

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

**ÉCOLE DOCTORALE 3MPL**  
**Matière, Molécules, Matériaux en Pays de la Loire**

Année 2013

# Évaluation du potentiel rhéologique d'huiles issues de microalgues pour des applications en tant que matériaux de substitution aux bitumes

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie  
Spécialité : Chimie des matériaux

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Mariane AUDO**

*Le 28 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs François CANSELL, Directeur de recherche, INP Bordeaux  
Carlos VACA-GARCIA, Directeur de recherche, ENSIACET Toulouse  
Examineurs Anne ROUBAUD, Ingénieur de recherche, CEA Grenoble  
Jack LEGRAND, Directeur de recherche, GEPEA Saint-Nazaire  
Olivier LEPINE, Ingénieur, Alpha Biotech – Algosource Technologies  
Clémence QUEFFELEC, Maître de conférences, CEISAM Nantes  
Emmanuel CHAILLEUX, Chargé de recherche, IFSTTAR Bouguenais  
Bruno BUJOLI, Directeur de recherche, CEISAM Nantes

*Directeur de thèse : Bruno Bujoli*



UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

**ÉCOLE DOCTORALE 3MPL**  
**Matière, Molécules, Matériaux en Pays de la Loire**

Année 2013

# Évaluation du potentiel rhéologique d'huiles issues de microalgues pour des applications en tant que matériaux de substitution aux bitumes

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie  
Spécialité : Chimie des matériaux

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Mariane AUDO**

*Le 28 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs François CANSELL, Directeur de recherche, INP Bordeaux  
Carlos VACA-GARCIA, Directeur de recherche, ENSIACET Toulouse  
Examineurs Anne ROUBAUD, Ingénieur de recherche, CEA Grenoble  
Jack LEGRAND, Directeur de recherche, GEPEA Saint-Nazaire  
Olivier LEPINE, Ingénieur, Alpha Biotech – Algosource Technologies  
Clémence QUEFFELEC, Maître de conférences, CEISAM Nantes  
Emmanuel CHAILLEUX, Chargé de recherche, IFSTTAR Bouguenais  
Bruno BUJOLI, Directeur de recherche, CEISAM Nantes

*Directeur de thèse : Bruno Bujoli*



# Remerciements

Cette thèse s'est déroulée dans le cadre du projet régional Algoroute, financé par la région Pays de la Loire, au sein de l'Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux de Bouguenais, dans l'équipe Matériaux pour les Infrastructures de Transport, dirigée par M. Ferhat HAMMOUM. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Une partie de ce travail a également été réalisé à l'Université des Sciences et Techniques de Nantes, au sein du laboratoire Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation, dirigé par M. Bruno BUJOLI, qui a également dirigé ce travail de thèse. Qu'il trouve ici ma reconnaissance pour tous les précieux conseils dont il a su me faire part, pour m'avoir fait bénéficier de sa rigueur scientifique, et pour toutes les discussions toujours très profitables auxquelles il a participé.

Je tiens également à remercier M. Emmanuel CHAILLEUX, chargé de recherche à l'IFSTTAR et co-encadrant de cette thèse, d'avoir été toujours disponible quand j'en ai eu besoin, pour ses remarques toujours pertinentes, et pour avoir initié une chimiste à la science complexe de la rhéologie. Le cours de ma vie aurait été bien différent si tu ne m'avais pas appelée un beau jour de Mai 2010 pour me proposer ce sujet de thèse. Mes remerciements vont également à Mme Clémence QUEFFÉLEC, maître de conférences au CEISAM et co-encadrante de cette thèse, pour avoir été très présente à mes côtés durant ces trois années, pour m'avoir habilement conseillée tant à la paillasse que pour la production de documents scientifiques. Je suis très fière et honorée d'avoir été ta première thésarde.

Merci à MM. François CANSELL et Carlos VACA-GARCIA, directeurs de recherche à l'Institut Polytechnique de Bordeaux et de Toulouse respectivement, pour avoir accepté de faire parti du jury de cette thèse, et d'en être rapporteurs. Merci à Mme Anne ROUBAUD, chargée de recherche au CEA Grenoble pour avoir accepté de faire parti du jury de cette thèse, et d'examiner ce travail.

Mes plus vives reconnaissances à MM. Jack LEGRAND et Olivier LÉPINE, directeur du GEPEA et directeur général d'Alpha Biotech respectivement, pour avoir accepté de faire parti du jury de cette thèse, et pour leur implication dans le projet Algoroute.

Merci à Franck FAYON, pour m'avoir accueillie plusieurs jours au sein du laboratoire CEMHTI à Orléans, pour l'acquisition de spectres RMN MAS. Merci également à Fabienne FARCAS, du site parisien de l'IFSTTAR, pour les caractérisations par chromatographie d'exclusion stérique.

Un grand merci à Maria PARASCHIV, post-doctorante au GEPEA, pour avoir réalisé les liquéfactions hydrothermales en enceinte d'un litre, dont les résultats sont présentés dans ce manuscrit. Merci aux deux étudiants que j'ai eu l'occasion d'encadrer durant cette thèse : Nicolas GUILLOPÉ, du M1 ACBPI (Nantes), et Justine PUILLANDRE, du M2 Chimie Moléculaire (Rennes).

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes, et je tiens ici à les remercier : Isabelle LOUVET (analyses GC-FID), Julie HÉMEZ (analyses GC-MS), Denis LOQUET (analyses élémentaires), Nadège VIGNARD (caractérisations rhéologiques), et enfin Olivier BURBAN (mécano et électricien à ses heures perdues), Gilles DIDELET (mon parisien préféré), Jean-Luc GEFFARD (le projet phare de l'IFSTTAR), Cédric PETITEAU et Jean-Philippe TERRIER, les Mc Gyver du laboratoire !

Merci également à Arnaud ARTU, Camille LEMASSON et Antoine SOULIES, doctorants au GEPEA, pour les mesures de teneurs en sucres et en protéines.

Merci à tous les permanents du CEISAM et du groupe MIT de l'IFSTTAR que je n'ai pas cités, mais qui trouveront ici ma reconnaissance.

J'aurai bien évidemment un mot pour tous les collègues doctorants que j'ai croisés durant ces trois années, en espérant n'en oublier aucun. Du CEISAM, merci à : ma « big sis' » portugaise Sandra (sans toi, rien n'aurait été pareil) et ma maman algérienne Ouassila (loin des yeux, près du cœur), les collègues de chez EI (go materials chemistry), Adrien « Jésus » (star de JKG), Kristen « Mc Byrne » (my english is so better now you are here, isn't it ?) et Simon«pédia», les collègues de chez DD, Caroline « Gaga Judas », Christophe « Francky Vincent », Jérémy, Maxime et Samuel, ainsi que les collègues « d'en haut », Antoine, Esma, Florent, Ludovic, Nicolas, Romain, Romy, Sameh, Thibaut, Yoan, sans oublier Ugo, du bâtiment 9. De l'IFSTTAR, merci à Layella, ma collègue de bureau, à Cyrile, mon premier collègue de bureau, Andréa, Antoine, Christelle, Eric, Juliette, Manitou, et Manuela.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui n'ont pas été directement impliquées dans cette thèse, mais qui m'ont apporté leur soutien durant ces trois années. Je

souhaiterais tout d'abord remercier le Dr. Zoban (j'hésite à te balancer une vanne...), le Dr. Yannou. Si les six mois de stage passés à les côtoyer ne s'étaient pas si bien passés, je ne me serais probablement pas lancée dans la grande aventure de la thèse. J'ai également une pensée pour mes deux poulettes, Maud et Nathalie, des amies comme il est difficile d'en trouver. Merci pour ces gestes simples qui savent redonner le sourire dans des moments de stress intense. Merci à Tom-Tom, mon copain de galère. Merci à toutes les personnes venues m'encourager le jour J, votre soutien m'a fait chaud au cœur.

Merci à Aurélien, d'avoir embelli mes derniers mois de thèse, et d'avoir fait un long voyage pour supporter mes dernières heures de stress.

Pour terminer, j'ai bien évidemment une pensée pour mes parents, qui ont su m'inculquer le goût des études et du travail bien fait, et pour mon grand frère, qui a m'a accompagnée et soutenue tout au long de mon parcours scolaire.



*Somewhere ages and ages hence:  
Two roads diverged in a wood,  
and I, I took the one less traveled by,  
and that has made all the difference.*

*Robert Frost  
The road not taken, 1916*



# Sommaire

<b>Table des figures</b>	<b>19</b>
<b>Table des tableaux</b>	<b>25</b>
<b>Table des symboles et abréviations</b>	<b>29</b>
<b>Avertissement</b>	<b>31</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>33</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>38</b>
<b>Chapitre 1 État de l'art</b>	<b>41</b>
<b>Introduction</b>	<b>43</b>
<b>I – Liants routiers bitumineux et biosourcés</b>	<b>43</b>
1) Les liants bitumineux	44
a- Le pétrole	45
b- Origine du bitume	45
c- Caractérisation chimique	47
d- Caractérisation physique et rhéologique	51
2) Les substituts au bitume	58
a- Les fluxants et surfactants végétaux	59
b- Les liants routiers alternatifs	61
3) Conclusions	66
<b>II – Les microalgues</b>	<b>67</b>
1) Généralités	67
2) Culture	69
3) Récolte	72
4) Composition	73
5) Applications	75
a- Nutrition	76
b- Pharmaceutique, cosmétique, et autres composés biologiquement actifs	77
c- Bioplastiques	79
d- Environnement	79

e-	Bioénergies.....	80
6)	Conclusions .....	81
<b>III –</b>	<b>Extraction lipidique</b> .....	<b>82</b>
1)	Extractions « Folch » et « Bligh and Dyer » .....	82
2)	Extraction Soxhlet.....	83
3)	Extraction au fluide supercritique .....	84
4)	Extraction assistée par micro-ondes.....	86
5)	Extraction assistée par ultrasons.....	86
6)	Applications aux microalgues : comparaison des efficacités.....	87
a-	Influence du solvant d'extraction .....	88
b-	Extractions en conditions estérifiantes .....	89
c-	Influence d'un traitement externe.....	90
d-	Vers des extractions en voie humide .....	92
7)	Conclusions .....	93
<b>IV –</b>	<b>Liquéfaction hydrothermale</b> .....	<b>93</b>
1)	L'eau en milieu subcritique.....	98
a-	Relation pression/température .....	98
b-	Propriétés physico-chimiques.....	99
c-	Réactivité.....	101
2)	Mécanismes réactionnels en conversion hydrothermale.....	101
a-	Conversion hydrothermale des polysaccharides .....	101
b-	Conversion hydrothermale des lipides.....	104
c-	Conversion hydrothermale des protéines.....	105
d-	Conversion hydrothermale des pigments .....	106
e-	Réactivité des mélanges binaires.....	108
3)	Facteurs influençant les rendements de conversion hydrothermale.....	109
a-	Effet de la température.....	109
b-	Effet de la pression et de la nature du gaz .....	110
c-	Effet du temps de réaction.....	110
d-	Effet du rapport biomasse/liquide.....	111
e-	Effet de la vitesse de chauffe.....	112
f-	Effet des catalyseurs .....	112
4)	Rhéologie des bio-huiles .....	114
5)	Conclusions .....	115
<b>V –</b>	<b>Conclusions</b> .....	<b>115</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>118</b>

**Chapitre 2 Étude et caractérisation de *Scenedesmus sp.* \_\_\_\_\_ 131**

**Introduction \_\_\_\_\_ 133**

**I – Cas d'étude \_\_\_\_\_ 133**

**II – Caractérisation biochimique \_\_\_\_\_ 135**

- 1) Fraction lipidique à faible poids moléculaire ..... 135
  - a- Extraction ..... 135
  - b- Analyse qualitative..... 137
  - c- Analyse quantitative ..... 143
- 2) Fraction lipidique à haut poids moléculaire ..... 146
  - a- Les algaenans dans la littérature : extractions..... 147
  - b- Les algaenans dans la littérature : structures chimiques..... 150
  - c- Analyse des algaenans de *Scenedesmus sp.* cultivées à Alpha Biotech ..... 156
- 3) Fraction polysaccharidique ..... 163
- 4) Fraction protéinique ..... 167
- 5) Autres composés ..... 167
  - a- Chlorure de sodium..... 167
  - b- Carbonate de calcium..... 169
- 6) Conclusions ..... 170

**III – Potentiel rhéologique de la phase lipidique \_\_\_\_\_ 171**

- 1) Caractérisation rhéologique des extraits Soxhlet..... 171
- 2) Influence de la concentration en algaenans ..... 176
- 3) Conclusions ..... 180

**IV – Conclusions \_\_\_\_\_ 180**

**Bibliographie \_\_\_\_\_ 182**

**Chapitre 3 Liquéfaction hydrothermale des résidus de *Scenedesmus sp.* \_\_\_\_ 189**

**Introduction \_\_\_\_\_ 191**

**I – Présentation des appareillages \_\_\_\_\_ 192**

- 1) Réacteurs de Parr ..... 192
- 2) Réacteur de SACMO ..... 193

**II – Etudes préliminaires \_\_\_\_\_ 194**

- 1) Suivi thermique par DSC ..... 194
- 2) Essais préliminaires de liquéfaction en enceinte de 50 mL..... 196

<b>III– Influence des conditions opératoires sur les rendements</b>	<b>199</b>
1) Présentation du plan d'expériences .....	200
2) Interprétation des résultats .....	202
a- Analyse qualitative.....	204
b- Analyse statistique.....	206
3) Conclusions .....	208
<b>IV – Caractérisation chimique des différentes fractions</b>	<b>208</b>
1) Phases huileuses.....	209
a- Caractérisation par spectroscopie infrarouge .....	209
b- Analyse GC-MS.....	209
2) Phases aqueuses.....	213
3) Résidus solides .....	216
4) Gaz.....	220
5) Conclusions .....	221
<b>V – Caractérisations rhéologiques</b>	<b>221</b>
1) Huiles de liquéfaction du plan d'expériences.....	222
a- Propriétés rhéologiques .....	222
b- Influence des conditions expérimentales sur les propriétés rhéologiques .....	226
c- Relations rendements-rhéologie .....	228
d- Chromatographie d'exclusion stérique .....	230
e- Calorimétrie différentielle à balayage.....	231
2) Influence du changement d'échelle.....	233
3) Influence de la nature du solvant d'extraction.....	234
4) Influence du taux de chargement.....	236
5) Conclusions .....	238
<b>VI – Conclusions</b>	<b>239</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>241</b>
<b><i>Chapitre 4 Prétraitement acide de la biomasse Influence sur l'extraction</i></b>	
<b><i>Soxhlet et la liquéfaction hydrothermale</i></b>	<b>245</b>
<b>Introduction</b>	<b>247</b>
<b>I – Présentation des conditions expérimentales testées</b>	<b>248</b>
<b>II– Influence des conditions opératoires</b>	<b>249</b>
1) Evaluation du répartition de la biomasse .....	249

2)	Caractérisation chimique .....	251
a-	Fraction hydrophobe.....	251
b-	Fraction hydrophile.....	256
3)	Conclusions .....	259
<b>III – Influence du prétraitement acide en liquéfaction hydrothermale _____</b>		<b>260</b>
1)	Fraction hydrophobe .....	260
2)	Fraction hydrophile .....	262
3)	Conclusions .....	263
<b>IV – Conclusions _____</b>		<b>264</b>
<b>Bibliographie _____</b>		<b>266</b>
<b>Chapitre 5 Partie expérimentale _____</b>		<b>269</b>
<b>I – Généralités _____</b>		<b>271</b>
<b>II – Techniques de caractérisation _____</b>		<b>272</b>
1)	Chromatographie d'exclusion stérique.....	272
2)	Calorimétrie différentielle à balayage .....	272
3)	Spectroscopie infrarouge.....	273
4)	Analyse élémentaire.....	273
5)	RMN.....	274
a-	En milieu liquide.....	274
b-	En milieu solide.....	275
6)	Rhéologie .....	277
<b>II – Caractérisation des lipides _____</b>		<b>277</b>
1)	Isolement des lipides .....	277
2)	Analyses RMN.....	278
3)	Analyses infrarouge .....	282
4)	Analyses GC-FID.....	283
a-	Conversion des acides gras libres en esters méthyliques.....	283
b-	Conditions chromatographiques.....	283
c-	Analyse quantitative.....	284
<b>III – Caractérisation des algaenans _____</b>		<b>285</b>
1)	Isolement .....	285
a-	Protocoles.....	285
b-	Caractérisation infrarouge.....	286
2)	Clivage par $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .....	286

3) Clivage par $\text{RuO}_4$ .....	287
a- Protocoles de clivage.....	287
b- Analyses RMN des produits de clivage.....	288
4) Dérivatisation des produits de clivage.....	288
<b>IV – Caractérisation des sucres</b> .....	<b>289</b>
1) Acétylation des monosaccharides de référence.....	289
2) Analyse RMN des monosaccharides de référence.....	290
3) Isolement des monosaccharides.....	295
4) Analyse GC-FID.....	295
5) Dosage des sucres totaux par spectrophotométrie UV-Visible.....	296
<b>V – Dosage des protéines par spectrophotométrie UV-Visible</b> .....	<b>297</b>
<b>VI – Dosage des carbonates par calcimétrie</b> .....	<b>298</b>
<b>VII– Dosage du NaCl</b> .....	<b>300</b>
1) Détermination de la teneur en $\text{Na}^+$ par spectrophotométrie d'émission atomique.....	300
2) Détermination de la teneur en $\text{Cl}^-$ par dosage potentiométrique.....	301
<b>VIII – Liquéfaction hydrothermale</b> .....	<b>301</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>303</b>
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>305</b>





# Table des figures

Figure 1-1 : Lion sculpté dans le mastic de bitume découvert à Suse (3ème millénaire avant J.-C.)	44
Figure 1-2 : Représentation schématique du processus de raffinage du pétrole	46
Figure 1-3 : Classement général des bitumes	47
Figure 1-4 : Exemple de constituants de la fraction « saturés » des maltènes	47
Figure 1-5 : Exemple de de constituants de la fraction « aromatiques » des maltènes	48
Figure 1-6 : Exemple de constituants de la fraction « résines » des maltènes	48
Figure 1-7 : Exemple de constituants supposés d'asphaltènes isolés à partir de trois bruts iraniens	49
Figure 1-8 : Représentation schématique des deux structures extrêmes du bitume	51
Figure 1-9 : Déformation sinusoidale $\epsilon$ en réponse à une contrainte sinusoidale $\sigma$ appliquée à un matériau viscoélastique	54
Figure 1-10 : Comparaison des isothermes d'un bitume 20/30 et d'un bitume 50/70 en termes de norme de module complexe et d'angle de phase	56
Figure 1-11 : Comparaison des isochrones d'un bitume 20/30 et d'un bitume 50/70 en termes de norme de module complexe et d'angle de phase	57
Figure 1-12 : Comparaison des courbes de Black d'un bitume 20/30 et d'un bitume modifié au polymère	58
Figure 1-13 : Production mondiale de pétrole	58
Figure 1-14 : Exemples de chantiers Végécol	63
Figure 1-15 : Quelques espèces de microalgues	67
Figure 1-16 : Représentation phylogénétique simplifiée des algues	68
Figure 1-17 : Estimation de la productivité des microalgues à l'échelle du laboratoire	69
Figure 1-18 : Représentation schématique d'un raceway et d'un photobioréacteur tubulaire horizontal	71
Figure 1-19 : Prix et applications envisageables des microalgues	76
Figure 1-20 : Structure de la dinophysistoxine-1 extraite de <i>Prorocentrum lima</i>	77
Figure 1-21 : Structure de la fucoxanthine	78
Figure 1-22 : Structure du bromo-biindole majoritairement produit par <i>Rivularia firma</i>	78
Figure 1-23 : Extracteur Soxhlet	83
Figure 1-24 : Exemple de système d'extraction au fluide supercritique	85
Figure 1-25 : Diagramme de phases du $\text{CO}_2$	85
Figure 1-26 : Micrographie d'un microjet d'eau	87
Figure 1-27 : Structure de l'acide docosahexaénoïque	89
Figure 1-28 : Procédés de conversion thermique de la biomasse	96
Figure 1-29 : Diagramme de Van Krevelen de différentes matières d'origine fossile ou végétale	97
Figure 1-30 : Evolution de la pression de vapeur saturante de l'eau en fonction de la température	99
Figure 1-31 : Evolution de la constante diélectrique de l'eau en fonction de la température et comparaison avec des solvants organiques usuels	100

Figure 1-32 : Evolution du produit ionique de l'eau avec la température sous une pression de 30 MP	100
Figure 1-33 : Schéma réactionnel de la conversion hydrothermale des polysaccharides	104
Figure 1-34 : Structure de la chlorophylle a et du phytol	107
Figure 2-1 : Microalgues <i>Scenedesmus</i> sp observées par microscopie optique (grossissement : x100)	133
Figure 2-2 : Culture de <i>Scenedesmus</i> sp. à Alpha Biotech	134
Figure 2-3 : Structure de l'acide linoléique	137
Figure 2-4 : Spectres RMN <sup>1</sup> H dans CDCl <sub>3</sub> d'un mélange d'acides gras libres commerciaux et d'un extrait R2	137
Figure 2-5 : Spectres RMN <sup>1</sup> H du tristéarine, du 1,3-distéarine et du 1-monostéarine	139
Figure 2-6 : Comparaison du chromatogramme d'une fraction extraite à l'hexane avec celui de l'acide palmitique	141
Figure 2-7 : Comparaison du spectre infrarouge en solution dans CCl <sub>4</sub> d'un extrait R2 avec celui de l'acide linoléique	142
Figure 2-8 : Chromatogramme de quantification des acides gras libres chez <i>Scenedesmus</i> sp.	145
Figure 2-9 : Répartition des acides gras au sein des extraits Soxhlet	146
Figure 2-10 : Structure supposée des mélanoides	148
Figure 2-11 : Produits de dégradation de composés modèles par RuO <sub>4</sub>	151
Figure 2-12 : Spectres RMN MAS <sup>13</sup> C des algaenans issus de trois espèces de microalgues	152
Figure 2-13 : Structure des algaenans de <i>Nannochloropsis</i> sp.	154
Figure 2-14 : Structure des algaenans de <i>T. minimum</i> , <i>S. communis</i> , <i>P. boryanum</i>	155
Figure 2-15 : Structure des algaenans de <i>C. monoica</i>	155
Figure 2-16 : Structure des algaenans de <i>B. braunii</i> race A	156
Figure 2-17 : Spectre infrarouge des algaenans isolés selon la méthode 1	157
Figure 2-18 : Comparaison des spectres infrarouge des algaenans isolés selon deux méthodes	158
Figure 2-19 : Comparaison des spectres infrarouge en pastille dans KBr de la fraction extractible par CHCl <sub>3</sub> /MeOH et insoluble dans CCl <sub>4</sub> d'une part, et des algaenans de <i>Scenedesmus</i> sp. d'autre part	159
Figure 2-20 : Spectres infrarouges rapportés dans la littérature des algaenans isolés chez <i>Scenedesmus</i> sp.	160
Figure 2-21 : Chromatogramme des produits d'hydrolyse au RuO <sub>4</sub> des algaenans de <i>Scenedesmus</i> sp. après estérification	161
Figure 2-22 : Exemple de structure possible d'algaenans	163
Figure 2-23 : Chromatogramme d'analyse des polysaccharides non solubles dans l'eau	166
Figure 2-24 : Chromatogrammes d'analyse des polysaccharides hydrosolubles	166
Figure 2-25 : Structure du complexe cuivre-protéine en milieu alcalin	167
Figure 2-26 : Courbe de dosage des ions Cl <sup>-</sup> par AgNO <sub>3</sub>	168
Figure 2-27 : Droite d'étalonnage du spectromètre d'émission atomique	169
Figure 2-28 : Droite d'étalonnage du calcimètre de Bernard	170
Figure 2-29 : Composition moyenne des résidus de <i>Scenedesmus</i> sp. après extraction d'une fraction des protéines hydrosolubles	171
Figure 2-30 : Comparaison de la norme du module complexe en isochrone des différents extraits Soxhlet	173

Figure 2-31 : Comparaison de l'angle de phase en isochrone des différents extraits Soxhlet	174
Figure 2-32 : Evolution de la norme du module complexe en fonction de la teneur en algaenans	175
Figure 2-33 : Comparaison des duretés d'extraits Soxhlet avec celles de bitumes pétroliers	176
Figure 2-34 : Courbes de Black de trois fractions contenant des pourcentages progressifs en algaenans	177
Figure 2-35 : Courbes DSC de trois fractions contenant des pourcentages progressifs en algaenans et comparaison avec le comportement d'algaenans seuls	178
Figure 2-36 : Courbes de DSC d'acides gras libres de référence	179
Figure 2-37 : Courbes de DSC d'huiles végétales composées de triglycérides	179
Figure 3-1 : Système de liquéfaction hydrothermale de 50 mL (Parr Instrument Company)	193
Figure 3-2 : Système de liquéfaction hydrothermale de 1L fourni par SACMO	194
Figure 3-3 : Courbes DSC de liquéfaction hydrothermale	195
Figure 3-4 : Répétabilité de l'essai de liquéfaction hydrothermale en cellule DSC	196
Figure 3-5 : Photographies des différentes fractions obtenues par liquéfaction hydrothermale	197
Figure 3-6 : Comportement rhéologique de deux phases hydrophobes possédant des charges en résidus solides différentes	198
Figure 3-7 : Courbes de Black de deux phases hydrophobes possédant des charges en résidus solides différentes	199
Figure 3-8 : Photographies des différentes fractions obtenues par liquéfaction hydrothermale	203
Figure 3-9 : Evolution du rendement en résidus solides en fonction du rendement en bio-huile	206
Figure 3-10 : Exemple de spectre infrarouge des huiles de liquéfaction	209
Figure 3-11 : Exemple d'un chromatogramme d'une huile de liquéfaction	210
Figure 3-12 : Exemple d'un chromatogramme d'une phase aqueuse obtenue sur l'appareil de 50 mL	214
Figure 3-13 : Exemple de chromatogramme d'une fraction hydrophile obtenue sur le réacteur de 1 L	215
Figure 3-14 : Spectre d'émission X de la fraction inorganique des résidus solides	218
Figure 3-15 : Spectre infrarouge des résidus solides isolés par liquéfaction hydrothermale et comparaison avec le spectre du carbonate de calcium	219
Figure 3-16 : Evolution de la norme du module complexe en isochrone (1 Hz) des huiles de liquéfaction obtenues lors du plan d'expériences	223
Figure 3-17 : Evolution de de l'angle de phase en isochrone (1 Hz) des huiles de liquéfaction obtenues lors du plan d'expériences	223
Figure 3-18 : Evolution de la norme du module complexe en isochrone (1 Hz) des huiles de liquéfaction correspondant au point central du plan d'expériences	224
Figure 3-19 : Evolution de la norme de l'angle de phase en isochrone (1 Hz) des huiles correspondant au point central du plan d'expériences	225
Figure 3-20 : Comparaison des courbes de Black des huiles de liquéfaction correspondant au point central du plan d'expériences	225
Figure 3-21 : Comparaison du comportement des huiles de liquéfaction et de deux bitumes de référence	226
Figure 3-22 : Influence de la pression initiale en N <sub>2</sub> sur la norme du module complexe des huiles à 1 Hz	227

Figure 3-23 : Influence de la température de liquéfaction sur la norme du module complexe des huiles à 1 Hz	227
Figure 3-24 : Evolution des rendements de liquéfaction en fonction de la norme du module complexe à 1 Hz des huiles de liquéfaction	229
Figure 3-25 : Comparaison des chromatogrammes d'exclusion stérique des huiles de liquéfaction	230
Figure 3-26 : Exemple de courbes DSC d'une huile de liquéfaction	231
Figure 3-27 : Comparaison des comportements rhéologiques des huiles obtenues sur l'appareil de 50 mL et l'appareil de 300 mL	233
Figure 3-28 : Comparaison des propriétés rhéologiques (isochrones 1 Hz) de deux huiles de liquéfaction extraites au toluène, de l'huile obtenue par extraction au dichlorométhane des résidus solides obtenus après extraction au toluène, ainsi que d'une huile de liquéfaction extraite directement au toluène	236
Figure 3-29 : Comparaison des courbes de Black d'une huile de liquéfaction extraite au toluène et de l'huile extraite au $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ à partir des résidus solides après l'extraction au toluène	236
Figure 3-30 : Influence du taux de chargement du réacteur et de la température de liquéfaction sur les propriétés rhéologiques des phases hydrophobes	237
Figure 3-31 : Influence de la température de liquéfaction sur les courbes de Black à taux de chargement fixe	238
Figure 4-1 : Voies de répartition et de modification de la biomasse envisagées	249
Figure 4-2 : Caractérisation par RMN $^1\text{H}$ des extraits Soxhlet obtenus après prétraitement acide des microalgues	254
Figure 4-3 : Spectres RMN MAS $^{13}\text{C}$ HPDEC des fractions insolubles en milieu acide avec et sans les acides gras libres	255
Figure 4-4 : Spectre infrarouge de la fraction soluble dans HCl 10%, 48h	257
Figure 4-5 : Spectre infrarouge de l'acide alginique	257
Figure 4-6 : Spectres RMN MAS HPDEC des fractions solubles en milieu acide	258
Figure 4-7 : Chemin de dégradation des polysaccharides en milieu acide	259
Figure 5-1 : A gauche : Représentation schématique de la dépendance du déplacement chimique à l'orientation des cristallites ; à droite : forme des raies en RMN solide statique	275
Figure 5-2 : Représentation schématique de la rotation à l'angle magique	276
Figure 5-3 : Représentation schématique du MetraviB Dynamic Mechanical Analyser	277
Figure 5-4 : Calcimètre de Bernard	299
Figure 5-5 : Principe de l'émission atomique	300





# Table des tableaux

Tableau 1-I : Composition chimique du bitume	50
Tableau 1-II : Classement des bitumes selon leur grade	52
Tableau 1-III : Composition de certains liants végétaux industriels	62
Tableau 1-IV : Comparaison du coût des enrobés formulés avec différents liants	63
Tableau 1-V : Récapitulatif des liants routiers alternatifs non industriels	65
Tableau 1-VI : Structure de quelques polysaccharides retrouvés chez les microalgues	74
Tableau 1-VII : Principales familles de lipides retrouvées dans les microalgues	75
Tableau 1-VIII : Conditions d'obtention des meilleurs rendements d'extraction lipidique de microalgues	94
Tableau 1-IX : Avantages et inconvénients des différentes techniques d'extraction lipidique	95
Tableau 1-X : Comparaison des propriétés de l'eau dans différents états	100
Tableau 1-XI : Principaux produits obtenus lors de la liquéfaction hydrothermale du phytol	108
Tableau 1-XII : Distribution des produits de liquéfaction hydrothermale de bois en présence de différents catalyseurs	113
Tableau 1-XIII : Conditions d'obtention des meilleurs rendements en bio-huile sur des micro- et macro- algues	116
Tableau 2-I : Analyse immédiate de plusieurs espèces du genre <i>Scenedesmus</i>	134
Tableau 2-II : Comparaison des rendements, des écarts-type et des coefficients de variation pour des extractions en un tour ou en trois tours	136
Tableau 2-III : Attribution des signaux des acides gras libres en RMN <sup>1</sup> H	138
Tableau 2-IV : Acides gras identifiés dans <i>Scenedesmus</i> sp.	141
Tableau 2-V : Attribution des principaux signaux infrarouge des acides gras libres	142
Tableau 2-VI : Rendements d'extraction et de conversion en esters méthyliques des acides gras libres	145
Tableau 2-X : Récapitulatif des différents processus d'isolement des algaenans	149
Tableau 2-XII : Produits d'hydrolyse des algaenans de <i>Scenedesmus</i> sp. par RuO <sub>4</sub>	161
Tableau 2-XIII : Liste des monosaccharides de référence étudiés	165
Tableau 2-XIV : Teneurs massiques en algaenans des différents matériaux étudiés	172
Tableau 3-I Facteurs et niveaux du PCC	201
Tableau 3-II : Matrice d'expériences du PCC	202
Tableau 3-III : Rendements des différentes fractions de liquéfaction hydrothermale	204
Tableau 3-IV : Analyse de la répétabilité expérimentale	205
Tableau 3-V : Analyse statistique des rendements en bio-huile	206
Tableau 3-VI : Liste des composés provenant de la condensation de deux acides aminés	211
Tableau 3-VII : Structures des principaux acides aminés ayant réagi en liquéfaction hydrothermale	211
Tableau 3-VIII : Produits de liquéfaction divers	213
Tableau 3-IX : Molécules identifiées dans les phases aqueuses des réacteurs de 50 mL et 300 mL	214

<i>Tableau 3-X : Quelques exemples de structures de molécules identifiées dans les phases aqueuses de liquéfaction hydrothermale</i>	215
<i>Tableau 3-XI : Molécules identifiées dans la fraction aqueuse du réacteur de 1 L</i>	217
<i>Tableau 3-XII : Analyse élémentaire des résidus solides obtenus lors du plan d'expériences</i>	218
<i>Tableau 3-XIII : Distribution massique approximative (%) des différents éléments détectés par spectrométrie de fluorescence X</i>	219
<i>Tableau 3-XIV : Teneurs en carbonate de calcium déterminées par calcimétrie sur les résidus solides de liquéfaction hydrothermale</i>	220
<i>Tableau 3-XV : Composition des gaz de liquéfaction pour deux essais de liquéfaction</i>	221
<i>Tableau 3-XVI : Coefficients de corrélation entre la pression initiale de liquéfaction hydrothermale et la norme du module complexe des huiles</i>	228
<i>Tableau 3-XVII : Coefficients de corrélation entre la température de liquéfaction hydrothermale et la norme du module complexe des huiles</i>	228
<i>Tableau 3-XVIII : Coefficients de corrélation entre les rendements de liquéfaction en bio-huile et les propriétés rhéologiques de ces huiles</i>	229
<i>Tableau 3-XIX : Températures de fusion et de cristallisation des huiles de liquéfaction</i>	232
<i>Tableau 3-XX : Analyse statistique des résultats de DSC</i>	232
<i>Tableau 4-I : Rendements en phase soluble et en phase insoluble en fonction des différentes conditions opératoires</i>	250
<i>Tableau 4-II : Composition élémentaire des fractions insolubles en milieu acide et comparaison avec la biomasse</i>	251
<i>Tableau 4-III : Rendements d'extraction Soxhlet (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2 : 1, v/v) en fonction des conditions de prétraitement de la biomasse</i>	252
<i>Tableau 4-IV : Récapitulatif des conditions de liquéfaction testées sur la fraction insoluble en milieu acide</i>	261
<i>Tableau 4-V : Récapitulatif des conditions de liquéfaction testées sur la fraction insoluble en milieu acide débarrassée de ses acides gras</i>	261
<i>Tableau 4-VI : Récapitulatif des conditions de liquéfaction testées sur la fraction soluble en milieu acide</i>	263





# Table des symboles et abréviations

AcCl : Chlorure d'acyle

ACV : analyse de cycle de vie

B&D : Bligh and Dyer

BSA : bovine serum albumin

CPA : co-produits aqueux

DSC : calorimétrie différentielle à balayage

EDXS : Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy

FAMEs : Fatty Acids Methyl Esters = Esters méthyliques d'acides gras

GC-FID : chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse

MAS : rotation à l'angle magique

PCC : Plan Composite Centré

RMN : résonance magnétique nucléaire

TFA : acide trifluorique

$\nu$  : coefficient de Poisson

$\varphi$  : angle de phase

$\sigma$  : contrainte

$\sigma_a$  : amplitude de la contrainte

$\varepsilon$  : déformation

$\varepsilon_a$  : amplitude de la déformation

E : module en traction ou module de Young

$E'$  : module élastique

$E''$  : module visqueux

G : module en cisaillement ou module de Coulomb

$\eta$  : viscosité

$\dot{\varepsilon}(t)$  : vitesse de déformation

$T_c$  : température critique

$P_c$  : pression critique

p : probabilité critique



# Avertissement

L'avancement des différents essais présentés dans ce manuscrit ont été dépendants de la production de biomasse. Plusieurs lots de microalgues ont donc été utilisés.

Les différents lots utilisés sont présentés ci-dessous :

<b>Numéro lot</b>	<b>Numéro IFSTTAR</b>	<b>Conditionnement</b>
<u>1</u>	09148	Rétentat – Congelé
<u>2</u>	11012	Entières – Congelées
<u>3</u>	11013	Rétentat – Congelé
<u>4</u>	12013	Entières – Congelées
<u>5</u>	12027	Rétentat – Congelé
<u>6</u>	12033	Rétentat – Congelé
<u>7</u>	12144	Rétentat – Extrudé
<u>8</u>	13041	Rétentat - Congelé
<u>9</u>	-	Rétentat - Extrudé

Deux types de biomasses ont été utilisés :

- microalgues entières isolées par centrifugation ;
- résidus de microalgues, obtenus après extraction des protéines hydrosolubles par macération puis centrifugation.

De plus, à sa réception, la biomasse peut se présenter sous plusieurs formes :

- pâte congelée, contenant approximativement 80% d'eau, qui sera par la suite lyophilisée au laboratoire ;
- microalgues sèches extrudées.



# **Introduction générale**



Le bitume est un produit d'origine naturelle, issu de la distillation du pétrole. Dans le domaine des infrastructures de transport, il est utilisé afin d'assurer la cohésion de granulats, et d'ainsi former des matériaux enrobés.

Les couches supérieures des chaussées sont généralement constituées de ces matériaux, communément appelés enrobés bitumineux. Ils sont en majorité fabriqués à partir d'un bitume chauffé à des températures comprises entre 160 °C et 180 °C : ce sont des enrobés dits « à chaud ». Depuis plusieurs années, de nouvelles techniques d'enrobage sont encouragées, dans le but d'économiser l'énergie, mais également les matières premières :

- fabrication d'enrobés dits « tièdes », pour lesquels un additif est ajouté au bitume afin de fluidifier le mélange granulaire et ainsi d'abaisser les températures d'enrobage d'au moins 25 °C par rapport à un enrobé à chaud ;
- fabrication d'enrobés dits « à froid », pour lesquels le bitume est utilisé en émulsion dans une phase aqueuse. Ces émulsions se présentent donc sous forme liquide aux températures d'usage, permettant un enrobage des granulats à froid. En 2008, en France, près de trois millions de tonnes de bitume ont été utilisées dans l'industrie routière. Plus de 30% d'entre elles ont été formulées sous forme d'émulsions de bitume ; [1]
- fabrication d'enrobés recyclés : ce mode de fabrication permet d'économiser des matières premières, par recyclage des granulats et des liants bitumineux issus de chaussées en fin de vie. En 2008, près de 78% des 9,3 millions de tonnes de déchets d'enrobés bitumineux ont été recyclées. [2]

Néanmoins, si ces techniques permettent d'abaisser le coût environnemental de production des enrobés bitumineux, et de diminuer la consommation en matières premières, il n'en reste pas moins que le pétrole est une ressource fossile, dont la raréfaction n'est plus à démontrer. Ainsi, afin de participer à une transition vers une économie basée sur une filière biosourcée, la recherche de nouvelles sources de matériaux routiers est donc primordiale.

C'est dans ce contexte que le projet « Post-Oil Pavement » a été développé au sein de l'IFSTTAR, Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux. Ce projet présente deux objectifs principaux : d'une part identifier et caractériser des matériaux viscoélastiques capables de se substituer aux liants bitumineux (caractérisation de liants végétaux actuellement commercialisés, mais également

évaluation du potentiel de nouvelles biomasses), et d'autre part identifier des solutions à empreinte carbone réduite dans le domaine des matériaux hydrauliques.

De nombreux liants végétaux sont d'ores et déjà actuellement commercialisés et mis en œuvre sur divers chantiers (Végécol<sup>®</sup> de Colas, [3] Biophalt<sup>®</sup> d'Eiffage, [4] ou encore Floraphalt<sup>®</sup> de Shell [5]). Ceux-ci sont généralement composés d'une résine végétale naturelle ou modifiée, additionnée d'une huile végétale (*e.g.* huile de colza). Néanmoins, le fait qu'une huile alimentaire entre comme élément majoritaire dans la composition du liant limite fortement l'impact positif apporté par l'utilisation de ressources non fossiles.

C'est pourquoi il est intéressant d'identifier de nouvelles ressources pouvant permettre d'obtenir un liant routier, tout en n'entrant pas en concurrence avec des usages plus nobles de la biomasse, comme la nutrition humaine ou l'énergie.

Dans ce cadre, les microalgues semblent constituer une biomasse d'avenir. Très étudiée actuellement dans le domaine des biocarburants dits de troisième génération, que ce soit pour produire du biodiesel, du bioéthanol, ou encore du biogaz, [6], [7], [8], [9] leur utilisation n'entre pas en compétition avec un usage alimentaire puisqu'elles peuvent être cultivées sur des terres non arables.

Cependant, le coût de production des biocarburants algaux reste à l'heure actuelle trop élevé, et le potentiel énergétique trop faible par rapport aux coûts énergétiques de production et de récolte de la biomasse. [10] A elle seule, la voie énergétique de valorisation des microalgues ne semble pas être rentable. Une voie de valorisation des fractions non utilisables dans le domaine énergétique demande à être identifiée.

C'est pourquoi une « algo-raffinerie » pourrait constituer une réponse crédible à la problématique de valorisation globale des microalgues.

C'est dans ce contexte qu'est né le projet Algoroute, dans lequel cette thèse s'inscrit. Le but de ce projet est d'obtenir, à partir de sous-produits de l'industrie des microalgues, un liant présentant des propriétés physicochimiques spécifiques :

- une viscosité faible aux températures de mise en œuvre, afin d'assurer un enrobage optimal des granulats ;
- une rigidité suffisamment élevée aux températures d'usage afin d'assurer la cohésion de l'enrobé ;

- des propriétés viscoélastiques telles que les contraintes de dilatation et de contraction engendrées au passage des véhicules lourds puissent être relaxées.

La démarche adoptée dans le projet Algoroute est donc la suivante :

- caractérisation de la biomasse ;
- évaluation de méthodes d'obtention d'un matériau viscoélastique ;
- caractérisation chimique et rhéologique des différents liants obtenus ;
- fabrication et caractérisation mécanique de matériaux enrobés conçus à partir de ces liants.

Ce manuscrit va s'articuler plus précisément autour des trois premiers points. Après quelques rappels bibliographiques relatifs au bitume et aux microalgues dans un premier chapitre, le deuxième chapitre sera consacré à la caractérisation de l'espèce de microalgues étudiée, ainsi qu'au potentiel rhéologique de sa fraction lipidique. Dans un troisième chapitre seront présentés les résultats relatifs à la transformation thermochimique de la biomasse. Enfin, le quatrième chapitre sera consacré à l'évaluation de l'intérêt d'un traitement acide sur les microalgues en amont des procédés d'obtention des liants.

## Bibliographie

- [1] International Bitumen Emulsion Federation, Site internet consulté le 05.08.13 et disponible à l'adresse : <http://www.ibef.net/fr>, **2013**.
- [2] Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, *254 millions de tonnes de déchets produits par l'activité de construction en France en 2008*, Site internet consulté le 05.08.13 et disponible à l'adresse : <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Chiffres-et-statistiques,13117.html>.
- [3] Colas, *Liant de nature végétale pour la réalisation de matériaux pour le bâtiment et/ou les travaux publics*, EP1466878(A1), **2004**.
- [4] Eiffage, *Composition comprenant une fraction organique pour la réalisation d'une couche et/ou d'un revêtement de voie ou de bâtiment*, FR2915204(A1), **2007**.
- [5] Shell, *Binder composition and asphalt mixture*, WO2010128105 (A1), **2010**.
- [6] S. S. Oncel. Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2013**, 26, 241 – 264.
- [7] A. Ahmad, N. M. Yasin, C. Derek, J. Lim. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2011**, 15, 584 – 593.
- [8] R. P. John, G. Anisha, K. M. Nampoothiri, A. Pandey. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology* **2011**, 102, 186 – 193.
- [9] D. Beneroso, J. Bermudez, A. Arenillas, J. Menéndez. Microwave pyrolysis of microalgae for high syngas production. *Bioresource Technology* **2013**, doi : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.102>.
- [10] L. F. Razon, R. R. Tan. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. *Applied Energy* **2011**, 88, 3507 – 3514.





# **Chapitre 1**

## **État de l'art**



## Introduction

L'objectif de ce premier chapitre est d'apporter quelques éléments bibliographiques permettant de mieux appréhender la problématique des liants routiers alternatifs. Pour ce faire, la première partie traite des bitumes issus de la pétrochimie, de leurs compositions chimiques et de leurs propriétés mécaniques. Une étude exhaustive des matériaux alternatifs aux liants bitumineux est présentée, mettant en avant la nécessité de trouver de nouveaux liants biosourcés pouvant se substituer aux bitumes. Dans ce domaine, la biomasse de troisième génération que constituent les microalgues pourraient présenter un attrait tout particulier. La deuxième partie est donc constituée d'une étude bibliographique approfondie sur cette biomasse, notamment concernant sa composition et ses différentes applications. Cette étude doit permettre d'identifier les différentes fractions d'intérêt, mais aussi d'évaluer les sources de conflits possibles entre les différentes utilisations. Enfin, étant donnée la nécessité, pour l'application visée, d'obtenir un matériau thermosusceptible et hydrophobe, les deux dernières parties sont consacrées à une étude bibliographique de deux voies permettant d'accéder à une huile à partir de microalgues : l'extraction lipidique et la liquéfaction hydrothermale.

## I – Liants routiers bitumineux et biosourcés

A l'état naturel, le bitume se trouve sous forme d'asphaltes (aussi appelés sables bitumineux). Il s'agit d'un mélange de sable et d'argile minérale (80 à 85%), d'eau (5%), et de pétrole (10 à 15%), dont les éléments les plus légers ont été éliminés naturellement au cours du temps. Les plus grands gisements de bitume naturel sont situés sur l'île de Trinidad, dans la mer des Antilles, et à Alberta, au Canada.

Depuis l'Antiquité, l'Homme a mis à profit les propriétés hydrophobes de ce bitume naturel (connu sous le nom d' « asphaltos » chez les Grecs, et sous le nom de « bitumen » chez les Romains), pour assurer l'étanchéité de citernes, de canaux d'irrigation ou encore d'embarcations, pour le jointement de blocs de pierres, mais aussi dans des domaines artistiques, comme par exemple pour la réalisation de statuettes (Figure 1-1). Il a également été très tôt utilisé dans le domaine de la construction routière puisque des traces datant du 7<sup>ème</sup> siècle avant J.-C. ont été retrouvées sur le site de l'ancienne Babylone.

Cependant, l'emploi du bitume dans ce domaine s'est principalement développé à partir de la seconde moitié du 19<sup>ème</sup> siècle, comme outil de lutte contre la poussière engendrée par la circulation sur les chaussées en macadam (technique d'empierrement des chaussées, par dépôt de couches successives de granulométries décroissantes). En 1852, le chimiste belge Edmund J. DeSmedt réalisa la première chaussée revêtue de bitume naturel aux abords de Perpignan. Plus tard, en 1870 dans le New Jersey, puis en 1872, à Washington D.C., les premiers chantiers d'enrobés bitumineux (constitués, de manière simplifiée, de 5% en poids de liant bitumineux et de 95% en poids de granulats) furent mis en place. A la fin de la 2<sup>nde</sup> guerre mondiale, le bitume remplaça définitivement le goudron de houille, hautement cancérigène du fait de ses hautes teneurs en hydrocarbures aromatiques polycycliques.



Figure 1-1 : Lion sculpté dans le mastic de bitume découvert à Suse (3ème millénaire avant J.-C.)

L'objectif du premier paragraphe est de présenter ce matériau particulier qu'est le bitume, ainsi que ses propriétés physico-chimiques et mécaniques. Dans le second paragraphe, les différentes alternatives à son utilisation existant à ce jour seront exposées.

### 1) Les liants bitumineux

L'exploitation des bitumes naturels étant complexe, ils sont peu valorisés à l'heure actuelle (la production mondiale ne dépasse pas 200 000 tonnes par an). Aujourd'hui, le bitume est un produit majoritairement issu de l'industrie pétrolière. Fraction lourde du pétrole, obtenue après distillation des fractions légères (Gaz de Pétrole Liquéfié (GPL), essence ou encore diesel), il est constitué d'un continuum d'espèces chimiques, se présentant sous la forme d'un solide ou semi-solide à température ambiante, de couleur noire. Il est caractérisé par une très forte susceptibilité thermique (liquide au-dessus de 80 °C), des propriétés viscoélastiques très spécifiques et d'excellentes propriétés d'adhésivité sur des surfaces variées (pierre, béton, bois, verre, métal). Enfin, ses propriétés d'hydrophobicité en font un matériau de choix pour la réalisation d'étanchéités de surfaces, et surtout pour la construction

routière. En effet, en France, 90% des bitumes sont destinés à cette application (ce qui représentait plus de trois millions de tonnes en 2006), et 95% du réseau routier français est constitué de matériaux bitumineux.

#### *a- Le pétrole*

Le pétrole est une huile naturelle issue de la transformation thermochimique anaérobie de la matière organique animale et végétale ayant sédimenté dans le fond des océans. En effet, au fil du temps, des couches de sédiments ont recouvert cette matière organique et ont exercé sur elle des pressions élevées. Cet effet, combiné à celui de la température (entre 80 °C et 120 °C) a donné naissance à une « roche-mère ». Cette « roche-mère », lorsqu'elle est soumise à une pression suffisamment élevée, se fracture en libérant son contenu : le pétrole.

#### *b- Origine du bitume*

La majorité des bitumes utilisés actuellement provient du raffinage de certains pétroles, appelés « bruts à bitumes », représentant 10% des 1300 bruts référencés dans le monde. Ces « bruts à bitumes » proviennent généralement du Moyen-Orient, du Venezuela ou encore du Mexique. Plusieurs procédés d'isolement des bitumes existent (Figure 1-2), leur conférant chacun des structures et propriétés différentes :

- la distillation atmosphérique : il s'agit de la première étape de raffinage du pétrole. Elle permet de séparer le pétrole en coupes d'hydrocarbures, en fonction de leur point d'ébullition, jusqu'à des températures de l'ordre de 350 °C. Sont ainsi obtenus du gaz (<35 °C), de l'essence lourde (35-175 °C), du kérosène (175-235 °C), du gasoil léger et lourd (235-350 °C), et du fioul lourd, correspondant au résidu de fond de cuve, aussi appelé résidu atmosphérique ou brut réduit ;
- la distillation sous vide : elle permet de fractionner le résidu atmosphérique. Les pressions sont réduites (de l'ordre de quelques hectopascals), ce qui permet de réaliser des distillations à des températures similaires à celles appliquées en distillation atmosphérique, tout en empêchant une dégradation thermique des différentes fractions. En fonction du brut utilisé, et des conditions de fonctionnement de la colonne (température et pression), il est possible d'obtenir en fond de cuve un bitume dit de « distillation directe ». Les caractéristiques du bitume de distillation directe sont dépendantes du brut utilisé. Lorsque ce type de procédé est mis en place, les bitumes

de duretés intermédiaires sont obtenus par mélange d'un bitume de distillation directe mou et d'un bitume de distillation directe dur ;

- le soufflage : lorsque les bitumes issus de la distillation sous vide ne sont pas suffisamment durs pour une application industrielle, le résidu est engagé dans un processus de soufflage. Ce procédé permet de modifier les propriétés des bitumes, par insufflation d'air dans le résidu porté à 280 °C en moyenne. Se produisent alors des réactions de déshydrogénation, de craquage, d'oxydation et de condensation entre les différentes fractions du bitume, amenant à un bitume plus dur, qui sera principalement utilisé comme produit d'étanchéité dans le bâtiment ;
- le désasphaltage : le résidu issu de la distillation sous vide peut également subir un processus de désasphaltage. Il s'agit d'un procédé d'extraction par solvant, appliqué aux « bruts à huiles » et non plus aux « bruts à bitumes », permettant d'éliminer les hydrocarbures les plus légers et générant une huile désasphaltée et du bitume. Selon le solvant utilisé (propane ou butane principalement), différentes classes de bitumes peuvent être obtenues.

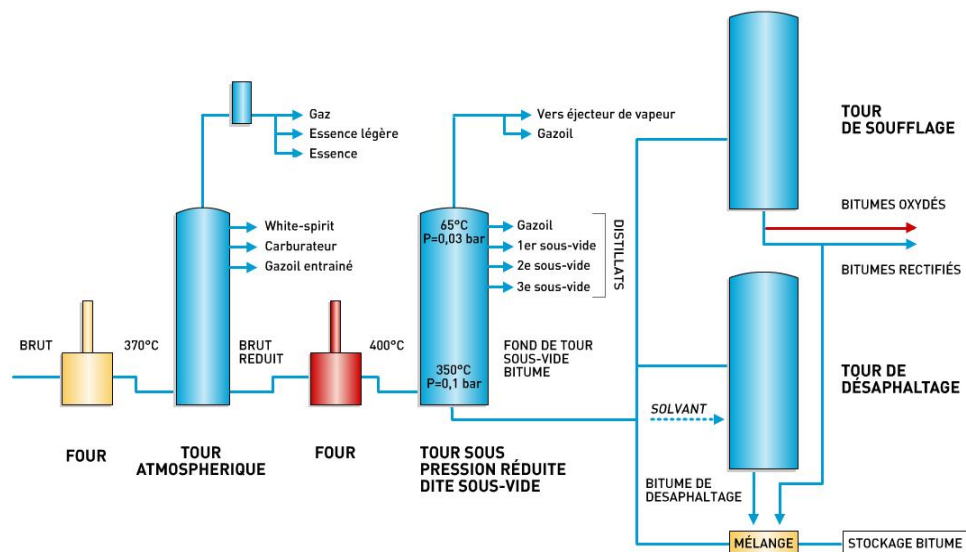


Figure 1-2 : Représentation schématique du processus de raffinage du pétrole [1]

Une fois les processus de distillation terminés, d'autres modifications peuvent être appliquées aux bitumes, dans le but de modifier leurs propriétés rhéologiques (bitumes modifiés par des polymères) ou encore de faciliter leur stockage et abaisser leur température de mise en œuvre (bitumes fluxés et bitumes fluidifiés respectivement). Classiquement, les bitumes sont classés selon le diagramme suivant (Figure 1-3), selon la norme NF EN 12597 : [2]

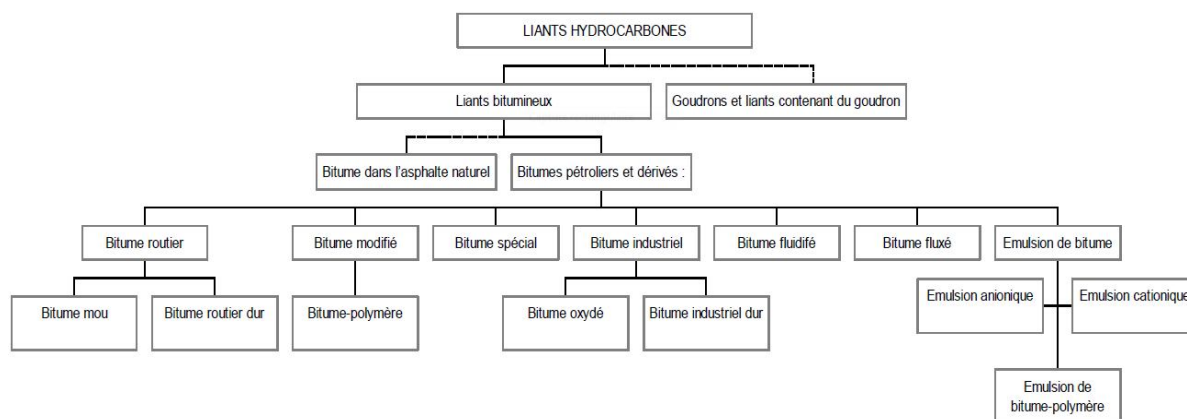


Figure 1-3 : Classement général des bitumes [2]

### c- Caractérisation chimique

D'un point de vue chimique, le bitume est un mélange essentiellement hydrocarboné. En effet, l'analyse élémentaire met en évidence la présence majoritaire de carbone (79 à 88%) et d'hydrogène (7 à 13%). Sont également présents, mais en plus faibles proportions, de l'azote (0 à 3%), du soufre (0 à 8%) et de l'oxygène (2 à 8%). Enfin, des métaux peuvent également être retrouvés sous forme de traces, notamment du vanadium (10 à 2000 ppm) et du nickel (10 à 150 ppm). [3]

Le bitume est en réalité un continuum de molécules chimiques, difficilement identifiables une à une. En pratique, pour simplifier sa caractérisation, il est fractionné en deux groupes : les maltènes (solubles dans le n-heptane) et les asphaltènes (insolubles dans le n-heptane).

Les maltènes sont subdivisés en trois familles :

- les saturés (Figure 1-4) : cette famille regroupe les composés les plus légers du bitume (leur masse molaire est comprise entre 300 et 1000 g/mol). Il s'agit d'alcane linéaires ou cycliques, plus ou moins ramifiés, représentant généralement moins de 10% de la masse du bitume ;

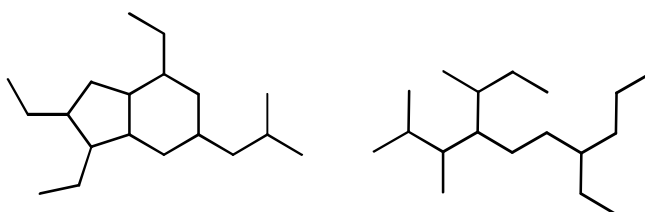


Figure 1-4 : Exemple de constituants de la fraction « saturés » des maltènes [4]

- les aromatiques (Figure 1-5) : il s'agit de la fraction la plus importante du bitume en terme de masse (50 à 70%), qui possède la plus grande influence sur la transition vitreuse du bitume. Ils présentent une masse molaire à peine plus élevée que celle des saturés (300 à 2000 g/mol). Contrairement à la fraction précédente, ceux-ci contiennent des cycles aromatiques, et peuvent également contenir des hétéroatomes ;

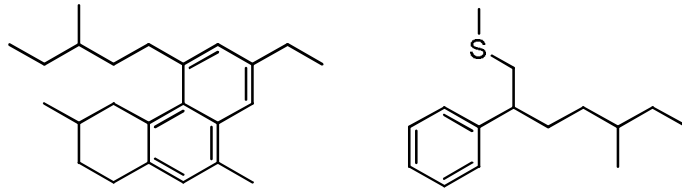


Figure 1-5 : Exemple de de constituants de la fraction « aromatiques » des maltènes [4]

- les résines (Figure 1-6) : leur structure est similaire à celle de la fraction aromatique, mais elles présentent un degré de condensation plus élevé. Les masses molaires sont par conséquent plus élevées (500 à 5000 g/mol). Cette fraction représente environ 10% de la masse du bitume ;

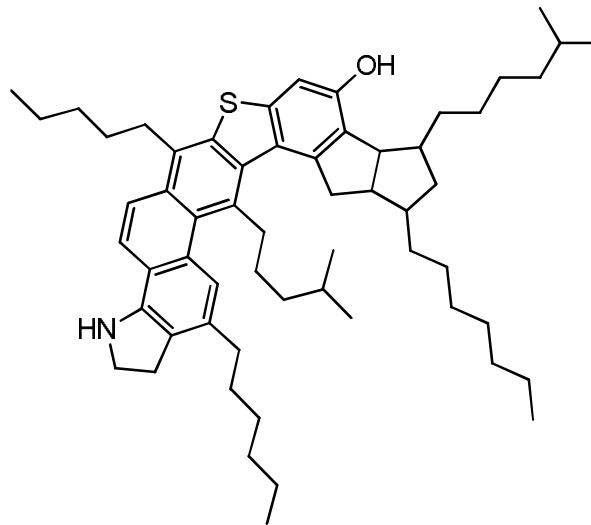


Figure 1-6 : Exemple de constituants de la fraction « résines » des maltènes [4]

La deuxième famille des composés du bitume est donc constituée par les asphaltènes. Il s'agit de la fraction la plus lourde du bitume (masse molaire allant de 600 à 300 000 g/mol), représentant de 10 à 20% de la masse de ce dernier. A température ambiante, ils se présentent sous la forme d'un solide noir, cassant, possédant un point de ramollissement très élevé. La teneur en asphaltènes d'un bitume est un paramètre clé pour la caractérisation de celui-ci, car elle va directement influencer sa dureté. Leur structure n'est pas clairement élucidée à ce jour,

et est probablement dépendante du brut étudié. Plusieurs modèles sont cependant proposés dans la littérature (Figure 1-7).

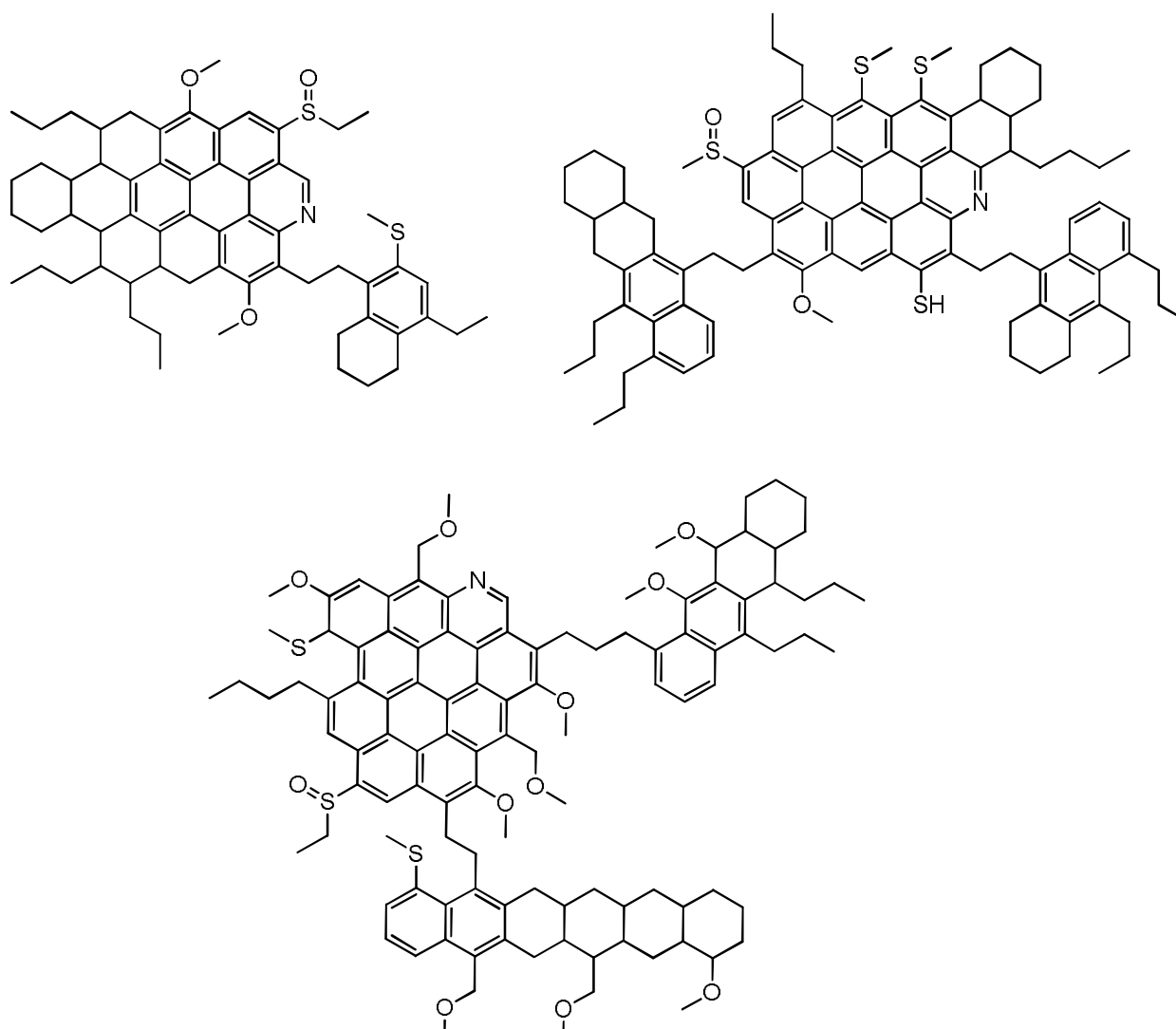


Figure 1-7 : Exemple de constituants supposés d'asphaltènes isolés à partir de trois bruts iraniens [5]

Ces quatre fractions SARA (Saturés, Aromatiques, Résines, Asphaltènes) peuvent être séparées selon leur solubilité dans des solvants de polarité et aromaticité croissantes (Tableau 1-I). Les asphaltènes sont obtenus par précipitation dans le n-heptane. Les maltènes sont ensuite fractionnés en saturés, aromatiques et résines par chromatographie d'adsorption sur alumine, en fonction de leur solubilité dans le n-heptane, le toluène (en remplacement du benzène utilisé historiquement) et un mélange toluène : méthanol (1 :1, v/v) (en remplacement du mélange méthanol : benzène : trichloréthylène - 1 :1 :1, v/v/v - utilisé historiquement) respectivement. [6]

Tableau 1-I : Composition chimique du bitume

Fraction du bitume	Solubilité	Pourcentage	Masse molaire (g/mol)
Saturés	Solubles dans le n-heptane	< 10%	300 à 1000
Aromatiques	Solubles dans le toluène	50 à 70%	300 à 2000
Résines	Soluble dans le toluène/méthanol	10%	500 à 5000
Asphaltènes	Insolubles dans le n-heptane	10 à 20 %	600 à 300 000

En 1924, Nellensteyn fut le premier à émettre l'hypothèse de la formation de suspensions colloïdales d'asphaltènes au sein d'une matrice malténique dans les bitumes. [7] En effet, au sens strict du terme, les asphaltènes ne sont pas solubles dans les huiles (saturés et aromatiques) qui constituent le bitume. Néanmoins, les résines, possédant une structure chimique intermédiaire entre les huiles et les asphaltènes, créent une couche de solvation (aussi appelée couche peptisante dans la littérature) autour de ces derniers en s'adsorbant à leur surface, les empêchant ainsi de précipiter. Ce modèle colloïdal a permis d'expliquer les différences de comportements rhéologiques des bitumes. Selon l'organisation moléculaire des espèces chimiques présentes, et leurs pourcentages relatifs, trois types de structure de bitume peuvent être identifiés : la structure dite « sol », la structure dite « gel » ou la structure intermédiaire dite « sol-gel » [8] (Figure 1-8) :

- structure « sol » : dans cette structure, les micelles d'asphaltènes sont dispersées au sein de la phase huileuse malténique, et n'interagissent pas entre elles. Le bitume présente alors un comportement d'un fluide quasi-newtonien ;
- structure « gel » : à l'inverse, dans la structure « gel », les micelles d'asphaltènes interagissent très fortement entre elles, assurant la cohésion du milieu. Cette structure est caractéristique des bitumes soufflés, qui sont très rigides et présentent un comportement nettement non-newtonien ;
- structure « sol-gel » : il s'agit d'une structure intermédiaire entre les deux structures précédentes, que possèdent la majorité des bitumes. Le milieu est plus structuré qu'un milieu « sol » mais reste moins bien structuré qu'un milieu « gel ».

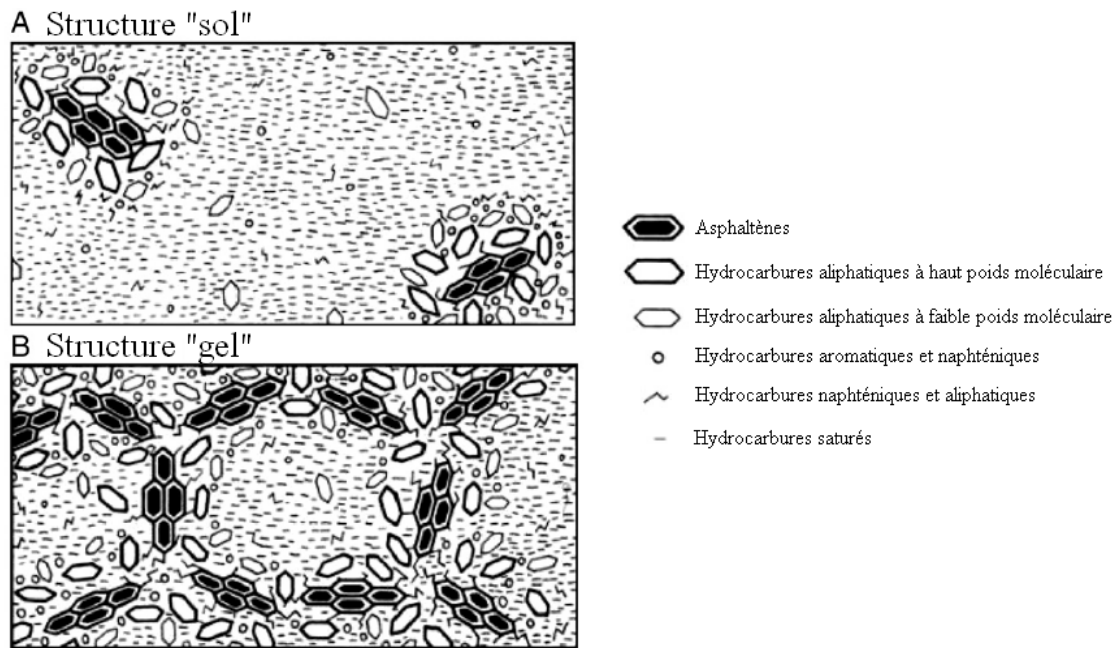


Figure 1-8 : Représentation schématique des deux structures extrêmes du bitume [9]

#### d- Caractérisation physique et rhéologique

Un bitume doit répondre à plusieurs exigences concernant ses propriétés physiques et mécaniques. D'une part, il doit être assez rigide aux températures d'usage afin d'assurer la cohésion de l'enrobé et limiter les phénomènes d'orniérages par fluage (apparition de déformations permanentes longitudinales sous le passage répété des véhicules). Mais il doit également présenter une viscosité suffisamment faible à haute température, lors de la mise en œuvre, afin de pouvoir le pomper et le manier aisément, mais aussi d'assurer un enrobage optimal des granulats. Enfin, ses propriétés viscoélastiques doivent être telles que le matériau puisse relaxer les contraintes issues des cycles de dilatation/contraction au passage de véhicules et lors des changements de températures. De bonnes propriétés viscoélastiques permettent ainsi à l'enrobé de résister à la fissuration par fatigue ou par retrait thermique. [10] De manière générale, toutes ces propriétés sont difficilement compatibles. Dès lors, il est important de pouvoir caractériser les bitumes en amont de la fabrication de l'enrobé, afin de sélectionner celui qui permettra à l'enrobé de présenter des performances optimales face aux conditions (climatiques, de trafic...) auxquelles sera soumise la chaussée.

#### ➤ Mesures de consistance

Deux tests normalisés sont généralement utilisés pour caractériser les bitumes du point de vue de leur consistance. Les bitumes seront classés selon les réponses à ces tests :

- pénétrabilité à l'aiguille (NF EN 1426) [11] : la pénétrabilité représente la profondeur à laquelle une aiguille va s'enfoncer dans un bitume, à une température donnée et sous un chargement défini pendant cinq secondes. Les tests sont généralement réalisés à 25 °C sous un chargement de 100 g. Ainsi, plus la pénétrabilité (exprimée en 1/10 de mm) d'un bitume est élevée, plus celui est mou.
- température Bille-Anneau (NF EN 1427) [12] : les bitumes, constitués d'un continuum d'espèces chimiques, ne possèdent pas de température de fusion. Il est néanmoins possible de déterminer une température de ramollissement. Cette température est déterminée par le test de température bille-anneau, en déterminant la température à laquelle une bille en acier (3,5 g et 9,5 mm de diamètre) s'enfonce de 25 mm dans un disque de bitume soumis à une rampe de chauffe de 5 °C/min.

Les différents grades de bitumes, pouvant être définis suite à ces deux tests, sont présentés dans le Tableau 1-II : [13]

**Tableau 1-II : Classement des bitumes selon leur grade**  
(les pénétrabilités à 25 °C sont données en 1/10 de mm, les températures Bille-Anneau en °C)

Propriété	Grade								
	20/30	30/45	35/50	40/60	50/70	70/100	100/150	160/220	250/330
<b>Pénétrabilité à 25 °C</b>	20-30	30-45	35-50	40-60	50-70	70-100	100-150	160-220	250-330
<b>Température Bille-Anneau</b>	55-63	52-60	50-58	48-56	46-54	43-51	39-47	35-43	30-38

Ces tests classiques ne permettent pas de déterminer des propriétés intrinsèques d'un bitume, mais des réponses sous des conditions de température et de chargement précises. Malgré tout, ils permettent de donner une indication sur sa thermosusceptibilité, et donc sur les conditions dans lesquelles il pourra être utilisé.

