une structure cristalline nouvelle. [33]

La technologie de prétraitement par ammoniaque extractif utilise l'ammoniaque pour cliver les complexes lignine-polysaccharides en solubilisant la lignine et en l'extrayant sélectivement de la biomasse. Le prétraitement à l'ammoniaque peut entraîner des modifications structurales de la lignine, notamment l'incorporation d'atomes d'azote, et la préservation de la fonctionnalité de la lignine, comme les unités β -O-4 sensibles. [34]

Strassberger *et al.* ont montré que l'ammoniaque est un candidat de choix pour solubiliser des lignines techniques. Ils parviennent à solubiliser instantanément des lignines commerciales, dont une lignine Kraft Indulin AT à température ambiante dans l'ammoniaque (à environ 8 g/L). Ils concluent que

l'ammoniaque n'est pas un solvant inoffensif, car de l'azote a été incorporé dans la lignine résiduelle, qui s'est ensuite réarrangée en fractions de masse molaire plus élevée. Ils montrent qu'une lignine *soda* solubilisée par l'ammoniaque puis extraite avec du DCM passe d'une masse molaire de 5 000 g/mol à 6 900 g/mol. Leur analyse en RMN-2D montre que la solubilisation dans l'ammoniaque a éliminé les unités syringyles, sans que les auteurs expliquent comment. [35]

Dans le cas de notre étude, le tampon ammoniacal est concentré en ammoniaque à 200 mM. Les chromatogrammes des fractions solubles et insolubles obtenues sont représentés en Figure IV-28.

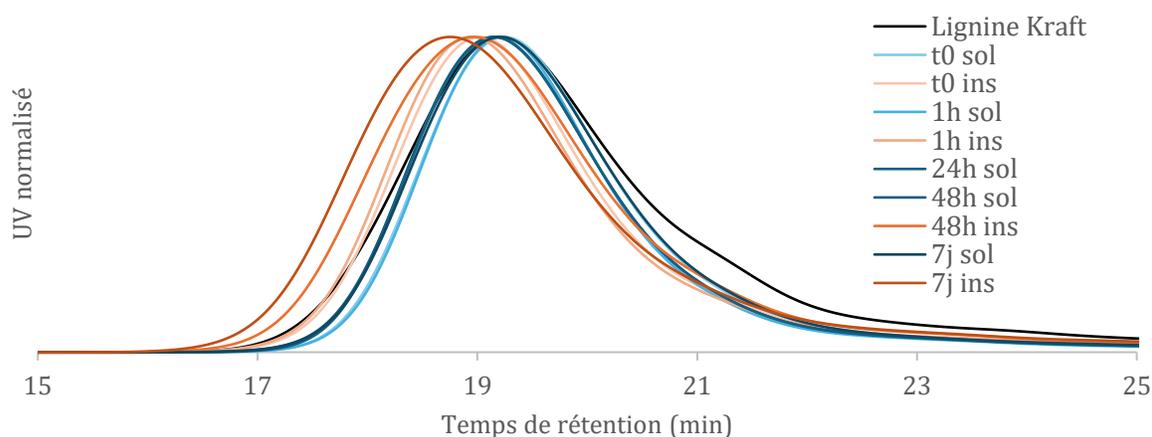


Figure IV-28 : Chromatogramme SEC en phase aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles du contrôle dans un tampon ammoniacal à pH 10.

Le volume hydrodynamique des fractions insolubles augmente au cours du temps de solubilisation, tandis que ceux des fractions solubles restent semblables à la lignine Kraft de départ. Les spectres RMN 2D-HSQC des fractions insolubles ne montrent pas de différences avec la lignine Kraft.

Pour conclure sur ce traitement contrôlé, le tampon ammoniacal produit assez peu de fraction soluble, malgré son pH élevé constant. Cette fraction soluble ne montre aucune variation de masse molaire. En revanche, les fractions insolubles majoritaires voient leur masse molaire augmenter au cours du temps de solubilisation. C'est un phénomène connu d'après la littérature, mais les causes sont encore indéterminées car il n'est observé aucune différence avec la lignine Kraft de départ en RMN 2D-HSQC.

II.3. Conclusion de cette partie

Dans cette partie, il a été investigué l'effet de plusieurs solvants aqueux sur la solubilité de la lignine Kraft et sa structure. Le Tableau IV-9 récapitule la proportion de fraction soluble obtenue avec chaque solvant. Il détaille également les variations de masses molaires induites par chaque solubilisation. L'objectif initial de ces solubilisations était d'approfondir la compréhension de l'interaction du

tampon borate à pH 10 avec la lignine Kraft. En effet, il est observé que c'est le seul solvant dans lequel les fractions solubles récupérées ont une masse molaire apparente augmentée.

Tableau IV-9 : Bilan des solubilisations contrôlées de la lignine Kraft.

Solvant	Fraction soluble (%wt)	Variation Mw (fraction soluble)
Eau distillée	10 %	Diminution
Eau distillée à pH 10 sans ajustement	15 %	Diminution
Eau distillée à pH = constante = 10	100 %	Diminution
Tampon phosphate à pH 8	[34 - 47] %	Faible diminution
Tampon carbonate à pH 10	[52 - 77] %	Pas de variation
Tampon ammoniacal à pH 10	[7 - 25] %	Pas de variation
Tampon borate à pH 10	[58 - 88] %	Augmentation

Dans le cas d'une solubilisation de la lignine Kraft dans des solutions aqueuses non tamponnées, avec ou sans soude, les masses molaires apparentes des fractions solubles sont diminuées. La cause exacte de ce phénomène n'est pas entièrement comprise. Il est supposé que cela soit dû à un effet d'hydratation des chaînes polymères, ce qui conduirait à une modification des volumes hydrodynamiques, et donc à une diminution des masses molaires apparentes en SEC aqueuse. Dans le cas d'une solubilisation de la lignine Kraft dans une solution tampon phosphate à pH 8, les fractions solubles récupérées voient également leur masse molaire diminuer faiblement. Enfin, dans le cas d'une solubilisation contrôlée dans des solutions tampons carbonate et ammoniacal à pH 10, les fractions solubles récupérées conservent une masse molaire égale à celle de la lignine de départ.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse formulée plus haut dans ce chapitre : le bore réagit avec la lignine et forme de nouvelles espèces borées. La complexation du bore avec la lignine est un phénomène rapporté dans la littérature. Les alcools aliphatiques de la lignine peuvent être complexés par des espèces borates $B(OR)_4^-$ (Figure IV-29).

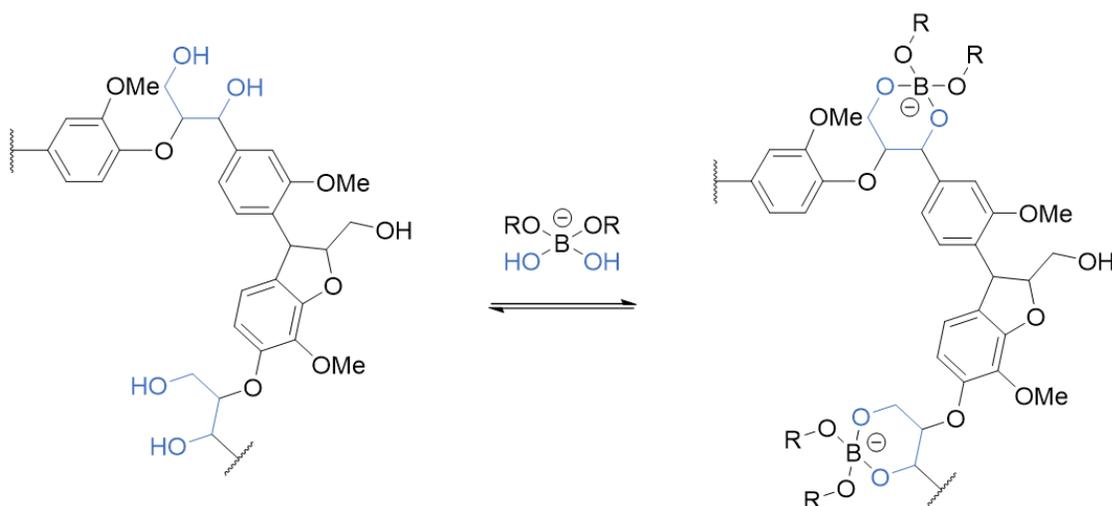


Figure IV-29 : Complexation de la lignine avec des espèces borate. R = H ou lignine. [31]

Dans la littérature, il est montré que les liaisons éther de bore formées de manière réversible au sein de la lignine sont utilisées pour ajuster ses propriétés physiques, y compris la température de transition vitreuse et le profil de solubilité. C'est une stratégie utile pour développer des matériaux souples fonctionnels tels que des hydrogels, des retardateurs de flamme et des absorbants pour la remédiation environnementale. [36]

Raval *et al.* comparent l'adsorption du bore par une cellulose microcristalline, une lignine et une résine polymère. [37] Les anions borate interagissent avec les diols vicinaux dans les unités de la cellulose pour former des complexes chélates de bore. En revanche, d'après eux, la lignine technique qui contient moins de diols a moins tendance à former ces complexes lorsqu'elle est traitée avec une solution aqueuse d'acide borique.

Pour conclure, les solubilisations contrôlées dans différents solvants aqueux ont révélé que même sans enzyme, une partie de la lignine devient soluble, accompagné de changements de masses molaires. Le tampon borate à pH 10 solubilise une fraction importante de lignine Kraft, en formant des complexes qui augmentent la masse molaire d'un facteur 1,6. Cependant, cette fraction soluble ne peut pas être filée par le CRPP pour former des fibres de carbone. En effet, il a été montré que le mélange PVA-fraction soluble du contrôle n'a pas les propriétés rhéologiques nécessaires pour procéder au filage.

III. Références bibliographiques

- [1] S. Constant, H. L. J. Wienk, A. E. Frissen, P. de Peinder, R. Boelens, D. S. van Es, R. J. H. Grisel, B. M. Weckhuysen, W. J. J. Huijgen, R. J. A. Gosselink, *Green Chemistry*. **2016**, *18* (9), 2651–2665. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5GC03043A>.
- [2] Z. Hu, X. Du, J. Liu, H. Chang, H. Jameel, *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **2016**, *36* (6), 432–446. DOI: <https://doi.org/10.1080/02773813.2016.1214732>.
- [3] A. Jacobs, O. Dahlman, *Nordic Pulp & Paper Research Journal*. **2000**, *15* (2), 120–127. DOI: <https://doi.org/10.3183/npprj-2000-15-02-p120-127>.
- [4] W. M. Goldmann, J. Ahola, M. Mikola, J. Tanskanen, *Separation and Purification Technology*. **2019**, *209*, 826–832. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.06.054>.
- [5] E. C. Gaugler, W. Radke, A. P. Vogt, D. A. Smith, *Analytical Science and Technology*. **2021**, *12* (1), 30. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00283-5>.
- [6] S. Ralph, J. Ralph, F. Lu, **2024**. DOI: <https://doi.org/10.11578/2409191>.
- [7] D. S. Argyropoulos, *Research on Chemical Intermediates*. **1995**, *21* (3), 373–395. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03052265>.
- [8] T.-D. Ngo, E. Patenaude, B. Ahvazi, *Cellulose Chemistry and Technology*. **2019**, *53* (5–6), 435–448. DOI: <https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2019.53.44>.
- [9] C. Crestini, H. Lange, M. Sette, D. S. Argyropoulos, *Green Chemistry*. **2017**, *19* (17), 4104–4121. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7GC01812F>.
- [10] J. Sameni, S. Krigstin, M. Sain, *BioResources*. **2016**, *11* (4), 8435–8456. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.11.4.8435-8456>.
- [11] Q. Liu, S. Wang, Y. Zheng, Z. Luo, K. Cen, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **2008**, *82* (1), 170–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2008.03.007>.
- [12] J. Cao, G. Xiao, X. Xu, D. Shen, B. Jin, *Fuel Processing Technology*. **2013**, *106*, 41–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.06.016>.
- [13] M. Balat, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. **2008**, *30* (7), 620–635. DOI: <https://doi.org/10.1080/15567030600817258>.
- [14] A. Ayoub, T. Treasure, L. Hansen, T. Nypelö, H. Jameel, S. Khan, H. Chang, M. A. Hubbe, R. A. Venditti, *Cellulose*. **2021**, *28* (2), 1039–1053. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03571-2>.
- [15] J. A. Pe Iii, J. S. Mun, S. P. Mun, *BioRes*. **2022**, *18* (1), 926–936. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.18.1.926-936>.
- [16] H. Li, A. G. McDonald, *Industrial Crops and Products*. **2014**, *62*, 67–76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.013>.
- [17] S. Kubo, J. F. Kadla, *Journal of Applied Polymer Science*. **2005**, *98* (3), 1437–1444. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.22245>.
- [18] J. H. Bridson, D. J. van de Pas, A. Fernyhough, *Journal of Applied Polymer Science*. **2013**, *128* (6), 4355–4360. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.38664>.
- [19] J. Schott, J. Kretzschmar, M. Acker, S. Eidner, M. U. Kumke, B. Drobot, A. Barkleit, S. Taut, V. Brendler, T. Stumpf, *Dalton Transactions*. **2014**, *43* (30), 11516–11528. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4DT00843J>.
- [20] G. R. Eaton, *Journal of Chemical Education*. **1969**, *46* (9), 547. DOI: <https://doi.org/10.1021/ed046p547>.
- [21] E. Tsilikounas, C. A. Kettner, W. W. Bachovchin, *Biochemistry*. **1993**, *32* (47), 12651–12655. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00210a013>.
- [22] H. DeFrancesco, J. Dudley, A. Coca, in *ACS Symposium Series* (Ed: A. Coca), Vol. 1236, American Chemical Society, Washington, DC **2016**.
- [23] H. Zhang, Y. Bai, B. Yu, X. Liu, F. Chen, *Green Chemistry*. **2017**, *19* (21), 5152–5162. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7GC01974B>.

- [24] H. Zhang, S. Fu, Y. Chen, *International Journal of Biological Macromolecules*. **2020**, *147*, 607–615. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.105>.
- [25] Z. Yuan, S. Cheng, M. Leitch, C. (Charles) Xu, *Bioresource Technology*. **2010**, *101* (23), 9308–9313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.140>.
- [26] J. Long, Y. Xu, T. Wang, Z. Yuan, R. Shu, Q. Zhang, L. Ma, *Applied Energy*. **2015**, *141*, 70–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.12.025>.
- [27] V. Patil, S. Adhikari, P. Cross, H. Jahromi, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2020**, *133*, 110359. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110359>.
- [28] M. Norambuena, C. Vidal, L. Carrasco, P. Reyes, C. Parra, D. Contreras, R. Teixeira Mendonça, *BioResources*. **2016**, *11* (1), 1828–1842. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.11.1.1828-1842>.
- [29] G.-G. Xia, B. Chen, R. Zhang, Z. C. Zhang, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. **2014**, *388–389*, 35–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.08.016>.
- [30] W. Jung, D. Savithri, R. Sharma-Shivappa, P. Kolar, *Waste Biomass Valor*. **2020**, *11* (11), 5891–5900. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00859-8>.
- [31] F. Kačík, J. Ďurkovič, D. Kačíková, in *Lignin: Structural Analysis, Applications in Biomaterials and Ecological Significance* **2014**.
- [32] V. S. Chang, M. T. Holtzapple, in *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 2–6, 1999, in Fort Collins, Colorado* (Eds: M. Finkelstein, B. H. Davison), Humana Press, Totowa, NJ **2000**.
- [33] A. Mittal, R. Katahira, B. S. Donohoe, S. Pattathil, S. Kandemkavil, M. L. Reed, M. J. Bidy, G. T. Beckham, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2017**, *5* (3), 2544–2561. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02892>.
- [34] L. da C. Sousa, M. Foston, V. Bokade, A. Azarpira, F. Lu, A. J. Ragauskas, J. Ralph, B. Dale, V. Balan, *Green Chemistry*. **2016**, *18* (15), 4205–4215. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6GC00298F>.
- [35] Z. Strassberger, P. Prinsen, F. van der Klis, D. S. van Es, S. Tanase, G. Rothenberg, *Green Chemistry*. **2014**, *17* (1), 325–334. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4GC01143K>.
- [36] Z. Dong, H. Yang, Z. Liu, P. Chen, Y. Chen, X. Wang, H. Chen, S. Wang, *Bioresource Technology*. **2022**, *355*, 127218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127218>.
- [37] P. Raval, N. Thomas, L. Hamdouna, L. Delevoeye, O. Lafon, G. N. Manjunatha Reddy, *Langmuir*. **2023**, *39* (15), 5384–5395. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c00021>.

V. Chapitre 5 : Étude du traitement enzymatique d'une lignine Kraft

I.	Traitement enzymatique dans le tampon borate à pH 10.....	193
I.1.	Présentation des fractions obtenues	193
I.2.	Analyses des fractions obtenues	194
I.3.	Conclusion	206
II.	Influence des paramètres	206
II.1.	Influence de la température	206
II.2.	Influence du flux d'oxygène.....	208
II.3.	Influence de la concentration massique en lignine	209
II.4.	Influence de la quantité de BOD	209
II.5.	Influence de la présence d'un médiateur.....	210
II.6.	Influence de la concentration du tampon.....	211
II.7.	Influence de la dialyse.....	213
II.8.	Conclusion	214
III.	Traitement dans d'autres tampons.....	215
III.1.	Carbonate pH 10	215
III.2.	Ammoniacal pH 10.....	217
III.3.	Phosphate pH 8.....	218
III.4.	Conclusion	219
IV.	Étude d'une BOD désactivée	220
IV.1.	Comparaison structurale des enzymes BOD et BOD-T1d.....	221
IV.2.	Traitement de la lignine avec BOD-T1d	222
V.	Traitement des fractions solubles obtenues.....	224
V.1.	Traitement des contrôles	224
V.2.	Retraitement des traitements.....	226
V.3.	Conclusion	228
VI.	Traitement enzymatique d'une lignosulfonate de sodium	228
VII.	Réaction de Dakin sur la lignine Kraft et traitements enzymatiques.....	231
VII.1.	Dakin puis BOD.....	231
VII.2.	BOD puis Dakin.....	233
VIII.	Tentative de fractionnement de la lignine Kraft.....	234
VIII.1.	Traitement de LignK_sol avec la BOD	236
VIII.2.	Traitement de LignK_sol avec une laccase.....	237
IX.	Conclusion.....	238
X.	Références bibliographiques.....	240
XI.	Annexes	241

I. Traitement enzymatique dans le tampon borate à pH 10

La lignine Kraft Indulin AT caractérisée et étudiée dans le chapitre précédent a été traitée avec l'enzyme BOD de *B. Pumilus*. Une cinétique a été menée sur ce système dans le tampon borate à pH 10, à température ambiante avec un bullage d'oxygène. Des expériences ont été arrêtés à 1 h, 24 h, 48 h et 5 jours de réaction. Le milieu réactionnel a été dialysé, centrifugé et lyophilisé. Des fractions solubles et insolubles ont été obtenues, et sont présentées dans le paragraphe suivant.

I.1. Présentation des fractions obtenues

La quantité de fraction soluble obtenue augmente avec le temps de réaction, comme le montre la Figure V-1. Elle passe de 52 % en 1 h de traitement enzymatique à 80 % après 5 jours.

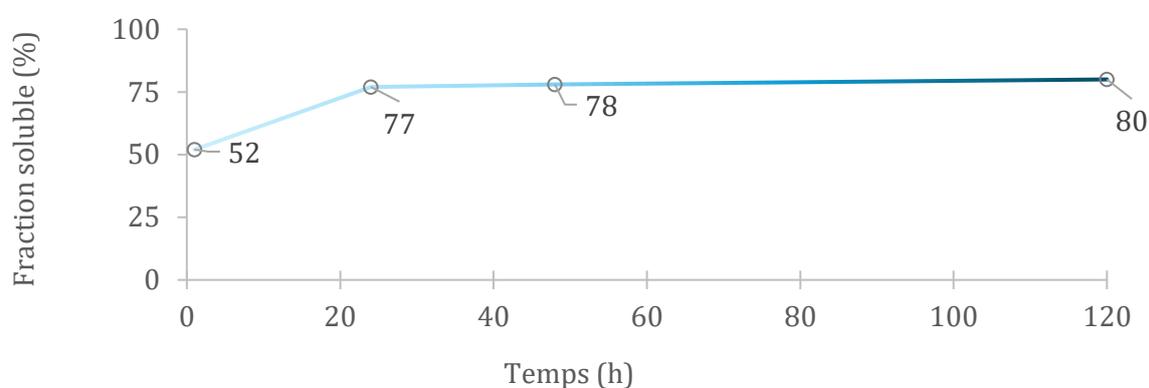


Figure V-1 : Cinétique de la production de fraction soluble au cours du temps de réaction.

Les échantillons lyophilisés ont ensuite été analysés par SEC en phase aqueuse à pH 12, et leurs chromatogrammes sont tracés en Figure V-2. Une augmentation des masses molaires est observée au cours du temps de réaction pour les fractions solubles et insolubles. L'augmentation des masses molaires est d'autant plus flagrante pour les fractions insolubles, qui ne sont pas entièrement analysables car insolubles dans la soude à pH 12 au bout de 48 h de traitement enzymatique. Il est notable que la masse molaire des fractions solubles issues du traitement enzymatique atteint des valeurs nettement plus élevées que celles des fractions solubles des échantillons de contrôle

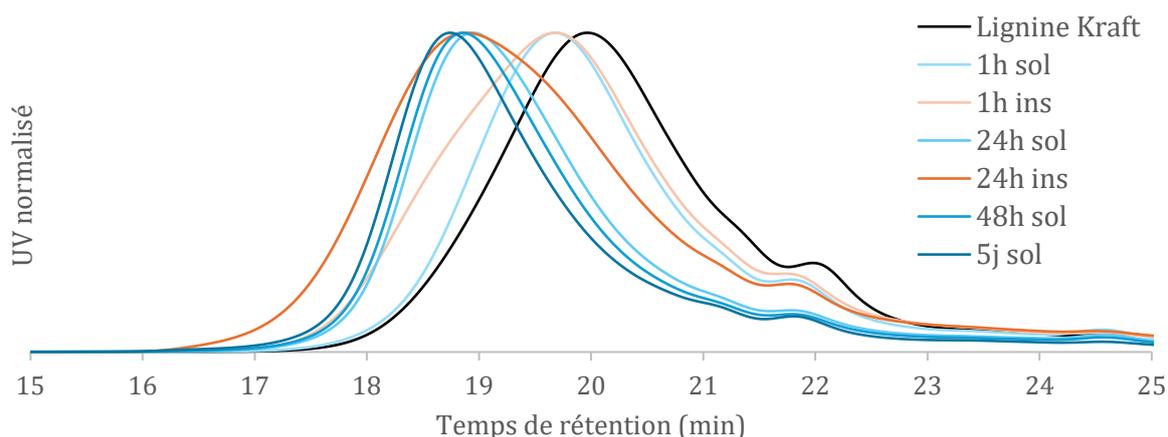


Figure V-2 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles issues de la réaction de la lignine Kraft avec la BOD dans le tampon borate à pH 10.

Le Tableau V-1 présente une comparaison des M_w entre les masses molaires des fractions solubles atteintes avec et sans la BOD, estimées à l'aide d'une calibration PSS. Par exemple, après seulement 1 h de traitement enzymatique, la masse molaire atteint 3 910 g/mol, contre seulement 2 350 g/mol pour le contrôle. Après 48 h, cette différence est encore plus prononcée avec une masse molaire de 8 230 g/mol avec l'enzyme contre 3 770 g/mol pour le contrôle. Cependant, ces résultats peuvent être interprétés avec prudence, car ils concernent les volumes hydrodynamiques des polymères. De plus, dans un système de polyélectrolytes tel que celui étudié à pH 12, et avec des colonnes chargées, il existe un risque d'influence sur les profils SEC. Plusieurs analyses de ces fractions ont été réalisées et seront présentées dans la suite de ce manuscrit.

Tableau V-1 : Comparaison des masses molaires en nombre des différentes fractions solubles produites à différents temps du contrôle et du traitement enzymatique de la lignine Kraft.

		1 h	24 h	48 h	5 jours
Fractions solubles contrôle	M_w (g/mol)	2 350	2 900	3 770	-
	\bar{D}	13,8	19,0	14,2	-
Fractions solubles avec BOD	M_w (g/mol)	3 910	6 760	8 230	9 180
	\bar{D}	8,9	10,6	13,2	14,1

I.2. Analyses des fractions obtenues

Les fractions solubles et insolubles du traitement enzymatique qui seront analysées dans la suite de ce paragraphe sont celles obtenues après une nuit de traitement (environ 16 h), durée de traitement standardisée par le laboratoire partenaire CRPP.

1.2.1. IRTF

La spectroscopie infrarouge est réalisée pour identifier les groupements fonctionnels présents dans les fractions du traitement enzymatique. Ces spectres sont comparés à celui de la lignine Kraft, et ils sont représentés en Figure V-3. Les spectres ont été normalisés sur le signal à 1515 cm^{-1} qui représente la déformation des liaisons C-C des cycles aromatiques. Il est supposé que ces liaisons ne sont pas impactées par le traitement enzymatique. La fraction insoluble semble identique à la lignine Kraft de départ. Quant à la fraction soluble, le spectre IRTF montre l'apparition d'un signal à 1700 cm^{-1} , une augmentation d'une bande à 1570 cm^{-1} et d'une bande large à 3400 cm^{-1} . Tout cela avait été attribué dans les chapitres précédents à la présence de bore. C'est toujours le cas ici, comme vont le confirmer les résultats des analyses thermogravimétriques.

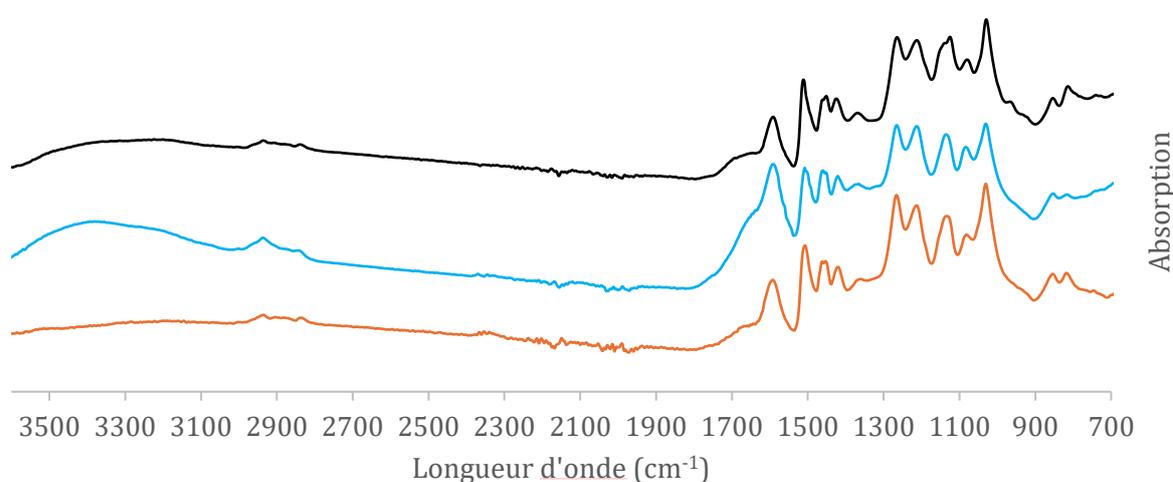


Figure V-3 : Spectres infra-rouge de la lignine Kraft (noir), de la fraction soluble de son traitement avec la BOD (bleu) et de la fraction insoluble (orange).

1.2.2. ATG

Des analyses thermogravimétriques des fractions solubles et insolubles ont été réalisées et comparées à celle de la lignine Kraft en Figure V-4.

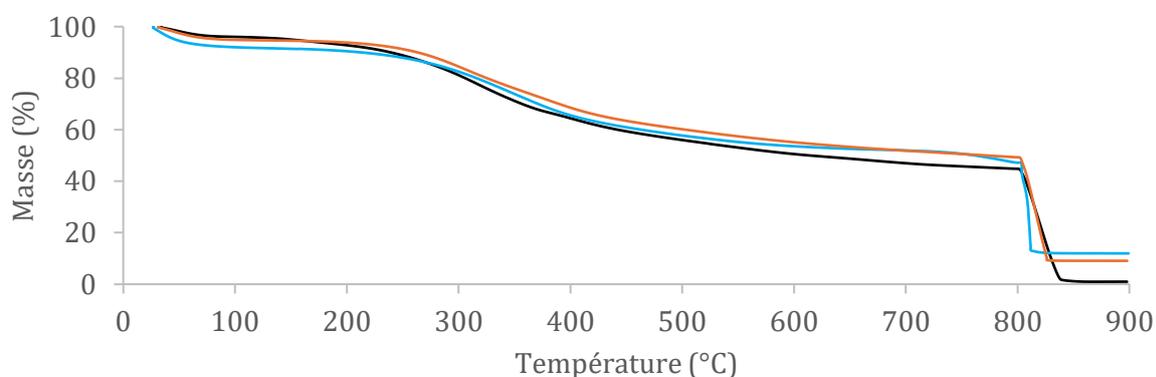


Figure V-4 : Stabilité thermique de la lignine Kraft (noir), de la fraction soluble de son traitement avec la BOD (bleu) et de la fraction insoluble (orange) par analyse thermo gravimétrique.

Les échantillons sont chauffés à 10 °C/min et leur perte de masse est mesurée. À partir de 800 °C, un flux d'air remplace l'atmosphère inerte, provoquant la combustion des composés organiques et ne laissant qu'un résidu inorganique. Les profils de perte de masse des différentes fractions sont similaires à celui de la lignine Kraft. Un résidu de 0,9 % était obtenu pour la lignine Kraft. La fraction soluble présente un taux de résidu inorganique de 12 % plus important que la fraction insoluble de 9,1 %. Le taux de résidu inorganique de la fraction soluble à plusieurs temps de réaction a également été comparé (Tableau V-2).

Tableau V-2 : Taux de résidus inorganiques des fractions solubles et insolubles du traitement de la lignine Kraft avec la BOD.

