



Université de Lille
SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur

Thèse de doctorat
Mention Micro-nanosystèmes et capteurs

Justine DILLIES

Développement d'outils de criblage à haut débit d'enzymes de type oxydoréductases pour la valorisation de lignines

Soutenue le 18 Octobre 2019

Présidée par M. Yannick COFFINIER

Membres du jury :

Rapporteur	M. Gérard MORTHA	Professeur	Grenoble INP-Pagora
Rapporteuse	Mme Gabrielle POTOCKI-VERONESE	Directrice de recherche	TBI Toulouse
Examinatrice	Mme Catherine SARAZIN	Professeure	Université de Picardie
Examineur	M. Yannick COFFINIER	Chargé de recherche CNRS	Université Lille 1 IEMN
Directeur de thèse	M. Vincent SENEZ	Directeur de recherche CNRS	Université Lille 1 IEMN
Co-Directeur de thèse	M. Renato FROIDEVAUX	Professeur	Université Lille 1 ICV
Encadrante	Mme Céline VIVIEN	Maître de conférences	Université Lille 1 IEMN
Invitée	Mme Virginie LE RAVALEC	Ingénieure référent ADEME	ADEME Angers

« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite. Un plein effort est une pleine victoire. »

Gandhi

Remerciements

Ma thèse ayant été effectuée à l'institut Charles Viollette (ICV) ainsi qu'à l'institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) de Villeneuve d'Ascq, je tiens à remercier les directeurs respectifs, Pascal DHULSTER et Lionel BUCHAILLOT de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Merci également aux financeurs de ma thèse : Yncréa et l'ADEME. Merci de m'avoir invitée à effectuer différentes présentations d'avancement de ma thèse au sein de vos établissements. Pour le côté administratif, merci Laetitia PERQUIN (yncréa), Valérie PINEAU (ADEME), Hélène DELSARTE (IEMN), Cathy OUBLION (ICV). Merci à Virginie LE RAVALEC d'avoir été ma référente ADEME et d'avoir fait le déplacement au laboratoire pour assister à ma présentation d'avancement de thèse et de m'avoir accordé mon entrée en 3^{ème} année.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse. Tout d'abord Rénato FROIDEVAUX de m'avoir accueilli à l'ICV pour mon stage de Master dans un premier temps et de m'avoir ensuite proposé d'effectuer cette thèse pluridisciplinaire. Puis, Vincent SENEZ de m'avoir accueillie au sein de l'équipe BioMEMS de l'IEMN qui m'a permis de d'acquérir des connaissances et compétences supplémentaires dans le domaine de la physique et de la microfluidique qui m'étaient inconnus. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces années de thèse pour mener au bout ce sujet complexe.

Un énorme merci à mon encadrante Céline VIVIEN, de m'avoir formée, encadrée, aidée et soutenue tout au long de la thèse face à l'imprimante jet d'encre et la lignine !! Merci pour la joie et la bonne humeur que tu apportes chaque jour et nos nombreux éclats de rires !

Je remercie les différents membres de mon jury, Gabrielle POTOCKI-VERONESE, Catherine SARAZIN, Yannick COFFINIER et Gérard MORTHA d'avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche.

Un énorme merci également à tous ceux qui m'ont aidée à l'avancement de ce projet : Alexis VLANDAS pour tous tes conseils, Gabrielle CHATAIGNE pour tous les échanges que l'on a eu autour de l'HPLC et bien d'autres, Dominique DERESMES pour la partie AFM, Flavie BRAUD pour l'Ellipsométrie, Barbara DERACINOIS, Mickaël CHEVALIER et Christophe FLAHAUT pour votre aide sur la partie MALDI, Egon HEUSON pour les idées et

ton partage de connaissance en enzymologie et Caroline CIENESKI-BERNARD pour ton investissement dans la partie purification d'enzymes, même si cela n'a pas abouti. Merci également à tous ceux que j'ai pu croiser au cours des différents congrès pour vos échanges, vos idées et encouragements.

Merci à l'ensemble de mes collègues différents laboratoires : Corinne, Camille, Alexandre Berth, Alice, Kalim, Elodie, Rémi, etc. Sans oublier mes plus proches collègues / amis d'avant thèse ou qui le sont devenu au cours de la thèse : Sandy (inséparables depuis le stage 😊), Barbara (notre maman du bureau qui apporte joie et bonne humeur 😊), Alexandre (merci pour les pauses côte d'or 😊), Tiffany, Léanna et Laetitia. Merci d'avoir été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments (et les très mauvais aussi... 😊).

Le meilleur pour la fin : je remercie ma famille d'avoir été présente. Mais surtout mon amour (Mickaël) d'être entré dans ma vie au pire moment pour l'illuminer et de m'avoir offert le plus beau cadeau, notre fille Léa, même si cela à décaler la date soutenance, cela valait le coup 😊. Merci pour ta patience, l'amour que tu me portes et surtout un énorme merci de m'avoir soutenue et encouragée pour aller jusqu'au bout de cette thèse. Je t'aime.

Résumé

L'augmentation du prix des ressources fossiles, l'incertitude quant à leur disponibilité à long terme et les préoccupations environnementales orientent les recherches vers l'exploitation de matières premières abondantes, renouvelables et ayant un potentiel de valorisation à haute valeur ajoutée. Des technologies alternatives sont également recherchées dans le but de réduire les atteintes à l'environnement, notamment en termes d'émissions de dioxyde de carbone. La biomasse lignocellulosique entre dans ces critères et sa valorisation suscite beaucoup d'intérêt au cours de ces dernières années (la lignine principalement qui est le deuxième composé le plus abondant de la biomasse lignocellulosique après l'hémicellulose). La lignine est un polymère phénolique complexe mais récalcitrant à cause de son insolubilité dans les milieux aqueux. Sa valorisation par dépolymérisation enzymatique représente donc un enjeu majeur dans le but d'obtenir des composés de faibles masses moléculaires à haute valeur ajoutée tel que la vanilline. La dépolymérisation enzymatique de la lignine nécessite l'utilisation de médiateur(s) qui sont de petites molécules jouant le rôle d'intermédiaire dans la réaction d'oxydation de la laccase (appelé le « Système Laccase-Médiateur » (LMS)). Une très grande diversité de lignines, d'enzymes ainsi que de médiateurs sont présents de par leur source très variées, ce qui rend nécessaire de développer des outils permettant le criblage de toutes ces conditions enzymatiques sur les lignines. Cependant, l'insolubilité des lignines dans les milieux aqueux (milieu d'activité optimal pour les réactions enzymatiques) rend difficile leur dépolymérisation enzymatique en milieu liquide. Dans ces conditions, nous avons développé un outil de criblage enzymatique permettant de visualiser une dépolymérisation enzymatique en milieu solide (lignine sous forme de films solides ou de micro-dépôts solides). La lignine sous forme de films solides a été réalisée par la technique du spin-coating et sous forme de micro-dépôts solides par la technologie d'impression jet d'encre.

Mots clés : lignine, dépolymérisation enzymatique, laccase, films solides, impression jet d'encre.

Abstract

The increase in the price of fossil fuels, the uncertainty of their long-term availability and environmental concerns are guiding research towards the exploitation of abundant, renewable raw materials with a high added value potential. Alternative technologies are also being sought to reduce environmental damage, particularly in terms of carbon dioxide emissions. Lignocellulosic biomass falls within these criteria and its valorization is of great interest in recent years (mainly lignin, which is the second most abundant compound of lignocellulosic biomass after hemicellulose). Lignin is a complex phenolic polymer but recalcitrant because of its insolubility in aqueous media. Its valorization by enzymatic depolymerization thus represents a major challenge in order to obtain compounds of low molecular weight with high added value such as vanillin. The enzymatic depolymerization of lignin requires the use of mediator(s) which are small molecules acting as intermediates in the laccase oxidation reaction (called "Laccase-Mediator System" (LMS)). A great diversity of lignins, enzymes and mediators are present from their very varied source, which makes it necessary to develop tools to screen all these enzymatic conditions on lignins. However, the insolubility of lignins in aqueous media (optimal activity medium for enzymatic reactions) makes their enzymatic depolymerization in liquid medium difficult. Under these conditions, we developed an enzymatic screening tool to visualize an enzymatic depolymerization in solid medium (lignin in the form of solid films or solid micro-deposits). Lignin in the form of solid films has been produced by the spin-coating technique and in the form of solid micro-deposits by inkjet printing technology.

Key words : lignin, enzymatic depolymerization, laccase, solid films, inkjet printing.

Abréviations

- **3-HAA** : 3-hydroxyanthranilate
- **ABTS** : 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
- **ACN** : Acétonitrile
- **AFM** : « Atomic Force Microscopy »
- **BSA** : Bovine serum albumin
- **BTX** : Fraction Butane, Toluène et Xylène
- **C₄F₈** : Octafluorocyclobutane
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **EDI** : Eau déionisée
- **ESI-IM-IM** : Electrospray ionization ion mobility mass spectrometry
- **GOT** : Glucose oxydase
- **GPC** : « Gel Permeation Chromatography », Chromatographie de perméation de gel ou chromatographie d'exclusion stérique
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- **HBT** : 1-hydroxybenzotriazole
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- **HRP** : Horseradish peroxidase
- **ICP** : Induced Coupled Plasma
- **IgG** : Immunoglobuline G
- **IJE** : Impression Jet d'Encre
- **IMS** : « Ion Mobility Spectrometry »
- **ITO** : Oxyde d'indium-étain
- **LK** : Lignine Kraft
- **LO** : Lignine Organosolv
- **LS** : LignoSulfonate de sodium
- **PAH** : Polyalylamine hydrochloride
- **PDMS** : Polydiméthylsiloxane
- **PEDOT/PSS** : poly(3,4-ethylenedioxythiophene/polystyrene sulfonic acid
- **PFTS** : Perfluorooctyltrichlorosilane
- **PSS** : Polymer Standards Service GmbH
- **PZT** : Piézoélectrique
- **SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate
- **Silane** : 3-(Méthacryloyloxy)propyl]triméthoxysilane
- **STS** : Surface Technology System
- **TEMPO** : 2,2,6,6-Tetraméthyl-1-piperidinyloxy, free radical, 2,2,6,6-Tetraméthylpiperidine 1-oxyl
- **THF** : Tétrahydrofurane
- **TMSPMA** : 3-(triméthylsilyl)propylméthacrylate
- **U** : Unité enzymatique

Sommaire

Remerciements	i
Résumé	iii
Abstract	iv
Abréviations	v
Sommaire	vi
Introduction générale.....	1
Chapitre I. Introduction bibliographique	8
I. 1. Structure moléculaire de la lignine	8
I. 2. Les différents procédés d'extraction	10
I.2.1. Procédé Kraft	11
I.2.2. Procédé aux sulfites	12
I.2.3. Procédé Organosolv.....	13
I. 3. Applications – Enjeux de valorisation	14
I.3.1. Application à faible valeur ajoutée	15
I.3.2. Application à haute valeur ajoutée	16
I. 4. Voies de dépolymérisation des lignines.....	18
I.4.1. Voie chimique.....	18
I.4.1.1. La catalyse thermochimique	18
I.4.1.2. La catalyse réductrice	20
I.4.1.3. La catalyse oxydante	20
I.4.2. Voie enzymatique	21
I.4.2.1. Les peroxydases.....	22
I.4.2.2. Les laccases	25
I.4.2.3. Le système Laccase-Médiateur (LMS).....	27
I. 5. Criblage d'activités de dépolymérisation enzymatique de lignines.....	29
I. 6. La technologie d'impression jet d'encre	30

I. 7. Objectifs de la thèse	34
Chapitre II. Matériel et méthodes	37
II. 1. Réactifs	37
II. 2. Etude de la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu liquide	37
II.2.1. Mesure de l'activité enzymatique.....	37
II.2.2. Conditions de réaction de dépolymérisation en phase liquide.....	38
II.2.3. Analyse de la lignine et des produits issus de la réaction de dépolymérisation par Gel Permeation Chromatography (GPC)	39
II.2.4. Analyse de la lignine et des produits issus de la réaction de dépolymérisation par spectrométrie de masse : ESI-IM-MS	40
II.2.4.1. Collecte des échantillons	40
II.2.4.2. Analyse par spectrométrie de masse	42
II. 3. Etude de la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu solide	43
II.3.1. Réalisation de films de lignines par enduction centrifuge (ou spin-coating) .	43
II.3.2. Conditions de réaction de dépolymérisation en milieu solide	44
II.3.3. Mesure de l'épaisseur des films par ellipsométrie.....	46
II.3.4. Réalisation de micro-dépôts de lignines par impression jet d'encre	46
II.3.4.1. Préparation des encres de lignine	46
II.3.4.2. Préparation des supports d'impression.....	46
II.3.4.3. Paramètres d'impression	47
II.3.5. Mesure de l'épaisseur des dots imprimés par AFM	49
Chapitre III. Etude de la possibilité d'effectuer des films solides de lignines.....	52
III. 1. Principe de la dépolymérisation enzymatique en milieu solide.....	52
III. 2. Solubilité des lignines	54
III. 3. Etude de la capacité filmogène des lignines et de la stabilité des films obtenus par spin-coating.....	56
III. 4. Etude de la capacité de dépolymérisation enzymatique des films solides obtenus par spin-coating.....	63

Chapitre IV. Etude de la dépolymérisation enzymatique de lignines industrielles en milieu liquide et solide	72
IV. 1. Mise au point d'une méthode d'analyse de la lignine par Gel Permeation Chromatography (GPC)	72
IV.1.1. Point bibliographique	72
IV.1.2. Calibration des colonnes	74
IV.1.3. Détermination de la masse molaire des lignines industrielles	75
IV. 2. Paramètres influençant l'activité enzymatique : laccase issue de <i>Trametes versicolor</i>	77
IV.2.1. Influence du pH sur l'activité enzymatique de la laccase	77
IV.2.2. Influence de la température sur l'activité enzymatique de la laccase	78
IV.2.3. Influence de la présence de solvants organiques sur l'activité enzymatique de la laccase	78
IV. 4. Preuve de la dépolymérisation enzymatique en milieu liquide	80
IV.4.1. Utilisation de l'enzyme seule	80
IV.4.2. Utilisation du système laccase-médiateur (LMS)	82
IV.4.3. Spectrométrie de masse	88
IV.4.4. Mise en place de l'outil de criblage sur lignine en milieu liquide	93
IV.4.5. Mise en place de l'outil de criblage sur films obtenus par spin-coating	103
IV.4.5.1. Observation à l'œil nu et mesures ellipsométriques	103
IV.4.5.2. Analyses GPC	105
IV. 1. Conclusion - Discussion	115
Chapitre V. Vers un outil haut débit : impression jet d'encre	120
V. 1. Généralités sur l'impression jet d'encre	120
V. 2. Impression de micro-dépôts de lignines	124
V.2.1. Réglages des paramètres d'impression	124
V.2.2. Supports d'impression	125
V.2.3. Ajustement de l'encre	127

V.2.3.1. Utilisation de l'isopropanol comme co-solvant	127
V.2.3.2. Utilisation du DMSO comme co-solvant.....	129
V.2.4. Conclusion	131
V. 3. Tests enzymatiques	131
V.3.1. Etude visuelle après réaction enzymatique.....	131
V.3.2. Visualisation par AFM après réaction enzymatique.....	135
V. 4. Conclusion - Discussion	138
Conclusion générale et perspectives	140
Références bibliographiques	145
Liste des figures et tableaux	155

Introduction générale

L'augmentation du prix des ressources fossiles, l'incertitude quant à leur disponibilité à long terme et les préoccupations environnementales orientent les recherches vers l'exploitation de matières premières abondantes, renouvelables et ayant un potentiel de valorisation à haute valeur ajoutée. Des technologies alternatives sont également recherchées dans le but de réduire les atteintes à l'environnement, notamment en termes d'émissions de dioxyde de carbone. La biomasse lignocellulosique entre dans ces critères et sa valorisation (la lignine principalement) suscite beaucoup d'intérêt au cours de ces dernières années.

La biomasse lignocellulosique est une matrice complexe regroupant un ensemble de polymères constitutifs des parois cellulaires des plantes. Les parois cellulaires végétales ont pour rôle principal de définir la taille et la forme des différents types de cellules nécessaires à la formation des tissus et des organes de la plante. Leur localisation entre les cellules leur confère également un rôle important dans la communication inter-cellulaire, l'intégrité structurale, la médiation des signaux et la protection de la cellule contre les différents stress extérieurs. Les parois cellulaires des végétaux sont constituées de quatre éléments : la cellulose (40-50% de la biomasse végétale), les hémicelluloses (20-35%), la lignine (15-35%) et les extractibles (3-10%) représentant la biomasse lignocellulosique (1). La lignine a pour rôle de former une matrice autour des microfibrilles de cellulose pour assurer le renfort et le maintien de la paroi végétale (Figure 1). La cellulose est un polymère linéaire de forte masse moléculaire constitué de chaînes linéaires de D-glucose reliées de façon parallèles entre elles par des liaisons hydrogènes. L'hémicellulose est un polymère linéaire, de plus faible masse moléculaire que la cellulose, constitué de pentoses (xylose, arabinose), d'hexoses (glucose, mannose, galactose) ainsi qu'un heptose (l'acide 4-O-méthyl glucuronique) (2). La lignine est un polymère phénolique constitué de trois unités de base branchées de façon totalement aléatoire (para-hydroxyphenyl, guaiacyl et syrynyl). Dans la plante, les hémicelluloses ont un rôle de pontage entre la cellulose et la lignine. Les extractibles sont des molécules de plus faibles masses molaires dont le rôle principal est d'empêcher la décomposition du végétal. La plupart des recherches se concentrent sur la valorisation de la cellulose et des hémicelluloses car ce sont des composés plus facilement extractibles et exploitables en comparaison à la lignine (3).

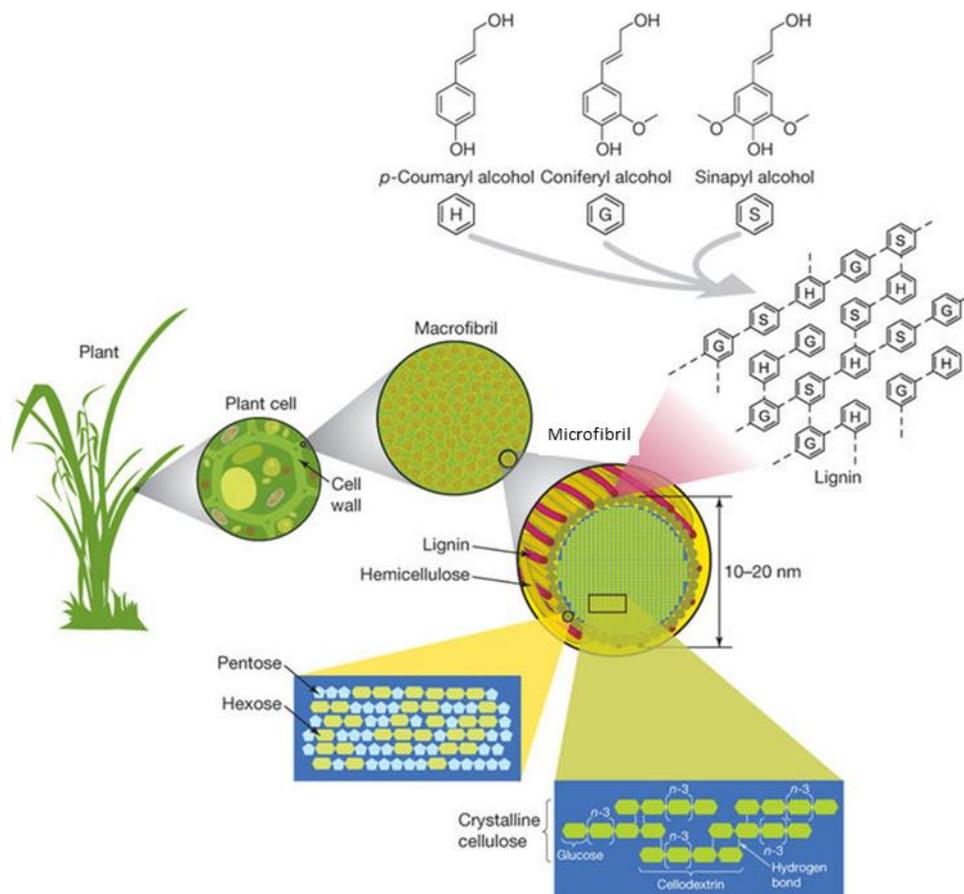


Figure 1 : Structure de la paroi cellulaire végétale et de ses composants (4).

Actuellement, l'industrie papetière produit 50 millions de tonnes de lignine en tant que co-produit (5). Cette lignine est principalement utilisée comme combustible afin de générer de l'énergie pour les industries papetières ainsi que comme additif pour le ciment et est donc très peu valorisée. La lignine est une biomasse récalcitrante mais représente un enjeu majeur de valorisation en raison de son fort potentiel grâce à son abondance, son aspect renouvelable, sa structure qui fait d'elle une grande source de composés aromatiques très prisés dans divers domaines tels que celui de la chimie. La valorisation de la lignine nécessite sa dépolymérisation afin d'obtenir des composés aromatiques de faibles masses moléculaires tels que le phénol, le BTX (Benzène, Toluène, Xylène), la vanilline, etc. La dépolymérisation de la lignine par voie chimique est largement rapportée dans la littérature actuelle et est la seule voie permettant la production de vanilline à l'échelle industrielle, composé à haute valeur ajoutée. Devant l'impact environnemental des procédés chimiques, les recherches s'orientent de plus en plus vers des procédés plus respectueux de l'environnement. C'est dans cette optique que les procédés enzymatiques font l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Cependant, la faible solubilité des lignines dans les milieux aqueux (milieu d'activité optimal pour les réactions enzymatiques) rend difficile sa valorisation par voie enzymatique. De plus, devant une très

grande diversité de lignines et d'enzymes, il y a une nécessité de développer des outils permettant le criblage de toutes ces conditions enzymatiques sur les lignines. Malheureusement, à l'heure actuelle, aucune méthode ne permet le criblage enzymatique sur les lignines directement.

La technologie d'impression jet d'encre n'est plus limitée à l'impression de texte sur des feuilles de papier, mais elle a été développée pour des domaines très variés. Parmi ces domaines nous trouvons des applications en tant que biocapteurs. C'est un outil permettant d'effectuer des dépôts solides d'un volume de l'ordre du picolitre à partir de solutions appelées « encre ». L'impression d'un très grand nombre d'échantillons est alors possible ainsi que des dépôts d'échantillons de compositions différentes, ce qui fait de cette technologie un outil à haut débit de production. L'impression de lignine à partir de solutions organiques pour obtenir des dépôts solides pourrait être alors possible. Ce qui permettrait de résoudre une grande partie des problèmes liés à la dépolymérisation de la lignine présents en milieu liquide, notamment les problèmes liés à sa solubilité.

L'objectif de ce travail de thèse a été dans un premier temps de démontrer la dépolymérisation enzymatique des trois principales lignines industrielles (Lignine Kraft, Lignosulfonate et Lignine Organosolv) par voie enzymatique en milieu liquide. Dans un deuxième temps de démontrer la possibilité d'obtenir des dépôts solides de lignines industrielles par le biais de l'enduction centrifuge à partir de solutions de lignines solubilisées dans des solvants organiques permettant leur solubilisation. Cette dernière permet une étude préliminaire car c'est une méthode beaucoup plus simple par rapport à l'impression jet d'encre. En effet, le dépôt est réalisé par simple étalement de la solution grâce à une force centrifuge. Dans un troisième temps d'étudier la dépolymérisation enzymatique de la lignine sous forme de dépôts solides (appelée ici catalyse en milieu solide). Le dernier objectif a été d'étudier la réalisation de micro-dépôts de lignine par impression jet d'encre suivie de la catalyse en milieu solide sur ces micro-dépôts.

Ce manuscrit est constitué de cinq chapitres. Le premier chapitre est une introduction bibliographique qui présente la structure des trois principales lignines, les différents procédés d'extraction, les applications de la lignine à faible et haute valeur ajoutée, les différentes voies de valorisations (chimiques et enzymatiques) ainsi que la technologie d'impression jet d'encre. Le second chapitre détaille les méthodes expérimentales utilisées lors de ce travail de thèse. Les

chapitres trois à cinq présentent les différents résultats obtenus pour répondre aux objectifs définis précédemment ainsi que les discussions. Le troisième chapitre présente la réalisation de films solides de lignines par spin-coating ainsi que des premiers tests de dépolymérisation enzymatique de ces derniers. Le quatrième chapitre montre les résultats obtenus concernant la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu liquide et solide dans le but de mettre en place l'outil de criblage. Le cinquième chapitre présente les résultats de dépôts solides de lignines obtenus par impression jet d'encre ainsi que ceux issus de leur catalyse enzymatique.

Chapitre I : Introduction bibliographique

Ce chapitre d'introduction bibliographique présente dans un premier temps la structure moléculaire de la lignine. Ensuite, les trois principaux procédés d'extraction de la lignine à partir de la biomasse lignocellulosique sont exposés. Un paragraphe présente ensuite les applications actuelles utilisant la lignine ainsi que les applications possibles à moyen et long terme. Une voie de valorisation de la lignine nécessite sa dépolymérisation afin d'obtenir des composés de faible masses moléculaires à plus haute valeur ajoutée. Les deux voies principales de valorisation par dépolymérisation des lignines sont donc présentées. Tout d'abord, la voie chimique qui permet la production de vanilline à l'échelle industrielle, pourtant très énergivore. Dans un souci d'aller vers des procédés plus respectueux de l'environnement, la voie enzymatique suscite beaucoup d'intérêts. Cependant, la faible solubilité des lignines dans les milieux aqueux (milieu d'activité optimal pour les réactions enzymatiques) rend difficile sa valorisation par voie enzymatique. De plus, devant une très grande diversité de lignines et d'enzymes, il y a une nécessité de développer des outils permettant le criblage de toutes ces conditions enzymatiques sur les lignines. Malheureusement, à l'heure actuelle, aucune méthode ne permet le criblage enzymatique sur les lignines directement. La technologie d'impression jet d'encre est présentée dans un dernier paragraphe avant de définir les objectifs de la thèse. En effet, cette technologie permettrait de résoudre une grande partie des problèmes liés à la dépolymérisation de la lignine existants en milieu liquide.

Chapitre I. Introduction bibliographique	8
I. 1. Structure moléculaire de la lignine	8
I. 2. Les différents procédés d'extraction	10
I.2.1. Procédé Kraft	11
I.2.2. Procédé aux sulfites	12
I.2.3. Procédé Organosolv	13
I. 3. Applications – Enjeux de valorisation	14
I.3.1. Application à faible valeur ajoutée	15
I.3.2. Application à haute valeur ajoutée	16
I. 4. Voies de dépolymérisation des lignines	18
I.4.1. Voie chimique	18
I.4.1.1. La catalyse thermochimique	18
I.4.1.2. La catalyse réductrice	20
I.4.1.3. La catalyse oxydante	20
I.4.2. Voie enzymatique	21
I.4.2.1. Les peroxydases	22
I.4.2.2. Les laccases	25
I.4.2.3. Le système Laccase-Médiateur (LMS)	27
I. 5. Criblage d'activités de dépolymérisation enzymatique de lignines	29
I. 6. La technologie d'impression jet d'encre	30
I. 7. Objectifs de la thèse	34

Chapitre I. Introduction bibliographique

I. 1. Structure moléculaire de la lignine

La lignine est le terme générique pour désigner un vaste groupe de polymères aromatiques. Elle constitue le principal groupe de polymères à squelette aromatique. Constituée de trois unités de base, elle forme une structure tridimensionnelle complexe, irrégulière et de forte masse molaire. Ces trois sous unités, dont leur structure est présentée en *Figure 2*, sont le para-hydroxyphenyl (unité H), le Guaiacyl (unité G) et le Syringyl (unité S). Elles se distinguent par leur degré de méthylation en position 3 et 5 du cycle aromatique.

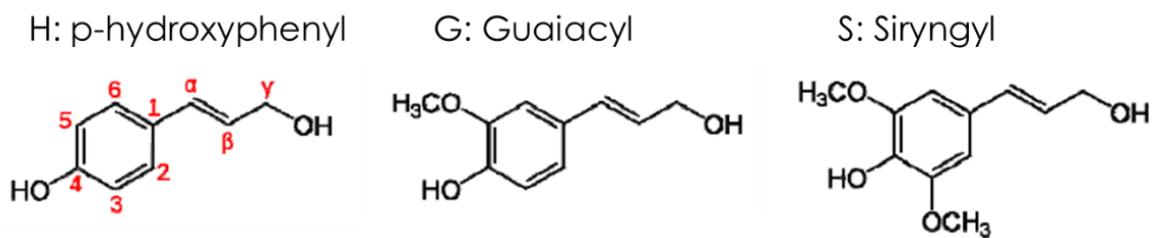


Figure 2 : Structure chimique des sous-unités de base du polymère de lignine (5).

Ces sous-unités sont connectées de façon aléatoire au sein du polymère, laissant place à une grande diversité structurale de lignines. En effet, la structure de la lignine va varier en fonction de beaucoup de paramètres différents comme l'espèce dont elle est issue (résineux, feuillus, plantes herbacées), du tissu, de l'âge de la cellule, des différents procédés d'extraction papetiers, etc. (6). Tous ces paramètres vont influencer la proportion de ces trois unités de base au sein de la lignine. Les lignines issues de résineux sont majoritairement composées d'unités G (95%), celles de feuillus possèdent à la fois les unités G et S et celles issues des herbacées sont également constituées d'unités G et S mais elles contiennent également des petites proportions d'unités H. La *Figure 3* présente un exemple de structure de lignine issue de feuillu.

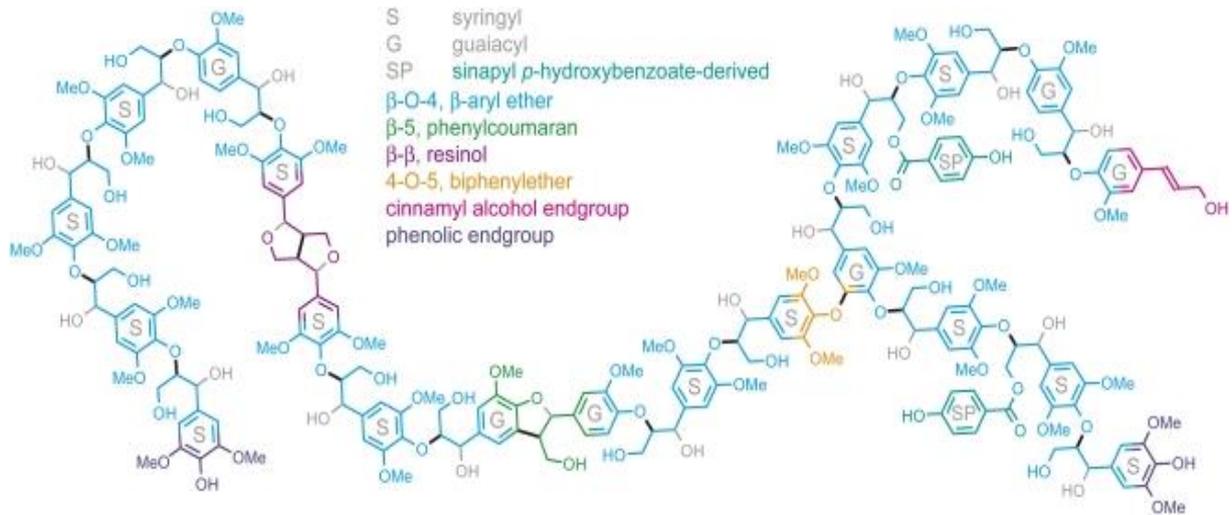


Figure 3 : Exemple de structure d'une lignine issue de feuillu. Extrait de Vanholme et al. (7).

Les sous-unités sont liées entre elles par deux types de liaisons, présentées en Figure 4. Tout d'abord les liaisons de type carbone-oxygène (alkyl-aryl éther (β -O-4 et α -O-4) et diaryléther (4-O-5)), hydrolysables, et qui permettent la délignification dans les procédés papetiers par exemple. Elles impliquent plus particulièrement les sous-unités S. Puis, les liaisons de type carbone-carbone (phénylcoumarane (β -5), biphenyle (5-5), diarylpropane (β -1) et résinol (β - β)) qui sont plus résistantes à la dépolymérisation et nécessitent un traitement plus drastique pour être rompues. Elles impliquent plus particulièrement les sous-unités G et H (8). Le Tableau 1 présente la variation de la proportion des différentes liaisons observée en fonction de l'espèce dont la lignine est issue. Quel que soit l'espèce, la liaison β -O-4 est la plus présente dans les lignines.

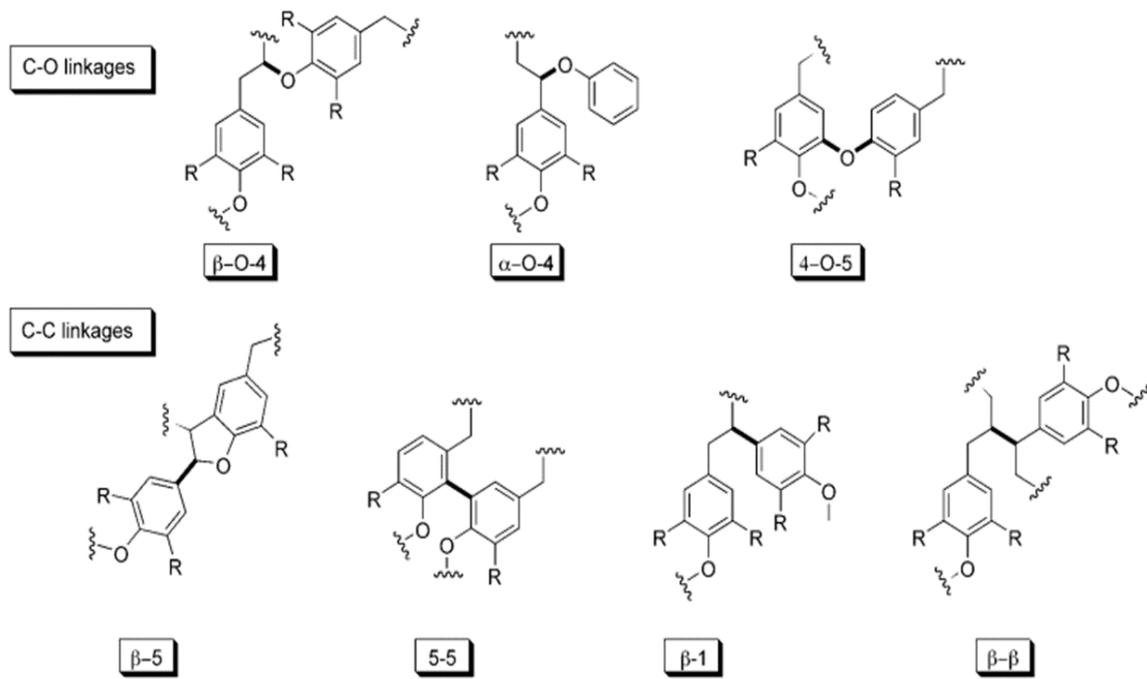


Figure 4 : Principales liaisons C-O et C-C entre les sous-unités présentes dans la lignine. Extrait de Calvo-Flores et al. (9).

Tableau 1 : Proportion (%) des différentes liaisons retrouvées dans les lignines de feuillus et résineux

	β -O-4	α -O-4	4-O-5	β -5	5-5	β -1	β - β
Feuillus	65	-	1,5	6	2,3	15	5,5
Résineux	49 - 51	6 - 8	3,5	9 - 45	9,5	2	2

I. 2. Les différents procédés d'extraction

Au sein de la paroi végétale, il existe un lien étroit entre la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Les microfibrilles de cellulose sont liées avec les hémicelluloses par des liaisons hydrogène et Van der Waals. Puis, les hémicelluloses et la lignine sont liées par des liaisons covalentes (ester et éther) (10, 11). L'industrie papetière utilise la cellulose et les hémicelluloses, ce qui nécessite la rupture de ces liaisons présentes entre les trois composés afin d'en extraire la lignine. De ce fait, la lignine est un déchet des industries papetières produit en grande quantité. L'existence de liaisons fortes entre les hémicelluloses et la lignine rend difficile son extraction. Il existe trois principaux procédés d'extraction donnant lieu à trois grands types de lignines plus ou moins modifiées (procédé Kraft, procédé aux sulfites et procédé Organosolv) (12–14). Ils utilisent des conditions différentes en termes de température,

pression, solvant et pH, ce qui modifie la structure de la lignine obtenue selon le procédé. Les trois principaux procédés sont présentés ci-après.

I.2.1. Procédé Kraft

Le procédé Kraft est un procédé d'extraction aux sulfates utilisé dans les industries papetières. Les lignines issues de ce procédé sont appelées lignines Kraft ou thiolignines et représentent 85 % du total des lignines industrielles produites dans le monde (15, 16). Elles contiennent 1,5 à 3 % de soufre et elles sont solubles dans les solutions alcalines ($\text{pH} \geq 10$). Lors de ce procédé, les copeaux de bois sont traités à température élevée (entre 150 et 180°C) pendant deux à cinq heures par des solutions aqueuses de soude (NaOH) et de sulfure de sodium (Na_2S) (17). Les ions hydroxyle et hydrogénosulfure entraînent la rupture des liaisons ester entre lignines et polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) ainsi que les liaisons alkyle-aryle éther des lignines ($\beta\text{-O-4}$). La liqueur extraite est appelée « liqueur noire » et contient la lignine sous forme de phénolate de sodium de masses molaires comprises entre 2 000 et 3 000 g/mol (18), des polysaccharides, des sels inorganiques et des acides résiniques. Les lignines Kraft peuvent être isolées de la liqueur noire par précipitation en milieu acide (généralement acide sulfurique). La structure de la lignine Kraft obtenue à l'issue de ce procédé est présentée en

Figure 5.

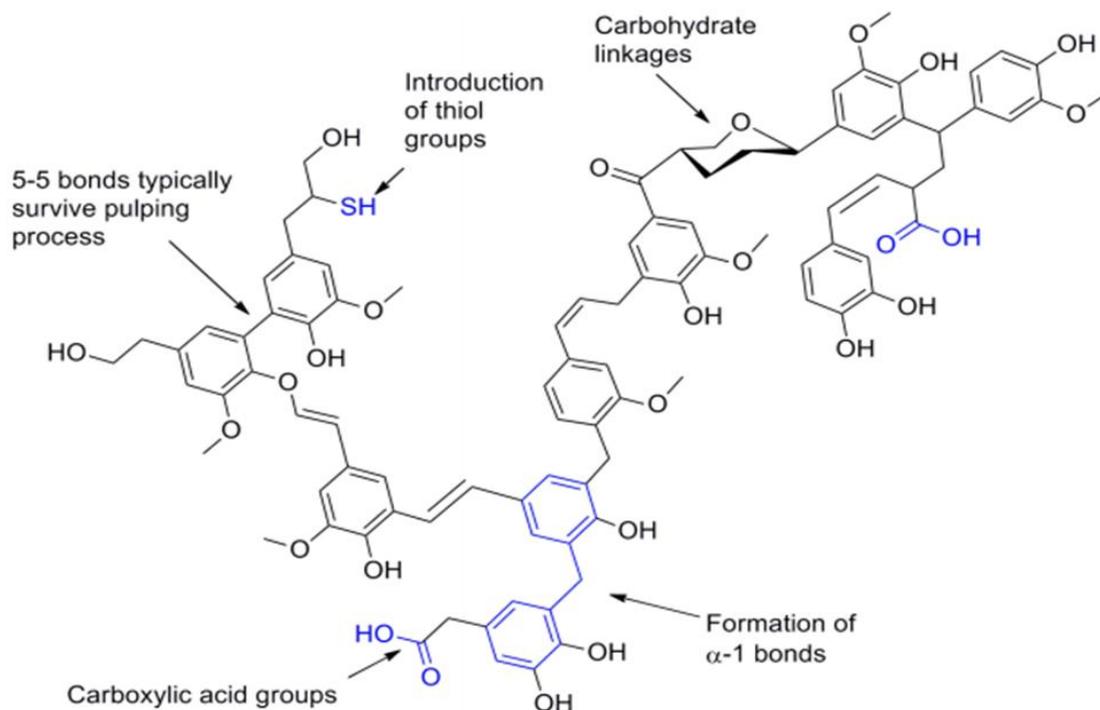


Figure 5 : Représentation de la structure de la lignine Kraft. Extrait de Zakzeski et al. (19).

I.2.2. Procédé aux sulfites

Tout comme le procédé Kraft, le procédé aux sulfites est utilisé par les industries papetières. Les Lignines issues de ce procédé sont appelées les Lignosulfonates. Elles possèdent un fort degré de sulfonation (4 à 8 %), ce qui les rend solubles en milieux aqueux, dans les solutions ayant un pH inférieur à 10. Lors de ce procédé, les copeaux de bois sont traités par l'acide sulfureux et du bisulfite de sodium, de magnésium ou d'ammonium à une température de 140-160°C. La masse molaire moyenne des Lignosulfonates est plus élevée (20 000 – 50 000 g/mol) que celui des lignines Kraft en raison de l'incorporation de nombreux groupes sulfonate. La structure de la Lignosulfonate obtenue à l'issue de ce procédé est présentée en *Figure 6*. Un inconvénient majeur de ces lignines est la présence d'un taux important d'impuretés à l'issue du procédé (sucres, cendre et matériaux inorganiques).

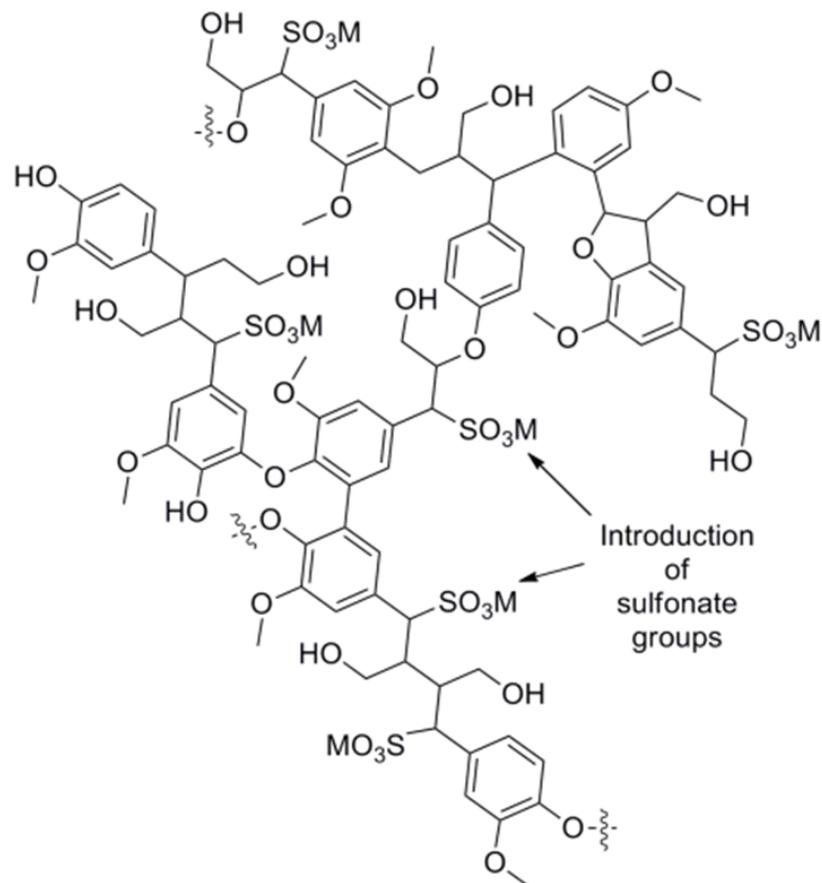


Figure 6 : Représentation de la structure de la Lignosulfonate. Extrait de Zakzeski et al. (19).

I.2.3. Procédé Organosolv

Le procédé d'extraction Organosolv utilise divers solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'éthylène glycol, l'hydroxyde de sodium et des acides organiques (acide formique, acétique, chlorhydrique) (18). Les lignines issues de ce procédé sont appelées lignines Organosolv et ont en général une solubilité élevée dans les solvants organiques. Lors de ce procédé, la cellulose, les hémicelluloses ainsi que la lignine sont obtenues séparément. Ces lignines possèdent donc un haut niveau de pureté, ce qui les rend très intéressantes pour leur valorisation. Ce procédé est généralement considéré comme moins nocif pour l'environnement car il ne nécessite pas l'utilisation de sulfures ou de conditions sévères comme pour le procédé Kraft et le procédé aux sulfites. La lignine Organosolv ne possède donc pas de soufre dans sa structure et possède une faible masse molaire (inférieure à 2 000 g/mol). Le principal inconvénient de ce procédé est le coût élevé de la récupération du solvant.

Lors de ce travail de thèse, les expériences ont été réalisées avec ces trois lignines industrielles, sans modification au préalable. Le Tableau 2 présente un résumé des propriétés de chacune de ces lignines. La dispersité représente le rapport M_w/M_n . La masse molaire moyenne en poids, M_w , définit les caractéristiques du polymère à l'état fondu. La masse molaire moyenne en nombre, M_n , définit les caractéristiques du polymère à l'état solide.

Tableau 2 : Propriétés des lignines obtenues selon les différents procédés d'extraction (18).

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

I. 3. Applications – Enjeux de valorisation

La structure récalcitrante de la lignine fait d'elle un composé ayant actuellement des applications à faible valeur ajoutée (combustible et additif ciment par exemple). La structure aromatique de la lignine ainsi que son abondance rendent très intéressante sa valorisation par dépolymérisation pour des applications à haute valeur ajoutée à moyen et long terme (phénol, BTX, vanilline par exemple) (20). Cependant, la forte complexité de sa structure, son hétérogénéité, sa diversité ainsi que son insolubilité en milieu aqueux rendent sa dépolymérisation très difficile. Les différentes applications potentielles de la lignine présentées Figure 7 montrent que la valorisation par dépolymérisation de la lignine est un enjeu très important pour son utilisation dans des domaines variés (21, 22).

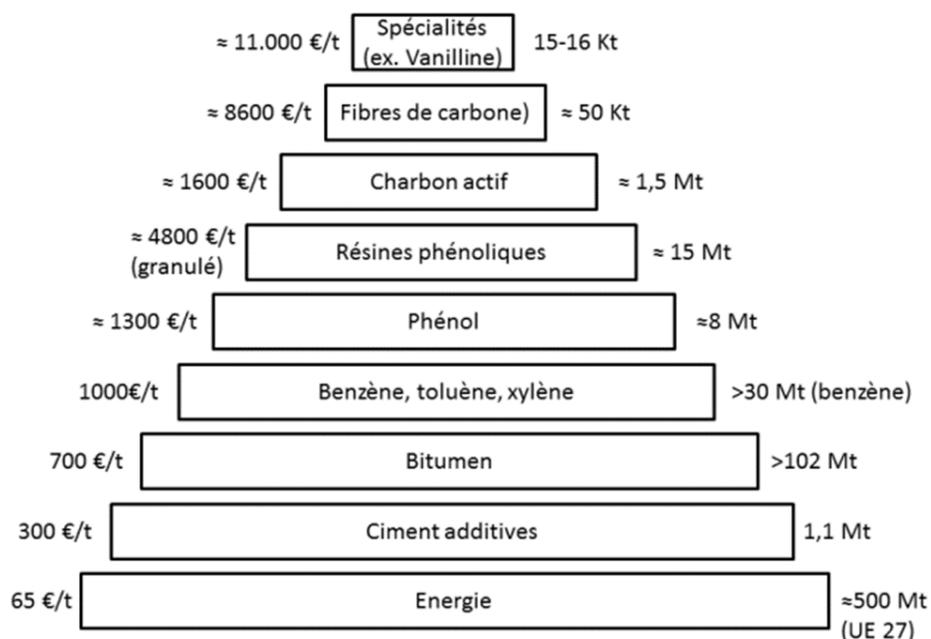


Figure 7 : Principales voies de valorisations de la lignine, leur valeur sur le marché ainsi que le volume pouvant potentiellement être fabriqué. Extrait de O'Donohue (23).

I.3.1. Application à faible valeur ajoutée

Combustible

La lignine est un matériau carboné ayant une valeur calorifique élevée (26,7 MJ kg⁻¹) grâce à son fort degré d'oxydation. Par exemple, la cellulose possède une valeur calorifique moins élevée (17,3 MJ kg⁻¹) par rapport à la lignine (24). Depuis les années 1930, les industries papetières brûlent la lignine (déchet de production du papier) afin de récupérer l'énergie. La combustion de la lignine peut rendre les industries presque autonomes en énergie. Actuellement, la combustion est la principale utilisation de la lignine, seulement 1 à 2 % de la lignine produite est utilisée pour d'autres applications (25, 26).

Additif ciment

La lignine, la Lignosulfonate notamment, possède un pouvoir plastifiant qui permet de l'utiliser en tant qu'additif dans le ciment dans le but d'augmenter sa fluidité, sa coulabilité, sa maniabilité et permet également d'augmenter sa résistance. En général, 0,1 à 0,3 % (m/m) de lignine est ajouté dans le ciment (27).

Liant dans les aliments pour animaux

L'utilisation de lignine (la Lignosulfonate notamment), non toxique pour les animaux, permet de répondre à des besoins de l'industrie agro-alimentaire. Par exemple, elles peuvent être mélangées avec différentes compositions alimentaires et avec une grande diversité de ratios de matières grasses, de céréales, de fibres alimentaires, etc. Les propriétés des aliments ainsi que la santé des animaux sont améliorées avec l'ajout de lignine. En effet, la lignine possède une activité antibiotique et antioxydante naturelle. L'ajout de lignine joue également sur les propriétés physiques des aliments, telles que la dureté et la durabilité des granulés. Les granulés présentent une bonne stabilité à l'humidité, ce qui facilite le transport, le stockage ainsi que la manipulation des aliments. La société Borregaard a développé un liant à partir de lignine appelé « LignoBond DD® » (26, 28).

Additif dans les pellets combustibles

La lignine est un excellent additif pour les pellets combustibles. En effet, c'est un liant naturel et sa valeur calorifique élevée aide à améliorer les propriétés du combustible. Par exemple, l'entreprise Weyerhaeuser NR a développé des bûches artificielles par ajout de lignine et de propane-1,3-diol à des matériaux cellulosiques. Les propriétés des flammes produites sont améliorées et les performances des bûches sont équivalentes aux bûches commerciales (26, 29).

I.3.2. Application à haute valeur ajoutée

Production de vanilline

La vanilline (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, $C_8H_8O_3$) est l'un des arômes le plus utilisé dans le monde (dans les aliments, les boissons, les produits pharmaceutiques et cosmétiques). Elle est dérivée de la lignine depuis 1937 par Borregaard qui reste actuellement le seul fournisseur de vanilline produite à partir de lignine (Figure 8). Le marché mondial de la vanilline en 2011 a été évalué à environ 16 000 tonnes pour une valeur d'environ 11 000 euros par tonnes. Environ 20 % de la vanilline fabriquée provient de la valorisation de la lignine (à partir de la liginosulfonate ou la lignine Kraft) et les 80 % restant proviennent de pétrole non raffiné. La transformation de la lignine est réalisée par oxydation sous conditions fortement alcalines et utilisant un métal de transition comme catalyseur (30–32).

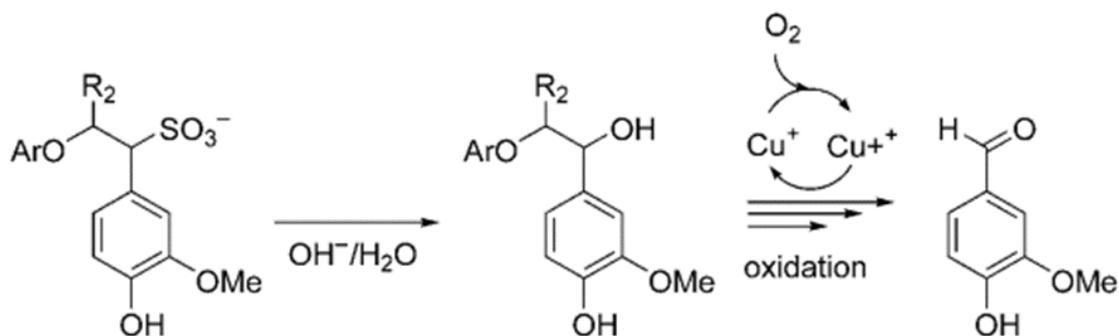


Figure 8 : Synthèse de la vanilline selon Borregaard. Extrait de Calvo-Flores et al. (9).

Macromolécules (fibres de carbonées, résines, polyuréthane etc.)

Les fibres de carbonées occupent un marché mondial annuel d'environ 50 000 tonnes métriques depuis 2011, ce qui représente environ 8 600 euros par tonnes. Environ 40 à 50 % d'acier auxiliaire pourraient être remplacés par un matériau composite en fibres de carbone. Cependant, le traitement fondamental est coûteux en raison du biotraitement de son précurseur (le polyacrylonitrile). La lignine représente une source riche en carbone naturel et de faible coût. Le coût de traitement de la lignine est plus faible que le polyacrylonitrile grâce à sa température de fusion plus basse ainsi que sa capacité à se stabiliser plus rapidement (33).

Un autre grand marché commercial est celui de la valorisation de la lignine en tant que résines (époxy et phénoliques) et il possède une valeur ajoutée plus élevée que lors de l'utilisation de la lignine en tant que source d'énergie et de carburant. Les résines sont des polymères thermodurcis composés de monomères contenant au moins un groupe époxy pour les résines époxy et des phénols pour les résines phénoliques. Elles sont généralement obtenues par polymérisation anionique ou cationique avec les composants de la lignine. Une petite quantité d'amine est ajoutée en tant qu'agent réticulant (18, 34–36).

Les polyuréthanes sont des composés remarquables car ils existent à la fois sous forme rigide et flexible. Ils sont généralement utilisés comme isolants et matériaux flottants. Ils sont synthétisés par une réaction entre des diisocyanates et des polyols ayant des fonctions hydroxyles en position terminale (37). La lignine peut être utilisée en tant que polyol pour la synthèse de polyuréthanes (38, 39).

Composés aromatiques (BTX, composés phénoliques etc.)

La lignine peut être transformée en fraction contenant du benzène, du toluène et du xylène (BTX). Cette transformation s'effectue en deux étapes. La première étape est une dépolymérisation de la lignine en monomères aromatiques oxygénés, la deuxième étape est une hydrodésoxygénation et une déméthoxylation. Le BTX est le précurseur pour la synthèse de matériaux tels que les résines, les fibres de nylon, polyuréthane et polyester (40).

Le phénol est principalement produit à partir du cumène qui est un produit obtenu par alkylation de benzène dérivé de la lignine. La production de phénol par dépolymérisation de la lignine n'a pas encore été démontrée et a besoin de quelques décennies supplémentaires. Les phénols sont largement utilisés dans la synthèse des résines formaldéhyde et les polyuréthanes (41).

I. 4. Voies de dépolymérisation des lignines

Comme énoncé précédemment, la structure aromatique de la lignine ainsi que son abondance rendent très intéressante sa valorisation pour des applications à haute valeur ajoutée. Cependant, la forte complexité de sa structure, son hétérogénéité, sa diversité ainsi que son insolubilité en milieu aqueux rendent sa valorisation très difficile. La principale voie de valorisation vise la dépolymérisation de la lignine afin de la convertir en molécules de plus faibles masses moléculaires pouvant être utilisées comme molécules biosourcées en alternative à celles issues de la pétrochimie. La partie suivante présente les deux voies principales de dépolymérisation de la lignine étudiées dans la littérature, la voie chimique ainsi que la voie enzymatique.

I.4.1. Voie chimique

Il existe trois grands types de dépolymérisation par voie chimique : la catalyse thermochimique (pyrolyse, gazéification et hydrogèneolyse), la catalyse réductrice et la catalyse oxydante.

I.4.1.1. La catalyse thermochimique

C'est la méthode la plus utilisée pour la conversion de la biomasse en produits de plus faibles masses moléculaires. La pyrolyse consiste généralement au chauffage d'une substance organique en absence d'air (atmosphère non oxydante) et à des températures comprises entre 300 °C et 1 000 °C afin que la structure moléculaire soit décomposée en unités plus petites. Le produit final sera présent sous forme liquide ou gazeuse (appelé gazéification) en fonction de la sévérité des conditions de traitement (température et temps de réaction). La pyrolyse de la lignine est très complexe et dépend de plusieurs facteurs tels que la source de matière première, la vitesse de chauffage, la température de réaction, les additifs, etc. Les principaux produits issus de la pyrolyse de la lignine sont les hydrocarbures gazeux (monoxyde de carbone et

dioxyde de carbone), les liquides volatils (méthanol, acétone et acétaldéhyde), les monolignols, les monophénols (phénol, guaiacol, syringol et catéchol) et autres phénols substitués. Les monomères aromatiques majeurs obtenus par pyrolyse sont présentés en Figure 9. Une partie de la lignine est convertie en produits stables thermiquement, appelés char (42–45).

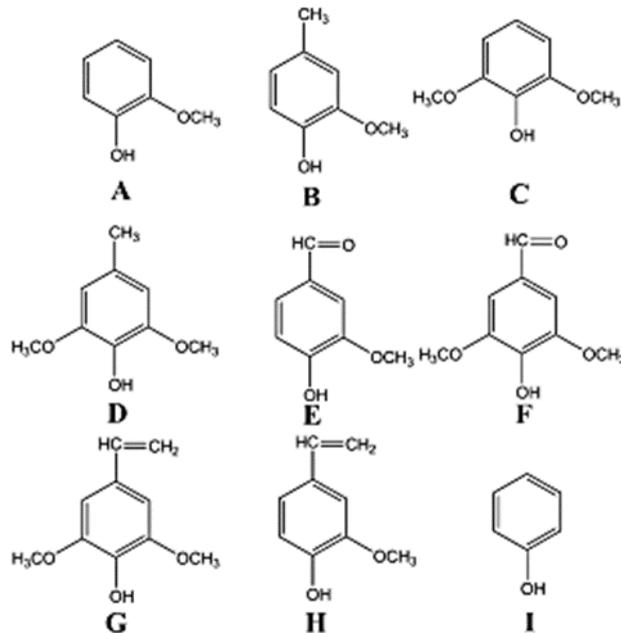


Figure 9 : Produits majeurs obtenus lors de la pyrolyse de la lignine. (A) guaiacol, (B) méthyl guaiacol, (C) syringol, (D) méthyl syringol, (E) vanilline, (F) syringaldéhyde, (G) vinyl syringol, (H) vinyl guaiacol, (I) phénol. Extrait de Pandey et al. (43)

La gazéification de la lignine (pyrolyse à haute température) donne de l'hydrogène (H_2) (par craquage des cycles aromatiques), du dioxyde de carbone (CO_2) (par reformation de fonction C=O et COOH), du monoxyde de carbone (CO) (par craquage des groupes fonctionnels C-O-C et C=O) et du méthane (CH_4) (par craquage des groupes méthoxyle) (46–48).

La dépolymérisation de la lignine commence par le clivage des liaisons les plus faibles à basse température et les liaisons plus fortes sont rompues à température plus élevée. A une température > 500 °C, une fissuration et une condensation du cycle aromatique sont observées, libérant ainsi de l'hydrogène. A une température comprise entre 120 et 300 °C (première étape), les produits observés sont l'acide formique, le formaldéhyde, le dioxyde de carbone, le monoxyde de carbone et l'eau.