➤ Mesures rhéologiques

Il est également possible d'étudier parallèlement les propriétés rhéologiques des bitumes, c'est-à-dire leur écoulement et leur déformation sous l'effet d'une contrainte, pour des

conditions de température et de chargement variées. En effet, les bitumes sont des corps complexes, présentant à la fois des propriétés visqueuses et des propriétés élastiques, variant selon la température et la fréquence de la sollicitation à laquelle ils sont soumis. Ces mesures consistent donc à étudier la déformation d'un bitume sous l'influence d'une contrainte, sur des plages prédéfinies de température et de fréquence. Si en pratique plusieurs essais peuvent être mis en place, le plus couramment utilisé est l'essai à sollicitation sinusoïdale, permettant d'accéder à la mesure du module complexe.

Un matériau idéal élastique isotrope, soumis à une force de traction, répond à la loi de Hooke :

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (1)$$

La déformation  $\varepsilon$  est proportionnelle à la contrainte  $\sigma$  appliquée. Le coefficient de proportionnalité  $E$  est appelé module de Young, ou module dynamique, et représente une caractéristique intrinsèque du matériau étudié.

Pour ce même matériau il est possible de déterminer le module de Coulomb, ou module de cisaillement  $G$  :

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (2)$$

Ce module  $G$  peut aisément être relié au module de rigidité  $E$ , *via* le coefficient de Poisson  $\nu$  selon l'équation suivante :

$$G = \frac{E}{2(1+\nu)} \quad (3)$$

Pour un matériau visqueux newtonien, la contrainte n'est plus reliée à la déformation, mais à la vitesse de déformation  $\dot{\gamma}(t)$ , selon la loi de Newton :

$$\tau(t) = \eta \dot{\gamma}(t) \quad (4)$$

Où  $\eta$  représente la viscosité du milieu.

La viscosité et le module de cisaillement sont alors reliés par la loi suivante :

$$G = \omega\eta \quad (5)$$

Où  $\omega$  est la fréquence d'essai en rad/s.

Les corps viscoélastiques, comme le bitume, présentent un comportement intermédiaire entre ces deux matériaux idéaux. Le rapport entre la contrainte et la déformation n'est plus une constante (il dépend notamment du temps de charge). Si une déformation sinusoïdale est appliquée à une éprouvette de bitume, la réponse en contrainte est également une sinusoïde, déphasée d'un angle  $\varphi$  (pour de petites déformations) (Figure 1-9).

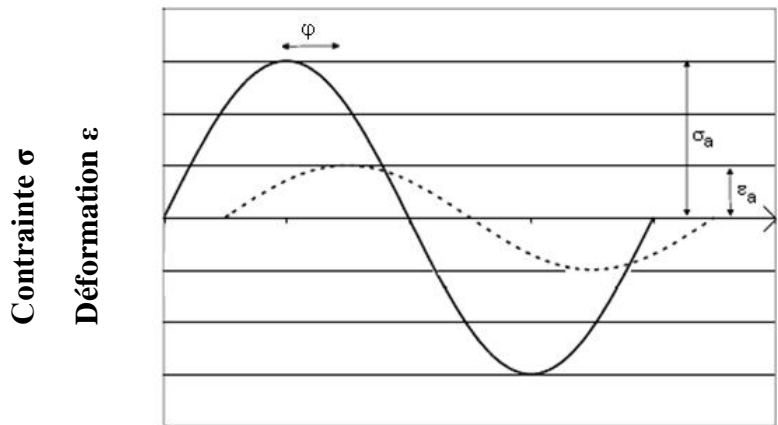


Figure 1-9 : Déformation sinusoïdale  $\varepsilon$  en réponse à une contrainte sinusoïdale  $\sigma$  appliquée à un matériau viscoélastique

Le module complexe  $E^*$  est alors défini comme étant le rapport entre la contrainte et la déformation exprimées sous forme complexe :

$$E^* = \frac{\sigma^*}{\varepsilon^*} = \frac{\sigma_a}{\varepsilon_a} e^{i\varphi} = E' + iE'' \quad (6)$$

Où  $\varphi$ , appelé angle de phase, correspond au déphasage entre la contrainte et la déformation,  $\sigma_a$  et  $\varepsilon_a$  aux amplitudes respectives des contraintes et déformations,  $E'$  et  $E''$  aux composantes élastique (module de conservation) et visqueuse (module de perte) du matériau.

Aux basses températures et fréquences élevées, le bitume se comporte comme un matériau élastique : la déformation est proportionnelle à la charge appliquée, et simultanée à la contrainte (l'angle de phase est nul). De plus, si celle-ci est annulée suffisamment rapidement, le retour à l'état initial est total. A l'opposé, aux températures élevées et faibles vitesses de sollicitation, le bitume se comporte comme un liquide newtonien. Le retard de la réponse à la

contrainte sera maximal (l'angle de phase vaut alors  $90^\circ$ ). Le matériau subira une déformation rémanente, même si la charge est annulée rapidement (le module de perte est non nul). Dans les situations intermédiaires, le bitume présente des propriétés combinées des solides élastiques idéaux et des liquides visqueux idéaux, dépendantes de la vitesse et du temps de chargement auquel ils sont soumis.

Plusieurs représentations du comportement rhéologique des bitumes sont communément employées :

- les isothermes représentent l'évolution, pour chaque température, de la norme du module complexe  $|E^*|$  et de l'angle de phase  $\phi$  en fonction de la fréquence de la sollicitation. Elles permettent de visualiser la susceptibilité cinétique du matériau (Figure 1-10) ;
- les isochrones représentent l'évolution, pour chaque fréquence de sollicitation, de la norme du module complexe et de l'angle de phase en fonction de la température. Elles permettent de visualiser la susceptibilité thermique du matériau (Figure 1-11) ;
- les courbes de Black représentent l'évolution de l'angle de phase en fonction de la norme du module complexe, pour chaque couple (fréquence ; température) testé. La continuité des isothermes peut être interprétée en termes de stabilité physico-chimique de la structure du bitume. Ces courbes peuvent permettre de discriminer, par exemple, la présence ou non de polymère dans un bitume, *via* la présence d'un plafonnement de l'angle de phase (Figure 1-12).

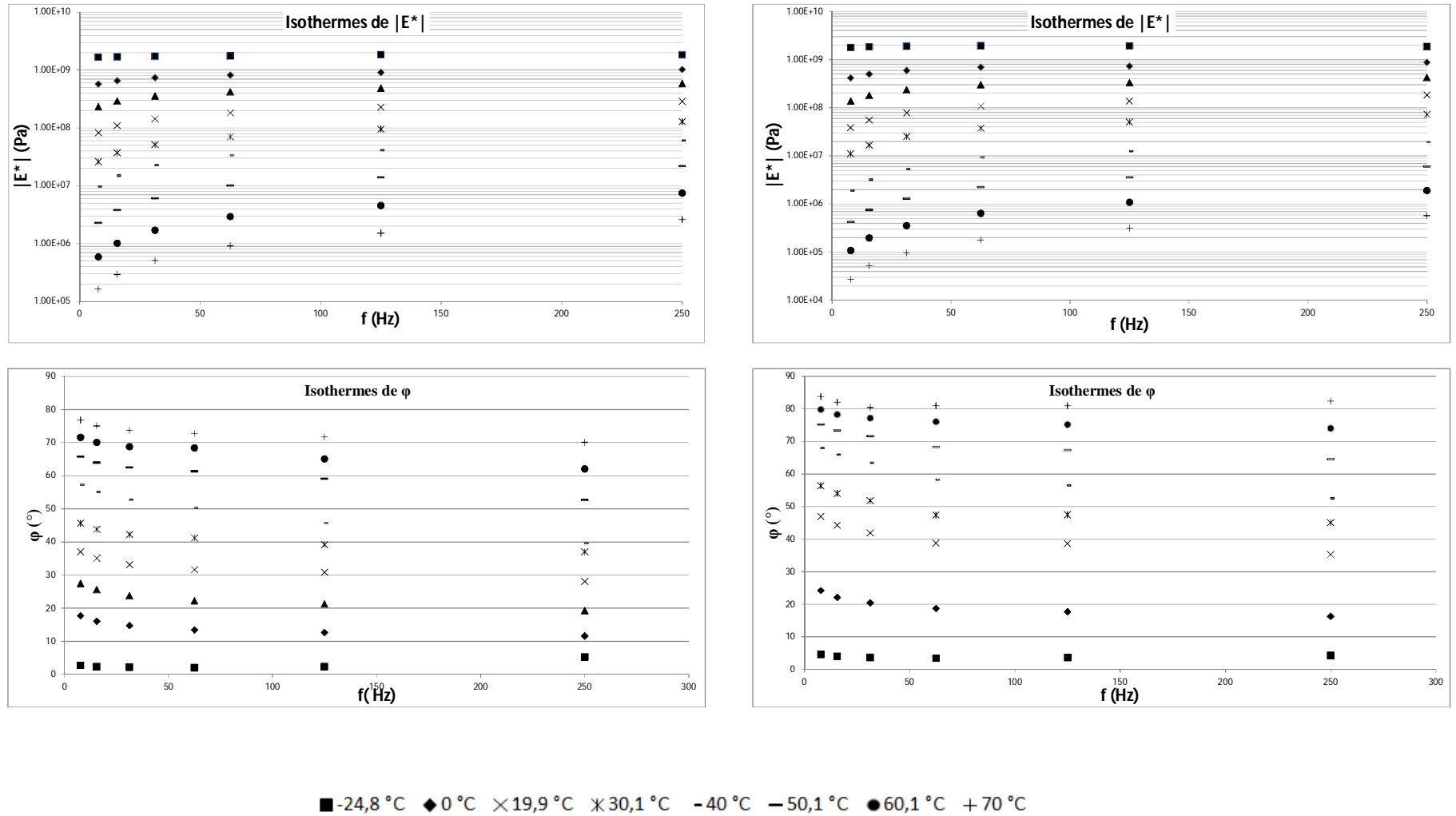


Figure 1-10 : Comparaison des isothermes d'un bitume 20/30 (à gauche) et d'un bitume 50/70 (à droite) en termes de norme de module complexe (en haut) et d'angle de phase (en bas)

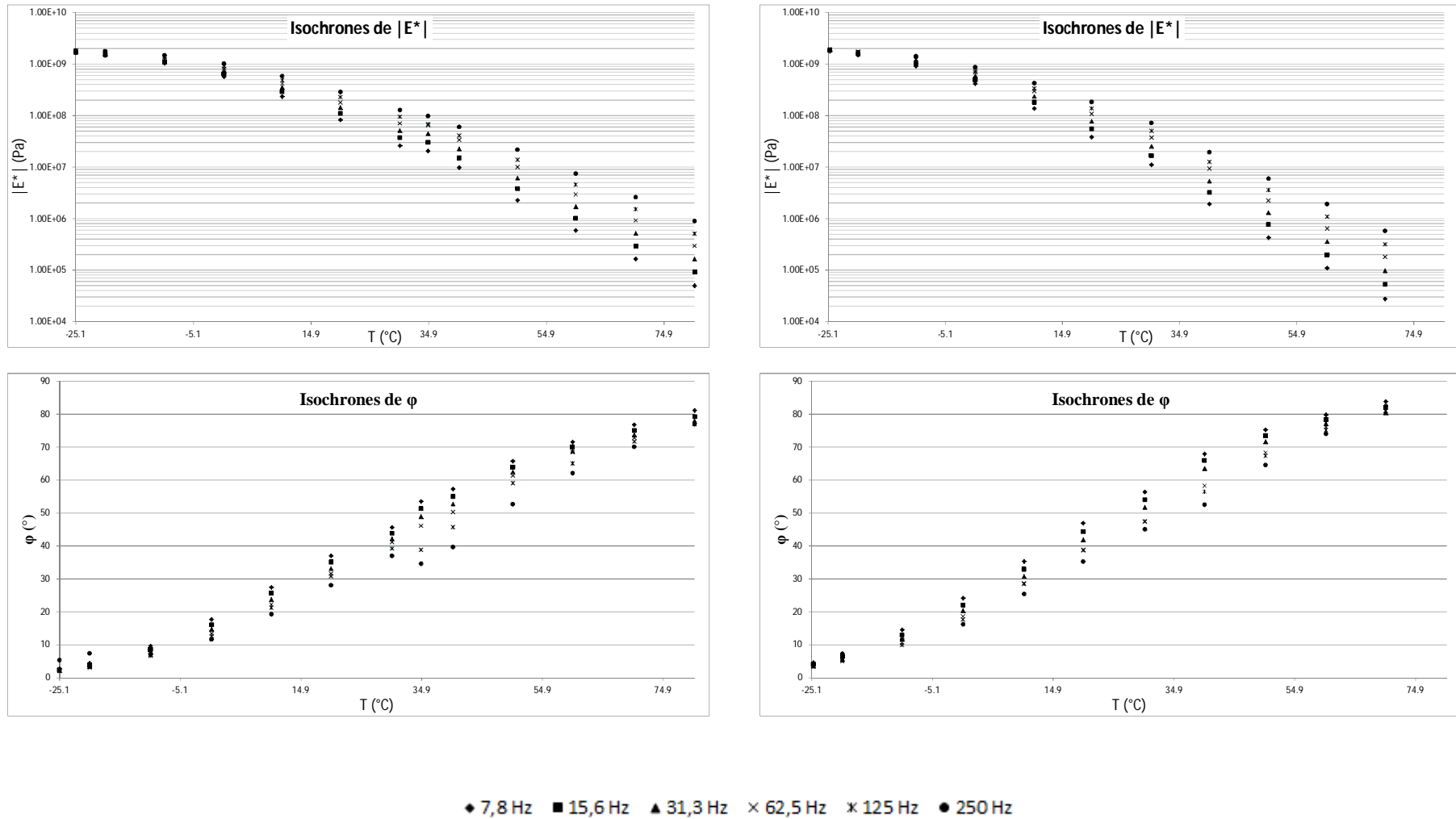


Figure 1-11 : Comparaison des isochrones d'un bitume 20/30 (à gauche) et d'un bitume 50/70 (à droite) en termes de norme de module complexe (en haut) et d'angle de phase (en bas)

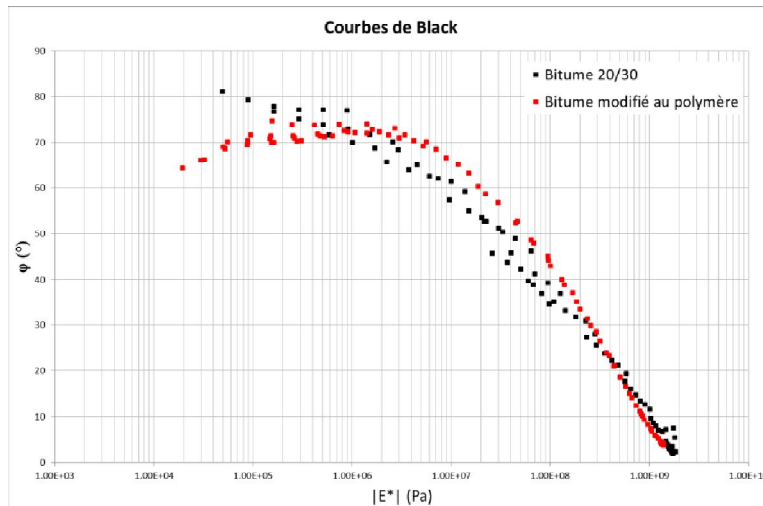


Figure 1-12 : Comparaison des courbes de Black d'un bitume 20/30 et d'un bitume modifié au polymère

## 2) Les substituts au bitume

Le pétrole fait partie, au même titre que le gaz naturel ou le charbon, des ressources fossiles. A l'échelle humaine, sa vitesse de régénération est presque nulle, et sa consommation est si intensive que son épuisement progressif est inexorable. Le pic de Hubbert ou pic pétrolier, correspondant au maximum de production de pétrole, est susceptible d'être atteint dans les cinq à dix prochaines années (Figure 1-13, [14]).

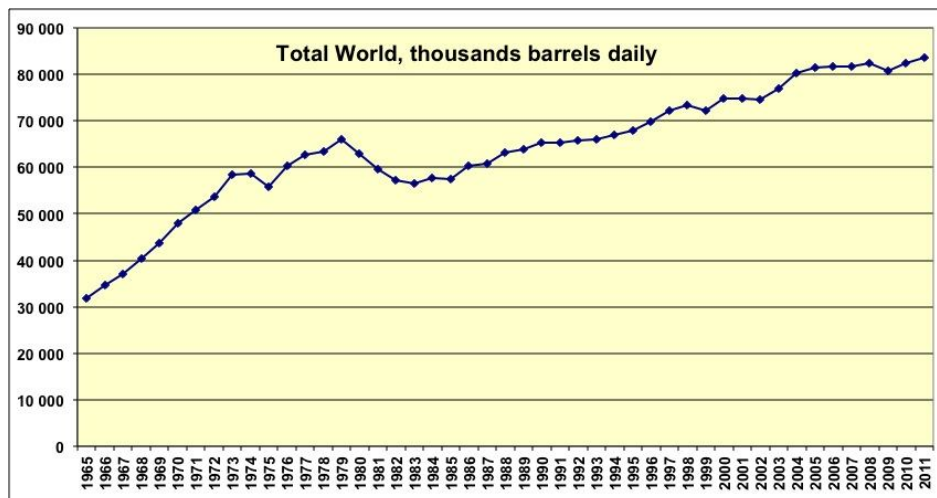


Figure 1-13 : Production mondiale de pétrole (en milliers de barils par jour) [14]

Ainsi, les ressources en pétrole, selon les évaluations les plus pessimistes, pourraient être épuisées dans les cinquante prochaines années. C'est pourquoi de nouvelles stratégies de raffinage du pétrole ont vu le jour. Le craquage des fractions lourdes bitumineuses en

fractions plus légères énergétiques devient une alternative rentable, ayant comme conséquence un accroissement des difficultés d'approvisionnement en bitume.

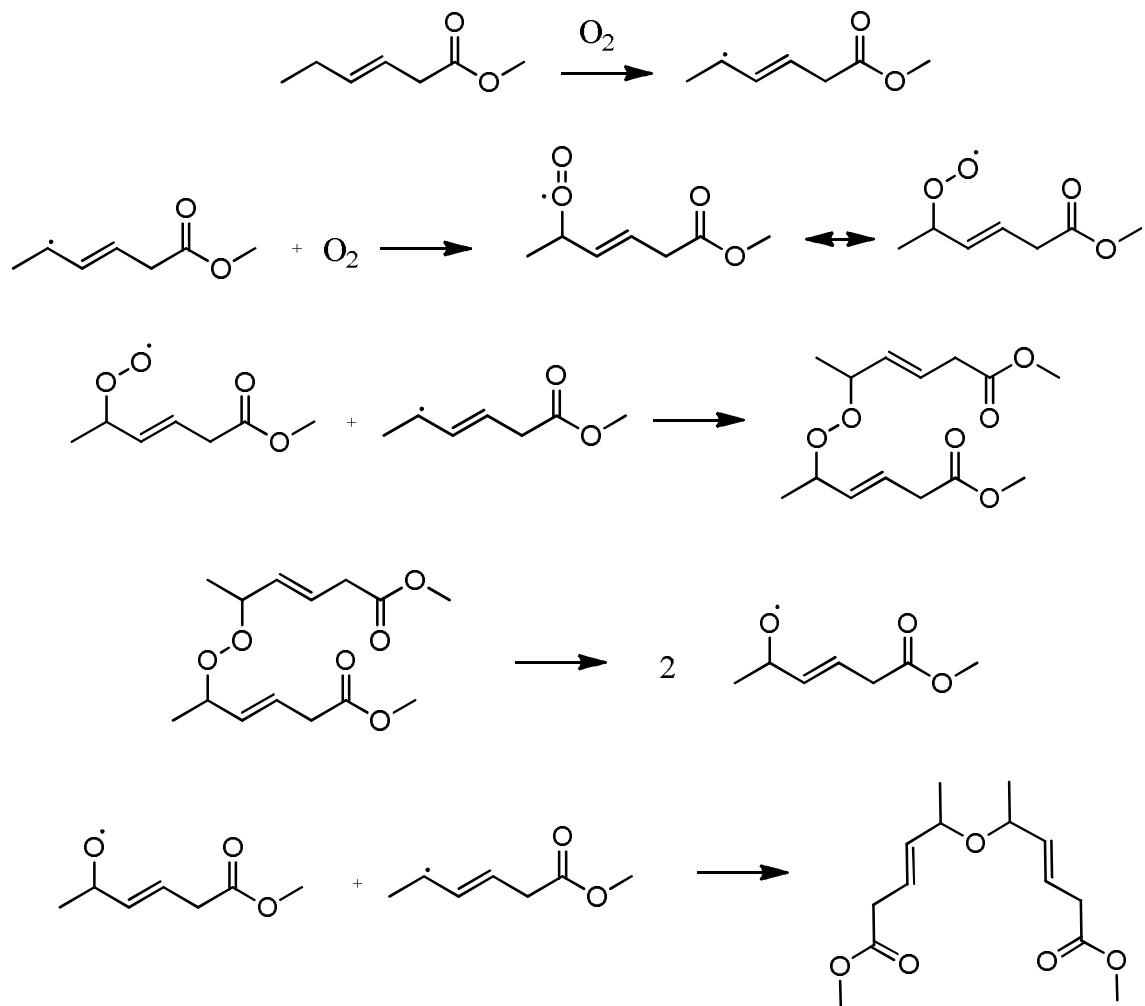
D'autre part, l'impact du bitume sur la santé humaine est au cœur des débats. En 2011, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les bitumes oxydés dans le groupe 2A des produits probablement cancérigène pour l'homme, et les bitumes durs et les bitumes de distillation dans le groupe 2B des produits possiblement cancérigène pour l'homme (le groupe 1 correspondant aux produits cancérigènes pour l'homme).

Ces deux effets cumulés ont eu pour effet de créer un climat propice à l'essor de la recherche de liants routiers alternatifs. Certains d'entre eux ont d'ailleurs intégré le marché du bitume depuis une dizaine d'années. L'objet du paragraphe suivant est donc de présenter ces produits de substitution partielle ou totale du bitume.

#### *a- Les fluxants et surfactants végétaux*

Les fluxants sont des produits qui, lorsqu'ils sont ajoutés aux bitumes, permettent d'en réduire la viscosité et de faciliter leur mise en œuvre. A l'heure actuelle, ces fluxants sont majoritairement issus de la chimie de la houille ou du pétrole. Après mise en œuvre sous forme d'enrobé, le durcissement du liant est assuré par l'évaporation de composés organiques volatils, qui sont au cœur des débats du fait de leurs effets sur la santé humaine.

Les premières valorisations de matières premières végétales dans le domaine des bitumes ont concerné ces fluxants. La majorité d'entre eux est composée d'esters d'acides gras. En 1997, l'entreprise SAADA commercialise sous le nom de Bioflux<sup>®</sup> des esters méthyliques d'acides gras, obtenus par transestérification d'huiles végétales. A ces esters méthyliques est ajouté un sel métallique (de cobalt, manganèse, ou zirconium) qui, après mise en œuvre du bitume, catalyse des réactions de polymérisation entre les chaînes esters en présence de l'oxygène de l'air (Réaction 1-1). Le durcissement du liant est donc assuré par réticulation et non plus par simple évaporation du fluxant, [15] ce qui permet de limiter la libération de composés organiques volatils. En 2001, un produit similaire est commercialisé par le groupement d'intérêt économique Oléoroute (co-fondé par Appia, branche d'Eiffage). En effet, l'Oléoflux 18<sup>®</sup> est également obtenu par transestérification de l'huile de tournesol.



Réaction 1-1 : Réaction de polymérisation de l'hexénoate de méthyl en présence de l'oxygène de l'air

Quelques années plus tard, le premier brevet de l'entreprise française Colas traitant de fluxant végétal est publié. [16] Leur choix s'est porté sur l'utilisation de matières grasses naturelles partiellement insaturées. Ces insaturations vont constituer le cœur des réactions chimiques, puisqu'au moins 15% d'entre elles vont être fonctionnalisées par des fonctions oxygénées de types éthers, époxydes ou anhydrides maléiques. Ces groupements chimiques sont par la suite susceptibles de réagir avec des groupements chimiques réactifs du bitume, conférant ainsi à ce dernier, les propriétés rhéologiques attendues.

Plus récemment, la société Valagro a proposé d'utiliser des esters ou diesters d'acide gras et de polyglycérol comme tensioactifs entrant dans la fabrication d'émulsion de bitume ou de tout autre liant hydrocarboné. [17]

*b- Les liants routiers alternatifs*

➤ Liants basés sur des huiles végétales

S'il a fallu attendre les années 2000 pour que les premiers liants végétaux soient commercialisés en France, le premier brevet traitant de la réalisation d'un liant alternatif basé sur des composés partiellement issus de la biomasse a été publié dès 1991. [18] Ce liant est obtenu à partir d'un mélange de résines végétales naturelles ou modifiées (tall oil – sous-produit de l'industrie papetière se présentant sous la forme d'un liquide visqueux -, bois, ou térébenthine). A cette résine sont ajoutés une huile et un polymère, permettant d'ajuster la rhéologie du mélange. Enfin, l'ajout de pigments inorganiques permet de colorer ce liant. De manière assez surprenante, c'est cet aspect « teintable » (à l'opposé du bitume, difficilement colorable du fait de sa couleur noire) qui est alors mis en avant dans ce brevet, son aspect « durable » n'étant alors pas du tout valorisé.

Une décennie plus tard, la majorité des grandes entreprises routières commercialisent leur propre liant végétal. La formulation de ces liants est basée sur trois grandes familles de composants (à l'instar du liant présenté ci-dessus) : une résine végétale (naturelle ou modifiée), une huile (généralement végétale, parfois minérale) et des polymères (Tableau 1-III). [19], [20], [21], [22] Leur consistance est telle que le processus de fabrication de l'enrobé, qui est par ailleurs similaire à celui des enrobés bitumineux, est réalisé à des températures plus faibles d'environ 40 °C, ce qui correspond à un gain énergétique non négligeable. Il est à noter que seul le Végécol<sup>®</sup> de Colas peut être qualifié de 100% végétal, car aucun polymère d'origine pétrolière n'entre dans sa composition.

Un frein à la démocratisation de ces différentes alternatives aux bitumes réside dans leur prix. En effet, le prix des liants végétaux est équivalent à celui des liants synthétiques (obtenus par mélange de produits issus du pétrole), et est de 3 à 10 fois supérieur au prix d'un bitume pétrolier. Ceci se traduit par un enrobé environ quatre fois plus cher (Tableau 1-IV). Ils ne sont donc pas concurrentiels à l'heure actuelle (même si le coût des bitumes pétroliers ne cesse d'augmenter, suite à l'augmentation du prix du baril de pétrole).

Tableau 1-III : Composition de certains liants végétaux industriels (les pourcentages sont donnés par rapport à la masse du liant)

Nom commercial	Entreprise	Résine	Huile	Polymère	Additifs	Référence
-	-	Résine de tall oil, de bois ou térébenthine	Huile minérale, végétale ou tall oil 15 à 20%	PP <sup>1</sup> , PE <sup>2</sup> , PA <sup>3</sup> , SB <sup>4</sup> 2 à 15%	Pigments inorganiques (TiO <sub>2</sub> , Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	[18]
Végécol®	Colas	Colophanes <sup>5</sup> naturelles ou modifiées (estérifiées ou maléïnisées) 40 à 70%	Huile de lin, de ricin ou de bois, brute, raffinée ou modifiée chimiquement 20 à 40%	-	Sel de Co, Zr, Mn	[19]
Biophalt®	Eiffage	Colophanes naturelles ou modifiée, terpènes solides ou modifiés 1 à 40%	Poix de tall-oil	1 à 20%	Cire – additif de réglage 1 à 10% Fibres – additif de réglage 2 à 10% Huile de fluxage 2 à 25% Additif sicatif Sel de Co, Va, Ca ou Mn 2 à 30%	[20]
Floraphalte®	Shell	Ester de colophane 20 à 90%	Huile de colza, de palme ou tall-oil 10 à 80%	EVA <sup>6</sup> fonctionnalisé par des silanes 1 à 10%	-	[21]
Séquoia®	Eurovia	Colophanes naturelles ou modifiées, terpènes naturels ou modifiés 40 à 60%	Polyester obtenu par polycondensation d'une huile de colza, tournesol, soja, palme ou tall-oil avec des polyacides et des polyols 40 à 60%	SB, EVA 5 à 10%	Agent renforçant la tenue aux UV Agents structurants Agents de renforts Agent modificateur de rhéologie Sel de Ti, Zn ou Fe	[22]

<sup>1</sup> Polypropylène

<sup>2</sup> Polyéthylène

<sup>3</sup> Polyamide

<sup>4</sup> Styrène- butadiène

<sup>5</sup> Résidu de distillation de la térébenthine, produite par les arbres résineux

<sup>6</sup> Ethylène – acétate de vinyle

Tableau 1-IV : Comparaison du coût des enrobés formulés avec différents liants (prix donnés en €/m<sup>2</sup>) [23]

Liant	Bitume noir	Bitume coloré	Emulsion de bitume	Liants végétaux	Liants synthétiques
Prix	12	14	10 à 12	40	35 à 40

Pour cette raison, mais aussi principalement pour des raisons de tonnages disponibles, ces liants sont pour l'instant presque exclusivement mis en place sur des pistes cyclables, des allées piétonnes, des trottoirs ou encore des parkings (Figure 1-14 gauche).

Quelques chantiers expérimentaux sur routes ont également été réalisés, tout particulièrement dans des zones présentant un enjeu socio-économique important (exemple de la « Route du Futur » à Ploufragan, dans les Côtes d'Armor). A l'heure actuelle, très peu de données sont disponibles sur leur comportement à long terme, car les premiers chantiers ont été réalisés dans les années 2000. Néanmoins, les premiers retours chantiers indiquent des problèmes lors du vieillissement de l'enrobé (fissurations transversales et longitudinales importantes - Figure 1-14 droite -, faïençage – ensemble de fissures formant un maillage -, ou encore plumage – arrachement des granulats), liés à des phénomènes de vitrification. De plus, l'utilisation de denrées entrant directement en compétition avec la nutrition humaine (huiles comestibles) constitue un frein majeur à la généralisation de l'utilisation de ces liants.

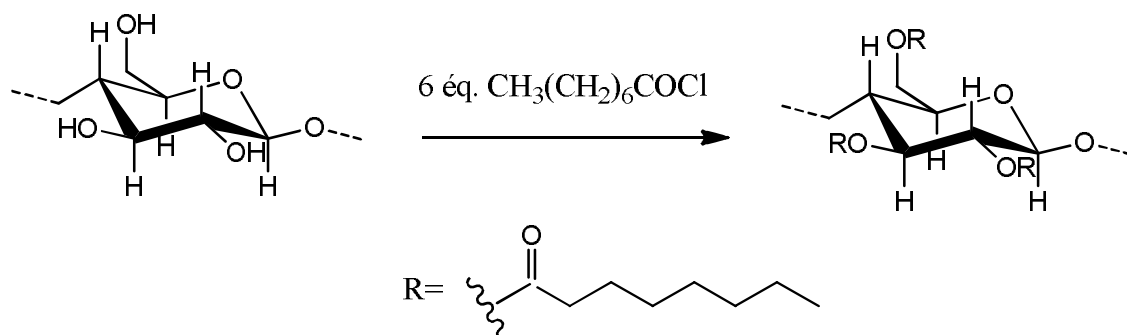


Figure 1-14 : Exemples de chantiers Végécol : Parking situé à Erdeven dans le Morbihan (à gauche) – Piste cyclable entre Le Bégo et Penthièvre dans le Morbihan (à droite)

- Liants basés sur d'autres matières premières

La recherche actuelle ne se concentre pas exclusivement sur l'utilisation d'huiles végétales, et de nombreux projets originaux ont récemment été développés par des laboratoires académiques. Ainsi, l'université de Picardie Jules Verne a déposé en 2008 un brevet concernant l'élaboration d'un liant à partir de composés protéiques et de vinaigre (ou d'autres acides organiques issus du monde végétal). [24] La mise en solution acide des substances protéiques entraîne une coagulation de ces dernières par perte de leur structure primaire, engendrant la formation d'un mélange caoutchouteux thermodurcissant. Cette invention présente l'avantage de valoriser une ressource abondante non utilisée : l'hémoglobine. Issue de l'abattage des animaux, les quantités disponibles s'élèvent à plus de 140 000 tonnes en Allemagne, 100 000 tonnes en Grande-Bretagne et 80 000 tonnes en France. Ce concept pourrait également être appliqué à d'autres composés protéiques, comme la caséine.

Un brevet a également été déposé par l'Institut National Polytechnique de Toulouse en 2010 sur l'utilisation de biomasses cellulosiques (biomasse la plus abondante sur terre) dans un liant routier. [25] Le principe est basé sur l'estérification des fonctions hydroxyles des unités glucose composant la cellulose (20 à 30% en masse du liant) par des acides gras, transformant ainsi les propriétés hydrophiles originelles de la cellulose en propriétés hydrophobes, recherchées pour un liant routier (Réaction 1-2). La maîtrise du degré de substitution de la cellulose (entre 0,9 et 3), correspondant au nombre moyen de fonctions hydroxyles ayant réagi par unité de glucose, et le choix des acides gras (saturés ou insaturés, comprenant entre 8 et 18 atomes de carbone) permet de moduler les propriétés rhéologiques du matériau final.



**Réaction 1-2 : Estérification de la cellulose par le chlorure d'octanoyle, menant à un degré de substitution DS=3**

Plus récemment, une équipe américaine s'est intéressée à la valorisation de lisier de porc, en le transformant en huile par un processus thermochimique : la liquéfaction hydrothermale.

[26] Ce concept s'insère parfaitement dans la politique environnementale américaine, visant à imposer une gestion de plus en plus stricte du lisier issu des élevages porcins, afin d'éviter des épandages excessifs en tant que fertilisants, ou encore des déversements accidentels dans l'environnement. Le potentiel de cette bio-huile a été étudié en tant qu'additif à un bitume 50/70, à des concentrations de 2%, 5% et 10%. L'étude a montré que l'incorporation de cette bio-huile dans le bitume entraîne une diminution de la viscosité d'autant plus importante que les concentrations de bio-huile sont élevées, entraînant un abaissement des températures d'enrobage et de compactage. De plus, les propriétés d'adhésivité des bitumes modifiés semblent être améliorées en comparaison du bitume de référence.

D'autres types de matières premières ont été traitées par des traitements thermo-chimiques. Ainsi, la pyrolyse rapide (procédé durant lequel une biomasse sèche est décomposée en quelques secondes en l'absence d'oxygène, à des températures comprises entre 500 °C et 1000 °C, et des vitesses de chauffe de l'ordre de 1000 °C/min) a été appliquée à des biomasses essentiellement ligneuses. [27] L'huile obtenue par ce procédé peut ainsi être directement utilisée en tant que liant, être modifiée par ajout de polymère synthétique, ou encore être utilisée en mélange avec du bitume.

Un récapitulatif de ces différentes alternatives non industrialisées est présenté dans le Tableau 1-V.

**Tableau 1-V : Récapitulatif des liants routiers alternatifs non industriels**

<b>Matière première</b>	<b>Technique</b>	<b>Remarques</b>	<b>Référence</b>
Hémoglobine	Dénaturation chimique en présence d'un acide organique	Modifications possibles par ajout d'huile végétale	[24]
Cellulose	Estérification par des chlorures d'acides gras	Rhéologie dépendante de la nature des acides gras et du degré de substitution	[25]
Lisier de porc	Liquéfaction hydrothermale	Utilisation en mélange avec du bitume	[26]
Biomasse ligneuse	Pyrolyse rapide	Modifications possibles par ajout de polymère ou utilisation en mélange avec du bitume	[27]

### 3) Conclusions

A l'heure actuelle, de nombreuses alternatives à l'utilisation du bitume sont proposées. Cependant, toutes ne sont pas encore industrialisées, car un liant routier alternatif optimal doit répondre à plusieurs caractéristiques qu'il est parfois difficile de concilier :

- des propriétés viscoélastiques similaires à celles de bitumes pétroliers ;
- l'utilisation de ressources n'entrant pas en compétition avec d'autres usages plus nobles tels que l'alimentation ou l'énergie ;
- un coût de production similaire, voire inférieur à celui de bitumes pétroliers.

La recherche doit donc maintenant se focaliser sur de nouvelles technologies de production, mais aussi et surtout sur de nouvelles sources de matière première. En effet, les liants végétaux commercialisés actuellement sont principalement basés sur l'huile de colza. Or, dans le domaine des biocarburants, l'actualité récente et les tensions créées sur les marchés alimentaires ont montré les conséquences que peut avoir l'utilisation de biomasses comestibles pour la production de co-produits. L'utilisation de ressources alimentaires pour une application « liant routier » semble donc difficilement compatible avec une industrialisation à l'échelle mondiale.

Dans la recherche de nouvelles biomasses n'entrant pas en compétition avec la nutrition humaine, les microalgues sont apparues, durant les dernières années, comme étant très prometteuses. A l'heure actuelle, elles sont très étudiées, notamment concernant la production de biocarburants dits de 3<sup>ème</sup> génération et représentent d'ailleurs pour le moment l'alternative la plus crédible à l'usage des carburants issus de l'industrie du pétrole. Si le potentiel des microalgues dans ce domaine n'est aujourd'hui plus à prouver, leur utilisation pour la réalisation d'un substitut au bitume n'a, à notre connaissance, pas encore été étudiée.

Or, dans ce domaine aussi les microalgues pourraient représenter une alternative crédible. En effet, après extraction des fractions à plus haute valeur ajoutée (pour l'énergie, la cosmétique, ou encore la pharmacie), il pourrait être intéressant de valoriser les fractions les moins nobles. Ce processus pourrait s'inscrire dans une potentielle « algo-raffinerie », limitant ainsi la génération de sous-produits.

## II – Les microalgues

Les microalgues sont des végétaux aquatiques, qui s'éloignent des végétaux terrestres aussi bien de par leur mode de culture que de par leur composition. Il s'avère donc nécessaire de mener une étude bibliographique approfondie sur ces microorganismes très spécifiques, détaillant leurs modes de cultures et de récoltes, leur composition, mais aussi leurs applications potentielles, afin de comprendre au mieux dans quel cadre cette biomasse pourrait être utilisée pour une application « liant routier ».

### 1) Généralités

Le terme générique « microalgues » regroupe deux familles de microorganismes : les microalgues au sens strict du terme, c'est-à-dire des algues microscopiques eucaryotes, et les cyanobactéries, procaryotes. Dans la suite de ce manuscrit, le terme « microalgue » fera référence au sens large du terme, c'est-à-dire aussi bien aux microorganismes procaryotes qu'aux microorganismes eucaryotes.

Ces microorganismes peuplent les océans et cours d'eau douce depuis plus de trois milliards et demi d'années, et leur biodiversité est immense (quelques espèces sont représentées en Figure 1-15). On estime qu'il existerait entre 200 000 et plusieurs millions d'espèces de microalgues, [28] réparties selon leur pigmentation ou encore l'organisation des membranes photosynthétiques (Figure 1-16).

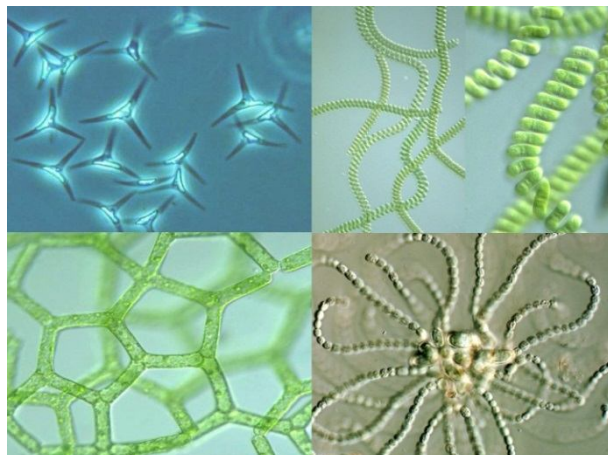


Figure 1-15 : Quelques espèces de microalgues (de gauche à droite et de haut en bas : *Phaeodactylum sp.*, *Spirulina sp.*, *Hydrodictyon sp.*, *Anabaena sp.*)

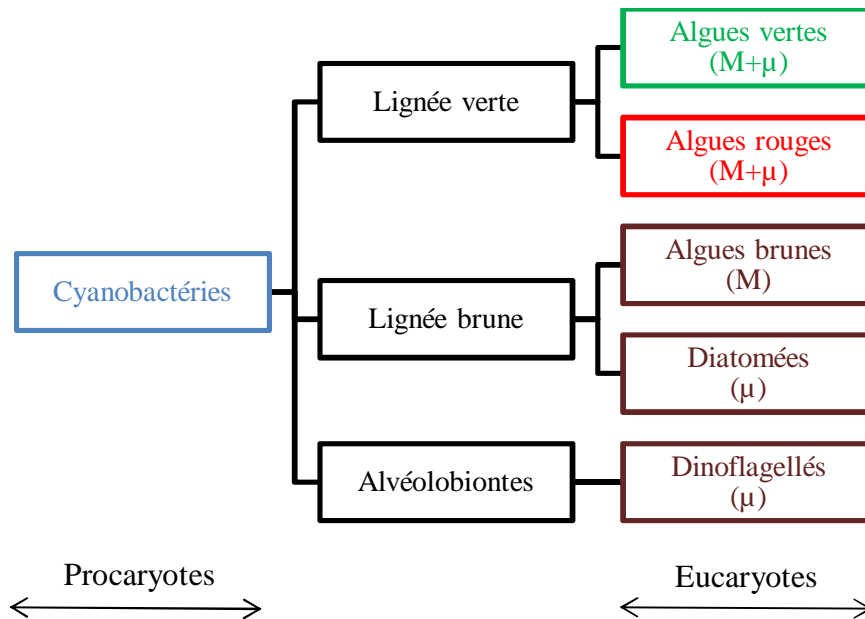


Figure 1-16 : Représentation phylogénétique simplifiée des algues (M : macro, μ : micro) (d'après [29])

Cependant, malgré cette large biodiversité, seules quelques espèces sont actuellement cultivées à très grande échelle (*Spirulina sp.*, *Chlorella sp.*, et *Dunaliella sp.* principalement, mais aussi *Nannochloropsis sp.* et *Odontella sp.*) et ce à cause de problèmes de coût de production. Malgré tout, la production mondiale de microalgues a augmenté de manière exponentielle en 25 ans, passant de 5 tonnes en 1975 à 3 500 tonnes en 2000. Aujourd'hui, elle plafonne à 10 000 tonnes. Ainsi, la production microalgale mondiale en 2004, toutes espèces confondues, était estimée entre 7 000 et 10 000 tonnes (à titre de comparaison, selon des données de la « Food and Agriculture Organization », la production mondiale de blé la même année était supérieure à 500 millions de tonnes et la production mondiale de macroalgues atteignait les 15 millions de tonnes).

Les microalgues sont des organismes photoautotrophes, c'est-à-dire que leur croissance est basée sur le processus de photosynthèse : elles nécessitent donc de l'énergie solaire, ainsi que du dioxyde de carbone. La culture à grande échelle de ces microorganismes pourrait donc permettre de fixer quantitativement du CO<sub>2</sub> et participer ainsi de manière positive au bilan carbone global. Leur vitesse de croissance élevée et leur rendement photosynthétique élevé leur permettent d'atteindre des productivités (à l'échelle du laboratoire) nettement supérieures à celles de végétaux photosynthétiques terrestres (Figure 1-17).

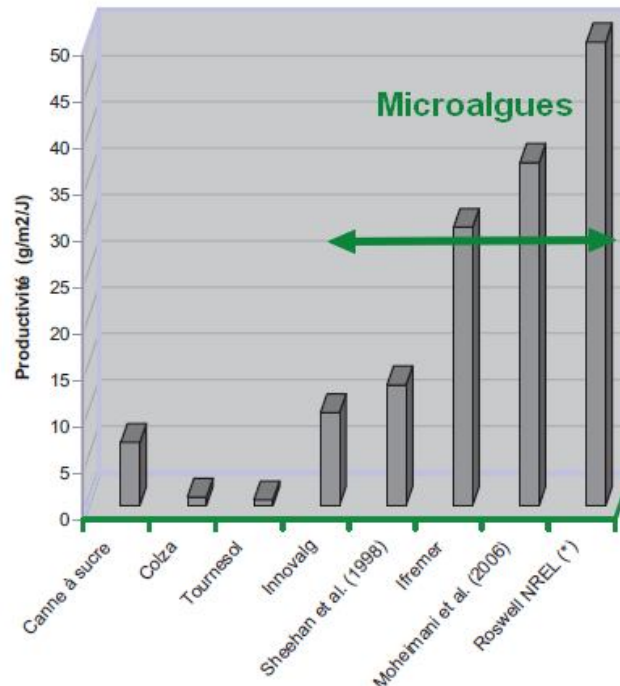


Figure 1-17 : Estimation de la productivité des microalgues à l'échelle du laboratoire et comparaison avec celle de végétaux terrestres usuels (adapté de [28])

## 2) Culture

Les microalgues, contrairement à leurs homologues macroscopiques, ne sont pas récoltées directement dans les milieux aqueux naturels, mais sont cultivées dans des ouvrages spécifiquement conçus pour leur assurer une croissance optimale.

Pour croître, les microalgues ont besoin de trois éléments : [30]

- la lumière : elle peut être avantageusement apportée par le soleil. Néanmoins, la croissance sera alors dépendante des cycles diurnes et saisonniers d'ensoleillement, ainsi que du taux d'ensoleillement de la région. Il est possible de remplacer cet ensoleillement naturel et gratuit par une exposition à une lumière artificielle constante et optimale. Cette technique permet une production en continu en s'affranchissant des cycles jours/nuits, mais présente l'inconvénient d'augmenter la dépense électrique et par conséquent les coûts de production ;
- le dioxyde de carbone : celui-ci peut être idéalement apporté par l'air dans le milieu naturel, mais, afin de garantir une répartition optimale au sein du milieu de culture, il sera préférentiellement apporté par les effluents gazeux d'industries lourdes ou encore par la dissolution de carbonates (*e.g.*  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{NaHCO}_3$ ) dans le milieu de culture ;

- des nutriments, incluant des sources d'azote, de phosphore et de soufre (pour certaines espèces de microalgues seulement). L'apport en azote se fait généralement par l'utilisation d'urée, tandis que l'apport en phosphore se fait par des ions phosphates en large excès.

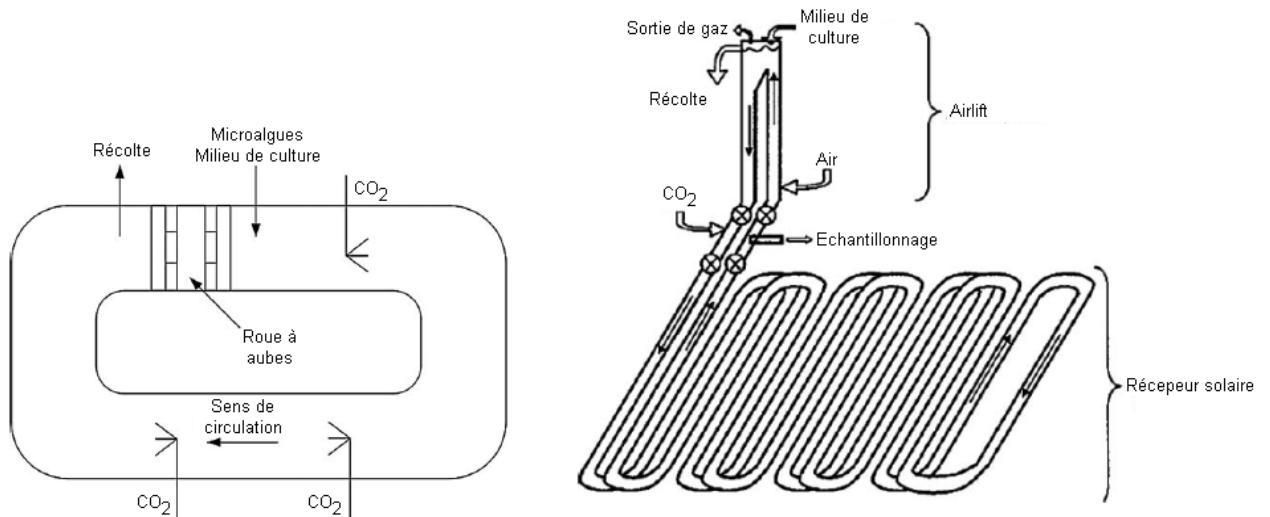
Certaines espèces de microalgues peuvent également se développer par hétérotrophie (sans lumière), par apport d'une source de carbone organique, telle que des sucres, du glycérol ou encore des acides organiques.

Deux grandes techniques de culture photoautotrophique de microalgues s'opposent : les systèmes ouverts (« open ponds » ou « open raceways ») et les systèmes fermés (photobioréacteurs).

Chronologiquement, les systèmes ouverts ont été utilisés les premiers (dès les années 1950), du fait de leur simplicité de mise en œuvre. Ils sont généralement composés d'une boucle fermée d'une profondeur variant entre 0,2 m et 0,5 m, et équipés d'un système de circulation d'eau comme des roues à aubes (cette agitation représente la dépense énergétique la plus élevée de ce type de système), permettant de stabiliser la croissance et la productivité (Figure 1-18 gauche). Si ce système de culture présente l'avantage d'être relativement peu onéreux à mettre en place, et d'être assez facile à entretenir, il ne peut être utilisé que pour des souches résistantes ou se développant dans des conditions particulièrement extrêmes (en termes de pH, ou encore de salinité). En effet, ces bassins sont extrêmement sensibles à la contamination et pollution par des parasites et/ou des prédateurs extérieurs. De plus, de nombreux facteurs (tels que les fluctuations de température, l'ensoleillement insuffisant, un brassage inefficace ou une évaporation trop importante de l'eau) limitent très fortement la productivité de ce type de système.

Les photobioréacteurs ont par la suite été développés afin de pallier certains problèmes liés aux systèmes ouverts. Ils permettent notamment de cultiver des souches moins résistantes que celles cultivées en bassins ouverts, car les risques de contamination sont fortement minimisés.

Les photobioréacteurs sont composés d'un réseau de tubes en plastique ou en verre (le plus souvent de diamètre inférieur à 0,1 m), alignés de manière horizontale, verticale, inclinée ou encore en hélice. Un système de pompe mécanique ou d'airlift assure le brassage du milieu de culture (Figure 1-18 droite).



**Figure 1-18 : Représentation schématique d'un raceway (à gauche) et d'un photobioréacteur tubulaire horizontal (à droite) (adaptés de [30])**

Trois types de photobioréacteurs peuvent être distingués : [31]

- les photobioréacteurs plats : utilisés dès les années 1950, ils offrent une large surface de captation d'énergie solaire et sont facilement installables en extérieur ;
- les photobioréacteurs à colonne verticale : leur simplicité de mise en œuvre est contrebalancée par des diamètres assez élevés (de l'ordre de la dizaine de centimètres) limitant l'efficacité en volume ;
- les photobioréacteurs tubulaires, qui peuvent être verticaux, horizontaux, obliques, coniques ou serpentins : de par leur diamètre plus faible (quelques centimètres), l'efficacité volumique est augmentée. Néanmoins, des phénomènes d'encrassement et de création de gradients de pH ou encore de concentration en CO<sub>2</sub> limitent le développement à grande échelle de ce type de configurations.

Contrairement aux systèmes ouverts, les photobioréacteurs présentent un coût d'investissement élevé, et présentent des difficultés supplémentaires concernant l'entretien. Néanmoins, c'est le système qui, à ce jour, permet de contrôler au mieux les différents paramètres influençant la culture, permettant ainsi une augmentation sensible des rendements.

### 3) Récolte

La récolte des microalgues constitue réellement un enjeu à part. En effet, du fait des faibles tailles de ces organismes, les techniques classiques de récoltes ne peuvent pas être appliquées. De plus, cette étape représente un coût majeur dans la chaîne de production (entre 20 et 30% du coût total).

Les techniques actuelles de récoltes de microalgues sont basées sur deux grands principes : [32]

- les séparations gravimétriques :
  - gravitation/floculation : il s'agit d'un processus (naturel pour certaines espèces de microalgues, chimique, ou encore électrolytique pour d'autres) permettant d'agréger des particules initialement dispersées pour former des agglomérats suffisamment lourds pour sédimenter. L'avantage de cette technique est qu'elle peut s'appliquer à de nombreuses espèces de microalgues, et permet de traiter facilement de larges volumes ;
  - centrifugation : l'application d'une force comprise entre 500 et 1000 g permet d'isoler rapidement de 80 à 90% des microalgues contenues dans le milieu de culture (l'augmentation de l'accélération permet d'augmenter la quantité de microalgues isolées). L'inconvénient principal de cette technique réside dans les coûts d'investissement et de process ;
  - flottation : contrairement à la floculation, il s'agit dans ce cas d'amener les microalgues à la surface de l'eau en faisant buller de l'air dans le milieu de culture. L'efficacité de cette technique est extrêmement dépendante de la taille des cellules à isoler : plus celles-ci sont petites, plus leur capacité à être lévitées par les bulles de gaz sera grande. Cependant, la probabilité de contact entre les bulles de gaz et les cellules est d'autant plus faible que celles-ci sont petites.
- les séparations par exclusion stérique :
  - tamisage : appliqué pour des tailles de cellules supérieures à 40  $\mu\text{m}$ , cela consiste à faire circuler le milieu de culture perpendiculairement à la surface d'un filtre. Il s'agit probablement du process le plus simple à mettre en œuvre, car de simples tamis ou tamis vibrants sont utilisés. Néanmoins, des phénomènes de colmatage des mailles sont généralement observés ;

- filtration membranaire tangentielle : appliquée pour des tailles de cellules inférieures à 40  $\mu\text{m}$ , cela consiste à faire circuler le milieu de culture parallèlement à la surface du filtre, ce qui permet de limiter les phénomènes de colmatage.

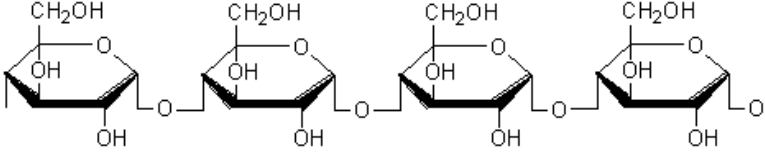
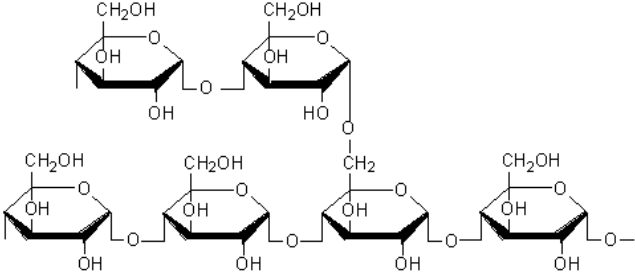
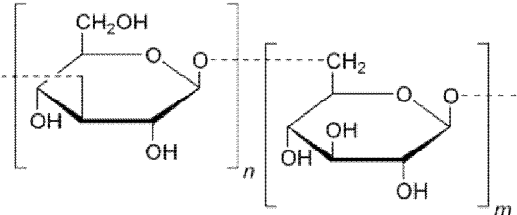
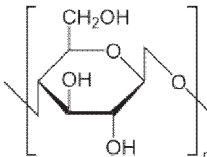
Le choix de la technique est donc fonction à la fois de la taille de l'espèce de microalgues à récolter (de 1 à 100  $\mu\text{m}$ ), de la consommation énergétique du procédé, de l'objectif d'humidité de la biomasse ainsi que de la concentration du milieu de culture (de 0,1 à 10 g/L).

#### 4) Composition

Il est possible de séparer les composants des microalgues en trois grandes familles principales que sont les polysaccharides, les protéines et les lipides : [33]

- polysaccharides (10 à 50%) : contenus dans les microalgues sous forme de monomères et de polymères, ils assurent à la fois une fonction mécanique (maintien de la structure) mais aussi parfois de stockage énergétique. Ce sont également des briques initiales pour la synthèse d'autres composés biochimiques. La structure de ces polysaccharides varie en fonction de l'espèce de microalgues considérée. Ainsi, les microalgues vertes vont majoritairement produire de l'amidon, constitué d'amylose (unités glucoses liées par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$ ) et d'amylopectine (unités glucoses liées par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  et ramifiées par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow6)$ ) dont les structures sont représentées dans le Tableau 1-VI. Les microalgues rouges vont quant à elles synthétiser de l'amidon floridéen, constitué presque exclusivement d'amylose. D'autres polysaccharides sont plus rarement retrouvés chez certaines espèces de microalgues, comme la chrysolaminarine, composée d'unités glucoses liées par des liaisons  $\beta(1\rightarrow3)$  et  $\beta(1\rightarrow6)$  ou la cellulose, composée d'unités glucoses liées par des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  ;

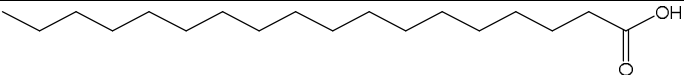
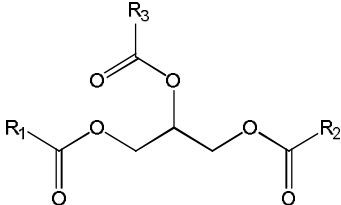
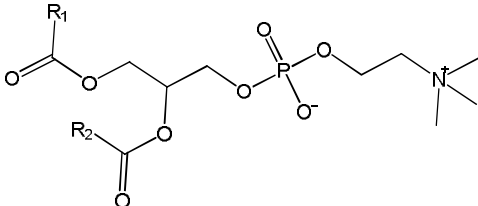
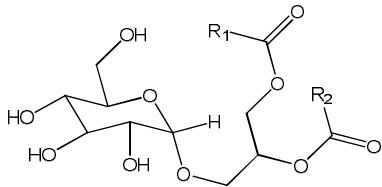
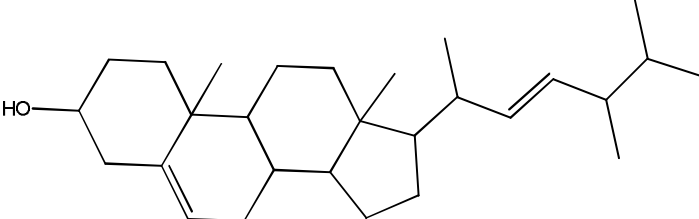
Tableau 1-VI : Structure de quelques polysaccharides retrouvés chez les microalgues

Nom	Structure
Amylose	
Amylopectine	
Chrysolaminarine	
Cellulose	

- protéines (20 à 60%) : tout comme les polysaccharides, les protéines assurent des fonctions à la fois structurales et métaboliques. D'une part, sous forme d'enzymes, elles sont la clé de la machinerie cellulaire, en catalysant le métabolisme des microalgues, et en favorisant leur croissance. D'autre part, elles peuvent également assurer un rôle structural dans les membranes lipidiques ;
- lipides (15 à 60%) : sous forme de triglycérides (trois acides gras libres condensés sur une molécule de glycérol, Tableau 1-VII), ils constituent une réserve énergétique importante. Sous forme de phospholipides et de glycolipides, ils sont retrouvés dans les parois cellulaires. La grande diversité de ces deux types de lipides en termes de tête

polaire (groupement phosphate ou sucre) et de nature de chaîne lipidique (longueur, degré d'insaturation) permet de moduler les propriétés de fluidité de la membrane cellulaire. De manière moins courante, des dérivés stéroliques sont parfois retrouvés. [34]

**Tableau 1-VII : Principales familles de lipides retrouvées dans les microalgues (les groupements R sont des chaînes aliphatiques de longueur et degré d'insaturation variables)**

Famille de lipides	Exemple de structure
Acides gras libres	
Triglycérides	
Phospholipides	
Glycolipides	
Stérols	

## 5) Applications

Etant donnée l'extrême diversité de microalgues, et par conséquent la diversité en métabolites produits, il est possible d'imaginer un grand nombre d'applications dans des domaines très variés. Quelques-unes d'entre elles vont être détaillées dans la suite de ce paragraphe. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que beaucoup de ces applications ne sont pas

encore industrialisées, car leur coût de revient est trop élevé. En effet, pour arriver à concurrencer des produits similaires non algosourcés, il est nécessaire que ces produits soient disponibles à des prix équivalents (Figure 1-19).

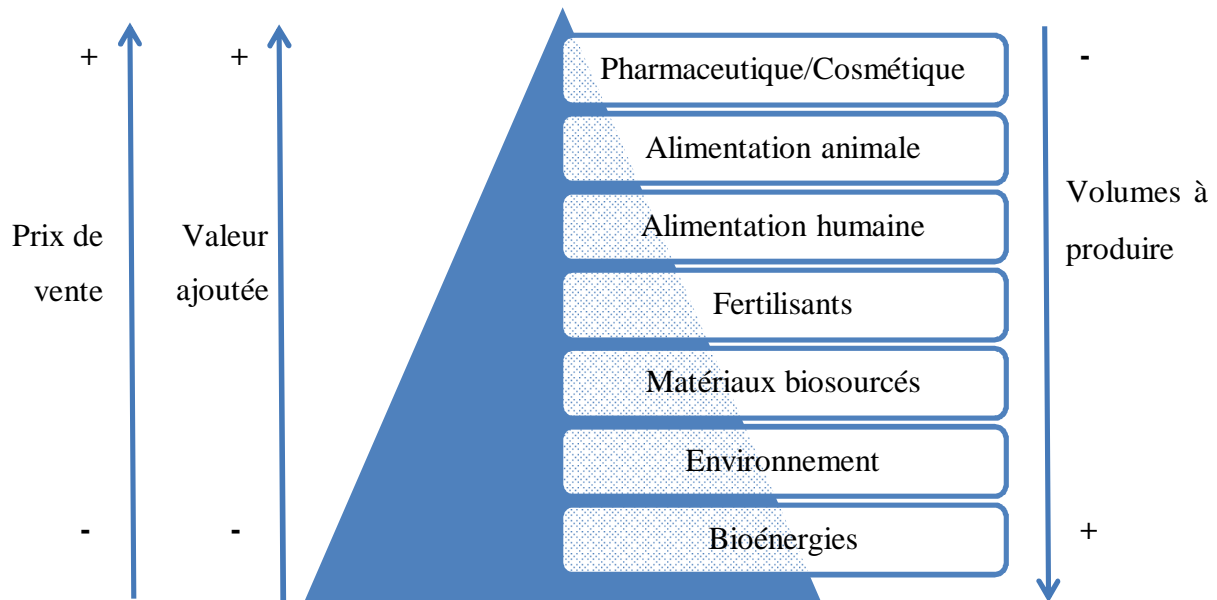


Figure 1-19 : Prix et applications envisageables des microalgues

#### a- Nutrition

Les microalgues sont depuis longtemps déjà utilisées dans le domaine de la nutrition animale, mais aussi de la nutrition humaine :

- nutrition animale : qu'elles soient destinées au bétail (plus particulièrement aux volailles) ou à l'aquaculture, les microalgues sont très utilisées pour la nutrition animale. Dans le premier cas, elles peuvent se substituer efficacement aux tourteaux oléagineux (résidus solides obtenus après extraction de l'huile des oléagineux). Dans le deuxième cas, elles sont utilisées soit pour alimenter du zooplancton, nourriture des poissons, soit en substitution des farines de poissons ;
- nutrition humaine : les microalgues sont très utilisées comme compléments alimentaires pour la nutrition humaine, du fait de leurs teneurs élevées en protéines. Ainsi, la spiruline et la chlorelle sont deux des microalgues les plus consommées au monde. Cependant, peu de microalgues sont autorisées pour la consommation humaine à l'heure actuelle, du fait des réglementations très strictes d'acceptation de

nouveaux aliments sur le marché. D'autre part, les acides gras ou encore les pigments des microalgues peuvent être valorisés sous forme de nutraceutiques (aliments de consommation courante combinant la notion d'aliment et de médicament, censés diminuer les risques ou prévenir l'apparition de certaines maladies).

*b- Pharmaceutique, cosmétique, et autres composés biologiquement actifs*

De nombreuses microalgues se sont révélées productrices de composés antimicrobiens et antiviraux. Parmi ces composés, sont retrouvées des structures aussi variées que des phénols (*e.g.* extraits méthanoliques de *Nostoc muscorum*, actifs contre deux pathogènes humains dont le staphylocoque doré [35]), des acides gras (*e.g.* acide linoléique des extraits méthanoliques de *Chlorococcum sp.*, également actif contre le staphylocoque doré [36]), des polysaccharides (*e.g.* exopolysaccharide sulfaté de *Gyrodinium impudicum* montrant une activité antivirale contre le virus de l'encephalomyocardite<sup>7</sup> [37]) ou encore des polyéthers (*e.g.* polyéthers cycliques extraits de *Prorocentrum lima*, *Dinophysis fortii* et *Gambierdiscus toxicus*, et actifs contre divers micro-organismes - Figure 1-20, [38]). Certaines microalgues possèdent également des propriétés antimicroalgales. Il a été montré qu'*Isochrysis galbana* produit une molécule dérivée de l'acide lauroléique C12 :1, qui inhibe la croissance de certaines souches de microalgues, mais aussi sa propre croissance. [39]

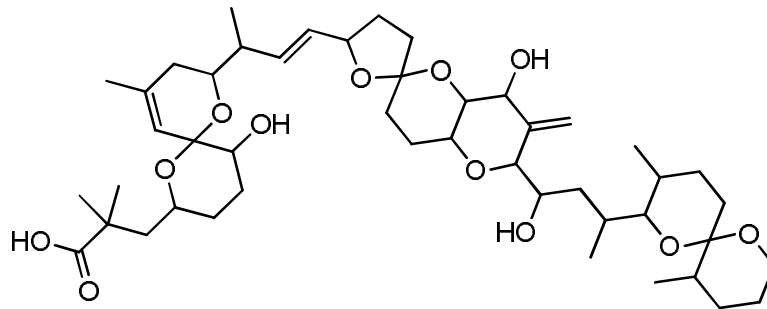


Figure 1-20 : Structure de la dinophysistoxine-1 extraite de *Prorocentrum lima* [38]

Les microalgues produisent également d'autres composés bioactifs d'intérêt, comme les pigments. A titre d'exemple, la scytonemine, produite par plusieurs cyanobactéries, possède des propriétés anti-UV et est par conséquent largement utilisée dans les crèmes solaires. [40] De même, certains pigments de la famille des caroténoïdes présentent des propriétés biologiques très intéressantes. Ainsi, la fucoxhantine (Figure 1-21) posséderait des activités

<sup>7</sup> Maladie engendrant des troubles nerveux, des avortements ou encore des diabètes chez les espèces contaminées.

allant de l'effet anti-cancéreux à un effet anti-obésité en passant par des effets antidiabétique ou encore antioxydant. [41]

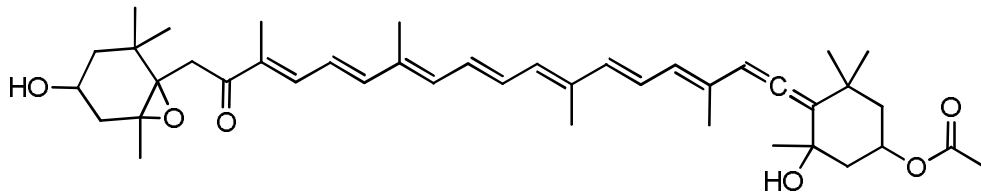


Figure 1-21 : Structure de la fucoxanthine

L'industrie cosmétique est également très friande de biomolécules issues de microalgues. Les antioxydants, les pigments, ainsi que les vitamines (A, E, B1...) sont autant de molécules pouvant aider le corps humain à lutter contre la sécheresse cutanée, contre le vieillissement tissulaire *via* les radicaux libres, ou encore aider au renouvellement cellulaire. C'est pourquoi elles sont largement intégrées aux crèmes de beauté.

D'autres biomolécules sont également produites, même si elles n'ont pas encore trouvé d'applications en thérapie. C'est le cas des saxitoxines, retrouvées dans de nombreux dinoflagellés, et possédant une activité similaire à celle de la tétrodotoxine (blocage des canaux sodiques empêchant la propagation de certains signaux nerveux). [42] Parfois, leurs avantages sont contrebalancés par des effets secondaires. Ainsi, un des bromo-biindoles produits par *Rivularia firma* (Figure 1-22, [43]) malgré ses propriétés anti-inflammatoire et anti-amphétaminique, a déclenché l'apparition de tumeurs chez les rats et les souris. [44] Néanmoins, ces biomolécules peuvent servir de structure de base afin de synthétiser des analogues possédant les mêmes propriétés biologiques intéressantes, tout en limitant les effets secondaires.

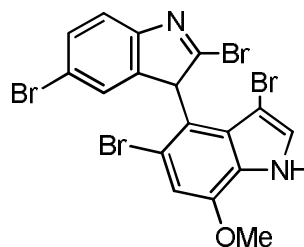


Figure 1-22 : Structure du bromo-biindole majoritairement produit par *Rivularia firma*

### c- Bioplastiques

Une première application des microalgues dans ce domaine concerne les biotechnologies blanches. En effet, certaines espèces de microalgues peuvent produire, naturellement ou après modification de leur génome, des biopolymères pouvant se substituer aux polymères issus de l'industrie du pétrole pour la fabrication de bioplastiques biodégradables. Par exemple, un biopolyester, le poly-3-hydroxybutyrate, a été sécrété par des souches mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* [45] et de *Phaeodactylum tricormutum*. [46]

Les microalgues peuvent également être mises en forme par extrusion, comme ont pu l'être *Nannochloropsis sp.* et *Spirulina sp.* en mélange avec de l'amidon et du polyuréthane, du polyéthylène ou du polypropylène. [47] Des matériaux similaires ont également été obtenus avec *Chlorella sp.* en mélange avec du polyéthylène. [48] Récemment, plusieurs entreprises américaines se sont lancées dans la fabrication à l'échelle industrielle de bioplastiques à partir de microalgues : Cereplast (spécialisée dans les plastiques non pétrochimiques), ou encore Blue Marble (spécialisée dans la production de composés chimiques biosourcés, en respect des principes de la chimie verte) en partenariat avec Bionavitas (spécialisée dans la culture de microalgues). Les dirigeants de Cereplast estiment que l'utilisation de microalgues permettrait de remplacer au moins 50% de la teneur en pétrole contenue actuellement dans les plastiques. A l'heure actuelle, il n'existe pas de bioplastique entièrement conçu à partir de microalgues, sans additif issu de la pétrochimie.

De nombreux autres domaines d'applications des microalgues dans le domaine de la chimie verte sont étudiés actuellement. A titre d'exemples, il est possible de citer la production de peintures à partir de molécules extraites de microalgues (projet Algicoat de l'université de Wageningen aux Pays-Bas) ou encore la production d'émulsifiants. [49]

### d- Environnement

Des applications originales des microalgues peuvent être retrouvées dans le domaine de l'environnement. En effet, elles peuvent être utilisées pour la biorémediation de milieux pollués :

- les industries lourdes (cimenteries, raffineries...) sont très productrices de CO<sub>2</sub>. En théorie, ce CO<sub>2</sub> (après une éventuelle dépollution), pourrait être réinjecté dans le milieu de culture des microalgues, ce qui permettrait de participer à la diminution de

l'empreinte carbone liée à ce type d'industries et limiterait le coût de production des microalgues ; [50]

- la mise en place de systèmes de lagunages permet de dépolluer des eaux résiduaires urbaines. Dans un premier bassin, des bactéries dégradent la matière organique en sels minéraux ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) et gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ), qui serviront alors à la croissance des microalgues dans un deuxième bassin. Ces microalgues sont par la suite consommées par du zooplancton dans un dernier bassin. Les eaux peuvent alors être rejetées en toute sécurité dans le milieu naturel. Ce type de système a récemment été mis en place avec succès dans l'Hérault ; [31]
- les microalgues peuvent également être valorisées dans le domaine de la biorémediation de lixiviats générés par des décharges municipales, plus spécifiquement afin de diminuer les concentrations en métaux lourds. [51]

#### e- Bioénergies

Il s'agit très probablement de l'application potentielle des microalgues présentant le plus d'enjeux, et étant la plus médiatisée. De par leur composition biochimique, les microalgues pourraient aussi bien s'intégrer dans un processus de production de biodiesel, de biogaz, de bioéthanol ou encore de dihydrogène :

- biodiesel : les microalgues sont connues pour pouvoir accumuler des quantités importantes de lipides (jusqu'à 50% de leur masse lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions de carence). Ces lipides, majoritairement composés de triglycérides, peuvent facilement être dérivatisés en esters méthyliques ou éthyliques d'acides gras par voie chimique ou par voie enzymatique, *via* les lipases. Leur structure chimique se rapproche alors fortement de celle des hydrocarbures qui composent les coupes gasoils issues du pétrole. Ce biodiesel peut par la suite être converti en biokérosène pour l'aviation, *via* une réaction d'hydrogénation des doubles liaisons. Il est également possible de s'affranchir de l'étape de transformation chimique pour la production de biocarburants. En effet, quelques rares microalgues, dont *Botryococcus braunii*, peuvent produire directement des hydrocarbures (jusqu'à 60% de son poids), sans aucun forçage physiologique. Ces hydrocarbures, une fois extraits, peuvent donc directement se substituer aux carburants pétroliers. Une dernière alternative pour obtenir un carburant liquide réside dans la liquéfaction hydrothermale et/ou la

pyrolyse. Ces deux techniques (la première par voie humide, la seconde par voie sèche) permettent d'obtenir une bio-huile qui, après distillation, peut se substituer au diesel ;

- biogaz : du méthane peut être obtenu par digestion anaérobie des microalgues. Cette technique est particulièrement prometteuse, car elle ne nécessite pas de séchage préalable de la biomasse. Après purification et concentration en méthane, le biogaz peut se substituer à l'utilisation du gaz naturel. Le CO<sub>2</sub> coproduit durant ce processus (environ 30%) pourrait être idéalement recyclé pour la production des microalgues ;
- bioéthanol : actuellement, il est produit à partir de ressources alimentaires comme le maïs, ce qui engendre des tensions sur l'approvisionnement et le prix des denrées alimentaires. Il serait envisageable de produire ce bioéthanol à partir de certaines souches de microalgues produisant de l'amidon comme réserve énergétique, ou encore à partir des parois cellulaires polysaccharidiques de toutes les microalgues, en conservant les mêmes processus de production que pour les ressources agricoles classiques.
- dihydrogène : la production « propre » de dihydrogène représente un enjeu tout particulièrement important. En effet, sa combustion par le dioxygène ne produit que de l'eau. Ce carburant pourrait être produit par voie photosynthétique, en cultivant certaines souches de microalgues en milieu carencé en soufre (mais les conditions sont alors peu favorables à la croissance). La gazéification de la biomasse à haute température pourrait être une voie économiquement et écologiquement viable.