	Taux de résidus inorganiques	
	Fraction soluble	Fraction insoluble
16 h	12 %	9,1 %
5 jours	26 %	7,5 %

Ainsi, la fraction soluble se charge de composés minéraux inorganiques au cours du traitement, tandis que la fraction insoluble possède de moins en moins de sels. Ce résidu inorganique est relié au bore et au sodium présents dans le tampon borate à pH 10. Des RMN du ¹¹B des résidus inorganiques obtenus ont été réalisées, mais le signal était trop faible dû à la très petite quantité de matière disponible. Finalement, il n'est pas évident d'expliquer la variation des taux de résidus inorganiques en fonction du temps de réaction.

En conclusion, cette analyse montre la présence résiduelle en grande quantité de sels inorganiques dans les fractions soluble et insoluble de lignine traitée avec la BOD dans le tampon borate à pH 10.

1.2.3. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La fraction soluble a été analysée par calorimétrie différentielle à balayage, présentée en Figure V-5. Cette méthode consiste à soumettre la fraction soluble à des cycles de chauffage et de refroidissement pour analyser son comportement thermique. Elle débute par un équilibrage à 25 °C, suivi d'un chauffage jusqu'à 200 °C à 10 °C/min et d'une stabilisation isotherme de 2 min. Ensuite, l'échantillon est refroidi à -80 °C à 2 °C/min, puis chauffé et refroidi plusieurs fois entre 200 °C et -80 °C à des vitesses de 10 °C/min. Chaque étape est suivie d'une stabilisation isotherme de 2 min, permettant d'observer les transitions thermiques. La première descente en température a été effectuée à une vitesse plus lente afin de constater l'apparition ou non d'un signal selon la vitesse de refroidissement.

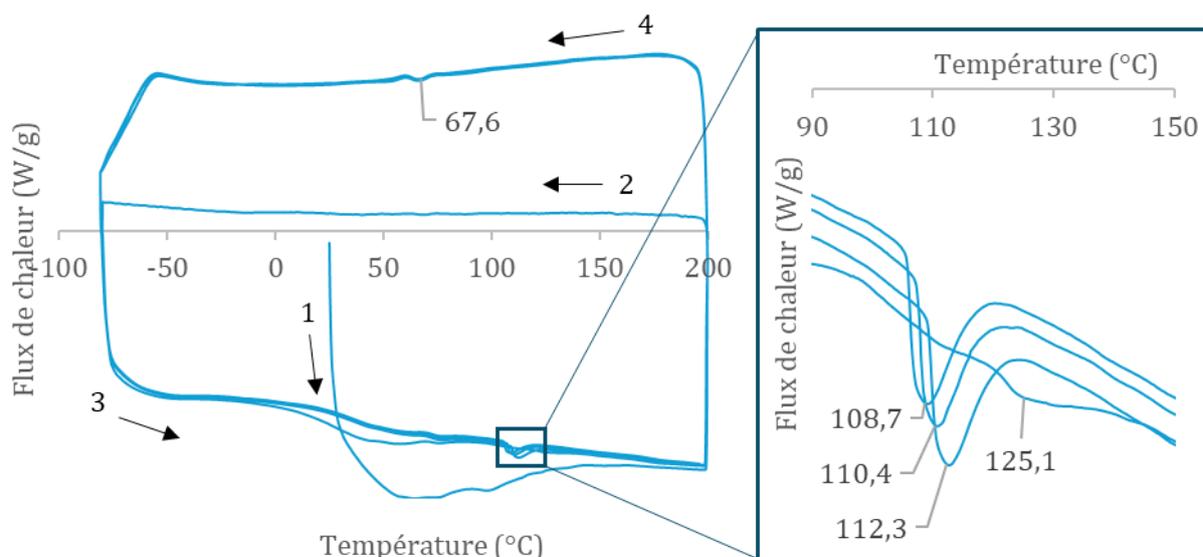


Figure V-5 : Analyse DSC de la fraction soluble. Exo up.

Lorsque l'échantillon est refroidi à une vitesse de 10 °C/min, un faible signal apparaît à une température constante de 67,6 °C à chaque cycle, ce qui pourrait indiquer une cristallisation reproductible. En revanche, le refroidissement plus lent à 2 °C/min ne montre pas ce signal exothermique. Un calcul d'intégrale donne une valeur de 1,5 J/g, ce qui est très faible et considéré non significatif. Par ailleurs, un signal endothermique apparaît autour de 110 °C et baisse de température à chaque cycle : 125,1 °C à la première chauffe, 112,3 °C à la seconde, 110,4 °C à la troisième et 108,7 °C à la dernière. Cela pourrait être attribué à la perte de l'eau liée, qui s'évapore au premier cycle, puis recondense en partie à chaque cycle. Ainsi, aucun changement structurel clair n'est déterminé grâce à cette analyse.

1.2.4. Diffusion de la lumière dynamique (DLS)

Des analyses par diffusion de la lumière dynamique (Dynamic Light Scattering, DLS) ont été réalisées. Le solvant utilisé est l'eau, à pH 12 ou pH 7 en fonction de la solubilité de la lignine employée. La lignine Kraft n'est soluble qu'à un pH alcalin. Les lignines sont diluées à 1 mg/mL et apparaissent limpides à l'œil nu. Les profils DLS obtenus sont présentés en Figure V-6. En analyse par diffusion de la lumière dynamique (DLS), le taux de comptage (count rate) est un paramètre crucial qui reflète l'intensité des photons diffusés par les particules en solution. Il représente le nombre de photons détectés par unité de temps et est influencé par la concentration des particules et leur taille. Il permet d'évaluer la stabilité et la qualité des mesures : une variation constante et faible du taux de comptage suggère une stabilité de l'échantillon, tandis que des fluctuations soudaines ou importantes peuvent indiquer des phénomènes tels que l'agrégation des particules ou des changements dans leur concentration. Ici, la valeur du taux de comptage

permet d'évaluer la présence de particules qui diffusent dans le milieu. Le détail numérique des analyses DLS effectuées est présenté en Tableau V-3.

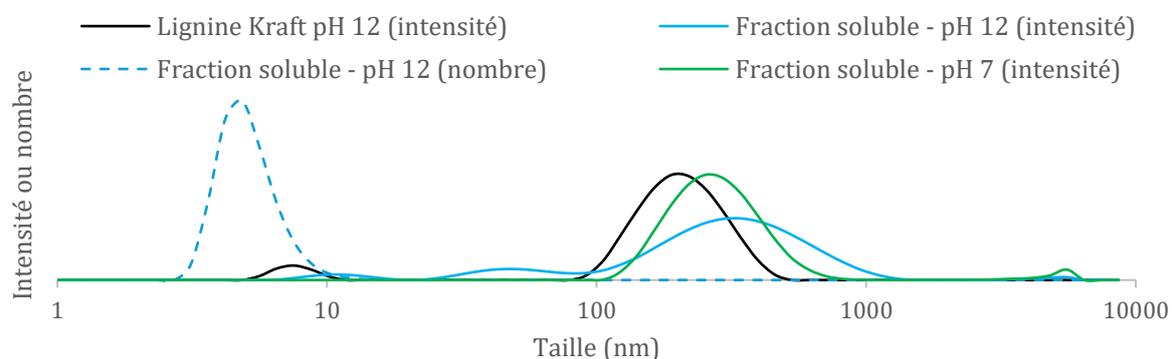


Figure V-6 : Profils DLS de la lignine Kraft à pH 12, et de la fraction soluble de son traitement enzymatique avec la BOD à pH 12 et 7.

Tableau V-3 : Détails des analyses DLS. Le diamètre présenté correspond au Z average.

	Taux de comptage (kcps)	Diamètre hydrodynamique (nm)	Indice de polydispersité
Lignine Kraft pH 12	373	188	0,29
Fraction soluble pH 12	1 226	61	0,61
Fraction soluble pH 7	13 740	181	0,31

Bien que la courbe en intensité de la fraction soluble à pH 12 présentée en Figure V-6 montre les tailles les plus élevées, son diamètre hydrodynamique est le plus faible (64 nm). La courbe en nombre représentée en pointillés montre que les populations de plus petites tailles sont majoritaires. Le peu d'objets volumineux présents diffuse beaucoup la lumière, car la diffusion est proportionnelle à la taille et pas à la quantité de particules.

Il est remarquable que la fraction soluble à pH 12 possède un taux de comptage plus élevé que la lignine Kraft au même pH. Il y aurait donc plus d'objets diffusant dans la fraction soluble. Il peut être important d'évoquer la couleur des échantillons : la lignine Kraft solubilisée à pH 12 est marron foncé, tandis que la fraction soluble à la même concentration est plus claire. La couleur marron d'un échantillon de lignine peut affecter les résultats en absorbant ou en diffusant la lumière laser, ce qui peut entraîner une réduction du signal détecté. Cette absorption optique augmentée pour la lignine Kraft peut fausser la mesure du taux de comptage, rendant difficile l'évaluation précise de la taille des particules et pouvant entraîner une surestimation de la polydispersité.

En revanche, il est intéressant de comparer le taux de comptage de la fraction soluble à deux pH différents. Les résultats de l'analyse DLS montrent des différences marquées entre les fractions

solubles de lignine à pH 7 et pH 12. La fraction soluble à pH 7 présente un taux de comptage très élevé de 13 740 kcps, indiquant une diffusion de lumière beaucoup plus intense par rapport à la fraction à pH 12, qui a un taux de comptage de seulement 1 226 kcps. Cette différence suggère que l'échantillon à pH 7 contient plus de particules ou que les particules diffusent la lumière de manière plus efficace. En termes de taille, la fraction à pH 12 a une taille moyenne des particules de 61 nm, bien plus petite que celle à pH 7, qui est de 181 nm. Cela pourrait indiquer une meilleure solubilisation ou désagrégation des particules à pH 12, tandis que les particules à pH 7 sont plus grandes, potentiellement dues à l'agrégation. Le PDI, ou indice de polydispersité, est de 0,61 pour la fraction à pH 12, révélant une distribution de taille multimodale, assez large et hétérogène. En revanche, le PDI de 0,31 pour la fraction à pH 7 indique une distribution de taille plus uniforme et monomodale, même si les particules sont plus grandes en moyenne. Ces observations suggèrent que le pH influence fortement la taille et la distribution des particules de lignine, avec un pH plus bas favorisant une meilleure diffusion et une homogénéité accrue, tandis qu'un pH plus élevé conduit à des particules plus petites mais plus hétérogènes.

I.2.5. Spectroscopie RMN

Des analyses de spectroscopie RMN ont été réalisées sur la fraction soluble obtenue par traitement enzymatique, mais plusieurs problèmes ont été rencontrés.

I.2.5.a. RMN quantitative du phosphore

Une des premières analyses qui a été réalisée est la RMN quantitative du phosphore. Elle permet la quantification de toutes les fonctions hydroxyles présentes dans le polymère analysé. Les résultats pour la lignine Kraft de départ et de la fraction soluble du traitement enzymatique sont présentées en Figure V-7. La fraction insoluble n'a pas pu être étudiée *via* cette méthode car le mélange de dérivatisation précipitait dans le tube RMN.

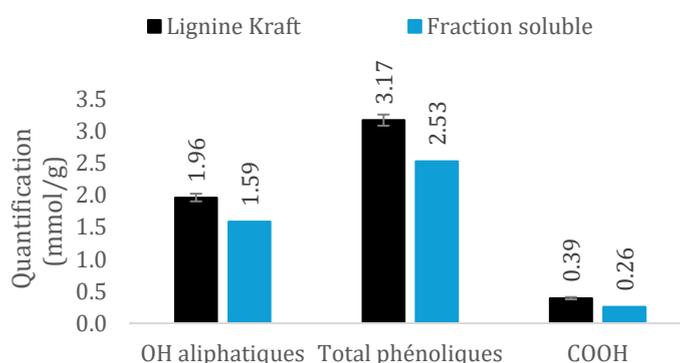


Figure V-7 : Quantification par RMN ^{31}P des fonctions hydroxyles de la lignine Kraft et de la fraction soluble de son traitement avec la BOD.

Une diminution du taux d'hydroxyle dans la fraction soluble est observée. Les hydroxyles aliphatiques et phénoliques montrent une diminution de 20 %, tandis que les acides subissent une

réduction de 30 %. Il était attendu une oxydation des hydroxyles en α de la lignine qui aurait conduit à une diminution des OH aliphatiques. La diminution des OH phénoliques pourrait indiquer la présence de couplage oxydant au sein de la lignine Kraft.

Il est possible de se demander à l'issue de cette analyse si la lignine Kraft a été oxydée, voire même couplée par la BOD pendant le traitement enzymatique. D'autres analyses ont été réalisées pour tenter d'élucider l'action de l'enzyme sur la structure de la lignine.

I.2.5.b. RMN 2D-HSQC

La fraction soluble ne se solubilise pas aussi bien que la lignine Kraft dans le DMSO- d_6 , ce qui a conduit à des difficultés avec les essais initiaux de RMN 2D-HSQC, car aucun signal n'a été détecté. Les spectres obtenus ne montrent que les signaux du DMSO deutéré et parfois des groupes méthoxy vers $\{\delta_H = 3,8 \text{ ppm} ; \delta_C = 56 \text{ ppm}\}$. Pour remédier à cela, les analyses ont été effectuées dans le D_2O afin de mettre à profit la solubilité de la fraction soluble dans l'eau. Bien que la définition du temps de relaxation optimal ait été fixée à 2,5 s et que le nombre de scans ait été augmenté à 256, la résolution du signal obtenu, présenté en Figure V-8, n'est pas idéale. Il n'est observé aucun signal dans la zone des aromatiques (δ_H entre 5,5 et 8 ppm et δ_C entre 100 et 140 ppm). Un unique signal de faible intensité apparait dans une zone plus déblindée : ($\delta_H = 8,35 \text{ ppm} ; \delta_C 171 \text{ ppm}$). La zone aliphatique (δ_H entre 2 et 6 ppm et δ_C entre 40 et 90 ppm) comporte une quantité plus importante de signaux, incluant ceux des méthoxys (δ_H entre 2,47 et 4,0 ppm et $\delta_C = 56 \text{ ppm}$), et d'autres signaux non identifiés.

La lignine Kraft n'étant pas soluble dans le D_2O il n'est pas possible de comparer les signaux obtenus dans les deux systèmes de solvant.

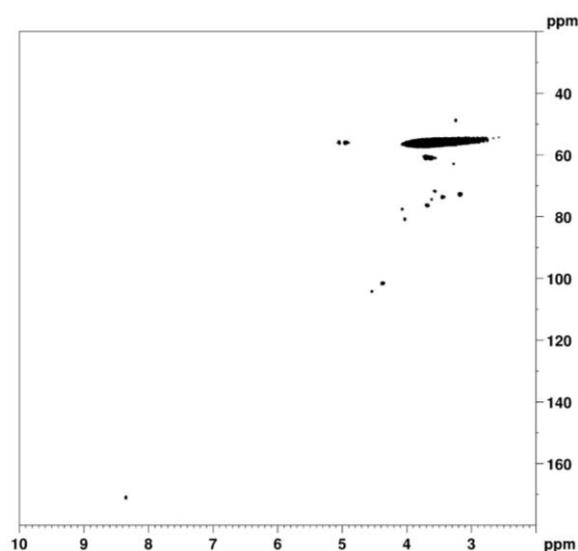


Figure V-8 : Spectre RMN 2D-HSQC de la fraction soluble dans le D_2O . $D1 = 2,5 \text{ s}$ et $ns = 256$.

I.2.5.c. RMN du fluor

Une tentative d'analyse RMN du fluor a été effectuée pour évaluer la quantité de groupes carbonyles dans les fractions solubles et insolubles du traitement enzymatique. Cette méthode a été utilisée par Constant *et al.* pour quantifier les groupes carbonyles dans la lignine en utilisant la dérivatisation avec la 4-(trifluorométhyl)phénylhydrazine. [1] Ce réactif forme des hydrazones spécifiquement avec les carbonyles, permettant leur détection par RMN du fluor. La réaction de dérivatisation est illustrée en Figure V-9. Pour garantir la précision des quantifications, un étalon interne, le 1-méthyl-4-(trifluorométhyl)benzène, est employé. Cette méthode permet une quantification précise des groupes carbonyles présents dans la lignine.

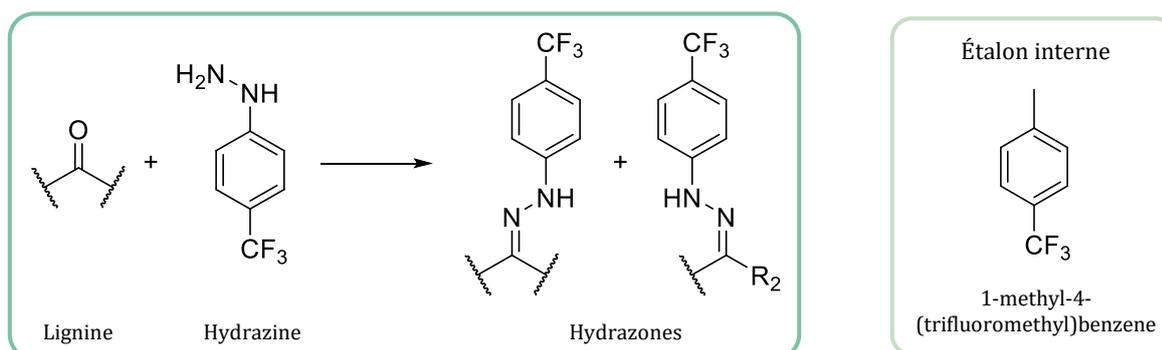


Figure V-9 : Principe de la fonctionnalisation de la lignine avec l'hydrazine et formation d'hydrazones détectables en RMN du fluor. La structure de l'étalon interne est également présentée.

Des tests ont été menés sur la lignine Kraft, sur les fractions solubles et insolubles du traitement enzymatique avec la BOD, et sur la fraction soluble de la solubilisation contrôle, présentée au chapitre précédent. Les résultats sont présentés en Tableau V-4. Malheureusement, aucune des deux fractions du traitement enzymatique n'était soluble aux concentrations employées dans le mélange de DMSO deutéré et d'agent de dérivatisation. La quantité de lignine introduite a été réduite et le volume de solvant deutéré augmenté, mais une solubilisation correcte n'a pu être obtenue, même après plusieurs jours d'agitation.

Tableau V-4 : Présentation de la quantification des groupements carbonyles *via* RMN du fluor de plusieurs lignines

	mmol groupe carbonyle/ g lignine
Lignine Kraft	0,176
Fraction soluble – traitement avec BOD	-
Fraction insoluble – traitement avec BOD	-
Fraction soluble – contrôle	0,141

I.2.5.d. RMN quantitative du carbone

Une tentative d'analyse quantitative du ^{13}C a également été effectuée, selon des méthodes développées dans la littérature par Argyropoulos *et al.* [2] En plus d'un étalon interne (1,3,5-trioxane), un agent de relaxation (l'acétylacétonate de chrome III) a été ajouté, mais cela n'a pas non plus permis d'améliorer les résultats. Les spectres sont présentés en Figure V-10. Malgré une acquisition de 34 000 scans pour les deux échantillons, aucun signal d'intérêt n'apparaît pour la fraction soluble : seuls les signaux du DMSO-d₆ et de l'étalon interne sont visibles.

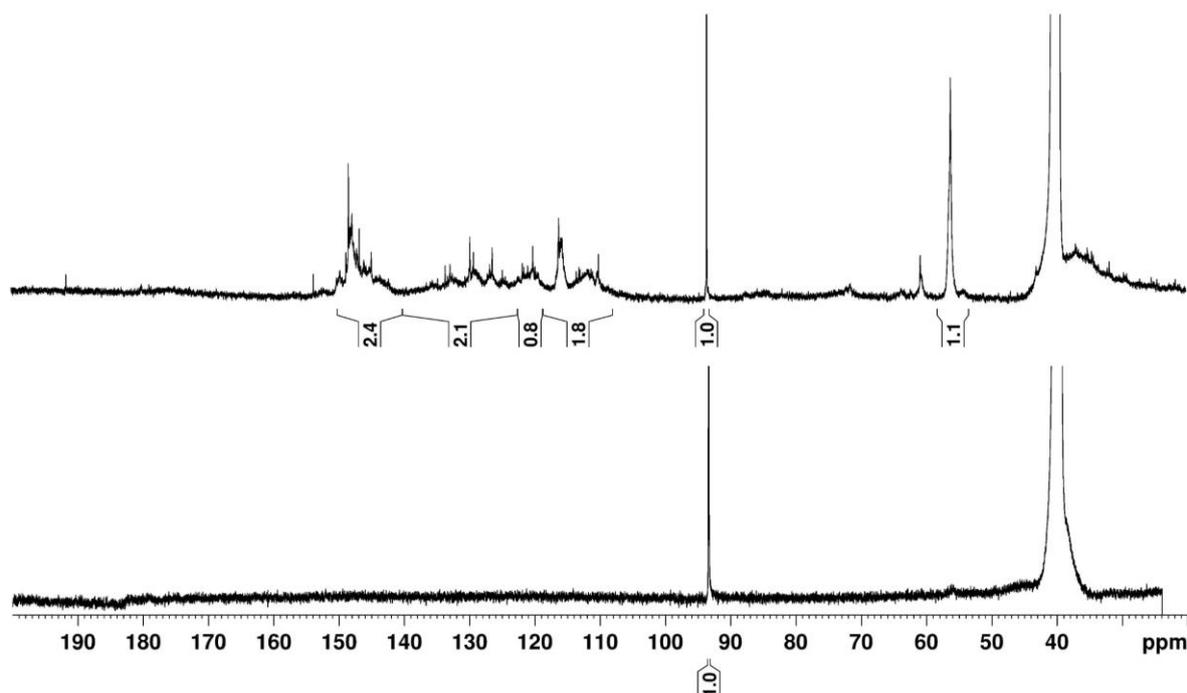


Figure V-10 : Spectres RMN ^{13}C quantitatif de la lignine Kraft et de la fraction soluble avec l'acétylacétonate de chrome III comme étalon interne dans le DMSO-d₆ (de haut en bas).

I.2.5.e. RMN du carbone en phase solide

Finalement, pour s'affranchir de tout problème de solubilité, la RMN du carbone en phase solide a été réalisée en collaboration avec le CESAMO pour la lignine Kraft ainsi que les fractions solubles et insolubles. Les spectres obtenus sont représentés en Figure V-11.

L'attribution des déplacements chimiques a été réalisée grâce à la littérature. [3–6] Aucune différence notable entre la lignine Kraft et les fractions obtenues post traitement enzymatique n'est observée, sauf un léger épaulement dans la fraction soluble vers 158 ppm. Cet épaulement pourrait correspondre à des structures aromatiques légèrement différentes de celles présentes dans la lignine native.

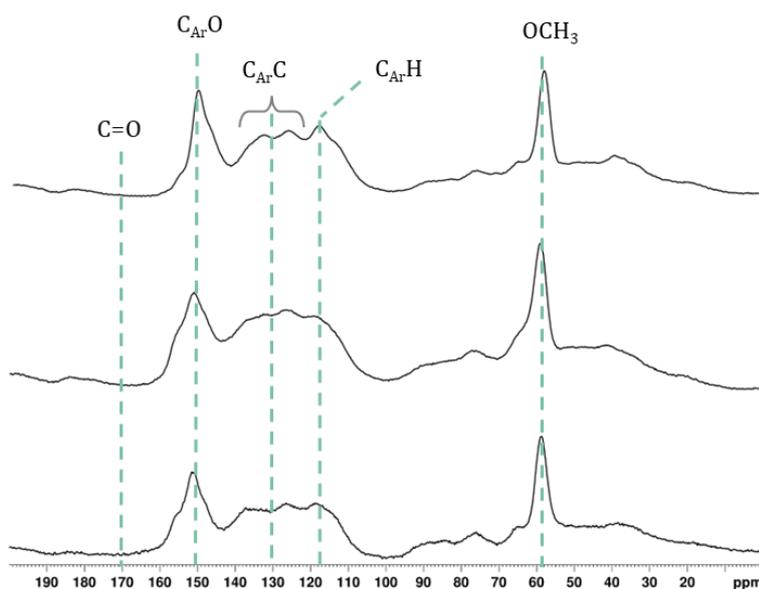


Figure V-11 : Spectres RMN ^{13}C à l'état solide de la lignine Kraft (en haut), et des fractions solubles (au milieu) et insolubles (en bas) issues de son traitement enzymatique avec la BOD.

La diminution du signal dans la région aromatique du spectre 2D-HSQC, associée à des signaux intenses dans la zone aromatique (140-160 ppm) du spectre RMN du solide ^{13}C , pourrait indiquer un couplage 5-5'. Ce couplage C-C aromatique entraîne une perte de protons tout en préservant les structures aromatiques. Ainsi, l'oxydation induite par la BOD, responsable de ce couplage, expliquerait les profils spectraux observés.

Rien n'exclut, dans les analyses présentées dans cette section, la formation d'un couplage Ar-O-Ar de type 4-O-5', qui pourrait également contribuer à une diminution du signal des protons aromatiques en RMN-2D, tout en en diminuant le taux de phénols et en augmentant la masse molaire de la lignine traitée par la BOD.

I.2.6. Acétylation des échantillons

Pour tenter de surmonter les problèmes d'analyses et de solubilité rencontrés, une acétylation des échantillons a été réalisée. Dans la littérature, l'acétylation est souvent utilisée pour améliorer la solubilité de la lignine, car elle réduit les interactions hydrophobes et augmente la compatibilité

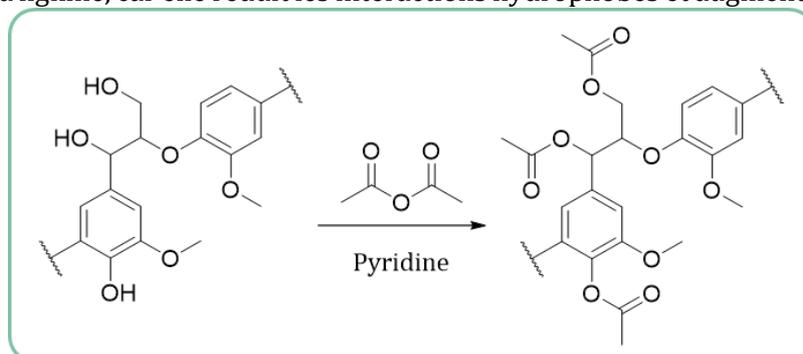


Figure V-12 : Acétylation des fonctions hydroxyles d'un fragment de lignine.

de la lignine modifiée avec les solvants organiques. Elle est réalisée dans la pyridine avec de l'anhydride acétique, comme montré en Figure V-12.

L'acétylation a été suivie par IRTF, où le signal caractéristique des esters entre 1730 et 1760 cm^{-1} est bien présent. Ces spectres sont représentés en Annexe V-1. Bien qu'une acétylation complète ait été confirmée par IRTF, des problèmes de solubilité persistent, même après l'acétylation : la fraction soluble acétylée demeure insoluble dans le THF (pour la chromatographie d'exclusion stérique) ou dans le THF-d8 (pour les analyses RMN).

La Figure V-13 montre les traces SEC dans le THF. Un signal satisfaisant est obtenu pour la lignine Kraft acétylée. Cependant, les fractions solubles et insolubles acétylées n'étaient que partiellement soluble et une partie est restée bloquée sur le filtre en PTFE de 0,45 μm de porosité. Cette insolubilité s'illustre par une intensité très faible des traces de SEC obtenues pour les fractions acétylées.

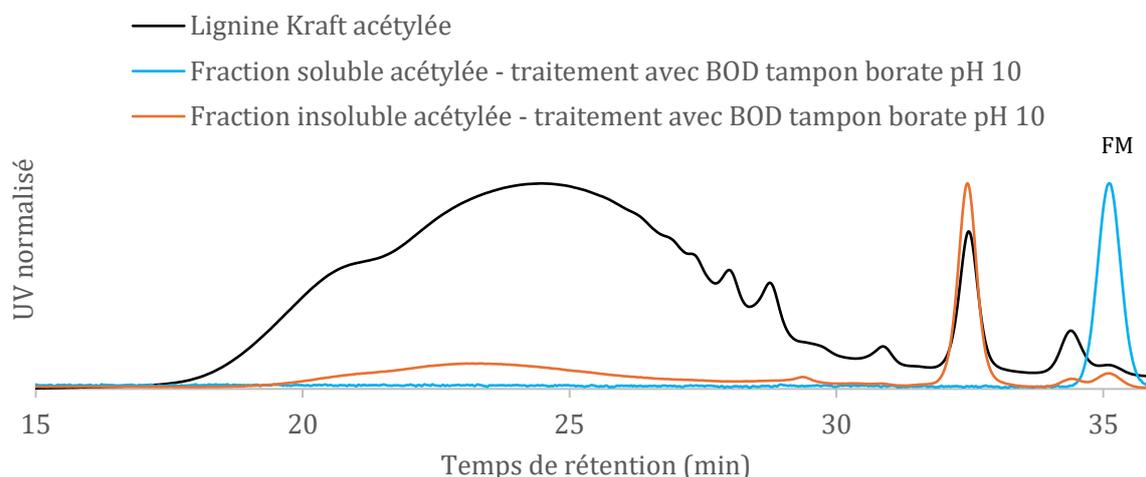


Figure V-13 : Chromatogrammes SEC dans le THF.

La limite de solubilité des fractions traitées acétylées dans les solvants organiques classiques est illustrée dans le Tableau V-5. On y voit que la lignine Kraft acétylée est comme attendue soluble dans le DMSO, le DMF et le chloroforme, tandis que la fraction soluble acétylée ne l'est pas.

Tableau V-5 : Solubilité des lignines acétylées. Sol. = soluble ; ins. = insoluble ; part. = solubilité partielle.

	DMSO	DMF	CHCl_3
Lignine Kraft acétylée	Sol.	Sol.	Sol.
Fraction soluble acétylée	Part.	Ins.	Ins.

L'hypothèse avancée pour expliquer le problème de solubilité repose sur la modification des fonctions hydroxyles. La quantité de groupes hydroxyles ayant diminué d'après la RMN du

phosphore, le taux d'acétylation a été réduit, ce qui aurait diminué le pouvoir solubilisant de la méthode. La perte de solubilité post-acétylation peut également être attribuée à d'autres facteurs, tels que la formation de structures agrégées ou des interactions intermoléculaires qui ne sont pas rompues par l'acétylation. Ces interactions pourraient limiter l'accès des solvants, comme le THF, aux sites modifiés, empêchant ainsi la solubilisation complète des échantillons acétylés.