L'hydrogénolyse est une pyrolyse effectuée en présence d'hydrogène à une température comprise entre 300 et 600 °C. Ce procédé permet d'obtenir des rendements plus élevés en monophénols et forme moins de char que la pyrolyse.

1.4.1.2. La catalyse réductrice

La catalyse réductrice est une pyrolyse en milieu réducteur. Elle permet d'obtenir des composés benzéniques et phénoliques avec de bons rendements (jusqu'à 70 %) (19). La majorité des systèmes décrits dans la littérature utilisent l'hydrogène comme réducteur en présence d'un catalyseur hétérogène métallique. Les conditions utilisées sont dures avec une pression en hydrogène comprise entre 4 et 22 bars et une température comprises entre 250 et 450 °C (49).

1.4.1.3. La catalyse oxydante

La lignine est un bon candidat pour l'oxydation ou le craquage oxydatif en raison de la présence de groupes hydroxyles. La réaction de craquage oxydatif implique le clivage des cycles de la lignine, les liens aryléther ou d'autres liens au sein de la lignine. Les produits d'oxydation de la lignine sont des aldéhydes aromatiques et/ou des acides carboxyliques en fonction de la sévérité des conditions de réactions ainsi que du type de lignine utilisée. La lignine de bois résineux (bois souple) permet d'obtenir de la vanilline et de l'acide vanillique tandis que le syringaldéhyde et l'acide syringique sont obtenus à partir de la lignine de bois dur. Les oxydants les plus utilisés pour l'oxydation de la lignine sont le nitrobenzène, les oxydes de métaux et le peroxyde d'hydrogène.

La vanilline est le principal produit chimique de faible masse molaire fabriqué industriellement dans de grandes quantités à partir de l'oxydation de lignines techniques (32, 50). La vanilline est produite selon un mécanisme d'oxydation radicalaire. Le mécanisme proposé est présenté en Figure 10. Un premier clivage (I → II) donne lieu à des intermédiaires de quinonéméthide (III et IIIa) et au dioxéthane (V). Le dioxéthane est dégradé par un clivage des liaisons C-C et C-O pour former l'ion vanillé (VI) (51).

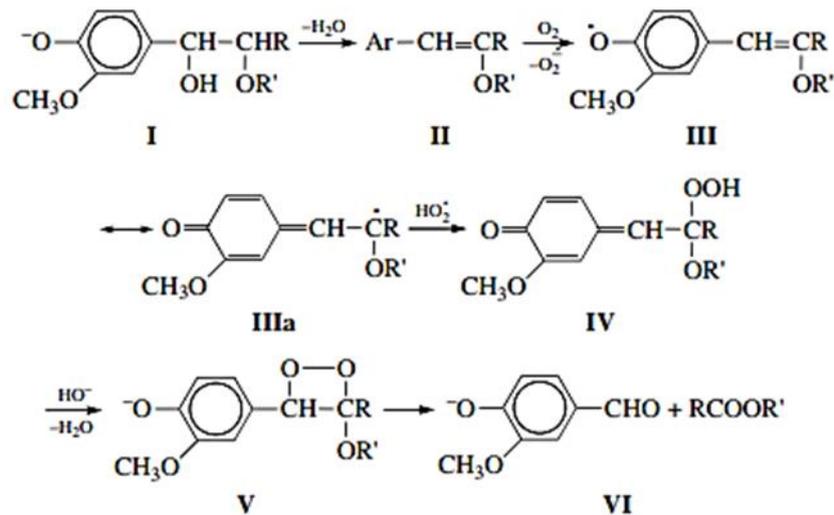


Figure 10 : Mécanisme de la réaction d'oxydation catalytique de la lignine allant vers la production de vanilline. Extrait de Tarabanko et al. (51).

La valorisation par voie chimique est la méthode majeure permettant l'obtention de petits fragments de lignine mais ces méthodes emploient des conditions dures (températures entre 300 et 1000 °C et pressions entre 4 et 30 MPa), très énergivores (19, 43). Actuellement, l'intérêt se portant sur la protection de l'environnement, les recherches se tournent donc vers des procédés plus respectueux de l'environnement tels que les procédés de valorisation par voie enzymatique. La catalyse enzymatique est effectuée dans des conditions douces (milieux aqueux) ainsi qu'à faible température (souvent entre 30 et 60 °C). Les enzymes utilisées sont des oxydoréductases, elles vont donc mimer la catalyse chimique oxydante et ainsi tenter de produire des composés aromatiques de faibles masses moléculaires tels que la vanilline.

I.4.2. Voie enzymatique

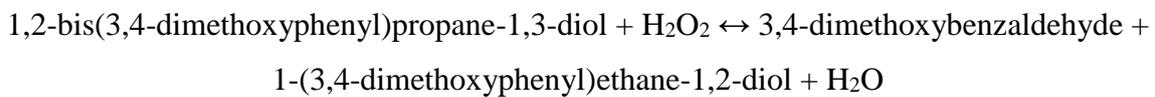
Les lignines sont surtout dépolymérisées par les enzymes produites par les champignons (*Trametes*, *Pycnoporus*, *R. vernicifera*, *Pleurotus*, *Bierkandera*, *P. eryngii*, *P. chrysosporium*, *Coriopsis polyzona*, *Lentinus tirinus*, etc.), appelées collectivement enzymes lignolytiques ou ligninases (52) mais également par quelques bactéries telles que *Bacillus*, *E.coli*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, etc. (53–55). Ces enzymes sont divisées en deux classes : les peroxydases et les laccases.

1.4.2.1. Les peroxydases

Les peroxydases sont des enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elles sont subdivisées en trois classes, les peroxydases de lignine, les manganèse peroxydases et les peroxydases versatiles.

Les peroxydases de lignine

Les peroxydases de lignine (EC 1.11.1.14) sont majoritairement des glycoprotéines ayant un site actif composé d'un complexe ferreux (l'hème). La réaction catalysée est représentée selon l'équation suivante :



Elles possèdent un potentiel redox élevé (environ 1,2 V) qui leur permet d'oxyder les fractions aromatiques phénoliques et non phénoliques de la lignine, en présence de peroxyde d'hydrogène. Le mécanisme d'oxydation du site catalytique des peroxydases de lignine est représenté Figure 11.

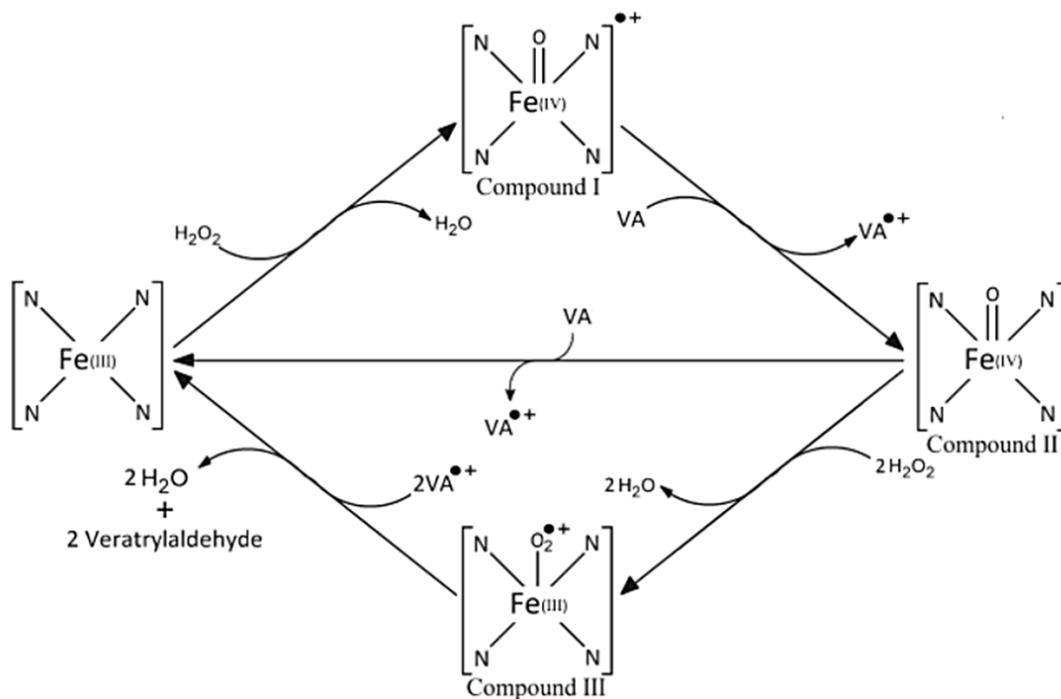


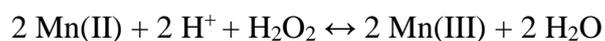
Figure 11 : Mécanisme d'oxydoréduction du site catalytique des peroxydases de lignine. VA : Alcool veratrylique. Extrait de Pollegioni et al. (56).

Le complexe ferreux sous sa forme Fe(III) subit tout d'abord une oxydation à 2 électrons par le peroxyde d'hydrogène et forme le composé intermédiaire I (un cation radical avec le complexe ferreux sous sa forme Fe(IV)). Ensuite, deux réactions de réduction à 1 électron ont lieu de manière consécutive. La première est celle de la réduction du composé I à partir d'un substrat donneur d'électron (l'alcool vératrylique (VA)) pour former le composé intermédiaire II. Ce composé II est également réduit à partir de l'alcool vératrylique pour reformer le complexe ferreux sous sa forme Fe(III), permettant de terminer le cycle. La présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène provoque une oxydation du composé II pour former le composé intermédiaire III et engendre une inactivation de l'enzyme. La présence du cation radical d'alcool vératrylique permet de convertir le composé III vers la forme active de l'enzyme (Fe(III)) et semble donc protéger l'enzyme de son inactivation (57).

Les peroxydases de lignine sont très actives sur une large gamme de composés aromatiques tels que l'alcool vératrylique, les méthoxybenzènes, etc. Cependant, la taille des substrats utilisés affecte de manière significative l'efficacité catalytique de l'enzyme. Baciocchi *et al.* ont montré que l'activité de la peroxydase de lignine est diminuée de 25 fois en présence d'un trimère modèle de lignine (58).

Les manganèse peroxydases

Les manganèse peroxydases (EC 1.11.1.13) sont les peroxydases lignolytiques les plus répandues, elles sont sécrétées par presque tous les basidiomycètes colonisateurs de bois, y compris la pourriture blanche et divers champignons colonisant le sol. La première manganèse peroxydase a été détectée dans *Phanerochaete chrysosporium* en 1985 (59, 60). Tout comme les peroxydases de lignine, leur site actif est composé d'un complexe ferreux (l'hème). La réaction catalysée est représentée selon l'équation suivante :



Le mécanisme d'oxydation du site catalytique des manganèse peroxydases, représenté en Figure 12 est similaire à celui des peroxydases de lignine, mais elles utilisent le manganèse comme substrat. Tout d'abord, le Mn^{3+} se dissocie de l'enzyme et est complexé par des acides carboxyliques (oxalate et malate). Ce complexe va alors jouer le rôle d'oxydant de composés phénoliques et former un radical phénoxy intermédiaire. A l'inverse, le Mn^{3+} est inactif sur les composés non phénoliques et sur l'alcool vératrylique (61). Le complexe ferreux sous sa forme

Fe^{3+} est oxydé par le peroxyde d'hydrogène pour former le composé intermédiaire I qui est un cation radical ($\text{Fe}^{\bullet 4+}$). Ensuite, deux réactions de réductions consécutives ont lieu à partir du Mn^{3+} comme substrat pour former le composé intermédiaire II dans un premier temps puis reformer le complexe sous sa forme Fe^{3+} .

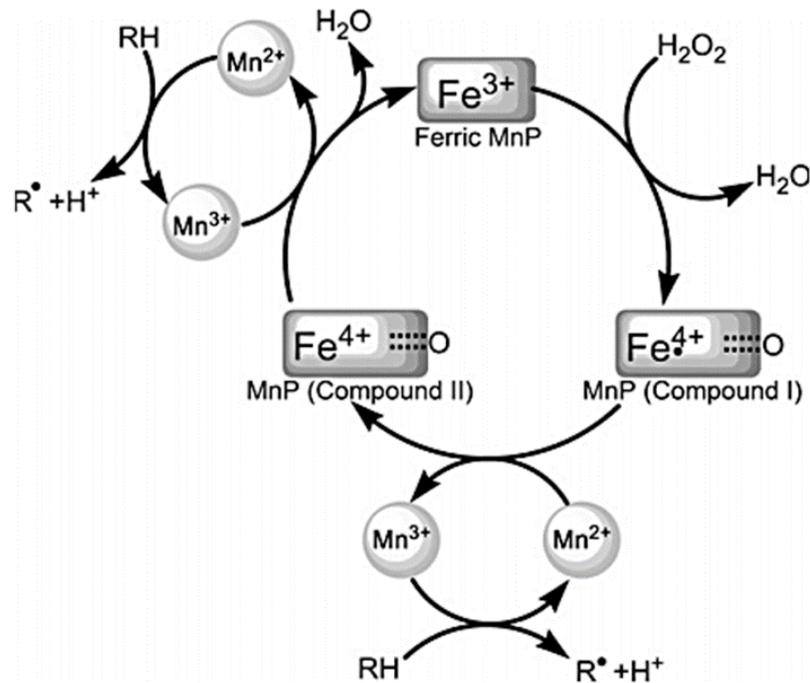


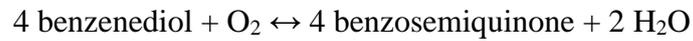
Figure 12 : Mécanisme d'oxydoréduction du site catalytique des manganèse peroxydases. Extrait de Pollegioni et al. (56).

Les peroxydases versatiles

Les peroxydases versatiles (EC 1.11.1.16) sont des peroxydases hybrides, c'est-à-dire qu'elles se caractérisent par une affinité de substrat et un partage des caractéristiques typiques des manganèse peroxydases et des peroxydases de lignine. Ces enzymes ont été trouvées chez différentes espèces de *Pleurotus* et *Bjerkandera* (62, 63). Par exemple, la peroxydase versatile de *P. eryngii*, appelée VPL, possède un site de fixation de Mn^{2+} et une efficacité catalytique pour l'oxydation de Mn^{2+} (caractéristique des manganèse peroxydases). La VPL possède également un résidu tryptophane (analogue aux peroxydases de lignine) qui participe au transfert d'électrons des composés aromatiques donneurs et par conséquent permet à l'enzyme d'oxyder des composés aromatiques non phénoliques. Cependant, l'efficacité catalytique de la VPL sur l'alcool vératrylique est relativement faible en comparaison avec la peroxydase de lignine de *P. chrysosporium* (64, 65).

I.4.2.2. Les laccases

Les laccases (EC 1.10.3.2) sont des enzymes de type oxydoréductases. Elles ont été découvertes il y a plus d'un siècle dans l'arbre japonais *Rhus vernicifera* (66). La réaction s'effectue en présence d'oxygène selon l'équation suivante (56):



Leur site actif est composé de quatre atomes de cuivre formant trois sites d'oxydoréduction (Figure 13). Le cuivre 1, représentant le site T1, dirige le potentiel redox de l'enzyme. Il permet de capter les électrons arrachés aux substrats qui sont ensuite transférés aux autres atomes de cuivre. Les cuivres 2 et 3, représentant le site T2, ainsi que le cuivre 4, représentant le site T3, forment un cluster trinucéaire relié par un motif hautement conservé de résidus d'histidine.

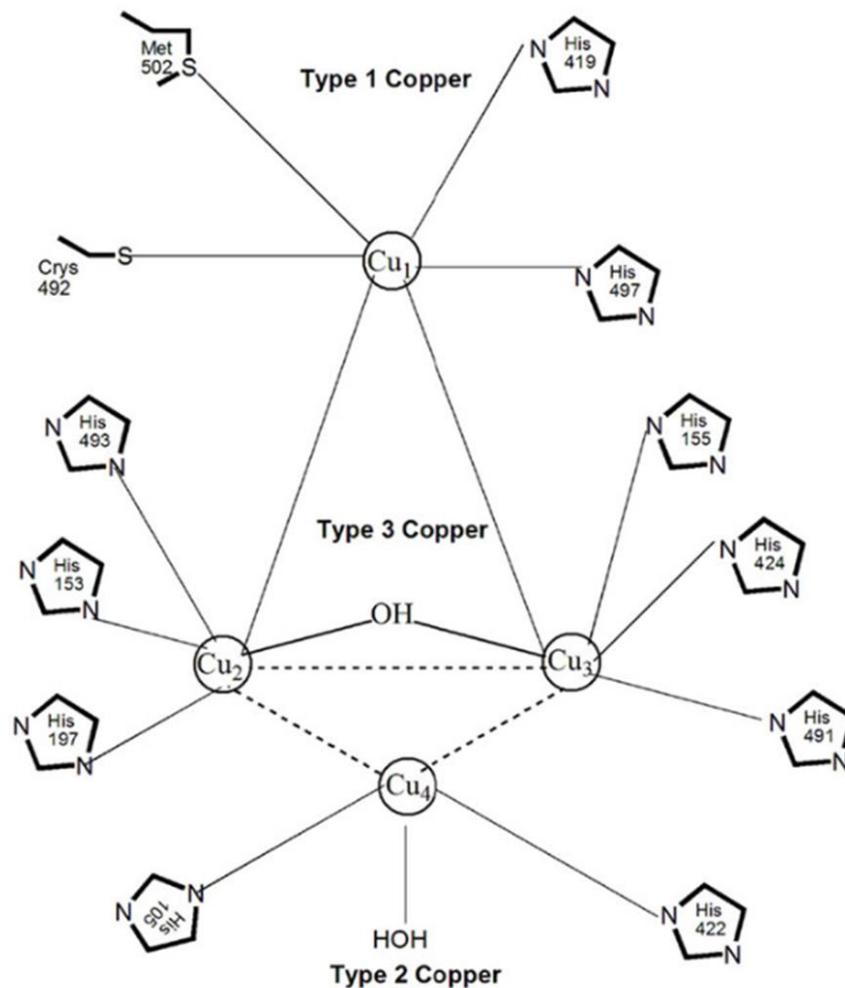


Figure 13 : Représentation du site actif des laccases. Extrait de Kunammeni et al. (67).

Le mécanisme d'oxydoréduction, présenté en Figure 14, se déroule selon quatre réactions d'oxydation pour atteindre un état d'oxydation +2 au niveau des quatre atomes de cuivre. Le cuivre du site T1 est tout d'abord réduit par un substrat réducteur. L'électron est arraché au substrat et est ensuite transféré aux cuivres des sites T2 et T3. Lors de la deuxième étape, une molécule d'oxygène est captée par le cluster (sites T2 et T3) pour former un intermédiaire peroxyde. L'oxygène est ensuite réduit en eau lors de la troisième étape impliquant deux électrons pour donner un intermédiaire radical oxy.

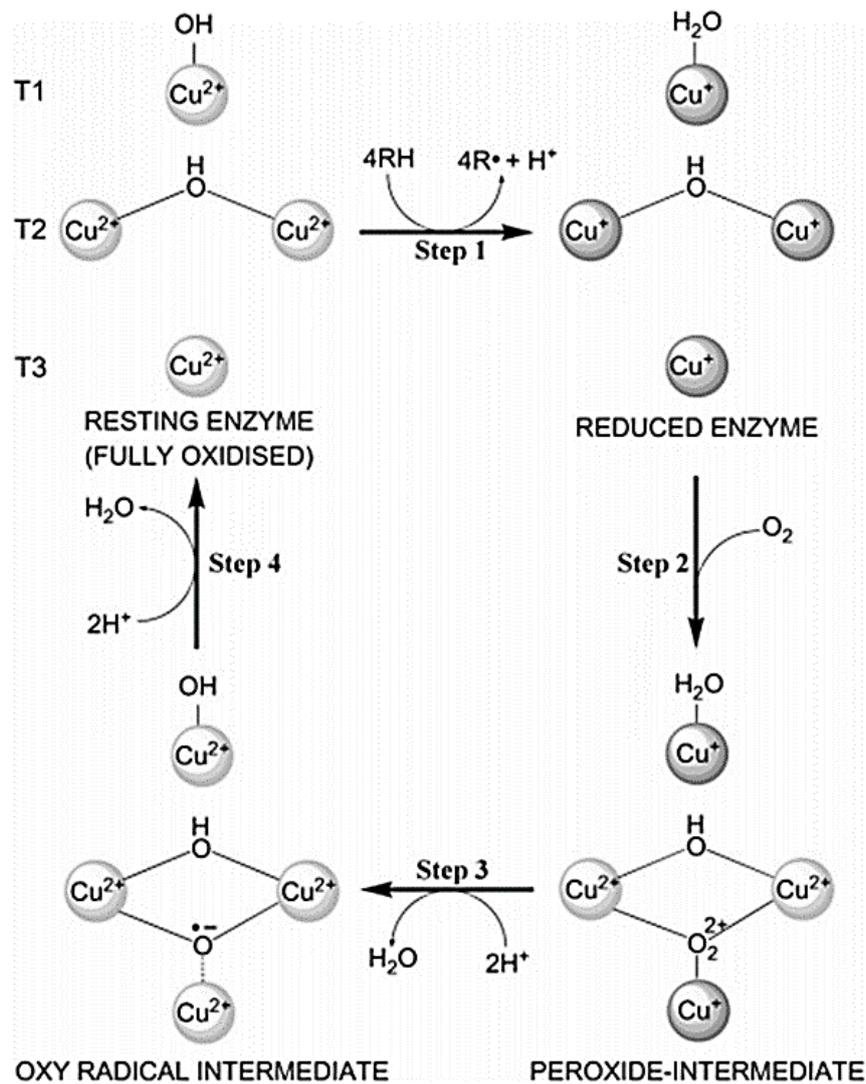


Figure 14 : Mécanisme d'oxydoréduction du site catalytique des laccases. Extrait de Pollegioni et al. (56).

Les laccases présentent une stabilité plus importante que les peroxydases car elles n'utilisent pas le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme cofacteur qui participe à leur désactivation. Elles sont sécrétées par de nombreux types d'organismes tels que les plantes supérieures (*Rhus vernicifera*, par exemple) où elles sont impliquées dans la lignification, les champignons (*Pleurotus*, *Basidiomycete*, *Trametes*, *Pycnoporus*, etc.) permettant la délignification ainsi que chez quelques bactéries (*Bacillus*) où elles jouent un rôle dans la synthèse de pigments. Cette diversité d'origine des laccases implique la présence d'un très grand nombre d'enzymes ayant des comportements différents sur les substrats utilisés.

Les laccases possèdent un potentiel redox relativement faible (environ 0,8 V) qui limite leur action à l'oxydation des composés phénoliques de la lignine, contrairement aux peroxydases. Elles nécessitent l'intervention d'un médiateur afin de pouvoir oxyder des composés aromatiques non phénoliques, elles forment alors le « système laccase-médiateur » présenté ci-après. En effet, les réactions d'oxydation des composés phénoliques et non phénoliques de la lignine ont été largement étudiées dans la littérature dans l'objectif de la dépolymériser et ainsi permettre une valorisation à haute valeur ajoutée. Comme énoncé précédemment, les laccases sont des oxydoréductases, elles sont donc potentiellement capables de catalyser des réactions de dépolymérisation et de polymérisation de la lignine. Différentes études, utilisant la laccase seule (sans médiateur) sur des composés modèles de lignine ou sur la lignosulfonate ont montré une préférence pour la réaction de polymérisation (68–70).

1.4.2.3. Le système Laccase-Médiateur (LMS)

Les substrats d'intérêts ne peuvent souvent pas être oxydés directement par les laccases, soit parce qu'ils ont un potentiel redox trop faible soit parce qu'ils ont une structure tridimensionnelle trop grande pour pénétrer dans le site actif de l'enzyme. Les recherches se sont donc focalisées sur l'utilisation de médiateur(s) afin de faciliter la dépolymérisation enzymatique de la lignine par les laccases. L'utilisation combinée de la laccase et du médiateur est appelé le système laccase-médiateur (LMS). Un médiateur est un composé ayant une faible masse molaire et un potentiel redox plus élevé que la laccase lui permettant d'agir comme substrat intermédiaire de la laccase. En effet, il va agir comme un diffuseur d'électrons et permettre l'oxydation des composés aromatiques non phénoliques de la lignine et ainsi engendrer sa dépolymérisation. Bourbonnais et Paice (52) ont été les premiers à montrer l'efficacité du système laccase-médiateur à travers l'oxydation d'alcools benzyliques non phénoliques en présence d'un médiateur (l'ABTS : 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-

sulfonic acid) diammonium salt). Le mécanisme d'oxydation d'un substrat par le système LMS est présenté Figure 15. La laccase utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons. La laccase sous forme oxydée va permettre l'oxydation du médiateur qui lui-même va pouvoir pénétrer dans le substrat et l'oxyder (71).

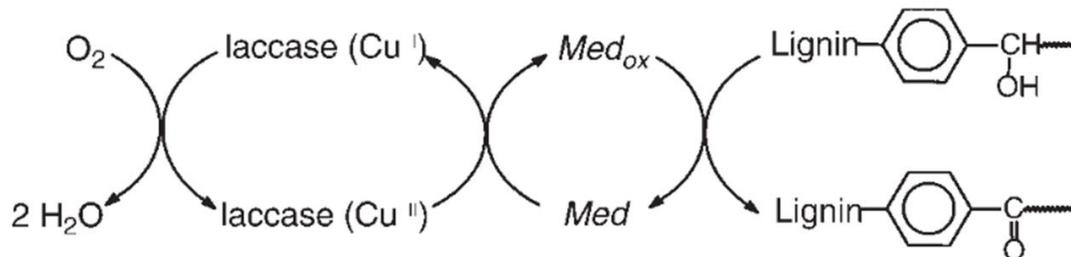


Figure 15 : Mécanisme d'oxydation d'un substrat (la lignine) par le système laccase-médiateur (LMS). Extrait de Galli et al. (72).

Les trois médiateurs les plus communément utilisés, présentés Figure 16, sont l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), le 1-hydroxybenzotriazole (HBT) et le (2,2,6,6-tétraméthyl-pipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO) car ils présentent une grande efficacité catalytique (73, 74).

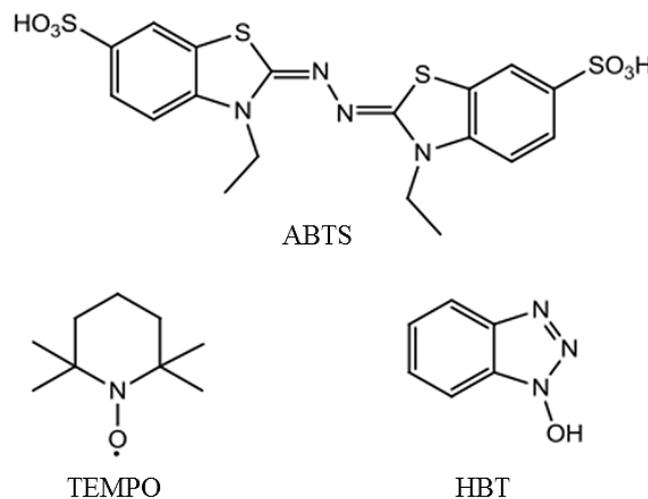


Figure 16 : Structure des trois principaux médiateurs.

Shleev *et al.* ont montré l'efficacité du système LMS. L'utilisation de la laccase seule sur une lignine Kraft commerciale (SIGMA-ALDRICH), contenant des groupements sulfonates la rendant soluble dans l'eau, montre une réaction de polymérisation (75). A l'inverse, l'utilisation du système LMS, avec l'ABTS et l'HBT comme médiateur, sur cette même lignine montre une réaction de dépolymérisation (76). Eggert *et al.* montrent également une réaction

de dépolymérisation sur des composés modèles de lignine (solubles dans l'eau) en utilisant le système LMS avec le 3-HAA (3-hydroxyanthranilate) comme médiateur (77). Cependant, Prasetyo *et al.* montrent une réaction de polymérisation avec l'utilisation du système LMS avec l'HBT comme médiateur sur une Lignosulfonate (78). La réaction de dépolymérisation dépend donc de l'enzyme, du médiateur, de leurs proportions et de l'environnement réactionnel.

L'efficacité du système LMS dépend également de la solubilité de la lignine. La plupart des études montrant l'efficacité du système LMS utilisent des lignines commerciales, des lignines modifiées ou des composés modèles, tous solubles dans l'eau. Les lignines commerciales, achetées chez un fabricant (souvent SIGMA-ALDRICH), ont subi un traitement au préalable les rendant solubles dans l'eau et possèdent un faible taux d'impureté contrairement aux lignines industrielles. Cependant, les lignines industrielles issues des industries papetières présentent une très faible solubilité dans l'eau et sont solubles dans les solvants organiques. Seules les Lignosulfonates sont solubles dans l'eau. La dépolymérisation de lignines industrielles reste donc un challenge. Afin de relever ce défi, des chercheurs s'intéressent à l'action des laccases sur des composés modèles de lignine dans les solvants organiques tels que des solvants alcalins, l'éthanol, le propylène glycol, les liquides ioniques, etc. (68, 79, 80). Actuellement, aucune méthode permettant d'obtenir une dépolymérisation directe des lignines industrielles insolubles dans l'eau n'est décrite dans la littérature.

I. 5. Criblage d'activités de dépolymérisation enzymatique de lignines

Les précédentes parties ont montré l'existence d'une très grande diversité de lignines, d'enzymes ainsi que de médiateurs. Ce qui représente un nombre incalculable de combinaisons possibles à tester dans le but de déterminer les conditions optimales pour obtenir une dépolymérisation efficace de la lignine. Cependant, aucune méthode de criblage enzymatique en application directe sur les lignines industrielles n'est connue dans la littérature actuellement. Seules des méthodes colorimétriques basées sur l'oxydation de molécules à faibles masses molaires par les laccases ou peroxydases existent. Ces méthodes ont pour but de mesurer l'activité enzymatique des enzymes mais ne sont pas représentatives de leur efficacité de dépolymérisation sur les lignines industrielles directement (81–83).

De plus, il a été montré que la dépolymérisation en milieu liquide reste difficile malgré les nombreuses recherches effectuées ces dernières années en partie causée par la faible solubilité de la lignine. Il est donc nécessaire de chercher d'autres outils qui permettraient de

solubiliser la lignine dans les solvants organiques et les enzymes dans leurs tampons de travail (milieu aqueux), et ainsi développer une nouvelle méthode de dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles et de criblage enzymatique sur celles-ci. Les travaux de cette thèse se sont dirigés vers la technologie d'impression jet d'encre qui permettrait d'imprimer la lignine, c'est-à-dire qu'elle se présenterait sous forme solide après évaporation du solvant et permettrait ainsi de s'affranchir des problèmes de solubilité de la lignine. Le paragraphe suivant présente cette technologie ainsi que quelques exemples d'applications actuelles.

I. 6. La technologie d'impression jet d'encre

La technologie d'impression jet d'encre, surtout connue pour l'impression de documents papier, est utilisée également dans d'autres domaines tels que l'électronique organique, la synthèse chimique, la fabrication de capteurs, la chimie combinatoire et la biologie (84–86). Elle permet d'effectuer des dépôts solides de solutions de manière localisée, selon un schéma préétabli et en utilisant une faible quantité de matière (formation de gouttes de l'ordre du picolitre). La solution est déposée sans contact entre l'outil d'impression et le support d'impression. Un actionneur piézoélectrique engendre une déformation à l'intérieur de la buse d'éjection et permet ainsi l'éjection de liquide sous forme de goutte vers le support d'impression. L'absence de contact présente un avantage pour l'utilisation de solutions de biomolécules afin de prévenir toute contamination et perte de fonction dues à des modifications structurales. Cette technologie permet le développement d'expérimentations à haut débit grâce à la rapidité de fabrication, certains systèmes d'impression sans contact permettent l'impression d'environ 500 gouttes par seconde (87). Bien que cette technologie présente des avantages très attrayant pour une utilisation dans divers domaines, elle reste très peu utilisée à cause des contraintes liées aux propriétés physico-chimiques des solutions nécessaires à l'impression (tension de surface, viscosité, mouillabilité du support d'impression, paramètres d'impression etc.). Sans optimisation de la solution à imprimer les problèmes suivants peuvent être observés : pas d'impression, certains points manqués, des points satellites, coalescence des points, etc. Ces problèmes sont souvent la cause d'une faible solubilité des encres à base de protéines, d'une forte teneur en sel, d'une viscosité trop importante, d'une faible tension de surface ou d'une mouillabilité trop importante du support d'impression. Les approches pour traiter ces problèmes sont la modification du support d'impression par des hydrocarbures fluorés, l'ajout de co-solvants organiques tels que le DMSO ou de stabilisants de protéines tels que la sérum-albumine.

Cette technologie permet différentes applications dans le domaine de la biologie (88) :

Tests immunologiques

Actuellement, l'application la plus courante est celle des tests immunologiques (ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Les tests immunologiques impliquent la mesure d'une substance particulière dans un échantillon en utilisant la réaction d'un anticorps dirigé contre son antigène correspondant. Cette technologie est utilisée pour une analyse qualitative et/ou quantitative de cytokines, de facteurs de croissance, d'anticorps, d'allergènes et autres biomarqueurs pour les traumatismes cérébraux, les maladies cardiaques, les agents pathogènes, les cancers, le groupe sanguin et la grossesse. Récemment, Li *et al.* (89) ont développé un biocapteur de tétracycline obtenu par impression jet d'encre et dont le principe est basé sur un test ELISA. Ce biocapteur, présenté en *Figure 17*, possède une haute sensibilité ainsi qu'une bonne spécificité et voit son intérêt dans le domaine de la médecine.

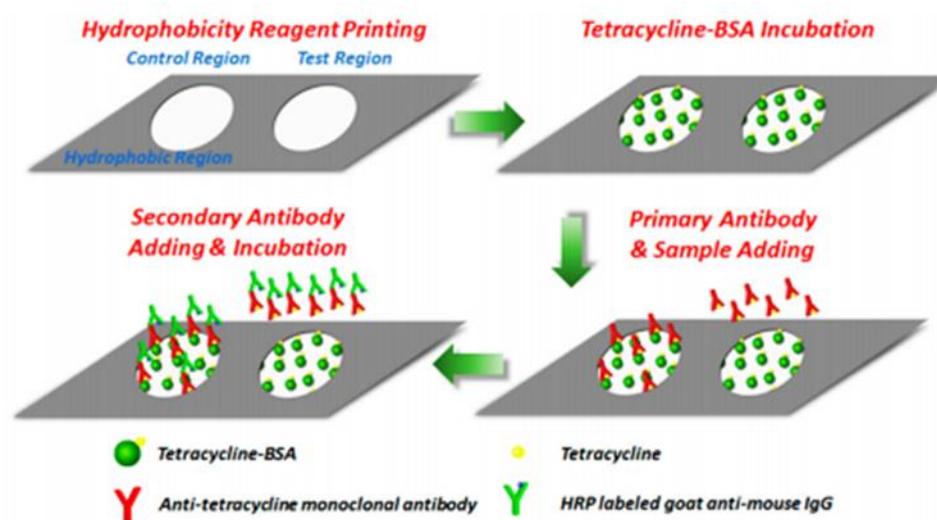


Figure 17 : Biocapteur de tétracycline obtenu par impression jet d'encre basé sur le principe du test ELISA. Extrait de Li *et al.* (89).

Un antigène de la tétracycline est déposé dans la région contrôle ainsi que dans la région test. Puis une solution de sérum-albumine bovine (BSA) est ajoutée au niveau des régions test et contrôle afin de bloquer les sites de liaison non réactifs et réduire l'adsorption non spécifique. Puis, l'échantillon à tester est ajouté dans la région test et un tampon contrôle (sans tétracycline) dans la région contrôle. Une solution d'anticorps anti-tétracycline est ensuite introduite aux deux régions. Enfin, une Immunoglobuline G (IgG) marquée avec une enzyme (HRP : HorseRadish Peroxidase) est ajoutée aux deux régions pour former des complexes antigène-anticorps-enzyme marqués permettant la détection de la tétracycline (89).

Protéomique

La protéomique est l'étude à grande échelle de la fonction et de la structure des protéines. Le protéome (l'ensemble protéique) varie d'une cellule à l'autre ainsi que lorsque les cellules interagissent avec le génome et son environnement, ce qui rend son étude difficile. L'impression jet d'encre est donc utilisée en protéomique comme outil d'analyse à haut débit grâce à la possibilité d'imprimer des matrices de protéines (ou d'autres macromolécules) sur un substrat analytique (pour une analyse en MALDI-MS par exemple) (90–92).

Biocapteurs

Un biocapteur est un appareil d'analyse qui utilise des anticorps, des enzymes, des acides nucléiques, des micro-organismes, des cellules isolées ou autres systèmes biologiquement dérivés en tant qu'élément de détection (93).

Le dépôt de faible quantité de matière entraîne une plus grande sensibilité de réponse du biocapteur. En effet, le temps de réponse du détecteur est plus rapide car moins de temps est nécessaire pour que l'interaction entre le matériel déposé et l'analyte ait lieu et qu'un signal soit détecté. L'impression jet d'encre montre en général l'obtention de dépôts hautement reproductibles et est donc une technologie adaptée à la fabrication de biocapteurs.

La Figure 18 présente un des premiers exemples de biocapteur obtenu par impression jet d'encre : celui d'un capteur de glucose. La réaction d'oxydoréduction du glucose catalysée par la glucose oxydase (GOD) génère un signal ampérométrique facilement mesurable. La solution aqueuse de l'enzyme est imprimée avec un polymère conducteur tel que le PEDOT/PSS (poly(3,4-ethylenedioxythiophene/polystyrene sulfonic acid) sur une couche conductrice d'oxyde d'indium-étain (ITO) qui est ensuite encapsulée par une membrane d'acétate de cellulose semi-perméable.

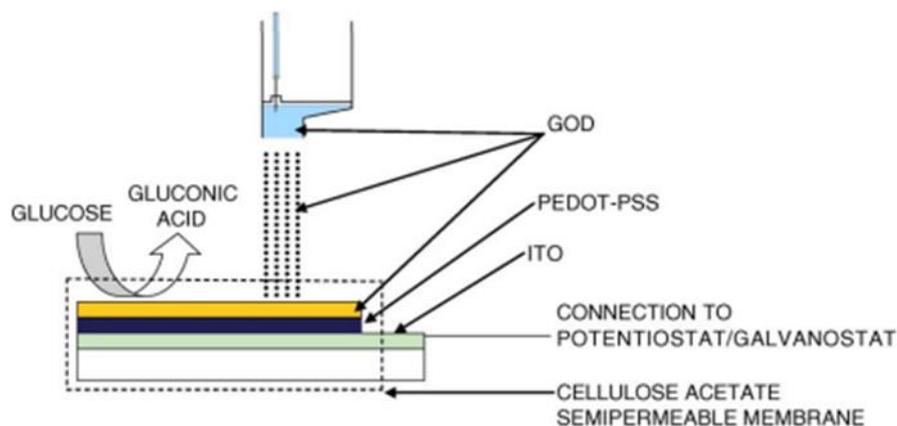


Figure 18 : Prototype d'un biocapteur de glucose obtenu par impression jet d'encre. Extrait de Ballarin *et al.* (94).

Ces travaux sont inspirants pour développer des outils de criblage enzymatique. Cerclier *et al.* ainsi que S. Lamant (95, 96) ont développé un outil de criblage enzymatique de polymère (arabinoxylane) présent sous forme solide. Ce polymère a été déposé par enduction centrifuge (ou spin-coating) et par impression jet d'encre, cette dernière permettant d'aller vers des criblages haut débit. Ces technologies seront présentées dans les parties III. 1 et V. 1, respectivement. Seuls, Ufarté *et al.* (97) ont montrés une dégradation enzymatique, utilisant une enzyme bactérienne (issue de *Clostridia*), sur des films solides de lignines obtenus par enduction centrifuge à partir d'une Lignosulfonate en solution avec une résine qui permet la polymérisation du polymère (la lignine) au support (wafer de silicium). Cependant, les films obtenus ne sont pas homogène et la technologie de l'enduction centrifuge ne permet pas d'effectuer des criblages à haut débit ni d'avoir des résultats quantitatifs.

I. 7. Objectifs de la thèse

Face à une grande diversité de lignines et d'oxydoréductases, un nombre incalculable de tests sont à effectuer afin de trouver les meilleures combinaisons permettant de dépolymériser la lignine et ainsi aller vers une valorisation efficace. L'objectif est donc d'aller vers un outil haut débit permettant alors de répondre à de nombreuses questions scientifiques qui seraient intraitables en utilisant différentes approches manuelles séquentielles. Il s'agit de démontrer la possibilité de réaliser des dépôts solides de lignine et une dépolymérisation de ces derniers (dépolymérisation en milieu solide) en comparaison avec les résultats obtenus en milieu liquide. Ces résultats permettant d'aller vers l'étude de la réalisation de dépôts solides par impression jet d'encre et d'étudier leur dépolymérisation enzymatique dans le but d'aller vers un outil de criblage à haut débit.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce chapitre présente les différentes conditions de réactions enzymatiques utilisées, les protocoles de fabrication de films solides ainsi que les méthodes d'analyses et de suivi de la dépolymérisation enzymatique des lignines en milieu liquide (lignines solubilisées) et en milieu solide (lignines sous forme de films solides).

Chapitre II. Matériel et méthodes	37
II. 1. Réactifs	37
II. 2. Etude de la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu liquide	37
II.2.1. Mesure de l'activité enzymatique.....	37
II.2.2. Conditions de réaction de dépolymérisation en phase liquide.....	38
II.2.3. Analyse de la lignine et des produits issus de la réaction de dépolymérisation Gel Permeation Chromatography (GPC)	39
II.2.4. Analyse de la lignine et des produits issus de la réaction de dépolymérisation par spectrométrie de masse : ESI-IM-MS	40
II.2.4.1. Collecte des échantillons	40
II.2.4.2. Analyse par spectrométrie de masse	42
II. 3. Etude de la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu solide	43
II.3.1. Réalisation de films de lignines par enduction centrifuge (ou spin-coating) .	43
II.3.2. Conditions de réaction de dépolymérisation en milieu solide	44
II.3.3. Mesure de l'épaisseur des films par ellipsométrie.....	46
II.3.4. Réalisation de micro-dépôts de lignines par impression jet d'encre	46
II.3.4.1. Préparation des encres de lignine	46
II.3.4.2. Préparation des supports d'impression.....	46
II.3.4.3. Paramètres d'impression	47
II.3.5. Mesure de l'épaisseur des dots imprimés par AFM	49

Chapitre II. Matériel et méthodes

II. 1. Réactifs

Les lignines ont été fournies par des industriels et ont été utilisées sans traitements préalables pour toutes les expériences. Trois types de lignines ont été utilisés durant cette thèse : une Lignosulfonate de Sodium (LS) fournie par Tembec, une Lignine Organosolv (LO) fournie par Chemical Point ainsi qu'une Lignine Kraft (LK) fournie par UPM Biochemicals.

L'enzyme utilisée pour la réalisation des expériences de dépolymérisation des lignines est une laccase de référence issue de *Trametes versicolor* (SIGMA-ALDRICH) ayant une activité spécifique de 0,87 U/mg. Deux médiateurs ont été utilisés : le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) et le 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical, 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) (SIGMA-ALDRICH).

Les solvants suivants, utilisés pour la réalisation des différentes expériences de cette thèse proviennent de chez SIGMA-ALDRICH : le tétrahydrofurane (THF), le 1,4-dioxane, l'éthanol, l'isopropanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le n-hexane, le dichlorométhane, le silane, l'acide acétique, le toluène, l'acétonitrile, l'acide chlorhydrique (HCl), l'acétate de sodium et l'hydroxyde de sodium..

II. 2. Etude de la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu liquide

II.2.1. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique a été mesurée dans différentes conditions de pH, températures et solvants afin de déterminer les conditions expérimentales présentant la meilleure activité. L'activité enzymatique est donnée en unité enzymatique (U). L'unité enzymatique représente la quantité d'enzyme nécessaire pour traiter une micromole de substrat en une minute dans des conditions opératoires précises (pH, température, milieu de réaction).

Le dosage de l'activité enzymatique est effectué en microplaque et en triplicat. Le milieu de réaction est composé de 50 μl de substrat ABTS à une concentration de 1,8 mM (solution prête à l'emploi - SIGMA-ALDRICH), 50 μl de laccase issue de *Trametes versicolor* ainsi que 100 μl de tampon acétate pH 4,6 (acide acétique/acétate de sodium 0,2 M). Ce mélange est incubé à la température voulue puis une lecture de l'absorbance est effectuée à 405 nm pendant 20 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque (ELx808 Absorbance Reader – BioTek Instrument Inc.).

Le calcul de l'activité enzymatique s'effectue à partir de la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon lc,$$

Avec, A représentant l'absorbance ; ϵ , le coefficient d'extinction molaire du substrat utilisé en $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; l, la longueur du trajet optique en cm et c, la concentration de la solution en M.

Cette loi s'appliquant à la vitesse maximale de l'enzyme, soit dans la zone linéaire de la courbe $A = f(\text{temps})$, le calcul est basé sur un ΔA et Δc .

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\epsilon l} (\text{M}.\text{min}^{-1})$$

$$\text{Activité (U)} = \frac{\Delta A}{\epsilon l} \times 2.10^2$$

Avec, $\epsilon_{\text{ABTS}} = 36\,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $l = 0,59 \text{ cm}$.

II.2.2. Conditions de réaction de dépolymérisation en phase liquide

Les réactions de dépolymérisation des lignines en phase liquide ont été réalisées en Eppendorf de 2 ml avec un volume de réaction de 1,5 ml à l'aide d'un bloc chauffant mélangeur MB-102 de la marque BIOER. Le milieu de réaction contient 3 mg de lignine solubilisée dans 375 μl de 1,4-dioxane, 750 μl de tampon acétate 0,2 M pH 4,6 contenant 0,0015 mmol de médiateur (ABTS, TEMPO ou les deux) ainsi que 350 μl de solution enzymatique contenant 3 U/ml de laccase solubilisée dans le tampon acétate 0,2 M pH 4,6. Ce milieu de réaction est incubé à 30°C pendant 5 jours sous agitation orbitale à 600 rpm.

II.2.3. Analyse de la lignine et des produits issus de la réaction de dépolymérisation par Gel Permeation Chromatography (GPC)

Suite aux réactions de dépolymérisation des lignines en phase liquide et en phase solide (Cf. II. 3) l'échantillon obtenu est analysé directement par chromatographie de perméation de gel (Gel Permeation Chromatography - GPC). Cette analyse permet d'obtenir la masse moléculaire apparente des lignines ainsi que d'effectuer le suivi de leur dépolymérisation. En effet, les molécules seront séparées en fonction de leurs tailles lors de leur passage à travers des colonnes composées de résine microporeuse. La Figure 19 montre le principe de séparation de molécules de tailles différentes lors de leur analyse par GPC. Une petite molécule va pouvoir pénétrer dans les pores de la résine et aura ainsi un trajet assez long alors qu'une grosse molécule aura un trajet beaucoup plus court car elle passe en dehors des pores.

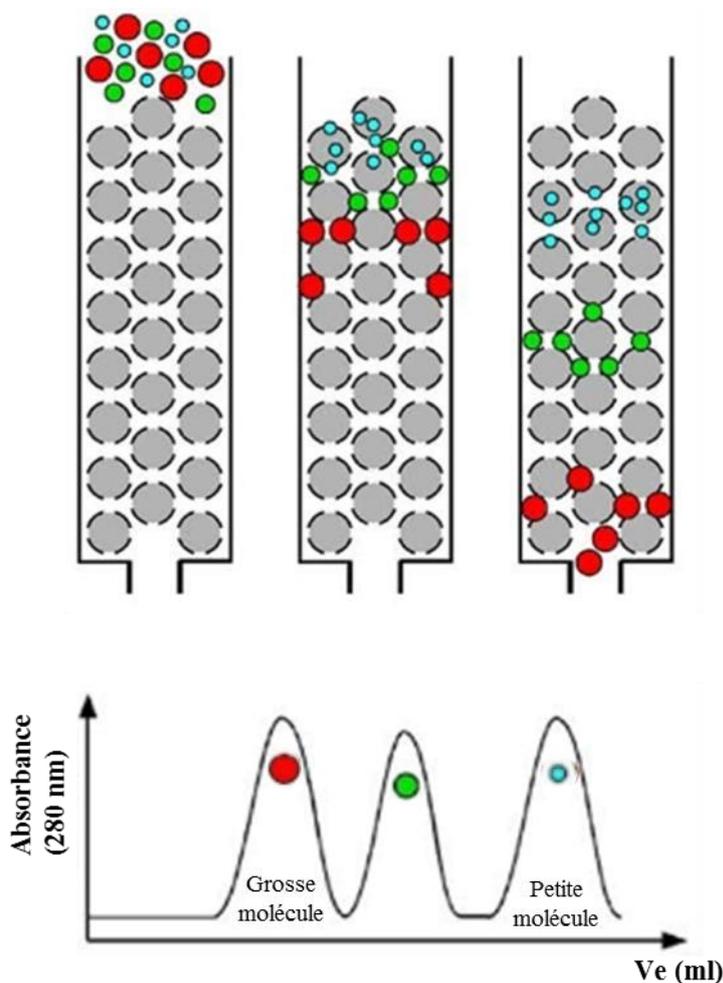


Figure 19 : Principe de séparation de la GPC. V_e : Volume d'éluion.

Deux ou trois colonnes GPC sont connectées en série sur un système HPLC de la marque Waters. L'HPLC est équipée d'une pompe, d'un dégazeur, d'un passeur automatique d'échantillons, d'un détecteur UV à 280 nm. Les colonnes utilisées sont la TSK-gel G 4 000 PW_{XL}, la TSK-gel G 3 000 PW_{XL} et la TSK-gel G oligo PW (Tosoh Biosciences). Ces colonnes ont été choisies afin de séparer les molécules dans une large gamme de masses : la TSKgel 4 000 PW_{XL} permet de séparer les molécules ayant une masse comprise entre 2 000 et 300 000 Da, la TSKgel 3 000 PW_{XL} sépare les molécules ayant une masse inférieure à 50 000 Da et la TSKgel Oligo-PW pour les molécules ayant une masse inférieure à 2 000 Da. La phase mobile utilisée est composée d'hydroxyde de sodium 0,2 M et de 20% d'acétonitrile. Le débit d'élution est de 0,5 ml/min à température ambiante. 100 µl de l'échantillon sont injectés dans le système chromatographique à l'aide d'un Autosampler. Les colonnes ont été calibrées à l'aide de cinq standards de polystyrènes sulfonés de différents poids moléculaires (1 000, 4 000, 10 000, 30 000 et 140 000 Da de chez PSS (Polymer Standards Service GmbH) ainsi que le 2,6-diméthoxyphénol, un monomère ayant un poids moléculaire de 154 Da et le guaiacylglycerol-beta-guaiacyléther, un dimère ayant un poids moléculaire de 320 Da (SIGMA-ALDRICH). Chaque chromatogramme obtenu a été décomposé à l'aide du logiciel PeakFit (Systat Software Inc.) selon un profil de Voigt.

II.2.4. Analyse de la lignine et des produits issus de la réaction de dépolymérisation par spectrométrie de masse : ESI-IM-MS

II.2.4.1. Collecte des échantillons

Afin de vérifier la dépolymérisation enzymatique des lignines, des collectes ont été effectuées à partir du profil chromatographique obtenu par dépolymérisation enzymatique de la Lignosulfonate puis analysées par spectrométrie de masse. Sur le profil chromatographique de la Lignosulfonate avant (Figure 20) et après (Figure 21) dépolymérisation enzymatique, le pic correspondant à la lignine non dépolymérisée (appelé « Li 1 ») et les pics correspondant aux produits de dépolymérisation (appelé « Li 2 » pour le profil avant dépolymérisation et « Produits » pour le profil après dépolymérisation) ont été collectés séparément.

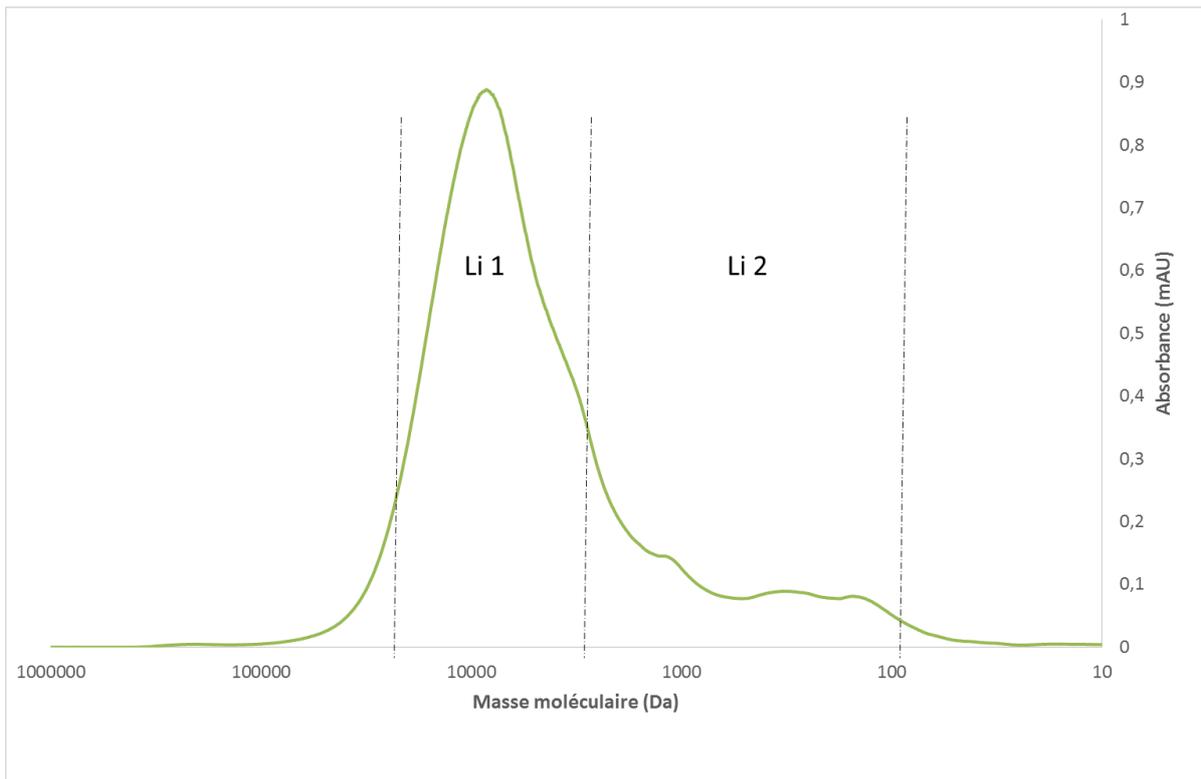


Figure 20 : Représentation des collectes effectuées à partir du profil chromatographique de la Lignosulfonate avant dépolymérisation enzymatique par la laccase de *T. versicolor*. Le pic « Li 1 » représente le premier pic de lignine non dépolymérisée et le pic « Li 2 » représente le deuxième pic de lignine non dépolymérisée.

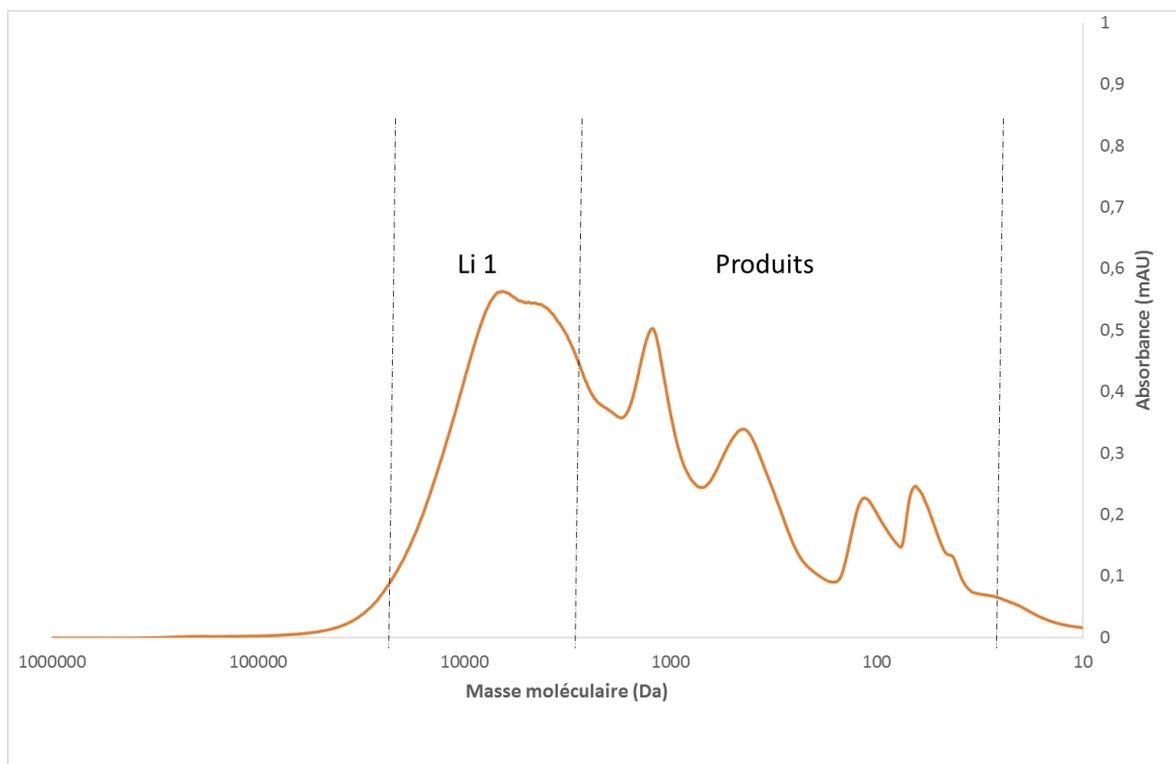


Figure 21 : Représentation des collectes effectuées à partir du profil chromatographique de la Lignosulfonate après dépolymérisation enzymatique par la laccase de *T. versicolor* en présence de 1,6 nM d'ABTS. Le pic « Li 1 » représente le premier pic de lignine non dépolymérisée et le pic « produits » représente les produits de dépolymérisation.

Après collecte, chaque échantillon a été séché au speedvac et repris dans le solvant d'analyse IMS au moment de l'analyse (50/50 (v/v) d'acétonitrile (ACN)/H₂O).

II.2.4.2. Analyse par spectrométrie de masse

Les échantillons collectés ainsi que des polymères synthétiques modèles (Polyéthylène glycol ($M_w \approx 1000$ g/mol) et polyguaiacol synthétisé selon le protocole présenté ci-après) ont d'abord été analysés par MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Le polyguaiacol a été synthétisé par polymérisation enzymatique du guaiacol. Le guaiacol à 5 mmol a été dissout dans 45 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7) contenant du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Ensuite 1 mg d'enzyme (horseradish peroxidase -SIGMA-ALDRICH) a été dissoute dans 5 ml de ce même tampon phosphate. Ces deux solutions ont été mélangées pour démarrer la réaction enzymatique. Puis, 250 μ l de peroxyde d'hydrogène (5 % en milieu aqueux) est ajouté à ce milieu toutes les 5 minutes pour alimenter la réaction. Et ceci pour un total de 14 ajouts. La réaction est réalisée sous agitation magnétique et à température ambiante. Le milieu est ensuite agité pendant 1h, centrifugé et le précipité est lavé sous vide avec de l'eau distillée (98, 99). L'analyse MALDI-TOF-MS a été effectuée par dépôt successifs d'une matrice (le dithranol, molécule permettant de favoriser l'ionisation et couramment utilisé pour l'analyse des polymères) et de l'échantillon à analyser (100). Ces dépôts ont été réalisés sur une cible de type AnchorChip. L'analyse a été effectuée en mode linéaire négatif.