## 6) Conclusions

Les microalgues constituent donc une matière première dont la composition est extrêmement dépendante du genre auquel elles appartiennent, mais aussi des conditions dans lesquelles leur croissance s'est déroulée. De manière simplifiée, elles sont composées de trois grandes familles de composés : les lipides, les protéines, et les polysaccharides. Chacune de ces familles possède des propriétés spécifiques, laissant espérer une valorisation dans des domaines très variés.

Les microalgues sont actuellement principalement valorisées dans des marchés de niche tels que la cosmétique ou la nutraceutique. Mais elles ont également été identifiées comme une biomasse d'avenir dans des marchés de masse, tels que les biocarburants. L'utilisation de

cette biomasse dans le domaine innovant des liants routiers alternatifs devra se faire en s'insérant dans une démarche globale d'algo-raffinerie, sans nuire aux usages les plus nobles de cette matière.

Pour cette application, l'hydrophobicité des liants potentiellement issus des microalgues sera un critère de choix. Les deux parties suivantes vont donc être focalisées sur différents procédés permettant d'extraire des microalgues une phase hydrophobe, thermosusceptible et viscoélastique.

### **III – Extraction lipidique**

Une des voies permettant d'accéder à une phase hydrophobe à partir de microalgues est l'extraction lipidique. En effet, les lipides possèdent des propriétés intrinsèques hydrophobes, intéressantes pour l'application envisagée.

L'extraction de lipides de produits naturels représente depuis longtemps un enjeu majeur pour les industriels de manière générale, et dans le domaine des microalgues tout particulièrement. En effet, les lipides extraits de cette biomasse le sont généralement dans le but d'être convertis en biodiesel. Un compromis doit donc être trouvé entre le coût du processus d'extraction (en termes d'énergie et de consommables) et le rendement d'extraction, afin de pouvoir concurrencer les produits pétroliers d'un point de vue financier.

L'objet de ce paragraphe est de présenter une étude bibliographique des différentes techniques d'extraction de lipides régulièrement appliquées aux biomasses, de discuter des avantages et inconvénients de chacune d'entre elles, et de comparer leurs efficacités relatives lorsqu'elles sont appliquées aux microalgues.

#### **1) Extractions « Folch » et « Bligh and Dyer »**

En 1956, une méthode d'extraction des lipides totaux par macération à froid est publiée. Elle sera par la suite connue sous le nom de « méthode Folch ». [52] Trois ans plus tard, est publiée par Bligh et Dyer (B&D) la célèbre méthode d'extraction de lipides portant leurs noms. [53] Initialement tournées vers la quantification de lipides dans des tissus animaux et des tissus de poissons respectivement, le domaine d'application de ces deux techniques s'est par la suite étendu à tous types de matériaux biologiques. Elles ont depuis été largement

appliquées aux microalgues. Aujourd'hui, il s'agit de deux techniques de référence, auxquelles sont souvent comparées les autres méthodes d'extraction.

La méthode Folch consiste en une extraction à froid par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2/1, v/v). Après filtration, l'ajout d'eau au filtrat permet d'isoler une fraction organique contenant les lipides totaux purs.

La méthode Bligh et Dyer est assez similaire à la méthode précédente, mais le solvant d'extraction utilisé est ici un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/2, v/v). Les quantités de solvant sont choisies de telle sorte qu'un système monophasique se forme avec l'eau du milieu biologique. L'ajout d'eau additionnelle permet de générer un système biphasique : les lipides sont alors contenus dans la phase chloroforme.

Ces deux méthodes présentent l'avantage d'être extrêmement simples à mettre en place. De plus, s'agissant d'une extraction à froid, elles empêchent toute dénaturation thermique des composés à extraire. Il faut cependant noter que le volume de solvant d'extraction est un paramètre important. En effet, afin que l'extraction puisse se dérouler dans des conditions quantitatives, ce volume doit être suffisamment important afin de ne pas atteindre les limites de solubilité des lipides dans ce solvant.

## 2) Extraction Soxhlet

Au cours de sa carrière, Franz von Soxhlet, célèbre agrochimiste allemand de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, s'est tout particulièrement intéressé à l'étude des lipides. Ses recherches l'ont mené à développer en 1879 un appareillage permettant de doser la teneur en graisses dans une matrice solide, qui sera plus tard connu sous le terme « extracteur Soxhlet » (Figure 1-23).

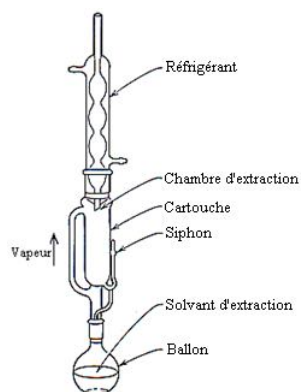


Figure 1-23 : Extracteur Soxhlet

Cet extracteur permet de réaliser de façon très simple des extractions liquide-solide. La matière à extraire est placée dans une cartouche en cellulose, elle-même placée dans la chambre d'extraction. Un ballon contenant le solvant d'extraction est placé sous cette chambre d'extraction et est chauffé grâce à un bain d'huile. Grâce à la présence d'un réfrigérant, les vapeurs de solvant sont ensuite condensées dans la chambre d'extraction, permettant ainsi à la matrice solide de « macérer » dans le solvant chaud. La présence d'un siphon permet de vidanger régulièrement le système vers le ballon, qui contient alors le solvant d'extraction et les produits extraits. L'extraction se fait donc en continu, avec un solvant perpétuellement propre, permettant de déplacer l'équilibre d'extraction et de concentrer progressivement les produits d'extraction dans le ballon.

Ce système présente de nombreux avantages, dont le faible coût de l'équipement de base, ainsi que sa simplicité de mise en œuvre et d'utilisation. Néanmoins, il présente également plusieurs inconvénients : [54]

- la non-sélectivité du processus. En effet, des produits autres que des lipides, tels que des pigments, sont généralement co-extraits ;
- la nécessité de travailler sur des échantillons exempts de toute eau, afin de permettre une pénétration optimale du solvant dans l'échantillon. Cette étape de séchage est très énergivore et représente un coût financier non négligeable ;
- l'utilisation de solvants organiques nocifs et/ou dangereux pour l'environnement (hexane, chloroforme...). Or, aujourd'hui, la société tend à développer des processus respectant au maximum les principes de la chimie verte, et l'utilisation de ce type de solvants ne rentre pas dans ces principes ;
- l'extraction se faisant à la température d'ébullition du solvant, une dégradation thermique des composés d'intérêt peut se produire au cours du processus.

### 3) Extraction au fluide supercritique

Le principe de l'extraction au fluide supercritique (SFE) est basé sur une extraction en continu (Figure 1-24). Le fluide utilisé est dans son domaine supercritique, c'est-à-dire à des températures et pressions supérieures au point critique (voir l'exemple du dioxyde de carbone en Figure 1-25). Le fluide, dans cet état, possède des propriétés intermédiaires entre celles d'un liquide et celles d'un gaz. [55] Il possède notamment une densité élevée (similaire à celle d'un liquide), permettant une meilleure solubilisation des composés. Sa faible viscosité

(similaire à celle d'un gaz) et sa diffusivité intermédiaire entre celle d'un liquide et celle d'un gaz, permettent au fluide de pénétrer facilement dans les solides.

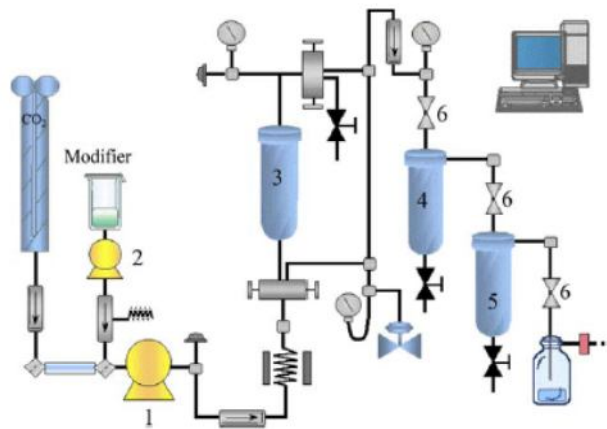


Figure 1-24 : Exemple de système d'extraction au fluide supercritique [55]

1 : Pompe à CO<sub>2</sub> ; 2 : Pompe à co-solvant ; 3 : Cellule d'extraction ; 4 et 5 : Cellules de fractionnement ; 6 : Valve

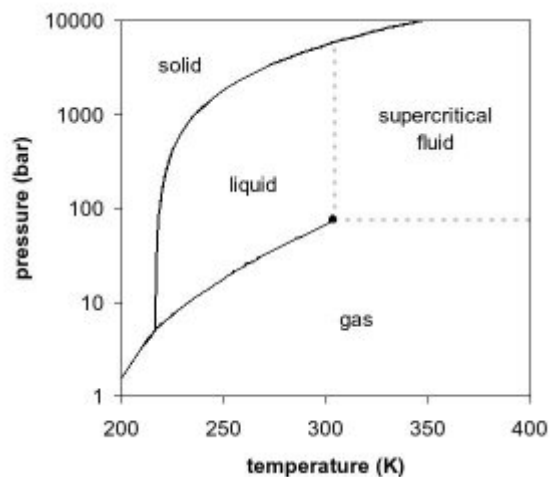


Figure 1-25 : Diagramme de phases du CO<sub>2</sub>

Une fois l'extraction finie, la phase lipidique dissoute est séparée du fluide supercritique par simple dépressurisation. Le fluide peut alors être recyclé ou réengagé dans un nouveau processus d'extraction.

Le fluide le plus adapté est le CO<sub>2</sub>, pour son faible coût, sa non-inflammabilité et innocuité, ainsi que sa capacité à solubiliser les composés lipophiles. De plus, ses points critiques sont relativement bas ( $T_c = 31,3 \text{ °C}$  ;  $P_c = 73,9 \text{ MPa}$ ) par rapport à d'autres fluides. Des co-solvants lui sont souvent ajoutés, afin d'augmenter sa polarité et par conséquent, de lui conférer la capacité à extraire les composés les plus polaires de l'échantillon.

Cette technique permet de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques et des problèmes de toxicité. De plus, les propriétés extractives du fluide étant directement lié à sa densité, et par conséquent à la pression d'extraction, il est très facile de les moduler en changeant simplement les conditions de pression et température.

#### 4) Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 1 GHz et 300 GHz. Le chauffage par micro-ondes résulte de deux phénomènes :

- la conduction ionique : il s'agit de la migration électrophorétique des ions sous l'influence d'un champ électromagnétique. L'échauffement de la solution est alors dû à la friction entre le flux d'ions et la solution ;
- la polarisation dipolaire : il s'agit du réalignement permanent des dipôles en présence d'un champ magnétique. Par friction moléculaire et collisions, les dipôles vont perdre leur énergie, qui va alors être transférée au milieu réactionnel. Cette énergie est alors convertie en énergie thermique et/ou cinétique.

Ainsi, *via* ces deux phénomènes, un solvant pourra être chauffé en enceinte fermée à une température supérieure à sa température d'ébullition à pression atmosphérique, augmentant ainsi de manière significative le rendement et la vitesse d'extraction. [56]

Cette méthode a été appliquée à l'extraction de graisses de produits naturels dès les années 1980, pour la préparation d'échantillons pour l'analyse chromatographique. [57] Appliquée à de nombreux produits d'origine végétale ou animale, elle a alors été comparée à l'extraction Soxhlet. Les auteurs ont montré que pour le même solvant utilisé, l'extraction assistée par micro-ondes est légèrement moins efficace (98% des graisses extraites par Soxhlet le sont également par micro-ondes), mais permet un gain de temps non négligeable (cinq minutes d'extraction, contre plus de trois heures pour le Soxhlet). Pour des composés plus polaires que les lipides, il semblerait même que l'extraction assistée par micro-ondes soit plus efficace que les techniques d'extraction dites classiques.

#### 5) Extraction assistée par ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques de fréquences comprises entre 20 kHz et 10 MHz. Lorsque ces ondes traversent un milieu élastique, elles créent un déplacement

longitudinal des particules, entraînant la création de phases de compression et de dilatations. [58] Lorsque les phases de dilatations dues aux ultrasons sont suffisamment fortes, les distances entre les molécules peuvent dépasser la distance moléculaire critique (distance entre deux molécules au-delà de laquelle le milieu s'effondre), et des bulles de cavitation, responsables de l'effet ultrasonique, sont alors générées. Au cours des cycles de compressions/dilatations, ces bulles vont croître jusqu'à atteindre une taille critique, et imploser en libérant des quantités significatives d'énergie. Localement, des températures supérieures à 5000 K et des pressions supérieures à 200 MPa peuvent être atteintes. Lorsque ces bulles implosent à proximité d'une surface, la cavitation se déroule de manière asymétrique, et des micro-jets se forment en direction de cette surface (comme représenté sur la Figure 1-26).

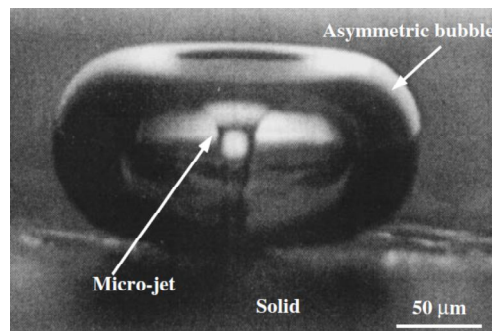


Figure 1-26 : Micrographie d'un microjet d'eau (tiré de [59])

C'est cette propriété qui est mise à profit lors d'extractions assistées par ultrasons : les hautes températures et pressions générées par les micro-jets vont détruire les parois cellulaires, et le contenu des cellules peut alors être libéré dans le milieu. L'avantage principal des extractions assistées par ultrasons réside dans les temps d'extraction relativement courts comparés à ceux nécessaires pour une extraction non assistée par ultrasons. L'inconvénient majeur réside dans le non renouvellement du solvant (l'extraction peut alors être limitée par le coefficient de partage). [54] L'efficacité de ce type d'extraction est généralement similaire ou légèrement inférieure à celle d'une extraction Soxhlet, mais la reproductibilité est moindre.

## 6) Applications aux microalgues : comparaison des efficacités

De nombreuses études se sont focalisées sur la comparaison de plusieurs techniques d'extraction de lipides appliquées aux microalgues. Malgré tout, il semble difficile de rationaliser et généraliser les résultats décrits dans la littérature, tant les couples souche de

microalgue/technique d'extraction peuvent varier d'une étude à une autre. Néanmoins, quelques éléments de réponse vont être fournis dans les paragraphes suivants.

*a- Influence du solvant d'extraction*

Les extractions sont, de manière générale, extrêmement dépendantes des solvants utilisés, et toutes les études ne s'accordent pas sur l'influence de la nature du solvant d'extraction sur les rendements d'extraction. D'une part, il semblerait que les mélanges de solvant polaire et de solvant moyennement polaire permettent de maximiser la quantité de lipides extraits. En effet, le solvant polaire permettrait de libérer les lipides impliqués dans des complexes protéines-lipides, tandis que le solvant moins polaire permettrait leur solubilisation, comme le montre une étude réalisée sur *Chlorella vulgaris* (rendement maximal pour un mélange chloroforme et méthanol). [60] A l'inverse, dans une autre étude, pour deux des trois microalgues testées (*Phaeodactylum tricornerum* et *Nannochloropsis granulata*), les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus avec un solvant polaire : l'éthanol (alors que pour la troisième espèce, *Botryococcus braunii*, c'est également un mélange chloroforme/méthanol qui a permis d'obtenir un rendement maximal). [61]

Une seule publication traite de l'utilisation d'éther méthylique pour l'extraction de lipides de microalgues. [62] Ce solvant, partiellement miscible à l'eau, permet de pénétrer la couche de solvation entourant la biomasse. Possédant un point d'ébullition très bas (-24 °C), il est utilisé sous forme liquéfié (il ne nécessite donc aucun chauffage, contrairement aux solvants organiques usuels). A la fin du processus, l'application d'une simple dépression permet de le volatiliser. Sur cinq souches de microalgues (deux *Oscillatoria agardhii*, deux *Microcystis aeruginosa*, et une *Monoraphidium Chlorophyta*), cette technique s'est révélée être presque aussi efficace qu'une extraction de type Bligh et Dyer (le rapport des rendements d'extraction entre les deux méthodes est supérieur à 98% pour toutes les souches testées). Cependant, les lipides extraits par l'éther méthylique ont montré des teneurs en carbone et hydrogène plus fortes, et des teneurs en oxygène et azote plus faibles que ceux extraits par B&D, leur conférant ainsi des pouvoirs calorifiques potentiellement plus élevés.

Le CO<sub>2</sub> supercritique en tant que solvant d'extraction des lipides a été largement étudié. De manière générale, les rendements d'extraction sont plus faibles que les rendements obtenus par des méthodes plus classiques (type B&D). Néanmoins, le CO<sub>2</sub> supercritique présente une sélectivité plus importante vis-à-vis de certains lipides, notamment l'acide

docosahexaénoïque (Figure 1-27), laissant suggérer une application pour des produits à hautes valeurs ajoutées. [63], [64]

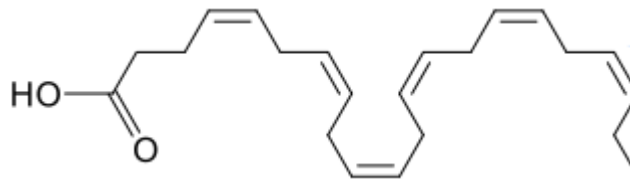


Figure 1-27 : Structure de l'acide docosahexaénoïque

Pour d'autres auteurs, des rendements similaires sont obtenus entre une extraction au CO<sub>2</sub> supercritique et une extraction par Soxhlet à l'hexane. [65], [66] La technique présente alors un intérêt en terme de cinétique, puisque l'extraction par Soxhlet est vingt fois plus lente.

D'autres solvants ont été, jusqu'à présent, peu ou pas étudiés. Une publication récente traite de l'utilisation de la *N,N*-diméthylcyclohexylamine comme solvant d'extraction. [67] Il s'agit d'un solvant dont les propriétés d'hydrophobie ou d'hydrophilie dépendent de la présence ou non de CO<sub>2</sub> dissous. Ainsi, après extraction des lipides de *Botryococcus braunii* par ce solvant, le bullage de CO<sub>2</sub> permet de le rendre hydrophile, menant à une séparation effective des lipides, sans distillation de solvant. Si l'utilisation de ce type de solvant permet de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques chlorés et/ou inflammables, les rendements d'extraction sont deux fois plus faibles que ceux obtenus par Soxhlet CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2 : 1, v/v).

Enfin, l'utilisation de terpènes comme substitut à l'hexane a également été étudiée récemment. [68] Les terpènes sont des hydrocarbures de formule (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>, pouvant être obtenus à partir de ressources renouvelables. Des extractions réalisées en parallèle par Soxhlet avec du *d*-limonène, de l' $\alpha$ -pinène, du *p*-cymène, et de l'hexane sur *Chlorella vulgaris* ont montré que des rendements d'extraction légèrement meilleurs sont obtenus avec les terpènes (1,29% ; 0,91 % ; 1,52% respectivement pour les terpènes, contre 0,88% pour l'hexane). De plus, ces solvants semblent présenter les mêmes sélectivités vis-à-vis des lipides, puisque les différents extraits présentent le même profil chromatographique.

#### *b- Extractions en conditions estérifiantes*

Lorsque les lipides extraits sont destinés à la production de biodiesel, il peut être intéressant de réaliser une extraction en conditions estérifiantes, en s'affranchissant ainsi des

deux étapes classiques d'extraction puis de saponification/estérification. Cependant, de même qu'une extraction « classique » est dépendante des solvants utilisés, les extractions en conditions estérifiantes sont extrêmement dépendantes des réactifs utilisés.

Quatre réactifs d'estérification *in situ* ont été testés sur *Botryococcus braunii* et *Synechocystis sp.* : un mélange méthanol/acide chlorhydrique/chloroforme, un mélange méthanol/acide chlorhydrique/hexane, un mélange méthanol/chlorure d'acyle (AcCl), et un mélange méthanol/benzène/chlorure d'acyle. [69] Pour ces deux souches, les rendements d'extraction les plus élevés ont été obtenus en présence d'un mélange AcCl/MeOH (5/100, v/v). Par ailleurs, il est important de noter que dans le cas de *B. braunii*, ce rendement est 2,2 fois plus élevé que celui obtenu par une extraction de type Folch.

Une extraction par estérification *in situ* (méthanol acidifié par 1,8% d'acide sulfurique) a également été testée sur *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis suecica* et *Chlorella sorokiniana*, et comparée à des extractions au CHCl<sub>3</sub>/MeOH assistées respectivement par ultrasons et par microondes. [70] Dans ce cas, pour les trois espèces étudiées, les meilleurs rendements ont été obtenus pour l'extraction assistée par ultrasons suivi de l'extraction en conditions estérifiantes.

L'extraction en conditions estérifiantes pour la production de biocarburant présente un avantage intéressant par rapport à d'autres types d'extraction. La comparaison entre une extraction de type Soxhlet CHCl<sub>3</sub>/MeOH et une estérification *in situ* en présence de toluène et de chlorure d'acyle a montré que, bien que les rendements d'extraction soient plus élevés par Soxhlet, de nombreux composés non estérifiables sont également extraits. [61] *A contrario*, l'extraction en conditions estérifiantes permet d'isoler exclusivement des esters d'acides gras. De plus, lors de cette même étude, il a été montré que l'extraction Soxhlet CHCl<sub>3</sub>/MeOH n'était pas quantitative, puisqu'une extraction en conditions estérifiantes de la fraction non extractible par Soxhlet a permis d'extraire des acides gras supplémentaires. L'estérification *in situ* semble donc être une méthode de choix pour l'isolement d'esters d'acides gras, permettant d'obtenir à la fois de bons rendements d'extraction et une bonne sélectivité.

### *c- Influence d'un traitement externe*

De nombreux traitements peuvent être appliqués aux microalgues en amont de l'extraction, ou simultanément à celle-ci. Ces traitements ont généralement pour but de fragiliser les parois cellulaires, afin de favoriser l'extraction des lipides.

Plusieurs techniques de rupture cellulaire (sonication, congélation/dégel, broyage à billes) ont été appliquées sur plusieurs espèces de microalgues au préalable d'une extraction au  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/1, v/v). [60] Si pour une unique extraction, le broyage à bille permet d'augmenter le rendement d'extraction d'environ 7% par rapport aux autres techniques, lorsque deux extractions successives sont réalisées, l'application d'un prétraitement semble devenir inutile, car il n'apporte plus aucune amélioration de rendement d'extraction, et ne modifie aucunement la nature des classes lipidiques extraites (lipides neutres vs. glycolipides vs. phospholipides). De la même manière, une étude menée sur *Pavlova sp.* a montré que l'application d'un broyage à billes au préalable d'une extraction Soxhlet ou d'une extraction au  $\text{CO}_2$  supercritique favorisait de 13,3% et 72,1% respectivement l'extraction des lipides. [71]

Différentes conditions d'extraction assistées par ultrasons ont été testées sur *Chlorella vulgaris*. [72] Toutes ces extractions ( $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  ou encore isopropanol/hexane) ont fourni de meilleurs rendements (52,5%, 10,9%, 16,1% et 2,2% respectivement) qu'une extraction Soxhlet à l'acétone, pour laquelle un rendement faible de 1,8% a été obtenu. Néanmoins, un autre facteur pourrait permettre d'expliquer cette différence. En effet, l'acétone, utilisée pour l'extraction Soxhlet, n'est pas connue pour être un excellent solvant d'extraction des lipides, contrairement aux mélanges  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  ou  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  utilisés pour les extractions assistées par ultrasons. Malgré tout, d'autres études corroborent l'effet positif des ultrasons. Ce prétraitement est celui qui a permis d'obtenir les meilleurs rendements en lipides sur deux des trois espèces de microalgues étudiées (*Chlorella sp.* et *Nostoc sp.*), en comparaison avec des prétraitements par microondes, chocs osmotiques, ou autoclavage. [73] Pour la dernière espèce (*Tolypothrix sp.*), l'application de microondes a permis d'obtenir le meilleur rendement, même si l'utilisation des ultrasons a permis d'augmenter le rendement d'extraction par rapport à une extraction sans rupture cellulaire.

Ainsi, l'intérêt des microondes ne semble être également plus à prouver. Une étude portant sur *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris*, et *Scenedesmus sp.* a permis de démontrer l'efficacité des microondes comme prétraitement des microalgues avant une extraction de

type B&D. [74] Les rendements d'extraction ont ainsi été multipliés par des facteurs variant entre deux et quatre en fonction de l'espèce étudiée. Des résultats intéressants sont également obtenus lorsque les microondes sont appliquées pendant le processus d'extraction. Des rendements d'extraction similaires ont été obtenus par une extraction Soxhlet (EtOH : CHCl<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O, 10/5/4, v/v/v) et une extraction assistée par microondes (éthanol, auquel 40% d'esters méthyliques d'huile de soja ont été ajoutés). [75] Si la seconde méthode ne permet pas d'augmenter la quantité de lipides extraits, elle permet néanmoins de s'affranchir de l'utilisation de solvants toxiques tels que le chloroforme, et les durées d'extraction mises en jeu sont nettement moins importantes (20 minutes, contre 8 heures pour le Soxhlet). Le facteur ayant la plus grande influence sur l'extraction assistée par microondes est probablement la température. En effet, l'augmentation de celle-ci a engendré une augmentation du rendement d'extraction (32% à 80 °C, puis 38% à 100 °C puis 56,6% à 120 °C), même si les lipides extraits à plus hautes températures ne sont pas tous saponifiables (glycolipides et phospholipides), et donc peu intéressants pour l'application biodiesel proposée dans l'étude.

Des traitements chimiques peuvent également être appliqués dans le but de fragiliser les membranes cellulaires. Dès les années 1970, des quantités minimales d'acide chlorhydrique (quelques gouttes) ont été utilisées en mélange avec un solvant d'extraction. [76] Sur la vingtaine de microalgues étudiée, les rendements ont pu être améliorés de 3% (*Chlorella* *Euglena*) à presque 400% (*Fragillaria construens*).

Enfin, dans le domaine des biocarburants, un paramètre important à prendre en compte est la nature des lipides isolés. En effet, la présence d'acides gras sous forme libre n'est pas souhaitable car elle générerait de l'eau durant l'étape d'estérification. Il a été montré que l'ajout d'isopropanol avant une extraction, ou la lyophilisation de la biomasse permettent de désactiver les lipases, responsables de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres. [60] Il semble donc nécessaire d'appliquer l'un de ces deux prétraitements, afin de s'assurer de la qualité du biodiesel final.

#### *d- Vers des extractions en voie humide*

Dans la plupart des processus d'extraction des lipides des microalgues, l'étape préalable de séchage est celle qui réclame le plus d'énergie. C'est pourquoi de plus en plus d'études portent sur de nouveaux procédés, permettant d'utiliser une biomasse initiale humide. Ainsi,

des extractions aqueuses par voie enzymatique ont pu voir le jour. Les enzymes ont pour rôle d'hydrolyser les parois polysaccharidiques des microalgues, et ainsi de favoriser la libération des lipides intracellulaires. Des expériences menées sur des pâtes de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus*, et *Nannochloropsis sp.*, contenant 82% d'eau, ont montré que 49,8%, 46,8% et 11,7% respectivement des lipides totaux peuvent être extraits par voie enzymatique, après un prétraitement par ultrasons. [77]

Une autre possibilité est d'appliquer un choc osmotique aux microalgues. C'est le choix qui a été fait par une équipe coréenne pour l'étude d'une pâte de *Chlamydomonas reinhardtii* contenant 99,4% d'eau. [78] L'utilisation de chlorure de sodium à une concentration de 60 g/L (compromis entre l'efficacité et des aspects environnementaux), combiné à une extraction par un mélange hexane : méthanol (7 : 3, v/v), a permis de doubler le rendement d'extraction, par rapport à une extraction en voie humide classique (sans choc osmotique).

## 7) Conclusions

Qu'elle soit appliquée dans un but de caractérisation, de quantification ou de valorisation à l'échelle industrielle, l'extraction de lipides de microalgues représente une étape à laquelle beaucoup d'attention doit être portée. En effet, les rendements d'extractions et la nature des lipides extraits sont fonction de nombreux paramètres :

- croissance des microalgues : la biosynthèse des lipides peut être affectée par les conditions de culture des microalgues (exposition à la lumière, stress physiologique...);
- technique d'extraction employée : la nature des lipides extraits est dépendante du type d'extraction choisi (à chaud ou à froid, assistée par ultrasons ou non...) ainsi que par la nature du solvant (polaire ou apolaire, seul ou en mélange).

Quel que soit le processus d'extraction choisi (Tableau 1-VIII, Tableau 1-XI), il est important de garder en mémoire les facteurs environnementaux (utilisation de solvants organiques toxiques) et énergétiques (lyophilisation, chauffage des solvants...) afin de trouver le meilleur compromis possible entre ces aspects, et les rendements d'extraction.

## **IV – Liquéfaction hydrothermale**

Tableau 1-VIII : Conditions d'obtention des meilleurs rendements d'extraction lipidique de microalgues

Microalgues étudiées	Type d'extraction	Solvant	Rendement (%)	Référence
<i>Oscillatoria agardhii</i>			13	
<i>Monoraphidium chlorophyta</i>	Bligh and Dyer	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1/1, v/v)	20	[62]
<i>Microcystis aeruginosa</i>			12	
<i>Chlorella vulgaris</i>			3,4	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Bligh and Dyer	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	15,1	[77]
<i>Scenedesmus dimorphus</i>			10,6	
<i>Nannochloropsis sp.</i>			16,0	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Bligh and Dyer assistée par ultrasons	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (5/10/4, v/v/v))	52,5	[72]
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Bligh and Dyer assistée par microondes	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	44	[70]
<i>Tetraselmis suecica</i>			23	
<i>Chlorella sorokiniana</i>			23,5	
<i>Synechocystis sp.</i>			18,4	
<i>Synechocystis elongatus</i>			17,7	
<i>Chlorella sp.</i>	Bligh and Dyer assistée par ultrasons	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	42,6	[73]
<i>Nostoc sp.</i>			36	
<i>Tolypothrix sp.</i>	Bligh and Dyer assistée par microondes	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	32	[73]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Bligh and Dyer assistée par microondes	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1/1, v/v)	9	[74]
<i>Scenedesmus sp.</i>			10	
<i>Botryococcus sp.</i>			28	
<i>Pavlova sp.</i>	Solvant assistée par ultrasons	AcOEt/MeOH (2/1, v/v)	44,7	[71]
<i>Botryococcus braunii</i>	Esterification in situ	AcCl/MeOH (5/100, v/v)	12,1	[69]
<i>Synechocystis sp.</i>			7,4	
<i>Botryococcus braunii</i>	Soxhlet	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	52	[67]
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Soxhlet	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	47,8	[75]
<i>Nannochloropsis granulata</i>	Soxhlet	EtOH	31,5	[61]
<i>Botryococcus braunii</i>		CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	34	
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>		EtOH	23,5	
<i>Botryococcus braunii</i>	Soxhlet	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v) + 3 gouttes d'HCl 11M	52,6	[76]
<i>Chlorococcum oleofaciens</i>			21,6	
<i>Chlorosarcinopsis negevensis</i>			43	
<i>Chlorella Euglena</i>			22,6	
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>			28,1	
<i>Fragillaria construens</i>			16	
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>			19,9	
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Fluide supercritique Soxhlet	CO <sub>2</sub> Hexane	25	[65]
<i>Spirulina platensis</i>	Fluide supercritique Soxhlet	CO <sub>2</sub> Hexane	7,8	[66]

Tableau 1-IX : Avantages et inconvénients des différentes techniques d'extraction lipidique

Technique d'extraction	Avantages	Inconvénients
Bligh and Dyer, Folch	Simplicité de mise en œuvre Pas de dégradation thermique	Solvants toxiques et inflammables Filtration nécessaire Evaporation du solvant Rendement fonction de la limite de solubilité
Extraction assistée par ultrasons	Simplicité de mise en œuvre Durée d'extraction faible Coût faible de l'appareillage	Filtration nécessaire Volumes de solvant élevés
Extraction assistée par microondes	Durée d'extraction faible Consommation limitée de solvant	Coût de l'appareillage Filtration nécessaire Solvants polaires nécessaires Dégradations thermiques éventuelles Réactions chimiques parasites éventuelles
Soxhlet	Simplicité de mise en œuvre Coût de l'appareillage Pas de limitation due à la limite de solubilité Pas de filtration Bonne reproductibilité	Solvants toxiques et inflammables Extraction non-sélective Durée d'extraction élevée Dégradations thermiques éventuelles Perte des composés volatils Consommation énergétique élevée Evaporation du solvant Volumes de solvant élevés
Fluide supercritique	Durée d'extraction faible Pas d'utilisation de solvants organiques Extraction sélective Consommation énergétique moyennement élevée Elimination facile du fluide Pas de filtration	Coût de l'appareillage Pureté élevée des fluides Optimisation des paramètres

Dans le cadre de la recherche de combustibles alternatifs, les traitements thermiques de biomasses (qu'elles soient cellulosiques, ligno-cellulosiques ou ligneuses) sont des processus de plus en plus étudiés actuellement (Figure 1-28).

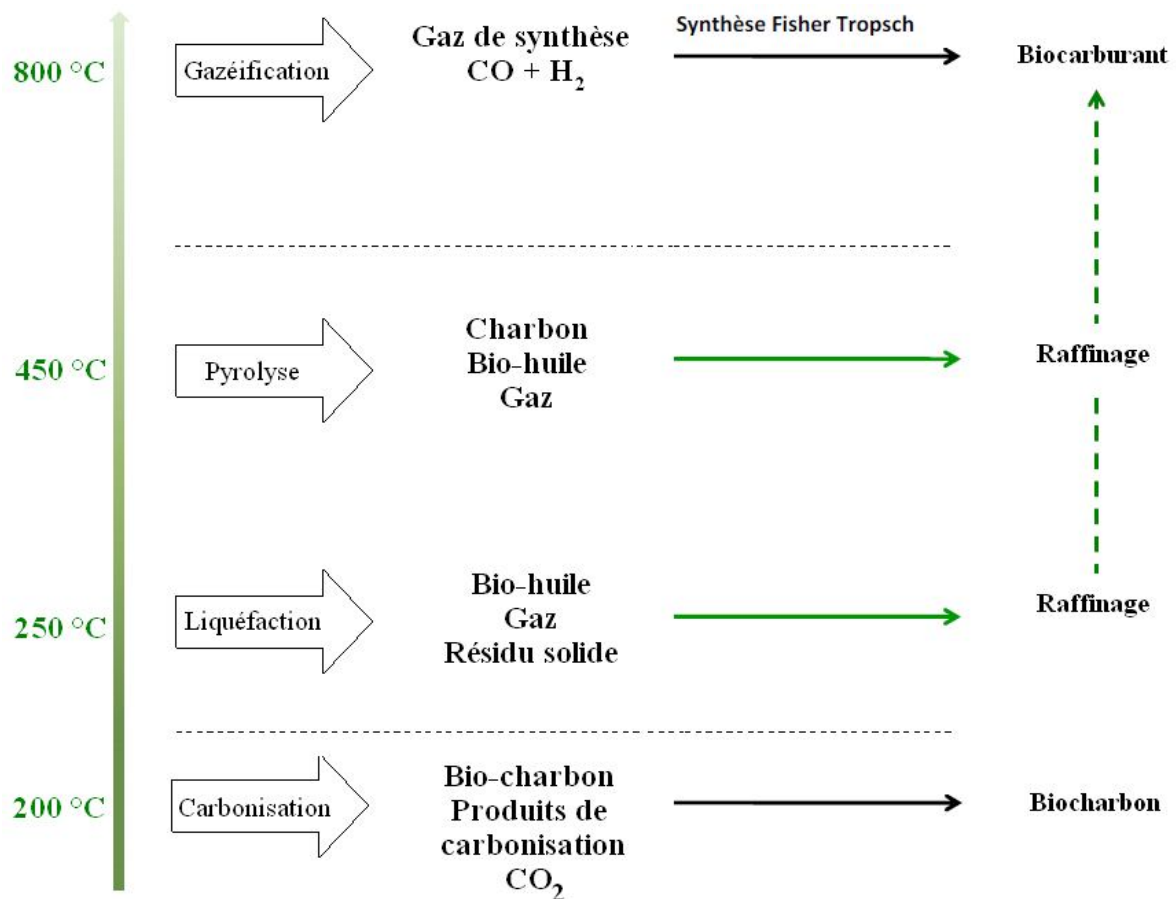


Figure 1-28 : Procédés de conversion thermique de la biomasse

Parmi tous ces processus thermo-chimiques, la liquéfaction hydrothermale semble particulièrement intéressante, car elle mime les conditions dans lesquelles le pétrole s'est naturellement formé (hautes pressions, hautes températures). De plus, elle offre l'avantage de se dérouler en milieu aqueux (l'eau subcritique jouant à la fois le rôle de solvant et de réactif). Ce type de procédé ne nécessite ainsi aucun séchage préalable de la biomasse (étape très énergivore), contrairement à d'autres procédés de conversion thermique, comme la pyrolyse.

La liquéfaction hydrothermale permet, dans des conditions optimales, d'obtenir une bio-huile qui, une fois raffinée, peut être utilisée comme biocarburant. Il semble donc cohérent de penser que cette huile, ou tout du moins une partie de cette huile, puisse être utilisée comme substitut au bitume.

En effet, comme indiqué sur la Figure 1-29, les biomasses sont nettement plus oxygénées ( $O/C=0,4$  pour la lignine,  $O/C=0,7$  pour le bois) que les bitumes ( $O/C < 0,1$ ). La liquéfaction hydrothermale semble donc être la voie idéale pour diminuer la teneur en oxygène *via* des réactions de déshydratation (élimination d'eau) et de décarboxylation (élimination de dioxyde de carbone), et ainsi aboutir à un rapport  $O/C$  se rapprochant de celui de produits pétroliers.

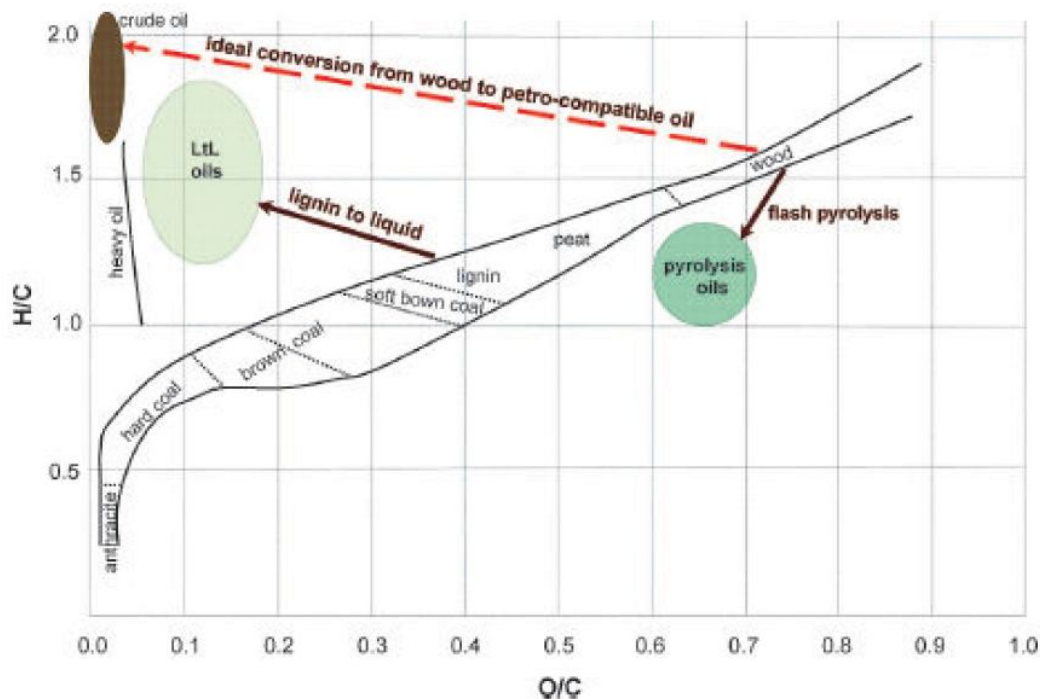


Figure 1-29 : Diagramme de Van Krevelen de différentes matières d'origine fossile ou végétale [79]

Des huiles possédant des caractéristiques chimiques proches de celles de bitumes ont d'ores et déjà été obtenues par une équipe de recherche travaillant sur la liquéfaction hydrothermale de macroalgues en vue de l'obtention de biocarburant [80], mettant ainsi en évidence tout le potentiel de ce type de procédé. Cependant, aucune caractérisation rhéologique de ces huiles n'a été menée.

Comme dans tout procédé de conversion thermochimique, la liquéfaction de la biomasse conduit à un mélange complexe de composés organiques liquides, de composés hydrosolubles, de résidus solides et de gaz. Nombreux sont les paramètres influençant la formation de l'une ou l'autre de ces fractions. La nature de la biomasse utilisée, la température (généralement entre 250 °C et 350 °C) et la durée du processus, la présence éventuelle d'un catalyseur ou encore le rapport biomasse/eau, sont autant de paramètres à prendre en compte pour obtenir un rendement maximal en bio-huile. Le premier paragraphe de cette partie concernera donc le comportement et les propriétés de l'eau en milieu

subcritique. Le deuxième paragraphe sera axé sur les mécanismes réactionnels mis en jeu lors de la liquéfaction hydrothermale, en se focalisant sur les trois grandes familles constitutives des microalgues. Le troisième paragraphe traitera de l'étude des différents paramètres susceptibles d'influencer les rendements en huile et leur nature. Quant au dernier paragraphe, il permettra de fournir quelques éléments de réponses à propos de la rhéologie de ces bio-huiles.

### 1) L'eau en milieu subcritique

Afin de comprendre au mieux les réactions susceptibles de se dérouler lors d'un processus hydrothermal, il est nécessaire d'avoir au préalable une bonne connaissance du milieu dans lequel se déroulent ces réactions.

#### *a- Relation pression/température*

En enceinte close, il est assez aisé de relier la pression auto-générée par la pression de vapeur saturante en fonction de la température appliquée. Entre 100 °C et 200 °C, une bonne approximation de la pression absolue en bars (erreur inférieure à 5%) est apportée par la loi empirique de Duperray (équation 7) :

$$P = \left(\frac{T}{100}\right)^4 \quad (7)$$

Avec T : température en °C

P : pression en bars

Pour des températures plus élevées, cette loi empirique s'éloigne de la loi réelle de Clausius-Clapeyron (équation 8), d'autant plus que la température est élevée (Figure 1-30).

$$P_2 = P_1 e^{\frac{L}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)} \quad (8)$$

Avec L : chaleur latente de vaporisation de l'eau considérée effectuée à pression constante

R : constante des gaz parfaits

P<sub>1</sub> et T<sub>1</sub> : pression et température (en K) de l'état initial

$P_2$  et  $T_2$  : la pression et la température (en K) de l'état final

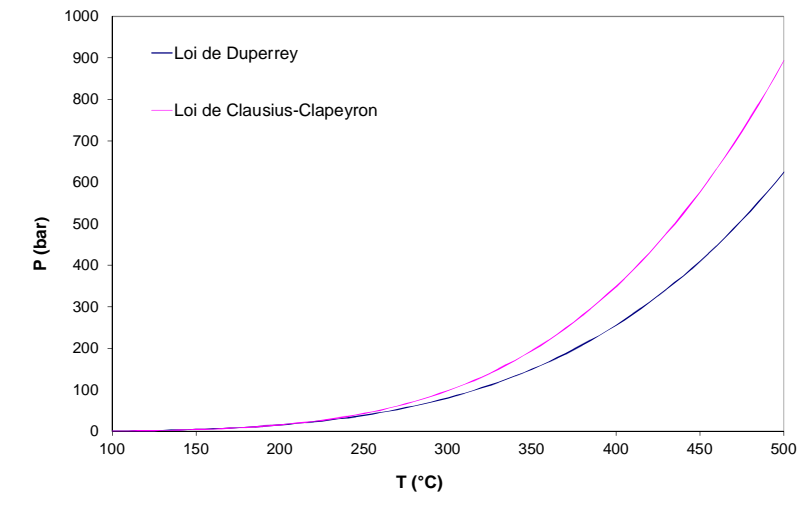


Figure 1-30 : Evolution de la pression de vapeur saturante de l'eau en fonction de la température

### *b- Propriétés physico-chimiques*

L'eau en milieu subcritique est caractérisée par une température inférieure à 374,15 °C (température critique de l'eau) et une pression égale ou supérieure à la pression de vapeur saturante de l'eau. Dans cet état, l'eau présente des propriétés physico-chimiques tout à fait particulières, différant à la fois de l'eau à température ambiante et de l'eau supercritique (Tableau 1-X). [81].

La diminution importante de la constante diélectrique avec la température (d'un facteur 3 pour une eau à 250 °C et 5 MPa), entraîne deux conséquences :

- une augmentation de la solubilité des composés organiques, grâce à une constante diélectrique se rapprochant de celle de solvants organiques dans des conditions usuelles (Figure 1-31). La solubilité des composés ioniques quant à lui diminue ;
- une diminution de l'énergie d'activation pour une réaction dont la polarité de l'état de transition est supérieure à celle de l'état initial. [82]

L'eau subcritique voit également son produit ionique augmenté d'environ trois ordres de grandeur. Elle est ainsi nettement plus riche en ions  $H_3O^+$  et  $HO^-$  que l'eau à température ambiante, entraînant ainsi une accélération des réactions catalysées en milieux acides et basiques. Au contraire, en milieu supercritique, un effondrement du produit ionique est

observé (Figure 1-32). Enfin, la viscosité dynamique et la masse volumique subissent une diminution progressive avec la température.

Tableau 1-X : Comparaison des propriétés de l'eau dans différents états

	Eau standard	Eau subcritique		Eau supercritique
<b>T (°C)</b>	25	250	350	400
<b>P (MPa)</b>	0,1	5	25	25
<b><math>\rho</math> (g.cm<sup>-3</sup>)</b>	1	0,8	0,6	0,1 – 0,3
<b><math>\epsilon</math> (F.m<sup>-1</sup>)</b>	78,5	27,1	14,1	5,9
<b>pK<sub>e</sub></b>	14,0	11,2	12	19,4
<b><math>\eta</math> (mPa.s)</b>	0,89	0,11	0,064	0,03

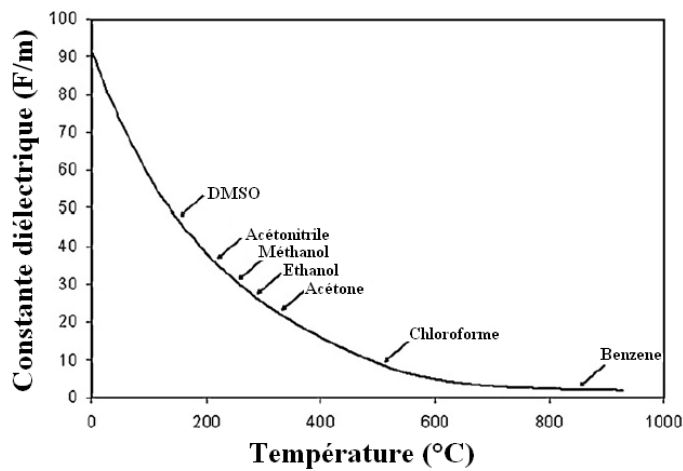


Figure 1-31 : Evolution de la constante diélectrique de l'eau en fonction de la température et comparaison avec des solvants organiques usuels [83]

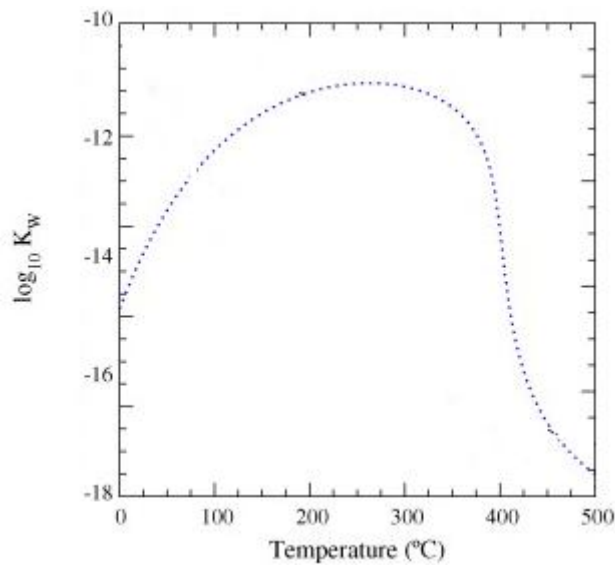


Figure 1-32 : Evolution du produit ionique de l'eau avec la température sous une pression de 30 MPa (adapté de [84])

## c- Réactivité

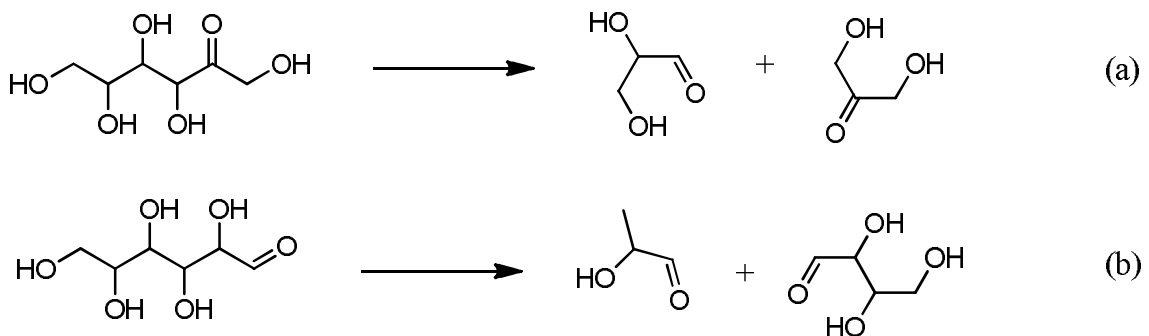
Dans des conditions subcritiques, l'eau ne joue pas seulement le rôle de solvant, mais joue également le rôle de réactif. Ainsi, ses propriétés de catalyse acido-basique sont communément admises, de par la formation d'ions hydroxyde et oxonium issus de son autoprotolyse. Elle permet également de catalyser certaines réactions par stabilisation d'états de transition. Enfin, elle intervient ainsi dans des réactions d'hydrolyse, de (dés)hydratation, de condensation, ou encore d'oxydoréduction. [82]

## 2) Mécanismes réactionnels en conversion hydrothermale

## a- Conversion hydrothermale des polysaccharides [85], [86]

En conditions hydrothermales, les polysaccharides subissent assez rapidement (la vitesse serait dépendante du degré de cristallinité) une dépolymérisation par hydrolyse, entraînant un relargage dans le milieu réactionnel des différentes unités oligo- et mono-saccharidiques les constituant (glucose, xylose, mannose...). Ces monosaccharides vont subir à leur tour des transformations chimiques.

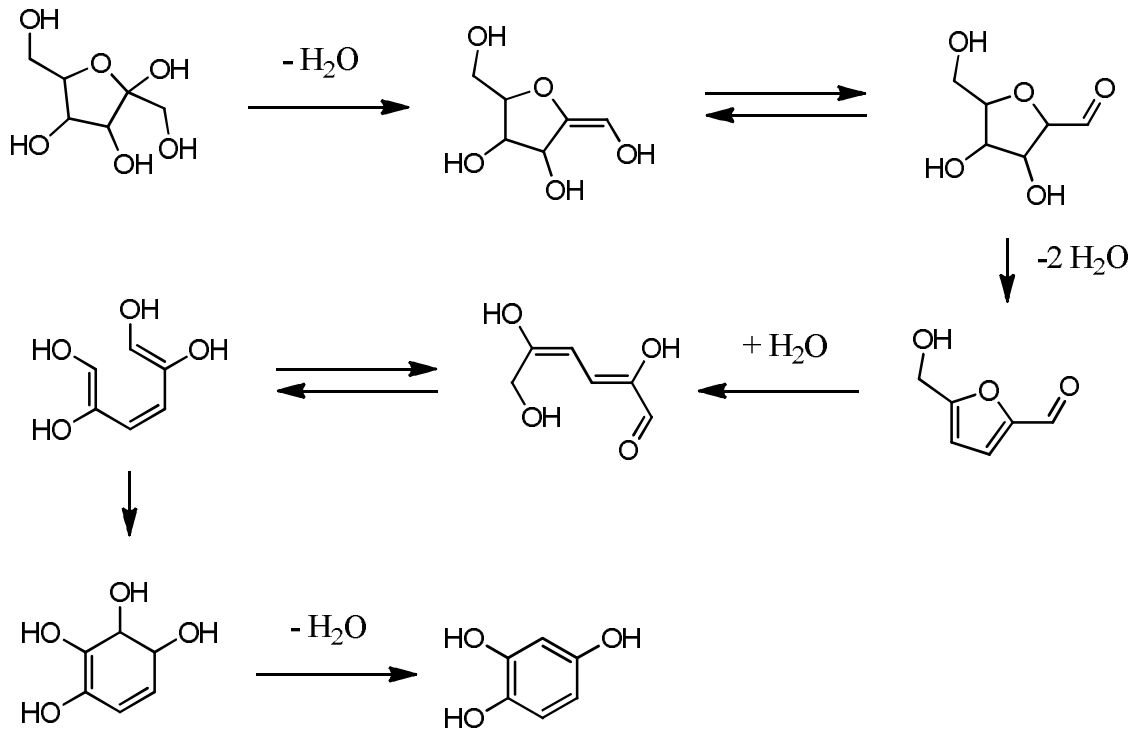
Une des voies de conversion des monosaccharides réside dans leur rétro-aldolisation, aboutissant à la formation d'hydroxycétones ou d'hydroxyaldéhydes (Réaction 1-3, [87]).



Réaction 1-3 : Rétroaldolisation du fructose en glycéraldéhyde et dihydroxycétone (a) et du glucose en glycoaldéhyde et érythrose (b)

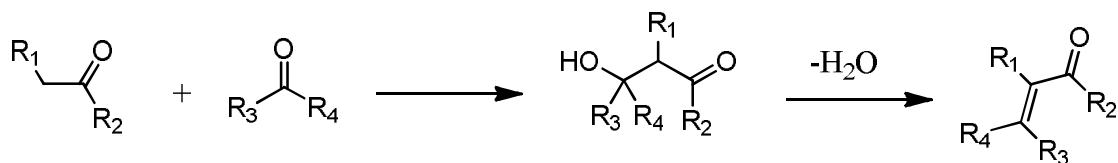
Ceux-ci peuvent par la suite subir des oxydations partielles, grâce au pouvoir légèrement oxydant de l'eau subcritique. Ainsi, les produits de conversion finaux obtenus par cette voie sont composés principalement d'acides carboxyliques, de cétones et d'aldéhydes.

Une autre voie de conversion aboutit à la formation de composés insaturés aromatiques. Ils sont obtenus par déshydratation des oses, en cycles furaniques. Par la suite, ceux-ci peuvent se réarranger en carbonyles insaturés conjugués, ou encore en cycles benzéniques hydroxylés. Cette voie est dite « voie d'aromatisation directe » (Réaction 1-4).



Réaction 1-4 : Exemple de voie d'aromatisation directe appliquée au fructose

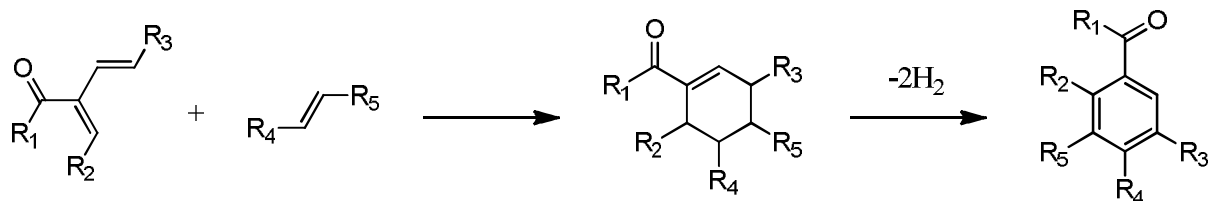
La dernière voie est appelée « voie d'aromatisation indirecte » et est formée par différentes réactions de condensation. Les premières sont l'aldolisation et la céto-lisation des composés carbonylés, qui sont généralement suivies d'une réaction de déshydratation, menant à la formation d'aldéhydes et cétones insaturées (réaction de crotonisation, Réaction 1-5).



Réaction 1-5 : Réaction de crotonisation

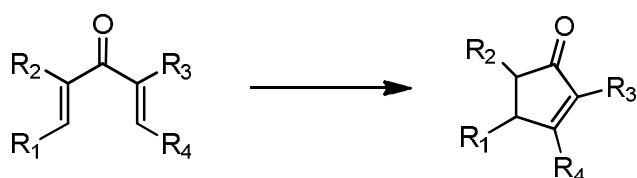
Les produits de crotonisation peuvent ensuite intervenir dans différents types de réactions :

- des réactions de cycloadditions de Diels-Alder, formant des cyclohexènes substitués. Il s'en suit une réaction de déshydrogénation, conduisant à la formation de cycles benzéniques substitués (Réaction 1-6) ;



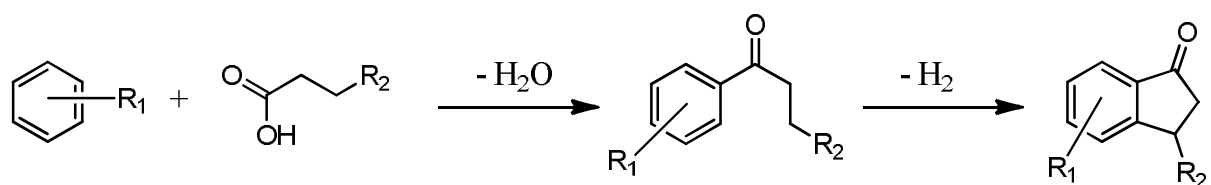
**Réaction 1-6 : Cycloaddition de Diels-Alder entre un produit de crotonisation et un alcène, suivie d'une déshydrogénation**

- des réactions de condensation intramoléculaire aboutissant à la formation de cyclopentènonnes (Réaction 1-7).



**Réaction 1-7 : Réaction de condensation intramoléculaire des produits de crotonisation**

Enfin, les dernières réactions à prendre en compte ici sont des réactions d'alkylation et d'acylation de cycles aromatiques. Elles sont à l'origine de l'apparition de composés aromatiques polycycliques, par des réactions ultérieures de cyclisation intramoléculaire (Réaction 1-8).



**Réaction 1-8 : Exemple de formation de composés aromatiques polycycliques**

La Figure 1-33 présente un bilan des cascades réactionnelles ayant lieu en conditions hydrothermales en présence de polysaccharides.

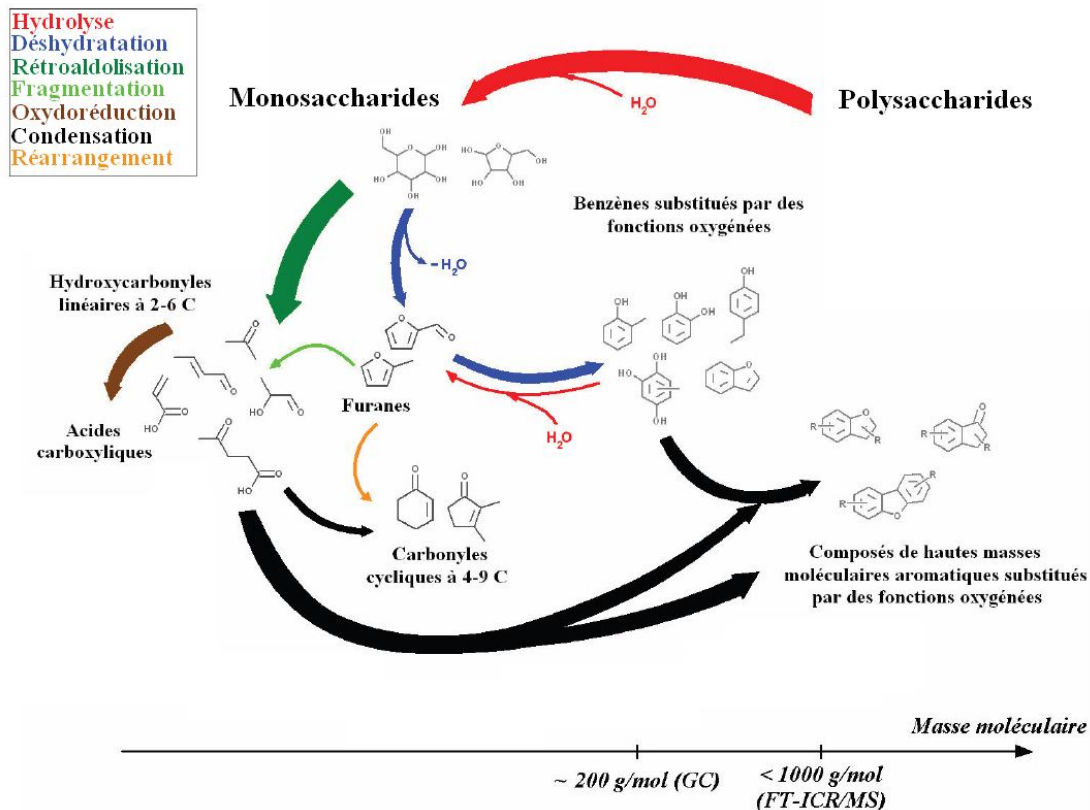


Figure 1-33 : Schéma réactionnel de la conversion hydrothermale des polysaccharides (l'épaisseur des flèches indiquant l'importance de la voie réactionnelle) [85]

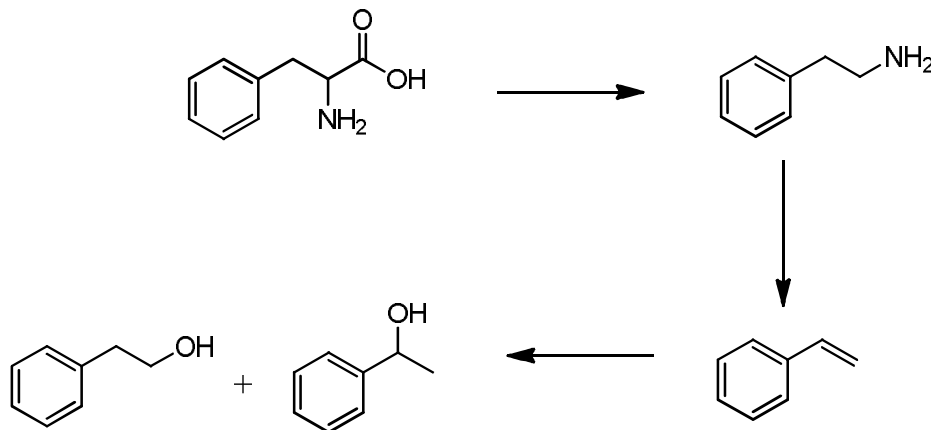
### b- Conversion hydrothermale des lipides

Dans une étude menée récemment aux Etats-Unis, le beurre a été choisi comme composé modèle pour représenter le comportement des lipides en liquéfaction hydrothermale. [88] Dans les conditions testées (300 °C, 30 minutes,  $P_i(N_2)=0,65$  MPa, teneur en solide de 20%), un rendement en bio-huile de 90% a été obtenu (contre 5,6% de gaz et 3,9% de produits hydrosolubles). Cette valeur ne semble pas surprenante, mais il est intéressant de constater que cette bio-huile est uniquement constituée d'acides gras libres, provenant de l'hydrolyse des triglycérides. Ces résultats sont cohérents avec une autre étude, dans laquelle il a été montré que lorsque les lipides se trouvent sous forme de triglycérides, comme dans les huiles végétales, leur liquéfaction hydrothermale aboutit à la formation d'acides gras libres et de glycérol. Les acides gras libres ne semblent donc pas subir de décarboxylation en conditions hydrothermales. [89] Dans une autre étude, l'oléate d'éthyle a été choisi comme composé modèle des lipides. [90] En conditions hydrothermales, l'hydrolyse de cet ester a été observée, avec une cinétique d'autant plus importante que la température était élevée.

### c- Conversion hydrothermale des protéines

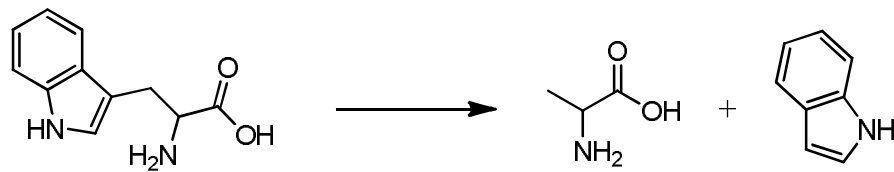
Plusieurs acides aminés ont été étudiés en liquéfaction hydrothermale comme composés modèles des protéines. En effet, en conditions hydrothermales, les protéines subissent dans un premier temps une hydrolyse des liaisons peptidiques, entraînant ainsi un relargage d'acides aminés dans le milieu réactionnel.

En conditions douces (température inférieure à 300 °C), la phénylalanine est principalement convertie en phényléthylamine par décarboxylation. [90] Dans des conditions plus sévères (à 350 °C), la formation de styrène est observée, provenant probablement de la déamination de la phényléthylamine. Enfin, pour des temps de séjour suffisamment longs, le styrène peut subir des réactions d'hydratation pour former du 1- et du 2-phényléthanol (Réaction 1-9).

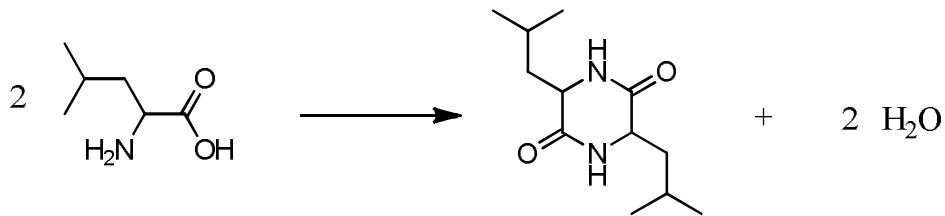


**Réaction 1-9 : Chemin réactionnel de la phénylalanine en conditions hydrothermales**

La liquéfaction d'albumine d'œuf (protéine dont la masse molaire est d'environ 65 000 g/mol) en conditions hydrothermales a montré un chemin préférentiel vers la production de produits hydrosolubles (69,9% des produits de liquéfaction). Le rendement en bio-huile n'atteint, quant à lui, que 19,9%. [88] Une diminution de la température entraîne une diminution de la conversion en bio-huile (3,2% à 200 °C) en faveur de la conversion en produits hydrosolubles (81,0%). Aux basses températures (230 °C), la bio-huile est principalement composée d'hétérocycles azotés tels que des indoles ou des pipérazinediones (probablement issus respectivement de la dégradation du tryptophane, Réaction 1-10, et de la condensation de la leucine sur elle-même, Réaction 1-11).

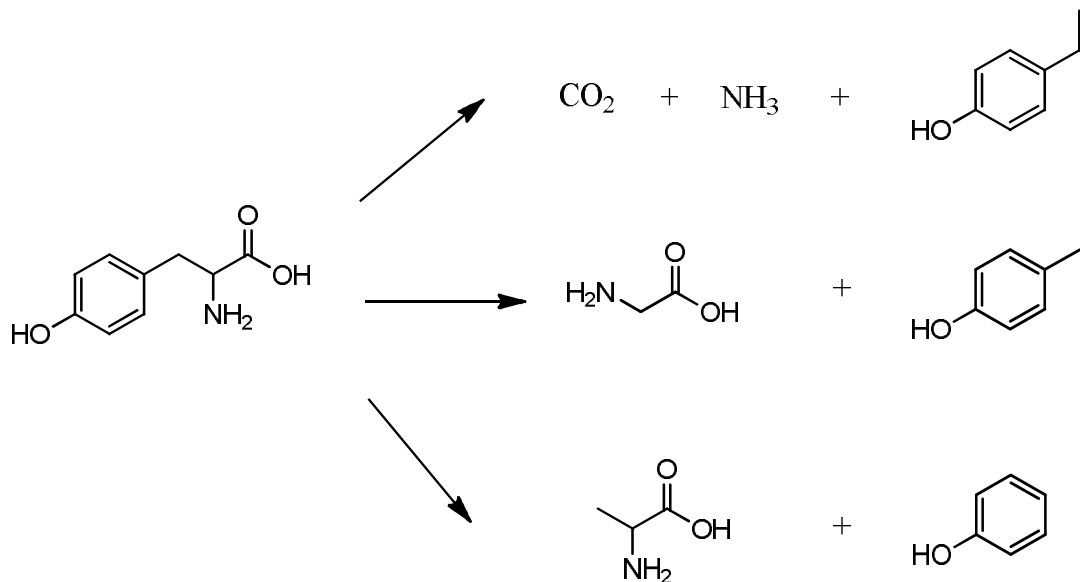


Réaction 1-10 : Dégradation du tryptophane en conditions hydrothermales



Réaction 1-11 : Condensation de la leucine sur elle-même en conditions hydrothermales

Aux plus hautes températures (300 °C), des hétérocycles azotés similaires sont également retrouvés, mais les chromatogrammes présentent des pics supplémentaires, correspondant à la présence d'acides carboxyliques et d'amides (de longueur de chaîne d'autant plus élevée que la température augmente), ainsi que des cycles phénoliques (potentiellement issus de la dégradation de la tyrosine, Réaction 1-12) et des acétamides à courtes chaînes.



