



HAL
open science

Prétraitement du miscanthus x giganteus : vers une valorisation optimale de la biomasse lignocellulosique

Roland El Hage

► **To cite this version:**

Roland El Hage. Prétraitement du miscanthus x giganteus : vers une valorisation optimale de la biomasse lignocellulosique. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10063 . tel-01746360

HAL Id: tel-01746360

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746360>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Nancy Université
Faculté des Sciences et Technologies
Ecole Doctorale (Sciences et Ingénierie) Ressources, Procédés, Produits et
Environnement (RP2E)

THESE

Pour obtenir le grade de Doctorat d'Université
Discipline : Sciences du bois et des fibres

Soutenue à Vandœuvre-lès-Nancy le 29 Octobre 2010

Présentée par

EL HAGE Roland

Directeur de thèse : Pr. Nicolas BROSSE

**Prétraitement du *Miscanthus x giganteus*.
Vers une valorisation optimale de la biomasse
lignocellulosique.**

Membres du jury

| | | |
|----------------------|--|---|
| Président : | Pr. René Gruber | Université de Metz, France |
| Rapporteurs : | Pr. Marie-Pierre Laborie Pr. Carlos Vaca-Garcia | Université de Fribourg, Allemagne ENSIACET, France |
| Examineurs : | Pr. Nicolas Brosse Dr. Laurent Chrusciel | Nancy-Université, France Nancy-Université, France |

**Je dédie cette thèse
à ma femme Maria
et à ma famille**

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur André Merlin, directeur du LERMAB, pour son accueil chaleureux, pour ses conseils scientifiques et pour sa bonne humeur.

C'est avec beaucoup de plaisir que j'exprime ici ma profonde gratitude à Nicolas Brosse (Professeur), mon directeur de thèse, pour son encadrement et soutien, sa patience, sa disponibilité et la confiance qu'il m'a témoignée. Nicolas, j'admire tes qualités professionnelles en recherche, mais aussi tes qualités humaines. Tu es toujours à l'écoute des autres même dans les moments difficiles. Je suis très reconnaissant et conscient du temps que tu m'as consacré. Je n'oublierai pas ces nombreuses discussions scientifiques que l'on a pu avoir et le temps que tu as passé pour relire mon travail. La rigueur du travail scientifique à tes côtés et nos discussions en général auront fortement contribué à mon épanouissement scientifique. Je repars riche de tes enseignements et je suis très heureux de t'avoir rencontré et d'avoir travaillé avec toi parce que tu es dynamique, enthousiaste et riche d'idées nouvelles pour faire avancer la recherche.

Je remercie très sincèrement Laurent Chrusciel (Maîtres de conférences). Je suis très admirateur de tes compétences scientifiques impressionnantes dans des domaines très variés. Laurent, je te remercie de m'avoir donné du temps en relisant et en corrigeant le présent travail. Merci pour tes conseils et merci pour ta bonne humeur tout au long de ma présence au laboratoire.

Je remercie Christine Gérardin (Professeur) nouveau membre de l'équipe pour ses conseils scientifiques et pour avoir accepté que j'utilise les appareillages de son laboratoire, ce qui m'ont permis d'avancer plus vite dans mes travaux de recherche.

Je remercie également Antonio Pizzi Professeur au LERMAB site d'Epinal pour ses conseils scientifiques et pour la collaboration avec son thésard Paola Navarrette. Ils m'ont permis grâce à leurs compétences de réaliser des adhésifs et des panneaux de particules.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à Riad Benelmir, Emmanuel Fredon et Stéphane Molina pour les opportunités d'enseignement en tant que vacataire qu'ils m'ont proposées et la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je tiens aussi à remercier tous les thésards et anciens thésards (Poaty Bouddah, Lan Ping, Chi Yuting, Xiong Guobing, Xavier Duret, Chaouch Mounir, Iaych Kamal, Benhadi Siham, Raghoubi Mohamed, Obounou Akong Firman....), le personnel et tous les enseignants-chercheurs du Lermab pour leur aide, leur bonne humeur et les agréables moments que j'ai passés avec eux. Un remerciement particulier s'adresse à Lyne Desharnais (ingénieur) qui m'a aidé à réaliser différentes analyses ce qui m'a permis de finaliser mon travail de thèse.

Je remercie Mehdi Yemloul ingénieur à l'Institut de Chimie et Physique Moléculaires et Biomoléculaires à la faculté des sciences de Nancy-Université, pour sa disponibilité et de son aide pour les analyses par spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire.

Mes remerciements tout particuliers, avec toute mon affection et ma reconnaissance à Corinne Courtehoux, secrétaire du Lermab, pour sa gentillesse, ses aides techniques et administratifs, pour mes divers déplacements et pour sa bonne humeur.

Plus personnellement, je dédie ce travail à ma famille (mon père, ma mère, ma sœur et mes trois frères) au Liban qui m'ont toujours soutenu et apporté beaucoup d'affection.

Enfin je souhaite remercier ma femme Maria, pour tout l'amour qu'elle me donne, ses sacrifices, sa patience infinie et pour le fait de toujours être présente à mes côtés.

Liste des publications réalisées pendant la thèse

El Hage R., Brosse N., Chrusciel L., Sanchez C., Sannigrahi P., Ragauskas A., (2009). Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from Miscanthus. *Polymer Degradation and Stability* 94(10), 1632-1638

Brosse N., El Hage R., Sannigrahi P., Ragauskas A. (2010). Dilute Sulphuric Acid and Ethanol Organosolv Pretreatment of Miscanthus x Giganteus. *Cellulose Chemistry and Technology* 44 (1-3), 71-78

El Hage R., Brosse N., Sannigrahi P., Ragauskas A., (2010). Effect of the Severity of the Ethanol Organosolv Process on the Chemical Structure of Ethanol Organosolv Miscanthus Lignins. *Polymer Degradation and Stability* 95, 997-1003

El Hage R., Brosse N., Navarrete P., Pizzi A., (2010). Extraction, characterization and utilization of Organosolv Miscanthus Lignin for the conception of Environmentally Friendly Mixed Tannin/LigninWood Resins. *Journal of Adhesion Science and Technology* 0, 1-12

Brosse N., El Hage R., Chaouch M., Pétrissans M., Dumarçay S., Gérardin P., (2010). NMR investigations of chemical modifications of Milled Wood Lignin during heat treatment. *Polymer Degradation and Stability* 95, 1721-1726

El Hage R., Chrusciel L., Desharnais L., Brosse N., (2010). Effect of Autohydrolysis of Miscanthus x giganteus on Lignin Structure and Organosolv Delignification. *Bioresource Technology* 101, 9321-9329

El Hage R., Navarrete P., Pizzi T., Brosse N., (2010). Extraction de la lignine de Miscanthus x Giganteus pour la production d'adhésifs pour le matériau bois. *Materiaux et techniques (soumise)*

El Hage R., Dominique P., Brosse N., (2010). Effect of the pretreatment severity on the antioxidant properties of ethanol organosolv Miscanthus x Giganteus lignin. (En cours de rédaction)

Liste des abréviations

AAO : Activité antioxydante

Ar : Aryle

ASL : Lignine soluble dans l'acide

CI : Chromatographie ionique

D₂O : Eau deutérée

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DP_w : Degré de polymérisation en poids

EOL : Lignine Ethanol Organosolv

FT-IR : Infrarouge à transformée de Fourier

G : Guaiacyl

GC-MC : Chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse

H : p-hydroxyphényle

IP : Indice de polydispersité

IR : Infra rouge

LH : Linoléate de méthyle

LK : Lignine de Klason

LS : Lignine soluble

MEB : microscopie électronique à balayage

M_n : Masse moléculaire moyenne en nombre

M_w : Masse moléculaire moyenne en poids

MWL : Lignine de bois broyé (en anglais : milled wood lignin)

MxG : *Miscanthus x Giganteus*

R₀ : Facteur de sévérité

RMN ¹³C : Résonance magnétique nucléaire du carbone

RMN ³¹P : Résonance magnétique nucléaire du phosphore

S : Syringyle

SC : Sévérité combinée

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

TMA : Analyse thermomécanique

UV : Ultraviolet

Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction générale et contexte | 1 |
| Chapitre I. Composition et structure chimique du <i>Miscanthus x Giganteus (MxG)</i> | 8 |
| I.1. Introduction..... | 9 |
| I.2. Composition du <i>MxG</i> | 12 |
| I.2.1. Composition chimique | 12 |
| I.2.2. Extraction et analyses des extractibles du <i>MxG</i> | 13 |
| I.2.3. Analyse de la paille du <i>MxG</i> par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 | 14 |
| I.3. Caractérisation de la lignine de bois broyé (MWL) du <i>MxG</i> | 16 |
| I.3.1. Analyse élémentaire..... | 16 |
| I.3.2 Analyse spectroscopique..... | 16 |
| I.3.2.1 Analyse par RMN du carbone ¹³ C | 16 |
| I.3.2.2 Analyse par RMN du phosphore ³¹ P..... | 19 |
| I.3.2.3 Analyse de la MWL par spectroscopie UV-Visible | 20 |
| I.3.2.4 Analyse par spectroscopie infrarouge (IR) | 21 |
| I.4. Caractérisation de la cellulose du <i>MxG</i> | 23 |
| I.4.1. Détermination de la masse moléculaire moyenne..... | 23 |
| I.4.2. Analyse de la cellulose par la RMN ¹³ C du solide..... | 23 |
| I.4.3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) | 25 |
| I.5 Conclusion | 27 |

| | |
|---|----|
| Chapitre II. Traitement Ethanol Organosolv du <i>Miscanthus x Giganteus</i> | 28 |
| II. Introduction | 29 |
| II.1. Optimisation du traitement éthanol organosolv sur le <i>MxG</i> | 32 |
| II.2. Analyse de la lignine éthanol organosolv (EOL) | 37 |
| II.2.1. Analyse par RMN ¹³ C de la lignine organosolv (EOL6) comparée à la MWL | 37 |
| II.2.2. Analyse de la masse moléculaire moyenne par SEC | 39 |
| II.2.3. Analyse par spectrophotométrie UV-Visible..... | 39 |
| II.3. Impact de la sévérité sur la structure des lignines | 41 |
| II.3.1. Analyse des lignines organosolv par RMN ¹³ C | 41 |
| II.3.2. Analyse des lignines organosolv par RMN ³¹ P..... | 43 |
| II.3.3. Analyse par FT-IR | 45 |
| II.3.4. Analyse de la distribution des masses moléculaires par SEC..... | 46 |
| II.3.5. Discussion et approche mécanistique | 47 |
| II.4. Conclusion | 50 |

| | |
|---|----|
| Chapitre III. Prétraitement de <i>MxG</i> | 51 |
| III. Introduction | 52 |
| III.1. Prétraitement par autohydrolyse..... | 55 |
| III.1.1. Suivre cinétique de la production des sucres et des produits de dégradation en phase aqueuse | 55 |
| III.1.2. Composition des résidus solides..... | 58 |
| III.2. Analyse physico-chimique des MWL après autohydrolyse | 61 |
| III.3. Prétraitement en deux étapes..... | 64 |
| III.4. Observation par microscopie électronique à balayage du <i>MxG</i> natif et traité..... | 68 |
| III.5. Prétraitement par hydrolyse enzymatique | 69 |
| III.5.1. Suivre cinétique des pertes des masse en fonction de la concentration d'enzymes et du temps | 69 |
| III.5.2. Prétraitement par hydrolyse enzymatique pour un traitement organosolv | 70 |
| III.7. Conclusion..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Chapitre IV. Applications pour la lignine éthanol organosolv (EOL) de <i>MxG</i> | 72 |
| IV. Introduction | 73 |
| IV.1. Adhésifs pour panneaux de particules à partir de la EOL..... | 76 |
| IV.1.1. Glyoxalisation de la lignine organosolv et analyse par RMN ¹³ C..... | 76 |
| IV.1.2. Préparation d'adhésifs et analyse par TMA | 77 |
| IV.1.3. Elaboration des panneaux de particules et analyse des propriétés mécaniques | 78 |
| IV.2. Etudes des propriétés anti oxydantes des lignines organosolv | 80 |
| IV.2.1. Inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle (LH)..... | 80 |
| IV. 3. Conclusion | 86 |

| | |
|---|----|
| Chapitre V. Matériels et méthodes | 87 |
| V.1. Matériels | 88 |
| V.1.1. <i>Miscanthus x Giganteus</i> (MxG)..... | 88 |
| V.1.2. Produits chimiques | 88 |
| V.2. Dispositifs et protocoles expérimentaux | 88 |
| V.2.1. Détermination du taux d'humidité..... | 88 |
| V.2.2. Réacteur Parr sous pression..... | 89 |
| V.2.3. Détermination du taux de cendres | 89 |
| V.2.4. Détermination de la composition chimique..... | 90 |
| V.2.5. Extraction de la cellulose..... | 90 |
| V.2.6. Extraction de la lignine de bois broyé (MWL)..... | 91 |
| V.2.7. Prétraitement thermique par autohydrolyse..... | 91 |
| V.2.8. Prétraitement par autohydrolyse avec du 2-Naphtol | 92 |
| V.2.9. Prétraitement enzymatique | 92 |
| V.2.10. Traitement Organosolv et extraction de la Lignine Ethanol Organosolv (EOL)..... | 93 |
| V.2.11. Glyoxalisation de la EOL et préparation d'adhésifs..... | 93 |
| V.2.12. Elaboration de panneaux de particules | 94 |
| V.3. Techniques d'analyses, de caractérisation physico-chimiques et morphologiques | 95 |
| V.3.1. Analyse par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS) des extractibles de <i>MxG</i> | 95 |
| V.3.2. Analyse élémentaire | 95 |
| V.3.3. Analyse par chromatographie ionique (CI) | 95 |
| V.3.3.1. Principe | 96 |
| V.3.3.2. Dosage des sucres | 96 |
| V.4. Analyse par spectroscopie UV visible..... | 97 |
| V.4.1. Principe | 97 |
| V.4.2. Dosage des furanes et de lignines solubles en phase aqueuse..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| V.5. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)..... | 99 |
| V.5.1. Principe | 100 |
| V.5.2. Détermination des masses moléculaires moyennes de la lignine et de la cellulose .. | 100 |
| V.6. Spectroscopie infrarouge (IR) | 101 |
| V.6.1. Principe | 101 |
| V.6.2. Préparation des échantillons..... | 101 |
| V.7. Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) | 102 |
| V.7.1. Principe | 102 |
| V.7.2. RMN du carbone ¹³ C..... | 102 |
| V.7.3. RMN du phosphore ³¹ P | 103 |
| V.7.4. RMN ¹³ C du solide..... | 104 |
| V.8. Analyse thermomécanique (TMA)..... | 104 |
| V.9. Inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle..... | 105 |
| V.10. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)..... | 106 |
| Conclusion générale et perspectives..... | 107 |
| Annexes..... | 110 |

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Photographie d'un champs de <i>MxG</i> au lycée agricole de Courcelles-Chaussy, Metz, France | 2 |
| Figure 2. Représentation schématique des composants de la paroi cellulaire végétale des biomasses lignocellulosiques (Shleser, 1994)..... | 3 |
| Figure 3. Structure chimique de la cellulose | 4 |
| Figure 4. Principaux glucides constituant les hémicelluloses | 5 |
| Figure 5. Structure des monolignols de la lignine dans les plantes herbacées | 5 |
| Figure 6. Complexes lignine-sucres représentés par Sun et al. 1997 | 10 |
| Figure 7. Spectre RMN ¹³ C du solide de la paille de <i>MxG</i> natif | 15 |
| Figure 8. Représentation d'un aldéhyde cinnamique | 17 |
| Figure 9. Spectre de RMN ¹³ C de la MWL de <i>MxG</i> | 17 |
| Figure 10. Représentation des liaisons β-O-4, β-β et β-5 de la lignine..... | 18 |
| Figure 11. Représentation d'un fragment coumarylique de la lignine en position γ | 18 |
| Figure 12. Mécanisme de phosphorylation de la lignine par le TMDP..... | 19 |
| Figure 13. Spectre de RMN ³¹ P de la MWL de <i>MxG</i> | 19 |
| Figure 14. Spectre UV de la MWL de <i>MxG</i> | 20 |
| Figure 15. Spectre FTIR de la MWL du <i>MxG</i> | 21 |
| Figure 16. Spectre de RMN du solide ¹³ C de la cellulose du <i>MxG</i> natif..... | 24 |
| Figure 17. Déconvolution spectrale de la zone C-4 du spectre RMC ¹³ C de la cellulose native de <i>MxG</i> | 24 |
| Figure 18. Représentation d'un dimère de glucose relié par la liaison glycosidique β-(1-4)..... | 26 |
| Figure 19. Spectre FT-IR de la cellulose de miscanthus natif..... | 26 |
| Figure 20. Schéma du traitement organosolv du miscanthus | 32 |
| Figure 21. Pourcentage de lignine résiduelle dans le résidu solide et de lignine sous forme EOL récupérée en fonction de la sévérité combinée (SC) | 34 |
| Figure 22. Pourcentage de furane de lignine soluble et de délignification en fonction de la sévérité combinée (SC)..... | 35 |
| Figure 23. Spectre RMN ¹³ C de la lignine organosolv (EOL6) (A) et de la MWL (B) du <i>MxG</i> | 37 |

| | |
|--|----|
| Figure 24. Expansion du spectre de la lignine organosolv (EOL6) (A) et de MWL (B) | 38 |
| Figure 25. Spectre UV de A) la MWL et de B) la lignine organosolv (EOL 6)..... | 40 |
| Figure 26. Spectres RMN ¹³ C quantitatifs de la MWL, de EOL1, de EOL3 et de EOL5 | 42 |
| Figure 27. Mécanisme de formation de la cétone d’Hibbert | 43 |
| Figure 28. Spectres RMN ³¹ P quantitatifs de la MWL, EOL4, EOL3 et EOL5..... | 44 |
| Figure 29. Variation de la concentration des groupements hydroxyle (en mmol.g ⁻¹ des lignines) en fonction de la sévérité combinée (à partir des spectres de RMN ³¹ P) | 45 |
| Figure 30. Spectre FT-IR des trois lignines organosolv EOL1, EOL3 et EOL5..... | 46 |
| Figure 31. Masse moléculaire moyenne en poids (Mw) des lignines organosolv en fonction de la SC | 47 |
| Figure 32. Mécanisme du clivage solvolytique des liaisons α- aryle éther | 48 |
| Figure 33. Mécanisme du clivage solvolytique des liaisons β- et γ-aryle éther | 48 |
| Figure 34. pH et pourcentage de furanes récupérés dans les phases aqueuses par autohydrolyse en fonction du temps et de la température..... | 55 |
| Figure 35. Pourcentage de xylose récupéré en phase aqueuse après autohydrolyse à 130, 140 et 150 °C en fonction du temps réactionnel..... | 56 |
| Figure 36. Composition des phases aqueuses en sucres, autres que xylose, après autohydrolyse à 130 °C, 140 °C et 150 °C en fonction du temps réactionnel | 57 |
| Figure 37. Composition des résidus solides après autohydrolyse à 130, 140 et 150 °C en fonction du temps | 59 |
| Figure 38. Taux de ligne de Klason des résidus solides avec et sans prétraitement par autohydrolyse | 65 |
| Figure 39. Mécanisme du clivage homolytique des liaisons β-aryle éther (voie a) et mécanisme réactionnel de l’action du 2-naphtol (voie b) | 66 |
| Figure 40. Image microscopique du : a) <i>MxG</i> Native, b) <i>MxG</i> après autohydrolyse et c) <i>MxG</i> après organosolv | 68 |
| Figure 41. Spectres RMN ¹³ C quantitatifs de la lignine EOL4 dans du DMSO (A) et de la lignine après glyoxalisation dans du D ₂ O (B)..... | 77 |
| Figure 42. Module d'élasticité de la lignine organosolv glyoxalée en fonction de la température obtenue par analyse thermomécanique (TMA) | 77 |
| Figure 43. Photographie d’un panneau de particules préparé avec une colle à base de lignine organosolv de <i>MxG</i> | 78 |
| Figure 44. Structure du linoléate de méthyle..... | 80 |
| Figure 45. Mesure de l’activité antioxydante (AAO)..... | 81 |

| | |
|---|-----|
| Figure 46. Influence des lignines (0,2 g/L) sur la consommation d'oxygène lors de l'oxydation de LH | 81 |
| Figure 47. Effet de la sévérité combinée sur l'activité antioxydante | 82 |
| Figure 48. Variation de l'AAO en fonction du nombre de moles des OH phénoliques des lignines.... | 83 |
| Figure 49. Réacteur Parr (4842) sous pression..... | 89 |
| Figure 50. Agitateur chauffant | 92 |
| Figure 51. Système de mélangeage et de pressage pour l'élaboration de panneaux de particules..... | 94 |
| Figure 52. Chromatographie ionique / ampérométrie pulsée | 96 |
| Figure 53. Chromatogramme obtenu par CI des sucres présents dans un étalon | 97 |
| Figure 54. Droites d'étalonnage des solutions de furfural et de HMF | 98 |
| Figure 55. Chromatographie d'exclusion stérique | 99 |
| Figure 56. Montage expérimental pour l'analyse des propriétés antioxydantes (R : réfrigérant) | 105 |
| Figure 57. Microscopie électronique à balayage Hitachi S-4800..... | 106 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Composition du Miscanthus | 12 |
| Tableau 2. Composition massique de <i>MxG</i> signalée dans la littérature | 12 |
| Tableau 3. Analyse des extractibles par GC-MS..... | 13 |
| Tableau 4. Attribution des pics du spectre RMN ¹³ C solide de la paille de <i>MxG</i> | 14 |
| Tableau 5. Quelques valeurs de Dp relatives à des biomasses herbacées fournies par la littérature..... | 23 |
| Tableau 6. Résultats de la convolution spectrale de la région C-4 du spectre RMN ¹³ C de la cellulose | 25 |
| Tableau 7. Conditions opératoires des essais | 33 |
| Tableau 8. Pourcentage de délignification des résidus solides et pourcentage de lignine soluble et de lignine éthanol organosolv solide récupérées en phase aqueuse | 34 |
| Tableau 9. Nomenclature des EOLs analysés physico-chimiquement en fonction de la SC | 41 |
| Tableau 10. Assimilation et quantification des déplacements chimiques des lignines | 42 |
| Tableau 11. Masse moléculaire moyenne en poids (<i>M_w</i>), masse moléculaire moyenne en nombre (<i>M_n</i>) et indice de polydispersité (<i>M_w/M_n</i>) des lignines éthanol organosolv | 46 |
| Tableau 12. Signaux et attributions des spectres RMN ¹³ C de la MWL native et après autohydrolyse | 61 |
| Tableau 13. Valeurs des groupements phénoliques des MWL avant et après autohydrolyse estimées par RMN ³¹ P en mmol/g..... | 62 |
| Tableau 14. Conditions opératoires utilisés pour le du traitement organosolv avec et sans prétraitement | 64 |
| Tableau 15. Bilan total de l'analyses des résidus solides et des phases aqueuses obtenus avec et sans prétraitement..... | 67 |
| Tableau 16. Pertes de masse du <i>MxG</i> en fonction de la concentration en enzymes pour 6 jours d'agitation et suivie cinétique de pertes de masse pour 5 % d'enzymes | 69 |
| Tableau 17. Résultats de l'analyse des résidus solides et des phases liquides en combinant le prétraitement enzymatique et le traitement organosolv..... | 70 |
| Tableau 18. Conditions opératoires et caractérisation mécanique des deux panneaux de particules élaborés..... | 79 |
| Tableau 19. Activités antioxydantes des échantillons de lignines à 4 h..... | 82 |
| Tableau 20. Groupes fonctionnels et zones d'intégration utilisées pour les spectres de RMN ³¹ P des lignines phosphorylées | 104 |

Introduction générale et contexte

Orienter les industries vers l'utilisation des matières premières végétales renouvelables constitue un enjeu majeur. Les ressources végétales offrent de nouvelles stratégies dans le domaine des énergies et matériaux renouvelables en apportant une solution originale face aux risques écologiques et en permettant de diminuer l'effet de serre et la pollution. Elle laisse envisager de nouveaux débouchés pour les filières agricoles ou forestières. En effet, les matériaux naturels lignocellulosiques sont constitués de nombreuses molécules différentes qui, jusqu'à présent, ont été relativement peu valorisées.

Parmi les biomasses lignocellulosiques, le *Miscanthus x Giganteus* (*MxG*) a attiré une grande attention en Europe notamment en France depuis une vingtaine d'années. La recherche sur le miscanthus a commencé en 1983 au Danemark où ont été plantés les premiers *Miscanthus x giganteus*, espèce stérile et très productive. L'étude de cette plante s'est développée un peu partout en Europe de l'Ouest notamment en Allemagne et en Grande Bretagne. Ce roseau de Chine ou herbe à éléphant, originaire de l'Est de l'Asie, est une variété de *Miscanthus* issue de l'hybridation entre le *miscanthus sinensis* et le *miscanthus sacchariflorus*. C'est une graminée pérenne et non alimentaire dont la durée de vie est estimée à une quinzaine d'années.



Figure 1. Photographie d'un champs de *MxG* au lycée agricole de Courcelles-Chaussy, Metz, France

Cette plante se développe à partir de rhizomes : un système racinaire capable d'engendrer de nouvelles pousses. C'est une espèce non invasive dont le métabolisme photosynthétique est de type C4 (photorespiration nulle ou très faible). La culture de cette plante ne présente pas de risque de propagation incontrôlée ou d'envahissement des sites naturels. Elle possède une forte résistance aux parasites et maladies et ne nécessite pas donc l'utilisation de pesticide et d'engrais chimique. La production de biomasse à partir de sa 3^{ème} année d'implantation est de l'ordre de 15 à 25 tonnes de matière sèche par hectare. La tige du miscanthus est composée d'environ 75 à 80 % d'holocellulose et de 25 à 30 % de lignine. Le *Miscanthus x Giganteus* pourrait donc constituer une ressource intéressante en polysaccharides (cellulose et hémicelluloses : majoritairement les xylanes) et en lignine (voir figure 2).

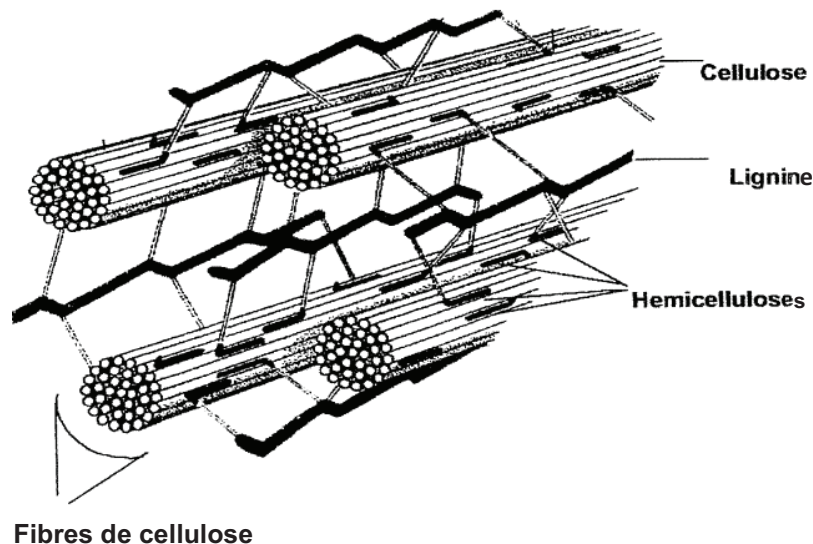


Figure 2. Représentation schématique des composants de la paroi cellulaire végétale des biomasses lignocellulosiques (Shleser, 1994)

D'une façon générale, la cellulose est un polymère régulier du glucose, de formule $(C_6H_{10}O_5)_n$. C'est le biopolymère le plus abondant sur la planète, représentant plus de la moitié de la biomasse terrestre. On estime que la nature produit entre 10^{10} et 10^{11} tonnes de cellulose chaque année constituant à elle seule 50% de la masse végétale [Robert et Roland 1998, Hon 1994]. C'est un homopolysaccharide linéaire constitué d'unités D-glucopyranose reliées par des liaisons $\beta(1-4)$. L'unité de répétition, le cellobiose, est constituée de deux motifs de glucose orientés à 180° l'un par rapport à l'autre autour de la liaison glycosidique

C1-O-C4 (voir figure 3). La réunion de plusieurs de ces macromolécules linéaires, parallèles, forme une fibrille, dont la cohésion est assurée par les liaisons hydrogène qui s'établissent d'une macromolécule à une autre, à partir des groupements hydroxyles. Dans la nature, les chaînes de cellulose ont un degré de polymérisation (DP) moyen d'environ 10000 unités glucopyranose dans le bois et 15000 dans le coton [Sjoström 1993]. Les deux extrémités de la molécule (figure 3) ont une fonctionnalité chimique différente : une extrémité non-réductrice en position C4 et une extrémité réductrice en position C1 (fonction hémiacétale de l'alcool secondaire terminal).

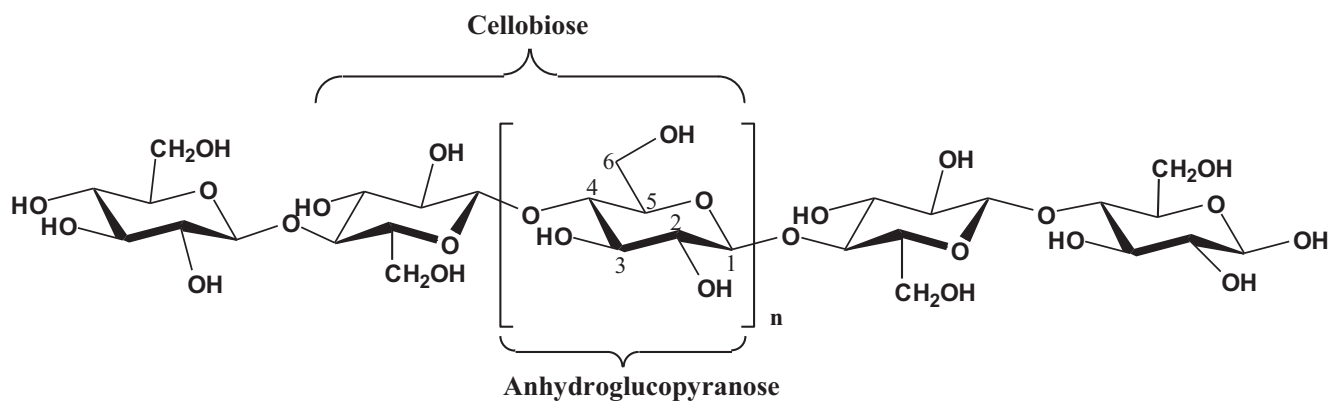


Figure 3. Structure chimique de la cellulose

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides qui sont également des matériaux de support des parois. Ils sont constitués par des sucres en C6 : les hexoses ($C_6H_{12}O_6$) et en C5 les pentoses ($C_5H_{10}O_5$). Assez hydrolysables par les acides [Sjoström 1993], par rapport à la cellulose, les hémicelluloses ne contiennent pas que des unités glucose mais elles sont constituées par cinq sucres monomères principaux (figure 4) : Le L-arabinose, le D-glucose, le D-xylose, le D-mannose, le D-galactose [Sun et al. 1996]. A cause de cette hétérogénéité de leurs constituants chimiques, les hémicelluloses, dans leur état natif, sont de nature amorphe non cristallisable et sont des polymères ramifiés de faible poids moléculaire (avec un degré de polymérisation entre 80 et 200) ce qui rend leur hydrolyse relativement plus facile que celle de la cellulose.

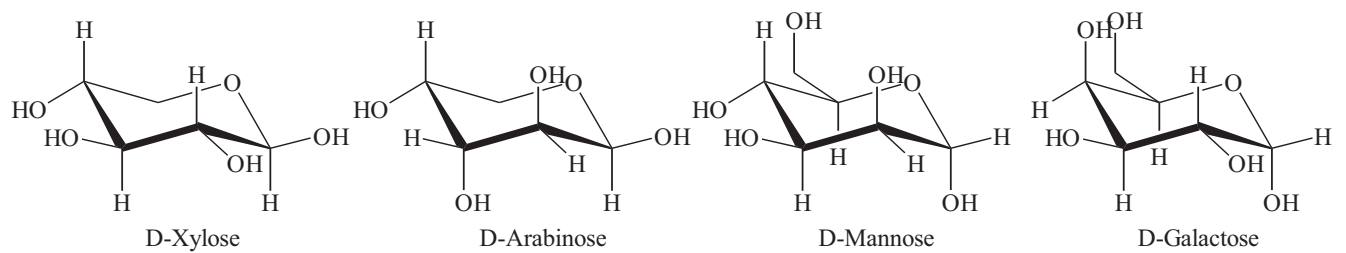


Figure 4. Principaux glucides constituant les hémicelluloses

La lignine est un polymère pariétal qui constitue la partie non glucidique la plus importante et représente le deuxième constituant le plus abondant dans le végétal. C'est un polymère complexe de nature principalement polyphénolique de haut poids moléculaire et dont la structure tridimensionnelle complexe n'est pas connue de façon très exacte [Sarkanen et Ludwig 1971, Argyropoulos et Menachem 1998]. Les lignines sont difficilement dégradées, très résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques. De façon générale, la structure de la lignine naturelle dépend de l'origine botanique, de l'âge de la plante, du type de tissu, des cellules et des couches pariétales dans lesquelles elle se trouve [He et Terashima 1991]. Cette forte variabilité naturelle associée aux variations relevant des méthodes d'analyse rend difficile la présentation de la structure de cette dernière. Différentes études ont montré que la structure de la lignine résulte de la copolymérisation de trois monomères aromatiques de type phénylpropène [Anvar et Mazza 2008-voir figure 5] : **1.** l'alcool coumarylique (unité hydroxyphényle), **2.** l'alcool coniférylique (unité guaiacyle) et **3.** l'alcool sinapylique (unité syringyle), que l'on désigne sous le terme général de monolignols.

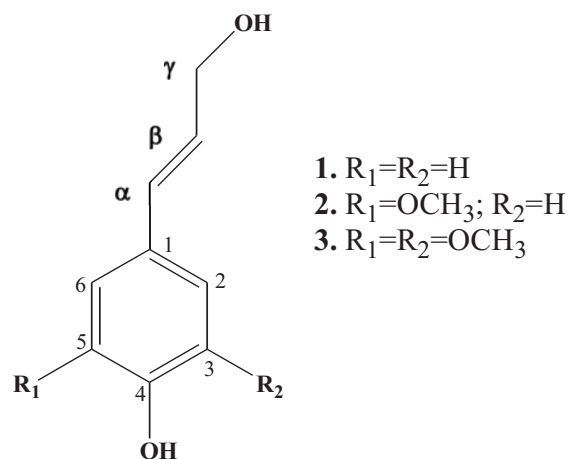


Figure 5. Structure des monolignols de la lignine dans les plantes herbacées

Le concept de bioraffinerie, né dans les années 1980, rencontre un regain d'intérêt face aux nouvelles préoccupations environnementales et aux évolutions du prix des ressources fossiles. Il repose sur le modèle de la raffinerie pétrolière qui utilise du pétrole brut, pour fabriquer des carburants et des produits dérivés variés. De la même façon, ce concept consiste à fractionner la plante puis à purifier et transformer les différents éléments afin d'obtenir des produits aux usages divers dans les domaines énergétique (biocarburants), non énergétique (polymères, tensioactifs, solvants, agromatériaux...) et agroalimentaire (secteur le plus traditionnel jusqu'à aujourd'hui).

L'utilisation des trois biopolymères décrits précédemment nécessite une étape de prétraitement visant à les extraire et les séparer. Plusieurs types de traitements physiques et/ou chimiques pour la conversion et la valorisation de la biomasse ont été proposés : explosion à la vapeur [Glasser et al. 1998, Ballesteros et al. 2006], traitement à l'acide sulfurique [Lloyd et al. 2005, Willfoer et al. 2005], au dioxyde de soufre [Boussaid et al. 2000, Soderstroem et al. 2005], aux solvants organiques [Hasegawa et al. 2004, Pan et al. 2006], au dioxyde de carbone, à l'ammoniac [Foster et al. 2001] et à l'hydroxyde de sodium/ peroxyde d'hydrogène [Chang et al. 1998]. Ces technologies peuvent donner de bons résultats en termes de conversion des sucres, mais une utilisation optimale de tous les composants y compris des composés non saccharidiques constitue un des objectifs principaux.

Dans ce contexte, parmi les diverses méthodes de prétraitement actuellement étudiées, le traitement Organosolv semble être très prometteur puisqu'il produit non seulement un résidu cellulosique potentiellement utilisable pour la production de bioéthanol mais aussi une grande quantité de lignine relativement pure, peu dégradée et peu condensée et qui pourrait avoir de nouvelles utilités dans le monde industriel.

Récemment au niveau de notre laboratoire, **Brosse et al. 2009** ont montré qu'un procédé en deux étapes :

1. Prétraitement par acide sulfurique
2. Traitement organosolv ; ne permet pas seulement une meilleure délignification et un rendement en sucre en phase aqueuse élevé mais aussi l'obtention d'un résidu cellulosique facilement hydrolysable en glucose.

Il est aussi intéressant d'optimiser un autre traitement en deux étapes dont la première consiste en l'utilisation d'un procédé d'autohydrolyse ou d'une hydrolyse enzymatique en utilisant l'eau seule pour la phase aqueuse. Ce sont des procédés verts et respectueux de l'environnement.

C'est dans ce cadre que se situe la présente thèse qui vise à appliquer le principe de la bioraffinerie sur le *Miscanthus x Giganteus*. Nous proposons de la présenter en 4 chapitres :

- Le 1^{er} chapitre décrit une étude sur la composition et la structure chimique du *Miscanthus x Giganteus* (MxG).
- Le 2^{ème} chapitre concerne l'optimisation du traitement organosolv, l'extraction de la lignine organosolv et l'étude de l'impact de la sévérité du traitement sur sa structure.
- Le chapitre 3 est consacré à l'étude d'un prétraitement en 2 étapes : un prétraitement par autohydrolyse, puis un traitement organosolv réalisé avec des conditions très douces.
- Le chapitre 4 propose des applications de la lignine isolée dans le domaine des adhésifs verts et des antioxydants.

**Chapitre I. Composition et structure chimique
du *Miscanthus x Giganteus* (MxG)**

I.1. Introduction

Le *Miscanthus x Giganteus* est une biomasse lignocellulosique dont les caractéristiques générales ont été décrites dans l'introduction et peut être considérée comme source de matière première dans le domaine des énergies et matériaux renouvelables. Sa composition pouvant varier assez fortement en fonction de la source [Ligero et al. 2005, Daiyong et al. 2005, De Vrije et al. 2000, Sørensen et al. 2008], il est nécessaire de déterminer la composition chimique du miscanthus utilisé en déterminant le pourcentage en polysaccharides et en lignine. Pour cela, il existe dans la littérature des méthodes de dosage ou techniques d'analyse normalisées (Tappi T-249) permettant la détermination et la quantification du taux de sucre (dosage analytique), de la lignine de Klason et la lignine soluble (dosage pondérale et spectroscopique).

Le terme lignine est un terme générique qui désigne un ensemble de substances de haut poids moléculaire, de nature non glucidique et de constitution encore mal connue. La lignine n'existe pas seule comme un polymère indépendant dans la nature mais elle est reliée avec d'autres polymères (la cellulose et les hémicelluloses) qui forment ensemble un complexe polymérique. La lignine est souvent associée avec les hémicelluloses par des liaisons covalentes [Sarkanen et Ludwig 1971]. Le complexe lignine-sucre des plantes herbacées a une structure différente de la lignine qui se trouve dans le matériau bois et contient des liaisons féruliques qui la relient aux sucres (arabinoxylanes) *via* des liaisons esters d'acide férulique [Himmelsbach 1993]. Néanmoins, la lignine est nommée comme un complexe de lignine/phénoliques-sucre où l'acide férulique est attaché à la lignine *via* des liaisons éthers et aux sucres *via* des liaisons esters (figure 1 [Sun et al. 1997]). Il semble maintenant admis que ce polymère tridimensionnel provient de la copolymérisation de trois alcools phénylpropénoïques (alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique) [Freudenberg 1965 et Monties 1980].