Pour l'analyse ESI-IM-MS, les échantillons de lignines collectés ont été injectés directement dans le spectromètre de masse (SYNAPT-G2-Si – Waters) avec un débit de 15 μ l/min en mode de résolution négative. L'échantillon a été soumis à une pulvérisation électrolytique sous une tension de 2.5 kV, en utilisant un débit de gaz de désolvatation (N₂) de 600 L/h, une pression de gaz nébuliseur de 6.5 bar et des températures de désolvatation de 150 et 300 °C, respectivement. Les scans complets de l'étude en spectrométrie de masse ont été acquis avec un pouvoir de résolution de 20000 (FWHM) sur une gamme de masse de 200 – 2000 m/z. Les signaux de masse ont été analysés à l'aide du logiciel Mass Lynx (ver. 4.1 – Waters). Les spectres de masse ont été calibrés de manière externe en mode négatif avec une solution de formate de sodium (SIGMA-ALDRICH) à 5 mM dans 50/50 (v/v) ACN/H₂O. Les paramètres des ondes progressives utilisés pour les mesures IMS (Ion Mobility mass Spectrometry) sont les suivants : la vitesse de l'onde source est de 300 m/s, la hauteur de l'onde source est de 0.2 V, la vitesse de l'onde de piégeage est de 311 m/s, la hauteur de l'onde de

piégeage est de 4 V, la vitesse d'onde IMS est de 650 m/s, la hauteur d'onde IMS est de 40 V, la vitesse de l'onde de transfert est de 175 m/s et la hauteur d'onde de transfert est de 4 V.

II. 3. Etude de la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu solide

II.3.1. Réalisation de films de lignines par enduction centrifuge (ou spin-coating)

Les films ont été réalisés par enduction centrifuge à partir de solutions de lignines solubilisées dans différents solvants à différentes concentrations. Les lignines sont solubilisées, centrifugées à 8000 rpm pendant 5 min à 25°C puis filtrées sur une membrane de cellulose 0,20 µm avant utilisation. Les solutions de lignine Kraft et Organosolv ont été utilisées directement après filtration. Les solutions de Lignosulfonate ont été préparées avec de la résine de mélamine formaldéhyde (Madurit MW 112 – INEOS) avant utilisation. La solution de Lignosulfonate préalablement préparée à la concentration voulue (solubilisée dans l'EDI) est mélangée à 10 µl de résine, 1 µl de polyallylamine hydrochloride (PAH) et 2,5 µl d'acide chlorhydrique (HCl). La solution est déposée sur un wafer de silicium brut de chez TOPSIL préalablement nettoyé à l'acétone et à l'isopropanol puis séché. Les tests ont été effectués sur des wafers complet ou sur des ¼ de wafer. Ensuite, le wafer est mis en rotation à l'aide d'un spin-coater à 1000 rpm pendant 10 secondes avec une accélération de 100 rpm/s. L'évaporation du solvant est effectuée par un recuit du wafer à 140°C (101) en étuve pendant environ 2h dans le but d'obtenir une évaporation complète du solvant et de permettre la polymérisation de la résine de mélamine formaldéhyde et ainsi obtenir un film solide (Figure 22).

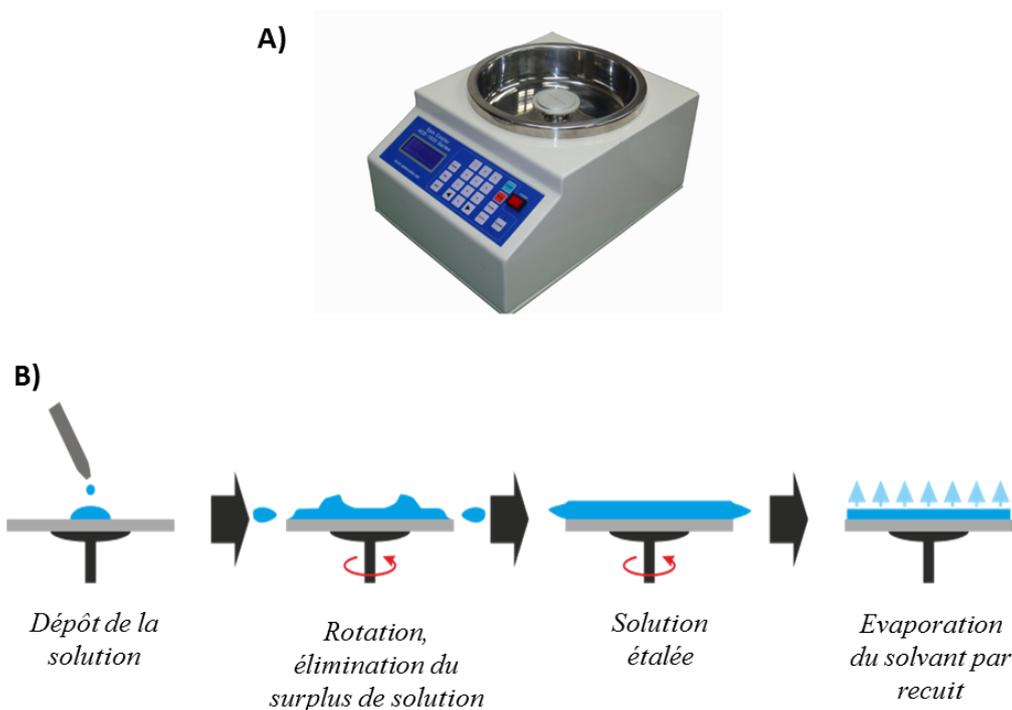


Figure 22 : a) Photographie du spin-coateur. b) Principe de dépôt de film fin par enduction centrifuge

II.3.2. Conditions de réaction de dépolymérisation en milieu solide

Le film de lignine obtenu dans la partie II.3.1. est immergé dans l'EDI pendant 30 min afin de vérifier sa stabilité. Un film est dit « stable » lorsqu'il n'a pas été resolubilisé après immersion dans l'eau.

Un moule en polydiméthylsiloxane (PDMS) est réalisé de la façon suivante : Un mélange du précurseur et du durcisseur (10 :1) est préparé à l'aide d'un kit (Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit) et mis sous vide afin de retirer les bulles. Ce mélange est ensuite versé dans une boîte de pétri et cuit à 70°C pendant environ 1h. La plaque de PDMS obtenue est ensuite poinçonnée avec un stylo à biopsie de façon à obtenir des puits permettant le dépôt de 20 µl de solution (Figure 23). Enfin, cette dernière est appliquée sur le film de lignine, le tout est mis à l'étuve à 70°C pendant environ 1h afin de favoriser l'accroche du moule en PDMS sur le film de lignine et ainsi éviter les fuites des solutions déposées dans les puits.

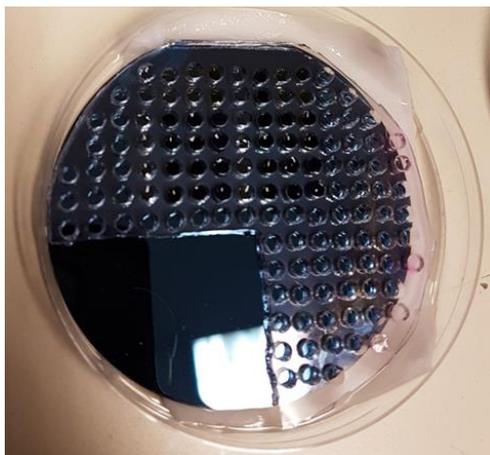


Figure 23 : Photo du moule de PDMS permettant de déposer un volume de 20 µl de solution enzymatique.

Chaque puits permet de déposer différentes préparations enzymatiques. Différentes concentrations en laccase (0 ; 3 et 15 U) et en ABTS (0 ; 1,6 ; 3,2 et 16 nM) préalablement solubilisés dans l'eau ou dans le tampon acétate pH 4,6, ont été testées. Après dépôt des solutions enzymatiques dans les puits, le tout est incubé à 30°C en étuve pendant 24h sous atmosphère humide afin d'éviter l'évaporation du milieu réactionnel déposé. L'atmosphère humide est maintenue en déposant un coton humide en dessous du wafer de silicium, le tout déposé dans une boîte de pétri fermée. Après réaction, le film solide de lignine est rincé à l'eau distillée et séché à l'air comprimé.

Un moule de PDMS poinçonné de façon à obtenir des puits permettant le dépôt de 150 µl de solution enzymatique a été réalisé (Figure 24) dans le but de prélever ce volume après incubation. Ces solutions enzymatiques sont alors injectées en GPC (injection de 100 µl - Chapitre II.2.3) afin d'observer si la dépolymérisation de la lignine est effective après réaction enzymatique en phase solide (sur film).

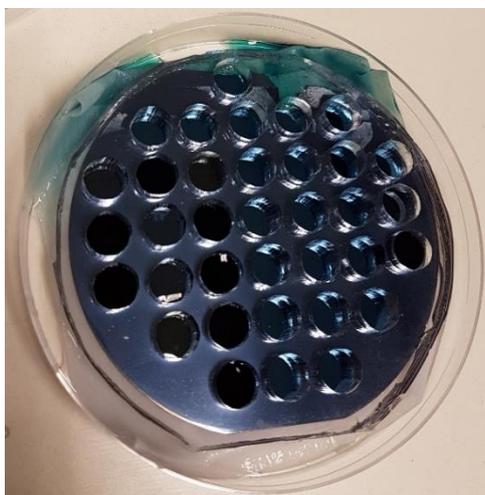


Figure 24 : Photo du moule de PDMS permettant de déposer un volume de 150 µl de solution enzymatique.

II.3.3. Mesure de l'épaisseur des films par ellipsométrie

L'épaisseur du film de lignine est mesurée à l'aide d'un ellipsomètre de la marque HORIBA Jobin Yvon (UVISEL™). Les données sont acquises entre 2 eV et 5 eV avec un incrément de 0,10 eV, le temps d'intégration est de 20×200 ms et accumulé 1 fois. Le traitement des données mesurées et le calcul de l'épaisseur du film sont effectués par le logiciel Delta Psi 2. L'épaisseur est mesurée avant incubation avec les différentes solutions enzymatiques ainsi qu'après incubation, rinçage et séchage du film au centre de chaque spot obtenu (fonds des puits).

II.3.4. Réalisation de micro-dépôts de lignines par impression jet d'encre

II.3.4.1. Préparation des encres de lignine

Les micro-dépôts ont été réalisés par impression jet d'encre à partir de solutions de lignines à 25 g/L solubilisées dans du 1,4-dioxane seul ou en présence de 10 % de co-solvant (eau, DMSO, Isopropanol). Les lignines sont solubilisées, centrifugées à 8000 rpm pendant 5 min à 25°C puis filtrées sur une membrane de cellulose 0,20 µm avant utilisation.

II.3.4.2. Préparation des supports d'impression

Les encres de lignines sont imprimées sur des wafers de silicium bruts ou recouverts de C₄F₈, de PFTS ou de TMSPMA afin de changer l'angle de contact du support d'impression. Les wafers de silicium bruts sont préalablement nettoyés à l'acétone puis à l'éthanol et ensuite séchés. Les différents revêtements de surface ont été préparés de la façon suivante :

Le C₄F₈ : octofluorocyclobutane

Le C₄F₈ est un fluoropolymère hydrophobe déposé sur le wafer de silicium brut par ICP (Induced Coupled Plasma). Préalablement, une couche d'accroche est réalisée afin d'obtenir une meilleure accroche du C₄F₈ sur le wafer de silicium. Cette couche d'accroche est préparée de la manière suivante : le wafer de silicium brut est déposé pendant au moins 2 heures dans un composé de 40 ml de Toluène, 200 µl de Silane et 200 µl d'acide acétique. Ensuite, le wafer est rincé dans deux bains consécutifs d'hexane pendant 1 à 2 minutes. Puis, un rinçage à l'isopropanol et un séchage au diazote sont effectués. Le dépôt de C₄F₈ est réalisé à l'aide d'un bâti ICP de la marque STS (Surface Technology System) avec une pression de chambre de

949 mTorr, une puissance de passivation de 1000 W, un débit de 220 sccm pendant 20 secondes. Cette méthode permet d'obtenir un dépôt de C₄F₈ d'environ 100 nm d'épaisseur avec un angle de contact d'environ 108°.

Le PFTS : Perfluorotrichlorosilane

La réalisation de PFTS liquide s'effectue sous boîte à gant (environnement exempt d'oxygène) de la manière suivante : le wafer de silicium brut est déposé pendant environ 2 heures dans un bain composé de 70 % de n-hexane, 30 % de dichlorométhane et de 50 µl de PFTS. La surface obtenue possède un angle de contact de 102° et a été activée avec un traitement à l'uv / O₃ puis séchée à l'azote avant utilisation.

Le TMSPMA : 3-(trimethylsilyl)propylmethacrylate

Le wafer de silicium brut est déposé pendant au moins 2 heures dans un bain composé de 70 % de n-hexane, 30 % de dichlorométhane, 100 µl de silane ([3-(Methacryloxy)propyl]trimethoxysilane) et 100 µl d'acide acétique. Ensuite, le wafer est rincé dans deux bains consécutifs de dichlorométhane pendant 1 minute. Puis rincé au dichlorométhane et à l'isopropanol et séché. La surface obtenue possède un angle de contact de 60-70°.

Les différents angles de contacts ont été mesurés à l'aide d'un KRUS DSA300 selon la méthode de la goutte posée sur le support.

II.3.4.3. Paramètres d'impression

L'imprimante utilisée est la CeraPrinter série X (CERADROP - France), elle est composée d'une platine porte-échantillon motorisée, de deux caméras d'observations (éjection de la goutte au niveau de la buse et position de l'échantillon) et de têtes d'impression monobuse (Figure 25). Le logiciel Driver CERAPRINTER permet de commander l'imprimante: réglage de la distance intergoutte, réglage de l'étalement, réglage et visualisation de la stabilité de la goutte, etc. L'impression est réalisée à l'aide de buses d'impression de 20 µm ou de 35 µm de diamètre (MicroFab) permettant de produire des gouttes d'environ 35 pl ou 90 pl respectivement avec les encres de lignines préparées lors de cette thèse.

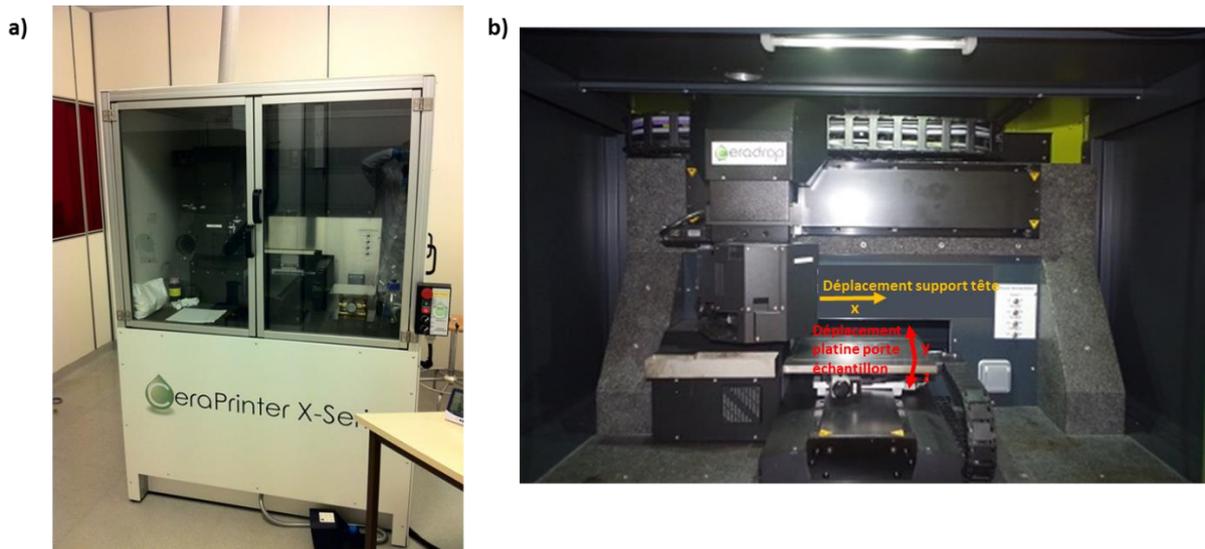


Figure 25 : Photographie de l'imprimante jet d'encre CeraPrinter série X (CERADROP) (a) ainsi que de l'intérieur de la machine (b).

L'impression est réalisée selon un masque numérique créé à partir du logiciel CERASLICE. Le masque d'impression est composé de motifs carrés de l'ordre du millimètre espacés l'un de l'autre de quelques millimètres. Chaque motif carré est constitué de micro dépôts espacés de quelques μm (Figure 26).

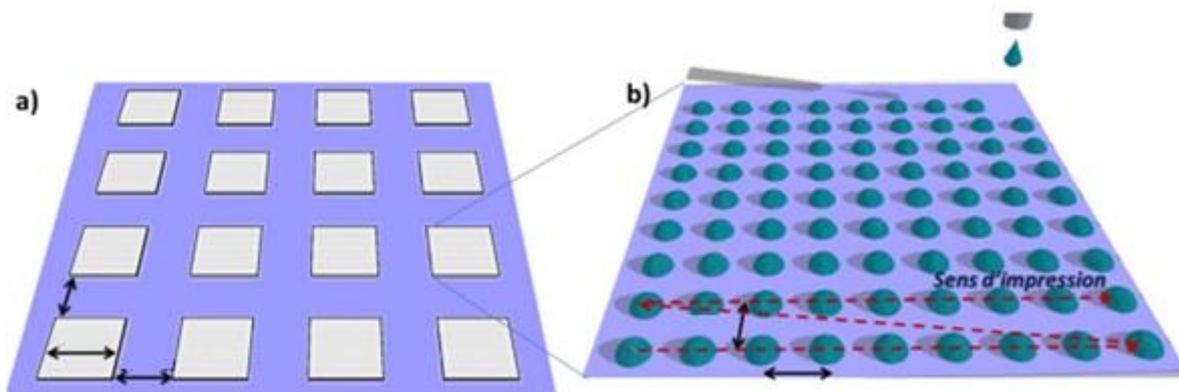


Figure 26 : Schéma du format d'impression (a) et des microdépôts dans chaque carrés (b) effectué avec l'imprimante CERADROP.

Après impression, une visualisation de l'aspect global est effectuée au microscope à l'aide de différents grossissements (2.5x, 10x, 20x et 50x), puis la visualisation de l'aspect en 3 dimensions et la mesure de l'épaisseur est effectuée par AFM.

II.3.5. Mesure de l'épaisseur des dots imprimés par AFM

Les dépôts n'ayant pas coalescés et présentant des interférences optiques ont été analysés à l'aide d'un AFM Bruker Dimension. Les images ont été scannées en mode Tapping en utilisant un microlevier possédant une pointe de contact à base de nitrure de silicium. Le logiciel « NanoScope Analysis 1.5 » a été utilisé pour analyser les images afin de déterminer la forme en 3 dimensions du microdépôt imprimé ainsi que son épaisseur.

Chapitre III : Etude de la possibilité d'effectuer des films solides de lignines

Comme énoncé lors du chapitre bibliographique, la dépolymérisation enzymatique de la lignine en milieu liquide a fait l'objet de nombreuses recherches en vue de sa valorisation en produits de plus faible masse moléculaire et à haute valeur ajoutée. Cependant, la récalcitrance de la lignine (insoluble dans les milieux aqueux) ainsi que l'activité optimale des enzymes dans les milieux aqueux rendent difficile cette dépolymérisation. L'objectif est donc de développer un outil alternatif à la dépolymérisation en milieu liquide qui est la dépolymérisation en milieu solide (lignines sous forme de films solides). Cet outil permettrait une solubilisation des lignines dans un solvant organique, de l'enzyme dans son tampon de travail (milieu aqueux) ainsi qu'une visualisation directement à l'œil nu de la dépolymérisation enzymatique. Ainsi, ce chapitre présente tout d'abord le principe de la dépolymérisation en milieu solide. Puis, les études de solubilité des lignines dans les différents solvants organiques. Enfin, les études de la capacité filmogène des lignines, de la stabilité des films obtenus et de leur capacité de dépolymérisation enzymatique.

Chapitre III. Etude de la possibilité d'effectuer des films solides de lignines	52
III. 1. Principe de la dépolymérisation enzymatique en milieu solide	52
III. 2. Solubilité des lignines	54
III. 3. Etude de la capacité filmogène des lignines et de la stabilité des films obtenus par spin-coating	56
III. 4. Etude de la capacité de dépolymérisation enzymatique des films solides obtenus par spin-coating	63

Chapitre III. Etude de la possibilité d'effectuer des films solides de lignines

III. 1. Principe de la dépolymérisation enzymatique en milieu solide

Face à l'insolubilité des lignines dans les milieux aqueux et leur solubilité dans les solvants organiques, l'objectif est de développer un outil alternatif à la dépolymérisation en milieu liquide. En effet cette dernière est difficile car elle nécessite de travailler en milieu aqueux, permettant à l'enzyme d'être active. Cette alternative est la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu solide (lignines sous forme de dépôts solides et l'enzyme est présente en milieu liquide) qui permettrait de s'affranchir des principales contraintes liées à la dépolymérisation enzymatique en milieu liquide. Les conditions optimales seraient les suivantes :

- La solubilisation des lignines dans un solvant organique
- La solubilisation de l'enzyme dans son tampon aqueux de travail (tampon acétate pH 4.6 pour l'enzyme issue de *Trametes versicolor*)
- Une visualisation directement à l'œil nu de la dépolymérisation enzymatique.

Dans un premier temps, une étude de la possibilité d'effectuer des films solides à partir de solutions de lignines solubilisées dans les solvants organiques a donc été réalisée. Puis une étude de leur capacité de dépolymérisation a été effectuée. Cette dépolymérisation en milieu solide passe par différentes étapes :

1. **Solubilisation de la lignine** : Utilisation d'un solvant organique pour les lignines Kraft et Organosolv ou d'un solvant aqueux pour la Lignosulfonate afin d'avoir une très bonne solubilisation. Les solutions obtenues seront déposées sur un wafer de silicium par enduction centrifuge, ce qui permet d'obtenir un film solide de lignine après évaporation du solvant. Le silicium étant une surface réfléchissante, une couleur caractéristique de l'épaisseur du film déposé est observée selon le principe d'interférences optiques. Pour un film d'une épaisseur de l'ordre de la centaine de nanomètre, une couleur bleue est observée. Le principe d'interférences optiques, présenté en Figure 27, est basé sur une différence de réfraction entre le film nanométrique, l'air et le wafer de silicium. Lorsqu'une onde lumineuse (rayon incident) arrive à la surface du film nanométrique, une partie va se réfléchir au niveau de l'interface air/film (rayon réfléchi) et une partie va traverser le film pour être réfléchi au niveau de l'interface film/silicium pour aller traverser une seconde

fois l'interface film/air et ainsi être réfracté (rayon réfracté). Ainsi, ce que nous observons à l'œil nu est la somme de deux rayons ayant parcouru un chemin optique différent et sont à l'origine de l'apparition de couleurs. Ces deux rayons seront réfléchis de différentes manières selon l'épaisseur du film et présenteront des couleurs variées, observées à l'œil nu.

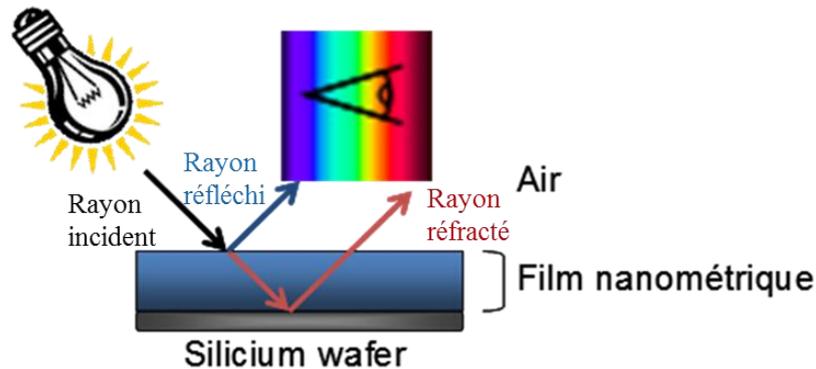


Figure 27 : Principe de l'interférence optique.

2. **Solubilisation de la laccase** : L'enzyme est solubilisée dans un tampon acétate de sodium 0,2 M pH 4,6 permettant d'avoir une activité optimale (milieu aqueux). La solution enzymatique est ensuite déposée sur le film solide. L'ensemble est incubé à 30 °C en milieu humide afin d'éviter l'évaporation de la solution enzymatique.
3. **Réaction enzymatique en milieu solide** : La réaction est arrêtée en retirant la solution enzymatique par rinçage et séchage du film solide. Après dépolymérisation enzymatique, l'épaisseur du film a diminué, cela se traduit par une variation voire une disparition de la couleur du film (Figure 28).

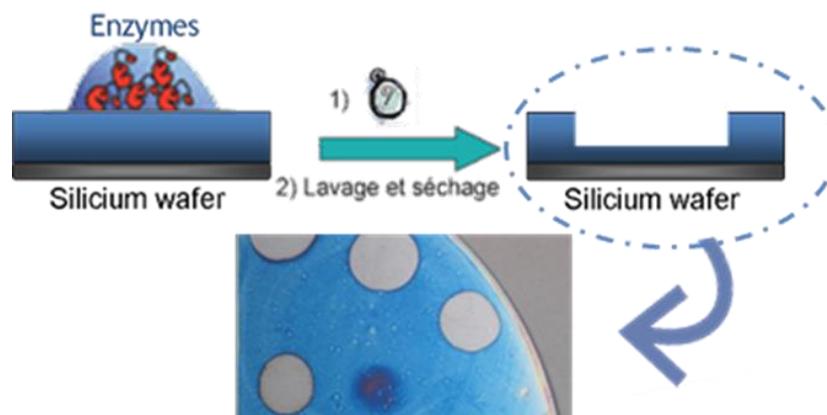


Figure 28 : Principe de la réaction enzymatique sur un film nanométrique déposé sur un wafer de silicium

La photographie en Figure 28 présente les résultats observés par Cerclier *et al.* (95) de la dépolymérisation en milieu solide d'un film d'un polymère (l'arabinoxylane) par une xylanase. C'est une technologie très peu étudiée avec les lignines en tant qu'outil de criblage.

III. 2. Solubilité des lignines

Dans le but d'adapter cet outil pour permettre une étude de la dépolymérisation en milieu solide de lignines industrielles, plusieurs objectifs préliminaires sont à atteindre. Le premier objectif est de déterminer les solvants permettant la meilleure solubilité des lignines. La solubilité des lignines dans différents solvants ou mélanges de solvants a été étudiée. La Lignosulfonate est connue pour être soluble en milieu aqueux tandis que la lignine Kraft et la lignine Organosolv ne le sont en général pas mais sont solubles dans certains solvants. Le Tableau 3 montre la solubilité observée de ces trois lignines dans quelques solvants purs. La solubilité des lignines a été effectuée par une interprétation visuelle de la couleur du surnageant et de la quantité du culot présent après centrifugation de la solution. La Lignosulfonate est très soluble dans l'eau, plus légèrement dans le DMSO et totalement insoluble dans tous les autres solvants testés. La lignine Kraft et la lignine Organosolv montrent une affinité similaire aux différents solvants. Les solvants permettant leur solubilisation totale sont les solvants ayant un pH basique (NaOH, NH₄OH, etc.), DMSO, le 1,4-dioxane, le THF et dans une moindre mesure l'éthanol et l'acétone. Elles sont totalement insolubles dans tous les autres solvants testés.

Tableau 3 : Solubilité des lignines dans les solvants purs. +++ Dissolution totale, ++ Dissolution avec présence d'un petit culot, + Dissolution partielle, - Insoluble.

Solvant	Solubilité		
	Lignine Kraft	Lignine Organosolv	Lignosulfonate
Eau	-	-	+++
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	+++	+++	++
1,4-dioxane	++	++	-
Acétonitrile	-	-	-
Dichlororméthane	-	-	-
Ethanol	+	+	-
Ether diéthylique	-	-	-
Tétrahydrofurane (THF)	+++	++	-
Acétone	+	+	-

Des mélanges hydro-organiques ont également été testés, afin de prendre en compte la nécessité de la présence de l'eau pour garantir le maintien de l'activité enzymatique. Le Tableau 4 montre les limites de solubilité des lignines dans les mélanges solvant/eau. La Lignosulfonate reste principalement soluble dans l'eau. Elle est soluble à partir de 90 % d'eau dans les mélanges 1,4-dioxane/eau et THF/eau. La lignine Kraft et la lignine Organosolv sont totalement insolubles dans les mélanges éthanol/eau et solubles à partir de 70 % et 80 % de THF ou DMSO dans les mélanges THF/eau et DMSO/eau respectivement. Puis, la lignine Kraft et la lignine Organosolv sont solubles à partir de 40 % et 30 % de 1,4-dioxane respectivement. Cette faible limite de solubilité fait du 1,4-dioxane un bon candidat pour son utilisation en tant que co-solvant de réaction.

Tableau 4 : Limite de solubilité des lignines dans les mélanges eau/solvants.

Solvant	Solubilité		
	Lignine Kraft	Lignine Organosolv	Lignosulfonate
1,4-dioxane / Eau	40 % / 60 %	30 % / 70 %	10 % / 90 %
THF / Eau	70 % / 30 %	70% / 30 %	10 % / 90 %
DMSO / Eau	80 % / 20 %	80 % / 20 %	Soluble
Ethanol / Eau	Insoluble	Insoluble	Soluble

III. 3. Etude de la capacité filmogène des lignines et de la stabilité des films obtenus par spin-coating

Comme énoncé dans la partie précédente, la Lignosulfonate est soluble dans l'eau, le DMSO et l'éthanol puis les lignines Kraft et Organosolv sont plutôt solubles dans les solvants organiques tels que le DMSO, le 1,4-dioxane, le THF et dans les mélanges THF/Eau (70/30 v/v), 1,4-dioxane/Eau (40/60 v/v) et DMSO/Eau (80/20 v/v). Cependant, chaque solvant possède des propriétés différentes de mouillabilité, tension de surface, etc. donc toutes les solutions ne permettent pas d'obtenir de film. Le deuxième objectif est donc d'étudier la capacité filmogène des solutions de lignines obtenues. Le but est d'obtenir des films homogènes, c'est-à-dire, couvrant toute la surface et sans présence d'agrégats. Ensuite, comme expliqué dans la partie III. 1, pour observer uniquement la dépolymérisation enzymatique, il est nécessaire de pouvoir déposer la solution enzymatique (solution aqueuse) sur le film sans qu'il ne se resolubilise ou se décolle, c'est ainsi que nous avons défini la notion de stabilité des films. Cette stabilité est testée en trempant les films dans un bain d'eau pendant quelques minutes, un film est dit « stable » lorsqu'il ne s'est pas resolubilisé ou qu'il ne se décolle pas.

Le Tableau 5 montre les résultats obtenus en termes de solubilité, de capacité filmogène ainsi que de la stabilité des différents films obtenus de Lignosulfonate, de lignine Kraft et de lignine Organosolv. Le but est de déterminer le solvant ainsi que la concentration en lignine permettant d'obtenir des films homogènes, stables et de couleur bleue caractéristique d'un film ayant une épaisseur de l'ordre de la centaine de nanomètre.

Tableau 5 : Résumé des résultats de capacité filmogène et de stabilité des lignines dans différents solvants (aqueux, organiques et en mélanges).

	Solvant	Type de lignine	[Lignine]	Obtention de film	Film stable	Résultats	
Solvant aqueux	NaOH 2M	LK	900 g/L (A)	Non	Non	<i>Figure 29</i>	
			450 g/L (B)	Oui	Non		
			90 g/L (C)	Oui	Non		
	NH ₄ OH 1M	LK (A) et LO (B)	400 g/L	Oui	Non	<i>Figure 30</i>	
			200 g/L	Oui	Non		
Eau / Résine	LS	250 g/L	Oui	Non	Film bleu/vert		
		200 g/L	Oui	Non			
Solvant organique	THF	LK	250 à 10g/L (A-G)	Oui	Oui à partir de 50 g/L	<i>Figure 31</i>	
			25 g/L (H)	Oui			Oui
	1,4-dioxane	LK	10 g/L ; 25 g/L (A)	Oui	Oui	<i>Figure 32</i>	
			10 g/L ; 25 g/L (B)	Oui	Oui		
	DMSO	LK (A) LO (B) LS (C)	25 g/L	Non	Non	<i>Figure 33</i>	
25 g/L			Oui	Oui			
25 g/L			Non	Non			
Mélanges de solvants	1,4-dioxane/Eau 90 % à 60 % 1,4-dioxane	LK	25 g/L	Oui à partir de 80 % de dioxane (A)	Oui	<i>Figure 34</i>	
				Oui à partir de 90 % de dioxane (B)	Oui		
	1,4-dioxane /Ethanol	LK (70 % (A) et 60 % (B) Ethanol) LO (60 % Ethanol (C))	25 g/L	25 g/L	Oui	Oui	<i>Figure 35</i>
					Oui	Oui	
	THF / DMSO 50 %	LK	25 g/L	Oui Non uniforme	Oui	<i>Figure 36</i>	

Dans un premier temps, les tests ont été effectués dans différents milieux aqueux. Les lignines sont solubles dans les solvants ayant un pH basique (102). La lignine Kraft solubilisée dans le NaOH 2M à forte concentration (900 g/l) ne permet pas d'obtenir un film homogène mais un dépôt marron foncé très craquelé (Figure 29 A). A une concentration plus faible (450 g/l), un film non homogène de couleur rose et verte est obtenu (Figure 29 B). Pour une concentration plus faible (90g/l), nous observons une cristallisation du NaOH sur le film ce qui nous permet de dire que le NaOH n'est pas le solvant adapté pour la formation de films fins (Figure 29 C). De plus, quelle que soit la concentration, les films ne sont pas stables.

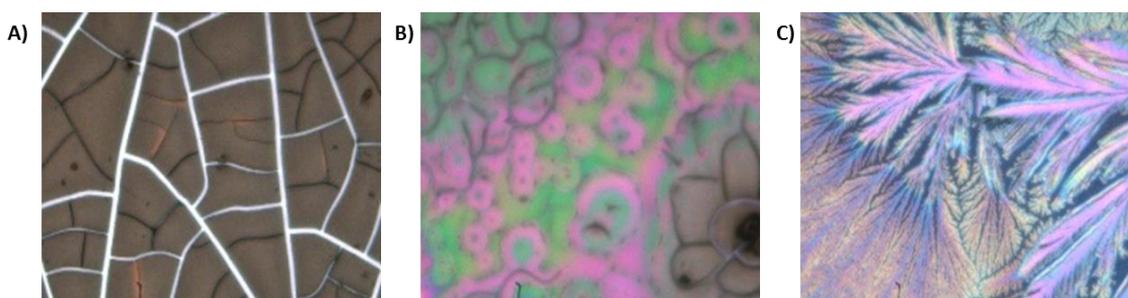


Figure 29 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de lignine Kraft à A) 900g/l, B) 450 g/l et C) 90g/l solubilisée dans le NaOH 2M. Grossissement 20x.

Très peu d'études décrivant des méthodes de dépôts utilisées pour faire des films fins de lignines ont été réalisées. L'étude principale est celle de Norgren *et al.* (103, 104). Ils ont effectué des films de 100 nm d'épaisseur à partir de lignines solubilisées dans l'ammoniaque (NH_4OH) 1M. Le NH_4OH permet de solubiliser les lignines utilisées pendant la thèse, les films obtenus avec la lignine Kraft à 400 g/l et la lignine Organosolv à 200 g/l sont montrés sur la Figure 30. Ces solutions ont permis d'obtenir des films fins mais ayant un aspect craquelé, ce qui les fragilise et les rend instables.

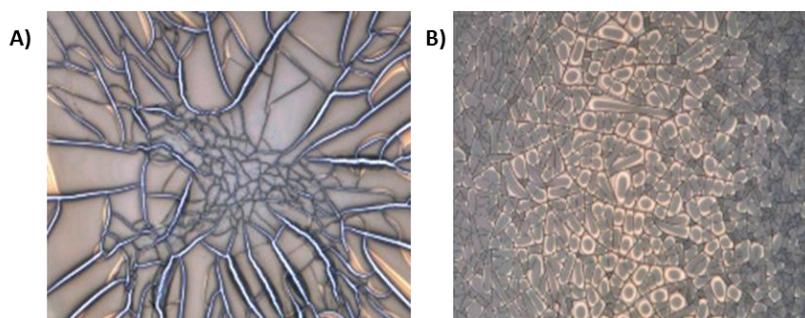


Figure 30 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft à 450 g/l et B) de lignine Organosolv à 200 g/l solubilisée dans du NH_4OH 1M. Grossissement 20x.

Ensuite, les travaux de S. LAMANT lors d'une précédente thèse sur le développement d'un biocapteur d'activité d'hydrolyse enzymatique par impression jet d'encre avec l'arabinoxylane, en partenariat avec Cerclier *et al.* (95) (Figure 28), ont permis de développer une solution aqueuse d'arabinoxylane permettant d'obtenir des films stables. Cette stabilité est acquise grâce à l'utilisation d'une résine de mélamine formaldéhyde. La Lignosulfonate, soluble dans l'eau, comme l'arabinoxylane, a été testée à 250 et 200 g/l en présence de résine. Ces solutions nous ont permis d'obtenir des films homogènes de couleur bleu/vert mais qui ne sont pas stables. Ces films ne sont donc pas utilisables pour effectuer les tests de catalyse enzymatique en milieu solide.

Dans un deuxième temps, les tests ont été réalisés en utilisant des solvants organiques capables de solubiliser les trois types de lignines, en s'appuyant sur les résultats obtenus dans la partie précédente (THF, 1,4-dioxane et DMSO). La Figure 31 montre les photographies des films de lignine Kraft obtenus à différentes concentrations (250, 200, 150, 100, 50, 25 et 10 g/l), solubilisée dans le THF, afin de trouver la concentration en lignine nécessaire pour obtenir un film de couleur bleue. Ainsi, la lignine Organosolv a été testée à une concentration de 25 g/l uniquement, solubilisée dans le THF. Aux fortes concentrations en lignine (250, 200 et 150 g/l), les films ont un aspect marron foncé assez homogène. Ces films sont épais donc la partie supérieure du film, moins accrochée au wafer de silicium, se décolle et se resolubilise lors du lavage, le film présente alors une couleur beaucoup plus éclaircie. Plus la concentration en lignine diminue plus le film s'éclairci jusqu'à donner une couleur violacée à 50 g/l et bleue à 25 g/l. A une concentration de 10 g/l le film est de nouveau marron clair. Les films de lignine Kraft sont stables à partir de 50 g/l et en dessous. Le film de lignine Organosolv à 25 g/l présente un aspect orangé mais est assez homogène et stable, il est donc gardé pour effectuer les tests de catalyse enzymatique en milieu solide. La concentration en lignine permettant d'obtenir un film de couleur bleue est de 25g/l, qui est la couleur d'un film ayant une épaisseur de l'ordre de la centaine de nanomètre (épaisseur recherchée). Suite à cette série de tests, la concentration de 25 g/l a été conservée pour les études suivantes.

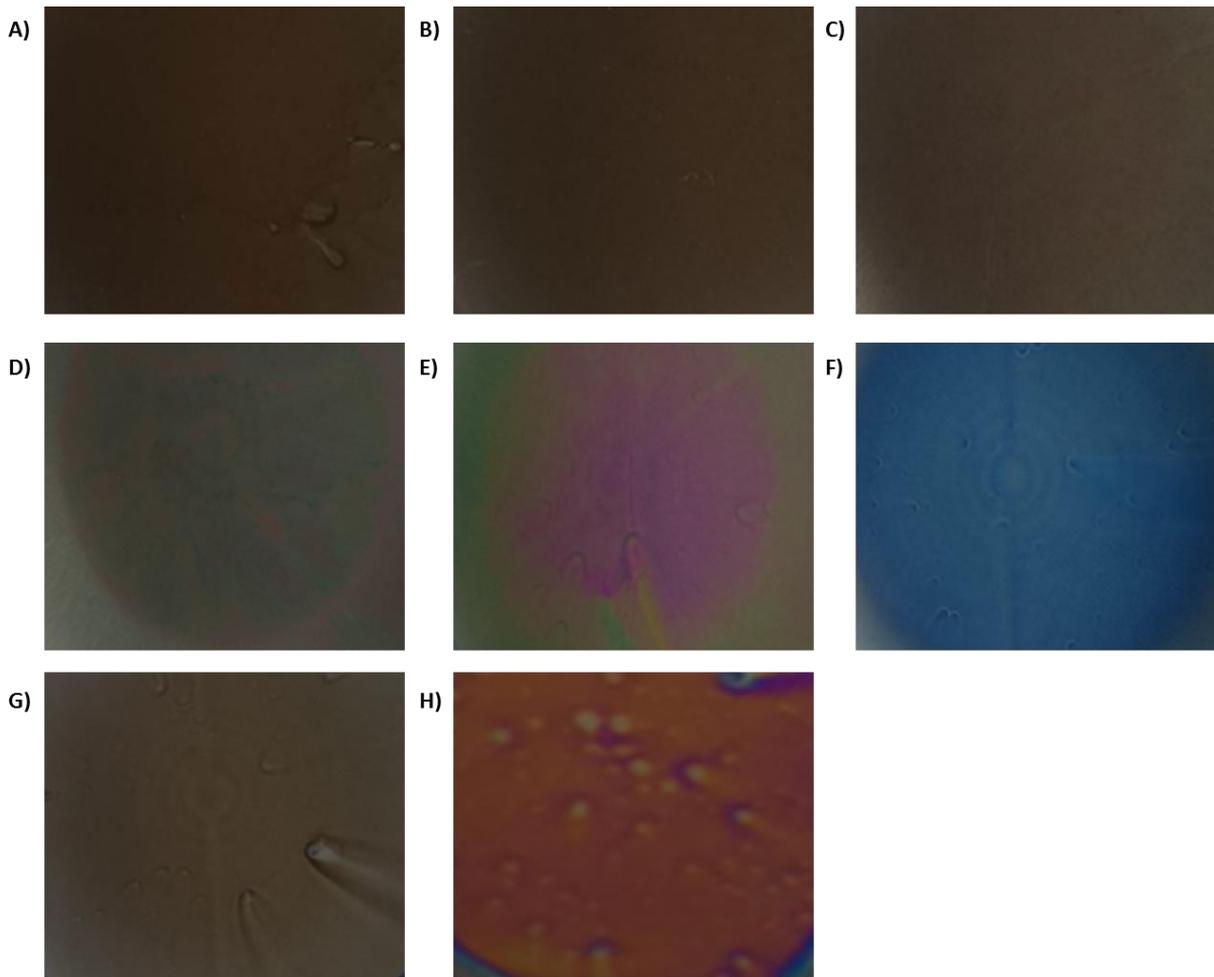


Figure 31 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de lignine Kraft à A) 250 g/l, B) 200 g/l, C) 150 g/l, D) 100 g/l, E) 50 g/l, F) 25 g/l et G) 10g/l ainsi que de H) lignine Organosolv à 25 g/l solubilisés dans le THF. Grossissement 20x.

La lignine Kraft et la lignine Organosolv à 25 g/l, solubilisées dans le 1,4-dioxane présentent toute les deux des films d'un aspect bleu, homogène et stable. Ces résultats, présentés en Figure 32 remplissent les attentes pour pouvoir effectuer les tests de dépolymérisation enzymatique en milieu solide.

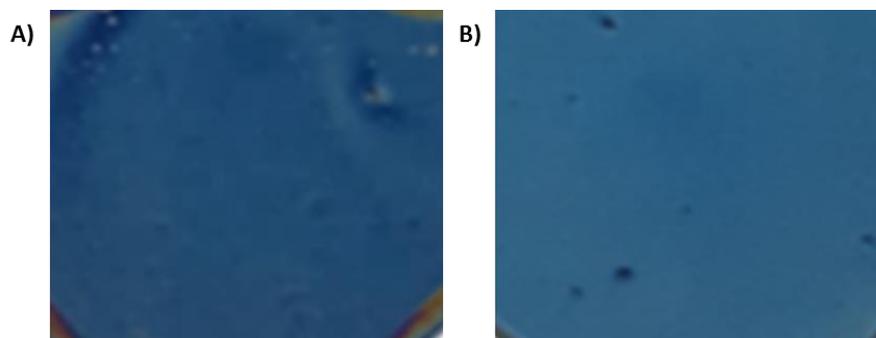


Figure 32 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft à 25 g/l et B) de lignine Organosolv à 25 g/l solubilisés dans le 1,4-dioxane. Grossissement 20x.

La Figure 33 présente les résultats obtenus avec le DMSO pour les trois lignines. Bien que les trois lignines soient solubles dans le DMSO, seule la lignine Organosolv à 25 g/l permet d'obtenir un film homogène, d'un aspect bleu et stable. Avec les deux autres lignines, la solution n'adhère pas au wafer de silicium, elle est directement éjectée lors de la rotation.



Figure 33 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft, B) de lignine Organosolv et de C) Lignosulfonate à 25 g/l solubilisés dans le DMSO. Grossissement 20x.

Ensuite, les tests ont été réalisés en utilisant des mélanges de solvants (organiques et hydro-organiques) capables de solubiliser les trois types de lignine : 1,4-dioxane/eau (de 90 % à 60 % de 1,4-dioxane), 1,4-dioxane/éthanol (70 % et 60 % d'éthanol pour la lignine Kraft et 60 % d'éthanol pour la lignine Organosolv) et THF/DMSO à 50 %. Toutes les solutions contenaient une concentration en lignine de 25 g/l. La lignine Kraft permet d'obtenir des films d'un aspect bleu, homogène et stable à partir de 80 % (et plus) de 1,4-dioxane dans le mélange 1,4-dioxane/eau (Figure 34 A) ainsi qu'à 40 % et 30 % de 1,4-dioxane dans le mélange 1,4-dioxane/éthanol (Figure 35 A et B). Dans le mélange organique contenant 50 % de DMSO et de THF, le film de lignine Kraft obtenu est stable mais non homogène (Figure 36). La lignine Organosolv permet d'obtenir des films d'un aspect bleu, homogène et stable à partir de 90 % de 1,4-dioxane dans le mélange hydro-organique 1,4-dioxane/eau (Figure 34 B) ainsi qu'à 40 % de 1,4-dioxane dans le mélange 1,4-dioxane/éthanol (Figure 35 C).

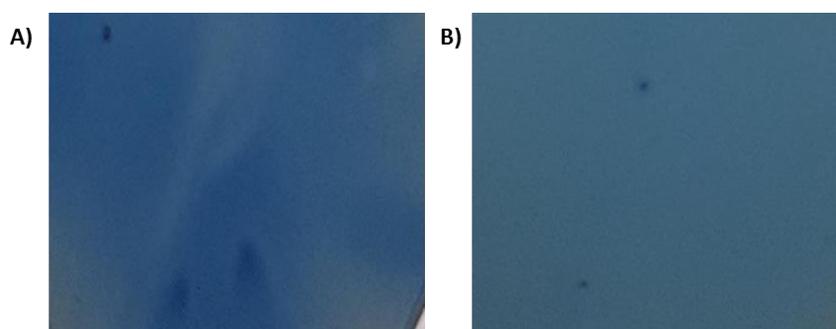


Figure 34 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft et B) de lignine Organosolv à 25 g/l solubilisés dans le mélange hydro-organique 1,4-dioxane/eau à 80 % et 90% de 1,4-dioxane respectivement. Grossissement 20x.

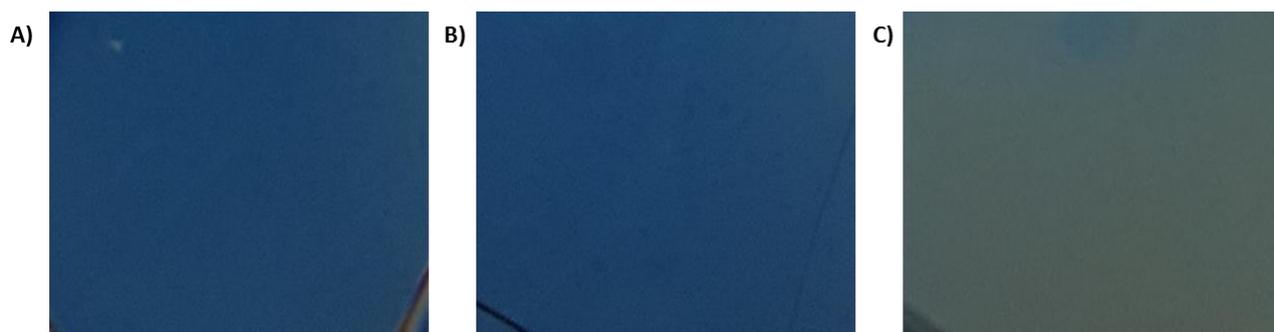


Figure 35 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de lignine Kraft à 25 g/l solubilisée dans le mélange organique contenant le 1,4-dioxane et de l'éthanol à A) 30% de 1,4-dioxane et B) 40% de 1,4-dioxane ainsi que C) la lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le mélange organique contenant 60% d'éthanol et 40% de 1,4-dioxane. Grossissement 20x.

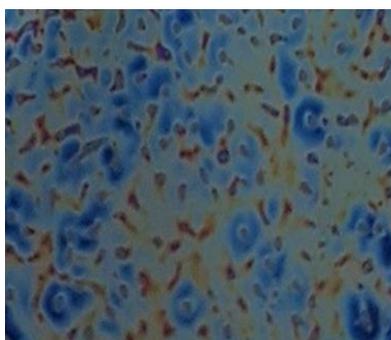


Figure 36 : Photographies microscopiques d'un film solide obtenu par spin-coating à partir d'une solution de lignine Kraft à 25 g/l solubilisée dans un mélange mixte 50/50 de THF/DMSO. Grossissement 20x.

En conclusion, les films retenus pour effectuer les études de dépolymérisation enzymatique en milieu solide sont ceux obtenus à partir de lignine Kraft et de lignine Organosolv à 25 g/l solubilisées dans le THF et dans le 1,4-dioxane.

III. 4. Etude de la capacité de dépolymérisation enzymatique des films solides obtenus par spin-coating

Des films de lignine Kraft et Organosolv ont été effectués en plusieurs exemplaire sur des quarts de wafer à partir de solutions à 25 g/l dans le THF et le 1,4-dioxane.

Dans un premiers temps les wafers ont été soumis à un bain d'eau pendant 30 minutes ou 17h30 dans le but de rincer le surplus de lignine non « accrochée » et de tester la stabilité du film à court et moyen terme. Dans un deuxième temps, les films ont été incubés avec la laccase pendant une durée de 13h et de 38h à 30 °C afin d'étudier l'efficacité d'action de l'enzyme. Sur chaque film, 18 conditions différentes ont été réalisées en déposant des gouttes de 5 µl à la pipette. Les conditions testées sont les suivantes : des gouttes « contrôles » avec uniquement l'eau, le tampon acétate 0,2 M pH 4,6, la laccase seule solubilisée dans le tampon ou l'eau ; différentes conditions de réaction enzymatiques en présence d'un médiateur (l'ABTS). Les conditions testées sont les suivantes : différents ratio laccase/ABTS avec des concentrations en laccase de 3 U et de 15 U ainsi que des concentrations en ABTS de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM. La Figure 37 présente le schéma des gouttes déposées sur les films de lignine.

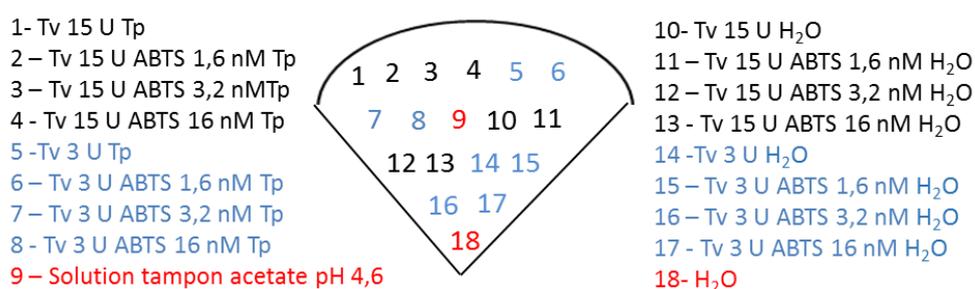


Figure 37 : Schéma des gouttes déposées sur chaque film de lignine. Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*. Tp : Tampon acétate 0,1 M pH 4,6.

Enfin, le wafer est lavé dans un bain d'eau pendant 23h dans le but de rincer le film et de retirer la solution enzymatique.

La Figure 38 présente les résultats obtenus à chaque étape avec des films de lignine Kraft réalisés à partir d'une solution à 25 g/l dans le THF. Les films obtenus avant la première phase de lavage ont un aspect orange et non uniforme (a à d). Après le lavage de 30 minutes ou de 17h30, l'aspect du film reste inchangé (e à h). Les films obtenus après mise en contact avec la laccase ne montrent aucune action enzymatique après 13h ou 38h (i à l). L'aspect du film reste également inchangé après le dernier bain de rinçage de 23h (m à p).

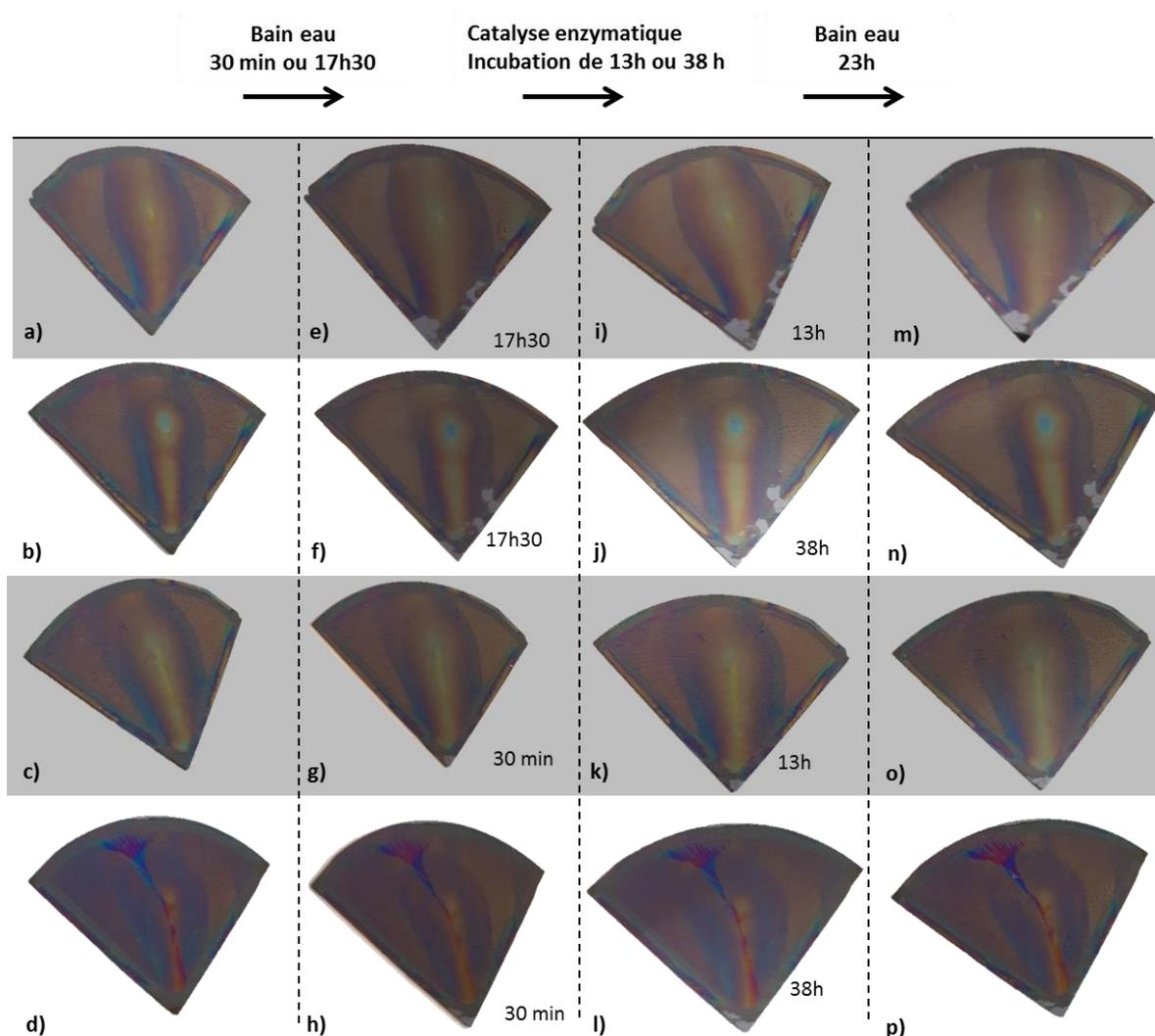


Figure 38 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Kraft réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le THF. Conditions enzymatiques : différents ratio laccase/ABTS avec des concentrations en laccase de 3 U et de 15 U ainsi que des concentrations en ABTS de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM, le tout solubilisé soit dans l'eau soit dans le tampon acétate 0,2 M pH 4,6 à 30°C.

La Figure 39 présente les résultats obtenus à chaque étape avec des films de lignine Kraft réalisés à partir d'une solution à 25 g/l dans le 1,4-dioxane. Avant la première phase de lavage, les films ont un aspect bleu, caractéristique d'une épaisseur de l'ordre de la centaine de nanomètres mais sont homogènes uniquement au centre du wafer (a à d). Après le bain d'eau de 30 minutes, l'aspect du film reste inchangé (g et h) alors qu'après un bain d'eau de 17h30 le film est légèrement plus foncé (e et f), ce qui montre une légère diminution de l'épaisseur du film. Cependant, aucune action enzymatique n'est observée après 13h de contact suivi du bain d'eau de 17h30 (i). Une légère action enzymatique est observée sur le film ayant subi un bain d'eau de 17h30 puis une incubation enzymatique de 38h (j) ainsi que sur celui ayant subi un bain d'eau de 30 minutes et une incubation enzymatique de 13h (k). Une action plus importante de la laccase semble être présente sur le film ayant subi un bain d'eau de 30 minutes et une

incubation enzymatique de 38h (l). L'enzyme peut probablement diffuser dans la couche supérieure de lignine faiblement accrochée qui n'a pas été enlevée par le bain d'eau. En effet, après le lavage de ce film avec le bain d'eau pendant 23h, plus aucune trace d'action enzymatique n'est observée (p) et le film est légèrement plus foncé, ce qui laisse supposer que la couche supérieure du film a été enlevée.