Réaction 1-12 : Dégradation de la tyrosine en conditions hydrothermales

#### *d- Conversion hydrothermale des pigments*

La chlorophylle est un pigment présent chez de nombreuses microalgues. Par conséquent, il est intéressant d'étudier sa conversion en conditions hydrothermales. Etant donnée sa

structure, il peut être pertinent d'étudier comme composé modèle le phytol, un alcool terpénique constituant la queue lipophile de la chlorophylle (Figure 1-34). [90]

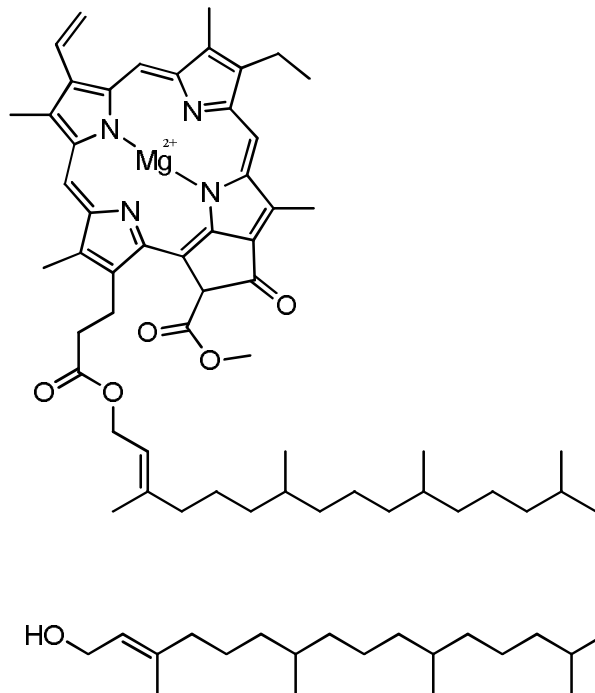


Figure 1-34 : Structure de la chlorophylle a (en haut) et du phytol (en bas)

Selon les conditions expérimentales, le phytol peut subir différentes réactions :

- une déshydratation, menant à la formation d'isomères du néophytadiène ;
- un réarrangement allylique en isophytol ;
- des oxydations en acide phyténique ou en phyténal ;
- des hydrogénations, entraînant la formation de dihydrophytol ;

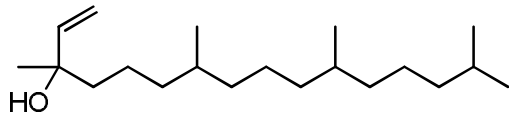
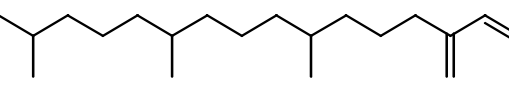
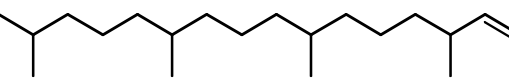
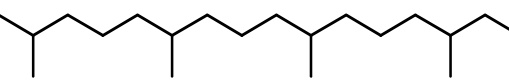
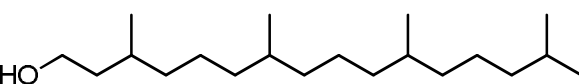
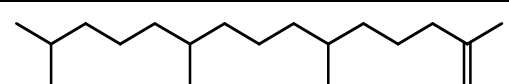
Tous ces produits de liquéfaction peuvent à leur tour subir des transformations :

- l'hydrogénation du néophytadiène mène à la formation d'isomères du phytène, pouvant eux aussi subir une hydrogénation, menant à la formation du phytane ;
- l'acide phyténique peut être décarboxylé en pristène ;
- l'addition d'eau sur le phyténal entraîne la formation d'un  $\beta$ -aldol, qui peut par la suite subir une rétroaldolisation entraînant la formation de phytone.

Pour des températures inférieures ou égales à 300 °C et des temps de séjour de 40 minutes, les produits de liquéfaction sont majoritairement constitués de néophytadiène et d'isophytol. Lorsque les températures et les temps de séjour sont plus élevés, les

concentrations en pristène, phytène, phytane et dihydrophytol augmentent (Tableau 1-XI). Enfin, l'application de conditions sévères (350 °C) favorise la formation de composés à hauts poids moléculaires insolubles, par des phénomènes d'oligomérisation.

**Tableau 1-XI : Principaux produits obtenus lors de la liquéfaction hydrothermale du phytol**

Nom	Structure
Isophytol	
Néophytadiène	
Phytène	
Phytane	
Dihydrophytol	
Pristène	

#### *e- Réactivité des mélanges binaires*

S'il est bien évident qu'il est important de connaître le comportement de chaque composé de manière isolé, il est plus important encore de comprendre les interactions qu'ils peuvent avoir entre eux, en termes de réactivité, mais aussi de cinétique.

Ainsi, il a été montré qu'en présence de phénylalanine et d'acide oléique, l'ammoniac formé par la déamination de l'acide aminé entraîne une amidification de l'acide gras (formation du 9-octadécénamide). Cet acide gras peut également réagir avec la phényléthylamine issue de la phénylalanine (Réaction 1-9), pour former le *N*-phényléthyl-9-octadécénamide. [90]

En présence de sucres et d'acides aminés, il est reconnu que des réactions de Maillard peuvent se dérouler. Cette réaction se déroule en plusieurs étapes, dont les deux premières sont :

- une réaction entre le groupement carbonyle d'un sucre (sous sa forme ouverte) et la fonction amine d'un acide aminé, menant à la formation d'une glycosylamine N-substituée ;
- un réarrangement de la glycosamine en cétosamines.

Ces réactions peuvent amener à la formation de composés dérivés de la pyrazine.

### 3) Facteurs influençant les rendements de conversion hydrothermale

#### *a- Effet de la température*

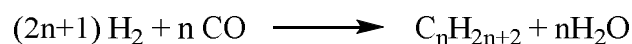
Dans toutes les expériences de liquéfaction hydrothermale, il semble exister un optimum de température pour maximiser le rendement en bio-huile, ce rendement et cette température étant dépendants de la biomasse considérée. Une étude sur la cyanobactérie *Spirulina platensis* [91] a montré qu'une augmentation de la température engendre une augmentation de ce rendement jusqu'à 350 °C (avec un rendement de 39,9% pour une concentration de 20% et un temps de réaction de 60 minutes). Au-delà de cette température, une diminution du rendement est observée. Des résultats similaires ont été observés sur *Enteromorpha prolifera* [92]. Pour cette macroalgue, une augmentation du rendement en bio-huile est également observée de 220 °C à 300 °C (avec un rendement de 20,4% pour un temps de réaction de 30 minutes et une charge de 13%). Une autre étude [80], menée sur *Laminaria saccharina* a également mis en évidence l'importance du paramètre température, avec une augmentation de la teneur en bio-huile avec une augmentation de température. L'optimum se situe à 350 °C, pour un rendement de 19,3% (temps de réaction de 15 minutes, pour une charge de 10%). *Dunaliella tertiolecta* présente le même comportement, avec une augmentation du rendement en huile jusqu'à 360 °C, puis une diminution au-delà (probablement à cause de l'effondrement du produit ionique en conditions supercritiques). [93] La même tendance a pu être observée sur des biomasses plus « exotiques », comme du fumier de bovins. [94] Pour cette étude, l'optimum de température se situe aux alentours de 310 °C, avec une conversion en bio-huile quasi-nulle pour des températures inférieures à 260 °C et des températures supérieures à 360 °C.

Le paramètre température apparaît donc être primordial dans le processus de liquéfaction hydrothermale. Il demande à être optimisé au cas par cas, même si des températures comprises entre 300 °C et 350 °C sont généralement celles permettant l'obtention d'un maximum d'huile. Des températures plus élevées favoriseraient à la fois l'apparition de radicaux libres dans le milieu - augmentant ainsi la probabilité de repolymérisation - et les processus de gazéification (pour des températures supérieures à la température critique de l'eau). [95]

*b- Effet de la pression et de la nature du gaz*

Peu d'études ont été menées sur l'effet éventuel de la présence d'un gaz exogène, de sa nature et de sa pression. Néanmoins, une équipe a balayé une large gamme de nature de gaz (air, monoxyde de carbone, diazote et dihydrogène) et de pressions (variant entre une pression atmosphérique et 0,69 MPa), lors d'une étude portant sur la liquéfaction de lisier de bovin. [94]

Les autres paramètres de liquéfaction étant fixés, les meilleurs rendements en bio-huile ont été obtenus en présence de monoxyde de carbone (48,8%, devant le dihydrogène - 44,7% - et le diazote - 38,5% -, et loin devant l'air - 28,0%). Ceci peut s'expliquer en partie par la formation d'alcane par réaction entre le CO injecté dans l'enceinte de liquéfaction et le H<sub>2</sub> produit au cours de l'expérience (réaction de Fischer-Tropsch, Réaction 1-13).



**Réaction 1-13 : Réaction de Fischer-Tropsch**

Cette même étude a montré que pour un gaz donné, la teneur en bio-huile diminuait avec l'augmentation de la pression initiale exogène (la teneur en huile est divisée par plus de 5 en passant d'une atmosphère de CO à 0,01 MPa à une atmosphère de CO à 0,7 MPa). Cet effet n'a pas été observé lors de la liquéfaction de *Chlorella pyrenoidosa*. [96] En effet, les mêmes rendements en huile ont été obtenus pour des pressions initiales en N<sub>2</sub> variant de 0 à 0,7 MPa.

*c- Effet du temps de réaction*

Le temps est un autre paramètre pouvant influencer énormément les résultats d'expériences menées en conditions hydrothermales. En effet, un temps de réaction

insuffisant ne permettra pas la formation d'une fraction organique hydroinsoluble, tandis qu'un temps trop long engendrera des réactions de condensation et de polymérisation qui aboutiront à des fractions solides plus importantes. Ainsi, l'étude menée sur *Laminaria saccharina* a montré qu'un temps de réaction de 15 minutes à 350 °C était suffisant pour obtenir le maximum de fraction huileuse. Sur *Spirulina platensis*, un temps plus important d'une heure est nécessaire pour la même température. Pour ces deux études, une augmentation du temps de réaction a engendré une diminution du rendement en huile.

Ce comportement n'a pas été observé sur *Enteromorpha prolifera*, pour laquelle 30 minutes à 300 °C permettent d'atteindre le maximum de bio-huile. Cependant, ce rendement ne diminue pas avec une augmentation du temps réactionnel jusqu'à une heure.

Un comportement opposé a même été observé lors d'expérimentations menées sur *Chlorella pyrenoidosa*. [96] En effet, pour les différentes températures testées (240 °C, 260 °C et 280 °C), le rendement n'a cessé d'augmenter avec l'augmentation du temps de séjour (de 0 à 120 minutes).

A l'instar de la température, le temps de réaction est donc un paramètre à optimiser pour chaque étude. Le temps semble également avoir une influence sur la composition même de la bio-huile.

#### *d- Effet du rapport biomasse/liquide*

Quelques auteurs ont étudié l'influence de la teneur en biomasse dans l'autoclave sur la formation d'huile. Sur la macroalgue *Laminaria saccharina*, différents essais ont été menés à 350 °C pendant une heure avec des teneurs en biomasse allant de 5% à 20%. Le maximum d'huile a été obtenu pour une charge de 10% (3 g d'algues pour 30 mL d'eau). [80] Les essais réalisés sur *Spirulina platensis* ont montré qu'à partir d'une concentration de 20%, le rendement en huile est maximal et n'évolue plus avec une augmentation de la concentration jusqu'à 50%. [91] Sur *Dunaliella tertiolecta*, les rendements de conversion et les rendements en bio-huile les plus élevés ont été obtenus en diminuant les concentrations massiques de 17,5% à 7,5%. [93] Enfin, des teneurs en biomasse comprises entre 1% et 10% ont été testées dans une étude récente menée sur *Chlorella sp.* et *Spirulina sp.*, dans une unité pilote de liquéfaction hydrothermale en continue. [97] Les résultats ont montré que pour la teneur la

plus faible (1%), les rendements en bio-huile étaient significativement inférieurs aux rendements obtenus avec des teneurs plus élevées.

Ces études indiquent que le ratio optimal est dépendant de l'espèce étudiée, et des paramètres physiques et énergétiques doivent également être pris en compte. En effet, si une teneur élevée en biomasse permet de réduire la dépense énergétique liée à la vaporisation de l'eau, elle entraîne également une diminution de la quantité d'eau disponible pouvant d'une part solubiliser, et d'autre part réagir avec les composés issus des microalgues.

#### *e- Effet de la vitesse de chauffe*

Des études ont montré qu'une vitesse de chauffage lente favorise la formation de cendres, suite à de nombreuses réactions secondaires. Néanmoins, des vitesses de chauffage trop élevées aboutissent à une formation prédominante de gaz aux dépens des bio-huiles. Cet effet a été démontré sur une biomasse composée d'un mélange de 18 plantes vivaces. [98] Le rendement en bio-huile a ainsi augmenté de manière logarithmique (de 61–63 % à 73–76 %) en passant d'un chauffage à 5 °C/min à un chauffage à 140 °C/min.

Il a été montré qu'une variation de la vitesse de chauffage entraîne une modification des pourcentages d'huile, de gaz et de résidu solide, sans pour autant affecter la composition chimique de chacune de ces phases. Quant à la vitesse de refroidissement, elle n'affecte ni la distribution entre les différentes phases, ni la composition chimique. [99]

#### *f- Effet des catalyseurs*

Certaines études portent sur l'ajout d'un catalyseur dans le milieu réactionnel, dans le but d'augmenter le taux de conversion de la biomasse, et de rendre cette conversion plus sélective. Les catalyseurs homogènes les plus étudiés sont principalement des sels basiques de types hydroxydes, carbonates et sulfates. Une étude menée sur une biomasse lignocellulosique à 250 °C pendant 15 minutes, [100] a mis en évidence l'amélioration du rendement en huile et en produits solubles dans l'eau au détriment de résidus solides en présence de différents catalyseurs, le plus efficace étant le carbonate de potassium (Tableau 1-XII). La nature du contre ion de l'espèce basique a donc une influence significative sur la distribution des différents produits :

- un gain de 6,7% est observé en passant de l'hydroxyde de sodium à l'hydroxyde de potassium, et un gain de 10,7% est observé en passant du carbonate de sodium au carbonate de potassium ;
- l'influence de l'espèce basique est moins importante puisque l'amélioration des rendements en huile n'est comprise qu'entre 0,6 et 5% en passant d'un catalyseur de type hydroxyde à un catalyseur de type carbonate (pour un même contre-ion).

**Tableau 1-XII : Distribution des produits de liquéfaction hydrothermale de bois en présence de différents catalyseurs [100]**

<b>Solution (0,94 M)</b>	<b>Huile (% en poids)</b>	<b>Gaz (% en poids)</b>	<b>Résidu solide (% en poids)</b>	<b>Solubles dans l'eau (% en poids)</b>
Eau	8,6	9,7	41,7	40,0
NaOH	22,4	12,0	14,0	51,6
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	23,0	11,5	11,5	54,0
KOH	28,7	11,8	8,6	50,9
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	33,7	11,0	4,0	51,3

Une étude menée l'année suivante par la même équipe [101] a montré que la composition de la phase huileuse varie selon la concentration en catalyseur (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) utilisée. Ainsi, par exemple, le benzènediol et certains de ses dérivés sont observés pour une concentration en catalyseur de 0,94 M alors que des concentrations inférieures (0,47 M et 0,235 M) n'ont pas permis de mettre en évidence la formation de ce type de composés.

Certaines études portent sur la comparaison du pouvoir catalytique de ces sels basiques avec, par exemple, des catalyseurs de nickel. La voie réactionnelle de la biomasse lignocellulosique semble être différente en présence de ces deux types de catalyseur [102]. Si la présence d'un catalyseur basique comme Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> favorise la stabilisation de l'huile, un catalyseur à base de nickel favoriserait dans un premier temps la création de produits solubles dans l'eau. Pour des temps de réaction plus longs et/ou des températures plus élevées, il catalyserait les réactions de reformage à la vapeur et de méthanisation, pour obtenir finalement majoritairement une phase gazeuse.

Des tendances similaires ont été observées lors de la liquéfaction de *Spirulina platensis*. [103] En effet, sur les trois catalyseurs testés (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> et NiO), seul le premier a permis d'augmenter les rendements en bio-huile, de plus de 10%. Des diminutions des

rendements en bio-huile de 5% et 9% ont été observées lors de l'utilisation respective de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  et NiO.

Différents catalyseurs hétérogènes ont également été testés sur *Nannochloropsis sp.* [104] Une augmentation des rendements en bio-huile a été observée en présence des différents catalyseurs testés (Pd/C, Pt/C, Ru/C, Ni/SiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CoMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, zéolithe) lorsque les expériences ont été menées sous hélium. L'efficacité des catalyseurs n'a plus été observée lorsque les réactions ont été menées sous pression élevée en dihydrogène. Dans ces conditions, des rendements similaires ont été obtenus en présence ou en absence de catalyseurs. Il est à noter que les auteurs ont également reporté la variabilité qualitative de la viscosité des huiles en fonction du catalyseur étudié.

#### 4) Rhéologie des bio-huiles

Très peu de données concernant les propriétés rhéologiques des huiles issues de liquéfactions hydrothermales sont accessibles, les recherches portant plutôt sur leur pouvoir énergétique. Néanmoins, il semble que les viscosités des huiles issues de la liquéfaction hydrothermale de biomasses soient nettement plus élevées que celles d'huiles issues de pyrolyses flash ou que celles de produits pétroliers : 15 000 mPa.s à 61 °C, [105] 30 à 200 mPa.s à 40 °C, [106], 180 mPa.s à 50 °C [85] respectivement.

Les seules données concernant des huiles de liquéfaction de microalgues (*Dunaliella tertiolecta*) montrent des tendances similaires, avec des viscosités à 50 °C comprises entre 150 et 15 000 mPa.s selon les conditions de réaction. [107] Une augmentation de la température de liquéfaction semble induire une légère diminution de la viscosité. L'augmentation du temps réactionnel engendre également une diminution de la viscosité, mais de manière plus significative. L'influence d'un éventuel catalyseur (dans l'étude, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% en poids) sur les propriétés de viscosité n'a pas été clairement démontrée.

Cependant, les huiles issues d'un processus de liquéfaction hydrothermale semblent avoir une faible stabilité au cours du temps, due à des phénomènes d'oxydation et de polymérisation pouvant se dérouler à température ambiante. C'est pourquoi les propriétés telles que la viscosité sont fortement susceptibles d'évoluer. Une des solutions à ce type de problème pourrait résider dans l'ajout d'un agent stabilisant, donneur de liaisons hydrogène, comme la tétraline. [108]

## 5) Conclusions

La liquéfaction hydrothermale semble donc être une voie tout particulièrement prometteuse pour l'obtention d'une phase organique hydrophobe à partir de microalgues. En effet, d'une part, elle se déroule en milieu aqueux, permettant ainsi de s'affranchir d'étapes de séchage de biomasses extrêmement gourmandes en énergie. D'autre part, elle permet d'obtenir des rendements en bio-huile supérieurs à la teneur en lipides de la biomasse initiale. Les protéines, mais aussi les polysaccharides participent donc également à la formation de cette bio-huile.

Cependant, les paramètres à optimiser pour ce type de procédé sont nombreux :

- la température : la courbe rendement/température suit généralement une forme en cloche, avec un maximum entre 300 °C et 350 °C ;
- le temps de réaction : un temps de réaction trop court n'aboutira pas à la formation d'huile, tandis qu'un temps de réaction long favorisera l'apparition d'une fraction résiduelle solide ;
- le catalyseur : la nature, ainsi que la concentration du catalyseur peuvent favoriser, ou encore inhiber la formation de bio-huile ;
- la phase gazeuse : l'absence en phase gaz de composés oxygénés semblerait favoriser la production de bio-huile tandis qu'une pression initiale trop élevée en gaz exogène aurait l'effet inverse.

Tous ces paramètres sont autant de critères à prendre en compte afin d'obtenir des rendements en bio-huile les plus élevés possibles. Ceux-ci varient de manière générale entre 20% et 40%, comme indiqué dans le Tableau 1-XIII, avec un rendement maximum de 64% obtenu par une équipe japonaise travaillant sur *Dunaliella tertiolecta*. [115]

## **V – Conclusions**

Initialement considéré comme un sous-produit de l'industrie pétrolière, le bitume est devenu aujourd'hui un matériau indispensable dans le domaine de la construction routière. En effet, il permet à la fois d'assurer la cohésion des chaussées, mais aussi de relaxer les

Tableau 1-XIII : Conditions d'obtention des meilleurs rendements en bio-huile sur des micro- et macro- algues  
(PA : pression atmosphérique, np : non précisé)

Espèces d'algues	Température (°C)	Pression initiale (MPa)	Nature du gaz	Temps (min)	Concentration massique (biomasse : eau)	Catalyseur	Rendement en bio-huile (%)	Référence
<i>Spirulina platensis</i>	310	PA	N <sub>2</sub>	30	1 : 3	-	38	[109]
<i>Spirulina platensis</i>	350	20	N <sub>2</sub>	60	1 : 4	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5%)	51,6	[103]
<i>Spirulina platensis</i>	350	20	N <sub>2</sub>	60	1 : 4	-	39,9	[91]
<i>Spirulina sp.</i>	350	PA	Air	60	1 : 9	KOH (50%)	13,6	[110]
<i>Spirulina sp.</i>	300	6,5	N <sub>2</sub>	30	1 : 4	-	32,6	[111]
<i>Spirulina sp.</i>	350	PA	Air	60	1 : 9	-	28,6	[112]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	360	PA	Air	30	1 : 10	-	36,9	[93]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	360	PA	Air	50	1 : 10	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5%)	25,8	[113]
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	300	30	N <sub>2</sub>	5	np	-	43,8	[107], [114]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	280	PA	N <sub>2</sub>	120	1 : 4	-	39,4	[96]
<i>Chlorella vulgaris</i>	350	PA	Air	60	1 : 9	KOH (50%)	9,0	[110]
<i>Chlorella vulgaris</i>	350	PA	Air	60	1 : 9	-	35,7	[112]
<i>Botryococcus braunii</i>	300	PA	N <sub>2</sub>	60	1 : 14	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5%)	64	[115]
<i>Nannochloropsis salina</i>	350	PA	N <sub>2</sub>	30	1 : 3	-	46	[109]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	350	PA	Air	60	1 : 9	-	34,3	[112]
<i>Nannochloropsis sp.</i>	350	0,69	He	60	np	-	43	[116]
<i>Nannochloropsis sp.</i>	350	PA	Air	60	1 : 4	-	39	[117]
<i>Nannochloropsis sp.</i>	350	0,7	He	60	1 : 3	Pd/C (50%)	57	[104]
<i>Microcystis viridis</i>	340	30	N <sub>2</sub>	30	1 : 19	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5%)	33	[118]
<i>Porphyridium cruentum</i>	350	PA	Air	60	1 : 9	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (50%)	22,9	[112]
<i>Chaetomorpha linum</i>	395	30	N <sub>2</sub>	60	np	-	8	[119]
<i>Enteromorpha prolifera</i>	300	20	N <sub>2</sub>	30	1 : 6,5	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5%)	23	[92]
<i>Laminaria saccharina</i>	350	PA	Air	15	1 : 9	-	19,3	[80]
<i>Sargassum patens</i>	340	30	N <sub>2</sub>	15	1 : 9	-	32,1	[120]

contraintes auxquelles celle-ci est soumise. De par son mode de production, l'approvisionnement en bitume est extrêmement dépendant des quantités de pétrole disponibles. Or celles-ci sont appelées à diminuer fortement, voire disparaître, dans les cinquante prochaines années. La nécessité de lui trouver des matériaux de substitution se fait donc de plus en plus urgente.

De manière idéale, ces nouveaux matériaux seraient totalement biosourcés, afin d'éviter toute dépendance vis-à-vis de ressources non renouvelables. Cet aspect a déjà été longuement étudié, puisque le premier liant routier alternatif a été proposé il y a plus de vingt ans. Depuis, ce domaine s'est développé, et à l'heure actuelle, sont déjà commercialisés des fluxants végétaux, ainsi que des liants routiers alternatifs principalement composés d'huiles et de résines végétales. L'inconvénient principal de ces matériaux réside dans le fait que les huiles utilisées entrent en compétition avec la nutrition humaine. Il est donc important d'explorer de nouvelles solutions, en privilégiant des matières premières encore non valorisées.

Les microalgues sont une alternative prometteuse. En effet, à l'heure actuelle, le potentiel de cette biomasse n'est pas entièrement exploité. D'une part, ces microorganismes offrent la promesse de pouvoir un jour s'affranchir des ressources non renouvelables, telles que le pétrole, notamment dans le domaine des carburants. Cette promesse a entraîné un essor de l'industrie des microalgues, même si de nombreux verrous technologiques restent encore à lever afin d'atteindre cet objectif. D'autre part, la production d'un co-produit, tel qu'un substitut au bitume, pourrait s'avérer être une solution crédible aux coûts élevés de production des biocarburants algaux.

La problématique de l'utilisation de microalgues pour réaliser un liant routier réside dans l'obtention d'un matériau viscoélastique et thermosusceptible. Plusieurs voies peuvent être envisagées :

- la valorisation de lipides, possédant intrinsèquement les caractères viscoélastiques et thermofusibles recherchés. Le choix de la technique d'extraction devra alors être guidé par des considérations économiques et environnementales ;
- la valorisation de la biomasse dans sa globalité *via* l'application d'un processus thermochimique judicieusement choisi.

Quel que soit le processus choisi, celui-ci devra s'insérer dans une vision globale d' « algo-raffinerie », en laissant à la matière première sa valorisation la plus noble.

## Bibliographie

- [1] *La fabrication par distillation directe*, Site internet du Groupement Professionnel des Bitumes, consulté le 27.09.12 et disponible à l'adresse : [http://www.bitume.info/rub\\_bitume\\_B2.htm](http://www.bitume.info/rub_bitume_B2.htm).
- [2] *Norme NF EN 12597 - Bitume et liants bitumineux - Terminologie*, **2002**.
- [3] *Asphalt (Bitumen)*, *Concise International Chemical Assessment Document*, No. 59, World Health Organization, **2004**.
- [4] E. Gasthauer, M. Mazé, J. Marchand, J. Amouroux. Characterization of asphalt fume composition by GC/MS and effect of temperature. *Fuel* **2008**, 87, 1428 – 1434.
- [5] J. S. Amin, E. Nikooee, M. Ghatee, S. Ayatollahi, A. Alamdari, T. Sedghamiz. Investigating the effect of different asphaltene structures on surface topography and wettability alteration. *Applied Surface Science* **2011**, 257, 8341 – 8349.
- [6] L. W. Corbett. Composition of asphalt based on generic fractionation, using solvent deasphalting, elution-adsorption chromatography, and densimetric characterization. *Analytical Chemistry* **1969**, 41, 576–579.
- [7] F. J. Nellensteyn. The constitution of asphalt. *Journal of the Institute of Petroleum Technology* **1924**, 10, 311–325.
- [8] D. Lesueur. The colloidal structure of bitumen: consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, 145, 42 – 82.
- [9] D. Whiteoak, J. Read, *The Shell Bitumen Handbook*, R. Hunter, ICE Publishing, **2003**.
- [10] D. Lesueur. La rhéologie des bitumes : principes et modification. *Rhéologie* **2002**, 2, 1–30.
- [11] *Norme NF EN 1426 - Bitumes et liants bitumineux - Détermination de la pénétrabilité à l'aiguille*, **2007**.
- [12] *Norme NF EN 1427 - Bitumes et liants bitumineux - Détermination du point de ramollissement - Méthode Bille et Anneau*, **2007**.

- [13] Norme NF EN 12591 - Bitumes et liants bitumineux - Spécifications des bitumes routiers, **2009**.
- [14] J.-M. Jancovici, *Le pic de production, une réalité déjà courante?*, Site internet consulté le 22.11.12 et disponible à l'adresse : [http://www.manicore.com/documentation/petrole/pic\\_passe\\_petrole.html](http://www.manicore.com/documentation/petrole/pic_passe_petrole.html).
- [15] SAADA, *Liant bitumineux, composition et utilisation*, FR2768150 (A1), **1997**.
- [16] Colas, *Obtention de liants routiers à base de bitume et d'une nouvelle gamme de fluxants d'origine naturelle fonctionnalisés*, EP1645595(A1), **2004**.
- [17] Valagro, *Procédé de préparation d'une composition tensioactive à base de bio-tensioactifs non-ioniques d'origine naturelle*, FR2972191 (A1), **2011**.
- [18] O. Pinomaa, *Dyeable pavement material*, US5021476 (A), **1991**.
- [19] Colas, *Liant de nature végétale pour la réalisation de matériaux pour le bâtiment et/ou les travaux publics*, EP1466878(A1), **2004**.
- [20] Eiffage, *Composition comprenant une fraction organique pour la réalisation d'une couche et/ou d'un revêtement de voie ou de bâtiment*, FR2915204(A1), **2007**.
- [21] Shell, *Binder composition and asphalt mixture*, WO2010128105 (A1), **2010**.
- [22] Eurovia, *Liant synthétique essentiellement à base de matières issues de ressources renouvelables, en particulier d'origine végétale, et ses applications en technique routière*, FR2955586(A1), **2010**.
- [23] *Catalogue des revêtements adaptés aux véloroutes, voies vertes, pistes cyclables et bandes cyclables*, Site internet du Conseil Général des Yvelines consulté le 11.01.13 et disponible à l'adresse : [http://www.yvelines.fr/wp-content/uploads/2011/12/Catalogue-des-revetements-VVV\\_v4.pdf](http://www.yvelines.fr/wp-content/uploads/2011/12/Catalogue-des-revetements-VVV_v4.pdf).
- [24] U. de Picardie Jules Verne, *Procédé de fabrication d'un liant, notamment destiné à l'élaboration et/ou l'enrobage de granulats ou encore entrant dans la composition de matrices pour la fabrication de biocomposites*, FR2935375 (A1), **2008**.
- [25] I. N. P. de Toulouse, *Coating material for road construction*, WO2010/003838 (A1), **2010**.

- [26] E. H. Fini, E. W. Kalberer, A. Shahbazi, M. Basti, Z. You, H. Ozer, Q. Aurangzeb. Chemical characterization of bio-binder from swine manure : a sustainable modifier for asphalt binder. *Journal of Materials in Civil Engineering* **2011**, 23, 1506–1513.
- [27] C. R. Williams, M. A. R. Mohamed Metwally, R. C. Brown, *Bio-oil formulation as an asphalt substitute*, WO2011/153152 (A2), **2011**.
- [28] J.-P. Cadoret, O. Bernard. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie* **2008**, 202, 201–211.
- [29] G. Lecointre, H. Le Guyader, *Classification phylogénétique du vivant*, Belin (), **2006**.
- [30] L. Brennan, P. Owende. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2010**, 14, 557 – 577.
- [31] J. Person, *Livre turquoise "Algues, filières du futur"*, Adebitech, **2011**.
- [32] N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquah, G. M. Forde, A. Hoadley. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy* **2010**, 2, 012701–012715.
- [33] P. J. I. B. Williams, L. M. L. Laurens. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy and Environmental science* **2010**, 3, 554–590.
- [34] J. K. Volkman, S. M. Barrett, S. I. Blackburn. Eustigmatophyte microalgae are potential sources of C29 sterols, C22-C28 n-alcohols and C28-C32 n-alkyl diols in freshwater environments. *Organic Geochemistry* **1999**, 30, 307 – 318.
- [35] M. M. S. Cano, M. C. Mulé, G. Z. Caire, D. R. Halperin. Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Journal of Applied Phycology* **1990**, 2, 79–81.
- [36] S. Ohta, T. Chang, A. Kawashima, T. Nagate, M. Murase, H. Nakanishi, H. Miyata, M. Kondo. Anti methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity by linolenic acid isolated from the marine microalga *Chlorococcum* HS-101. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1994**, 52, 673–680.

- [37] J. H. Yim, S. J. Kim, S. H. Ahn, C. K. Lee, K. T. Rhie, H. K. Lee. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Marine Biotechnology* **2004**, *6*, 17–25.
- [38] H. Nagai, M. Satake, T. Yasumoto. Antimicrobial activities of polyether compounds of dinoflagellate origins. *Journal of Applied Phycology* **1990**, *2*, 305–308.
- [39] S. Yingying, W. Changhai, C. Jing. Growth inhibition of the eight species of microalgae by growth inhibitor from the culture of *Isochrysis galbana* and its isolation and identification. *Journal of Applied Phycology* **2008**, *20*, 315–321.
- [40] P. J. Proteau, W. H. Gerwick, F. Garcia-Pichel, R. Castenholz. The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1993**, *49*, 825–829.
- [41] J. Peng, J.-P. Yuan, C.-F. Wu, J.-H. Wang. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine drugs* **2011**, *9*, 1806–1828.
- [42] B. Hille. The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin - A structural hypothesis. *Biophysical journal* **1975**, *15*, 615–619.
- [43] R. S. Norton, R. J. Wells. A series of chiral polybrominated biindoles from the marine blue-green alga *Rivularia firma*. Application of carbon-13 NMR spin-lattice relaxation data and carbon-13-proton coupling constants to structure elucidation. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104*, 3628–3635.
- [44] J. T. Baker. Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. *Hydrobiologia* **1984**, *116-117*, 29–40.
- [45] W. Chaogang, H. Zhangli, L. Anping, J. Baohui. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) in the transgenic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Phycology* **2010**, *46*, 396–402.
- [46] F. Hempel, A. S. Bozarth, Lindenkamp, A. N., Klingl, S. Zauner, U. Linne, A. Steinbüchel, U. G. Maier. Microalgae as bioreactors for bioplastics production. *Microbial Cell Factories* **2011**, *10*, 81–86.

- [47] B. Shi, G. Wideman, J. Wang. A new approach of *BioCO<sub>2</sub>* fixation by thermoplastic processing of microalgae. *Journal of Polymers and the Environment* **2012**, *20*, 124–131.
- [48] T. Otsuki, F. Zhang, H. Kabeya, T. Hirotsu. Synthesis and tensile properties of a novel composite of *Chlorella* and polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, *92*, 812–816.
- [49] A. Schwenzfeier, A. Helbig, P. A. Wierenga, H. Gruppen. Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis sp.* *Food Hydrocolloids* **2013**, *30*, 258 – 263.
- [50] K. L. Kadam. Power plant flue gas as a source of *CO<sub>2</sub>* for microalgae cultivation: economic impact of different process options. *Energy Conversion and Management* **1997**, *38*, supplement, S505 – S510.
- [51] R. Richards, B. Mullins. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. *Ecological Modelling* **2012**, *249*, 59–67.
- [52] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **1957**, *226*, 497–509.
- [53] E. G. Bligh, W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology* **1959**, *37*, 911–917.
- [54] M. D. L. de Castro, L. E. García-Ayuso. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *369*, 1 – 10.
- [55] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibañez. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry* **2006**, *98*, 136 – 148.
- [56] C. S. Eskilsson, E. Björklund. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **2000**, *902*, 227 – 250.
- [57] K. Ganzler, A. Salgó, K. Valkó. Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A* **1986**, *371*, 299 – 306.

- [58] F. Chemat, Z. e Huma, M. K. Khan. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* **2011**, *18*, 813 – 835.
- [59] Y.-J. Chen, L.-W. Huang, T.-S. Shih. Diagnosis of oxide films by cavitation microjet impact. *Materials Transactions* **2003**, *44*, 327–335.
- [60] E. Ryckebosch, K. Muylaert, I. Foubert. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2012**, *89*, 189–198.
- [61] J. McNichol, K. MacDougall, J. Melanson, P. McGinn. Suitability of soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with in situ transesterification. *Lipids* **2012**, *47*, 195–207.
- [62] H. Kanda, P. Li, T. Ikehara, M. Yasumoto-Hirose. Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: extraction yield and properties. *Fuel* **2012**, *95*, 88 – 92.
- [63] R. M. Couto, P. C. Simoes, A. Reis, T. L. Da Silva, V. H. Martins, Y. Sanchez-Vicente. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Engineering in Life Sciences* **2010**, *10*, 158–164.
- [64] S. Tang, C. Qin, H. Wang, S. Li, S. Tian. Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids* **2011**, *57*, 44 – 49.
- [65] G. Andrich, U. Nesti, F. Venturi, A. Zinnai, R. Fiorentini. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis sp.* *European Journal of Lipid Science and Technology* **2005**, *107*, 381–386.
- [66] G. Andrich, A. Zinnai, U. Nesti, F. Venturi, R. Fiorentini. Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (arthrospira) platensis*. *Acta Alimentaria* **2006**, *35*, 195–203.
- [67] A. R. Boyd, P. Champagne, P. J. McGinn, K. M. MacDougall, J. E. Melanson, P. G. Jessop. Switchable hydrophilicity solvents for lipid extraction from microalgae for biofuel production. *Bioresource Technology* **2012**, *118*, 628 – 632.

- [68] C. Dejoye Tanzi, M. Abert Vian, C. Ginies, M. Elmaataoui, F. Chemat. Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules* **2012**, *17*, 8196–8205.
- [69] H.-L. Tran, S.-J. Hong, C.-G. Lee. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from *Botryococcus braunii* LB 572 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2009**, *14*, 187–192.
- [70] B. D. Wahlen, R. M. Willis, L. C. Seefeldt. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 2724 – 2730.
- [71] C.-H. Cheng, T.-B. Du, H.-C. Pi, S.-M. Jang, Y.-H. Lin, H.-T. Lee. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO<sub>2</sub>. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 10151 – 10153.
- [72] G. S. Araujo, L. J. Matos, J. O. Fernandes, S. J. Cartaxo, L. R. Gonçalves, F. A. Fernandes, W. R. Farias. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry* **2013**, *20*, 95 – 98.
- [73] P. Prabakaran, A. Ravindran. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology* **2011**, *53*, 150–154.
- [74] J.-Y. Lee, C. Yoo, S.-Y. Jun, C.-Y. Ahn, H.-M. Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, S75 – S77.
- [75] J. Iqbal, C. Theegala. Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. *Algal Research* **2012**, *2*, 34-42.
- [76] Z. Dubinsky, S. Aaronson. Increase of lipid yields from some algae by acid extraction. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 51 – 52.
- [77] K. Liang, Q. Zhang, W. Cong. Enzyme-assisted aqueous extraction of lipid from microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 11771–11776.
- [78] G. Yoo, W.-K. Park, C. W. Kim, Y.-E. Choi, J.-W. Yang. Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. *Bioresource Technology* **2012**, *123*, 717 – 722.

- [79] M. Kleinert, T. Barth. Towards a lignocellulosic biorefinery: direct one-step conversion of lignin to hydrogen-enriched biofuel. *Energy & Fuels* **2008**, *22*, 1371–1379.
- [80] K. Anastasakis, A. Ross. Hydrothermal liquefaction of the brown macro-alga *Laminaria Saccharina*: effect of reaction conditions on product distribution and composition. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 4876 – 4883.
- [81] S. S. Toor, L. Rosendahl, A. Rudolf. Hydrothermal liquefaction of biomass: a review of subcritical water technologies. *Energy* **2011**, *36*, 2328 – 2342.
- [82] A. Kruse, E. Dinjus. Hot compressed water as reaction medium and reactant: properties and synthesis reactions. *The Journal of Supercritical Fluids* **2007**, *39*, 362 – 380.
- [83] A. G. Carr, R. Mammucari, N. Foster. A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal* **2011**, *172*, 1 – 17.
- [84] A. A. Peterson, P. Vontobel, F. Vogel, J. W. Tester. In situ visualization of the performance of a supercritical-water salt separator using neutron radiography. *The Journal of Supercritical Fluids* **2008**, *43*, 490 – 499.
- [85] J. Barbier, *Relation structure/réactivité en conversion hydrothermale des macromolécules de lignocellulose*, , Université Bordeaux I, **2010**.
- [86] J. Barbier, N. Charon, N. Dupassieux, A. Loppinet-Serani, L. Mahé, J. Ponthus, M. Courtiade, A. Ducrozet, A.-A. Quoineaud, F. Cansell. Hydrothermal conversion of lignin compounds. A detailed study of fragmentation and condensation reaction pathways. *Biomass and Bioenergy* **2012**, *46*, 479 – 491.
- [87] B. M. Kabyemela, T. Adschiri, R. M. Malaluan, K. Arai. Glucose and fructose decomposition in subcritical and supercritical water: detailed reaction pathway, mechanisms, and kinetics. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1999**, *38*, 2888–2895.
- [88] Z. Wang, *Reaction mechanisms of hydrothermal liquefaction of model compounds and biowaste feedstocks*, , Université de l'Illinois à Urbana-Champaign, **2011**.
- [89] R. L. Holliday, J. W. King, G. R. List. Hydrolysis of vegetable oils in sub- and supercritical water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1997**, *36*, 932–935.

- [90] S. M. Changi, *Hydrothermal reactions of algae model compounds*, , University of Michigan, **2012**.
- [91] U. Jena, K. Das, J. Kastner. Effect of operating conditions of thermochemical liquefaction on biocrude production from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 6221 – 6229.
- [92] D. Zhou, L. Zhang, S. Zhang, H. Fu, J. Chen. Hydrothermal liquefaction of macroalgae *Enteromorpha prolifera* to bio-oil. *Energy & Fuels* **2010**, *24*, 4054–4061.
- [93] S. Zou, Y. Wu, M. Yang, C. Li, J. Tong. Bio-oil production from sub- and supercritical water liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* and related properties. *Energy and Environmental Science* **2010**, *3*, 1073–1078.
- [94] S. Yin, R. Dolan, M. Harris, Z. Tan. Subcritical hydrothermal liquefaction of cattle manure to bio-oil: effects of conversion parameters on bio-oil yield and characterization of bio-oil. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 3657 – 3664.
- [95] J. Akhtar, N. A. S. Amin. A review on process conditions for optimum bio-oil yield in hydrothermal liquefaction of biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2011**, *15*, 1615 – 1624.
- [96] G. Yu, L. Zhang, L. Schideman, T. L. Funk, Z. Wang. Hydrothermal liquefaction of low lipid content microalgae into bio-crude oil. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* **2011**, *54*, 239–246.
- [97] C. Jazrawi, P. Biller, A. B. Ross, A. Montoya, T. Maschmeyer, B. S. Haynes. Pilot plant testing of continuous hydrothermal liquefaction of microalgae. *Algal Research* **2013**, –.
- [98] B. Zhang, M. von Keitz, K. Valentas. Thermochemical liquefaction of high-diversity grassland perennials. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2009**, *84*, 18 – 24.
- [99] B. Zhang, M. von Keitz, K. Valentas. Thermal effects on hydrothermal biomass liquefaction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2008**, *147*, 143–150.
- [100] S. Karagöz, T. Bhaskar, A. Muto, Y. Sakata, T. Oshiki, T. Kishimoto. Low-temperature catalytic hydrothermal treatment of wood biomass: analysis of liquid products. *Chemical Engineering Journal* **2005**, *108*, 127 – 137.

- [101] S. Karagöz, T. Bhaskar, A. Muto, Y. Sakata. Hydrothermal upgrading of biomass: Effect of  $K_2CO_3$  concentration and biomass/water ratio on products distribution. *Bioresource Technology* **2006**, *97*, 90 – 98.
- [102] T. Minowa, F. Zhen, T. Ogi. Cellulose decomposition in hot-compressed water with alkali or nickel catalyst. *The Journal of Supercritical Fluids* **1998**, *13*, 253 – 259.
- [103] U. Jena, K. Das, J. Kastner. Comparison of the effects of  $Na_2CO_3$ ,  $Na_2(PO_4)_2$  and NiO catalysts on the thermochemical liquefaction of microalga *Spirulina platensis*. *Applied Energy* **2012**, *98*, 368–375.
- [104] P. Duan, P. E. Savage. Hydrothermal liquefaction of a microalga with heterogeneous catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2011**, *50*, 52–61.
- [105] D. C. Elliott, G. F. Schiefelbein. Liquid hydrocarbon fuels from biomass. *Division of Fuel Chemistry American Chemical Society* **1989**, *34*, 1160–1166.
- [106] A. V. Bridgwater, D. Meier, D. Radlein. An overview of fast pyrolysis of biomass. *Organic Geochemistry* **1999**, *30*, 1479 – 1493.
- [107] T. Minowa, S. ya Yokoyama, M. Kishimoto, T. Okakura. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel* **1995**, *74*, 1735 – 1738.
- [108] J. D. Adjaye, R. K. Sharma, N. N. Bakhshi. Characterization and stability analysis of wood-derived bio-oil. *Fuel Processing Technology* **1992**, *31*, 241 – 256.
- [109] S. S. Toor, H. Reddy, S. Deng, J. Hoffmann, D. Spangsmark, L. B. Madsen, J. B. Holm-Nielsen, L. A. Rosendahl. Hydrothermal liquefaction of *Spirulina* and *Nannochloropsis Salina* under subcritical and supercritical water conditions. *Bioresource Technology* **2013**.
- [110] A. Ross, P. Biller, M. Kubacki, H. Li, A. Lea-Langton, J. Jones. Hydrothermal processing of microalgae using alkali and organic acids. *Fuel* **2010**, *89*, 2234 – 2243.
- [111] D. R. Vardon, B. Sharma, J. Scott, G. Yu, Z. Wang, L. Schideman, Y. Zhang, T. J. Strathmann. Chemical properties of biocrude oil from the hydrothermal liquefaction of *Spirulina algae*, swine manure, and digested anaerobic sludge. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 8295 – 8303.

- [112] P. Biller, A. Ross. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 215 – 225.
- [113] Z. Shuping, W. Yulong, Y. Mingde, I. Kaleem, L. Chun, J. Tong. Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* cake. *Energy* **2010**, *35*, 5406 – 5411.
- [114] S. Inoue, S. Sawayama, T. Ogi. Components of oil derived from liquefaction of hydrocarbon-rich microalgae. *Preprints of Papers, American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry* **1996**, *41*, 720–723.
- [115] S. Sawayama, S. Inoue, Y. Dote, S.-Y. Yokoyama.  $CO_2$  fixation and oil production through microalga. *Energy Conversion and Management* **1995**, *36*, 729 – 731.
- [116] T. M. Brown, P. Duan, P. E. Savage. Hydrothermal liquefaction and gasification of *Nannochloropsis sp.* *Energy & Fuels* **2010**, *24*, 3639–3646.
- [117] P. J. Valdez, J. G. Dickinson, P. E. Savage. Characterization of product fractions from hydrothermal liquefaction of *Nannochloropsis sp.* and the influence of solvents. *Energy & Fuels* **2011**, *25*, 3235–3243.
- [118] Y. Yang, C. Feng, Y. Inamori, T. Maekawa. Analysis of energy conversion characteristics in liquefaction of algae. *Resources Conservation and Recycling* **2004**, *43*, 21–33.
- [119] M. Aresta, A. Dibenedetto, M. Carone, T. Colonna, C. Fragale. Production of biodiesel from macroalgae by supercritical  $CO_2$  extraction and thermochemical liquefaction. *Environmental Chemistry Letters* **2005**, *3*, 136–139.
- [120] D. Li, L. Chen, D. Xu, X. Zhang, N. Ye, F. Chen, S. Chen. Preparation and characteristics of bio-oil from the marine brown alga *Sargassum patens* C. Agardh. *Bioresource Technology* **2012**, *104*, 737 – 742.





**Chapitre 2**  
**Étude et caractérisation de**  
***Scenedesmus sp.***



## Introduction

Afin de comprendre comment valoriser au mieux les différents composants de la biomasse étudiée, il est important de caractériser au préalable chacun d'entre eux d'un point de vue chimique. C'est pourquoi ce deuxième chapitre est essentiellement consacré à l'analyse de l'espèce de microalgues étudiée : *Scenedesmus sp.*. Après une première partie présentant le contexte de l'étude, la deuxième partie sera axée sur la caractérisation chimique des différents constituants de la biomasse étudiée, à savoir les lipides, les sucres et les protéines. La dernière partie sera consacrée à l'étude des propriétés thermo-rhéologiques de la phase lipidique. En effet, celle-ci possédant des propriétés natives d'hydrophobicité et de thermosusceptibilité, elle pourrait s'avérer être un bon candidat pour l'obtention d'un matériau pouvant se substituer au bitume.

## I – Cas d'étude

Ce chapitre porte sur l'étude de *Scenedesmus sp.*, espèce de microalgues décrite pour la première fois en 1828 par Meyen. Il s'agit d'une microalgue verte d'eau douce, appartenant à la classe des chlorophyceae. Elle se présente sous la forme de colonies structurées, comportant de deux à trente-deux individus immobiles, répartis sur une ou deux rangées. Les cellules sont de formes ellipsoïdales ou fusiformes, et leurs pôles sont généralement ornés d'épines. [1] La taille de ces cellules est très variable : de quelques micromètres pour les plus petites à plusieurs dizaines de micromètres pour les plus grandes (Figure 2-1). Leur composition en lipides, sucres et protéines peut varier selon la souche étudiée, et les conditions de culture (Tableau 2-I).

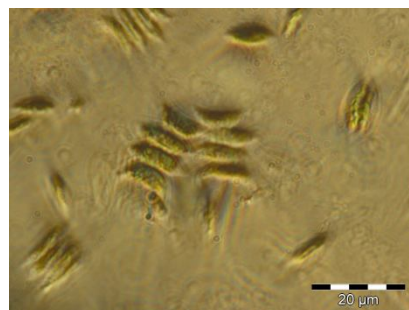


Figure 2-1 : Microalgues *Scenedesmus sp.* observées par microscopie optique (grossissement : x100)

Tableau 2-I : Analyse immédiate de plusieurs espèces du genre *Scenedesmus* (% par rapport à la masse sèche) (- : non renseigné)

Souche	Lipides	Protéines	Polysaccharides	Référence
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12-14	50-56	10-17	[2]
	21-50	8-34	-	[3]
	11-16	28-35	6	[4]
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	2	47	-	[2]
	20	54	-	[5]
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40	8-18	21-52	[2]
	23	50	6	[5]
<i>Scenedesmus abundans</i>	9-36	9-39	4-26	[6]
<i>Scenedesmus sp.</i>	12	51	7	[7]

Les microalgues sur lesquelles porte l'étude ont été cultivées en raceways à Alpha Biotech (Figure 2-2), société située dans les marais salants à Assérac (Loire-Atlantique). Cette entreprise est spécialisée dans la culture de microalgues et cyanobactéries, ainsi que dans la commercialisation de spiruline enrichie en phycocyanine (pigment bleu présent chez les cyanobactéries).



Figure 2-2 : Culture de *Scenedesmus sp.* à Alpha Biotech

La récolte de *Scenedesmus sp.* est réalisée par centrifugation. Après un processus de congélation/macération du rétentat, une seconde centrifugation permet d'isoler, en phase aqueuse, une partie des protéines hydrosolubles. Ces protéines sont alors valorisées par l'entreprise dans le domaine de la cosmétique, de la diététique, ou encore de la nutraceutique.

Le rétentat, enrichi en polysaccharides et en lipides, peut se présenter sous deux formes

- une pâte verte, constituée d'approximativement 80% d'eau en poids. Après avoir été conservé par congélation à -26 °C, elle a été lyophilisée au laboratoire pendant une semaine à -90 °C ;

- microalgues sèches, ayant subi une extrusion.

Les étapes de séchage ont pour but de pouvoir maîtriser au mieux les conditions expérimentales, et de comparer les différentes expériences en termes de rendements, en se basant sur les quantités de matières sèches. Néanmoins, elles sont extrêmement coûteuses en énergie. En effet, plusieurs Analyses de Cycles de Vies (ACV) ont permis de mettre en évidence le coût énergétique des étapes de séchage de biomasse dans un procédé de production de biocarburant algal :

- dans une étude de 2011, l'étape de récolte associée à l'étape de séchage de la biomasse constitue l'étape la plus énergivore du processus, avec des demandes énergétiques de 3 à 3,5 fois supérieures à celles des autres étapes (production des microalgues en raceways, extraction lipidique et transestérification) ; [8]

- dans une étude de 2012, l'étape de séchage constitue également l'étape la plus demandeuse d'énergie (> 15 000 kJ/kg de biomasse), pour une production d'énergie de seulement 10 000 kJ/kg de biomasse. Le procédé consomme donc plus d'énergie qu'il n'en produit. [9]

Dans l'idéal, cette étape devra donc être absente de tout processus industriel visant à produire un substitut bitumineux algal.

## II – Caractérisation biochimique

De manière simplifiée, les microalgues sont constituées de trois grandes familles de composés : les lipides, les protéines, et les polysaccharides. Tour à tour, ceux-ci ont été caractérisés, d'un point de vue qualitatif et/ou quantitatif.

### 1) Fraction lipidique à faible poids moléculaire

#### *a- Extraction*

Le choix de la technique d'extraction des lipides des microalgues s'est porté vers l'extracteur Soxhlet, principalement du fait de sa simplicité de mise en œuvre, et de son caractère universel. Des extractions successives ont été réalisées sur la biomasse lyophilisée avec des solvants de polarités croissantes (hexane, CHCl<sub>3</sub>, et un mélange CHCl<sub>3</sub> : MeOH (2 :

1, v/v)), permettant d'isoler trois fractions nommées R1, R2 et R3 respectivement dans la suite de ce manuscrit. La polarité du solvant d'extraction doit permettre de fractionner les différentes classes lipidiques selon leur nature (acides gras libres, esters d'acides gras, glycérides, phospholipides ou encore glycolipides) et potentiellement selon la nature de la chaîne grasse (longueur, degré d'insaturation ou encore degré de ramification).

Le rendement cumulé d'extraction en trois tours successifs atteint environ 22% par rapport à la masse sèche de biomasse insérée dans la cartouche d'extraction :

- 4 à 5% proviennent de l'extraction hexane ;
- 5 à 6% proviennent de l'extraction chloroforme ;
- 12 à 14% proviennent de l'extraction chloroforme/méthanol.

Par ailleurs, compte-tenu des coefficients de variation élevés, ce rendement est similaire au rendement obtenu par une extraction directe au chloroforme/méthanol (Tableau 2-II) :

**Tableau 2-II : Comparaison des rendements, des écarts-type et des coefficients de variation pour des extractions en un tour ou en trois tours (moyenne des résultats obtenus sur les lots 1, 3, 5 et 6)  
( $\sigma$  : écart-type ; CV : coefficient de variation)**

		<b>Rendement d'extraction moyen (%)</b>	<b><math>\sigma</math></b>	<b>CV (%)</b>
<b>Extraction en trois tours</b>	Hexane	4,2	1,2	28,5
	CHCl <sub>3</sub>	5,6	1,7	30,9
	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2 : 1, v/v)	12,6	1,8	14,1
	Cumul	22,4	0,8	3,7
<b>Extraction en un tour</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2 : 1, v/v)	23,6	2,2	9,2

Les coefficients de variation élevés obtenus sur les diverses extractions peuvent s'expliquer par la non-homogénéité de la prise d'échantillon, qui n'est peut-être pas représentative de la globalité de la biomasse (présence notamment de sels de culture, qui peuvent avoir une influence sur la masse réelle de microalgues présente dans la cartouche d'extraction).

Par ailleurs, l'influence de l'ajout d'acide chlorhydrique au solvant d'extraction a été étudiée. Cette technique est connue pour augmenter les rendements d'extraction des lipides, en favorisant notamment l'extraction des phospholipides. [10] L'utilisation de quelques gouttes d'HCl 6N a permis d'atteindre un rendement d'extraction proche de 30%.

*b- Analyse qualitative*

Les analyses ont été menées sur les huiles extraites en absence d'HCl. Les premières analyses ont été effectuées par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$  dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ). Lors de cette étape, il a été remarqué qu'une fraction des extraits Soxhlet ne se resolubilisait pas dans le solvant deutéré. Les spectres RMN présentés par la suite seront donc uniquement caractéristiques de la fraction des extraits Soxhlet soluble dans  $\text{CDCl}_3$ .

Ces analyses ont permis de mettre en évidence la présence quasi-exclusive d'acides gras libres (Figure 2-3, Figure 2-4), quel que soit le solvant d'extraction utilisé. L'attribution des signaux (Tableau 2-III) a été réalisée par comparaison avec les spectres RMN de références commerciales d'acides gras libres, de longueurs de chaîne comprises entre 10 et 20 carbones, et de degrés d'insaturation et de ramification variés.

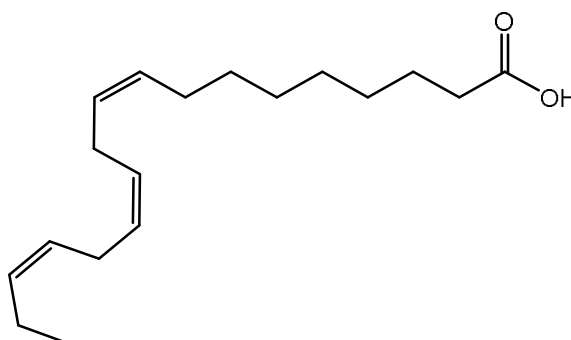


Figure 2-3 : Structure de l'acide linoléique

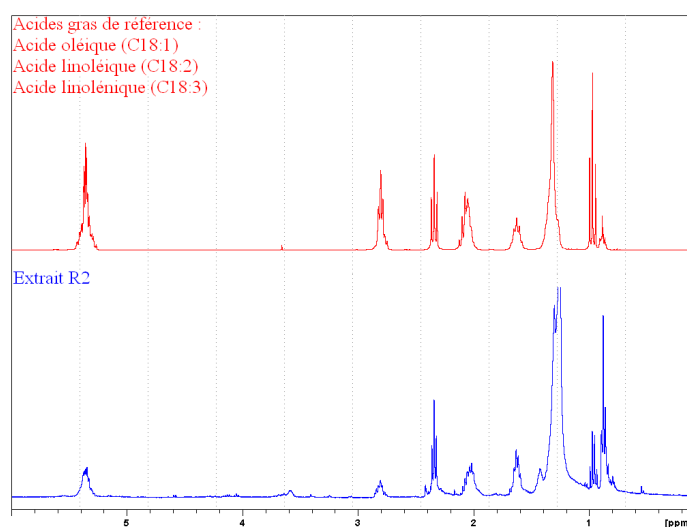


Figure 2-4 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  dans  $\text{CDCl}_3$  d'un mélange d'acides gras libres commerciaux (en rouge) et d'un extrait R2 (en bleu)

Tableau 2-III : Attribution des signaux des acides gras libres en RMN <sup>1</sup>H

$\delta$ (ppm)	Groupe chimique
0,85	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-}$
0,95	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-HC=CH-(CH}_2)_n$
1,26	$\text{-(CH}_2)_n\text{-}$
1,62	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$
2,04	$\text{-H}_2\text{C-HC=CH-CH}_2\text{-}$
2,34	$\text{-H}_2\text{C-COO-}$
2,80	$\text{=HC-CH}_2\text{-HC=}$
5,36	$\text{-HC=CH-}$

D'après les spectres RMN, quelques points importants peuvent déjà être mis en évidence :

- tous les signaux relatifs aux acides gras libres sont bien présents ;
- il n'y a pas de signal relatif à des acides gras ramifiés ;
- il n'y a que très peu, voire aucun signal dans la zone 4-4,5 ppm, zone caractéristique des mono-, di-, ou triglycérides. Des exemples de spectres RMN <sup>1</sup>H de ces molécules sont présentés en Figure 2-5 ;
- sont également absents de ces spectres tous signaux liés à des esters d'acides gras, ainsi que ceux liés à des phospholipides (pas de signal entre 3 et 4 ppm caractéristique d'une liaison carbone-azote présente dans la structure des phospholipides, et absence de signal en RMN du phosphore <sup>31</sup>P). L'ajout d'HCl au solvant d'extraction n'a pas permis de mettre en évidence la présence de phospholipides dans les extraits (pas de signal en RMN <sup>31</sup>P), à l'inverse de ce qui a pu être rapporté dans la littérature. [10]

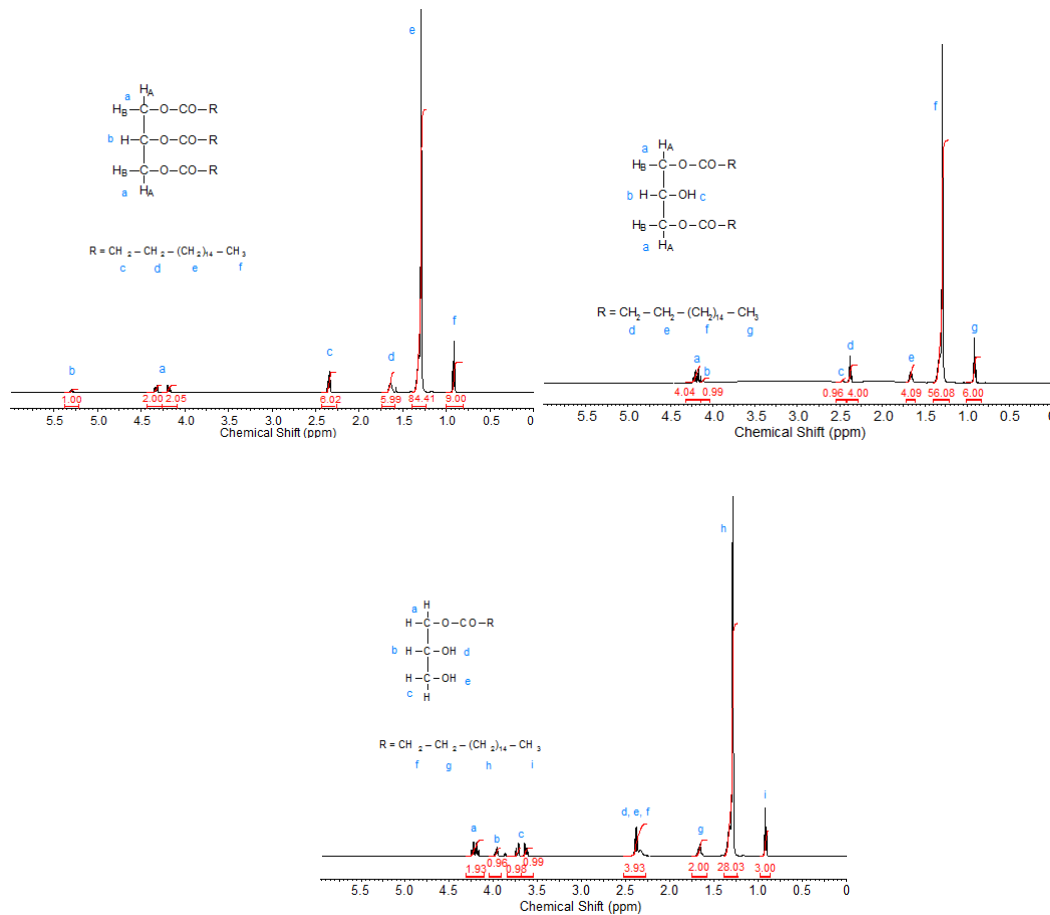


Figure 2-5 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  du tristéarine, du 1,3-distéarine et du 1-monostéarine [11]

L'absence de glycérides, et la présence des seuls acides gras libres, est un résultat qui peut paraître surprenant au premier abord. En effet, les microalgues sont connues pour accumuler des lipides de réserve sous forme de triglycérides, et les acides gras libres ne sont pas synthétisés naturellement par ces microorganismes. [12] Ces acides gras libres peuvent même parfois présenter un caractère cytotoxique pour le phytoplancton. [13] Néanmoins, les microalgues contiennent des lipases, qui sont des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons esters des glycérides. Lors des processus de macération, de centrifugation et de conservation par congélation des microalgues, ces enzymes ont pu être préservées, et ainsi favoriser l'hydrolyse des glycérides en glycérol et acides gras libres. En effet, il a été montré que seuls une lyophilisation ou un ajout d'isopropanol sont en mesure de désactiver les lipases. [14]

L'identification précise des acides gras libres, *i.e.* la longueur de chaîne et le degré d'insaturation, a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse à détection par ionisation de flamme (GC-FID) et/ou par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Du fait de l'absence de glycérides, l'étape de saponification

classiquement réalisée sur les phases lipidiques des microalgues a pu être évitée. Pourtant, afin de diminuer les interactions entre ces composés et les colonnes chromatographiques polaires utilisées, et d'augmenter leur volatilité par diminution des interactions hydrogène, il a été nécessaire de les dériver avant leur injection. Le plus souvent, la fonction acide carboxylique est ainsi transformée par une estérification ou une silylation. Le choix s'est porté sur une méthylation en présence de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3$ ) en solution dans le méthanol, méthode estérifiant de manière quantitative tous les acides gras (essais réalisés sur plusieurs références commerciales saturées et insaturées, seules ou en mélanges) contrairement aux mélanges HCl/méthanol, chlorure d'acétyl/méthanol, ou encore  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ /méthanol, également testés sur les mêmes références commerciales.

Les acides gras sont classés selon leur longueur de chaîne carbonée  $n$  et leur nombre d'insaturations  $m$ , et sont traditionnellement décrits de la façon suivante :  $\text{C}_n : m$ . L'analyse par GC-FID des huiles extraites à partir du lot 1 de microalgues a permis de déterminer la présence de six acides gras libres saturés (par comparaison des temps de rétention avec ceux de références, comme le montre la Figure 2-6), allant du  $\text{C}_{10} : 0$  au  $\text{C}_{20} : 0$ , avec une prédominance de l'acide palmitique  $\text{C}_{16} : 0$  et de l'acide stéarique  $\text{C}_{18} : 0$ . Concernant les acides gras libres insaturés, ils sont au nombre de neuf, allant du  $\text{C}_{16} : 1$  au  $\text{C}_{22} : 1$ , avec une prédominance des acides oléique  $\text{C}_{18} : 1$ , linoléique  $\text{C}_{18} : 2$  et linoléique  $\text{C}_{18} : 3$  dans une moindre mesure. La GC-MS (limite de détection plus basse que la GC-FID) a permis de détecter des acides gras de longueur de chaîne plus élevée, ne pouvant être détectés par GC-FID avec la colonne utilisée. Ainsi, les extraits lipidiques comportent également, en faibles quantités, des acides gras libres allant du  $\text{C}_{24}$  au  $\text{C}_{28}$  (saturés et ou insaturés). Le Tableau 2-IV fournit un récapitulatif de tous les acides gras identifiés par chromatographie en phase gazeuse, quelle que soit la méthode de détection utilisée.

Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature sur *Scenedesmus sp.*, pour laquelle les acides gras majoritairement identifiés sont ceux à 16 et 18 carbones. [15], [16], [17]

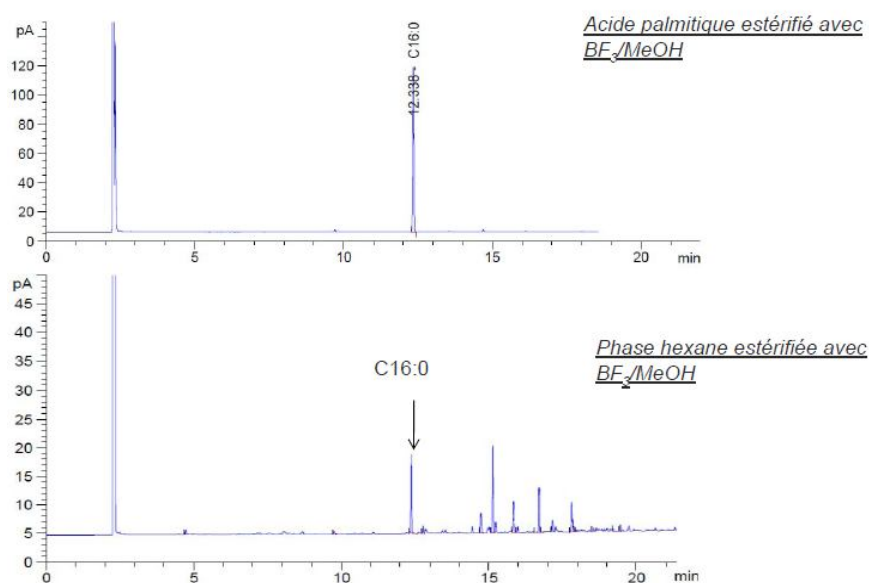


Figure 2-6 : Comparaison du chromatogramme d'une fraction extraite à l'hexane avec celui de l'acide palmitique

Tableau 2-IV : Acides gras identifiés dans *Scenedesmus sp.*

Abréviation	Nom trivial	Abréviation	Nom trivial
C 10 : 0	Acide caprique	C 16 : 1	Acide palmitoléique
C 15 : 0	Acide pentadécylique	C 18 : 1	Acide oléique
C 16 : 0	Acide palmitique	C 18 : 2	Acide linoélique
C 18 : 0	Acide stéarique	C 18 : 3	Acide linoléique
C 19 : 0	Acide nonadécylique	C 20 : 1	Acide gadoléique
C 20 : 0	Acide arachidique	C 20 : 2	Acide eicosadiénoïque
C 24 : 0	Acide lignocérique	C 20 : 4	Acide arachidonique
C 26 : 0	Acide cérotique	C 20 : 5	Acide timnodonique
C 28 : 0	Acide montanique	C 24 : 1	Acide nervonique

La technique d'extraction Soxhlet a été comparée à une extraction en conditions estérifiantes. Ces extractions ont été réalisées en tubes scellés, en mettant directement en présence des microalgues et une solution méthanolique de  $\text{BF}_3$ . Après réaction, les esters méthyliques ont été extraits à l'hexane. Cette technique s'est révélée peu concluante, avec des rendements en masse atteignant au maximum 17%, rendements nettement inférieurs à ceux obtenus par extraction Soxhlet classique. Cette technique semble donc s'avérer avantageuse

uniquement dans le cas d'une recherche sur les biocarburants, permettant d'obtenir en une seule étape des esters méthyliques.

Une caractérisation par spectroscopie infrarouge a également été menée sur les différents extraits en solution dans le tétrachlorure de carbone  $\text{CCl}_4$ . A l'instar du comportement des extraits dans  $\text{CDCl}_3$ , une partie des échantillons ne se résolubilise pas dans  $\text{CCl}_4$ . Les spectres présentés ne sont donc représentatifs que de la fraction solubilisée.

Quelle que soit la fraction R1, R2 ou R3 étudiée, le spectre infrarouge présente toujours les mêmes caractéristiques. Ainsi, un spectre « typique » (Figure 2-7) présente un signal important vers  $2900 \text{ cm}^{-1}$ , correspondant à la présence des longues chaînes aliphatiques  $(\text{CH}_2)_n$ . La présence d'une fonction  $\text{C}=\text{O}$  est également montrée par la présence d'un signal intense vers  $1700 \text{ cm}^{-1}$  (Tableau 2-V).

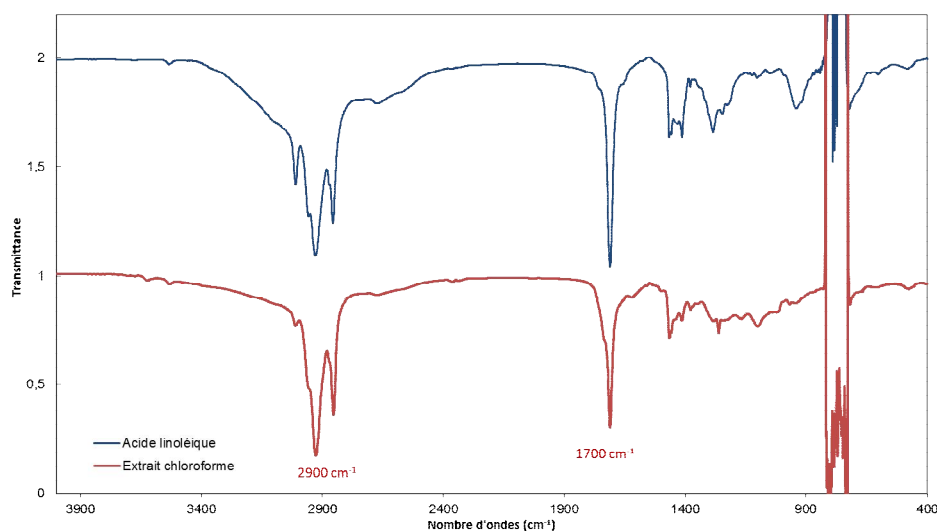


Figure 2-7 : Comparaison du spectre infrarouge en solution dans  $\text{CCl}_4$  d'un extrait R2 avec celui de l'acide linoléique

Tableau 2-V : Attribution des principaux signaux infrarouge des acides gras libres  
 $\nu$  : Vibrations d'élongation ;  $\delta$  : Vibrations de déformation

Nombre d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ )	Vibration	Nombre d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ )	Vibration
3014	$\nu_a$ (C-H) dans $\text{CH}_3$	1466	$\delta(\text{OH})$ dans le plan associé par liaisons H
2960	$\nu_a$ (C-H) dans $\text{CH}_2$	1416	$\delta_a$ ( $\text{CH}_3$ )
2937	$\nu_s$ (C-H) dans $\text{CH}_3$	1288	$\nu$ (C-O)
2858	$\nu_s$ (C-H) dans $\text{CH}_2$	950	$\delta(\text{OH})$ hors du plan associé par liaisons H
1713	$\nu_a$ (C=O)		

*c- Analyse quantitative*

Les acides gras contenus dans les extraits Soxhlet ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. En analyse quantitative par chromatographie en phase gazeuse, plusieurs techniques peuvent être utilisées : ajouts dosés, étalonnage externe ou encore étalonnage interne. La méthode de dosage par les ajouts dosés est une méthode contraignante, nécessitant de nombreuses injections. La méthode par étalonnage externe, quant à elle, nécessite une très bonne reproductibilité des volumes injectés, difficile à obtenir en chromatographie en phase gazeuse. Enfin, la méthode par étalonnage interne permet de s'affranchir des écarts liés à l'injection. Pour l'analyse quantitative des acides gras présents chez *Scenedesmus sp.*, le choix s'est donc porté vers cette dernière méthode de dosage par étalonnage interne.

L'étalon interne doit répondre à quatre critères principaux :

- il doit posséder une structure chimique proche de celle des composés à doser (un acide gras libre dans ce cas) ;
- il doit être absent de l'échantillon à analyser ;
- il doit être suffisamment séparé du pic de solvant et des pics des acides gras à doser ;
- il ne doit pas interagir avec les constituants du mélange.

Ainsi, l'acide dodécanoïque, acide gras possédant 12 carbones, et non présent chez *Scenedesmus sp.* s'est avéré être le candidat idéal.

La méthode de calcul utilisée pour déterminer les teneurs en acides gras libres est présentée dans le chapitre 5.