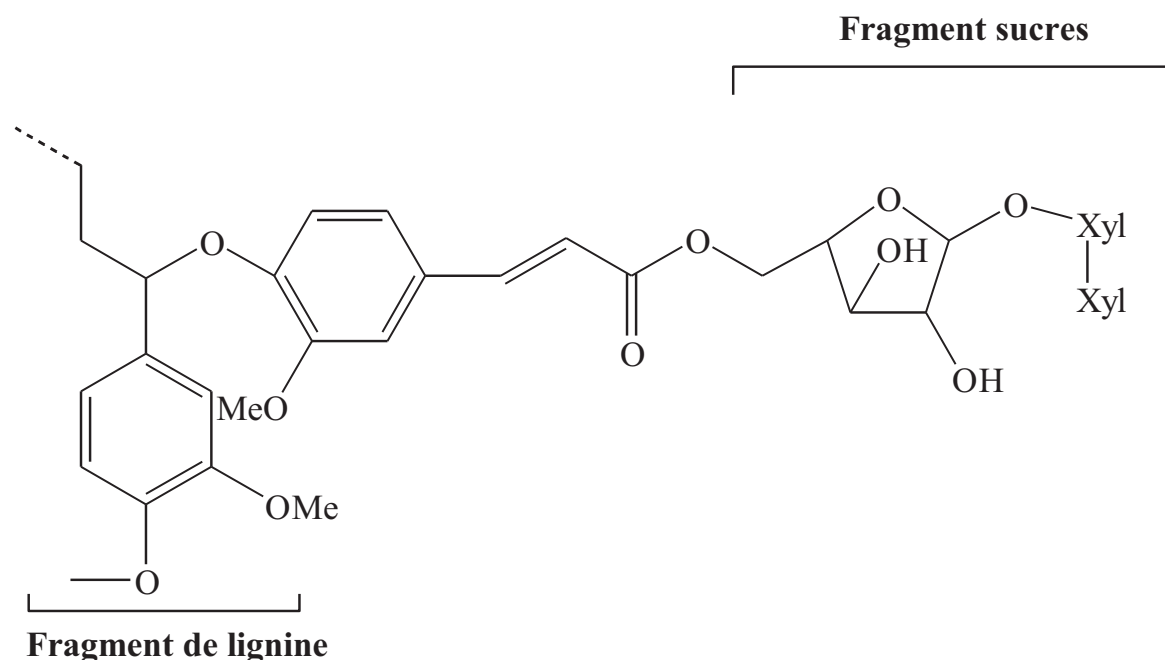


Figure 6. Complexes lignine-sucres représentés par Sun *et al.* 1997

Des études sur la structure de lignine ont montré que contrairement à la lignine du bois, la lignine des herbacées peut naturellement contenir des groupements acétylés en présence d'acide p-coumarylique qui est présent sur la position γ des chaînes latérales de la lignine [Shimada *et al.* 1971, Nakamura et Higuchi 1976]. Des études récentes ont montré que la lignine de maïs, de blé et d'autres herbacées est acétylée exclusivement à la position γ sur les motifs syringyles [Crestini et Argyropoulos 1997, Ralph *et al.* 1999]. Malgré toutes ces études, la structure de la lignine dans son état natif reste toujours mal connue. Différentes méthodes sont présentées dans la littérature pour l'extraction de la lignine. Il existe des méthodes hydrothermiques, chimiques et enzymatiques. Parmi ces méthodes, l'extraction de la lignine de bois broyé (MWL) par traitement chimique doux en utilisant le mélange dioxane-eau comme solvant peut nous permettre d'extraire une lignine qui sera la plus proche de son état natif.

Lorsque nous avons débuté ce travail, la lignine de *MxG* n'avait jamais été décrite dans la littérature d'où l'intérêt de sa caractérisation.

En ce qui concerne la cellulose, c'est une macromolécule à très longue chaîne stéréorégulière formée de maillons de glucose. Le nombre de ces maillons ou degré de

polymérisation varie suivant l'origine de la cellulose. La cellulose existe dans plusieurs états polymorphiques. Pendant de nombreuses années, la cellulose native a suscité l'intérêt d'une large communauté de chercheurs qui cherchait à élucider sa structure cristalline [Meyer et Misch 1937, Honjo et Watanabe 1958, Sarko et Muggli 1974]. La cellulose existe sous la forme de six allomorphes appelés I, II, III_I, III_{II}, IV_I et IV_{II} avec la possibilité pour certains d'entre eux de conversion allomorphique [Chanzy *et al.* 1979, Isogai 1994, Helbert *et al.* 1997]. L'allomorphe I correspond à la cellulose native fibrillaire. Les autres formes sont obtenues par conversion du type I lors de traitements chimiques ou thermiques. Par des expériences de RMN du solide avec polarisation croisée (¹³C CP/MAS), Atalla et VanderHart (1984) ont proposé que la cellulose de type I ait une structure composite contenant deux formes cristallines : une phase triclinique I α à une chaîne par maille et une phase monoclinique I β à deux chaînes par maille. Cette description a été confirmée par des expériences de diffraction électronique sur de la cellulose de paroi cellulaire d'algues [Sugiyama *et al.* 1991], puis simulée numériquement [Viator *et al.* 2000]. La proportion des deux allomorphes I α et I β varie selon l'origine de la cellulose.

Ce chapitre est consacré à la détermination de la composition chimique et à la caractérisation des polymères de lignine et de cellulose du *MxG*. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à sa composition chimique en sucres et composés phénoliques en utilisant des techniques d'analyse normalisées (Tappi T-249). Dans un second temps, une étude physicochimique a été effectuée sur la structure de la lignine de bois broyé (MWL) et de la cellulose extraite à partir de la biomasse.

I.2. Composition du *MxG*

I.2.1. Composition chimique

La composition de la biomasse a été réalisée par l'analyse des sucres et de la lignine de Klason selon la procédure « laboratory analytical procedure » (LAP) décrite par le « National Renewable Energy Laboratory » (NREL). Cette méthode normalisée Tappi-249 consiste en une hydrolyse totale des sucres (cellulose et hémicelluloses) par l'acide sulfurique à 72 % suivie par des dosages pondéraux de la lignine et analyses des sucres en phase aqueuse. Les teneurs en lignine de Klason, en cellulose, en hémicelluloses, en extractibles et en cendres ont été déterminées. Le tableau 1 donne la composition massique du *MxG* utilisé tout au long de cette étude.

Tableau 1. Composition de *Miscanthus*

| Glucose (%) | Xylose (%) | Arabinose (%) | Galactose (%) | Mannose (%) | Lignine de Klason (%) | Lignine soluble (%) | Extractible (%) | Cendre (%) |
|-------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|---------------------|-----------------|-------------|
| 45 ±0,6 | 22,5 ±0,5 | 2,3 ±0,04 | 0,41 ±0,03 | 0,16 ±0,01 | 26 ±0,5 | 0,48 ±0,02 | 1,02 ±0,07 | 2,8 ±0,2 |

Les sucres représentent plus de 70 % de la plante entière et la lignine 26 %. La composition de différents lots de *Miscanthus* décrits précédemment dans la littérature est également donnée pour comparaison dans le tableau 2 ci-dessous. Le *MxG* utilisé dans cette étude a une teneur comparable en lignine de Klason et en sucres trouvés ou signalés dans la littérature.

Tableau 2. Composition massique de *MxG* signalée dans la littérature

| Constituants % | <i>Ligero et al.</i> (2005) | <i>Ye et al.</i> (2005) | <i>De Vrije et al.</i> (2000) | <i>Sørensen et al.</i> (2008) |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Cendres | 0,4 | 0,7 | 2 | 5,9 |
| Extractibles | | | | |
| Celluloses | 64,5 | 72,5 | 38,2 | 40 |
| Hémicelluloses | | | 24,3 | 18 |
| Lignine de Klason | 23,5 | 19,9 | 24,1 | 25 |
| Xylanes | | | 19 | 25 |

1.2.2. Extraction et analyses des extractibles du *MxG*

L'isolement des extractibles du *MxG* a été réalisé par un extracteur soxhlet et en utilisant le chlorométhane comme solvant. Les extractibles isolés à partir de la matière première utilisée dans notre étude ont été récupérés après évaporation du solvant. Les résultats de caractérisation de la teneur en matière sèche des extractibles par analyse GC-MS de la matière première utilisée dans notre étude sont présentés dans le tableau 3. Les résultats montrent que les extractibles sont principalement composés de stérols et d'acides gras (avec une teneur élevée en acide octacosanoïque).

Très récemment et parallèlement à notre étude, **Villaverde et al. (2009)** ont décrit la composition chimique d'extraits lipophiles de l'écorce et le corps de la tige de *Miscanthus x giganteus*. Même si les résultats décrits par ces auteurs sont relativement proches de ceux rapportés dans le tableau 3, quelques différences ont été relevées : dans le cadre de notre étude, des quantités inférieures en composés aromatiques et supérieures en alcools gras et en stérols (du sitostérol et du stigmastérol) ont été observées.

Tableau 3. Analyse des extractibles par GC-MS

| Composés | mg/100 g |
|------------------------------|----------|
| Lignine | |
| Vanilline | 9,07 |
| Acide vanillique | 2,09 |
| Acide cinnamique p-Hydroxyle | 3,90 |
| Acide Férulique | 1,78 |
| Acide gras | |
| C14:COOH | 5,50 |
| C15:COOH | 3,74 |
| C16:COOH | 69,85 |
| Acide oléique | 22,43 |
| Acide linoléique | 42,14 |
| C18:COOH | 12,47 |
| C19:COOH | 1,87 |
| C20:COOH | 12,88 |
| C21:COOH | 0,00 |
| C22:COOH | 9,75 |
| C23:COOH | 11,74 |

| | |
|-------------------------|-------|
| C24:COOH | 12,21 |
| C28:COOH | 23,49 |
| Acide résiniques | |
| Acid Abiétique | 2,04 |
| Alcanols | |
| C22:OH | 0,80 |
| C24:OH | 3,69 |
| C26:OH | 7,99 |
| C28:OH | 71,65 |
| Glycérides | |
| 1-Mono oléoyl glycérol | 5,22 |
| Stérols | |
| Cholest-5-en-24-one | 23,49 |
| Stigmastérol | 42,98 |
| Sitostérol | 77,30 |
| stigmast-4-en-3-one | 19,95 |

I.2.3. Analyse de la paille du *MxG* par résonance magnétique nucléaire du carbone 13

Le spectre obtenu par analyse RMN ^{13}C du solide est représenté sur la figure 7. Les signaux ont été attribués en fonction des données de la littérature [Jair *et al.* 2001, Locci *et al.* 2008, Gilardi *et al.* 1995] et sont rassemblés dans le tableau 4:

Tableau 4. Attribution des pics du spectre RMN ^{13}C solide de la paille de *MxG*

| Symbole | Assimilation |
|---------|--|
| A | C=O de la lignine et des hémicelluloses |
| B | C aromatique de la lignine |
| C | C1 des hémicelluloses et de la cellulose |
| D | C4 de la cellulose cristalline |
| E | C4 de la cellulose amorphe |
| F | C2, C3, C5 des hémicelluloses et de la cellulose |
| G | C6 de la cellulose |
| H | Groupements méthoxy (OMe) de la lignine et des hémicelluloses |
| I | Motifs méthylique des groupements acétates de la lignine et des hémicelluloses |

D'après ce spectre, on observe distinctement les signaux représentatifs des hémicelluloses, de la lignine et de la cellulose. Ce spectre correspond à une matière première lignocellulosique et il est semblable à d'autres spectres de la littérature [Jair et al. 2001, Locci et al. 2008, Gilardi et al. 1995].

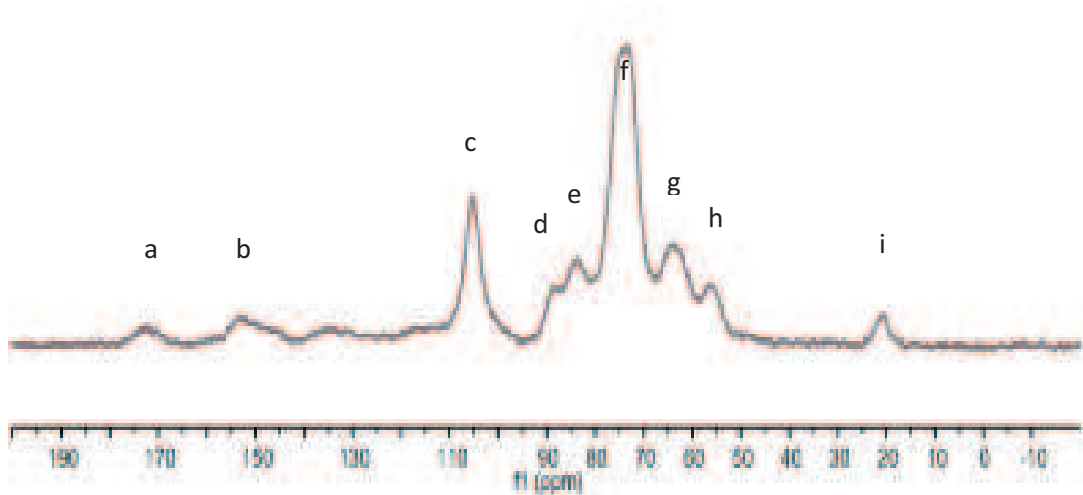


Figure 7. Spectre RMN ^{13}C du solide de la paille de *MxG* natif

I.3. Caractérisation de la lignine de bois broyé (MWL) du *MxG*

La lignine de bois broyé a été extraite en utilisant le dioxane-eau comme solvant (voir partie expérimentale) suivie d'une caractérisation physico-chimique après purification.

I.3.1. Analyse élémentaire

Les compositions élémentaires en carbone, hydrogène, azote et oxygène de la MWL de *MxG* ont été déterminées. Elles sont respectivement : carbone 63,5 %, hydrogène 5,7 %, oxygène 29,2 % et azote 0,2 %. La formule moyenne C₉ calculée à partir de la composition élémentaire est alors C₉H_{9,6}O_{3,1}.

I.3.2 Analyse spectroscopique

I.3.2.1 Analyse par RMN du carbone ¹³C

Le spectre RMN ¹³C quantitatif de la MWL du *MxG* est représenté sur la figure 9. Il est assez similaire aux spectres des biomasses herbacées précédemment décrits [Buranov et Mazza 1998, Jahan et al. 2007]. L'absence de signaux entre 90 et 102 ppm indique une faible concentration en sucres résiduels dans cette lignine. L'intégration de la zone δ 160-102 ppm a été fixée comme référence et est assimilée à 6,12 carbones aromatiques qui représentent ainsi les 6 carbones aromatiques avec une contribution de 0,12 liée aux chaînes latérales insaturées des groupements coniféryliques et coumaryliques [Holtman et al. 2004]. Par conséquent, les valeurs des intégrales sont exprimées par groupement aromatique. Le tableau en annexe 1 rassemble les attributions des signaux du spectre ainsi que la quantification de certains d'entre eux. Un petit pic d'un aldéhyde cinnamique (0,02/Ar, voir figure 8) a été observé à 194 ppm. Dans la région des carbones aromatiques entre 103 et 162 ppm, les unités guaiacyl (G) produisent des signaux à 150,5-149,5 ppm (C-3 étherifiés), 148-147 ppm (C-4 étherifiés), 146 ppm (C-3 non étherifiés), 135,5 (C-1), 119,5 ppm (C-6) et 113-111 ppm (C-2). Les unités syringyle (S) ont été détectées par des signaux à 154-152 ppm (C-3 C-5 étherifiés) et 148 ppm (C-3 C-5 non étherifiés), 138,5 ppm (C-4), 134 (C-1), 105-104 ppm (C-2 C-6). Les unités résiduelles p-hydroxyphenyle (H) ont été détectées par la présence de faibles signaux à 128 et 158 ppm ce qui confirme que la lignine peut être considérée comme une lignine GSH d'herbacés [Xu et al. 2006]. Le ratio guaiacyl / syringyle / p-hydroxyphenyle (G/S/H) a été estimé à ~ 52 % / ~ 44 % / ~ 4 % en se basant sur le nombre de

carbones C-2 par cycle aromatique de l'unité guaiacyle, C-2/C-6 de l'unité syringyle et C-4 de l'unité p-hydroxyphenyle.

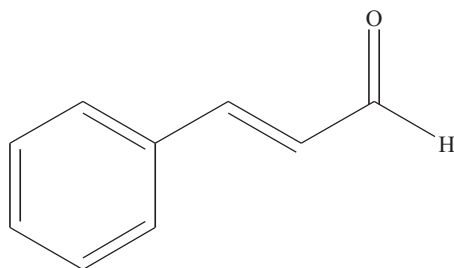


Figure 8. Représentation de l'aldéhyde cinnamique

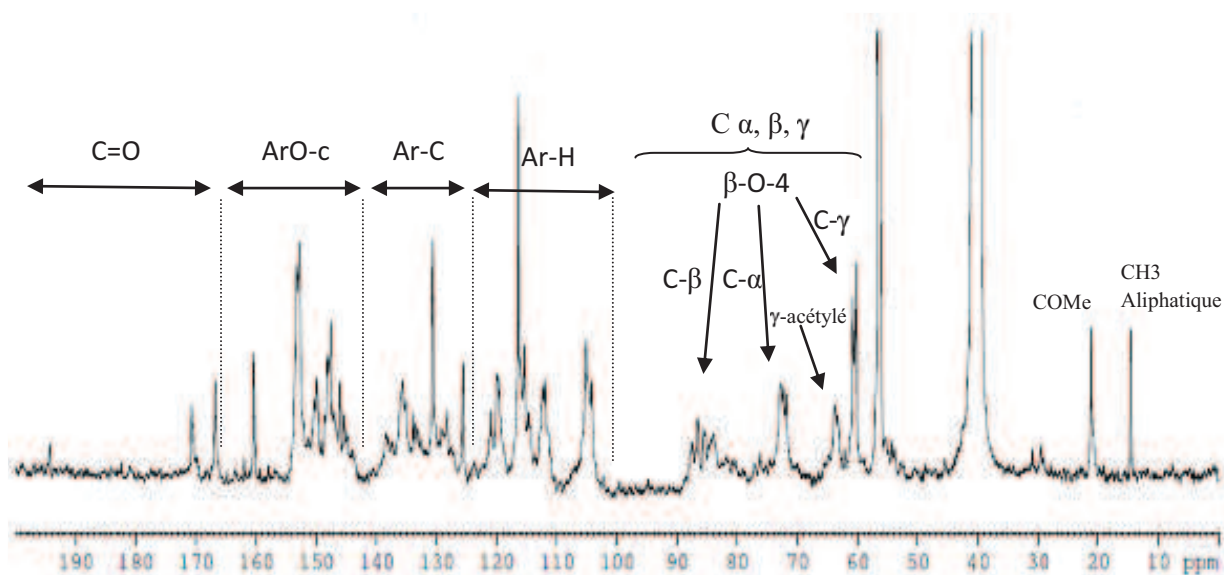


Figure 9. Spectre de RMN ^{13}C de la MWL de MxG

Les liaisons β -O-4 qui constituent les principales liaisons inter-monomériques de la lignine ont été détectées par la présence des signaux à 86,5 ppm, 73 ppm et 61 ppm qui correspondent respectivement à $\text{C}\beta$, $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\gamma$ (voir figure 11). Selon **Capanema et al. (2005)**, il est possible d'estimer la quantité totale des liaisons β -O-4 à partir de l'intégrale 88-82,5 ppm (0,45/Ar qui comprend également les liaisons β -5 et β - β , voir figure 10) à partir de laquelle on soustrait l'intégrale à 54-53 ppm. Par conséquent, la quantité de liaison β -O-4 est alors estimée à 0,41/Ar.

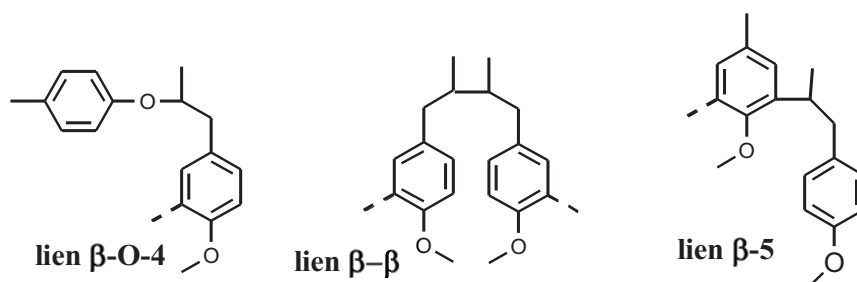


Figure 10. Représentation des liaisons β -O-4, β - β et β -5 de la lignine

Le signal à 64 ppm est attribué à la liaison C γ avec C α = 0. Cette oxydation de chaîne latérale pourrait provenir du processus d'extraction par broyage fin ce qui réduit le degré de polymérisation de la lignine *via* un clivage homolytique, qui résulte de la formation de radicaux libres sur la chaîne latérale qui réagissent avec l'oxygène dans des conditions aérobiques [Xu et al. 2008]. La présence de motifs acides coumariques estérifiés est clairement démontrée comme habituellement dans les plantes monocotylédones par des signaux forts à 167 ppm, 161 ppm, 130,5 ppm, 125,5 ppm et 116 ppm (attribués respectivement aux carbones aromatiques C-O et C-4, C-2 et C-6, C-1, C-3 et C-5). La quantité des résidus p-coumaryliques déterminée par intégration a été estimée à environ 0,1/Ar. La présence de p-coumaryle sur la position γ de la chaîne latérale de la lignine pourrait également contribuer à ce signal à 64 ppm [Crestini et Argyropoulos 1997] (voir figure 10). Des exemples de lignines herbacées coumarylées en position γ ont été décrits dans la littérature par des études RMN [Buranov et Mazza 1998, Crestini et Argyropoulos 1997].

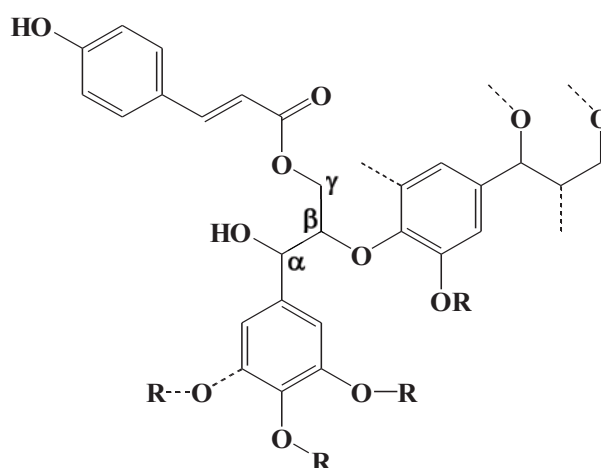


Figure 11. Représentation d'un fragment coumarylique de la lignine en position γ

I.3.2.2 Analyse par RMN du phosphore ^{31}P

La MWL du *MxG* a été analysée quantitativement par RMN du phosphore selon la méthode décrite par **Granata et Argyropoulos (1995)**; un échantillon de lignine est dissout dans un mélange chloroforme deutéré pyridine ; il est ensuite phosphorylée par du 2-chloro-4,4,5,5-tetraméthyl-1,2,3-dioxaphospholane (TMDP) en présence de cyclohexanol utilisé comme référence interne (RI) « voir figure 12 ».

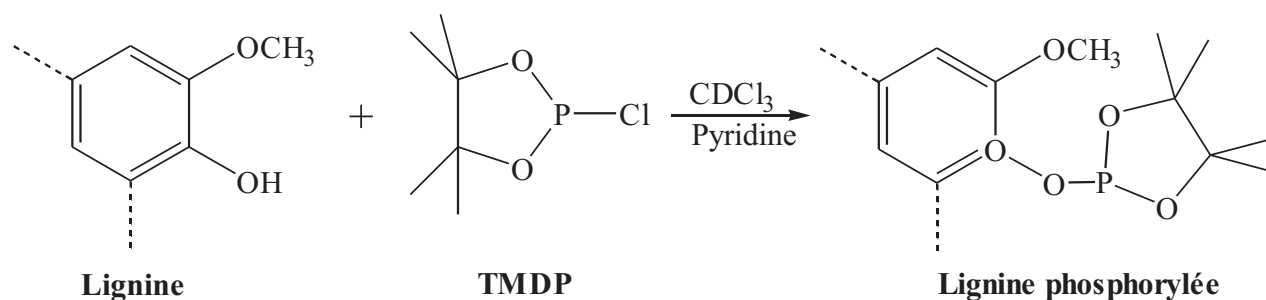


Figure 12. Mécanisme de phosphorylation de la lignine par le TMDP

Le spectre obtenu est représenté sur la Figure 13. La concentration de chaque groupement fonctionnel hydroxyle (en mmol.g^{-1}) a été calculée sur la base des hydroxyles contenus dans la référence interne (le cyclohexanol) et l'intégration de son pic (145 ppm). Le nombre de groupements fonctionnels par unité C9 (group/C9) a été calculé en se référant à l'analyse élémentaire effectuée sur la MWL (Voir annexe 2).

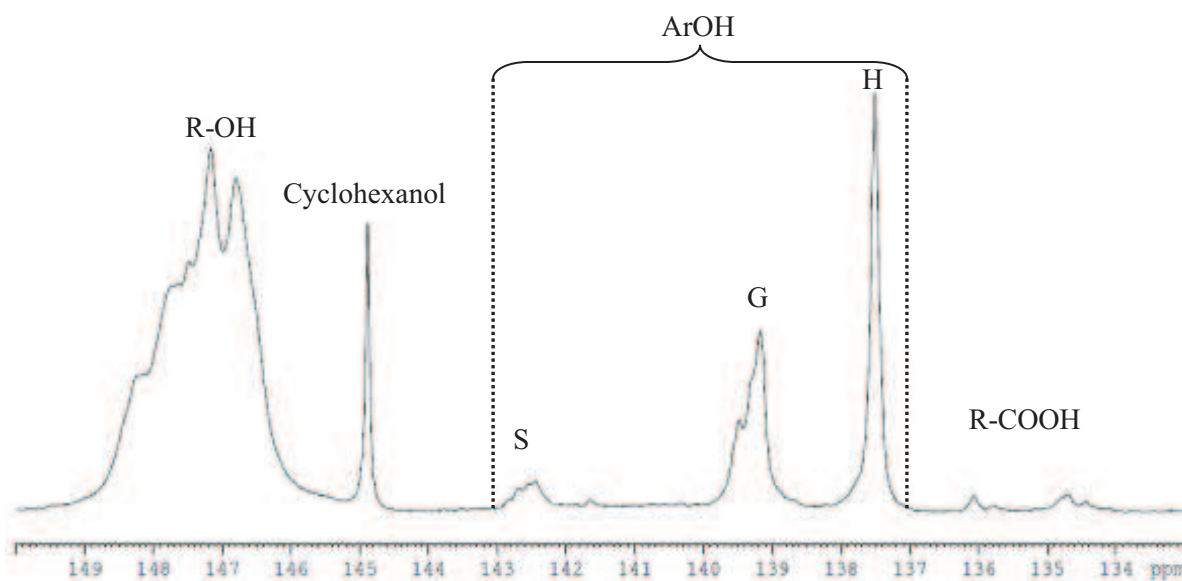


Figure 13. Spectre de RMN ^{31}P de la MWL de *MxG*

Le spectre RMN de la MWL (Figure 13) montre la présence des unités guaiacyles 0,11/C9, de groupements hydroxyles aliphatiques 0,67/C9, de faibles quantités de groupements syringyles 0,04/C9 et un signal fin à 138,2 ppm attribué aux groupements p-hydroxyphenyle 0,11/C9 (voir tableau en annexe 2). Ce signal peut être principalement attribué aux groupements esters p-coumarique porteur d'un hydroxyle phénolique libre, comme décrit dans la littérature [Granata et Argyropoulos 1995]. La quantification de ce signal confirme une même quantité en résidus p-coumarylique estimée précédemment par la courbe d'intégration du spectre RMN ^{13}C précédemment décrit ($\sim 0,1/\text{Aryle}$).

I.3.2.3 Analyse de la MWL par spectroscopie UV-Visible

La mesure d'absorption UV-Visible (figure 14) a été réalisée en utilisant le p-dioxane/eau comme solvant pour une longueur d'onde comprise entre 255 et 330 nm. Cette fraction de la lignine montre un spectre typique de la lignine, avec deux maxima qui proviennent des groupes phénoliques non conjugués et conjugués (acides p-coumarique et férulique) [Xu et al. 2006, Xiao et al. 2001, Seca 2000, Jahan et al. 2007, Xu et al. 2008]. Dans le spectre, une valeur de λ_{max} de 282 nm, similaire à celle observée pour d'autres monocotylédones, correspond à une lignine riche en motifs guaiacyles (unités syringyles correspondant à $\lambda_{\text{max}} = 268\text{-}276\text{ nm}$) [Xu et al. 2008].

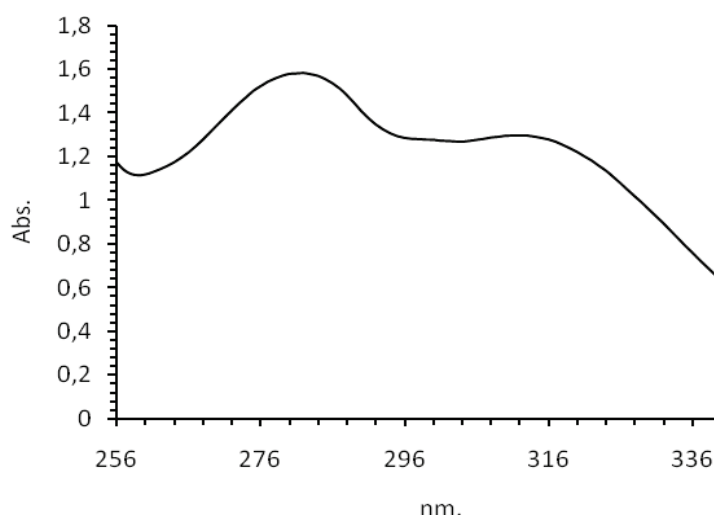


Figure 14. Spectre UV de la MWL de *MxG*

I.3.2.4 Analyse par spectroscopie infrarouge (IR)

Le spectre IR à transformée de Fourier (FT-IR) de la MWL est présenté sur la figure 15. Les attributions des signaux présents sont rassemblées dans le tableau de l'annexe 3, conformément à la littérature [Xu et al. 2006, Sun et al. 2002, Xiao et al. 2001, Seca et al. 2000, Jahan et al. 2007, Capanema et al. 2005, Xu et al. 2008]. Les attributions spectrales FT-IR des lignines herbacées rapportées dans la littérature sont également présentées dans le même tableau [Xu et al. 2006, Jahan et al. 2007]. Les bandes comprises entre 1760 cm^{-1} et 1650 cm^{-1} représentent les fonctions carbonylées. La bande à 1659 cm^{-1} correspond à un groupement carbonyle conjugué et peut être attribuée au groupement ester coumarylique.

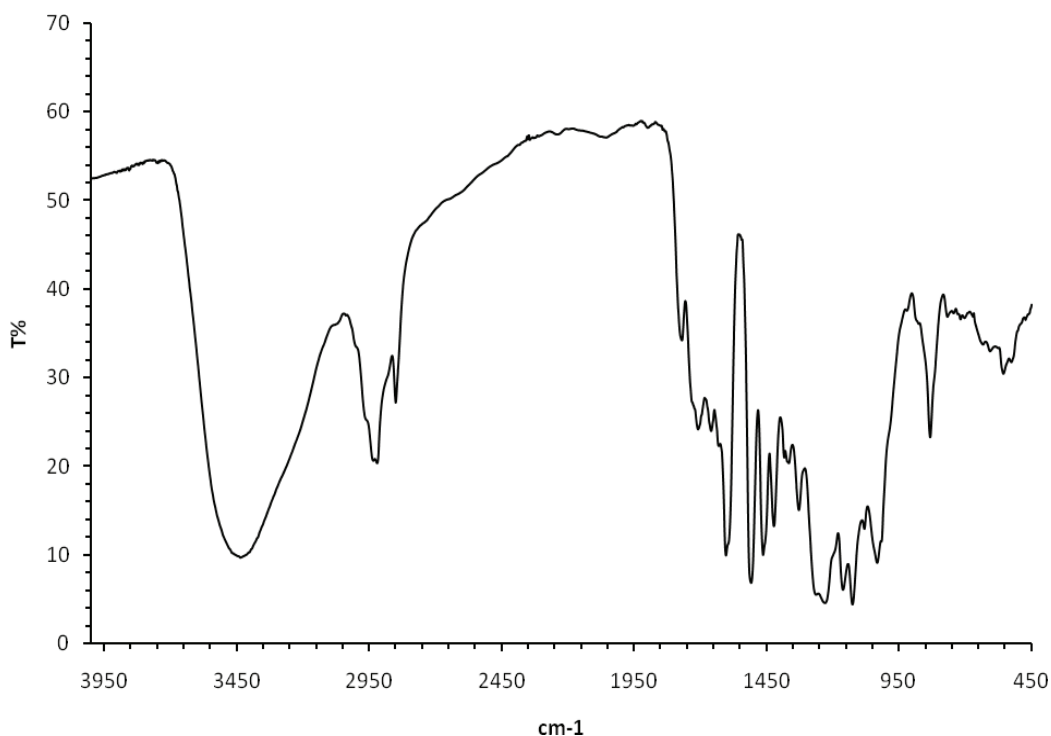


Figure 15. Spectre FTIR de la MWL du *MxG*

Une faible bande à 1769 cm^{-1} présente dans le spectre de la MWL mais absente dans des spectres de la paille de blé et des cannes de jute peut être attribuée à une bande d'élongation d'une fonction carbonyle d'un acétate phénolique [Faix 1992, Hergert 1960]. En outre, le spectre de la MWL présente une absorption à 1268 cm^{-1} (G: guaiacyle) et une autre à 1328 cm^{-1} (S: syringyle) de plus faible intensité suggérant un contenu en syringyle plus faible. Ceci est en accord avec la proportion des unités G et S de la MWL calculées à

partir des spectres RMN ^{13}C et aussi visualisées par dosage UV. Néanmoins, les bandes autour de 830 et 1120 cm^{-1} et un épaulement vers 1159 cm^{-1} indiquent la présence des unités guaiacyle, p-hydroxyphenyle et les unités de syringyle [Seca et al. 2000, Faix 1991].

I.4. Caractérisation de la cellulose du *MxG*

L'extraction de la cellulose de *MxG* a été réalisée en 2 étapes, selon un procédé bien connu : (1) une délignification de la paille de *MxG* par du chlorite de sodium (oxydant) en présence d'acide acétique (2) une hydrolyse acide des hémicelluloses par une solution de 2,5 N d'HCl pendant 4 h. La caractérisation de la cellulose a été réalisée en déterminant la masse moléculaire moyenne par SEC, le taux de cristallinité par RMN ^{13}C du solide ainsi que par FT-IR.

I.4.1. Détermination de la masse moléculaire moyenne

La masse moléculaire moyenne, en poids (M_w), en nombre (M_n), l'indice de polydispersité (I_p) et le degré de polymérisation en poids $DP_w = M_w/519$ ont été déterminés à partir des chromatogrammes obtenus par SEC. La masse moléculaire moyenne en poids de la cellulose du *MxG* est de $1,1403 \cdot 10^6$, la M_n est de $4,5037 \cdot 10^4$, un indice de polydispersité de 25,89. Le degré de polymérisation en poids est de l'ordre de 2197. Cette valeur est notablement supérieure aux valeurs de Dp_w des biomasses herbacées décrites dans la littérature (voir tableau 5).

Tableau 5. Quelques valeurs de Dp relatives à des biomasses herbacées fournies par la littérature

| Dp_w | Biomasse | Référence |
|---------------|----------------------|---------------------------|
| 2197 | <i>MxG</i> | <i>Notre étude</i> |
| 1000 | Buddleja daWidii | <i>Hallac et al. 2010</i> |
| 198,3 | Tiges de Lespedeza | <i>Wang et al. 2009</i> |
| 934,9-1203,3 | Feuille de ray-grass | <i>Liu et al. 2006</i> |
| 357,7 | Tiges de Lespedeza | <i>Wang et al. 2009</i> |
| 1406,5- 822,5 | Canne à sucre | <i>Sun et al. 2004</i> |

I.4.2. Analyse de la cellulose par la RMN ^{13}C du solide

La RMN du solide ^{13}C a été utilisée pour étudier la cristallinité de la cellulose du *MxG*. Le spectre RMN ^{13}C de la cellulose obtenu est donné dans la figure 16. La région C-4 (δ 80-92) du spectre est très informative car elle correspond à la partie cristalline/paracristalline (δ 86-92) et amorphe (δ 80-86) [Atalla et Vanderhart 1999]. Les signaux entre 60-70 ppm sont attribués au C-6 de l'alcool primaire, entre 70-80 ppm à C-2, C-3 et C-5 et entre 98-110 ppm au C-1. Le signal à 21 ppm attribué aux groupements acétyles des

hémicelluloses n'était pas présent dans le spectre. Cela montre qu'il y a eu une hydrolyse totale des hémicelluloses.

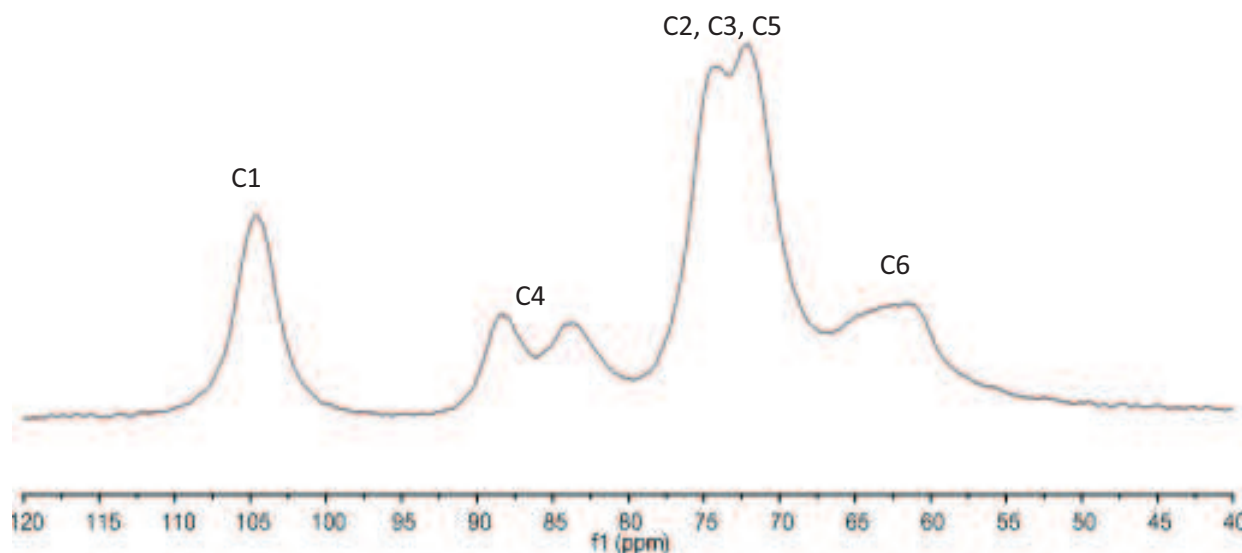


Figure 16. Spectre de RMN du solide ^{13}C de la cellulose du *MxG* natif

La déconvolution de la zone C4 du spectre a été réalisée en utilisant le logiciel NUTS NMR. Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau 6 et la figure 17.

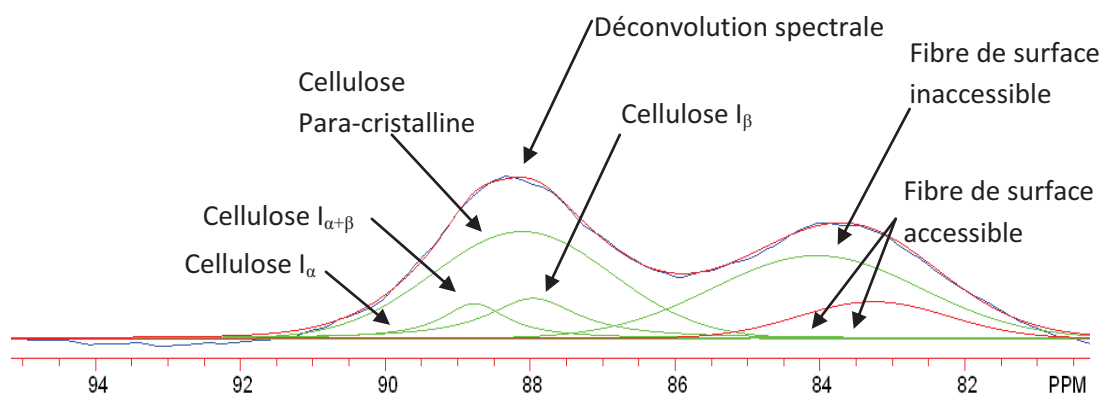


Figure 17. Déconvolution spectrale de la zone C-4 du spectre RMC ^{13}C de la cellulose native de *MxG*

Le degré de cristallinité a été calculé comme étant le ratio des zones d'intégrales 92-86 ppm et 86-82 ppm. La cellulose de miscanthus a un indice de cristallinité de l'ordre de 52,6 % qui est légèrement inférieur à ceux du Lin (70 %), du coton (65 %) et du Kenaf (60 %) [Reddy et Yang 2005], du bois de pin [Sannigrahi et al. 2008] et de peuplier [Foston et al. 2009] (63 %) mais plus élevé que la cellulose native du ray-grass anglais (*Lolium*

perenne), de l'ivraie (33 à 38 %) [Liu et al. 2006], et d'épicéa (48 %) [Maunu et al. 2000]. Les proportions des différentes formes de la cellulose ont été estimées par déconvolution et sont représentées dans le tableau 6. Ces résultats montrent que la cellulose de *MxG* est notamment composée de la forme I β .