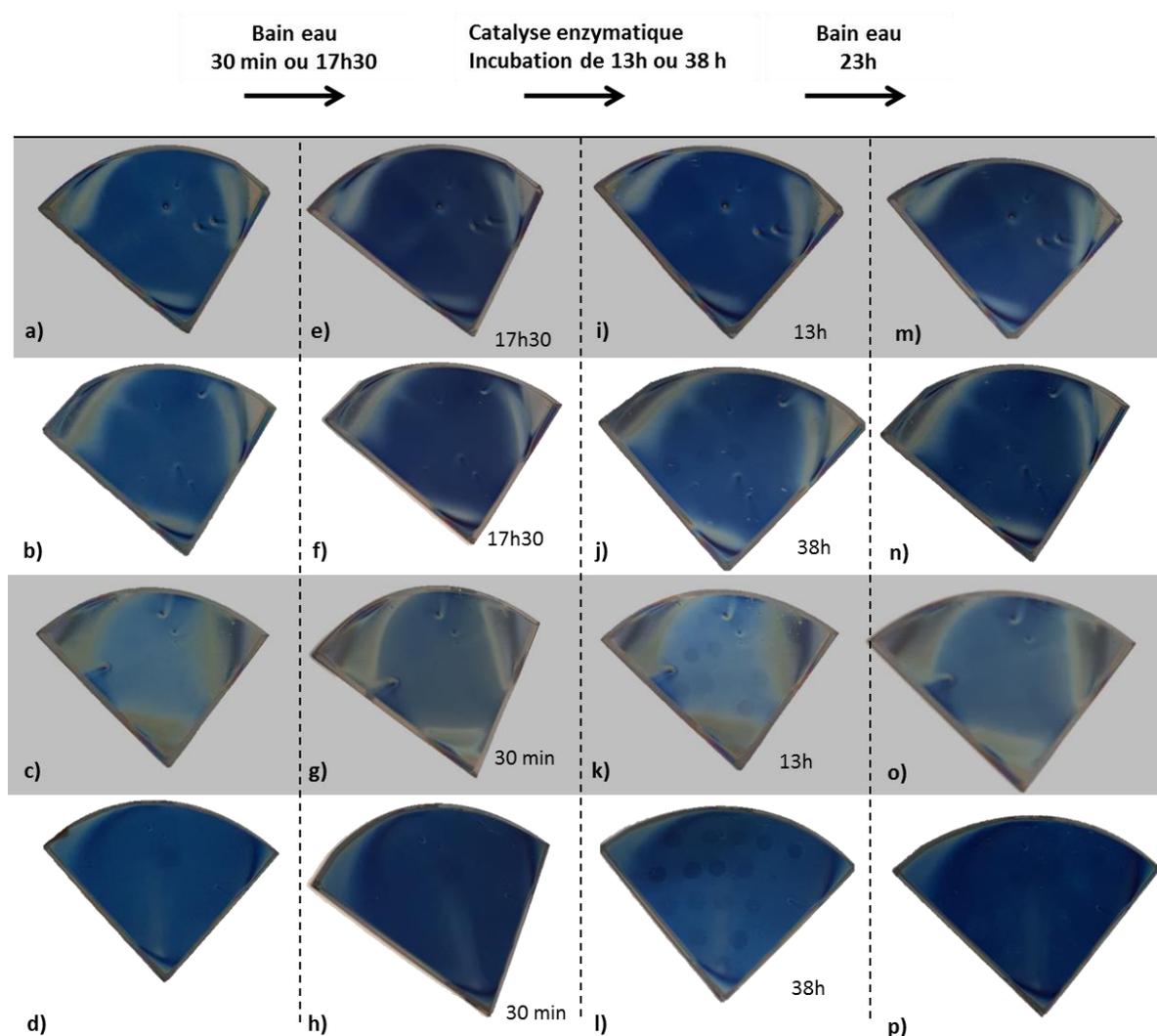


Figure 39 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Kraft réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le 1,4-dioxane. Conditions enzymatiques : différents ratio laccase/ABTS avec des concentrations en laccase de 3 U et de 15 U ainsi que des concentrations en ABTS de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM, le tout solubilisé soit dans l'eau soit dans le tampon acétate 0,2 M pH 4,6 à 30°C.

La Figure 40 présente les résultats obtenus à chaque étape avec des films de lignine Organosolv réalisés à partir de solutions à 25 g/l dans le THF. Les films obtenus avant la première phase de lavage ont un aspect bleu/orange et non uniforme (a à d). Après le bain d'eau de 30 minutes ou de 17h30, l'aspect du film est un peu plus orange (e à h). Sur chaque film, après mise en contact avec la laccase, une action enzymatique semble être observée sur

quelques zones (i à l). Après le dernier bain d'eau de 23h, l'apparition de zones supplémentaires sont observées sur les films ayant subi le premier bain d'eau de 30 minutes et une incubation avec la laccase de 13h et de 38h (o et p). Sur tous les films, la base (zone du film en dehors des zones de dépôt de solution enzymatique) apparaît plus claire. L'enzyme semble continuer à agir après immersion des films dans l'eau. L'enzyme et/ou le médiateur réussit probablement à diffuser dans le film solide de lignine et peut donc continuer à agir lorsque le film est immergé dans un milieu aqueux, favorable à l'action enzymatique. Ce phénomène n'est pas observé lorsque le film a subi un premier bain de 17h30 car la couche supérieure moins accrochée a été enlevée. Les résultats visuels de l'action enzymatique ne montrent pas de corrélation entre l'absence ou la présence de l'ABTS ni en fonction de la concentration en ABTS et en laccase.

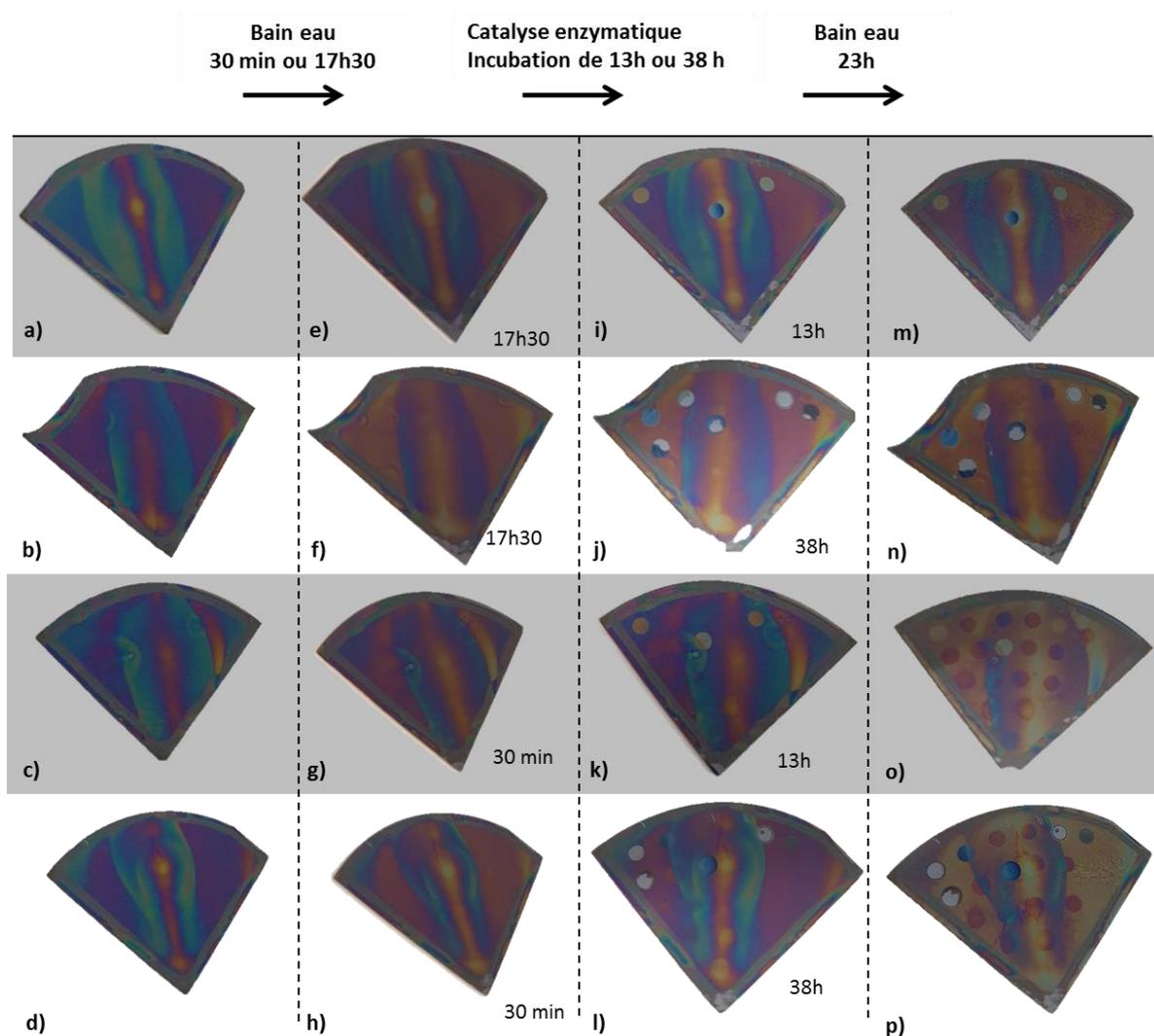


Figure 40 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Organosolv réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le THF. Conditions enzymatiques : différents ratio laccase/ABTS avec des concentrations en laccase de 3 U et de 15 U ainsi que des concentrations en ABTS de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM, le tout solubilisé soit dans l'eau soit dans le tampon acétate 0,2 M pH 4,6 à 30°C.

La Figure 41 présente les résultats obtenus à chaque étape avec des films de lignine Organosolv réalisés à partir de solutions à 25 g/l dans le 1,4-dioxane. Les films obtenus avant la première phase de lavage ont un aspect bleu et uniforme au centre du wafer (a à d). Après un bain de 30 minutes, l'aspect du film reste inchangé (g et h) alors qu'après un bain de 17h30 les films sont bleus plus foncés (e et f). Quelques zones montrent un changement de couleur du film après mise en contact avec la laccase sont visibles sur les films ayant subi un premier bain de 17h30 et une incubation enzymatique de 13h et 38h (i et j). Ces zones sont légèrement plus marquées après le dernier bain de 23h (m et n). Une action de l'enzyme semble être observée au niveau de chaque dépôt de façon plus au moins marquée. Tout comme observé à la Figure 40, l'action de la laccase est beaucoup plus marquée après le dernier bain d'eau de 23h des films ayant subi le premier bain d'eau de 30 minutes et une incubation enzymatique de 13h et 38h (o et p). La base du film apparaît également plus foncée. Les résultats visuels de l'action enzymatique ne montrent pas de corrélation entre l'absence ou la présence de l'ABTS ni en fonction de la concentration en ABTS et en laccase. L'action enzymatique au sein d'un dépôt n'est pas homogène (correspondant à la présence de 16 nM d'ABTS ainsi que de 3 U ou 15 U de laccase - flèches rouges). Cela est dû au fait que la goutte déposée présente la forme d'un dôme, l'épaisseur de la goutte est donc plus importante au centre, l'action enzymatique est donc différente au centre et à l'extérieur de la goutte. De plus, cela semble montrer que la présence d'une plus forte concentration en ABTS provoque une action enzymatique plus importante.

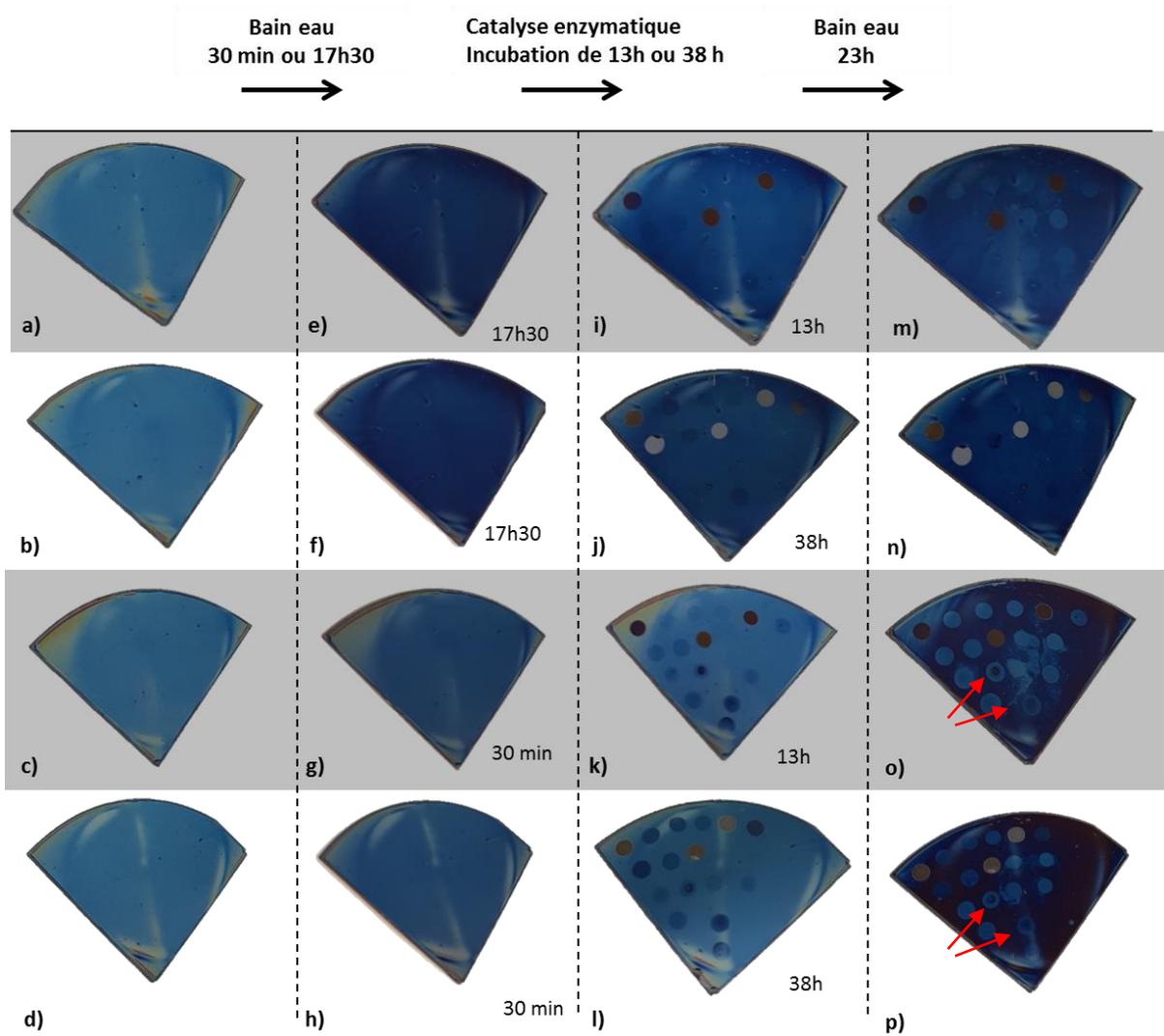


Figure 41 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Organosolv réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le 1,4-dioxane. Conditions enzymatiques : différents ratio laccase/ABTS avec des concentrations en laccase de 3 U et de 15 U ainsi que des concentrations en ABTS de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM, le tout solubilisé soit dans l'eau soit dans le tampon acétate 0,2 M pH 4,6 à 30°C.

La non homogénéité des films montrée dans les Figure 38 à Figure 41 est probablement due à un effet de bord du quart de wafer et donc une mauvaise répartition du liquide sur la surface. De plus, l'aspect orangé des films obtenus à partir des solutions de lignines dans le THF montrent une non répétabilité des résultats dans ce solvant ainsi que probablement une faible stabilité dans le temps du solvant (dégradation spontanée du solvant lors de la conservation). Cependant, les films obtenus à partir de lignines solubilisées dans le 1,4-dioxane montrent une répétabilité des résultats et un aspect bleu que l'on souhaite. De plus, seule la lignine Organosolv montre une sensibilité à l'action de la laccase. Les études de dépolymérisation enzymatique en milieu solide suivantes ont donc été effectuées avec des wafers complets recouverts de lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le 1,4-dioxane pour obtenir des films homogènes.

Chapitre IV : Etude de la dépolymérisation enzymatique de lignines industrielles en milieu liquide et solide

Le deuxième objectif de la thèse a été de démontrer une dépolymérisation enzymatique des trois principales lignines industrielles (Lignine Kraft, Lignine Organosolv et Lignosulfonate) par le Système Laccase-Médiateur (LMS) et ainsi développer l'outil de criblage. En effet, la dépolymérisation enzymatique de la lignine a été très étudiée ces dernières années mais uniquement en utilisant des composés modèles de faibles masses moléculaire ou des lignines solubles dans l'eau. L'utilisation de la laccase seule ne permet pas une dépolymérisation, l'action d'un médiateur en combinaison avec la laccase est nécessaire. Ainsi, ce chapitre présente tout d'abord la mise au point d'une méthode d'analyse permettant le suivi de la dépolymérisation enzymatique des trois lignines utilisées. Ensuite, différentes études déterminant les conditions optimales de la dépolymérisation enzymatique en milieu liquide sont présentées (influence du pH, de la température et du co-solvant sur l'enzyme). Puis, les résultats de dépolymérisation en milieu liquide et en milieu solide des lignines sont exposés. Les résultats de dépolymérisation en milieu liquide sont présentés en deux parties, tout d'abord, une partie permettant de démontrer la dépolymérisation enzymatique par le système LMS avec l'ABTS comme médiateur puis une deuxième partie qui présente différentes concentrations en enzyme et en médiateur, permettant de comparer ces résultats à ceux de la dépolymérisation en milieu solide et ainsi aller vers l'outil de criblage.

Chapitre IV. Etude de la dépolymérisation enzymatique de lignines industrielles en milieu liquide et solide	72
IV. 1. Mise au point d'une méthode d'analyse de la lignine par Gel Permeation Chromatography (GPC)	72
IV.1.1. Point bibliographique	72
IV.1.2. Calibration des colonnes	74
IV.1.3. Détermination de la masse molaire des lignines industrielles	75
IV. 2. Paramètres influençant l'activité enzymatique : laccase issue de <i>Trametes versicolor</i>	77
IV.2.1. Influence du pH sur l'activité enzymatique de la laccase	77
IV.2.2. Influence de la température sur l'activité enzymatique de la laccase	78
IV.2.3. Influence de la présence de solvants organiques sur l'activité enzymatique de la laccase	78
IV. 4. Preuve de la dépolymérisation enzymatique en milieu liquide	80
IV.4.1. Utilisation de l'enzyme seule	80
IV.4.2. Utilisation du système laccase-médiateur (SLM)	82
IV.4.3. Spectrométrie de masse	88
IV.4.4. Mise en place de l'outil de criblage sur lignine en milieu liquide	93
IV.4.5. Mise en place de l'outil de criblage sur films obtenus par spin-coating	103
IV.4.5.1. Observation à l'œil nu et mesures ellipsométriques	103
IV.4.5.2. Analyses GPC	105
IV. 1. Conclusion - Discussion	115

Chapitre IV. Etude de la dépolymérisation enzymatique de lignines industrielles en milieu liquide et solide

IV. 1. Mise au point d'une méthode d'analyse de la lignine par Gel Permeation Chromatography (GPC)

Dans un premier temps, une méthode d'analyse de la lignine a été mise au point afin de faire le suivi de la lignine et des produits de dépolymérisation. La méthode la plus communément utilisée est la chromatographie de perméation de gel (GPC – Gel Permeation Chromatography) appelée également chromatographie d'exclusion stérique (SEC – Size Exclusion Chromatography). Cependant, il existe une multitude de méthodes GPC utilisées pour l'analyse des lignines. Cette première partie présente donc tout d'abord une vue d'ensemble sur les principales méthodes utilisées afin de faire un choix sur la méthode employée. Ensuite, la calibration des colonnes choisies est présentée pour permettre de déterminer la masse moléculaire approximative des trois lignines utilisées dans une troisième partie.

IV.1.1. Point bibliographique

L'analyse des lignines par GPC nécessite l'utilisation de deux à trois colonnes particulières connectées en série. En effet, la lignine est une macromolécule de haut poids moléculaire mais, en fonction de la nature et la source de la lignine analysée, celle-ci peut être partiellement dépolymérisée et avoir des composés de plus faibles masses molaires. Pour les séparer il est donc nécessaire de combiner plusieurs colonnes ayant des gammes de séparation différentes.

Il existe trois méthodes GPC, celles utilisant des colonnes permettant une analyse en milieux solvants organiques (principalement avec le THF), celles travaillant avec des colonnes en milieux solvants polaires et celles en milieux aqueux (Tableau 6) (97-126). Actuellement, les méthodes les plus courantes sont celles en milieux THF et aqueux. En milieu THF, les Microgel (135), Styragel (135–137) et PL-Gel (138, 139) sont principalement retrouvées, alors qu'en milieu aqueux ce sont les Sephadex ou les TSK-Gel (140). L'éluant utilisé pour les méthodes en milieux aqueux est principalement l'hydroxyde de sodium (NaOH).

Tableau 6: Exemples de méthodes GPC utilisées pour l'analyse de lignines ou de molécules modèles de lignines (141).

	Gel type	Detection	Lignin sample	
Organic SEC THF systems				
Faix et al. 1981	Microgel	UV 254 nm	MWL	ac
Robert et al. 1984	μ-Spherogel	UV 280 nm	KL	ac
Pellinen and Salokoski-Salonen 1985	Ultrastyrigel	UV 280 nm	DHP, SEL, KL	ac; sil
Mörck et al. 1986	Ultrastyrigel	UV 280 nm	KL	ac
Gellerstedt and Lindfors 1987	μ-Spherogel	UV 280 nm	KL	ac
Kelley et al. 1988	μ-Spherogel	UV 280 nm	OSL	hp
Faix and Beinhoff 1992	Microgel	UV 253 nm	DHP, MWL	ac
Glasser et al. 1993	Ultrastyrigel	Visco+RI	KL, OSL, SEL	ac
Oliveira et al. 1994;	PL-Gel	UV 254 nm	OSL	ac
Constantino et al. 1996				
Kubo et al. 1996	Shodex KF	UV	KL, SEL	ac
Thring et al. 1996	Ultrastyrigel	UV 277 nm	OSL	-
Baumberger et al. 1998;	PL-Gel	UV 280 nm	KL	ac
Pouteau et al. 2003				
Norgren and Lindström 2000	-	RI	KL	ac
Cathala et al. 2003	Microgel	MALLS + RI + UV + visco	MWL, DHP	ac
Gosselink et al. 2004a	PL Gel	UV 254 nm + RI	AL, OSL	-
Kadla and Kubo 2004	Styrigel	UV 280 nm + RI	KL	ac
Majcherczyk and Hüttermann 1997	TSK	UV 280 nm	KL, LS, OSL	QAM
Ben-Ghedalia and Yosef 1994	PSM Zorbax	Diode array	AL, DL	QAM
Polar solvent systems				
Chum et al. 1987	μ-Spherogel	Diode array	SEL, OSL, MWL	ac
THF/DMF, 0.1 M LiBr				
Johnson et al. 1989	SDVB	UV + RI	DHP, OSL	ac
DMF/THF, 0.1 M LiBr				
Gilardi and Cass 1993, DMF	PSM Zorbax	Diode array	OSL	-
Cathala et al. 2003, DMF	Styrigel	MALLS + RI + UV + visco	MWL, DHP	-
Gosselink et al. 2004a	Cosmosil Si-Gel 5SL/	UV 280 nm	AL; OSL	-
DMF/0.2 M LiCl	Styrigel			
Ringena et al. 2006a		Diode array + RI + visco	LS, KL, AL, SEL	-
DMSO/water/0.05 M LiBr	PSS Gram	+ two-angle LS		
DMAc/0.11 M LiCl	PSS PFG-PRO			
Aqueous SEC				
Herrick et al. 1979	Polyacrylamide Bio-gel	UV 254 nm	LS	
NaOH, Na ₂ SO ₄ , NaNO ₃				
Callec et al. 1984, 0.5 M NaOH	Fractogel TSK	Visco + RI	Polystyrene sulfonates; dextrans; PEGs	
Forss et al. 1989, 0.5 M NaOH	Sephadex	UV 280 nm	KL	
Hortling et al. 1990, 0.5 M NaOH	Fractogel TSK HW-55	UV 280 nm	Enz. L	
Himmel et al. 1995, 0.5 M NaOH	EG-M TSK	Visco + RI	SEL; OSL; acid hydrolysis lignins; MWL	
Wong and de Jong 1996, 0.3 M NaOH	E-M Toyopearl	UV + PAD	KL; Enz. L	
Bikova et al. 1998, 2000	Polyacrylate-methacrylate	UV + RI	Residual KL, spent liquor	
DMF/0.03 M H ₃ PO ₄ /2.5 mM NaOH				
Chen and Li 2000	Ultrahydrogel/Ultrastyrigel	RI	LS; AL	
0.1 M Na NO ₃ , pH 7 or 12				
Fredheim et al. 2002, 0.01 M EDTA/	TSK	MALLS + RI	LS	
0.05 M Na ₂ SO ₄ /acetonitrile				
Fredheim et al. 2002	Jordi Glucose-DVB	MALLS + RI	LS	
Phosphate-SDS-DMSO				

ac, acetylation; AL, alkali lignins; DHP, dehydrogenation polymer; DL, dioxan lignins; DVB, divinylbenzene; E-M, ethylene-methacrylate; EG-M, ethylene glycol-methacrylate; Enz. L, enzyme lignin; hp, hydroxypropylation; KL, kraft lignin; LS, lignosulfonates; MALLS, multi-angle laser light scattering; MWL, milled-wood lignin; OSL, organosolv lignins; PAD, pulsed amperometric detection; PL, Polymer Laboratories; PSM, porous silica microsphere; PSS, polystyrene sulfonates; QAM, quaternary amine; RI, refractive index; SDVB, styrene-divinylbenzene copolymer; SEL, steam explosion lignin; sil, silylation; TSK, ethylene glycol-methacrylate; UV, ultraviolet; visco, viscosimetry.

Lors de cette thèse, le choix s'est porté sur l'utilisation de colonnes TSK-Gel connectées en série permettant des analyses en milieu aqueux. En effet, les échantillons obtenus lors de cette thèse (lignines non dépolymérisées et produits de dépolymérisation issus des réactions en milieu liquide et solide) étant majoritairement présents dans des tampons (solution aqueuse), cela nous a permis une analyse directe (sans préparation supplémentaire avant analyse). Le solvant d'élution utilisé est composé de NaOH 0,2M permettant une bonne solubilité des lignines et de 20% d'acétonitrile permettant d'améliorer la détection (142).

IV.1.2. Calibration des colonnes

Les analyses GPC ont été effectuées selon deux approches. Dans un premier temps en utilisant deux colonnes (TSKgel 4000PW_{XL} et TSKgel Oligo-PW) et par la suite, dans le but d'améliorer la séparation et d'obtenir une analyse plus fine, une troisième colonne intermédiaire a été ajoutée (TSKgel 3000PW_{XL}). Une calibration des colonnes a été réalisée avec cinq standards de polystyrènes sulfonés (PSS) de masses molaires suivantes : 1 000, 4 000, 10 000, 30 000 et 140 000 Da, un dimère modèle de lignine (le guaiacylglycérol-beta-guaiacylether) de 320 Da et un monomère modèle de lignine (2.6-dimethoxyphenol) de 154 Da. A partir de ces standards, des courbes de calibration ont été obtenues (Figure 42) et nous ont permis de déterminer une masse molaire approximative de la lignine et des produits de dépolymérisation à l'aide de leur volume d'élution respectif.

Nous pouvons observer la différence de R^2 entre ces deux approches. Avec l'utilisation de deux colonnes nous avons un R^2 de 0,8963 et avec les trois colonnes le R^2 augmente à 0,916.

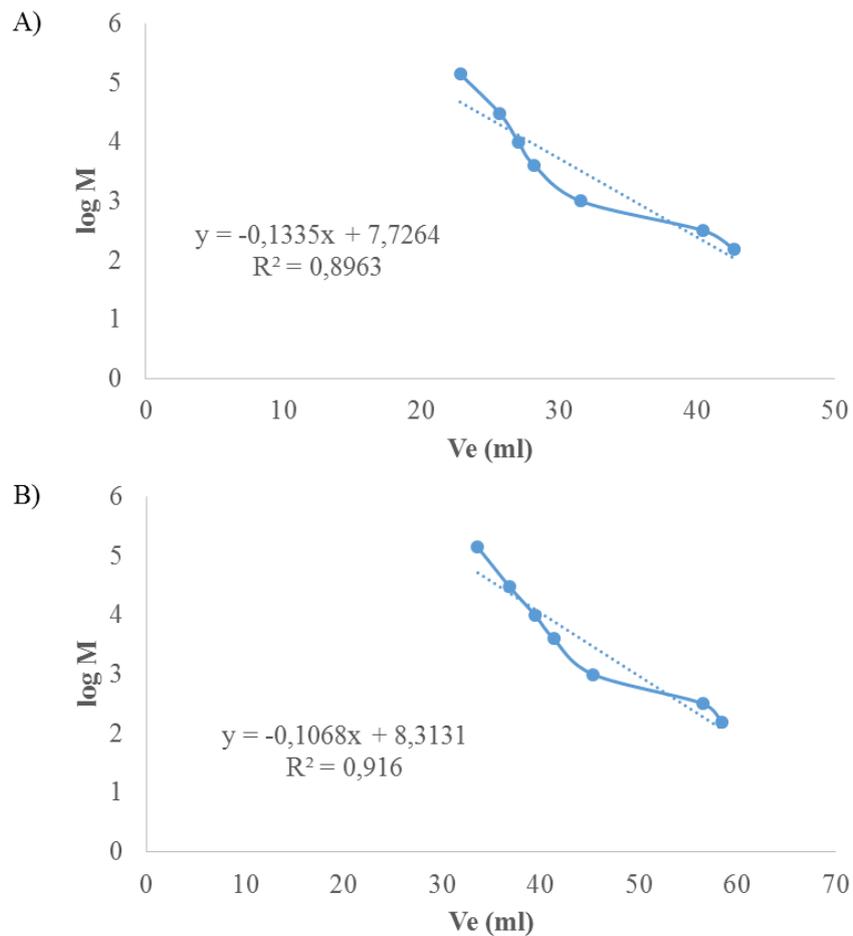
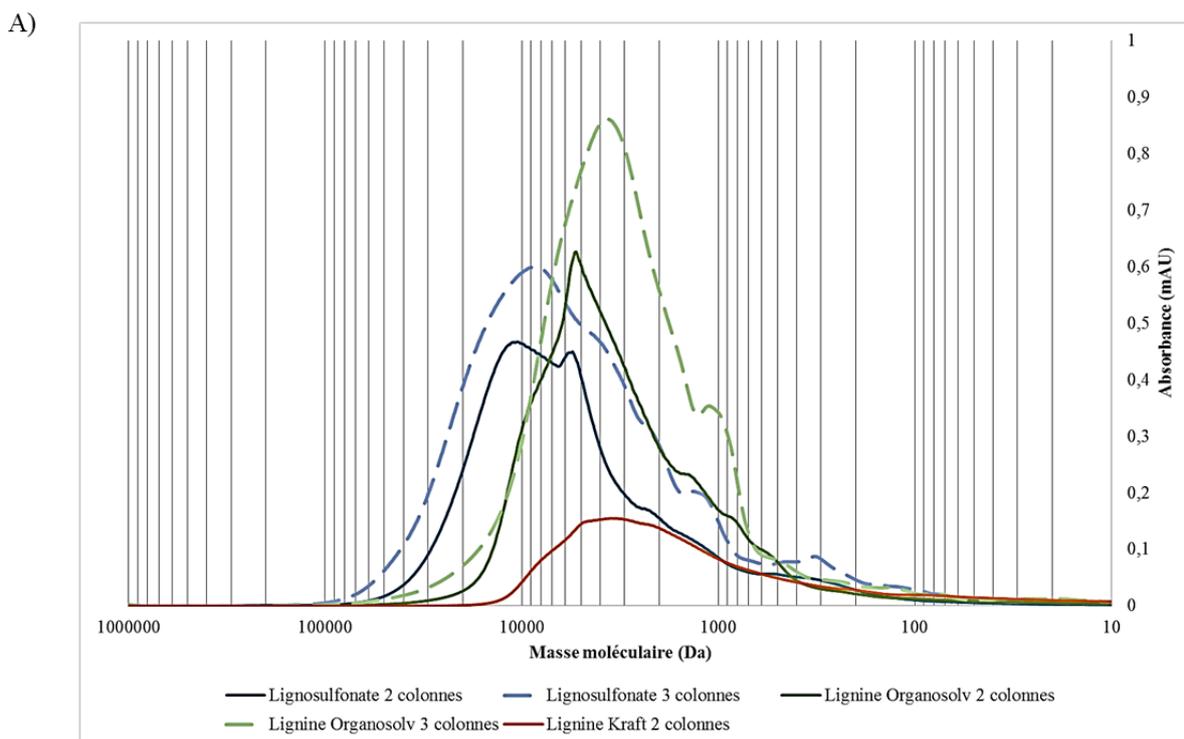


Figure 42: Courbes de calibration des colonnes A) selon l'approche 1 utilisant deux colonnes (TSKgel 4000PW_{XL} et TSKgel Oligo-PW) et B) selon l'approche 2 utilisant trois colonnes (TSKgel 4000PW_{XL}, TSKgel 3000PW_{XL} et TSKgel Oligo-PW).

IV.1.3. Détermination de la masse molaire des lignines industrielles

La calibration des colonnes a permis l'obtention d'une équation reliant le volume d'éluion (Ve) au logarithme de la masse molaire. Par conséquent, il est possible de déterminer une masse molaire approximative de chaque lignine utilisée pendant la thèse (Figure 43 A).



B)

	2 colonnes	3 colonnes
Lignosulfonate	10 000 Da	8 000 Da
Lignine Organosolv	5 000 Da	4 000 Da
Lignine Kraft	3 000 Da	Non déterminé

Figure 43 : Profils GPC A) et masses moléculaires approximatives obtenues B) de la Lignosulfonate, la lignine Organosolv et la lignine Kraft non dépolymérisée selon les deux approches (2 ou 3 colonnes).

Les résultats obtenus pour chaque lignine selon les deux approches sont assez similaires et nous permettent de donner les gammes de masses suivantes : 8 000 -10 000 Da pour la Lignosulfonate, 4 000-5 000 Da pour la lignine Organosolv et 3 000 Da pour la lignine Kraft (Figure 43 B). Ce qui corrèle avec les gammes de masses retrouvées dans la littérature pour la lignine Organosolv et la lignine Kraft (500 – 5 000 Da et 1 000 – 3 000, respectivement) alors que pour la Lignosulfonate les valeurs de notre étude sont inférieures (15 000-50 000 Da) (143).

IV. 2. Paramètres influençant l'activité enzymatique : laccase issue de *Trametes versicolor*

Une étude a été effectuée afin de déterminer les conditions optimales de dépolymérisation par voie enzymatique des lignines en milieu liquide. L'enzyme modèle communément utilisée est une enzyme commerciale et facilement accessible : la laccase issue de *Trametes versicolor*. Cette étude consiste à déterminer l'influence du pH, de la température ainsi que la présence de solvants organiques, seuls ou en mélange dans l'eau, sur l'activité enzymatique.

IV.2.1. Influence du pH sur l'activité enzymatique de la laccase

L'influence du pH sur l'activité enzymatique de la laccase issue de *Trametes versicolor* a été réalisée avec deux tampons à différents pH : le tampon phosphate à pH 5,7 ; 6,7 et 7,7 ainsi que le tampon acétate à pH 3,7 ; 4,6 et 5,6. L'expérience a été réalisée selon le protocole énoncé en partie II.2.1, l'enzyme et l'ABTS ont été solubilisés dans les différents tampons et la réaction a été réalisée à température ambiante. La Figure 44 présente les résultats obtenus. L'activité enzymatique maximale est obtenue avec le tampon acétate à pH 4,6. L'activité obtenue avec les tampons acétate à pH 3,7 et 5,6 reste importante avec une diminution de 12 % et 32 % respectivement par rapport à l'activité observée avec le tampon acétate à pH 4,6. Cependant, les activités enzymatiques chutent brutalement lorsque le pH est supérieur ou égal à 5,7, pour aboutir à une perte totale lorsque le pH est de 7,7.

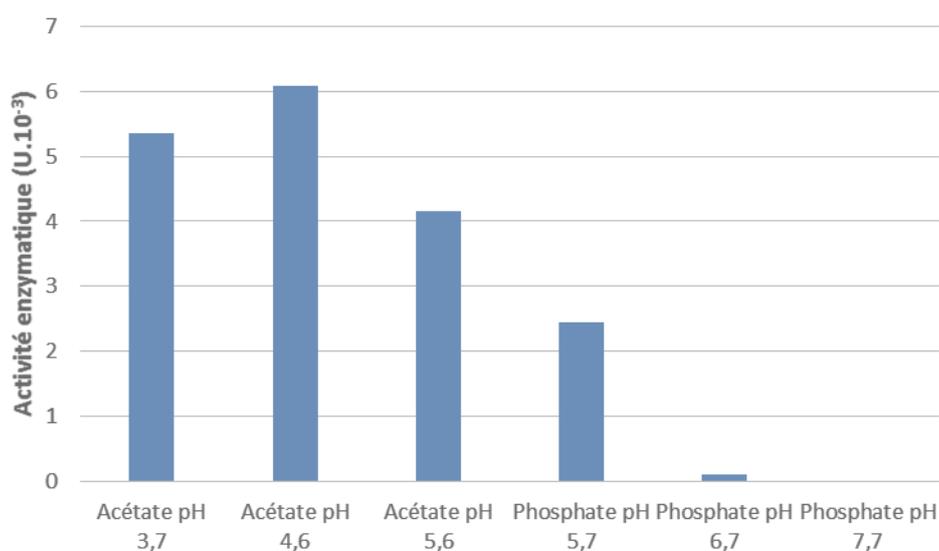


Figure 44: Activité enzymatique de la laccase issue de *Trametes versicolor* en fonction du pH à température ambiante.

IV.2.2. Influence de la température sur l'activité enzymatique de la laccase.

L'influence de la température a été réalisée entre 30 et 60°C. L'expérience a été réalisée selon le protocole énoncé en partie II.2.1, l'enzyme et l'ABTS ont été solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6 et la réaction a été réalisée aux différentes températures à l'aide d'un bain marie connecté au spectrophotomètre. La Figure 45 présente les résultats obtenus. L'activité maximale est obtenue à 30°C. A 35°C l'activité diminue de 4%. Ensuite l'activité chute brutalement pour atteindre une diminution de 82 % à 50°C et une perte totale à 60°C.

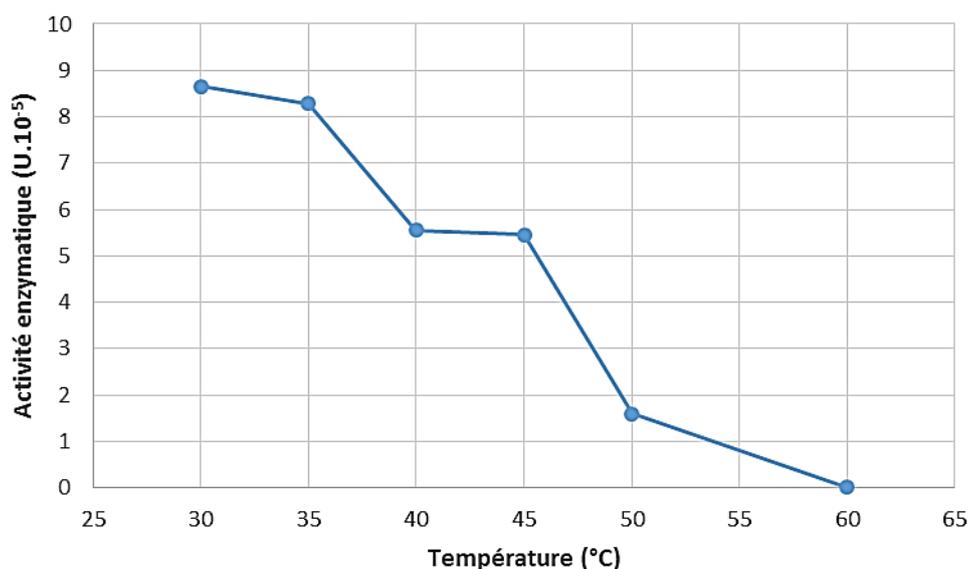


Figure 45 : Activité enzymatique de la laccase issue de *Trametes versicolor* en fonction de la température.

IV.2.3. Influence de la présence de solvants organiques sur l'activité enzymatique de la laccase

En parallèle, les différents mélanges hydro-organiques ainsi que le NaOH ont été testés sur l'activité de la laccase. L'objectif est d'avoir la part de co-solvant la plus petite possible afin de permettre une solubilisation des lignines et un maintien de l'activité enzymatique. Le NaOH, utilisé en tant que solvant d'éluant pour la méthode GPC, permet une solubilisation des lignines. L'expérience a été réalisée selon le protocole énoncé en partie II.2.1, l'enzyme et l'ABTS ont été solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de différents pourcentage de co-solvant et la réaction a été réalisée à 30°C. La Figure 46 présente l'évolution de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du pourcentage d'hydroxyde de sodium 0,2M (NaOH) ou de solvant (1,4-dioxane, éthanol (EtOH) et tétrahydrofurane (THF) en mélange dans l'eau.

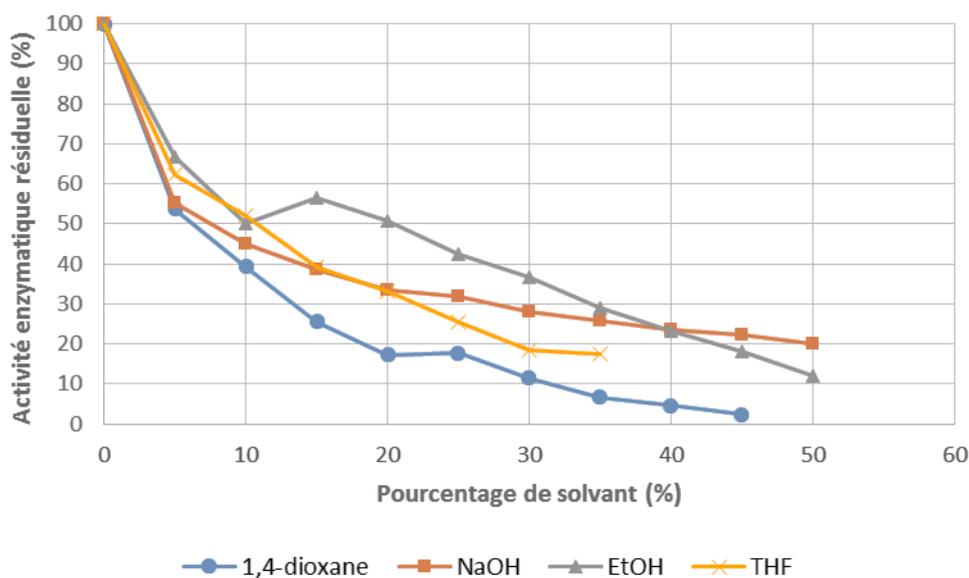


Figure 46 : Activité enzymatique résiduelle de la laccase issue de *Trametes versicolor* en fonction du pourcentage d'hydroxyde de sodium 0,2 M (NaOH) ou de solvant (1,4-dioxane, éthanol (EtOH) et tétrahydrofurane (THF)) présent dans l'eau et à 30°C.

La présence de 35 % de THF dans l'eau, pourcentage insuffisant pour favoriser la solubilisation totale des lignines, provoque une perte d'activité très élevée (82 %). 25 % de 1,4-dioxane entraîne une chute d'activité de 82 % mais permet une solubilisation totale des lignines. Nous savons que 100 % d'éthanol et de NaOH sont requis pour solubiliser totalement les lignines, cependant, à une concentration de 50 % une perte d'activité de 87 % et de 81 %, respectivement est observée. A la vue de ces résultats, le meilleur co-solvant utilisable pour effectuer les réactions de dépolymérisation des lignines en milieu liquide est le 1,4-dioxane à 25 % malgré une chute d'activité importante. En effet, le 1,4-dioxane permet d'observer une solubilisation complète des lignines en ajoutant une faible quantité (25 %), ce qui permet de travailler dans un milieu contenant 75 % du tampon de travail de l'enzyme. Il permet également un maintien de l'activité d'environ 20 %, ce qui représente la même activité résiduelle qu'en présence de 100 % d'éthanol ou de NaOH.

IV. 3. Dépolymérisation enzymatique en milieu liquide

Cette partie présente les résultats issus de la mise en œuvre de la dépolymérisation enzymatique des lignines industrielles en milieu liquide. Les résultats des catalyses en milieu liquide sur les trois lignines sont présentés, permettant de démontrer la dépolymérisation enzymatique en utilisant le système LMS. Ensuite les résultats de dépolymérisation en milieu liquide et solide sont présentés en utilisant la lignine Organosolv, qui a montré de meilleurs résultats lors du chapitre III. ainsi que différentes concentrations en enzyme et ABTS, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus et ainsi aller vers l'outil de criblage.

Le milieu réactionnel contient 25 % de 1,4-dioxane pour permettre la solubilisation de la lignine (3 mg) et la préservation d'une certaine activité enzymatique. Les réactions enzymatiques ont été effectuées avec les trois lignines industrielles (Lignine Organosolv, Lignine Kraft, Lignosulfonate) sans traitement ni modifications structurales (acétylation, etc.) au préalable et dans le tampon acétate pH 4,6 avec un volume final de 1,5ml, à 30°C pendant 5 jours sous agitation orbitale à 600 rpm.

IV. 4. Preuve de la dépolymérisation enzymatique en milieu liquide

IV.4.1. Utilisation de l'enzyme seule

Dans un premier temps, l'enzyme a été utilisée seule c'est-à-dire sans présence de médiateur. Les Figure 47, Figure 48 et Figure 49 comparent les profils GPC obtenus après réaction enzymatique sur les trois lignines en utilisant 3U de laccase et le contrôle sans enzyme qui a été incubé dans les mêmes conditions que les échantillons traités pendant 5 jours également. Ces résultats ne montrent aucun effet significatif du traitement enzymatique sur les trois lignines utilisées.

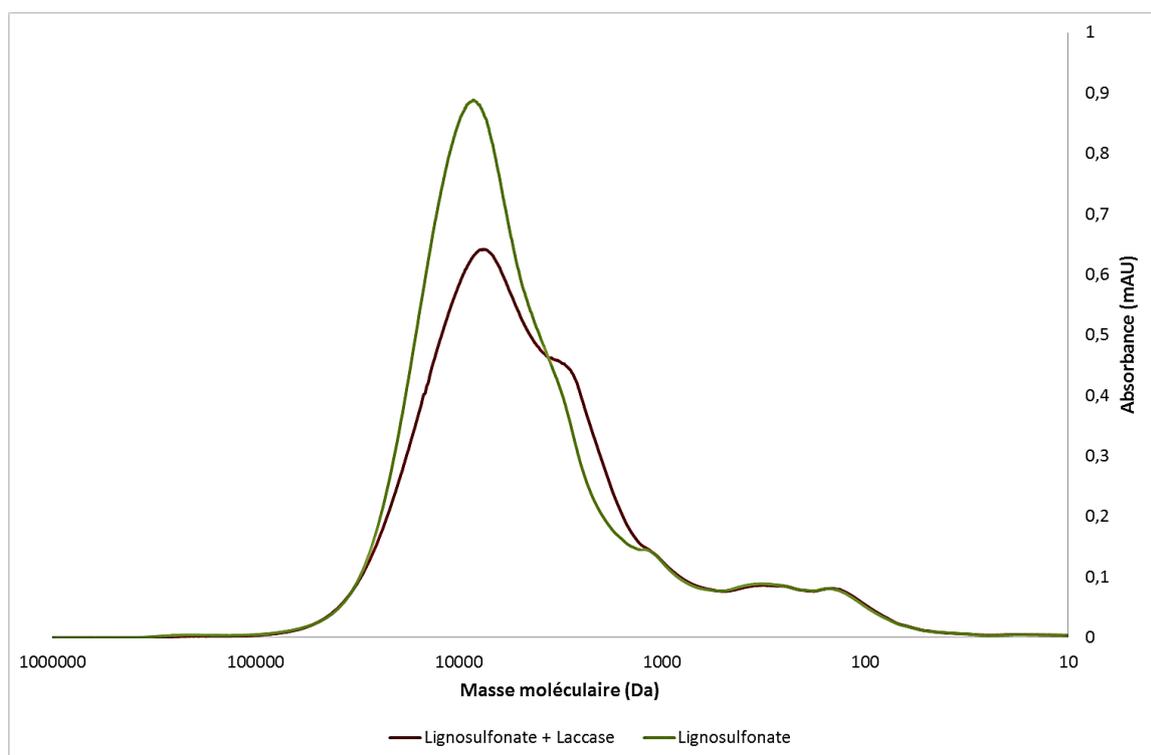


Figure 47 : Profils GPC de la Lignosulfonate avant (courbe verte) et après (courbe rouge) le traitement enzymatique de 5 jours. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm. Analyses effectuées avec 2 colonnes.

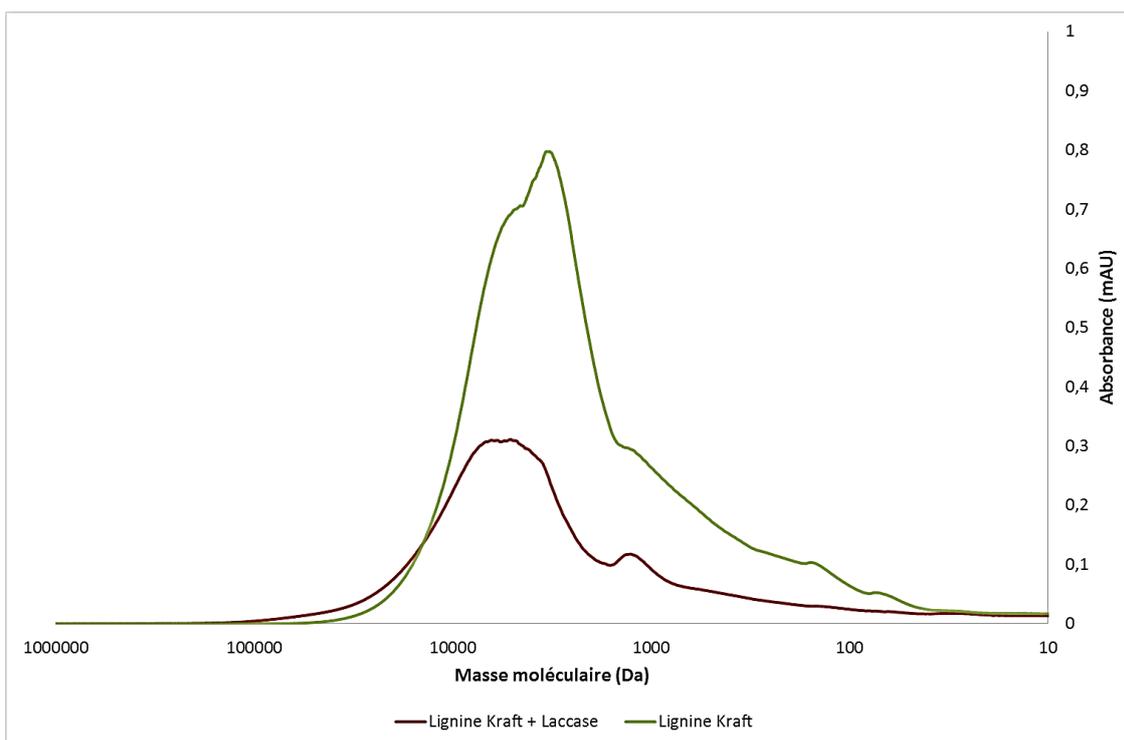


Figure 48 : Profils GPC de la Lignine Organosolv avant (courbe verte) et après (courbe rouge) le traitement enzymatique de 5 jours. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm. Analyses effectuées avec 2 colonnes.

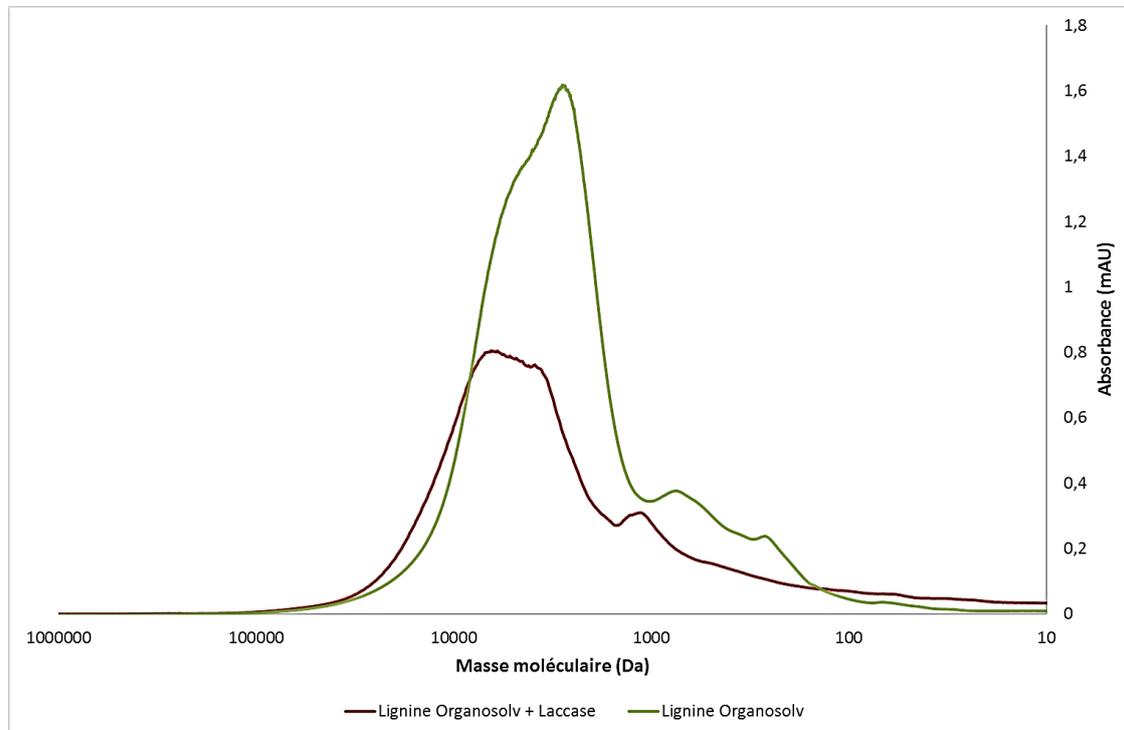


Figure 49 : Profils GPC de la Lignine Kraft avant (courbe verte) et après (courbe rouge) le traitement enzymatique de 5 jours. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm. Analyses effectuées avec 2 colonnes.

IV.4.2. Utilisation du système laccase-médiateur (LMS)

Différentes réactions d'oxydation ont été effectuées en utilisant le système laccase-médiateur. Les deux principaux médiateurs souvent utilisés dans la littérature ont été sélectionnés pour notre étude : l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) diammonium salt (ABTS), le 2,2,6,6-tetraméthyl-1-piperidinyloxy, free radical, 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) et un mélange des deux afin de tester la synergie entre ces deux médiateurs. Les réactions ont été menées dans les mêmes conditions que précédemment et en présence de 0,0015 mmol de médiateur.

L'hypothèse d'un effet synergique entre les médiateurs est basée sur ce qu'il se passe dans la nature. La laccase des champignons de pourriture blanche oxyde dans un premier temps les fonctions phénoliques les plus accessibles de la lignine. Ce qui libère de petites molécules phénoliques qui sont utilisées comme médiateur dans le but d'oxyder les parties réticentes et/ou inaccessibles à l'enzyme. Il n'y a donc pas un seul médiateur mais un ensemble travaillant en synergie. Mais très peu d'études ont été faites à ce sujet. A. Rakotoveloa a montré qu'il pouvait y avoir un effet synergique entre les médiateurs notamment lorsque l'ABTS est impliqué dans cette association. En effet, les associations ABTS/HBT ainsi que ABTS/Méthyle syringate montrent un taux de conversion d'une molécule modèle de sa forme réduite à sa forme oxydée (l'acétovanillone benzylée) améliorée par rapport aux taux de conversion lorsque les médiateurs sont utilisés seuls. L'association HBT/Méthyle syringate ne montre pas de synergie (144, 145).

Les Figure 50, Figure 51, Figure 52 présentent les profils GPC obtenus après les réactions de dépolymérisation. Ces résultats montrent la présence de quatre pics de plus faibles masses moléculaires (ayant une masse moléculaire d'environ 1500, 550, 110 et 60 Da) après dépolymérisation des trois lignines en utilisant l'ABTS comme médiateur.

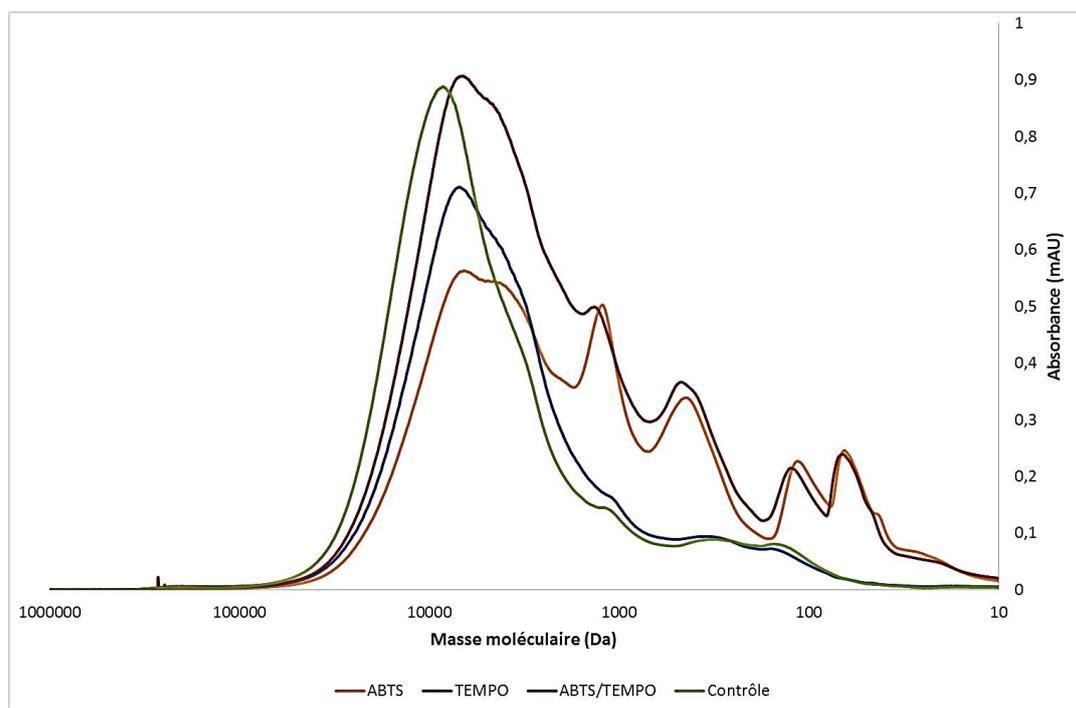


Figure 50 : Profils GPC de la Lignosulfonate après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Les médiateurs utilisés sont l'ABTS, le TEMPO et un mélange ABTS/TEMPO. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* et 0,0015mmol de médiateur solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm. Analyses effectuées avec 2 colonnes.