L'analyse quantitative des acides gras présents chez *Scenedesmus sp.* a été réalisée sur un lot de microalgues extrudées : le lot 7. Ce traitement n'est pas censé changer la composition biochimique de la microalgue étudiée. Seuls les acides gras majoritaires identifiés précédemment, ont été dosés, à savoir les acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linolénique.

Cinq extractions ont été réalisées en un tour ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 2 : 1, v/v) sur des prises d'essai de microalgues similaires (environ 1 g), provenant du même lot. La globalité des extraits Soxhlet a été engagée dans une réaction d'estérification, afin d'éviter tout fractionnement, puis injectés en GC-FID. Il aurait également été possible d'ajouter l'étalon interne sous forme d'acide gras libre dès la première étape d'extraction Soxhlet, afin de

s'affranchir des variations liées à cette étape, ainsi qu'à l'étape d'estérification. Néanmoins, le choix a été fait de l'ajouter directement sous forme d'ester méthylique au moment de l'injection en GC-FID, et ce, pour deux raisons :

- l'ajout de laurate de méthyle au moment de l'extraction Soxhlet ne permettra en aucun cas de vérifier le rendement de l'extraction. En effet, celui-ci sera directement au contact du solvant et sera donc très probablement totalement extrait, alors que les lipides contenus dans les cellules des microalgues doivent, eux, traverser des barrières membranaires, et présenteront donc un comportement tout à fait différent ;
- la méthode d'estérification par une solution de trifluorure de bore à 12% dans le méthanol, en tube scellé, a été validée (rendements d'estérification quantitatifs) auparavant sur des acides gras de référence isolés et en mélange.

D'un point de vue qualitatif, il est aisé de constater que la distribution des acides gras libres dans ce lot (7) n'est pas la même que celle dans les lots (1, 3, 5) ayant servi à l'analyse qualitative, même si les mêmes acides gras libres sont retrouvés (Figure 2-6, Figure 2-8). Cette variabilité peut être expliquée par la variation intrinsèque de composition des microalgues issues de plusieurs productions différentes (variation de l'apport en nutriment, exposition au rayonnement solaire...) Ainsi, seuls les acides palmitique et oléique présentent des concentrations conséquentes. Les trois autres acides gras (stéarique, linoléique et linoléinique) sont présents à des concentrations faibles. De manière assez surprenante, deux acides gras sont retrouvés en concentrations importantes à des temps de rétention assez élevés, 18,85 minutes et 15,97 minutes. Ils ont été identifiés par GC-MS comme étant de l'acide 10-oxo-octadécanoïque et de l'acide 10-hydroxy-octadécanoïque respectivement. Ces acides gras ont été identifiés uniquement dans le lot de microalgues ayant servi à la quantification et pourraient provenir de l'oxydation de l'acide oléique au cours du processus d'extrusion.

Les résultats de l'analyse quantitative sont présentés dans le Tableau 2-VI.

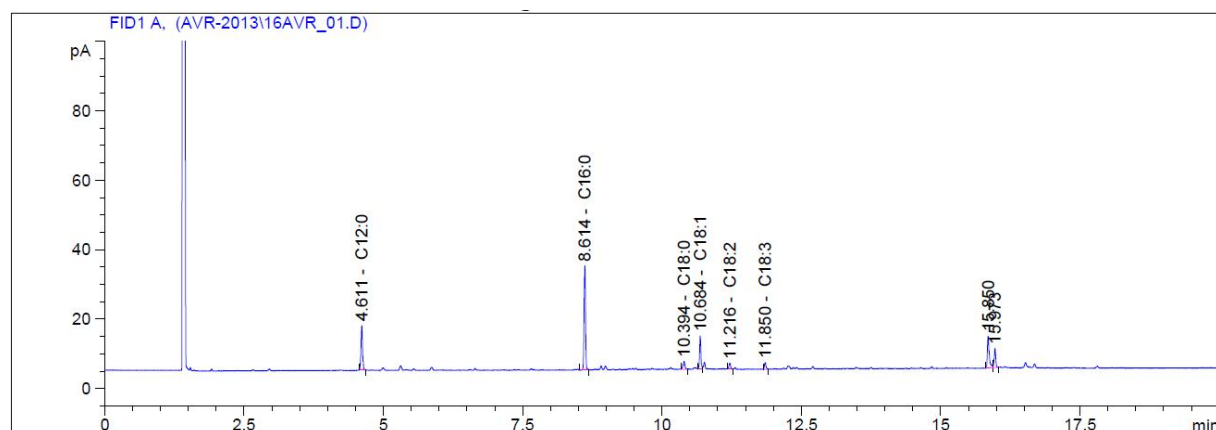


Figure 2-8 : Chromatogramme de quantification des acides gras libres chez *Scenedesmus sp.*

Tableau 2-VI : Rendements d'extraction et de conversion en esters méthyliques (FAMES : Fatty Acids Methyl Esters) des acides gras libres (AGL)

	m (m.-a.) (g)	m (extrait) (g)	Rdt Soxhlet (%)	m (FAMES) (g)	Teneur en AGL dans l'extrait Soxhlet (%)	Teneur en AGL dans les m.-a. (%)
<b>Extraction 1</b>	0,990	0,180	18,2	0,125	69,4	12,6
<b>Extraction 2</b>	1,106	0,228	20,6	0,157	68,9	14,2
<b>Extraction 3</b>	0,974	0,196	20,1	0,127	64,8	13,0
<b>Extraction 4</b>	0,961	0,194	20,2	0,134	69,1	13,9
<b>Extraction 5</b>	1,041	0,212	20,4	0,141	66,5	13,5
<b>Moyenne</b>			19,9		67,6	13,5
<b><math>\sigma</math></b>			0,88		1,78	0,57
<b>CV (%)</b>			4,4		2,6	4,2

Une bonne répétabilité du rendement d'extraction est observée (coefficient de variation de 4,4%), compte tenu du non échantillonnage préalable de la biomasse. Sa moyenne est de 19,9%, soit une valeur assez proche des valeurs obtenues sur des lots précédents, malgré un traitement différent d'isolement des microalgues.

La teneur en acides gras libres dans les extraits Soxhlet est définie comme étant la masse d'acides gras ayant été estérifiés par rapport à la masse d'huile extraite. La différence à 100% peut provenir de la fraction ne se resolubilisant ni dans  $\text{CDCl}_3$  ni dans  $\text{CCl}_4$ , mais aussi de produits minoritaires tels que des pigments (caroténoïdes, chlorophylles...).

Les coefficients de réponse des cinq acides gras à quantifier s'étant avérés très proches, un coefficient de réponse moyen a été adopté pour évaluer les teneurs en acide 10-oxo-octadécanoïque et en acide 10-hydroxy-octadécanoïque (non disponibles commercialement). La répartition moyenne des acides gras au sein des extraits Soxhlet est donc présentée en Figure 2-9.

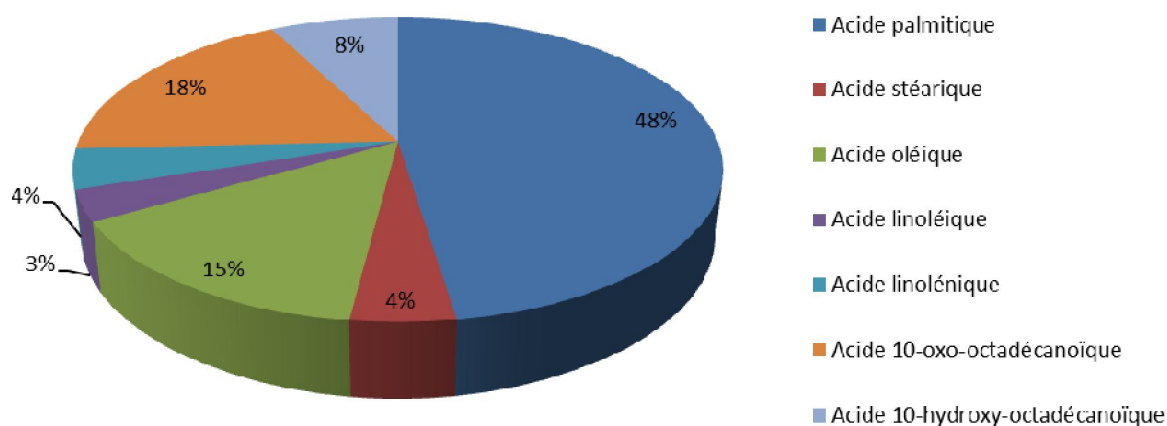


Figure 2-9 : Répartition des acides gras au sein des extraits Soxhlet

## 2) Fraction lipidique à haut poids moléculaire

Comme indiqué précédemment, lors des diverses caractérisations chimiques des extraits R1, R2 et R3 par RMN et infrarouge, une fraction des échantillons s'est avérée être non soluble dans les solvants d'analyse :  $\text{CCl}_4$  et  $\text{CDCl}_3$ . Après isolement par filtration puis séchage, cette fraction est devenue insoluble dans tous les solvants organiques classiques, empêchant toute analyse chimique en solution. Des tests de solubilité dans  $\text{CCl}_4$  ont montré que les extraits R1 sont solubles à 100% dans ce solvant, tandis que seulement 80% et 65% des extraits R2 et R3 respectivement peuvent être solubilisés dans  $\text{CCl}_4$ .

Or, dans la littérature, il est connu que chez plusieurs espèces de microalgues d'eau douce (principalement chez les chlorophytes mais aussi chez certaines eustigmatophytes [18]), comme chez certains végétaux supérieurs, des biopolymères de hauts poids moléculaires, résistants à l'hydrolyse et l'acétolyse peuvent être retrouvés dans les parois cellulaires. Ceux-ci jouent un rôle très important puisqu'ils sont sélectivement préservés lors de la sédimentation (contrairement aux contenus cellulaires) et forment ainsi les constituants majoritaires des kérogènes, matière pouvant être transformée en pétrole sous des conditions de pressions et de températures appropriées. Jusqu'au milieu des années 1980, ces biopolymères étaient tous regroupés sous le terme de sporopollénine. La sporopollénine était

alors définie comme un polymère naturel lipidique (composé principalement d'acides gras et de groupements phénols), constituant principal des parois externes des pollens et des spores. Ce n'est que vers le début des années 1990 que la distinction a été faite entre la sporopollénine et les algaenans, issus des microalgues ou encore la cutine, issues des végétaux terrestres. [19] Tous ces biopolymères possèdent des caractéristiques physico-chimiques très spécifiques, notamment une forte résistance aux traitements non oxydants, tels que les attaques acides et alcalines. Ils sont également résistants aux attaques biologiques. De plus, ils présentent la particularité de devenir totalement insoluble après isolement, à l'instar des extraits Soxhlet insolubles dans CCl<sub>4</sub>.

#### *a- Les algaenans dans la littérature : extractions*

L'extraction des algaenans est une étape clé pour l'analyse de ceux-ci. En effet, l'apparition de certains artefacts lors du processus d'isolement et de purification est susceptible d'entraîner des erreurs d'interprétation. De même, l'analyse de ces biopolymères sous leur forme fossilisée peut entraîner de mauvaises interprétations dues à des phénomènes de diagenèse (déshydratation, dissolution, action de micro-organismes...). Ainsi, suite à l'analyse de fossiles de *Pediastrum sp.* contenus dans des sédiments, il a été conclu que leurs algaenans contenaient des composés aromatiques. [20] Il a fallu attendre sept ans pour qu'une nouvelle étude, sur des microalgues vivantes de la même espèce, montre qu'en réalité, les parois cellulaires sont constituées d'un biopolymère exclusivement aliphatique. [21]

Il existe dans la littérature presque autant de protocoles d'isolement d'algaenans que de publications traitant de ce sujet. Si ceux-ci ont été optimisés au cours du temps pour éviter l'apparition de tout artefact, ils restent néanmoins généralement constitués de trois étapes principales similaires :

- une première étape d'extraction par solvant organique permettant d'extraire les lipides ;
- une deuxième étape d'hydrolyse acide permettant de cliver les liaisons glycosidiques des polysaccharides ;
- une troisième étape d'hydrolyse basique (pouvant être antérieure ou postérieure à l'hydrolyse acide) permettant d'éliminer la fraction liée par liaisons esters.

A ces trois étapes s'ajoutent des étapes intermédiaires de neutralisation, filtration, lavage ou encore extraction.

Les lipides sont généralement extraits successivement par des solvants de polarités croissantes allant de l'hexane ou l'heptane au méthanol, en passant par le dichlorométhane ou le chloroforme. [22], [23], [24], [25], [26] Des solvants comme l'éther diéthylique, moins connus pour extraire les lipides, sont parfois utilisés malgré tout. [27]

L'équipe de Blokker propose de faire précéder cette extraction de lipides par une étape d'élimination mécanique du cytoplasme et une étape d'hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase. [24], [28], [29] Cette étape permettrait de limiter les risques de formation d'artefacts par réactions entre les sucres et les protéines (connus pour former, par réaction de Maillard, des polymères de type mélanoïde, [30] dont la structure est présentée Figure 2-10).

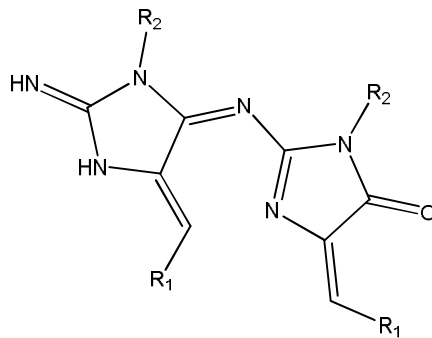


Figure 2-10 : Structure supposée des mélanoïdes

Après extraction des lipides, deux hydrolyses (une acide et une basique) sont réalisées, et sont généralement entrecoupées de lavages à l'eau et avec divers solvants organiques (les mêmes que ceux utilisés pour extraire les lipides).

Chronologiquement, l'acide phosphorique a été le premier acide utilisé pour les hydrolyses acides. [22], [27] L'utilisation de l'acide trifluoroacétique [25], [31], de l'acide chlorhydrique [32], de l'acide sulfurique [24], [29], ou encore de plusieurs d'entre eux de manière successive [28] lui est désormais préférée.

Concernant l'hydrolyse alcaline, elle a toujours été exclusivement réalisée par de l'hydroxyde de potassium, en solution dans du méthanol [23], [33], [34], de l'eau [27], un mélange méthanol/eau [24], [29], ou un mélange 2-méthoxyéthanol/eau. [26], [32]

L'ultime étape d'isolement des algaenans est très souvent un lavage à l'eau et divers solvants organiques.

L'ensemble de ces processus d'isolement des algaenans est résumé dans le Tableau 2-VII.

[CARACTERISATION DES RESIDUS DE SCENEDESMUS SP.]

**Tableau 2-VII : Récapitulatif des différents processus d'isolement des algaenans**  
(C : *Chlorella*, B : *Botryococcus*, T : *Tetraedron*, O : *Oocystis*, P : *Pediastrum*, S : *Scenedesmus*)

Microalgue étudiée	Traitement initial	Extraction des lipides	Hydrolyse 1	Traitement intermédiaire	Hydrolyse 2	Traitement final	Référence
<i>C. fusca</i>	-	1) Hexane 2) CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	KOH 6% dans MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1, v/v) (reflux, 6 h)	-	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (55 °C, 13 jours)	Extraction : 1) H <sub>2</sub> O 2) EtOH 3) Acétone 4) Et <sub>2</sub> O	[22]
<i>B. braunii</i> <i>T. minimum</i>	-	Sous ultrasons : 1) MeOH 2) MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1/1, v/v) 3) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexane (1/1, v/v) 4) Hexane	KOH méthanolique 2M	-	HCl	Lavage à l'eau	[23], [33], [34]
<i>C. sphaericum</i>	-	1) EtOH 2) Et <sub>2</sub> O	KOH aqueux 6% (reflux, 6 h)	Neutralisation puis lavage : 1) H <sub>2</sub> O 2) EtOH 3) Et <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% (t.a., 7 jours)	Lavage : 1) H <sub>2</sub> O 2) EtOH 3) Et <sub>2</sub> O	[27]
<i>O. solitaria</i> <i>B. braunii</i> <i>P. boryanum</i> <i>P. braunii</i> <i>S. spinulosum</i> <i>C. reticulatum</i> <i>T. minimum</i>	1) Elimination mécanique du cytoplasme 2) Hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase	Sous ultrasons : 1) MeOH 2) MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1/1, v/v) 3) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexane (1/1, v/v) 4) Hexane	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M	Lavage : 1) H <sub>2</sub> O 2) MeOH 3) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexane (1/1, v/v) 4) Hexane	KOH méthanolique 1M contenant 4% d'eau (reflux, 1 h)	Extraction : 1) MeOH 2) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexane (1/1, v/v) 3) Hexane	[24], [21], [29]
<i>S. communis</i> <i>B. braunii</i> <i>C. emersonii</i> <i>C. minutissima</i> <i>S. pannonicus</i> <i>T. minimum</i> <i>S. subspicatus</i> <i>S. armatus</i>	-	1) Heptane 2) CHCl <sub>3</sub> 3) CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	1) 2xTFA 2N (100 °C, 3h) 2) TFA 4N (100 °C, 18 h) 3) TFA 6N (100 °C, 18 h)	Reflux 1 h dans : 1) H <sub>2</sub> O 2) MeOH 3) CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	KOH 5% dans 2-méthoxyéthanol/H <sub>2</sub> O (88/12, v/v) (reflux, 1 h)	HCl 6N (110 °C, 24 h)	[25], [31]
<i>C. monoica</i>	1) Elimination mécanique du cytoplasme 2) Hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase	Sous ultrasons : 1) MeOH 2) MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1/1, v/v) 3) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexane (1/1, v/v) 4) Hexane	1) TFA 2M (reflux, 1 h) 2) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 12M (reflux, 1 h)	Lavage : 1) H <sub>2</sub> O 2) MeOH 3) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexane (1/1, v/v) 4) Hexane	KOH méthanolique 1M contenant 4% d'eau (reflux, 1 h)	Extraction : 1) MeOH 2) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hexane (1/1, v/v) 3) Hexane	[28]
<i>B. braunii</i>	-	1) Heptane 2) CHCl <sub>3</sub> 3) CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	1) TFA 2N (reflux, 2x3 h + 18 h) 2) TFA 4N (reflux, 15 h)	1) Lavage à l'eau 2) MeOH (reflux, 1h) 3) CHCl <sub>3</sub> (reflux, 1h)	KOH 1,2% dans 2-méthoxyéthanol/H <sub>2</sub> O (88/12, v/v) (110 °C, 1 h)	1) Lavage à l'eau 2) H <sub>2</sub> O (reflux) 3) MeOH (reflux) 4) CHCl <sub>3</sub> (reflux)	[26]
<i>C. emersonii</i> <i>T. minimum</i> <i>S. communis</i>	-	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2/1, v/v)	HCl 6N (110 °C, 18 h)	-	KOH 5% dans 2-méthoxyéthanol/H <sub>2</sub> O (88/12, v/v) (reflux, 1 h)	Lavage : 1) H <sub>2</sub> O 2) HCl 0,1 N	[32]

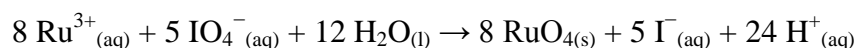
Dans une étude datant de 2001, un protocole plus original est proposé pour l'isolement de ces lipides hautement condensés. [35] Le protocole d'isolement consiste à extraire dans un premier temps les lipides au chloroforme. Dans un deuxième temps, les algaenans sont précipités par ajout d'acétone et conservation du mélange à 4 °C pendant plusieurs jours.

*b- Les algaenans dans la littérature : structures chimiques*

Concernant la détermination de la structure chimique précise de ces macromolécules, une des voies privilégiées dans la littérature est la dégradation oxydative. Celle-ci est principalement réalisée à l'aide du tétroxyde de ruthénium RuO<sub>4</sub>. [24], [29], [33], [34]. En effet, il a été montré toute l'efficacité de cet agent oxydant sur des composés modèles comprenant des fonctions susceptibles d'être retrouvées dans les algaenans (Figure 2-11).

Ainsi, les composés comprenant une double liaison sont oxydés en deux acides carboxyliques, ou dans le cas d'une double liaison terminale, en un acide carboxylique et du dioxyde de carbone. Les éthers sont eux aussi oxydés en acides carboxyliques. Selon leur classe, les alcools présentent des réactivités différentes. L'oxydation d'alcools primaires engendre la formation d'acides carboxyliques, tandis que l'oxydation d'alcools secondaires entraîne la formation de cétones. Les alcools tertiaires, quant à eux, ne présentent aucune réactivité.

Le plus souvent, le tétroxyde de ruthénium est généré *in situ* à partir de periodate de sodium NaIO<sub>4</sub> et d'un précurseur de ruthénium (III) RuCl<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O selon l'équation suivante :



La réaction se déroule généralement dans un mélange eau/acétonitrile/chloroforme sous ultrasons. Une extraction ultérieure à l'hexane et/ou au dichlorométhane permet d'isoler les produits de dégradation, qui sont, après méthylation, analysés par GC-MS.

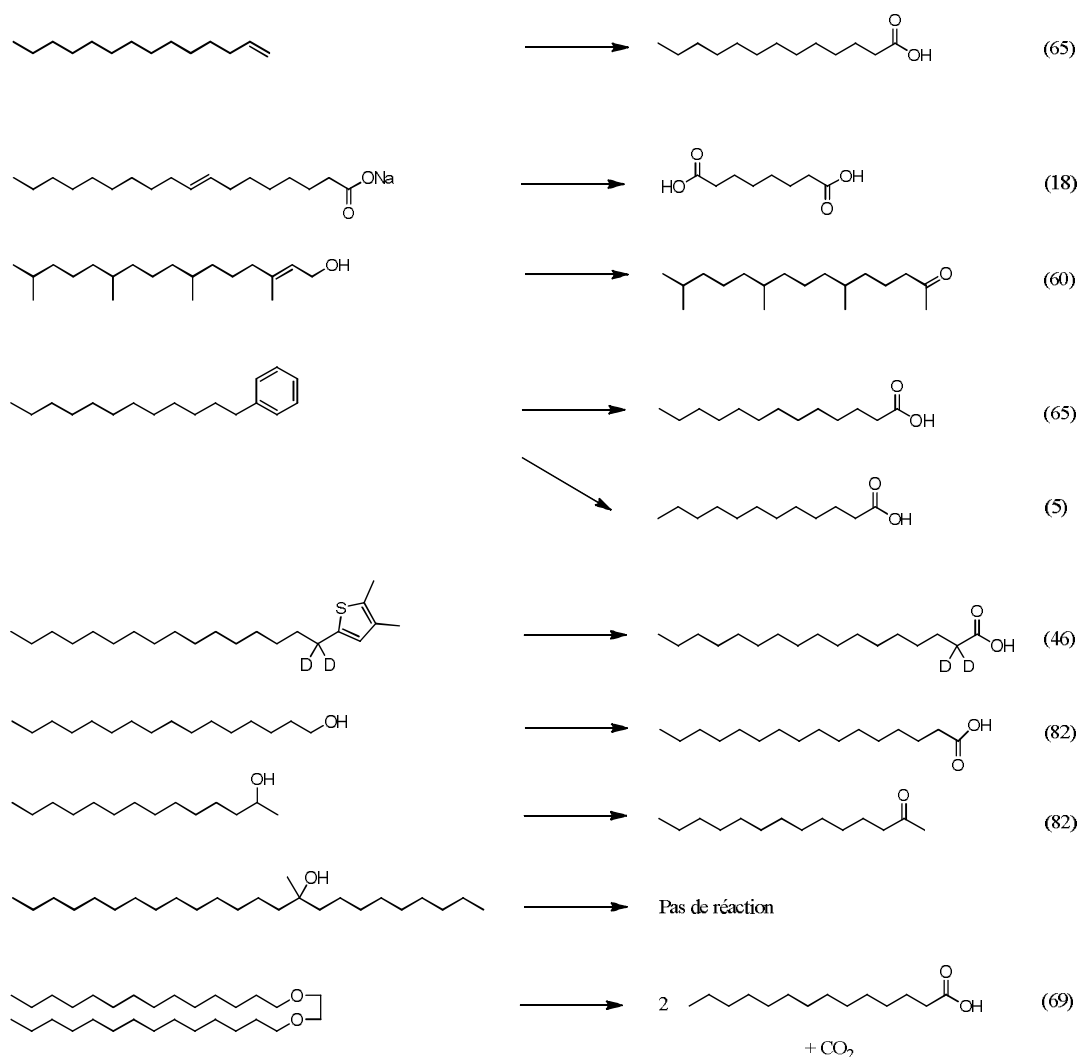


Figure 2-11 : Produits de dégradation de composés modèles par RuO<sub>4</sub> (les chiffres entre parenthèses indiquent les taux de conversion) [34]

Une autre voie d'analyse des algaénans par dégradation chimique met en jeu l'iodure d'hydrogène HI. [24], [33] Ce traitement, nettement moins répandu que le traitement au RuO<sub>4</sub>, permet de cliver sélectivement les liaisons éthers, en formant des produits possédant une fonction iodure. La réaction se fait au reflux d'une solution aqueuse d'HI. Les produits de dégradation iodés sont successivement extraits par des solvants de polarité décroissante. Leurs fonctions iodures sont par la suite converties en thioéthers méthyliques par le thiométhoxyde de sodium NaSMe. Ces molécules possédant un chemin de fragmentation très spécifique en spectrométrie de masse, il est alors possible de déterminer la position du groupement thioéther méthylique et ainsi, remonter à la position initiale de la fonction éther. Néanmoins, cette technique présente un inconvénient majeur : étant donné que le mélange HI/NaSMe convertit également en thioéthers méthyliques les fonctions esters et alcools, il n'est pas possible de discriminer les fonctions esters des alcools et des éthers.

Il est également possible d'envisager une dégradation thermochimique des algaenans. Dans ce contexte, la pyrolyse s'est avérée être une technique de choix. Cette méthode consiste à décomposer thermiquement à très hautes températures (entre 400 °C et 600 °C, sous atmosphère inerte) ces macromolécules et à analyser leurs produits de dégradation par GC-MS. Ces produits de dégradation sont parfois fractionnés par chromatographie sur silice avant leur injection en GC-MS. [22] Plus souvent, la GC-MS est directement couplée à l'appareil de pyrolyse (Py/GC-MS). [24], [28], [33]

Le choix de la technique d'isolement des algaenans peut engendrer l'apparition d'artefacts. Ainsi, de nombreuses études ont postulé la nature isoprénoïque des algaenans. [36], [37], [23], [38] Ceux-ci auraient été issus de la polymérisation oxydante des caroténoïdes ou de leurs esters. [37] En réalité, si la structure chimique précise des algaenans semble varier en fonction des auteurs et surtout en fonction des microalgues étudiées, presque tous les modèles proposés depuis une quinzaine d'années montrent une composante hautement aliphatique comme en témoignent les diverses analyse de RMN solide  $^{13}\text{C}$  MAS (Figure 2-12). [24], [27], [33] La seule exception provient des algaenans isolés de *C. marina*, pour lesquels des composés polyaromatiques (e.g. phénanthrène, tétracène...) ont été identifiés dans le pyrolysat. [39]

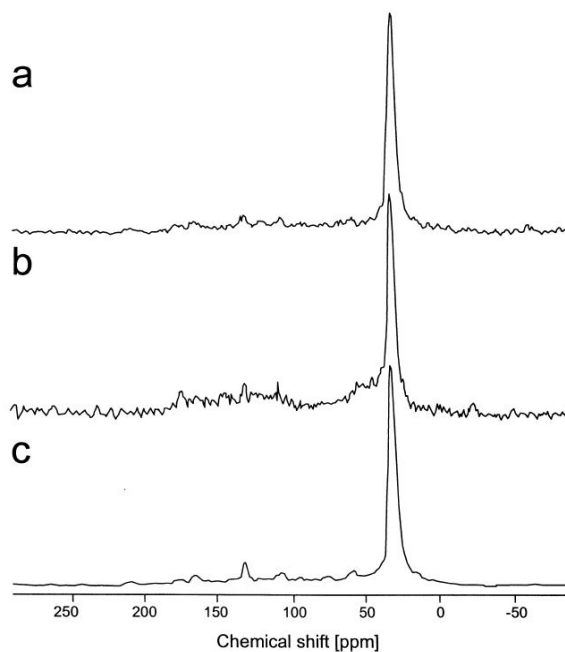


Figure 2-12 : Spectres RMN MAS  $^{13}\text{C}$  des algaenans issus de trois espèces de microalgues (a : *T. minimum*, b : *S. communis*, c : *P. boryanum*) [24]

Les auteurs s'accordent également sur le taux de réticulation élevé de ces macromolécules, leur conférant leur grande stabilité thermique. Il existe à l'heure actuelle trois grands modèles de structure d'algaenans.

Le premier modèle de structure chimique d'algaenans (issus de deux souches *Nannochloropsis sp.*) a été proposé par F. Gelin en 1997, [40] après la mise en relation des résultats de diverses analyses.

D'une part, l'analyse des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  MAS a montré que les algaenans étaient composés à 95% de chaînes méthyléniques. L'analyse par GC-MS du pyrolysate des algaenans a montré une distribution bimodale de n-alcanes et n-alc-1-ènes, avec des pics à C15-17 et C26-28. Des cétones  $\omega$ 17 et  $\omega$ 18, saturées et insaturées, ont également été retrouvées, résultant très probablement du clivage d'éthers secondaires en position  $\omega$ 17 et  $\omega$ 18 des algaenans.

D'autre part, par traitement au  $\text{RuO}_4$ , trois grandes familles de composés ont été identifiées :

- des acides carboxyliques de longueurs de chaînes variant entre 11 et 32 carbones, et présentant deux maxima à C17 et C27-29 ;
- des  $\alpha$ - $\omega$ -diacides carboxyliques de longueurs de chaînes variant entre 8 et 17 carbones ;
- des  $\omega$ 17 et/ou  $\omega$ 18 oxo- et dioxo-acides gras de longueurs de chaînes variant entre 28 et 34 carbones, et présentant un maximum à C30-32.

Enfin, le mélange résultant du traitement au HI/NaSMe est majoritairement composé d'isomères de bis(thiométhyl) n-alcanes de longueurs de chaînes variant entre 28 et 36 carbones. Le chemin de fragmentation spécifique de ce type de composés en spectrométrie de masse a permis de montrer qu'un des groupements thiométhyl se situe en fin de chaîne tandis que le second groupement se trouve principalement en position  $\omega$ 16,  $\omega$ 17 ou  $\omega$ 18.

En se basant sur tous ces résultats, le modèle suivant (Figure 2-13) a été proposé pour la structure des algaenans de *Nannochloropsis sp.*

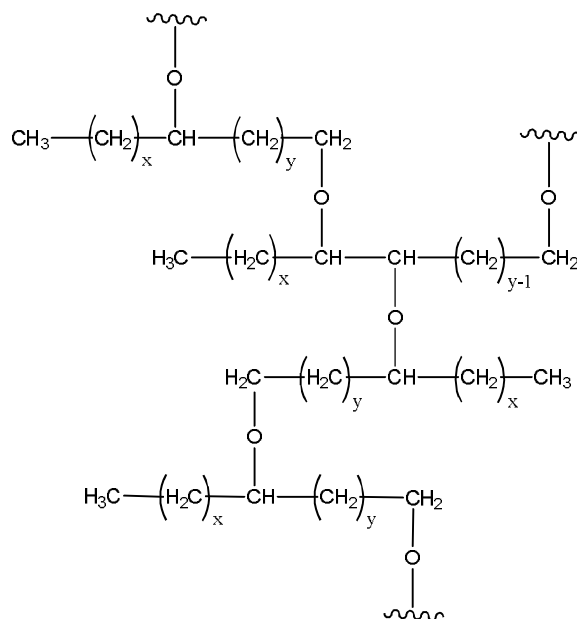


Figure 2-13 : Structure des algaenans de *Nannochloropsis* sp. ( $x=15$  ou  $16$ ,  $12 < y < 16$  ou  $11 < y < 15$ ) [40]

Un an plus tard, un nouveau modèle de structure chimique d'algaenans (isolés à partir de *T. minimum*, *S. communis* et *P. Boryanum*) est proposé par P. Blokker. [24]

La composante aliphatique a d'abord été observée par FT-IR, avec la présence de pics d'absorption entre 3000 et 2000  $\text{cm}^{-1}$ , à 1466  $\text{cm}^{-1}$  et à 720  $\text{cm}^{-1}$  indiquant la présence de chaîne  $(\text{CH}_2)_n$ . La composante carbonylée a également été observée, ainsi que l'éventuelle présence de groupements éther (vibration de la liaison C-O à 1050  $\text{cm}^{-1}$ ).

Les données RMN  $^{13}\text{C}$  MAS ont confirmé la nature aliphatique des algaenans avec la présence d'un signal à 29 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  polyméthyléniques. Cependant, du fait du faible rapport signal sur bruit, la distinction de pics correspondant éventuellement à des fonctions oxygénées reste difficile. Les auteurs semblent malgré tout observer un pic entre 60 et 80 ppm correspondant à la présence de fonctions alcool et éther, et un pic entre 165 et 180 ppm correspondant aux groupements carbonyle.

Des informations plus précises ont été obtenues par pyrolyse flash. Les principaux produits de dégradation observés ont été des n-alcènes et des n-alcane de longueurs de chaîne carbonées comprises entre 7 et 31. En plus faibles quantités ont également été observées des cétones, pouvant témoigner de la présence de ponts éthers.

Le traitement au HI a libéré majoritairement des acides gras de longueurs variant entre 24 et 34 carbones selon l'espèce de microalgues, ainsi que des  $\omega$ -thiométhyl acides gras.

Les produits d'oxydation au  $\text{RuO}_4$  sont principalement des  $\alpha,\omega$ -diacides carboxyliques. Quant aux lipides libérés par hydrolyse alcaline, il s'agit principalement d' $\omega$ -hydroxy acides gras insaturés en position 9, 9 et 18, ou 9 et 19, et possédant entre 30 et 34 carbones.

La combinaison de tous ces résultats a mené P. Blokker à proposer le modèle suivant (Figure 2-14) :

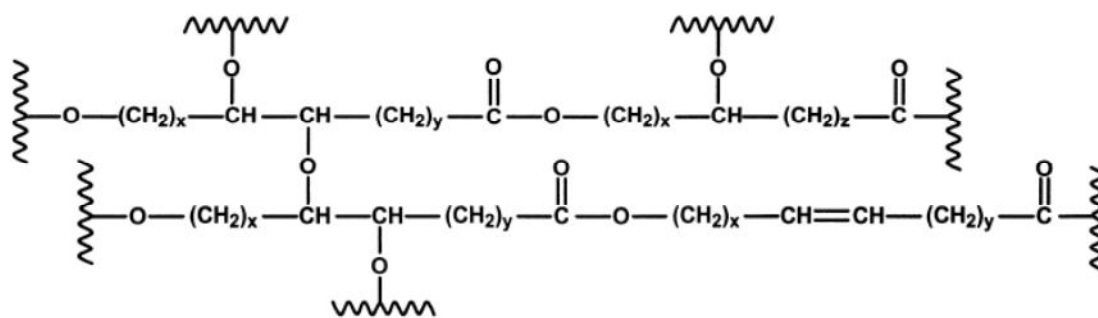


Figure 2-14 : Structure des algaenans de *T. minimum*, *S. communis*, *P. boryanum* ( $x+y=27,29,31$  ;  $x+z=28,30,32$ ) [24]

Les mêmes techniques d'analyse ont été mises en œuvre par la même équipe pour l'analyse des algaenans de *C. monoica*. [28] La structure proposée est sensiblement la même que précédemment (Figure 2-15), cependant les chaînes aliphatiques saturées sont plus courtes que chez les trois espèces précédentes (les chaînes les plus longues possédant 26 carbones).

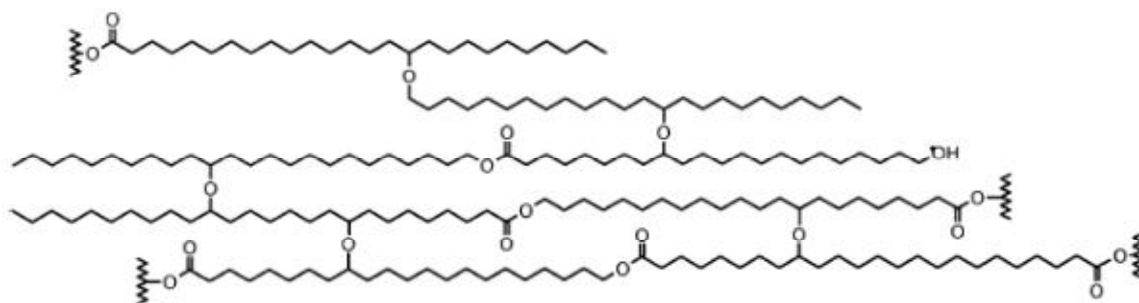


Figure 2-15 : Structure des algaenans de *C. monoica* [28]

La structure des algaenans de *B. braunii* [41] semblent s'éloigner de celles proposées précédemment, notamment par la nature des fonctions chimiques assurant la réticulation du polymère. En effet, l'étude menée par RMN a montré que dans ce cas, la réticulation des chaînes aliphatiques ne serait plus assurée par des ponts éther mais par des ponts ester et acétal (Figure 2-16). De plus, le polymère serait localement substitué par des fonctions aldéhyde.

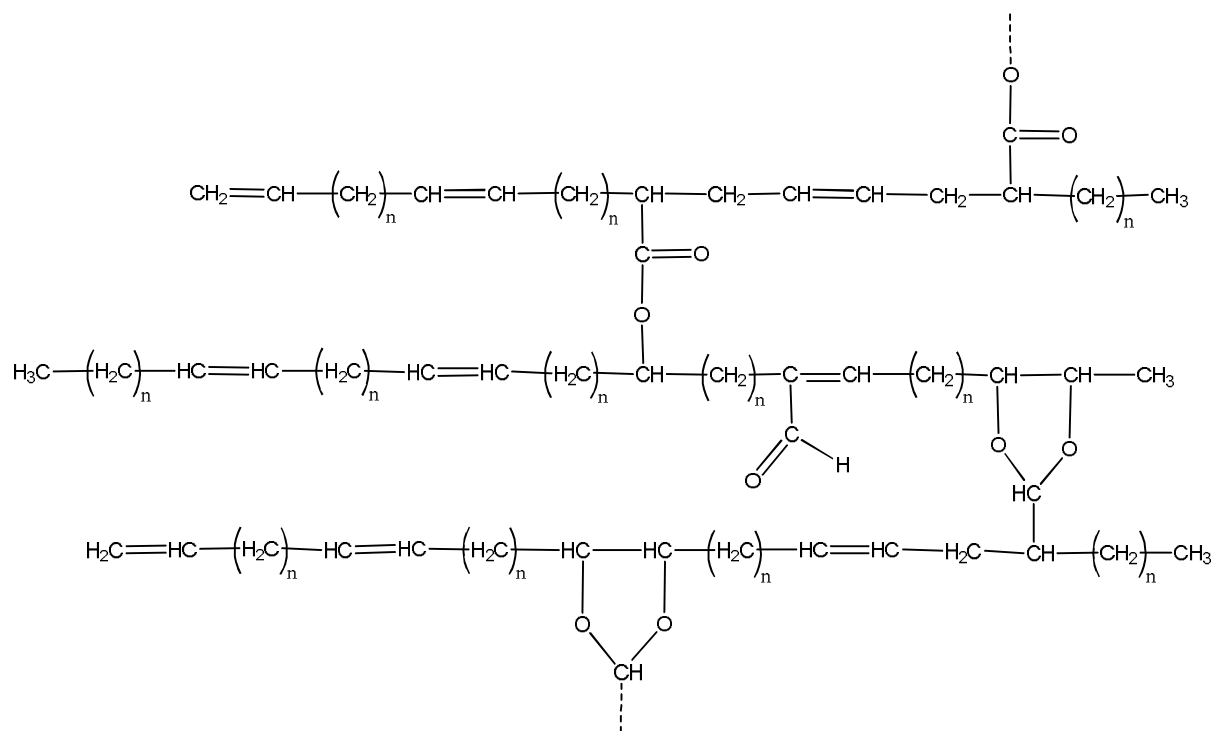


Figure 2-16 : Structure des algaenans de *B. braunii* race A [41]

c- Analyse des algaenans de *Scenedesmus* sp. cultivées à Alpha Biotech

L'étude bibliographique menée précédemment a mis en évidence la difficulté de déterminer de manière précise la structure chimique des algaenans. L'analyse par des méthodes spectroscopiques doit donc, dans un premier temps, permettre de connaître les fonctions chimiques présentes au sein de l'échantillon. Une fois ces fonctions connues, l'application de dégradations chimiques et l'analyse des fragments doit permettre, *in fine*, de proposer un modèle de structure.

Le polymère isolé à partir des extractions Soxhlet ne constitue qu'une très faible fraction massique des extraits. Dans le cadre de cette étude, le choix a donc été fait d'isoler les algaenans en quantités suffisantes *via* des traitements acides et basiques, [25] afin d'en déterminer leur structure.

➤ Choix de la méthode d'isolement

La première méthode d'isolement des algaenans étudiée (méthode 1) a mis en œuvre une hydrolyse acide avec HCl 6N, suivie d'une hydrolyse alcaline avec KOH à 5% en solution dans un mélange 2-méthoxyéthanol/eau (88 : 12, v/v). [32] Le spectre infrarouge des algaenans isolés selon ce protocole est présenté en Figure 2-17.

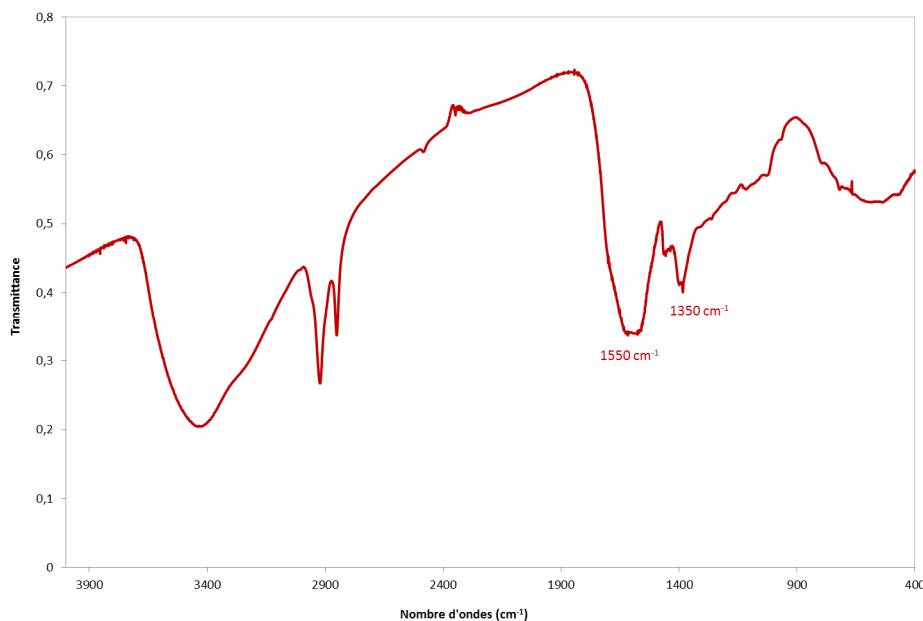


Figure 2-17 : Spectre infrarouge des algaenans isolés selon la méthode 1

Si, comme pour les algaenans, les bandes vers  $2900\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques d'une composante hautement aliphatique, les bandes à  $1550\text{ cm}^{-1}$  et  $1350\text{ cm}^{-1}$  sont, quant à elles, spécifiques de la présence de mélanoides, [30] polymère résultant de réactions entre les monosaccharides et les acides aminés.

Afin d'éviter la formation de polymère au cours de l'isolement des algaenans, un nouveau protocole a été adopté (méthode 2). Il consiste à faire précéder l'hydrolyse par HCl par une hydrolyse par l'acide trifluoroacétique TFA. Celle-ci permet de cliver sélectivement les liaisons osidiques des polysaccharidiques, permettant de relarguer les monosaccharides en milieu aqueux. Ceux-ci sont donc éliminés par simple filtration, limitant les réactions possibles entre les sucres et les protéines, et par conséquent, la formation d'un polymère secondaire. Les algaenans isolés selon cette méthode ont également été caractérisés par spectroscopie infrarouge (Figure 2-18) et montrent l'absence de polymère de type mélanoides (disparition de la bande large centrée autour de  $1550\text{ cm}^{-1}$ ).

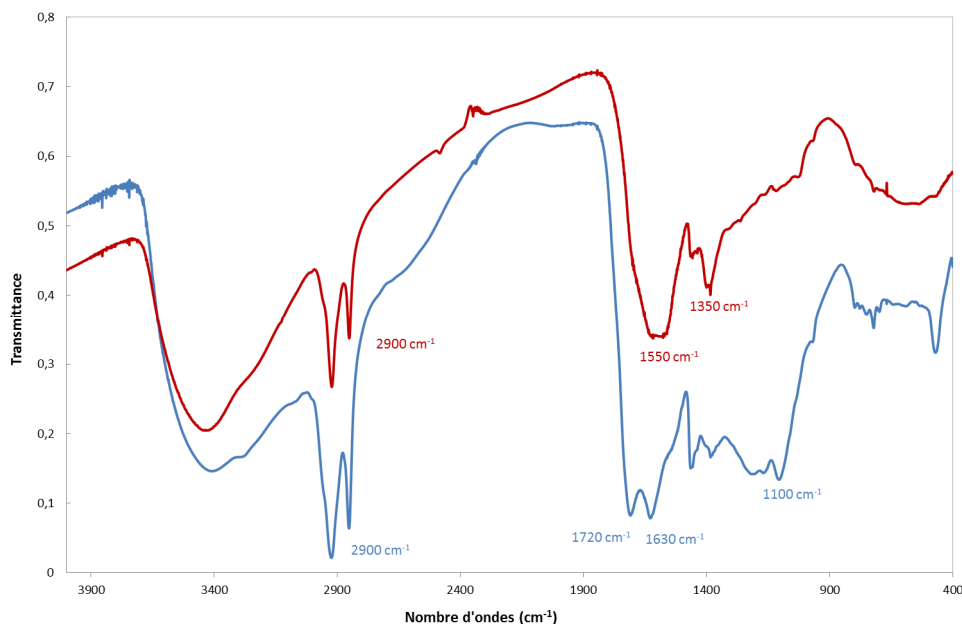


Figure 2-18 : Comparaison des spectres infrarouge des algaenans isolés selon la méthode 1 (rouge) et la méthode 2 (bleu)

Les algaenans, isolés sur le lot 6 avec un rendement de 8% selon la méthode 2, présentent des bandes caractéristiques, permettant de mettre en avant la présence de fonctions spécifiques :

- 2900  $\text{cm}^{-1}$  : vibration des  $\text{CH}_2$  ;
- 1720 et 1630  $\text{cm}^{-1}$  : vibration des  $\text{C}=\text{O}$  des acides et esters ;
- 1100  $\text{cm}^{-1}$  : vibration des  $\text{C}-\text{O}$  des éthers.

➤ Caractérisation spectroscopique des algaenans

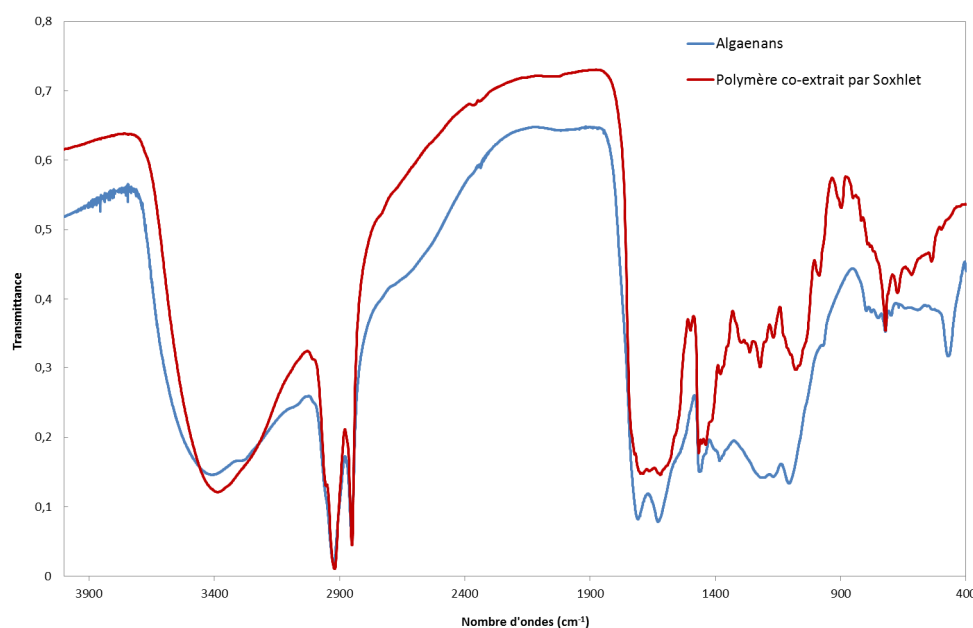
La spectroscopie infrarouge s'est avérée être une technique de choix pour caractériser la nature chimique des algaenans.

Les spectres infrarouges des algaenans et de la fraction co-extraite par Soxhlet (Figure 2-19) montrent des similarités frappantes :

- une bande très large vers 3400  $\text{cm}^{-1}$  (vibrations d'élongation des liaisons  $\text{O}-\text{H}$  ou  $\text{N}-\text{H}$  d'alcools et/ou d'eau, ou d'amines respectivement) ;
- deux bandes fines mais intenses vers 2900  $\text{cm}^{-1}$  (vibrations d'élongation des liaisons  $\text{C}-\text{H}$  des  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ ) ;

- une ou deux bandes larges entre  $1640\text{ cm}^{-1}$  et  $1720\text{ cm}^{-1}$  (vibrations d'élongation des liaisons C=O des esters, des acides carboxyliques, et/ou des amides) ;
- une bande à  $720\text{ cm}^{-1}$  (vibrations du squelette  $(\text{CH}_2)_{n>4}$  ou déformations hors du plan des liaisons C-H des doubles liaisons en configuration *cis*).

Une bande caractéristique des éthers alkyles (vibration d'élongation de la liaison C-O) est également présente sur les deux spectres, vers  $1100\text{ cm}^{-1}$ , cohérente avec des structure déjà proposées pour les algaenans dans la littérature. [24], [28], [40]



**Figure 2-19 : Comparaison des spectres infrarouge en pastille dans KBr de la fraction extractible par  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  et insoluble dans  $\text{CCl}_4$  d'une part, et des algaenans de *Scenedesmus sp.* d'autre part**

Ces résultats sont accord avec ceux présentés dans la littérature, obtenus à partir de souches de *Scenedesmus communis* (Figure 2-20). Les principales différences résident dans les variations d'intensité des différentes bandes. Chez les algaenans isolés par Blokker *et al.*, la bande caractéristique des fonctions éther, large et intense, domine largement le spectre infrarouge. [24] Chez les algaenans isolés par Allard *et al.*, cette bande est nettement moins intense, tandis que les bandes caractéristiques des  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  sont nettement plus intenses. Ces deux bandes pourraient être caractéristiques du degré de réticulation du polymère (bande à  $1100\text{ cm}^{-1}$ ), ainsi que de la longueur des chaînes alkyles (bandes entre  $3000$  et  $2800\text{ cm}^{-1}$ ).

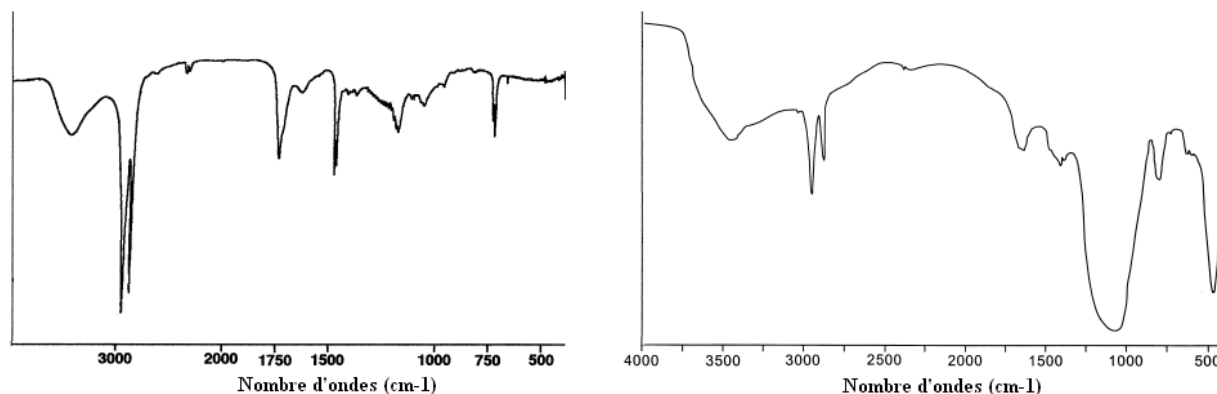


Figure 2-20 : Spectres infrarouges rapportés dans la littérature des algaenans isolés chez *Scenedesmus sp.* (à gauche : adapté de [35] ; à droite : adapté de [24])

➤ Caractérisations par hydrolyses chimiques

Différentes techniques d'hydrolyses chimiques ont été appliquées afin de cliver les fonctions ester et éthers potentiellement présentes chez les algaenans de *Scenedesmus sp.*

Des essais de clivage ont été réalisés à partir de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . Ce réactif est connu pour hydrolyser les liaisons éthers. Il a d'ailleurs déjà été mis à profit pour la caractérisation de kérogènes, [42] matière intermédiaire entre la matière organique et le pétrole, et partiellement composée d'algaenans. [43], [44]

Un rendement d'hydrolyse très faible de 6% a été obtenu par cette technique, et l'analyse des produits de clivage n'a pas permis de proposer une structure d'algaenans.

Des résultats plus encourageants ont été obtenus à partir du tétroxyde de ruthénium, qui s'est finalement avéré être le réactif permettant de cliver au mieux les algaenans. En effet, jusqu'à 35% des algaenans isolés à partir de *Scenedesmus sp.* ont pu être hydrolysés par cette technique. Les hydrolysats, après dérivatisation, ont été analysés par GC-MS. Les résultats sont présentés en Figure 2-21 et dans le Tableau 2-VIII.

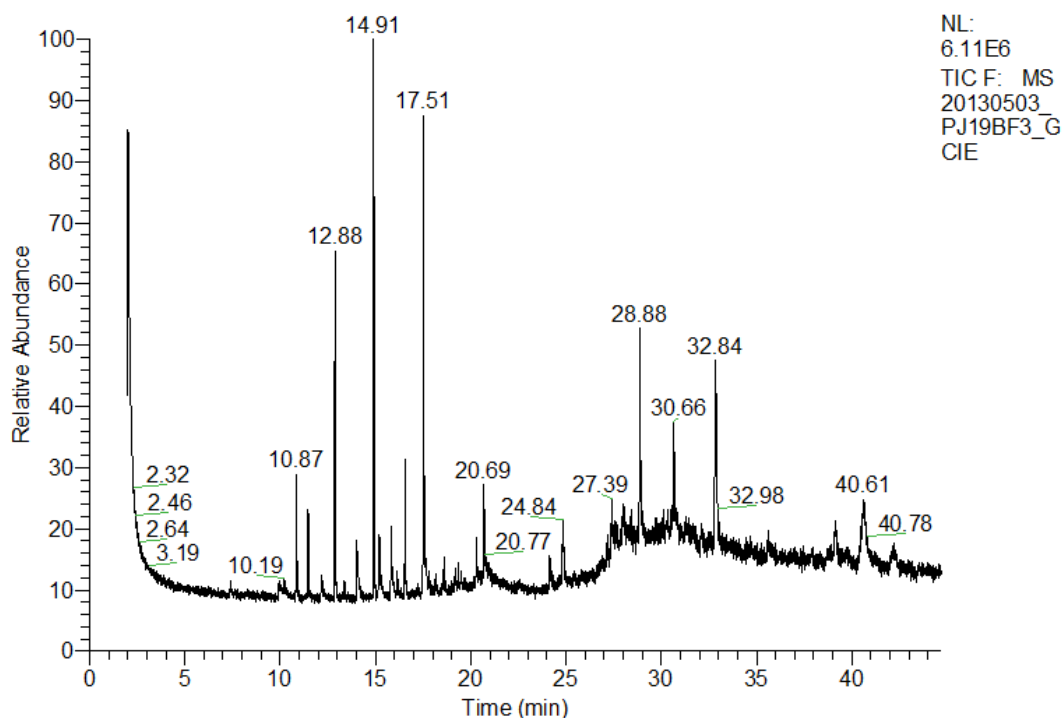


Figure 2-21 : Chromatogramme des produits d'hydrolyse au RuO<sub>4</sub> des algaenans de *Scenedesmus sp.* après estérification

Tableau 2-VIII : Produits d'hydrolyse des algaenans de *Scenedesmus sp.* par RuO<sub>4</sub>

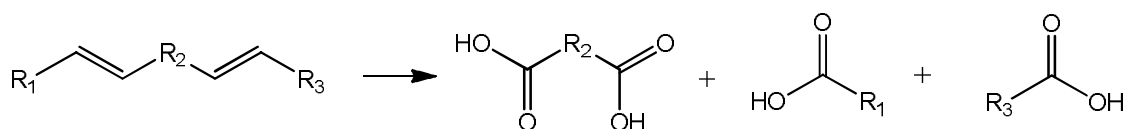
Temps de rétention	Produit	Masse molaire (g/mol)
10,87	2,6,10-triméthylundécanoate de méthyle	242
12,88	3,7,11-triméthylododécanoate de méthyle	256
14,04	12-méthyltridécanoate de méthyle	242
14,91	4,8,12-triméthyltridécanoate de méthyle	270
15,84	Pentadécanoate de méthyle	256
16,55	5-méthylhexadécanoate de méthyle	284
17,51	Hexadécanoate de méthyle	270
20,30	8-octadécenoate de méthyle	296
20,69	14-méthylheptadécanoate de méthyle	270
28,88	Docosanedioate de diméthyle	398
30,66	Eicosanedioate de diméthyle	370

Ces analyses ont donc révélé la présence d'acides gras (sous leur forme estérifiée) de degrés de ramification et de longueurs de chaînes variés (entre 11 et 20 carbones). Comme indiqué précédemment sur la Figure 2-11, ceux-ci peuvent provenir d'alcènes, de cycles

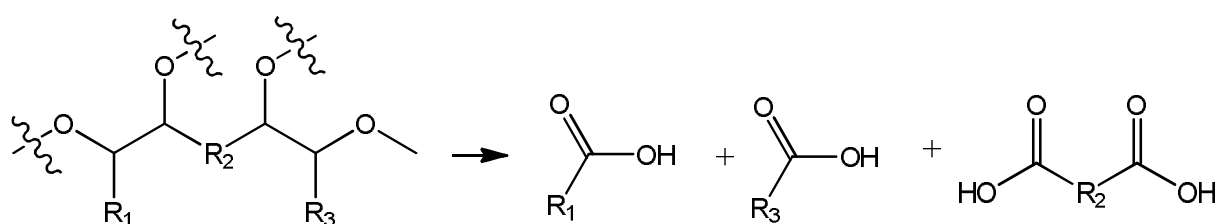
benzéniques, d'alcools mais aussi d'éthers, ce qui serait cohérent avec certaines structures proposées dans la littérature. De plus, la présence de composés bifonctionnels confirme la présence d'un polymère.

Ces différents résultats permettent de proposer plusieurs structures chimiques pour les algaenans, des analyses complémentaires devant être effectuées pour affirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses :

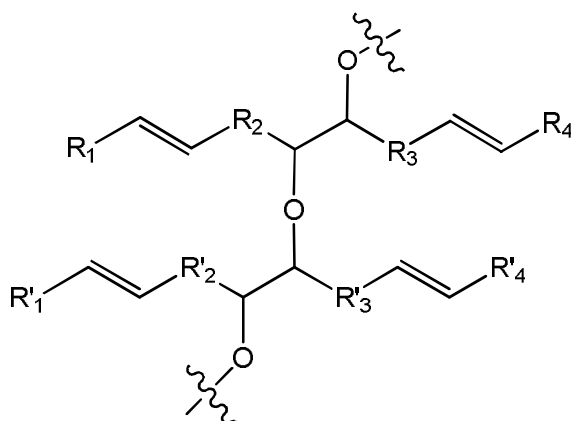
- une structure basée sur un motif polyène, à partir duquel des monoacides gras et des diacides gras peuvent être obtenus par oxydation au  $\text{RuO}_4$  (Réaction 2-1) ;
- une structure basée sur un motif polyéther, à partir duquel des monoacides gras et des diacides gras peuvent également être obtenus à partir d'un traitement au  $\text{RuO}_4$  (Réaction 2-2) ;
- une structure intermédiaire entre les deux structures précédentes, basée sur des chaînes polyènes reliées entre elles par des ponts éthers (Figure 2-22).



Réaction 2-1 : Clivage d'un polyène en présence de  $\text{RuO}_4$



Réaction 2-2 : Clivage d'un polyéther en présence de  $\text{RuO}_4$



avec  $R_2$ ,  $R'_2$ ,  $R_3$  et  $R'_3$  : eicosyl ou docosyl

avec  $R_1$ ,  $R'_1$ ,  $R_4$  et  $R'_4$  : 2,6,10-triméthylundécyl  
 3,7,11-triméthyl dodécyl  
 12-méthyltridécyl  
 4,8,12-triméthyltridécyl  
 pentadécyl  
 5-méthylhexadécyl  
 hexadécyl  
 8-octadécenyl  
 14-méthylheptadécyl

Figure 2-22 : Exemple de structure possible d'algaenans

### 3) Fraction polysaccharidique

La teneur en sucres totaux a été déterminée par la méthode de Dubois. [45] La première étape de cette technique consiste à hydrolyser les polysaccharides par l'acide sulfurique. Les hydrolysats, composés de dérivés du furfural, se combinent au phénol pour former des composés de couleur jaune/orange. La concentration en monosaccharides peut alors être déterminée par spectrophotométrie dans le visible. La courbe d'étalonnage étant réalisée à partir de solutions de concentrations connues en glucose, les résultats sont exprimés en équivalents glucose.

Les analyses menées sur le lot 8 de microalgues non lyophilisées ont montré que ce rétentat est composé d'environ 30,2% (en poids) de polysaccharides.

L'analyse qualitative des sucres a été réalisée selon une méthode classique décrite dans la littérature. Les polysaccharides sont dans un premier temps extraits à chaud dans de l'eau.

Afin d'éliminer les protéines potentiellement co-extraites, la procédure de Sevag est appliquée. [46] Elle consiste en une extraction de la phase aqueuse par un mélange  $\text{CHCl}_3$  : n-BuOH (4 : 1, v/v). Dans ces conditions, les protéines adoptent une conformation spatiale particulière, et se retrouvent à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique. Les polysaccharides, contenus dans la phase aqueuse, sont ensuite précipités à froid par ajout d'éthanol absolu. Cette technique a permis d'isoler 39% des polysaccharides totaux. L'hydrolyse des liaisons osidiques est par la suite réalisée par le TFA. Enfin, les monosaccharides isolés sont acétylés en présence d'anhydride acétique et de pyridine, afin d'être analysés en GC-FID.

En parallèle, une hydrolyse au TFA a également été réalisée sur la fraction des microalgues non extractible à l'eau chaude. En effet, celle-ci semble également être constituée de polysaccharides, dont les propriétés de solubilités diffèrent des polysaccharides précédents. De cette manière, 22% des polysaccharides totaux ont pu être hydrolysés. Le même protocole de dérivation que précédemment a été appliqué.

L'identification a ensuite été réalisée par comparaison des temps de rétention avec ceux de monosaccharides de référence également acétylés. La présence d'acides uroniques (monosaccharide dont le dernier carbone porte une fonction acide carboxylique) a également été testée, *via* deux références acétylées et estérifiées. Toutes ces références sont présentées dans le Tableau 2-IX. La principale difficulté de cette analyse a résidé dans l'optimisation de la méthode de séparation des composés de référence en GC-FID. Leur polarité élevée a nécessité l'emploi d'une colonne très polaire (86% diméthylpolysiloxane). En effet, ces différents composés présentent des différences d'affinité avec la colonne très faibles, car les variations dans leurs structures sont principalement des inversions de positions des fonctions hydroxyles.

L'analyse des polysaccharides non solubles dans l'eau a montré la présence majoritaire de glucose et de mannose. Deux autres hexoses sont présents de manière importante, mais n'ont pas pu être identifiés (à 23,35 et 24,42 min). De façon plus minime, sont retrouvés des pentoses (rhamnose, fucose, arabinose et lyxose), ainsi que du galactose (Figure 2-23).

Concernant les polysaccharides hydrosolubles, leur isolation et hydrolyse mène à un mélange beaucoup plus complexe (Figure 2-24). En effet, bien que les polysaccharides aient été isolés par précipitation, et lavés afin d'en éliminer les protéines, des composés non saccharidiques sont encore présents, et sont élués pendant les six premières minutes du

[CARACTERISATION DES RESIDUS DE SCENEDESMUS SP.]

chromatogramme. La distribution en monosaccharides est malgré tout similaire à celle des polysaccharides non hydrosolubles, avec la présence supplémentaire de tagatose et de ribose.

Tableau 2-IX : Liste des monosaccharides de référence étudiés (la forme présentée est la forme tautomère la plus stable dans l'eau, à 20 °C)

Nom	Structure	Nom	Structure
Xylose		Tagatose	
Arabinose		Galactose	
Lyxose		Mannose	
Ribose		Fucose	
Glucose		Acide glucuronique	
Fructose		Acide galacturonique	

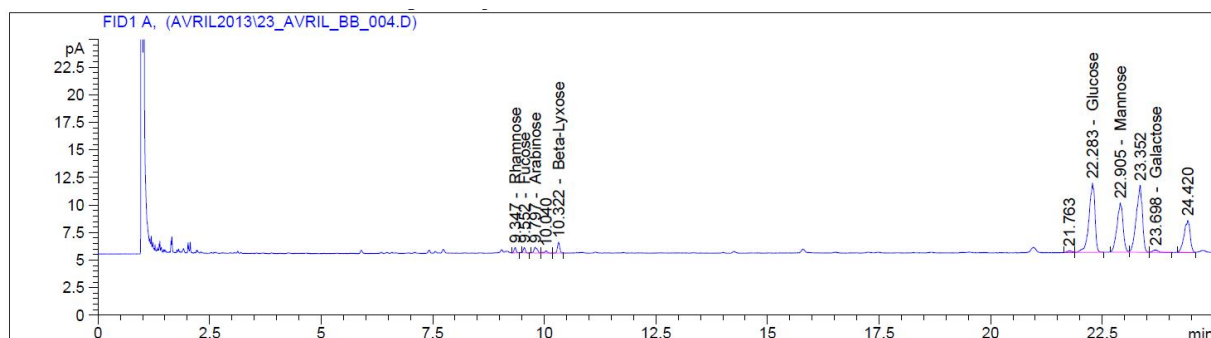


Figure 2-23 : Chromatogramme d'analyse des polysaccharides non solubles dans l'eau

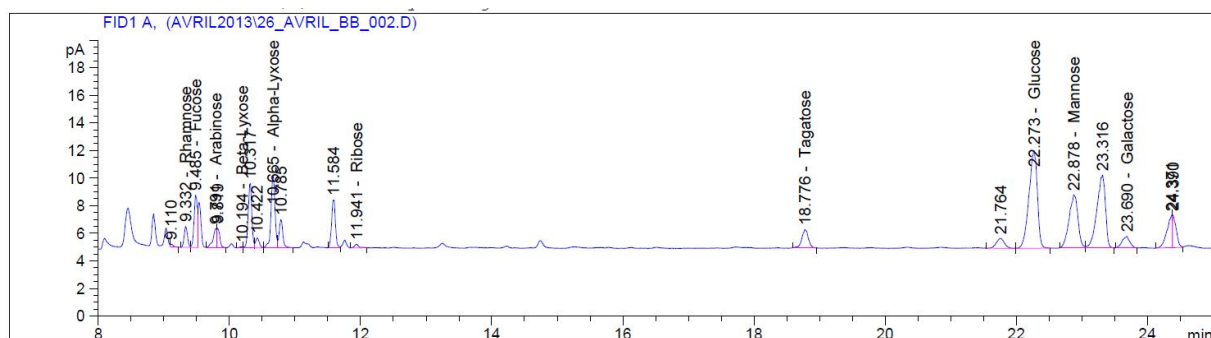
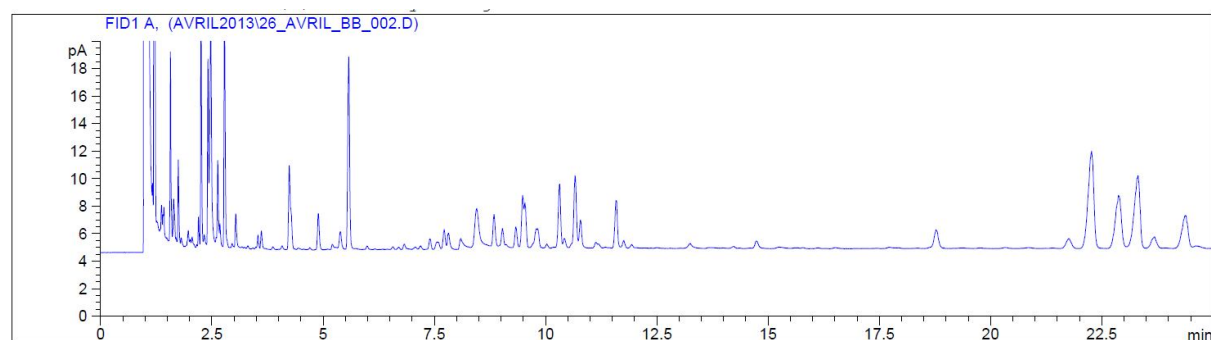
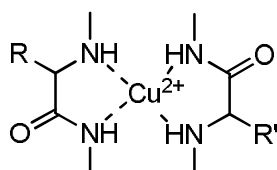


Figure 2-24 : Chromatogrammes d'analyse des polysaccharides hydrosolubles (en haut : chromatogramme intégral ; en bas : chromatogramme des composés monosaccharidiques)

Il est important de remarquer que la totalité des polysaccharides n'a pas été caractérisée par GC-FID, puisque seuls 61% des monosaccharides ont pu être isolés (39% par extraction aqueuse des polysaccharides et 22% par hydrolyse directe de la fraction non extractible à l'eau). L'image de la composition en monosaccharides révélée par le chromatogramme n'est donc que partielle.

#### 4) Fraction protéinique

Bien que la biomasse étudiée ait déjà subi une extraction de protéines, celle-ci n'a pas été totale (seule une partie des protéines hydrosolubles a pu être extraite), et la teneur en protéines résiduelles est donc non nulle. La quantification de cette teneur en protéines résiduelles a été réalisée par la méthode de Lowry. [47] Le principe de cette technique est basé sur la formation d'un complexe tétravalent entre les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et les azotes des protéines en milieu alcalin (Figure 2-25).



avec R et R' : chaînes latérales des acides aminés

**Figure 2-25 : Structure du complexe cuivre-protéine en milieu alcalin**

En présence du réactif de Folin-Ciocalteu, composé de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans un mélange d'acide phosphorique et d'acide chlorhydrique, les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) vont être réduits. Le complexe réduit présente une coloration bleu-vert, dont l'intensité peut être déterminée par spectrophotométrie dans le visible. L'étalonnage est réalisé à partir de solutions de concentrations connues en albumine de sérum bovin (BSA).

Les analyses menées sur le lot 8 de microalgues non lyophilisées ont montré que ce rétentat est composé d'environ 20,7% (en poids) de protéines.

#### 5) Autres composés

D'autres composés, ne faisant pas partie intrinsèquement de la composition des microalgues, ont été retrouvés dans la biomasse étudiée. Ceux-ci proviennent de manière générale du milieu de culture, et ont été piégés dans la biomasse lors de sa lyophilisation.

##### *a- Chlorure de sodium*

Lors de caractérisations par microscopie électronique couplée à l'EDXS (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) des résidus de *Scenedesmus sp.*, du chlore et du sodium ont

été détectés. Afin de valider l'hypothèse de la présence de NaCl, chacun des deux ions a été dosé. La solution a été obtenue par macération de microalgues dans de l'eau osmosée à température ambiante. Après filtration, le filtrat a pu être titré pour déterminer d'une part, la concentration en  $\text{Cl}^-$  et d'autre part, la concentration en  $\text{Na}^+$ .

Les ions chlorures ont été dosés par potentiométrie (précipitation de chlorure d'argent à partir d'une solution de nitrate d'argent). La courbe de dosage (Figure 2-26) a ainsi permis de déterminer une concentration en ions chlorures de 4,43 mmol/L.