1.2.7. Titrage acide des fractions solubles

Récemment, Hämäläinen *et al.* ont étudié le traitement enzymatique d'une lignine de feuillu par une laccase modifiée par l'entreprise de biotechnologie finlandaise, MetGen Oy. Cette laccase d'origine bactérienne (MetZyme® LIGNO™) est génétiquement modifiée pour être active à des valeurs de pH de 10-11 et à des températures élevées, traitant ainsi la lignine à l'état soluble. Cet article présente les principales caractéristiques de cette enzyme ainsi que son action sur une lignine brute issue d'un processus industriel. Pour chaque traitement enzymatique, un contrôle des masses molaires est réalisé dans leur système de solvant (NaOH aqueux ajusté à pH 10,5 tout au long des 21 h de réaction). Ils montrent que le traitement enzymatique en milieu alcalin diminue les masses molaires de la lignine (4 kDa pour leur lignine brute devient 2 kDa pour la lignine traitée).

Un titrage des fractions solubles obtenues lors du traitement enzymatique et du contrôle est réalisé par ajout d'acide chlorhydrique. Le pH des solutions diminue à l'ajout de HCl. Le pH de la fraction soluble du contrôle chute assez rapidement. Le pH de la fraction soluble du traitement se comporte différemment, et une zone tampon où le pH reste quasiment constant apparaît entre pH 8 et 7. Les auteurs lient ce phénomène aux pKa des espèces présentes dans le milieu : le phénol réduit et sa version oxydée. D'après eux, l'oxydation du carbone alpha en cétone abaisse le pKa du phénol de l'unité impliquée (de pKa = 9-11 pour la version réduite et à pKa = 7-8 pour la version oxydée), ce qui augmente la solubilité à pH neutre et facilite la rupture de la chaîne de lignine.

Un titrage des fractions solubles du traitement (« Sol_BOD ») et du contrôle (« Sol_contrôle ») a été effectué dans le cadre de notre étude, et les résultats sont présentés en Figure V-14.

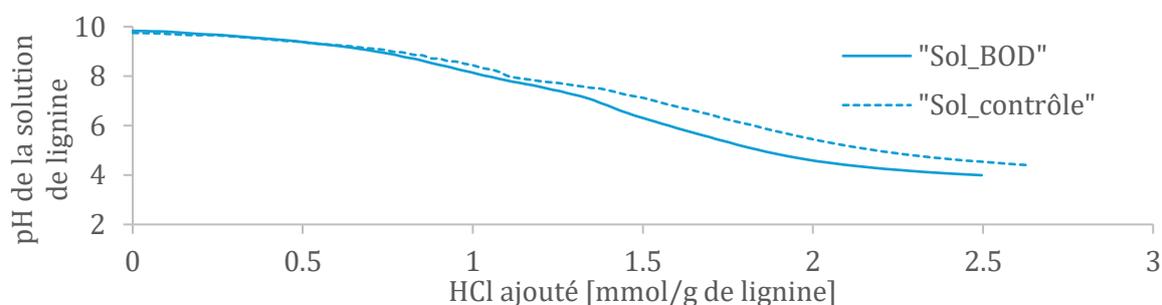


Figure V-14 : Évolution du pH de la solution de deux lignines solubles en fonction de l'ajout de HCl aqueux.

Le pH de la solution de lignine diminue avec l'ajout de HCl aqueux. Avec l'ajout de 1 mmol de HCl pour un g de lignine, le pH des fractions diminue aux environs de pH 8,1 - 8,2. Cependant, aucune différence notable n'est remarquable entre les deux profils. Contrairement à l'article de référence, le pH de la fraction contrôle diminue même moins rapidement que le pH de la fraction traitée enzymatiquement.

I.3. Conclusion

Les analyses effectuées pour évaluer les changements structuraux de la fraction soluble obtenue après traitement enzymatique de la lignine Kraft avec la BOD n'ont révélé que peu de modifications. L'analyse par RMN du phosphore a montré une diminution de 20 % des groupes hydroxyles aliphatiques et phénoliques, tandis que l'IR n'a pas révélé l'apparition de nouvelles bandes caractéristiques. L'analyse thermogravimétrique (ATG) a révélé des taux de résidus inorganiques très élevés dans les fractions solubles et insolubles après traitement, sûrement dû au bore et au sodium. L'analyse par diffusion de la lumière dynamique (DLS) a montré la présence d'objets diffusants à la fois dans la lignine Kraft de départ et dans la fraction soluble. En outre, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) n'a révélé aucune modification claire concernant la structure de la fraction soluble.

La solubilité de la fraction soluble dans le DMSO deutéré était limitée, et seuls des spectres dans le D₂O ont pu être obtenus, ce qui a empêché la comparaison des spectres avant et après traitement. L'analyse quantitative du carbone a échoué. La disparition des signaux aromatiques en HSQC mis en lien avec l'apparition d'un léger signal des carbones aromatiques en RMN du solide ainsi que la diminution du taux de phénols laisse penser que du couplage 5-5' ou 4-0-5' s'est produit. Cette observation est cohérente avec les informations fournies par la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en milieu alcalin, qui a montré une augmentation des masses molaires.

Ainsi, la BOD provoquerait le couplage oxydant en 5-5' ou en 4-0-5' des chaînes de lignine, augmentant leur masse molaire.

II. Influence des paramètres

Afin de mieux comprendre l'action de la BOD sur la lignine Kraft, plusieurs paramètres ont été étudiés. Cette partie se concentre sur l'exploration des conditions réactionnelles et des facteurs influençant l'efficacité du traitement enzymatique ainsi que la structure des fractions solubles obtenues.

II.1. Influence de la température

Le premier paramètre qui a été étudié est la température à laquelle la réaction enzymatique se déroule. D'après le brevet déposé par Mano *et al.* en 2020, la température du traitement

enzymatique est de 37 °C. [7] Dans leurs articles concernant la BOD, Durand *et al.* présentent des études menées avec l'ABTS qui montre une activité maximale de la BOD *B. Pumilus* à environ 60 °C. [8] Des traitements enzymatiques ont donc été menés, dans le tampon borate à pH 10, avec un bullage d'oxygène pendant 16 h, à 60 °C et à température ambiante (environ 20 °C). Le Tableau V-6 présente la quantité de fractions solubles et insolubles obtenues en fonction de la température du traitement.

Tableau V-6 : Quantité de fractions solubles et insolubles produites par un traitement enzymatique à plusieurs températures.

	Fraction soluble	Fraction insoluble
Traitement avec BOD, à température ambiante	70 %	30 %
Traitement avec BOD, à 60 °C	91 %	9 %

Les données montrent une augmentation de la quantité de fraction soluble de lignine lors du traitement avec la BOD à 60 °C par rapport à la température ambiante, passant de 70 % à 91 %. Cette augmentation indique que l'élévation de la température pourrait améliorer l'efficacité de la BOD, en la plaçant dans une gamme de température où son activité est maximale. Cependant, il est également possible que la chaleur joue un rôle direct dans la solubilisation de la lignine, car l'augmentation de la température peut réduire la cohésion interne de la structure du polymère, rendant ainsi la lignine plus accessible aux solvants et augmentant sa solubilité.

Ces deux fractions solubles sont analysées en SEC aqueuse à pH 12, et leurs chromatogrammes sont représentés en Figure V-15.

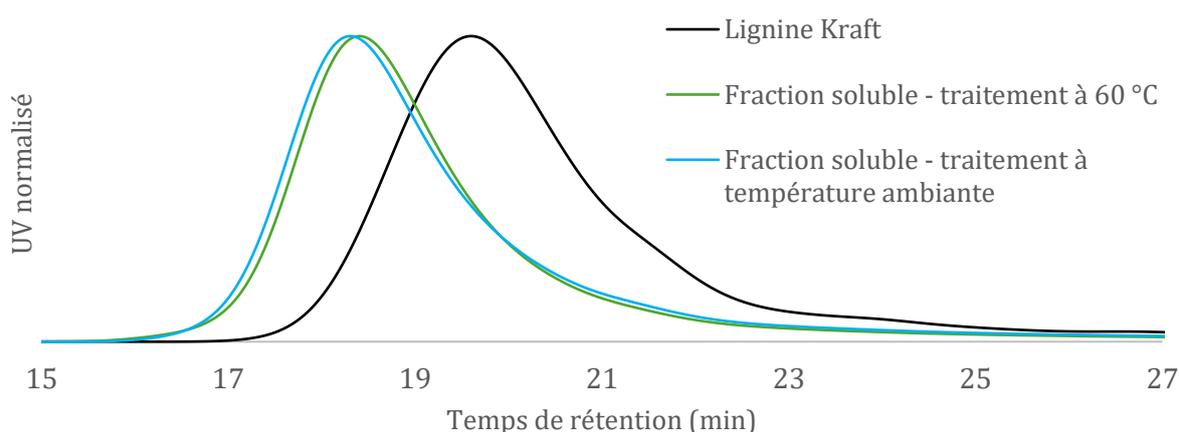


Figure V-15 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des fractions solubles issues de traitements enzymatiques à plusieurs températures.

On observe une augmentation significative et identique des masses molaires pour les traitements à température ambiante et à 60 °C. Cette augmentation semble indiquer que l'action de la BOD est

la même pour les deux températures. L'augmentation de la quantité de fraction soluble à 60 °C est due à la solubilisation thermique. En effet, bien que plus de fraction soluble soit produite à 60 °C, l'absence de variation dans les masses molaires suggère que la chaleur contribue davantage à solubiliser la lignine qu'à augmenter l'activité enzymatique.

Ces observations conduisent à la conclusion que, pour notre étude, le traitement à température ambiante est suffisant, car il ne modifie pas les résultats structuraux tout en consommant moins d'énergie. Cependant, pour le CRPP, qui vise à maximiser le rendement en fraction soluble pour le filage des fibres de carbone, le choix de traiter la lignine à 60 °C se justifie.

II.2. Influence du flux d'oxygène

Le second paramètre qui a été étudié est le flux d'oxygène. Dans les réactions enzymatiques catalysées par des enzymes multi-cuivre, l'apport en oxygène joue un rôle essentiel et peut être un facteur limitant, car il sert de co-substrat indispensable à l'oxydation des substrats phénoliques, et sa disponibilité restreinte peut freiner la vitesse globale de la réaction.

Une expérience contrôle a été réalisée sans oxygène en utilisant un bullage d'azote dans le milieu avant l'ajout des réactifs. Le bullage d'azote a été maintenu tout au long de la réaction afin de s'assurer que le milieu soit entièrement exempt d'oxygène.

L'expérience contrôle sans BOD produit 80 % de fraction soluble et 20 % de fraction insoluble. Ces deux fractions ont été analysées par SEC aqueuse dans la soude, et leurs chromatogrammes sont représentés en Figure V-16. Il est observé une augmentation des masses molaires apparentes pour les deux fractions, avec une augmentation d'autant plus importante pour la fraction insoluble.

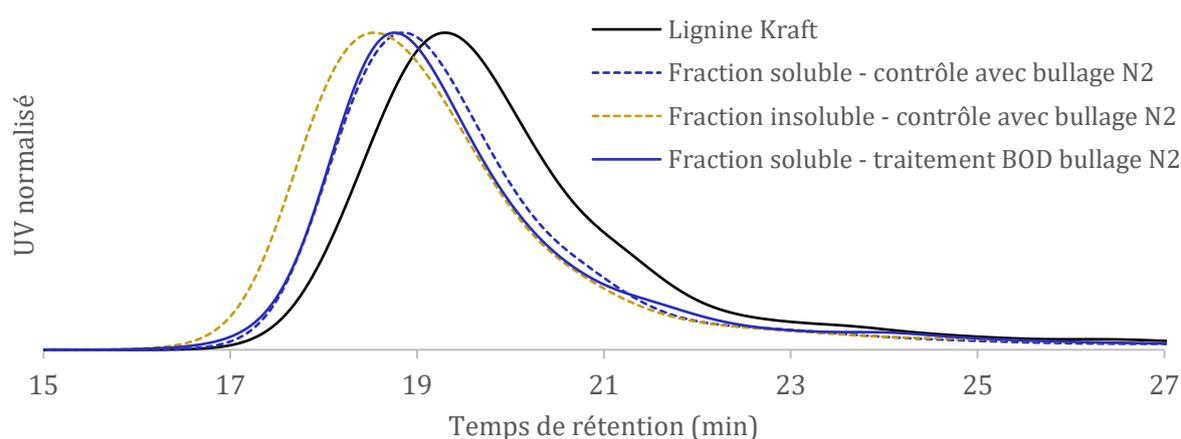


Figure V-16 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des fractions solubles issues des contrôles et du traitement BOD avec bullage d'azote.

Concernant le traitement enzymatique sous azote, 81 % de fraction soluble est produite. Les 19 % de fraction insoluble n'ont pas réussi à être solubilisés dans le NaOH aqueux à pH 12, pour être

analysés en SEC. La même augmentation de masse molaire est observée pour les deux fractions solubles obtenues sous azote, avec et sans BOD. Ainsi, en présence d'un bullage d'azote, l'ajout de BOD dans le milieu ne provoque pas d'augmentation de la masse molaire de la fraction soluble obtenue.

Il est possible d'en conclure que c'est l'action du bore présent dans le tampon borate qui est observée, comme discuté dans le Chapitre 4. Ce contrôle sous azote confirme le rôle crucial de l'oxygène pour que l'enzyme agisse sur la lignine Kraft.

II.3. Influence de la concentration massique en lignine

Pour le filage de fibres de carbone, le CRPP utilise une lignine soluble qui a été traitée à une concentration de 30 mg/mL. Une diminution de cette concentration a été effectuée, à 10 mg/mL, pour évaluer l'impact sur la fraction soluble formée. Les autres paramètres tels que la nature et la concentration du tampon, la température et le bullage d'oxygène ont été maintenus constants. Le Tableau V-7 récapitule les proportions de fraction soluble obtenues.

Tableau V-7 : Quantité de fractions solubles et insolubles produites en fonction de la concentration massique de lignine initiale.

[lignine] mg/mL	Fraction soluble – contrôle	Fraction soluble – traitement BOD
10	70 %	70 %
30	60 %	67 %

À une concentration de lignine de 10 mg/mL, la fraction soluble est identique dans le contrôle et en présence de la BOD, à 70 %. En revanche, à 30 mg/mL, le traitement enzymatique améliore la production de fraction soluble de 60 % dans le contrôle à 67 %. Cela suggère que, bien que le traitement enzymatique n'affecte pas la solubilité de la lignine à une concentration plus faible, il exerce un effet positif à une concentration plus élevée. Pour rappel, les fractions solubles obtenues sans enzyme ne sont pas filables pour l'obtention de fibres de carbone. Les analyses SEC en phase aqueuse à pH 12 montrent des profils semblables pour les deux contrôles et les deux traitements. Ainsi, les deux concentrations massiques initiales en lignine permettent d'obtenir des fractions solubles de mêmes masses molaires, dans des proportions similaires.

II.4. Influence de la quantité de BOD

Dans le cadre de l'étude de l'influence de la quantité d'enzyme dans le milieu, avec les autres paramètres maintenus constants, il a été observé que l'utilisation de 10 fois plus de BOD produit 70 % d'une fraction soluble identique à celle obtenue avec la quantité initiale de BOD. Les chromatogrammes SEC de ces deux fractions solubles sont représentés en Figure V-17, et il n'est

constaté aucune influence sur les masses molaires. En effet, les masses molaires des produits augmentent de manière similaire quelle que soit la quantité d'enzyme.

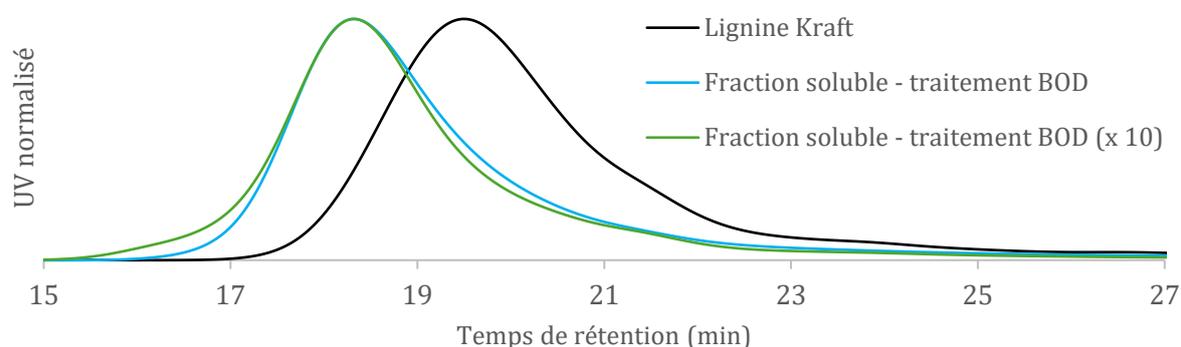


Figure V-17 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 montrant l'influence de la quantité d'enzyme sur les fractions solubles obtenues.

Ce résultat est surprenant, surtout en regard des observations du Chapitre 2, où une augmentation de la quantité de BOD avait montré un effet significatif sur la quantité de dimères produits. Cette absence d'effet suggère que la quantité d'enzyme utilisée initialement pourrait avoir atteint un seuil suffisant, voire maximal, pour traiter tous les sites réactifs de la lignine.

II.5. Influence de la présence d'un médiateur

Plusieurs articles ont effectué des criblages de médiateurs naturels pour améliorer les performances des laccases vis-à-vis de la lignine. Chen *et al.* ont examiné la dégradation enzymatique d'un modèle de liaison β -O-4 par la laccase en présence de médiateurs naturels (sous-unités syringyles de lignine) et de médiateur artificiel, tel l'ABTS. Ils ont montré que les médiateurs syringyles étaient plus efficaces pour accélérer le clivage β -O-4 et l'oxydation en position α que l'ABTS. [9] Camarero *et al.* ont identifié que les médiateurs naturels les plus efficaces pour la décoloration d'un colorant diazoïque étaient l'acétosyringone et le syringaldéhyde. [10]

Pour cette étude, le syringaldéhyde a été sélectionné comme médiateur afin d'évaluer son impact sur le traitement enzymatique de la lignine Kraft. Les fractions solubles et insolubles obtenues sont analysées par SEC aqueuse à pH 12, et les chromatogrammes obtenus sont représentés en Figure V-18.

La gamme de couleur bleu est utilisée pour le traitement classique, et la gamme de couleur rouge désigne les fractions solubles obtenues en présence de médiateur, à différents temps de réaction. En présence d'un médiateur, les signaux se déplacent beaucoup plus rapidement vers les faibles temps de rétention, indiquant une augmentation plus importante et plus rapide de la masse molaire. Au bout de 24 h, le volume hydrodynamique maximal est atteint, à un temps de rétention

de 18,7 minutes. D'après la calibration PSS cela correspond à une masse molaire en nombre $M_w = 13\ 000$ g/mol, et une dispersité de 13.

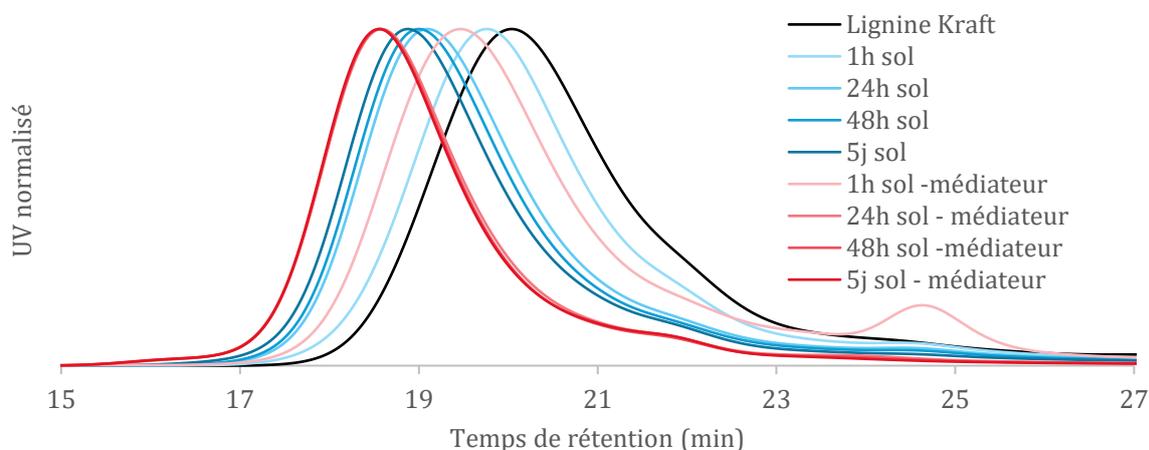


Figure V-18 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des fractions solubles obtenues à plusieurs temps de réaction, avec et sans médiateur.

Ainsi, le médiateur accélère la modification de la lignine en formant des polymères plus grands en 24 h. Ces résultats démontrent l'impact positif du médiateur sur l'action de l'enzyme dans le traitement de la lignine Kraft.

II.6. Influence de la concentration du tampon

Afin d'étudier l'impact de la concentration du tampon sur le traitement enzymatique de la lignine Kraft, la lignine a été traitée par la BOD dans deux concentrations de tampons borates à pH 10, avec un bullage d'oxygène, pendant 1 h, 24 h, 48 h, et 7 jours. Un tampon était classiquement concentré à 50 mM en acide borique, le second était concentré à 200 mM. Après le temps de réaction imparti, le mélange a été dialysé afin d'éliminer les sels et d'atteindre un pH neutre. Ensuite, il a été centrifugé et le surnageant soluble a été lyophilisé séparément du culot insoluble. L'évolution du pH du milieu réactionnel pendant la réaction et de la quantité de fraction soluble produite, pesée après séchage, est représentée en Figure V-19.

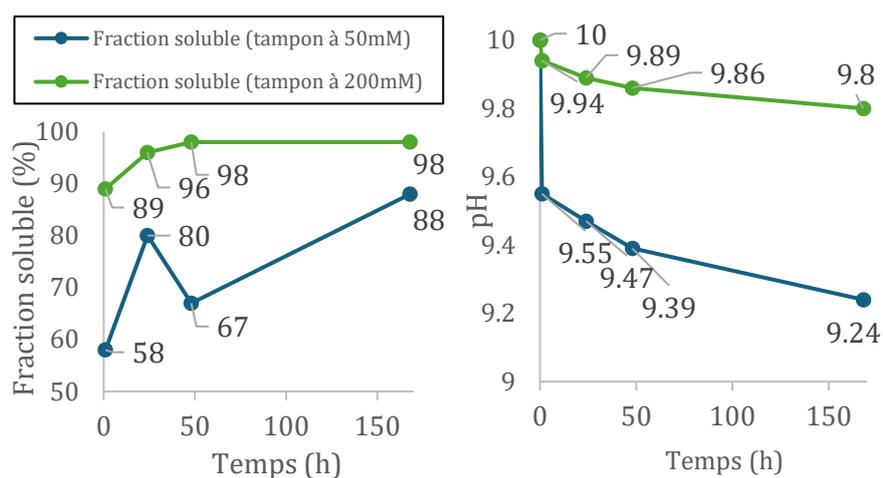


Figure V-19 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans deux tampons borate à pH 10 : un concentré à 50 mM et l'autre à 200 mM.

Les SEC en phase aqueuse à pH 12 de ces fractions ont été effectuées, et les chromatogrammes obtenus sont représentés en Figure V-20. Dans un tampon plus concentré en espèces bore (200 mM), le pH atteint des valeurs plus élevées lors du traitement. Les masses molaires des fractions solubles et insolubles semblent augmenter plus rapidement, mais au bout de 48 h elles sont moins hautes que dans le tampon borate à 50 mM.

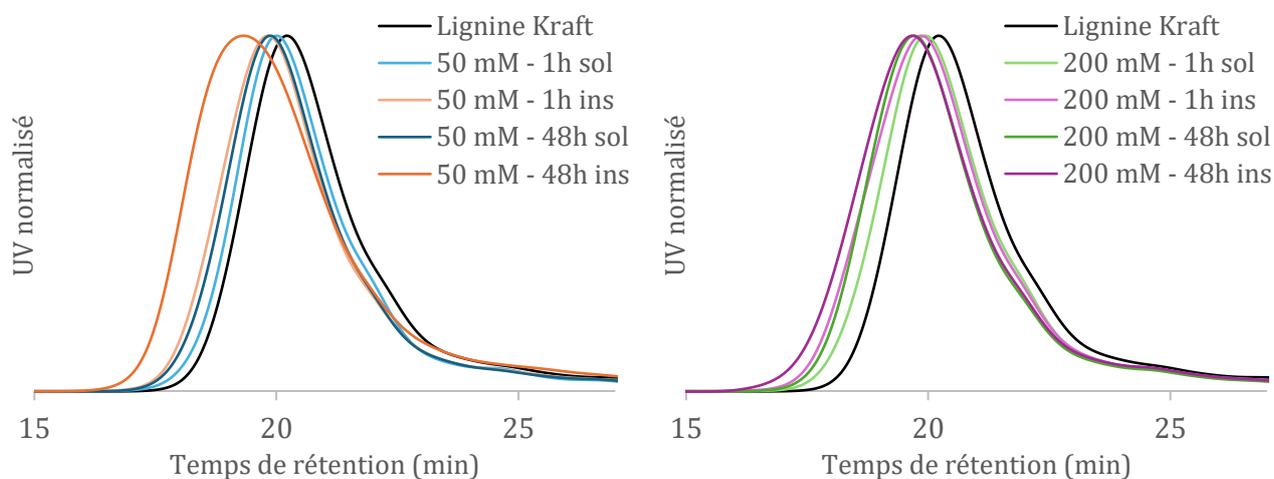


Figure V-20 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 des fractions obtenues au bout de 1 h et 48 h dans deux tampons borate à pH 10 de concentrations différentes.

Ainsi, l'utilisation d'un tampon plus concentré en espèce borates présente l'intérêt de produire une grande quantité de fraction soluble en peu de temps (96 % en 24 h). Ces fractions solubles montrent une masse molaire un peu inférieure que dans le tampon classique. De plus, dans la perspective d'une utilisation industrielle, l'emploi du bore est à proscrire pour des raisons de toxicité. C'est pourquoi le tampon borate le moins concentré est conservé pour la suite de l'étude.

II.7. Influence de la dialyse

Enfin, l'effet de la durée de la dialyse a été étudié, avec tous les autres paramètres maintenus constants : une concentration massique de lignine fixée à 30 mg/mL, un traitement effectué à température ambiante, et un bullage d'O₂. La taille des pores des membranes de dialyse est de 10 kDa. Un traitement enzymatique a été centrifugé et lyophilisé sans passer par aucune étape de dialyse. Un autre traitement enzymatique a subi une dialyse intensive pendant deux semaines, avec deux changements de dialysat chaque jour. La quantité des fractions solubles produites est présentée en Tableau V-8.

Tableau V-8 : Quantités de fractions solubles produites en fonction du temps de dialyse appliqué.

Fraction soluble – sans dialyse	73 %
Fraction soluble – dialyse classique	67 %
Fraction soluble – dialyse deux semaines	43 %

Les chromatogrammes en SEC aqueuse à pH 12 de ces fractions solubles sont comparés en Figure V-21.

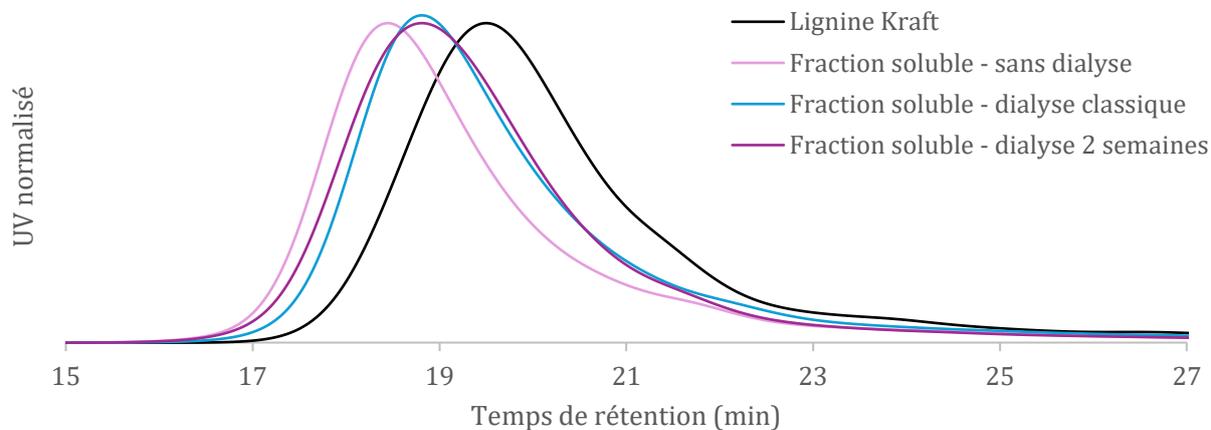


Figure V-21 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de fractions solubles ayant subi différents temps de dialyse.

Il est remarqué que la fraction soluble n'ayant pas subi de dialyse possède la plus haute masse molaire. Ensuite, les fractions solubles ayant subi une dialyse classique de 24 h avec deux changements de dialysat ainsi qu'une dialyse intensive de deux semaines présentent un profil similaire. Ainsi, il est suggéré que le maximum de sels présents en suspension aurait été éliminé après 24 h de passage à travers les pores de la membrane de dialyse. C'est donc cette méthode de 24 h qui sera conservée par la suite.

Une variation de la taille des pores de la membrane de dialyse a été effectuée pour évaluer son impact et s'assurer que la bonne gamme avait été choisie. Les résultats observés entre les membranes ayant des pores de taille 1 kDa et 10 kDa étaient similaires : les sels étaient éliminés tandis que la fraction contenant la lignine restait à l'intérieur de la poche. Cependant, lorsque des membranes avec des pores de taille 100 kDa étaient utilisées, le milieu réactionnel diffusait et fuyait dans le dialysat. Une photo illustrant ces fuites a été prise (Figure V-22). Elle montre les poches de dialyse et les dialysats d'un contrôle sans enzyme (à droite) et d'un traitement avec la BOD (à gauche) utilisant des membranes de pore de taille 100 kDa. Il est intéressant de remarquer que la fraction de lignine ayant subi le traitement enzymatique présente à l'œil nu moins de fuites que le contrôle. Le dialysat du bécher de gauche est en effet beaucoup moins coloré que celui du bécher de droite. Cela confirme les résultats de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), qui montrent une augmentation beaucoup plus marquée de la masse molaire ou du volume hydrodynamique pour la fraction traitée enzymatiquement par rapport à celle du contrôle.