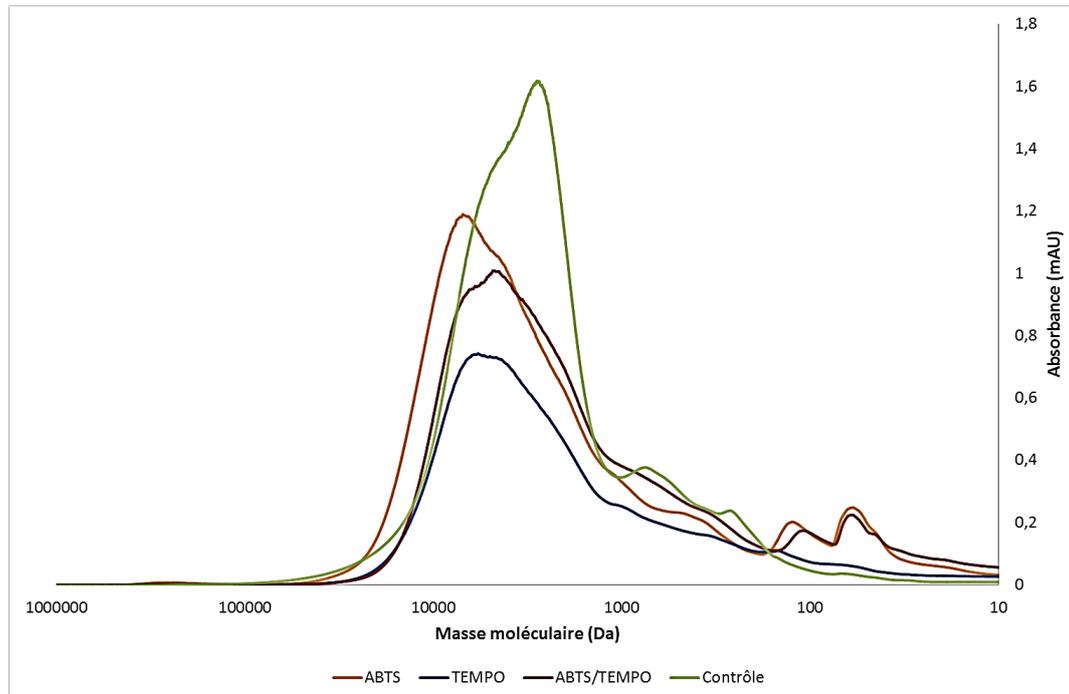


Figure 51 : Profils GPC de la Lignine Organosolv après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Les médiateurs utilisés sont l'ABTS, le TEMPO et un mélange ABTS/TEMPO. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* et 0,0015mmol de médiateur solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm. Analyses effectuées avec 2 colonnes.

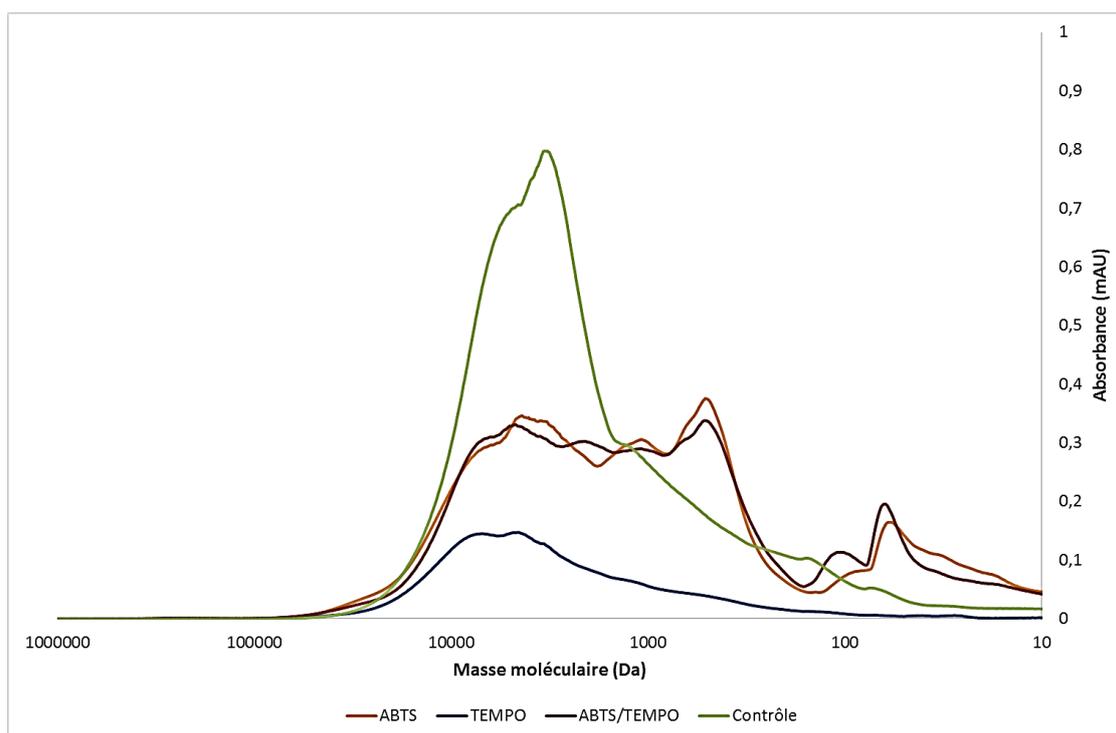


Figure 52 : Profils GPC de la lignine Kraft après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Les médiateurs utilisés sont l'ABTS, le TEMPO et un mélange ABTS/TEMPO. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* et 0,0015mmol de médiateur solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm. Analyses effectuées avec 2 colonnes.

Les pics correspondant aux produits de réaction de chaque lignine apparaissent dans les mêmes gammes de masse (1500, 550, 110 et 60 Da environ), seule la proportion varie (pourcentage d'aire). Une décomposition de chaque pic issu des profils GPC des trois lignines a été effectuée avec le logiciel PeakFit afin de déterminer le pourcentage d'aire. Les Figure 53, Figure 54 et Figure 55 présentent la décomposition des pics issus du profil GPC de la Lignosulfonate, de la lignine Organosolv et de la lignine Kraft, respectivement, après traitement enzymatique utilisant l'ABTS comme médiateur. La décomposition des profils GPC de la lignine Organosolv et de la lignine Kraft a été effectuée de la même façon. Les pics 1 et 2 ont été regroupés pour correspondre à un pic appelé « lignine » car ils ont le même temps de rétention que l'expérience « contrôle » (lignine non dépolymérisée). Les pics 3, 4 et 5 correspondent aux produits de dépolymérisation de la Lignosulfonate appelés P1, P2 et P3 respectivement. Ensuite, les différents pics obtenus à partir du pic 6 ont été regroupés pour correspondre au produit 4, appelé P4. La masse moléculaire de P1, P2, P3 et P4 est approximativement de 1 500, 550, 110 et 60 respectivement selon la calibration des colonnes présentée dans la partie IV.1.2.

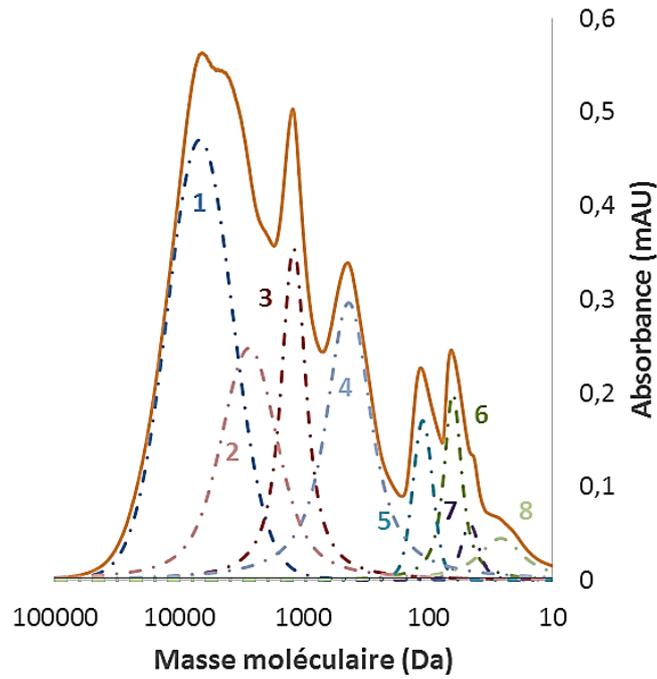


Figure 53 : Décomposition des pics issus du profil GPC de la **Lignosulfonate** après traitement enzymatique utilisant l'ABTS comme médiateur.

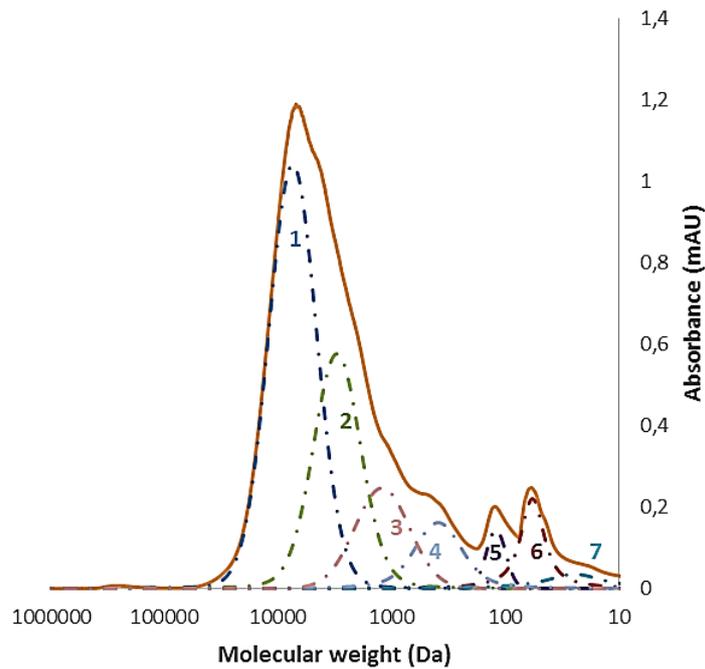


Figure 54 : Décomposition des pics issus du profil GPC de la **lignine Organosolv** après traitement enzymatique utilisant l'ABTS comme médiateur.

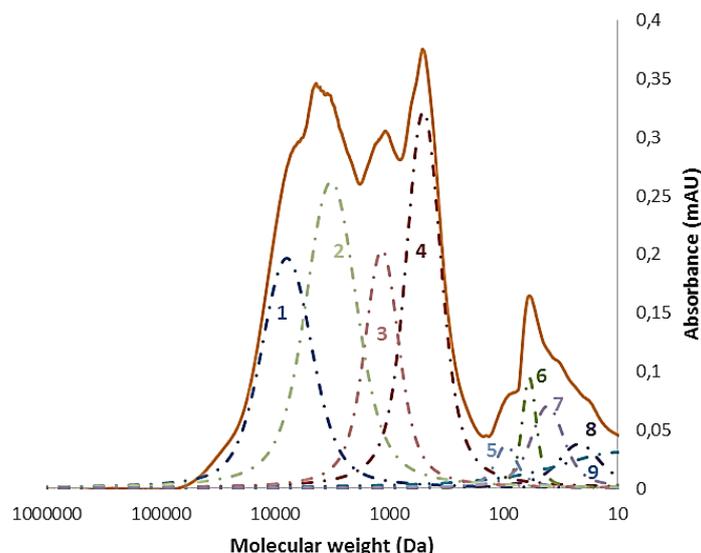


Figure 55 : Décomposition des pics issus du profil GPC de la **lignine Kraft** après traitement enzymatique utilisant l'ABTS comme médiateur.

Les Figure 56, Figure 57 et Figure 58 montrent les histogrammes représentant le pourcentage d'aire des pics « lignine » et des produits (1, 2, 3 et 4) issus des profils GPC pour chaque lignine après cinq jours de réaction avec le système LMS contenant soit l'ABTS ou le TEMPO seul, soit un mélange d'ABTS et de TEMPO. Toutes les réactions ont été réalisées deux fois afin de montrer la reproductibilité de la réaction, les données présentées sont donc la moyenne de ces deux réactions.

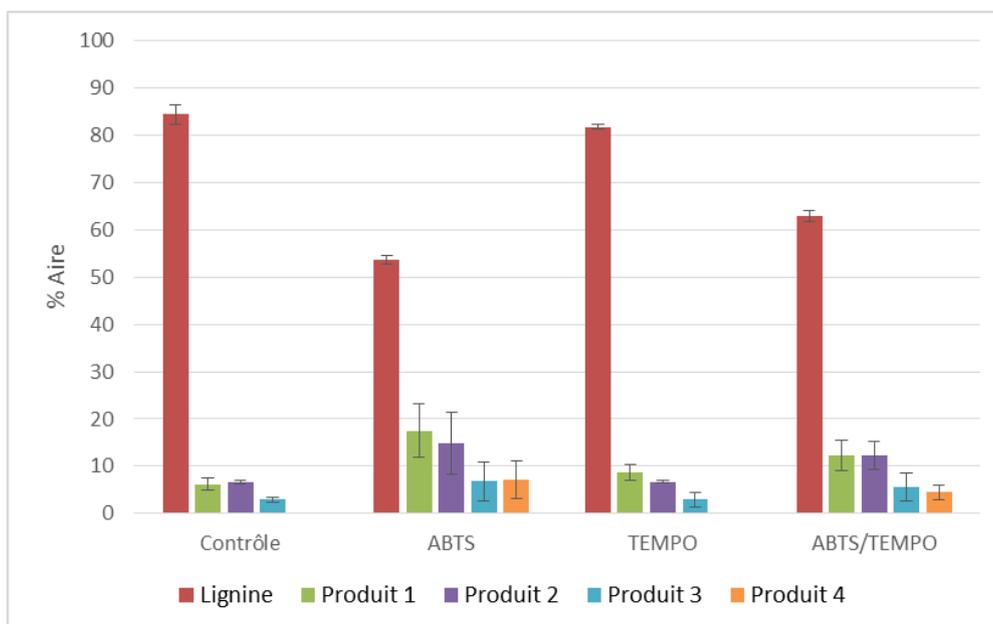


Figure 56 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignosulfonate. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* et 0,0015mmol de médiateur solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm.

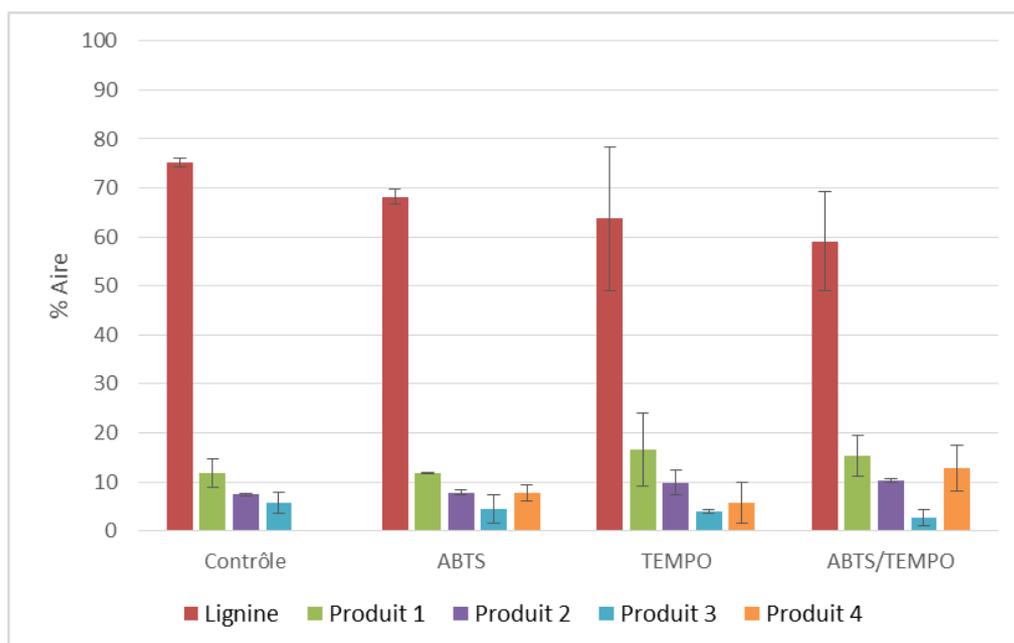


Figure 57 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* et 0,0015mmol de médiateur solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm.

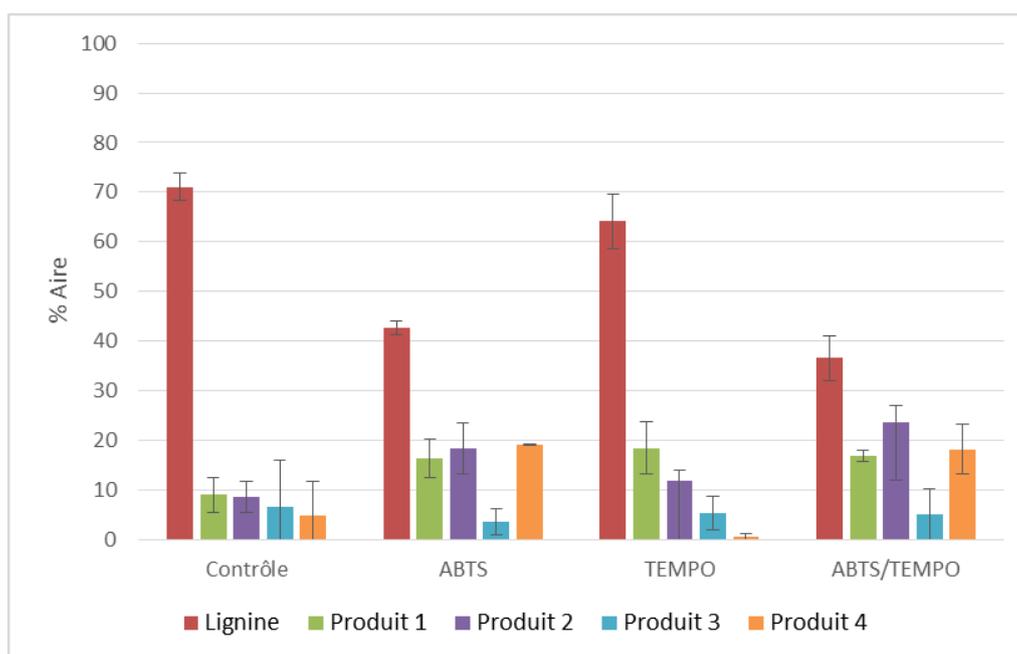


Figure 58 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la lignine Kraft. Conditions réactionnelles : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* et 0,0015mmol de médiateur solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm.

Une augmentation de la proportion des quatre « produits » est observée pour les trois lignines. Des composés ayant la même masse moléculaire sont néanmoins déjà présents dans les expériences contrôles mais en faible proportion. En effet, les pics de « lignine » (barres rouges) diminuent de façon significative (30,6 % ; 7,1 % et 28,4 % pour la Lignosulfonate, la lignine Organosolv et la lignine Kraft respectivement) dans les conditions utilisant l'ABTS, avec une efficacité moins importante pour la lignine Organosolv. La diminution du pourcentage d'aire correspondant à la perte de lignine est corrélée à la somme des pourcentages de chacun des quatre « produits ». Ces résultats semblent montrer l'efficacité de la dépolymérisation enzymatique sur les trois lignines industrielles. Le « produit 3 » montre une diminution de 1,2 % pour la Lignine Organosolv et de 3,1 % pour la Lignine Kraft par rapport à l'échantillon contrôle. Ce « produit 3 » n'ayant pas « disparu », une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est une polymérisation de ces produits afin de former un composé de plus haute masse moléculaire. Une légère dépolymérisation est observée avec le TEMPO (diminution entre 2,6 % ; 11,5 % et 7 % pour la Lignosulfonate, la lignine Organosolv et la lignine Kraft respectivement). Cependant, certaines études présentes dans la littérature montrent une bonne efficacité du TEMPO, utilisé seul à une concentration plus importante ainsi qu'en présence d'une forte concentration en enzyme (146, 147). La concentration utilisée dans notre étude n'est donc probablement pas suffisante pour observer une dépolymérisation enzymatique. Face à ces résultats, le ratio Lignine/Enzyme/Médiateur paraît être un facteur important. Ensuite, les réactions utilisant le mélange TEMPO/ABTS montrent des résultats identiques à ceux obtenus avec l'ABTS seul (diminution de 16,1 % pour la lignine Organosolv et de 34,5 % pour la lignine Kraft). Il n'y a donc pas d'effet synergique entre ces deux médiateurs dans les conditions réactionnelles utilisées dans notre étude.

IV.4.3. Spectrométrie de masse

L'analyse GPC, basée sur une séparation selon la masse moléculaire des molécules, seule n'est pas suffisante pour démontrer la dépolymérisation enzymatique des lignines. Une caractérisation de la structure moléculaire des produits de dépolymérisation obtenus serait une preuve irréfutable. Cependant, la caractérisation précise des produits de dépolymérisation des lignines est très difficile du fait de la structure complexe de la lignine et aux nombreux produits différents qu'il est possible d'obtenir. En effet, dans la littérature, de nombreuses tentatives pour analyser des oligomères de lignine ont été effectuées en utilisant les méthodes courantes de caractérisation par spectrométrie de masse (148). La méthode appelée « Matrix-assisted laser

desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry » (MALDI-TOF-MS) est la méthode la plus couramment utilisée pour la caractérisation de polymères synthétiques ou naturels. Des informations telles que la masse moléculaire, la nature ou le nombre de répétition des unités peuvent être déduite de cette méthode. Largement utilisée pour les polymères synthétiques, cette méthode n'est que très peu explorée pour l'analyse de la lignine. Les spectres de masse de lignines publiés sont très peu nombreux et montrent une très faible résolution due principalement à la faible efficacité d'ionisation des échantillons de lignines (149, 150).

Des échantillons correspondants aux différents pics (lignine non dépolymérisée et produits) des profils chromatographiques GPC avant et après dépolymérisation ont été collectés (II.2.4.1). Le pic correspondant à la lignine non dépolymérisée (appelé « Li 1 ») et les pics correspondant aux produits de dépolymérisation (appelé « Li 2 » pour le profil avant dépolymérisation et « Produits » pour le profil après dépolymérisation) ont été collectés séparément. Après collecte, chaque échantillon a été séché au speedvac et repris dans le solvant d'analyse IMS au moment de l'analyse (50/50 (v/v) d'acétonitrile (ACN)/H₂O). Les échantillons correspondants aux pics « Li1 » et « Produits » ainsi que des polymères modèles (polyéthylène glycol ($M_w \approx 100$ g/mol) et polyguaiacol synthétisé selon le protocole présenté dans la partie II.2.4.2) ont été analysés en MALDI-TOF-MS. La Figure 59 montre que les polymères modèles sont facilement détectables alors que la lignine non dépolymérisée ainsi que les produits de dépolymérisation ne sont pas détectable avec cette méthode. Face à cette difficulté de caractérisation de la lignine et ses produits de dépolymérisation, il est nécessaire de se tourner vers des méthodes alternatives.

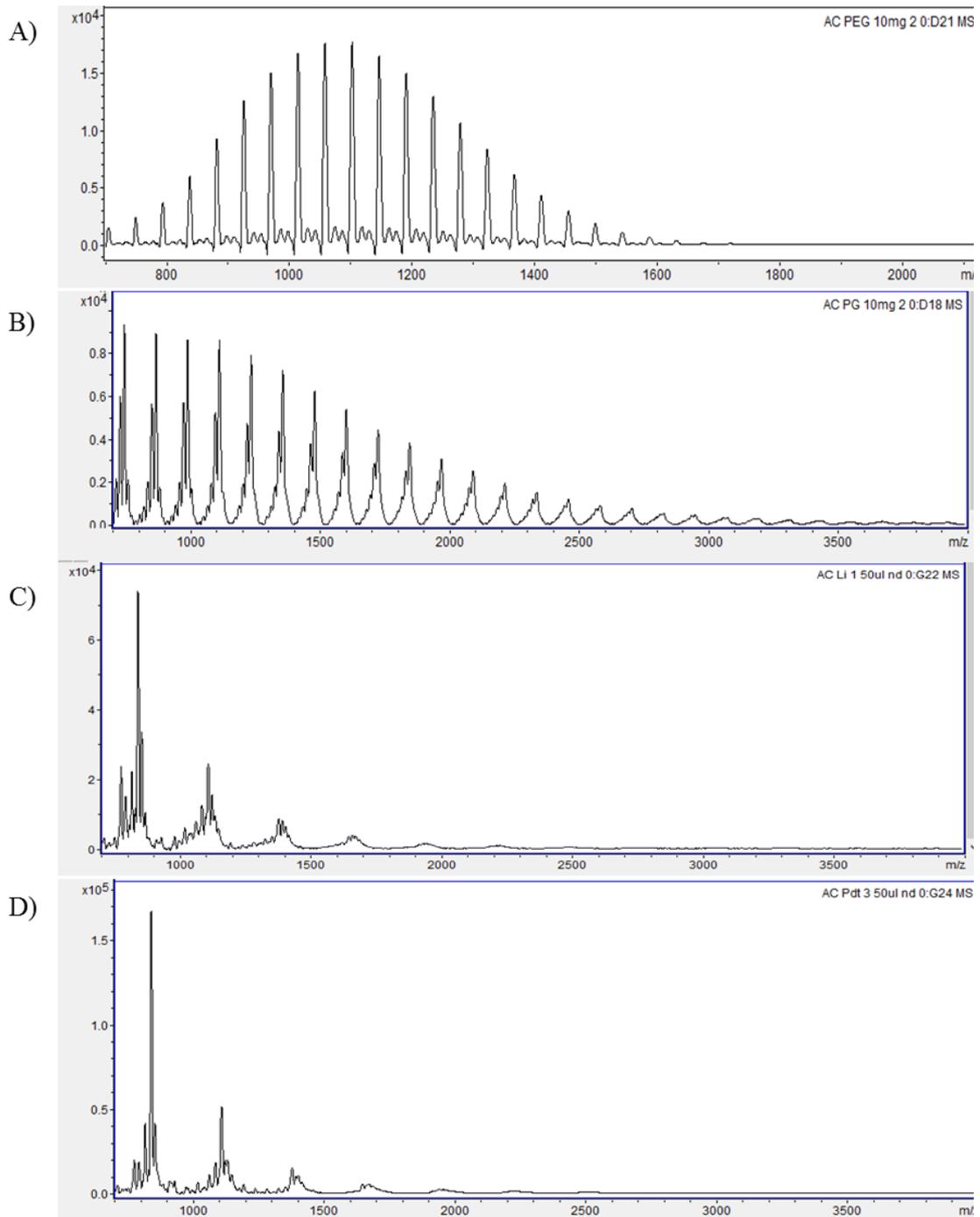


Figure 59 : Spectromètre de masse obtenus en MALDI-TOF-MS A) d'un polyéthylèneglycol ($M_w \approx 1000g/mol$), B) d'un polyguaiacol. Ainsi que des pics C) « Li 1 » et D) « Produit » collectés des profils GPC après dépolymérisation enzymatique par le système LMS (enzyme issue de *Trametes versicolor* / ABTS) en milieu liquide de la Lignosulfonate.

Une analyse Electrospray Ionization-Ion Mobility-Mass Spectrometry (ESI-IM-MS) permettant d'évaluer la mobilité ionique de la lignine avant dépolymérisation enzymatique ainsi que celle des produits issus de la dépolymérisation enzymatique pourrait être une alternative aux méthodes classiques dans le but d'obtenir d'autres preuves de dépolymérisation. Cette étude de spectrométrie de masse en mobilité ionique des échantillons issus de la collecte des pics obtenus en GPC pour la Lignosulfonate après dépolymérisation enzymatique et d'un témoin n'ayant subi aucune dépolymérisation enzymatique (II.2.4.1.) a été effectuée. Les profils de mobilité ionique de la fraction GPC de la Lignosulfonate non dépolymérisée (« Li 1 ») que ce soit avant (courbe bleue) ou après dépolymérisation enzymatique (courbe verte) sont présentés en Figure 60. De même, les profils de mobilité ionique de la fraction GPC correspondants aux produits de dépolymérisation (« Li 2 » et « Produits ») de la Lignosulfonate que ce soit avant (courbe bleue) ou après réaction enzymatique (courbe verte) sont présentés en Figure 61. Le changement de mobilité ionique (différence entre la courbe bleue et verte) est induit par un changement de conformation spatiale des molécules présentes dans ces fractions GPC. Ce changement de mobilité ionique des molécules n'est pas corrélé à la masse molaire. En effet, une molécule ayant une masse molaire donnée mais une conformation spatiale étendue présentera un temps de dérive plus grand (une mobilité ionique plus grande) qu'une molécule de masse molaire identique mais de conformation spatiale plus contrainte.

La Figure 60 montre un décalage du temps de dérive du pic « Li 1 » avant (courbe bleue) et après dépolymérisation enzymatique (courbe verte). Ainsi, le temps de dérive augmente après dépolymérisation, ce qui indique que la lignine obtenue présente une conformation plus étendue après dépolymérisation. Par conséquent, la lignine non dépolymérisée est plus contrainte. La Figure 61 montre également un décalage du temps de dérive des pics « Produits » après dépolymérisation enzymatique (courbe verte) par rapport au pic « Li 2 » avant dépolymérisation enzymatique (courbe bleue). Ce décalage de mobilité ionique est ici inverse au décalage précédent. En effet, le temps de dérive diminue après dépolymérisation, ce qui indique que les produits issus de la dépolymérisation présente une conformation plus contrainte que les composés de la même fraction GPC de lignine non dépolymérisée. L'analyse de ces mobilogrammes apporte donc une preuve supplémentaire de la dépolymérisation enzymatique de la Lignosulfonate.

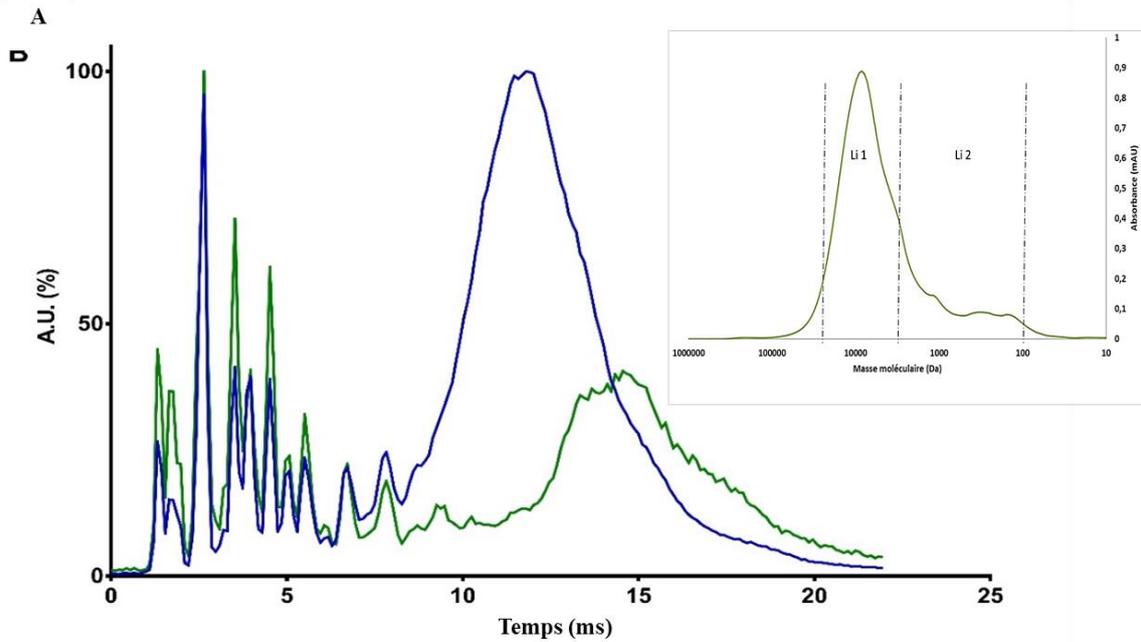


Figure 60 : Représentation du temps de dérive obtenu par analyse ESI-IM-MS des échantillons correspondant au pic de lignine non dépolymérisée (Li 1) issus de la collecte du profil GPC de la Lignosulfonate avant dépolymérisation enzymatique (courbe bleue) ainsi qu'après dépolymérisation enzymatique par la laccase de *T. versicolor* en présence de 1,6 nM d'ABTS (courbe verte)

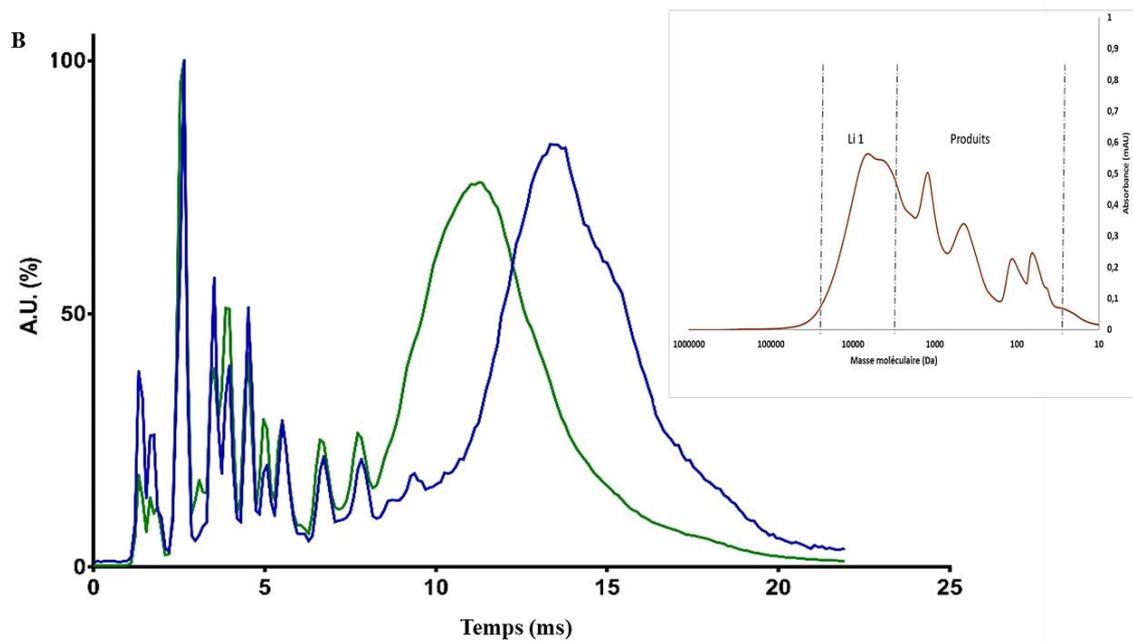


Figure 61 : Représentation du temps de dérive obtenu par analyse ESI-IM-MS des échantillons correspondant au deuxième pic de lignine non dépolymérisée (Li 2) issus de la collecte du profil GPC de la Lignosulfonate avant dépolymérisation enzymatique (courbe bleue) ainsi qu'aux produits de dépolymérisation après dépolymérisation enzymatique par la laccase de *T. versicolor* en présence de 1,6 nM d'ABTS (courbe verte)

IV.4.4. Mise en place de l'outil de criblage sur lignine en milieu liquide

L'objectif est de développer un outil de criblage qui permet de supprimer les contraintes liées à la réaction enzymatique des lignines en milieu liquide exprimées précédemment (partie III. 1). Afin de valider cet outil de criblage développé lors de ce Chapitre IV, il est nécessaire d'étudier la dépolymérisation en milieu liquide et en milieu solide avec différentes conditions enzymatiques et de les comparer entre eux. Les concentrations en enzyme et en médiateur testées sont les suivantes : 0, 3 et 15 U de laccase et 0 ; 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS, le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau. Les études suivantes ont été réalisées avec la lignine Organosolv, sélectionnée lors du chapitre III. 4.

La Figure 62 présente les chromatogrammes GPC obtenus en absence d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. La lignine est éluée avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes avec ou sans la présence d'ABTS, reflétant aucune dépolymérisation de la lignine, même en présence d'ABTS. Ces résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes exprimant le pourcentage d'aire des différents pics obtenus par décomposition des profils GPC (Figure 63). Le premier produit de dépolymérisation (pic observé à un temps de rétention d'environ 52 minutes) est déjà présent avant réaction enzymatique.

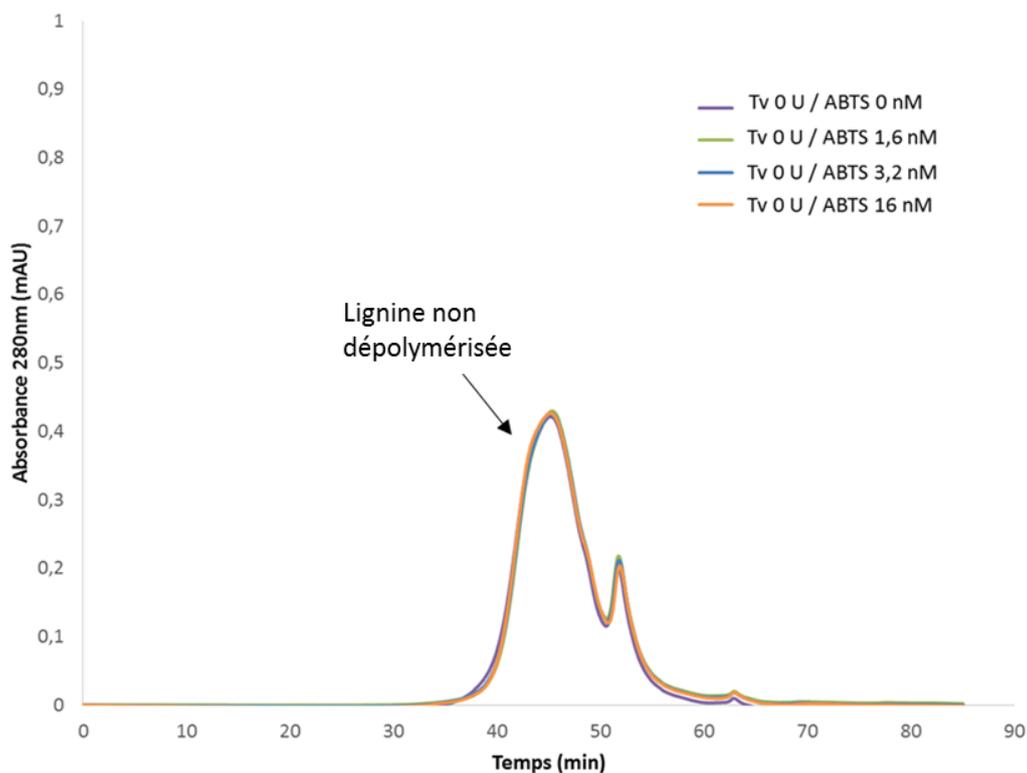


Figure 62 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après 5 jours de réaction enzymatique par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En **absence d'enzyme** (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

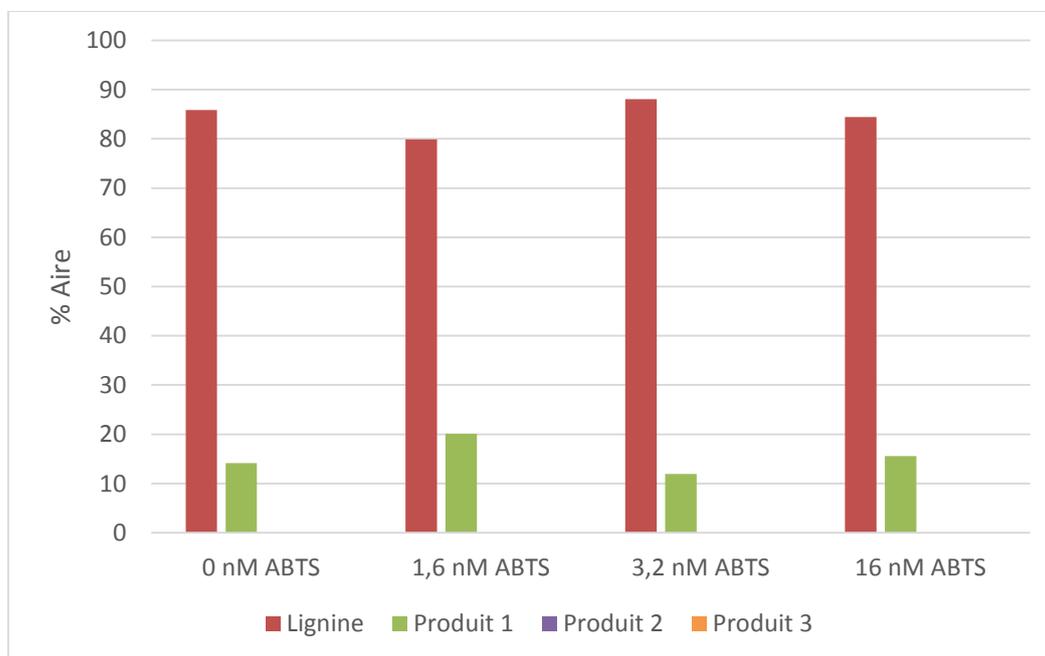


Figure 63 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire issu des différents profils GPC après 5 jours de réaction enzymatique de la Lignine Organosolv dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane en **absence de laccase**.

La Figure 64 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 3 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. En absence d'ABTS, seul le pic correspondant à la lignine est détecté avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes. En présence d'ABTS, l'apparition de produits de dépolymérisation est observée avec des temps de rétention de 50 à 60 minutes ainsi que de 65 à 75 minutes. Plus la concentration en ABTS augmente plus leur intensité augmente (0,2 et 0,1 mAU avec 1,6 nM d'ABTS et 0,5 et 0,4 mAU avec 16 nM d'ABTS). Les histogrammes exprimant le pourcentage d'aire des différents pics obtenus par décomposition des profils GPC montrent que plus il y a d'ABTS, plus il y a dépolymérisation enzymatique (Figure 65). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 16,11 ; 27,83 et 34,26 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits 1, 2 et 3 ayant des temps de rétention de 50 à 60 minutes, 70 minutes et 75 minutes, respectivement. La diminution de la quantité de lignine observée correspond au gain obtenu réparti sur les trois produits.

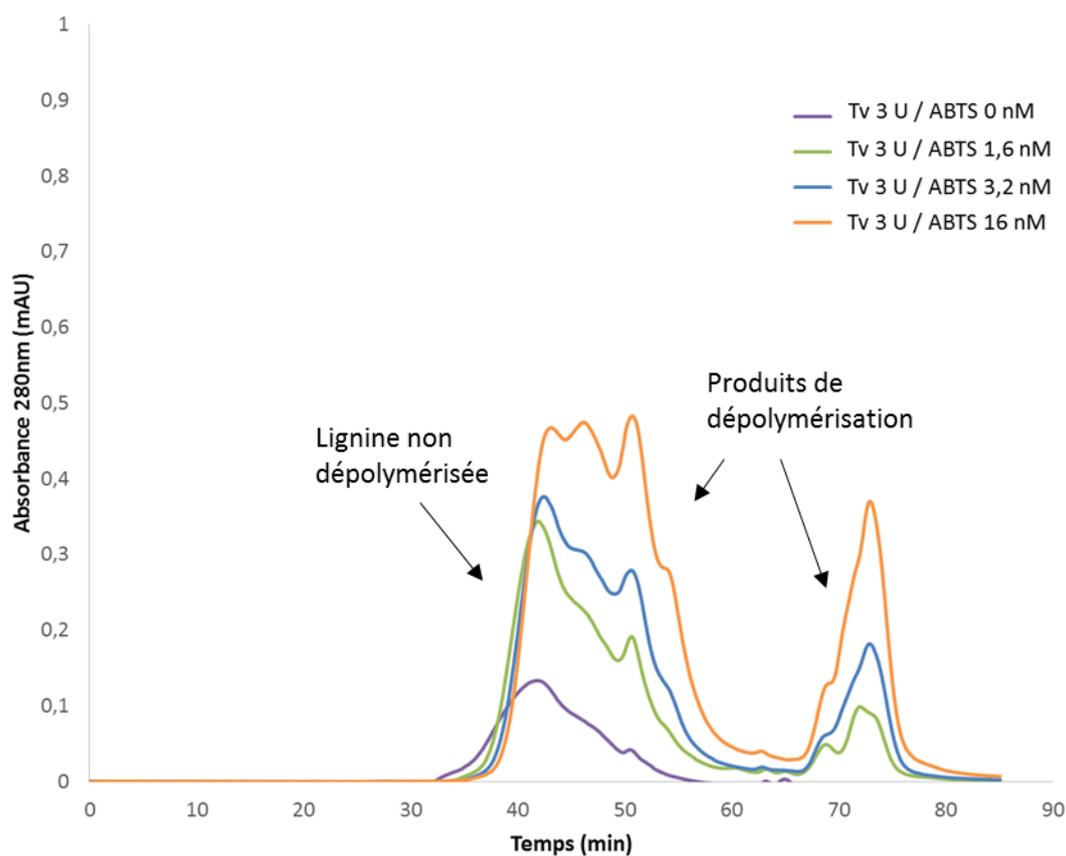


Figure 64 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après 5 jours de réaction enzymatique par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

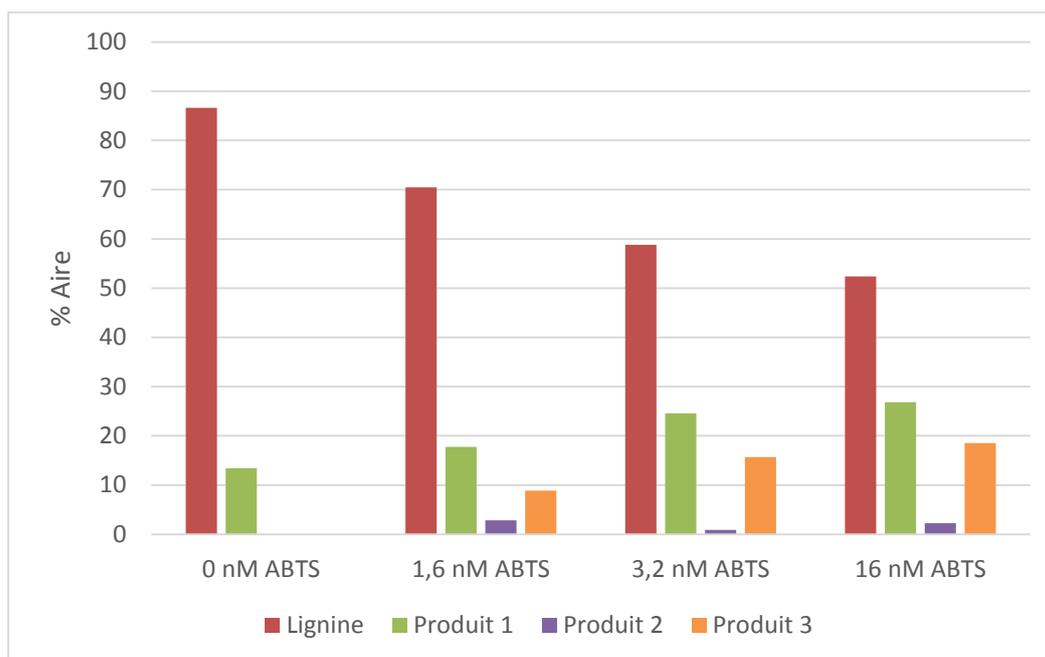


Figure 65 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire issu des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane en présence de 3 U de laccase.

La Figure 66 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 15 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. En absence d'ABTS, seule la lignine est détectée avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes. En présence d'ABTS, les pics correspondant aux produits de dépolymérisation sont élués avec des temps de rétention de 50 à 60 minutes et 70 à 75 minutes et sont plus nombreux (plus d'épaulement et dédoublement des pics). Plus la concentration en ABTS augmente, plus l'intensité de ces pics augmente (0,4 et 0,1 mAU avec 1,6 nM d'ABTS et 0,55 et 0,35 mAU avec 16 nM d'ABTS). Les histogrammes exprimant le pourcentage d'aire des différents pics obtenus par décomposition des profils GPC montrent que plus il y a d'ABTS, plus il y a dépolymérisation enzymatique (Figure 67). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 11,66 ; 23,39 et 31,75 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits 1, 2 et 3 ayant des temps de rétention de 50 à 60 minutes, 70 minutes et 75 minutes, respectivement. La diminution de la quantité de lignine observée correspond au gain obtenu réparti sur les trois produits.

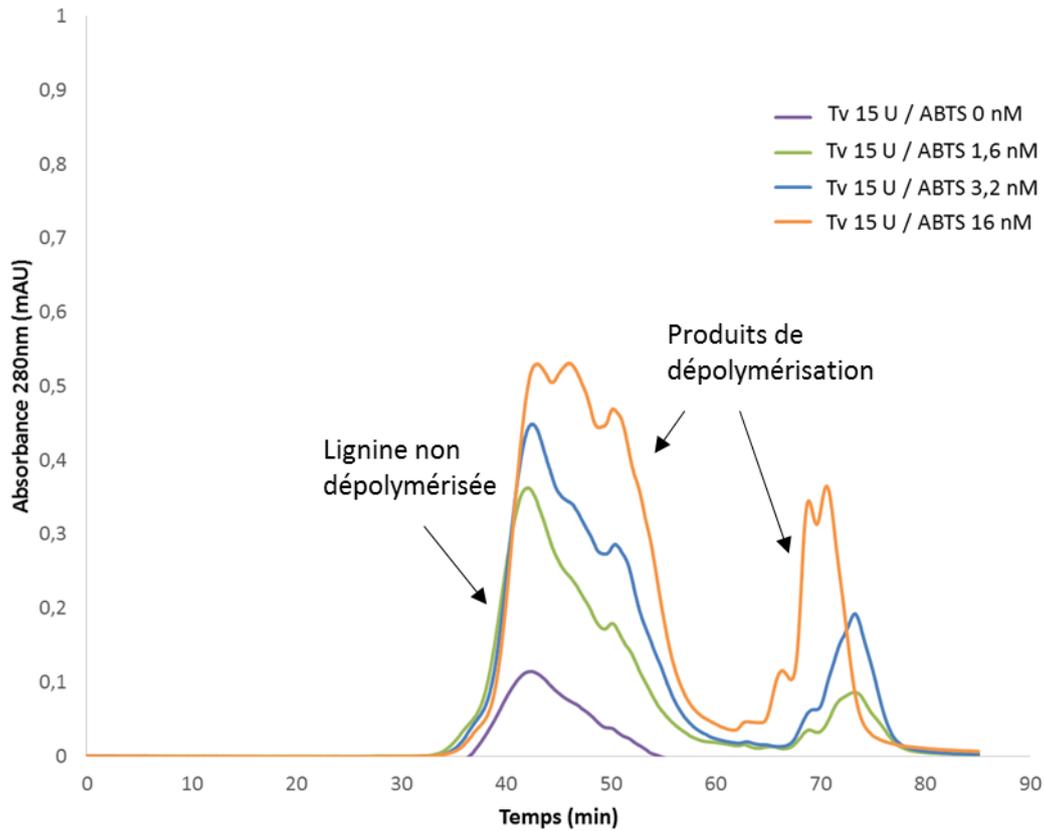


Figure 66 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après 5 jours de réaction enzymatique par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

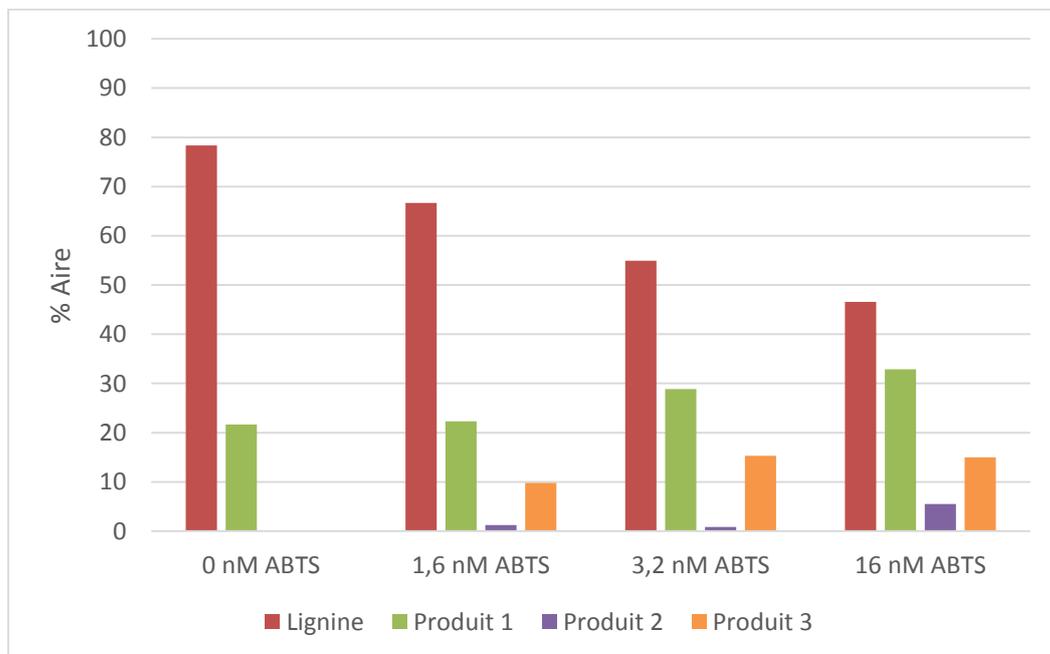
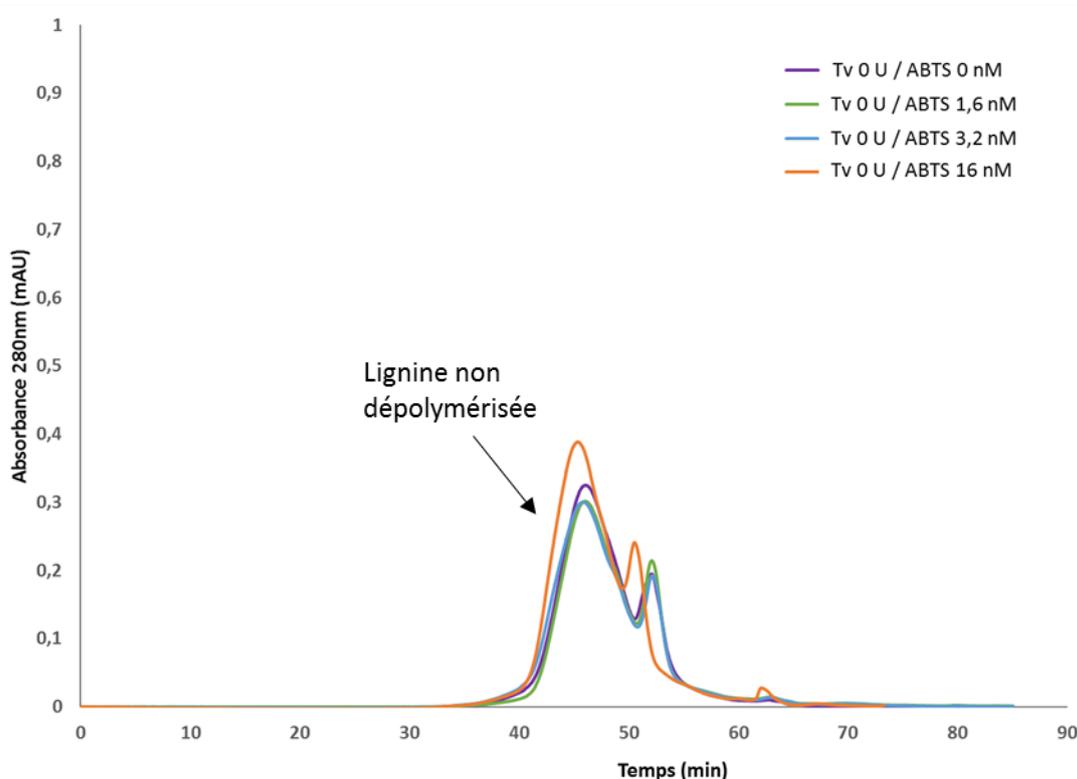


Figure 67 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire issu des différents profils GPC après 5 jours de réaction enzymatique de la Lignine Organosolv dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane en présence de 15 U de laccase.

La Figure 68 présente les chromatogrammes GPC obtenus en absence d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans l'eau. Seule la lignine est détectée avec ou sans la présence d'ABTS, ne traduisant aucune dépolymérisation lorsque le médiateur est présent sous sa forme non oxydée (absence d'enzyme). Ces résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes exprimant le pourcentage d'aire de la lignine et des produits obtenus à partir de la décomposition des profils GPC. Ces derniers ne montrent aucune dépolymérisation (absence des produits 2 et 3) (Figure 69). Le premier produit de dépolymérisation (pic observé à un temps de rétention d'environ 52 minutes) est déjà présent avant réaction enzymatique.



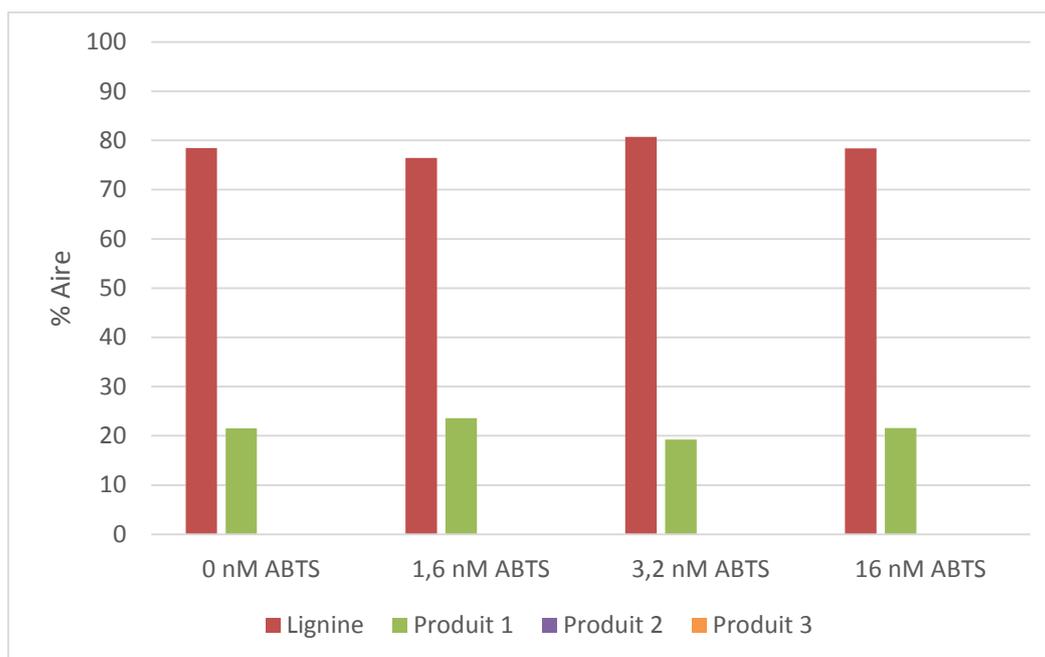


Figure 69 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv en solution dans l'EDI et 25 % de 1,4-dioxane en **absence de laccase**.