Tableau 6. Résultats de la déconvolution spectrale de la région C-4 du spectre RMN ^{13}C de la cellulose

| Attributions | Déplacement chimique (ppm) | Intensité relative (%) |
|------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Cellulose I α | 90,0 | 0,0 |
| Cellulose I $\alpha+\beta$ | 88,8 | 6,7 |
| cellulose <i>Para</i> -cristalline | 88,1 | 37,6 |
| Cellulose I β | 87,9 | 10,8 |
| Fibre de surface accessible | 84,9 | 0,0 |
| Fibre de surface non accessible | 84,0 | 33,9 |
| Fibre de surface accessible | 83,2 | 10,8 |
| Indice de cristallinité (%) | | 52,6 |

I.4.3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

L'analyse par FTIR de la cellulose extraite a été réalisée pour identifier le polysaccharide et déterminer sa pureté. La figure 19 montre le spectre de la cellulose extraite par le traitement de blanchiment. Le spectre obtenu est comparable à d'autres spectres de la cellulose décrits dans la littérature [Wang et al. 2009, Gümüşkaya et al. 2003, Helbert et al. 1997, Sang et al. 2005]. Les absorptions à 3400 cm^{-1} et 2918 cm^{-1} sont respectivement attribuées aux groupements $-\text{OH}$ et C-H (élongation) correspondant aux fragments aliphatiques de la cellulose. Le pic à 1644 cm^{-1} correspond à l'élongation de l'eau adsorbée par le polymère (Sun XF et al. 2004). Les liaisons C-H sont aussi présentes à 1373 cm^{-1} . Les pics présents à 1162 cm^{-1} et 898 cm^{-1} proviennent de l'élongation C-O-C des liaisons glycosidiques β -(1-4). Les pics à 1060 cm^{-1} et 1033 cm^{-1} sont indicatifs des élongations C-O à la position C-3, des élongations C-C et C-O à la position C-6 (voir figure 11) de la cellulose [Liu et al. 2006].

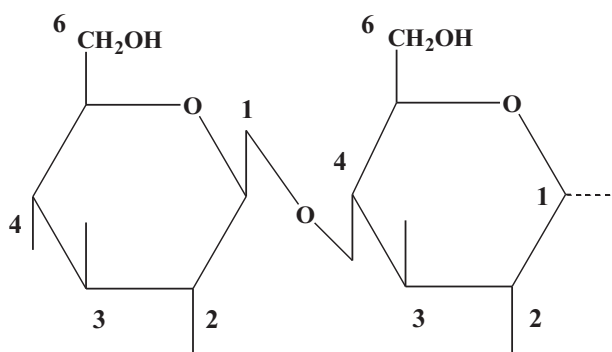


Figure 18 Représentation d'un dimère de glucose relié par la liaison glycosidique β -(1-4)

L'absence du pic à 1520cm^{-1} représentatif des vibrations des motifs aromatiques de la lignine montre l'absence de lignine résiduelle [Liu et al. 2006]. Deux bandes importantes qui permettent l'identification de la structure de la cellulose sont :

- à 1420 cm^{-1} : attribué à la cellulose amorphe et à la cellulose II cristallisée
- à 1430 cm^{-1} : attribué à la cellulose cristalline I.

Le spectre obtenu de la cellulose de *MxG* montre un pic vers 1430 cm^{-1} , indiquant la présence en grande quantité de la cellulose I cristalline. De plus les pics à 710 cm^{-1} et $750\text{-}760\text{ cm}^{-1}$ sont respectivement caractéristiques de la cellulose I β et I α [Gümüskaya et al. 2003, Wada et al. 1995]. D'après le spectre obtenu, seulement un pic à 710 cm^{-1} est présent, ce qui confirme la structure cristalline de type I β de la cellulose de miscanthus. Ceci confirme les résultats obtenus par RMN ^{13}C solide.

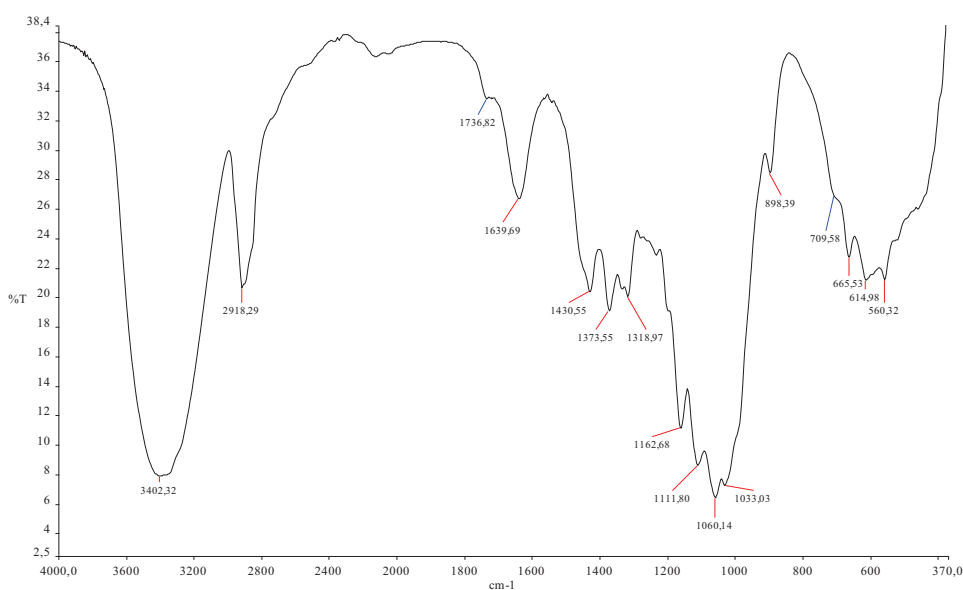


Figure 19. Spectre FT-IR de la cellulose de miscanthus natif

I.5 Conclusion

L'analyse de la paille de *MxG* a permis de montrer qu'elle est constituée à 70 % d'holocellulose dont une teneur importante en xylane 23 %. Ce taux important en polysaccharides confirme le fait que *MxG* pourrait être utilisé comme une matière première pour la production de bioéthanol par voie fermentaire. À partir des caractérisations spectroscopiques (RMN, FTIR et UV) de sa MWL, on conclue que la lignine de *Miscanthus* est de type p-hydroxyphenyle-guaiacyle-syringyle (H-G-S) avec $G > S \gg H$ (estimés respectivement à ~ 52 %, ~ 44 % et ~ 4 %) et ~ 0,41 de liaison β -O-4 par motif aromatique. La lignine extraite est acétylée (~ 0,06/Ar) et coumarylée (~ 0,1/Ar), l'acide coumarique étant lié à la lignine par liaison ester, ce qui est courant dans les plantes monocotylédones. La cellulose de *MxG* a également été analysée et on a pu déterminer par RMN du solide ^{13}C un taux de cristallinité de l'ordre de 53 %.

Chapitre II. Traitement Ethanol Organosolv du
Miscanthus x Giganteus

II. Introduction

Le traitement organosolv est un procédé de délignification qui permet d'extraire la lignine ainsi que les hémicelluloses à partir des biomasses lignocellulosiques. Il permet donc, en utilisant des phases liquides organiques ou aqueuses/organiques, de récupérer les hémicelluloses en phases aqueuses, la lignine précipitée sous forme solide et la cellulose qui reste intacte dans le résidu solide [Duff et Murray 1996]. Il semble que le traitement organosolv soit prometteur dans le domaine de la bioraffinerie des matières premières lignocellulosiques qui considère l'utilisation optimale de leurs trois essentiels constituants (la lignine, la cellulose et les hémicelluloses).

Il est connu que le traitement organosolv est réalisé en utilisant des solvants organiques ou aqueuses/organiques en présence ou en absence de catalyseur acide. Parmi les solvants testés, les plus utilisés sont ceux présentant une faible température d'ébullition comme l'éthanol et le méthanol; d'autres alcools à température d'ébullition plus élevées ont été aussi utilisés (éthylène glycol, glycérol, l'alcool tetrahydrofurfurylique) ainsi que d'autres composés organiques (Ex. diméthylesulfoxyde, éthers, cétones et phénols [Thring et al. 1990]. La plupart des traitements organosolv réalisés à une température élevée (185-210 °C) ne nécessite pas l'ajout d'un acide; en effet dans cette gamme de température, il y a production d'acide organique (les acides carboxyliques) issue de la dégradation des sucres de la biomasse qui peuvent jouer le rôle de catalyseur pour la rupture des liaisons lignine-sucres [Duff et Murray 1996]. Par contre, l'ajout d'acide durant le traitement augmente considérablement le pourcentage de délignification et permet une meilleure récupération des xyloses. Les acides minéraux : acide chlorhydrique, acide sulfurique, et acide phosphorique sont des bons catalyseurs qui accélèrent la délignification et la dégradation des xylanes, mais on peut aussi envisager l'utilisation d'autres acides comme les acides formique, oxalique, acétyle salicylique et salicylique [Sun et Cheng 2002]. La plus grande partie de la lignine et des hémicelluloses est solubilisée mais la cellulose reste intacte dans le résidu solide. Les solvants organiques utilisés dans le processus nécessitent d'être recyclés pour réduire le coût du traitement [Zhao et al. 2009].

Dans ce contexte, parmi les diverses méthodes de prétraitement actuellement étudiées, le traitement Ethanol Organosolv semble être très prometteur. L'utilisation de l'éthanol pour traiter le bois existe depuis la fin de 19^{ème} siècle, mais uniquement dans le but d'analyser le bois [Muurinen et al. 2000]. Depuis les années 40, différents traitements de délignification par l'éthanol ont été décrits (sans catalyseur, avec catalyseur acide ou basique, avec un mélange d'oxygène/éthanol) [Muurinen et al. 2000, Lopez et al. 2006, Wu et al. 2003]. Récemment, les travaux de Neilson et al. (1983) ont montré l'amélioration apportée par le traitement éthanol organosolv sur l'hydrolyse enzymatique des résidus cellulosiques.

Comparé au méthanol, l'éthanol est beaucoup moins toxique et moins dangereux. L'éthanol est facilement récupéré par simple distillation mais son prix plus élevé que celui du méthanol. On aboutit à un traitement légèrement plus coûteux [Chum et al. 1985]. L'éthanol a une température d'ébullition faible, ce qui facilite sa récupération après le traitement et a pour avantage de réduire la consommation d'énergie. Notons aussi que l'éthanol est le seul solvant organique non toxique pour l'homme.

Ce processus de délignification par l'éthanol est l'un des processus les plus étudiés de nos jours pour la conversion des biomasses lignocellulosiques. Le prétraitement le plus étudié est celui qui nécessite l'utilisation d'un mélange d'une solution aqueuse/éthanol en présence d'acide sulfurique comme catalyseur. Ce traitement est très bénéfique puisqu'il produit non seulement un résidu cellulósique potentiellement utilisable pour la production de bioéthanol [Brosse et al. 2009, Pan et al. 2007 et 2008, Pan et al. 2005] mais aussi une grande quantité de lignine relativement pure, non dégradée et peu condensée. Néanmoins, très peu d'études détaillées sur l'impact de la sévérité du traitement sur sa structure ont été effectués.

L'étude que nous allons présenter dans ce chapitre consiste en une investigation du traitement Ethanol Organosolv sur le *MxG* comme biomasse lignocellulosique. Dans un premier temps nous proposerons une série de traitements réalisés sur le *MxG* en faisant varier le rapport éthanol/eau, la concentration en acide sulfurique ainsi que la température du traitement. Les pertes de masse, le taux de lignine de Klason, le pourcentage en furane (provenant de la dégradation des sucres) et en lignine soluble ainsi que le pourcentage de délignification seront mesurés et calculés pour chaque traitement. Ensuite, nous évaluerons l'impact de la sévérité du traitement sur la structure physicochimique des lignines extraites en

utilisant la résonance magnétique nucléaire du carbone ^{13}C et de phosphore ^{31}P , l'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie UV-visible et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). L'ensemble de cette étude révélera une approche mécanistique pour évaluer l'effet de cette optimisation et de ce traitement sur la lignine de *MxG*.

II.1. Optimisation du traitement éthanol organosolv sur le *MxG*

Le traitement organosolv a été réalisé et optimisé sur le miscanthus selon le protocole général présenté sur la figure 20. Les conditions opératoires détaillées de cette optimisation ont été inspirées des travaux de **Pan et al. (2006), (2007) et (2008)** optimisées sur différentes essences de bois et sont représentées dans le tableau 7 :

- Une gamme de température entre 160 et 190 °C
- Un temps réactionnel d'une heure
- Un rapport éthanol (à 95 %) / eau entre 0,5 et 0,8
- Une concentration d'acide sulfurique qui varie entre 0,5 et 2 % (w/w).

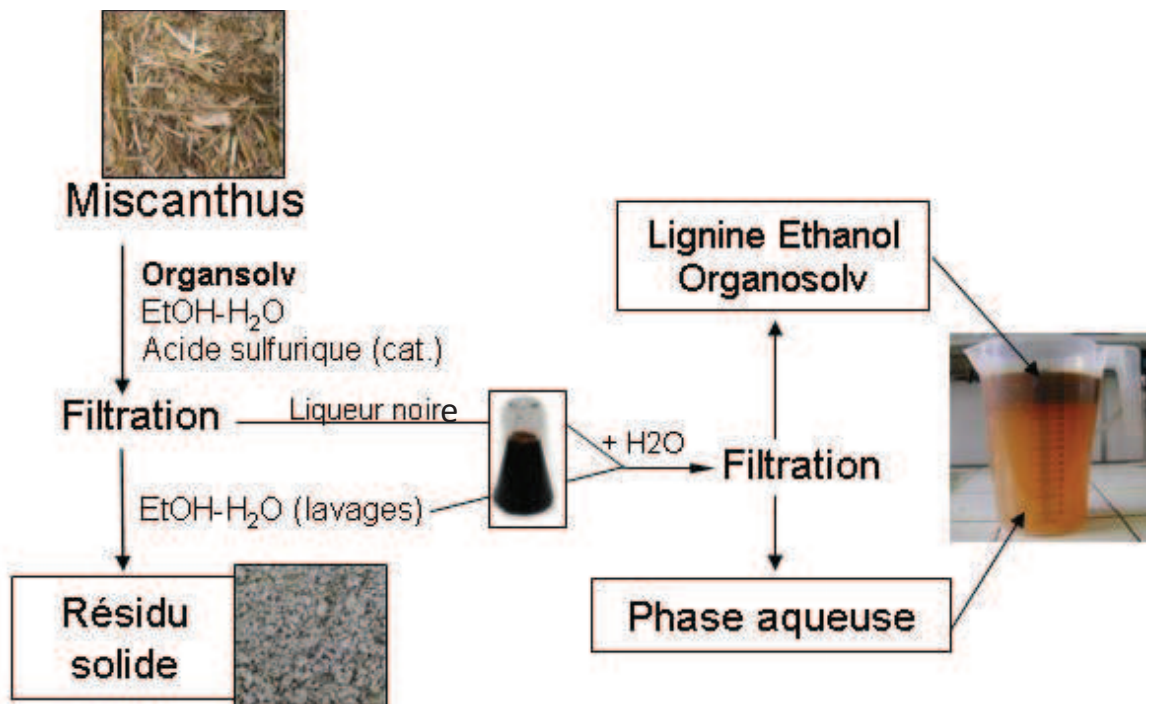


Figure 20. Schéma du traitement organosolv du miscanthus

Comme le montre la figure 20, à la fin de chaque expérience, le *MxG* traité est filtré sous vide modéré. La pâte est lavée avec un mélange d'éthanol/eau (8/2). On récupère un résidu solide blanchâtre et une solution de liqueur noire. Les phases liquides sont rassemblées et 3 volumes d'eau y sont ajoutés pour précipiter la lignine éthanol organosolv (EOL) qui sera récupérée par centrifugation et filtration puis séchée et enfin pesée.

La réalisation de ces traitements nécessite d'étudier l'influence de plusieurs paramètres. Pour comparer les conditions opératoires des différents essais, les paramètres opératoires sont reliés par une formule mathématique en utilisant l'indice de sévérité combinée (SC) qui décrit la sévérité du traitement en fonction du temps réactionnel (t : minutes), de la température (T °C) et du pH. SC est calculé par la formule suivante [Montane et al. 1998] :

$$SC = \text{Log}(R_0) - pH$$

$$\text{où } \text{Log}R_0 = \frac{\text{Log}(t \cdot \exp[T - T_{\text{Réf}}])}{14,7} \text{ et } T_{\text{ref}} = 100^\circ\text{C}$$

Dans notre étude, les conditions opératoires utilisées correspondent à des indices de sévérité allant de 1,41 à 3,02 (temps de traitement de 60 minutes, avec un ratio liquide/solide égal à 8/1). Le calcul des indices de sévérité combinée nous a permis de comparer les essais entre eux.

Tableau 7. Conditions opératoires des essais

| Essais | Température (°C) | Ethanol/eau (%) | Acide sulfurique (%) | pH | Sévérité combinée |
|--------|------------------|-----------------|----------------------|------|-------------------|
| 1 | 160 | 80 | 0,5 | 2,14 | 1,41 |
| 2 | 170 | 80 | 0,5 | 2,14 | 1,69 |
| 3 | 170 | 65 | 0,5 | 2,08 | 1,75 |
| 4 | 180 | 65 | 1,0 | 2,05 | 2,08 |
| 5 | 190 | 65 | 1,0 | 2,05 | 2,38 |
| 6 | 190 | 65 | 1,2 | 1,65 | 2,77 |
| 7 | 190 | 50 | 1,6 | 1,49 | 2,93 |
| 8 | 190 | 50 | 2,0 | 1,41 | 3,02 |

A la fin de chaque traitement, la perte de masse relative des résidus solides a été déterminée; la lignine de Klason (LK) et la lignine soluble (LS) correspondant à chaque résidu solide ont été quantifiées. A partir de ces valeurs, il est alors possible de calculer le pourcentage de délignification en se référant à la quantité de lignine extraite. Concernant la lignine extraite par le traitement organosolv, des analyses de la phase aqueuse isolée à partir de chaque traitement ont également été effectuées :

- le dosage spectroscopique par UV de la lignine soluble.
- les dosages des fractions de lignine éthanol organosolv récupérées sous forme solide.

Enfin, le pourcentage en furane a été estimé pour évaluer l'impact des conditions réactionnelles sur la récupération des sucres. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 8.

Tableau 8. Pourcentage de délignification des résidus solides et pourcentage de lignine soluble et de lignine éthanol organosolv solide récupérées en phase aqueuse

| SC* | Perte de masse (%) | ¹ LK (%) | ² ASL (%) | Délignification (%) | ³ LS (%) | ⁴ EOL (%) | Furanes (%) |
|------|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------------|
| 0 | 0 | 26,00 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,69 | 18,51 | 14,15 | 1,30 | 40,54 | 10,10 | 0,41 | 0,68 |
| 1,75 | 55,96 | 6,62 | 0,48 | 72,90 | 15,29 | 2,8 | 0,87 |
| 2,08 | 51,90 | 2,46 | 0,14 | 90,19 | 7,30 | 16,31 | 1,40 |
| 2,38 | 53,23 | 2,22 | 0,10 | 91,27 | 7,23 | 16,05 | 1,52 |
| 2,77 | 57,46 | 2,10 | 0,05 | 91,86 | 6,47 | 15,92 | 3,18 |
| 2,93 | 71,38 | 2,32 | 0,02 | 91,15 | 5,06 | 18,46 | 8,68 |
| 3,02 | 78,12 | 3,64 | 0,10 | 85,90 | 6,18 | 17,49 | 10,61 |

* Sévérité Combinée (SC), ¹LK (lignine de Klason), ²ASL (lignine soluble dans l'acide), ³LS (lignine soluble dans la phase aqueuse), ⁴EOL (lignine éthanol organosolv)

Les figures 21 et 22 représentent respectivement :

- le pourcentage de lignine résiduelle dans les résidus solides ainsi que le pourcentage de lignine précipitée et récupérée (EOL) en fonction de la sévérité combinée (SC) (figure 21).
- Le pourcentage de furane et de délignification en fonction de SC (Figure 22).

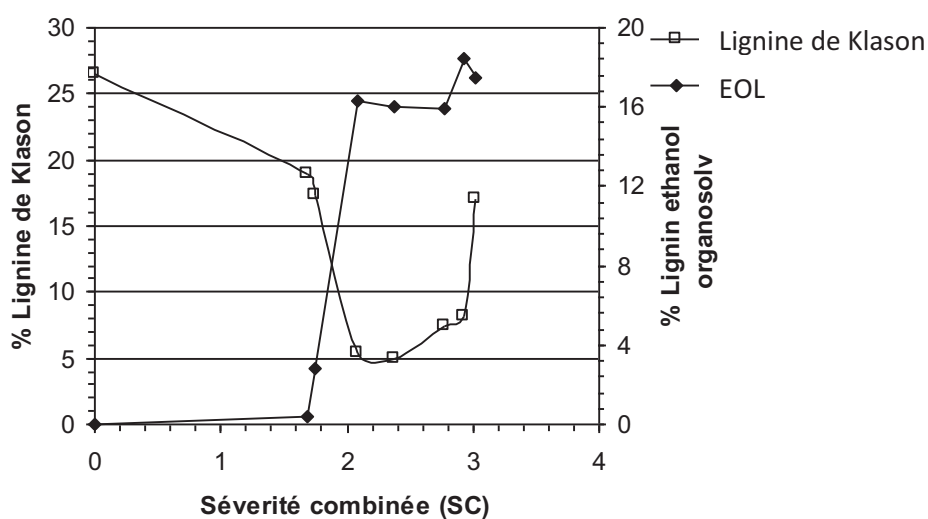


Figure 21 Pourcentage de lignine résiduelle dans le résidu solide et de lignine sous forme EOL récupérée en fonction de la sévérité combinée (SC)

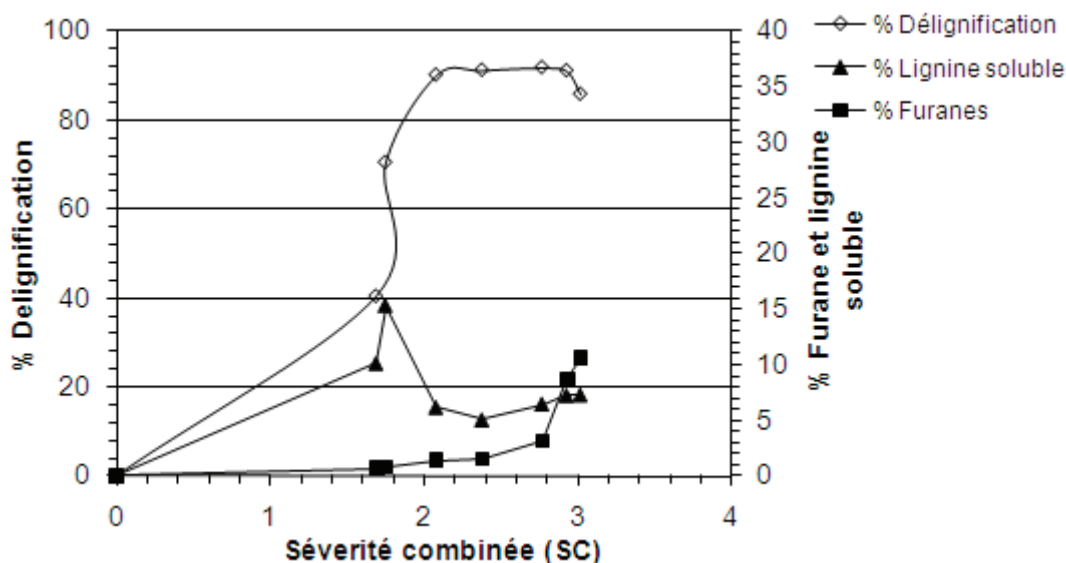


Figure 22. Pourcentages de furanes, de lignine soluble et de délignification en fonction de la sévérité combinée (SC)

D'après la figure 21, on remarque que pour des sévérités faibles à moyennes ($SC < 2,5$), une augmentation de sévérité du traitement entraîne une augmentation des rendements en EOL pour atteindre un plateau aux environs de 16 % et une diminution importante de contenu en LK du résidu solide. Comme le montre la lignine soluble dans la phase aqueuse, on remarque que ce pourcentage augmente avec la sévérité et atteint un maximum de 15 % pour une sévérité combinée de 1,74 ce qui explique l'augmentation du pourcentage de délignification et la faible teneur en lignine récupérée sous forme EOL (figure 22). Pour des sévérités supérieures, on observe une chute brutale vers un minimum de l'ordre de 5 % (figure 22) accompagnée d'une augmentation du pourcentage de délignification pour atteindre (pour $SC > 2$) un rendement de délignification > 90 % (figure 22).

Cette observation semble montrer qu'à faible sévérité ($SC < 2$), les conditions réactionnelles conduisent à une délignification partielle par hydrolyse de la lignine et à la formation de fragments de faibles masses moléculaires, solubles. Par contre, pour des $2,5 > SC > 2$, un excellent rendement de délignification est observé avec récupération optimale de la lignine sous forme de EOL insoluble résultant de réactions de repolymérisation des fragments. Pour des SC plus élevées ($SC > 2,77$), une augmentation significative de la teneur en lignine de Klason dans la pâte a été observée. Cela peut être expliqué par la forte dégradation des oligosaccharides des résidus solides, ce qui se traduit par des valeurs de perte de masse importantes (> 70 %).

Cette hypothèse est confortée par le fait que pour des SC supérieures à 2,8, une augmentation rapide du taux de furane avec l'augmentation de sévérité a été observée dans les phases liquides, comme le montre la figure 3. Cette observation confirme une forte dégradation des sucres (aux alentours de 10 % de la matière sèche initiale). Il apparaît donc, d'après l'ensemble de ces résultats, que les conditions optimales de ce traitement se situent pour des sévérités combinées aux alentours de 2 : ainsi, en utilisant ces conditions, nous obtenons un rendement de délignification élevé accompagné d'un bon rendement en lignine récupérée sous forme EOL et enfin une très faible production de furane dans la phase aqueuse.

II.2. Analyse de la lignine éthanol organosolv (EOL)

Afin de mieux comprendre l'impact du procédé organosolv sur la structure de la lignine isolée, une investigation structurale (RMN ^{13}C , RMN ^{31}P , SEC et UV) a été effectuée pour l'une des fractions de lignine extraite (EOL6) en la comparant avec la MWL décrite dans le premier chapitre.

II.2.1. Analyse par RMN ^{13}C de la lignine organosolv (EOL6) comparée à la MWL

Les spectres de RMN de carbone ^{13}C quantitatifs de la lignine de bois broyé (MWL) et de la lignine éthanol organosolv (EOL6) de *MxG* sont représentés sur la figure 23. L'attribution des signaux et des analyses quantitatives des spectres a été décrite au chapitre 1.

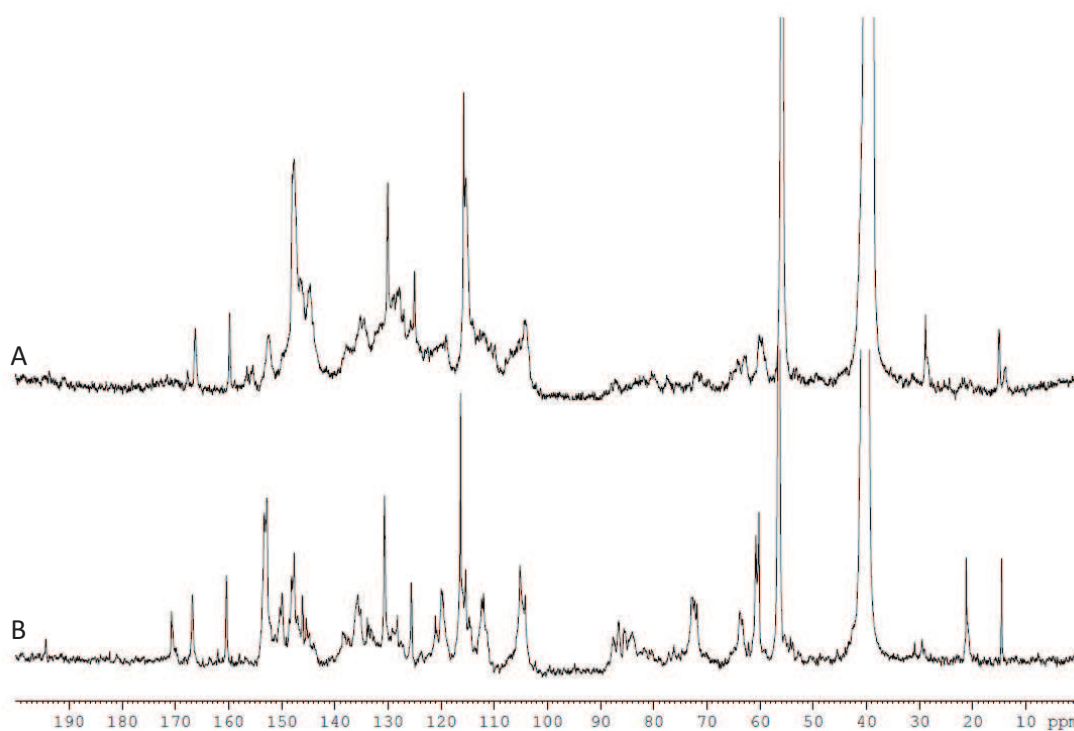


Figure 23. Spectre RMN ^{13}C de la lignine organosolv (EOL6) (A) et de la MWL (B) du *MxG*

Les deux spectres (figure 23) montrent une similarité entre MWL et EOL; on retrouve les mêmes groupes de signaux, même allure générale et absence de signaux correspondant aux sucres. Cette observation confirme que la lignine organosolv est une lignine relativement

peu modifiée. Néanmoins, les spectres montrent quelques différences principales vers deux régions :

- La région aliphatique (60-90 ppm) correspondant aux carbones $C\alpha$, $C\beta$ et $C\gamma$
- La région aromatique (145-152 ppm); la figure 24 présente une expansion de cette région montrant que l'intensité des carbones aromatiques ArOR des motifs guaiacyle et syringyle est moins intense et les ArOH plus intense dans le spectre de la lignine organosolv EOL6 comparée à la MWL. Ces modifications démontrent un clivage des liaisons aryles éther.

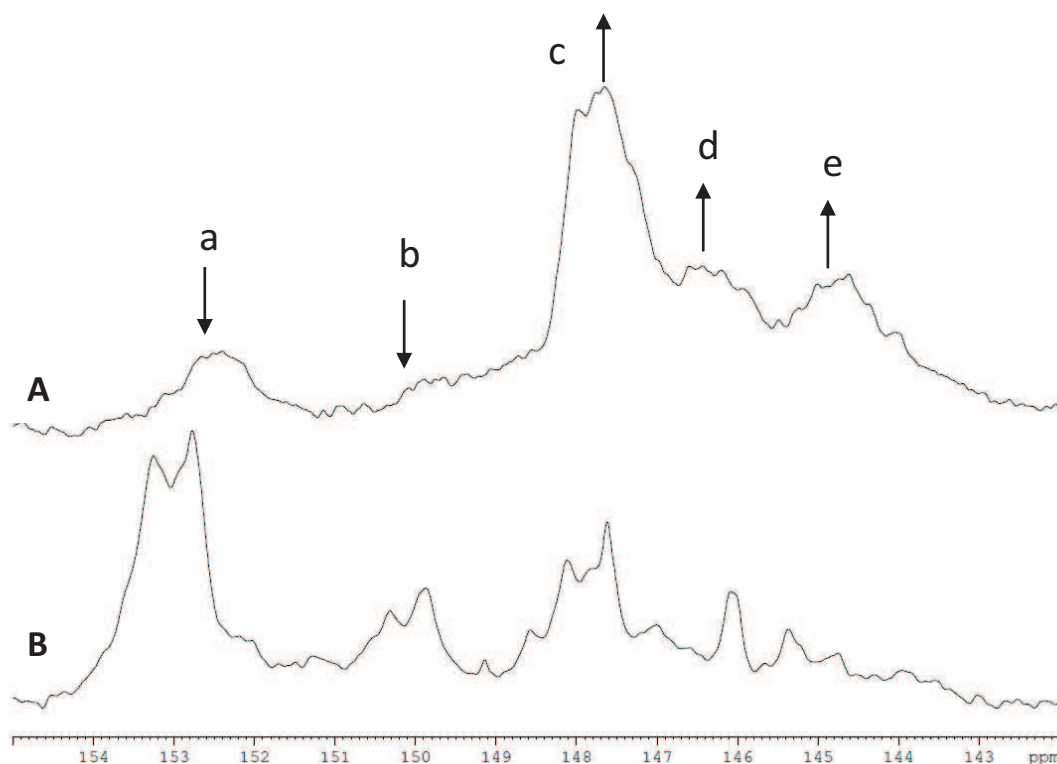


Figure 24. Expansion du spectre de la lignine organosolv (EOL6) (A) et de MWL (B)

Attribution des pics a-e. a : C3-C5 S étherifié ; b : C3 G étherifié ; c : C3-C5 S non étherifié ; d : C3 G non étherifié ; e : C4 G non étherifié

On observe que les groupements acétate (171 ppm) et cinnamaldéhyde (194 ppm) présents dans le spectre de la MWL sont absents dans celui de la lignine organosolv (EOL6) (figure 23) et l'intensité des signaux correspondant aux groupements p-coumaryle a diminué de presque moitié comparée à celle de la MWL (voir tableau : annexe 4). Ces observations peuvent être expliquées par une hydrolyse acide des groupements acétate et cinnamaldéhyde

durant le traitement organosolv. On observe pour la lignine organosolv que le nombre des carbones aromatiques condensés (Ar-C) augmente et celui des aromatiques protonés (Ar-H) diminue, cela traduit une augmentation du degré de condensation de la lignine.

II.2.2. Analyse par RMN ^{31}P de EOL6 comparée à la MWL

D'une façon générale, on retrouve dans le spectre de EOL6 les signaux attribués aux hydroxyles aliphatiques (145,5-150 ppm), aromatiques (136,5-144,5 ppm) et carboxyliques (134-135,5ppm). Cependant, on constate des variations importantes au niveau des intensités relatives des signaux (voir Annexe 5). Le nombre d'hydroxyles carboxyliques de la lignine organosolv (EOL6) comparé à celui de la MWL augmente de 0,02 à 0,04/C9. Cette augmentation correspond à une hydrolyse des liaisons esters durant le traitement organosolv. L'intensité des signaux de la région aromatique (Syringyle + Guaiacyle + p-hydroxyphenyle) augmente fortement de 0,28 à 0,50 groupement hydroxyle/C9, confirmant un clivage important des liaisons aryle éther au cours du procédé d'hydrolyse. Par contre, on observe une diminution importante du signal attribué aux hydroxyles aliphatiques (de 0,67 à 0,19 groupements hydroxyle/C9), probablement due à des réactions d'élimination par catalyse acide. Contrairement aux motifs guaiacyle et syringyle, le signal à 137-138 ppm attribué aux motifs p-hydroxyphenyle, reste pratiquement inchangé au cours du traitement, ($\sim 0,1/\text{C9}$). Cette observation peut être expliquée par deux réactions simultanées : la production de p-hydroxyphenyle qui résulte du clivage des liaisons aryle éther et l'hydrolyse des esters p-coumaryle comme démontré précédemment par RMN ^{13}C .

II.2.2. Analyse de la masse moléculaire moyenne par SEC

La masse moléculaire moyenne de la lignine organosolv comparée à celle de la MWL montre une grande différence. La masse moléculaire moyenne en nombre ($M_n = 4690$) et en poids ($M_w = 7060$) de la lignine organosolv (EOL6) sont plus faibles que celle de la MWL ($M_w = 1140300 / M_n = 45037$). Ces résultats indiquent clairement que le traitement organosolv dégrade la structure macromoléculaire de la lignine.

II.2.3. Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

L'absorption par UV-visible (figure 25) a été réalisée sur EOL6 en présence du dioxane-eau comme solvant et a aussi été comparée avec le spectre de la MWL décrit dans le

chapitre 1 et pour une longueur d'onde comprise entre 255 et 330 nm. Comme le montre ces deux spectres, les deux types de lignine ont des spectres semblables et typiques d'une lignine avec la présence de deux maxima originaires des groupements phénoliques conjugués et non conjugués (p-coumarylique et l'acide férulique) [Xu et al. 2006, Xiao et al. 2001, Seca 2000, Jahan et al. 2007, Xu et al. 2008]. Comme le montrent les spectres, les coefficients d'absorption les plus élevés correspondent à EOL6 indiquant une pureté plus élevée de la lignine et d'une teneur plus faible en impuretés (ex. sel minéraux et sucre résiduel [Xu et al. 2008]). Les spectres montrent une diminution relative de l'intensité du second maximum (315 nm) pour la lignine organosolv (EOL6) comparée à celle de la MWL. Cette observation confirme une hydrolyse partielle des esters p-coumaryliques durant le traitement organosolv comme cela a été déjà démontré précédemment.

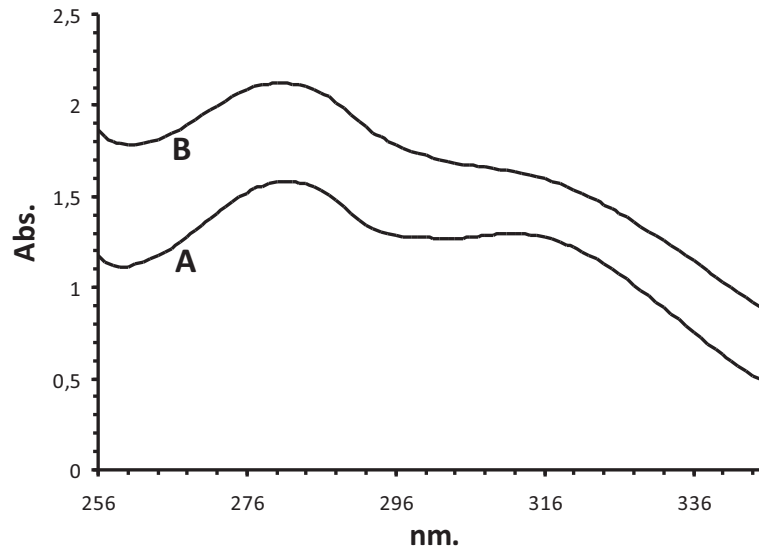


Figure 25. Spectre UV de A) la MWL et de B) la lignine organosolv (EOL 6)

II.3. Impact de la sévérité sur la structure des lignines

Afin de comprendre l'effet de la sévérité des traitements sur la structure des EOLs une étude physico-chimique utilisant différentes techniques d'analyses a été réalisée sur les lignines extraites avec des sévérités croissantes de 1,75 à 2,93 (voir tableau 7, essais '3' '4' '5' '6' '7' du tableau 9) en les comparant avec la lignine de bois broyé (MWL) représentative de la lignine native décrite dans le chapitre précédent.

Tableau 9. Nomenclature des EOLs analysés physico-chimiquement en fonction de la SC

| Expériences* | Nom | CS |
|--------------|-------|-------------|
| 3 | EOL 3 | 1,75 |
| 4 | EOL 4 | 2,08 |
| 5 | EOL 5 | 2,38 |
| 6 | EOL 6 | 2,77 |
| 7 | EOL 7 | 2,93 |

*Voir tableau 7 pour les conditions opératoires

II.3.1. Analyse des lignines organosolv par RMN ^{13}C

Les spectres de RMN de carbone ^{13}C quantitatifs de la lignine éthanol organosolv EOL3, EOL5 et EOL7 de *MxG* sont représentés sur la figure 26. Le tableau 10 rassemble l'attribution des signaux des spectres des EOLs obtenus ainsi que leurs quantifications [El Hage et al. 2009, El Hage et al. 2010].

L'observation des spectres RMN du carbone ^{13}C permet de faire quelques remarques :

- 1- En augmentant la sévérité, on observe des modifications sur les spectres ^{13}C ce qui montre un impact de la sévérité sur la structure de la lignine
- 2- Comme on le voit dans le tableau 4, le nombre des carbones aromatiques condensés par noyau aromatique (δ 142-124) augmente avec la sévérité du traitement et en parallèle le nombre de sites aromatiques protonés diminue. Cela traduit une augmentation du degré de condensation des lignines avec la sévérité.
- 3- Une augmentation de la sévérité du traitement organosolv entraîne une diminution des signaux des C-O aliphatiques de 2,16 C par groupe aryle pour EOL3 jusqu'à 0,59 pour EOL7. Cela est dû pour une grande partie à une forte diminution des liaisons C α . En fait la région des liaisons C β et C γ a été presque invariable (respectivement \sim 0,35 et 0,85 C par unité

aromatique) pour les faibles et moyennes sévérités (EOL3, 4 et 5). Une diminution de l'intensité de ces signaux a été observée seulement pour des sévérités de traitement élevées (> 2,5).