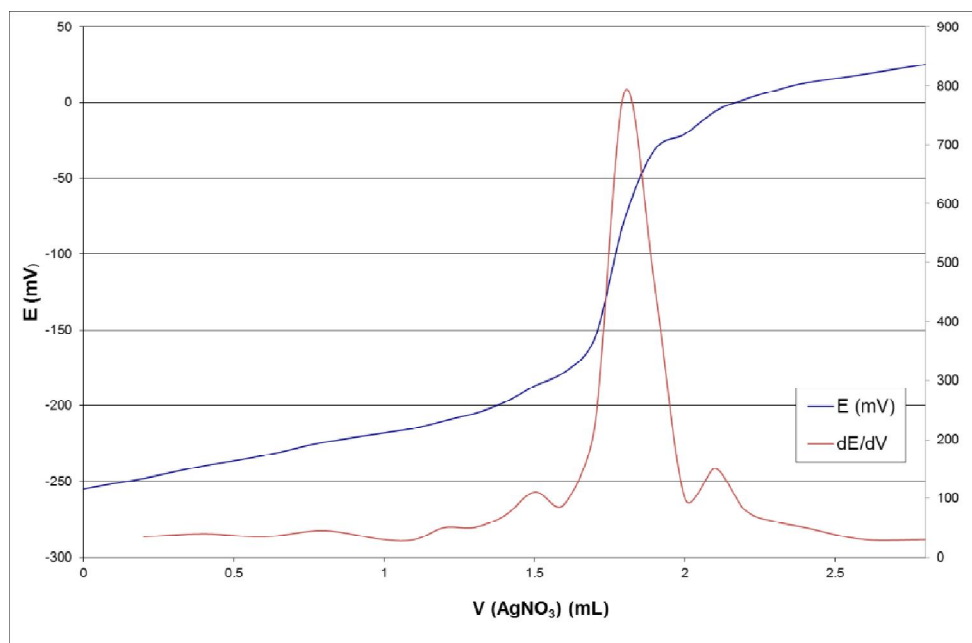


Figure 2-26 : Courbe de dosage des ions  $\text{Cl}^-$  par  $\text{AgNO}_3$

En parallèle, les ions sodium ont également été dosés, par spectroscopie d'émission atomique, technique nécessitant un étalonnage préalable (Figure 2-27). La gamme d'étalonnage étant comprise entre 0 et 5 ppm, la solution ayant servi au dosage des ions  $\text{Cl}^-$  a été diluée afin que sa concentration soit comprise dans la gamme d'étalonnage. La concentration de la solution mère ainsi déterminée est de 4,29 mmol/L, ce qui correspond parfaitement à la concentration en ions chlorures.

Les microalgues lyophilisées contiennent donc du NaCl, à hauteur d'environ 20 mg par gramme de microalgues sèches dans le lot 1. En effet, bien que *Scenedesmus* soit une espèce d'eau douce, son milieu de culture contient un pourcentage non nul de NaCl, qui est donc piégé dans les microalgues lors de leur lyophilisation.

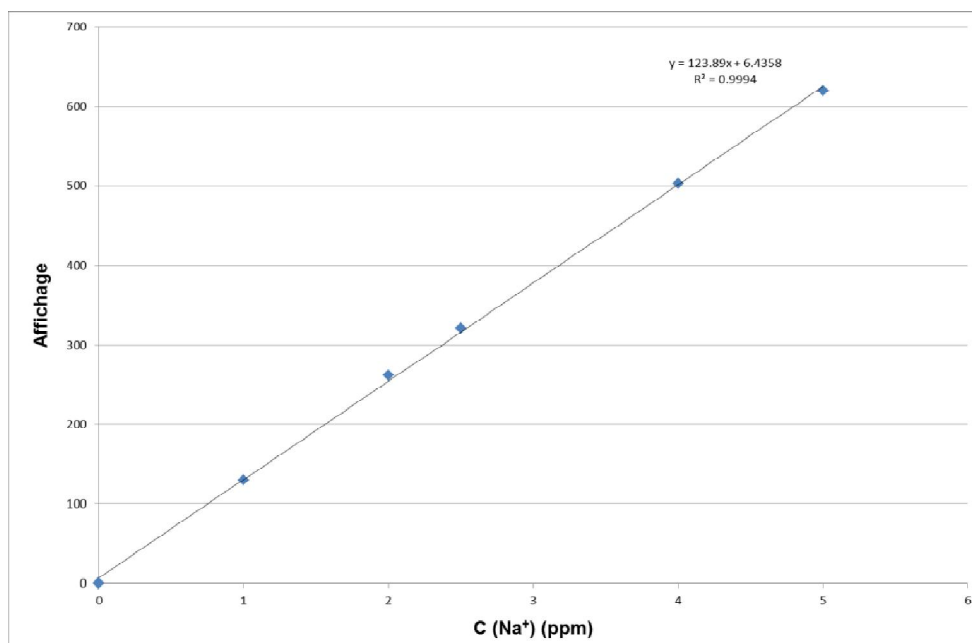


Figure 2-27 : Droite d'étalonnage du spectromètre d'émission atomique

#### b- Carbonate de calcium

Du carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$ , provenant très probablement du milieu de culture des microalgues (utilisé pour réguler le pH), a également été identifié dans les résidus de *Scenedesmus sp.*, par infrarouge. Son dosage a été réalisé *via* un calcimètre de Bernard, permettant de doser la teneur en carbonates.

Le principe du calcimètre de Bernard est basé sur la conversion des ions carbonates en dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  en milieu acide. La mesure du volume de gaz dégagé permet alors de remonter directement à la teneur en  $\text{CaCO}_3$  dans l'échantillon, en supposant que ce soit le seul type de carbonate présent. L'étalonnage du calcimètre de Bernard a été réalisé à partir de carbonate de calcium pur, pour des masses comprises entre 50 et 300 mg, chaque mesure ayant été réalisée en triplicat (Figure 2-28).

La caractérisation de trois prises d'échantillons de microalgues, de masses comprises entre 190 et 310 mg, a permis d'évaluer la teneur en  $\text{CaCO}_3$  aux environs de 8,5% en masse dans le lot 6.

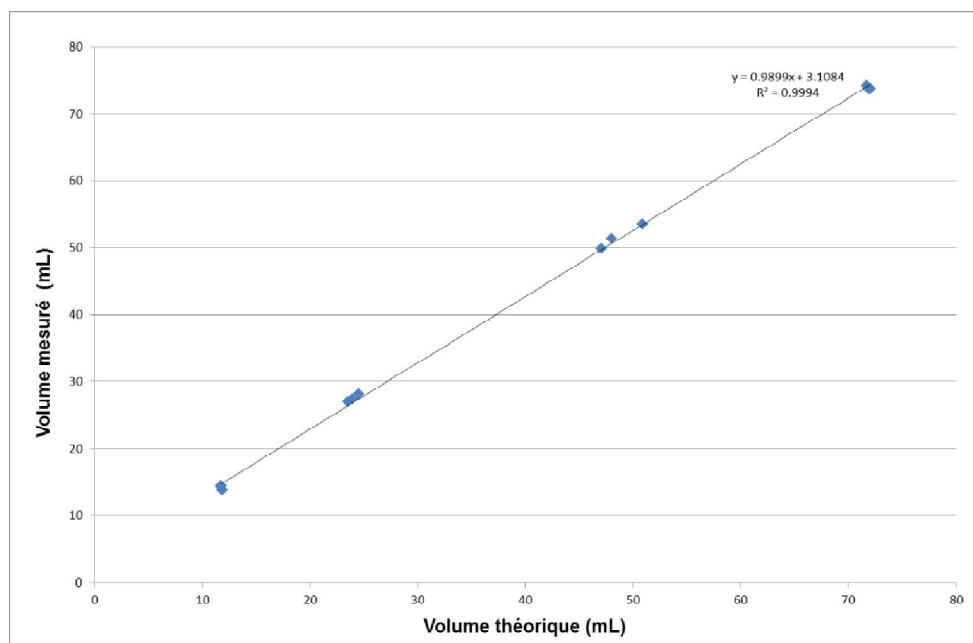


Figure 2-28 : Droite d'étalonnage du calcimètre de Bernard

## 6) Conclusions

La composition des microalgues étudiées est donc très complexe, et peut varier d'une récolte à une autre, selon les conditions de cultures auxquelles elles ont été exposées :

- les lipides de faible poids moléculaire sont principalement composés d'acides gras libres à chaînes à 16 ou 18 carbones. Selon les lots, ceux-ci sont retrouvés sous forme native (acide oléique), ou sous forme oxydée (acide 9-oxo-stéarique et acide 9-hydroxy-stéarique) ;
- les lipides de haut poids moléculaire, nommés algaenans, partiellement co-extraits par Soxhlet lorsque la polarité du solvant est suffisante ;
- les polysaccharides, composés de monosaccharides de natures variées, et dont l'enchaînement n'a pas été caractérisé ;
- les protéines, dont la composition précise n'a pas été identifiée ;
- des sels, provenant du milieu de culture, et ayant été piégés dans les microalgues au moment de leur lyophilisation ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ).

La distribution massique (dont une représentation moyenne obtenue à partir d'analyses de différents lots de microalgues est présentée Figure 2-29), ainsi que la composition précise de chacune de ces fractions au sein de la biomasse peuvent donc potentiellement influencer les propriétés rhéologiques de toute fraction ou matériau qui en serait issu.

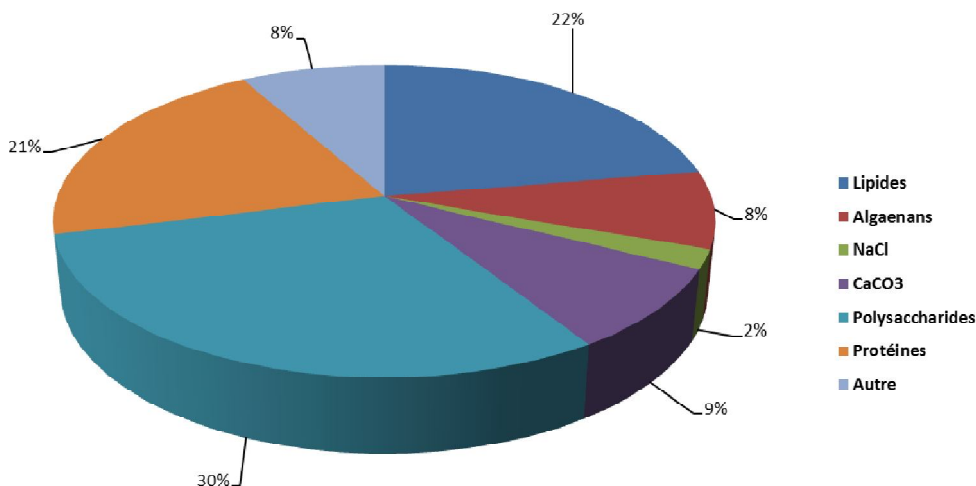


Figure 2-29 : Composition moyenne des résidus de *Scenedesmus sp.* après extraction d'une fraction des protéines hydrosolubles

### III – Potentiel rhéologique de la phase lipidique

Dans un premier temps, un intérêt particulier a été porté aux fractions lipidiques des microalgues, du fait de leurs propriétés hydrophobes intrinsèques. Dans ce cadre, il est important de considérer une éventuelle concurrence directe avec la production de biocarburants. De manière générale, ceux-ci sont préférentiellement générés par transestérification méthanolique ou éthanolique d'huiles végétales ou algales, composées de triglycérides. La présence d'acides gras libres n'est pas requise, et est même indésirable pour ce genre de procédé. En effet, la saponification des acides gras libres va mener à la formation d'eau dans le milieu réactionnel, participant ainsi à l'hydrolyse des esters d'acides gras. Ces acides carboxyliques vont donc entraîner une diminution du rendement en esters d'acides gras.

Il a été montré dans la première partie de ce chapitre que les extraits Soxhlet sont principalement composés d'acides gras libres. Pour ce cas d'étude particulier, l'utilisation des lipides en tant que liant routier n'entrerait donc pas en compétition avec la production de biodiesel.

#### 1) Caractérisation rhéologique des extraits Soxhlet

Afin de comparer le comportement thermorhéologique des extraits Soxhlet avec celui de bitumes pétroliers, des mesures de module complexe en cisaillement annulaire ont été réalisées. Quatre échantillons ont ainsi été caractérisés : R1, R2, R3 (obtenus par extractions

successives à l'hexane, au  $\text{CHCl}_3$ , et par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , et le mélange  $\text{R1}+\text{R2}+\text{R3}$ , obtenu par une extraction Soxhlet en un tour  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (norme du module complexe en Figure 2-30, angle de phase en Figure 2-31).

Concernant la rigidité des quatre fractions R1, R2, R3 et  $\text{R1}+\text{R2}+\text{R3}$ , le module diminue quand la température augmente ou quand la fréquence de sollicitation diminue, à l'image des bitumes pétroliers. L'angle de phase des trois matériaux R1, R2 et R3 augmente avec la température, mais adopte des comportements particuliers avec la fréquence. En effet, pour le matériau R1, l'angle de phase diminue quand la fréquence diminue. Pour le matériau R2, l'angle de phase apparaît peu sensible à la variation de fréquence. En revanche le comportement du matériau R3 est plus typique des bitumes pétroliers, avec une diminution de l'angle de phase lorsque la fréquence de sollicitation augmente. Le matériau extrait en un tour ( $\text{R1}+\text{R2}+\text{R3}$ ) présente un comportement comparable au matériau R2.

Il est également intéressant de noter que plus le solvant d'extraction est polaire, plus la norme du module complexe est élevée (Figure 2-30). Afin de comprendre les différents comportements de ces différentes fractions, il semble intéressant de tenter de relier ces propriétés rhéologiques à la composition chimique. Pour rappel, les teneurs en algaenans des différentes fractions sont présentées dans le Tableau 2-X.

Tableau 2-X : Teneurs massiques en algaenans des différents matériaux étudiés

	Teneur en algaenans (% massique)
<b>R1</b>	0
<b>R2</b>	15
<b>R3</b>	35
<b>R1+R2+R3</b>	22

Ainsi, sur la Figure 2-32 est représentée l'évolution de la norme du module complexe à 1 Hz des différentes phases en fonction de leur teneur en algaenans.

[CARACTERISATION DES RESIDUS DE SCENEDESMUS SP.]

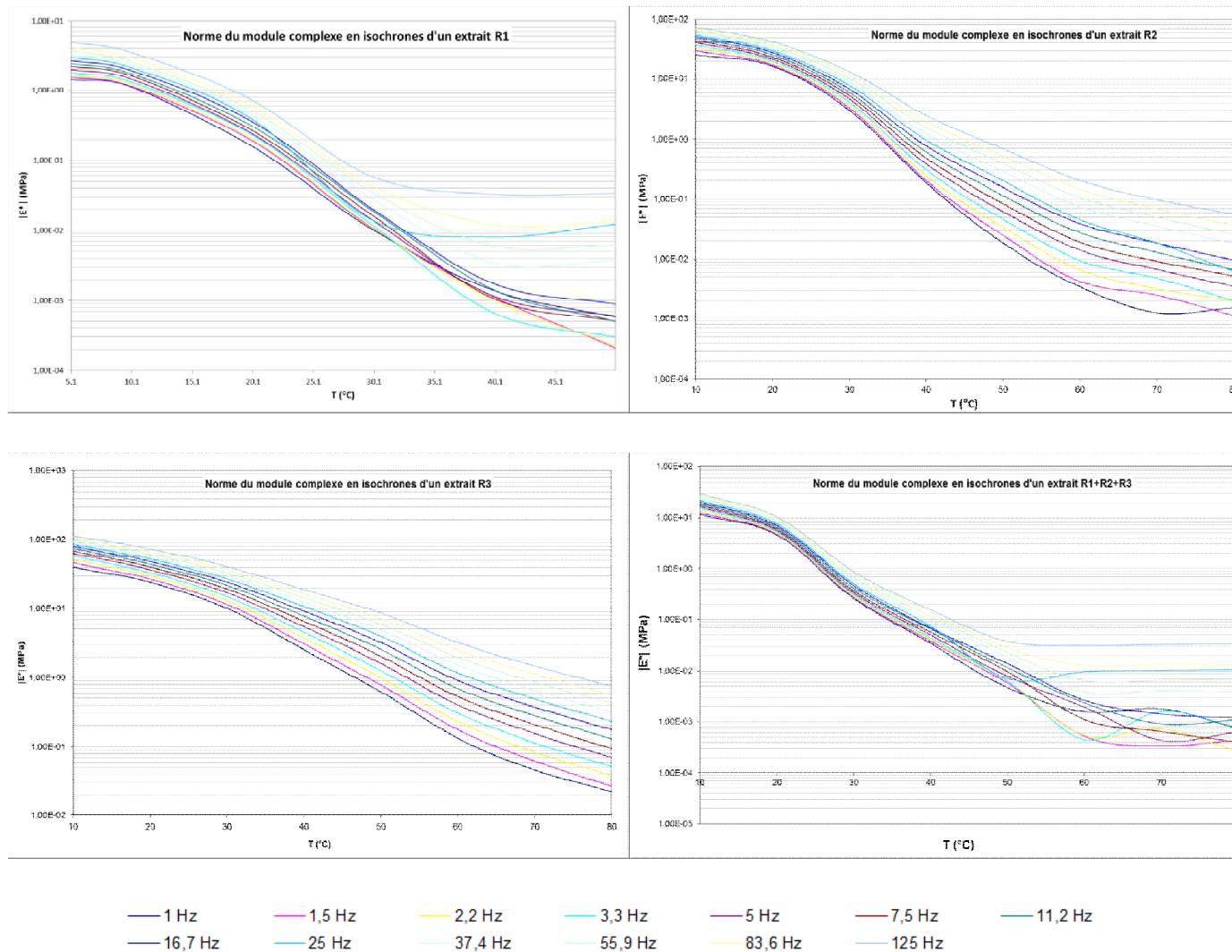


Figure 2-30 : Comparaison de la norme du module complexe en isochrone des différents extraits Soxhlet

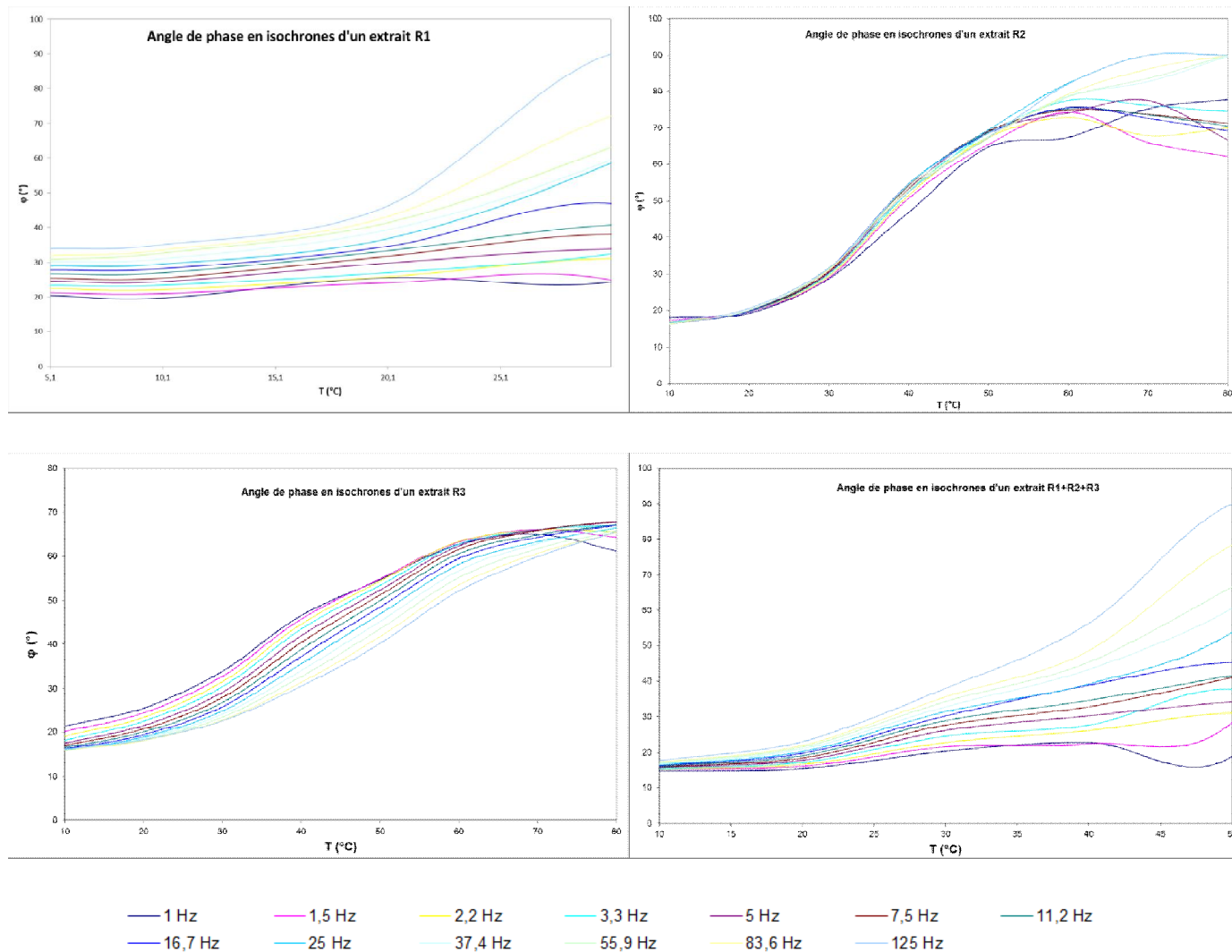


Figure 2-31 : Comparaison de l'angle de phase en isochrone des différents extraits Soxhlet

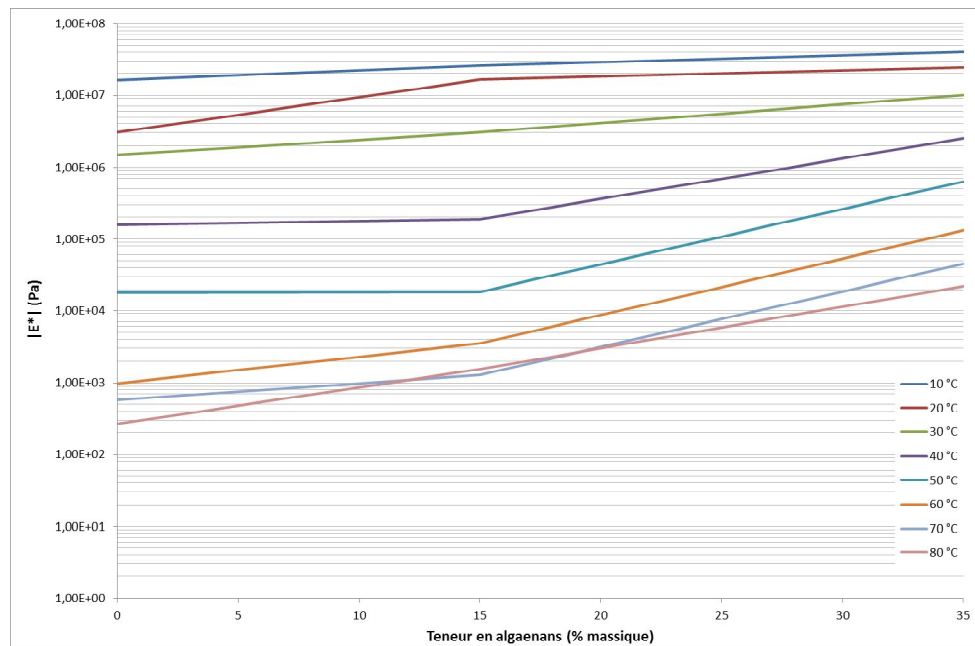


Figure 2-32 : Evolution de la norme du module complexe (1 Hz) entre 30 °C et 50 °C en fonction de la teneur en algaenans

Il semble donc que la rigidité du matériau soit directement reliée à sa teneur en algaenans. La présence de ces macromolécules semble apporter une cohérence rhéologique au matériau. Ce comportement est également observé sur la Figure 2-31, représentant l'évolution de l'angle de phase de chaque fraction avec la température. Seule les isochrones de la fraction R3 présentent un comportement cohérent (augmentation progressive de l'angle de phase avec la température). La valeur d'angle de phase 90°, optimale pour l'enrobage de granulats, n'est pas atteinte. Néanmoins, une valeur de 70°, atteinte à une température relativement faible (80 °C) correspond aux spécifications attendues.

La Figure 2-33 permet de comparer la susceptibilité cinétique, ainsi que la dureté de bitumes pétroliers et d'extraits Soxhlet, pour une vitesse de sollicitation de 125 Hz, et des températures comprises entre 10 °C et 70 °C.

Le matériau R3 semble donc être le matériau ayant le comportement le plus approprié. En effet, l'évolution de sa rigidité en fonction de la température est comprise entre celle d'un bitume 20/30 et celle d'un bitume 50/70. Quant à la fraction extraite par Soxhlet en un tour (R1+R2+R3), elle présente une rigidité nettement plus faible que celle d'un bitume 50/70, de une à deux décades selon la température. Elle pourrait néanmoins être utilisée pour ajuster la rhéologie d'une fraction plus rigide (loi des mélanges).

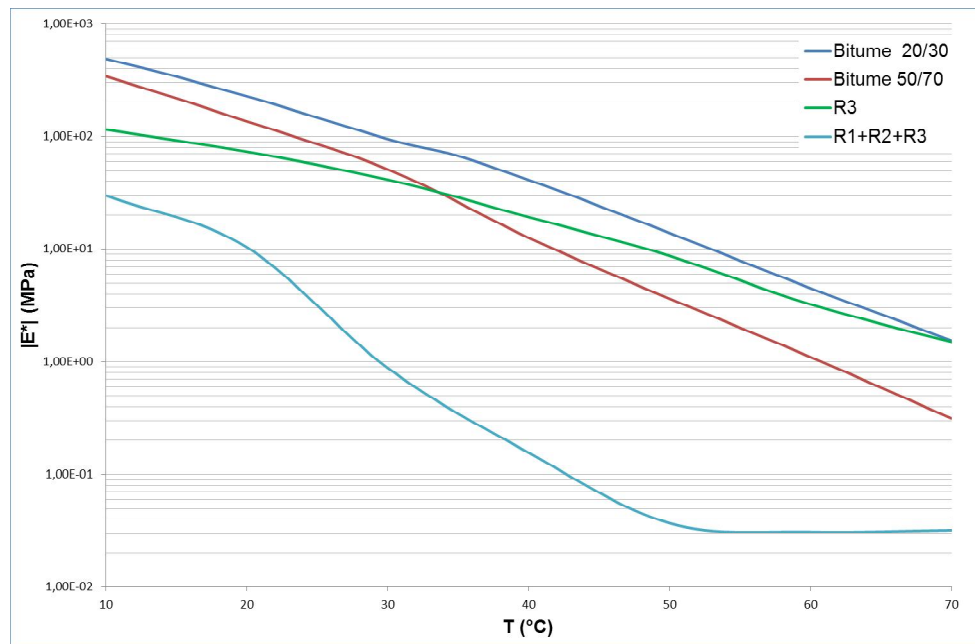


Figure 2-33 : Comparaison des duretés d'extraits Soxhlet avec celles de bitumes pétroliers

## 2) Influence de la concentration en algaenans

Afin de mieux apprécier l'influence de la concentration en algaenans sur les propriétés rhéologiques des extraits Soxhlet, des caractérisations ont été menées sur ces extraits, avec des teneurs en algaenans différentes, issus de deux lots différents de microalgues. Les courbes de Black, présentées en Figure 2-34, permettent bien de visualiser des différences de comportement en fonction du solvant d'extraction :

- les isothermes des fractions ne contenant pas ou peu d'algaenans ( $\leq 20\%$ ) présentent des discontinuités, signe d'une réorganisation moléculaire dans le milieu lorsque la température augmente. Après mise en œuvre sous forme d'enrobé, ceci peut avoir pour conséquence une discontinuité dans les propriétés de relaxation des contraintes, et générer l'apparition de plusieurs phases au sein du matériau ;
- les isothermes de la fraction contenant 35% d'algaenans sont continues, à l'instar de celles d'un bitume. Ceci démontre la stabilité et la simplicité thermo-rhéologique du matériau étudié. Il n'y a pas, dans ce cas, de réorganisation moléculaire du matériau avec une augmentation de température. Les mesures, réalisées en duplicats, ont montré une bonne répétabilité, avec des évolutions similaires de la norme du module complexe et de l'angle de phase avec la température. Notamment, l'angle de phase maximal (pour les faibles fréquences de sollicitations et les hautes températures) est

compris entre 70° et 80°, et la norme du complexe avoisine  $1,9 \cdot 10^2$  MPa pour les deux séries de mesure.

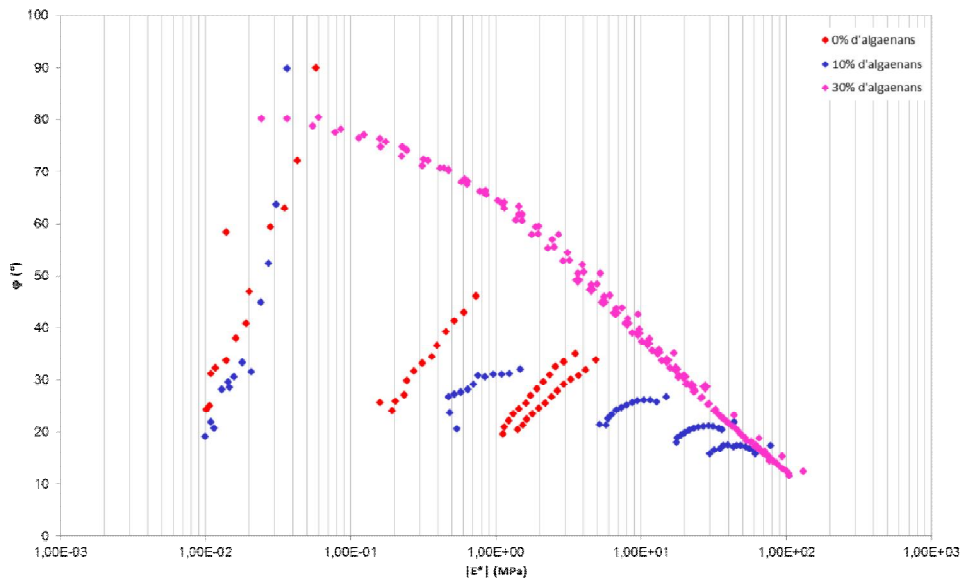
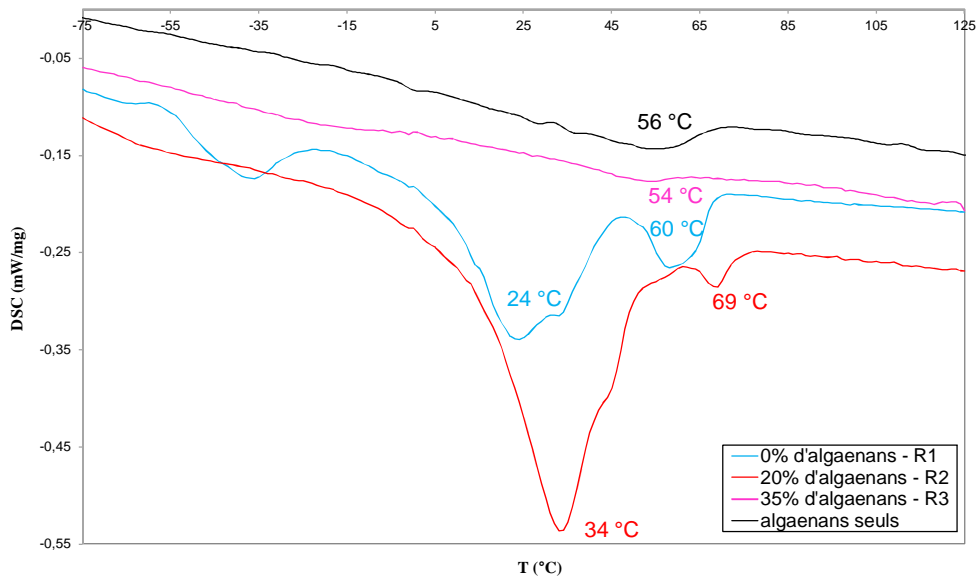


Figure 2-34 : Courbes de Black de trois fractions contenant des pourcentages progressifs en algaenans

Les propriétés rhéologiques des extraits Soxhlet semblent donc être principalement influencées par la teneur en algaenans. Il semble exister une concentration optimale, entre 20% et 35%, permettant d'accéder à un matériau thermo-rhéologiquement stable.

Des analyses de calorimétrie différentielle à balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry) ont également été menées, afin de corroborer les conclusions obtenues en rhéologie. Les résultats sont présentés en Figure 2-35. Les deux fractions contenant le moins d'algaenans (et étant les moins stables en rhéologie) présentent des pics de fusion assez large, entre 24 °C et 34 °C pour la première transition, et entre 60 °C et 69 °C pour la seconde transition. Ces pics correspondent très probablement à la fusion des acides gras libres, composants majoritaires de ces deux phases. Le décalage en température entre les deux extraits peut être lié à une variation de la distribution des acides gras au sein des échantillons, en termes de longueurs de chaînes et de degrés d'insaturation. En effet, il est connu qu'une augmentation de la longueur de la chaîne carbonée va entraîner une augmentation de la température de fusion, tandis qu'une augmentation du nombre d'insaturations va avoir pour conséquence sa diminution.



**Figure 2-35 : Courbes DSC de trois fractions contenant des pourcentages progressifs en algaenans et comparaison avec le comportement d'algaenans seuls**

L'analyse DSC d'acides gras libres de référence a permis de mettre en avant cette variation de point de fusion (Figure 2-36). L'analyse de la série des acides gras à 18 carbones permet de mettre en évidence la diminution du point de fusion avec l'augmentation du nombre d'insaturations (en passant de zéro à trois insaturations, le point de fusion passe d'approximativement 75 °C à environ -11 °C). La configuration des doubles liaisons (*cis* ou *trans*) joue également un rôle important sur les températures de fusion, puisqu'une différence de 27 °C est observée entre les pics de fusion de l'acide oléique *cis* et de son isomère *trans*. De même, pour deux acides gras saturés à 18 et 22 carbones respectivement, une différence de point de fusion supérieure à 10 °C est observée.

Le comportement thermique de deux huiles végétales, composées de triglycérides, a également été étudié (Figure 2-37). Ainsi, l'huile de lin, riche en acides gras polyinsaturés, voit sa température de fusion diminuer par rapport à l'huile de colza, riche en acides gras monoinsaturés. Globalement, les températures de fusion des triglycérides sont abaissées par rapport aux températures de fusion des acides gras libres.

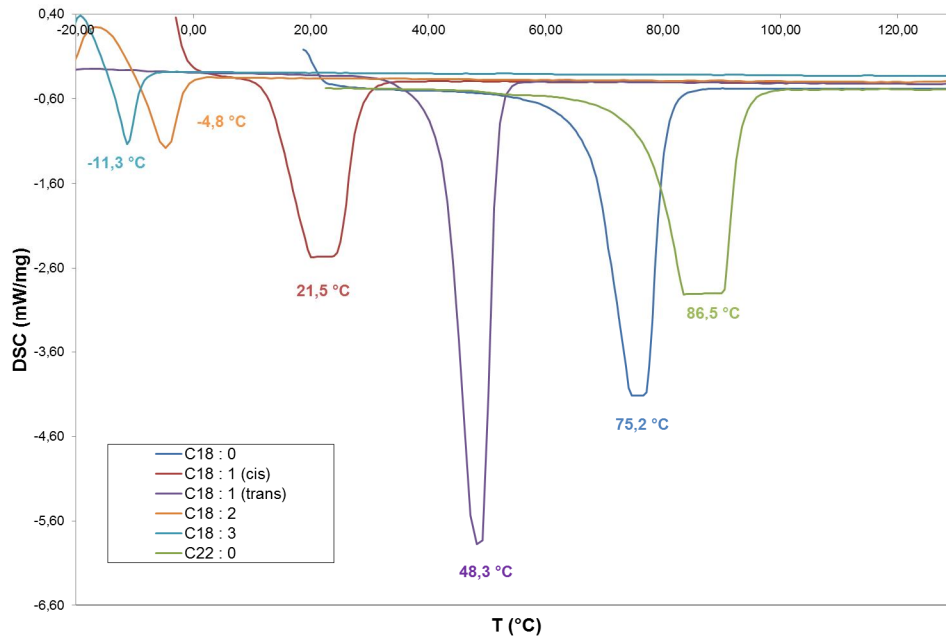


Figure 2-36 : Courbes de DSC d'acides gras libres de référence

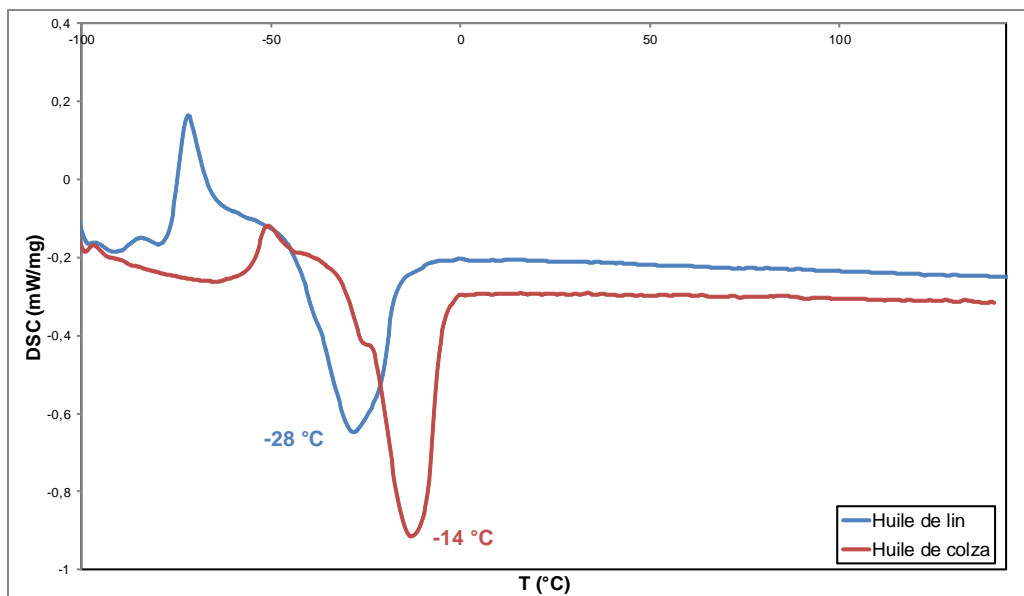


Figure 2-37 : Courbes de DSC d'huiles végétales composées de triglycérides

Les plages de température de fusion observées pour les extraits Soxhlet R1 et R2 correspondent donc bien aux plages de température de fusion des acides gras libres, et non des triglycérides, confirmant ainsi l'absence de ceux-ci au sein des résidus de *Scenedesmus sp.*. La réorganisation moléculaire des phases pauvres en algaenans, détectées *via* les courbes de Black, pourrait donc être directement liée à la fusion des acides gras libres.

A l'inverse, la fraction riche en algaenans ne présente plus ces pics de fusion, bien qu'elle contienne encore 65% en masse d'acides gras libres. Néanmoins, une transition semble présente aux environs de 54 °C. Cette transition semble être typique des algaenans, la même transition étant observée pour les algaenans seuls (isolés par précipitation dans CCl<sub>4</sub> des huiles extraites par Soxhlet). Cette transition ne peut pas être attribuée à la fusion des algaenans, puisque ceux-ci ont été testés sur banc Koeffler de la température ambiante jusqu'à 250 °C, et aucune fusion n'a pu être visuellement observée.

Malgré tout, ces résultats de DSC sont en accord avec les résultats de rhéologie. En effet, ils montrent que le comportement de la fraction la plus polaire est nettement plus influencé par les algaenans que par les acides gras qui la composent. Il semble donc exister une concentration minimale en algaenans permettant d'accéder à un matériau thermo-rhéologiquement simple, ne présentant plus de pic de fusion, et se comportant de manière continue vis-à-vis des variations de température et fréquences de sollicitation.

### 3) Conclusions

Les phases lipidiques extraites par Soxhlet des résidus de *Scenedesmus sp.* présentent donc des comportements rhéologiques très intéressants. Ces comportements sont fonction de la distribution massique entre les acides gras libres et les algaenans au sein de l'extrait. Il semble exister un rapport optimal, permettant d'obtenir un matériau thermo-rhéologiquement simple. En deçà, le matériau se déstructure avec une augmentation modérée de la température. Ces matériaux à faible teneur en algaenans ne sont donc *a priori* pas appropriés pour être utilisés en tant que liant routier, mais pourraient servir dans une certaine mesure à moduler les propriétés rhéologiques des fractions les plus riches en algaenans.

## IV – Conclusions

Dans cette partie, il a été démontré que les microalgues étudiées sont composées de nombreuses entités biologiques. Selon les conditions auxquelles ces micro-organismes sont soumis durant leur croissance, leur composition en lipides, protéines et polysaccharides peut varier, et ce manque de reproductibilité peut parfois entraîner des difficultés dans la rationalisation des résultats. De plus, la présence de sels de culture au sein de la matière première peut conduire à une sous-estimation des rendements. Néanmoins, la biomasse étudiée est composée de 20 à 30% de lipides approximativement, formés par des acides gras

libres à longues chaînes (16 et 18 carbones principalement). La présence d'un biopolymère, hautement aliphatique, entrant dans la composition des résidus de microalgues à hauteur de 8%, a également été démontrée.

Le potentiel rhéologique de cette phase lipidique a également été mis en avant. La variabilité de ces propriétés peut être expliquée par la nature du solvant d'extraction, la polarité de ce dernier influençant la quantité d'algaenans extraits. Lorsque les phases lipidiques extraites sont composées d'une quantité suffisante d'algaenans dispersés au sein d'une matrice d'acides gras libres, ceux-ci apportent une cohérence à l'ensemble, qui présente alors des propriétés viscoélastiques similaires à celles de bitumes issus de la pétrochimie.

Ces propriétés satisfaisantes constituent une preuve de concept intéressante, et laissent présager tout le potentiel des microalgues pour la formulation d'un nouvel enrobé « vert ».

Il est malgré tout nécessaire de trouver de nouvelles voies de transformation de la biomasse, plus éco-responsables, économes en énergie et en solvants. En effet, l'extraction Soxhlet nécessite des temps de chauffage importants, ainsi qu'une consommation élevée en solvant organique chloré, difficilement compatibles avec un processus développé à l'échelle industrielle.

De plus, il serait intéressant de ne pas valoriser uniquement la fraction lipidique des microalgues, mais également une partie, voire la totalité, des fractions polysaccharidiques et protéiques, afin de limiter ou supprimer la création de nouveaux sous-produits.

## Bibliographie

- [1] E. H. Hegewald. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. *Algae (The Korean Journal of Phycology)* **1997**, *12*, 235–246.
- [2] E. W. Becker, *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Press Syndicate of the University of Cambridge, **1994**.
- [3] M. Piorreck, K.-H. Baasch, P. Pohl. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 207 – 216.
- [4] M. A. Toyub, M. I. Miah, A. B. Habib, M. M. Rahman. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. *Bangladesh Journal of Animal Science* **2008**, *37*, 86–93.
- [5] S. Renaud, D. Parry, L.-V. Thinh. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology* **1994**, *6*, 337–345.
- [6] M. Tahiri, A. Benider, M. Belkoura, A. Dauta. Caractérisation biochimique de l’algue verte *Scenedesmus abudans* : influence des conditions de culture. *International Journal of Limnology* **2000**, *36*, 3–12.
- [7] T. M. Badwi, E. M. Ibrahim, M. M. Zeinhom, *Partial replacement of fish meal with dried microalga (Chlorella spp and Scenedesmus spp) in Nile tilapia (Oreochromis Niloticus) diets*, *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 801–811.
- [8] J. Dufour, J. Moreno, R. Rodriguez, *Life Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae Oil: Effect of Algae Species and Cultivation System - Towards Life Cycle Sustainability Management*, M. Finkbeiner, Springer Netherlands, **2011**, 437–442.
- [9] V. Vasudevan, R. W. Stratton, M. N. Pearlson, G. R. Jersey, A. G. Beyene, J. C. Weissman, M. Rubino, J. I. Hileman. Environmental performance of algal biofuel technology options. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, 2451–2459.
- [10] Z. Dubinsky, S. Aaronson. Increase of lipid yields from some algae by acid extraction. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 51 – 52.

- [11] AOCS, English *The lipid library*, **2010**. <http://lipidlibrary.aocs.org/index.html>.
- [12] G. Huang, F. Chen, D. Wei, X. Zhang, G. Chen. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* **2010**, *87*, 38 – 46.
- [13] J.-T. Wu, Y.-R. Chiang, W.-Y. Huang, W.-N. Jane. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology* **2006**, *80*, 338 – 345.
- [14] E. Ryckebosch, K. Muylaert, I. Foubert. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2012**, *89*, 189–198.
- [15] J.-Y. Lee, C. Yoo, S.-Y. Jun, C.-Y. Ahn, H.-M. Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, S75 – S77.
- [16] S. Tang, C. Qin, H. Wang, S. Li, S. Tian. Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids* **2011**, *57*, 44 – 49.
- [17] Y. Tan, J. Lin. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus* rubescens-like microalga. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 10131–10135.
- [18] J. Leeuw, G. Versteegh, P. Bergen. Biomacromolecules of algae and plants and their fossil analogues. *Plant Ecology* **2006**, *182*, 209–233.
- [19] B. Teyssèdre, *Les algues vertes (phylum Viridiplantae) sont-elles vieilles de deux milliards d'années?*, **2006**.
- [20] J. S. S. Damsté, F. C. de las Heras, P. F. van Bergen, J. W. de Leeuw. Characterization of tertiary catalan lacustrine oil shales: discovery of extremely organic sulphur-rich type I kerogens. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1993**, *57*, 389 – 415.
- [21] P. Blokker, S. Schouten, J. W. de Leeuw, J. S. S. Damsté, H. van den Ende. A comparative study of fossil and extant algaenans using ruthenium tetroxide degradation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2000**, *64*, 2055 – 2065.
- [22] S. Derenne, C. Largeau, P. G. Hatcher. Structure of *Chlorella fusca* algaenan: relationships with ultralaminae in lacustrine kerogens; species- and environment-dependent

variations in the composition of fossil ultralaminae. *Organic Geochemistry* **1992**, *18*, 417 – 422.

[23] F. Gelin, J. W. de Leeuw, J. S. S. Damsté, S. Derenne, C. Largeau, P. Metzger. Scope and limitations of flash pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry as revealed by the thermal behaviour of high-molecular-weight lipids derived from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1994**, *28*, 183–204.

[24] P. Blokker, S. Schouten, H. van den Ende, J. W. de Leeuw, P. G. Hatcher, J. S. S. Damsté. Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Organic Geochemistry* **1998**, *29*, 1453 – 1468.

[25] B. Allard, J. Templier, C. Largeau. An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from microalgae. *Organic Geochemistry* **1998**, *28*, 543 – 548.

[26] O. Bertheas, P. Metzger, C. Largeau. A high molecular weight complex lipid, aliphatic polyaldehyde tetraterpenediol polyacetal from *Botryococcus braunii* (L race). *Phytochemistry* **1999**, *50*, 85 – 96.

[27] M. C. Rodríguez, A. S. Cerezo. The resistant biopolymer in cell walls of *Coelastrum sphaericum*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 731 – 734.

[28] P. Blokker, S. Schouten, J. W. de Leeuw, J. S. Sinninghe Damsté, H. van den Ende. Molecular structure of the resistant biopolymer in zygosporangium cell walls of *Chlamydomonas monoica*; *Planta* **1999**, *207*, 539–543.

[29] P. Blokker, H. van den Ende, J. W. de Leeuw, G. J. Versteegh, J. S. S. Damsté. Chemical fingerprinting of algaenans using  $RuO_4$  degradation. *Organic Geochemistry* **2006**, *37*, 871 – 881.

[30] B. Allard, J. Templier, C. Largeau. Artifactual origin of mycobacterial bacteran. Formation of melanoidin-like artifact macromolecular material during the usual isolation process. *Organic Geochemistry* **1997**, *26*, 691 – 703.

[31] B. Allard, J. Templier. Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 369 – 380.

- [32] B. Allard, M.-N. Rager, J. Templier. Occurrence of high molecular weight lipids (C80+) in the trilaminar outer cell walls of some freshwater microalgae. A reappraisal of algaenan structure. *Organic Geochemistry* **2002**, *33*, 789 – 801.
- [33] F. Gelin, I. Boogers, A. A. Noordeloos, J. S. Damsté, P. Hatcher, J. de Leeuw. Novel, resistant microalgal polyethers: an important sink of organic carbon in the marine environment? *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1996**, *60*, 1275 – 1280.
- [34] S. Schouten, P. Moerkerken, F. Gelin, M. Baas, J. W. de Leeuw, J. S. S. Damsté. Structural characterization of aliphatic, non-hydrolyzable biopolymers in freshwater algae and a leaf cuticle using ruthenium tetroxide degradation. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 987 – 993.
- [35] B. Allard, J. Templier. High molecular weight lipids from the trilaminar outer wall (TLS)-containing microalgae *Chlorella emersonii*, *Scenedesmus communis* and *Tetraedron minimum*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 459 – 467.
- [36] J. Burczyk. Biogenetic relationships between ketocarotenoids and sporopollenins in green algae. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 113 – 119.
- [37] A. W. Atkinson, B. E. S. Gunning, P. C. L. John. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of <sup>14</sup>C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* **1972**, *107*, 1–32.
- [38] F. Behar, S. Derenne, C. Largeau. Closed pyrolyses of the isoprenoid algaenan of *Botryococcus braunii*, L race: geochemical implications for derived kerogens. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1995**, *59*, 2983 – 2997.
- [39] S. Derenne, C. Largeau, C. Berkaloff. First example of an algaenan yielding an aromatic-rich pyrolysate. Possible geochemical implications on marine kerogen formation. *Organic Geochemistry* **1996**, *24*, 617 – 627.
- [40] F. Gelin, I. Boogers, A. A. Noordeloos, J. S. Damsté, R. Riegman, J. W. D. Leeuw. Resistant biomacromolecules in marine microalgae of the classes Eustigmatophyceae and Chlorophyceae: geochemical implications. *Organic Geochemistry* **1997**, *26*, 659 – 675.
- [41] A. J. Simpson, X. Zang, R. Kramer, P. G. Hatcher. New insights on the structure of algaenan from *Botryococcus braunii* race A and its hexane insoluble botryals based on

multidimensional NMR spectroscopy and electrospray-mass spectrometry techniques. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 783 – 796.

[42] A. Amblès, L. Grasset, G. Dupas, J.-C. Jacquesy. Ester and ether bond cleavage in immature kerogens. *Organic Geochemistry* **1996**, *24*, 681 – 690.

[43] D. Dessort, J. Connan, S. Derenne, C. Largeau. Comparative studies of the kinetic parameters of various algaenans and kerogens via open-system pyrolyses. *Organic Geochemistry* **1997**, *26*, 705 – 720.

[44] I. M. Höld, S. Schouten, H. M. van Kaam-Peters, J. S. S. Damsté. Recognition of n-alkyl and isoprenoid algaenans in marine sediments by stable carbon isotopic analysis of pyrolysis products of kerogens. *Organic Geochemistry* **1998**, *28*, 179 – 194.

[45] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **1956**, *28*, 350–356.

[46] M. G. Sevag, D. B. Lackman, J. Smolens. The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form. *Journal of Biological Chemistry* **1938**, *124*, 425–436.

[47] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **1951**, *193*, 265–275.





**Chapitre 3**  
**Liquéfaction hydrothermale des**  
**résidus de *Scenedesmus sp.***



## Introduction

La liquéfaction hydrothermale apparaît être une technique de choix dans la valorisation de microalgues en tant que substitut bitumineux. En effet, cette technique se déroule en milieu aqueux, permettant ainsi de s'affranchir d'une étape préalable de séchage de la biomasse, et met en œuvre des réactions thermochimiques, permettant de valoriser en phase hydrophobe non seulement la fraction lipidique de la biomasse, mais également une partie des fractions polysaccharidique et protéinique.

Néanmoins, les processus mis en jeu sont complexes. L'étude bibliographique présentée dans le premier chapitre a montré que les paramètres à prendre compte sont nombreux (température, pression...), et l'influence de chacun de ces paramètres sur les rendements et les caractéristiques des produits obtenus est encore mal connue et maîtrisée. De plus, il peut exister une corrélation entre ces différents paramètres, entraînant une difficulté supplémentaire dans la rationalisation des résultats.

Après avoir présenté dans une première partie les appareils de liquéfaction utilisés, la deuxième partie sera consacrée à deux études préliminaires, menées dans le but d'identifier les paramètres les plus pertinents à étudier.

Après identification de ces paramètres, le moyen le plus adapté pour déterminer s'il y a corrélation entre les conditions expérimentales, les rendements en bio-huile et/ou les propriétés rhéologiques, semble être la mise en place d'un plan d'expériences. Ce dernier doit permettre d'identifier au mieux l'influence de chaque facteur pris de manière isolé, ainsi que leurs éventuelles interactions.

De plus, l'utilisation d'appareils de liquéfaction de volumes variables (compris entre 50 mL et 1 L) permettra :

- d'identifier et de caractériser des effets de changement d'échelle en termes de rendements et de composition des différentes fractions ;
- d'appréhender les difficultés pratiques d'une liquéfaction hydrothermale à grande échelle potentiellement industrialisable.

## I – Présentation des appareillages

Trois appareils de liquéfaction ont été utilisés pour réaliser les expériences de liquéfaction hydrothermale. Les deux premiers sont des appareils fournis par Parr Instrument Company. Le troisième appareil a été fourni par SACMO. Leurs caractéristiques sont présentées dans les paragraphes suivants. Tous ces appareils sont utilisés en mode « batch », c'est-à-dire que l'appareil doit être arrêté entre deux expériences. Il n'existe à l'heure actuelle que très peu d'appareils de liquéfaction hydrothermale en mode « continu ». [1] Pourtant, c'est ce type d'appareillage qui sera amené à être développé à l'échelle industrielle, car il permet de s'affranchir des étapes successives de chauffage puis de refroidissement du réacteur entre chaque chargement. Ces étapes sont inhérentes au mode « batch », ces étapes représentant des pertes énergétiques importantes.

### 1) Réacteurs de Parr

Les deux réacteurs de Parr sont composés d'une cuve en inox, de 50 mL et 300 mL respectivement. La température est régulée par un thermocouple plongeant directement dans le milieu réactionnel, et qui est relié à un PID (pour « Proportional-Integral-Derivative »). Le chauffage est assuré par un collier chauffant en céramique, pouvant générer des températures jusqu'à 350 °C au sein du milieu réactionnel. Pour l'enceinte de 50 mL, une chemise en aluminium assure le contact thermique entre l'enceinte et le collier chauffant. L'ensemble est également équipé d'un manomètre permettant de vérifier la pression au cours de l'expérience (qui ne doit pas dépasser 180 MPa, ce qui correspond à la limite de résistance du disque de rupture). Enfin, deux vannes correspondent à une entrée (reliée à une bouteille de N<sub>2</sub>) et une sortie de gaz (permettant de purger l'enceinte en fin de manipulation), tandis que la troisième permet de prélever le milieu réactionnel à chaud et sous pression (Figure 3-1).



Figure 3-1 : Système de liquéfaction hydrothermale de 50 mL (Parr Instrument Company)

## 2) Réacteur de SACMO

Le troisième réacteur est situé à l'Ecole des Mines de Nantes, au sein du laboratoire « Systèmes Energétiques et Environnement » du GEPEA. Les résultats des expériences menées sur ce réacteur dans le cadre du projet Algoroute ont été comparés aux résultats obtenus sur les réacteurs de Parr.

Ce réacteur est composé d'une cuve en inox de 1 L. Le système de chauffage est différent de celui des appareils de Parr, puisqu'ici, des résistances chauffantes sont présentes à l'intérieur des parois de la cuve, permettant d'atteindre des températures de chauffe de 400 °C (Figure 3-2). Les vitesses de chauffe sont également plus élevées : quand il faut approximativement soixante minutes au collier chauffant de Parr pour atteindre 300 °C, il en faut environ dix pour le réacteur SACMO. La pression maximale d'utilisation est de 190 MPa. L'ensemble du système est équipé d'un système de régulation thermique, et d'acquisition des données (températures, pression, puissance consommée et débits de gaz – H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, ou CO – injecté).

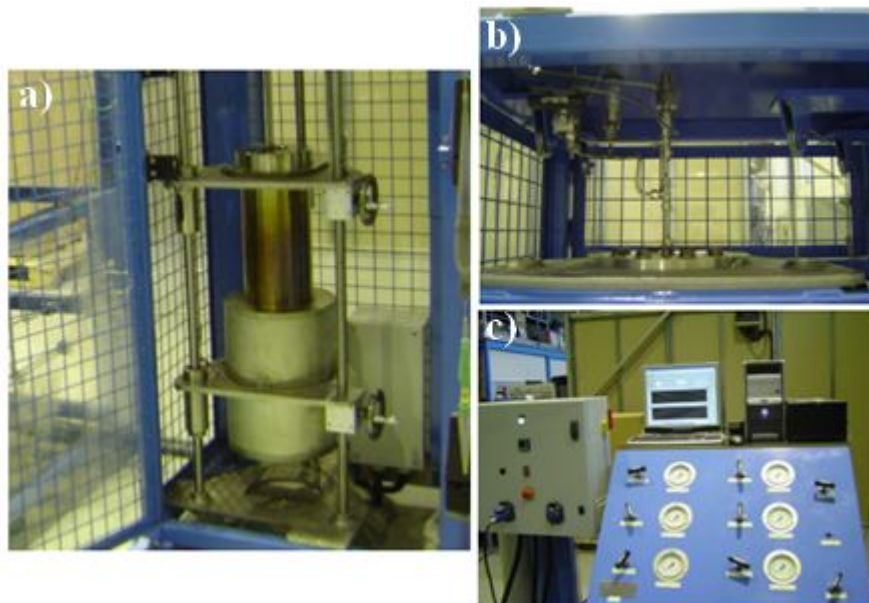


Figure 3-2 : Système de liquéfaction hydrothermale de 1L fourni par SACMO  
a) Enceinte de liquéfaction ; b) Partie supérieure de l'enceinte de liquéfaction ; c) Système de contrôle des gaz injectés

## II – Etudes préliminaires

### 1) Suivi thermique par DSC

Afin de déterminer les plages de températures optimales à étudier, des essais de liquéfaction hydrothermale ont été menés en cellules de DSC. Ces expériences doivent permettre d'étudier le comportement de la biomasse en milieu hydrothermal en fonction de la température, et également de mesurer la dépense énergétique de ce procédé.

La limitation à ce type d'essai réside dans le volume réduit de la cellule (20  $\mu\text{L}$ ). La masse de travail est donc limitée (3 mg de microalgues pour 12  $\mu\text{L}$  d'eau) et augmente donc les problèmes liés à une prise d'échantillon non homogène. De plus, il est impossible de déterminer la pression au sein de l'enceinte à un instant  $t$  (si la pression autogène de vapeur d'eau peut aisément être déterminée, il n'est pas possible de déterminer la quantité de gaz créé par réactions chimiques).

Deux expériences ont pu être menées. Elles se sont déroulées entre 25 °C et 300 °C, avec une vitesse de chauffe de 2 °C/min, permettant de compenser l'inertie thermique des creusets en acier (cette vitesse de chauffe a été optimisée sur des composés de référence). Cette vitesse

est différente de celle appliquée lors des liquéfactions en enceintes de 50 mL et 300 mL (qui s'approche de 5 °C/min), les phénomènes observés seront donc potentiellement différents.

Après avoir atteint la température de 300 °C, celle-ci a été maintenue à cette valeur durant une heure. Après refroidissement à 25 °C, un deuxième cycle de chauffe jusqu'à 300 °C à 2 °C/min a été imposé sur le même échantillon, afin de vérifier la réversibilité des réactions.

La courbe DSC liée au premier essai ne présente qu'un seul pic exothermique (Figure 3-3), à 219 °C, superposée à une parabole, correspondant à l'énergie fournie par le système pour chauffer l'eau (le creuset de référence ne contenant pas d'eau). La présence d'un pic exothermique est probablement lié à l'hydrolyse des polysaccharides. En effet, il est connu dans la littérature que la formation de monosaccharides à partir de polysaccharides en milieu subcritique se fait entre 200 °C et 250 °C. Ainsi, l'hydrolyse de la lignine et de l'hémicellulose peut débuter à 190 °C, alors que l'hydrolyse de la cellulose n'est complète qu'au-delà de 260 °C. [2], [3] De manière moins probable, ce pic pourrait correspondre à l'hydrolyse des protéines, qui ne se déroule de manière générale que très rarement en dessous de 230 °C. [3] Après avoir atteint la température de consigne de 300 °C, plus aucun pic n'a été observé.

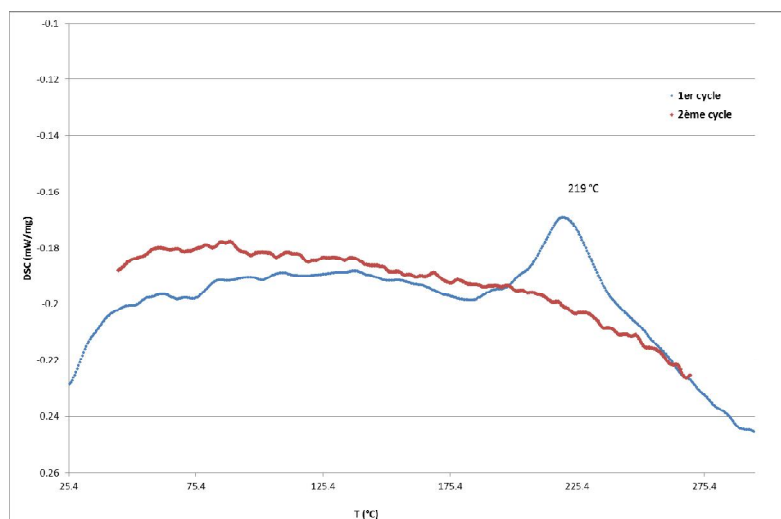


Figure 3-3 : Courbes DSC de liquéfaction hydrothermale

L'intégration de ce pic, entre 185 °C et 250 °C conduit à une énergie de 26,99 J/g d'échantillon placé dans le creuset, composé à 20% de microalgues. En considérant que

l'énergie libérée est uniquement due à l'hydrolyse des liaisons osidiques, l'énergie libérée durant cette hydrolyse est donc de 134,95 J/g de microalgues.

Au deuxième cycle, plus aucun pic n'apparait, ce qui signifie que la réaction observée lors du premier cycle est non réversible. Ceci est donc cohérent avec une réaction d'hydrolyse des polysaccharides. A l'instar du premier cycle, aucun pic n'a été observé après avoir atteint des conditions isothermes à 300 °C.

Cet essai semble assez reproductible, compte-tenu de la faible prise d'échantillon. En effet, une deuxième expérience menée dans des conditions similaires a montré un comportement très proche de celui observé lors de la première expérience (Figure 3-4). Un pic exothermique est observé à la même température précisément (219 °C, intégrant pour une énergie de 117,93 J/g de microalgues), et une absence de signal est observée à partir du moment où des conditions isothermes sont atteintes. La seule différence appréciable visuellement réside dans la zone autour de 125 °C. Lors de la première expérience, aucune transition n'a pu être observée dans cette zone, tandis que lors de la deuxième expérience, un signal est observé (intégration de 62,95 J/g de microalgues).

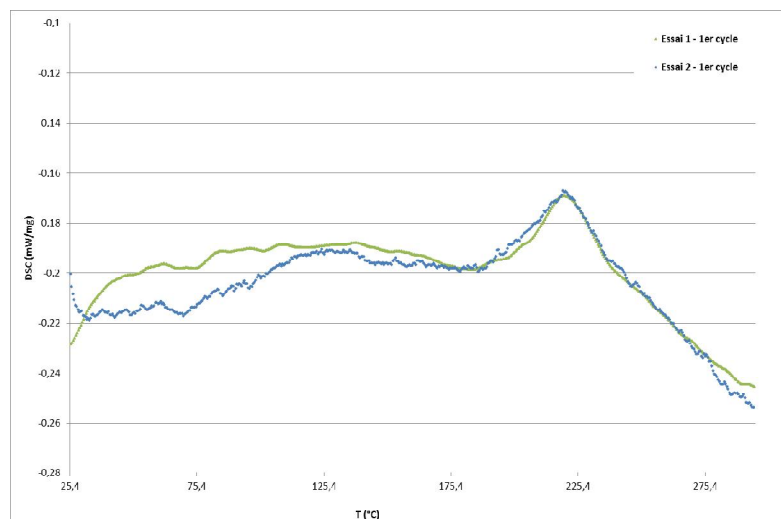


Figure 3-4 : Réproductibilité de l'essai de liquéfaction hydrothermale en cellule DSC

Il semble donc qu'une température supérieure à 220 °C soit nécessaire pour que des réactions commencent à se dérouler.

## 2) Essais préliminaires de liquéfaction en enceinte de 50 mL

Afin d'appréhender au mieux les expériences de liquéfaction hydrothermale et d'identifier les paramètres semblant influencer les propriétés viscoélastiques des matériaux hydrophobes isolés, une étude préliminaire a été menée sur le lot 4 de microalgues (se présentant sous la forme d'une pâte contenant environ 80% d'eau en poids). Les expériences ont été menées à partir d'environ 28 g de pâte de microalgues.

Quelles que soient les conditions de liquéfaction appliquées, trois phases ont pu être isolées :

- une phase hydrophobe, composée d'un mélange intime entre une huile viscoélastique noire et des résidus solides bruns ;
- une fraction hydrophile orangée, se retrouvant en milieu aqueux ;
- une phase gazeuse.

Après une purge du système, les deux premières fractions (Figure 3-5) sont facilement séparables par simple gravité.



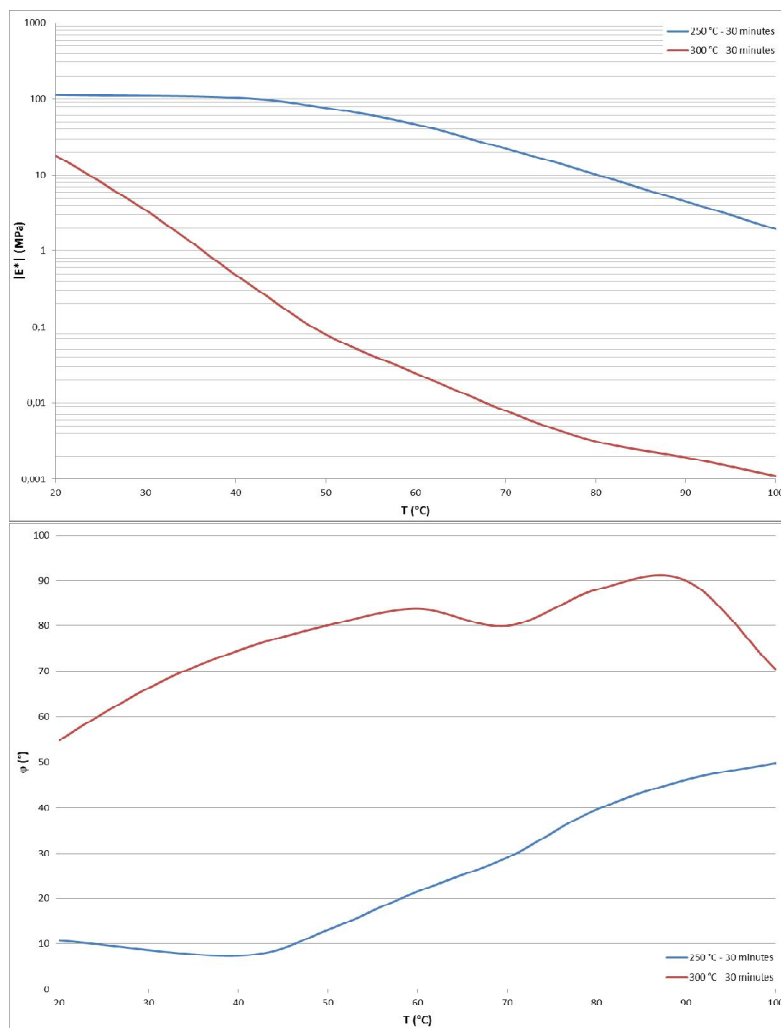
**Figure 3-5 : Photographies des différentes fractions obtenues par liquéfaction hydrothermale (phase aqueuse à gauche, mélange entre l'huile et les résidus solides à droite)**

Dans l'idéal, la fraction composée de l'huile et des résidus solides pourrait directement être utilisée comme matériau de substitution au bitume. Ce procédé d'isolement serait alors peu onéreux et plus « vert » qu'une extraction Soxhlet, puisqu'il ne nécessiterait pas l'utilisation de solvants organiques. Des caractérisations rhéologiques ont donc été menées en ce sens.

La Figure 3-6 représente le comportement rhéologique de deux phases hydrophobes obtenues dans ces conditions différentes :

- 250 °C pendant 30 minutes (bleu) ;
- 300 °C pendant 30 minutes (rouge).

Dans ce cadre, il semble que la teneur en résidus solides soit le paramètre pertinent permettant d'expliquer les variations de rhéologie. En effet, après solubilisation de la bio-huile dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , il a été montré que la phase hydrophobe obtenue à 250 °C est composée à 67% de résidus solides, tandis que la phase hydrophobe obtenue à 300 °C est composée à 44% de résidus solides. Ces teneurs en particules se répercutent directement sur les propriétés rhéologiques puisque la fraction contenant le plus de particules est également celle présentant la rigidité la plus élevée, ainsi que l'angle de phase le plus bas. Ainsi, les résidus solides, dispersés au sein de l'huile, pourraient jouer un rôle similaire à celui des asphaltènes dans les bitumes pétroliers, conférant au matériau final une rigidité accrue. Ces résultats sont confirmés par l'analyse des courbes de Black (Figure 3-7). En effet, celles-ci indiquent une structuration partielle du matériau et un comportement plus élastique que visqueux, avec une continuité des isothermes dans l'espace de Black.



**Figure 3-6 : Comportement rhéologique (norme du module complexe en haut, angle de phase en bas ; isochrones 1 Hz) de deux phases hydrophobes possédant des charges en résidus solides différentes**

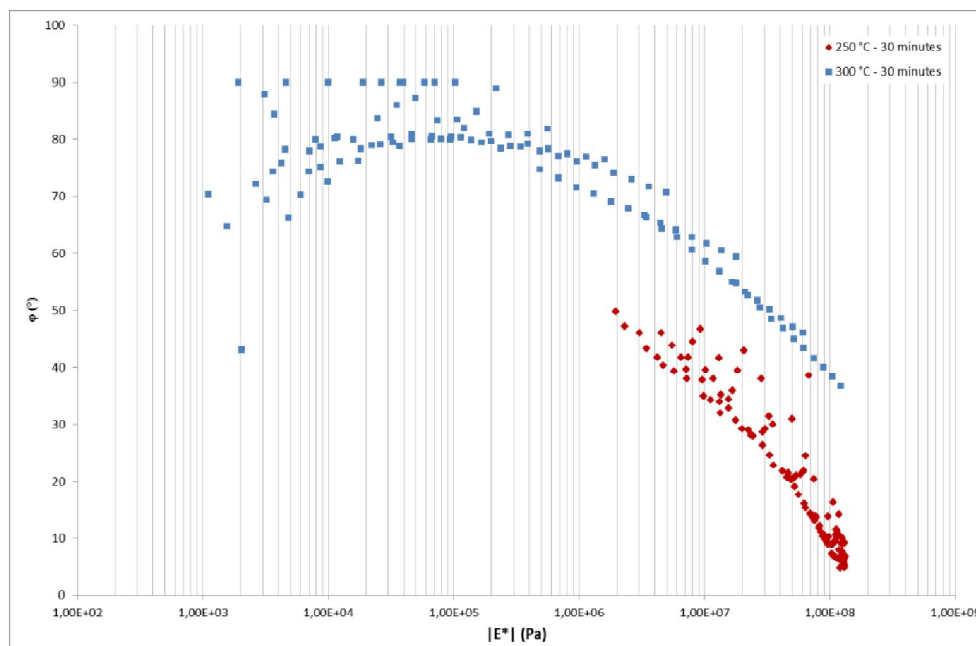


Figure 3-7 : Courbes de Black de deux phases hydrophobes possédant des charges en résidus solides différentes

Les résidus solides ont donc un rôle prédominant dans le comportement rhéologique de la phase hydrophobe. Or, la composition et la quantité de ces résidus solides dispersés au sein de l'huile sont directement dépendantes du lot de microalgues étudié. En effet, celles-ci contiennent des quantités variables de sels de culture, et notamment du carbonate de calcium. Il a donc été décidé par la suite d'isoler la bio-huile des résidus solides, afin de s'affranchir d'une source de variabilité supplémentaire.