La Figure 70 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 3 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans l'eau. En absence d'ABTS, la lignine montre un épaulement vers des temps de rétentions plus petits (inférieurs à 40 minutes). Ce résultat semble montrer que la réaction enzymatique se déroule dans le sens de la polymérisation, générant des produits de plus haut poids moléculaire. En présence d'ABTS, les pics correspondant aux produits de dépolymérisation sont présents avec des temps de rétention de 50 minutes, 60 minutes et 70 minutes (appelés produits 1, 2 et 3 respectivement). Plus la concentration en ABTS augmente, plus l'intensité de ces pics augmente. Les histogrammes représentant le pourcentage d'aire de la lignine et des produits obtenus à partir de la décomposition des profils GPC montrent que plus il y a d'ABTS, plus il y a dépolymérisation enzymatique (Figure 71). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 37,21 ; 50,81 et 48,44 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits 1, 2 et 3. De plus, cette diminution correspond au gain réparti sur les trois produits. La dépolymérisation est plus efficace dans l'eau que lors des réactions dans le tampon.

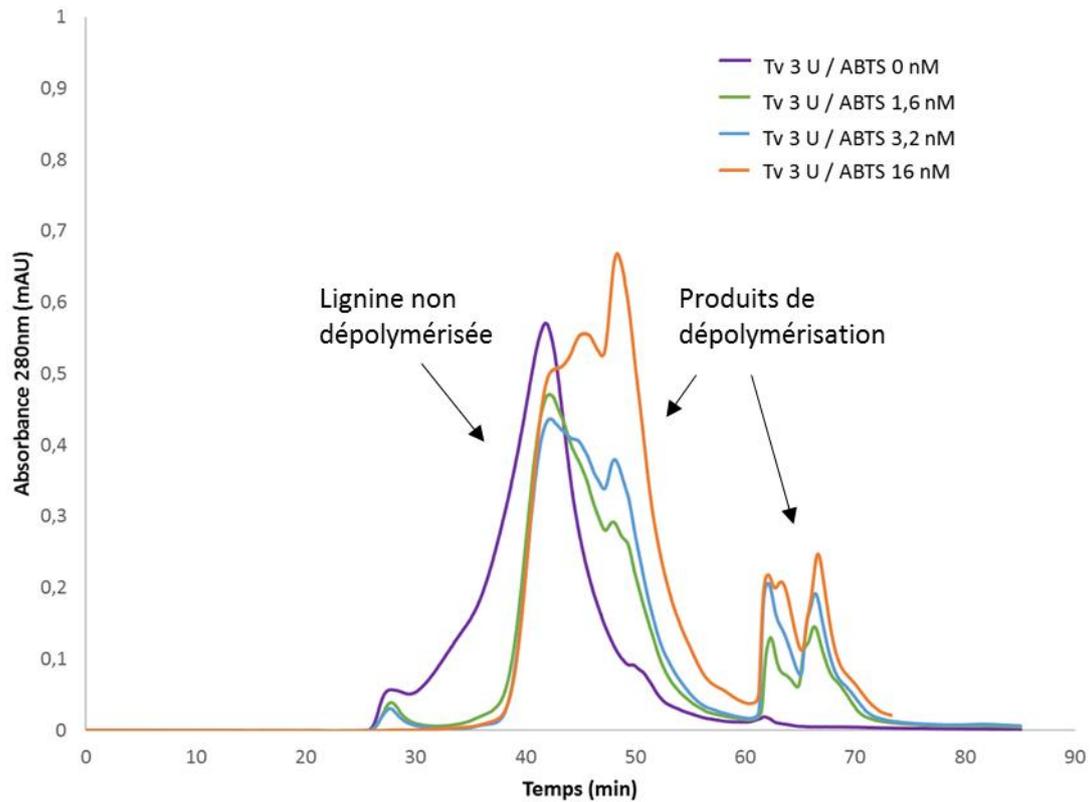


Figure 70 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

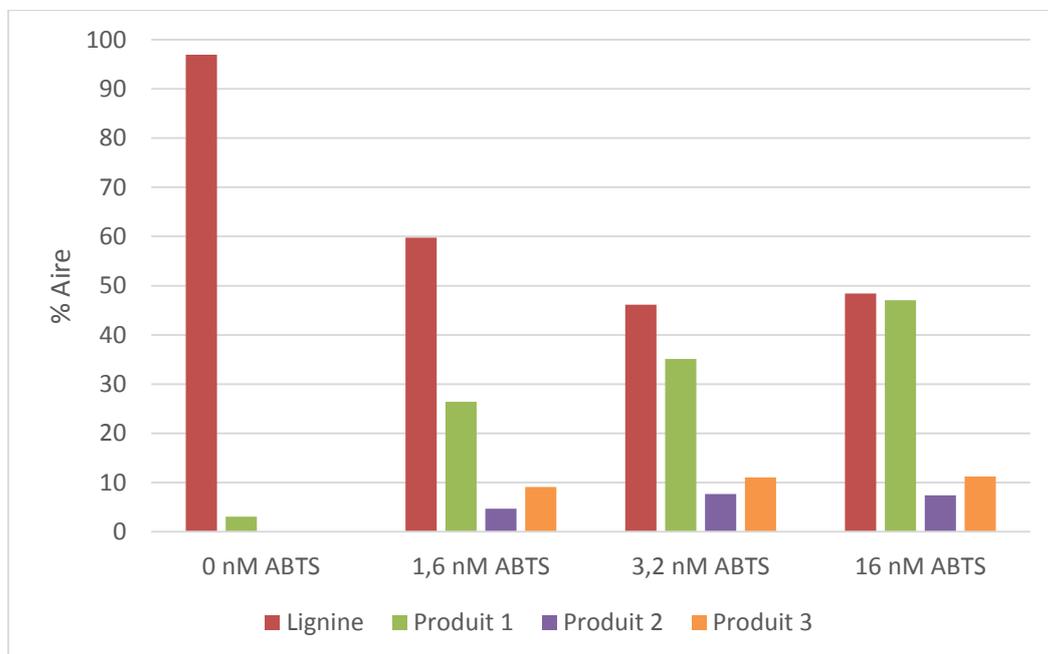


Figure 71 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv en solution dans l'EDI et 25 % de 1,4-dioxane en présence de 3 U de laccase.

La Figure 72 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 15 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans l'eau. En absence d'ABTS, la lignine présente un épaulement plus important que précédemment (observé avec 3 U d'enzyme et 0 nM d'ABTS) dans les plus petits temps de rétention (plus grandes masses moléculaire). Ce qui montre que la réaction se déroule dans le sens de la polymérisation. En présence de 1,6 et 3,2 nM d'ABTS la lignine est éluée avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes, traduisant aucune dépolymérisation enzymatique. En présence de 16 nM, un pic ayant un temps de rétention de 50 minutes est observé, pouvant correspondre à un produit. Les histogrammes exprimant le pourcentage d'aire de la lignine et des produits de dépolymérisation après décomposition des différents profils GPC montrent que plus il y a d'ABTS, plus il y a action de la laccase (Figure 73). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 16,11 ; 27,83 et 34,26 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits 1, 2 et 3. Cette diminution correspond au gain obtenu réparti sur les trois produits. La dépolymérisation est beaucoup moins efficace en présence de 15 U de laccase (pas de présence de produits de dépolymérisation), ce qui est dû à la compétition entre la dépolymérisation et la polymérisation.

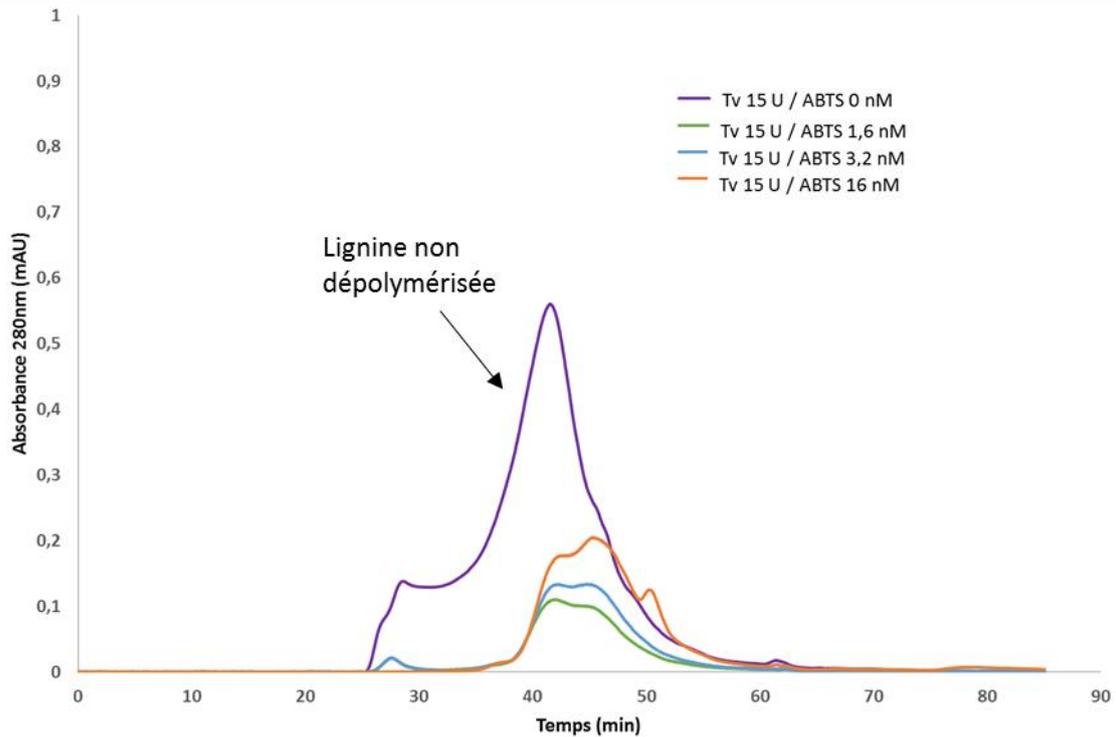


Figure 72 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

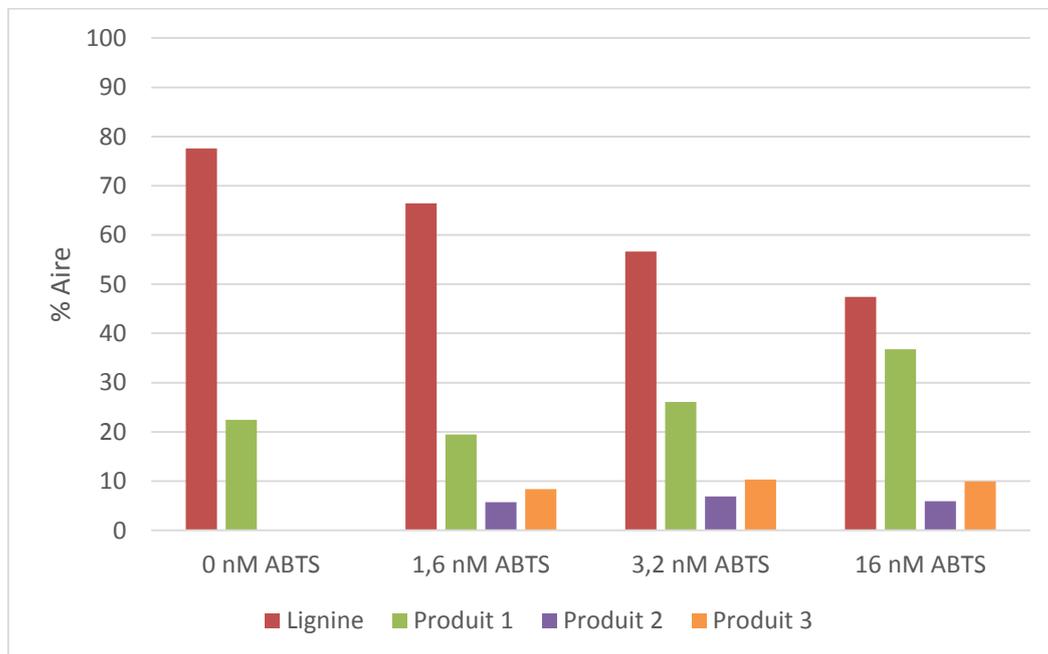


Figure 73 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv en solution dans l'EDI et 25 % de 1,4-dioxane en présence de 15 U de laccase.

Remarque : Les histogrammes présentés lors de la partie IV.4.2. montrent la présence de 4 produits de dépolymérisation alors que ceux présentés lors de cette partie en montrent seulement 3. Ceci est probablement dû au fait que la lignine est utilisée directement sans traitement au préalable. La composition de la lignine prélevée à différents moment et différents endroits dans le récipient de lignine peut être différente et ceci rend un peu moins reproductible la réaction de dépolymérisation enzymatique.

IV.4.5. Mise en place de l'outil de criblage sur films obtenus par spin-coating

IV.4.5.1. Observation à l'œil nu et mesures ellipsométriques

Les mêmes conditions réactionnelles ont été appliquées sur un wafer de silicium complet, recouvert d'un film de lignine Organosolv obtenu à partir d'une solution à 25 g/l dans le 1,4-dioxane. Les dépôts des solutions enzymatiques ont été réalisés à l'aide d'un moule en PDMS formant des puits (Chapitre II.3.2.) dans le but d'obtenir une action de la laccase uniforme sur tout le film de lignine. Les conditions testées sont les suivantes : différents ratio laccase/ABTS avec des concentrations en laccase de 3 U et de 15 U ainsi que des concentrations en ABTS de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM, le tout réalisé soit dans l'eau soit dans le tampon acétate pH 4,6. Puis des dépôts « contrôles » ont été effectués sans présence de laccase et avec (1,6 nM, 3,2 nM ou 16 nM) ou en absence d'ABTS, le tout réalisé soit dans l'eau soit dans le tampon acétate pH 4,6. La Figure 74 montre les résultats visuels obtenus après 24h de contact avec la solution enzymatique à 30 °C sous atmosphère humide et après rinçage et séchage du film. Lorsque l'enzyme (3U) et l'ABTS sont solubilisés dans le tampon acétate pH 4,6, le film devient un peu plus foncé à partir de 16 nM d'ABTS. En présence de 15 U d'enzyme, le film a totalement été enlevé à partir de 16 nM d'ABTS. Lorsque l'enzyme (3U) et l'ABTS sont solubilisés dans l'eau, le film est un peu plus foncé à 1,6 nM d'ABTS et a totalement disparu à partir de 3,2 nM d'ABTS. Ce qui laisse émettre l'hypothèse qu'il y a une action de la laccase de plus en plus importante quand la concentration en ABTS augmente. En présence de 15 U d'enzyme, le film a totalement été enlevé à une concentration en ABTS de 16 nM. Ces résultats montrent que la réaction enzymatique dépendrait du ratio laccase/méiateur. Les réactions témoins en présence ou non d'ABTS réalisées dans le tampon ou dans l'eau et sans enzyme montrent des résultats similaires. En effet, en présence d'ABTS et sans enzyme, le film change totalement de couleur pour devenir marron de plus en plus clair lorsque la concentration en ABTS augmente. Ceci est expliqué par Kent *et al.* (151) par le fait que l'ABTS sous sa forme non oxydée déstabilise physiquement le film tandis que l'ABTS sous sa forme oxydée (sous

l'action de l'enzyme) permettrait une stabilisation du film. Une déstabilisation du film serait réalisée en absence d'enzyme alors qu'en présence d'enzyme une dépolymérisation enzymatique serait réalisée.

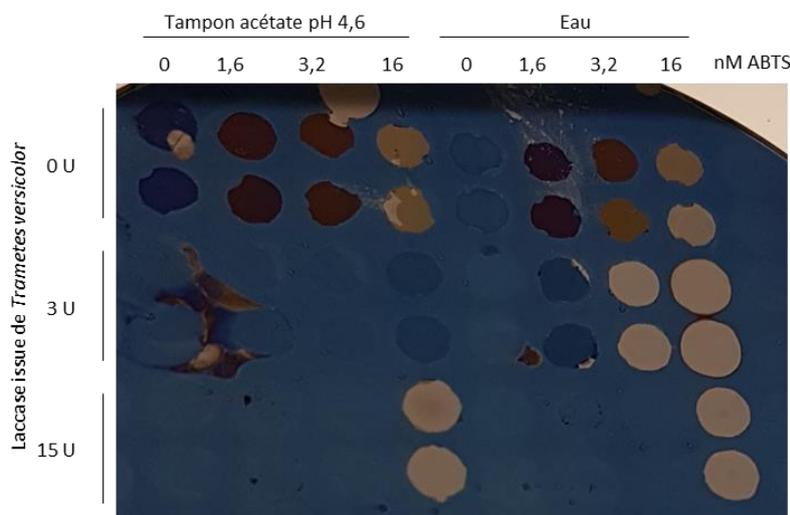


Figure 74 : Résultats visuels après contact de la laccase sur un film de lignine Organosolv obtenu à partir d'une solution à 25 g/l dans le 1,4-dioxane. La solution enzymatique contient la laccase issue de *Trametes versicolor* et l'ABTS comme médiateur solubilisés soit dans le tampon acétate pH 4,6 soit dans l'eau déionisée à différentes concentrations.

L'épaisseur au niveau de chaque spot a été mesurée par ellipsométrie afin d'avoir une analyse plus quantitative ainsi que de confirmer la tendance visuelle. Le Tableau 7 montre le pourcentage de perte d'épaisseur du film solide de lignine Organosolv (Figure 74) par rapport à l'épaisseur du film avant dépôt des solutions. En absence d'enzyme, le tampon acétate seul provoque une diminution de l'épaisseur du film de 18 % alors qu'avec l'eau seule, une perte de 5 % est observée. En présence d'ABTS, la même tendance est observée qu'il soit solubilisé dans le tampon ou l'eau, cette perte est d'environ 30 % en présence de 1,6 nM d'ABTS à environ 60 % pour 16 nM. Lorsque l'enzyme et l'ABTS sont solubilisés dans le tampon, en présence de 3 U d'enzyme, la perte d'épaisseur est très faible. Elle est de 4 % en absence d'ABTS, 5% en présence de 1,6 et 3,2 nM d'ABTS et de 7 % en présence de 16 nM d'ABTS. En présence de 15 U d'enzyme, l'épaisseur diminue très fortement à partir de 16 nM d'ABTS (85 %). Lorsque l'enzyme et l'ABTS sont solubilisés dans l'eau, en présence de 3 U d'enzyme, une diminution d'épaisseur de 9 % est observée en présence de 1,6 nM d'ABTS alors qu'elle est considérable en présence de 3,2 et 16 nM d'ABTS (96 % et 99 % respectivement). En présence de 15 U d'enzyme, l'épaisseur diminue très fortement à partir de 16 nM d'ABTS (90 %).

Tableau 7 : Pourcentage de perte d'épaisseur du film solide de lignine Organosolv après contact avec la laccase et/ou le médiateur (ABTS). Les données d'épaisseur ont été obtenues par ellipsométrie.

Enzyme issue de <i>Trametes versicolor</i>	nM ABTS Tampon acétate pH 4,6				nM ABTS Eau			
	0	1,6	3,2	16	0	1,6	3,2	16
0 U	18 %	36 %	40 %	62 %	5 %	31 %	45 %	68 %
3 U	4 %	5 %	5 %	7 %	0,6 %	9 %	96 %	99 %
15 U	1 %	1 %	2 %	85 %	0 %	1 %	2 %	90 %

Les tendances mesurées par ellipsométrie confirment celles observées visuellement. De plus, le tampon seul semble déstabiliser légèrement physiquement le film (diminution d'épaisseur de 18 %) alors que l'eau provoque une perte d'épaisseur de 5% seulement. L'eau semble donc être plus appropriée pour mener les réactions enzymatiques en milieu solide sur film et dans la perspective de conception du biocapteur enzymatique.

IV.4.5.2. Analyses GPC

Le contenu de chaque puits a été collecté avant rinçage et séchage du film et analysé en GPC. Le but de cette analyse est de confirmer les résultats précédents. En effet, lorsqu'il y a dépolymérisation enzymatique les produits obtenus, de plus faibles masses molaires deviennent solubles dans l'eau.

La Figure 75 présente les profils GPC obtenus en absence d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans le tampon pH 4,6. En absence d'ABTS, la lignine non dépolymérisée est éluée avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes, avec une très faible intensité (≈ 0 mAU). Lorsque l'ABTS est présent, il est élué avec un temps de rétention de 70 minutes. Plus la concentration en ABTS augmente plus son intensité est importante et plus l'intensité de la lignine augmente (de 0,05 à 0,1 mAU). Plus la concentration en ABTS sous sa forme non oxydée augmente, plus le film semble être déstabilisé physiquement, c'est-à-dire qu'une partie du film a été décroché (lignine non dépolymérisée). Ces résultats correspondent à ce qui a été observé en milieu liquide (Figure 62) : pas de pic correspondant aux produits de dépolymérisation. Ces résultats correspondent également à ce qui a été observé sur le film (Figure 74) qui a légèrement changé d'aspect avec le tampon acétate seul, puis qui devient de plus en plus déstabilisé physiquement lorsque la concentration en ABTS augmente (couleur marron). Ceci semble confirmer que l'ABTS sous sa forme non

oxydée provoque une déstabilisation physique du film et « décroche » la lignine non dépolymérisée.

Le pic correspondant à l'ABTS observé lors des chromatogrammes GPC issus des échantillons collectés après réaction en milieu solide n'a pas été observé sur les profils obtenus après réaction en milieu liquide (Figure 62, Figure 64, Figure 66, Figure 68, Figure 70 et Figure 72). En effet, l'ABTS est présent en plus grande quantité (bien que la concentration initiale soit la même) par rapport à la lignine dans les échantillons issus des réactions en milieu solide contrairement aux réactions en milieu liquide.

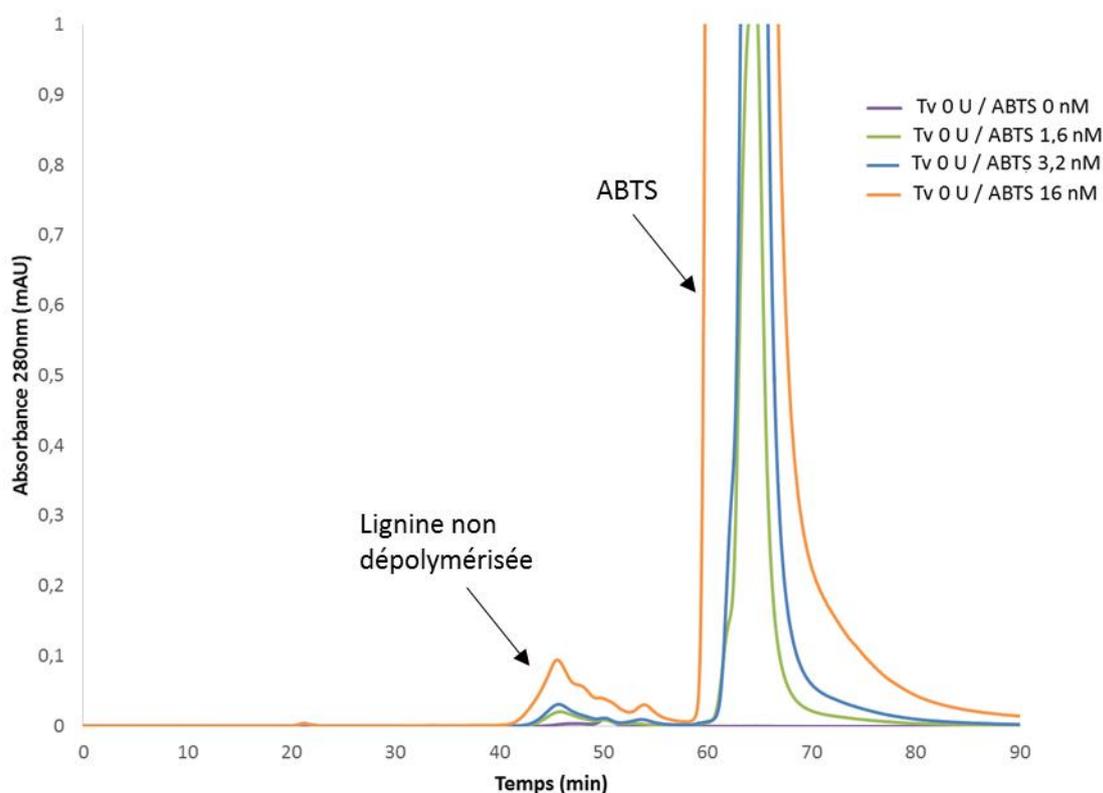


Figure 75 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En l'absence d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

La Figure 76 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 3 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans le tampon pH 4,6. En l'absence d'ABTS, la lignine est éluée avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes avec une faible intensité (0,5 mAU). En présence d'ABTS, le pic correspondant à l'ABTS est présent (temps de rétention de 70 min) et il y a apparition de pics correspondant aux produits de dépolymérisation de la lignine (temps de rétention de 50 et 60 minutes). L'intensité des pics

correspondant aux produits, en présence de 1,6 et 3,2 nM d'ABTS, reste assez faible (0,3 et 0,1 mAU) mais est plus importante pour une concentration en ABTS de 16 nM (0,9 et 0,1 mAU). Ces résultats correspondent à ce qui est observé en milieu liquide (Figure 64) : présence des produits de dépolymérisation. Ces résultats sont également similaires à ce qui est observé sur le film (Figure 74) qui a légèrement changé d'aspect en présence de 1,6 et 3,2 nM d'ABTS et un peu plus pour 16 nM d'ABTS (couleur bleue plus foncée). Ces résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes exprimant le pourcentage d'aire de la lignine et des produits issu de la décomposition des profils GPC (Figure 77). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 46,89 ; 69,3 et 71,66 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits de dépolymérisation 1, 2 et 3 ayant des temps de rétention de 50 minutes, 60 minutes et 70 minutes. Le produit 3 étant composé majoritairement d'ABTS.

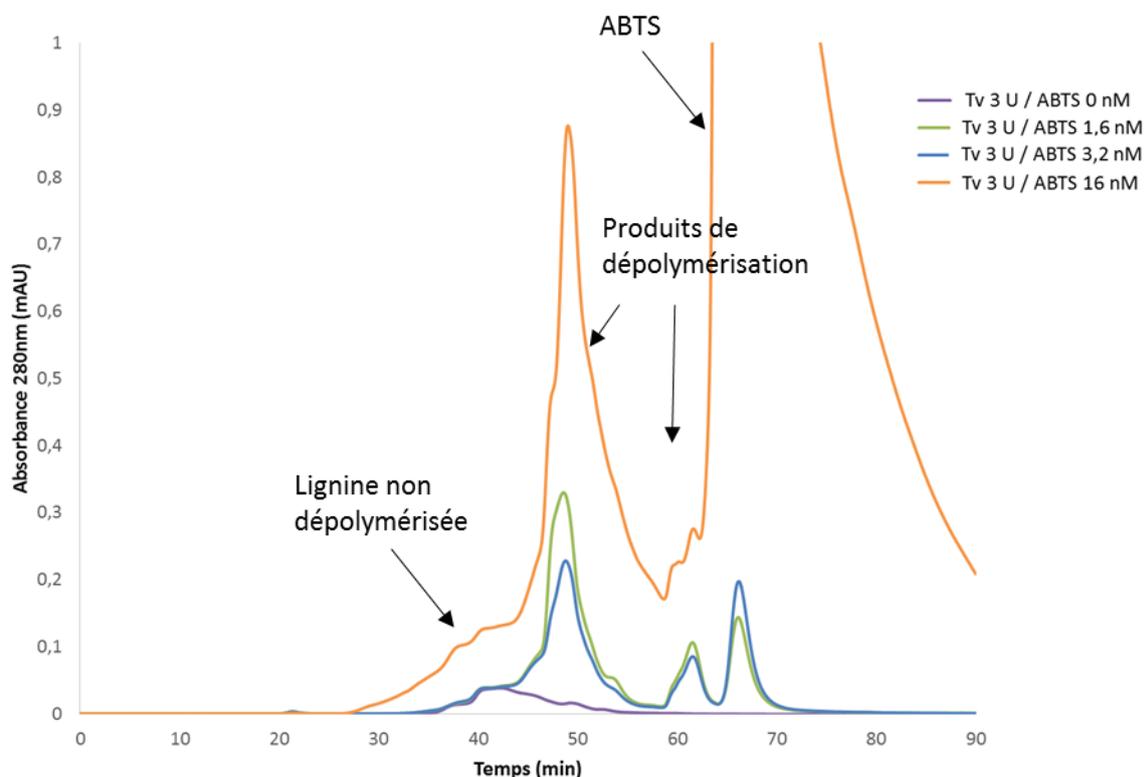


Figure 76 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

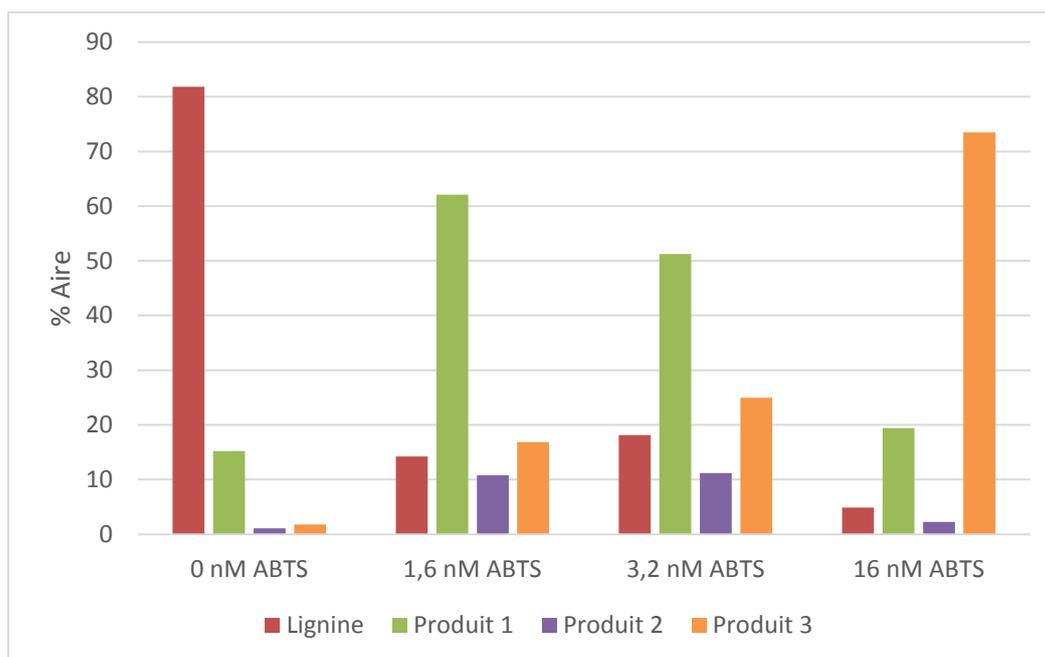


Figure 77 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6.

La Figure 78 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 15 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans le tampon pH 4,6. En l'absence d'ABTS, le profil chromatographique montre que la lignine (temps de rétention de 40 à 50 minutes) a une intensité plus importante (0,2 mAU) que dans les conditions précédentes (0 U et 3 U d'enzyme). En présence d'ABTS, celui-ci est élué avec un temps de rétention de 70 minutes et les produits sont observés avec des temps de rétentions de 50 et 60 minutes. L'intensité des pics correspondant aux produits est assez importante (de 0,4 à 0,8 mAU et de 0,2 à 0,3 mAU), ce qui n'est pas en accord avec ce qui est observé sur le film (Figure 74) où il change totalement d'aspect à partir de 16 nM d'ABTS. En effet, une disparition totale du film est observée (observation de la couleur du wafer de silicium). Cependant ces résultats correspondent avec ce qui est observé en milieu liquide (Figure 66) : présence des produits de dépolymérisation. Ceci ne permet donc pas de confirmer la fiabilité du biocapteur dans ces conditions (15 U de laccase). Ces résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes exprimant le pourcentage d'aire de la lignine et des produits issu de la décomposition des profils GPC (Figure 79). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 60,44 ; 49,82 et 52,58 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits de dépolymérisation 1, 2 et 3 ayant des temps de rétention de 50 minutes, 60 minutes et 70 minutes. Le produit 3 étant composé majoritairement d'ABTS.

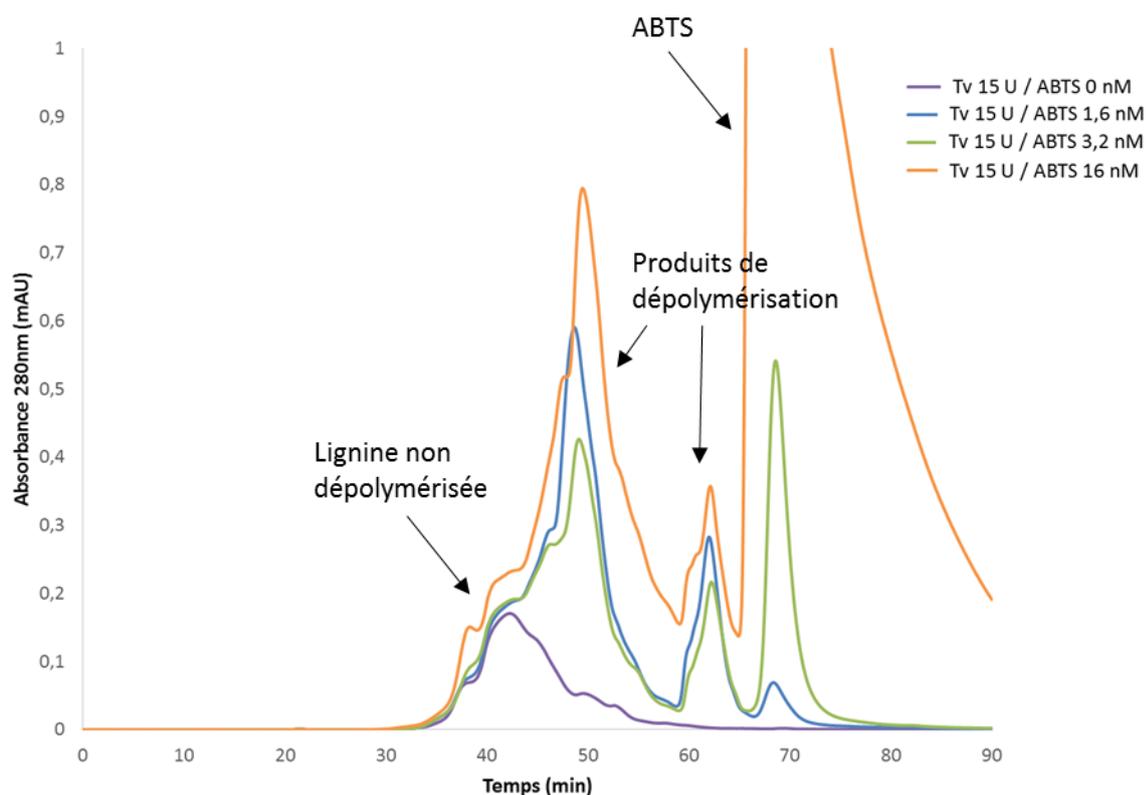


Figure 78 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

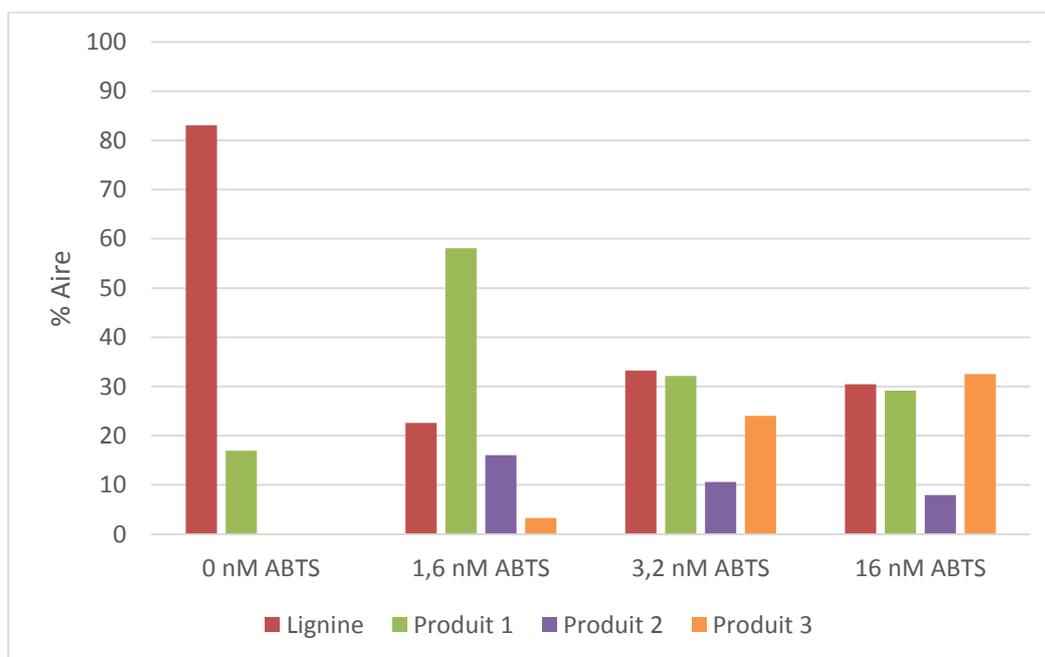
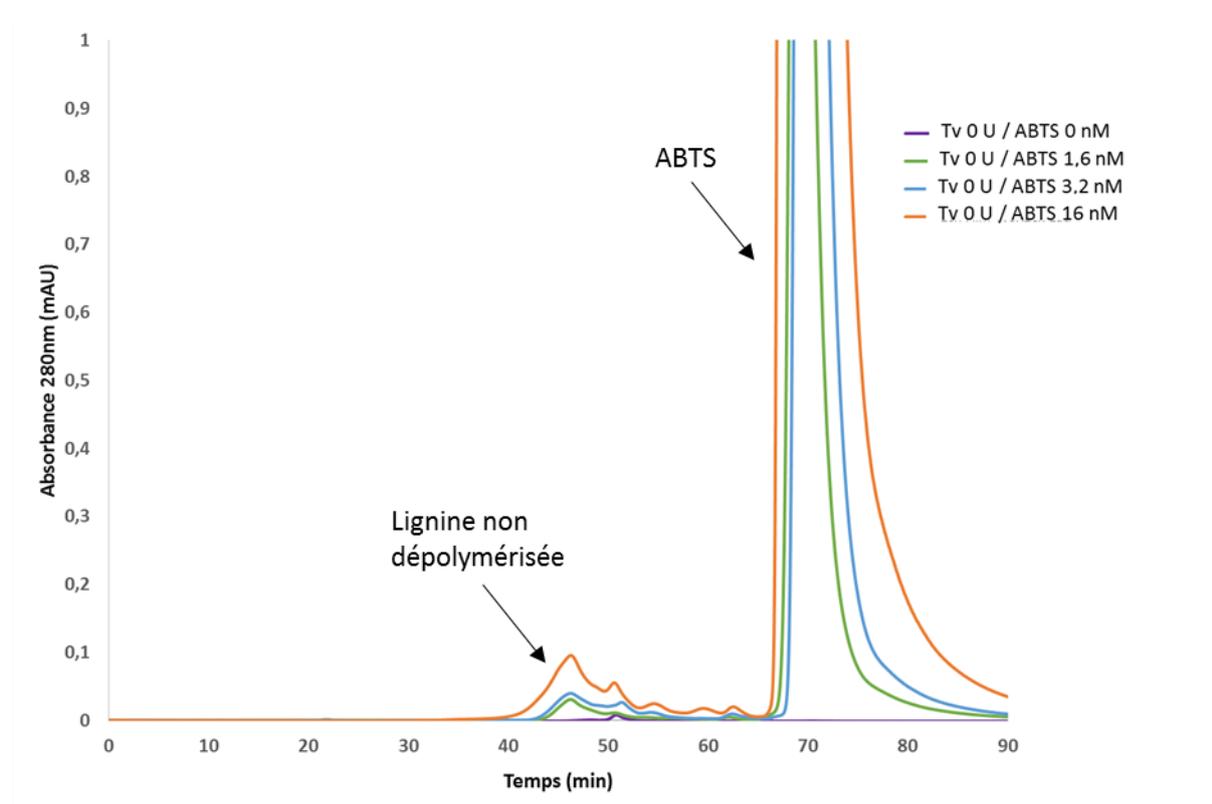


Figure 79 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6.

La Figure 80 présente les chromatogrammes GPC obtenus en absence d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans l'eau. En l'absence d'ABTS, nous n'observons pas de lignine non dépolymérisée sur le profil chromatographique (courbe violette). Cependant, en présence d'ABTS, la lignine (temps de rétention de 40 à 50 minutes) et l'ABTS (temps de rétention de 70 minutes) sont présents et plus la concentration en ABTS augmente plus l'intensité de la lignine et de l'ABTS augmente. L'intensité de la lignine passe de 0,05 mAU en présence de 1,6 nM d'ABTS à 0,1 mAU en présence de 16 nM d'ABTS. Ces résultats correspondent à ce qui a été observé en milieu liquide (Figure 68) : pas de pic correspondant aux produits de dépolymérisation. Comme énoncé précédemment, ceci est dû à l'ABTS sous sa forme non oxydée (en l'absence de laccase) qui provoque la déstabilisation physique du film (151). Ces résultats correspondent également à ce qui a été observé sur le film (Figure 74). En présence d'eau uniquement, le film n'a pas changé d'aspect, c'est-à-dire que l'eau seule ne resolubilise pas le film. Le film devient de plus en plus déstabilisé physiquement lorsque la concentration en ABTS augmente (couleur marron). Ceci semble confirmer que l'ABTS sous sa forme non oxydée provoque une déstabilisation physique du film et « décroche » la lignine non dépolymérisée.



La Figure 81 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 3 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans l'eau. En l'absence d'ABTS, la lignine est éluée avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes avec une faible intensité (0,05 mAU). En présence d'ABTS, les pics correspondants aux produits de dépolymérisation ainsi que celui correspondant à l'ABTS sont présents avec des temps de rétentions respectifs de 50, 65 et 75 minutes. Plus la concentration en ABTS augmente, plus l'intensité des pics de produits et d'ABTS augmentent (de 0,45 à 1 mAU et de 0,15 à 0,25 mAU pour les produits et de 0,6 à plus de 1 (saturation) mAU pour l'ABTS). Ces résultats correspondent à ce qui a été observé en milieu liquide (Figure 70) : présence des pics correspondant aux produits de dépolymérisation. Ces résultats correspondent également à ce qui est observé sur le film (Figure 74). Plus la concentration en ABTS augmente, plus l'épaisseur du film diminue (Tableau 7). Ce qui semble valider la fiabilité du biocapteur dans ces conditions (présence de 3 U de laccase). Ces résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes exprimant le pourcentage d'aire de la lignine et des produits issus de la décomposition des profils GPC (Figure 82). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 65,74 ; 64,17 et 65,82 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits de dépolymérisation 1, 2 et 3 ayant des temps de rétention de 50 minutes, 60 minutes et 70 minutes. Le produit 3 étant composé majoritairement d'ABTS.

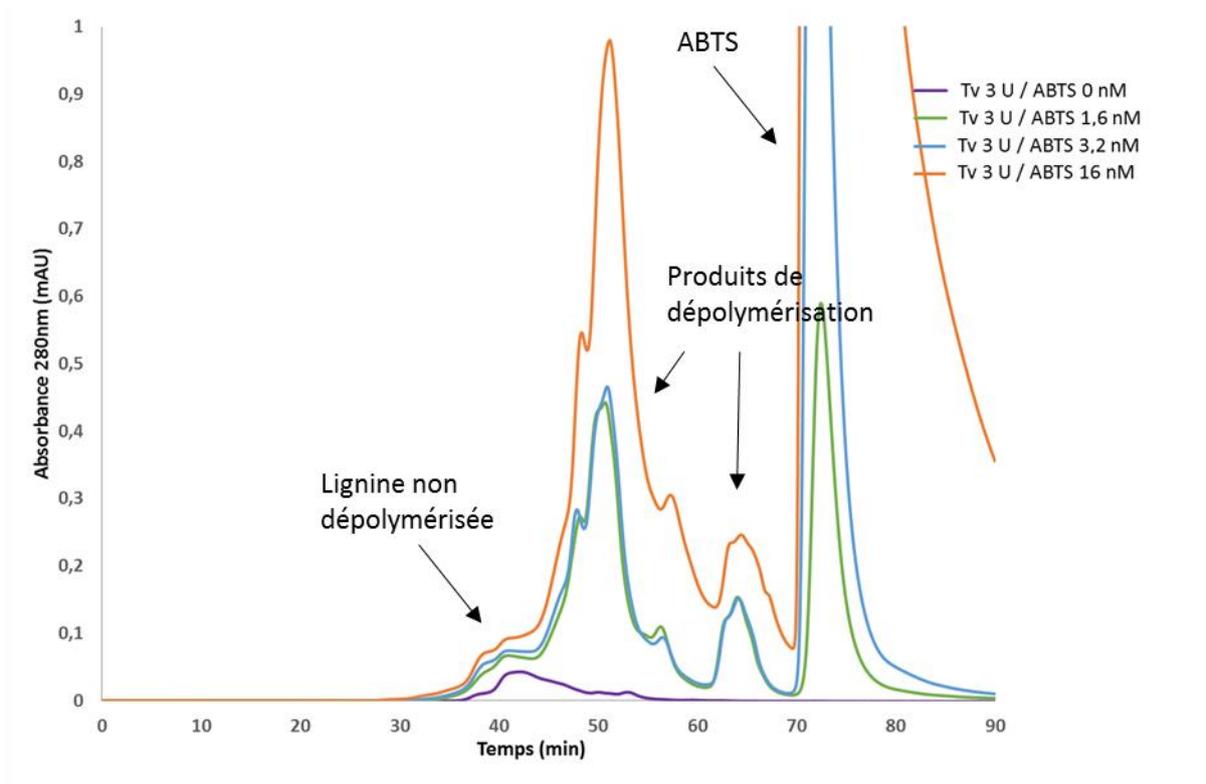


Figure 81 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase avec le film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

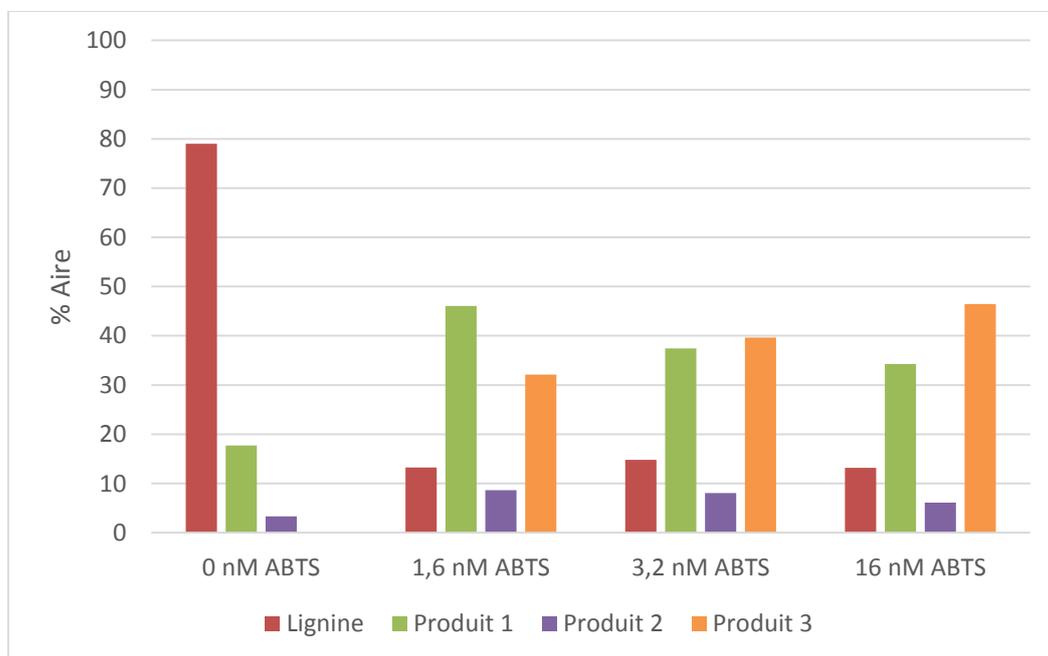


Figure 82 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

La Figure 83 présente les chromatogrammes GPC obtenus en présence de 15 U d'enzyme et en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS ou en son absence, le tout réalisé dans l'eau. En l'absence d'ABTS, la lignine est éluée avec un temps de rétention de 40 à 50 minutes et avec une intensité plus importante (0,2 mAU) que dans les conditions précédentes (0 U et 3 U d'enzyme). En présence d'ABTS, celui-ci n'est pas observé sur le profil chromatographique et les pics correspondant aux produits de dépolymérisation de la lignine sont observés avec des temps de rétention de 50 à 60 minutes ainsi que 65 à 70 minutes. Ces derniers sont présents de façon plus nombreuse (présence de plus d'épaulement et dédoublement des pics) par rapport aux autres conditions. L'intensité des pics est assez élevée (0,7 et 0,3 mAU). Ces résultats ne correspondent pas à ce qui a été observé en milieu liquide (Figure 72) : pas de pic correspondant aux produits de dépolymérisation. Ces résultats ne correspondent également pas à ce qui est observé sur le film (Figure 74). En effet, le film change totalement d'aspect à partir de 16 nM d'ABTS, une disparition totale du film est observée (observation de la couleur du wafer de silicium). Ceci ne permet pas de valider la fiabilité du biocapteur dans ces conditions (présence de 15 U de laccase), les produits de dépolymérisation aurait dû être présents uniquement dans les dernières conditions (16 nM d'ABTS). Ces résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes exprimant le pourcentage d'aire de la lignine et des produits issu de la décomposition des profils GPC (Figure 84). En effet, l'aire des pics de lignine diminue (diminution de 50,19 ; 51,22 et 47,01 % en présence de 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS respectivement) pour former les produits de dépolymérisation 1, 2 et 3 ayant des temps de rétention de 50 minutes, 60 minutes et 70 minutes.

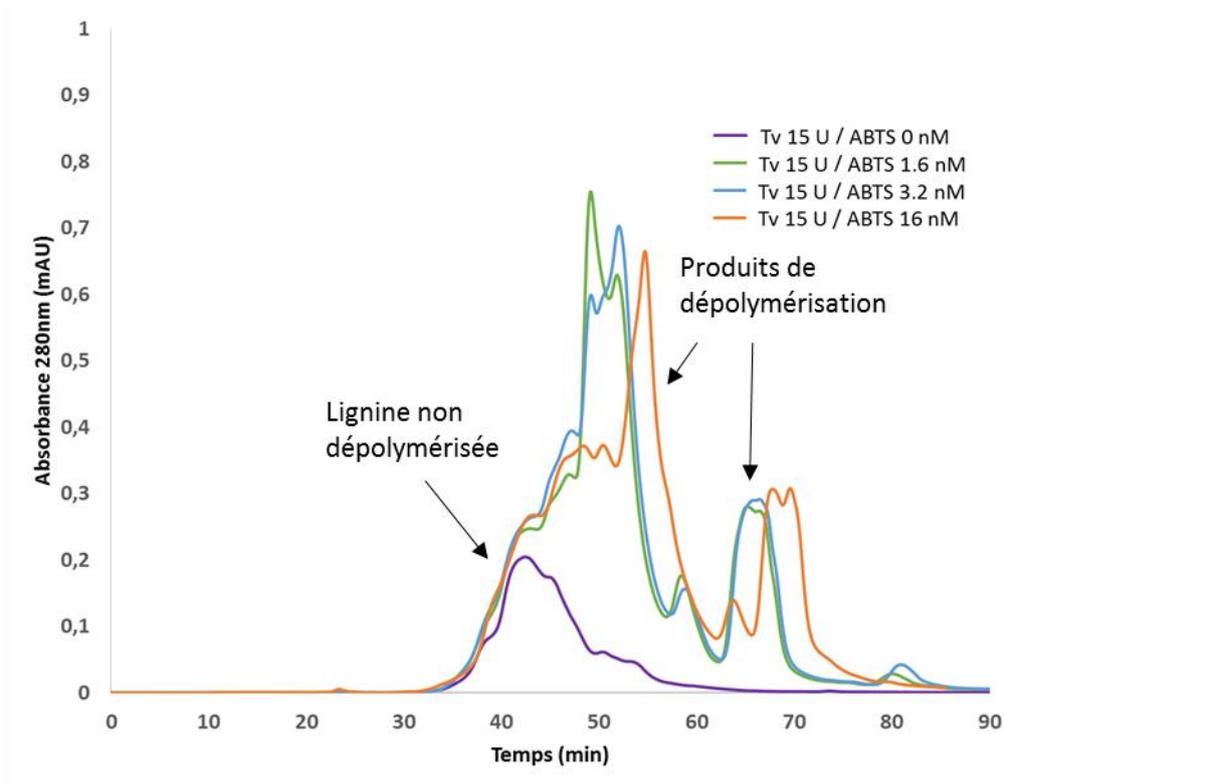


Figure 83 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase avec le film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.

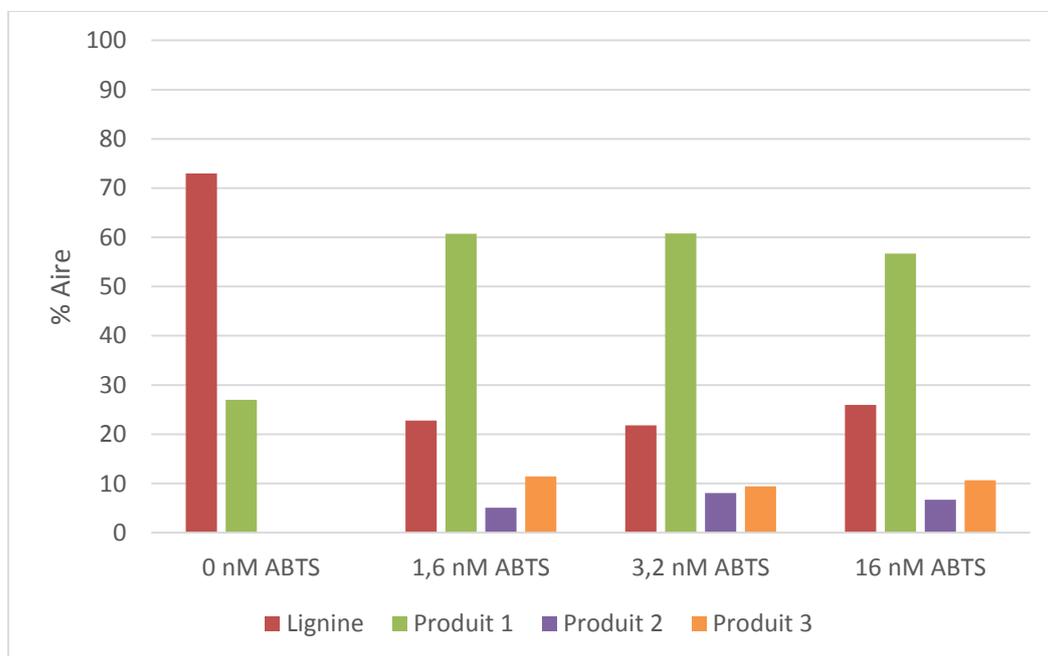


Figure 84 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau.

IV. 1. Conclusion - Discussion

L'objectif de ce deuxième chapitre a été d'étudier le développement de l'outil de criblage en milieu solide (lignines sous forme de films solides) qui permet de s'affranchir des contraintes liées à la dépolymérisation en milieu liquide. Pour cela, la méthodologie suivie a été tout d'abord de prouver la nécessité d'utiliser un médiateur (appelé le système laccase-médiateur) afin d'obtenir une dépolymérisation des lignines. Cette étude, réalisée sur les trois lignines en milieu liquide, a montré une dépolymérisation enzymatique avec l'utilisation de l'ABTS comme médiateur.

Ensuite, différentes conditions enzymatiques (avec l'ABTS comme médiateur) ont été étudiées dans le but de développer l'outil de criblage. En effet, ces différentes conditions ont été étudiées en milieu liquide et en milieu solide afin de pouvoir comparer les résultats obtenus et ainsi valider ou non l'outil de criblage. Ces études ont été réalisées sur la lignine Organosolv avec utilisation du 1,4-dioxane en milieu liquide (25 % de co-solvant) et en milieu solide. Les réactions enzymatiques ont été effectuées à 30°C pendant 5 jours en milieu liquide et 24 h en milieu solide en présence de 1,6 ; 3,2 ou 16 nM d'ABTS et de 3 U ou 15 U de laccase de *T. versicolor* ou en leur absence, le tout a été réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau. La Figure 74 montre les résultats visuels obtenus après réaction enzymatique en milieu solide. Après incubation, les solutions enzymatiques déposées sur le film de lignine ont été collectées avant rinçage et séchage du film et analysées en directement en GPC. Ces mêmes conditions enzymatiques (différentes concentration en ABTS et en laccase) ont été réalisées en parallèle en milieu liquide afin de comparer les résultats et de confirmer ou non la fiabilité de l'outil de criblage.

L'ensemble de ces résultats montrent tout d'abord qu'en absence d'enzyme et en absence d'ABTS le tampon seul déstabilise un peu physiquement le film solide alors que l'eau ne montre aucun changement visuel sur le film. En absence d'enzyme et en présence d'ABTS solubilisée dans le tampon acétate ou dans l'eau, le film solide est déstabilisé. Plus la concentration en ABTS augmente plus le film est déstabilisé physiquement. Les résultats GPC des solutions collectées du film et des réactions en milieu liquide ne montrent aucune dépolymérisation enzymatique. Comme énoncé lors de ce chapitre, ceci montre que les changements de couleur du film observés ne reflètent pas une dépolymérisation enzymatique mais une déstabilisation physique causée par l'ABTS présent sous sa forme non oxydée (non oxydée par l'enzyme).

Puis, lorsque l'ABTS et l'enzyme sont solubilisés dans le tampon acétate, en présence de 3 U d'enzyme, un léger changement de couleur du film est observé à partir de 16 nM d'ABTS. Les résultats GPC des solutions collectées du film après réaction montrent la présence de pics correspondants aux produits de réaction. L'intensité de ces pics est faible pour les réactions en présence de 1,6 et 3,2 nM d'ABTS et est plus importante pour la réaction en présence de 16 nM d'ABTS. Ces résultats sont donc similaires à ce qui est observé sur le film. Les résultats GPC des réactions en milieu liquide montrent des pics correspondants aux produits de dépolymérisation, ce qui ne correspond pas à ce qui est observé sur le film. En présence de 15 U d'enzyme, un changement de couleur du film est observé à partir de 16 nM d'ABTS. Les résultats GPC des solutions collectées du film après réaction et des réactions en milieu liquide montrent la présence de pics correspondant aux produits de réactions, ce qui ne correspond pas avec ce qui est observé sur le film.