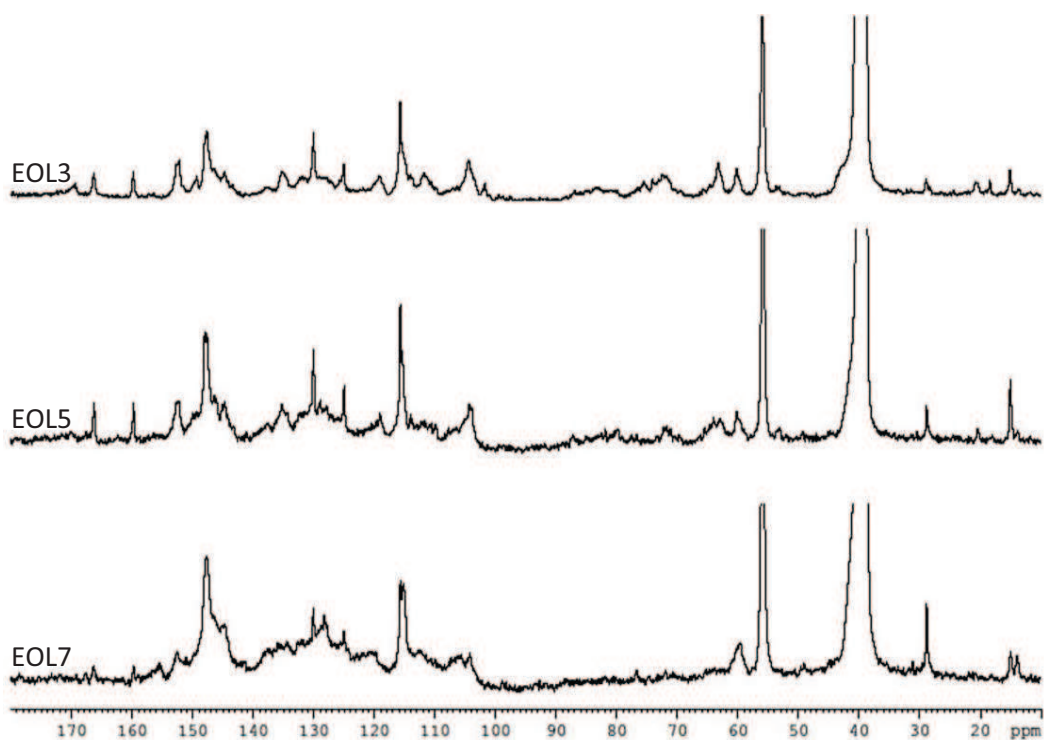


Figure 26. Spectres RMN ^{13}C quantitatives de la MWL, de EOL1, de EOL3 et de EOL5

Tableau 10. Assimilation et quantification des déplacements chimiques des lignines

| Déplacement chimique (δ ppm) | Attribution | EOL (expérience #) | | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------|------|------|------|------|
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 171 | OCOMe | 0,17 | 0,06 | 0,05 | 0 | 0 |
| 167 | C γ PC ester | 0,14 | 0,08 | 0,08 | 0,04 | 0,05 |
| 161 | C4 PC ester | 0,14 | 0,08 | 0,08 | 0,04 | 0,05 |
| 155-142 | Aromatique C-O | 2,05 | 1,94 | 2,19 | 1,77 | 2,05 |
| 142-124 | Aromatique C-C | 1,90 | 2,16 | 2,26 | 2,27 | 2,33 |
| 124-102 | Aromatique C-H | 2,16 | 1,97 | 1,68 | 2,07 | 1,73 |
| 89-78 | C β dans β O4, C α dans β 5 et $\beta\beta$ | 0,35 | 0,35 | 0,33 | 0,20 | 0,11 |
| 73-71 | C α dans β -O-4 | 0,93 | 0,30 | 0,24 | 0,20 | 0,13 |
| 64-61 | C γ | 0,88 | 0,85 | 0,89 | 0,55 | 0,49 |
| 90-58 | Aliphatique-O | 2,16 | 1,5 | 1,46 | 0,95 | 0,59 |
| 56 | OMe | 1,33 | 1,43 | 1,41 | 1,34 | 1,33 |
| 31-29 | α , β (groupe méthylénique) | 0,14 | 0,15 | 0,22 | 0,20 | 0,20 |
| 21 | CH $_3$ dans les groupes acétyles | 0,19 | 0,06 | 0,06 | 0 | 0 |
| 19 | OCH $_2$ CH $_3$ | 0,10 | 0,03 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | γ méthyle (chaîne latérale propylique) | 0,25 | 0,26 | 0,27 | 0,27 | 0,28 |

Une proportion importante de groupements acétyle et p-coumaryle a été détectée pour EOL3 à partir respectivement des signaux à 171 et 21 ppm ($\sim 0,17$ groupe par unité aromatique) et 167 et 161 ppm (respectivement $\sim 0,14$ groupe par unité aromatique). Pour EOL4 et EOL5 qui sont extraites à des sévérités moyennes, la proportion de groupements acétyles est plus faible. Mais pour EOL 6 et EOL7 extraites à des sévérités très élevées, seulement quelques traces de résidus acétylique et coumarylique ont été détectées, ceci étant due à une forte hydrolyse des groupements esters. Dans la zone des aliphatiques (10-50 ppm), les signaux aux alentours de 30 ppm ont été attribués aux groupements α et β méthyléniques formés par les réactions de déshydratation incluant un clivage des liaisons β -O-4 et la formation de la cétone d'Hibbert (voir figure 27 [West et al. 1943]).

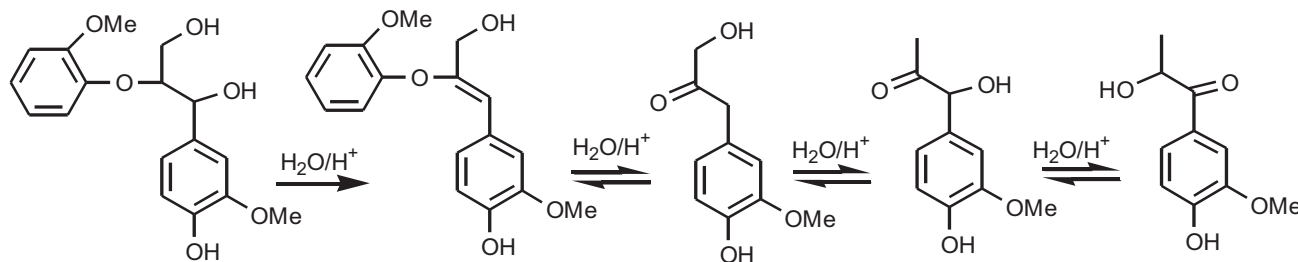


Figure 27. Mécanisme de formation de la cétone d'Hibbert

L'intensité de ces signaux augmente légèrement avec la sévérité (0,14 groupe par unité pour EOL3 jusqu'à 0,20 pour EOL7). Il est aussi intéressant de noter que dans le spectre de EOL3, un signal vers 19 ppm a été assimilé pour les groupements éthoxyliques ($\sim 0,1$ EtO par unité aromatique) qui provient de l'addition d'un nucléophile, l'éthanol (solvant), sur la position benzylique (voir figure 32, partie 2.3.5.).

II.3.2. Analyse des lignines organosolv par RMN ^{31}P

Les spectres de RMN de phosphore quantitatifs de la lignine éthanol organosolv EOL4, EOL5 et EOL7 de *MxG* sont représentés sur la figure 28. L'interprétation des spectres obtenus et leur quantification sont rassemblées dans l'annexe 6. La concentration de chaque groupement hydroxyle (en mmol/g) a été calculée en se basant sur l'intensité du signal correspondant à la référence standard interne (le cyclohexanol).

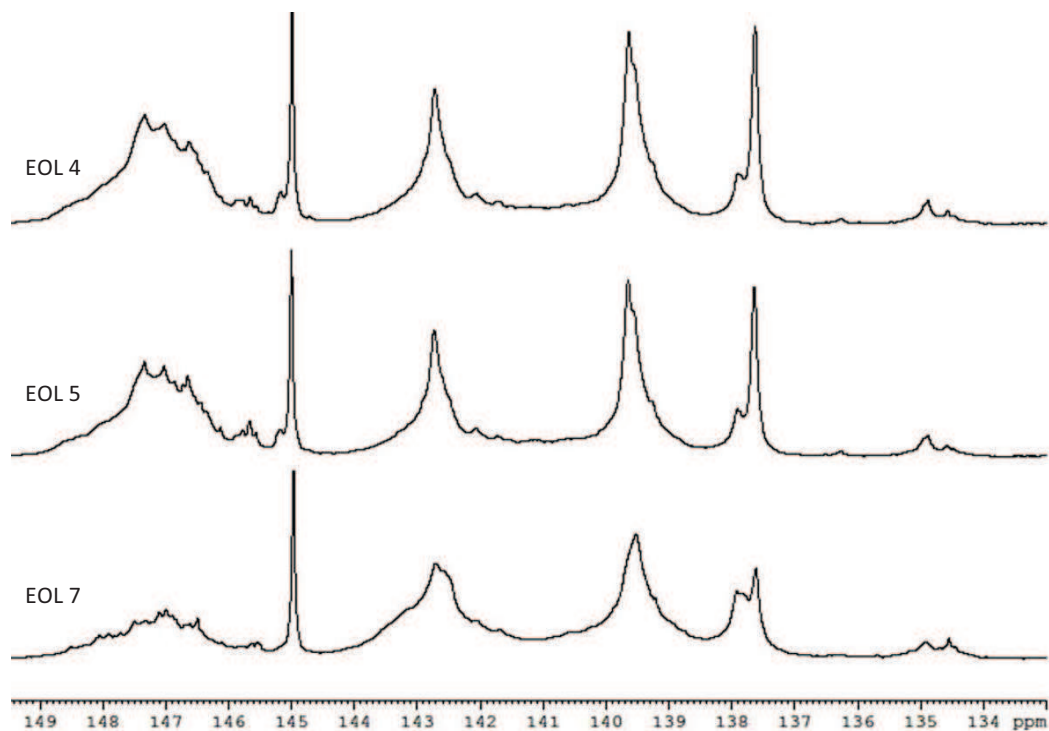


Figure 28. Spectres RMN ^{31}P quantitatifs de la MWL, EOL4, EOL3 et EOL5

La figure 29 représente les variations de la concentration des groupements hydroxyles (mmol/g) en fonction de la sévérité combinée du traitement organosolv. Comme on le voit sur cette figure, l'augmentation de la sévérité du traitement correspond à une forte baisse de la concentration des OH aliphatiques accompagnée d'une augmentation des OH phénoliques. Ce comportement est probablement dû à deux réactions simultanées : une hydrolyse des aryles éthers (augmentation des OH phénoliques) et une déshydratation sur la chaîne propylée (diminution des OH aliphatiques).

Sur la figure 29, on constate que les valeurs des concentrations en groupements hydroxyle phénoliques guaiacyle (G) et syringyle (S) varient peu dans une gamme de SC allant de 1,75 à 2,38. Par contre, une forte augmentation de la concentration en ces groupements hydroxyles phénoliques a été observée à forte sévérité (EOL6 et EOL7, $\text{CS} > 2,77$), indiquant un possible changement de mécanisme d'hydrolyse. Pour les groupements p-hydroxyphényle (H), la quantité des fonctions hydroxyles reste pratiquement inchangée ($\sim 0,5$ mmol/g) pour toutes les conditions opératoires. Cette observation peut être justifiée par deux phénomènes simultanés et opposés : l'hydrolyse des liens aryles éthers

impliquant des unités p-hydroxyphenyles et l'hydrolyse des fractions des résidus d'ester p-coumarylique comme démontrés par la RMN ^{13}C .

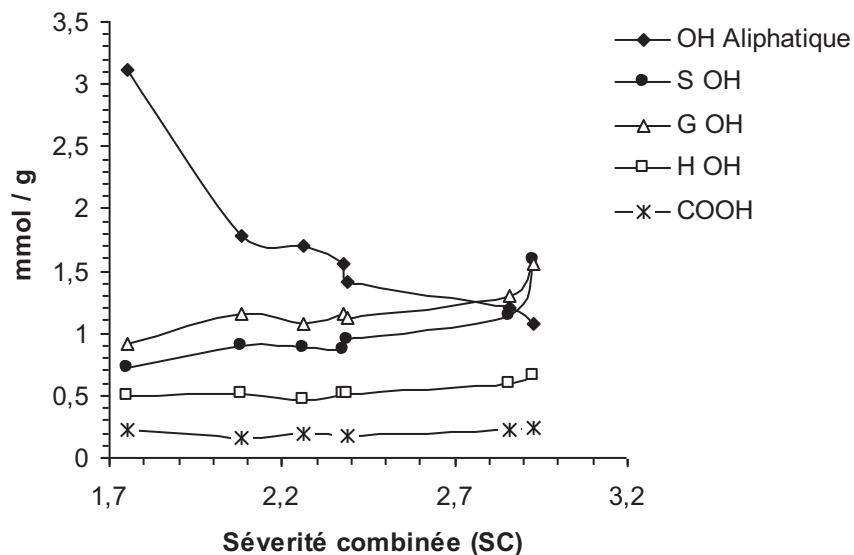


Figure 29. Variation de la concentration des groupements hydroxyles (en mmol.g⁻¹ de lignine) en fonction de la SC (à partir des spectres de RMN ^{31}P)

II.3.3. Analyse par FT-IR

Les spectres FT-IR des trois lignines organosolv (EOL3, EOL5 et EOL7) sont représentés sur la figure 30. Dans le spectre de EOL3 et en se référant au spectre IR de la MWL décrit dans le chapitre 1, le signal vers 1739 cm^{-1} a été attribué aux groupements ester non conjugués et les signaux de 1705 et 1639 cm^{-1} aux esters p-coumaryliques (respectivement les groupements carbonyles et éthylénique) en se basant sur la comparaison avec le spectre IR des esters p-coumaryle. Pour EOL5, on a observé une diminution de l'intensité de ces trois signaux, justifiée par une importante hydrolyse des esters comme il a été montré par les analyses RMN du carbone. Néanmoins, l'analyse du spectre de la lignine extraite avec une forte sévérité de traitement (EOL7) montre la présence du signal vers 1705 cm^{-1} et la disparition des signaux à 1739 et 1639 cm^{-1} . Ce comportement peut être interprété par la formation de fonctions cétone provenant de réactions de déshydratation qui surviennent sur les chaînes latérales de la lignine pour des conditions de sévérités élevées. Cette observation soutient les conclusions obtenues par les RMN ^{13}C et ^{31}P concernant la forte dégradation des structures des lignines organosolv (EOL6 et EOL7) incluant le clivage des liaisons $\beta\text{-O-4}$ et la formation de la cétone d'Hibbert (voir figure 27).

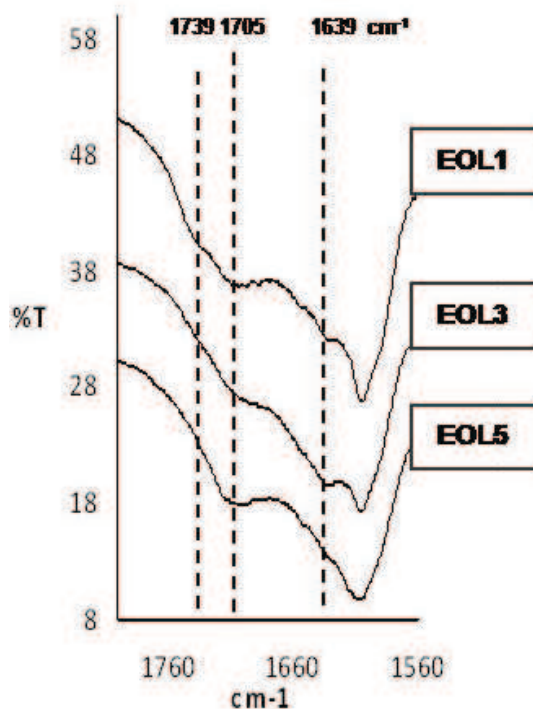


Figure 30. Spectre FT-IR des trois lignines organosolv EOL1, EOL3 et EOL5

II.3.4. Analyse de la distribution des masses moléculaires par SEC

La question de l'effet de la sévérité des traitements organosolv sur la dépolymérisation ou la repolymérisation des lignines a été envisagée avec une étude par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sur les 5 lignines après acétylation et dissolution dans du THF. La masse moléculaire moyenne en nombre (Mn), la masse moléculaire moyenne en poids (Mw) ainsi que l'indice de polydispersité des cinq EOL sont donnés dans le tableau 11.

Tableau 11. Masse moléculaire moyenne en poids (Mw), masse moléculaire moyenne en nombre (Mn) et indice de polydispersité (Mw/Mn) des lignines éthanol organosolv

| Expériences | CS | Mw | Mn | Mw/Mn |
|-------------|------|------|------|-------|
| EOL3 | 1,75 | 6469 | 2488 | 2,60 |
| EOL4 | 2,08 | 5994 | 3795 | 1,58 |
| EOL5 | 2,39 | 4282 | 3087 | 1,39 |
| EOL6 | 2,77 | 3568 | 2468 | 1,45 |
| EOL7 | 2,93 | 3188 | 2305 | 1,38 |

Il apparaît clairement que les masses moléculaires moyennes en masse et en nombre de lignine organosolv sont plus faibles que celles de la lignine de bois broyé. De plus, on

constate que les masses moléculaires moyennes des lignines organosolv diminuent en fonction de la sévérité combinée des traitements comme le montrent le tableau 11 et la figure 31. Cette observation montre une dépolymérisation croissante des fractions de lignine isolées en fonction de la sévérité du traitement. Cette observation confirme que le traitement organosolv provoque un important clivage des liaisons intermoléculaires de la lignine et que cette dégradation est fonction du temps de traitement, de la température et de l'acidité du milieu.

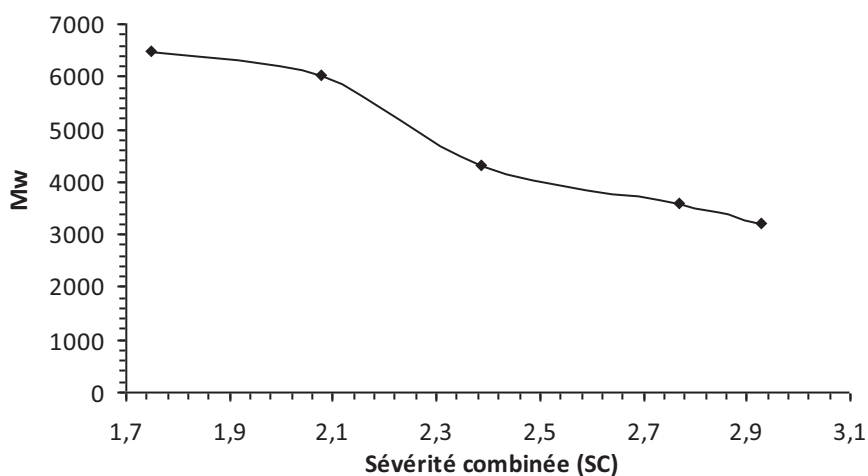


Figure 31. Masse moléculaire moyenne en poids (Mw) des lignines organosolv en fonction de la SC

II.3.5. Discussion et approche mécanistique

Cette étude physico-chimique concernant l'effet du traitement organosolv sur la structure de la lignine a clairement montré qu'une augmentation de la sévérité entraîne une augmentation :

- (1) des réactions d'hydrolyse des groupements esters
- (2) des réactions de déshydratation des chaînes latérales de la lignine
- (3) de la concentration des groupements phénoliques
- (4) du degré de condensation de la lignine.

L'examen des spectres RMN ^{13}C des lignines organosolv extraites à faible sévérité (essais 3-5) montre que l'hydrolyse a principalement affecté les positions $\text{C}\alpha$ des chaînes latérales de la lignine. Dans ces conditions, le fractionnement solvolytique des α -aryles éthers mène à la formation d'un carbocation benzylique qui peut réagir soit avec l'eau soit avec

l'éthanol (voie 1, figure 32) ou produit des réactions de substitution électrophile aromatique (voie 2, figure 32). Cette observation est soutenue par des travaux antérieurs montrant que les liaisons α -aryles éthers sont plus facilement hydrolysées que les liaisons β -aryles éthers [Kishimoto et Sano 2003].

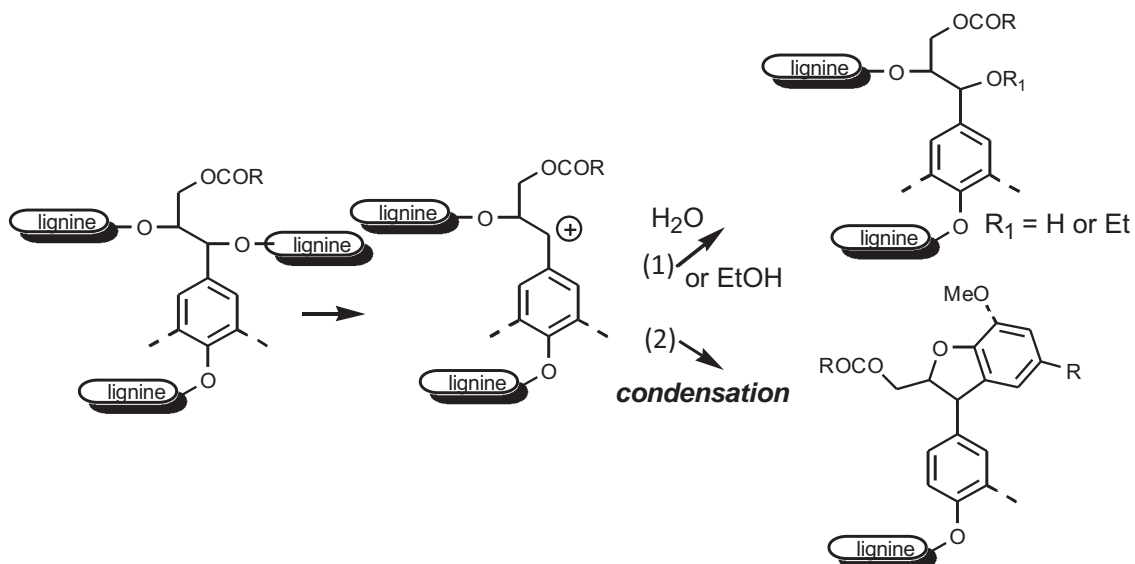


Figure 32. Mécanisme du clivage solvolytique des liaisons α - aryle éther

Pour des sévérités élevées ($SC > 2,7$), on a observé une forte modification des caractéristiques spectroscopiques des EOL : une augmentation considérable des groupements OH phénoliques, exprimant une forte hydrolyse des liaisons aryles éthers accompagnée d'une diminution des intensités des signaux attribués aux $C\beta$ et $C\gamma$. Par ailleurs, la présence de groupements carbonyles dans les spectres FTIR (figure 30) de EOL6 et EOL7 semble indiquer un clivage des liaisons β -éther avec formation de cétones d'Hibbert comme représenté sur la figure 33.

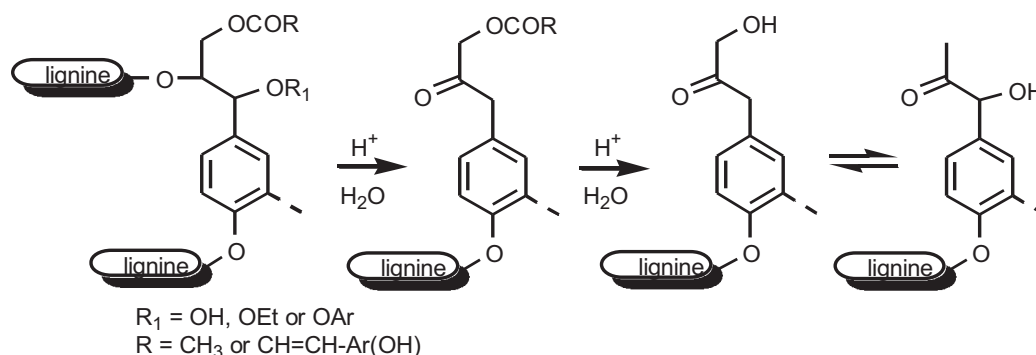


Figure 33. Mécanisme du clivage solvolytique des liaisons β - et γ -aryle éther

Pour les sévérités de traitement qui sont généralement utilisées dans la littérature ($1,74 < SC < 2,4$), le clivage des liaisons β -aryle éther semble de ne pas jouer un rôle sur la réaction de délignification. Ces conclusions sont en accord avec différents travaux de la littérature. **Sarkanen et al. (1980)** ont indiqué que l'hydrolyse acide de la lignine organosolv isolée accroît fortement la formation des OH phénoliques, indiquant que les liaisons β -O-4 restent intactes. Récemment, **Kubo et Kadla (2004)** ont démontré par RMN à deux dimensions que les structures β -O-4 de la lignine Alcell sont intactes après les processus chimiques. De plus, il a été démontré que la réaction de délignification est fortement contrôlée par l'hydrolyse des α -aryle éther qui présentent une énergie d'activation faible. L'énergie d'activation mentionnée par **Meshgini et Sarkanen (1989)** pour l'hydrolyse des α -aryles éthers de lignine est de l'ordre de 80 à 118 kJ/mol, dépendant des motifs de substitution. **Vazquez et al. (1997)** ont signalé que l'énergie d'activation par traitement acéto-solv des α -aryles éthers de la lignine du bois de pin en absence et en présence de catalyseur acide (HCl), sont respectivement 78,8 kJ/mole et 69,7 kJ/mol. L'énergie d'activation de l'hydrolyse des β -aryles éthers étant plus élevée (150 kJ/mol), les auteurs concluent que les traitements de délignification ne sont pas contrôlés par l'hydrolyse des liaisons β -aryles éthers.

II.4. Conclusion

Le traitement éthanol organosolv a été étudié dans un premier temps en utilisant le *MxG* comme matière première. Ce procédé a permis un bon fractionnement des trois constituants de la biomasse (la lignine, la cellulose et les hémicelluloses). L'optimisation de ce traitement nous a permis de conclure qu'une sévérité combinée d'environ 2,08 a permis une bonne délignification, un bon rendement en lignine récupérée sous forme EOL et enfin une très faible production de furanes dans la phase aqueuse. Dans la seconde partie de ce chapitre, on a tout d'abord réalisé une étude spectroscopique et chromatographique comparative entre la lignine organosolv et la lignine de bois broyé qui montre que la lignine organosolv est une lignine relativement peu modifiée. Une étude de l'impact de la sévérité du traitement sur la structure chimique des EOL extraites a été ensuite envisagée. Nos résultats ont montré qu'une augmentation de la sévérité de traitement aboutit à un accroissement des réactions de déshydratation des chaînes latérales de la lignine, une augmentation du degré de condensation de la lignine et de la concentration des groupements phénoliques ainsi qu'une forte diminution de la masse moléculaire. Nos résultats d'analyse spectroscopique ont également montré que des traitements organosolv réalisés avec des conditions de sévérité classiquement utilisées dans la littérature conduisent à une hydrolyse prépondérante des liaisons α -aryles éthers.

Chapitre III. Prétraitement de *Miscanthus x Giganteus*

III. Introduction

Les traitements hydrothermiques se réfèrent à l'utilisation de l'eau, sous son état de liquide ou de vapeur, pour traiter la biomasse lignocellulosique [Laser et al. 2002]. Ces traitements sont désignés dans la littérature par les termes suivants: autohydrolyse [Lora et Wayman 1978, Garrote et al. 1999], extraction ou liquéfaction aqueuse [Saska et Ozer 1995], hydrothermolyse [Bonn et al. 1983, Kubikova et al. 1996], préhydrolyse à l'eau [Conner 1984] et traitement à la vapeur ou explosion à la vapeur [Ramos et al. 1992].

L'autohydrolyse des polysaccharides est une méthode de dégradation douce qui suit le même mécanisme qu'une hydrolyse acide. Elle consiste en l'hydrolyse des polysaccharides en utilisant comme catalyseur les ions hydroniums générés par la réaction. L'acidité est ici apportée par l'hydrolyse des groupements acétates des hémicelluloses ainsi que par les fonctions carboxyles et/ou sulfates des polysaccharides. Ce procédé est décrit comme permettant une hydrolyse sélective des hémicelluloses et par conséquent la séparation de la biomasse lignocellulosique en deux fractions : un extrait aqueux composé principalement d'hémicelluloses et ses dérivés, et un résidu solide composé de cellulose presque intacte et de résidu de lignine [Van Walsum et al. 1996, Garrote et al. 1999]. L'autohydrolyse est un procédé technologique respectueux pour l'environnement qui a suscité l'intérêt de plusieurs travaux [Weil et al. 1998, Garrote et al. 1999]. Cette technique est avantageuse et attractive du fait de l'absence de produit chimique ajouté, du taux de récupération élevé des pentoses, de l'absence de produit inhibiteur généré et d'une diminution de la quantité de déchets issus du prétraitement [Ogier et al. 1999].

Divers travaux ont étudié l'impact des conditions opératoires de l'autohydrolyse sur différentes matières premières lignocellulosiques. La sévérité du traitement d'autohydrolyse varie dans un intervalle de température compris entre 130 et 230 °C et un temps de prétraitement qui varie de quelques secondes jusqu'à plusieurs heures [Capek-Ménard et al. 1987, Saska et Ozer 1995]. Pour des conditions opératoires sévères, le xylose provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses peut se dégrader en furfural qui, à son tour, peut se transformer en d'autres produits de dégradation. La cellulose contenue dans la biomasse lignocellulosique est pratiquement non hydrolysée sous les conditions d'autohydrolyse généralement utilisées dans la littérature (< 230 °C) [Abatzoglou et al. 1990, Aoyama et al.

1995, Biermann et al. 1984, Carrasco et al. 1994, Garrote 1999, Saska et Ozer 1995]. En ce qui concerne la lignine, normalement son hydrolyse débute en faible proportion entre 150 et 180 °C dans les milieux neutres [Bobleter 1994, Garrote 1999].

Il a été montré que l'utilisation de conditions de prétraitement par autohydrolyse à forte sévérité (température et temps réactionnel élevés), le taux de délignification par le procédé Kraft ainsi que la solubilité de la lignine diminue [Leschinsky et al. 2008, Sixta 2006]. Une explication proposée par Li et Lundquist (2000) pour cette difficulté à extraire la lignine repose sur la repolymérisation et la recondensation de la lignine par la formation de nouvelles liaisons β - β , β -1 et β -5. Wayman et Lora (1978) ainsi que Li et Gellerstedt (2008) ont confirmé une amélioration de l'extraction de la lignine après la réalisation d'un prétraitement par autohydrolyse en présence du 2-naphtol qui agit comme un piègeur de la recondensation de la lignine.

Récemment, au sein du LERMAB, un prétraitement du *MxG* par hydrolyse acide en présence d'acide sulfurique comme catalyseur a été optimisé [Brosse et al. 2009, Brosse et al. 2010]. Les résultats obtenus ont montré une très bonne récupération des hémicelluloses dont 70 % de xylanes et une grande partie des autres sucres. 80 % des xylanes ont été récupérés sous forme de monosaccharides. De plus, ce prétraitement a permis une meilleure délignification organosolv et une très bonne conversion de la cellulose en glucose par hydrolyse enzymatique.

Dans ce contexte, ce chapitre consiste à examiner un protocole de délignification en deux étapes : un prétraitement par autohydrolyse suivi par un traitement organosolv réalisé avec une faible sévérité.

La première partie de ce travail porte sur une étude du suivi cinétique et une analyse chimique des produits issus d'une réaction d'autohydrolyse à 130, 140 et 150 °C. Il s'agit d'optimiser la récupération des sucres et notamment du xylose. Une étude physicochimique a été réalisée sur la structure de la lignine de bois broyé (MWL) de *MxG* extraite à partir des résidus solides obtenus après autohydrolyse. Le traitement organosolv a ensuite été réalisé sur les résidus solides obtenus par les conditions optimales. Nous avons pu visualiser l'effet du prétraitement par autohydrolyse en absence et en présence du 2-naphtol.

Enfin, une étude préliminaire de l'effet d'un prétraitement enzymatique sur le processus de délignification par le traitement organosolv en utilisant un cocktail industriel d'enzymes clôturera les travaux de ce chapitre.

III.1. Prétraitement par autohydrolyse

III.1.1. Suivi cinétique de la production des sucres et des produits de dégradation en phase aqueuse

Trois séries d'expériences d'autohydrolyse à température constante (130, 140 et 150 °C) ont été réalisées pour étudier l'effet de la durée du traitement (de 1 h à 43 h) sur la composition des résidus solides et des hydrolysats. A la fin de chaque prétraitement, les résidus solides récupérés par filtration ont été analysés en mesurant le taux de lignine de Klason, de glucane et xylane et d'arabinane. Les phases aqueuses sont également analysées. Ainsi, la figure 34 rassemble les valeurs de pH et des teneurs en furane de la phase aqueuse pour chaque condition. Ces valeurs numériques sont également reportées dans l'annexe 7.

Comme prévu, quelle que soit la température envisagée, nous constatons une augmentation de l'acidité du milieu réactionnel (due à la formation d'acide acétique durant l'hydrolyse) ainsi que du taux de furanes (formés par dégradation des sucres simples en solution) en fonction de la durée du traitement.

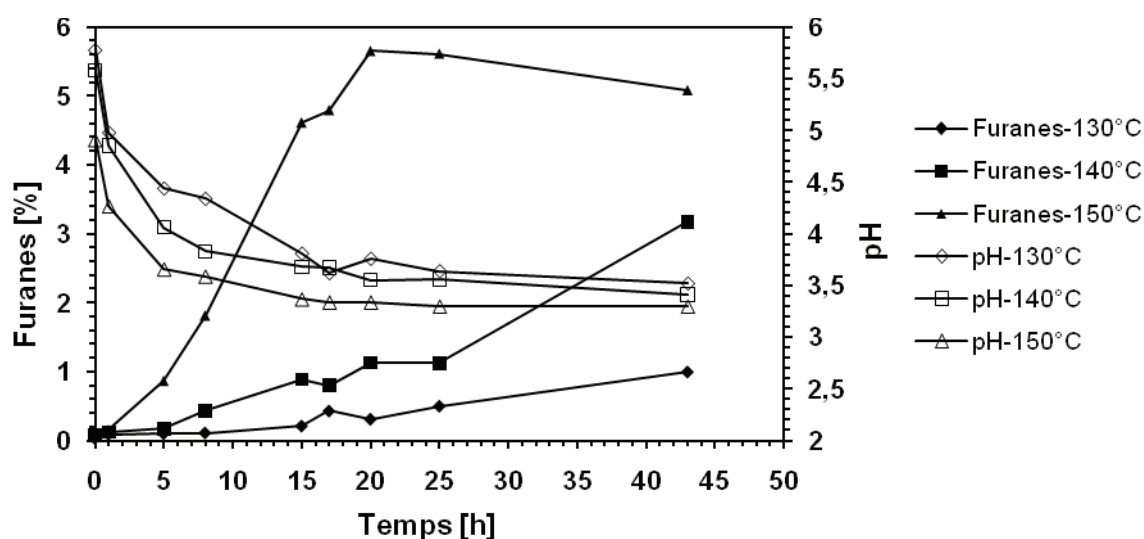


Figure 34. pH et pourcentage de furanes récupéré dans les phases aqueuses par autohydrolyse en fonction du temps et de la température

A 130 et 140 °C, le taux de furanes augmente d'une façon régulière avec la durée du traitement tandis qu'à 150 °C, l'allure de la courbe est différente : on observe une augmentation beaucoup plus importante pour atteindre un maximum de 5,5 % de la masse initiale (voir annexe 7) après 20 h de traitement approximativement, suivie d'une diminution, probablement due à une dégradation ultérieure des furanes en acides carboxyliques [Nabarlatz et al. 2004].

Les figures 35 et 36 représentent respectivement la variation des xyloses et la variation des autres sucres présents en phase aqueuse pour chaque température de traitement (130, 140 et 150 °C). Les valeurs numériques sont rassemblées dans le tableau de l'annexe 8. Comme le montre les figures 35 et 36, les concentrations en xylose sont beaucoup plus élevées que celles des autres sucres. Cette observation est en accord avec la teneur élevée en xylane pour le miscanthus observée dans le chapitre 1. On constate que pour les 3 températures, un maximum d'environ 43 % de la teneur initiale en xylane (23 %) a été récupérée en phase aqueuse.

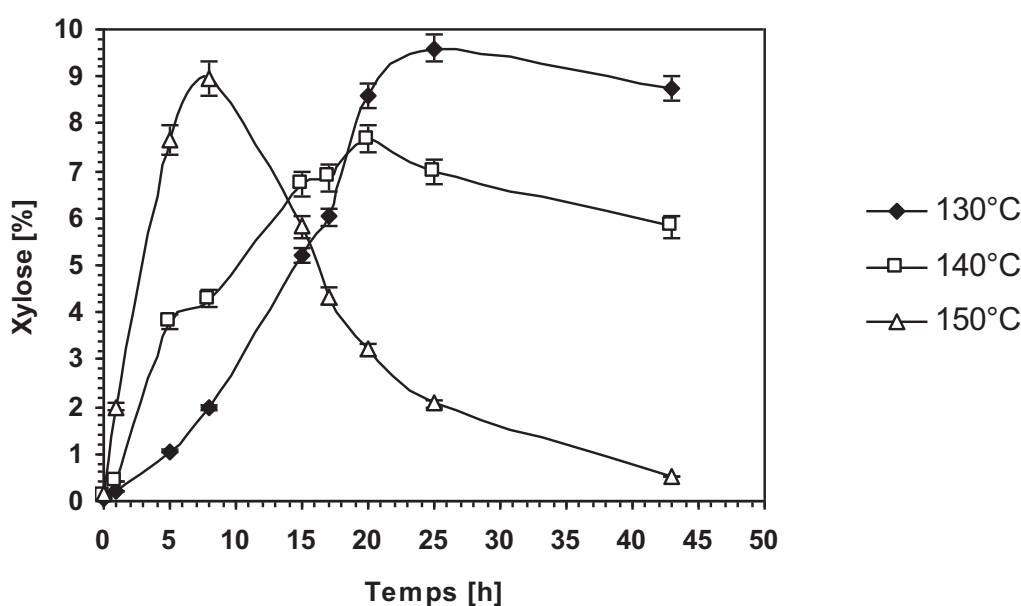


Figure 35. Pourcentage de xylose récupéré en phase aqueuse après autohydrolyse à 130, 140 et 150 °C en fonction du temps réactionnel

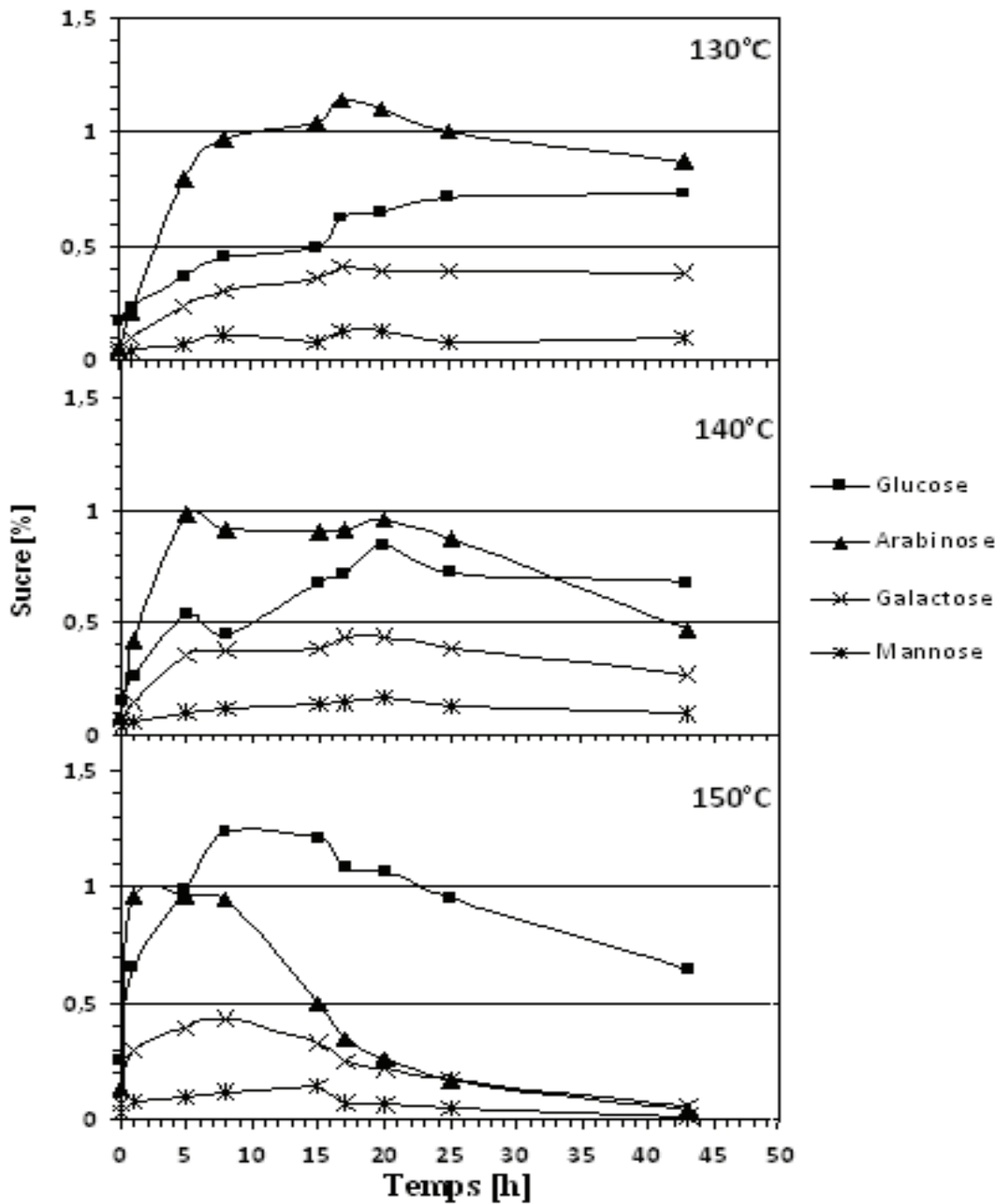


Figure 36. Composition des phases aqueuses en sucres, autres que xylose, après autohydrolyse à 130 °C, 140 °C et 150 °C en fonction du temps réactionnel

Concernant les concentrations en sucres dans la phase aqueuse, la tendance générale est la même. Pour les 3 températures étudiées, on constate une augmentation des concentrations avec le temps réactionnel pour atteindre un maximum puis une décroissance probablement due à une dégradation ultérieure des sucres dans le milieu réactionnel. Les maxima sont atteints à des temps différents. Le maximum pour le xylose est atteint vers 25 h pour 130 °C, 16 h pour 140 °C et 8 h pour 150 °C, pour l'arabinose le maximum est atteint vers 10 h pour 130 °C, 5 h pour 140 °C et 1 h pour 150 °C ce qui confirme une grande sensibilité à l'hydrolyse des arabinanes [Lee et al. 2009, Garrote et al. 2004]. En ce qui concerne le glucose, sa teneur est faible en phase aqueuse après autohydrolyse : à 130 et 140 °C un maximum de ~ 2 % (m/m) de glucane est hydrolysé en phase aqueuse, alors qu'à 150 °C, une hydrolyse de ~ 4 % de glucane a été observée vers 15 h de traitement. Cette observation d'une concentration légèrement élevée de glucose pour les conditions les plus sévères (150 °C > 15 h) pourrait indiquer une hydrolyse partielle de la partie cellulosique.