### III– Influence des conditions opératoires sur les rendements

Afin d'étudier l'influence de différents paramètres sur les rendements et propriétés des bio-huiles générées en liquéfaction hydrothermale, un plan d'expériences a été mis en place.

Un plan d'expériences correspond à une série ordonnée d'essais, qui doit permettre de modéliser la variation d'une réponse (*e.g.* rendement d'une réaction chimique, transition vitreuse d'un polymère...) en fonction de plusieurs facteurs interdépendants (température, pression...). Chaque facteur présente plusieurs niveaux (correspondant aux différentes valeurs prises par chaque facteur). Le plan d'expériences permet alors de caractériser les effets simples, quadratiques (voire d'ordre supérieur) de chaque facteur, ainsi que leurs interactions éventuelles (généralement limitées au premier et second ordre). Il permet également de

modéliser le processus étudié, en proposant une équation modèle pour la prédiction de la réponse étudiée, de type :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2$$

Avec  $a_0$  : constante

$a_i$  : estimation de l'effet du facteur  $i$

$a_{ij}$  : estimation de l'effet de la corrélation entre le facteur  $i$  et le facteur  $j$

$a_{ii}$  : estimation de l'effet quadratique du facteur  $i$

$x_i$  : valeur du facteur  $i$

$x_j$  : valeur du facteur  $j$

Un plan d'expériences peut être de deux types : complet ou fractionnaire. Pour le plan complet, l'ensemble des expériences correspondant aux combinaisons des différents niveaux des facteurs sont réalisées (soit  $n^k$  expériences pour  $k$  facteurs à  $n$  niveaux). En pratique, cela peut vite s'avérer long et fastidieux, c'est pourquoi, il existe des plans fractionnaires, permettant de réaliser un nombre restreint d'expériences. Ces expériences sont judicieusement choisies pour permettre de limiter les résultats aux effets principaux et quadratiques, ainsi qu'aux interactions du premier ordre.

### 1) Présentation du plan d'expériences

Dans le cadre de la liquéfaction hydrothermale, l'influence de trois facteurs (température, temps de séjour, atmosphère) sur les rendements en bio-huile et les propriétés thermoélastiques a été étudiée. Ces facteurs ont été choisis car ce sont les facteurs qui, d'après la littérature, semblent avoir le plus d'influence sur les rendements en bio-huile. Leurs niveaux ont également été choisis autour de valeurs moyennes optimales proposées dans la littérature :

- température : entre 250 °C et 300 °C ;
- temps de séjour : entre 0 et 60 min ;
- pression partielle en  $N_2$  : 0,8 à 50 MPa.

Le plan d'expériences choisi est un plan d'expériences composite centré (PCC). Il est basé sur la mise en place d'une matrice d'expériences, comportant trois catégories d'essais ( $N_C$ ,  $N_A$ ,  $N_F$ ) pour les trois facteurs étudiés (Tableau 3-I) :

- $N_C$  correspond au nombre de répétition du point central du plan d'expériences, le niveau de chaque facteur étant 0. Cette répétition doit permettre d'estimer la variance expérimentale, et le nombre d'essais dépend du nombre de facteurs étudiés. Dans le cas d'un PCC à trois facteurs,  $N_C$  doit être égal à 6 ; [4]
- $N_A$  correspond aux essais des points axiaux du plan. Ces essais résultent de toutes les combinaisons possibles entre les facteurs de niveaux  $\pm 1$ . Pour 3 facteurs étudiés,  $N_A$  est égal à 6 ;
- $N_F$  correspond aux points du plan factoriel complet à  $2^3$  essais, soit 8 expériences.

Tableau 3-I Facteurs et niveaux du PCC

Facteur	Niveau des variables				
	- $\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
Température (°C)	250	260	275	290	300
Temps de séjour (min)	0	20	30	40	60
Pression partielle en N <sub>2</sub> (MPa)	0,8	1	10	30	50

L'utilisation d'un plan d'expériences fractionnaire permet de limiter le nombre d'expériences à 20 essais, au lieu des 125 essais qui auraient été requis pour un plan d'expériences complet.

Le plan d'expériences a été généré à l'aide du logiciel Statgraphics® Centurion XVI. Les vingt expériences ont été réalisées dans l'ordre aléatoire proposé par le logiciel, et sont présentées dans le Tableau 3-II. Le caractère aléatoire du plan permet de prévenir tout artéfact d'analyse provenant de sources de variations extérieures auxquelles l'expérimentateur n'aurait pas pensé, ou qu'il ne maîtrise pas (température et pression dans la salle d'essai, qualité de l'eau injectée dans le processus...).

Tableau 3-II : Matrice d'expériences du PCC

Nature de l'essai	Ordre standard	Ordre d'essai	Température	Temps de séjour	Pression partielle en N <sub>2</sub>
Plan factoriel	1	9	-1	-1	-1
Plan factoriel	2	14	-1	-1	1
Plan factoriel	3	1	-1	1	-1
Plan factoriel	4	19	-1	1	1
Plan factoriel	5	15	1	-1	-1
Plan factoriel	6	11	1	-1	1
Plan factoriel	7	8	1	1	-1
Plan factoriel	8	3	1	1	1
Point axial	9	13	$-\alpha$	0	0
Point axial	10	20	$\alpha$	0	0
Point axial	11	16	0	$-\alpha$	0
Point axial	12	10	0	$\alpha$	0
Point axial	13	2	0	0	$-\alpha$
Point axial	14	6	0	0	$\alpha$
Point central	15	4	0	0	0
Point central	16	5	0	0	0
Point central	17	7	0	0	0
Point central	18	12	0	0	0
Point central	19	17	0	0	0
Point central	20	18	0	0	0

Dans la suite du manuscrit, il sera fait références aux huiles de liquéfaction suivant leur ordre d'obtention selon le plan d'expériences (l'huile obtenue lors de la première expérimentation sera nommée « huile 1 »).

## 2) Interprétation des résultats

Les expériences de liquéfaction hydrothermale ont été réalisées à partir de 7 g de microalgues lyophilisées (lot 6), auxquels ont été rajoutés 28 mL d'eau osmosée, soit une concentration massique en microalgues de 20%. Ces conditions sont représentatives de la concentration massique de la pâte de microalgues avant lyophilisation, qui, dans le cas d'un

développement à l'échelle industrielle, serait injectée non lyophilisée dans le réacteur. Le temps de séjour est considéré à partir du moment où la température de consigne est atteinte. Lorsque ce temps de séjour arrive à terme, le chauffage est éteint. L'ensemble est laissé à refroidir, et le milieu réactionnel est prélevé à des températures inférieures à 50 °C. Il a été choisi de fractionner ce mélange en utilisant un solvant organique. Ce fractionnement est alors dépendant de la nature du solvant utilisé, et notamment de sa polarité. Le choix a été ici fait d'utiliser le dichlorométhane afin d'extraire la bio-huile.

Les différentes phases pouvant être isolées sont présentées sur la Figure 3-8.



**Figure 3-8 : Photographies des différentes fractions obtenues par liquéfaction hydrothermale (bio-huile extraite au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , phase aqueuse, résidus solides)**

Pour chaque expérience, les rendements en bio-huile extraite au dichlorométhane, phase hydrophile et résidus solides ont été calculés (masse sèche de chaque fraction par rapport à la masse sèche de microalgues insérées dans le réacteur). Les résultats sont présentés dans le Tableau 3-III. Les rendements ont été corrigés de la teneur en  $\text{CaCO}_3$  déterminée sur le résidu solide pour chaque expérimentation à l'aide d'un calcimètre de Bernard. La différence à 100% inclut la phase gazeuse, qui, dans cette étude, n'a pas été quantifiée, mais aussi toutes les pertes éventuelles au cours des différentes étapes d'isolement (extractions, filtrations, évaporations...).

Tableau 3-III : Rendements des différentes fractions avec, en rouge, les essais correspondant au point central (nd : non déterminé)

Ordre d'essai	Rendement en bio-huile (%)	Rendement en phase hydrophile (%)	Rendement en résidus solides (%)	Total	Différence à 100%
1	27,7	nd	28,0	nd	nd
2	35,7	11,8	20,2	67,7	32,3
3	45,0	6,6	12,5	64,1	35,9
4	38,2	16,4	14,9	69,5	30,5
5	41,7	16,4	15,1	72,5	27,5
6	45,2	18,4	8,7	72,3	27,7
7	39,1	18,7	14,5	72,3	27,7
8	39,1	16,6	13,4	69,1	30,9
9	28,6	21,0	24,8	74,4	25,6
10	43,2	15,7	8,8	67,7	32,3
11	44,6	18,6	9,0	72,2	27,8
12	43,6	18,1	11,2	72,9	27,1
13	34,3	20,0	20,2	74,5	25,5
14	39,9	21,0	15,6	76,5	23,5
15	38,5	16,8	19,9	75,2	24,8
16	36,5	19,8	16,7	73,0	27,0
17	41,1	18,8	11,9	72,1	27,9
18	41,4	18,2	11,2	70,8	29,2
19	37,4	20,1	14,8	72,3	27,7
20	43,1	13,1	7,1	63,3	36,7

#### a- Analyse qualitative

L'analyse des résultats relatifs au point central du plan d'expériences va permettre d'évaluer la répétabilité du procédé. Les moyennes des rendements, ainsi que les écarts-type, sont présentés dans le Tableau 3-IV, et montrent que cette répétabilité est tout à fait correcte, notamment concernant les rendements en bio-huile et en phase aqueuse, avec des coefficients de variation de l'ordre de 5%. La répétabilité du rendement en résidus solides est légèrement moins bonne, puisque le coefficient de variation dépasse les 10%.

Tableau 3-IV : Analyse de la répétabilité expérimentale

	Rendement moyen (%)	CV (%)
Bio-huile	40,9	4,3
Phase hydrophile	17,8	5,6
Résidus solides	13,1	13,0

Les différentes conditions expérimentales testées semblent influencer de manière très importante les rendements en phase hydrophile, bio-huile et résidus solides. En effet, entre 27,7% et 44,6% de la biomasse a pu être convertie en bio-huile selon les paramètres testés, avec en moyenne un rendement de 40,9%. Il est important de noter que cette valeur est très supérieure à la teneur en lipides extractibles par Soxhlet de la biomasse initiale (environ 22%). La liquéfaction hydrothermale est donc un procédé qui n'est pas une simple extraction, mais qui met bien en jeu des réactions chimiques plus ou moins complexes, permettant de transformer une partie des fractions non lipidiques, c'est-à-dire les protéines et les polysaccharides, en huile.

Il est intéressant de remarquer que, quelles que soient les conditions expérimentales, le rendement en phase non soluble dans l'eau (c'est-à-dire l'huile de liquéfaction plus les résidus solides) semble être constant :  $54,0 \pm 3,6\%$ .

La Figure 3-9 représente l'évolution du rendement en résidus solides en fonction du rendement en bio-huile. La courbe obtenue présente l'aspect d'une droite de pente négative égale à -1, avec un coefficient de corrélation  $r^2$  supérieur à 0,8. Ainsi, il semble qu'un équilibre ait lieu entre la formation de l'huile de liquéfaction et la formation des résidus solides. De plus, l'échange se déroulant entre ces deux fractions est équimassique, la valeur absolue de la pente étant égale à 1. En extrapolant la droite à un rendement nul en résidus solides, il est possible d'estimer le rendement maximal en bio-huile qui pourrait potentiellement être obtenu. Ainsi, dans des conditions idéales, pour lesquelles la production de résidus solides serait nulle, il serait envisageable d'obtenir un rendement maximal en huile d'environ 54%.

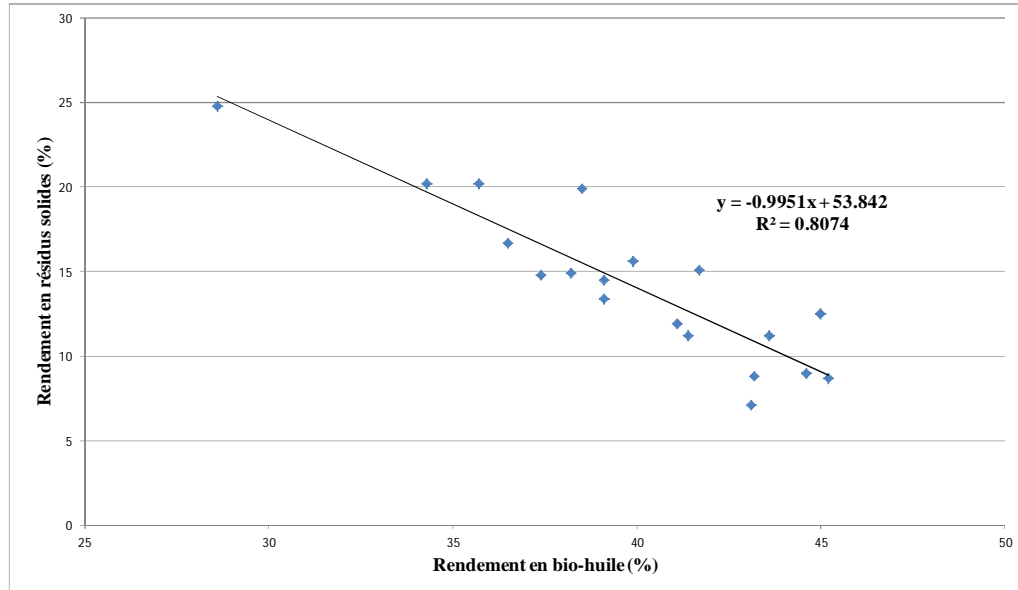


Figure 3-9 : Evolution du rendement en résidus solides en fonction du rendement en bio-huile

*b- Analyse statistique*

L'analyse statistique des résultats du plan d'expériences par le logiciel Statgraphics® doit permettre de déterminer quels paramètres ont la plus grande influence sur les rendements en bio-huile, mais aussi de déterminer les conditions optimales permettant de maximiser ce rendement. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le Tableau 3-V.

**Tableau 3-V : Analyse statistique des rendements en bio-huile**  
(A : température, B : temps de séjour, C : pression partielle en N<sub>2</sub>)

Analysis of Variance for Rendement					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Temperature	171.528	1	171.528	27.22	0.0004
B:Temps	5.75838	1	5.75838	0.91	0.3616
C:Atmosphere	175.644	1	175.644	27.87	0.0004
AA	20.104	1	20.104	3.19	0.1044
AB	2.42	1	2.42	0.38	0.5493
AC	10.125	1	10.125	1.61	0.2337
BB	8.64513	1	8.64513	1.37	0.2686
BC	0.405	1	0.405	0.06	0.8050
CC	4.55805	1	4.55805	0.72	0.4149
Total error	63.0133	10	6.30133		
Total (corr.)	457.469	19			

R-squared = 86.2257 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 73.8288 percent  
Standard Error of Est. = 2.51024  
Mean absolute error = 1.44493  
Durbin-Watson statistic = 1.65039

$p$  est appelé « probabilité critique », et va permettre de déterminer, à un seuil de risque  $\alpha$  donné, si un facteur a un effet significatif sur le rendement en bio-huile. Pour un niveau de confiance de 95% ( $\alpha=0,05$ ), pour l'expérimentation mise en place, les facteurs A et C (soit la température et la pression partielle en  $N_2$ ) ont une influence significative sur le rendement en huile ( $p<\alpha$ ). Au contraire, le temps de séjour ne semble pas avoir d'influence significative ( $p>\alpha$ ). De même, il n'y a pas d'effets quadratiques, ni d'interactions de premier ordre entre les différents facteurs ( $p>\alpha$ ).

La valeur de  $r^2$  indique que 86,2% de la variance expérimentale peut être expliquée par les facteurs étudiés. La différence à 100% peut être attribuée à des paramètres non étudiés ou mal maîtrisés, comme la vitesse de chauffe et de refroidissement du réacteur, ou encore le non-échantillonnage de la biomasse.

L'équation modèle proposée par le logiciel est la suivante :

$$y = 39,2 + 3,5x_A + 3,6x_B$$

Avec  $x_A$  : niveau codé du facteur température et  $x_B$  : niveau codé du facteur pression

A l'aide de cette équation, il est également possible de prédire les conditions permettant de maximiser le rendement en bio-huile. Ces conditions, à savoir une température de 350 °C et une pression partielle en  $N_2$  de 50 MPa, doivent permettre d'atteindre un rendement de 51,2%. Malheureusement, ce résultat n'a pas pu être vérifié, car l'expérience dans ces conditions n'a pas pu être menée. En effet, la pression maximale atteinte aurait été supérieure à 200 MPa (pression autogène de la vapeur d'eau à laquelle s'additionne les 50 MPa de  $N_2$ ), alors que l'appareillage ne supporte pas des pressions supérieures à 180 MPa.

Néanmoins, cette équation modèle est à considérer avec prudence. En effet, afin de vérifier sa validité, une expérience a été réalisée dans des conditions ne correspondant à aucune expérience du PCC. Pour une pression initiale de 6 MPa en  $N_2$ , une température de 290 °C et un temps de séjour de 5 minutes, le modèle généré prévoit un rendement de 41,5% en huile. En pratique, le rendement obtenu a été de 29,3%.

Malgré tout, les résultats obtenus lors de la mise en place de ce plan d'expériences tendent à prouver que la température et la pression initiale sont deux facteurs qui ont une très forte influence sur la répartition des produits dans les différentes phases, tandis que le temps de séjour n'a lui, pas d'influence significative.

Une influence aussi marquée de la pression initiale en gaz exogène n'a jamais été rapportée dans la littérature. En effet, les seuls effets décrits concernent un effet négatif de la pression initiale en CO, [5] et un effet nul de la pression initiale en N<sub>2</sub>. [6]

L'effet observé de la température est cohérent avec diverses études portant sur des microalgues, qui ont montré un effet positif de ce facteur, même pour des températures assez élevées : 350 °C chez *Spirulina platensis*, [7] 360 °C chez *Dunaliella tertiolecta*. [8]

### 3) Conclusions

La mise en place d'un plan d'expériences a permis :

- de mettre en évidence un processus d'échange de matière équimassique entre les résidus solides et la bio-huile ;
- de déterminer les paramètres ayant une influence significative sur les rendements en huile (effets positifs de la température et de la pression en N<sub>2</sub>), ceci n'excluant pas un effet négatif de ces facteurs pour des niveaux au-delà des limites du plan d'expériences ;
- de déterminer le rendement maximal théorique d'huile (51,2%) pouvant théoriquement être obtenu dans des conditions testées par le plan d'expériences (350 °C, 50 MPa en N<sub>2</sub>) et le rendement maximal pouvant être *a priori* obtenu, toutes conditions confondues (53,8%).

## IV – Caractérisation chimique des différentes fractions

Les quatre fractions générées en liquéfaction hydrothermale ont été caractérisées d'un point de vue chimique. Les huiles de liquéfaction et les fractions hydrophiles ont été analysées par GC-MS. Les résidus solides ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge et fluorescence X. La composition en gaz a quant à elle été déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

## 1) Phases huileuses

### a- *Caractérisation par spectroscopie infrarouge*

Les spectres infrarouge de toutes les huiles de liquéfaction ont été acquis, et présentent tous le même aspect général (Figure 3-10). Le caractère fortement aliphatique de ces huiles est indiqué par de fortes bandes d'absorption à 2900 et 2850  $\text{cm}^{-1}$  (vibrations des C-H), ainsi qu'une bande importante à 1460  $\text{cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_2)_n$ ). La présence d'une large bande à 1678  $\text{cm}^{-1}$  indique la formation de composés comportant des carbonyles (acides carboxyliques, esters, amides, aldéhydes ou cétones). Enfin, la bande à 3300  $\text{cm}^{-1}$ , due à l'élongation des liaisons O-H ou N-H, peut être attribuée à la présence d'eau résiduelle, d'alcools ou d'amines. De plus, ces spectres montrent des ressemblances frappantes avec des spectres d'autres huiles de liquéfaction obtenues sur diverses souches de microalgues. [8], [9], [10]

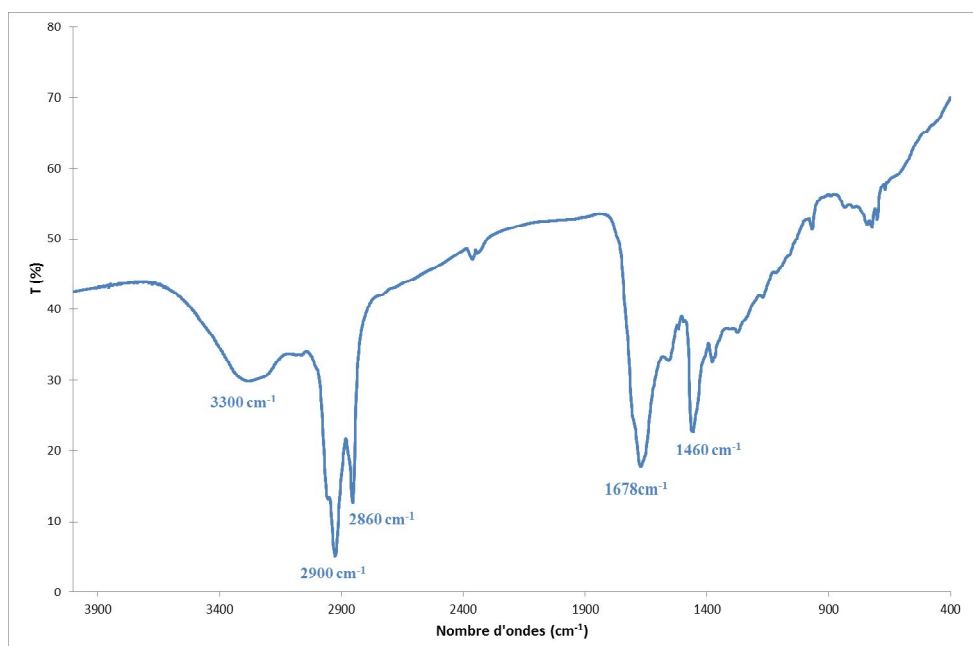


Figure 3-10 : Exemple de spectre infrarouge des huiles de liquéfaction (huile 12)

### b- *Analyse GC-MS*

L'analyse par GC-MS des huiles de liquéfaction fournit des chromatogrammes très complexes, présentant une cinquantaine de pics (Figure 3-11). Les différents composés ont été identifiés par comparaison avec des spectres de masse contenus dans la base de données NIST

(pour « National Institute of Standards and Technology »), et enregistrés pour une énergie d'ionisation de 70 eV.

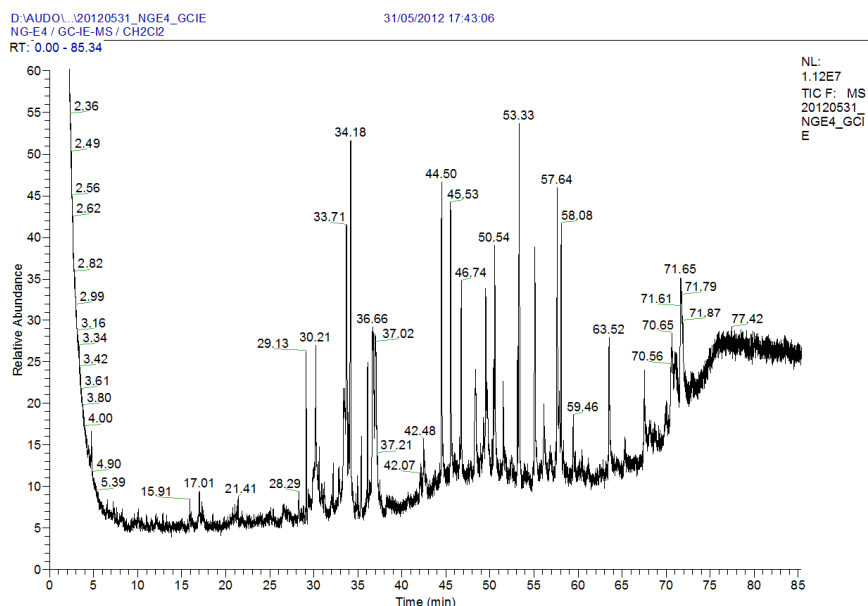
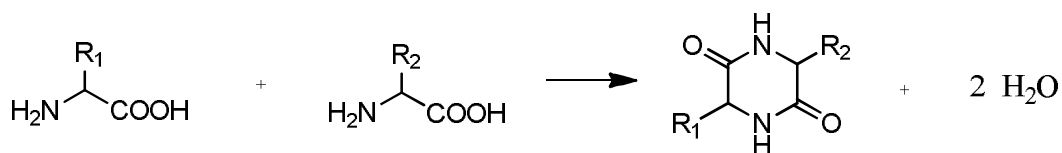


Figure 3-11 : Exemple d'un chromatogramme d'une huile de liquéfaction (huile 4)

Les différents chromatogrammes obtenus présentent de très fortes similarités, indiquant que les différentes conditions expérimentales testées n'influencent pas de manière significative la nature des produits formés, mais influencent légèrement leurs proportions dans le mélange.

La première grande famille de produits identifiés est issue de la condensation de deux acides aminés, eux-mêmes issus de l'hydrolyse des protéines. Les fonctions acides carboxyliques et amines des aminoacides réagissent deux à deux pour former des hétérocycles azotés substitués de type pipérazinediones, avec élimination de deux molécules d'eau (Réaction 3-1).



Réaction 3-1 : Formation de pipérazinediones à partir d'acides aminés

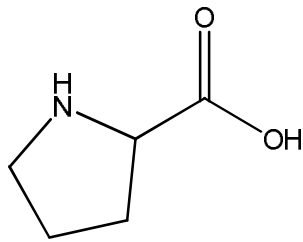
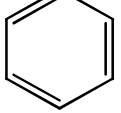
Les produits formés selon ce mécanisme réactionnel sont présentés dans le Tableau 3-VI. Ces produits sont principalement issus de la valine, la leucine, la proline et la phénylalanine,

qui semblent donc être les quatre acides aminés majoritaires chez *Scenedesmus sp.* (Tableau 3-VII).

Tableau 3-VI : Liste des composés provenant de la condensation de deux acides aminés ( $T_r$  : temps de rétention)  
(Récurrence : nombre de fois où la molécule a été détectée, sur les 20 expériences du plan d'expériences)

$T_r$ (min)	Nom	M (g/mol)	Provenance	Récurrence
26,51	3-methyl-6-(1-methylethyl)-2,5-pipérazinedione	170,2	Valine + Valine	4
36,66	3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-pipérazinedione	226,3	Leucine + Leucine	20
36,96	Hexahydro-3-(2-methylpropyl)-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	210,3	Leucine + Proline	20
46,52	3-benzyl-6-isopropyl-2,5-pipérazinedione	246,3	Valine + Phénylalanine	7
48,28	3-Benzyl-6-isobutyl-2,5-pipérazinedione	260,3	Leucine + Phénylalanine	18
48,32	Hexahydro-3-(phenylmethyl)-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	244,3	Phénylalanine + Proline	18

Tableau 3-VII : Structures des principaux acides aminés ayant réagi en liquéfaction hydrothermale

Acide aminé	Structure	Acide aminé	Structure
Leucine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Proline	
Phénylalanine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ 	Valine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

La deuxième famille de composés présents dans les huiles est issue de la réaction entre des lipides (*i.e* les acides gras libres) et des produits issus des protéines. Ainsi, sont retrouvés

de l'hexadécanamide et du 9-octadécènamide, formés par réactions entre les acides gras libres correspondants et l'ammoniac issu de la déamination des acides aminés. De manière similaire, les acides gras libres peuvent réagir directement avec les acides aminés :

- l'acide oléique réagit en présence de proline pour former le 1-(1-oxo-9-octadécényl)-pyrrolidine, d'alanine pour former le N-éthyl-9-octadécènamide, de leucine pour former le N-méthylpropyl-9-octadécènamide et de valine pour former le N-isobutyl-9-octadécènamide ;
- l'acide stéarique réagit lui avec la valine pour former le N-isobutyl-octadécènamide et avec la proline pour former le 1-(1-oxooctadécyl)-pyrrolidine ;
- l'acide palmitique réagit avec l'alanine pour former le N-éthylhexadécènamide et avec la leucine pour former le N-méthylpropylhexadécènamide.

La troisième famille présente dans les huiles de liquéfaction comprend les dérivés du phytol, lui-même issu de l'hydrolyse de la chlorophylle. Le phytol, l'isophytol, la phytone, le phytène et l'acétate de dihydrophytol ont ainsi pu être observés.

La dernière famille est constituée par des dérivés stéroliques, mais dont l'identification précise n'a pas pu être réalisée, étant donnée la mauvaise résolution des pics chromatographiques.

Un certain nombre de composés ont été identifiés dans les huiles de liquéfaction sans qu'aucun mécanisme expliquant leur formation ne puisse être présenté à ce jour. Ces composés sont présentés dans le Tableau 3-VIII.

Enfin, un certain nombre de pics chromatographiques n'ont pas pu être attribués, ces produits n'étant probablement pas présents dans la base de données utilisée.

Des produits similaires ont été retrouvés dans la bio-huile issue du réacteur de 1 L, et extraite au toluène.

Ces analyses sont en accord avec les données disponibles dans la littérature, qui indiquent la présence récurrente d'amides, d'alcanes, d'acides gras, ainsi que d'hétérocycles azotés (pyrazines, pipérazines, pyrrolidines) comme produits majoritaires de liquéfaction. [9], [11], [12], [13], [14]

Tableau 3-VIII : Produits de liquéfaction divers

<b>T<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Nom</b>	<b>M (g/mol)</b>	<b>Réurrence</b>
15,92	1,2-dihydro-1,1,6-triméthyl-naphtalène	176,3	20
29,13	Heptadécane	240,5	20
29,37	2,6,10-triméthylhexadécane	268,5	3
30,61	9-nonadécène	266,5	13
32,96	Tétracosane	338,7	5
36,77	5,10-diéthoxy-2,3,7,8-tétrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a ;1'-2'-d]pyrazine	250,3	10
45,56	Palmitaldéhyde O-méthyl oxime	269	14
53,13	1-pentacosanol	368,7	20
57,65	Dihydro-3-octadécyl-2,5-furanedione	352,6	6
67,56	2-nonacosanone	422,8	20

## 2) Phases aqueuses

Les fractions aqueuses issues de la liquéfaction hydrothermale n'ont pas pu être injectées telles quelles en GC-MS, puisque la présence d'eau est rédhibitoire pour cette technique d'analyse. Elles ont donc dû être extraites au préalable par du n-butanol (premier n-alcool partiellement non miscible à l'eau, permettant d'extraire les composés hydrophiles).

Les phases issues des réacteurs de 50 mL et 300 mL d'une part, et de 1 L d'autre part, n'ont pas été traitées de manière similaire. Dans le cas des deux premiers réacteurs, elles ont, dans un premier temps, subi une évaporation à chaud sous pression réduite afin d'éliminer un maximum d'eau, puis ont été lyophilisées. Cette étape a permis de déterminer la quantité de matière contenue dans la phase aqueuse, et de faire ainsi des bilans massiques. Les extractions au n-butanol ont donc été réalisées sur ces lyophilisats. A l'inverse, dans le cas du troisième réacteur, les bilans massiques n'ont pas été calculés, et l'extraction au n-butanol a été réalisée directement sur la phase aqueuse originelle.

Les molécules retrouvées dans les phases aqueuses lors des liquéfactions hydrothermales dans les appareils de 50 mL et 300 mL (Figure 3-12, Tableau 3-IX, Tableau 3-X) sont majoritairement issues de la condensation entre deux acides aminés. De manière assez surprenante, de l'acide palmitique est également retrouvé dans chacune des phases aqueuses.

Pour autant, ces résultats ne sont pas en contradiction avec la littérature. En effet, une méthode de détection et d'identification d'acides gras au sein des phases aqueuses issues de la liquéfaction hydrothermale de diverses biomasses a récemment été décrite, et a permis d'identifier des acides gras comportant entre 14 et 22 carbones. [15]

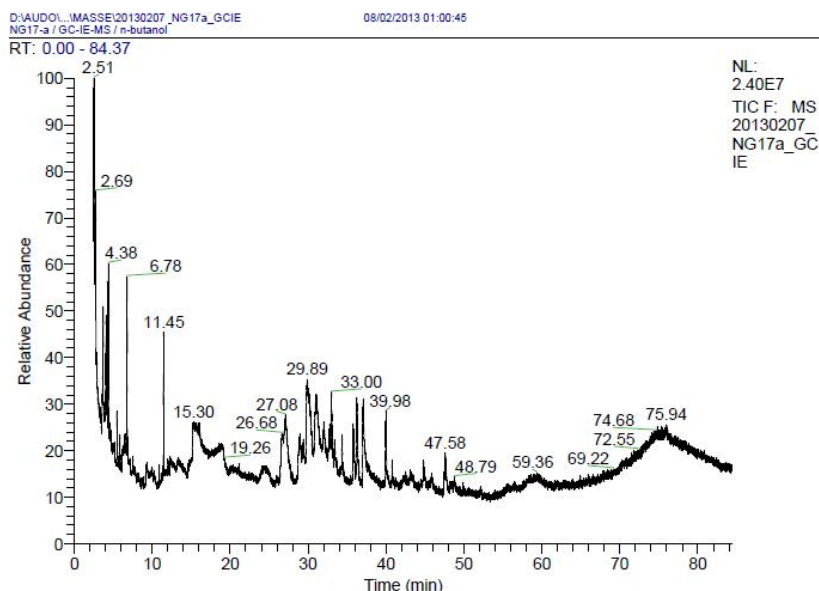
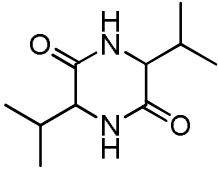
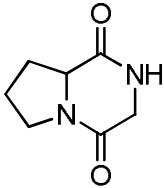
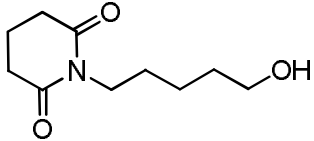


Figure 3-12 : Exemple d'un chromatogramme d'une phase aqueuse obtenue sur l'appareil de 50 mL

Tableau 3-IX : Molécules identifiées dans les phases aqueuses des réacteurs de 50 mL et 300 mL

<b>T<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Nom</b>	<b>M (g/mol)</b>
3,71	acide 4-méthyl-pentanoïque	116
5,48	1-éthényl-2-pyrrolidinone	111
27,08	3-méthyl-6-(1-méthyléthyl)-2,5-pipérazinedione	170
31,05	hexahydro-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	154
32,75	3,6-diisopropylpipérazine-2,5-dione	198
33,40	1-(5-hydroxypentyl)-2,6-pipéridinedione	199
35,79	5,10-diéthoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a ;1',2'-d]pyrazine	250
36,26	hexahydro-3-(2-méthylpropyl)-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	210
37,06	acide hexadécanoïque	256
44,79	3-benzyl-6-isopropyl-2,5-pipérazinedione	246
47,58	hexahydro-3-(phénylméthyl)-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	244

Tableau 3-X : Quelques exemples de structures de molécules identifiées dans les phases aqueuses de liquéfaction hydrothermale

Molécule	Structure
3,6-diisopropylpipérazine-2,5-dione	
hexahydro-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	
1-(5-hydroxypentyl)-2,6-pipéridinedione	

L'analyse des phases aqueuses issues de la liquéfaction hydrothermale dans le réacteur de 1 L a mis en évidence la présence de molécules différentes de celles présentées précédemment (Figure 3-13, Tableau 3-XI). Des molécules beaucoup plus légères sont retrouvées, dont majoritairement des hétérocycles azotés.

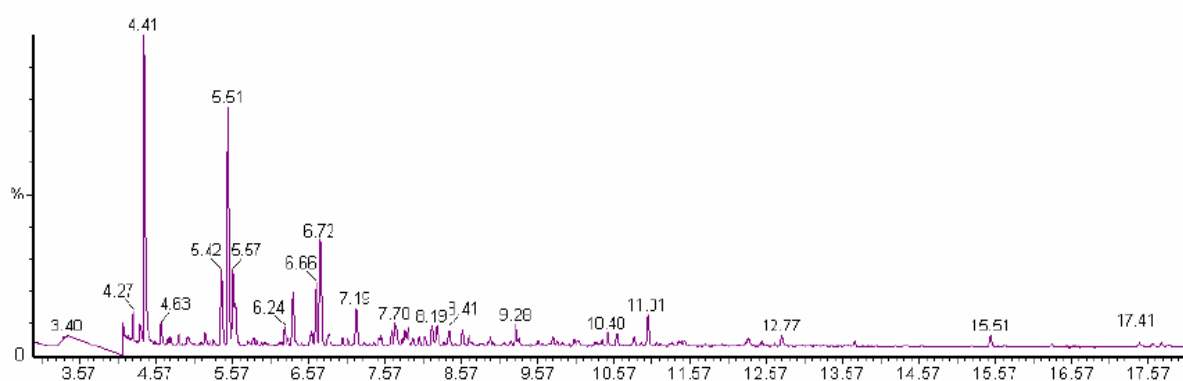


Figure 3-13 : Exemple de chromatogramme d'une fraction hydrophile obtenue sur le réacteur de 1 L

Les différences rencontrées entre ces deux méthodes sont donc significatives. En effet, il semblerait que dans le cas où les phases aqueuses ont subi une lyophilisation, les molécules les plus volatiles aient été éliminées au cours de l'évaporation sous vide. Cette perte pourrait

par ailleurs expliquer la différence à 100% des bilans massiques observée pour les appareillages de 50 mL et 300 mL.

Ces analyses sont malgré tout en accord avec les quelques données disponibles dans la littérature, montrant la prépondérance de molécules volatiles (acide acétique, éthanol, acétone), de polyols, d'acides aminés et de dipeptides, ainsi que de pyrrolidones dans les phases aqueuses issues de la liquéfaction. [16]

Il est important de noter que les conditions de liquéfaction (temps, température, pression) n'influencent pas la nature des produits de liquéfaction hydrosolubles, pour un traitement donné, mais influencent seulement leur distribution. Ceci peut faciliter la mise en place d'un procédé de traitement et/ou réutilisation de ces phases, qui, telles quelles, sont potentiellement nocives.

### 3) Résidus solides

Les résidus solides ont pu être caractérisés par analyse élémentaire, par spectrométrie de fluorescence X, ainsi que par calcimétrie.

L'analyse élémentaire réalisée sur les résidus solides issus du plan d'expériences (Tableau 3-XII) met en évidence la présence d'une fraction appauvrie en carbone, avec une teneur moyenne de 38,0%, alors que la teneur en carbone chez les microalgues initiales était de 46,7%. Ceci est lié au fait que les résidus solides constituent une fraction enrichie en molécules inorganiques (*e.g.* carbonates). Les teneurs en azote et en hydrogène sont également moindres (2,6% en moyenne, contre 6,6% chez les microalgues, et 4,0% en moyenne contre 7,0% chez les microalgues, respectivement). La présence de soufre est parfois détectée (4 échantillons sur 19), mais à des niveaux très faibles (inférieurs au pourcent).

[LIQUEFACTION HYDROTHERMALE DES RESIDUS DE SCENEDESMUS SP.]

Tableau 3-XI : Molécules identifiées dans la fraction aqueuse du réacteur de 1 L

t (min)	Nom	M (g/mol)	t (min)	Nom	M (g/mol)
4,27	1-éthyl-1H-pyrole	95	8,02	5-éthyl-2-furaldehyde	124
4,36	2-méthyl-pyridine	93	8,09	quinuclidine-3-ol	127
4,41	méthyl-pyrazine	94	8,19	1-méthyl-1H-pyrole-2-acetonitrile	120
4,63	cyclohexanone	98	8,25	4,6-diméthyl-3,5-dioxo-2,3,4,5-tétrahydro-1,2,4-triazine	141
5,42	2-méthyl-2-cyclopentèn-1-one	96	8,67	2-tert-butyl-cyclohexylamine	155
5,51	2,5-diméthyl-pyrazine	108	8,96	4-méthoxy-benzenamine	123
5,57	éthyl-pyrazine	108	9,28	2-méthyl-5-(1-propenyl)-pyrazine	134
5,60	2,3-diméthyl-pyrazine	108	9,33	3-éthyl-1,3-diméthyl-2,5-pyrrolidinedione	155
6,24	3-méthyl-2-cyclopentèn-1-one	96	9,49	5,6,7,8-tétrahydroquinoxaline	134
6,37	Phénol	94	9,58	2,5-diméthyl-6,7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine	148
6,66	2-éthyl-5-méthyl-pyrazine	122	9,77	1-butyl-2-pyrrolidinone	141
6,72	2-éthyl-3-méthyl-pyrazine	122	10,05	3-amino-5-tert-butylpyrazole	139
7,01	3,4-diméthyl-2-cyclopentèn-1-one	110	10,41	2-méthoxy-4-méthyl-aniline	137
7,09	5-éthyl-2-méthyl-pyridine	121	10,48	indole	117
7,19	2,3-diméthyl-2-cyclopentèn-1-one	110	10,83	éthylthio-benzène	138
7,50	2,3,4-tétraméthyl-cyclopent-2-ène-1-one	124	10,93	2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-inden-1-one	136
7,53	1-(1-H-pyrrol-2-yl)-éthanone	109	11,01	1-(1-méthyl-2-piperidiny)-2-propanone	155
7,65	4-méthyl-phénol	108	12,33	2-oxo-1-méthyl-3-isopropylpyrazine	152
7,71	2,5-diméthyl-3-éthyl-pyrazine	136	12,77	N-(2-phényléthyl)-acetamide	163
7,79	3-hydroxy-4-méthyl-benzaldéhyde	136	15,51	mepivacaine	246
7,82	2,3-diméthyl-5-éthyl pyrazine	136	16,31	3,6-diisopropylpipérazin-2,5-dione	198
7,87	2,3,4-triméthyl-2-cyclopentèn-1-one	124	17,46	3,6-bis(2-méthylpropyl)-2,5-pipérazinedione	226
7,95	2-méthyl-5-propyl-pyrazine	136	17,62	hexahydro-3-(2-méthylpropyl)-pyrrolo[1,2-A]pyrazine-1,4dione	210

Tableau 3-XII : Analyse élémentaire des résidus solides obtenus lors du plan d'expériences

N° essai	%C	%N	%H	%S	N° essai	%C	%N	%H	%S
2	42,52	2,98	4,69	0,00	12	41,18	2,88	4,63	0,26
3	24,41	1,25	2,29	0,00	13	49,74	4,45	5,64	0,00
4	41,05	2,8	4,4	0,00	14	43,68	3,31	4,62	0,00
5	36,43	2,29	3,68	0,00	15	44,93	2,84	5,15	0,15
6	28,49	1,77	2,51	0,91	16	43,97	3,43	4,63	0,00
7	41,85	2,81	4,49	0,00	17	33,83	2,12	3,43	0,00
8	39,13	2,38	4,2	0,00	18	37,41	2,52	3,79	0,00
9	48,7	3,54	5,61	0,19	19	39,18	3,01	4,20	0,00
10	27,72	1,52	2,55	0,00	20	28,63	1,62	2,76	0,00
11	29,62	1,81	2,88	0,00					

La présence majoritaire de calcium au sein de ces échantillons a également été mise en évidence par spectrométrie de fluorescence X (Figure 3-14, Tableau 3-XIII). Celle-ci a été réalisée uniquement sur la fraction inorganique des résidus solides, isolés par centrifugation. Les résultats suivants ont été obtenus :

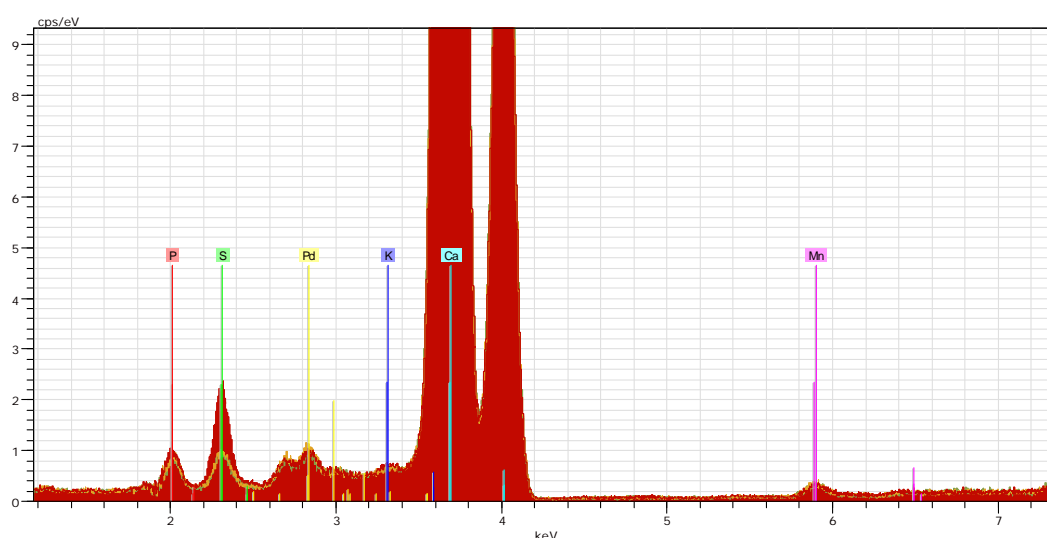


Figure 3-14 : Spectre d'émission X de la fraction inorganique des résidus solides

La présence, dans des quantités moins importantes, de phosphore, soufre, potassium, manganèse et palladium a également été révélée par cette technique.

Tableau 3-XIII : Distribution massique approximative (%) des différents éléments détectés par spectrométrie de fluorescence X

Elément	P	S	K	Ca	Mn	Pd
Mesure 1	4,27	3,02	0,31	90,61	0,11	1,69
Mesure 2	4,16	1,19	0,29	92,35	0,13	1,89
Mesure 3	3,61	1,13	0,29	93,15	0,12	1,70
Moyenne	4,01	1,78	0,29	92,04	0,12	1,76
Ecart-type	0,35	1,07	0,01	1,30	0,11	0,11

La présence de ce calcium exogène aux microalgues a été attribuée à la présence de carbonate de calcium, provenant lui-même du milieu de culture. Ces carbonates ont également été identifiés par spectroscopie infrarouge (Figure 3-15, bandes caractéristiques à 1440, 873 et 710  $\text{cm}^{-1}$ ), puis dosés par calcimétrie. Les mesures ont été réalisées en triplicat sur chaque échantillon après homogénéisation, et les résultats montrent la présence de 1,9% à 7,2% de  $\text{CaCO}_3$  au sein des résidus solides (Tableau 3-XIV). Cette variabilité s'explique, non pas par la variation des conditions de liquéfaction, mais plus probablement par la non homogénéité de la prise d'échantillon de microalgues.

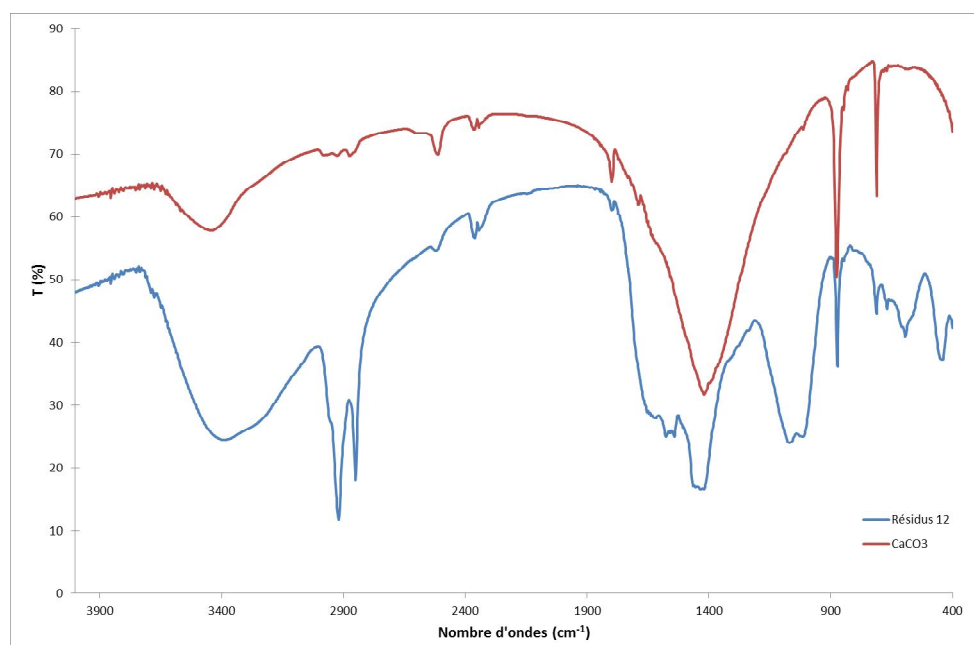


Figure 3-15 : Spectre infrarouge des résidus solides isolés par liquéfaction hydrothermale (bleu) et comparaison avec le spectre du carbonate de calcium (rouge)

Tableau 3-XIV : Teneurs en carbonate de calcium déterminées par calcimétrie sur les résidus solides de liquéfaction hydrothermale

N° essai	%CaCO <sub>3</sub>	CV (%)	N° essai	%CaCO <sub>3</sub>	CV (%)
2	5,2	3,2	12	2,2	6,7
3	7,2	2,3	13	1,9	3,0
4	4,6	2,0	14	4,3	3,7
5	5,2	3,8	15	2,2	4,5
6	5,4	2,5	16	3,5	5,8
7	4,3	4,8	17	4,7	3,3
8	5,1	3,4	18	3,7	3,4
9	4,0	1,7	19	3,8	6,7
10	6,3	2,9	20	3,8	4,2
11	3,6	4,9			

#### 4) Gaz

Les gaz non condensables issus de la liquéfaction hydrothermale ont été analysés uniquement pour les expériences réalisées sur le réacteur d'1 L. Les résultats, présentés dans le Tableau 3-XV, montrent que le principal gaz formé est du dioxyde de carbone. Sont également présents en quantité beaucoup plus faible du monoxyde de carbone et du dioxygène, des alcanes et alcènes à courtes chaînes à l'état de traces ( $n_C \leq 3$ ), ainsi que du dihydrogène.

Ce dioxyde de carbone peut provenir de la décarboxylation des acides gras libres, constituant la fraction lipidique des microalgues, ou encore de la décarboxylation des acides aminés, résultant de l'hydrolyse des protéines. Le diazote, présent en quantités importantes, n'a pas été généré *in situ*, mais correspond au N<sub>2</sub> injecté au milieu réactionnel en début de processus, afin de rendre l'atmosphère inerte.

Tableau 3-XV : Composition des gaz de liquéfaction pour deux essais (300 °C, 1 h, N<sub>2</sub>)

Gaz	Composition du gaz (% volumique)	
	Essai 1	Essai 2
H <sub>2</sub>	0,51	0,54
O <sub>2</sub>	1,76	2,02
N <sub>2</sub>	31,47	20,23
CH <sub>4</sub>	0,22	0,30
CO	2,02	1,47
CO <sub>2</sub>	62,28	70,85
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	0,06	0,06
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	0,08	0,10
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	0,15	0,15
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	0,07	0,08

## 5) Conclusions

La liquéfaction hydrothermale est donc un processus menant à la formation de quatre fractions, possédant chacune des caractéristiques spécifiques, notamment en termes de composition chimique, et de propriétés physiques. La GC-MS s'est avérée être la technique de choix pour la caractérisation des phases huileuses et hydrophiles. La nature des composés identifiés dans chacune de ces fractions ne semble pas dépendre des conditions opératoires, même si leur distribution peut varier selon les expérimentations. La caractérisation des résidus solides s'est avérée plus compliquée, même si le carbonate de calcium a été identifié comme étant le constituant majoritaire de la fraction inorganique. Quant à la fraction gazeuse, elle est principalement composée de dioxyde de carbone, qui pourrait avantageusement être intégré à un système de production de microalgues.

## V – Caractérisations rhéologiques

Pour chaque essai de liquéfaction hydrothermale où la quantité d'huile produite a été suffisante, celle-ci a été caractérisée par des mesures de module complexe en cisaillement

annulaire. Les gammes de températures testées ont parfois été adaptées selon l'aspect de l'huile, déterminé d'un point de vue qualitatif.

## 1) Huiles de liquéfaction du plan d'expériences

### *a- Propriétés rhéologiques*

Sur les vingt huiles de liquéfaction obtenues par extraction au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  lors de la mise en place du plan d'expériences, 19 ont pu être caractérisées d'un point de vue rhéologique. Etant donnée leur consistance, les mesures ont été réalisées entre 5 °C et 70 °C (sauf pour deux huiles), pour des fréquences allant de 1 Hz à 125 Hz. Ces courbes sont présentées sur la Figure 3-16 et la Figure 3-17, et montrent une variabilité importante en fonction des essais réalisés.

Ces huiles présentent toutes une susceptibilité thermique similaire, avec une chute de la norme du module complexe comprise entre trois et quatre décades lorsque la température augmente de 5 °C à 70 °C, avec une transition observée vers 45 °C.

Les courbes d'angle de phase sont présentées uniquement pour des températures inférieures à 60 °C, car au-delà de cette température, le matériau est tellement peu visqueux que celles-ci ne sont plus cohérentes (limite de sensibilité du dispositif de cisaillement annulaire). Dans cette gamme de température, les angles de phase des huiles de liquéfaction montrent une faible dépendance à la température, avec une augmentation de l'angle de phase de 15 à 20° lorsque la température varie de 5 à 40 °C. Au-delà de cette température, une augmentation de l'angle de phase jusqu'à 90° est observée. A partir de 60 °C, les huiles de liquéfaction présentent un comportement similaire à celui d'un liquide.

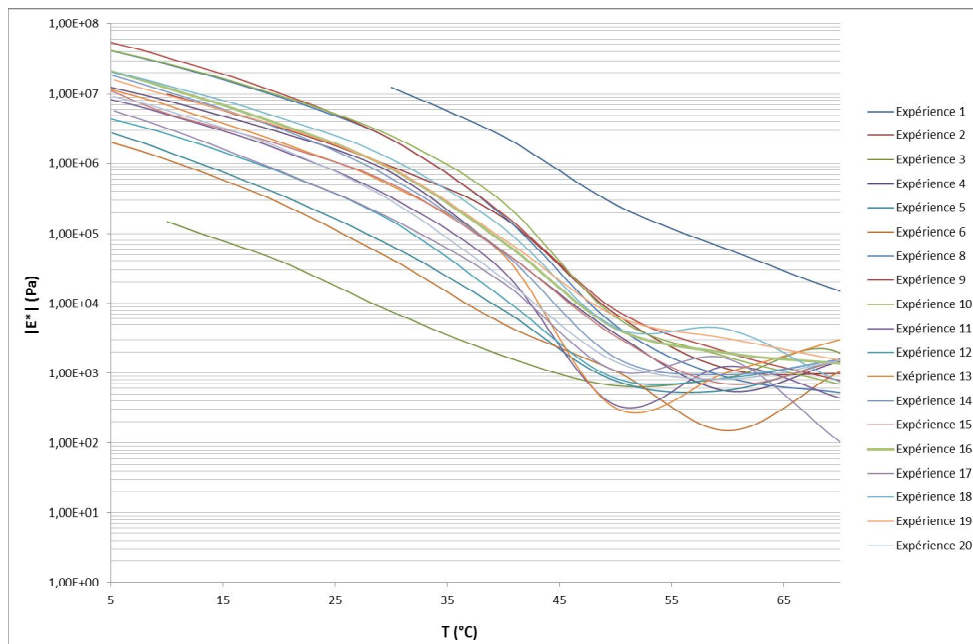


Figure 3-16 : Evolution de la norme du module complexe en isochrone (1 Hz) des huiles de liquéfaction obtenues lors du plan d'expériences

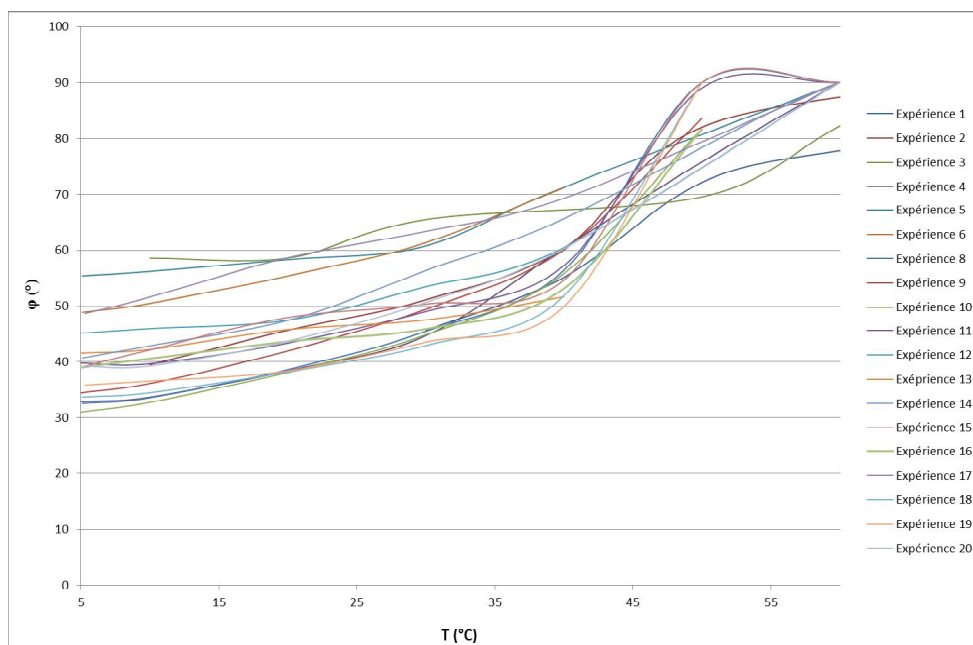
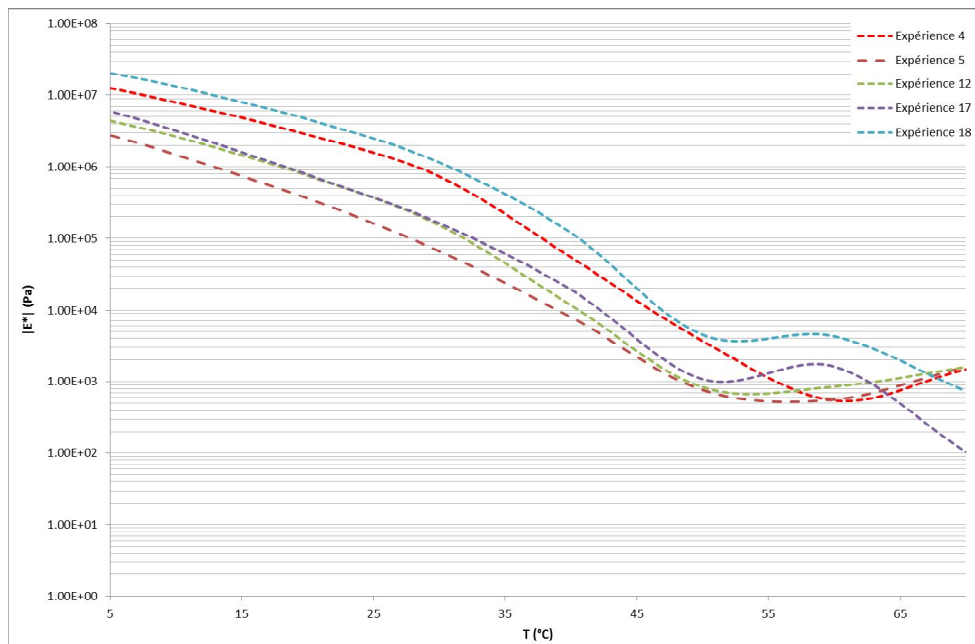


Figure 3-17 : Evolution de de l'angle de phase en isochrone (1 Hz) des huiles de liquéfaction obtenues lors du plan d'expériences

En revanche, la répétabilité de la rhéologie des huiles de liquéfaction est mauvaise (Figure 3-18). En effet, les cinq courbes représentent le comportement de cinq huiles obtenues dans les mêmes conditions de temps de séjour, de pression et de température. Or, l'écart entre les deux courbes extrêmes est de l'ordre d'une décade, ce qui est supérieur à la différence entre deux bitumes de grades successifs.



**Figure 3-18 : Evolution de la norme du module complexe en isochrone (1 Hz) des huiles de liquéfaction correspondant au point central du plan d'expériences**

Les mêmes conclusions peuvent être tirées à partir de l'observation de l'évolution de l'angle de phase avec la température (Figure 3-19). En effet, à 5 °C, la différence d'angle de phase entre la quatrième et la cinquième expérience est de 20°.

En représentation de Black (Figure 3-20), les huiles présentent des comportements assez proches, avec une organisation des isothermes similaire. Celles-ci présentent le même sens de variation (diminution de la norme du module complexe et augmentation de l'angle de phase lorsque la température et la fréquence augmentent), ainsi que des discontinuités à chaque température.

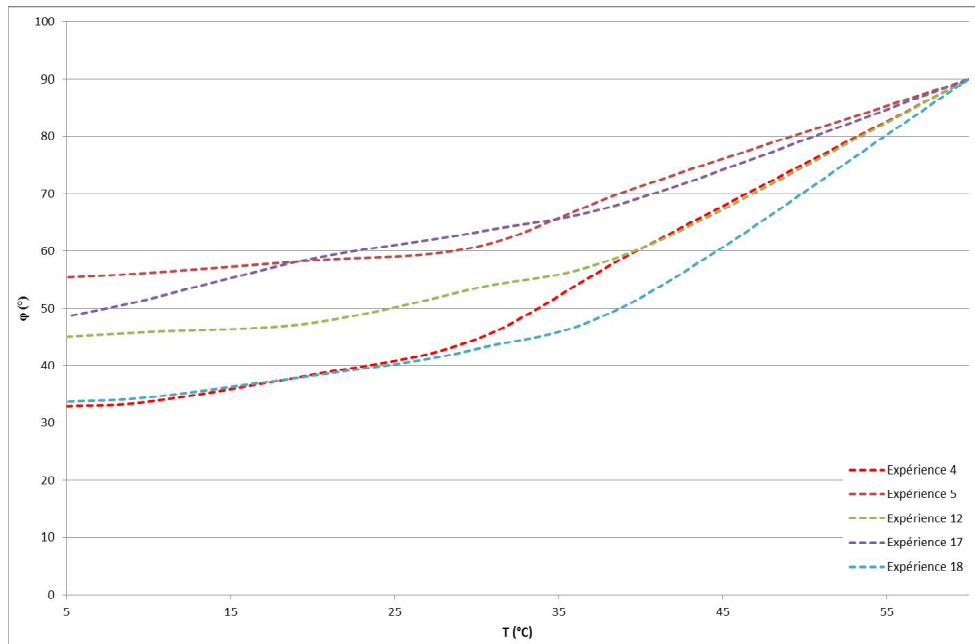


Figure 3-19 : Evolution de la norme de l'angle de phase en isochrone (1 Hz) des huiles correspondant au point central du plan d'expériences

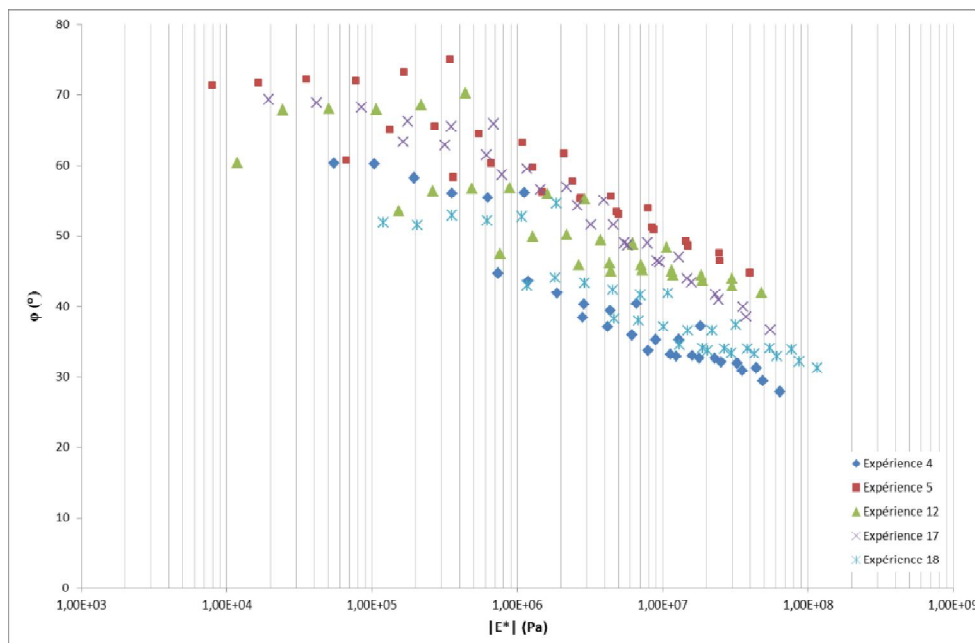


Figure 3-20 : Comparaison des courbes de Black des huiles de liquéfaction correspondant au point central du plan d'expériences

Malgré cette difficulté à maîtriser la rhéologie des huiles de liquéfaction, partiellement liée au montage expérimental, cette technique semble prometteuse. En effet, la gamme de rhéologies obtenues en liquéfaction hydrothermale englobe une large gamme de grades de bitumes. Ainsi, les courbes représentant les normes du module complexe à 1 Hz pour deux

bitumes 35/50 et 80/100 sont comprises entre les deux courbes extrêmes obtenues lors du plan d'expériences, comme indiqué sur la Figure 3-21. Il semble donc possible de pouvoir moduler les propriétés rhéologiques des bio-huiles en fonction des conditions expérimentales, et ainsi de viser l'obtention d'un liant équivalent à un grade de bitume spécifique.

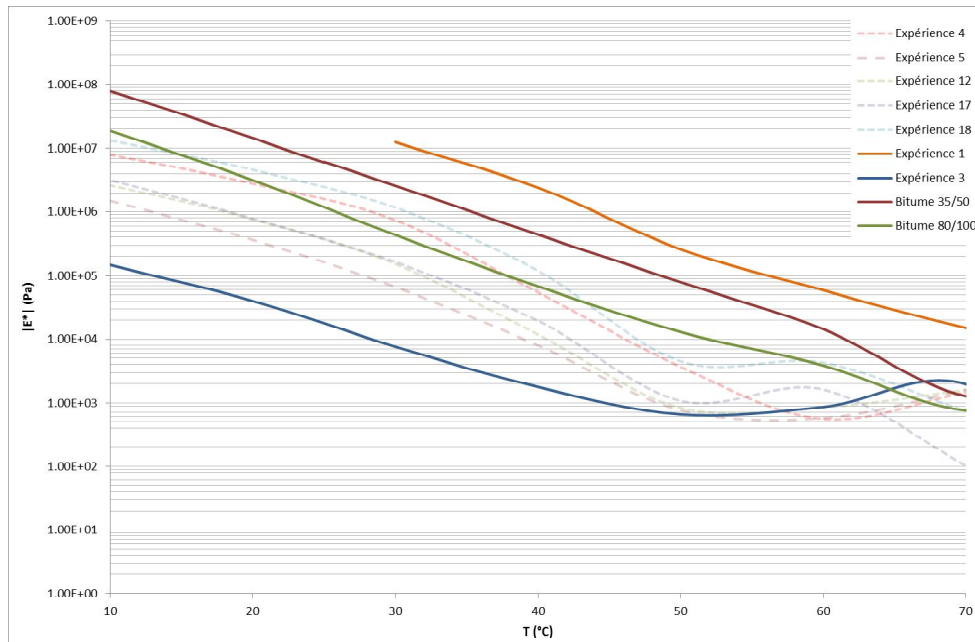


Figure 3-21 : Comparaison du comportement des huiles de liquéfaction et de deux bitumes de référence (isochrones de la norme du module complexe à 1Hz)

*b- Influence des conditions expérimentales sur les propriétés rhéologiques*

Afin de déterminer une éventuelle corrélation entre les conditions opératoires appliquées durant la liquéfaction hydrothermale, et la rhéologie des huiles résultantes, les évolutions de la norme du module complexe des huiles en fonction des pressions initiales et températures de liquéfaction sont représentées en Figure 3-22 et en Figure 3-23 respectivement, pour une fréquence de sollicitation de 1 Hz.

A la vue de ces deux distributions de points, aucune tendance claire ne peut se dégager. Il semble néanmoins qu'une augmentation de la pression initiale tende à diminuer la rigidité des huiles. En effet, en fittant la distribution des points par des fonctions exponentielles (de type  $y = ae^{bx}$ ), les coefficients de corrélation  $r^2$  prennent des valeurs comprises entre 0,2 et 0,3, indiquant qu'entre 20% et 30% de la variabilité expérimentale peut être expliquée par la variation de pression (Tableau 3-XVI).

Cette tendance est nettement moins marquée avec la variation de température, puisque les coefficients de variation prennent des valeurs inférieures à 0,15 et peuvent même prendre des valeurs proches de 0 (Tableau 3-XVII).

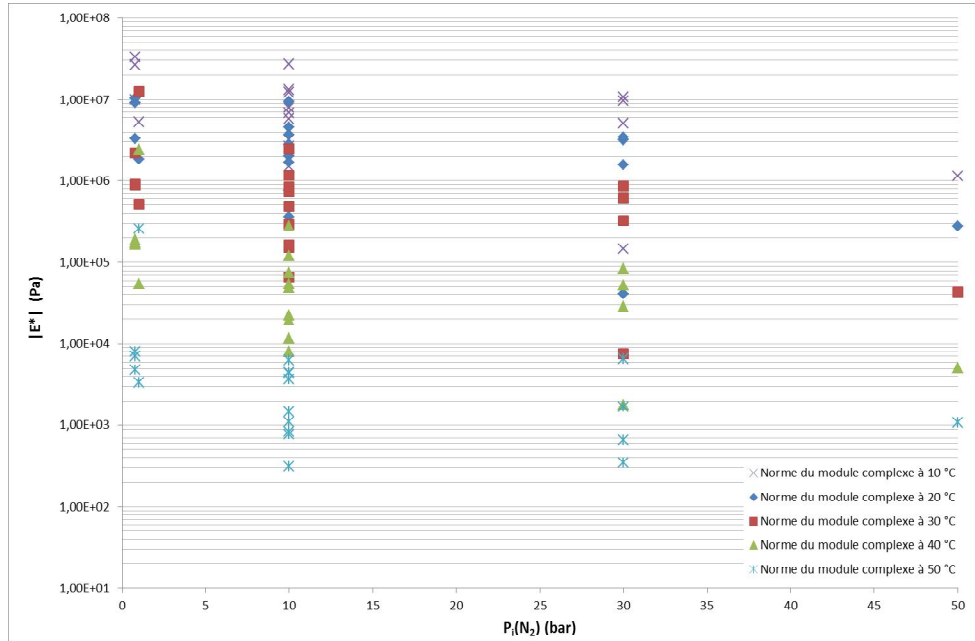


Figure 3-22 : Influence de la pression initiale en  $N_2$  sur la norme du module complexe des huiles à 1 Hz

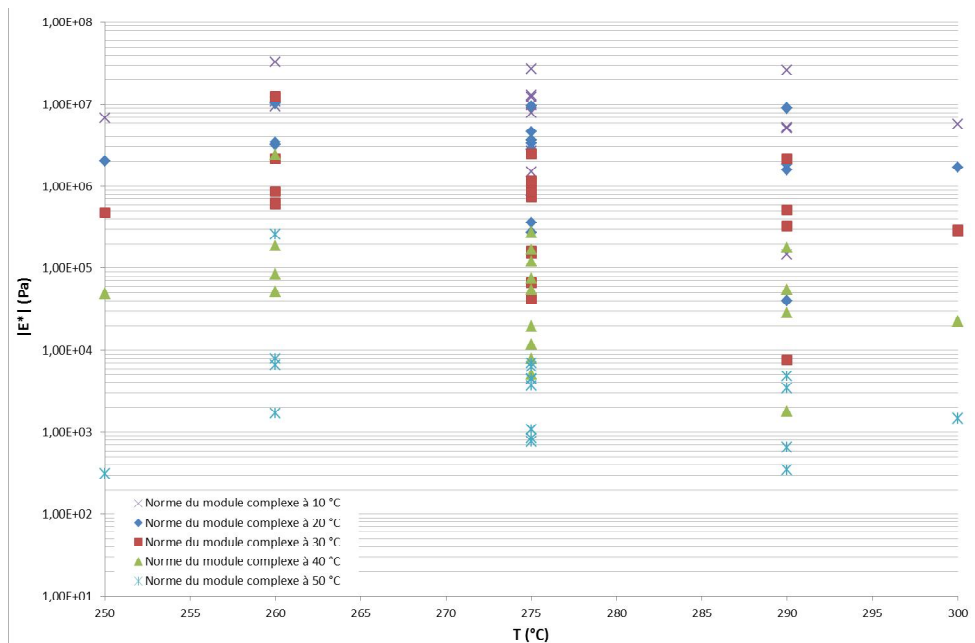


Figure 3-23 : Influence de la température de liquéfaction sur la norme du module complexe des huiles à 1 Hz

**Tableau 3-XVI : Coefficients de corrélation entre la pression initiale de liquéfaction hydrothermale et la norme du module complexe des huiles ( $|E^*|$  donnée à 1 Hz)**

Température de sollicitation (°C)	Coefficient de corrélation ( $r^2$ ) entre $ E^* $ et $P_i(N_2)$
10	0,26
20	0,26
30	0,33
40	0,33
50	0,19

**Tableau 3-XVII : Coefficients de corrélation entre la température de liquéfaction hydrothermale et la norme du module complexe des huiles ( $|E^*|$  donnée à 1 Hz)**

Température de sollicitation (°C)	Coefficient de corrélation ( $r^2$ ) entre $ E^* $ et T
10	0
20	0,08
30	0,13
40	0,14
50	0,07

*c- Relations rendements-rhéologie*

Une relation potentielle entre les rendements de liquéfaction et les propriétés rhéologiques des huiles a également été envisagée. Pour cela, les rendements de liquéfaction ont été portés en fonction de la norme du module complexe des huiles à 1 Hz, pour des températures de sollicitations comprises entre 10 °C et 70 °C (Figure 3-24).