Figure V-22 : Photographies de baignoires de dialyse. La poche du bécher de gauche contient une lignine traitée par la BOD tandis que la poche du bécher de droite contient un contrôle sans enzyme. Les poches de dialyse ont des pores de 100 kDa.

Finalement, des membranes de dialyse avec des pores de taille de 10 kDa ont été employées pour le reste des dialyses, pour des raisons de disponibilité.

II.8. Conclusion

Dans cette section, plusieurs paramètres influençant l'efficacité du traitement enzymatique de la lignine Kraft par la BOD ont été explorés afin de mieux comprendre son action. L'influence de la température a été examinée en premier, révélant que l'élévation à 60°C augmentait la solubilisation de la lignine sans altérer significativement sa structure, suggérant une action thermique plutôt qu'enzymatique. L'importance du flux d'oxygène a été mise en évidence par une expérience réalisée sous azote, confirmant que la présence d'oxygène est cruciale pour l'activité de la BOD. La concentration en lignine a également été étudiée, montrant que l'efficacité du

traitement enzymatique s'améliore à des concentrations plus élevées. De plus, il a été constaté que l'augmentation de la quantité de BOD utilisée atteint un plateau au-delà duquel aucun effet supplémentaire sur la structure de la lignine n'est observé. L'ajout d'un médiateur naturel a permis d'accélérer les réactions, produisant des lignines de plus grande taille en un temps réduit. Enfin, concernant le traitement du milieu réactionnel, la durée de la dialyse a été fixée à 24 h et les pores des membranes de dialyse à 10 kDa. L'ensemble de ces paramètres a été étudié afin de maximiser l'efficacité du traitement enzymatique tout en maintenant une approche de réflexion pour une potentielle application industrielle future.

III. Traitement dans d'autres tampons

Dans l'idée de s'affranchir des effets du bore présent dans le tampon utilisé initialement, des traitements enzymatiques ont été réalisés dans d'autres tampons : carbonate et ammoniacal à pH 10, et phosphate à pH 8. Ces résultats sont à mettre en relation avec les traitements contrôlés effectués dans la partie II.2 du chapitre 4. Il a été démontré qu'aucune augmentation de la masse molaire de la lignine n'était observée lorsqu'elle était solubilisée dans les différents tampons, à l'exception du tampon borate. Dans ce dernier, la présence d'espèces boratées permet la complexation des phénols présents dans la lignine, entraînant ainsi une augmentation de la masse molaire. Ici, l'étude de l'ajout de l'enzyme BOD sur la lignine solubilisée dans les différents tampons est étudiée.

III.1. Carbonate pH 10

La lignine Kraft a été traitée avec la BOD dans un tampon carbonate à pH 10 avec un bullage d'oxygène pendant 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours. Le mélange a été dialysé afin d'éliminer les sels et d'atteindre un pH neutre. Ensuite, il a été centrifugé et le surnageant soluble a été lyophilisé séparément du culot insoluble. L'évolution du pH du milieu réactionnel pendant la réaction et de la quantité de fraction soluble produite, pesée après séchage, est représentée en Figure V-23.

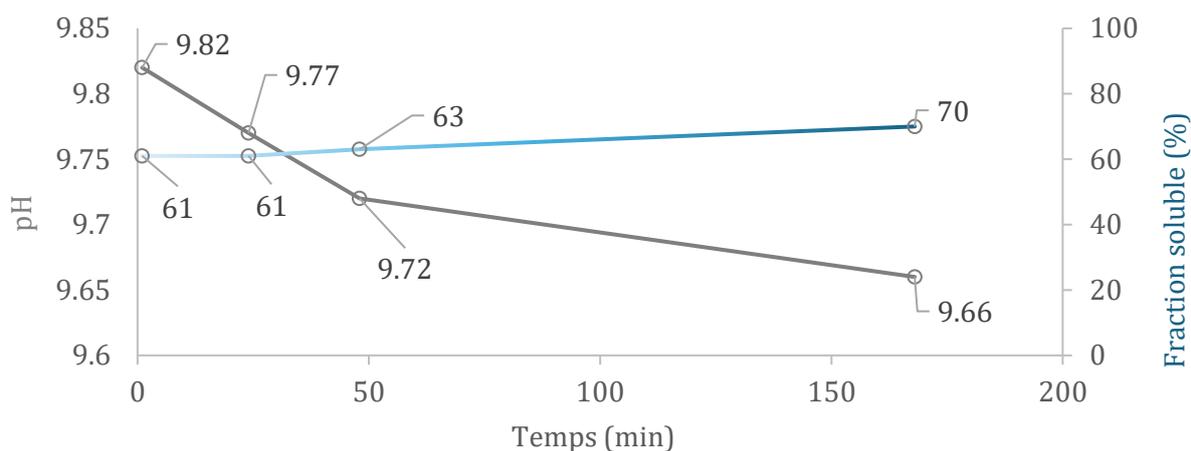


Figure V-23 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans un tampon carbonate à pH 10.

Le pH du milieu reste relativement constant, atteignant 9,66 après une semaine. La proportion de fraction soluble augmente progressivement, atteignant 70 % après 7 jours de réaction, sensiblement comme le contrôle (Figure IV-23).

Les chromatogrammes SEC des fractions solubles sont représentés en Figure V-24. Seules les fractions insolubles isolées après 1 h et 24 h de traitement enzymatique étaient solubles dans la soude aqueuse à pH 12 pour l'analyse SEC. Une nette augmentation des masses molaires est remarquée. La masse molaire augmente au cours du temps. Un plateau est atteint, à un temps de rétention d'environ 18 minutes. Il est possible de se demander si cette valeur de masse molaire apparente est la limite du système enzymatique ou de la solubilité limite des fractions de lignine dans la soude aqueuse à pH 12.

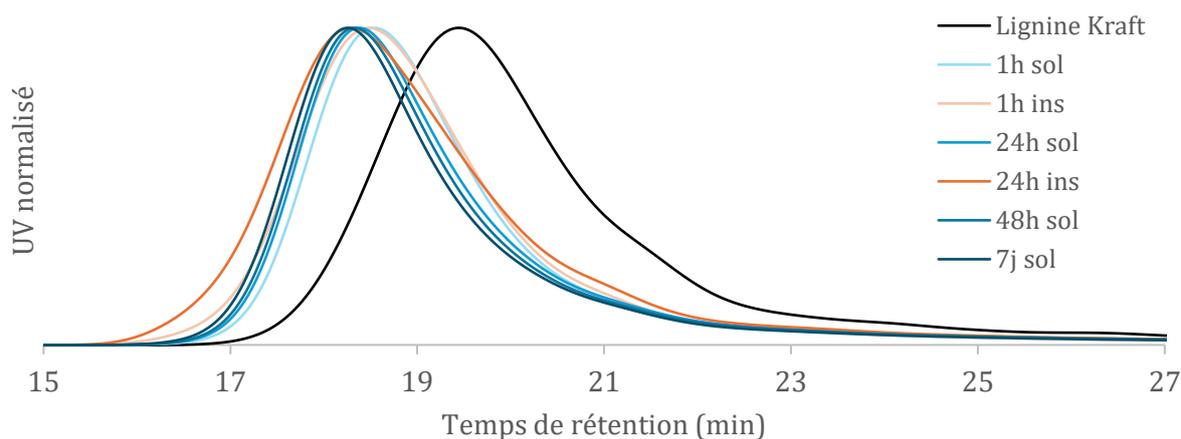


Figure V-24 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de fractions solubles issues du traitement avec la BOD dans le tampon phosphate à différents temps d'avancement.

Comparé aux solubilisations contrôles, où aucune modification des chromatogrammes SEC n'était observée, il apparaît clairement que la BOD induit une modification de la structure de la lignine Kraft, entraînant une augmentation significative de sa masse molaire.

Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir des spectres RMN-2D HSQC ni de RMN ^{31}P satisfaisants pour ces fractions solubles. Malgré l'optimisation du temps de relaxation D1 et une concentration élevée de lignine dans le DMSO- d_6 , les spectres obtenus présentent un bruit de fond important. Seuls les signaux du solvant deutéré et des groupes méthoxyles sont visibles.

III.2. Ammoniacal pH 10

La lignine Kraft a été traitée avec la BOD dans un tampon ammoniacal à pH 10 avec un bullage d'oxygène pendant 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours. Le mélange a été dialysé afin d'éliminer les sels et d'atteindre un pH neutre. Ensuite, il a été centrifugé et le surnageant soluble a été lyophilisé séparément du culot insoluble. L'évolution du pH du milieu réactionnel pendant la réaction et de la quantité de fraction soluble produite, pesée après séchage, est représentée en Figure V-25.

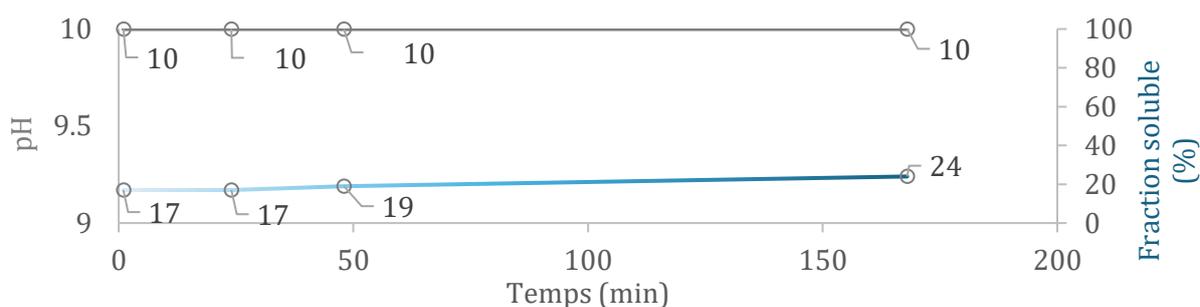


Figure V-25 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans un tampon ammoniacal à pH 10.

Le pH n'évolue pas et reste à 10 tout au long de la solubilisation. La quantité de fraction soluble produite augmente au cours du temps. En revanche, les valeurs atteintes sont très faibles : 24 % de fraction soluble après 7 jours de solubilisation, de la même manière que ce qui avait été obtenu lors du contrôle (Figure IV-27).

Les chromatogrammes des fractions solubles et insolubles obtenues sont représentés en Figure V-26.

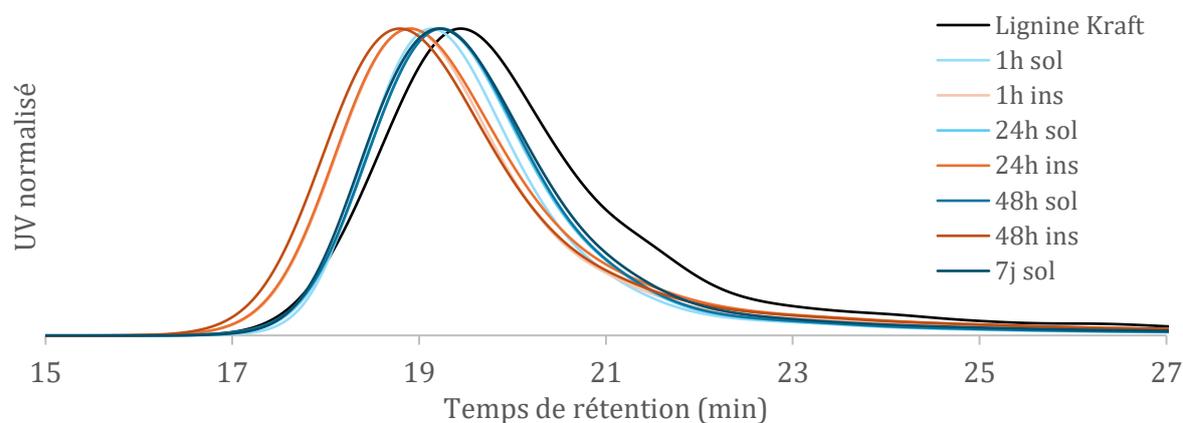


Figure V-26 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de fractions solubles issues du traitement avec la BOD dans le tampon ammoniacal à différents temps d'avancement.

Les volumes hydrodynamiques des fractions solubles et insolubles augmentent au cours du temps de réaction. L'augmentation observée est plus importante pour les fractions insolubles. Lors de la solubilisation contrôlée, les masses molaires des fractions solubles étaient confondues avec celle de la lignine Kraft de départ. Cela indique une fois de plus que la BOD a un effet également dans un tampon ammoniacal à pH 10. Cet effet est moindre sur les fractions solubles qui voient leurs masses molaires augmenter plus modestement que celles des fractions insolubles. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir des spectres RMN-2D HSQC ni de RMN ^{31}P satisfaisants pour les fractions obtenues.

III.3. Phosphate pH 8

La lignine Kraft a été traitée avec la BOD dans un tampon phosphate à pH 8 avec un bullage d'oxygène pendant 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours. Le mélange a été dialysé afin d'éliminer les sels et d'atteindre un pH neutre. Ensuite, il a été centrifugé et le surnageant soluble a été lyophilisé séparément du culot insoluble. L'évolution du pH du milieu réactionnel pendant la réaction et de la quantité de fraction soluble produite, pesée après séchage, est représentée en Figure V-27. Le pH observe une petite diminution au cours de la réaction, atteignant 7,88 après 7 jours. La quantité de fraction soluble produite augmente au cours du temps. En revanche, les valeurs atteintes sont faibles : 36 % de fraction soluble après 7 jours de solubilisation. Ce sont des valeurs inférieures à celles atteintes lors du contrôle (Figure IV-25).

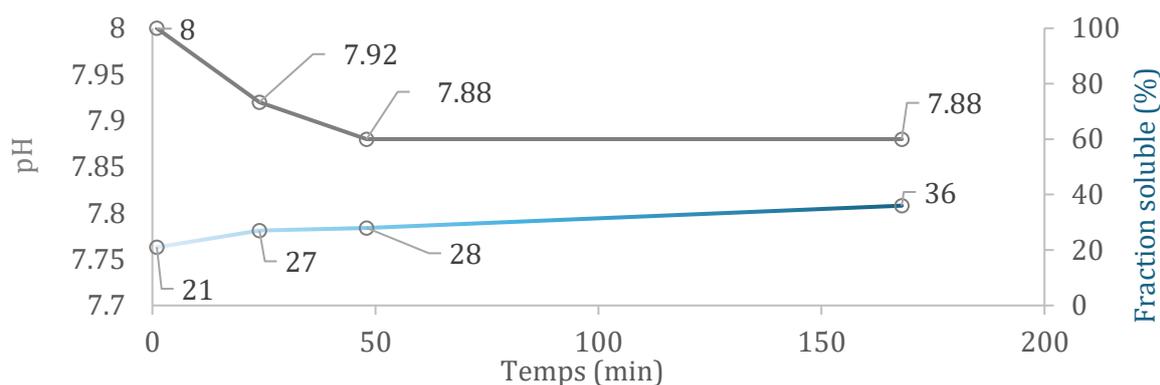


Figure V-27 : Évolution du pH et du taux de fraction soluble au cours du temps dans un tampon phosphate à pH 8.

Les chromatogrammes des fractions solubles et insolubles sont représentés en Figure V-28. Les masses molaires apparentes des fractions solubles augmentent considérablement avec le temps. Les fractions insolubles conservent le même ordre de grandeur que la lignine Kraft de départ. Cette forte augmentation est incontestablement due à l'action de l'enzyme, car les solubilisations contrôlées produisaient des fractions solubles de petites masses molaires. Les spectres RMN-2D HSQC des fractions obtenues étaient malheureusement très bruités et inexploitable.

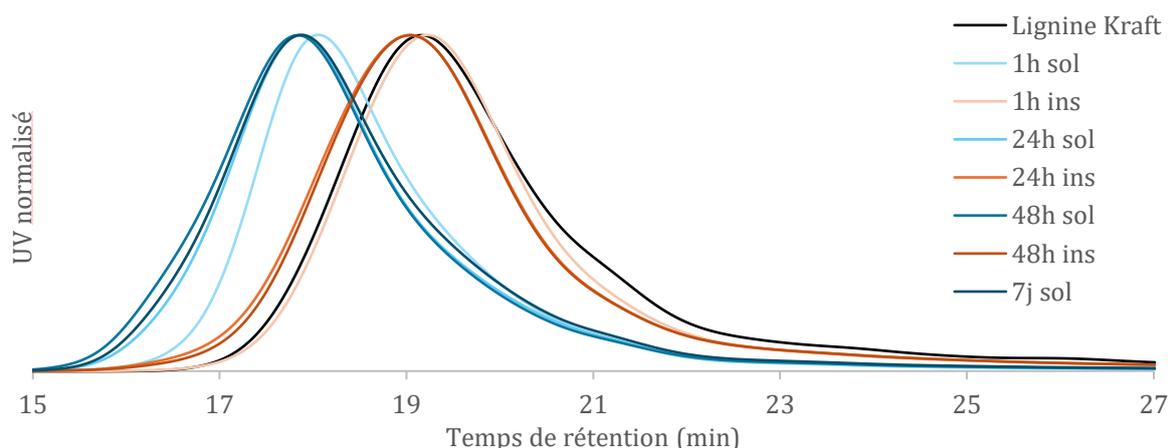


Figure V-28 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de fractions solubles issues du traitement avec la BOD dans le tampon phosphate à différents temps d'avancement.

III.4. Conclusion

En conclusion, il a été démontré que les traitements enzymatiques dans différents tampons, en l'occurrence, carbonate à pH 10, ammoniacal à pH 10 et phosphate à pH 8, entraînent une augmentation des masses molaires des fractions de lignine Kraft solubilisées, bien que l'ampleur de cet effet varie en fonction du tampon utilisé. Dans le tampon carbonate, une nette augmentation des masses molaires a été observée, suggérant un effet significatif de l'enzyme BOD sur la structure de la lignine. De même, le tampon ammoniacal à pH 10 a montré une augmentation des volumes hydrodynamiques des fractions solubles et insolubles, bien que cet effet soit plus marqué pour les fractions insolubles. Enfin, dans le tampon phosphate à pH 8, une augmentation des

masses molaires des fractions solubles a été observée, confirmant l'action de la BOD, contrairement aux solubilisations contrôles où aucune modification des masses molaires n'a été détectée. Ces résultats montrent que l'effet de la BOD sur la lignine Kraft est influencé par le pH et la nature du tampon, ouvrant la voie à des optimisations supplémentaires pour exploiter pleinement le potentiel de cette enzyme.

Le Tableau V-9 synthétise les résultats obtenus avec et sans BOD dans différents tampons. De manière générale, la quantité de fraction soluble obtenue est légèrement inférieure pour les fractions issues du traitement avec la BOD comparé au contrôle.

Tableau V-9 : Récapitulatif des quantités de fractions solubles produites par la solubilisation contrôle ou le traitement enzymatique par la BOD dans différents tampons.

Tampon	Contrôle Fraction soluble (%wt)	Avec BOD Fraction soluble (%wt)
Phosphate à pH 8	[34 – 47] %	[21 – 36] %
Carbonate à pH 10	[52 – 77] %	[61 – 70] %
Ammoniacal à pH 10	[7 – 25] %	[17 – 24] %
Borate à pH 10	[58 – 80] %	[52 – 80] %

Le tampon qui permet l'obtention de plus de fraction soluble est le tampon borate à pH 10. Il serait plus judicieux de travailler avec le tampon carbonate à pH 10, qui permet une augmentation des masses molaire en présence de BOD, mais qui n'induit pas la formation de complexes, comme il l'était observé avec le tampon borate. La présence de bore dans la fraction soluble qui sert de précurseur à des fibres de carbone pourrait être un frein à la commercialisation et à l'industrialisation du procédé exploité dans ce projet ANR. Des tests de filage de ces fractions solubles sont en cours par le partenaire du projet en charge des fibres de carbone.

IV. Étude d'une BOD désactivée

L'idée d'une interaction entre l'enzyme BOD et les substrats qu'elle modifie a déjà été étudiée dans le chapitre 2 (II.II.2.1). Il avait été montré grâce au spectre de dichroïsme circulaire qu'une altération structurale de la BOD pouvait avoir lieu, induite par son interaction avec le dimère formé. Il a été envisagé que la structure protéique de l'enzyme pourrait influencer les résultats observés quant au traitement de la lignine. En effet, cette enzyme, d'une masse de 60 kDa, reste probablement dans le surnageant en raison du protocole de traitement employé. Sa taille est trop importante pour qu'elle puisse passer à travers les pores des membranes de dialyse de 10 kDa. Par conséquent, l'enzyme se retrouverait dans la fraction soluble, en petite quantité (3 mg par g

de lignine). Afin d'évaluer l'impact de la structure protéique sur la lignine traitée, une BOD dont le centre actif T1 qui accepte les électrons du substrat a été désactivé a été produite. Elle est appelée BOD-T1d (pour BOD au centre T1 désactivé).

IV.1. Comparaison structurale des enzymes BOD et BOD-T1d

L'équipe du CRPP a produit cette enzyme en modifiant les acides aminés présents autour du cuivre du site T1. Il s'agit du mutant C492S. Dans ce mutant, la cystéine qui coordonne le T1 est changée en sérine afin d'empêcher le cuivre du T1 de se fixer. Ce centre déstabilisé ne permet plus d'effectuer correctement le transfert d'électrons. Ainsi, la BOD-T1d possède une activité enzymatique nulle pour l'oxydation de l'ABTS. La production biologique de ce mutant est détaillée dans un article publié par leur équipe. [11] Une analyse par spectroscopie de dichroïsme circulaire (Figure V-29) a montré que la BOD et la BOD-T1d partagent la même structure, indiquant que la déstabilisation du centre T1 n'a pas induit de réorganisation structurale de la protéine.

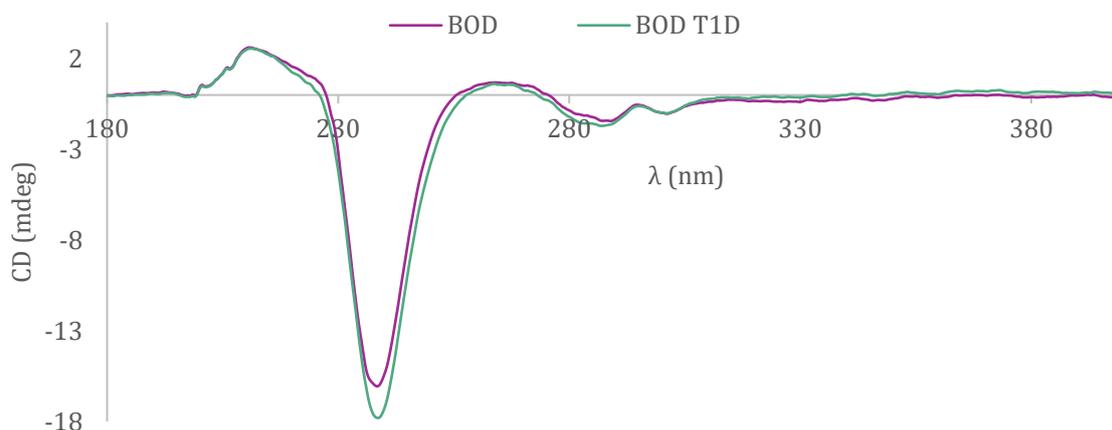


Figure V-29 : Spectres de dichroïsme circulaire de la BOD classique et de la BOD-T1d supposée inactive.

De plus, une analyse SDS-PAGE a révélé que la BOD et la BOD-T1d possèdent la même taille moléculaire (Annexe V-2).

Une étude préliminaire a été menée pour vérifier l'inactivité supposée de la BOD-T1d en utilisant la vanilline, un substrat phénolique modèle. Il a été observé une faible production de dimère, la divanilline, à hauteur de 3,5 %. Ces résultats suggèrent que bien que la structure globale de l'enzyme semble inchangée, la BOD-T1d possède effectivement une activité très réduite envers les substrats classiques de la BOD. Cependant, le transfert d'électrons au sein du centre actif de l'enzyme n'est pas complètement empêché, ce qui permet la production d'une petite quantité de radicaux, conduisant ainsi à la formation de dimères.

IV.2. Traitement de la lignine avec BOD-T1d

La comparaison de l'action de la BOD et de la BOD-T1d sur la lignine Kraft a été réalisée en tenant compte de deux critères principaux. D'une part, la quantité de fraction soluble produite a été mesurée dans des conditions identiques de solvant, d'oxygène, et de température. D'autre part, les masses molaires des fractions obtenues ont été évaluées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Le milieu réactionnel est dialysé, lyophilisé et centrifugé afin de séparer deux fractions distinctes : une fraction soluble et une fraction insoluble, dont les proportions sont présentées en Tableau V-10. Les quantités de fraction soluble produites sont similaires entre le traitement avec la BOD classiquement active et la BOD-T1d volontairement désactivée.

Tableau V-10 : Comparaison des quantités de fractions solubles et insolubles produites par la BOD et la BOD-T1d.

	Fraction soluble	Fraction insoluble
Traitement BOD dans tampon borate pH 10	70	30
Contrôle dans tampon borate pH 10	60	40
Traitement BOD-T1d dans tampon borate pH 10	70	30

Ces fractions ont également été analysées par SEC aqueuse à pH 12, et les chromatogrammes obtenus sont représentés en Figure V-30.

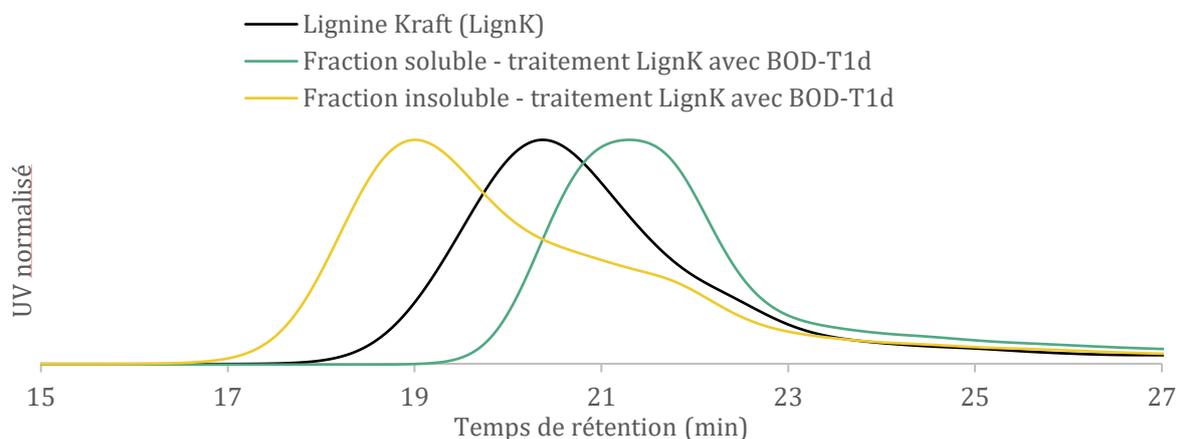


Figure V-30 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des fractions solubles et insolubles issues du traitement avec la BOD-T1d.

Il apparaît que les masses molaires de la fraction soluble augmentent significativement avec la BOD, et qu'elles diminuent avec la BOD-T1d dont le centre T1 est inactif. Les deux fractions solubles et insolubles post traitement avec la BOD-T1d ont été analysées en RMN-2D HSQC et aucune différence avec la lignine Kraft de départ n'est détectable.

La RMN quantitative du phosphore a été réalisée, et est présentée en Figure V-31. Une diminution des hydroxyles phénoliques est observée. A part une possible interaction entre les espèces borées qui pourraient ponter avec les phénols et ainsi les masquer en RMN du phosphore, ce résultat n'est pas expliqué à ce jour.

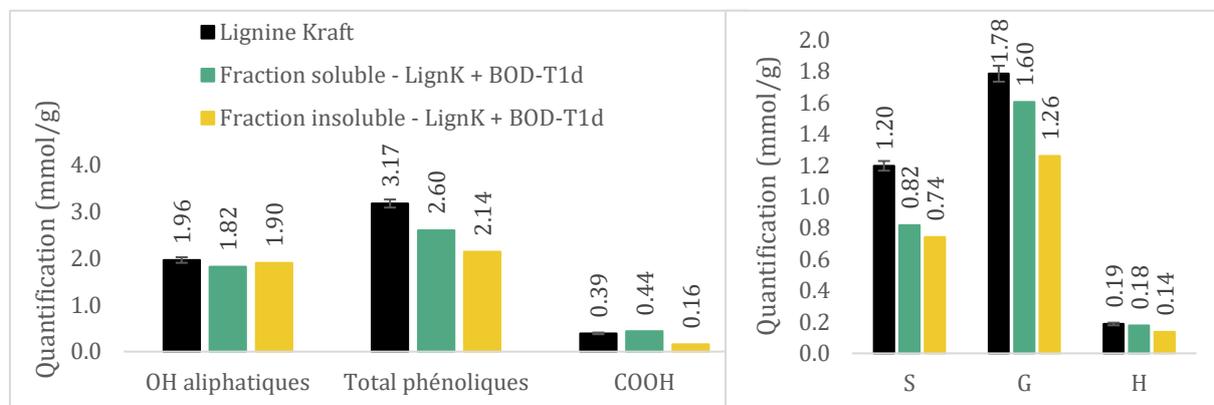


Figure V-31 : Quantification par RMN ³¹P des fonctions hydroxyles des fractions issues du traitement de la lignine Kraft avec la BOD-T1d.

Pour finir de tester l'hypothèse selon laquelle l'ajout d'une protéine de grande taille pourrait influencer la production d'une fraction soluble de lignine, une enzyme neutre, la BSA a été utilisée. Cette protéine est incapable de modifier les liaisons de la lignine. Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles appliquées avec la BOD, c'est-à-dire dans un tampon borate à pH 10, avec bullage d'oxygène et à température ambiante. Différentes quantités de BSA ont été introduites pour chaque g de lignine : soit 4 mg, soit 40 mg. Les chromatogrammes présentés en Figure V-32 montrent que le « traitement » de la lignine Kraft avec la BSA n'a aucun effet sur les masses molaires apparentes, à l'exception de l'augmentation classique due à la présence de bore dans le tampon.