Comme observé précédemment la concentration en xylose dans la phase aqueuse atteint un maximum vers 25 h pour 130 °C, 16 h pour 140 °C et 8 h pour 150 °C. Il est remarquable que ces trois conditions opératoires présentent le même facteur de sévérité ($\log R_0 \sim 4,1$). Ce facteur décrit ou corrèle la sévérité du traitement en fonction de la température et du temps où $T_{ref} = 100$ °C selon l'équation suivante : $\log R_0 = \log(t \cdot \exp[(T - T_{ref})/14,7])$ [Montane et al. 1998]. En présence de catalyseur acide, les valeurs de pH sont prises en compte par l'utilisation de la formule de sévérité combinée (SC) comme dans le cas du chapitre 2 [Chum et al. 1990]. Dans la présente étude, l'autohydrolyse est réalisée sans catalyseur et dans notre cas les valeurs de pH à la fin de chaque traitement sont très proches ($\text{pH} \sim 3,5 \pm 0,05$) l'équation du facteur de sévérité a été utilisée sans corrélation du pH.

III.1.2. Composition des résidus solides

La figure 37 ainsi que le tableau de l'annexe 9 rassemblent les compositions en lignine, en cellulose, en xylose et en arabinose des résidus solides après autohydrolyse réalisée à trois températures (130, 140 et 150 °C) en fonction du temps de traitement.

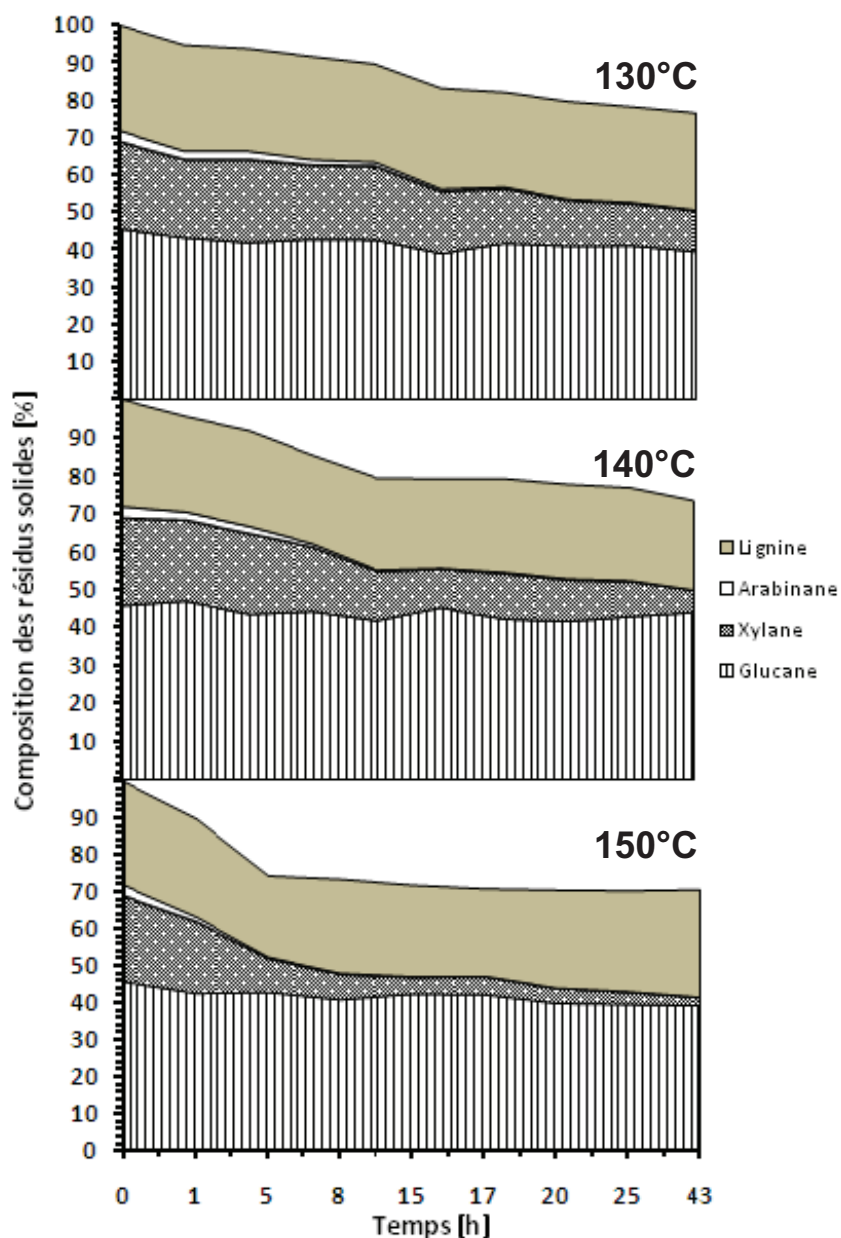


Figure 37. Composition des résidus solides après autohydrolyse à 130, 140 et 150 °C en fonction du temps

Comme le montre la figure 37, on observe que les teneurs en lignine et en glucane ne varient pratiquement pas en fonction de la température pour les trois températures d'autohydrolyse (130, 140 et 150 °C) ce qui confirme que dans les conditions opératoires utilisées, ces deux polymères semblent peu affectés. Néanmoins, pour un traitement réalisé à 150 °C, on observe une légère augmentation en lignine de Klason après 5 h de traitement ; cette observation peut être expliquée par la formation de « pseudo-lignine » provenant de la repolymérisation des polysaccharides ou de produits issus de la dégradation des polysaccharides sur les chaînes de lignines [Jakobsons et al. 1995].

En ce qui concerne les hémicelluloses, les résultats rassemblés sur la figure 34 montrent une tendance comparable pour les trois températures :

- La cinétique d'hydrolyse des xylanes est relativement faible à 130 °C; celle-ci augmente avec la température du traitement. A 150 °C, environ 70 % des xylanes sont hydrolysés en 8 h de traitement.
- Concernant les autres sucres présents en plus faible concentration dans la matière première, les arabinanes sont détectés durant les premières heures des traitements alors que les galactanes et mannanes ne sont pas détectés, sans doute à cause d'une hydrolyse rapide dès le début du traitement.

Il apparaît donc que la cinétique d'hydrolyse des hémicelluloses est largement affectée par la température. A 130 et 140 °C la quantité d'hémicelluloses dans les résidus solides diminue d'une façon régulière avec le temps de traitement et atteint un taux d'extraction d'environ 50 % des hémicelluloses contenues initialement dans la biomasse. Cela correspond à l'extraction des fractions d'hémicelluloses facilement hydrolysables (à faible poids moléculaire). A 150 °C, on observe l'extraction de ces fractions facilement hydrolysables durant les huit premières heures du prétraitement. Pour un temps de traitement plus élevé, on observe une diminution de la vitesse d'hydrolyse.

III.2. Analyse physico-chimique des MWL après autohydrolyse

Les lignines de bois broyé (MWL) ont été isolées à partir des résidus solides de *MxG* obtenus après autohydrolyse réalisée à 130, 140 et 150 °C et pour un même facteur sévérité dans le but d'obtenir une image complète du changement de la structure de lignine.

Les spectres RMN ^{13}C des trois autohydrolyses ont été analysés et comparés avec la MWL native décrite dans le 1er chapitre. Les attributions des signaux des spectres RMN ^{13}C quantitatifs sont rassemblées dans le tableau 12.

Tableau 12. Signaux et attributions des spectres RMN ^{13}C de la MWL native et après autohydrolyse

| δ ^{13}C NMR | Attributions | RM^b | 130 °C ^c | 140 °C ^d | 150 °C ^e |
|------------------------------|-------------------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 155-142 | Aromatique C-O | 1,93 | 1,75 | 1,71 | 1,85 |
| 142-124 | Aromatique C-C | 1,65 | 1,87 | 2,13 | 2,15 |
| 124-102 | Aromatique C-H | 2,50 | 2,49 | 2,28 | 2,10 |
| 90-58 | Aliphatique-O | 1,80 | 0,83 | 0,50 | 0,33 |
| 56 | CH ₃ O | 1,30 | 1,37 | 1,37 | 1,41 |

^a Valeurs présentés sont en nombre d'atome de carbone par motif aromatique

^b MWL de *MxG* native

^c MWL de *MxG* après autohydrolyse à 130 °C pendant 31 h

^d MWL de *MxG* après autohydrolyse à 140 °C pendant 16 h

^e MWL de *MxG* après autohydrolyse à 150 °C pendant 8 h

On observe dans le tableau 12 que pour un même facteur de sévérité de traitement par autohydrolyse ($\text{Log } R_0 \sim 4,1$) mais à trois températures différentes, les valeurs du nombre de carbones aromatiques condensés (δ 140-123 ppm) par noyau aromatique augmentent et celles des carbones aromatiques protonés (δ 123-106 ppm) diminuent avec la température. Cette observation traduit une augmentation du degré de condensation. La région aliphatique (δ 89-58 ppm) des spectres RMN ^{13}C représente les signaux relatifs des liaisons C-O des chaînes latérales des lignines. Il semble qu'une augmentation de la température influence fortement les valeurs de signaux des liaisons C-O. Une forte diminution est constatée de 0,83 C par groupement aryle à 130 °C jusqu'à une valeur de 0,33 C à 150 °C. L'estimation de la quantité en liaison β -O-4 a montré une diminution de ces structures pour la même sévérité mais en augmentant la température (de 0,17 C à 130 °C jusqu'à 0,02 C à 150 °C).

Les résultats des spectres quantitatifs réalisés par RMN du phosphore ^{31}P sont présentés dans le tableau 13. Comme le montre ce tableau, une augmentation de la température est accompagnée par une diminution des hydroxyles aliphatiques. Cette observation est probablement due à deux réactions simultanées : une réaction d'élimination par catalyse acide des chaînes latérales et la production des hydroxyles phénoliques provenant du clivage des liaisons $\beta\text{-O-4}$.

Tableau 13. Valeurs des groupements phénoliques des MWL avant et après autohydrolyse estimées par RMN ^{31}P en mmol/g

| $\delta^{31}\text{P}$ NMR | Attributions | Native ^b | 130 °C ^c | 140 °C ^d | 150 °C ^e |
|---------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 145.5-150.0 | 1- Aliphatique OH | 4,00 | 3,54 | 2,78 | 2,46 |
| 144.9 | Cyclohexanole (IS) | | | | |
| 136.5-144.5 | 2- Phénols | 1,66 | 2,20 | 3,62 | 3,42 |
| 141.8-143.5 | 2a- OH syringyle | 0,22 | 0,80 | 1,31 | 1,27 |
| 138.7- 140.1 | 2b- OH guaiacyle | 0,67 | 0,93 | 1,55 | 1,47 |
| 137.2-138.1 | 2c- OH p-hydroxyphenyle | 0,64 | 0,47 | 0,76 | 0,68 |
| 134-135.7 | 3- Acide carboxylique | 0,13 | 0,01 | 0,31 | 0,27 |

^a Valeurs en mmol.g⁻¹

^b MWL de *MxG* native

^c MWL de *MxG* après autohydrolyse à 130 °C durant 31 h

^d MWL de *MxG* après autohydrolyse à 140 °C durant 16 h

^e MWL de *MxG* après autohydrolyse à 150 °C durant 8 h

D'après ces résultats, il est remarquable de constater que l'augmentation de la température pour un même facteur de sévérité de l'autohydrolyse ait un impact important sur la dégradation de la lignine notamment concernant la diminution des liaisons $\beta\text{-O-4}$ et l'augmentation du degré de condensation des lignines. Dans la littérature, il a été démontré que les liaisons $\beta\text{-aryle}$ éther sont dégradées en milieu acide: l'acide acétique libéré à partir des hémicelluloses joue un rôle de catalyseur pour la dépolymérisation de la lignine par l'intermédiaire d'un clivage hétérolytique par catalyse acide qui pourrait également conduire à des réactions concomitantes de repolymérisation de la lignine par formation de nouvelles liaisons C-C ($\beta\text{-}\beta$, $\beta\text{-1,}\beta\text{-5}$) [Lora et Wayman 1978]. Dans notre cas, les valeurs de pH des phases aqueuses à la fin des trois traitements par autohydrolyse sont légèrement acides et très proches (pH $\sim 3,5 \pm 0,05$). La différence d'acidité du milieu entre les conditions d'autohydrolyse ne permet donc pas d'expliquer les différences de structures observées au niveau de la lignine. Par contre, il a été démontré qu'en milieu légèrement acidifié, le clivage homolytique précédé de la formation d'une quinone est favorisé [Li et Lundquist 2000 et

Nimz 1966, voir figure 39-voie a]. Ce mode de fragmentation est responsable de la dégradation de la lignine par le traitement d'explosion à la vapeur [**Tanahashi 1990**] et par traitement mécanique dans le domaine des pâtes à papier [**Johansson et Gellerstedt 2002**]. Par conséquent, le clivage hétérolytique des liaisons aryle éther ne doit pas être un modèle unique de la dégradation de la lignine mais une fragmentation homolytique peut également se produire celle-ci serait favorisée par l'augmentation de la température de l'autohydrolyse.

III.3. Prétraitement en deux étapes

Le traitement organosolv a été effectué sur le *MxG* natif et sur les résidus solides récupérés après autohydrolyse pour une même sévérité du prétraitement ($\text{LogR}_0 \sim 4,1$) réalisée à 130, 140 et 150 °C. L'autohydrolyse réalisée à 150 °C a été aussi effectuée en présence du 2-naphtol (4 %, m/m par rapport à la masse sèche) décrit dans la littérature comme étant un réactif qui permet d'améliorer les rendements de délignification [Li et al. 2007, Li et Gellerstedt 2008].

Nous avons choisi de réaliser le traitement organosolv pour des conditions opératoires à faible sévérité combinée de traitement (voir tableau 14). Ce choix de faible sévérité de traitement a été retenu dans le but de limiter la dégradation des sucres en furanes et ses dérivés mais également pour étudier l'influence du prétraitement par autohydrolyse sur la délignification.

Tableau 14. Conditions opératoire utilisés pour le traitement organosolv avec et sans prétraitement

| t (min) | T (°C) | EtOH/H ₂ O (%) | H ₂ SO ₄ (%) | Ratio (liquide/solide) | Sévérité combinée (SC) |
|---------|--------|---------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 60 | 170 °C | 80 | 0,5 | 8/1 | 1,69 |

La figure 38 montre la teneur en lignine de Klason des résidus solides récupérés après le traitement organosolv et le tableau 15 rassemble tous les résultats obtenus en tenant compte des 2 processus (organosolv + prétraitement), la composition des résidus solides et des phases aqueuses, la quantité en EOL et en lignine soluble récupérée. Comme le montre la figure 38, une SC de 1,69 du traitement organosolv sur le *MxG* non traité semble ne pas être efficace et les conditions utilisées ne permettent pas une solubilisation efficace de la lignine. Par contre, une grande quantité de lignine est extraite à partir des résidus solides de *MxG* après autohydrolyse. Ainsi, en utilisant un procédé en deux étapes, 65 à 82 % de la lignine est récupéré sous forme de EOL et de lignine soluble laissant un taux de lignine résiduelle faible dans le résidu solide (~ 10 %, voir figure 38).

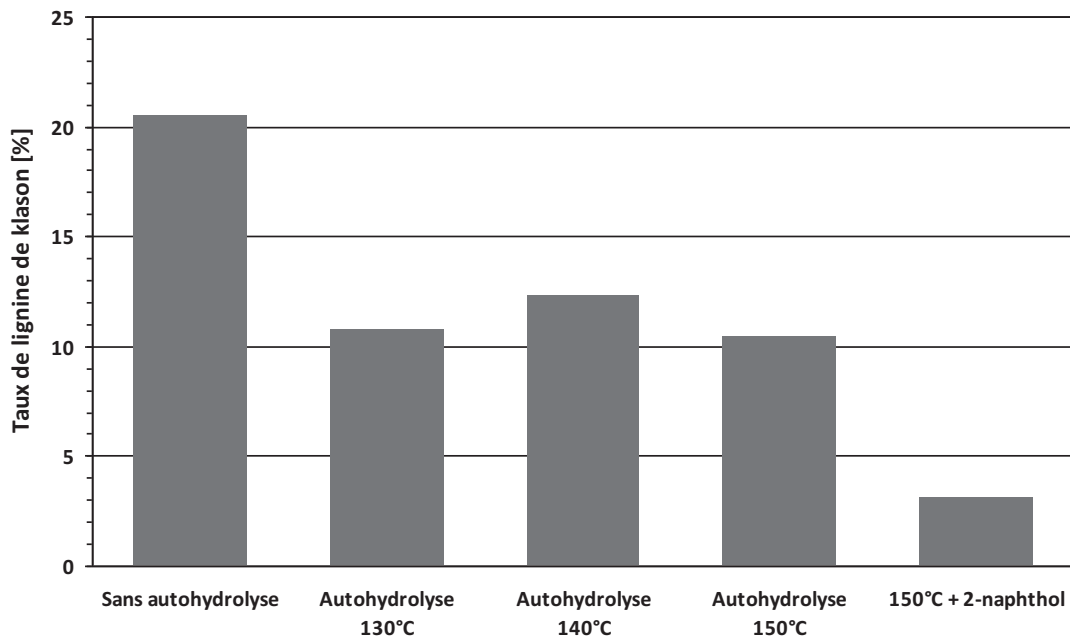


Figure 38. Taux de ligne de Klason des résidus solides avec et sans prétraitement par autohydrolyse

Comme montré précédemment (voir paragraphe III.2.) la principale raison de l'augmentation de la délignification observée est liée à la dépolymérisation de la lignine par l'intermédiaire d'un clivage des liaisons α -aryle éther. Néanmoins, pour les autohydrolyses réalisées à 140 et 150 °C, le bilan du taux délignification (EOL + LS ~20 %, tableau 15) est légèrement plus faible que celui obtenu à 130 °C (EOL+LS ~23 %, tableau 15). Cette observation peut être expliquée par des réactions de condensation de la lignine par la formation des liaisons C-C décrites dans le paragraphe précédant qui seraient responsables de la diminution du taux de délignification à des températures plus élevées.

Ainsi, ce processus de repolymérisation de la lignine dû à sa condensation agit d'une façon négative en diminuant le taux de délignification. Par contre, il apparaît que la présence de 2-naphtol durant l'étape du prétraitement, agit positivement et améliore le taux de délignification et la récupération de lignine sous forme EOL tout en laissant un résidu solide final présentant une teneur en lignine très faible (3 %, voir figure 38).

Ce résultat s'explique par un processus de dépolymérisation de la lignine par clivages homolytique et hétérolytique des liaisons aryle ether accompagnés de l'addition du naphtol sur la chaîne propyle de la lignine. En effet, le naphtol présentant une plus grande réactivité chimique vis-à-vis des réactions de substitution électrophile aromatique que la lignine, celui-

ci réagit préférentiellement avec le carbocation benzylique intermédiaire de la réaction de dépolymérisation de la lignine en bloquant la position α et en limitant les réactions d'autocondensation [Li et Gellesrstedt 2008, voir figure 39-voie b].

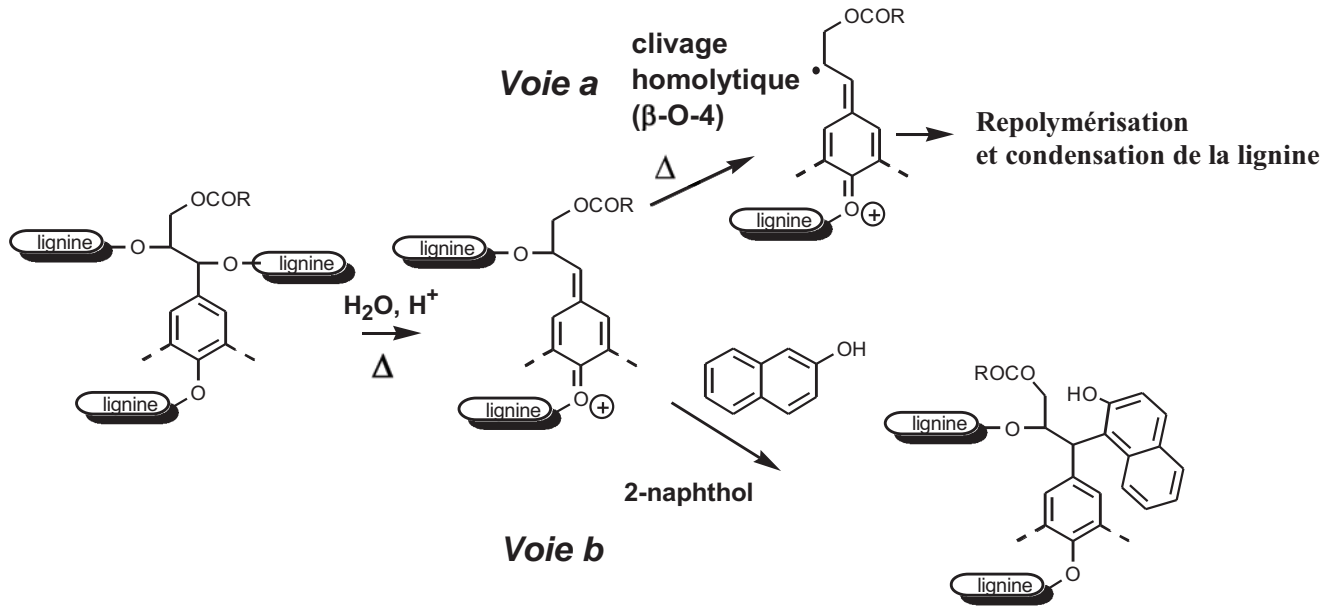


Figure 39. Mécanisme du clivage homolytique des liaisons β -aryle éther (voie a) et mécanisme réactionnel de l'action du 2-naphtol (voie b)

Ainsi, en présence du 2-naphtol, on observe une augmentation de la dépolymérisation de la lignine après autohydrolyse qui permet la production de lignine de faible poids moléculaire dont la solubilité est plus élevée en présence d'éthanol.

De façon plus surprenante, en présence du 2-naphtol nous observons également une meilleure récupération des sucres : des bons rendements en glucose et xylose solubles ont été obtenus, accompagnés par un taux de furanes plus faible. Ce comportement serait probablement associé à la forte délignification observée qui, en augmentant la surface spécifique du substrat [Del rio et al. 2010], améliorerait la diffusion de l'eau et des ions hydroniums à travers les pores de la biomasse et permettrait une hydrolyse importante d'hémicelluloses tout en limitant la dégradation des sucres.

Tableau 15. Bilan total de l'analyse des résidus solides et des phases aqueuses obtenus avec et sans prétraitement

| Condition opératoire | Résidu solide | | | | | | Phase liquide | | | | |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|---------------|------------------|------------------|------------------|
| | LK ^a | ASL ^b | Glu ^c | Xyl ^d | Ara ^e | EOL ^f | LS ^g | furans | Glu ^c | Xyl ^d | Ara ^e |
| Sans prétraitement | 14,15 ±0,28 | 1,3 ± 0,01 | 45,80 | 19,17 | 0,97 | 0,41 | 10,1 ±0,5 | 0,35 ±0,03 | 0,33 (0,04) | 2,21 (0,07) | 1,19 (0,32) |
| Autohydrolyse 130 °C 31 h | 4,44 ± 0,50 | 0,20 ±0,02 | 37,55 | 1,94 | - | 17,24 | 6,12 ±0,14 | 1,40 ±0,05 | 4,54 (0,93) | 12,63 (4,93) | 1,35 (0,99) |
| Autohydrolyse 140 °C 16 h | 6,07 ±0,50 | 0,15 ±0,02 | 39,80 | 4,32 | - | 12,74 | 6,54 ±0,12 | 1,50 ±0,04 | 2,22 (0,34) | 10,18 (5,44) | 1,23 (0,96) |
| Autohydrolyse 150 °C 8 h | 4,25 ±0,30 | 0,17 ±0,03 | 36,71 | 1,08 | - | 13,42 | 6,50 ±0,16 | 2,36 ±0,07 | 6,28 (1,27) | 10,37 (6,02) | 0,99 (0,79) |
| Autohydrolyse 150 °C 8 h + 2-Naphthol | 0,96 ±0,10 | 0,22 ±0,02 | 35,94 | 1,14 | - | 17,05 | 9,04 ±0,32 | 1,35 ±0,05 | 10,55 (1,86) | 16,70 (4,86) | 1,45 (0,66) |
| Autohydrolyse 150 °C 8 h + 2-Naphthol | 1,11 ±0,10 | 0,19 ±0,04 | 36,53 | 0,95 | - | 16,07 | 8,50 ±0,20 | 1,29 ±0,03 | 8,00 (1,50) | 14,00 (3,85) | 1,02 (0,70) |

^a(LK) Lignine de Klason ^b(ASL) Lignine soluble dans l'acide ^c(Glu) Glucose ^d(Xyl) Xylose ^e(Ara) Arabinose ^f(EOL) lignine éthanol organosolv ^g(LS) Lignine soluble

III.4. Observation par microscopie électronique à balayage du *MxG* natif et traité

Des observations par microscopie électronique à balayage ont été effectuées et sont présentées dans les figures ci-dessous :

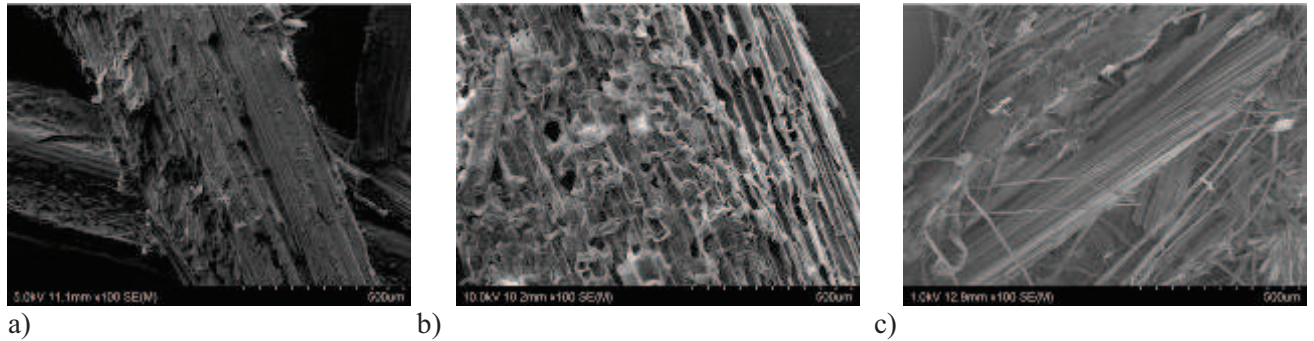


Figure 40. Image microscopique du : a) *MxG* Native, b) *MxG* après autohydrolyse et c) *MxG* après organosolv

Comme le montrent ces images, on voit que la surface du *Miscanthus* sans traitement (figure 40-a) est intacte, tandis que l'image de cette biomasse après autohydrolyse (figure 40-b) montre une surface non homogène qui présente des trous et des déchirures. Ces observations peuvent être expliquées par l'extraction des xylanes traitée précédemment qui fragiliserait la matière première et permettrait une extraction plus facile de la lignine. La figure 40-c montre après extraction de la lignine par le traitement organosolv, un matériau fibreux composé principalement des fibres de cellulose.

III.5. Prétraitement par hydrolyse enzymatique

Cette partie de notre travail est une étude préliminaire consacrée à un procédé biocatalysé. Ce choix se justifie par l'utilisation d'enzymes industrielles de faible coût et produites en grande quantité. Un cocktail enzymatique connu sous le nom de cellulolve commercialisé par la société Sigma-Aldrich a été utilisé pour un prétraitement du *MxG*. Nous avons sélectionné ces enzymes car ils présentent des activités spécifiques pour l'hydrolyse des xylanes.

III.5.1. Suivie cinétique des pertes des masse en fonction de la concentration d'enzymes et du temps

L'optimisation de l'effet de la concentration du cocktail enzymatique sur la perte de masse a été envisagée. Le tableau 16 rassemble les pertes de masse obtenues en fonction de la concentration du cocktail enzymatique. Comme le montrent ces résultats, on observe une corrélation entre la teneur en enzymes et les pertes de masse. Après 6 jours d'agitation continue à une température de 45 °C et en utilisant seulement l'eau comme phase liquide, le meilleur résultat de perte de masse (12,5 %) a été obtenu pour une concentration d'enzymes de 5 %.

Nous avons ensuite réalisé un suivi cinétique des pertes de masse de *MxG* en présence du cocktail enzymatique (5 %). Le tableau 16 rassemble les valeurs de la moyenne des pertes de masse en fonction du temps. Ces expériences ont été réalisées 2 fois et en parallèle. On observe que l'activité du cocktail enzymatique a atteint son maximum dès 24 h d'agitation.

Ces résultats ont permis d'optimiser le prétraitement enzymatique. Les conditions opératoires (5 % du cocktail enzymatique, 24 h d'agitation) ont été retenues comme conditions optimales pour la suite de notre travail.

Tableau 16. Pertes de masse du *MxG* en fonction de la concentration en enzymes pour 6 jours d'agitation et suivie cinétique des pertes de masse pour 5 % d'enzymes

| | | | | | | | |
|---------------------------|------|-----|------|------|-------|-------|------|
| t (Jours) | 6 | 6 | 6 | 6 | 1 | 2 | 3 |
| Cellulive (%) | 0 | 1 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Perte de masse (%) | 5,32 | 8,5 | 8,40 | 12,5 | 12,27 | 12,00 | 12,5 |

III.5.2. Prétraitement par hydrolyse enzymatique pour un traitement organosolv

L'influence du prétraitement enzymatique a été étudiée par l'intermédiaire d'une étude préliminaire sur le *MxG* pour voir son effet sur le traitement organosolv. Les résidus solides obtenus après prétraitement enzymatique (5 % enzyme, 24 h d'agitation) ont été traités par le procédé organosolv (SC ~ 1,69).

Les résultats des analyses des résidus solides et des phases liquides sont rassemblés dans le tableau 17. On observe que le prétraitement enzymatique aboutit à un bon rendement de délignification du *MxG*. Comparé au procédé organosolv réalisé sans prétraitement et après autohydrolyse, un meilleur rendement en lignine sous forme EOL ainsi qu'en sucre a été observé. Le pourcentage de lignine de Klason dans le résidu solide est plus faible que celui obtenu après autohydrolyse et se rapproche de la valeur du pourcentage de lignine après autohydrolyse en présence du 2-naphtol. Ce résultat prometteur s'explique par les conditions réactionnelles utilisées: l'hydrolyse enzymatique est un procédé réalisé dans des conditions particulièrement douces (45 °C) permettant une fragilisation de la matrice qui relie les hémicelluloses, la cellulose et la lignine tout en limitant la modification et la condensation de la lignine permettant ainsi l'élimination d'environ 99 % de la masse initiale de lignine qui compose notre biomasse. Le résultat obtenu confirme donc la conclusion du paragraphe III.3 qui met en relation l'état de condensation de la lignine et l'efficacité du processus de délignification.

Tableau 17. Résultats des analyses des résidus solides et des phases liquides en combinant le prétraitement enzymatique et le traitement organosolv

| Condition opératoire | Résidu solide | | | | | | Phase liquide | | | | |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|---------------|------------------|------------------|------------------|
| | LK ^a | ASL ^b | Glu ^c | Xyl ^d | Ara ^e | EOL ^f | LS ^g | furanes | Glu ^c | Xyl ^d | Ara ^e |
| Hydrolyse enzymatique | 1,80 ±0,05 | 0,31 ±0,03 | 37,00 | 3,58 | - | 14,66 | 7,12 ±0,18 | 0,52 ±0,02 | 3,71 (1,57) | 14,64 (6,28) | 2,02 (0,57) |

^a(LK) Lignine de Klason ^b(ASL) Lignine soluble dans l'acide ^c(Glu) Glucose ^d(Xyl) Xylose ^e(Ara) Arabinose ^f(EOL) lignine éthanol organosolv ^g(LS) Lignine soluble

III.7. Conclusion

Un procédé de traitement en deux étapes, impliquant une autohydrolyse préalable au traitement organosolv a été étudié. Cette préhydrolyse peut être considérée comme un procédé vert puisqu'il utilise uniquement de l'eau comme réactif et solvant. Une analyse chimique détaillée des résidus solides et des hydrolysats a été menée afin d'établir les conditions optimales du traitement. Cette hydrolyse facilite l'étape ultérieure de délignification organosolv en déstructurant la lignine. De plus, il a été démontré que pour une même sévérité de traitement et pour trois températures différentes, l'augmentation de la température avait un impact sur la structure de la lignine. L'étude de l'impact de la température de l'autohydrolyse sur la structure chimique de la lignine de bois broyé (MWL) contenue dans le résidu solide a été menée et a permis une optimisation du procédé grâce à l'ajout d'un piègeur de carbocations: le 2-naphtol.

Un essai préliminaire de prétraitement enzymatique réalisé dans des conditions douces s'est révélé tout à fait prometteur et nous a permis d'obtenir un excellent rendement de délignification accompagné d'une dégradation des sucres particulièrement faible.

Chapitre IV. Applications pour la lignine éthanol organosolv (EOL) de *MxG*

IV. Introduction

La lignine est un polymère naturel qui présente des applications importantes. La lignine commerciale est actuellement un co-produit de l'industrie de la pâte à papier qui est, dans une grande proportion, utilisée pour la production d'énergie.

Pourtant, compte tenu de sa structure chimique, la lignine pourrait constituer une source de matières premières dans les secteurs de l'alimentation et des matériaux.

Depuis quelques années, on constate un intérêt industriel croissant pour le développement d'adhésifs naturels ou verts pour le bois pour remplacer les résines synthétiques. Cet intérêt est dû à l'augmentation et à la fluctuation du prix du pétrole. De plus la protection de l'environnement est devenue un enjeu au niveau mondial. Historiquement, dans la fabrication des premières colles pour le bois, l'homme a cherché à utiliser des produits naturels comme les extraits de poisson ou le blanc d'œuf. Au vingtième siècle sont apparus les adhésifs synthétiques industriels. Les adhésifs thermodurcissables les plus utilisés aujourd'hui dans l'industrie du panneau de bois sont les résines urée-formaldéhyde (80-85 %), mélanine-urée-formaldéhyde (10-15 %), phénol-formaldéhyde (3-5 %), et isocyanate (1-2 %). Ainsi, la plupart des adhésifs employés pour la production des panneaux dérivés du bois utilisent des polymères d'origine fossile et le formaldéhyde comme agent de réticulation. En raison de la reclassification recommandée du formaldéhyde comme étant une substance cancérigène pour l'homme (ICRC, 2004), les nouvelles normes japonaises concernant les émissions de formaldéhyde des adhésifs pour le bois sont devenues très restrictives et font face à une demande accrue aux résines à faible ou sans émission de formaldéhyde. Une solution alternative pourrait donc être l'utilisation des adhésifs à base de polymères éco-sourcés (tannins et/ou de lignine) en l'absence de formaldéhyde. L'utilisation de l'hexamine comme un agent durcisseur dans la préparation des adhésifs est acceptée par les normes japonaise JIS A5908 (1994). L'hexamine n'est pas considérée comme une source de formaldéhyde en présence des flavonoïdes condensés [Pichelin *et al.* 2006, Kamoun *et al.* 2000]. Dans la littérature, il existe de nombreux travaux sur l'utilisation de la lignine comme précurseur pour adhésifs [Abe 1987, Feldman 2002, Lewis et Lantzy 1989, Nimz 1983, Pecina et Kuchne 1995]. Malgré ce grand nombre de publications qui s'y intéressent, les utilisations industrielles de colles vertes à base de lignine sont encore très limitées. En

laboratoire, des colles vertes à base de fractions de lignines issues de l'industrie papetière ont récemment été préparées avec succès et des panneaux de particules présentant des caractéristiques mécaniques proches de la norme européenne ont été obtenus [Lei et al. 2008, EL Mansouri et al. 2007]. Mais, à notre connaissance, aucun travail n'a été réalisé sur la préparation de colles vertes à partir de la lignine de *Miscanthus x Giganteus* extraite par le traitement éthanol organosolv.

Depuis les années 90, de nombreux travaux s'intéressent à l'activité antioxydante potentielle d'extraits de plantes lignocellulosiques destinés aux domaines de la santé et de l'alimentation. Les travaux de Mitjans et Vinardell (2005) ont montré que les plantes constituées de lignine possèdent des activités bénéfiques pour la santé en tant qu'antibactériens, antiparasitiques, antitumoraux, antiviraux, et autres. La lignine extraite à partir de différentes sources a été reportée dans la littérature comme étant un polymère possédant des propriétés antioxydantes et un réactif piègeur radicalaire efficace qui stabilise les réactions induites par l'oxygène et ses espèces radicalaires dues aux divers groupements fonctionnels qui la structure [Dizhbite 2004, Vinardell et al. 2008, Sakagami et al. 1992, Dizhbite et al. 2004]. L'activité antioxydante de la lignine a été largement étudiée; elle dépend énormément de la nature des biomasses lignocellulosiques à partir desquelles elle est extraite, des procédés d'extractions utilisés et des traitements appliqués durant l'étape d'isolation et de purification. Récemment, Garcia et al. (2010) ont présenté une étude comparative de l'effet de traitement par autohydrolyse, de traitement à la soude et organosolv sur l'activité antioxydante de la lignine de *Miscanthus Sinensis*. Mais à notre connaissance, l'effet de la sévérité du traitement éthanol organosolv sur les propriétés antioxydantes des lignines de *MxG* extraites n'a jamais été étudié.

Dans ce contexte, le présent chapitre a pour objectif de montrer des applications pour la lignine organosolv de *MxG* dans le domaine des adhésifs pour panneaux de particules et dans le domaine des antioxydants.

Dans ce cadre, la première partie de ce chapitre montrera la possibilité de préparer un adhésif vert à base de lignine organosolv de *miscanthus*. La résine préparée servira à élaborer des panneaux de particules dans lequel un aldéhyde non toxique et peu volatile (le glyoxal) est employé en remplacement du formaldéhyde.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous intéresserons aux propriétés antioxydantes des lignines organosolv extraites; une étude de l'effet de la variation de la sévérité du traitement éthanol organosolv et des groupements fonctionnels hydroxyles des lignines extraites sur les propriétés antioxydantes sera menée en utilisant la méthode de l'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle.