Enfin, lorsque l'ABTS et l'enzyme sont solubilisés dans l'eau, une dépolymérisation enzymatique est observée. En présence de 3 U d'enzyme, plus la concentration en ABTS augmente, plus la dépolymérisation du film est importante. Les résultats GPC des solutions collectées du film après réaction et des réactions en milieu liquide confirment ces résultats. En présence de 15 U d'enzyme, une dépolymérisation enzymatique est observée à partir de 16 nM d'ABTS. Les résultats GPC des réactions en milieu liquide montrent plutôt une polymérisation de la lignine et non une dépolymérisation en absence d'ABTS. Aucune dépolymérisation n'est observée en présence de 1,6 et 3,2 nM d'ABTS. En présence de 16 nM d'ABTS, un pic de faible intensité correspondant à un produit de dépolymérisation est observé. Ce qui pourrait montrer qu'il y a dépolymérisation à partir de 16 nM d'ABTS et à plus faible concentration en ABTS il pourrait y avoir une compétition entre la polymérisation et la dépolymérisation enzymatique. Les résultats GPC des solutions collectées du film après réaction montre la présence de pics correspondant aux produits de dépolymérisation, ce qui ne correspond pas avec ce qui est observé sur le film. Une hypothèse pour expliquer ce résultat est que la dépolymérisation se fait dans la solution lorsqu'elle est présente sur le film ou dans le tube après collecte.

Lors de ce chapitre, il a été précisé que l'ABTS sous forme oxydée (en présence de laccase) permet la stabilisation du film de lignine donc ceci confirme qu'en présence d'enzyme, une dépolymérisation enzymatique est observée lorsque le film change d'aspect.

En prenant en compte l'ensemble des résultats obtenus ainsi que les hypothèses émises, l'outil de criblage paraît fiable dans le cas où l'enzyme et l'ABTS sont solubilisés dans l'eau. De plus, les résultats montrent que la réaction enzymatique pourrait être dépendante du ratio enzyme : médiateur. En effet, en présence de 3 U d'enzyme, une dépolymérisation importante est observée à partir de 3,2 nM d'ABTS, ce qui correspond à un ratio 1 : 1. Puis en présence de 15 U d'enzyme, une dépolymérisation importante est observée à partir de 16 nM, ce qui correspond également à un ratio 1 : 1.

Chapitre V : Vers un outil haut débit : impression jet d'encre

Après avoir déterminé les conditions permettant : (i) d'avoir un film solide de lignine sur un wafer de silicium, déposé par enduction centrifuge (ou spin-coating) qui remplit les exigences en termes de capacités filmogènes, de stabilité lors de l'incubation du film dans un bain d'eau, (ii) d'avoir une dépolymérisation par le système laccase-médiateur des lignines industrielles en phase liquide (lignine solubilisée dans un mélange eau/solvant) et en phase solide (lignine sous forme de film solide) ; le troisième objectif de la thèse a été d'étudier la conception d'un outil de criblage haut débit en réalisant des micro-dépôts solides de lignines par impression jet d'encre. La solution filmogène de lignine obtenue lors du chapitre IV (solution de Lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le 1,4-dioxane) a été développée dans le but d'obtenir une encre imprimable, avec des propriétés particulières (viscosité, pression de vapeur, tension de surface, absence d'agrégats, etc.). De plus l'obtention d'un dépôt par impression jet d'encre nécessite l'ajustement des paramètres d'impression ainsi que du support d'impression. Ce chapitre présente tout d'abord des généralités sur l'impression jet d'encre dans le but d'exposer les objectifs. Ensuite, les différents tests effectués qui ont permis d'obtenir les paramètres d'impression sont exposés. Puis, les résultats des tests enzymatiques sont montrés en passant par une étude visuelle et une analyse des dépôts par AFM (Atomic Force Microscopy).

Chapitre V. Vers un outil haut débit : impression jet d'encre	120
V. 1. Généralités sur l'impression jet d'encre	120
V. 2. Impression de micro-dépôts de lignines	124
V.2.1. Réglages des paramètres d'impression.....	124
V.2.2. Supports d'impression	125
V.2.3. Ajustement de l'encre	127
V.2.3.1. Utilisation de l'isopropanol comme co-solvant	127
V.2.3.2. Utilisation du DMSO comme co-solvant.....	129
V.2.4. Conclusion	131
V. 3. Tests enzymatiques	131
V.3.1. Etude visuelle après réaction enzymatique.....	131
V.3.2. Visualisation par AFM après réaction enzymatique.....	135
V. 4. Conclusion - Discussion	138

Chapitre V. Vers un outil haut débit : impression jet d'encre

V. 1. Généralités sur l'impression jet d'encre

L'outil de criblage développé dans le chapitre IV par utilisation de l'enduction centrifuge présente des limites telles que l'utilisation d'une grande quantité de solution de lignine (2 à 3 ml par wafer de silicium), les dépôts des solutions d'enzymes à la pipette assez long à effectuer (environ 1h par wafer de silicium), les fuites des solutions à travers le moule en silicone, etc. Mais surtout, cette méthode ne permet pas la quantification de la dépolymérisation enzymatique et ne permet pas l'obtention de film de lignine à grande échelle.

L'objectif de ce chapitre est d'améliorer l'outil de criblage, basé sur les résultats obtenus lors du chapitre IV, permettant d'aboutir à un outil de criblage haut débit. Une méthode de criblage haut débit appliquée à l'arabinoxylane a été développée précédemment par S. LAMANT (96) en utilisant la technologie d'impression jet d'encre (IJE). L'IJE permet l'impression de microdépôts de manière définie et localisée sur tout type de surface. En effet, une matrice d'impression est préalablement préparée à partir du logiciel CERASLICE. Pour cette application, des motifs d'une forme carrée ont été choisis afin de « mimer » la disposition des fonds de puits des plaque 96 puits (ou plus) souvent utilisée pour les criblages de molécules en liquide. Ce motif carré est réalisé par l'impression de micro-gouttes. Les microdépôts obtenus au séchage présentent des interférences optiques (observation au microscope) qui reflètent la différence d'épaisseur en leur sein, ceux-ci ayant la forme d'un dôme (Figure 85). La forme carrée des motifs permet un dépôt de l'enzyme plus localisé et évite ainsi les fuites des solutions à travers un moule. Lors de l'action enzymatique sur les micro-dépôts, leur épaisseur va diminuer et une différence d'interférence optique va être observée, ce qui permet une quantification de l'action enzymatique. Le volume des gouttes déposées est beaucoup plus faible (de l'ordre du picolitre) que celui déposé par spin-coating (2-3 ml). L'épaisseur du dépôt ainsi que la quantité de lignine déposée est alors plus faible, ce qui permet d'avoir un temps de réaction enzymatique plus court et une sensibilité de réaction plus importante. Cette méthode permet donc le dépôt rapide d'encres de lignines (30 minutes par plaques environ) ainsi que le dépôt de plusieurs encres de lignines différentes sur la même plaque. La matrice d'impression étant déterminée et précise, le dépôt de l'enzyme par un robot est envisageable. Cependant, l'IJE nécessite de développer des encres imprimables ayant des propriétés particulières (viscosité, pression de vapeur, tension de surface, absence d'agrégats, etc.).

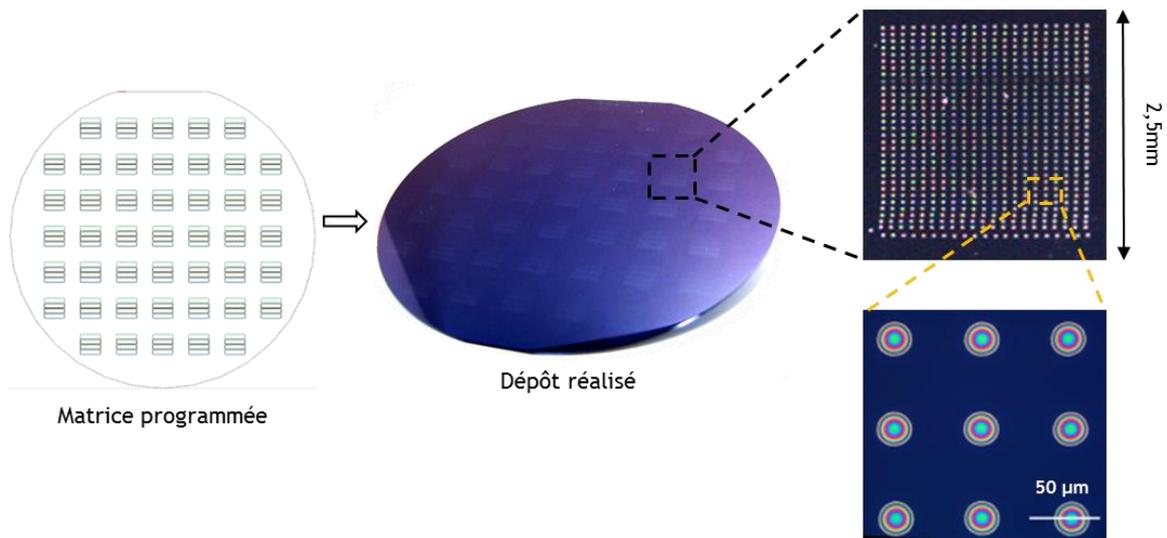


Figure 85 : Exemple d'arabinoxylane imprimée sur un support de silicium recouvert de C_4F_8 à partir d'une matrice programmée et résultats observés au microscope (96).

L'obtention d'un dépôt par le biais de l'IJE passe par différentes étapes présentées en Figure 86: Dans le cas idéal, l'actionnement de la buse d'impression permet tout d'abord l'éjection de l'encre, ensuite une goutte unique est formée. Lors de l'impact avec le support d'impression, cette goutte va s'étaler puis se rééquilibrer et reformer une goutte ayant une surface de contact plus ou moins grande avec le support d'impression. Un dépôt solide est obtenu après évaporation du solvant par chauffage ou par séchage à l'air libre.

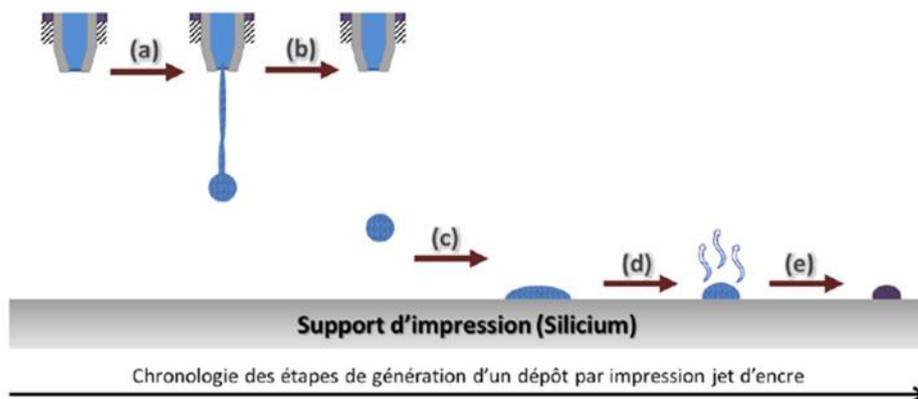


Figure 86 : Les différentes étapes d'un dépôt par impression jet d'encre (96).

Afin d'obtenir ce résultat à chaque étape et de produire des micro-dépôts de lignines, il est nécessaire de prendre en compte et de contrôler un certain nombre de paramètres. Ces paramètres sont les suivants :

La buse d'impression

Les buses d'impression utilisées lors de cette thèse sont des monobuses de 20 ou 35 μm de diamètre provenant de la société MicroFab. Le liquide passe à travers la buse d'impression par un tube capillaire en quartz (diamètre allant de 20 à 80 μm disponible avec MicroFab), entouré d'un élément piézoélectrique (PZT) permettant l'actionnement de l'éjection. Ces éléments sont présentés dans un boîtier de protection permettant l'alimentation de la buse en liquide par une connectique fluïdique, la sortie du liquide par un orifice d'éjection ainsi que la sortie des câbles d'alimentation PZT reliés à un connecteur électrique (Figure 87). En général, plus le diamètre de la buse est important, plus les gouttes produites auront un volume important et plus la surface d'étalement lors de l'impact de la goutte sera grande. Il est donc nécessaire de régler la distance inter-goutte en fonction du diamètre de buse choisi afin d'éviter la coalescence des gouttes entre elles lors de l'impression. A l'inverse, plus le diamètre de la buse est petit, plus les gouttes produites auront un petit volume. Dans ce dernier cas, il y a un risque de boucher la buse par des agrégats ou de ne pas pouvoir éjecter un liquide trop visqueux.

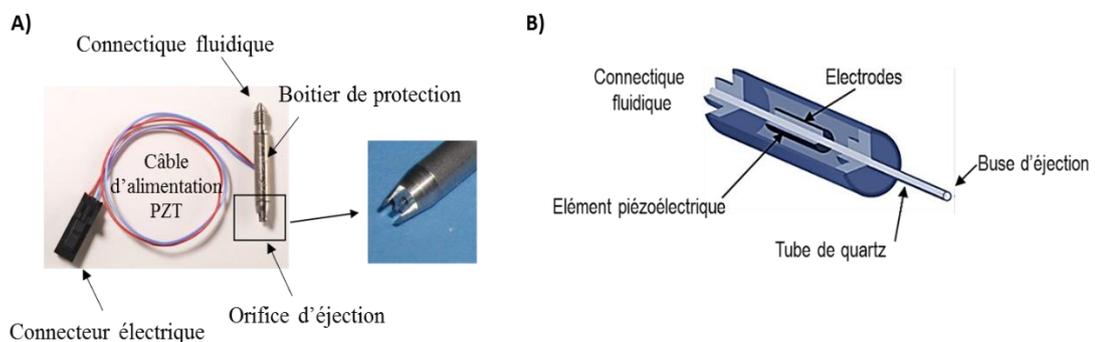


Figure 87 : A) Photographie et B) schéma de la buse d'impression. (PZT : piézoélectrique).

La viscosité de l'encre

La viscosité de l'encre est un paramètre important pour la formation de la goutte. Une encre peu visqueuse n'est pas retenue dans le capillaire de la buse et va donc couler sans que l'élément PZT n'ait été actionné par exemple. A l'inverse, l'élément PZT ne permet pas l'éjection d'une encre trop visqueuse. L'encre ayant une viscosité importante peut être éjectée mais former un filament sans jamais produire de goutte. Ce qui rend les dépôts non répétables et souvent sous forme de lignes, coulures et surtout, non uniformes. Le Tableau 8 présente les données de viscosité des principaux solvants utilisés lors de cette thèse.

Tableau 8 : Représentation des données de viscosité, de pression de vapeur ainsi que de tension de surface des principaux solvants utilisés lors de cette thèse. (Données de tension de surface : <http://www.surface-tension.de/> ; données de viscosité et de pression de vapeur : Wikipédia).

	Viscosité (cP ou mPa.s)	Pression de vapeur (mbar)	Tension de surface (mN/m à 20°C)
Eau	1,002 à 20°C 0,890 à 25°C	23,4 à 20°C 31,7 à 25°C	72,80
Ethanol	1,200 à 20°C 1,250 à 25°C	50 à 20°C	22,39
THF	0,456 à 20°C 0,480 à 25°C	176 à 20°C	26,40
1,4-dioxane	1,177 à 25°C	38 à 20°C	33
DMSO	1,996 à 20°C 2,000 à 25°C	0,8 à 20°C	43,54
Isopropanol	2,370 à 20°C	44 à 20°C	23

Le solvant de l'encre

Les solvants présentent des propriétés de tension de surface et de pression de vapeur différentes. En fonction de ces paramètres, les solutions auront une surface d'étalement sur le support d'impression plus ou moins importante ainsi qu'une évaporation plus ou moins rapide. Le Tableau 8 présente les données de tension de surface et de pression de vapeur des principaux solvants utilisés lors de cette thèse. Le DMSO est assez visqueux et possède une pression de vapeur très faible, il est donc un très bon candidat pour être utilisé en tant que co-solvant.

Le support d'impression

Le support d'impression est un élément important lors de l'impact de la goutte. En premier lieu, il doit être propre et peu rugueux. Ensuite, plus l'énergie de surface du support ou du revêtement est grande devant celle du liquide déposé, plus le liquide a tendance à s'étaler, on dit qu'il est mouillable, son angle de contact est faible.

V. 2. Impression de micro-dépôts de lignines

Cette partie est destinée à déterminer les paramètres d'impression (distance intergoutte et splat), supports d'impression (mouillabilité, hydrophobie), solvant et co-solvant de l'encre (viscosité, pression de vapeur, tension de surface, etc.) pour répondre aux exigences expliquées précédemment.

Lors du développement de l'outil de criblage sur films créés par dépôt en spin-coating (Chapitre IV.), les tests enzymatiques ont été effectués sur des films obtenus à partir de solutions de Lignine Organosolv à 25 g/l dans le 1,4-dioxane. Les tests d'impression ont donc été effectués avec cette solution comme base pour le développement de l'encre.

V.2.1. Réglages des paramètres d'impression

Dans un premier temps, l'objectif était de régler les paramètres d'impression permettant d'éviter une coalescence entre chaque goutte. Les paramètres à ajuster sont la distance intergoutte et le « splat » (étalement). Ces tests d'impression ont été effectués avec l'encre de Lignine Organosolv à 25g/l en solution dans le 1,4-dioxane sur un wafer de silicium brut préalablement rincé à l'acétone et à l'isopropanol puis séché.

Avec un « splat » de 50 μm et une distance intergoutte de 80 μm , toutes les gouttes ont coalescé entre elles (Figure 88). Le dépôt n'a pas la forme d'un dôme, le solvant paraît s'être évaporé au centre et ne laisser un dépôt solide uniquement sur l'extérieur de la goutte, ceci est appelé l'effet tâche de café (Figure 88 A). Un « splat » de 70 μm et une distance intergoutte de 100 μm permet d'obtenir des lignes avec des gouttes qui n'ont pas coalescé entre elles, et un peu moins entre les colonnes (Figure 88 B). Des dépôts bien distincts ont été obtenus avec une distance intergoutte et un « splat » plus importants, 80 μm et 150 μm , respectivement. En effet, les colonnes et les lignes n'ont pas coalescé entre elles mais le dépôt solide à l'aspect d'un

« O ». Le solvant s'est évaporé et la matière solide s'est répartie sur les bords de la goutte (effet tâche de café) (Figure 89).

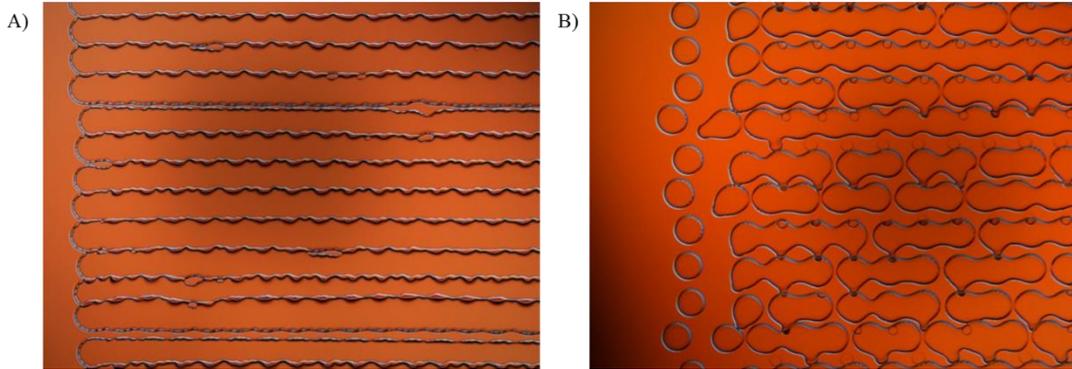


Figure 88 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** sur un wafer de **silicium brut**. Les gouttes déposées ont un splat de 50 µm (A) et de 70 µm (B) et une distance intergoutte de 80 µm (A) et de 100 µm (B).

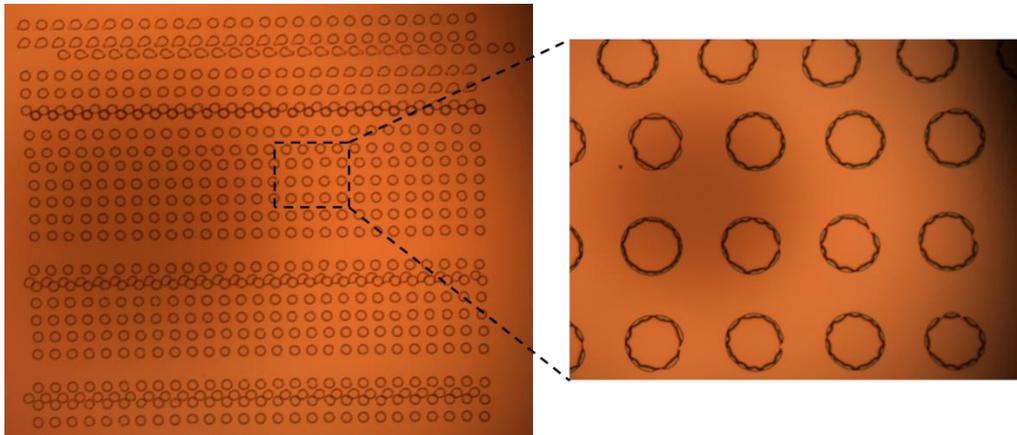


Figure 89 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** sur un wafer de **silicium brut**. Les gouttes déposées ont un splat de 80 µm et une distance intergoutte de 150 µm.

V.2.2. Supports d'impression

Comme énoncé précédemment, le support d'impression est un élément important lors de l'impact de la goutte. De ce fait, le deuxième objectif était de tester différents supports d'impression. Des revêtements différents à tendance plus ou moins hydrophobe ont été réalisés sur des wafers de silicium : le C_4F_8 et le PFTS. Le changement d'hydrophobie du support d'impression pourrait permettre d'obtenir un dépôt solide complet sous forme de dôme et de visualiser des interférences optiques. Ces tests d'impression ont été effectués avec l'encre de Lignine Organosolv à 25g/l en solution dans le 1,4-dioxane sur des wafers de silicium recouverts de différents revêtements, avec une distance intergoutte de 150 µm et un « splat » de 80 µm.

Les résultats obtenus sur un wafer de silicium brut ont été présentés en Figure 89. Sur un wafer de silicium recouvert de PFTS, la matière solide s'est également répartie sur les bords de la goutte mais des petites interférences optiques sont observées (Figure 90). Sur un wafer de silicium recouvert de C_4F_8 , les interférences sont plus marquées mais les dépôts ne sont pas complets. Ils ont un aspect de demi-lune ou de « I » (Figure 91). Ceci signifie que le solvant des gouttes déposées ne s'évapore pas de façon uniforme pour former un dépôt en forme de dôme donc un ajustement de la composition de l'encre est nécessaire.

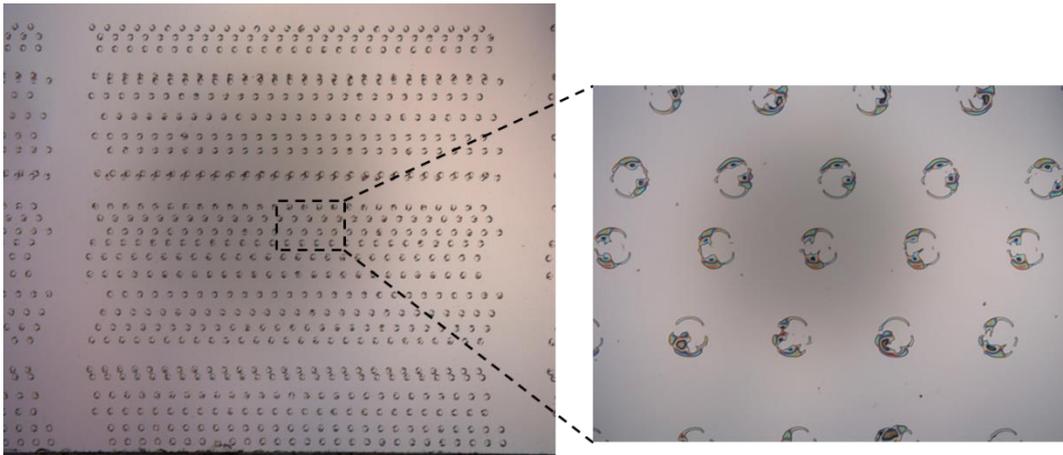


Figure 90 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4-dioxane sur un wafer de silicium recouvert de PFTS. Les gouttes déposées ont un *splat* de 80 μm et une *distance intergoutte* de 150 μm .

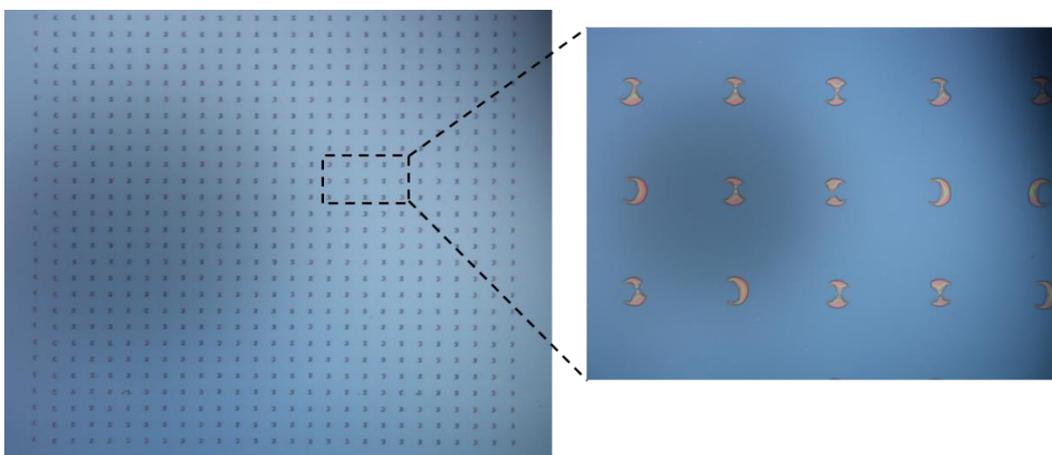


Figure 91 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4-dioxane sur un wafer de silicium recouvert de C_4F_8 . Les gouttes déposées ont un *splat* de 80 μm et une *distance intergoutte* de 150 μm .

V.2.3. Ajustement de l'encre

Enfin, un ajustement de l'encre a été effectué en utilisant des co-solvants dans l'objectif d'améliorer l'évaporation du solvant pour éviter l'effet tâche de café et ainsi obtenir des micro-dépôts en forme de dôme (avec la matière bien répartie). Ces tests d'impression ont été réalisés avec l'encre de Lignine Organosolv à 25 g/l en solution dans le 1,4-dioxane sur des wafers de silicium bruts ou recouverts des différents revêtements montrés précédemment (PFTS et C₄F₈) ainsi que le TMSPMA, avec une distance intergoutte de 150 µm et un « splat » de 80 µm. Tout d'abord, l'isopropanol a été testé. Comme énoncé au Tableau 8, il possède une viscosité et une pression de vapeur plus importante que le 1,4-dioxane et une tension de surface moins importante, ce qui fait de ce solvant un bon candidat en tant que co-solvant. Puis le DMSO, ayant une viscosité et une tension de surface plus importante que le 1,4-dioxane mais surtout une pression de vapeur beaucoup plus faible, faisant de ce solvant un très bon candidat en tant que co-solvant, a été testé. L'isopropanol et le DMSO ont été introduits à 10 % (v/v).

V.2.3.1. Utilisation de l'isopropanol comme co-solvant

La Figure 92 montre les résultats obtenus sur un wafer de silicium brut. L'aspect du dépôt est similaire à celui obtenu sur silicium brut sans utilisation de co-solvant (Figure 89). Le solvant s'est évaporé et la matière solide s'est répartie sur les bords de la goutte pour donner un aspect en forme de « O ». Sur un wafer recouvert de PFTS (Figure 93), le dépôt est un peu plus complet avec de légères interférences. Cependant, le centre montre une couleur assez homogène et semble avoir une épaisseur plus petite qui montrerait une légère évaporation du solvant et une répartition de la matière sur les bords du dépôt. Sur un wafer recouvert de C₄F₈ (Figure 94), deux types de dépôts sont obtenus. Tout d'abord des dépôts ayant un aspect en demi-lune, comme observés précédemment sur silicium recouvert de C₄F₈ sans utilisation de co-solvant (Figure 91) ainsi que des dépôts similaires à ceux observés sur wafer de silicium recouvert de PFTS avec utilisation de 10 % d'isopropanol (Figure 93) montrant des interférences sur les bords du dépôt et une couleur plus uniforme au centre, qui semble montrer une plus petite épaisseur au centre.

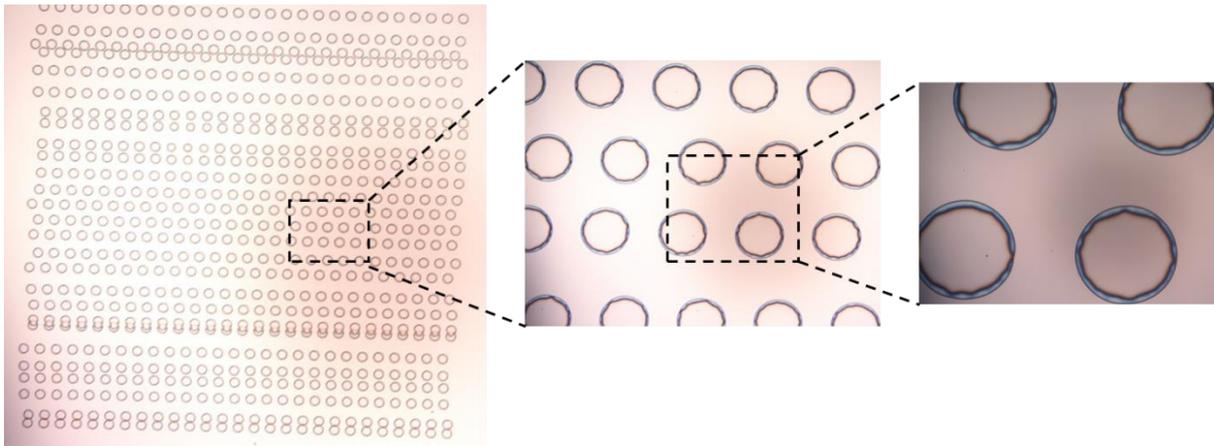


Figure 92 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4-dioxane et 10% d'isopropanol sur un wafer de silicium brut. Les gouttes déposées ont un splat de 80 μm et une distance intergoutte de 150 μm .

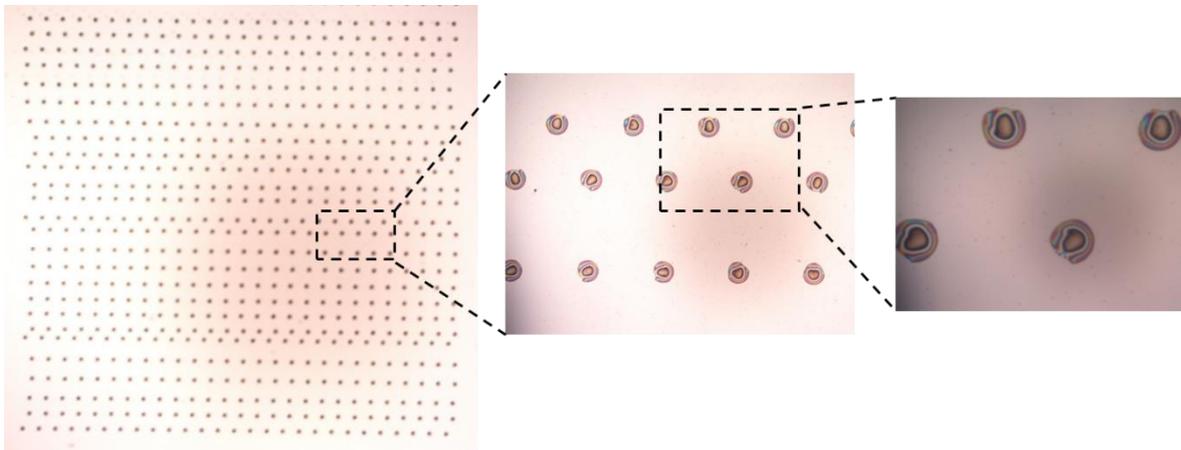


Figure 93 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4-dioxane et 10% d'isopropanol sur un wafer de silicium recouvert de PFTS. Les gouttes déposées ont un splat de 80 μm et une distance intergoutte de 150 μm .

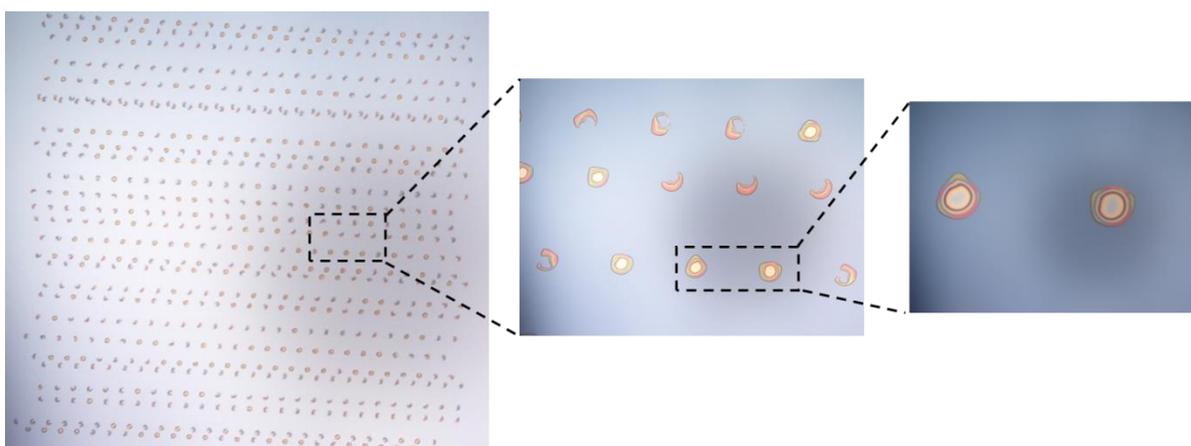


Figure 94 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4-dioxane et 10% d'isopropanol sur un wafer de silicium recouvert de C_4F_8 . Les gouttes déposées ont un splat de 80 μm et une distance intergoutte de 150 μm .

V.2.3.2. Utilisation du DMSO comme co-solvant

La Figure 95 montre les résultats obtenus sur silicium brut. Les dépôts sont de couleur marron et sont totalement étalés. Le solvant ne s'est pas évaporé mais le support d'impression semble avoir une mouillabilité trop importante. Sur un wafer recouvert de PFTS (Figure 96), les dépôts montrent des interférences optiques avec un centre de couleur bleue. Cet aspect est assez proche de ce qui est attendu, en comparaison avec les résultats obtenus par S. LAMANT avec des dépôts d'arabinoxylane (Figure 85). Sur un wafer recouvert de C_4F_8 (Figure 97) les dépôts sont moins étalés que sur la surface de PFTS et présentent plus d'interférences. Les résultats avec cette encre étant très concluants sur wafer recouverts de revêtement par rapport aux résultats obtenus sur wafer de silicium brut, un troisième revêtement a été testé : le TMSPMA (Figure 98). Les dépôts obtenus montrent peu d'interférences, avec un centre bleu. Ces dépôts sont corrects mais moins satisfaisant qu'avec le PFTS et le C_4F_8 .

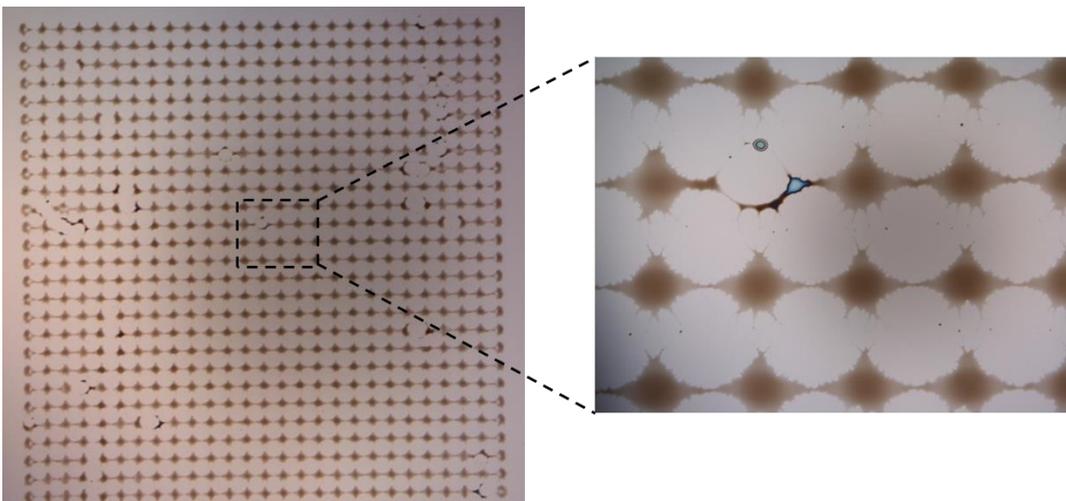


Figure 95 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% de DMSO** sur un wafer de **silicium brut**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 µm** et une **distance intergoutte de 150 µm**.

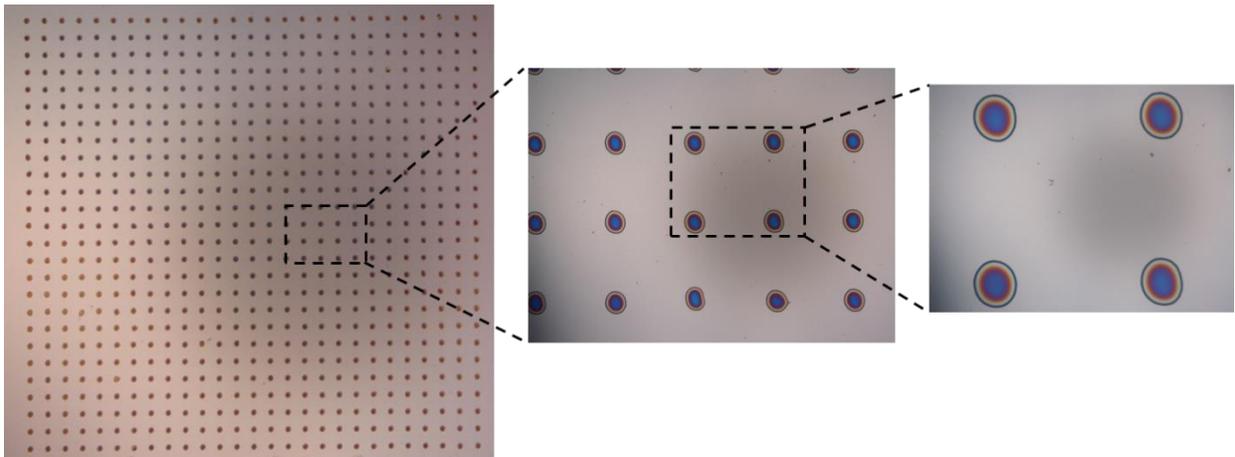


Figure 96 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4- dioxane et 10% de DMSO sur un wafer de silicium recouvert de PFTS. Les gouttes déposées ont un splot de 80 μm et une distance intergoutte de 150 μm .

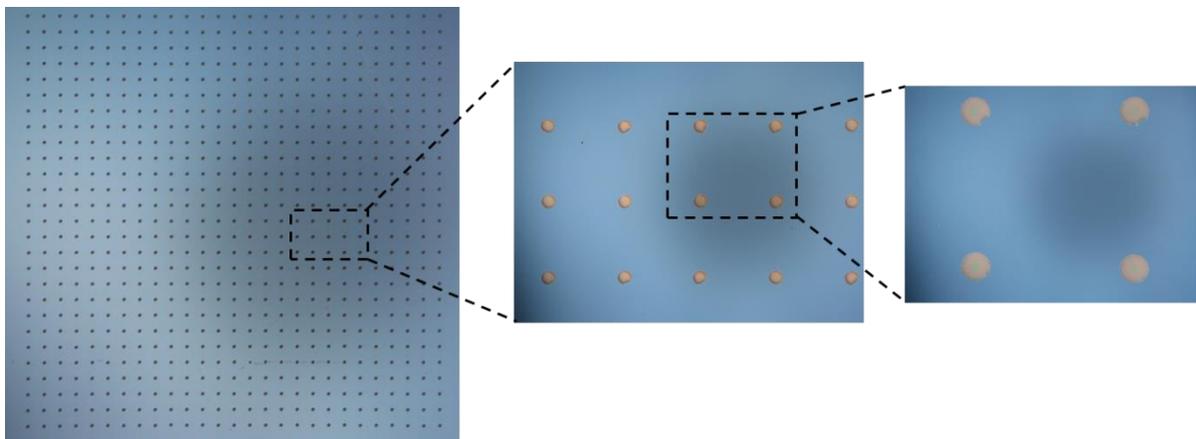


Figure 97: Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4-dioxane et 10% de DMSO sur un wafer de silicium recouvert de C_4F_8 . Les gouttes déposées ont un splot de 80 μm et une distance intergoutte de 150 μm .

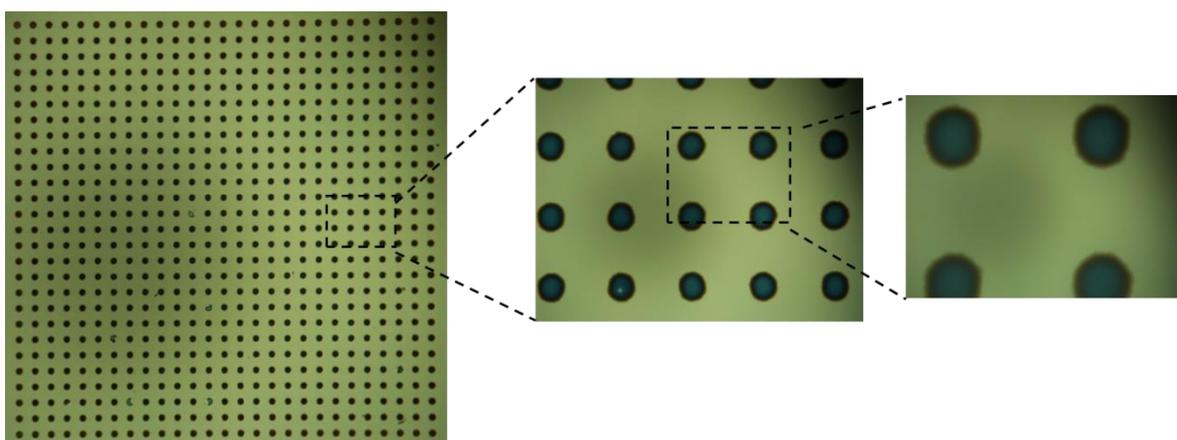


Figure 98 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine *Organosolv* à 25 g/L solubilisée dans le 1,4-dioxane et 10% de DMSO sur un wafer de silicium recouvert de TMSPMA. Les gouttes déposées ont un splot de 80 μm et une distance intergoutte de 150 μm .

V.2.4. Conclusion

La base de l'encre, développée pour l'impression jet d'encre, a été choisie en fonction des résultats obtenus lors du chapitre IV. Les films solides ont été effectués à partir de solutions de Lignine Organosolv à 25 g/l dans le 1,4-dioxane. Puis différents tests ont été réalisés afin de définir les paramètres d'impression permettant l'obtention de dépôts solides présentant des interférences optiques. Les paramètres d'impression choisis sont les suivants :

- Une distance intergoutte de 150 μm et un « splat » de 80 μm permettant d'avoir des dépôts bien distincts, qui n'ont pas coalescé.
- Un co-solvant a été nécessaire afin d'éviter une évaporation trop rapide du 1,4-dioxane et ainsi obtenir un dépôt complet. Le DMSO a été ajouté à la solution (10 % v/v). En effet, c'est un solvant qui possède une pression de vapeur très faible et une viscosité plus élevée, permettant ainsi de limiter l'évaporation rapide observée avec le 1,4-dioxane seul.
- Un revêtement sur le silicium a été nécessaire pour changer la mouillabilité du support. Ainsi, des micro-dépôts solides en forme de dôme et présentant des interférences ont été obtenus sur du silicium recouvert de PFTS ou de C_4F_8 , avec des résultats plus satisfaisants avec le C_4F_8 .

V. 3. Tests enzymatiques

V.3.1. Etude visuelle après réaction enzymatique

Les tests enzymatiques ont été effectués sur des plaques réalisées avec les paramètres d'IJE définis dans la partie précédente :

- Lignine Organosolv à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de **PFTS**.
- Lignine Organosolv à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de **C₄F₈**.

Les Tableau 9 et

Tableau 10 montrent les résultats visuels de dépolymérisation enzymatique obtenus (observation au microscope) sur ces films après une exposition de 18h à 3 U ou 15 U de laccase de *Trametes versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau déionisée ainsi qu'en absence d'enzyme (tampon acétate pH 4,6 ou l'eau seuls). Les micro-dépôts solides obtenus par impression jet d'encre (IJE) étant beaucoup plus fins et plus petits que ceux obtenus par induction centrifuge, une hypothèse est que la laccase serait capable d'agir seule sur le dépôt de lignine, sans l'intervention d'un médiateur comme l'ABTS. C'est pourquoi les tests enzymatiques sur les micro-dépôts obtenus par IJE ont été effectués en utilisant différentes quantités d'enzyme, sans la présence d'ABTS.

Le Tableau 9 montre les résultats obtenus avec le film de Lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de **PFTS**. La présence de l'eau ou du tampon acétate pH 4,6 seul (0 U d'enzyme) modifie l'aspect du dépôt. Les interférences ont changé de couleur, le centre est passé du bleu au violet. En présence de 3 U d'enzyme solubilisée dans le tampon acétate, le nombre d'interférences a diminué et le centre du dépôt est bleu foncé. En présence de 15 U d'enzyme solubilisée dans le tampon acétate la couleur de centre est bleue claire. En présence de 3 U et de 15 U d'enzyme, l'aspect de tous les micro-dépôts du carré a changé, l'action de la laccase n'est pas visible.

Le

Tableau 10 montre les résultats obtenus avec le film de Lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de C₄F₈. La présence du tampon acétate seul ne modifie pas l'aspect du film alors qu'en présence d'eau seule, le film a énormément changé d'aspect, il devient jaune/vert et se décolle au niveau de certains dépôts. Cependant, en présence de 3 U et de 15 U de laccase solubilisée dans l'eau, l'aspect du film n'a pas changé. En présence de 3 U d'enzyme solubilisée dans le tampon acétate la couleur des interférences a changé (jaune/orange à l'extérieur et bleue au centre), puis, en présence de 15 U de laccase la couleur a d'avantage changée (présence d'interférences jaune/orange à l'extérieur puis rouge dans une zone intermédiaire puis bleue au centre).

Remarque : Les dépôts après incubation enzymatique ont un aspect craquelé. Ceci est dû au stockage du film (température trop importante), les photos ont été prises après ce problème.

Tableau 9 : Photographies des dépôts solides obtenus par **impression jet d'encre** à partir d'un encre de **Lignine Organosolv** à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de **PFTS** avant et après une exposition de 18h à **3 U ou 15 U de laccase de *T. versicolor*** réalisée dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau ou en absence d'enzyme (tampon acétate pH 4,6 ou EDI seuls).

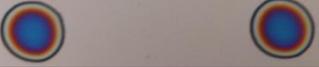
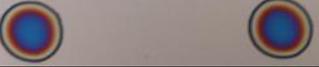
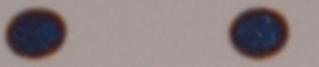
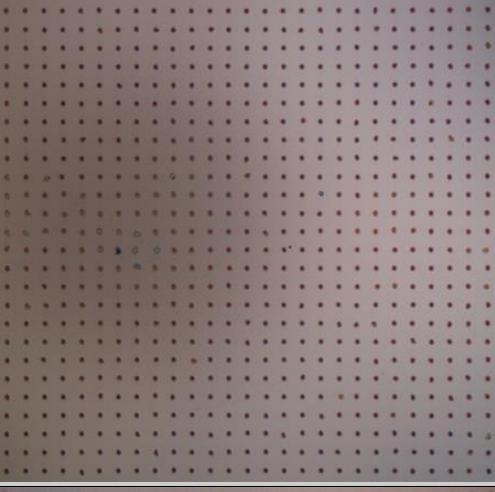
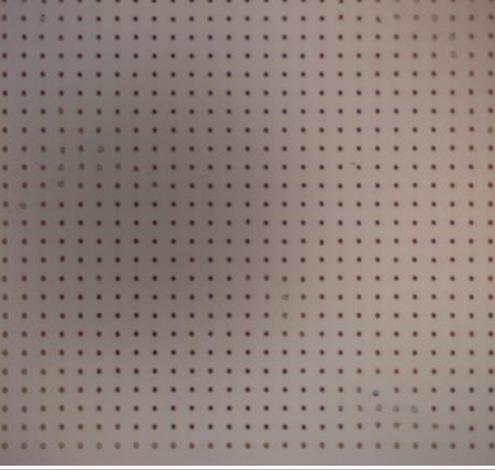
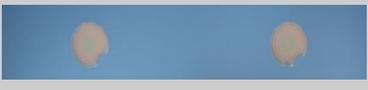
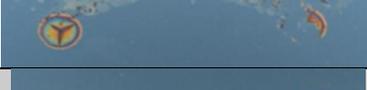
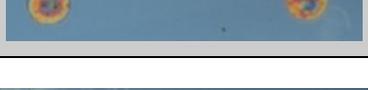
		Tampon acétate pH 4,6	Eau
Laccase issue de <i>Trametes versicolor</i>	Avant dépolymérisation		
	0 U		
	3 U		
	15 U		

Tableau 10: Photographies des dépôts solides obtenus par **impression jet d'encre** à partir d'une encre de **Lignine Organosolv** à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de C_4F_8 avant et après une exposition de 18h à **3 U ou 15 U de laccase** de *T. versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau ou en absence d'enzyme (tampon acétate pH 4,6 ou EDI seuls).

		Tampon acétate pH 4,6	Eau
Avant dépolymérisation			
Enzyme issue de <i>Trametes versicolor</i>	0 U		
	3 U		
	15 U		

En conclusion de ces résultats visuels d'études enzymatiques sur des dépôts de lignines réalisés par impression jet d'encre, il semblerait que la laccase permet un changement d'aspect du dépôt imprimé sur un wafer de silicium recouvert de PFTS ou de C_4F_8 . Ce changement est plus important quand la quantité d'enzyme augmente et lorsqu'elle est solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6. Cependant les résultats sont meilleurs avec l'IJE réalisée sur un wafer de silicium recouvert de C_4F_8 , c'est pourquoi ces dépôts ont été analysés par AFM.

V.3.2. Visualisation par AFM après réaction enzymatique

Une analyse AFM a été effectuée sur les dépôts obtenus par impression jet d'encre à partir d'une encre de Lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de C_4F_8 avant et après une exposition de 18h au tampon acétate seul et à 3 U et 15 U d'enzyme solubilisée dans le tampon. Cette analyse permet une visualisation en trois dimensions du dépôt et une mesure de son épaisseur et de sa largeur, la dépolymérisation du dépôt par l'enzyme est alors confirmé ou non par le biais de cette méthode.

Comme attendu lors de l'expression des objectifs dans la partie V. 1, les micro-dépôts ont bien l'aspect d'un dôme, la composition de l'encre développée est alors validée, elle permet l'obtention de dépôts corrects sur un support de silicium recouvert de C_4F_8 (Figure 99, Figure 100 et Figure 101). Avant exposition à l'enzyme ou au tampon, l'épaisseur des micro-dépôts a une valeur comprise entre 700 et 800 nm. Après exposition au tampon seul (Figure 99), à 3 U

d'enzyme (Figure 100) et à 15 U d'enzyme (Figure 101) les épaisseurs observées par AFM sont de 400 nm, 350 nm et 370 nm, respectivement. Lorsque le dépôt est exposé à l'enzyme, l'épaisseur est divisée par deux alors que l'aspect visuel montre les mêmes interférences après exposition au tampon seul et des interférences totalement différentes après exposition à la laccase. Ces mesures AFM ne valident donc pas le fait que la laccase puisse dépolymériser seule un dépôt de lignine réalisé par impression jet d'encre.

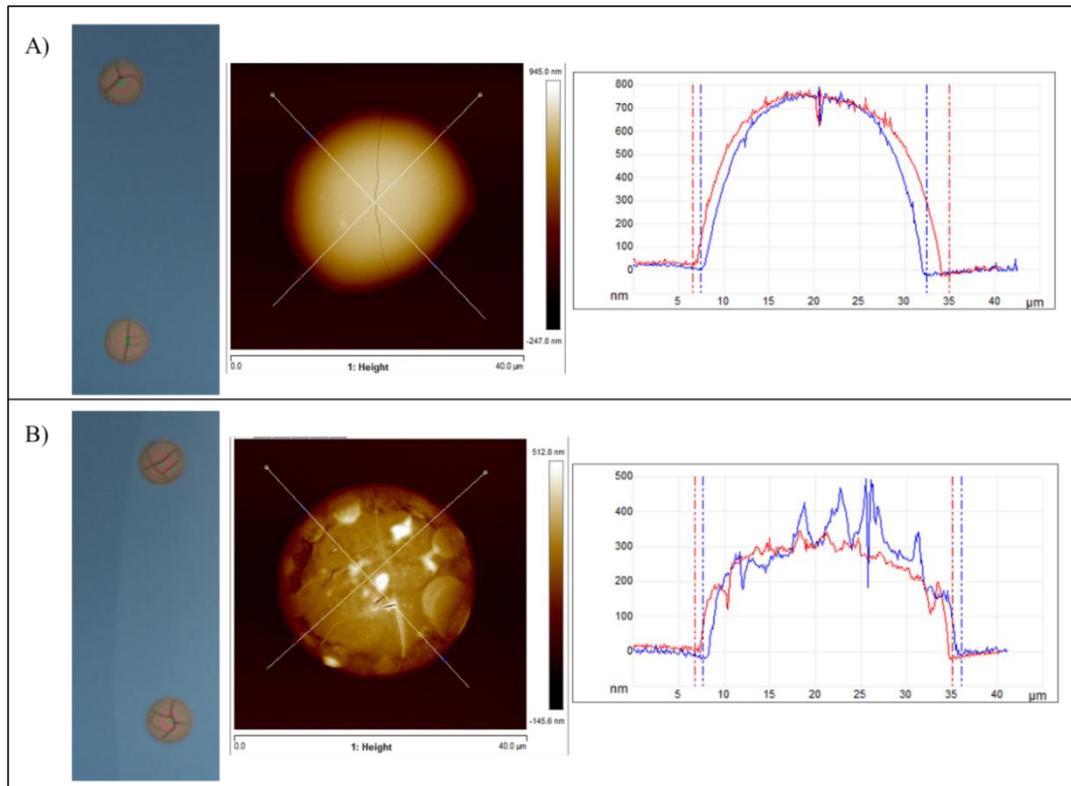


Figure 99 : Observation AFM des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'une encre de Lignine Organosolv à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de C_4F_8A avant et B) après une exposition de 18h au tampon acétate pH 4,6 seul.

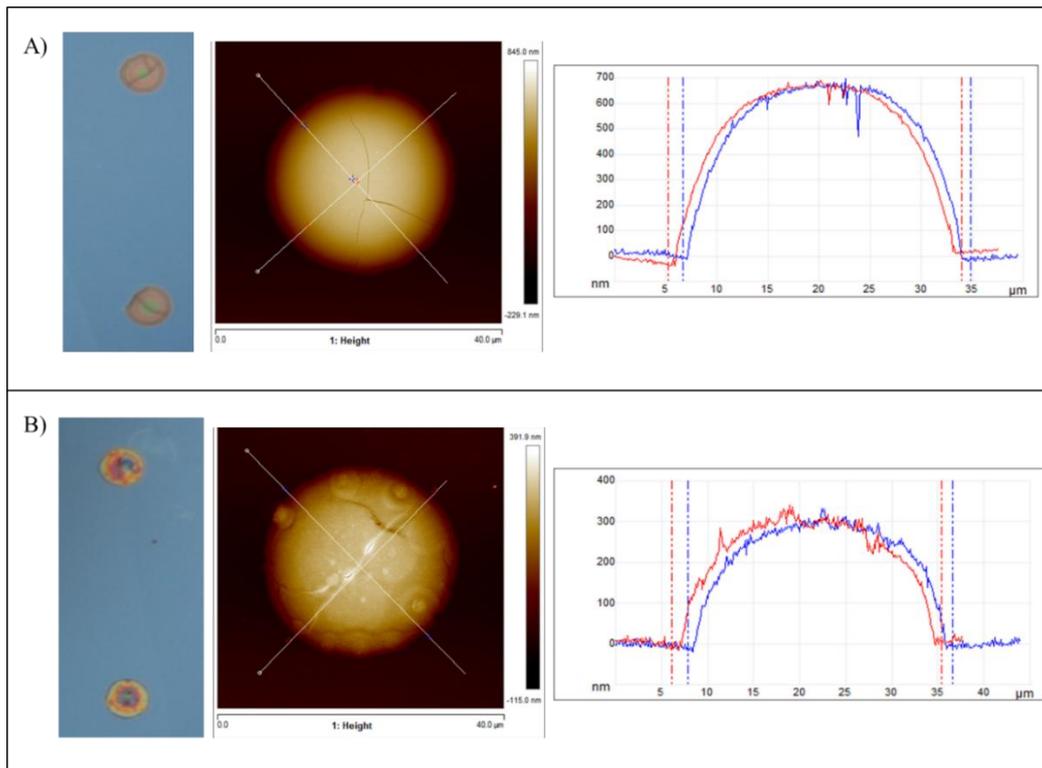


Figure 100 : Observation AFM des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'une encre de Lignine Organosolv à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de C_4F_8A avant et B) après une exposition de 18h à 3 U de laccase de *T. versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6.

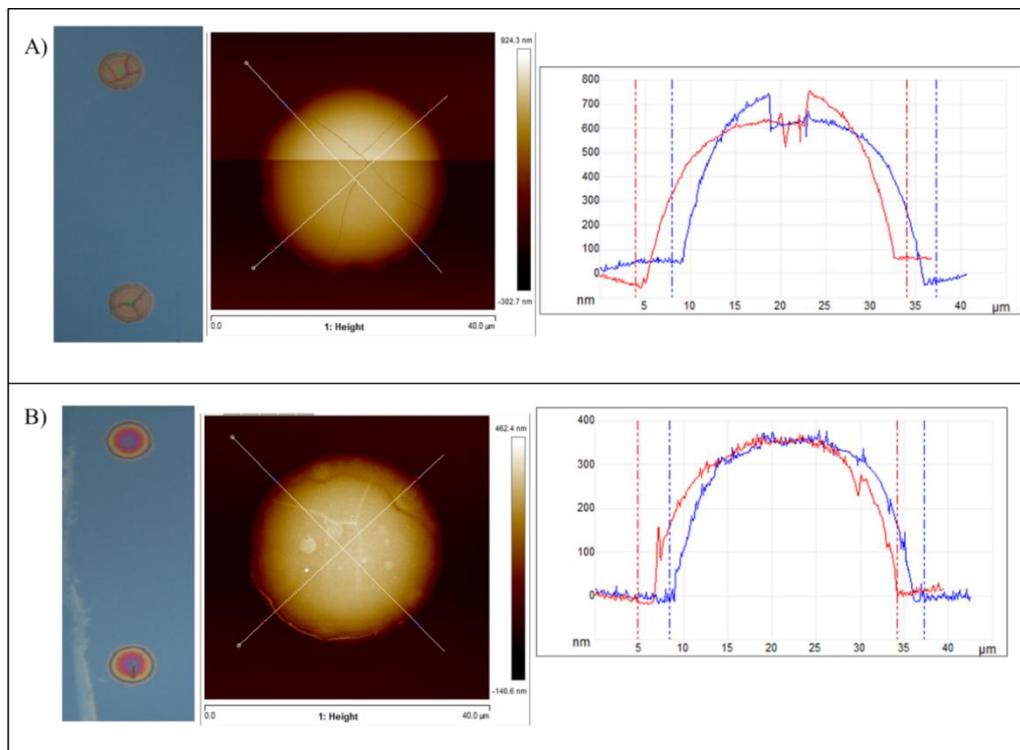


Figure 101 : Observation AFM des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'une encre de Lignine Organosolv à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de C_4F_8A avant et B) après une exposition de 18h à 15 U de laccase de *T. versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6.