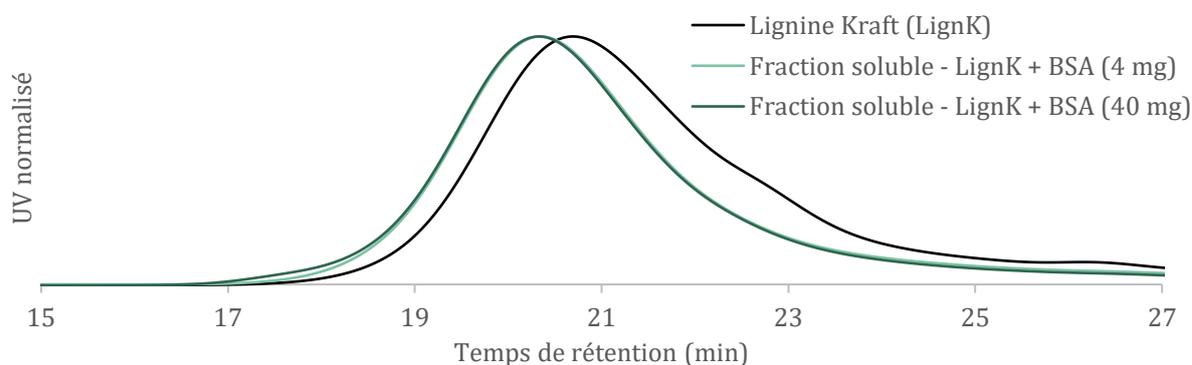


Figure V-32 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des fractions solubles issues du traitement avec l'albumine de sérum bovin (BSA).

En conclusion, bien que les résultats du traitement de la lignine Kraft avec une BOD-T1d rendue volontairement inactive ne soient pas encore entièrement compris, il a été démontré dans cette section que la seule action d'une protéine de grande taille ne suffit pas à produire une fraction de lignine soluble dans l'eau neutre et de haute masse molaire.

V. Traitement des fractions solubles obtenues

Dans l'optique de mieux comprendre l'action de la BOD sur la lignine Kraft, et afin d'exploiter les propriétés de solubilité des fractions obtenues, des traitements enzymatiques ont été conduits sur des fractions solubles.

Dans un premier temps, les fractions solubles des manipulations contrôle, c'est-à-dire sans enzyme, ont été confrontées à la BOD ou à la laccase. Dans un second temps, ce sont les fractions solubles d'un premier traitement enzymatique qui ont été à nouveau traitées. Les résultats et les analyses effectuées font l'objet de la partie suivante.

Dans cette partie, la fraction soluble du contrôle représente la fraction soluble obtenue après solubilisation de la lignine Kraft dans le tampon borate à pH 10. Elle représente 60 % de la lignine récupérée. Cette fraction soluble contrôle sera appelée « **Sol_contrôle** » dans la suite du paragraphe. La fraction soluble du traitement de la lignine Kraft par la BOD, largement étudiée et décrite au début de ce chapitre, sera appelée « **Sol_BOD** ».

V.1. Traitement des contrôles

V.1.1. Traitement contrôle de « Sol_contrôle »

Dans un premier temps, la fraction « Sol_contrôle » a été solubilisée à nouveau dans le tampon borate à pH 10, à température ambiante, avec un bullage d'oxygène pendant 16 h. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé pour éliminer les sels, centrifugé et lyophilisé. Il est obtenu 75 % de fraction soluble, et le reste de fraction insoluble. Ces fractions ont été analysées en SEC aqueuse à pH 12 et les chromatogrammes sont représentés en Figure V-33.

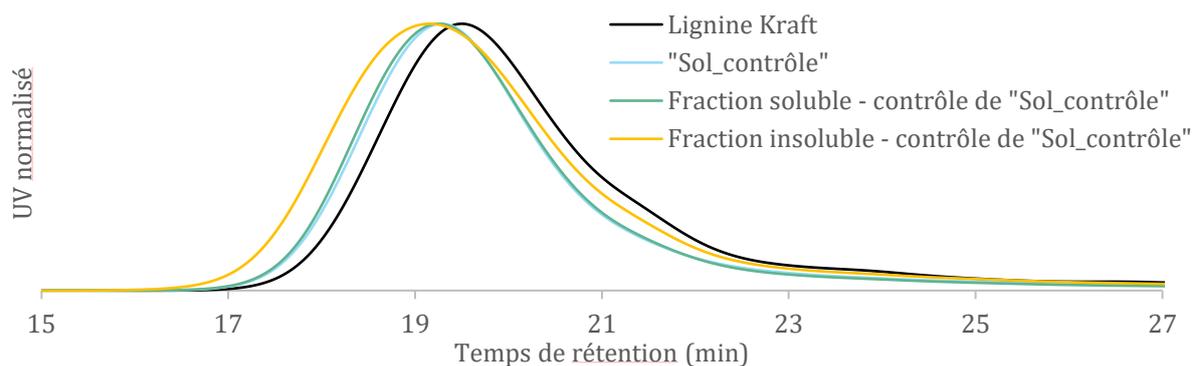


Figure V-33 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et des fractions solubles et insolubles issues de la solubilisation contrôlée de « Sol_contrôle ».

La fraction soluble semble avoir atteint une masse maximale après un premier traitement dans le tampon borate. En revanche, la fraction insoluble voit sa masse molaire légèrement augmenter lors d'un second passage dans le tampon. L'augmentation des masses molaires observée pourrait être attribuée soit à des conformations de chaînes différentes, qui modifient les volumes hydrodynamiques, soit à des associations ou répulsions entre molécules, qui altèrent les propriétés des objets en solution, voire aux deux phénomènes combinés.

V.1.2. Traitement de « Sol_contrôle » avec BOD

Cette même fraction « Sol_contrôle » a ensuite été solubilisée dans un tampon borate à pH 10 et la BOD a été ajoutée au milieu. La réaction a été conduite avec un bullage d'oxygène à température ambiante pendant 16 h. Le milieu réactionnel limpide a ensuite été dialysé, centrifugé et lyophilisé. Il a été obtenu 100 % d'une fraction soluble, dont le chromatogramme SEC en phase aqueuse à pH 12 est représenté en Figure V-34.

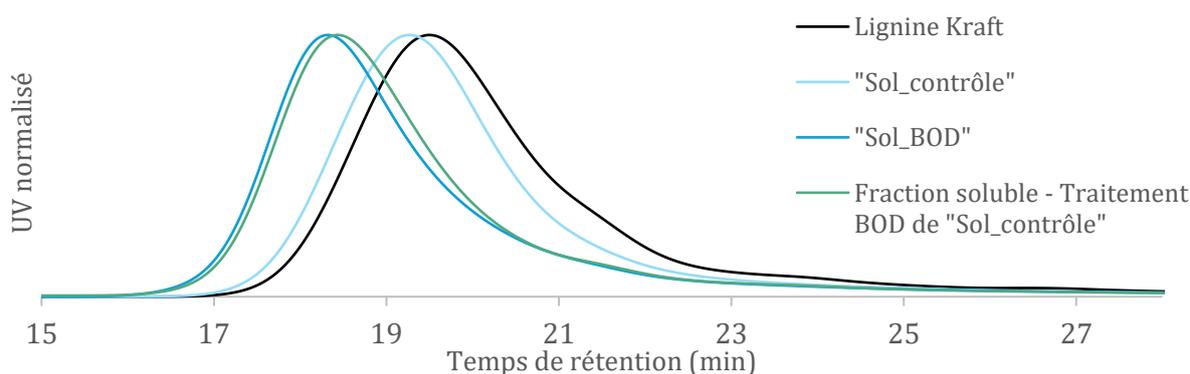


Figure V-34 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de la fraction soluble issue du traitement avec la BOD de « Sol_contrôle ».

Il est observé une augmentation du volume hydrodynamique de la fraction soluble issue du traitement avec la BOD de « Sol_contrôle ». Le chromatogramme de cette fraction soluble se confond quasiment avec celui du traitement BOD de la lignine Kraft : « Sol_BOD ». Ainsi, il est

montré que la BOD a la même action sur la lignine Kraft que sur « Sol_contrôle », qui possède une masse molaire de départ légèrement supérieure et qui contient à priori du bore dans sa structure.

V.1.3. Traitement de « Sol_contrôle » avec laccase

Cette fraction « Sol_contrôle » a ensuite été solubilisée dans un mélange tampon acétate à pH 5 / acétone (20 %v) et une laccase d'*Aspergillus sp.* a été ajoutée au milieu. La réaction a été conduite avec un bullage d'oxygène à température ambiante pendant 16 h. Il a été produit 84 % de fraction soluble et 16 % de fraction insoluble qui sont séparées par centrifugation et séchées par lyophilisation. Le chromatogramme SEC de la fraction soluble est représenté en Figure V-35. La fraction insoluble obtenue en quantité minoritaire n'était pas soluble dans la solution de soude à pH 12 pour procéder à l'analyse SEC.

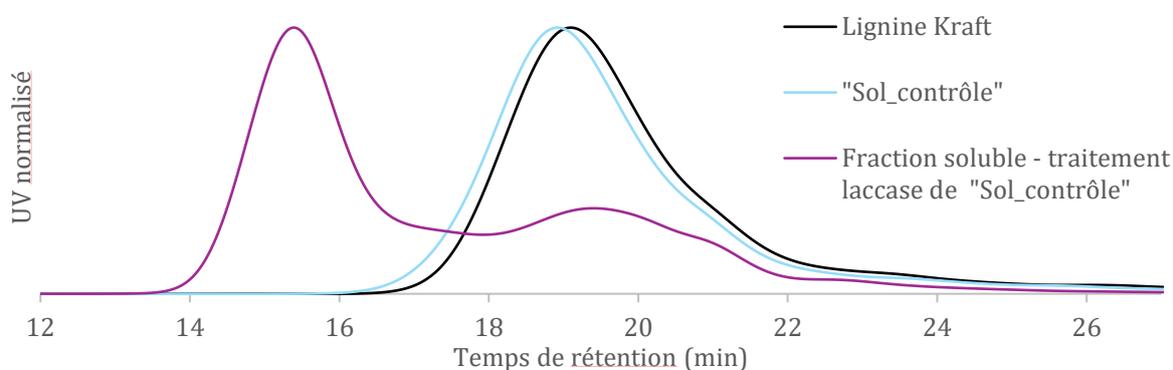


Figure V-35 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de la fraction soluble issue du traitement avec la laccase de « Sol_contrôle ».

Le volume hydrodynamique de la fraction soluble obtenue est largement augmenté, et son profil est bimodal, indiquant la présence de deux populations de molécules de tailles différentes. Comparée à la lignine Kraft initiale, la fraction soluble après traitement avec la laccase montre une première population avec un temps de rétention plus court, suggérant un couplage des chaînes. La seconde population correspond à une population de taille semblable à la lignine Kraft et à la fraction soluble du contrôle. Il avait été déterminé que l'augmentation de la masse molaire du contrôle était due à la formation de complexes de bore. Ici, il est montré que cette lignine complexée comportant du bore peut être polymérisée enzymatiquement par la laccase.

V.2. Retraitement des traitements

V.2.1. Traitement de « Sol_BOD » avec BOD

La fraction soluble issue du traitement enzymatique avec la BOD de la lignine Kraft, « Sol_BOD », est mélangée au tampon borate à pH 10, et la BOD est ajoutée. La réaction est conduite pendant 16 h, avec un bullage d'oxygène et à température ambiante. À la fin de la réaction le mélange

réactionnel est dialysé, centrifugé et lyophilisé. Il est obtenu 100 % d'une fraction soluble dont le chromatogramme de SEC en phase aqueuse à pH 12 est représenté en Figure V-36.

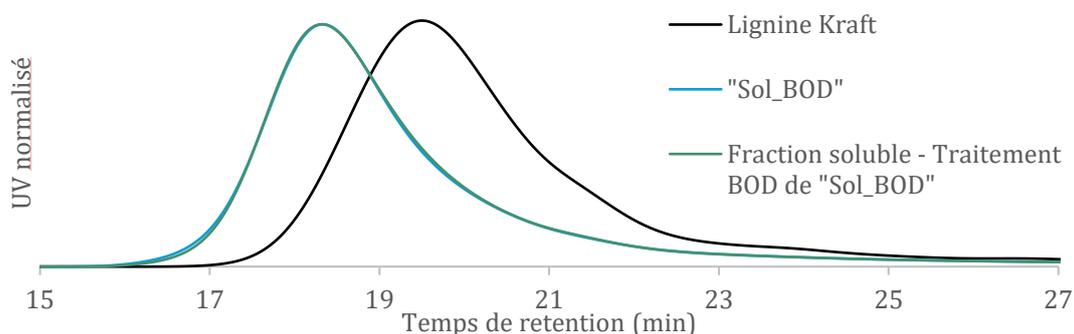


Figure V-36 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de la fraction soluble issue du traitement avec la BOD de « Sol_BOD ».

Les traces SEC des deux fractions solubles se superposent, indiquant l'absence d'effet supplémentaire de la BOD. Des masses molaires « plafond » semblent avoir été atteintes dès le premier traitement enzymatique avec la BOD, c'est-à-dire que tout ce qui pouvait être modifié l'a été lors du premier traitement et qu'il ne reste plus de sites où l'enzyme peut agir.

V.2.1. Traitement de « Sol_BOD » avec laccase

La fraction soluble issue du traitement enzymatique avec la BOD de la lignine Kraft, « Sol_BOD », est mélangée à un tampon acétate à pH 5, et la laccase est ajoutée. La réaction est conduite pendant 16 h, avec un bullage d'oxygène et à température ambiante. Il est obtenu 54 % d'une fraction

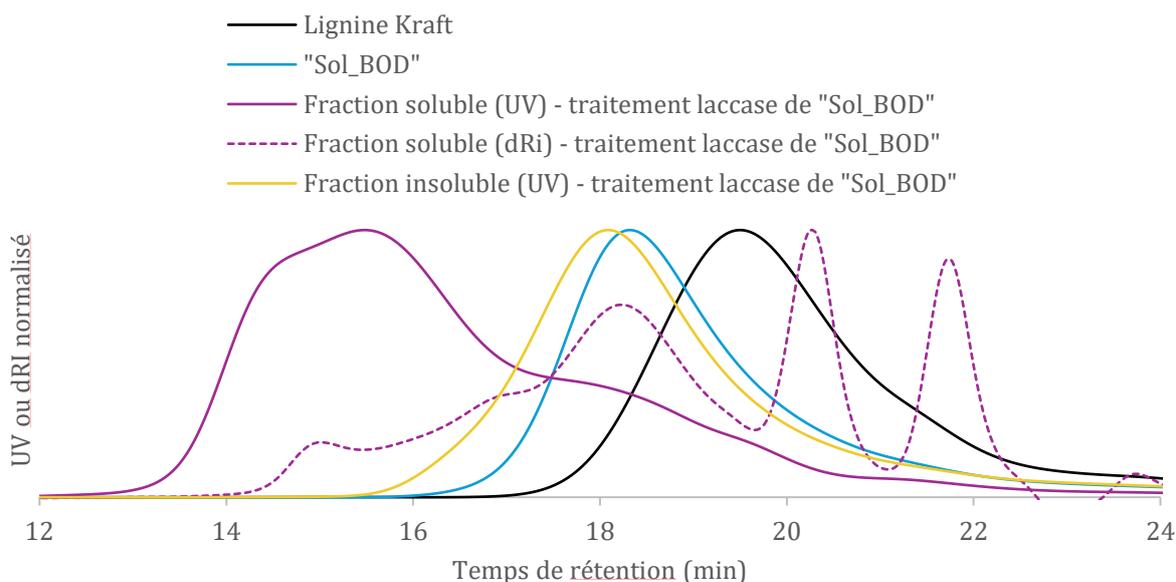


Figure V-37 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignine Kraft et de la fraction soluble issue du traitement avec la laccase de « Sol_BOD ».

soluble et 46 % de fraction insoluble dont les chromatogrammes de SEC en phase aqueuse sont représentés en Figure V-37.

La fraction insoluble possède une masse molaire légèrement plus élevée que la lignine « Sol_BOD » de départ. En revanche, une très grande augmentation de la masse molaire de la fraction soluble obtenue est observée en détection UV. La trace dRi de cette fraction a été également représentée (en pointillés sur le graphique), car elle est proportionnelle à la quantité des espèces présentes dans le milieu. Un tout autre profil est observé : une population de haute masse molaire non majoritaire et au moins quatre autres populations de plus faible masse molaire. Il semble intrigant que des petits fragments soient détectés en dRi et non en UV, révélant leur caractère non aromatique. Ainsi, la laccase aurait un effet à la fois de couplage et de dépolymérisation en molécule non-aromatiques sur « Sol_BOD ».

V.3. Conclusion

Cette section avait pour but de traiter une deuxième fois des fractions solubles issues d'un contrôle dans un tampon ou d'un traitement enzymatique. La BOD a permis de polymériser la fraction « Sol_contrôle » quasiment de la même manière qu'elle avait polymérisé la lignine Kraft. Cependant, le traitement d'une fraction soluble déjà traitée par la BOD donne le même résultat : la BOD a effectué tout le travail possible dès le premier traitement enzymatique.

Le traitement de « Sol_contrôle » et de « Sol_BOD » avec la laccase a montré que de très hautes masses molaires pouvaient être atteintes. Il a également été observé un double phénomène de couplage/dépolymérisation lors du traitement de « Sol_BOD » avec la laccase. Ainsi, le passage de la lignine Kraft dans le tampon borate, avec ou sans enzyme, permet d'obtenir une fraction soluble qui semble pouvoir être particulièrement bien polymérisée par une laccase par la suite.

VI. Traitement enzymatique d'une lignosulfonate de sodium

Une lignosulfonate de sodium a été traitée par la BOD. Elle a été fournie par la bioraffinerie RYAM et vient du site de production de Tartas, en France. C'est une lignine de résineux, issue des pins maritimes de la région, appelée ARBO® N18. Son traitement enzymatique a été réalisé dans un tampon carbonate à pH 10 afin de s'affranchir de l'effet complexant du bore pour cette étude.

VI.1.1. Traitement de la lignosulfonate avec la BOD

La lignosulfonate de sodium a été dans un premier temps traitée avec la BOD. Il a été obtenu 100 % de fraction soluble, dont le chromatogramme en SEC aqueuse à pH 12 est représenté en Figure V-38. Aucune augmentation notable de la masse molaire n'est observée. L'examen du signal dRi indique même une tendance à la dépolymérisation.

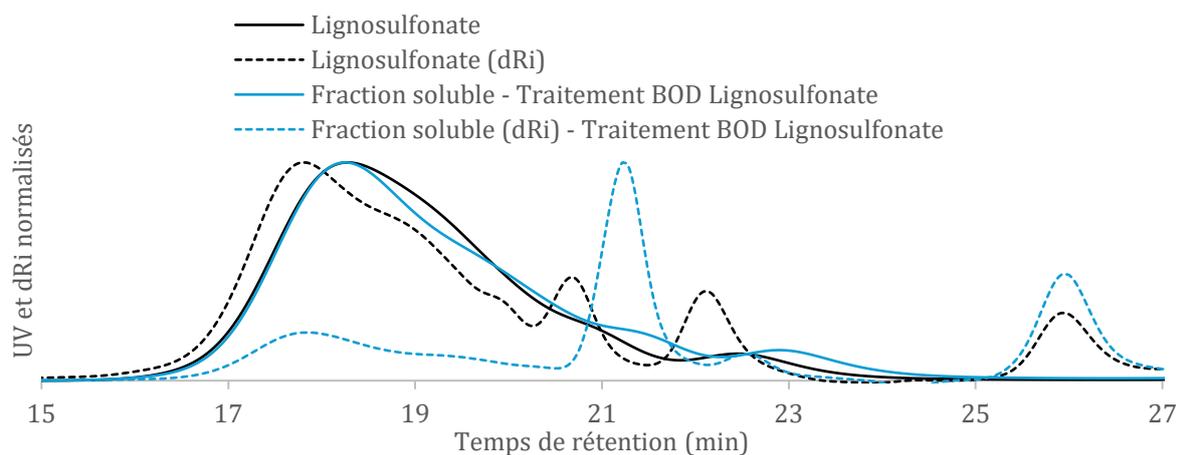


Figure V-38 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignosulfonate et de la fraction soluble issue de son traitement enzymatique avec la BOD.

La RMN quantitative du phosphore a été exclue, car il n'a pas été possible d'obtenir les spectres de la lignosulfonates de départ. En effet, il est connu que l'analyse par RMN du phosphore des lignosulfonates présente des défis en raison de problèmes de solubilité dans les systèmes de solvants couramment utilisés. [13] Il est conclu que la BOD semble ne pas modifier la lignosulfonate de sodium.

VI.1.2. Traitement du lignosulfonate avec la laccase

Le traitement des lignosulfonates avec des laccases est connu dans la littérature, et il donne lieu à une polymérisation. Gellerstedt *et al.* ont notamment montré des augmentations de masse molaire de l'ordre de 500 % en présence de HBT comme médiateur. [14, 15] Ici, le lignosulfonate de sodium étudié a été solubilisé dans un mélange de tampon acétate à pH 5 et d'acétone (20 %v), et la laccase d'*Aspergillus sp.* a été ajoutée au milieu. Après 16 h de réaction à température ambiante avec un bullage d'oxygène, l'acétone a été éliminé du milieu, qui a ensuite été centrifugé et lyophilisé. Il a été obtenu 100 % d'une fraction soluble dont le chromatogramme en SEC soude est représenté en Figure V-39.

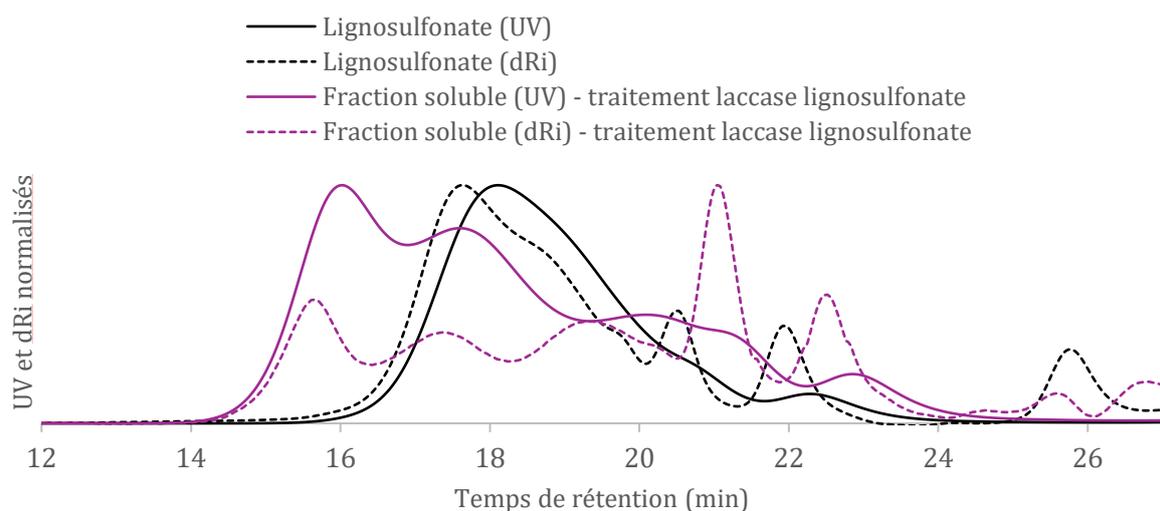


Figure V-39 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 de la lignosulfonate et de la fraction soluble issue de son traitement enzymatique avec la laccase.

La fraction soluble obtenue présente un pic élargi et décalé vers des temps de rétention plus petits, indiquant une augmentation notable des masses molaires après traitement avec la laccase. Cette augmentation suggère que la laccase a induit un couplage lignosulfonate, formant ainsi des polymères de plus haute masse molaire. Des populations de plus petites tailles sont également détectées. L'usage d'un médiateur n'a pas été testé dans cette étude, et pourrait amplifier l'action de la laccase.

Pour conclure, cette partie a montré que la BOD n'avait pas d'effet sur une lignosulfonate de sodium, contrairement à la laccase qui permet sa polymérisation. Ce résultat met en évidence une distinction intéressante entre les actions des deux enzymes, chacune ayant ou non une influence sur des substrats spécifiques.

VII. Réaction de Dakin sur la lignine Kraft et traitements enzymatiques

La réaction de Dakin, classiquement utilisée en chimie pour effectuer la coupure oxydante de composés aromatiques en milieu basique et en présence de peroxyde d'hydrogène, peut être appliquée pour dépolymériser la lignine après son oxydation. Traditionnellement, cette réaction est conduite pour cliver les liaisons entre les unités phénoliques de la lignine et créer des acides carboxyliques ou des phénols. [16, 17]

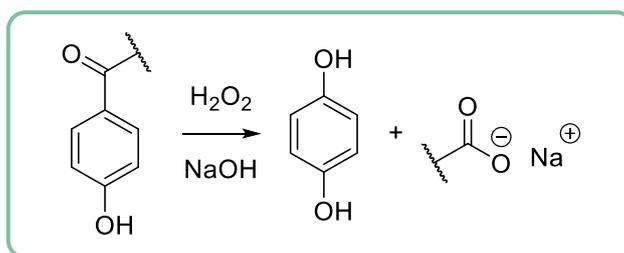


Figure V-41 : Oxydation de Dakin

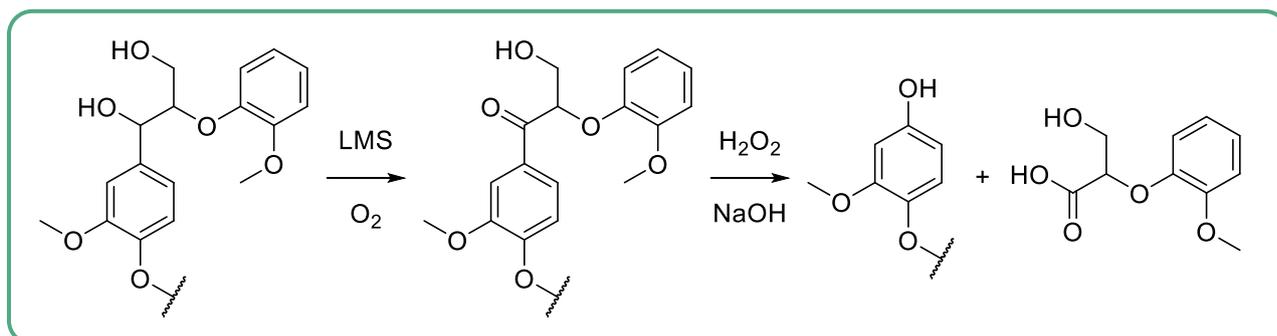


Figure V-40 : Stratégie de dépolymérisation de la lignine : oxydation enzymatique grâce au système laccase-médiateur puis coupure oxydante de Dakin milieu basique

Dans le contexte de notre projet, l'oxydation préalable pourrait avoir été réalisée par voie enzymatique grâce à la BOD.

VII.1. Dakin puis BOD

Dans un premier temps, la réaction de Dakin a été conduite sur la lignine Kraft brute. Une diminution du volume hydrodynamique a été observée en SEC phase aqueuse à pH 12 (chromatogramme violet de la Figure V-42).

Un contrôle a été effectué : la fraction issue de la réaction de Dakin de la lignine Kraft a été solubilisée dans le tampon borate à pH 10 à température ambiante avec bullage d'oxygène pendant 16 h. L'entièreté du produit de la réaction était soluble, il a été dialysé, centrifugé et lyophilisé. Cette fraction est ensuite analysée par chromatographie d'exclusion stérique et ne montre aucune différence de volume hydrodynamique avec la lignine de départ.

Cette même fraction issue du traitement Dakin de la lignine Kraft a ensuite été solubilisée dans le tampon borate à pH 10 et traitée avec la BOD, à température ambiante, avec bullage d'oxygène pendant 16 h. L'entièreté du produit de la réaction était soluble, il a été dialysé, centrifugé et lyophilisé. Cette fraction est ensuite analysée par chromatographie d'exclusion stérique. Ces premiers résultats montrent que la réaction de Dakin sur la lignine Kraft permet d'obtenir des lignines de plus petite taille, avec un temps de rétention passant de 20,5 à 21,2 minutes.

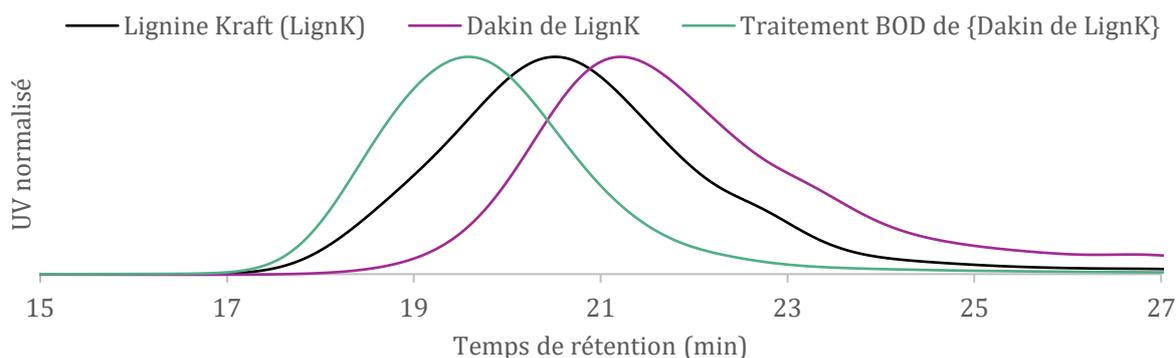


Figure V-42 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 du produit de la réaction de Dakin sur la lignine Kraft, puis du produit de cette lignine modifiée traitée avec la BOD.

Lorsque cette lignine modifiée, composée de chaînes plus courtes, est soumise à un traitement avec la BOD, les masses molaires augmentent de nouveau, atteignant des valeurs supérieures à celles de la lignine Kraft initiale. Cette observation confirme que la BOD possède la capacité de coupler les fragments de lignine, même après leur dégradation.

Des analyses de spectroscopie RMN quantitative du phosphore ont été réalisées et sont présentées en Figure V-43.