IV.1. Adhésifs pour panneaux de particules à partir de la EOL

On s'est intéressé à l'utilisation d'une des fractions de lignine organosolv extraite dans le chapitre 2 pour la production d'adhésifs pour le bois. Afin d'utiliser la lignine organosolv dans une formulation adhésive, il est nécessaire de l'activer dans un premier temps par l'utilisation d'un agent de réticulation. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de glyoxal, un dialdéhyde non toxique et peu volatile. L'hexamine a été ajoutée en faible quantité comme agent durcisseur.

IV.1.1. Glyoxalisation de la lignine organosolv et analyse par RMN ^{13}C

La glyoxalisation de la lignine organosolv de miscanthus a été réalisée par action du glyoxal sur la lignine dans un milieu basique. Le spectre RMN ^{13}C de la lignine organosolv (EOL4) comparé avec le spectre de la lignine après glyoxalisation (figure 41) indique que les conditions utilisées dégradent et modifient énormément le polymère; la région aliphatique (89-58 ppm) révèle un signal très faible correspondant à la zone aliphatique C-O de la chaîne latérale propylique de la lignine. Cette observation indique que les liaisons aryles éthers (β -O-4 et α -O-4) sont fortement affectées par ce traitement.

Quelques pics après glyoxalisation apparaissent dans le spectre de RMN ^{13}C : le plus important est le pic à 61 ppm qui correspond au groupement benzyle alcool formé par la réaction du glyoxal avec la chaîne ortho des motifs aromatiques de la lignine phénolique. Comme proposé ailleurs par **El Mansouri et al. (2007)**, le signal à 181 ppm est attribué au motif L-CH₂-COO₂Na dû à une dismutation de type « Cannizzaro », réaction du glyoxal dans l'eau [**Salomaa 1956, Arcus et Jackson 1964**].

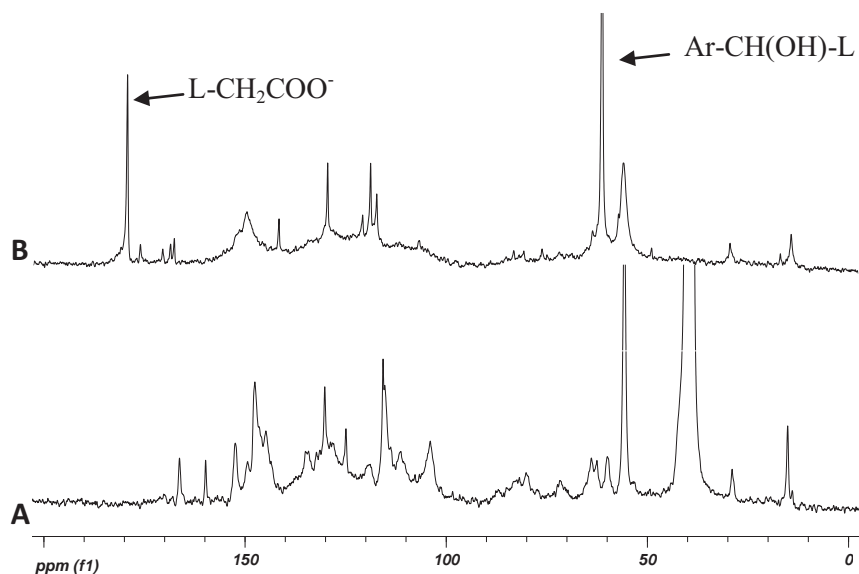


Figure 41. Spectres RMN ^{13}C quantitatifs de la lignine EOL4 dans du DMSO (A) et de la lignine après glyoxalisation dans du D_2O (B)

IV.1.2. Préparation d'adhésifs et analyse par TMA

Des travaux antérieurs ont démontré que, contrairement aux tannins, la lignine glyoxalée (GL) présente de médiocres propriétés adhésives et ne peut pas être utilisée seule comme adhésif pour le bois [Lei et al. 2008]. C'est pourquoi une formulation contenant 50 % de lignine de miscanthus glyoxalée et 50 % de tannin de mimosa a été préparée et évaluée par TMA pour étudier les réactions de polymérisation et de durcissement de la résine en fonction de la température.

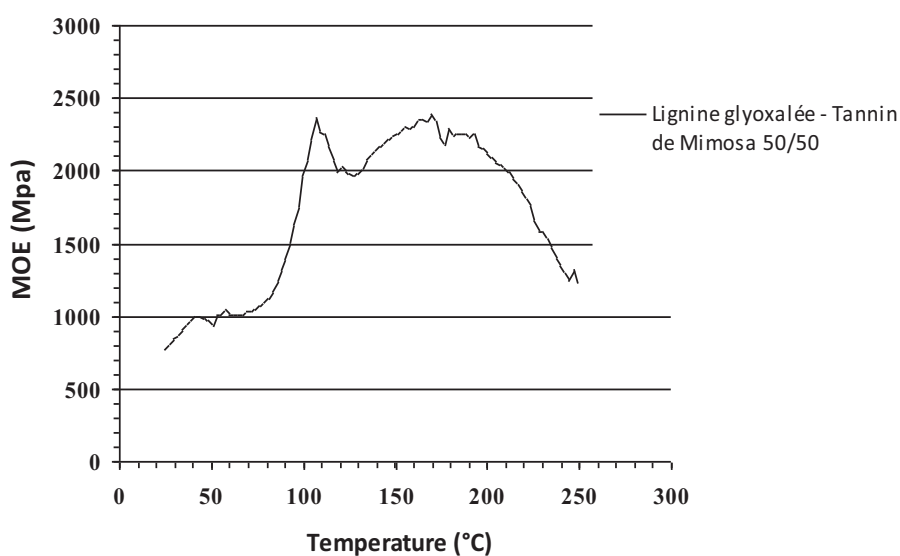


Figure 42. Module d'élasticité de la lignine organosolv glyoxalée en fonction de la température obtenue par analyse thermomécanique (TMA)

Le résultat de l'analyse thermomécanique (TMA) des résines préparées est représenté sur la figure 42. Le résultat obtenu nous enseigne qu'une température de 190 °C semble être suffisante pour un durcissement total de l'adhésif. De plus, d'après la figure 42, on constate un signal intense vers 100 °C qui correspond à une réaction de réticulation initiale par la formation d'un pont non-stable. Ce comportement est caractéristique de différentes résines phénoliques [Garcia et Pizzi 1998]. Précisément dans notre cas, la résine conduit à une réaction de réticulation par formation de ponts méthylène éther (-CH₂OCH₂-) instables dans les conditions de l'expérience qui évoluent avec une augmentation de température vers la formation de ponts méthylène stables (-CH₂-) et avec émission d'une molécule de formaldéhyde. Le formaldéhyde ainsi produit réagit à son tour avec les tannins pour conduire à des réactions de réticulations ultérieures.

IV.1.3. Elaboration des panneaux de particules et analyse des propriétés mécaniques

Après les résultats de TMA obtenus précédemment, deux panneaux de particules ont été finalement préparés (comme le montre la figure 43), selon les conditions opératoires rassemblés dans le tableau 18.



Figure 43. Photographie d'un panneau de particules préparé avec une colle à base de lignine organosolv de *MxG*

Le premier panneau de particule a été préparé selon une formulation incluant des particules de bois avec de la lignine EOL 4 glyoxalée et du tannin de Mimosa (50/50 %). La masse volumique est égale à 695 kg/m³ (bois/résine). Une température de 190 °C a été

appliquée pendant le pressage dont la durée de temps est de 7,5 minutes, conformément aux exigences industrielles. L'analyse mécanique de ce premier panneau de particules a révélé une valeur de la force de liaison interne encourageante de 0,33 MPa, très proche de la valeur correspondant à la norme européenne en vigueur (0,35 MPa).

On constate dans le tableau 18 que l'utilisation d'une formulation contenant 60 % de tannins et 40 % de lignine glyoxalée permet d'améliorer considérablement les propriétés mécaniques du panneau de particules: ainsi une valeur de 0,41 MPa a été obtenue, valeur nettement supérieure à la norme européenne [Pizzi et al. 1993].

Ces résultats préliminaires concernant l'utilisation de la lignine de *MxG* extraite par le procédé organosolv montrent la possibilité d'utiliser cette lignine dans le domaine des adhésifs pour panneaux de particules.

Tableau 18. Conditions opératoires et caractérisation mécanique des deux panneaux de particules élaborés

| Résines | Temps de pressage (min) | Température (°C) | Masse volumique (kg/m ³) | Force de liaison interne (IB) |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| | | | | N/mm ² = MPa |
| EOL (50 %) + tannins de Mimosa (50 %) | 7,5 | 195 | 695 | 0,33 ± 0,02 |
| EOL (40 %) + tannins de Mimosa (60 %) | 7,5 | 195 | 696 | 0,41 ± 0,05 |

IV.2. Etudes des propriétés anti oxydantes des lignines organosolv

L'activité antioxydante peut se mesurer de différentes manières, par des méthodes biochimiques ou par des méthodes purement chimiques. Elle est généralement étudiée en se référant à l'oxydation de divers substrats organiques. Nous avons utilisé dans cette étude une méthode basée sur l'inhibition de l'oxydation de linoléate de méthyle (figure 44).

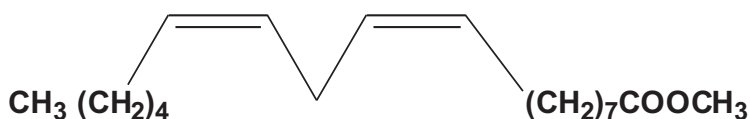


Figure 44. Structure du linoléate de méthyle

IV.2.1. Inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle (LH)

Nous avons étudié l'influence des lignines EOL extraites à différentes sévérités sur l'oxydation induite de LH afin d'établir qualitativement un classement de leur pouvoir antioxydant en comparant les vitesses de consommation d'oxygène en présence et en l'absence de lignine. Durant ces expériences, la consommation d'oxygène au cours du temps est suivie par mesure manométrique. La figure 45 montre un exemple d'une courbe d'un témoin (sans antioxydant) comparée avec une autre courbe obtenue en présence d'un agent antioxydant.

Nous calculons ensuite l'activité antioxydante (AAO) qui est définie en comparant la consommation d'oxygène en un temps donné en présence des lignines par rapport à la consommation d'oxygène en absence des lignines (témoin), comme l'illustre la figure 45.

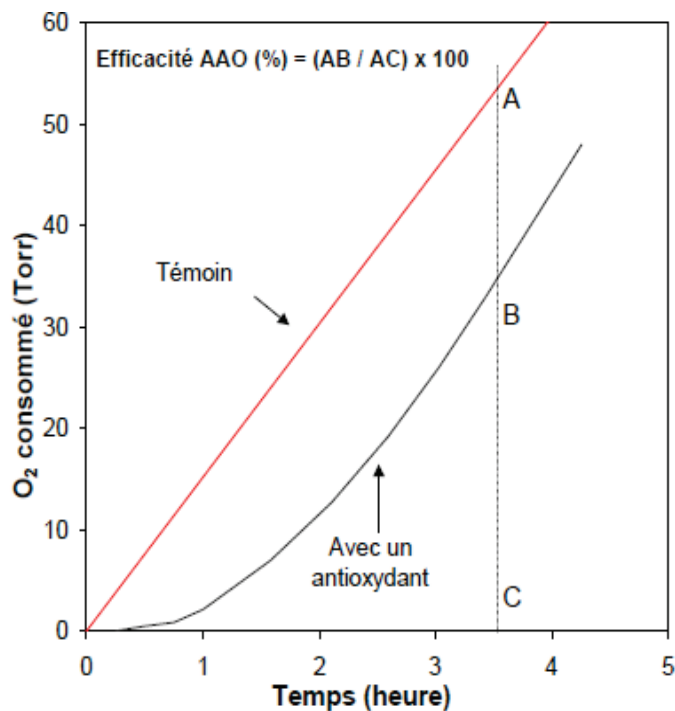


Figure 45. Calcul de l'activité antioxydante (AAO)

Les résultats des analyses des propriétés antioxydantes des lignines sont portés sur la figure 46. Notons que, bien que l'acquisition de la pression soit quasi-continue (voir annexe 10), nous avons porté les données sous forme de lignes, pour plus de clarté. Comme on peut le voir sur la figure 46, toutes les lignines étudiées inhibent l'oxydation de LH induite par l'AIBN. Cependant, leurs pouvoirs antioxydants sont très variables.

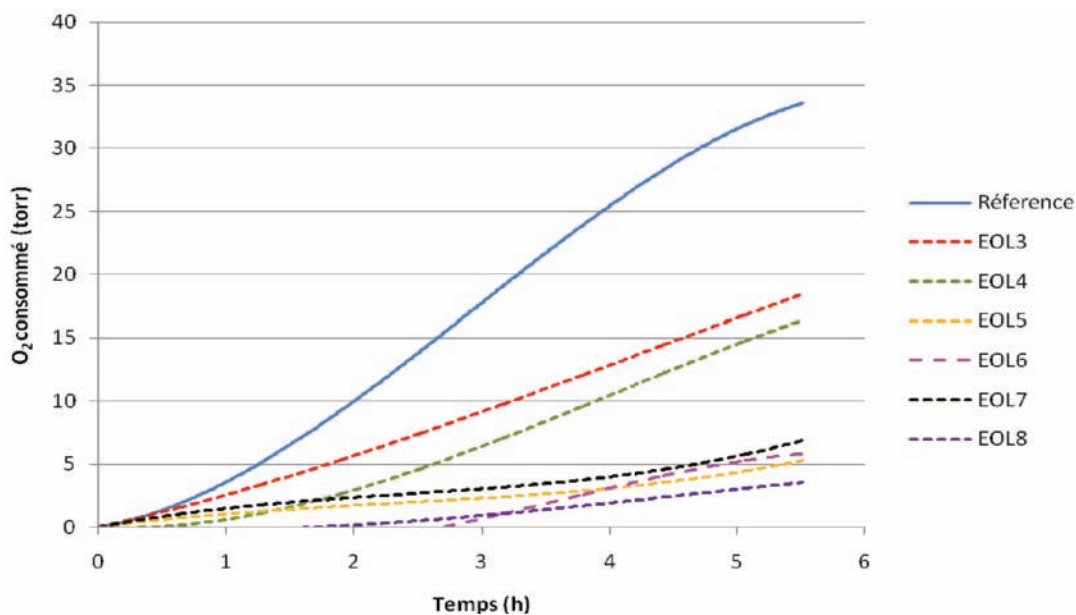


Figure 46. Influence des lignines (0,2 g/L) sur la consommation d'oxygène lors de l'oxydation de LH

On rassemble dans le tableau 19 les valeurs des activités antioxydantes calculées ainsi que les quantifications des motifs hydroxyles phénoliques déterminées par RMN ³¹P (cf. chapitre 2).

Tableau 19. Activités antioxydantes des échantillons de lignines à 4 h

| Nom | SC | OH phénolique | AAO (%) |
|------|------|---------------|---------|
| EOL3 | 1,75 | 2,34 | 47,92 |
| EOL4 | 2,08 | 2,72 | 69,17 |
| EOL5 | 2,38 | 2,71 | 82,08 |
| EOL6 | 2,77 | 4,04 | 88,10 |
| EOL7 | 2,93 | 3,93 | 84,58 |
| EOL8 | 3,02 | - | 92,50 |

On constate que le pouvoir antioxydant varie en fonction de la nature des fractions de lignine utilisées. Les valeurs des AAO estimées pour les lignines nous ont permis de classer les lignines organosolv par ordre croissant variant de EOL3 qui est la lignine dont les propriétés antioxydantes sont les plus faibles jusqu'à EOL7 (propriété antioxydante les plus élevées). Afin de comprendre ces résultats, nous représentons dans les figures 47 et 48 le pouvoir antioxydant des lignines en fonction de la sévérité combinée du traitement et la concentration en groupes OH phénoliques (mmol.g⁻¹) respectivement.

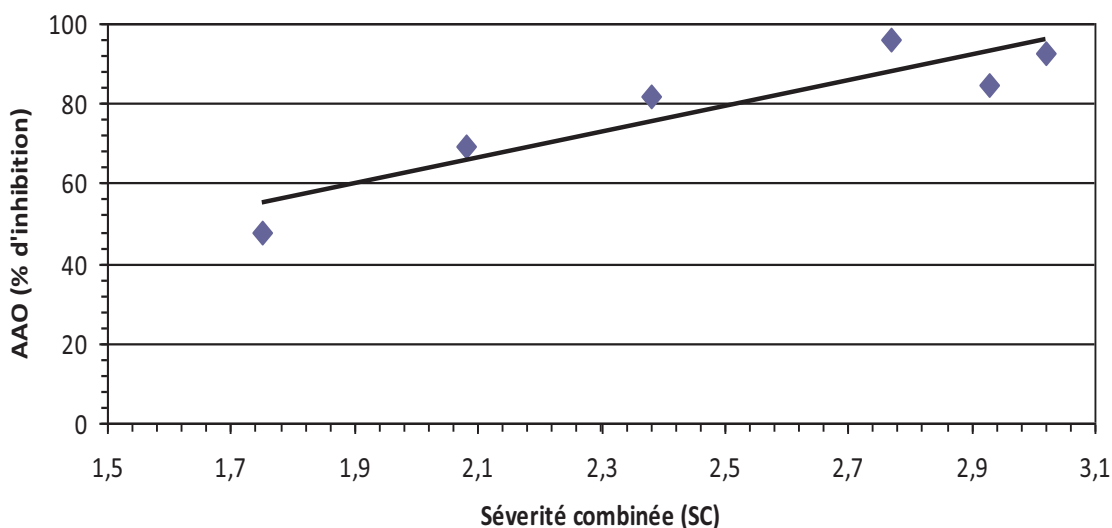


Figure 47. Effet de la sévérité combinée sur l'activité antioxydante

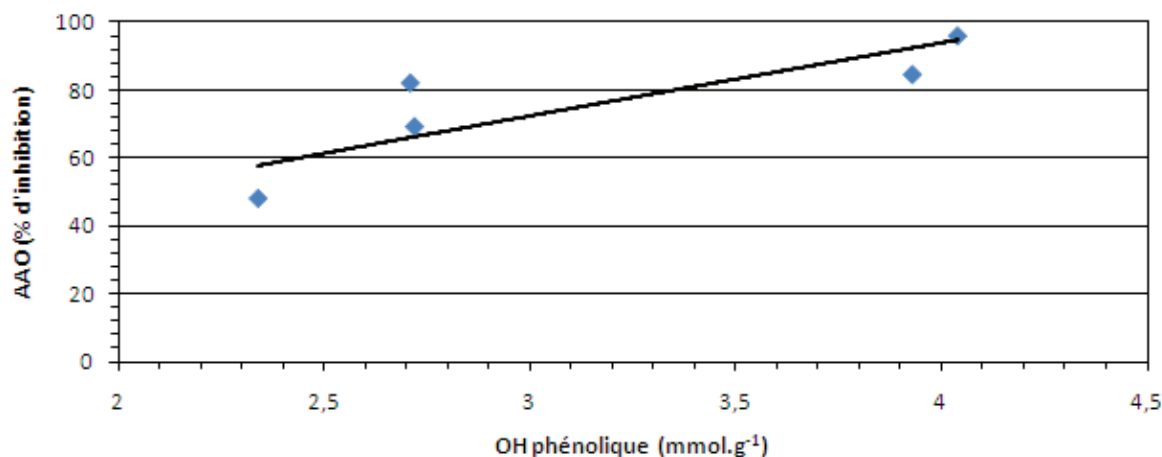


Figure 48. Variation de l'AAO en fonction du nombre de moles des OH phénoliques des lignines

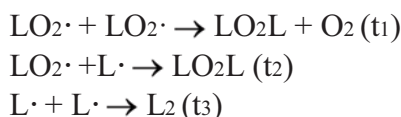
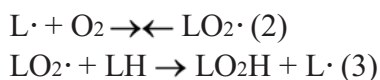
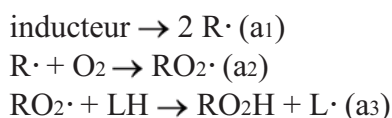
D'après la figure 47, on observe qu'il y a une assez bonne corrélation entre l'activité mesurée par la méthode de l'oxydation de LH et la sévérité combinée de traitement. L'activité antioxydante augmente avec la sévérité combinée du traitement organosolv.

La figure 48 montre qu'il y a aussi une corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en groupements hydroxyles phénoliques des lignines, très certainement impliqués dans les phénomènes d'antioxydation [Barclay et al. 1997, Dizhbite et al. 2004].

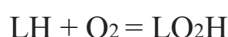
Il est indiqué dans la littérature que la masse moléculaire moyenne ainsi que l'indice de polydispersité les plus élevés jouent un facteur important dans la diminution de l'activité radicalaire de la lignine [Pan et al. 2006]. La masse moléculaire moyenne la plus élevée correspond à des lignines dont les propriétés antioxydantes sont plus faibles. D'après les résultats présentés dans le chapitre 2, la masse moléculaire moyenne des lignines diminue avec la sévérité combinée de traitement. Cette diminution est due à la dépolymérisation de la lignine, le clivage des liaisons esters qui permet l'augmentation des motifs OH phénoliques (Ar-OH). En d'autres termes, la lignine de faible masse moléculaire possède une teneur plus importante en motifs hydroxyles aromatiques. Cela explique les résultats des propriétés antioxydantes des lignines qui augmentent avec la sévérité combinée du traitement, le nombre de OH phénoliques et la diminution de la masse moléculaire. Ce comportement des propriétés antioxydantes des lignines organosolv de *MxG* est en accord avec les travaux de Pan et al. (2006). Leurs travaux ont montré que les propriétés antioxydantes les plus élevées correspondent aux lignines de peuplier qui sont extraites par le traitement le plus sévère :

(1) la température la plus élevée, (2) le temps de traitement le plus long et (3) l'acidité la plus forte.

En laboratoire, on utilise généralement un inducteur (thermique ou photochimique) pour la détermination des propriétés antioxydantes par le linoléate de méthyle. **Rousseau-Richard et al. (1988)** ont montré qu'à faible avancement réactionnel, l'oxydation induite de l'acide gras LH peut être interprétée à l'aide d'un mécanisme radicalaire en chaîne qui, dans sa version la plus simple, se présente comme suit :



Les radicaux libres porteurs de chaîne $\text{L}\cdot$ sont formés dans les processus (a₁) à (a₃) qui constituent l'amorçage des chaînes. Les processus (2) et (3) constituent la propagation des chaînes ; ils rendent compte de la stœchiométrie principale (tant que les chaînes sont longues) d'oxydation :



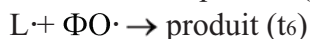
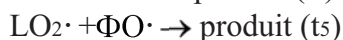
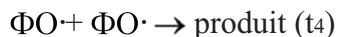
Enfin, les porteurs de chaîne $\text{L}\cdot$ et $\text{LO}_2\cdot$ participent aux processus de terminaison des chaînes (t₁) à (t₃).

Dans notre cas, la lignine est donc un corps qui agit en rompant la chaîne d'oxydation en remplaçant un radical porteur de chaîne par un radical plus stable et qui ne participe pas à cette chaîne. Ainsi, on peut interpréter les propriétés antioxydantes d'un donneur d'hydrogène (comme le sont de nombreux phénols), noté ΦOH , en ajoutant au mécanisme d'oxydation les processus suivants:



La capacité de piégeage des radicaux des composées phénoliques dépend non seulement de la capacité à former un radical phénoxy mais aussi de la stabilité de ce dernier. Les structures phénoliques avec des substituants qui peuvent stabiliser les radicaux phénoxy ont une activité plus élevée que ceux qui n'en ont pas. Par exemple, des substituants en position ortho tels que les groupes méthoxyles stabilisent les radicaux phénoxy par résonance. Les doubles liaisons conjuguées peuvent fournir une stabilisation supplémentaire des radicaux phénoxy par délocalisation. Toutefois, un motif carbonyle conjugué a un effet négatif sur l'activité antioxydante.

Ainsi le phénomène d'inhibition par ces molécules consiste à remplacer les radicaux $\text{LO}_2\cdot$ et $\text{L}\cdot$ très réactifs et à l'origine de la réaction en chaîne d'oxydation par les radicaux phénoliques $\Phi\text{O}\cdot$ stables, et qui ne réagiront donc plus que dans des processus de terminaison.



La complexité de la molécule de lignine comparée à celle des tannins et flavonoïdes, montre une difficulté pour attribuer cette activité antioxydante à un motif structurale bien défini de sa structure [Okuda et al. 1991, Sakagami et al. 2005].

IV. 3. Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à trouver des applications pour la lignine de *MxG* extraite par le procédé éthanol organosolv. La préparation d'adhésifs verts a été réalisée avec succès en utilisant des formulations à base de la lignine de miscanthus et de tannins de Mimosa. Des formulations glyoxalées à base de lignine organosolv de miscanthus et de tannins de mimosa ont été réalisées et analysées par TMA. Les premiers panneaux de particules à base de lignine de *MxG*, conçus à partir de matières premières naturelles ont été élaborés avec succès. La possibilité d'utiliser la lignine organosolv de *MxG* en tant qu'antioxydante a été mise en évidence. Les résultats ont montré que les propriétés antioxydantes sont corrélées avec la sévérité combinée des traitements, la masse moléculaire moyenne et le nombre des groupements hydroxyles phénoliques.

Chapitre V. Matériels et méthodes

Ce chapitre se compose de deux parties. Dans la première, nous décrirons les matières premières, les produits chimiques, les dispositifs et les protocoles expérimentaux utilisés pour la séparation des trois constituants essentiels de la biomasse (la lignine, la cellulose, et les hémicelluloses), ainsi que les procédés de mise en œuvre utilisés pour l'élaboration d'adhésifs vert pour application panneau de particules à partir de la lignine de *MxG*. Dans la seconde partie, nous présenterons les principales techniques d'analyses, de caractérisations physico-chimiques et morphologiques.

V.1. Matériels

V.1.1. *Miscanthus x Giganteus (MxG)*

Le miscanthus utilisé dans le cadre de ces travaux expérimentaux a été récolté en hiver 2008 à proximité d'un site local à Courcelles-Chaussy (Metz-France). La biomasse a été broyée en particules et a été stockée dans un congélateur à -5 °C tout au long de notre étude.

V.1.2. Produits chimiques

Dans cette étude, tous les produits chimiques sont commercialisés par la société Sigma-Aldrich et VWR international. Ils ont été utilisés tels qu'ils ont été reçus, à l'exception de p-dioxane qui a été distillé sur NaBH₄ avant d'être utilisé.

V.2. Dispositifs et protocoles expérimentaux

V.2.1. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité est défini comme le rapport de la masse totale d'eau de la biomasse sur la masse anhydre de la biomasse en question. La masse sèche de notre biomasse a été déterminée avant le début de chaque expérience par l'intermédiaire d'une balance d'humidité. Un chauffage par lumière infrarouge à une température de 105 °C a été appliqué et le pourcentage de matière sèche a été calculé directement par la balance qui tient compte de la masse initiale et de la masse finale.

V.2.2. Réacteur Parr sous pression

Afin de réaliser différents traitements et prétraitements en phase aqueuse dans des conditions thermiques qui dépassent les 100 °C, un réacteur Parr 4842 (volume = 600 ml), sous pression avec contrôle de la température a été utilisé. Le réacteur est également équipé d'un manomètre qui permet de suivre la valeur de la pression interne. A la fin de chaque expérience, le refroidissement du réacteur a été réalisé grâce à un serpentín interne alimenté en eau froide.



Figure 49. Réacteur Parr (4842) sous pression

V.2.3. Détermination du taux de cendres

La détermination du taux de cendres (*ash content*) est basée sur l'élimination des matières organiques d'un échantillon de matériau par calcination à une température définie durant un temps donné. La détermination du taux de cendre du *MxG* a été réalisé grâce à un four régulé en température. Dans un premier temps, une masse anhydre supérieure à 1 g est placée dans une coupelle en céramique. La biomasse est d'abord chauffée à 250 °C pendant 2 h puis à 500 °C pendant 4 h. Le résidu de cendre obtenu est pesé; le résultat est exprimé en pourcentage qui correspond au rapport de la masse du résidu obtenu après calcination sur la masse initiale anhydre de l'échantillon.

V.2.4. Détermination de la composition chimique

Afin de déterminer la composition de la biomasse, les analyses du taux de lignine de Klason et le taux de sucre ont été effectuées. Elle consiste à évaluer le résidu solide restant après hydrolyse complète des glucides (cellulose et hémicelluloses). Dans un premier temps, la biomasse broyée finement est extraite au soxhlet en utilisant du dichloroéthane comme solvant pour éliminer les extractibles. Une masse de 0,175 g (environ ou exactement) est pesée puis mélangée dans des tubes coniques avec un volume de 1,5 ml d'une solution d'acide sulfurique de densité égale à 1,6338 (normalisée TAPPI) préalablement préparée à l'aide d'un densimètre. Le mélange est ensuite humecté pendant 1 h de façon homogène par un agitateur en verre à extrémité aplatie et à une température de 30 °C dans un bain marie agitant. 42 ml d'eau distillée sont ensuite ajoutés afin d'avoir une concentration finale d'acide sulfurique de l'ordre de 3 %. Les tubes sont bien fermés et mis dans un autoclave où ils subissent un chauffage à 121 °C pendant 1 h. Après refroidissement, le mélange obtenu est filtré sous vide modéré sur un verre fritté n° 3 préalablement séché et pesé à vide. Le filtrat est placé dans une étuve à 105 °C pendant 24 h puis il est pesé après refroidissement à température ambiante dans un dessiccateur. La phase liquide est ensuite analysée pour déterminer le taux de sucre.

V.2.5. Extraction de la cellulose

Dans un ballon de 250 ml une masse sèche de 1,5 g de sciures de *MxG* (sans extractible) est mélangées avec 125 ml d'eau désionisée. Ensuite, 1 g de chlorite de sodium (NaClO_2) et 1 ml d'acide acétique glacial (CH_3COOH) sont ajoutés. Le mélange est porté à reflux sous agitation continue pendant 2 h à 70 °C. L'ajout de NaClO_2 et de CH_3COOH est répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un résidu solide blanchâtre (délignification totale). Le précipité solide « l'holocellulose » est ensuite filtré sous vide sur un verre fritté n° 2. Ce verre est préalablement séché et pesé à vide, il est lavé plusieurs fois à l'eau désionisée puis il est séché à l'étuve pendant 24 h. Pour éliminer les hémicelluloses et extraire la cellulose pure, l'holocellulose est traitée avec 2,5 N d'HCl à 100 °C pendant 4 h.

V.2.6. Extraction de la lignine de bois broyé (MWL)

La MWL de *MxG* représentative de la lignine native a été extraite selon la méthode décrite par **Guerra et al. (2004)** et **Holtman et al. (2006)**. Dans un premier temps, la biomasse est broyée finement (0,50 mm) par un broyeur (SIEBTECHNIK) puis traitée par un mélange binaire 1/2 (v/v) éthanol/toluène pendant 24 h dans un soxhlet suivi d'un traitement à l'éthanol seul pendant 24 h pour éliminer les extractibles. Ensuite, 50 g de *MxG* (sans extractible) sont lavés deux fois avec une solution de dioxane/eau (96 % v/v) sous agitation continue à 190 tr/min pendant 24 h dans l'obscurité. Les extraits dioxane/eau sont combinés et le volume de solvant est réduit à 100 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif. Cette solution est ajoutée goutte à goutte à l'eau DI (200 ml) en agitant, puis lyophilisée. Le lyophilisat « MWL » est dissout avec de l'acide acétique à 90 % (20 ml) et il est ensuite précipité dans l'eau DI (400 ml). La solution est centrifugée et le matériau solide est dissout dans du 1,2 dichloroéthane / éthanol (10 ml, 2:1 v/v) puis précipité dans l'éther diéthylique (200 ml). La solution est centrifugée et le solide est lavé à l'éther de pétrole (2 × 100 mL). La MWL obtenue est séchée à l'air puis dans un four sous vide toute la nuit (pression atmosphérique à 40 °C) avant analyse.

V.2.7. Prétraitement thermique par autohydrolyse

L'autohydrolyse ou traitement thermique en phase aqueuse est une méthode de dégradation extrêmement douce qui utilise l'eau comme solvant en l'absence de catalyseur acide. L'acidité est ici apportée par les fonctions carboxyles et/ou sulfates du polysaccharide. Dans notre travail, l'autohydrolyse de *MxG* a été réalisée en phase aqueuse dans le réacteur sous pression déjà décrit précédemment. Un suivi cinétique des pertes de masse et d'extraction des hémicelluloses a été réalisé pour trois températures différentes (130 °C, 140 °C et 150 °C) pendant un temps de traitement variant de 0 h à 43 h. Une masse connue de *MxG* est mélangée avec de l'eau DI (ratio 1/9 solide/liquide) dans le réacteur en acier. Le chauffage est ensuite démarré. L'instant initial t_0 est défini lorsque la température interne atteint sa valeur de consigne. A la fin de chaque expérience et après refroidissement, le mélange est filtré sous vide en utilisant des filtres de cellulose de 0,45 µm de porosité. Le résidu solide est ensuite lavé 3 fois avec 100 ml d'eau chaude (50 °C). Une partie des résidus solides et du liquide est séparée puis stockée à -5 °C avant analyse.

V.2.8. Prétraitement par autohydrolyse avec du 2-Naphtol

Ce prétraitement consiste à immerger 10 g (masse sèche) de *MxG* dans 100 ml d'acétone contenant 400 mg de 2-naphtol en suivant la méthode décrite par **Li et Gellerstedt (2008)**. Le mélange est homogénéisé et humidifié pendant un certain moment puis évaporé jusqu'à l'état sec à température ambiante dans une sorbonne aspirante. La paille est ensuite prétraitée par autohydrolyse comme décrit précédemment ($T = 150\text{ °C}$ pendant $t = 8\text{ h}$).

V.2.9. Prétraitement enzymatique

Dans une fiole erlenmeyer de 100 ml, une masse de 10 g (masse sèche) de *MxG* est mélangée avec de l'eau désionisée (ratio solide/liquide 1/7) en présence d'un cocktail enzymatique industrielle (cellulive). Trois expériences sont réalisées en parallèle dans un dispositif agitant et chauffant, avec une vitesse d'agitation de 140 ppm, une température de 50 °C et en présence d'enzymes dont la quantité représente respectivement 1, 2,5 et 5 % de la masse anhydre de *MxG*. Des suivis cinétiques des pertes de masse sont effectués pour une durée maximale de traitement de 6 jours. A la fin de chaque expérience, le mélange est centrifugé et lavé 3 fois avec de l'eau désionisée. Une partie des résidus solides et du liquide est séparée et stockée à -5 °C avant analyse.



Figure 50. Agitateur chauffant

V.2.10. Traitement Organosolv et extraction de la Lignine Ethanol Organosolv (EOL)

25 g (masse sèche) de *MxG* sont traités avec un mélange d'éthanol/eau (65 à 80 %) et en présence d'acide sulfurique comme catalyseur, en suivant les méthodes décrites par **Pan et al. (2006), (2007) et (2008)**. Le solide ratio liquide utilisé est 1/8. Les traitements sont effectués dans le réacteur Parr métallique décrit précédemment. A la fin du traitement, le résidu solide prétraité est lavé avec un mélange éthanol/eau à 60 °C (8/1, 3 x 50,00 ml) puis séché à l'air pendant la nuit. Les lavages sont combinés et 3 volumes d'eau sont ajoutés pour précipiter la lignine éthanol organosolv (EOL), qui est ensuite collectée par centrifugation et par filtration et enfin séchée à l'air. Une partie des résidus solides et du liquide est séparée et stockée à -5 °C avant analyse.

V.2.11. Glyoxalisation de la EOL et préparation d'adhésifs

Pour préparer les adhésifs, le protocole décrit par **El Mansouri et al. (2007)** a été suivi. La lignine de miscanthus (29,5 parties en masse) est progressivement ajoutée à 38,4 parties d'eau. Une solution d'hydroxyde de sodium à 30 % est ajoutée périodiquement pour maintenir le pH de la solution entre 12 et 12,5 et pour une meilleure dissolution de la lignine, ce qui a également été facilitée par une agitation vigoureuse. Un flacon de 250 ml à fond plat équipé d'un réfrigérant, d'un thermomètre et d'un barreau magnétique est rempli par la solution ci-dessus et chauffé à 58 °C. Après la dissolution totale de la lignine, 17,5 parties en masse de glyoxal (40 % dans l'eau) sont ajoutées et la solution de lignine est maintenue à un pH 12-12,5, sous agitation continue avec un agitateur magnétique sur une plaque chaude pendant 8 heures. La fraction massique totale de solide est d'environ 37 %. Le glyoxal est un aldéhyde non toxique (rat LD50 > 2960 mg / kg; LD50 souris > 1280 mg / kg) (**Niosh 2000**), peu volatile et moins réactif que le formaldéhyde qui est toxique (rat LD50 > 100 mg / kg ; LD50 souris > 42 mg / kg) (NTIS). Une solution de tannins de Mimosa dans l'eau a été préparée avec une concentration de 45 % et son pH ajusté à 10 avec une solution de NaOH dans l'eau à 33 %. Il a été aussi ajouté 6 % (solides sur tannins de mimosa) d'hexamine (solution à 33 % dans l'eau). Enfin la lignine glyoxalée a été mélangée avec cette solution de tannins pour préparer l'adhésif.

V.2.12. Elaboration de panneaux de particules

Un panneau de particules de 350 mm x 300 mm x 16 mm de dimension a été préparé en utilisant seulement des particules de bois de duramen d'hêtre (*Fagus sylvatica*) et d'épicéa norvégien (*Picea abies*). Une pression maximale de 35,7 kg/cm² et une température de 195 °C ont été appliqués. La quantité totale d'adhésif par rapport aux particules de bois est de l'ordre de 10 % en masse et le temps total de pressage est de 7,5 minutes. Le panneau de particules a été testé mécaniquement pour déterminer la force de liaison interne.



Figure 51. Système de mélangeage et de pressage pour l'élaboration de panneaux de particules

V.3. Techniques d'analyses, de caractérisation physico-chimiques et morphologiques

V.3.1. Analyse par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS) des extractibles de *MxG*

Une masse de 5 g de *Miscanthus* natif est traité avec du dichlorométhane (DCM), en utilisant un extracteur (soxhlet) pendant 6 h (36 cycles d'extraction). Le solvant est séché à l'aide d'un évaporateur rotatif et le résidu est pesé afin d'obtenir la teneur en matières extractibles. Un échantillon de l'extraction est prélevée pour la caractérisation des extractibles par GC-MS. Cet échantillon est concentré sous azote à température ambiante, puis les extractibles sont dérivatisés par le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA). L'échantillon ainsi préparé est analysé en utilisant un système de GC-MS avec une injection sans division. L'instrument utilisé est un Hewlett-Packard 5890 GC II équipé d'un détecteur de masse sélective Hewlett-Packard 5971A. Une colonne en silice 0,25 mm x 60 m dB-5 garnie d'un support solide inerte et imprégné chimiquement de 25 μm d'une phase stationnaire est utilisée pour la séparation chromatographique. Les conditions opératoires de la GC sont les suivantes: température initiale = 150 °C; temps initial = 5 min; vitesse de montée en température = 15 °C / min, température finale = 280 °C, temps final = 25 min, température d'injection = 250 °C. Le détecteur de masse est exploité en utilisant le mode d'ionisation par impact électronique à 70 eV. La quantification des différents composants est basée sur la superficie totale des pics après ionisation. Le facteur de réponse GC de chaque composé individuel est supposé être le même pour tous les calculs.

V.3.2. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires en carbone, en hydrogène, en oxygène et en azote pour la lignine de *MxG* ont été obtenues sur un appareil Perkin Elmer 240C microanalyseur.

V.3.3. Analyse par chromatographie ionique (CI)

La CI est une technique d'analyse pour séparer les constituants d'un mélange en phase aqueuse.



Figure 52. Chromatographie ionique / ampérométrie pulsée

V.3.3.1. Principe

Le principe de la CI est simple : une colonne est composée d'une résine chargée soit positivement (pour repousser des anions) soit négativement (pour repousser des cations). L'éluant emporte les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement. Le principe de la CI est basé sur un échange d'ions sur résine. Les ions sont entraînés par une phase mobile et séparés par l'action de la phase stationnaire.

V.3.3.2. Dosage des sucres

La séparation et la quantification des sucres neutres sont réalisées en utilisant un système de chromatographie ionique de type Dionex ICS-3000 qui contient un dispositif de pompage, un auto-injecteur, un détecteur électrochimique avec une électrode en or, une électrode de référence Ag/AgCl et un logiciel d'analyse et de traitement Chromeleon version 6.8 (Dionex corp., USA).