V. 4. Conclusion - Discussion

Lors du chapitre IV., l'outil de criblage a été développé par enduction centrifuge pour aboutir à la réalisation de films solides de lignine à partir d'une solution filmogène et stable (qui ne se resuspend pas dans l'eau), la Lignine Organosolv à 25 g/l en solution dans le 1,4-dioxane. Différentes études ont été exposées dans le but de déterminer les paramètres d'impression, la nature de l'encre ainsi que les propriétés du support nécessaires pour l'obtention de micro-dépôts sous forme de dôme et présentant des interférences par impression jet d'encre. Ces paramètres sont les suivants :

- Paramètres d'impression : la distance intergoutte est de 150 μm et la « splat » est de 80 μm . Utilisation d'une buse d'impression de 20 μm de diamètre.
- Nature de l'encre : Lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le 1,4-dioxane et 10 % (v/v) de DMSO.
- Propriétés du support d'impression : wafer de silicium recouvert de PFTS ou de C_4F_8 avec des résultats meilleurs avec le C_4F_8 .

La catalyse enzymatique a été effectuée par une exposition de 18h à 3 U ou 15 U de laccase issue de *Trametes versicolor* solubilisée dans l'EDI ou dans le tampon acétate pH 4,6. Des réactions témoins ont été réalisées par une exposition à l'EDI ou le tampon acétate pH 4,6 seul. Sur le wafer de silicium recouvert de C_4F_8 et avec la laccase solubilisée dans le tampon acétate, une différence visuelle (au microscope) est observée en présence de 3 U et 15 U d'enzyme. Avec le tampon acétate seul, aucune différence visuelle n'est observée. Ce qui laisse supposer une action enzymatique sur les micro-dépôts. Cependant, l'analyse AFM sur ces micro-dépôts, montre une diminution de l'épaisseur (divisée par 2) que ce soit avec le tampon acétate seul ou avec 3 U ou 15 U de laccase. Ces résultats ne confirment donc pas une action enzymatique sur les micro-dépôts obtenus par impression jet d'encre. L'hypothèse serait qu'il y a une resuspension puis une redistribution de la matière au sein de la goutte qui devient plus étalée et donc moins épaisse après séchage.

Contrairement aux conditions de réactions enzymatiques utilisant un médiateur dans les chapitres précédents, les tests enzymatiques ont été réalisés avec différentes quantités de laccase seule, sans utilisation de médiateur (ABTS). Les micro-dépôts obtenus par impression jet d'encre étant beaucoup plus fins et plus petits que ceux obtenus par enduction centrifuge, l'hypothèse était que la laccase serait capable de dépolymériser la lignine sans intervention d'un médiateur. Cependant, les résultats obtenus dans ce chapitre montrent que l'enzyme n'est pas capable d'agir seule sur les micro-dépôts. Des tests de réactions enzymatiques impliquant la laccase associée à l'ABTS en différentes proportions serait nécessaire pour valider cet outil de criblage.

Conclusion générale et perspectives

La valorisation de la lignine (deuxième composant majoritaire de la biomasse lignocellulosique) suscite beaucoup d'intérêt au cours de ces dernières années ainsi que la recherche de technologies alternatives permettant de réduire les atteintes à l'environnement. Devant la structure complexe de la lignine ainsi que sa faible solubilité dans les milieux aqueux, sa valorisation par dépolymérisation enzymatique est un challenge pour les scientifiques. La réussite de ce challenge présente un enjeu majeur ayant pour but de produire des composés ayant une haute valeur ajoutée tel que la vanilline.

Une très grande diversité de lignines est présente de par leur structure complexe, leurs sources très diversifiées, les différents procédés d'extraction, etc. Une très grande diversité d'enzymes (laccases et peroxydases) est également présente de par leurs sources très diversifiées (champignons, bactéries, etc.). De plus, la dépolymérisation enzymatique de la lignine nécessite l'utilisation de médiateur(s) agissant comme intermédiaire pour la réaction enzymatique. Il existe également un très grand nombre de molécules pouvant intervenir en tant que médiateur dans cette réaction. Cette grande diversité de lignines, enzymes et médiateur nécessite de développer des outils permettant le criblage de beaucoup de conditions enzymatiques, qui malheureusement n'existe pas à l'heure actuelle. Cette thèse fait donc l'objet du développement d'un outil de criblage à haut débit par l'utilisation de la technologie d'impression jet d'encre (IJE). Cet outil, déjà utilisé pour la fabrication d'un outil pour le criblage enzymatique d'un biopolymère d'arabinoxylane, a été adapté pour pouvoir l'utiliser avec le polymère complexe de lignine. Le développement de cet outil de criblage à haut débit passe par différentes étapes.

Tout d'abord, l'objectif a été d'étudier la possibilité d'effectuer des films solides de lignines dans le but de pouvoir mettre en œuvre la dépolymérisation enzymatique en milieu solide. La dépolymérisation en milieu solide permet de pallier aux difficultés de la dépolymérisation en milieu liquide, liées notamment à l'insolubilité des lignines dans les milieux aqueux, milieu nécessaire à l'enzyme pour être active. La réaction enzymatique en milieu solide, exposé dans le Chapitre III. (Figure 28), nécessite l'obtention d'un film fin (de l'ordre de la centaine de nanomètre ayant une couleur bleue), homogène (sans agrégats, couleur homogène, etc.) et stable (qui ne se « resolubilise » pas lorsque le film a subi un bain d'eau de quelques minutes). La stabilité du film est nécessaire afin de pouvoir déposer les solutions enzymatiques (milieu aqueux) sur le film afin d'observer uniquement la dépolymérisation enzymatique. Sur les trois lignines étudiées (la Lignosulfonate, la lignine Organosolv et la

lignine Kraft), des films répondants aux exigences ont été obtenus à partir de solutions de lignine Kraft et de lignine Organosolv à 25 g/l solubilisées dans le THF et dans le 1,4-dioxane.

Ensuite, face aux difficultés de réalisation de la dépolymérisation en milieu liquide exposées dans la littérature, nous avons effectué une démonstration de la nécessité d'utiliser le système Laccase-Médiateur (LMS) pour visualiser une action enzymatique sur les trois lignines utilisées lors de cette thèse. Une dépolymérisation enzymatique a été observée sur les trois lignines dans les conditions réactionnelles suivantes : 3 mg de lignine solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 en présence de 25 % de 1,4-dioxane, 3 U de laccase issue de *Trametes versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6, volume final : 1,5 ml, température : 30°C et sous agitation orbitale à 600 rpm.

Des études préliminaires de dépolymérisation enzymatique utilisant différentes conditions enzymatique (différents ratio laccase/ABTS avec des concentrations en laccase de 3 U et de 15 U ainsi que des concentrations en ABTS de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM) ont été réalisées sur ces films. Seule la lignine Organosolv montre une sensibilité à l'action de la laccase et de meilleurs résultats ont été obtenus à partir des films de lignine Organosolv solubilisée dans le 1,4-dioxane, film qui a été retenu pour développer l'outil de criblage.

Sur cette base, différentes concentrations en laccase (0 ; 3 et 15 U) et en médiateur (0 ; 1,6 ; 3,2 et 16 nM d'ABTS), réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau, ont été testées en milieu liquide ainsi qu'en milieu solide (lignine sous forme de film réalisés par spin-coating), en utilisant la lignine Organosolv, dans le but de mettre en place l'outil de criblage.

Les résultats obtenus en milieu liquide (analyse GPC du milieu réactionnel) (IV.4.4) et solide (résultats observés à l'œil nu ainsi que l'analyse GPC du contenu de chaque puits après réaction enzymatique) (IV.4.5) ont été comparés afin de vérifier la fiabilité de l'outil de criblage. En absence d'enzyme et en présence d'ABTS (sous forme non oxydée), réalisée dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau, le film change de couleur pour devenir marron et les analyses GPC des échantillons issus des réactions enzymatiques en milieu liquide et solide ne montrent aucune action enzymatique. Kent et al. ont montré que l'ABTS sous forme non oxydée provoque une déstabilisation physique du film alors que l'ABTS sous forme oxydée (en présence de laccase) permet la stabilisation de ce dernier (151). En présence de 3 U de laccase lorsque la réaction est réalisée dans le tampon acétate pH 4,6, une diminution de l'épaisseur du film à partir de 16 nM d'ABTS est observée. Les analyses GPC montrent des résultats similaires avec l'intensité des pics correspondants aux produits de dépolymérisation plus importante avec

16 nM d'ABTS. Cependant, en présence de 15 U de laccase, les résultats obtenus en milieu liquide et en milieu solide ne correspondent pas. Dans ces conditions, l'outil de criblage ne peut pas être validé. En présence de 3 U de laccase, lorsque la réaction est réalisée dans l'eau, l'épaisseur du film diminue lorsque la concentration en ABTS augmente. Les analyses GPC montrent également une action enzymatique plus importante lorsque la concentration en ABTS augmente. Cependant, en présence de 15 U de laccase, les résultats obtenus en milieu liquide et en milieu solide ne correspondent pas. L'outil de criblage paraît donc fiable dans le cas où la réaction est réalisée dans l'eau et en présence de 3 U de laccase. En prenant en compte l'ensemble des résultats obtenus ainsi que les hypothèses émises, l'outil de criblage paraît fiable dans le cas où l'enzyme et l'ABTS sont solubilisés dans l'EDI. De plus, les résultats montrent que la réaction enzymatique pourrait être dépendante du ratio enzyme : médiateur. En effet, en présence de 3 U d'enzyme, une dépolymérisation importante est observée à partir de 3,2 nM d'ABTS, ce qui correspond à un ratio 1 : 1. Puis en présence de 15 U d'enzyme, une dépolymérisation importante est observée à partir de 16 nM, ce qui correspond également à un ratio 1 : 1. D'autres études sont donc à effectuer afin de comprendre le mécanisme d'action de l'enzyme en fonction du ratio enzyme / lignine / médiateur, c'est-à-dire qu'il faut tester différentes concentrations en laccase, lignine Organosolv et ABTS dans un premier temps puis avec d'autres enzymes, lignines et médiateur(s) dans un deuxième temps dans le but de valider l'outil de criblage dans d'autres conditions.

Enfin, le dernier objectif a été d'étudier la conception d'un outil de criblage haut débit en réalisant des micro-dépôts solides de lignines par impression jet d'encre. La solution filmogène obtenue dans le Chapitre III. (Lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le 1,4-dioxane) a été développée dans le but d'obtenir une encre imprimable ayant des propriétés particulières (viscosité, pression de vapeur, tension de surface, absence d'agrégats, etc.) et les paramètres d'impression ainsi que le support d'impression ont été ajustés pour obtenir des dépôts optimaux (ayant la forme d'un dôme et des interférences optiques). Nous avons donc montré qu'il est possible d'effectuer des micro-dépôts de lignine Organosolv dans les conditions d'impression suivantes :

- Paramètres d'impression : la distance intergoutte est de 150 μm et la « splat » est de 80 μm . Utilisation d'une buse d'impression de 20 μm de diamètre.
- Nature de l'encre : Lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le 1,4-dioxane et 10 % (v/v) de DMSO.

- Propriétés du support d'impression : wafer de silicium recouvert de PFTS ou de C₄F₈ avec des résultats meilleurs avec le C₄F₈.

Sur ces dépôts, des tests de réactions enzymatiques ont été réalisés en utilisant l'enzyme seule, sans utilisation de médiateur. Cependant, les résultats obtenus dans le Chapitre V. montrent que l'enzyme n'est pas capable d'agir seule sur les micro-dépôts. Des tests de réactions enzymatiques impliquant la laccase associée à l'ABTS en différentes proportions serait nécessaire ainsi que de les comparer aux résultats obtenus avec les films réalisés par spin-coating pour valider cet outil de criblage à haut débit. Dans le cas où ces résultats seraient concluants, ces mêmes tests pourraient être effectués avec la lignine Kraft. En effet, cette lignine n'a montré aucune dépolymérisation enzymatique avec les films réalisés par spin-coating. Cependant, par IJE les micro-dépôts étant beaucoup moins épais, la laccase pourrait probablement agir plus facilement.

Devant l'impossibilité d'effectuer des films solides et stables avec la Lignosulfonate, des tests préliminaires de capacité filmogène ont été effectués avec d'autres Lignosulfonates (fournies par la société TEMBEC) ayant potentiellement des propriétés différentes (appelées LS-C12 ; LS-T11N5 et LS-T5). Ces Lignosulfonates ont permis l'obtention de films stables avec une concentration en lignine de 20 g/l avec l'utilisation de la résine de mélamine formaldéhyde. Des tests de dépolymérisation enzymatique sont donc à effectuer sur ces films afin d'élargir le panel de lignines utilisables et ainsi obtenir un outil de criblage « universel ».

Références bibliographiques

1. **Wertz J, Gembloux B.** 2009. Structure de la cellulose et différentes voies de bioraffinage Structure de la cellulose Structure moléculaire Principales formes cristallines • Cellulose I : 1–10.
2. **Valbiom JWD, Tech GA, Farr-wal D.** 2011. Les hémicelluloses.
3. **Fitzpatrick M, Champagne P, Cunningham MF, Whitney RA.** 2010. A biorefinery processing perspective : Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour Technol* **101**:8915–8922.
4. **Rubin EM.** 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* **454**:841–845.
5. **Wertz JL.** 2010. La lignine-Note de synthèse. ValBiom.
6. **L.JOUANIN.** 2010. Biologie moléculaire de la lignification, l’art de faire des lignines a façon. *Acad d’agriculture Fr* 1–5.
7. **Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W.** 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol* **153**:895–905.
8. **Condassamy O.** 2015. Valorisation d’une lignine alcaline industrielle. Vers le développement de nouveaux synthons et oligomères bio-sourcés issus de lignine. Université de Bordeaux.
9. **Calvo-Flores FG, Dobado JA.** 2010. Lignin as renewable raw material. *ChemSusChem* **3**:1227–1235.
10. **Takahashi N, Koshijima T.** 1988. Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sci Technol* **241**:231–232.
11. **You T, Zhang L, Zhou S, Xu F.** 2015. Structural elucidation of lignin – carbohydrate complex (LCC) preparations and lignin from *Arundo donax* Linn. *Ind Crop Prod* **71**:65–74.
12. **Jongerijs AL.** 2013. Catalytic Conversion of Lignin for the Production of Aromatics.
13. **Doherty WOS, Mousavioun P, Fellows CM.** 2011. Value-adding to cellulosic ethanol : Lignin polymers. *Ind Crop Prod* **33**:259–276.
14. **Hamidi NH.** 2013. Enzymatic depolymerization of lignin by laccases. University of Nottingham.
15. **Tejado A, Peña C, Labidi J, Echeverria JM, Mondragon I.** 2007. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresour Technol* **98**:1655–1663.
16. **Vishtal AG, Kraslawski A.** 2011. Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources* **6**:3547–3568.
17. **Kleppe PJ.** 1970. Kraft Pulping. *Tappi* **53**.
18. **Holladay J.F, Bazell J.J, White JF. JD.** 2007. Top Value Added Chemicals from Biomass Volume II — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Pacific Northehn Natl Lab [PNNL].
19. **Zakzeski J, Bruijnincx PCA, Jongerijs AL, Weckhuysen BM.** 2010. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals 3552–3599.

20. **Kumar V, Duc D, Dharmaraja J, Shobana S.** 2019. A review on lignin structure , pretreatments , fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour Technol* **271**:462–472.
21. **Abdelaziz OY, Brink DP, Prothmann J, Ravi K, Sun M, García-Hidalgo J, Sandahl M, Hulteberg CP, Turner C, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF.** 2016. Biological valorization of low molecular weight lignin. *Biotechnol Adv* **34**:1318–1346.
22. **Cline SP, Smith PM.** 2017. Opportunities for lignin valorization: an exploratory process. *Energy Sustain Soc* **7**:26.
23. **O'Donohue Michael.** 2013. La biomasse, simple source d'énergie ou source de matières premières renouvelables ? *Innov Agron* **26**:41–50.
24. **Jenkins BM, Baxter LL, Miles TR.** 1998. Combustion properties of biomassFuel Processing Technology.
25. **Laskar DD, Yang B, Wang H, Lee J, National N.** 2013. Pathways for biomass-derived lignin to hydrocarbon fuels †. *Biofuels, Bioprod Biorefining* **7**:602–626.
26. **Calvo-Flores FG, Dobado JA, Isac-García J, Martín-Martínez FJ.** 2015. Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
27. **Plank J.** 2004. Applications of biopolymers and other biotechnological products in building materials. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**:1–9.
28. LignoBond DD: Nature's Best Binder | Borregaard LignoTech. <https://www.lignotechfeed.com/Pelleting-Aids/LignoBond-DD>.
29. **Park DW, Neogi AN FL.** 2012. Artificial fire log.
30. **Borregaard.** The home of sustainable vanillin. <https://vanillin.com/>.
31. **Pacek AW, Ding P, Garrett M, Sheldrake G, Nienow AW.** 2013. Catalytic conversion of sodium lignosulfonate to vanillin: Engineering aspects. part 1. effects of processing conditions on vanillin yield and selectivity. *Ind Eng Chem Res* **52**:8361–8372.
32. **Silva EAB da, Zabkova M, Araújo JD, Cateto CA, Barreiro MF, Belgacem MN, Rodrigues AE.** 2009. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chem Eng Res Des.*
33. **Baker DA, Rials TG.** 2013. Recent Advances in Low-Cost Carbon Fiber Manufacture from Lignin. *J Appl Polym* 713–728.
34. **Zhao S, Abu-omar MM.** 2015. Biobased Epoxy Nanocomposites Derived from Lignin-Based Monomers. *Biomacromolecules* **16**:2025–2031.
35. **Upton BM, Kasko AM.** 2016. Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials : Review and Perspective. *Chem Rev* **116**:2275–2306.
36. **Stewart D.** 2008. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Ind Crops Prod* **27**:202–207.
37. **Engels H, Pirkl H, Albers R, Albach RW, Krause J, Hoffmann A, Casselmann H, Dormish J.** 2013. Polyurethanes : Versatile Materials and Sustainable Problem Solvers for Today s Challenges *Angewandte. Angew Chemie Int Ed* **52**:9422–9441.
38. **Strassberger Z, Tanase S, Rothenberg G.** 2014. The pros and cons of lignin

- valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv* **4**:25310–25318.
39. **Zhang Q, Zhang G, Xu J, Gao C, Wu Y.** 2015. Recent advances on lignin-derived polyurethane polymers. *Rev Adv Mater Sci* **40**:146–154.
 40. **Zhao C, Lercher JA.** 2012. Selective Hydrodeoxygenation of Lignin-Derived Phenolic Monomers and Dimers to Cycloalkanes on Pd / C and HZSM-5 Catalysts. *chem cat chem* **4**:64–68.
 41. **Brzonova I, Kozliak E, Kubátová A, Chebeir M, Qin W, Christopher L, Ji Y.** 2014. Kenaf biomass biodecomposition by basidiomycetes and actinobacteria in submerged fermentation for production of carbohydrates and phenolic compounds. *Bioresour Technol* **173**:352–360.
 42. **Joffres B, Laurenti D, Charon N, Daudin A, Quignard A, Geantet C.** 2013. Thermochemical Conversion of Lignin for Fuels and Chemicals : A Review **68**.
 43. **Pandey MP, Kim CS.** 2011. Lignin Depolymerization and Conversion : A Review of Thermochemical Methods 29–41.
 44. **Liu W, Jiang H, Yu H.** 2015. Thermochemical conversion of lignin to functional materials : a review and future directions. *Green Chem* 4888–4907.
 45. **Azadi P, Inderwildi OR, Farnood R, King DA.** 2013. Liquid fuels , hydrogen and chemicals from lignin : A critical review. *Renew Sustain Energy Rev* **21**:506–523.
 46. **Cao L, Yu IKM, Liu Y, Ruan X, Tsang DCW, Hunt AJ.** 2018. Bioresource Technology Lignin valorization for the production of renewable chemicals : State-of-the-art review and future prospects. *Bioresour Technol* **269**:465–475.
 47. **Huber GW, Iborra S, Corma A.** 2006. Synthesis of Transportation Fuels from Biomass : Chemistry , Catalysts , and Engineering **2**:4044–4098.
 48. **Sricharoenchaikul V.** 2009. Bioresource Technology Assessment of black liquor gasification in supercritical water. *Bioresour Technol* **100**:638–643.
 49. **Meier D, Ante R, Faix O.** 1992. Catalytic Hydrolysis of Lignin : Influence of Reaction Conditions on the Formation and Composition of Liquid Products **40**:171–177.
 50. **Bjørsvik* H-R, Minisci F.** 1999. Fine Chemicals from Lignosulfonates. 1. Synthesis of Vanillin by Oxidation of Lignosulfonates.
 51. **Tarabanko VE, Petukhov D V, Selyutin GE.** 2004. New Mechanism for the Catalytic Oxidation of Lignin to Vanillin **45**:603–611.
 52. **Bourbonnais R, Paice MG.** 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* **267**:99–102.
 53. **Yang C, Yue F, Cui Y, Xu Y, Shan Y, Liu B, Zhou Y, Lü X.** 2018. Biodegradation of lignin by *Pseudomonas* sp. Q18 and the characterization of a novel bacterial DyP-type peroxidase. *J Ind Microbiol Biotechnol* **45**:913–927.
 54. **Moya R, Saastamoinen P, Hernández M, Suurnäkki A, Arias E, Mattinen ML.** 2011. Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresour Technol* **102**:10006–10012.
 55. **Lee S, Kang M, Bae JH, Sohn JH, Sung BH.** 2019. Bacterial Valorization of Lignin:

- Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol* **7**:1–18.
56. **Pollegioni L, Tonin F, Rosini E.** 2015. Lignin-degrading enzymes **282**:1190–1213.
 57. **Valli K, Wariishi H, Gold MH.** 1999. Oxidation of Monomethoxylated Aromatic Compounds by Lignin Peroxidase : Role of Veratryl Alcohol in Lignin Biodegradation1 ". *Biochemistry* **29**:8535–8539.
 58. **Baclocchi E, Fabbri C, Lanzalunga O.** 2003. Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Nonphenolic Trimeric Lignin Model Compounds : Fragmentation Reactions in the Intermediate Radical Cations. *JOC Artic* **27**:9061–9069.
 59. **Glenn K and, Gold H.** 1985. Purification and Characterization of an Extracellular Mn (II) -Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading peroxidase found in the extracellular medium of ligninolytic the homogeneous protein has an ik & of 46 , 000 . The absorption spectrum of the e. *Arch Biochem Biophys* **242**:329–341.
 60. **Paszczynski A., Huynh, V.B. CR.** 1986. Comparison of Ligninase-I and Peroxidase-M2 from the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* ' Ligninase-I lular enzymes produced by ligninolytic cultures of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 , were purified and their propert. *Arch Biochem Biophys* **244**:750–765.
 61. **Hammel K, Cullenn D.** 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr Opin Plant Biol* **11**:349–355.
 62. **Camarero S, Sarkar S, Ruiz-duen FJ.** 1999. Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin That Has Both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites *. *J Biol Chem* **274**:10324–10330.
 63. **Mester T. and Field JA.** 1998. Characterization of a Novel Manganese Peroxidase-Lignin Peroxidase Hybrid Isozyme Produced by *Bjerkandera* Species Strain BOS55 in the Absence of Manganese *. *J Biol Chem* **273**:15412–15417.
 64. **Ruiz-duen FJ, Pogni R, Pe M, Basosi R, Choinowski T, Piontek K, Martı AT.** 2005. Versatile Peroxidase Oxidation of High Redox Potential Aromatic Compounds : Site-directed Mutagenesis , Spectroscopic and Crystallographic Investigation of Three Long-range Electron Transfer Pathways ' s Martı. *J Mol Biol* **354**:385–402.
 65. **Tien M, Kirk TK, Bulln C, Feell A.** 1985. Steady-state and Transient-state Kinetic Studies on the Oxidation of 3,4-Dimethoxybenzyl Alcohol Catalyzed by the Ligninase of. *J Biol Chem* **261**:1687–1693.
 66. **Hikorokuro Y.** 1883. LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society ofTokio. *Chem Soc* 472–486.
 67. **Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M.** 2008. Laccases and Their Applications : A Patent Review 10–24.
 68. **Maijala P, Mattinen M-L, Nousiainen P, Kontro J, Asikkala J, Sipilä J, Viikari L.** 2012. Action of fungal laccases on lignin model compounds in organic solvents. *J Mol Catal B Enzym* **76**:59–67.
 69. **Mattinen ML, Maijala P, Nousiainen P, Smeds A, Kontro J, Sipilä J, Tamminen T, Willför S, Viikari L.** 2011. Oxidation of lignans and lignin model compounds by laccase

- in aqueous solvent systems. *J Mol Catal B Enzym* **72**:122–129.
70. **Areskog D, Li J, Gellerstedt G, Henriksson G.** 2010. Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis. *Biomacromolecules* **11**:904–910.
 71. **Christopher LP, Yao B, Ji Y.** 2014. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Front Energy Res* **2**:1–13.
 72. **Galli C, Gentili P.** 2004. Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. *J Phys Org Chem* **17**:973–977.
 73. **Camarero S, Ibarra D.** 2005. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Appl Environ Microbiol* **71**:1775–1784.
 74. **Fabbrini M, Galli C, Gentili P.** 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J Mol Catal B Enzym* **16**:231–240.
 75. **Shleev S, Persson P, Shumakovich G, Mazhugo Y, Yaropolov A, Ruzgas T, Gorton L.** 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme Microb Technol* **39**:841–847.
 76. **Bajpai P.** 1999. Application of enzymes in the paper industry. *Biotechnol Prog* **15**:147–157.
 77. **Eggert C, Temp U, Dean JFD, Eriksson KEL.** 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett* **391**:144–148.
 78. **Nugroho Prasetyo E, Kudanga T, Østergaard L, Rencoret J, Gutiérrez A, del Río JC, Ignacio Santos J, Nieto L, Jiménez-Barbero J, Martínez AT, Li J, Gellerstedt G, Lepifre S, Silva C, Kim SY, Cavaco-Paulo A, Seljebakken Klausen B, Lutnaes BF, Nyanhongo GS, Guebitz GM.** 2010. Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. *Bioresour Technol* **101**:5054–5062.
 79. **Weihua Q, Hongzhang C.** 2008. An alkali-stable enzyme with laccase activity from entophytic fungus and the enzymatic modification of alkali lignin **99**:5480–5484.
 80. **Rehmann L, Ivanova E, Gunaratne HQN, Seddon KR, Stephens G.** 2014. Enhanced laccase stability through mediator partitioning into hydrophobic ionic liquids. *Green Chem.*
 81. **Manole A, Herea D, Chiriac H, V. M.** 2008. Laccase activity determination . ANALELE ȘTIINȚIFICE ALE Univ “AL I CUZA” IAȘI Tomul IV, s Biofiz Fiz medicală și Fiz Mediu 17–24.
 82. **Harkin JM, Obst JR.** 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia* **29**:381–387.
 83. **Ahmad M, Taylor CR, Pink D, Burton K, Eastwood D, Bending GD, Bugg TDH.** 2010. Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Mol Biosyst* **6**:815–821.
 84. **Tekin E, Smith PJ, Schubert US.** 2008. Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles 703–713.

85. **Gans B De, Schubert US.** 2004. Inkjet Printing of Well-Defined Polymer Dots and Arrays 7789–7793.
86. **Gans BB De, Duineveld PC, Schubert US.** 2004. Inkjet Printing of Polymers : State of the Art and Future Developments ** 203–213.
87. **Romanov V, Nikki S, Miles AR, Grainger DW, Gale BK, Brooks BD.** 2014. A critical comparison of protein microarray fabrication technologies 1303–1326.
88. **Delaney JT, Smith PJ, Schubert US.** 2009. Inkjet printing of proteins. *Soft Matter* **5**:4866.
89. **Li J, Wang X, Shan Y, Huang H, Jian D, Xue L, Wang S, Liu F.** Handheld Inkjet Printing Paper Chip Based Smart Tetracycline Detector.
90. **Barbulovic-nad I, Wheeler AR.** 2006. Bio-Microarray Fabrication Techniques — A Review 237–259.
91. **Shimma S., Furuta M., Ichimura K. YY and SM.** 2006. A Novel Approach to in situ Proteome Analysis Using Chemical Inkjet Printing Technology and MALDI-QIT-TOF Tandem Mass Spectrometer. *J Mass Spectrom* **54**:133–140.
92. **Baluya DL, Garrett TJ, Yost RA.** 2007. Automated MALDI matrix deposition method with inkjet printing for imaging mass spectrometry. *Anal Chem* **79**:6862–6867.
93. **Sumerel J., Lewis J., Doraiswamy A., Deravi L. F., Sewell S. L., Gerdon A.E. WDW and NRJ.** 2006. Piezoelectric ink jet processing of materials for medical and biological applications. *Biotechnol J* **1**:976–987.
94. **Ballarin B, Setti L, Fraleoni-morgera A, Ballarin B, Filippini A, Frascaro D, Piana C.** 2016. An amperometric glucose biosensor prototype fabricated by thermal inkjet printing An amperometric glucose biosensor prototype fabricated by thermal inkjet printing.
95. **Cerclier C, Guyomard-Lack A, Moreau C, Cousin F, Beury N, Bonnin E, Jean B, Cathala B.** 2011. Coloured semi-reflective thin films for biomass-hydrolyzing enzyme detection. *Adv Mater* **23**:3791–3795.
96. **S. L.** 2015. Développement d'un biocapteur d'activité d'hydrolyse enzymatique par impression jet d'encre : Application à l'ARABINOXYLANE.
97. **Ufarté L, Potocki-Veronese G, Cecchini D, Tauzin AS, Rizzo A, Morgavi DP, Cathala B, Moreau C, Cleret M, Robe P, Klopp C, Laville E.** 2018. Highly promiscuous oxidases discovered in the bovine rumen microbiome. *Front Microbiol* **9**:1–12.
98. **Gao Y, Jiang F, Zhang L.** 2016. Enzymatic synthesis of polyguaiacol and its thermal antioxidant behavior in polypropylene. *Polym Bull* **73**:1343–1359.
99. **Crawford RL, Robinson LE, Foster RD.** 1981. Polyguaiacol : a Useful Model Polymer for Lignin. *Appl Environ Microbiol* **41**:1112–1116.
100. **Hwang S, Lee Y, Lee C, Ahn I.** 2008. Manganese (III) Acetate-Catalyzed Synthesis of Polyguaiacol. *J Polym Sci* 6009–6015.
101. **Steiner M, Ra M, Ñ IB, Mu U.** 2006. Investigations on the Crosslinking Reactions of Melamine Resins in the Presence of Wood **886**:881–886.

102. **Saidane D, Barbe J, Birot M.** 2010. Preparation of Functionalized Kraft Lignin Beads **116**:1184–1189.
103. **Norgren M, Notley SM, Majtnerova A, Gellerstedt G.** 2006. Smooth model surfaces from lignin derivatives. I. Preparation and characterization. *Langmuir* **22**:1209–1214.
104. **Notley SM, Norgren M.** 2010. Surface Energy and Wettability of Spin-Coated Thin Films of Lignin Isolated from Wood. *Langmuir* **26**:5484–5490.
105. **Faix O, Lange W, Salud EC.** 1981. The Use of HPLC for the Determination of Average Molecular Weights and Molecular Weight Distributions of Milled Wood Lignins from *Shorea polysperma* (Blco.). *Holzforschung* **35**:3–9.
106. **Robert DR, Bardet M, Gellerstedt G, Lindfors EL.** 1984. Structural Changes In Lignin During Kraft Cooking Part 3.* on the Structure of Dissolved Lignins. *J Wood Chem Technol* **4**:239–263.
107. **Thring RW, Vanderlaan MN, Griffin SL.** 1996. Fractionation Of Alcell® Lignin By Sequential Solvent Extraction. *J Wood Chem Technol* **16**:139–154.
108. **S. Baumberger *, C. Lapierre and, Monties B.** 1998. Utilization of Pine Kraft Lignin in Starch Composites: Impact of Structural Heterogeneity.
109. **Pouteau C, Dole P, Cathala B, Averous L, Boquillon N.** Antioxidant properties of lignin in polypropylene.
110. **Norgren M, Lindström B.** 2000. Physico-Chemical Characterization of a Fractionated Kraft Lignin. *Holzforschung* **54**.
111. **Cathala B, Saake B, Faix O, Monties B.** 2003. Association behaviour of lignins and lignin model compounds studied by multidetector size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A* **1020**:229–239.
112. **Gosselink RJA, Abächerli A, Semke H, Malherbe R, Käuper P, Nadif A, van Dam JEG.** 2004. Analytical protocols for characterisation of sulphur-free lignin. *Ind Crops Prod* **19**:271–281.
113. **Kadla JF, Kubo S.** 2004. Lignin-based polymer blends: analysis of intermolecular interactions in lignin–synthetic polymer blends. *Compos Part A Appl Sci Manuf* **35**:395–400.
114. **Majcherczyk A, Hüttermann A.** 1997. Size-exclusion chromatography of lignin as ion-pair complex. *J Chromatogr A* **764**:183–191.
115. **Ben-Ghedalia D, Yosef E.** 1994. Effect of Isolation Procedure on Molecular Weight Distribution of Wheat Straw Lignins. *J Agric Food Chem* **42**:649–652.
116. **Chum HL, Johnson DK, Tucker MP, Himmel ME.** 1987. Some Aspects of Lignin Characterization by High Performance Size Exclusion Chromatography Using Styrene Divinylbenzene Copolymer Gels. *Holzforschung* **41**:97–108.
117. **Pellinen J, Salkinoja-Salonen M.** 1985. High-performance size-exclusion chromatography of lignin and its derivatives. *J Chromatogr* **328**:299–308.
118. **Johnson DK, Chum HL, Hyatt JA.** 1989. Molecular Weight Distribution Studies Using Lignin Model Compounds. *Am Chem Soc* 109–123.

119. **Gilardi G, Cass AEG.** 1993. Associative and Colloidal Behavior of Lignin and Implications for Its Biodegradation in vitro. *Langmuir* **9**:1721–1726.
120. **Ringena O, Lebioda S, Lehnen R, Saake B.** 2006. Size-exclusion chromatography of technical lignins in dimethyl sulfoxide/water and dimethylacetamide. *J Chromatogr A* **1102**:154–163.
121. **Herrick FW, Engen RJ, Goldschmid O.** 1979. Spent sulfite liquor viscosity and lignin sulfonate molecular weight. Effects of heat aging. *Tappi* **62**:81–86.
122. **Callec G, Anderson AW, Tsao GT, Rollings JE.** 1984. System development for aqueous gel permeation chromatography. *J Polym Sci Polym Chem Ed* **22**:287–293.
123. **Forss K, Kokkonen R, Sångfors P-E.** 1989. Determination of the Molar Mass Distribution of Lignins by Gel Permeation Chromatography, p. 124–133. *In* .
124. **Wong KKY, De Jong E.** 1996. Size-exclusion chromatography of lignin- and carbohydrate-containing samples using alkaline eluents. *J Chromatogr A* **737**:193–204.
125. **Bikova T, Klevinska V, Treimanis A.** 2000. Monitoring of lignin and hemicelluloses in spent cooking liquor during kraft delignification. *Holzforschung* **54**:66–70.
126. **Chen F, Li J.** 2000. Aqueous Gel Permeation Chromatographic Methods for Technical Lignins. *J Wood Chem Technol* **20**:265–276.
127. **Fredheim GE, Braaten SM, Christensen BE.** 2002. Molecular weight determination of lignosulfonates by size-exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. *J Chromatogr A* **942**:191–9.
128. **Moerck R, Yoshida H, Kringstad KP, Hatakeyama H.** 1986. Fractionation of kraft lignin by successive extraction with organic solvents. I. Functional groups, ¹³C-NMR spectra and molecular weight distributions. *Holzforsch (Germany, FR)* **40**:51–60.
129. **Gellerstedt G, Lindfors EL.** 1987. Hydrophilic groups in lignin after oxygen bleaching. *Tappi J* **70**:119–122.
130. **Kelley SS, Glasser WG, Ward TC.** 1988. Engineering Plastics from Lignin XIV. Characterization of Chain-Extended Hydroxypropyl Lignins. *J Wood Chem Technol* **8**:341–359.
131. **Faix, O. Beinhoff O.** 1992. Improves calibration of high-performance size-exclusion chromatography of lignins using lignin-like model compounds. *Holzforsch* **46**:355–356.
132. **Glasser WG, Davé V, Frazier CE.** 1993. Molecular weight distribution of (semi-) commercial lignin derivatives. *J Wood Chem Technol* **13**:545–559.
133. **Constantino ' CJL, Juliani LP, Botaro VR, Balogh DT, Pereira MR, Ticianelli EA, Curvelo AAS, Oliveira ON.** 1996. Langmuir-Blodgett films from ligninsThin Solid Films.
134. **Kubo S, Uraki Y, Sano Y.** 1996. Thermomechanical Analysis of Isolated Lignins.
135. **Cathala B, Saake B, Faix O, Monties B.** 2003. Association behaviour of lignins and lignin model compounds studied by multidetector size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A* **1020**:229–239.
136. **Gaspar AR, Guerra A, Lucia LA, Argyropoulos DS.** 2008. Propensity of Lignin to

- Associate : Light Scattering Photometry Study with Native Lignins 3362–3369.
137. **Lee SJ, Kim HJ, Cho EJ, Song Y, Bae H-J.** 2015. Isolation and characterization of lignin from the oak wood bioethanol production residue for adhesives. *Int J Biol Macromol* **72**:1056–62.
 138. **Crestini C, Melone F, Saladino R.** 2011. Bioorganic & Medicinal Chemistry Novel multienzyme oxidative biocatalyst for lignin bioprocessing. *Bioorg Med Chem* **19**:5071–5078.
 139. **Gilca IA, Popa VI, Crestini C.** 2015. Obtaining lignin nanoparticles by sonication. *Ultrason Sonochem* **23**:369–75.
 140. **Du X, Gellerstedt G, Li J.** 2013. Universal fractionation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) from lignocellulosic biomass: an example using spruce wood. *Plant J* **74**:328–338.
 141. **Baumberger S, Abacherli A, Fasching M, Gellerstedt G, Gosselink R, Hortling B, Li J, Saake B, de Jong E.** 2007. Molar mass determination of lignins by size-exclusion chromatography: towards standardisation of the method. *Holzforschung* **61**:459–468.
 142. **Mass M, Solution A.** TSKgel ® TECHNICAL INFORMATION SHEET No. 137 1–2.
 143. **Laurichesse S, Avérous L.** 2014. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Prog Polym Sci* **39**:1266–1290.
 144. **Rakotovelof A.** 2017. Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques École Doctorale des Sciences Chimiques.
 145. **Jeon JR, Murugesan K, Kim YM, Kim EJ, Chang YS.** 2008. Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**:783–790.
 146. **Munk L, Andersen ML, Meyer AS.** 2018. Enzyme and Microbial Technology Influence of mediators on laccase catalyzed radical formation in lignin. *Enzyme Microb Technol* **116**:48–56.
 147. **Matijosyte I.** 2008. Mechanistic Studies of Laccase / TEMPO Catalyzed Aerobic Oxidation of Alcohols.
 148. **Banoub J, Jr GD, Joly N, Mackenzie G.** 2015. A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing 5–48.
 149. **Richel, Vanderghem C, Simon M, Wathelet B, Paquot M.** 2012. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for Second-Generation Lignin Analysis. *Anal Chem Insights* 79.
 150. **Kosyakov DS, Ul'yanovskii N V., Sorokina E a., Gorbova NS.** 2014. Optimization of sample preparation conditions in the study of lignin by MALDI mass spectrometry. *J Anal Chem* **69**:1344–1350.
 151. **Kent MS, Avina IC, Rader N, Busse ML, George A, Sathitsuksanoh N, Baidoo E, Timlin J, Giron NH, Celina MC, Martin LE, Polsky R, Chavez VH, Huber DL, Keasling JD, Singh S, Simmons BA, Sale KL.** 2015. Assay for lignin breakdown based on lignin films: insights into the Fenton reaction with insoluble lignin. *Green Chem* **17**.

Liste des figures et tableaux

<i>Figure 1 : Structure de la paroi cellulaire végétale et de ses composants (4).</i>	3
<i>Figure 2 : Structure chimique des sous-unités de base du polymère de lignine (5).</i>	8
<i>Figure 3 : Exemple de structure d'une lignine issue de feuillu (7).</i>	9
<i>Figure 4 : Principales liaisons C-O et C-C entre les sous-unités présentent dans la lignine (9).</i>	10
<i>Figure 5 : Représentation de la structure de la lignine Kraft (19).</i>	11
<i>Figure 6 : Représentation de la structure de la lignosulfonate (19).</i>	12
<i>Figure 7 : Principales voies de valorisations de la lignine, leur valeur sur le marché ainsi que le volume pouvant potentiellement être fabriqué (23).</i>	14
<i>Figure 8 : Synthèse de la vanilline selon Borregaard (9).</i>	16
<i>Figure 9 : Produits majeurs obtenus lors de la pyrolyse de la lignine. (A) guaiacol, (B) méthyl guaiacol, (C) syringol, (D) méthyl syringol, (E) vanilline, (F) syringaldéhyde, (G) vinyl syringol, (H) vinyl guaiacol, (I) phénol. (43).</i>	19
<i>Figure 10 : Mécanisme de la réaction d'oxydation catalytique de la lignine allant vers la production de vanilline (51).</i>	21
<i>Figure 11 : Mécanisme d'oxydoréduction du site catalytique des peroxydases de lignine. VA : Alcool veratrylique (53).</i>	22
<i>Figure 12 : Mécanisme d'oxydoréduction du site catalytique des manganèse peroxydases (53).</i>	24
<i>Figure 13 : Représentation du site actif des laccases (64).</i>	25
<i>Figure 14 : Mécanisme d'oxydoréduction du site catalytique des laccases (53).</i>	26
<i>Figure 15 : Mécanisme d'oxydation d'un substrat (la lignine) par le système laccase-médiateur (LMS) (64).</i>	28
<i>Figure 16 : Structure des trois principaux médiateurs.</i>	28
<i>Figure 17 : Biocapteur de tétracycline obtenu par impression jet d'encre basé sur le principe du test ELISA (82).</i>	31
<i>Figure 18 : Prototype d'un biocapteur de glucose obtenu par impression jet d'encre (87).</i> ..	33
<i>Figure 19 : Principe de séparation de la GPC. Ve : Volume d'élution.</i>	39
<i>Figure 20 : Représentation des collectes effectuées à partir du profil chromatographique de la Lignosulfonate avant dépolymérisation enzymatique par la laccase de <i>T. versicolor</i>. Le pic « Li 1 » représente le premier pic de lignine non dépolymérisée et le pic « Li 2 » représente le deuxième pic de lignine non dépolymérisée.</i>	41
<i>Figure 21 : Représentation des collectes effectuées à partir du profil chromatographique de la Lignosulfonate après dépolymérisation enzymatique par la laccase de <i>T. versicolor</i> en présence de 1,6 nM d'ABTS. Le pic « Li 1 » représente le premier pic de lignine non dépolymérisée et le pic « produits » représente les produits de dépolymérisation.</i>	41
<i>Figure 22 : a) Photographie du spin-coateur. b) Principe de dépôt de film fin par enduction centrifuge</i>	44

<i>Figure 23 : Photo du moule de PDMS permettant de déposer un volume de 20 µl de solution enzymatique.</i>	45
<i>Figure 24 : Photo du moule de PDMS permettant de déposer un volume de 150 µl de solution enzymatique.</i>	45
<i>Figure 25 : Schéma du format d'impression (a) et des microdépôts dans chaque carrés (b) effectué avec l'imprimante CERADROP.</i>	48
<i>Figure 26 : Photographie de l'imprimante jet d'encre CeraPrinter série X (CERADROP)(a) ainsi que de l'intérieur de la machine (b).</i>	48
<i>Figure 27 : Principe de l'interférence optique.</i>	53
<i>Figure 28 : Principe de la réaction enzymatique sur un film nanométrique déposé sur un wafer de silicium</i>	53
<i>Figure 29 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de lignine Kraft à A) 900g/l, B) 450 g/l et C) 90g/l solubilisée dans le NaOH 2M. Grossissement 20x.</i>	58
<i>Figure 30 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft à 450 g/l et B) de lignine Organosolve à 200 g/l solubilisée dans du NH₄OH 1M. Grossissement 20x.</i>	58
<i>Figure 31 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de lignine Kraft à A) 250 g/l, B) 200 g/l, C) 150 g/l, D) 100 g/l, E) 50 g/l, F) 25 g/l et G) 10g/l ainsi que de H) lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le THF. Grossissement 20x.</i>	60
<i>Figure 32 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft à 25 g/l et B) de lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le 1,4-dioxane. Grossissement 20x.</i>	60
<i>Figure 33 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft, B) de lignine Organosolv et de C) Lignosulfonate à 25 g/l solubilisée dans le DMSO. Grossissement 20x.</i>	61
<i>Figure 34 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de A) lignine Kraft et B) de lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le mélange hydro-organique 1,4-dioxane/eau à 80 % et 90% de 1,4-dioxane respectivement. Grossissement 20x.</i>	61
<i>Figure 35 : Photographies microscopiques de films solides obtenus par spin-coating à partir de solutions de lignine Kraft à 25 g/l solubilisée dans le mélange organique contenant le 1,4-dioxane et de l'éthanol à A) 30% de 1,4-dioxane et B) 40% de 1,4-dioxane ainsi que C) la lignine Organosolv à 25 g/l solubilisée dans le mélange organique contenant 60% d'éthanol et 40% de 1,4-dioxane. Grossissement 20x.</i>	62
<i>Figure 36 : Photographies microscopiques d'un film solide obtenu par spin-coating à partir d'une solution de lignine Kraft à 25 g/l solubilisée dans un mélange mixte 50/50 de THF/DMSO. Grossissement 20x.</i>	62
<i>Figure 37 : Schéma des gouttes déposées sur chaque film de lignine. Tv : Laccase issue de Trametes versicolor. Tp : Tampon acétate 0,1 M pH 4,6.</i>	63

<i>Figure 38 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Kraft réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le THF.</i>	<i>64</i>
<i>Figure 39 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Kraft réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le 1,4-dioxane.</i>	<i>65</i>
<i>Figure 40 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Organosolv réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le THF.</i>	<i>66</i>
<i>Figure 41 : Photographies des résultats obtenus à chaque étape avant et après rinçage ou action de la laccase sur les films de lignine Organosolv réalisés à partir d'une solution à 25g/l dans le 1,4-dioxane.</i>	<i>68</i>
<i>Figure 42: Courbes de calibration des colonnes A) selon l'approche 1 utilisant deux colonnes (TSKgel 4000PW_{XL} et TSKgel Oligo-PW) et B) selon l'approche 2 utilisant trois colonnes (TSKgel 4000PW_{XL}, TSKgel 3000PW_{XL} et TSKgel Oligo-PW).</i>	<i>75</i>
<i>Figure 43 : Profils GPC A) et masses moléculaires approximatives obtenues B) de la lignosulfonate, la lignine Organosolv et la lignine Kraft non dépolymérisée selon les deux approches (2 ou 3 colonnes).</i>	<i>76</i>
<i>Figure 44: Activité enzymatique de la laccase issue de Trametes versicolor en fonction du pH.</i>	<i>77</i>
<i>Figure 45 : Activité enzymatique de la laccase issue de Trametes versicolor en fonction de la température.</i>	<i>78</i>
<i>Figure 46 : Activité enzymatique résiduelle de la laccase issue de Trametes versicolor en fonction du pourcentage d'hydroxyde de sodium 2,2 M (NaOH) ou de solvant (1,4-dioxane, éthanol (EtOH) et tétrahydrofurane (THF)) présente dans l'eau et à 30°C.</i>	<i>79</i>
<i>Figure 47 : Profils GPC de la Lignosulfonate avant (courbe verte) et après (courbe rouge) le traitement enzymatique de 5 jours.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 48 : Profils GPC de la Lignine Organosolv avant (courbe verte) et après (courbe rouge) le traitement enzymatique de 5 jours.</i>	<i>81</i>
<i>Figure 49 : Profils GPC de la Lignine Kraft avant (courbe verte) et après (courbe rouge) le traitement enzymatique de 5 jours.</i>	<i>81</i>
<i>Figure 50 : Profils GPC de la Lignosulfonate après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Les médiateurs utilisés sont l'ABTS, le TEMPO et un mélange ABTS/TEMPO.</i>	<i>83</i>
<i>Figure 51 : Profils GPC de la Lignine Organosolv après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Les médiateurs utilisés sont l'ABTS, le TEMPO et un mélange ABTS/TEMPO.</i>	<i>83</i>
<i>Figure 52 : Profils GPC de la lignine Kraft après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Les médiateurs utilisés sont l'ABTS, le TEMPO et un mélange ABTS/TEMPO.</i>	<i>84</i>

- Figure 53 : Décomposition des pics issus du profil GPC de la Lignosulfonate après traitement enzymatique utilisant l'ABTS comme médiateur. 85
- Figure 54 : Décomposition des pics issus du profil GPC de la lignine Organosolv après traitement enzymatique utilisant l'ABTS comme médiateur. 85
- Figure 55 : Décomposition des pics issus du profil GPC de la lignine Kraft après traitement enzymatique utilisant l'ABTS comme médiateur. 86
- Figure 56 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignosulfonate. 86
- Figure 57 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv. 87
- Figure 58 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la lignine Kraft. 87
- Figure 59 : Spectromètre de masse obtenus en MALDI-TOF-MS A) d'un polyéthylèneglycol ($M_w \approx 1000\text{g/mol}$), B) d'un polyguaiacol. Ainsi que des pics C) « Li 1 » et D) « Produit » collectés des profils GPC après dépolymérisation enzymatique par le système LMS (enzyme issue de *Trametes versicolor* / ABTS) en milieu liquide de la Lignosulfonate. 90
- Figure 60 : Représentation du temps de dérive obtenu par analyse ESI-IM-MS des échantillons correspondant au pic de lignine non dépolymérisée (Li 1) issus de la collectes du profil GPC de la Lignosulfonate avant dépolymérisation enzymatique (courbe bleu) ainsi qu'après dépolymérisation enzymatique par la laccase de *T. versicolor* en présence de 1,6 nM d'ABTS (courbe verte). 92
- Figure 61 : Représentation du temps de dérive obtenu par analyse ESI-IM-MS des échantillons correspondant au deuxième pic de lignine non dépolymérisée (Li 2) issus de la collectes du profil GPC de la Lignosulfonate avant dépolymérisation enzymatique (courbe bleu) ainsi qu'aux produits de dépolymérisation après dépolymérisation enzymatique par la laccase de *T. versicolor* en présence de 1,6 nM d'ABTS (courbe verte) 92
- Figure 62 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après 5 jours de réaction enzymatique par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En absence d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane. Analyses effectuées avec 3 colonnes. 94
- Figure 63 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire issu des différents profils GPC après 5 jours de réaction enzymatique de la Lignine Organosolv dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane en **absence de laccase**. 94
- Figure 64 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après 5 jours de réaction enzymatique par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane. Analyses effectuées avec 3 colonnes. 95
- Figure 65 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire issus des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane en **présence de 3 U de laccase**. 96

- Figure 66 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après 5 jours de réaction enzymatique par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane. Analyses effectuées avec 3 colonnes. 97
- Figure 67 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire issu des différents profils GPC après 5 jours de réaction enzymatique de la Lignine Organosolv dans le tampon acétate pH 4,6 et 25 % de 1,4-dioxane en **présence de 15 U de laccase**. 97
- Figure 68 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En absence d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes. 98
- Figure 69 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv en solution dans l'EDI et 25 % de 1,4-dioxane en **absence de laccase**. 99
- Figure 70 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes. 100
- Figure 71 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv en solution dans l'EDI et 25 % de 1,4-dioxane en **présence de 3 U de laccase**. 100
- Figure 72 : Chromatogrammes GPC de la lignine Organosolv après traitement enzymatique de 5 jours par le système laccase-médiateur (SLM). Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes. 102
- Figure 73 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC après 5 jours de traitement enzymatique de la Lignine Organosolv en solution dans l'EDI et 25 % de 1,4-dioxane en **présence de 15 U de laccase**. 102
- Figure 74 : Résultats visuels après contact de la laccase sur un film de lignine Organosolv obtenu à partir d'une solution à 25 g/l dans le 1,4-dioxane. La solution enzymatique contient la laccase issue de *Trametes versicolor* et l'ABTS comme médiateur solubilisés soit dans le tampon acétate pH 4,6 soit dans l'eau déionisée à différentes concentrations. 104
- Figure 75 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En l'absence d'enzyme (Tv : Laccase issue de *Trametes versicolor*) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. Analyses effectuées avec 3 colonnes. 106
- Figure 76 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence

<i>de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. Analyses effectuées avec 3 colonnes.</i>	<i>107</i>
<i>Figure 77 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6.</i>	<i>108</i>
<i>Figure 78 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6. Analyses effectuées avec 3 colonnes.</i>	<i>109</i>
<i>Figure 79 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans le tampon acétate pH 4,6.</i>	<i>109</i>
<i>Figure 80 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase avec le film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En l'absence d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 81 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase avec le film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 82 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 3 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 83 : Chromatogrammes GPC des échantillons collectés après contact de la laccase avec le film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau. Analyses effectuées avec 3 colonnes.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 84 : Histogrammes représentant le pourcentage d'aire des différents profils GPC des échantillons collectés après contact de la laccase sur film solide de lignine Organosolv. Représentation des conditions suivantes : En présence de 15 U d'enzyme (Tv : Laccase issue de Trametes versicolor) et en présence de 1,6 nM, 3,2 nM et 16 nM d'ABTS ou en son absence. Le tout réalisé dans l'eau.</i>	<i>114</i>

- Figure 85 : Exemple d'arabinoxylane imprimée sur un support de silicium recouvert de C_4F_8 à partir d'une matrice programmée et résultats observés au microscope. (89)..... 121
- Figure 86 : Les différentes étapes d'un dépôt par impression jet d'encre (89)..... 121
- Figure 87 : A) Photographie et B) schéma de la buse d'impression. (PZT : piézoélectrique).
..... 122
- Figure 88 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** sur un wafer de **silicium brut**. Les gouttes déposées ont un **splat de 50 μm** (A) et de **70 μm** (B) et une distance intergoutte de **80 μm** (A) et de **100 μm** (B). 125
- Figure 89 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** sur un wafer de **silicium brut**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une distance intergoutte de **150 μm** 125
- Figure 90 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** sur un wafer de silicium recouvert de **PFTS**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une **distance intergoutte de 150 μm** 126
- Figure 91 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** sur un wafer de silicium recouvert de **C_4F_8** . Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une **distance intergoutte de 150 μm** 126
- Figure 92 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% d'isopropanol** sur un wafer de **silicium brut**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une **distance intergoutte de 150 μm** 128
- Figure 93 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% d'isopropanol** sur un wafer de silicium recouvert de **PFTS**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une **distance intergoutte de 150 μm** 128
- Figure 94 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% d'isopropanol** sur un wafer de silicium recouvert de **C_4F_8** . Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une **distance intergoutte de 150 μm** 128
- Figure 95 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% de DMSO** sur un wafer de **silicium brut**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une **distance intergoutte de 150 μm** 129
- Figure 96 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% de DMSO** sur un wafer de silicium recouvert de **PFTS**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 μm** et une **distance intergoutte de 150 μm** 130

Figure 97: Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% de DMSO** sur un wafer de silicium recouvert de **C₄F₈**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 µm** et une **distance intergoutte de 150 µm**. 130

Figure 98 : Image de microscopie optique de dépôts obtenus par impression jet d'encre d'une encre de lignine **Organosolv** à 25 g/L solubilisée dans le **1,4-dioxane** et **10% de DMSO** sur un wafer de silicium recouvert de **TMSPMA**. Les gouttes déposées ont un **splat de 80 µm** et une **distance intergoutte de 150 µm**. 130

Figure 99 : Observation AFM des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'une encre de Lignine **Organosolv** à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de **C₄F₈** A) avant et B) après une exposition de 18h au tampon acétate pH 4,6 seul. 136

Figure 100 : Observation AFM des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'une encre de Lignine **Organosolv** à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de **C₄F₈** A) avant et B) après une exposition de 18h à 3 U de laccase de *T. versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6. 137

Figure 101 : Observation AFM des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'une encre de Lignine **Organosolv** à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de **C₄F₈** A) avant et B) après une exposition de 18h à 15 U de laccase de *T. versicolor* solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6. 137

<i>Tableau 1 : Proportion (%) des différentes liaisons retrouvées dans les lignines de feuillus et résineux</i>	10
<i>Tableau 2 : Propriétés des lignines obtenues selon les différents procédés d'extraction (18).</i>	13
<i>Tableau 3 : Solubilité des lignines dans les solvants purs. +++ Dissolution totale, ++ Dissolution avec présence d'un petit culot, + Dissolution partielle, - Insoluble</i>	55
<i>Tableau 4 : Limite de solubilité des lignines dans les mélanges eau/solvants.</i>	55
<i>Tableau 5 : Résumé des résultats de capacité filmogène et de stabilité des lignines dans différents solvants (aqueux, organiques et en mélanges)</i>	57
<i>Tableau 6: Exemples de méthodes GPC utilisées pour l'analyse de lignines ou de molécules modèles de lignines (133)</i>	73
<i>Tableau 7 : Pourcentage de perte d'épaisseur du film solide de lignine Organosolv après contact avec la laccase et/ou le médiateur (ABTS). Les données d'épaisseur ont été obtenues par ellipsométrie.</i>	105
<i>Tableau 8 : Représentation des données de viscosité, de pression de vapeur ainsi que de tension de surface des principaux solvants utilisés lors de cette thèse. (Données de tension de surface : http://www.surface-tension.de/ ; données de viscosité et de pression de vapeur : Wikipédia).</i>	123
<i>Tableau 9 : Photographies des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'un encre de Lignine Organosolv à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de PFTS avant et après une exposition de 18h à 3 U ou 15 U de laccase de <i>T. versicolor</i> réalisée dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau ou en absence d'enzyme (tampon acétate pH 4,6 ou EDI seuls)</i>	134
<i>Tableau 10: Photographies des dépôts solides obtenus par impression jet d'encre à partir d'un encre de Lignine Organosolv à 25g/l solubilisée dans du 1,4-dioxane et en présence de 10 % (v/v) de DMSO sur un support de silicium recouvert de C₄F₈ avant et après une exposition de 18h à 3 U ou 15 U de laccase de <i>T. versicolor</i> solubilisée dans le tampon acétate pH 4,6 ou dans l'eau ou en absence d'enzyme (tampon acétate pH 4,6 ou EDI seuls).</i>	135