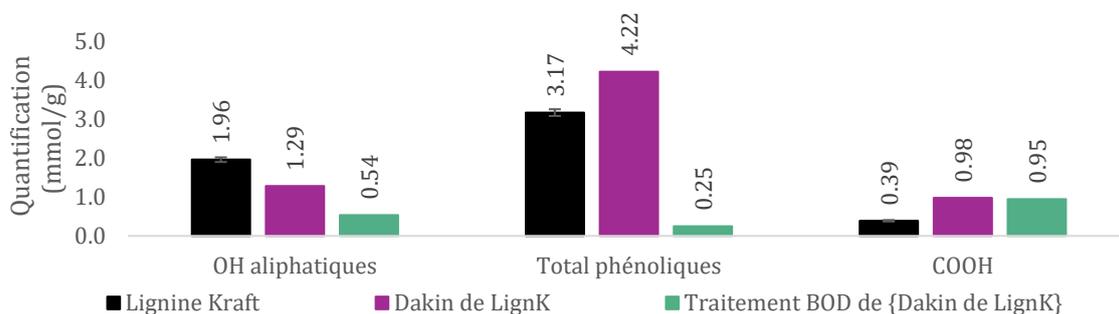


Figure V-43 : Quantification par RMN ^{31}P des fonctions hydroxyles du traitement Dakin de la lignine Kraft et de son traitement avec la BOD.

Il est intéressant de constater que le traitement de Dakin de la lignine Kraft (violet) a provoqué une diminution du taux des hydroxyles aliphatiques en parallèle d'une augmentation du taux de phénols et d'acides carboxyliques. Ces observations sont en accord avec la réaction de Dakin présentée en Figure V-41. Dans un second temps, la fraction issue du traitement enzymatique avec

la BOD de la lignine ayant subi la réaction de Dakin (vert) montre une diminution supplémentaire des hydroxyles aliphatiques, une quasi disparition des phénols et une quantité d'acides carboxyliques constante. Cette observation est cohérente avec les profils de SEC observés. En effet, la BOD procède à un couplage 5-5' qui entraîne la diminution des OH aliphatiques, et un couplage Ar-O-Ar qui provoque la diminution des OH phénoliques.

VII.2. BOD puis Dakin

Dans un second temps, la réaction de Dakin a été conduite sur la fraction soluble du traitement enzymatique de la lignine Kraft. Les chromatogrammes de ces différentes lignines sont présentés en Figure V-44.

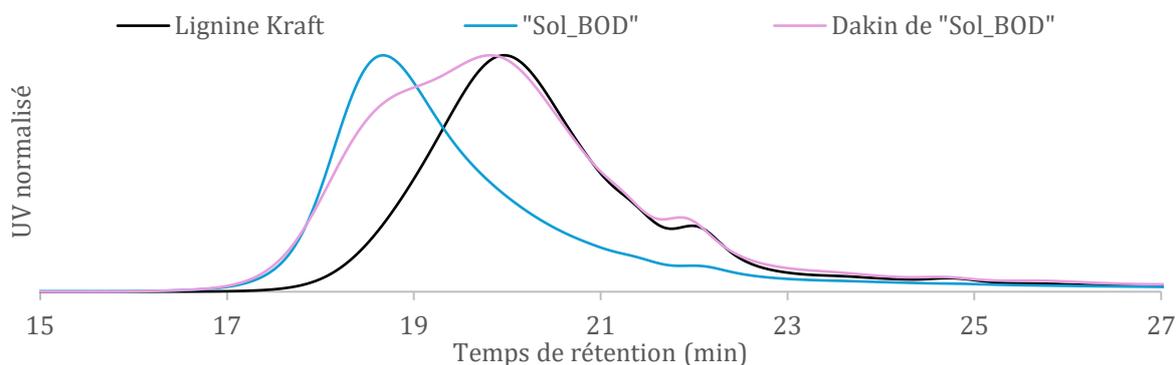


Figure V-44 : Chromatogrammes SEC en phase aqueuse à pH 12 du produit de la réaction de Dakin sur la lignine soluble issue du traitement enzymatique de la lignine Kraft avec la BOD.

Après l'augmentation de la masse molaire due à l'action de la BOD sur la lignine Kraft (« Sol_BOD »), la réaction de Dakin provoque une diminution de ces masses molaires (Dakin de « Sol_BOD »). Un profil bimodal est observé, suggérant qu'une partie de la lignine retrouve des masses molaires similaires à celles de la lignine Kraft initiale, mais sans revenir complètement à son état de départ.

Des analyses de spectroscopie RMN quantitative du phosphore ont été réalisées et sont présentées en Figure V-45. Le taux d'hydroxyles aliphatiques est constant. En revanche, il est observé une chute de la quantité de phénols et une augmentation des fonctions acides carboxyliques. C'est un résultat qui n'est pas cohérent avec la réaction de Dakin qui devrait théoriquement produire une quantité égale de OH phénoliques et de COOH. Une explication possible serait que la coupure de Dakin se fasse correctement dans un premier temps, scindant une unité oxydée en une unité phénolique et une unité COOH. Les masses molaires auraient donc tendance à diminuer. Dans un second temps, du bore encore présent dans le milieu réactionnel pour une raison encore inconnue, ponterait alors les phénols formés. Ainsi, les phénols engagés ne sont plus visibles en RMN du phosphore et les masses molaires augmentent à nouveau.

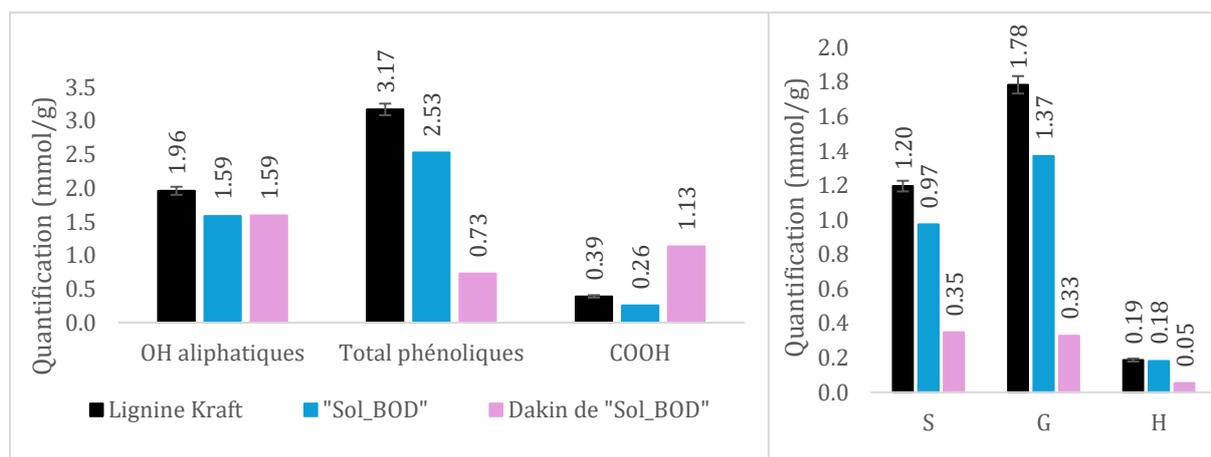


Figure V-45 : Quantification par RMN 31P des fonctions hydroxyles du traitement Dakin de « Sol_BOD ».

Il serait pertinent de reproduire cette expérience sur des lignines traitées avec d'autres tampons pour éliminer l'influence des ponts borates et ainsi mieux comprendre les mécanismes en jeu.

VIII. Tentative de fractionnement de la lignine Kraft

Une méthode couramment employée pour obtenir des fractions de lignine avec des propriétés de solubilité, de taille de chaîne et de polydispersité spécifiques est le fractionnement. Le fractionnement d'une lignine en plusieurs populations de caractéristiques différentes peut être de plusieurs natures : par variation de pH [18, 19], par ultrafiltration [20, 21], ou par extraction avec des solvants organiques. Cette dernière méthode a été retenue pour cette partie en raison de sa sélectivité et de sa simplicité de mise en œuvre.

Le fractionnement par extraction implique la dissolution d'une lignine technique dans un ou plusieurs solvants organiques, suivi de la séparation du surnageant et du culot, et la répétition de ce processus pour affiner progressivement la composition du surnageant. Cette séparation est dictée par deux facteurs principaux : la taille des molécules de lignine et leur fonctionnalité, qui influencent tous deux la solubilité de la lignine dans un solvant donné.

Un protocole, développé dans notre équipe, a été mis en œuvre en utilisant l'eau et l'acétone comme solvants. [22] Celui-ci n'a pas été optimisé, car l'objectif était simplement de vérifier si une fraction soluble de lignine Kraft Indulin AT pouvait être obtenue dans l'eau. Il est présenté en Figure V-46. Ainsi, plusieurs solubilisations successives de la lignine Kraft ont été effectuées : une première dans un mélange eau/acétone (50/50) qui a permis d'obtenir 65 % de fraction soluble. Après évaporation de l'acétone, de l'eau a été ajoutée et après élimination du culot centrifugé, une fraction de lignine Kraft soluble dans l'eau est obtenue (27% par rapport à la quantité de lignine de départ). Elle est appelée LignK_sol.



Figure V-46 : Protocole suivi pour l'obtention d'une fraction soluble de lignine Kraft par fractionnement.

Cependant, après lyophilisation, la poudre extraite de LignK_sol n'est plus soluble dans l'eau. Cela pourrait être dû à une agrégation irréversible des particules de lignine lors de l'étape de lyophilisation. En effet, lors de la lyophilisation, l'eau est retirée du système par sublimation, ce qui peut entraîner une réorganisation des molécules de lignine. En l'absence de solvant, les molécules de lignine peuvent se rapprocher et interagir davantage entre elles *via* des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des forces de van der Waals. Cette réorganisation peut conduire à la formation d'agrégats ou d'une structure plus compacte et plus cristalline rendant l'accès des molécules d'eau à la structure de la lignine difficile, et rendant ainsi la poudre obtenue après lyophilisation insoluble.

Les différentes fractions isolées ont été analysées par SEC en phase aqueuse à pH 12 et leurs chromatogrammes sont représentés en Figure V-47. La fraction soluble obtenue possède à peu près le même profil que la lignine Kraft de départ.

Il est à noter que plusieurs lots de lignine soluble fractionnée ont été réalisés, provoquant une variation des profils SEC de cette « LignK_sol » dans les prochains paragraphes.

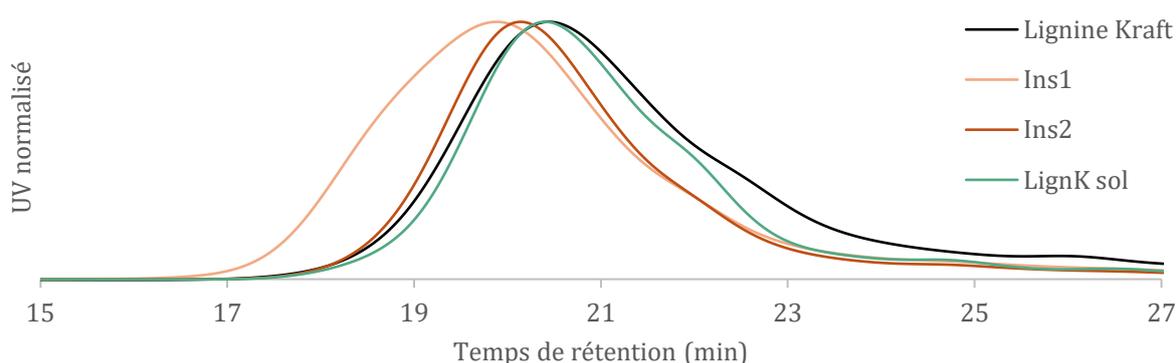


Figure V-47 : Chromatogrammes de SEC en phase aqueuse à pH 12 des différentes fractions issues du fractionnement de la lignine Kraft.

Les fractions insolubles, en particulier la première fraction insoluble « ins1 » présentent des masses molaires augmentées.

Une analyse par spectroscopie RMN du phosphore est réalisée et présentée en Figure V-48. La fraction soluble « LignK_sol » présente un taux d'hydroxyles aliphatiques égal à celui de la lignine Kraft. En revanche, son taux d'hydroxyles phénoliques diminue de 3,17 à 2,85 mmol/g et celui d'acide carboxylique augmente de 0,39 à 0,57 mmol/g. Le fractionnement semble donc avoir été effectué par une sélection des fonctions, aboutissant à une fraction soluble faiblement enrichie en acides carboxyliques hydrophiles.

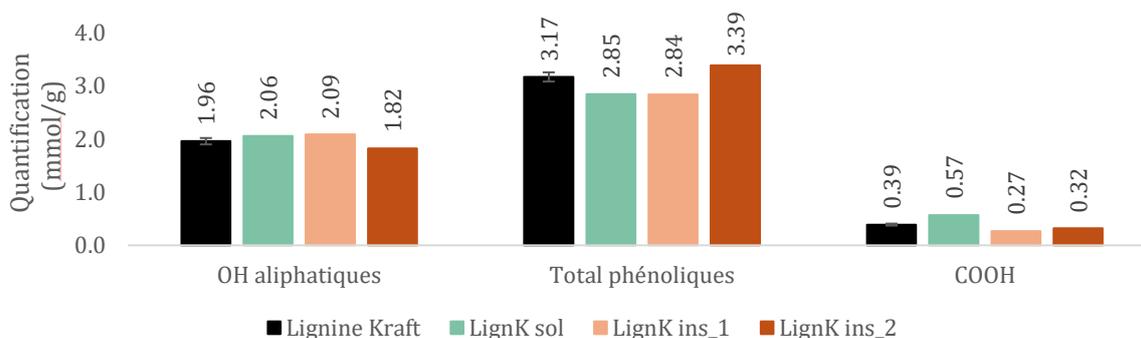


Figure V-48 : Quantification par RMN 31P des fonctions hydroxyles des différentes fractions issues du fractionnement de la lignine Kraft.

VIII.1. Traitement de LignK_sol avec la BOD

La solubilité dans l'eau de la fraction LignK_sol est mise à profit. Ainsi, dans un premier temps, l'enzyme BOD est ajoutée directement dans LignK_sol, avec un bullage d'oxygène, à température ambiante pendant 16 h. Pour rappel, le pH de la solution de LignK_sol est de 5,90. Après centrifugation et lyophilisation, deux fractions sont obtenues : une fraction soluble dans l'eau représentant 92 % de la lignine de départ et une fraction insoluble (8 %). Les SEC en phase aqueuse à pH 12 de ces fractions ont été effectuées, et sont présentées en Figure V-49.

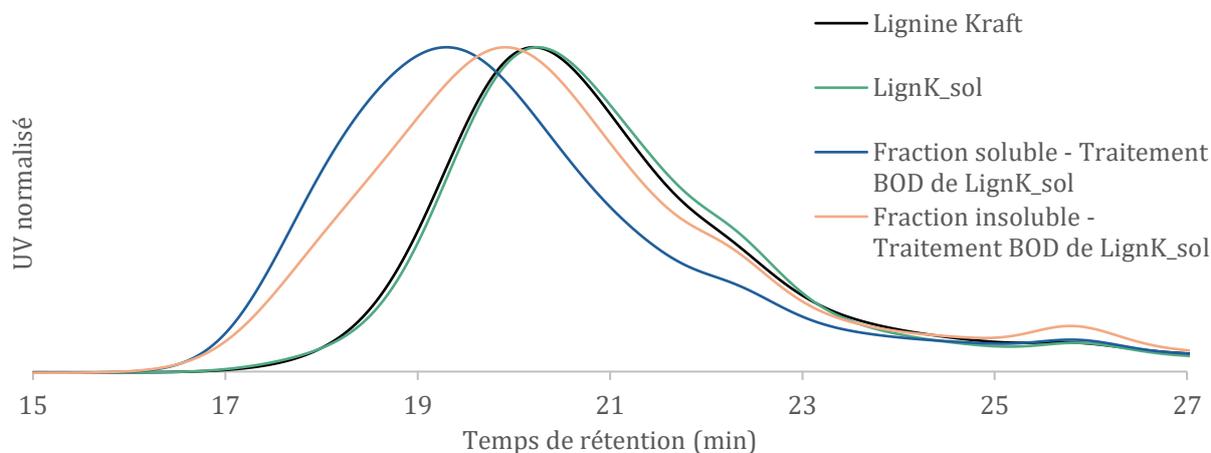


Figure V-49 : Chromatogrammes de SEC en phase aqueuse à pH 12 des fractions solubles et insolubles issues du traitement avec la BOD de « LignK_sol ».

Une augmentation des masses molaires apparentes est observée, d'autant plus pour la fraction soluble du traitement.

Dans un second temps, la fraction LignK_sol a été lyophilisée, pour pouvoir être dissoute dans le tampon borate à pH 10 classiquement employé pour les réactions avec la BOD. Cette LignK_sol lyophilisée sera abrégée « LignK_sol_lyoph » dans les prochaines figures. Après 16 h de réaction, à température ambiante avec bullage d'oxygène, le mélange limpide est dialysé, centrifugé et lyophilisé. Une seule fraction soluble est obtenue. Elle est analysée par SEC en phase aqueuse à pH 12, et son chromatogramme est représenté en Figure V-50.

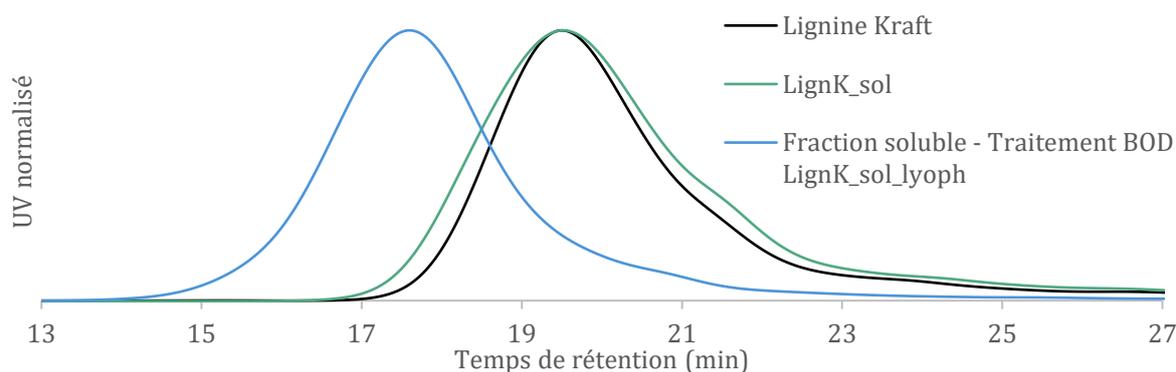


Figure V-50 : Chromatogrammes de SEC en phase aqueuse à pH 12 de la fraction soluble issue du traitement enzymatique avec la BOD de « LignK_sol_lyoph ».

Une fois de plus, la masse molaire de la fraction soluble obtenue est largement augmentée. Il semble que les masses molaires atteintes soient plus élevées que celles du précédent traitement directement dans l'eau à pH 5,90. Cela pourrait être dû à la fois à l'effet complexant du bore présent dans le tampon, et à l'activité de la BOD qui est optimale à des pH élevés tels que 10 et qui permet une polymérisation de la LignK_sol_lyoph.

VIII.2. Traitement de LignK_sol avec une laccase

La laccase d'*Aspergillus sp.* employée au long de ce chapitre a été ajoutée à la solution de LignK_sol. Après 16 h de réaction à température ambiante avec bullage d'oxygène, une solution limpide a été centrifugée et lyophilisée. Une seule fraction soluble est obtenue, et son chromatogramme en SEC aqueuse à pH 12 est représenté en Figure V-51. Une augmentation de la masse molaire de la fraction soluble est obtenue. Les mêmes résultats ont été obtenus avec la LignK_sol_lyoph dans un mélange tampon acétate à pH 5 et 20 % en volume d'acétone. C'est un résultat cohérent avec la littérature, par exemple Gouveia *et al.* polymérisent une lignine obtenue par fractionnement d'une lignine Kraft d'eucalyptus grâce à une laccase dans un tampon phosphate à pH 6. [23] Van de Pas *et al.* montrent également qu'après avoir fractionné plusieurs types de lignines, leur traitement enzymatique avec des laccases permet l'obtention de matériaux de haute masse molaire. [24]

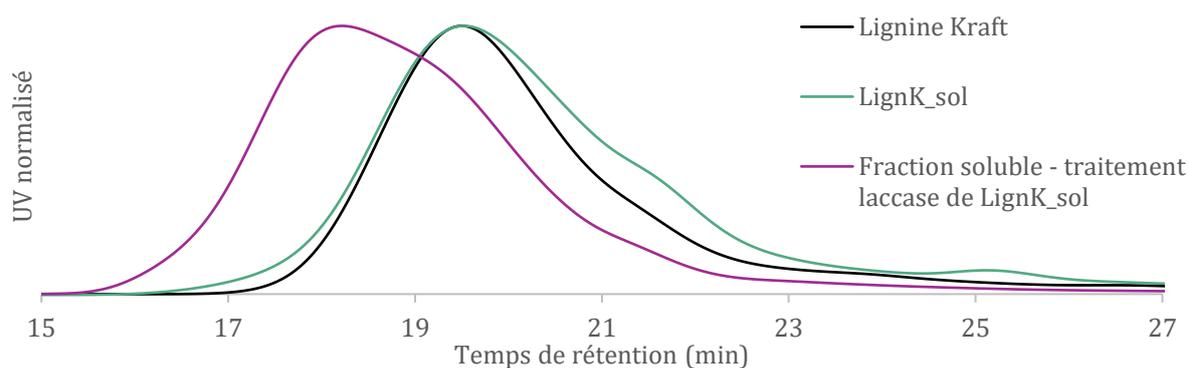


Figure V-51 : Chromatogrammes de SEC en phase aqueuse à pH 12 de la fraction soluble issue du traitement avec la laccase de « LignK_sol ».

Pour conclure, l'obtention d'une fraction soluble dans l'eau neutre par fractionnement de la lignine Kraft a été réalisée. Cette fraction possède des masses molaires apparentes semblables à la lignine Kraft de départ, avec une distribution plus fine. Elle présente des faibles variations de taux d'hydroxyles, notamment une augmentation de la quantité d'acides carboxyliques qui pourrait expliquer l'augmentation de l'hydrophilie de cette fraction. Cette fraction a pu être confrontée à l'action de la BOD et de la laccase, et il a été montré que ses masses molaires sont augmentées dans les deux cas. L'action de la BOD est plus importante lorsque la LignK_sol est préalablement lyophilisée puis dissoute dans le tampon borate à pH 10. Il pourrait être intéressant de fournir cette LignK_sol et les fractions solubles de masse molaire augmentées au partenaire du projet qui travaille sur le filage en fibres de carbone.

IX. Conclusion

Ce chapitre a consisté en l'étude du traitement enzymatique de la lignine Kraft avec la BOD. Il a été montré qu'une fraction soluble issue du traitement enzymatique est obtenue, dont la quantité augmente avec le temps de réaction. Cependant, cette fraction soluble dans l'eau neutre post lyophilisation a posé quelques problèmes d'analyses. La RMN quantitative du phosphore a révélé une diminution des groupes hydroxyles, tandis que la chromatographie d'exclusion stérique a montré une augmentation significative de la masse molaire de la fraction soluble. Ce résultat était surprenant, car une dépolymérisation de la lignine en synthons de plus petite taille était attendue, étant donné qu'il s'agissait d'une fraction de lignine Kraft soluble dans l'eau. Les analyses thermiques, telles que l'ATG et la DSC, n'ont pas permis de tirer des conclusions claires sur un éventuel changement structural. De même, la spectroscopie RMN n'a pas permis d'élucider les modifications structurales entre la lignine Kraft initiale et la fraction soluble obtenue, malgré de nombreux essais. Il a également été montré que la BOD permet d'obtenir une fraction soluble à masse molaire augmentée dans d'autres solvants que le tampon borate à pH 10. Le tampon carbonate à pH 10 s'est avéré particulièrement efficace, permettant de solubiliser 61 % de lignine

Kraft en 1 h de réaction, avec une augmentation de la masse molaire de cette fraction. Ce résultat est particulièrement intéressant pour l'application de cette fraction soluble dans la production de fibres de carbone, car elle pourrait constituer une alternative viable à la lignine soluble contenant du bore.

De ces deux paragraphes il est possible de conclure que la BOD permet le couplage de la lignine Kraft, sûrement en position 5-5' (Figure V-52) comme il avait été observé avec les modèles simplifiés.

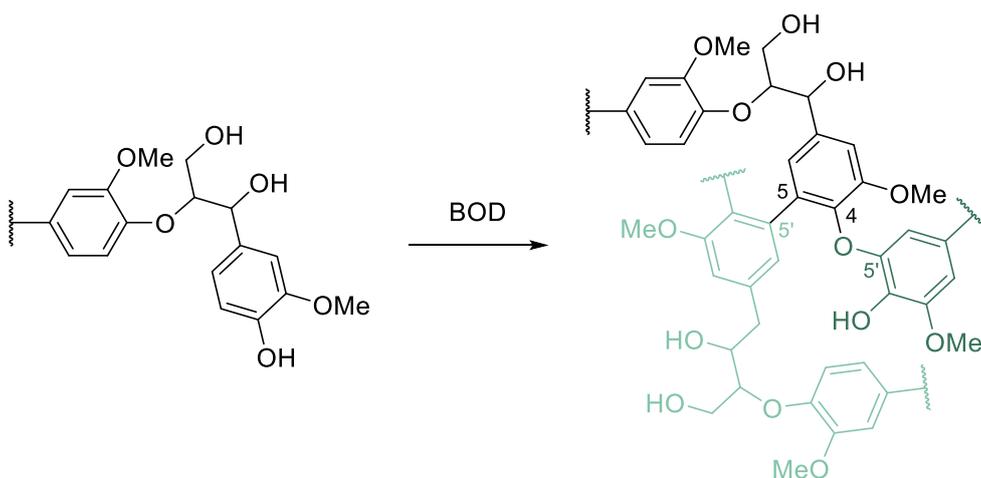


Figure V-52 : Action de la BOD sur la lignine Kraft : couplage 5-5' et 4-0-5'.

L'étude d'un traitement avec une BOD dont le centre T1 a été désactivé a révélé une diminution de la masse molaire de la fraction soluble et une baisse des taux d'hydroxyles, sans explication claire de ces résultats. De plus, le traitement de la lignine Kraft avec une protéine de contrôle, la BSA, n'a eu aucun effet sur les masses molaires, bien que toute la lignine soit devenue soluble après ce traitement.

La comparaison du traitement enzymatique d'une lignosulfonate de sodium avec la BOD et la laccase a montré que la BOD n'entraîne aucune augmentation de la masse molaire, contrairement à la laccase.

Des essais de réaction de Dakin appliqués à la lignine Kraft ont produit un polymère de petite taille, et il a été démontré que la BOD peut coupler ces fragments de lignine après leur dégradation. En revanche, la réaction de Dakin appliquée à la fraction soluble du traitement enzymatique de la lignine Kraft a donné des résultats moins clairs, suggérant une rupture partielle des liaisons formées pendant le couplage enzymatique.

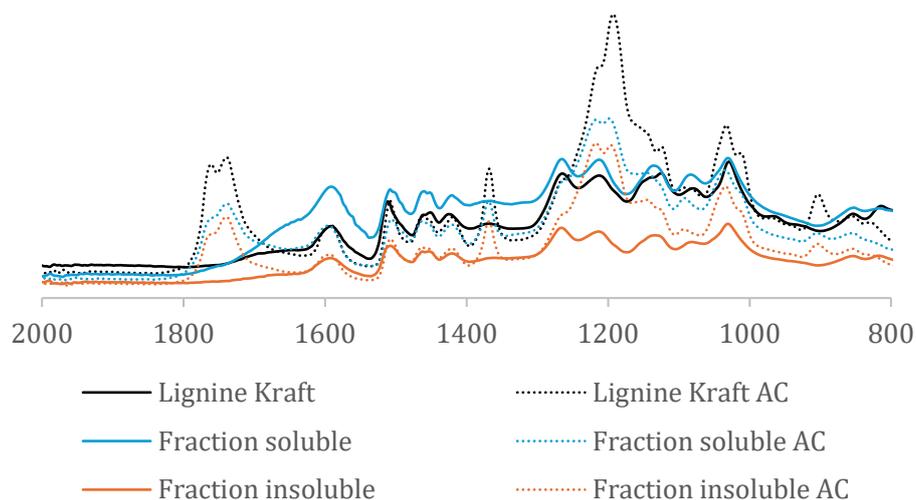
Enfin, un fractionnement par dissolution successive de la lignine Kraft dans de l'eau et de l'acétone a permis l'obtention d'environ 30 % d'une lignine soluble dans l'eau. Cette fraction a été traitée par la BOD, et une augmentation de ses masses molaires a été observée.