Une pré-colonne (4 x 50 mm, Dionex) reliée à une colonne CarboPac PA1 (4 x 250 mm, Dionex) sont utilisées comme phase stationnaire, en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium 1mM comme éluant. L'éluant est préparé par dilution du NaOH (46-48 %) dans de l'eau ultra-pure qui est dégazée par injection d'hélium pendant 20 minutes avant utilisation (eluent degassing module, Dionex). Après chaque essai, la colonne est lavée

avec une solution de NaOH (200 mM) pendant 10 minutes et rééquilibrée selon les conditions opératoires de départ pendant 15 minutes. Les échantillons sont injectés automatiquement (25 μ l) et la séparation des sucres est effectuée à 25 °C pour un débit de 1 ml/min. Dans un premier temps, une série de solutions étalons est injectée en utilisant des mélanges de sucres de concentration connue (xylose, arabinose, galactose, mannose et glucose), voir figure 53, afin d'établir une droite d'étalonnage. Cette droite est utilisée pour la détermination et la quantification des sucres.

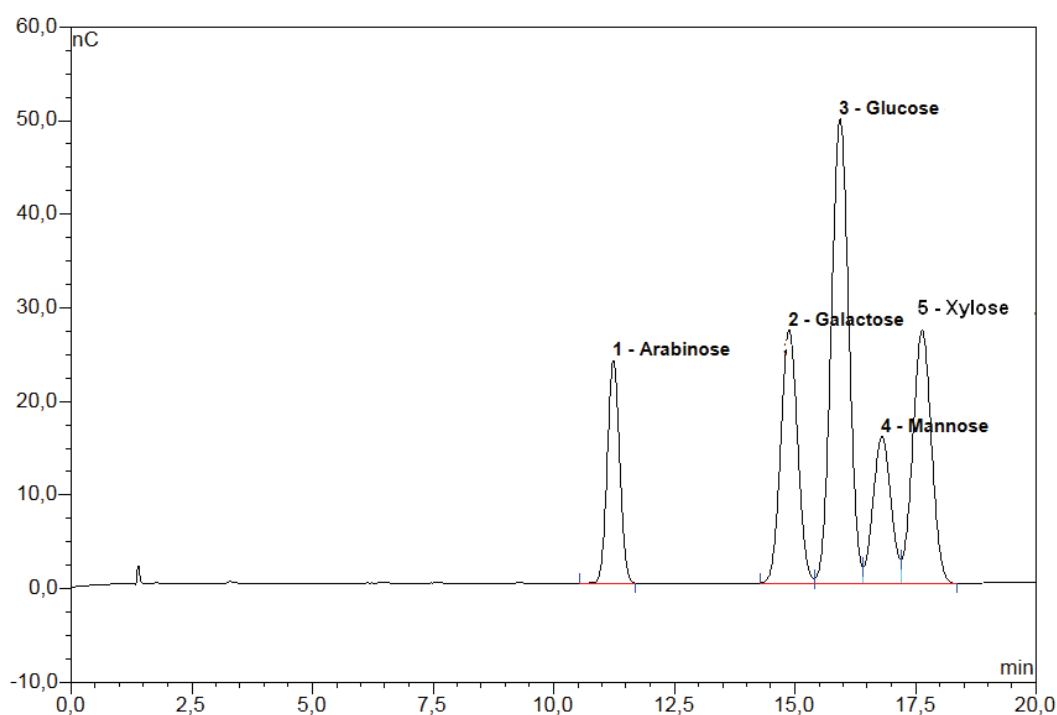


Figure 53. Chromatogramme obtenu par CI des sucres présents dans un étalon

V.4. Analyse par spectroscopie UV visible

V.4.1. Principe

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm). L'absorption du rayonnement UV-VIS par les molécules permet de mesurer la concentration de ces molécules présentes dans le trajet du rayonnement. A une longueur d'onde où la molécule absorbe, il existe une loi simple entre quantité de rayonnement transmis par le milieu et concentration des molécules qui absorbent (on suppose que seule l'espèce à doser absorbe à cette longueur

d'onde). C'est la **loi de Beer-Lambert** qui relie absorption, à une longueur d'onde λ , et concentration c des molécules qui absorbent $A = \epsilon lc$ avec :

A : absorbance du milieu à la longueur d'onde λ , exprimée en nm dans l'UV-VIS,

ϵ : coefficient spécifique d'absorbance molaire (ex-coefficient d'extinction moléculaire) en $l \cdot mole^{-1} \cdot cm^{-1}$,

l : trajet optique de la cellule en cm,

c : concentration en $mol \cdot l^{-1}$ des molécules qui absorbent à la longueur d'onde λ .

V.4.2. Dosage des furanes et de lignines solubles en phase aqueuse

La concentration en furanes ainsi qu'en lignines solubles dans les phases aqueuses ont été estimées par spectroscopie UV visible. Ainsi, en suivant la méthode décrite par **Martinez et al. (2000)**, le dosage quantitatif des furanes a été réalisé dans le domaine infrarouge pour 2 longueurs d'onde $\lambda = 284$ nm et $\lambda = 320$ nm. Dans un premier temps, un étalonnage par UV est réalisé pour différentes solutions ayant différentes concentrations en mélange de furfural et d'hydroxyméthylefurfural (HMF), [furfural seul, HMF seul, furfural/HMF (ratio 1/1), furfural/HMF (3/1), furfural/HMF (1/3)]. Les droites d'étalonnages obtenues sont représentées sur la figure 5. La moyenne des courbes est déterminée et l'équation de la droite de régression est utilisée tout au long de nos analyses.

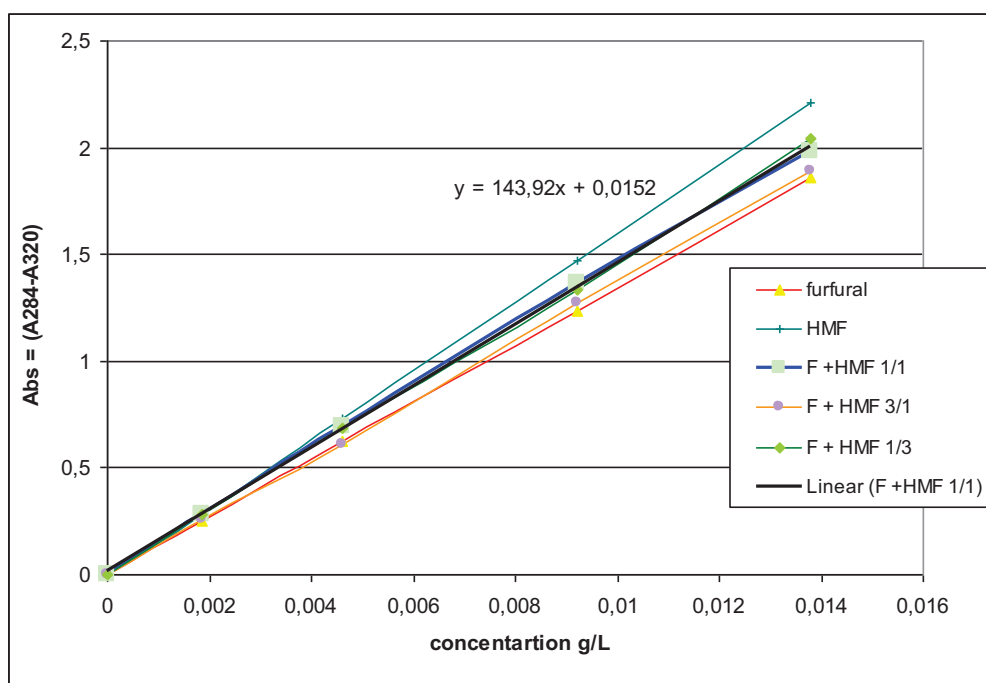


Figure 54. Droites d'étalonnage des solutions de furfural et de HMF

Enfin, le pourcentage en furanes est déterminé par calcul direct

$$\% \text{ furanes} = \left(\frac{((Abs(320nm) - Abs(284nm)) - 0,0152) \times Vt}{143,92 \times Mi} \right)$$

Où **Vt** : volume total de la phase aqueuse (ml)

Mi : masse sèche initiale de biomasse (g)

(143,92 et 0,0152 sont respectivement les valeurs de la pente a de la droite et du point b à l'origine de la droite d'étalonnage).

Le dosage des lignines solubles est effectué par analyse directe en suivant la méthode UM-250 (TAPPI 1985b) décrite par **Lin et Dence (1992)** pour une longueur d'onde $\lambda = 205 \text{ nm}$ et en utilisant une cuve en quartz.

Le pourcentage en lignine soluble (LS) à été déterminé par calcul direct

$$\% LS = \left(\frac{Abs(205 \text{ nm}) \times Vt \times 100}{110 \times 1000 \times Mi} \right)$$

Où **Vt** : volume totale de la phase aqueuse (ml)

Mi : masse sèche initiale de biomasse (g)

V.5. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La SEC est une technique très puissante de caractérisation de la distribution des masses des polymères.



Figure 55. Chromatographie d'exclusion stérique

V.5.1. Principe

Le principe se base de la séparation des macromolécules en fonction de leur taille est le suivant : les molécules éluées peuvent plus ou moins pénétrer les pores de la phase stationnaire, un gel polymère dont sont remplies les colonnes. Ainsi, les molécules les plus petites sont davantage retenues que les plus grosses, d'où un temps de rétention plus long pour les premières que pour les secondes.

V.5.2. Détermination des masses moléculaires moyennes de la lignine et de la cellulose

Les masses moléculaires moyennes en nombre (M_n) et en poids (M_w) des lignines sont déterminées par SEC après acétylation selon la méthode décrite par **Lundquist (1992)**. Une masse de 20 mg de lignine est dissoute dans un mélange d'anhydride acétique/pyridine (1/1) sous une agitation continue pendant 24 h à température ambiante. Un volume de 25 ml d'éthanol est ajouté au mélange, laissé au repos pendant 30 minutes puis la solution est concentrée sous pression réduite par un évaporateur rotatif. L'éthanol est ajouté et évaporé plusieurs fois jusqu'à élimination totale de l'anhydride acétique et de la pyridine de l'échantillon. La lignine acétylée est ensuite dissoute dans du chloroforme (2 ml) et précipitée dans l'éther diéthylique (100 ml). Le précipité est isolé par centrifugation, lavé plusieurs fois avec de l'éther de pétrole puis séché dans une étuve à 40 °C sous vide pendant 24 h. L'analyse de la lignine par SEC a été réalisée en utilisant un chromatographe Hewlett-Packard 1090, un détecteur UV et 3 colonnes de Styragel HR1, HR3, et HR4 reliées en séries utilisant le tétrahydrofurane (THF) comme éluant. La lignine dérivatisée est dissoute dans du THF (1 mg/ml), la solution est ensuite filtrée avec des microfiltres de 0,45 μm . La solution filtrée (20 μl) est injectée dans la SEC et la détection est réalisée à une longueur d'onde de 280 nm. Une droite d'étalonnage a été établie en utilisant des solutions standards de polystyrène. M_n , M_w et l'indice de polydispersité (I_p) ont été calculés par le logiciel de la SEC.

Les masses moléculaires moyennes en nombre et en masse de la cellulose sont déterminées par SEC. Les échantillons de cellulose sèche sont dérivatisés avec du phényle isocyanate. Environ 15 mg d'extrait sec de la cellulose sont mis en suspension dans 4 ml de pyridine anhydre dans un ballon de 25 ml et 0,5 ml d'isocyanate de phényle sont ajoutés. Le ballon est scellé avec un bouchon doublé en téflon. Le mélange réactionnel est maintenu à 65 °C sous agitation magnétique dans un bain d'huile pendant 2 à 3 jours jusqu'à ce que la

cellulose soit entièrement dissoute. Lorsque la réaction est terminée, la solution est refroidie. 1 ml de méthanol est ajouté pour éliminer le phényle isocyanate n'ayant pas réagi. Le mélange est ensuite versé dans 100 ml d'un mélange d'eau-méthanol (3/7). Le précipité de cellulose tricarbanilée est purifié par centrifugation à 8000 tr/min par des lavages répétés à 3 reprises avec un mélange eau-méthanol, et ensuite 2 fois avec de l'eau désionisée. La cellulose tricarbanilé est ensuite lyophilisée et séchée sous vide. L'analyse de la cellulose par SEC est réalisée en utilisant un chromatographe Hewlett-Packard 1090, un détecteur UV et 3 colonnes de Styragel HR1, HR3, et HR4 reliées en séries utilisant le tétrahydrofurane (THF) comme éluant. La cellulose dérivatisée est dissoute dans du THF (1 mg/ml), la solution est ensuite filtrée avec des microfiltres de 0,45 μm . La solution filtrée (20 μl) est injectée dans la SEC et la détection est réalisée à une longueur d'onde de 236 nm. Une droite d'étalonnage est établie en utilisant des solutions de polystyrène standards. M_n , M_w et l'indice de polydispersité I_p ont été calculés par le logiciel de la SEC. Le degré de polymérisation (DP) a été obtenu en divisant la M_w de la cellulose tricarbanilée par le poids moléculaire du glucose anhydre tricarbanilé (519 Da).

V.6. Spectroscopie infrarouge (IR)

V.6.1. Principe

La spectroscopie infrarouge permet de déterminer la présence de groupements fonctionnels dans les molécules organiques, et les structures de certaines molécules simples. Dans les molécules, les liaisons vibrent à une fréquence bien déterminée qui dépend des atomes de la liaison mais aussi de l'environnement de la liaison. Pour une fréquence donnée, ces liaisons rentrent en résonance et l'énergie apportée est alors consommée, les molécules absorbent et la transmission diminue. Si on représente sur un graphe l'évolution de la transmission en fonction de la fréquence, ou plus généralement du nombre d'onde (la fréquence divisée par la vitesse de la lumière dans le milieu), on observe des variations. Chaque pic (chaque absorption) est donc caractéristique d'un certain type de liaison.

V.6.2. Préparation des échantillons

L'acquisition de spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) de la lignine de *MxG* est effectuée sur un spectromètre « Perkin Elmer Spectrum one ». L'échantillon est

broyé finement avec du bromure de potassium (KBr) dans un mortier avec un pilon afin de supprimer les effets de diffusion des gros agrégats. Ce mélange poudreux est ensuite comprimé dans une presse afin de fournir une pastille translucide. Les spectres obtenus sont interprétés avec des tables de corrélation de spectroscopie infrarouge qui sont largement présentées dans la littérature.

V.7. Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelettes, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres.

V.7.1. Principe

Le principe de la RMN est fondé sur la mesure de l'absorption de la radiation de radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. L'absorption de la radiation pousse le spin nucléaire à se réaligner ou à retourner dans la direction de la plus haute énergie. Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettront une radiation RF et retourneront à leur état initial de moindre niveau d'énergie.

V.7.2. RMN du carbone ^{13}C

Avant sa caractérisation par RMN, la lignine est dans un premier temps extraite avec du pentane (au soxhlet) pour éliminer les impuretés résiduelles. L'analyse par RMN est réalisée par l'intermédiaire d'un spectromètre Bruker Avance-300 et une fréquence de 100,59 MHz. L'acquisition du spectre RMN ^{13}C est réalisée quantitativement en imposant un découplage inverse qui élimine les NOE (nuclear overhauser effect) et qui permet la relaxation totale de tous les noyaux avant la prochaine impulsion. Les échantillons sont préparés avec 300-400 mg/ml pour les lignines de bois broyés (MWL) et les lignines

organosolv. Le solvant utilisé est le DMSO-d6. Tous les échantillons sont mis dans des tubes RMN 5-mm (volume d'échantillon = 0,5 ml) et l'analyse est réalisée à une température de 50°C dans le but de réduire la viscosité. Les paramètres d'acquisition qui ont été appliqués [Robert 1992] sont les suivants: nombre d'acquisitions entre 9 et 15 000 K, un angle d'impulsion de 90 °C, et un temps de relaxation de 12 secondes. Le temps d'acquisition total des spectres est long, entre 36 et 48 h. Les zones d'intégrations ont été choisies en se référant à la littérature.

V.7.3. RMN du phosphore ^{31}P

Le réactif de phosphorylation utilisé est le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1-1,3,2 dioxaphospholane (TMDP). Le TMDP est préparé en suivant la procédure suivante [Granata et Argyropoulos 1995]. Les échantillons de lignine sont séchés sous vide à 40 °C pendant 24 h dans des flacons de 2 ml. Dans les pluparts des cas, une masse d'environ 25 mg est utilisée. Un mélange de solvant de pyridine/chloroforme deutéré CDCl_3 (1,6/1 V/V) est préparé et un volume de 400 μl est ajouté à la lignine. Une solution de chromium (III) acétylacétonate (3,6 mg/ml) et de cyclohexanole (4 mg/ml) dissoute dans le mélange pyridine/ CDCl_3 est préparée et 150 μl sont ajoutés à la solution de la lignine. Le chromium (III) acétylacétonate servira comme réactif de relaxation et le cyclohexanole comme une référence interne standard. Le mélange est vigoureusement agité jusqu'à dissolution complète de la lignine. Quelques minutes avant l'analyse par RMN, approximativement 75 μl de TMDP ont été ajoutés au flacon contenant le mélange, enfin l'ensemble est transféré dans un tube de RMN de 5 mm.

Les spectres de RMN ^{31}P sont acquis en imposant un découplage inverse qui permet une analyse quantitative. Un temps de relaxation de 25 secondes, 200 acquisitions sont effectuées, et un angle d'impulsion de 30° est utilisé. Les spectres obtenus sont traités par ordinateur en utilisant le logiciel de traitement RMN NUTS (Acorn RMN Inc.). Les spectres sont phasés et le réglage de la ligne de base est réalisé manuellement. La concentration de chaque groupement fonctionnel hydroxyle (en $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) est calculée sur la base des hydroxyles contenus dans la référence interne (le cyclohexanol) et l'intégration de son pic (145 ppm). Les intégrations des différentes régions des spectres RMN ^{31}P sont rassemblées dans le tableau 20 suivant :

Tableau 20. Groupes fonctionnels et zones d'intégration utilisés pour les spectres de RMN ³¹P des lignines phosphorylées

| Groupes fonctionnels | Zone d'intégration (ppm) |
|--|--------------------------|
| Cyclohexanole (référence standard interne) | 145,3-139,8 |
| OH aliphatiques | 150,0-145,3 |
| OH phénoliques condensés | 144,0-141,0 |
| OH phénolique (guaiacyle) | 141,0-137,0 |
| COOH | 136,2-134,0 |

L'estimation quantitative des différentes fonctions hydroxyles a été réalisée selon le mode de calcul suivant. La zone du signal de cyclohexanole ($6,01 \times 10^{-4}$ g) est intégrée puis calibrée à 1. Comme cette molécule contient une fonction hydroxyle et a une masse moléculaire de 100,16 g/mol, donc $6,01 \times 10^{-4} / 100,16 = 5,9994 \times 10^{-6}$ est le nombre de mole de groupements hydroxyles présents dans la référence interne standard. Parce que l'intégration de la zone de la référence interne standard est calibrée à 1, chaque unité dans le spectre correspond à $5,9994 \times 10^{-6}$ mol de fonction hydroxyle. Pour chaque spectre, cette valeur est multipliée par la valeur d'intégration de chaque pic et divisée par la masse d'échantillon de lignine. Par exemple si la lignine a une masse de 25,28 mg et l'intégration de la zone d'acide carboxylique correspond à 1,859 alors on trouve $(1,859 \times 5,9994 \times 10^{-6}) / 0,2528 = 0,00044$ mol/g de lignine. La valeur est ensuite multipliée par 1000 pour la convertir en mmol/g de lignine.

V.7.4. RMN ¹³C du solide

Les échantillons de paille de *MxG* (traités et non traités) et de la cellulose sont broyés finement. Ils sont ensuite compressés dans un rotor d'oxyde de zirconium de 4-mm de diamètre, équipé d'un bouchon de Kel-F spécifique pour l'analyse de matériau en phase solide. La polarisation croisée et la rotation à l'angle magique (CP/MAS) des expériences RMN ¹³C sont effectuées sur un spectromètre Bruker Avance-400 fonctionnant à une fréquence de 100,59 MHz. Tous les spectres sont acquis à la température ambiante en utilisant une sonde Bruker 4 mm -MAS.

V.8. Analyse thermomécanique (TMA)

Les réactions de polymérisation et de durcissement d'un adhésif peuvent être évaluées par analyse thermomécanique (TMA) par l'étude de la rigidité du système bois-adhésifs en

fonction de la température. L'adhésif préparé avec la lignine glyoxalée et des tannins de mimosa (50/50) est thermo-mécaniquement analysé. Il est déposé entre deux plaques de bois en formant un film d'épaisseur compris entre 200 et 700 μm . A l'intérieur du four, une sonde exerce une pression sur l'échantillon. Sous pression et chauffage, l'adhésif polymérise et adhère sur les plaques de bois. On enregistre simultanément la force appliquée par la sonde, la température et le déplacement de la sonde. Les expériences sont réalisées dans les conditions suivantes : une vitesse de chauffage de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et une température croissante de 25 à 250 $^{\circ}\text{C}$.

V.9. Inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle (LH)

L'oxydation est effectuée dans un système fermé, l'oxygène barbotant dans les réactifs en solution. Le dispositif expérimental (figure 56) est constitué de deux parties : la station de vide et de stockage de l'oxygène d'une part et la partie réaction d'autre part. Les réactions d'oxydation ont lieu dans un réacteur en Pyrex à double enveloppe thermostatée. Un tube capillaire plonge dans le réacteur pour assurer, par l'intermédiaire d'une pompe, l'agitation et la saturation en oxygène de la phase liquide. Le réacteur est surmonté d'un réfrigérant à 5 $^{\circ}\text{C}$ pour condenser le solvant. Le volume de la phase liquide est de 5 cm^3 , celui de la phase gazeuse d'environ 100 cm^3 . La consommation d'oxygène est suivie expérimentalement par mesure de la pression du ciel gazeux surmontant le mélange réactionnel.

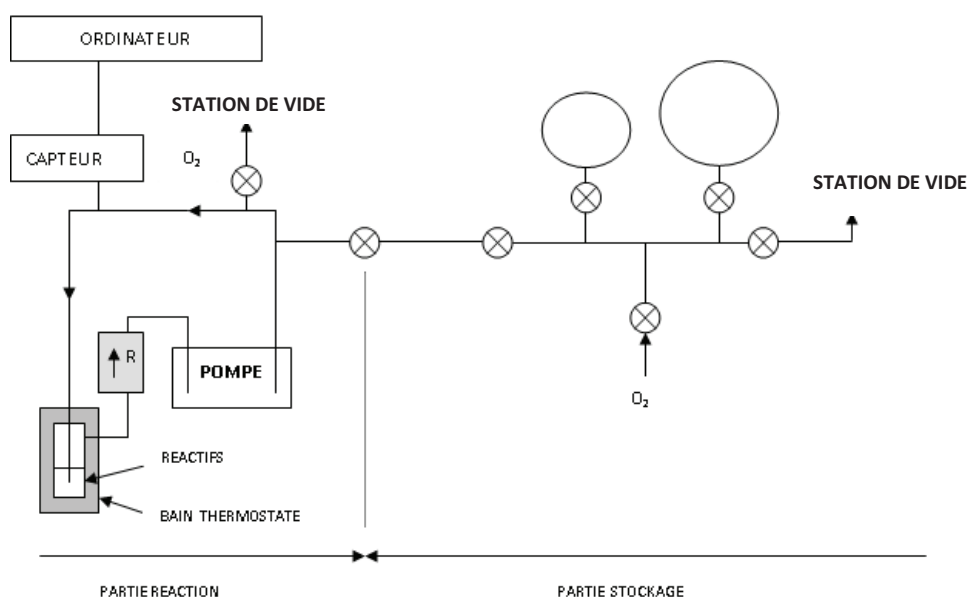


Figure 56. Montage expérimental pour l'analyse des propriétés antioxydantes (R : réfrigérant)

Nous avons étudié l'influence des lignines organosolv extraites sur l'oxydation induite de LH afin d'établir qualitativement un classement de leur pouvoir antioxydant en comparant les vitesses de consommation d'oxygène en présence et en absence d'antioxydant. Rappelons que la consommation d'oxygène au cours du temps est suivie par mesure manométrique. Les réactions d'oxydation sont amorcées par l'azobis-isobutyronitrile (AIBN) qui est un inducteur classique des réactions radicalaires. Les expériences ont été réalisées en utilisant comme solvant le n-butanol en présence et en absence de lignines à 0,2 g/l, les autres conditions expérimentales étant les suivantes :

- 1- Une température $T = 60^{\circ}\text{C}$
- 2- Une concentration initiale en méthyle linoléate $[\text{LH}]_0 = 0,32 \text{ M}$
- 3- Une concentration initiale en azobis-isobutyronitrile $[\text{AIBN}]_0 = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
- 4- Une pression initiale en oxygène $P_0(\text{O}_2) = 145 \text{ Torr}$

V.10. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse de la surface *MxG* (traité et non traité) est visualisée à l'échelle microscopique. Avant d'être observés au microscope électronique à balayage (Hitachi S-4800), les échantillons sont déposés sur des plots métalliques, collés avec du vernis puis métallisés pour diminuer les phénomènes d'accumulation de charges.



Figure 57 Microscopie électronique à balayage Hitachi S-4800

Conclusion générale et perspectives

Au terme de ce travail, nous pouvons dire que le *Miscanthus x Giganteus*, en raison de sa composition, présente toutes les qualités pour constituer un modèle d'étude pour la valorisation de la biomasse lignocellulosique. La démarche que nous avons adoptée dans cette étude se base sur le concept de la bioraffinerie pour une utilisation optimale de tous les constituants.

La première partie de notre travail concerne la caractérisation de la paille de *MxG*. Cette biomasse lignocellulosique contient 26 % d'hémicelluloses, 46 % de cellulose et 26 % de lignine. Une étude physicochimique sur la structure de la lignine et de la cellulose de *MxG* a été effectuée. L'étude a montré que la lignine native de *MxG* est acétylée ($\sim 0,06/\text{Ar}$) et coumarylée ($\sim 0,1/\text{Ar}$) et elle est de la forme guaiacyle, syringyle et p-hydroxyphenyle dont le rapport est estimé respectivement à $\sim 52\%$, $\sim 44\%$ et $\sim 4\%$. La caractérisation de la cellulose par RMN a montré un degré de cristallisation de l'ordre de 53 %.

Pour les besoins de notre étude, le traitement éthanol organosolv a été optimisé sur le miscanthus, ce qui a permis la séparation de ces trois constituants essentiels (lignine, cellulose et hémicelluloses). L'optimisation de ce traitement a montré qu'une sévérité combinée d'environ 2,08 permet une bonne délignification, un bon rendement en lignine récupérée sous forme EOL et enfin une très faible production de furanes dans la phase aqueuse. Les lignines organosolv extraites à différentes sévérités ont été soumises à une investigation physicochimique. Les résultats ont montré que la lignine organosolv comparée à la lignine native (MWL) est une lignine relativement peu modifiée. Néanmoins, l'augmentation de la sévérité de traitement aboutit à un accroissement des réactions de déshydratation des chaînes latérales de la lignine, une augmentation du degré de condensation de la lignine et de la concentration des groupements phénoliques ainsi qu'une forte diminution de la masse moléculaire.

Pour améliorer les rendements de la séparation des trois constituants du *MxG* tout en limitant la dégradation des sucres en furanes dans la phase aqueuse, un procédé de traitement en deux étapes, impliquant une autohydrolyse à l'eau (prétraitement vert) préalable au traitement organosolv a été étudié. Une étude cinétique de l'autohydrolyse a été effectuée pour trois températures de traitement : 130, 140 et 150 °C. Les résultats obtenus nous ont permis de d'établir les conditions optimales de récupération de xylose en phase aqueuse : 25 h

à 130 °C, 16 h à 140 °C et 8 h à 150 °C. Le prétraitement par autohydrolyse a permis de faciliter l'étape ultérieure de délignification organosolv, en déstructurant la lignine. De plus, il a été démontré que pour une même sévérité de traitement et pour trois températures différentes, l'augmentation de la température avait un impact sur la structure de la lignine. L'étude de l'influence de la température de l'autohydrolyse sur la structure chimique de la lignine (MWL) contenue dans le résidu solide a été menée et a permis une optimisation du procédé grâce à l'ajout d'un piègeur de carbocations: le 2-naphtol. Un essai préliminaire de prétraitement enzymatique réalisé dans des conditions douces s'est révélé tout à fait prometteur et nous a permis d'obtenir un excellent rendement de délignification accompagné d'une dégradation des sucres particulièrement faible.

Par la suite, la lignine organosolv extraite a été utilisée pour des applications dans le domaine de la préparation d'adhésifs pour panneaux de particules et en tant qu'antioxydant. Des formulations à base de lignine organosolv de miscanthus glyoxalée et de tannins de mimosa ont été réalisées et analysées par TMA. Les premiers panneaux de particules verts à base de lignine de *MxG*, totalement conçus à partir de matières premières naturelles ont été élaborés avec succès. Les propriétés antioxydantes des lignines organosolv ont été étudiées. Les résultats ont montré que la propriété antioxydant est corrélée avec la sévérité combinée des traitements, avec la masse moléculaire moyenne, l'indice de polydispersité et les groupements hydroxyles phénoliques.

L'ensemble de ces résultats ont permis d'établir qu'il est possible d'utiliser le traitement éthanol organosolv en une ou deux étapes pour la séparation des constituants de la biomasse et aussi d'obtenir une lignine peu dégradée utilisable dans le domaine des adhésifs pour panneaux de particules et en tant qu'antioxydant. Il sera intéressant pour la suite de ce travail de faire une étude approfondie sur la structure et la réactivité à l'hydrolyse de la cellulose restant dans les résidus solides et de trouver des applications utiles non seulement pour la préparation des biocarburants mais aussi dans le domaine des matériaux. Il ressort de l'ensemble de ce travail que le miscanthus et plus généralement la biomasse lignocellulosique possèdent, dans la perspective d'une société basée sur le développement durable, des potentialités très importantes pour des utilisations dans le domaine des matériaux, des carburants et des applications à hautes valeurs ajoutées.

Annexes

Annexe 1. Attributions et quantifications des signaux du spectre RMN ^{13}C de la MWL

| δ (ppm) | Attributions | n° group/aryle ^a MWL |
|----------------|--|------------------------------------|
| 194 | Ar-CH=CH-CHO | 0,02 |
| 171 | OCOCH ₃ | 0,06 |
| 167 | C γ PC ^b ester | 0,1 |
| 161 | C4 PC ester | 0,1 |
| 158 | C4 H ^c | |
| 154-152 | C3/C5 S ^d étherifié | 0,70 |
| 150,5-149,5 | C3 G ^e étherifié | |
| 148-147 | C4 G étherifié, C3C5 S non étherifié | |
| 146 | C3 G et C4 G non étherifié | |
| 145 | C4 G non étherifié | |
| 138,5 | C4 S | |
| 136 | C1 G | |
| 134 | C1 S | |
| 130,5 | C2/C6 PC ester | 0,21 |
| 128 | C2/C6 H | |
| 125,5 | C1 PC ester | 0,1 |
| 119,5 | C6 G | |
| 116 | C3/C5 PC ester | 0,2 |
| 115 | C5 G | |
| 113-111 | C2 G | |
| 105-104 | C2/C6 S | |
| 89-78 | C β dans β O4, C α dans β 5 et $\beta\beta$ | 0,45 |
| 73-71 | C α dans β -O-4 | 0,53 |
| 64 | C γ avec C α =O, C γ -O PC ester | 0,28 |
| 61 | C γ dans β -O-4 | 0,53 |
| 56 | OCH ₃ dans G et S | 0,98 |
| 31-29 | α , β groupement méthylène | 0,1 |
| 21 | CH ₃ dans les groupements acétyle | 0,14 |
| 14-15 | γ méthyle dans la chaîne latérale | 0,05 |
| 155-142 | Aromatique C-O | 1,93 |
| 142-124 | Aromatique C-C | 1,65 |
| 124-102 | Aromatique C-H | 2,50 |
| 90-58 | Aliphatique-O | 1,81 |

a) Déterminer par intégration ; b) PC = *p*-coumarylique ; c) H = hydroxyphenyle ; d) S = syringyle ; e) G = guaiacyle

Annexe 2. Valeurs des groupements phénoliques de la MWL estimées par RMN ³¹P en mmol/g de lignine

| δ (ppm) | Attributions | Lignine de bois broyé ^a | |
|----------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | mmol/g ^b | group/C9 ^c |
| 145,5-150,0 | 1- OH Aliphatique | 4,00 | 0,67 |
| 144,9 | Cyclohexanole (RI) | | |
| 136,5-144,5 | 2- Phénols | 1,66 | 0,28 |
| 141,8-143,5 | 2a- Syringyle OH | 0,22 | 0,04 |
| 138,7- 140,1 | 2b- Guaiacyle OH | 0,67 | 0,11 |
| 137,2-138,1 | 2c- <i>p</i> -Hydroxyphenyle | 0,64 | 0,11 |
| 134-135,7 | 3- acide carboxylique | 0,13 | 0,02 |

a) Lignine phosphorylée avec le 2-chloro-4,4,5,5-tetraméthyl-1,2,3-dioxaphospholane; b) déterminer par intégration en utilisant le cyclohexanole comme référence ; c) calculer en se basant sur les unités C9 obtenus par l'analyse élémentaire de la MWL.

Annexe 3. Attributions des signaux des spectres FT-IR de la lignine

| Attributions | Notre étude | paille de blé ^a | Canne de jute ^b |
|---|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| O-H élongation | 3435 | 3429 | 3425 |
| Aliphatique | 2918 | 2945 | 2939 |
| Ar-OAc | 1759 | - | - |
| Aliphatique-OAc | 1731 | 1732 | |
| C=O élongation asymétrique | 1709 | 1713 | |
| C=O élongation symétrique | 1660 | 1656 | |
| Vibration des aromatiques (C=C) | 1603 | 1595 | 1595 |
| Vibration des aromatiques (C=C) | 1508 | 1507 | 1510 |
| C-H déformation et vibration noyau aromatique | 1463 | 1460 | 1460 |
| Vibration des aromatiques | 1422 | 1434 | 1423 |
| Aliphatique C-H stretching dans CH ₃ | 1366 | 1373 | |
| Motif syringyle, C-O stretching | 1328 | 1328 | 1328 |
| Motif Guaiacycle | 1267 | 1265 | |
| C-O vibration | 1230 | 1235 | 1223 |
| C-O (vibration dans les groupes esters) | 1162 | 1165 | |
| Motif syringyle | 1126 | 1126 | 1120 |
| Aromatique C-H (déformation dans le plan G+S) | 1033 | 1034 | 1033 |
| Aromatique CH (déformation hors du plan G+S) | 833 | - | 833 |

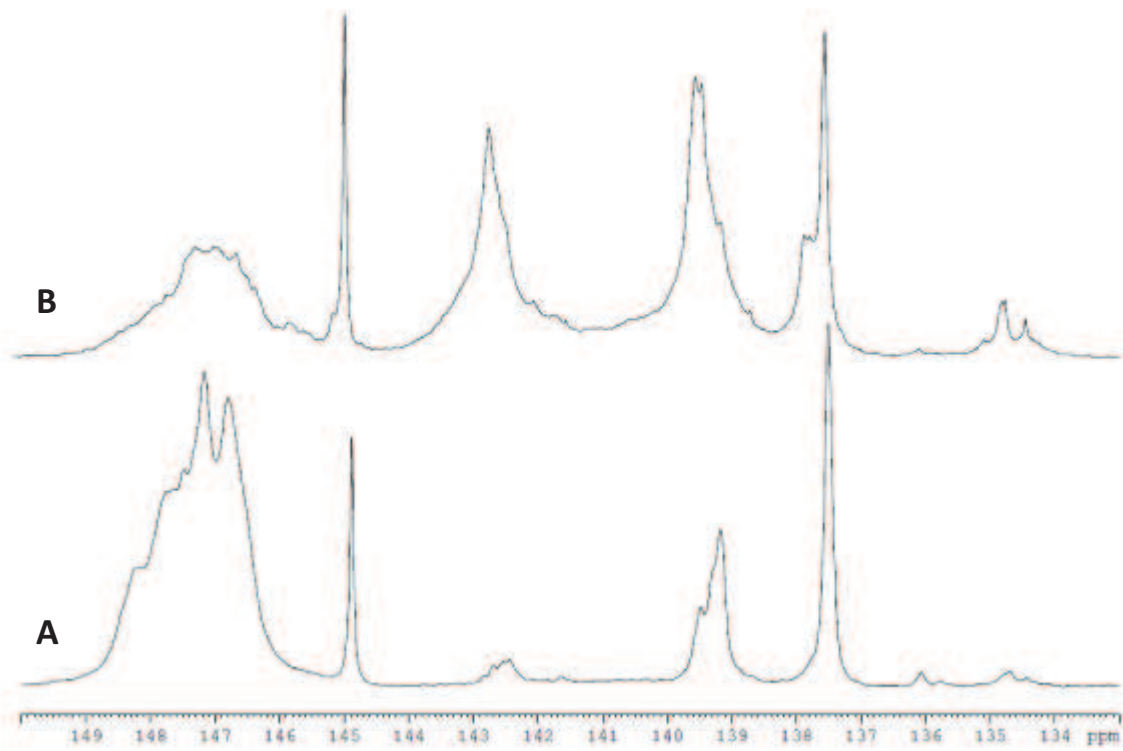
^a voir référence : Xu et al. 2008^b voir référence : Jahan et al. 2007

Annexe 4. Attributions et quantifications des signaux des spectres RMN ¹³C de la MWL et de la lignine ogranosolv (EOL6)

| δ (ppm) | Attribution | MWL | EOL6 |
|----------------|--|------------|-------------|
| 194 | Ar-CH=CH-CHO | 0,02 | 0 |
| 171 | O \underline{C} COCH ₃ | 0,06 | 0 |
| 167 | PC ^a ester C γ | 0,1 | 0,05 |
| 161 | PC ester C4 | 0,1 | 0,05 |
| 158 | H ^b C4 | | |
| 154-152 | S ^c etherifié C3/C5 | 0,70 | 0,15 |
| 150,5-149,5 | G ^d etherifié C3 | | |
| 148-147 | G etherifié C4, S non eth. C3C5 | | |
| 146 | G C3 et G non etherifié C4 | | |
| 145 | G non etherifié C4 | | |
| 138,5 | S C4 | | |
| 136 | G C1 | | |
| 134 | S C1 | | |
| 130,5 | PC ester C2/C6 | 0,21 | 0,11 |
| 128 | H C2/C6 | | |
| 125,5 | PC ester C1 | 0,1 | 0,05 |
| 119,5 | G C6 | | |
| 116 | PC ester C3/C5 | 0,2 | - |
| 115 | G C5 | | |
| 113-111 | G C2 | | |
| 105-104 | S C2/C6 | | |
| 89-78 | C β dans β O4, C α dans β 5 et $\beta\beta$ | 0,45 | 0,19 |
| 73-71 | C α dans β -O-4 | 0,53 | 0,23 |
| 64 | C γ avec C α =O, PC ester C γ -O | 0,28 | 0,23 |
| 61 | C γ dans β -O-4 | 0,53 | 0,32 |
| 56 | OCH ₃ dans G et S | 0,98 | 1,08 |
| 31-29 | α , β motif méthylène | 0,1 | 0,1 |
| 21 | CH ₃ dans motif acétyle | 0,14 | 0 |
| 14-15 | γ méthyle dans <i>n</i> -propyle | 0,05 | 0,07 |
| 155-142 | Aromatique C-O | 1,93 | 1,51 |
| 142-124 | Aromatique C-C | 1,65 | 2,00 |
| 124-102 | Aromatique C-H | 2,50 | 2,27 |
| 90-58 | Aliphatique-O | 1,81 | 0,97 |

^a p-coumaryle ^b p-hydroxyphenyle ^c Syringyle ^dGuaiacyle

Annexe 5. Spectres RMN ^{31}P de la MWL (A) et de EOL6 (B) de *MxG*



Annexe 6. Valeurs des groupements phénoliques des EOLs estimées par RMN ^{31}P en mmol/g de lignine

| Déplacement chimique (δ) | Attributions | EOL (expérience #) | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|------|------|------|------|
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 145,5-150,0 | OH aliphatique | 3,11 | 1,78 | 1,55 | 1,07 | 1,26 |
| 144,9 | <i>Cyclohexanol (IS)</i> | | | | | |
| 136,5-144,5 | OH phénoliques | 2,34 | 2,72 | 2,71 | 4,04 | 3,93 |
| 141,8-143,5 | OH syringyles | 0,72 | 0,90 | 0,87 | 1,59 | 1,70 |
| 138,7- 140,1 | OH guaiacyle | 0,91 | 1,15 | 1,16 | 1,55 | 1,58 |
| 137,2-138,1 | OH <i>p</i> -hydroxyphenyle | 0,49 | 0,51 | 0,51 | 0,66 | 0,65 |
| 134-135,7 | Acide carboxylique | 0,22 | 0,16 | 0,17 | 0,24 | 0,28 |

Annexe 7. pH et taux de furanes récupérées dans les phases aqueuses après autohydrolyse du miscanthus en fonction du temps et de la température

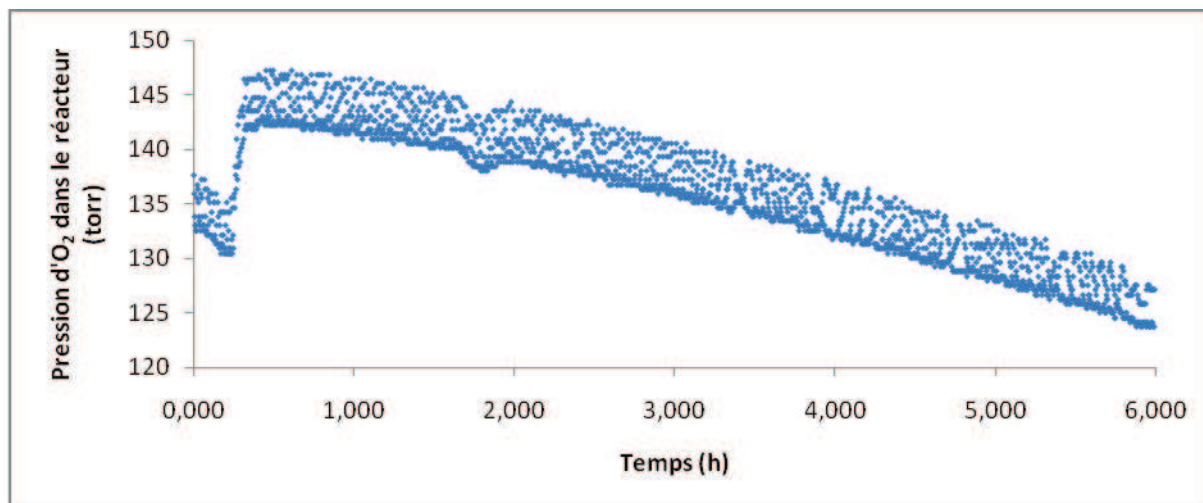
| T °C | 130 | | 140 | | 150 | |
|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | % furane | pH | % furane | pH | % furane | pH |
| 0 | 0,03 | 5,78 | 0,08 | 5,58 | 0,1 | 4,91 |
| 1 | 0,09 | 4,98 | 0,12 | 4,85 | 0,15 | 4,27 |
| 5 | 0,1 | 4,44 | 0,17 | 4,06 | 0,86 | 3,66 |
| 8 | 0,11 | 4,34 | 0,43 | 3,83 | 1,81 | 3,59 |
| 15 | 0,21 | 3,81 | 0,89 | 3,68 | 4,61 | 3,37 |
| 17 | 0,43 | 3,62 | 0,8 | 3,67 | 4,79 | 3,34 |
| 20 | 0,31 | 3,76 | 1,13 | 3,55 | 5,65 | 3,34 |
| 25 | 0,5 | 3,64 | 1,12 | 3,56 | 5,61 | 3,3 |
| 43 | 1,0 | 3,52 | 3,17 | 3,41 | 5,08 | 3 |

Annexe 8. Taux de sucres récupérés dans les phases aqueuses après autohydrolyse du miscanthus en fonction du temps et de la température

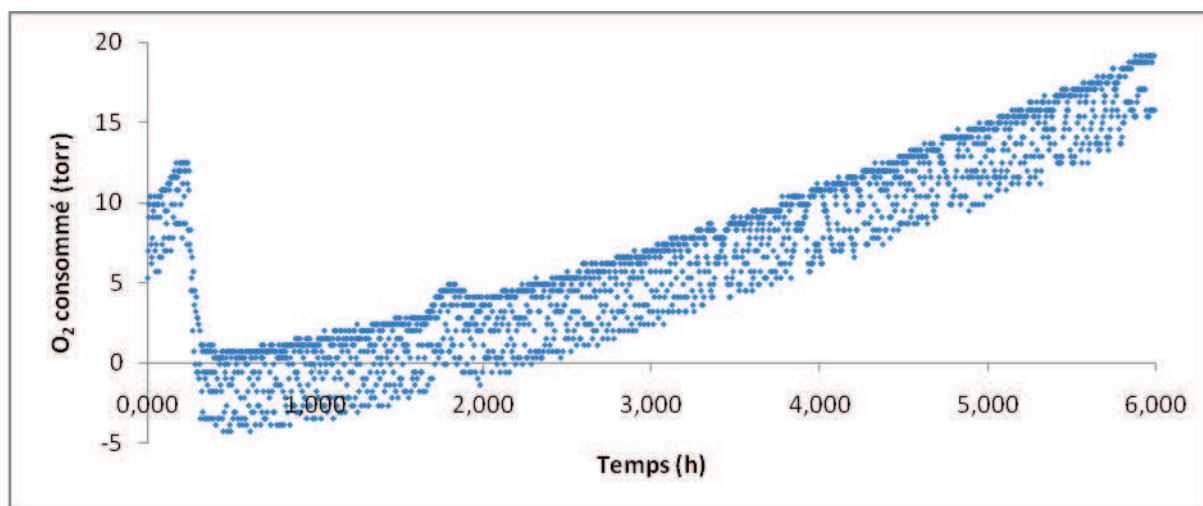
| T°C | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 |
|----------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|-------------|----------------|
| t (h) | Arabinose (%) | | | Xylose (%) | | | Glucose (%) | | | Galactose (%) | | | Mannose (%) | | |
| 0 | 0,05 (0,01) | 0,073 (0,02) | 0,14 (0,06) | 0,03 (0) | 0,11 (0) | 0,16 (0) | 0,17 (0) | 0,15 (0,04) | 0,26 (0,05) | 0,05 (0) | 0,06 (0,01) | 0,07 (0,01) | 0,03 (0) | 0,4 (0) | 0,03 (0) |
| 1 | 0,21 (0,09) | 0,42 (0,27) | 0,96 (0,46) | 0,21 (0) | 0,41 (0) | 2,01 (0,02) | 0,23 (0) | 0,26 (0,02) | 0,65 (0,05) | 0,1 (0) | 0,15 (0,01) | 0,30 (0,04) | 0,04 (0) | 0,06 (0) | 0,08 (0,02) |
| 5 | 0,79 (0,38) | 0,98 (0,68) | 0,96 (0,64) | 1,06 (0,18) | 3,82 (0,24) | 7,66 (1,90) | 0,37 (0,14) | 0,54 (0,06) | 0,99 (0,07) | 0,24 (0,07) | 0,35 (0,07) | 0,39 (0,13) | 0,07 (0) | 0,1 (0) | 0,10 (0,03) |
| 8 | 0,97 (0,86) | 0,91 (0,85) | 0,94 (0,57) | 1,98 (0,05) | 4,28 (0,87) | 8,96 (3,78) | 0,45 (0,08) | 0,44 (0,07) | 1,23 (0,12) | 0,3 (0,05) | 0,38 (0,14) | 0,43 (0,15) | 0,12 (0) | 0,11 (0) | 0,12 (0,04) |
| 15 | 1,04 (0,92) | 0,91 (0,66) | 0,50 (0,29) | 5,23 (0,67) | 6,72 (1,65) | 5,81 (3,94) | 0,49 (0,06) | 0,68 (0,06) | 1,21 (0,22) | 0,36 (0,11) | 0,39 (0,14) | 0,33 (0,15) | 0,08 (0) | 0,13 (0) | 0,15 (0,03) |
| 17 | 1,14 (1,13) | 0,91 (0,56) | 0,35 (0,22) | 6,04 (0,5) | 6,86 (1,29) | 4,35 (3,68) | 0,62 (0,11) | 0,72 (0,07) | 1,08 (0,32) | 0,41 (0,15) | 0,43 (0,11) | 0,25 (0,14) | 0,13 (0) | 0,14 (0) | 0,07 (0,04) |
| 20 | 1,10 (0,70) | 0,95 (0,64) | 0,26 (0,13) | 8,61 (3,03) | 7,68 (2,78) | 3,22 (1,95) | 0,65 (0,08) | 0,85 (0,11) | 1,06 (0,24) | 0,40 (0,11) | 0,44 (0,14) | 0,22 (0,11) | 0,13 (0) | 0,16 (0) | 0,06 (0,03) |
| 25 | 0,99 (0,72) | 0,87 (0,61) | 0,17 (0,09) | 9,59 (1,94) | 6,98 (2,57) | 2,07 (1,46) | 0,71 (0,08) | 0,72 (0,09) | 0,95 (0,31) | 0,39 (0,16) | 0,38 (0,15) | 0,17 (0,09) | 0,08 (0) | 0,13 (0) | 0,05 (0,02) |
| 43 | 0,87 (0,83) | 0,47 (0,35) | 0,04 (0,01) | 8,77 (1,03) | 5,81 (5,65) | 0,52 (0,21) | 0,73 (0,34) | 0,68 (0,22) | 0,65 (0,19) | 0,44 (0,38) | 0,27 (0,13) | 0,06 (0,03) | 0,10 (0) | 0,09 (0) | 0,02 (0,01) |

Annexe 9. Compositions des résidus solides récupérés après autohydrolyse du miscanthus en fonction du temps et de la température

| T °C | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 | 130 | 140 | 150 |
|-------|--------------------|-------|-------|---------------|------|------|------------|-------|-------|-------------|-------|-------|---------------|------|------|-------------|------|-----|
| t (h) | Lignine totale (%) | | | Arabinane (%) | | | Xylane (%) | | | Glucane (%) | | | Galactane (%) | | | Mannane (%) | | |
| 0 | 28,18 | 25,02 | 27,03 | 2,29 | 2,11 | 1,82 | 20,64 | 21,29 | 20,00 | 43,68 | 45,19 | 45,00 | 0,62 | 0,51 | 0,40 | 0,0 | 0,00 | 0,0 |
| 1 | 27,23 | 25,03 | 26,59 | 2,31 | 1,91 | 1,33 | 21,96 | 21,24 | 19,24 | 42,34 | 43,71 | 42,87 | 0,61 | 0,47 | 0,33 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5 | 27,36 | 23,11 | 22,01 | 1,55 | 0,88 | 0,35 | 19,55 | 17,03 | 9,07 | 43,25 | 44,41 | 43,15 | 0,38 | 0,19 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 8 | 26,00 | 24,03 | 25,40 | 1,16 | 0,50 | 0,32 | 19,45 | 12,98 | 6,77 | 43,08 | 41,96 | 41,17 | 0,20 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 15 | 26,74 | 23,34 | 24,71 | 0,75 | 0,31 | 0,16 | 16,42 | 10,17 | 4,48 | 39,42 | 45,44 | 42,70 | 0,17 | 0,14 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 17 | 25,15 | 24,47 | 23,65 | 0,52 | 0,40 | 0,08 | 14,40 | 11,98 | 4,82 | 42,17 | 42,44 | 42,54 | 0,10 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 20 | 25,94 | 24,74 | 26,48 | 0,37 | 0,37 | 0,06 | 12,00 | 10,95 | 3,99 | 41,43 | 41,79 | 40,22 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 25 | 25,46 | 24,31 | 27,27 | 0,33 | 0,27 | 0,08 | 11,09 | 9,27 | 3,32 | 41,50 | 43,09 | 39,88 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 43 | 25,85 | 23,41 | 29,09 | 0,29 | 0,07 | 0,01 | 10,71 | 5,79 | 2,18 | 39,87 | 44,24 | 39,56 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Annexe 10. Exemple des résultats bruts de l'oxydation du linoléate de méthyle

Exemple du suivi de la pression d'oxygène au cours du temps d'un essai (EOL4)



Exemple du suivi de la consommation d'oxygène au cours du temps d'un essai (EOL4)

Références bibliographiques

- Abatzoglou N., Koeberle P., Chornet E., Overend R., Koukios E., (1990).** An application to medium consistency suspensions of hardwoods using a plug flow reactor. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 68, 627–638
- Abe L., (1987).** Wood adhesives from natural polyphenols, *Mokuzai Kyogo*, 42, 151-156
- Anvar U., Mazza G., (2008).** Lignin in straw of herbaceous crops, industrial crops and products. 28, 237–259
- Aoyama M., Seki K., Saito N. (1995).** Solubilization of bamboo grass xylan by steaming treatment. *Holzforschung* 49, 193–196
- Arcus C., Jackson B., (1964).** Acceleration of a Cannizzaro reaction by a polymeric quaternary hydroxide. *Chemical Industry* 49, 2022-2023
- Argyropoulos D., Menachem S., (1998).** Lignin. Kaplan DL, editor. *Biopolymers from renewable resources*. Springer-Verlag; 1998. p. 292-322 [Chapter 12]
- Atalla R., Vanderhart D., (1999).** The role of solid state ¹³C NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *J. Magnetic Resonance* 15, 1–6
- Atalla R., VanderHart D., (1984).** Native cellulose. A composite of two distinct crystalline forms. *Science*, 223, 283-285
- Ballesteros I., Negro M., Oliva J., Cabanas A., Manzanares P., Ballesteros M., (2006).** Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132, 496–508
- Barclay L., Xi F., Norris J., (1997).** Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *J. Wood Chemistry and Technology* 17, 73-90
- Biermann C., Schultz T., McGinnis G., (1984).** Rapid steam hydrolysis/extraction of mixed hardwoods as a biomass pretreatment. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 4, 111–128
- Bobleter O., (1994).** Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science* 19, 797–841
- Bonn G., Concini R., Bobleter O. (1983).** Hydrothermolysis - a new process for the utilization of biomass. *Wood Science and Technology* 17, 195-202
- Boussaid A., Esteghlalian A., Gregg D., Lee K., Saddler J., (2000).** Steam pretreatment of Douglas-fir wood chips: Can conditions for optimum hemicellulose recovery still provide adequate access for efficient enzymatic hydrolysis? *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86, 693–705
- Brosse N., El Hage R., Sannigrahi P., Ragauskas A. (2010).** Dilute Sulphuric Acid and Ethanol Organosolv Pretreatment of *Miscanthus x Giganteus*. *Cellulose Chemistry and Technology* 44 (1-3), 71-78

- Brosse N., Sannigrahi P., Ragauskas A., (2009).** Pre-treatment of *Miscanthus x Giganteus* using the ethanol organosolv process for ethanol production. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48, 8328–8334
- Buranov A., Mazza G. (2008).** Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28(3), 237–59.
- Capanema E., Balakshin M., Kadla J., (2005).** Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agriculture and Food Chemistry* 53, 9639–49
- Capek-Ménard E., Press B., Bouchard J., Chornet E., Jaulin L., Overend R., (1987).** Enzymatic hydrolysis of a Populus deltoids substrate from a thermomechanical treatment of medium consistency slurries. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 65, 689–692
- Carrasco J., Saiz M., Navarro A., Soriano P., Saez F., Martinez J., (1994).** Effects of dilute acid and steam pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45/46, 23–34
- Chum H., Douglas L., Feinberg D., Schroeder H., (1985).** Evaluation of pretreatments for enzymatic hydrolysis of cellulose. Available from <http://www.nrel.gov/docs/legosti/old/2183.pdf>
- Chum H., Johnson D., Black S., (1990).** Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of Poplars. 2. Catalyst effects and the combined severity parameter. *Ind. Eng. Chem. Res.* 29 (2), 156–162.
- Chang V., Nagwani M., Holtzapple M., (1998).** Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 74, 135–159
- Chanzy H., Imada K., Mollard A., Vuong R., Barnoud F., (1979).** Crystallographic aspects of sub-elementary cellulose fibrils occurring in the wall of rose cells cultured in vitro. *Protoplasma* 100, 303-316
- Conner A., (1984).** Kinetic modeling of hardwood prehydrolysis. Part I: Xylan removal by water prehydrolysis. *Wood and Fiber Science* 16, 268-277
- Crestini C., Argyropoulos D., (1997).** Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative ³¹P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α -O-4 Substructures. *J. Agriculture and Food Chemistry* 45(4), 1212–9
- Daiyong Y., Montane D., Farriol X., (2005).** Preparation and characterisation of methylcelluloses from *Miscanthus sinensis* *Carbohydrate Polymers* 62, 258–266
- De Vrije T., De Haas G., Tan G., Keijsers E., Claassen P., (2000).** Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii* *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 1381 – 1390

- Del Rio L., Richard P., Saddler J., (2010).** The effect of varying organosolv pretreatment chemicals on the physicochemical properties and cellulolytic hydrolysis of mountain pine beetle-killed lodgepole pine. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161, 1-21
- Dizhbite T., Telysheva G., Jurkjane V., Viesturs U., (2004).** Characterization of the radical scavenging activity of lignins – natural antioxidants. *Bioresource Technology* 95, 309-317
- Duff S., Murray W., (1996).** Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 55, 1–33
- El Hage R., Brosse N., Chrusciel L., Sanchez C., Sannigrahi P., Ragauskas A., (2009).** Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polymer Degradation and Stability* 94, 1632-8
- El Hage R., Brosse N., Sannigrahi P., Ragauskas A., (2010).** Effects of process severity on the chemical structure of Miscanthus ethanol organosolv lignin. *Polymer Degradation and Stability* 95, 997-1003
- El Mansouri N., Pizzi A., Salvado J., (2007).** Lignin based wood panel adhesives without formaldehyde. *Holz als Roh- und Werkstoff* 65(1), 65-70
- Faix O., Grunwald C., Beinhoff O., (1992).** Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignins (MWL's) from different botanical origins using selective aminolysis, FT-IR, proton NMR, and UV spectroscopy. *Holzforschung* 46(5), 425-20
- Faix O., (1991).** Classification of lignins from different botanical origins by FTIR spectroscopy. *Holzforschung* 45, 21–7
- Feldman D., (2002).** Lignine and its polyblends: a review. In: Hu TG (ed) *Chemical modification, Properties and usage of lignin*. Kluwer academics/plenum Publishers, New York
- Foster B., Dale B., Doran-Peterson J., (2001).** Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated sugar beet pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91 (3), 269–282
- Foston M., Hubbell C., Davis M., Ragauskas A., (2009).** *J. Bioenergy Research* 2, 193–197
- Freudenberg K., (1965).** Lignine: its constitution and formation from p-hydroxycinamyl alcohols. *Sciences*, 148, 595-600
- Freudenberg K., Lautsch W., Brenek H., (1956).** German patent #947402, to Zellstoffabrik Walhof, and patents cited therein
- Garcia A., Toledano A., Andres M., Labidi J., (2010).** Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochemistry* 45, 935–940

- Garcia R., Pizzi A., (1998).** Polycondensation and autocondensation networks in polyflavonoids tannins. II. Polycondensation versus autocondensation. *Journal of Applied Polymer Science* 70, 1093-1109
- Garrote G., Dominguez H., Parajo J.C., (2004).** Production of Substituted Oligosaccharides by Hydrolytic Processing of Barley Husks. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 43, 1608-1614
- Garrote G., Dominguez H., Parajo J.C., (1999).** Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production for wood. *Chemical Technologie and Biotechnologie* 74, 1101-1109
- Gilardi G., Abis L., Cass A., (1995).** Carbon-13 CP/MAS solid-state NMR and FT-IR spectroscopy of wood cell wall biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 266-275
- Glasser W., Wright R., (1998).** Steam-assisted biomass fractionation II. Fractionation behavior of various biomass resources. *Biomass Bioenergy*. 14, 219–235
- Granata A., Argyropoulos D., (1995).** 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins. *Agriculture Food Chemistry* 43, 1538–44
- Guerra A., Mendonca R., Ferraz A., Lu F., Ralph J., (2004).** Structural characterization of lignin during *Pinus taeda* wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispora*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4073–4078
- Gümüşkaya E., Usta M., Kirci H., (2003).** The effect of various pulping conditions on crystalline structure of cellulose in cotton linters. *Polymer degradation and stability* 81, 559-564
- Hasegawa I., Tabata K., Okuma O., Mae K., (2004).** New pretreatment methods combining a hot water treatment and water/acetone extraction for thermo-chemical conversion of biomass. *Energy Fuels* 18, 755–760
- He L., Terashima N., (1991).** Formation and structure of lignin in monocotyledons. IV deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectroscopy. *Holzforschung*, 45, 191-198
- Helbert W., Sugiyama J., Ishihara M., Yamanaka S., (1997).** Characterization of native crystalline cellulose in the cell walls of Oomycota. *J. Biotechnology* 57, 29-37
- Hergert H., (1960).** Infrared spectra of lignin and related compounds.II. Conifer lignin and model compounds. *J. Organic Chemistry* 25(3), 405–13
- Himmelsbach D., (1993).** Structure of forage cell walls (session synopsis). In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hartfield, R.D., Ralph, J. (Eds.), *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy Inc., Madison, WI, pp. 271–283

- Holtman K., Cheng H., Jameel H., Kadla J., (2006).** Quantitative ^{13}C NMR characterization of milled wood lignins isolated by different milling techniques. *Wood Chemistry and Technology* 26, 21-34
- Hon D., (1994).** Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose*, 1, 1-25
- Honjo G., Watanabe M., (1958).** Examination of cellulose fiber by the low-temperature specimen method of electron diffraction and electron microscopy. *Nature*, 181, 326-328
- Isogai A., (1994).** Allomorphs of the cellulose and other polysaccharides, *Cellulosic Polymers, Blends and Composites*, Munich, Hanser Publishers
- Jahan M., Chowdhury D., Islam M., Moeiz S., (2007).** Characterization of lignin isolated from some nonwood available in Bangladesh. *Bioresource Technology* 98(2), 465–4699
- Jair C., Tito J., Emmerich F., (2001).** Investigation of biomass- and polymer-based carbon materials using ^{13}C high-resolution solid-state NMR. *Carbon* 39, 535–545
- Johansson M., Gellerstedt G., (2002).** On chromophores and leucochromophores formed during the refining of wood. *J. Pulp Paper Research* 17, 5-8
- Jakobson J., Hortling B., Erins P., Sundquist J., (1995).** Characterization of alkali soluble fraction of steam exploded birch wood. *Holzforschung* 49, 51–59
- Kamoun C., Pizzi A., (2000).** Mechanism of hexamine as a non-aldehyde polycondensation hardener. Part 2. Recomposition of intermediate reactive compounds. *Holzforsch Holzverwert* 52(3), 66-67
- Kishimoto T., Sano Y., (2003).** Delignification Mechanism During High-Boiling Solvent Pulping. V. Reaction of Nonphenolic b-O-4 Model Compounds in the Presence and Absence of Glucose. *J. Wood Chemistry and Technology* 23(3-4), 279–292
- Kubikova J., Zemann A., Krkoska P., Bobleter O., (1996).** Hydrothermal pretreatment of wheat straw for the production of pulp and paper. *TAPPI Journal* 79, 63–9
- Kubo S., Kadla J., (2004).** Poly(Ethylene Oxide)/Organosolv Lignin Blends: Relationship between Thermal Properties, Chemical Structure, and Blend Behavior. *Macromolecules*. 37(18), 6904-6911
- Laser M., Schulman D., Allen S., (2002).** A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology* 81, 33-44
- Lee J., Shi J., Venditti R., Jameel H., (2009).** Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. *Bioresource Technology* 100, 6434–6441
- Lei H., Pizzi A., (2008).** Environmentally friendly mixed tannin/lignin wood resins. *Applied Polymer Science* 107(1), 203-209

- Leschinsky M., Zuckerstatter G., Weber H., Patt R., Sixta H., (2008).** Effect of autohydrolysis of Eucalyptus globulus wood on lignin structure. Part 1 : Comparison of different lignin fractions formed during water prehydrolysis. *Holzforschung* 62, 645-652
- Lewis N., Lantzy T., (1989).** Lignin in adhesives. Introduction and historical perspective. ACS Symposium Series 397, 13-26
- Li J., Gellerstedt G., (2008).** Improved lignin properties and reactivity by modifications in autohydrolysis process of aspen wood. *Industrial Crops Production* 27, 175-181
- Li J., Henriksson G., Gellerstedt G., (2007).** Lignin depolymerisation / repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology* 98, 3061–3068
- Li S., Lundquist K., (2000).** Cleavage of arylglycerol b-aryl ethers under neutral and acid conditions. *Nordic Pulp and Paper Research* 15, 292–299.
- Ligero P., Vegaa A., Bao M., (2005).** Acetosolv delignification of Miscanthus sinensis bark Influence of process variables *Industrial Crops and Products* 21, 235–240
- Lin S., Dence C., (1992).** “Methods in Lignin Chemistry”, Springer Series in Wood Science, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
- Liu C., Xu F., Sun J., Ren J., Curling S., Sun P., (2006).** Fowler and M. S. Baird Physicochemical characterization of cellulose from perennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*). *J. Carbohydrate Research* 341, 2677–2687
- Liu C., Xu F., Sun J., Ren J., Curling S., Sun R., (2006).** Physicochemical characterization of cellulose from perennial leaves (*Lolium perenne*). *Carbohydrate Res.* 341(16), 2677-2687
- Lloyd T., Wyman C., (2005).** Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technologie* 96, 1967–1977
- Locci E., Laconi S., Pompei R., Scano P., Lai A., Marincola F., (2008).** Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. *Bioresource Technology* 99, 4279–4284
- Lopez F., Alfaro A., Jimenez L., (2006).** Alcohols as organic solvents for the obtainment of cellulose pulp. *Afinidad* 63, 174–182
- Lora J., Wayman M., (1978).** Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. *TAPPI Journal* 61, 47-50
- Lundquist K., (1992).** Proton (1H) NMR spectroscopy. In *Methods in Lignin Chemistry*; Lin S. Y., Dence, C. W., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, pp 242-249

- Maunu S., Littia T., Kaulimaki S., Hortling B., Sundquist J., (2000).** Carbon-13 CP/MAS NMR investigations of cellulose polymorphs in different pulps. *Cellulose* 7(2),147–159.
- Martinez A., Rodriguez M., York S., Preston J., Ingram L., (2000).** Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. *Biotechnology Progress* 16 (4), 637–641
- Meshgini M., Sarkanen K., (1989).** Synthesis and kinetics of acid catalysed hydrolysis of some a-aryl ether lignin model compounds. *Holzforschung* 43, 239–243
- Meyer K., Misch L., (1937).** Positions des atomes dans le nouveau modèle spatial de la cellulose. *Helvetica Chimica Acta* 20, 232-245
- Mitjans M., Vinardell M., (2005).** Biological activity and health benefits of lignans and lignins, *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology* 11, 55–62
- Montane D., Farriol X., Salvado J., Jollez P., Chornet E., (1998).** Fractionation of wheat straw by steam-explosion pretreatment and alkali delignification. *Cellulose pulp and byproducts from hemicellulose and lignin. J. Wood Chemistry and Technology* 18(2), 171–191
- Monties B., (1980).** Les lignines. In « Les polymères végétaux », 122-155. Ed. Gauthier - Villars, Paris
- Muurinen E., (2000).** Organosolv pulping-a review and distillation study related to peroxyacid pulping. Department of Process Engineering, University of Oulu, FIN 90014 University of Oulu, Finland. (Available online: http://herkules.oulu.fi/isbn9514256611/isbn_9514256611.pdf)
- Nabarlatz D., Farriol X., Montane D., (2004).** Kinetic Modeling of the Autohydrolysis of Lignocellulosic Biomass for the Production of Hemicellulose-Derived Oligosaccharides *Industrial and Engineering Chemistry Research* 43, 4124-4131
- Nakamura Y., Higuchi T., (1976).** Ester linkage of p-coumaric acid in bamboo lignin. *Holzforschung* 30(6), 187-191
- Neilson M., Shafizadeh F., Aziz S., Sarkanen K., (1983).** Evaluation of organosolv pulp as a suitable substrate for rapid enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Bioengineering* 25, 609–612
- Nimz H., (1983).** Lignin based adhesives. In: Pizzi A (ed) *Wood adhesives: Chemistry and Technology*, vol. 1, Marcel Dekker Inc., New York.
- Nimz H., (1966).** Rearrangement in the lignin field. *Angewandte Chemie* 78 (17) 821-822
- Northey R., (1992).** Low-cost uses of lignin, emerging technology of materials and chemicals from biomass. *ACS Symposium Series* 476. Washington, DC

- Ogier J., Ballerini D., Leygue J., Rigal L., Pourquoié J., (1999).** Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technologie- Revue de l'IFP* 54, 67-94
- Okuda T., Yoshida T., Hatano T., (1991).** Chemistry and biological activities of tannins in medicinal plants. In: Werner, H., Fainsworth, N.R. (Eds.), *Economic and Medicinal Plant Research*, Academic Press, 5, 129–165, New York
- Pan X., Arato C., Gilkes N., Gregg D., Mabee W., Pye K., Xiao Z., Zhang X., Saddler J., (2005).** Biorefining of softwoods using Ethanol Organosolv Process Pulping: Preliminary Evaluation of process Streams for manufacture of Fuel-Grade Ethanol and Co-products. *Biotechnology and bioengineering*, vol.90, no.4
- Pan X., Xie D., Yu R., Lam D., Saddler J., (2007).** Pretreatment of lodgepole pine killed by mountain pine beetle using the ethanol organosolv process: Fractionation and process optimization. *Industrial Engineering Chemistry Research* 46 (8), 2609–2617
- Pan X., Kadla J.F., Ehara K., Gilkes N., Saddler J., (2006).** Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure extraction conditions and antioxidant activity. *J. Agriculture and food chemistry* 54, 5806–5813
- Pan X., Xie D., Yu R., Saddler J., (2008).** The bioconversion of Mountain Pine Beetle-Killed Lodgepole Pine to fuel ethanol using the organosolv process. *Biotechnologie Bioengineering* 101(1), 39-47
- Pecina H., Kuchne G., (1995).** Lignin-polyphenol binder on organocell spent liquor for wood products, *Annals of Warsaw Agricultural University For Wood Technology* 46, 93-100.
- Pichelin F., Nakatani M., Pizzi A., Wieland S., Despres A., Rigolet S., (2006).** Structural beams from thick wood panels bonded industrially with formaldehyde-free tannin adhesives *J. Forest Products* 56 (5), 31-36
- Pizzi A., Valenzuela. J., Westermeyer C., (1993).** Non-emulsifiable, water-based, mixed diisocyanate adhesive systems for exterior plywood. Part II. Theory, application and industrial results . *Holzforschung* 47, 69-71
- Ralph J., Marita J., Ralph S., Hatfield R., Lu F., Ede R., Peng J., Quideau S., Helm R., Grabber J., Kim H., MacKay J., Sederoff R., Chapple C., Boudet A., (1999).** Solution-state NMR of lignins. In: Argyropoulos, D.S., Rials, T. (Eds.), *Progress in Lignocellulosics Characterization*. Tappi press, Atlanta, GA, pp. 55–108
- Ramos L., Breuil C., Kushner D., Saddler J., (1992).** Steam pre-treatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptusvitaminalis* wood chips. *Holzforschung* 46, 149-154
- Reddy N., Yang Y., (2005).** Structure and properties of high quality natural cellulose fibers from cornstalk. *Polymer* 46, 5494–5500

- Robert D., (1992).** Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: Lin S, Dence C (eds) *Methods in lignin chemistry*. Springer, Berlin
- Robert D., Roland J., (1998).** *Biologie végétale*, volume 1, Organisation cellulaire, Ed. Doin, Paris, p. 367
- Rousseau-Richard C., Richard C., Martin R., (1988).** Etude cinétique de l'influence complexe, pro- ou antioxydante, de dérivés phénoliques sur l'oxydation induite d'un substrat polyinsaturé. I- Analyse du mécanisme réactionnel. *Chimie Physique* 85, 167-174
- Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y., Fujisawa S., (2005).** Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry* 66, 2108-2120.
- Sakagami H., Kohno S., Takeda M., Nakamura K., Nomoto K., Ueno I., Kanegasaki S., Naoe T., Kawazoe Y., (1992).** O₂-scavenging activity of lignins, tannins and PSK. *Anticancer Research* 12, 1995-2000
- Salomaa P., (1956).** Kinetics of the Cannizzaro reaction of glyoxal. *Acta Chemica Scandinavica* 10, 311-319
- Sang Y., Yoo D., Shin Y., Seo G., (2005).** FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research* 340, 417-428
- Sannigrahi P., Ragauskas A., Miller S., (2008).** *Bioenergy Research*, 1, 205-214
- Sarkanen K., Ludwig C., (1971).** Definition and nomenclature, p.1- in « lignins : Occurrence, formation structure and reactions », K. V. Sarkanen et C.H. Ludwig eds., Wiley. Interscience, N.Y.
- Sarkanen K., (1980).** In Sarkanen K. and Tillman D., Editors. *Progress in Biomass Conversion*, vol. 2, New York: Academic Press, p. 127-144
- Sarkanen K., Ludwig C., (1971).** *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Wiley-Interscience, New York
- Sarko A., Muggli R., (1974).** Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. III. Valonia cellulose and cellulose II. *Macromolecules* 7, 486-494
- Saska M., Ozer E., (1995).** Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. *Biotechnology and Bioengineering* 45, 517-523
- Seca A., Cavaleiro J., Domingues F., Silvestre A., Evtuguin D., Neto P., (2000).** Structural characterization of the lignin from the nodes and internodes of *Arundo donax* reed. *J. Agriculture and Food Chemistry* 48(3), 817-24
- Shimada M., Fukumaza T., Higuchi T., (1971).** Ester linkages of p-coumaric acid in bamboo and grass lignins. *Tappi* 54, 72-78

- Shleser R., (1994).** Ethanol Production in Hawaii. Prepared for the State of Hawaii, Department of Business, Economic Development and Tourism. Honolulu: Energy Division, Dept. of Business, Economic Development and Tourism, State of Hawaii. 1. Energy crops-Hawaii. 2. Alcohol as fuel-Hawaii. 3. Biomass energy-Hawaii. HD9502.5.B54.S4.1994
- Sixta H., (2006).** Multistage Kraft pulping. In : Handbook of pulp. Ed Sixta, H. Wiley-VCH. Weinheim 325-365
- Sjoström E., (1993).** Wood chemistry fundamentals and applications, New-York, Academic Press.
- Soderstroem J., Galbe M., Zacchi G., (2005).** Separate versus simultaneous saccharification and fermentation of two-step steam pretreated softwood for ethanol production. Journal of Wood Chemistry and Technology 25, 187–202
- Sørensen A., Teller P., Hilstrom T., Ahring B., (2008).** Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre treatment and enzymatic treatment. Bioresource Technology 99(14), 6602-6607
- Sugiyama J., Vuong R., Chanzy H., (1991).** Electron diffraction study of the two crystalline phases occurring in the native celluloses from an algal cell wall. Macromolecules, 24, 4168-4175
- Sun J., Sun X., Zhao H., Sun R., (2004).** Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. J. Polymer Degradation and Stability 84, 331-339
- Sun R., Lawther J., Banks W., (1996).** Carbohydrate Polymer 29 325, Tech Ass Paper Pulp Ind. 43 (2), 209A-218A
- Sun R., Sun X., Wang S., Zhu W., Wang X., (2002).** Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. Industrial Crops and Products 15(3), 179–88
- Sun X., Sun R., Su Y., Sun J., (2004).** Comparative study of crude and purified cellulose from wheat straw. J. Agriculture and Food Chemistry 52(4) 838-47
- Sun Y., Cheng J., (2002).** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83, 1–11
- Sun R., Lawther J., Banks W., 1997.** A tentative chemical structure of wheat straw lignin. Industrial and Crops Products 6, 1–8
- Tanahashi M., (1990).** Characterization and degradation mechanism in wood components by steam explosion and utilization of exploded wood. Wood Research 77, 49-117

- Tapin S., Sigoillot J.C., Asther M., Petit-Conil M., (2006).** Feruloyl esterase utilization for simultaneous processing of nonwood plants into phenolics compounds and pulp fibers. *J. Agriculture and Food Chemistry* 54, 3697–3703
- Thring R., Chornet E., Qverend R., (1990).** Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. *Biomass* 23, 289–305
- Van Walsum G., Allen S., Spencer M., Laser M., Antal M., Lynd L., (1996).** Conversion of Lignocellulosics Pretreated with Liquid Hot Water to Ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58, 157-170
- Vazquez G., Antorrena G., Gonzalez J., Freire S., Lope S., (1997).** Acetosolv fractionation of pine wood. Kinetic modelling of lignin solubilisation and condensation. *Bioresource Technology* 59, 121-127.
- Vietor R., Mazeau K., Lakin M., Perez S., (2000).** A priori crystal structure prediction of native celluloses. *Biopolymers*, 54, 342-354
- Villaverde J., Domingues R., Freire C., Silvestre A., Pascoal Neto C., Ligerio P., Vega A., (2009).** *Miscanthus x giganteus* extractives: A source of valuable phenolic compounds and sterols. *J. Agriculture and Food Chemistry* 57(9), 3626-3631
- Vinardell M., Ugartondo V., Mitjans M., (2008).** Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial Crop and Products* 27, 220–223
- Wada M., Sugiyama J., Okano T., (2001).** Localization of I α and I β phases in alga cellulose revealed by acid treatments. *Cellulose* 8, 183-188.
- Wang K., Jiang J., Xu F., Sun R., (2009).** Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (*Lespedeza crytobotrya*): Part 1. Characteristics of degraded cellulose. *Polymer degradation and stability* 94, 1379-1388
- Wayman M., Lora J., (1978).** Aspen autohydrolysis. The effect of 2-naphthol and other aromatic compounds. *Tappi* 61, 55–57.
- Weil J.R., Sarikkaya A., Rau S.L., Goetz J., Ladish C.M., Brewer M., Hendrickson R., (1998).** Pretreatment of corn fibers by pressure cooking in water. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 73, 1-17
- West E., MacInnes A., Hibbert H., (1943).** Studies on Lignin and Related Compounds. LXIX. Isolation of 1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)- 2-propanone and 1- Ethoxy- 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2 –propanone from the Ethanolysis Products of Spruce Wood. *J. American Chemical Society* 65, 1187-1192
- Willfoer S., Sundberg A., Pranovich A., Holmbom B., (2005).** Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Science and Technologie* 39, 601–617
- Wu S., He B., Ping Q., Qian L., (2003).** New technologies for clean production of pulp and paper. Chemical Industry, Beijing

- Xiao B., Sun X., Sun R., (2001).** Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali - soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability* 74(2), 307–19
- Xu F., Geng Z., Liu C., Ren J., Sun J., Sun R., (2008).** Structural characterization of residual lignins isolated with cyanamide-activated hydrogen peroxide from various organosolvs pre-treated wheat straw. *J. Applied Polymer Science* 109(1), 555–64
- Xu F., Sun J., Sun R., Fowler P., Baird M., (2006).** Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products* 23(2), 180–193
- Xu F., Jiang J., Sun R., Tang J., Sun J., Su Y., (2008).** Fractional isolation and structural characterization of mild ball-milled lignin in high yield and purity from *Eucommia ulmoides* Oliv. *Wood Science Technology* 42(3), 211–26
- Zhao G., Cheng K., Liu D., (2009).** Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology Biotechnology* 82, 815–827

Résumé

Le *miscanthus x Giganteus* (*MxG*) constitue, du fait de sa composition, une source renouvelable de matière lignocellulosique pouvant être d'un grand intérêt pour la production de molécules à haute valeur ajoutée. Le *MxG* ayant servi à ce travail provient du lycée agricole à Courcelles-Chaussy, Metz-France. Sa teneur élevée en hémicelluloses (26 %), en lignine (26 %) et en cellulose (36 %) en fait une bonne source de polymères et de carburant renouvelable. L'étude que nous avons réalisée a été menée dans le but de caractériser la paille de *MxG* et d'optimiser le processus de délignification en une seule étape (1) par un traitement organosolv à l'éthanol et en deux étapes (2) par un prétraitement consistant en une autohydrolyse à l'eau/organosolv. Le procédé éthanol organosolv a permis un bon fractionnement des trois constituants de la biomasse (la lignine, la cellulose et les hémicelluloses). Le procédé de traitement en deux étapes, impliquant une autohydrolyse à l'eau (en présence et en l'absence du 2-naphtol), préalable au traitement organosolv, a permis de faciliter l'étape ultérieure de délignification en déstructurant la lignine. Une investigation portant sur la structure physico-chimique a été réalisée sur de la lignine de bois broyé et de la lignine organosolv de *MxG* extraite à différentes sévérités de traitement. Nous nous sommes ensuite intéressés à utiliser la lignine organosolv pour la formulation d'un adhésif pour le bois dans laquelle un aldéhyde non toxique et peu volatil (le glyoxal) est employé en remplacement du formaldéhyde. Une formulation, composée à 100 % de résines naturelles (60 % de tannins de mimosa et 40 % de lignine glyoxalée) a été utilisée pour la conception d'un panneau de particules et a donné des résultats prometteurs avec une force de liaison interne de 0,41 MPa, supérieure à la valeur de la norme européenne en vigueur. Enfin, une étude des propriétés antioxydantes a été faite sur les lignines extraites. Les résultats obtenus ont montré une corrélation entre l'activité antioxydante et les conditions opératoires du traitement organosolv, la masse moléculaire moyenne, l'indice de polydispersité et les groupements hydroxyles phénoliques des lignines.

Mots clés : *Miscanthus x giganteus*, traitement éthanol organosolv, autohydrolyse, lignine de bois broyé, lignine organosolv, adhésifs et antioxydants.