X. Références bibliographiques

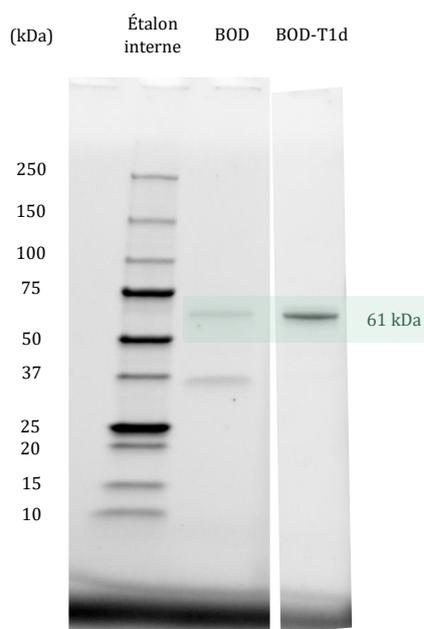
- [1] S. Constant, C. S. Lancefield, B. M. Weckhuysen, P. C. A. Bruijninx, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2017**, *5* (1), 965–972. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02292>.
- [2] S. Sen, S. Patil, D. S. Argyropoulos, *Green Chemistry*. **2015**, *17* (2), 1077–1087. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4GC01759E>.
- [3] I. Dababi, O. Gimello, E. Elaloui, F. Quignard, N. Brosse, *Polymers*. **2016**, *8* (9), 340. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym8090340>.
- [4] J. Mao, K. M. Holtman, J. T. Scott, J. F. Kadla, K. Schmidt-Rohr, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (26), 9677–9686. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf062199q>.
- [5] L. Fu, S. A. McCallum, J. Miao, C. Hart, G. J. Tudryn, F. Zhang, R. J. Linhardt, *Fuel*. **2015**, *141*, 39–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.039>.
- [6] X. Kang, A. Kirui, M. C. Dickwella Widanage, F. Mentink-Vigier, D. J. Cosgrove, T. Wang, *Nature Communications*. **2019**, *10* (1), 347. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0>.
- [7] N. Mano, S. Gounel, W. Neri, A. Derre, P. Poulin, *Modification Enzymatique De La Lignine Pour Sa Solubilisation Et Applications*, **2019**.
- [8] F. Durand, S. Gounel, C. H. Kjaergaard, E. I. Solomon, N. Mano, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2012**, *96* (6), 1489–1498. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3926-2>.
- [9] X. Chen, X. Ouyang, J. Li, Y.-L. Zhao, *ACS Omega*. **2021**, *6* (35), 22578–22588. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02501>.
- [10] S. Camarero, D. Ibarra, M. J. Martínez, Á. T. Martínez, *Applied and Environmental Microbiology*. **2005**, *71* (4), 1775–1784. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1775-1784.2005>.
- [11] A. Sekretareva, S. Tian, S. Gounel, N. Mano, E. I. Solomon, *Journal of the American Chemical Society*. **2021**, *143* (41), 17236–17249. DOI: <https://doi.org/10.1021/jacs.1c08456>.
- [12] C. Arato, E. K. Pye, G. Gjennestad, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2005**, *123* (1), 871–882. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:123:1-3:0871>.
- [13] G. K. Wurzer, M. Bacher, H. Hettegger, I. Sumerskii, O. Musl, K. Fackler, R. H. Bischof, A. Potthast, T. Rosenau, *Analytical Methods*. **2021**, *13* (45), 5502–5508. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1AY01241J>.
- [14] E. Nugroho Prasetyo, T. Kudanga, L. Østergaard, J. Rencoret, A. Gutiérrez, J. C. Del Río, J. Ignacio Santos, L. Nieto, J. Jiménez-Barbero, A. T. Martínez, *Bioresource Technology*. **2010**, *101* (14), 5054–5062. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.048>.
- [15] D. Areskogh, J. Li, G. Gellerstedt, G. Henriksson, *Biomacromolecules*. **2010**, *11* (4), 904–910. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm901258v>.
- [16] F. Fink, T. M. Stawski, J. M. Stockmann, F. Emmerling, J. Falkenhagen, *Biomacromolecules*. **2023**, *24* (9), 4274–4284. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00584>.
- [17] S. Dong, Z. Zhang, H. Zhang, X. Du, Z. Sun, Y. Shang, T. Yao, *Wood Science and Technology*. **2024**, *58* (3), 1141–1152. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00226-024-01555-0>.
- [18] Q. Li, M. T. Naik, H.-S. Lin, C. Hu, W. K. Serem, L. Liu, P. Karki, F. Zhou, J. S. Yuan, *Carbon*. **2018**, *139*, 500–511. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.07.015>.
- [19] P. Jiang, Q. Li, C. Gao, J. Lu, Y. Cheng, S. Zhai, Q. An, H. Wang, *Bioresource Technology*. **2019**, *289*, 121640. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121640>.
- [20] H. U. Cho, M. Lee, J. Shin, E.-S. Kim, Y. M. Kim, *Membrane and Water Treatment*. **2020**, *11* (1), 25–29. DOI: <https://doi.org/10.12989/MWT.2020.11.1.025>.
- [21] O. Sevastyanova, M. Helander, S. Chowdhury, H. Lange, H. Wedin, L. Zhang, M. Ek, J. F. Kadla, C. Crestini, M. E. Lindström, *Journal of Applied Polymer Science*. **2014**, *131* (18), app.40799. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.40799>.
- [22] N. Longhitano, *Élaboration de matériaux polymères thermodurcissables à partir de lignines modifiées*, Université de Bordeaux **2021**.

- [23] S. Gouveia, C. Fernández-Costas, M. A. Sanromán, D. Moldes, *Bioresource Technology*. **2012**, 121, 131–138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.144>.
- [24] D. Van De Pas, A. Hickson, L. Donaldson, G. Lloyd-Jones, T. Tamminen, A. Fernyhough, M.-L. Mattinen, *BioRes*. **2011**, 6 (2), 1105–1121. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.6.2.1105-1121>.

XI. Annexes



Annexe V-1 : Spectres infra-rouge de la lignine Kraft (noir), de la fraction soluble de son traitement avec la BOD (bleu) et de la fraction insoluble (orange) et de leurs versions acétylées (noir, bleu et orange pointillés respectivement).



Annexe V-2 : SDS PAGE de la BOD et de la BOD-T1d. Révélation par fluorescence (enzymes concentrées à 1mg/mL)

VI. Chapitre 6 : Partie expérimentale

I. Matériels

Les produits utilisés dans cette étude ont été acquis auprès de différents fournisseurs spécialisés. Tous les produits suivants ont été achetés chez **Fisher** : acétone, acétate d'éthyle, acétosyringone, 4-hydroxyacétophénone, bromure de cuivre, dichloroéthane, diméthylsulfoxyde, N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboxylic acid imide, éthanol, gaiacol, isopropanol, peroxyde d'hydrogène, soude, tétrahydruroborate de sodium, toluène et N,N-diméthylformamide. Chez **Sigma-Aldrich**, les produits suivants ont été achetés : acétovanillone, acide borique, acide sulfurique, acide vanillique, alcool 4-hydroxybenzylique, anhydride acétique, créosol, 2,6-diméthoxyphénol, DIBAL-H (hydrure de diisobutylaluminium), Peroxydase de radis noir (HRP), iodométhane, 4-hydroxybenzaldéhyde, laccase d'*Aspergillus*, pyridine, sulfate de magnésium, TMDP (N-triméthylsilyldiethylamine), vanilline, 4-(trifluorométhyl)phénylhydrazine, et acétylacétonate de chrome(III). Enfin, les produits suivants ont été achetés chez **TCI** : 1-méthyl-4-(trifluorométhyl)benzène, acide syringique, et N-acétylcystéine. Tous ces produits ont été utilisés sans purification supplémentaire.

L'ensemble des solvants deutérés est fourni par **Euriso-top**.

La lignine Kraft Indulin AT a été fournie par le centre technique **CANOË**.

La lignine lignosulfonate de sodium a été fournie par la bioraffinerie **RYAM**. C'est la lignosulfonate ARBO® N18 (CAS 68131-31-7).

La Bilirubine Oxydase a été produite et purifiée par le Centre de Recherche Paul Pascal (**CRPP**)

II. Méthodes de caractérisation

Les différentes méthodes de caractérisations qui ont été utilisées tout au long du manuscrit sont décrites dans cette partie.

II.1. Spectroscopie RMN

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C sont effectuées à 298 K sur un instrument Bruker Avance III HD 400 MHz équipé d'une sonde BBFO de 5 mm. La sonde fonctionne à 400,2 MHz pour l'analyse des protons (^1H) et à 100,6 MHz pour l'analyse du carbone (^{13}C). Sauf indication contraire, les spectres ^1H sont acquis avec 32 scans et un temps de recyclage de 1 s ; les spectres ^{13}C avec 1024 scans et un temps de recyclage de 2 s.

Les autres analyses de spectroscopie RMN présentées par la suite ont été réalisés à 296 K sur un spectromètre RMN Bruker Avance NEO 400 MHz, équipé d'une cryosonde Bruker Prodigy BBO de 5 mm.

Toutes les données sont traitées avec le logiciel TopSpin.

II.1.1. RMN ³¹P

Pour cette analyse, le milieu doit être anhydre ; avant utilisation, les solvants sont séchés sur tamis moléculaire (3Å) et la verrerie est mise à l'étuve à 110°C une nuit. Dans un pilulier sec, environ 30 mg de lignine séchée, précisément environ 5 mg d'étalon interne (N-Hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboxylic acid imide), ainsi que 1 ou 2 mg d'agent de relaxation (acétylacétonate de Chrome(III)) sont précisément pesés. Sous flux d'argon, 0,5 mL d'un mélange sec de pyridine/CDCl₃ (1,6:1) sont ajoutés, suivi de 0,5 mL de DMF sec. Enfin, 50 µL d'agent de dérivation, TMDP, sont ajoutés et l'agitation maintenue pendant 50 min. À l'issue de cette durée, 0,4 mL de ce mélange est transféré dans un tube RMN sec ainsi que 0,2 mL de CDCl₃ sec. L'analyse RMN est réalisée dans l'heure suivante car le produit de dérivation s'hydrolyse rapidement. Les mesures de RMN ³¹P sont réalisées à l'aide d'un programme de pulsation standard pour phosphore, avec un temps de recyclage de 5 s et 256 scans acquis entre 120 et 180 ppm. Les intégrales sont définies avec le logiciel Topspin, la phase et la ligne de base du spectre sont corrigées, et le spectre est calibré sur le signal de l'étalon interne : δ = 151,9 ppm. Les proportions de chaque type d'hydroxyle sont déterminées par intégration des zones recensées dans le tableau suivant :

Type d'hydroxyle	Zone de déplacement chimique (ppm)
Aliphatique	149 – 145,5
Phénolique – unité S	144,5 – 140,5
Phénolique – unité G	140,5 – 138,7
Phénolique – unité H	138,5 – 137,5
Acide carboxylique	136 – 134

Le calcul qui permet de déterminer la quantité d'hydroxyles en mol/g est le suivant :

$$\text{Quantité de OH en mol/g} = \frac{n_{OH}}{m_{lignine}} = \frac{[OH] \times V}{m_{lignine}}$$

$$\text{avec } [OH] = \frac{\text{Intégrale du signal OH}}{\text{Intégrale du signal de l'étalon interne}} \times [\text{étalon interne}]$$

L'intégrale du signal de l'étalon interne est fixée à 1.

$$\text{Soit quantité de OH en mol/g} = \frac{\text{intégrale du signal OH} \times n_{\text{étalon interne}}}{m_{lignine}}$$

Un facteur correcteur de 0,97 est appliqué à la quantité de matière de l'étalon interne afin de tenir compte de sa pureté dans le calcul.

II.1.2. RMN ¹⁹F

Dans un flacon de 4 mL, 150 mg de lignine et 10 mg de 1-méthyl-4(trifluorométhyl)benzène (standard interne) ont été dissous dans 500 µL de DMSO-d₆. Simultanément, 0,8 mmol de 4-(trifluorométhyl)phénylhydrazine a été dissous dans 300 µL de DMSO-d₆ et ajouté goutte à goutte à la solution de lignine. Il est important de noter que la 4-(trifluorométhyl)phénylhydrazine est instable en présence d'eau et nécessite un stockage au réfrigérateur. Le mélange réactionnel a été transféré dans un tube NMR standard et placé dans un four à 40 °C pendant 16 h pour assurer une dérivatisation complète. Juste avant l'analyse, 100 µL de solution d'agent de relaxation (acétylacétonate de chrome, 28 mg/mL dans DMSO-d₆, 0,008 mmol) a été ajouté au tube RMN, après quoi l'échantillon a été homogénéisé et analysé immédiatement. Le nombre de scans était 256 et le spectre est acquis entre -220 ppm et 20 ppm.

II.1.3. RMN ¹¹B

Les expériences de RMN ¹¹B ont été réalisées avec la séquence d'impulsion *zgbs*. 1024 scans ont été acquis et la largeur spectrale était de 201,7 ppm, ce qui correspond à un temps d'acquisition de 4 minutes environ. L'échantillon est solubilisé dans le DMSO-d₆, et placé dans un tube en quartz d'un diamètre de 5 mm (Norell S-5-500-QTZ-7).

II.1.4. 2D-HSQC

Les expériences de RMN HSQC ont été réalisées en utilisant la séquence d'impulsions *hsqcetgpsisp2.2*. Le nombre de points est de 2048 dans la dimension ¹H, et 32 scans ont été collectés avec un temps de recyclage de 2,5 s. Dans la dimension ¹³C, 256 points ont été enregistrés avec un couplage ¹J_{CH} fixé à 145 Hz. Les fréquences de base pour le proton et le carbone étaient respectivement de 400,33 MHz et 100,67 MHz. Un *zero filling* a été effectué dans la deuxième dimension (2048 points) ainsi que dans la première dimension (1024 points). Chaque analyse a été réalisée sur 20 à 30 mg de lignine dissous dans 0,5 mL de solvant deutéré, généralement le DMSO-d₆. Dans ce cas, le signal résiduel du solvant deutéré a été utilisé comme référence pour la calibration des analyses ($\delta^{13}\text{C}$: 39,5 ppm ; $\delta^1\text{H}$: 2,50 ppm).

II.1.5. RMN quantitative du ¹³C

Une quantité précise de 100 mg d'un échantillon de lignine séché a été dissoute dans 400 µL de DMSO-d₆. Un total de 100 µL d'une solution de 1,3,5-trioxane (45,8 mg.mL⁻¹ dans le DMSO) a été ajouté en tant qu'étalon interne, ainsi que 100 µL d'une solution d'acétylacétonate de chrome(III) (20 mg.mL⁻¹ dans le DMSO) en tant qu'agent de relaxation. Les solutions ont ensuite été transférées dans un tube RMN de 5 mm pour l'acquisition des données. Les conditions d'acquisition étaient les suivantes : largeur spectrale de 40 800 Hz, temps de recyclage de 1,7 s, et 34 000 scans.

II.1.6. RMN à l'état solide

Les mesures CP/MAS ^{13}C RMN ont été effectuées par le CESAMO (Bordeaux, France) à 25 °C avec un spectromètre Bruker Avance II 400. La fréquence d'opération pour le carbone était de 100,63 MHz. La méthode conventionnelle CP/MAS a été utilisée pour les mesures ^{13}C en haute résolution en phase solide. Les rotors en oxyde de zirconium contenant les échantillons ont été tournés à 8 kHz. Les autres paramètres d'acquisition étaient une durée d'impulsion ^1H de 2,8 μs (impulsion à 90°), des délais de recyclage de 5 secondes, un temps d'acquisition de 34,41 ms, et une largeur spectrale de 30 kHz. Les déplacements chimiques du ^{13}C ont été calibrés par la résonance du carbone du carbonyle de la glycine en tant que référence externe à 178 ppm, puis convertis en valeurs par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Tous les spectres RMN ont été mis en phase et leurs lignes de base corrigées.

II.2. Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) ont été enregistrés sur un instrument Bruker VERTEX 70 (résolution de 4 cm^{-1} , 64 scans, DLaTGS MIR) équipé d'une plaque Pike GladiATR (cristal de diamant) pour la réflectance totale atténuée (ATR) à température ambiante.

II.3. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

II.3.1. SEC dans le THF

Les échantillons ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en utilisant le tétrahydrofurane (THF) comme éluant. Les mesures ont été effectuées sur un système Ultimate 3000 de Thermoscientific équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). Le système comprend également un détecteur de diffusion de lumière laser multi-angle (MALS) et un détecteur d'indice de réfraction différentiel (dRI) de Wyatt technology. Les polymères ont été séparés sur trois colonnes de gel TOSOH HXL G2000, G3000 et G4000 (300 x 7,8 mm) (limites d'exclusion de 1000 Da à 400 000 g/mol) à un débit de 1 mL/min. La température des colonnes a été maintenue à 40°C. Des étalons standard de polystyrène de chez Agilent (de 180 à 364 000 g/mol) ont été utilisés pour réaliser les calibrations. L'échantillon est solubilisé pendant au moins 24 h à une concentration d'environ 5 mg/mL, puis filtré à travers un filtre PTFE de 0,20 μm . Le marqueur de débit employé est le 1,2,4-trichlorobenzène, à une concentration de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

II.3.2. SEC dans le DMF

Les échantillons ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en utilisant le N,N-Diméthylformamide (DMF) comme éluant. Les mesures ont été effectuées sur un système Ultimate 3000 de Thermoscientific équipé d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD). Le système comprend également un détecteur de diffusion de lumière multi-angles (MALS) et un détecteur d'indice de réfraction différentiel (dRI) de Wyatt technology. Les polymères ont été séparés sur

deux colonnes de gel Shodex Asahipack GF310 et GF510 (300 x 7,5 mm) (limites d'exclusion de 500 g/mol à 300 000 g/mol) à un débit de 0,5 mL/min. La température des colonnes a été maintenue à 50°C. Le kit Easyvial de Polystyrène d'Agilent a été utilisé comme étalons (Mn de 162 à 364 000 g/mol). L'échantillon est solubilisé pendant au moins 24 h à une concentration d'environ 5 mg/mL, puis filtré à travers un filtre PTFE de 0,20 µm. Le marqueur de débit employé est le toluène, à une concentration de 3 µL/mL.

II.3.3. SEC en phase aqueuse à pH 12

Les mesures ont été effectuées dans une solution aqueuse de NaOH à pH 12 avec un système Ultimate 3000 de ThermoScientific équipé d'un détecteur à réseau de diodes (DAD). Le système comprend également un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles (MALS) et un détecteur d'indice de réfraction différentiel (dRI) de Wyatt Technology. Les polymères ont été séparés sur trois colonnes (TSKgel G4000PW (8*300) ; 2* TSKgel G3000PW (8*300)) avec des limites d'exclusion allant de 100 g/mol à 300 000 g/mol, à un débit de 1,0 mL/min. La température des colonnes était maintenue à 25°C. Des polystyrènes sulfonate (PSS) de PSS-Agilent ont été utilisés comme étalons (Mn de 891 à 258 000 g/mol). L'échantillon est solubilisé pendant au moins 24 h à une concentration d'environ 5 mg/mL, puis filtré à travers un filtre Nylon de 0,20 µm. Le marqueur de débit employé est l'éthylène glycol (0,8 µL/mL)

II.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'analyse LC-ESI/MS a été réalisée sur un spectromètre de masse à trappe ionique linéaire (LTQ, Thermo Fisher Scientific) couplé à un système de chromatographie liquide Vanquish (Thermo Fisher Scientific), composé d'une pompe VF-P20-A, d'un détecteur UV-VIS (VF-V40-4 réglé à 280 nm), d'un four pour colonne (VH-C10-A) et d'un échantillonneur automatique (VF-A10-A). L'identification s'est basée sur une analyse en mode MS à balayage complet couvrant un rapport m/z de 50 à 1000, ainsi qu'en mode MS_n. Les données brutes ont été analysées à l'aide du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). L'analyse HPLC-MS_n a été effectuée en mode d'ionisation électrospray négative (ESI) avec une colonne LC Nucleodur 100-C5 C18 ec (250 x 4 mm, 5 µm) de Macherey-Nagel, maintenue à 25°C. La phase mobile était constituée d'un mélange acétonitrile/eau (80/20) avec un débit de 0,8 mL/min. L'échantillon était dissous (0,1 g/L) dans un mélange ACN/H₂O (80/20, v/v). Le volume d'injection était de 1 µL. Les paramètres de la source électrospray étaient les suivants : température du chauffage 45°C, voltage du capillaire -20 V, voltage du tube de lentille -120 V, température du capillaire 320°C, flux des gaz de protection et auxiliaire (N₂) 50 et 10, gaz de balayage 0, tension de pulvérisation 3 kV.

II.5. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les spectres MALDI-TOF-MS ont été réalisés par le CESAMO (Bordeaux, France) sur un spectromètre de masse Autoflex maX TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) équipé d'un laser Nd:YAG à triple fréquence émettant à 355 nm. Les spectres ont été enregistrés en mode ion positif à l'aide du réflectron et avec une tension d'accélération de 19 kV. Les échantillons ont été dissous dans du DMSO à 10 mg/ml et soniqués pendant 30 minutes. La matrice DCTB ((2E)-2-Méthyl-3-[4-(2-méthyl-2-propanyl)phényl]-2-propène-1-ylidène} malononitrile) a été préparée en dissolvant 10 mg dans 1 mL d'acétone. Une solution d'agent de cationisation (NaI, 10 mg/mL) a également été préparée. Les solutions ont été combinées dans un rapport de volume 10:1:1 entre la matrice, l'échantillon et l'agent de cationisation. Un à deux μL de la solution obtenue ont été déposés sur la cible de l'échantillon et séchés sous vide.

II.6. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les analyses thermogravimétriques sont conduites sur un équipement ATG-Q500 fabriquée par la société TA Instruments. Entre 5 et 15 mg de lignine sont employés. Les rampes de chauffe sont effectuées, sauf indication contraire, à 10 °C/min sous atmosphère d'azote de la température ambiante à 800 °C, puis sous air jusqu'à 900 °C.

II.7. Analyse par analyse enthalpique différentielle (DSC)

Les thermogrammes sont obtenus grâce à un équipement DSC Q100 de la société TA Instruments. Environ 10 mg de lignine sont analysés dans des creusets d'aluminium scellés et troués. Après un équilibrage à 25 °C, un premier cycle de chauffe est effectué jusqu'à 250 °C, où un isotherme de 5 min est effectué. Puis une descente jusqu'à -80 °C est effectuée et un second cycle est réalisé de -80 °C jusqu'à 250 °C, à une vitesse de 10 °C/min.

II.8. Analyses de diffusion de la lumière (DLS)

Les diamètres hydrodynamiques Z-moyen et l'indice de polydispersité des nanoparticules ont été déterminés par DLS à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments fonctionnant avec une source laser He-Ne (longueur d'onde 633 nm, angle de diffusion de 90°). Les fonctions de corrélation ont été analysées en utilisant la méthode des cumulants. Les dispersions ont été analysées à une concentration de 0,1 mg/mL dans l'eau.

II.9. Analyse par dichroïsme circulaire

Les analyses de spectroscopie de dichroïsme circulaire sont effectuées avec un spectrophotomètre à dichroïsme circulaire J-850 Jasco. Les données sont traitées sur le logiciel Spectra Manager. Les enzymes sont solubilisés dans l'eau milli-Q à une concentration de 0,1 mg/mL, puis sont placées dans une cuve en quartz de 10 mm. Le balayage en longueur d'onde est

réalisé dans l'UV lointain (190-260 nm) à une vitesse de 200 nm/min et à une température de 20°C. Chaque échantillon est analysé en triplicat. Un blanc (de l'eau milli-Q seule) est également effectué afin d'établir la ligne de base.

II.10. Électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) permet de déterminer la taille des protéines présentes dans un mélange. Cette méthode sépare les protéines en fonction de leur masse molaire par rétention sur un gel de polyacrylamide. De plus, le SDS rompt les ponts disulfures et dissocie les chaînes peptidiques, dont le rapport charge/masse devient identique. Sous l'influence d'un champ électrique les protéines migrent en fonction de leur masse molaire.

- Préparation des échantillons

Les enzymes sont solubilisées dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, SDS 5% à pH 8, à une concentration de 10 mg/mL. Une fois solubilisés, les mélanges sont centrifugés à 2 000 g pendant 2 min à 20 °C. Un volume de surnageant (150 µL) est prélevé et déposé dans un nouveau tube avec 100 µL de solution Laemmli 2x (Biorad). Le tout est homogénéisé, puis les échantillons sont placés dans un bain marie à sec à 90 °C pendant 3 min.

- Migration et révélation

Une fois les échantillons préparés, 10 µL sont déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (BioRad MiniPROTEAN TGX, non teinté, gradient 4%-20%). Un marqueur d'échelle de taille (BioRad Precision Plus Protein Unstained Standards) de 10 kDa à 250 kDa est également chargé à chaque analyse. Le solvant de migration utilisé est un tampon Tris/Glycine/SDS dilué par un facteur 10 depuis la solution commerciale (BioRad 10X TGS). La migration est réalisée avec l'appareil BioRad MiniPROTEAN® Tetra System, à une tension constante de 300 mV, une intensité de 25 mA/gel et pendant 50 min. Le gel est ensuite lavé et révélé avec le dispositif BioRad GelDoc™ EZ Imager. Le logiciel BioRad permet d'acquérir et de traiter les données.

III. Modes opératoires

III.1. Procédures concernant les enzymes

III.1.1. Tampons employés : espèces pesées pour 1 L de solution

	pH	Espèces
Tampon borate	10	Acide borique (H_3BO_3) : 3,09 g ; 50 mM ou 12,36 g ; 200 mM
Tampon carbonate	10	Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) : 3,88 g ; 46 mM Carbonate de sodium (Na_2CO_3) : 5,71 g ; 54 mM
Tampon ammoniacal	10	Chlorure d'ammonium (NH_4Cl) : 10,7 g ; 200 mM Ammoniaque à 30% NH_3 : 64 mL
Tampon phosphate	5	Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) : 6,81 g ; 49 mM Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) : 0,18 g ; 1 mM
Tampon phosphate	6	Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) : 4,01 g ; 29 mM Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) : 1,06 g ; 4 mM
Tampon phosphate	7	Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) : 2,92 g ; 21 mM Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) : 7,74 g ; 29 mM
Tampon phosphate	8	Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) : 0,47 g ; 3 mM Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) : 12,49 g ; 47 mM

III.1.2. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité de la laccase d'*Aspergillus sp.* commerciale a été déterminée par suivi spectroscopique de la réaction d'oxydation de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthiazoline 6-sulfonique) (ABTS, $\epsilon = 36\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$). Le mélange réactionnel contenait 0,04 mM d'ABTS, 50 mM de tampon acétate (pH 5,0) et de la laccase. Le changement d'absorbance a été suivi à 414 nm pendant 5 min à température ambiante. La quantité de laccase qui générerait 1 μmol de cation radicalaire d'ABTS par min a été définie comme une unité, U.

L'activité de la laccase utilisée dans cette étude a été évaluée à 10,3 U/mg.

L'activité de la BOD de *B. Pumilus* a été évaluée par le CRPP. En fonction des échantillons produits, l'activité variait entre 560 et 973 U/mg par rapport à l'ABTS.

III.1.3. Traitement enzymatique avec la BOD dans les tampons alcalins

À une solution agitée de substrat (0,5 g) dans 50 mL de tampon borate pH 10 (50 mmol/L) (ou d'une autre solution tampon), 10 mg de BOD (d'une activité moyenne de 800 U/mg) sont ajoutés. Un bullage régulier d' O_2 dans le milieu est mis en place, et la réaction est conduite pendant une

nuit à 60°C. Le milieu réactionnel est ensuite transféré dans une membrane de dialyse (Spectra/Por™ Pre-wetted Standard RC Dialysis Tubing, 10 kD MWCO) dans 2 L d'eau milli-Q à 4°C pendant une nuit, avec un changement du dialysat, afin d'éliminer les sels de borate. La partie solubilisée a été séparée de la partie insoluble par centrifugation (4500 rpm, 5°C, 20 min). Le surnageant (fraction soluble) a été lyophilisé séparément du culot (fraction insoluble).

Une expérience témoin a été réalisée pour chaque traitement enzymatique, selon le même protocole, sans ajout de BOD dans le milieu.

Lorsque la syringaldéhyde est ajoutée en tant que médiateur, 0,25 mmol sont ajoutés pour traiter 0,5 g de substrat.

III.1.4. Traitement enzymatique avec la BOD dans eau/acétone :

À une solution agitée de substrat (0,5 g) dans 50 mL d'eau milli-Q et d'acétone à 20% volumique, 10 mg de BOD (d'une activité moyenne de 800 U/mg) sont ajoutés. Un bullage régulier d'O₂ est mis en place dans le milieu fermé, et la réaction est conduite pendant une nuit à température ambiante. L'acétone est ensuite éliminée à l'évaporateur rotatif, et la partie solubilisée a été séparée de la partie insoluble par centrifugation (4500 rpm, 5°C, 20 min). Le surnageant (fraction soluble) a été lyophilisé séparément du culot (fraction insoluble).

III.1.5. Traitement enzymatique avec la laccase

À une solution agitée de substrat (0,5 g) dans 50 mL de tampon acétate à pH 5 et d'acétone à 20% volumique, environ 0,5 mL de laccase d'*Aspergillus sp.* sont ajoutés. Un bullage régulier d'O₂ est mis en place dans le milieu fermé, et la réaction est conduite pendant une nuit à température ambiante. L'acétone est ensuite éliminée à l'évaporateur rotatif, et la partie solubilisée a été séparée de la partie insoluble par centrifugation (4500 rpm, 5°C, 20 min). Le surnageant (fraction soluble) a été lyophilisé séparément du culot (fraction insoluble).

III.2. Chapitre 2

III.2.1. Fluorescence [1]

Les spectres de fluorescence ont été mesurés à l'aide d'un spectrofluorimètre FP-8500 Jasco. Les expériences de fluorescence ont été réalisées avec les paramètres suivants : longueur d'onde d'excitation à 280 nm et balayage des longueurs d'onde d'émissions entre 310 et 450 nm. Les largeurs de fente étaient respectivement de 2,5 nm pour l'excitation et de 10 nm pour les longueurs d'onde d'émission. Une cuve en quartz de 3 mL avec une longueur de trajet de 10 mm et un agitateur magnétique ont été utilisés pendant les mesures. Les expériences de « quenching » de fluorescence ont été réalisées par titration de la BOD (5 mM) avec de la diapocynine (0–16 mM) dans un tampon phosphate de 50 mM, pH 7,0, à différentes températures. Après chaque addition, les mélanges protéine/ligand ont été incubés pendant 2 min avant les mesures de fluorescence.

III.2.2. Dimérisation de l'acétovanillone par voie chimique

L'acétovanillone (20,0 g, 120 mmol) a été dissoute dans 800 mL d'eau bouillante avec agitation vigoureuse. Ensuite, du sulfate de fer (II) heptahydraté (1,67 g, 6 mmol) et du persulfate de sodium (14,29 g, 60 mmol) ont été ajoutés, ce qui a transformé la solution claire et jaune pâle en une couleur brune avec une précipitation rapide. Le mélange a été agité pendant 15 min, puis la solution a été filtrée. Le gâteau de filtration a été suspendu dans 500 mL d'eau, et la quantité minimale d'hydroxyde de sodium solide a été ajoutée pour dissoudre le solide. La solution a ensuite été acidifiée lentement avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à formation d'un précipité. Le produit solide a été filtré, le filtrat a été lavé plusieurs fois avec de l'eau chaude, puis séché au four pendant une nuit pour obtenir la diacétovanillone sous forme de poudre beige avec un rendement supérieur à 98 %.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,54 (s, 2H, 2OH), 7,47 (d, $J = 2$ Hz, 2H, H α , H α'), 7,46 (d, $J = 2$ Hz, 2H, H β , H β'), 3,90 (s, 6H, OCH $_3$), 2,50 (s, 6H, H β , H β'). ^{13}C RMN (100,6 MHz, DMSO- d_6) δ 196,6 (C α), 149,5 (C β), 147,9 (C γ), 128,3 (C δ), 125,7 (C ϵ), 124,9 (C ζ), 110,1 (C η), 56,4 (OCH $_3$), 26,7 (C θ).

III.2.3. Méthylation de l'acétovanillone

L'acétovanillone (8,64 g, 52 mmol) a été dissoute dans de l'acétone (200 mL). Du carbonate de potassium (30,4 g, 220 mmol) a été ajouté avant une addition lente de l'iodométhane (19,2 mL, 316 mmol). Après 15 h d'agitation à 80 °C, le mélange a été filtré et évaporé sous vide. Le produit huileux obtenu a ensuite été transféré dans 100 mL de DCM et lavé trois fois avec une solution saturée de thiosulfate de sodium. La phase organique a été séchée avec du MgSO $_4$ et évaporée sous vide. Une poudre blanche est obtenue avec un rendement de 98 %.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,62 (dd, $J = 2 ; 8$ Hz, 1H, H α), 7,44 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H β), 7,07 (d, $J = 8$ Hz, 8H, H γ), 3,84 (s, 3H, OCH $_3$), 3,81 (s, 3H, OCH $_3$), 2,53 (s, 3H, H β).

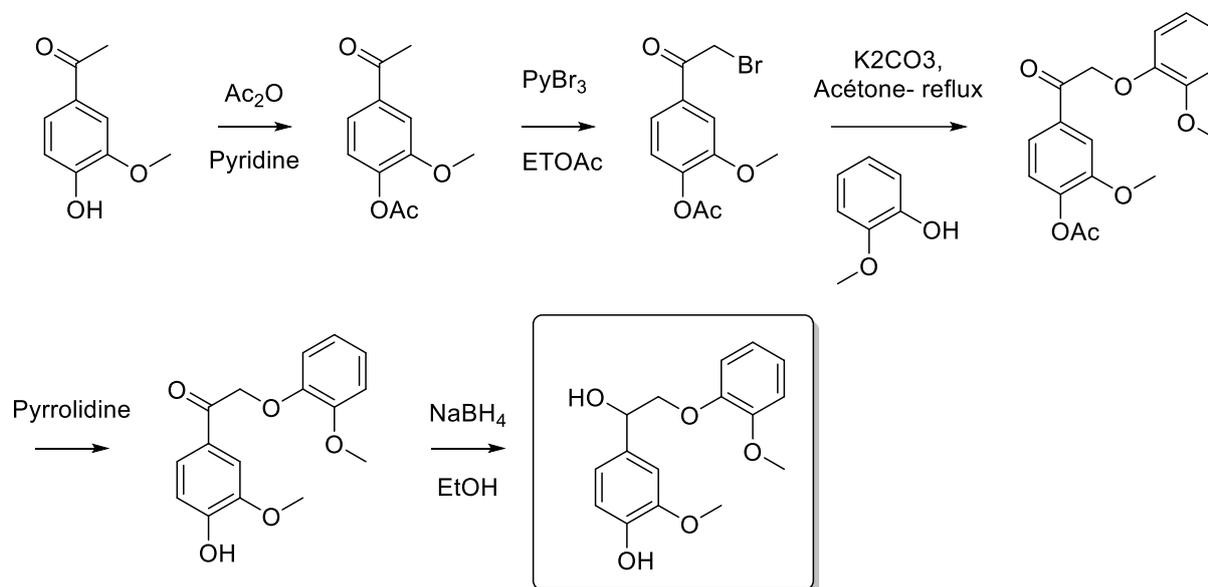
III.2.4. Synthèse de l'alcool vanillique : réduction de la vanilline

La vanilline (15,2 g, 100 mmol) a été ajoutée dans un ballon à fond rond et dissoute dans 40 mL d'une solution de soude à 1M. Le ballon a été placé dans un bain de glace et du NaBH $_4$ (3 g, 79 mmol) finement broyé est ajouté à la solution sur une période de 10 min. Une fois l'ajout terminé, la réaction a été agitée à température ambiante pendant 2 h. Le mélange devient progressivement limpide et se décolore. Le ballon est replacé dans de la glace, et du HCl aqueux 2,5 M a été ajouté goutte à goutte pour décomposer le NaBH $_4$ restant jusqu'à atteindre un pH inférieur à 2. Une poudre blanche est obtenue avec un rendement de 90 %.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6,94 (1H, dd, $J = 8,5 ; 2,7$ Hz, H α), 6,71 (1H, d, $J = 2$ Hz, H β), 6,64 (1H, d, $J = 8$ Hz, H γ), 4,40-4,50 (2H, s, H α), 3,79 (3H, s, OCH $_3$).

III.2.5. Synthèse du modèle dimère β -O-4 réduit

Le composé n'a pas été synthétisé par notre équipe, mais plusieurs voies de synthèses sont reportées dans la littérature, notamment par Zhao *et al.* [2]



III.3. Chapitre 3

III.3.1. Synthèse monomère G [3]

Une solution d'acétovanillone (5 g) dans 70 mL de CHCl_3 est ajoutée à une solution de CuBr_2 (13,4 g, 2 eq) dans 50 mL d'EtOH. Le mélange est porté au reflux durant 4 h, puis filtré, évaporé et séché sous vide durant une nuit. Le produit est dissous dans 75 mL d'acétate d'éthyle et 75 mL de H_2O , décanté, puis séché avec du MgSO_4 . Enfin, le produit est filtré, le solvant évaporé. Le produit est séché sous vide et conduit à un produit violet foncé (6,23 g ; rendement : 85 %).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 2,48 (s, 3H, CH_3) ; 3,83 (s, 3H, OCH_3) ; 4,8 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$) ; 6,87-6,89 (d, 1H, $J = 8,3$; H5) ; 7,47 (d, 1H, $J = 2$; H2) ; 7,55-7,57 (dd, 1H, $J = 2$; $J = 8,3$; H6).

Le même protocole est employé pour la synthèse des monomères H et S, avec comme réactif le 4-hydroxyacétophénone et le 4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl respectivement.

III.3.2. Polymérisation [4]

Après avoir préalablement séché et flammé la verrerie, K_2CO_3 (5 g, 2 eq) est ajouté à une solution agitée de l'acétovanillone bromée (4,9 g) dans du DMF anhydre (35 mL). La réaction est maintenue à 50°C pendant 24 h sous flux de N_2 . Puis le mélange est précipité dans 350 mL d'eau froide, filtré sur Büchner, lavé plusieurs fois avec de l'eau et du méthanol puis lyophilisé. Une poudre marron foncé est obtenue avec un rendement de 91 %.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 7,62-7,64 (m, 1H, H $_6$), 7,49-7,53 (m, 1H, H $_2$), 6,89-6,99 (m, 1H, H $_5$), 5,69 (s, 2H, H $_{\beta}$), 3,87 (s, 3H, OCH $_3$), 2,08 (s, 3H, CH $_3$). RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ 192,7 (C $_{\alpha}$), 152,9 (C $_3$), 149,2 (C $_4$), 122,7 (C $_1$), 112,6 (C $_5$), 111,2 (C $_2$), 70,7 (C $_{\beta}$), 56,2 (OCH $_3$), 26,8 (CH $_3$).

III.3.3. Réduction [4]

À une suspension agitée du polymère (2 g) dans 50 mL de DMSO est ajouté NaBH $_4$ (1,6 g, 4 eq). La réaction est portée à 50°C pendant 24 h. Le mélange est plongé dans 500 mL d'eau froide puis acidifié avec une solution de HCl 2N jusqu'à un pH inférieur à 3. Enfin, le précipité est filtré sur Büchner, lavé avec de l'eau et lyophilisé. Une poudre marron foncé est obtenue avec un rendement de 56 %.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 7,46 (m, 1H, H $_6$), 6,97-7,01 (m, 1H, H $_2$), 6,86-6,89 (m, 1H, H $_5$), 5,37 (m, 1H, C $_{\alpha}$ -OH), 4,80 (m, 1H, C $_{\alpha}$ -H), 3,89 (m, 2H, H $_{\beta}$), 3,72 (s, 3H, OCH $_3$), 1,25 (s, 3H, CH $_3$). RMN ^{13}C : δ 149,2 (C $_3$), 147,8 (C $_4$), 135,8 (C $_1$), 118,8 (C $_6$), 113,6 (C $_5$), 111,2 (C $_2$), 74,6 (C $_{\beta}$), 71,2 (C $_{\alpha}$), 55,9 (OCH $_3$), 26,5 (CH $_3$).

III.3.4. Synthèse du férulate d'éthyle à partir de l'acide férulique

Quelques gouttes de H $_2$ SO $_4$ concentré ont été ajoutées à une solution agitée d'acide férulique (0,25 g ; 1,28 mmol) dans de l'éthanol (50 mL). Le milieu réactionnel a été chauffé à reflux pendant 48 h. Après refroidissement à température ambiante, l'éthanol a été évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue a été solubilisée dans de l'acétate d'éthyle (250 mL). L'huile a été lavée avec une solution de NaHCO $_3$ (2 x 100 mL) et de brine (50 mL). La phase organique a ensuite été séchée sur du MgSO $_4$ anhydre et séchée sous vide. Une poudre blanche est obtenue avec un rendement de 95 %.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 9,58 (1H, s, OH), 7,56 (1H, d, J = 17 Hz, H $_6$), 7,32 (1H, d, J = 2 Hz, H $_{\alpha}$), 7,10 (1H, dd, J = 2 ; 8 Hz, H $_2$), 6,78 (1H, d, J = 8 Hz, H $_5$), 6,47 (1H, d, J = 16 Hz, H $_{\beta}$), 4,17 (2H, q, J = 7,1 Hz, H $_a$), 3,81 (3H, s, OCH $_3$), 1,25 (3H, t, J = 7,1 Hz, H $_b$).

III.3.5. Synthèse de l'alcool coniférylique à partir du férulate d'éthyle.

La procédure de Quideau et Ralph a été employée. [5] Le férulate d'éthyle (10 g, 45 mmol) mis en solution dans du toluène (100 mL, fraîchement distillé) a été refroidi dans un bain de glace-eau, le tout sous atmosphère d'azote. L'hydruure de diisobutylaluminium (4,2 eq) dans du toluène a été lentement ajouté à l'aide d'une seringue sur environ 10 minutes. Une fois l'ajout terminé, l'agitation a été maintenue pendant 1 h. Le mélange réactionnel a ensuite été soigneusement neutralisé avec 50 mL d'éthanol. Les solvants ont été partiellement évaporés sous vide à 40 °C. De l'eau (50 mL) est ajoutée, et la phase aqueuse, contenant un précipité gélatineux de sels d'aluminium, est extraite avec de l'acétate d'éthyle (4 x 150 mL). Les couches organiques combinées ont été séchées avec du MgSO $_4$ et évaporées à sec sous vide à 35 °C pour obtenir de

l'alcool coniférylique, généralement sous forme de solide blanc-jaune pâle avec un rendement de 64 %.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 8,98 (1H, s, OH) ; 6,99 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6), 6,79 (1H, dd, $J = 2 ; 8$ Hz, H2), 6,71 (1H, d, $J = 8$ Hz, H α), 6,42 (1H, d, $J = 15,6$ Hz, H5), 6,18 (1H, m, H β), 4,75 (1H, t, $J = 5,6$ Hz, γOH) (s), 4,07 (2H, td, $J = 5,5 ; 1,5$ Hz, H γ), 3,77 (3H, s, OCH $_3$).

III.3.6. Synthèse des déhydropolymères (DHPs)

- Première méthode : avec une peroxydase [6]

Trois solutions ont été préparées sous atmosphère d'azote comme suit.

(1) La peroxydase (HRP type VI, 250-330 U/mg, 18 mg, Sigma) a été dissoute dans 250 mL de tampon phosphate (pH 6 ; 33 mM).

(2) L'alcool coniférylique (2 g, 11 mmol) a été dissous dans 30 mL d'acétone et 100 mL de tampon phosphate.

(3) Le peroxyde d'hydrogène (3 mL, 30 %, 87,6 mmol) a été mélangé à 100 mL de tampon phosphate.

Les solutions (2) et (3) ont été ajoutées simultanément à la solution (1) au même débit goutte-à-goutte, selon la méthode Zutropf (ZT DHP), à raison de 5 mL/h pendant 26 h. Après l'ajout complet, le mélange a été laissé sous agitation pendant 16 h supplémentaires. Le précipité formé a été récupéré par centrifugation, puis lavé trois fois avec 50 mL d'eau ultrapure. Le polymère obtenu a été solubilisé dans du méthanol et séché sous vide. Une poudre beige est obtenue avec un rendement de 38 %.

- Seconde méthode : avec une laccase [7]

(1) : 544 mg de laccase *d'Aspergillus* de Sigma (Activité mesurée = 10,3 U/mg) ont été ajoutés à 50 mL de tampon phosphate (pH = 6, ; 33 mM) préparé avec de l'eau milli-Q et un bullage d'oxygène a été ajouté.

(2) : 1 g d'alcool coniférylique a été dissous dans 15 mL d'acétone et 50 mL de tampon phosphate. Méthode Zutropf (ZT DHP) : La solution 2 est ajoutée goutte à goutte à raison de 5 mL/h dans la solution 1. Après addition complète, le mélange réagit pendant 16 h supplémentaires. 544 mg supplémentaires de laccase ont été ajoutés et la réaction a été poursuivie pendant 24 h. Le mélange réactionnel a été extrait par agitation avec du 1,2-dichloroéthane. Le polymère DHP de couleur beige-orangé précipite à l'ajout du dichloroéthane, il est filtré et purifié. Un rendement de 67 % est obtenu.

III.4. Chapitre 5

III.4.1. Acétylation des échantillons de lignine :

Dans un flacon contenant environ 50 mg d'échantillons de lignine, 1 mL de pyridine et 1 mL d'anhydride acétique ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant 24 h à température ambiante, puis précipité dans une solution aqueuse de HCl (pH = 2). Le précipité obtenu a été centrifugé et lavé plusieurs fois avec la solution aqueuse de HCl. Le résidu a ensuite été séché dans une étuve sous vide à 40 °C pendant toute la nuit. L'avancement de l'acétylation peut être suivi par spectroscopie IRTF, en observant l'apparition des bandes caractéristiques des groupes acétyles autour de 1740 cm⁻¹ (vibration C=O).

III.4.2. Réaction de Dakin sur des échantillons de lignine

300 mg de lignine sont solubilisés dans 10 mL d'eau distillée. La solution est amenée à pH 12 avec une solution de NaOH 1 M. Puis, 1 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30 % est ajouté et le mélange est agité à 90°C pendant 12 heures. À la fin de la réaction, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est repris dans le méthanol, centrifugé pour éliminer les sels insolubles et séché sous vide.

III.4.3. Titrage de la lignine

Le titrage de la fraction soluble de lignine est réalisé grâce à une burette TITRONIC® 300. Les échantillons de lignine traitée par enzyme ainsi que les échantillons témoins sont concentrés à 25 g/L. Ils sont titrés avec une solution d'acide chlorhydrique Titripur® à 0,01 M. La sonde pH est calibrée grâce à deux solutions de pH 4 et 7, et la burette est rincée deux fois avec l'acide chlorhydrique. La variation du pH en fonction de la quantité d'HCl ajoutée par millimole de lignine a ensuite été tracée.

IV. Références bibliographiques

- [1] D. Venturini, B. Pastrello, M. L. Zeraik, I. Pauli, A. D. Andricopulo, L. C. Silva-Filho, V. S. Bolzani, N. H. Morgon, A. R. da Souza, V. F. Ximenes, *RSC Advances*. **2015**, 5 (76), 62220–62228. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA10960D>.
- [2] C. Zhao, J. Huang, L. Yang, F. Yue, F. Lu, *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **2019**, 58 (14), 5707–5714. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00499>.
- [3] A. Joy, S. Sun, *Substituted Phenacyl Molecules and Photoresponsive Polymers*, United States US9353214B2, **2016**.
- [4] T. Kishimoto, Y. Uraki, M. Ubukata, *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2005**, 3 (6), 1067–1073. DOI: <https://doi.org/10.1039/B416699J>.
- [5] S. Quideau, J. Ralph, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40 (7), 1108–1110. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00019a003>.
- [6] B. Cathala, B. Saake, O. Faix, B. Monties, *Polymer Degradation and Stability*. **1998**, 59 (1–3), 65–69. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00161-4).
- [7] K. Okusa, T. Miyakoshi, C.-L. Chen, *Holzforschung*. **1996**, 50 (1), 15–23. DOI: <https://doi.org/10.1515/Holzforschung.1996.50.1.15>.

Conclusion générale

L'objectif principal de ces travaux de thèse portait sur la compréhension de l'action d'une bilirubine oxydase sur la structure de la lignine.

L'étude de modèles phénoliques monomères a permis de montrer la capacité de la BOD à procéder au couplage oxydant de la plupart des phénols. En fonction de la substitution en ortho et en para du phénol, il est observé une dimérisation, oligomérisation, polymérisation, une simple oxydation ou aucune action de l'enzyme sur le substrat. Il a également été montré que le bore présent dans le tampon borate à pH 10 utilisé pour les traitements enzymatique affectait la structure des produits du traitement. En effet, les espèces boratées complexent les biphényles formés lors du couplage oxydant.

Afin d'étudier des modèles plus complexes qui seraient plus représentatifs de la structure de la lignine, des polymères ont été synthétisés. Ils modélisent la fonction β -O-4 de manière plus ou moins simplifiée. Une fois synthétisés et caractérisés, ces polymères ont été soumis à un traitement enzymatique dans différents systèmes de solvant : tampon borate à pH 10 ou mélange eau/acétone (80/20 v :v). Ce second chapitre expérimental a mis en lumière la possible oxydation de l'hydroxyle en α par l'enzyme, mais les conclusions étaient entravées par la difficulté de solubilisation des polymères dans des systèmes de solvant compatibles avec la BOD et son activité.

Le quatrième chapitre a porté sur la caractérisation de la lignine Kraft Indulin AT utilisée tout au long de cette étude, et sur l'impact de sa dissolution dans différents solvants et tampons. L'effet complexant du bore a également été observé sur les chaînes de lignine. L'ajout de la BOD dans le système a entraîné une augmentation des masses molaires, aussi bien dans la fraction soluble que dans la fraction insoluble. Des études cinétiques ont été réalisées et plusieurs paramètres expérimentaux ont été explorés (température, flux d'oxygène, présence de médiateurs, différents tampons, etc.). Malgré certaines limitations analytiques, il a été conclu que la BOD permet le couplage oxydant de la lignine Kraft, probablement *via* un couplage de type 5-5' et 4-O-5'.

La Figure VII-0 illustre les principaux résultats de cette thèse.

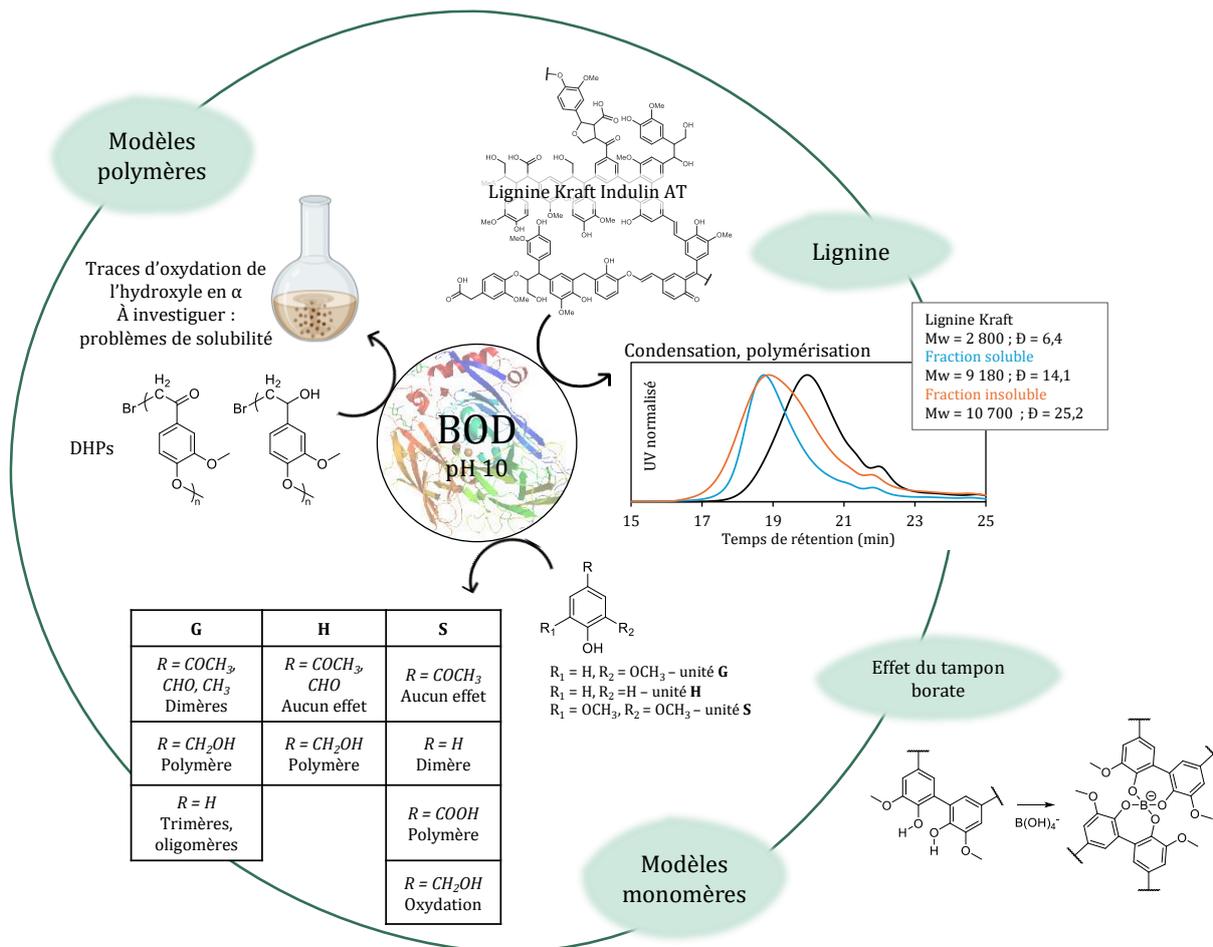


Figure VII-0 : Action de la BOD sur différents composés : modèles monomères et polymères ainsi que lignine Kraft Indulin AT. Illustration de l'effet du tampon borate.

Perspectives

Problèmes de solubilité rencontrés

Pour les perspectives du projet, la première piste majeure consisterait à modifier le tampon utilisé pour les réactions enzymatiques en adoptant un tampon carbonate à pH 10. Ce changement permettrait d'explorer, dans le cadre du projet ANR, si les fractions solubles obtenues pourraient être utilisées pour la production de fibres de carbone, et d'évaluer si leurs propriétés sont comparables à celles produites avec le tampon borate. Par ailleurs, la littérature suggère que les tampons basiques utilisés pour travailler avec des laccases alcaliphiles incluent souvent des solutions aqueuses de NaOH, ajustées régulièrement à pH 9, 10 ou 10,5, ou encore des tampons glycinate de sodium. [1-7] Le traitement du milieu réactionnel à la fin du traitement enzymatique est également différent : une grande partie des études procède à la précipitation de la fraction polymérisée dans une solution acide. Ces alternatives pourraient être employées afin de s'affranchir de tout tampon.

De plus, il serait pertinent de se pencher sur les problèmes de solubilité rencontrés lors du traitement des modèles oligomères et polymères. L'utilisation de liquides ioniques ou d'autres solvants alternatifs pourrait représenter une solution intéressante, à condition que la BOD tolère ces environnements. Un article récent s'intéresse d'ailleurs aux interactions entre des laccases et des liquides ioniques, dans l'optique de traiter la lignine, ouvrant ainsi une nouvelle voie d'investigation pour notre projet. [8]

Synthèse de nouveaux modèles

D'autres modèles polymères qui représenteraient plus justement la liaison β -O-4 ou d'autres liaisons présentes (β -5, β - β' , 5-5') dans les lignines techniques, serait également intéressant à synthétiser pour étudier leur traitement avec la BOD, en comparaison avec la laccase en voie acide.

Applications envisageables pour les fractions obtenues

D'autres applications pourraient être envisagées pour valoriser les fractions de lignine solubilisée. Aujourd'hui, leur filage en fibre de carbone est optimisé par les partenaires du projet ANR.

Il pourrait être intéressant d'évaluer les capacités de la lignine polymérisée à former des émulsions, voire même à former des encapsulations de pesticides par exemple. Sipponen et Österberg ont examiné l'utilisation de la lignine pour former des nano et micro-transporteurs ainsi que des particules sphériques. [9, 10] Traditionnellement, la lignine technique est dissoute dans des solvants organiques comme le THF ou l'éthanol, suivie de la formation de particules *via* un anti-solvant, souvent l'eau. Ici, la fraction soluble dans l'eau pourrait agir comme tensioactif, tandis que la fraction insoluble pourrait stabiliser des émulsions de Pickering ou encapsuler des substances d'intérêt.

La lignine polymérisée pourrait être avantageusement utilisée dans les formulations d'adhésifs, notamment pour les panneaux composites, grâce à ses interactions fortes avec d'autres composants. Divers agents réticulant comme les résines phénoliques permettent de copolymériser la lignine pour produire des adhésifs répondant aux normes industrielles. [11] L'utilisation de modifications enzymatiques douces de la lignine pourrait offrir des avantages supplémentaires, notamment une réactivité accrue sans avoir recours à des traitements chimiques sévères, augmentant ainsi la durabilité et la compatibilité des adhésifs à base de lignine avec des applications industrielles écologiques.

Enfin, il pourrait également être intéressant de tester les propriétés adsorbantes de cette lignine. Sa solubilité et sa fonctionnalité pourraient en faire un bon adsorbant pour métaux lourds et contaminants organiques dans les eaux usées. De plus, sa haute masse molaire pourrait créer des

réseaux poreux qui augmenteraient sa surface d'adsorption, améliorant ainsi l'efficacité de la purification. [12, 13]

Références bibliographiques

- [1] S. A. Mayr, R. Subagia, R. Weiss, N. Schwaiger, H. K. Weber, J. Leitner, D. Ribitsch, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22 (23), 13161. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222313161>.
- [2] W. Qiu, H. Chen, *Bioresource Technology*. **2008**, 99 (13), 5480–5484. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.014>.
- [3] Q. Weihua, C. Hongzhang, *Bioresource Technology*. **2008**, 99 (13), 5480–5484. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.014>.
- [4] L. Wang, L. Tan, L. Hu, X. Wang, R. Koppolu, T. Tirri, B. van Bochove, P. Ihalainen, L. S. Seleenmary Sobhanadhas, J. V. Seppälä, et al., *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2021**, 9 (26), 8770–8782. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01576>.
- [5] Z. Lu, J. Tienaho, P. Kilpeläinen, L. Wang, H. Zhang, L. Hu, R. Liu, H. Brännström, E. Halmemies, X. Wang, et al., *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2024**, 12 (23), 8765–8779. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c01611>.
- [6] V. Hämäläinen, T. Grönroos, A. Suonpää, M. W. Heikkilä, B. Romein, P. Ihalainen, S. Malandra, K. R. Birikh, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2018**, 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00020>.
- [7] N. Pajer, M. Gigli, C. Crestini, *ChemSusChem*. **2024**, 17 (15), e202301646. DOI: <https://doi.org/10.1002/cssc.202301646>.
- [8] J. C. Stevens, L. Das, J. K. Mobley, S. O. Asare, B. C. Lynn, D. W. Rodgers, J. Shi, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2019**, 7 (19), 15928–15938. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02151>.
- [9] M. Österberg, M. H. Sipponen, B. D. Mattos, O. J. Rojas, *Green Chemistry*. **2020**, 22 (9), 2712–2733. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0GC00096E>.
- [10] M. H. Sipponen, H. Lange, C. Crestini, A. Henn, M. Österberg, *ChemSusChem*. **2019**, 12 (10), 2039–2054. DOI: <https://doi.org/10.1002/cssc.201900480>.
- [11] A. F. Ang, Z. Ashaari, S. H. Lee, P. Md Tahir, R. Halis, *International Journal of Adhesion and Adhesives*. **2019**, 95, 102408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2019.102408>.
- [12] Y. Ge, Z. Li, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2018**, 6 (5), 7181–7192. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01345>.
- [13] P. Santander, B. Butter, E. Oyarce, M. Yáñez, L.-P. Xiao, J. Sánchez, *Industrial Crops and Products*. **2021**, 167, 113510. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113510>.

Titre : Etude de l'action d'une bilirubine oxydase sur la lignine Kraft en milieu alcalin : caractérisations et étude de modèles

Résumé : La lignine est le biopolymère aromatique le plus abondant sur Terre, mais son hétérogénéité et sa faible solubilité dans les solvants usuels en limitent la valorisation. Cependant, de nombreux efforts de recherche se concentrent sur la valorisation enzymatique de la lignine. Dans ce travail, une fraction de lignine Kraft soluble dans l'eau à pH neutre a été obtenue après traitement enzymatique par la bilirubine oxydase (BOD). La BOD est une enzyme oxydase multicuivre active à pH 10, où la lignine Kraft est soluble. Cette fraction soluble obtenue est utilisée par un partenaire du projet pour filer des fibres de carbone. Dans ce projet de thèse, les modifications structurales induites sur la lignine Kraft Indulin AT, ainsi que sur des modèles de type monomères, oligomères et polymères, ont été analysées. L'effet du tampon borate à pH 10 sur des structures biphényles a été mis en évidence. La capacité de couplage oxydant de la BOD en milieu alcalin a été démontré, menant à la dimérisation des modèles phénoliques et à la polymérisation de la lignine Kraft.

Mots clés : Lignine ; Polymérisation ; Enzymes ; Milieu alcalin.

Title : Study of the action of a bilirubin oxidase on Kraft lignin in alkaline media: characterizations and model study

Abstract : Lignin is the most abundant aromatic biopolymer on Earth, but its heterogeneity and poor solubility in common solvents limit its valorization. However, significant research efforts are focused on enzymatic lignin valorization. In this study, a water-soluble fraction of Kraft lignin was obtained after enzymatic treatment with bilirubin oxidase (BOD), a multicopper oxidase active at pH 10, where Kraft lignin is soluble. This fraction is used by a project partner to spin carbon fibers. Structural modifications in Kraft Indulin AT lignin, along with monomeric, oligomeric, and polymeric models, were analyzed, demonstrating oxidative coupling, phenolic dimerization, and lignin polymerization.

Keywords : Lignin; Polymerization; Enzymes; Alkaline reaction environment.

Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques

16 Avenue Pey Berland, 33600 PESSAC