Ici encore, aucune tendance claire ne se dégage. Néanmoins, il semble qu'une augmentation des rendements de liquéfaction engendre une diminution des valeurs des normes des modules complexes. En d'autres termes, plus la quantité d'huile produite au cours du processus est importante, moins cette huile est visqueuse.

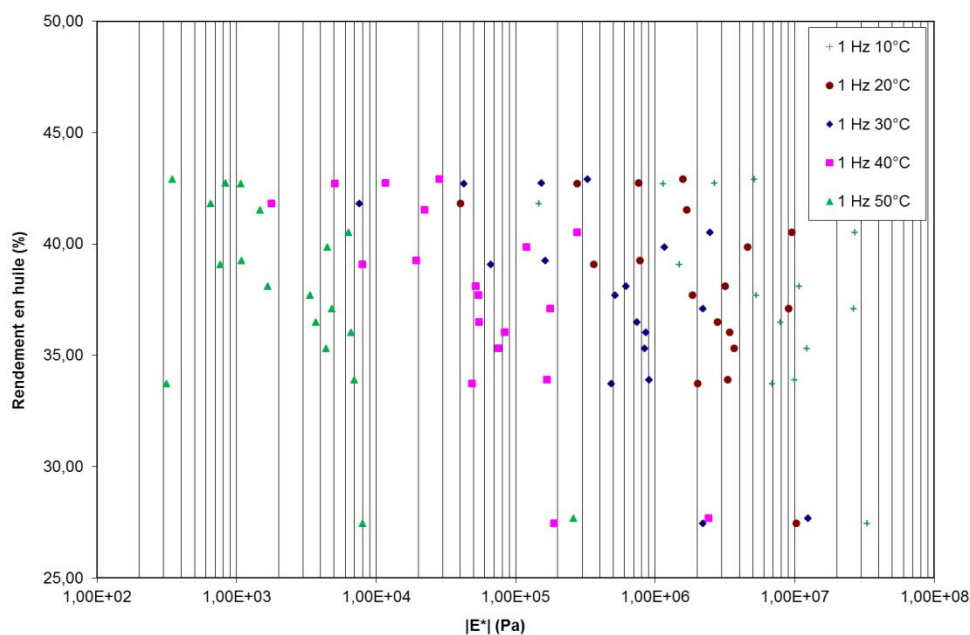


Figure 3-24 : Evolution des rendements de liquéfaction en fonction de la norme du module complexe à 1 Hz des huiles de liquéfaction (pour des températures de sollicitations comprises entre 10 °C et 50 °C)

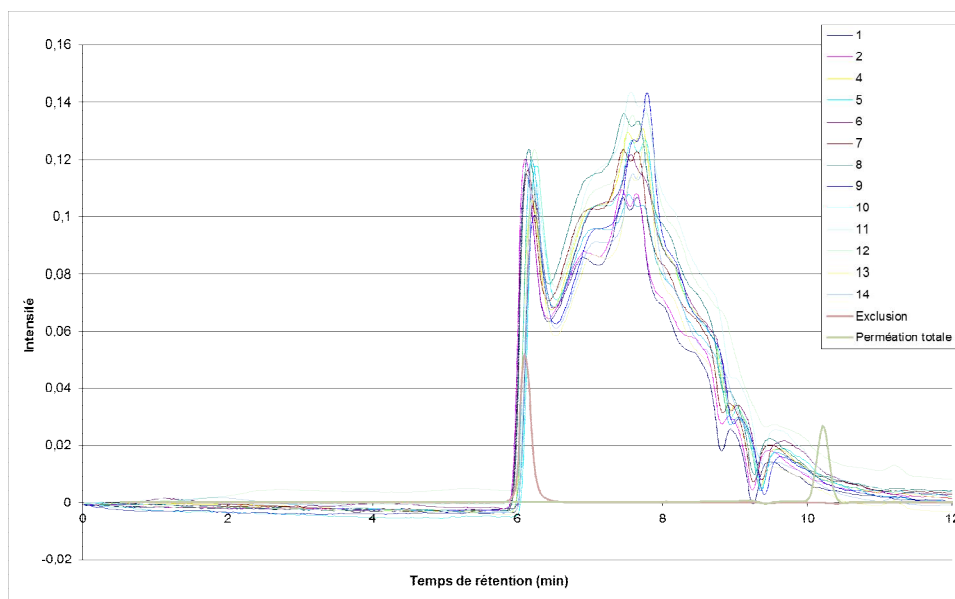
Entre 30% et 50% de la variabilité peut ainsi être expliquée en fittant les données expérimentales par des courbes de type exponentielles (voir Tableau 3-XVIII), sauf pour une température de sollicitation de 70 °C, pour laquelle le  $r^2$  chute à 0,16.

Tableau 3-XVIII : Coefficients de corrélation entre les rendements de liquéfaction en bio-huile et les propriétés rhéologiques de ces huiles ( $|E^*|$  donnée à 1 Hz)

Température de sollicitation (°C)	Coefficient de corrélation ( $r^2$ ) entre $ E^* $ et le rendement de liquéfaction
10	0,35
20	0,30
30	0,45
40	0,51
50	0,46
60	0,35
70	0,16

*d- Chromatographie d'exclusion stérique*

La variabilité de rhéologie en fonction des conditions expérimentales ne semble pas pouvoir s'expliquer par la variation de la composition chimique des huiles. En effet, les analyses GC-MS ont révélé une composition globalement similaire, quelles que soient les conditions de pression et de température appliquées lors de la liquéfaction hydrothermale. Néanmoins, l'utilisation d'une technique séparative telle que la chromatographie en phase gazeuse limite la taille des molécules détectables à environ 600 Da. En effet, au-delà de cette masse moléculaire, elles ne seront plus volatiles, et resteront donc piégées dans le système d'injection. Afin de déterminer la présence éventuelle de molécules plus lourdes, et de vérifier la pertinence de ce critère pour évaluer la variabilité de la rhéologie, certaines huiles ont été caractérisées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Tout particulièrement, les variations de chromatogrammes dans la gamme des hauts poids moléculaires pourraient être significatives d'un changement de propriétés visco-élastiques. Les chromatogrammes des huiles de liquéfaction sont présentés en Figure 3-25.



**Figure 3-25 : Comparaison des chromatogrammes d'exclusion stérique des huiles de liquéfaction**

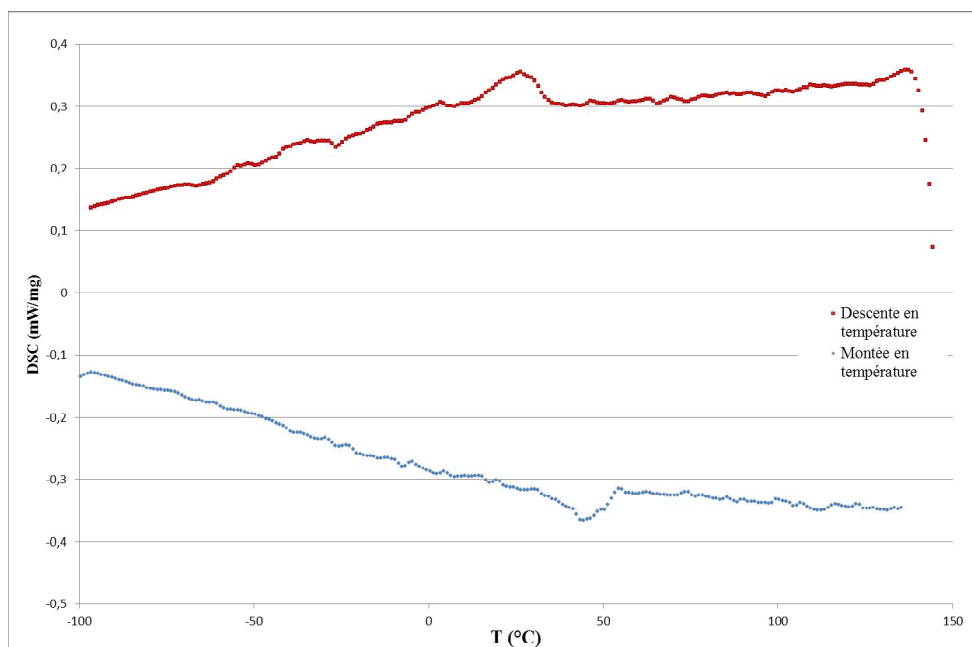
Il n'y a que peu de variations des chromatogrammes en fonction des huiles de liquéfaction. Au-delà de 7 minutes d'élution, les différents chromatogrammes présentent les mêmes pics, indiquant une distribution similaire des masses. En-deçà de 7 minutes, un seul pic est présent, à 6,1 min, correspondant à l'exclusion totale des molécules. Ceci peut

s'expliquer par le fait que la granulométrie de la colonne utilisée n'a pas permis de séparer toutes les molécules, et plus spécifiquement les molécules de plus hauts poids moléculaires.

Ainsi, des essais de séparation avec des colonnes montées en série, possédant des granulométries différentes, et par conséquent, pouvant séparer des molécules de tailles différentes, ont été menés. Malheureusement, ces essais se sont révélés non concluants, car ils n'ont pas permis d'améliorer la séparation des molécules possédant les masses moléculaires les plus élevées.

*e- Calorimétrie différentielle à balayage*

Ces huiles ont également été caractérisées par DSC, afin d'évaluer la présence de transitions spécifiques (fusion, solidification, transition vitreuse...). La Figure 3-26 représente un exemple de thermogramme obtenu (à partir de l'huile 1). Les autres thermogrammes présentent la même allure générale, avec des décalages en température plus ou moins importants des deux pics. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 3-XIX et le Tableau 3-XX.



**Figure 3-26 : Exemple de courbes DSC d'une huile de liquéfaction (Huile 1)**

Tableau 3-XIX : Températures de fusion et de cristallisation des huiles de liquéfaction

Essai	T <sub>fusion</sub> (°C)	T <sub>solidification</sub> (°C)	Essai	T <sub>fusion</sub> (°C)	T <sub>solidification</sub> (°C)
1	43,9	26,3	11	44,5	21,8
2	43,7	20,1	12	42,8	20,5
3	44,8	23,0	13	42,2	23,3
4	44,7	19,7	14	43,8	21,7
5	43,0	17,9	15	43,9	21,5
6	46,0	23,4	16	43,1	23,7
7	43,2	18,0	17	44,7	20,8
8	44,1	23,0	18	44,4	21,9
9	43,3	24,8	19	44,0	17,6
10	44,9	19,3	20	45,7	18,8

Tableau 3-XX : Analyse statistique des résultats de DSC

	T <sub>fusion</sub> (°C)	T <sub>solidification</sub> (°C)
<b>Moyenne</b>	44,0	21,4
<b>Ecart-type</b>	0,94	2,34
<b>CV (%)</b>	2,1	10,9

Il n'y a que peu de variation des températures de fusion des huiles de liquéfaction, qui sont centrées autour de 44 °C, avec un coefficient de variation d'environ 2%. Cette température correspond également à la transition observée à 45 °C lors des études rhéologiques des bio-huiles. La température de solidification apparaît être plus disparate que la température de fusion. Elle est centrée autour de 21 °C, avec un coefficient de variation supérieur à 10%.

Ces résultats montrent que ces nouveaux critères ne sont pas, encore une fois, discriminants vis-à-vis du comportement rhéologique des huiles de liquéfaction. En effet, les comportements spécifiques en rhéologie des huiles numérotées 1 et 3 n'apparaissent pas différenciés en fonction de ces températures. Malgré le fait que l'huile 1 possède la température de solidification la plus élevée de toutes les huiles analysées (ce qui est cohérent avec le fait qu'elle possède également la rigidité la plus élevée de toutes ces huiles), l'huile 3,

qui possède la rigidité la plus faible de ces mêmes huiles, présente une température de solidification incluse dans les valeurs moyennes obtenues sur le plan d'expériences.

## 2) Influence du changement d'échelle

Afin d'étudier une éventuelle influence d'un changement d'échelle, des expériences ont été menées sur un appareil de 300 mL, et comparées à celles menées sur l'appareil de 50 mL. La géométrie des deux appareils n'est pas exactement la même : le diamètre interne est multiplié par 1,9 et la hauteur par 1,7 en passant du volume de 50 mL au volume de 300 mL. Néanmoins, dans la pratique, la géométrie des deux appareils sera considérée comme identique. De plus, le même taux de remplissage a été conservé (7 g de microalgues et 28 mL d'eau pour l'appareil de 50 mL ; 42 g de microalgues et 168 mL d'eau pour l'appareil de 300 mL), ainsi que le protocole d'isolement des différentes fractions. Les variations observées, supérieures à la variabilité expérimentale, pourront être uniquement attribuées au changement d'échelle.

Sur la Figure 3-27, sont représentées l'évolution des normes du module complexe en isochrones à 1 Hz des deux huiles issues du plan d'expériences et possédant les rhéologies extrêmes. Sont également représentées les courbes relatives à quatre huiles obtenues avec l'appareil de 300 mL.

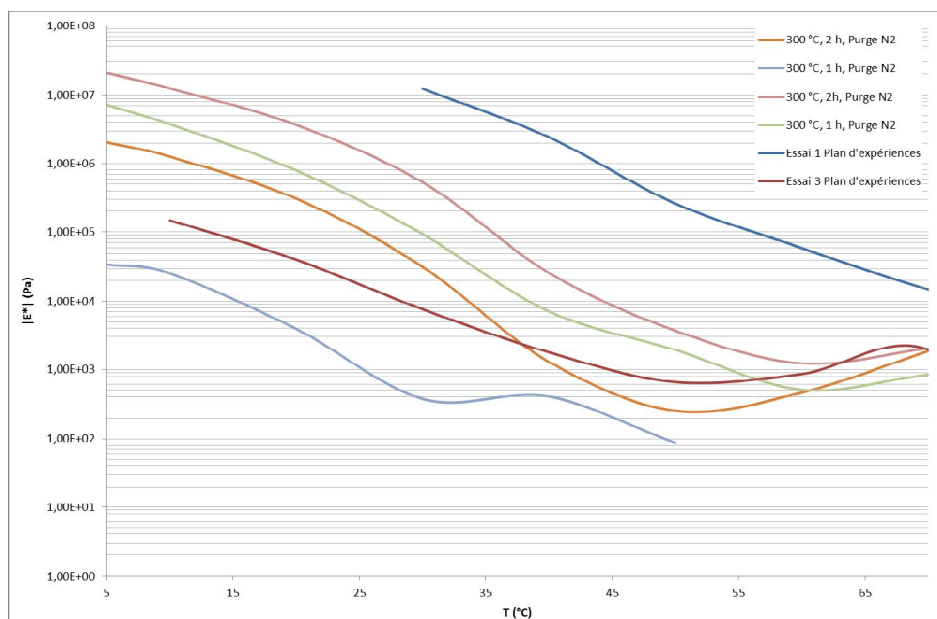


Figure 3-27 : Comparaison des comportements rhéologiques des huiles obtenues sur l'appareil de 50 mL et l'appareil de 300 mL

Les huiles obtenues avec l'appareil de 300 mL ont tendance à être globalement moins visqueuses que les huiles obtenues avec l'appareil de 50 mL. En effet, leurs isochrones se situent dans la partie basse, voire dans la partie inférieure, de la gamme de  $|E^*|$  délimitée par les isochrones à 1 Hz des huiles les plus et les moins visqueuses du plan d'expériences. Cependant, ces conclusions sont à avec précaution, car les courbes de montée en température varient selon les appareils.

### 3) Influence de la nature du solvant d'extraction

Comme indiqué précédemment, deux solvants organiques ont été utilisés pour extraire les huiles de liquéfaction : du toluène pour le réacteur de 1 L, et du dichlorométhane pour les réacteurs de 50 mL et 300 mL. Afin de s'affranchir de ce facteur supplémentaire de variabilité, des essais d'extraction de bio-huile au toluène ont été réalisées sur le réacteur de 300 mL.

D'un point de vue qualitatif, le toluène et le dichlorométhane semblent avoir des propriétés d'extraction très différentes. En effet, l'aspect des résidus solides, obtenus après extraction de la bio-huile, diffère selon le solvant d'extraction utilisé :

- avec le dichlorométhane, les résidus se présentent sous la forme d'une poudre fine marron clair ;
- avec le toluène, les résidus se présentent également sous la forme d'une poudre, mais d'aspect plus grossier, sur laquelle semble adsorbée une huile. L'ensemble présente une coloration marron foncé à noir.

Lorsque les résidus isolés avec le toluène sont mis en présence de dichlorométhane, la phase organique se colore, signe que toute la bio-huile n'a pas été extraite par le toluène. Les rendements sont cohérents avec ces observations, puisque des rendements en bio-huile obtenus au toluène sont approximativement 1,5 fois inférieurs à ceux obtenus au dichlorométhane. Ces résultats sont expliqués par la différence importante de polarité entre ces deux solvants organiques.

Enfin, les résultats d'analyse élémentaire corroborent ces données. Les résidus solides isolés par le toluène sont nettement plus riches en carbone et en hydrogène que ceux isolés par le dichlorométhane (60% et 7% environ en moyenne pour le premier solvant contre 38% et

4% environ en moyenne pour le second solvant). Le toluène ne semble donc pas être le solvant optimal d'extraction des bio-huiles en terme de maximisation des rendements.

Néanmoins, il peut sembler intéressant de faire varier le solvant d'extraction, puisque ceci a un impact direct sur la rhéologie des phases extraites. En effet, les huiles extraites au dichlorométhane ont tendance à être plus rigide que les huiles extraites au toluène (voir Figure 3-28, courbes violette, bleu et rouge). De plus, après une extraction de la bio-huile au toluène, il est possible d'extraire au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  une deuxième huile, à partir des résidus solides. Cette huile (Figure 3-28, courbe verte) présente des propriétés rhéologiques tout à fait particulières, puisqu'elle est nettement plus rigide (écarts supérieurs à quatre décades) que les huiles extraites directement au toluène ou au dichlorométhane. De plus, cette huile présente une continuité dans l'espace de Black (Figure 3-29) que les autres huiles ne possèdent pas, indiquant une meilleure stabilité thermorhéologique.

Ces résultats indiquent que pour optimiser la rhéologie des huiles de liquéfaction, un fractionnement semble nécessaire. Celui-ci pourrait être réalisé par des extractions avec des solvants de polarités croissantes, mais ceci ne constituerait pas une approche dite « verte ». De manière plus avantageuse, ce fractionnement pourrait être réalisé par distillation fractionnée, suivant des processus similaires à ceux appliqués aux bruts de pétrole. Idéalement, les fractions les plus légères pourraient être valorisées dans le domaine énergétique, tandis que les fractions les plus lourdes seraient valorisées en tant que liant routier non bitumineux.

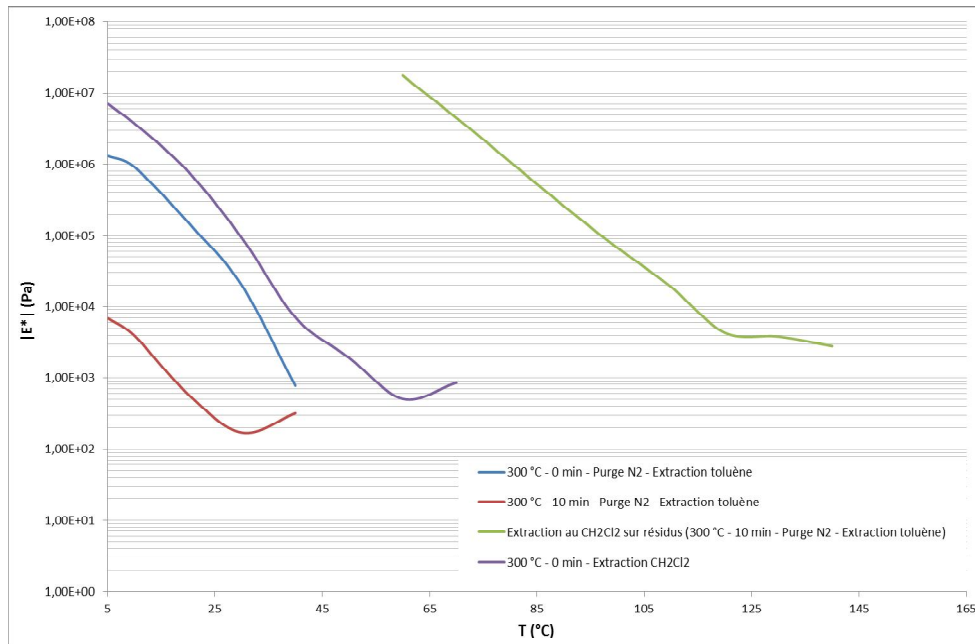


Figure 3-28 : Comparaison des propriétés rhéologiques (isochrones 1 Hz) de deux huiles de liquéfaction extraites au toluène, de l'huile obtenue par extraction au dichlorométhane des résidus solides obtenus après extraction au toluène, ainsi que d'une huile de liquéfaction extraite directement au toluène

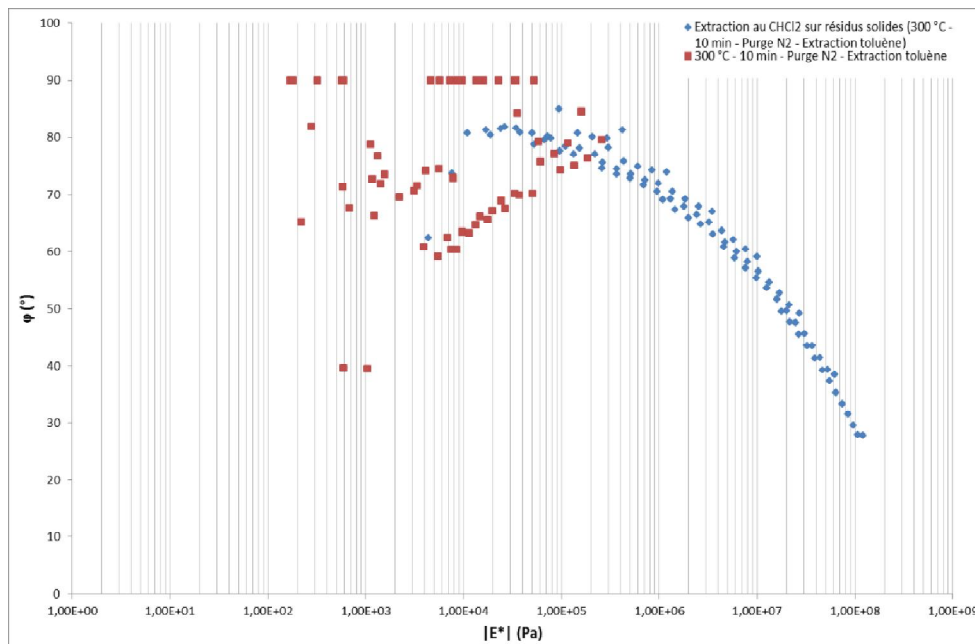


Figure 3-29 : Comparaison des courbes de Black d'une huile de liquéfaction extraite au toluène et de l'huile extraite au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à partir des résidus solides après l'extraction au toluène

#### 4) Influence du taux de chargement

Plusieurs expériences ont été menées sur l'appareil de liquéfaction de 1 L afin d'étudier l'influence de la variation du taux de chargement de l'enceinte de réaction, et donc de

l'espace de tête libre, sur les propriétés rhéologiques de l'huile résultante. Les expériences ont été réalisées à partir du lot 9 de microalgues. Le taux de chargement, calculé en considérant la densité des microalgues égale à un, a été défini comme étant :

$$\text{Taux de chargement} = \frac{\text{Volume}_{\text{eau}} + \text{Volume}_{\text{microalgues}}}{\text{Volume}_{\text{réacteur}}}$$

Trois taux de chargement ont été testés (0,35, 0,50 et 0,65) à trois températures différentes (260 °C, 280 °C, 300 °C), pour un temps de séjour d'une heure.

Les phases hydrophobes (huile de liquéfaction en mélange avec les résidus solides) ont été isolées après avoir été resuspendues dans le toluène et évaporation de celui à pression atmosphérique. Les neuf matériaux hydrophobes résultants ont été caractérisés d'un point de vue rhéologique.

Les résultats, présentés en Figure 3-30, montrent que le paramètre « taux de chargement » semble être un paramètre-clé influençant la rigidité des phases hydrophobes. En effet, il apparait que plus le taux de chargement est élevé, moins le matériau est visqueux (excepté fait du contre-exemple obtenu à 260 °C pour un taux de chargement de 0,65, qui donne un matériau cassant à froid et caoutchouteux à chaud).

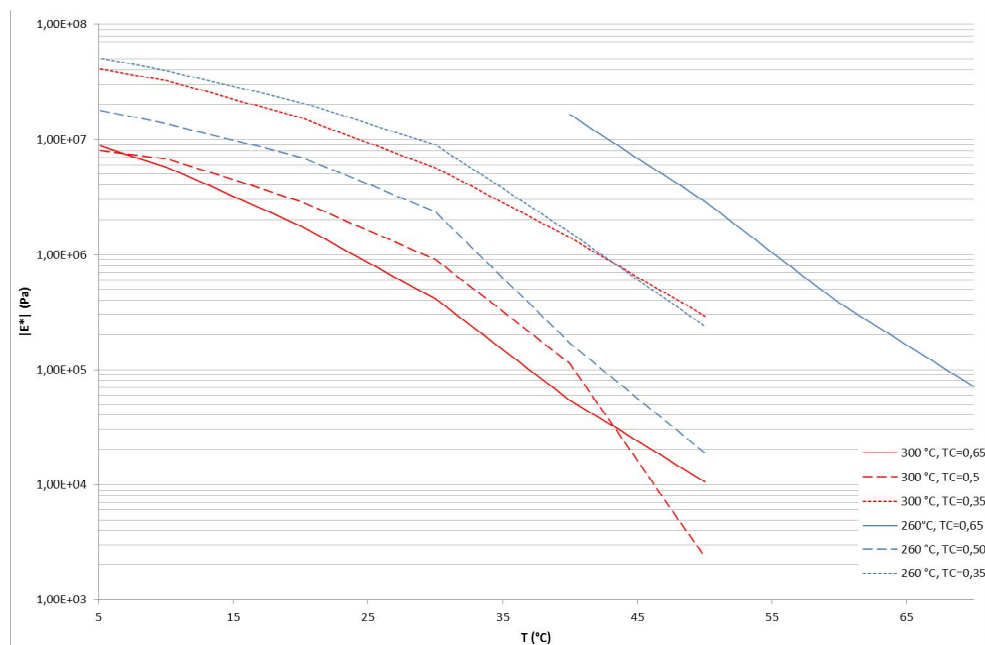


Figure 3-30 : Influence du taux de chargement du réacteur et de la température de liquéfaction sur les propriétés rhéologiques des phases hydrophobes (TC : taux de chargement)

De plus, quel que soit le taux de chargement appliqué, les courbes de Black (Figure 3-31) des huiles obtenues aux différentes températures présentent des caractères différents :

- aux plus basses températures, le matériau présente un comportement proche de celui d'un bitume, avec une augmentation de la norme du module complexe et une diminution de l'angle de phase lorsque la fréquence de sollicitation augmente ;
- aux plus hautes températures, le matériau présente un comportement différent, avec une augmentation à la fois de la norme du module complexe et de l'angle de phase lorsque la fréquence de sollicitation augmente.

Enfin, la répétabilité semble être améliorée, puisque deux phases hydrophobes obtenues dans les mêmes conditions, à partir de deux lots de microalgues différents (lot 7 et lot 9), ont montré un comportement rhéologique similaire.

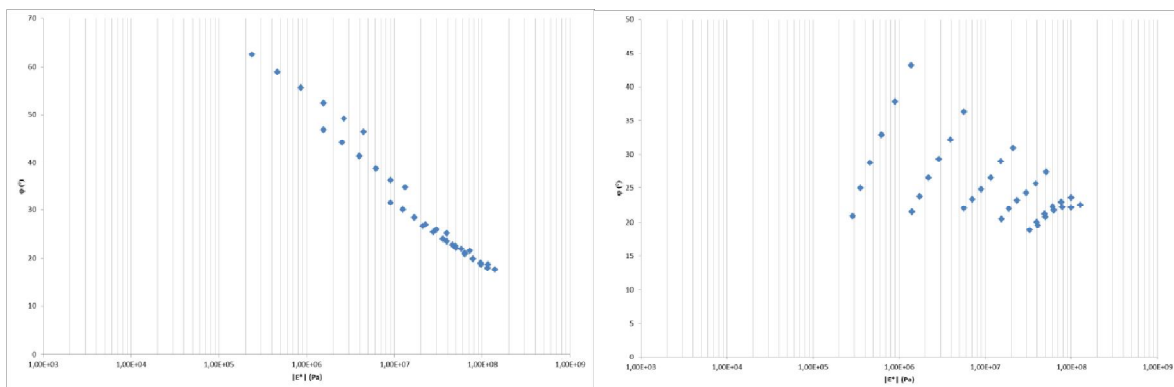


Figure 3-31 : Influence de la température de liquéfaction sur les courbes de Black à taux de chargement fixe (260 °C, TC=0,65 à gauche ; 300 °C, TC=0,35 à droite)

## 5) Conclusions

Les résultats de rhéologie obtenus sur les huiles de liquéfaction semblent encourageants. En effet, entre les deux huiles présentant les comportements rhéologiques extrêmes, il est possible de rencontrer tout une gamme de bio-huiles, présentant chacune des propriétés rhéologiques se rapprochant de celle d'un grade de bitume donné. Idéalement, à une combinaison de conditions de liquéfaction pourrait correspondre une rhéologie, et inversement.

Néanmoins, la reproductibilité et la maîtrise de ces propriétés n'est pas encore assurée, notamment du fait de la difficulté à obtenir une biomasse homogène. De plus, des phénomènes d'oxydation des bio-huiles pourraient se dérouler lors de l'évaporation sous vide du solvant d'extraction, ainsi qu'une évaporation des fractions les plus volatiles, menant à des comportements rhéologiques variables. La répétabilité semble malgré tout meilleure lorsque l'appareil d'1 L est utilisé, probablement du fait d'une prise d'échantillon plus grande.

Malgré un manque d'explication et de rationalisation des résultats obtenus en rhéologie, il semble envisageable de pouvoir moduler les propriétés de viscoélasticité des huiles de liquéfaction en fonction des conditions opératoires, notamment en modifiant le taux de chargement des enceintes. Ceci devrait permettre d'avoir ainsi accès à des grades équivalents à ceux de bitumes pétroliers.

*In fine*, l'utilisation de la fraction hydrophobe dans sa globalité, résidus solides compris, devrait s'avérer être le choix de valorisation le plus judicieux d'un point de vue économique et écologique.

## VI – Conclusions

La liquéfaction hydrothermale semble être une technique prometteuse pour l'obtention d'un matériau viscoélastique thermosusceptible, présentant des caractéristiques peu éloignées de celles des bitumes pétroliers. La limite de rendement en phase hydrophobe (huiles + résidus solides), à partir de *Scenedesmus sp.* et dans les conditions testées, semble être d'environ 55%. En considérant un échange équimassique entre la bio-huile et les résidus solides, un rendement maximal en bio-huile de 55% pourrait donc être atteint dans des conditions optimales. Ce rendement pourrait éventuellement être augmenté en repoussant les conditions limites imposées pendant le plan d'expériences.

Les huiles de liquéfaction ainsi obtenues présentent des propriétés viscoélastiques intéressantes, englobant les propriétés d'une large gamme de bitumes usuels. Néanmoins, le manque de maîtrise et de rationalisation de ces propriétés en fonction des conditions expérimentales imposées constitue à l'heure actuelle un problème important.

Pour l'instant, la limitation principale de la liquéfaction hydrothermale réside dans la création d'une phase aqueuse polluée. En effet, celle-ci contient majoritairement des

hétérocycles azotés potentiellement toxiques. Un recyclage de cette eau, ou une réutilisation dans un autre processus est donc indispensable pour la viabilité de ce procédé. Récemment, plusieurs études ont démontré la possibilité de réutiliser ces phases dans la culture de certains microorganismes. [14], [17], [18], Une autre approche pourrait consister à injecter ces phases aqueuses dans un processus de gazéification supercritique. [19] Pour l'instant, ces recherches n'en sont qu'à leurs prémices.

Une autre solution à ce problème pourrait résider dans la modulation des conditions expérimentales. Travailler à des températures de liquéfaction hydrothermale plus basses pourrait permettre de limiter la dénaturation de certains composés. Par exemple, en limitant la transformation des protéines et/ou polysaccharides à la simple étape d'hydrolyse en acides aminés et/ou monosaccharides, ceux-ci pourraient être avantageusement valorisés par la suite. Une étude en ce sens a déjà été menée par une équipe chinoise [20], qui propose une liquéfaction hydrothermale en deux étapes : la première étape permet d'isoler les polysaccharides en phase aqueuse (160 °C, 20 minutes), quand la deuxième étape permet de générer une bio-huile (240 °C, 20 minutes). Une étude similaire a été menée sur *Chlorella sorokiniana*, permettant d'isoler un  $\alpha$ -glucane, qui pourrait avoir des applications dans le domaine des biopolymères, notamment comme substitut à l'amylose. [21]

## Bibliographie

- [1] C. Jazrawi, P. Biller, A. B. Ross, A. Montoya, T. Maschmeyer, B. S. Haynes. Pilot plant testing of continuous hydrothermal liquefaction of microalgae. *Algal Research* **2013**, *2*, 268-277.
- [2] E. Kamio, S. Takahashi, H. Noda, C. Fukuhara, T. Okamura. Effect of heating rate on liquefaction of cellulose by hot compressed water. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *137*, 328 – 338.
- [3] S. S. Toor, L. Rosendahl, A. Rudolf. Hydrothermal liquefaction of biomass: a review of subcritical water technologies. *Energy* **2011**, *36*, 2328 – 2342.
- [4] G. E. P. Box, J. S. Hunter. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. *The Annals of Mathematical Statistics* **1957**, *28*, 195–241.
- [5] S. Yin, R. Dolan, M. Harris, Z. Tan. Subcritical hydrothermal liquefaction of cattle manure to bio-oil: effects of conversion parameters on bio-oil yield and characterization of bio-oil. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 3657 – 3664.
- [6] G. Yu, L. Zhang, L. Schideman, T. L. Funk, Z. Wang. Hydrothermal liquefaction of low lipid content microalgae into bio-crude oil. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* **2011**, *54*, 239–246.
- [7] U. Jena, K. Das, J. Kastner. Effect of operating conditions of thermochemical liquefaction on biocrude production from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 6221 – 6229.
- [8] S. Zou, Y. Wu, M. Yang, C. Li, J. Tong. Bio-oil production from sub- and supercritical water liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* and related properties. *Energy and Environmental Science* **2010**, *3*, 1073–1078.
- [9] Z. Shuping, W. Yulong, Y. Mingde, I. Kaleem, L. Chun, J. Tong. Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* cake. *Energy* **2010**, *35*, 5406 – 5411.
- [10] P. Duan, P. E. Savage. Hydrothermal liquefaction of a microalga with heterogeneous catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2011**, *50*, 52–61.

- [11] T. M. Brown, P. Duan, P. E. Savage. Hydrothermal liquefaction and gasification of *Nannochloropsis sp.* *Energy & Fuels* **2010**, *24*, 3639–3646.
- [12] D. R. Vardon, B. Sharma, J. Scott, G. Yu, Z. Wang, L. Schideman, Y. Zhang, T. J. Strathmann. Chemical properties of biocrude oil from the hydrothermal liquefaction of *Spirulina algae*, swine manure, and digested anaerobic sludge. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 8295 – 8303.
- [13] P. Biller, A. Ross. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 215 – 225.
- [14] A. Ross, P. Biller, M. Kubacki, H. Li, A. Lea-Langton, J. Jones. Hydrothermal processing of microalgae using alkali and organic acids. *Fuel* **2010**, *89*, 2234 – 2243.
- [15] S. R. Villadsen, L. Dithmer, R. Forsberg, J. Becker, A. Rudolf, S. B. Iversen, B. B. Iversen, M. Glasius. Development and application of chemical analysis methods for investigation of bio-oils and aqueous phase from hydrothermal liquefaction of biomass. *Energy & Fuels* **2012**, *26*, 6988–6998.
- [16] L. G. Alba, C. Torri, D. Fabbri, S. R. Kersten, D. W. W. Brilman. Microalgae growth on the aqueous phase from Hydrothermal Liquefaction of the same microalgae. *Chemical Engineering Journal* **2013**, *228*, 214 – 223.
- [17] P. Biller, A. Ross, S. Skill, A. Lea-Langton, B. Balasundaram, C. Hall, R. Riley, C. Llewellyn. Nutrient recycling of aqueous phase for microalgae cultivation from the hydrothermal liquefaction process. *Algal Research* **2012**, *1*, 70 – 76.
- [18] M. Nelson, L. Zhu, A. Thiel, Y. Wu, M. Guan, J. Minty, H. Y. Wang, X. N. Lin. Microbial utilization of aqueous co-products from hydrothermal liquefaction of microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource Technology* **2013**, *136*, 522–528.
- [19] L. Zhang, P. Champagne, C. C. Xu. Supercritical water gasification of an aqueous by-product from biomass hydrothermal liquefaction with novel Ru modified Ni catalysts. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 8279 – 8287.
- [20] C. Miao, M. Chakraborty, S. Chen. Impact of reaction conditions on the simultaneous production of polysaccharides and bio-oil from heterotrophically grown *Chlorella*

*sorokiniana* by a unique sequential hydrothermal liquefaction process. *Bioresource Technology* **2012**, *110*, 617–627.

[21] M. Chakraborty, A. G. McDonald, C. Nindo, S. Chen. An  $\alpha$ -glucan isolated as a co-product of biofuel by hydrothermal liquefaction of *Chlorella sorokiniana* biomass. *Algal Research* **2013**, *2*, 230-236.



**Chapitre 4**  
**Prétraitement acide de la biomasse**  
**Influence sur l'extraction Soxhlet et**  
**la liquéfaction hydrothermale**



## Introduction

Dans le but d'augmenter l'extraction lipidique par Soxhlet, il peut sembler intéressant d'essayer de fragiliser les parois cellulaires. Les lipides intracellulaires pourraient alors être plus facilement extractibles. Plusieurs solutions peuvent être envisagées afin d'attaquer les parois cellulaires : micro-ondes, ultrasons... Une autre solution, peu onéreuse, pourrait être de traiter la biomasse par une solution acide.

Dans la littérature, l'apport d'un prétraitement acide sur des microalgues, et notamment sur l'espèce *Scenedesmus*, mais aussi sur *Chlorococcum humicola* et sur *Chlorella vulgaris* respectivement, a été étudié dans le cadre de la valorisation des sucres afin de produire du bioéthanol. [1], [2], [3] Il a été montré que des prétraitements simples ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, 120 °C, 30 minutes ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, 140 °C, 30 minutes ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, 121 °C, 20 minutes respectivement) permettent de libérer facilement les sucres complexes intracellulaires, et de les hydrolyser en sucres simples. Ces sucres simples peuvent ensuite être injectés dans un processus de fermentation bactérienne pour générer du bioéthanol.

Cependant, peu de données sont disponibles concernant l'application d'un tel traitement dans le cadre de la valorisation des fractions lipidiques des microalgues. Une équipe a récemment montré l'intérêt de traiter *Nannochloropsis salina* par une solution aqueuse d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (1 h, 120 °C) avant une extraction à l'hexane afin d'augmenter le rendement en lipides (48,7% des lipides totaux sont extraits sans prétraitement acide contre 85,6% avec prétraitement). [4] De plus, l'hydrolysats a pu avantageusement être utilisé comme milieu de fermentation pour *Lactobacillus pentosus*, afin de produire de l'acide lactique, qui peut être utilisé en chimie de synthèse.

Enfin, il a été montré que lors d'une extraction lipidique par solvant organique, l'ajout de quelques gouttes d'HCl au solvant d'extraction permet d'améliorer l'extraction des phospholipides. [5]

Les prétraitements acides peuvent donc présenter plusieurs avantages, qui seront évalués tour à tour dans ce chapitre :

- une augmentation des rendements d'extractions lipidiques, *via* une fragilisation des parois cellulaires, permettant ainsi de favoriser la libération des lipides (notamment les

lipides intracellulaires complexes tels que des phospholipides ou des glycolipides, plus difficilement accessibles sans une hydrolyse acide préalable) ;

- une modification des propriétés rhéologiques des huiles extraites, du fait de l'apparition de nouvelles espèces chimiques (*e.g.* les phospholipides) ;
- une répartition simple de la biomasse entre une fraction hydrosoluble, principalement issue de l'hydrolyse des polysaccharides et de la transformation chimique des monosaccharides, et une fraction non soluble en milieu aqueux, majoritairement issue des composantes lipidiques des microalgues. Chacune de ces fractions pourrait présenter un comportement intéressant en liquéfaction hydrothermale, en apportant des propriétés rhéologiques nouvelles.

## I – Présentation des conditions expérimentales testées

Afin d'appréhender au mieux l'impact d'un traitement acide sur les microalgues, et de comprendre les phénomènes chimiques mis en œuvre, la modification de deux paramètres a été envisagée :

- le temps du traitement : 48 h ou 96 h ;
- la concentration en acide : solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10% ou 37% (massique) ;

Dans le but de comparer au mieux ces différentes conditions opératoires, ces traitements ont été appliqués à une biomasse lyophilisée, en mettant environ 150 mL d'acide et 7 g de microalgues à reflux de la solution d'acide choisie, et sous agitation magnétique.

A la fin du traitement, le milieu réactionnel est filtré sur cartouche Soxhlet, afin d'évaluer la répartition de la biomasse. La fraction insoluble en milieu acide est ensuite engagée dans une extraction Soxhlet par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2 : 1, v/v) et/ou en liquéfaction hydrothermale. La fraction aqueuse est évaporée à sec et lyophilisée afin de calculer le bilan de matière. Des études de liquéfaction hydrothermale de cette fraction ont également été menées, dans le but de transformer cette phase hydrophile en matériau hydrophobe. La voie globale de fractionnement de la biomasse est présentée en Figure 4-1.

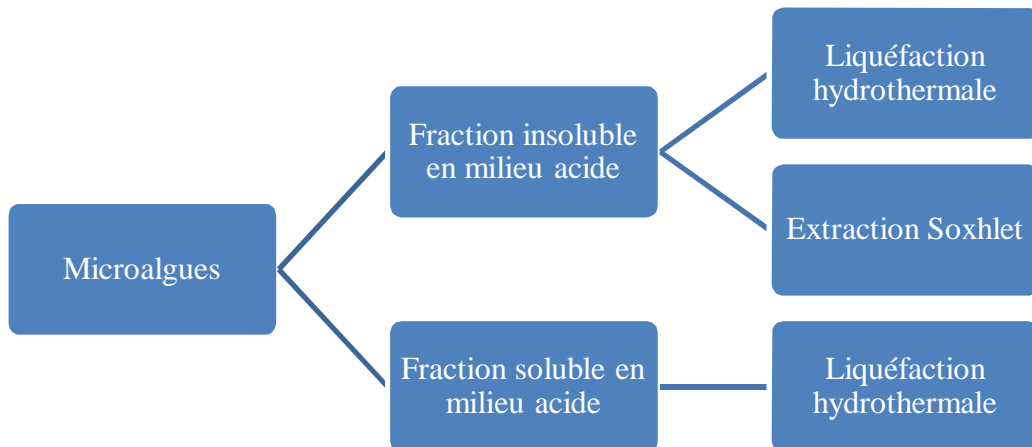


Figure 4-1 : Voies de répartition et de modification de la biomasse envisagées

## II– Influence des conditions opératoires

### 1) Evaluation de la répartition de la biomasse

Quel que soit le traitement appliqué à la matière première, celle-ci se retrouve fractionnée en deux composantes :

- une fraction soluble en milieu acide ;
- une fraction insoluble en milieu acide.

Les rendements en chacune de ces fractions (par rapport à la quantité initiale de biomasse sèche) ont été évalués pour les quatre conditions testées (HCl 10% ou 37%, reflux durant 48 h ou 96 h, Tableau 4-I), sur le lot 3 de microalgues. Une expérience similaire a également été réalisée au reflux de l'eau à titre de comparaison.

Les bilans massiques sont calculés selon l'équation :

$$\text{Bilan massique} = 100 \times \frac{m_{\text{fraction insoluble}} + m_{\text{fraction soluble}}}{m_{\text{microalgues}}} \quad (9)$$

Tableau 4-I : Rendements en phase soluble et en phase insoluble en fonction des différentes conditions opératoires

Durée du reflux (h)	Concentration en HCl (%)	Masse de m.-a. (g)	Insoluble (%)	Soluble (%)	Bilan massique (%)
48	0	7,32	77,9	13,9	91,8
48	10	7,47	26,1	62,8	88,9
48	10	7,16	22,8	60,7	83,5
48	37	7,39	36,7	53,1	89,8
48	37	6,45	31,8	59,7	91,5
96	10	7,15	24,1	64,3	88,4
96	10	6,10	24,4	65,1	89,5
96	37	7,44	30,9	58,0	88,9
96	37	5,84	30,3	56,5	86,8

Le temps de réaction ne semble pas influencer de manière significative la répartition de la biomasse (dans la gamme de temps testés) puisque, pour une concentration en acide donnée (10% ou 37%), les mêmes pourcentages d'insolubles sont obtenus pour un traitement de 48 h ou de 96 h : 24% avec HCl 10% ; 32% avec HCl 37%.

En revanche, la concentration en acide a une influence sur la répartition de la biomasse. Dans l'eau à reflux, une faible fraction de la biomasse (moins de 20%) se solubilise. Cette fraction est composée de sels de culture (NaCl notamment), ainsi que de protéines et polysaccharides hydrosolubles. Lorsque les expériences se déroulent en milieu acide, le pourcentage de la fraction soluble est d'autant plus faible que la concentration en acide est élevée (environ 63% de la biomasse est solubilisée pour une concentration en acide de 10% contre environ 57% pour une concentration en acide de 37%, quel que soit le temps réactionnel). Ces résultats semblent plutôt contre-intuitifs, puisqu'une augmentation de la fraction soluble était attendue avec une augmentation de la concentration en acide. En effet, les liaisons osidiques étant clivées en milieu acide, l'hydrolyse des polysaccharides (qu'ils soient de réserve ou assurant la structure des parois cellulaires) en monosaccharides hydrosolubles devrait être d'autant plus importante que la concentration en acide est élevée. Ceci devrait donc engendrer une augmentation de la quantité de matière en solution aqueuse d'une part, et par conséquent, une diminution de la quantité de matière insoluble d'autre part.

Le traitement acide par HCl n'engendre donc pas une simple hydrolyse des molécules de hauts poids moléculaires en molécules de faibles poids moléculaires, mais semble également

favoriser des réactions entre les fractions hydrophobes et les fractions hydrophiles. Ces hypothèses sont appuyées par le fait qu'en milieu acide, des mélanoides peuvent se former entre des acides aminés et des oses, par des réactions de Maillard, comme démontré dans le chapitre 2. Ces réactions favorisent l'apparition d'une fraction insoluble dans l'eau à partir de composés hydrosolubles, expliquant donc la diminution de matière en phase aqueuse avec l'augmentation de la concentration en acide.

## 2) Caractérisation chimique

### a- *Fraction hydrophobe*

Les compositions élémentaires des fractions insolubles en milieu acide, en fonction des conditions expérimentales, ont été déterminées (Tableau 4-II).

**Tableau 4-II : Composition élémentaire des fractions insolubles en milieu acide et comparaison avec la biomasse**

	%C	%N	%H
<b>HCl 10%, 48h</b>	70,5	2,8	9,4
<b>HCl 10%, 96h</b>	66,3	3,7	7,6
<b>HCl 37%, 48h</b>	64,0	1,6	7,6
<b>HCl 37%, 96h</b>	61,7	2,5	6,0
<b>Scenedesmus sp.</b>	46,7	6,6	7,0

Le traitement acide de la biomasse permet donc d'isoler de manière simple une fraction enrichie en carbone par rapport à la biomasse initiale (une augmentation comprise entre 15% et 25% est observée selon les conditions expérimentales), et appauvrie en azote (selon les conditions expérimentales, une diminution comprise entre un facteur 1,5 et 4 est observée). Le temps de réaction et la concentration en acide semblent tous les deux influencer la composition élémentaire des fractions non solubles. Ainsi, une concentration plus faible en acide semble permettre d'isoler une fraction plus riche en carbone, tandis qu'une augmentation du temps réactionnel engendre un appauvrissement en carbone.

Quelles que soient les conditions expérimentales appliquées, la première étape à se dérouler consiste en une hydrolyse des liaisons osidiques des polysaccharides, menant à une

solubilisation en phase aqueuse des composés fortement oxygénés. La fraction non hydrolysable est alors enrichie en carbone par rapport à la biomasse de départ, tandis que la fraction hydrolysable est enrichie en oxygène. Pour expliquer l'influence de la concentration en acide sur la composition élémentaire (fraction insoluble obtenue par HCl 37% plus riche en oxygène que la fraction insoluble obtenue par HCl 10%), des réactions secondaires, favorisées par les concentrations en acides élevées, pourraient se produire.

Une influence du traitement acide sur les rendements d'extraction Soxhlet a également été observée (Tableau 4-III). En effet, quelles que soient les conditions de prétraitement de la biomasse appliquées, les rendements d'extraction se trouvent être plus faibles que ceux obtenus sans prétraitement (environ 16% avec prétraitement acide contre environ 22% sans prétraitement acide).

La différence entre ces deux rendements pourrait correspondre à la teneur en algaenans extractibles par Soxhlet  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2 : 1, v/v) dans les microalgues. En effet, à l'inverse des huiles obtenues par extraction Soxhlet sur les microalgues non prétraitées, les huiles obtenues par extraction Soxhlet sur les microalgues prétraitées par HCl ne contiennent pas d'algaenans, puisque la totalité des huiles se solubilise dans un solvant apolaire tel que  $\text{CCl}_4$ ). Il est donc possible que durant le traitement acide, les algaenans habituellement partiellement extractibles par Soxhlet (ceux de faible masse moléculaire) se soient condensés avec les algaenans non extractibles par Soxhlet (de plus haute masse moléculaire, et entrant dans la composition de *Scenedesmus sp.* à hauteur de 8% environ), pour former une fraction de degré de condensation supérieur. Ainsi, seuls les acides gras libres seraient extraits lors de l'extraction par Soxhlet.

**Tableau 4-III : Rendements d'extraction Soxhlet ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  2 : 1, v/v) en fonction des conditions de prétraitement de la biomasse**

	<b>Rendement d'extraction par rapport à la masse de la fraction insoluble (%)</b>	<b>Rendement d'extraction par rapport à la masse de microalgues initiale (%)</b>
<b>HCl 10%, 48 h</b>	59,1	15,7
<b>HCl 10%, 96h</b>	62,0	17,0
<b>HCl 37%, 48h</b>	47,9	16,4
<b>HCl 37%, 96h</b>	Entre 39 et 49	Entre 11 et 15

L'application de l'extraction Soxhlet ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 2 : 1, v/v) a également permis de caractériser la fraction lipidique de faible poids moléculaire. L'analyse par RMN  $^1\text{H}$  a montré que celle-ci est composée d'acides gras libres. Ceux-ci sont partiellement retrouvés sous forme d'esters méthyliques (Figure 4-2), en lien avec la présence concomitante de méthanol et de traces d'acide chlorhydrique résiduel au moment de l'extraction, conditions permettant de réaliser des estérifications.

La teneur en insaturations est nettement plus faible que pour les extraits Soxhlet obtenus sans prétraitement acide. En effet, ces insaturations ont pu partiellement subir des hydroxylations et chlorations. Les intégrations des spectres RMN montrent que ces réactions secondaires sont d'autant plus importantes que la concentration en acide est élevée. En effet, l'analyse du ratio entre le signal à 5,35 ppm (protons portés par les carbones engagés dans une double liaison C=C) et celui à 2,29 ppm (protons en  $\alpha$  de la fonction carbonyle) montre que celui-ci diminue avec l'augmentation de la concentration en acide : 2 pour 2 sans prétraitement, 2 pour 3 pour un prétraitement avec HCl 10% et 2 pour 16 pour un prétraitement avec HCl 37%.

Les fractions insolubles en milieu acide ont également été analysées dans leur globalité (fraction extractible par Soxhlet + fraction non extractible par Soxhlet) par RMN  $^{13}\text{C}$  découplé  $^1\text{H}$  (HPDEC) du solide (Figure 4-3 haut). Les fractions résiduelles obtenues après extractions Soxhlet ont également été caractérisées (Figure 4-3 bas).



[TRAITEMENT ACIDE DE LA BIOMASSE]

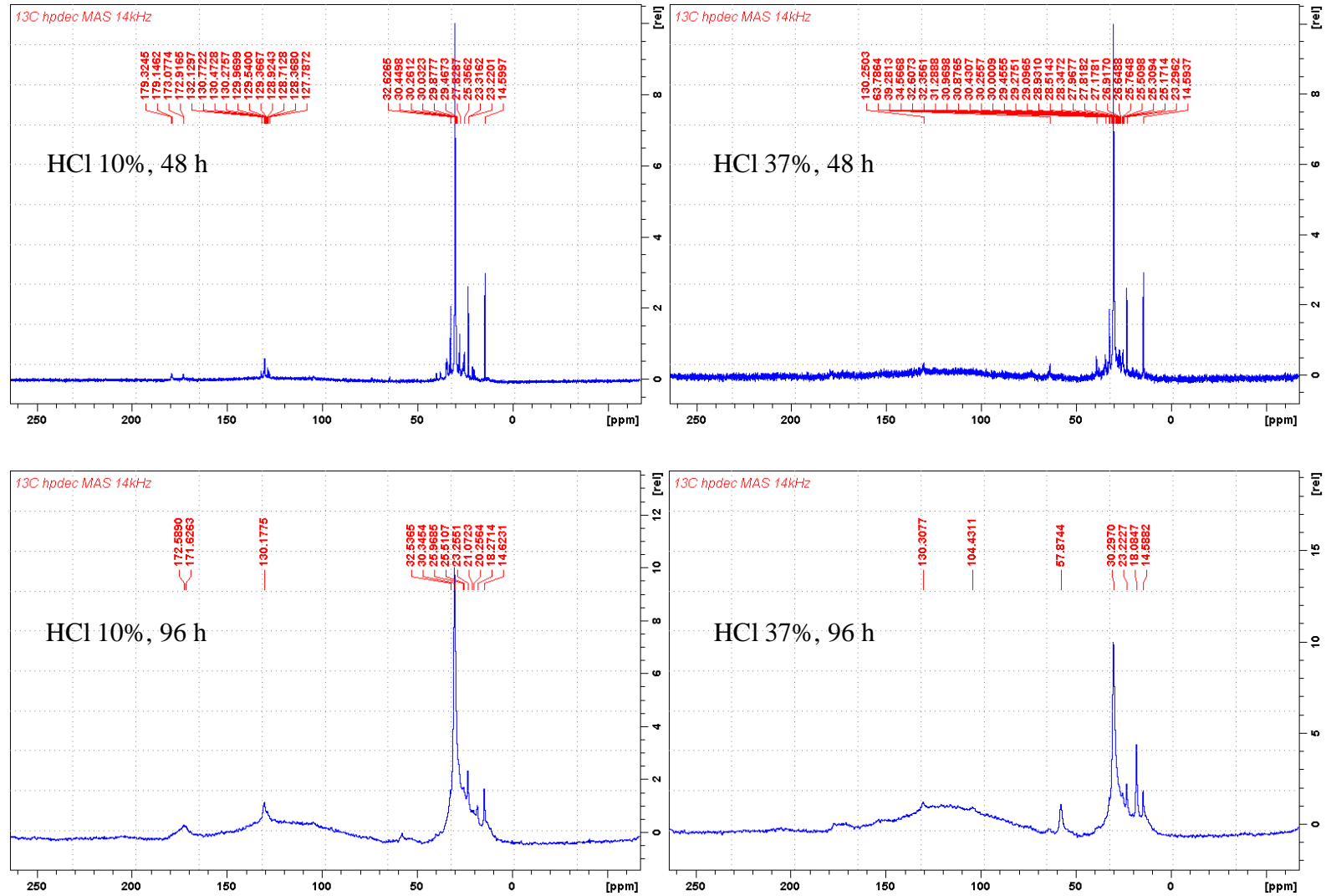


Figure 4-3 : Spectres RMN MAS  $^{13}\text{C}$  HPDEC des fractions insolubles en milieu acide avec (en haut) et sans (en bas) les acides gras libres (48h, HCl 10% à gauche, HCl 37% à droite)

Les raies des spectres des deux fractions insolubles dans l'acide sont très fines (Figure 4-3 haut). En RMN du solide, ceci est caractéristique de la présence d'une fraction dite mobile, présentant un comportement proche d'un liquide. Dans ce cas particulier, ces signaux fins peuvent être reliés à la présence des acides gras libres. En effet, des signaux similaires à ceux observés lors de l'analyse des acides gras libres par RMN liquide  $^1\text{H}$  sont observés. Ces spectres présentent de multiples signaux entre 14 et 32 ppm, correspondant à la présence de chaînes alkyles. Les deux signaux entre 170 et 180 ppm correspondent à la résonance des carbonyles des esters et des acides carboxyliques respectivement. Le signal à 130 ppm correspond à la résonance des protons des doubles liaisons. Ce signal est nettement plus intense sur le spectre issu du traitement avec HCl 10% que sur celui issu du traitement avec HCl 37%. Ceci corrobore l'hypothèse selon laquelle les doubles liaisons subiraient une addition d'eau ou d'HCl. Enfin, le signal large et écrasé entre 100 et 150 ppm, pourrait également être attribué à la présence d'insaturations.

Après extraction des acides gras par Soxhlet, les spectres des fractions non extractibles sont nettement moins bien résolus que précédemment, indiquant la présence d'un solide moyennement organisé, cohérente avec une phase polymérique présentant une masse moléculaire plus élevée. Néanmoins, l'aspect général du spectre est assez similaire à ceux obtenus en présence des acides gras libres : la résonance des  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  aliphatiques est observée entre 14 et 32 ppm et la résonance des  $\text{CH}=\text{CH}$  est observée à 130 ppm. La disparition du signal à 180 ppm indique que tous les acides gras ont bien été extraits. Seul subsiste le signal à 172 ppm, correspondant à la résonance des carbonyles des esters. Ces analyses tendent donc à prouver que la fraction insoluble est de nature polyester, qui pourrait être issue de la condensation d'acides gras. De plus, un signal apparaît vers 58 ppm. Ce signal, qui est d'autant plus important que la concentration en acide est élevée, peut être attribué aux carbones en  $\alpha$  de fonctions amines. Ces amines pourraient provenir de mélanoides, qui se forment en milieu acide, comme indiqué dans le chapitre 2.

#### *b- Fraction hydrophile*

La caractérisation de la fraction soluble en milieu acide s'est avérée compliquée. En effet, l'analyse par RMN liquide du proton ne s'est pas avérée concluante (obtention d'un seul signal très large entre 0 et 10 ppm). Après lyophilisation des fractions solubles en milieu acide, celles-ci ont donc été caractérisées par spectroscopie infrarouge (Figure 4-4). Les

spectres obtenus indiquent la présence de nombreuses fonctions hydroxyles, *via* la présence d'une large bande vers  $3400\text{ cm}^{-1}$ . La présence de C=O (bandes à  $1730\text{ cm}^{-1}$  et  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) est également à remarquer. Ces bandes peuvent laisser supposer la présence de monosaccharides ou d'oligosaccharides, ainsi que d'acides uroniques. En effet, les spectres infrarouge de ces derniers (dont un exemple est présenté Figure 4-5) se rapprochent très fortement des spectres obtenus à partir des fractions hydrosolubles. La bande importante à  $1100\text{ cm}^{-1}$  correspond à la bande caractéristique de la présence de fonctions éthers, liées aux liaisons osidiques. Elle est absente du spectre expérimental, puisque ces liaisons ont été hydrolysées, les molécules se retrouvant donc sous forme de monosaccharides.

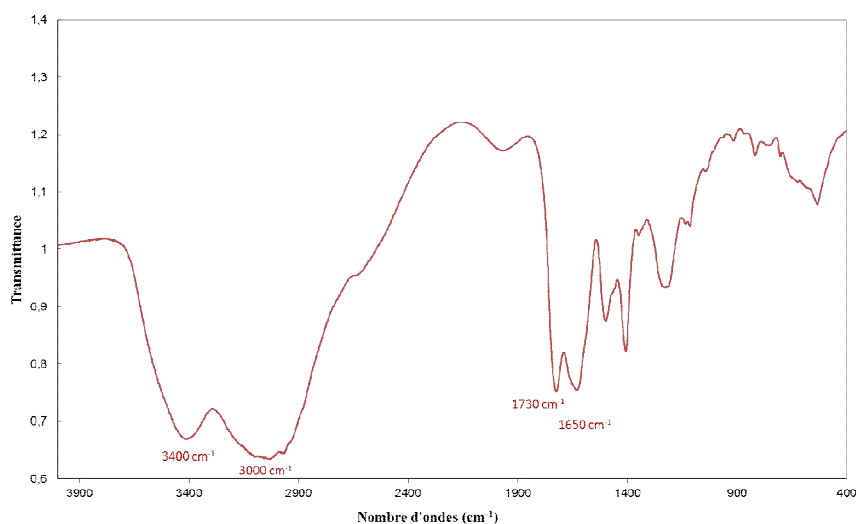


Figure 4-4 : Spectre infrarouge de la fraction soluble dans HCl 10%, 48h

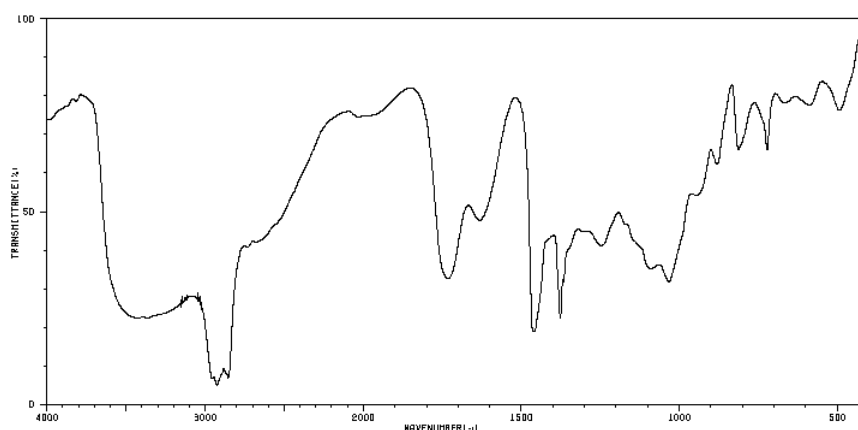


Figure 4-5 : Spectre infrarouge de l'acide alginique (polymère formé d'acide mannuronique et d'acide guluronique) [6]

Le traitement d'analyse des monosaccharides présenté dans le chapitre 2 a donc été appliqué à ces fractions (acétylation des fonctions hydroxyles et estérification des éventuelles fonctions acide carboxylique). Cependant, aucun monosaccharide, ni acide uronique n'a été détecté. Les monosaccharides, en milieu acide, se sont donc dégradés, ou ont subi des réarrangements.

Des caractérisations par RMN du solide ont également été menées sur les phases aqueuses lyophilisées (Figure 4-6). Quelle que soit la concentration en acide utilisée, les deux spectres présentent la même allure générale, et peuvent être séparés en quatre zones :

- résonance des CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> entre 16 et 35 ppm ;
- résonance des carbones en α d'amines et/ou d'éthers entre 45 et 65 ppm ;
- résonance des doubles liaisons carbone/carbone entre 100 et 130 ppm ;
- résonance des carbonyles vers 170 ppm.

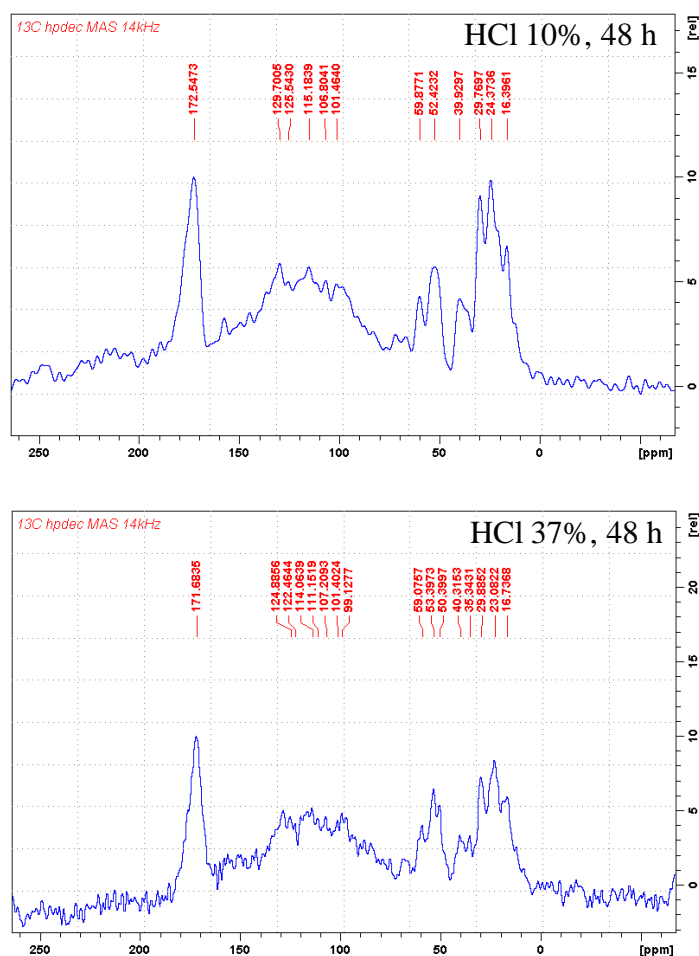


Figure 4-6 : Spectres RMN MAS HPDEC des fractions solubles en milieu acide (48h, HCl 10% en haut ; HCl 37% en bas)

Ces analyses RMN solides sont en accord avec les produits de dégradation des sucres en milieu acide, connus dans la littérature (Figure 4-7), et étant majoritairement composés d'acides (acétique, glycolique, formique et lévulinique), ainsi que de dérivés du furane (furfural, 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde). [7]

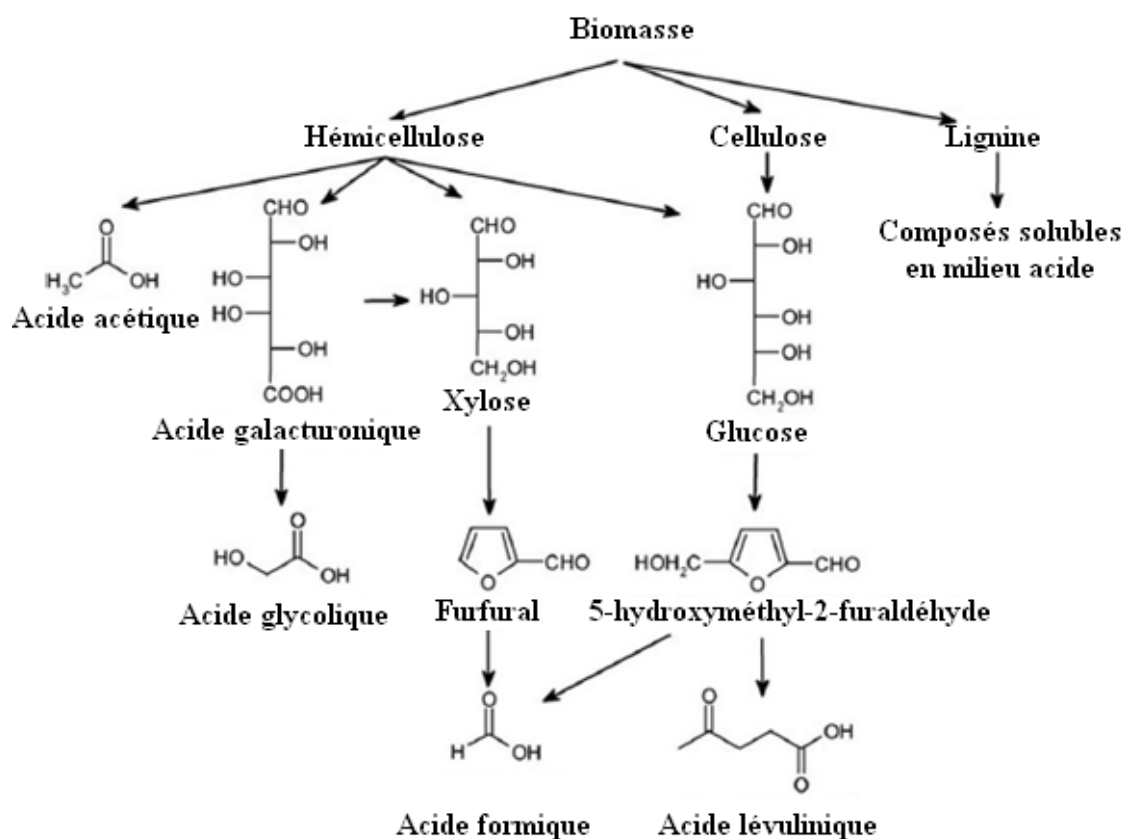


Figure 4-7 : Chemin de dégradation des polysaccharides en milieu acide (adapté de [7])

### 3) Conclusions

L'application d'un traitement acide aux microalgues semble être un moyen simple de fractionner la biomasse en une fraction hydrophile et hydrophobe. La fraction hydrophobe, enrichie en algaénans, et appauvrie en azote et oxygène, ne présente pas de caractère thermofusible, et ne peut donc pas être valorisée en tant que telle comme matériau viscoélastique. L'application d'un traitement hydrothermal pourrait permettre de liquéfier la globalité de cette fraction, qui pourrait alors avoir de meilleures propriétés de stabilité (vis-à-vis de phénomènes tels que les oxydations par exemple) que les huiles de liquéfaction obtenues sans prétraitement acide. Mais pour que ce procédé puisse être envisageable à une échelle industrielle, la fraction soluble en milieu acide doit aussi être valorisée. Pour cela, la

liquéfaction hydrothermale, connue pour désoxygéner les matières premières par décarboxylation du fait des hautes températures mises en oeuvre, pourrait également représenter une solution intéressante.

### III – Influence du prétraitement acide en liquéfaction hydrothermale

Le comportement des deux fractions isolées par traitement acide a été étudié. Dans le cas de la fraction hydrophobe, la liquéfaction hydrothermale a pour objectif de liquéfier une fraction non thermofusible. Dans le cas de la fraction hydrophile, ce procédé a pour but principal de désoxygéner la matière première afin de la rendre hydrophobe.

#### 1) Fraction hydrophobe

Le processus de liquéfaction hydrothermale a été appliqué à la phase insoluble en milieu acide, débarrassée ou non des acides gras. Toutes les fractions testées ont été obtenues à partir du lot 6 de microalgues. L'influence de la température a été étudiée (entre 275 °C et 340 °C, température générant la pression autogène maximale supportée par l'appareillage), ainsi que celle du temps de réaction.

Des essais ont été menés sur la fraction insoluble en milieu acide, contenant toujours les acides gras (Tableau 4-IV). Les rendements en huile sont calculés selon les formules suivantes :

$$Rdt\ 1 = 100 \times \frac{m_{huile}}{m_{insoluble\ en\ milieu\ acide}} \quad (9)$$

$$Rdt\ 2 = 100 \times \frac{m_{huile}}{m_{microalgues}} \quad (10)$$

L'analyse par RMN <sup>1</sup>H des huiles obtenues dans des conditions douces (275 °C, 30 minutes) a montré que seuls des acides gras libres (partiellement hydrochlorés) étaient extraits. De plus, l'extraction de ces acides gras ne semble pas quantitative, puisque les rendements en bio-huile sont inférieurs à ceux obtenus par extraction Soxhlet, notamment pour la fraction isolée à partir d'HCl 37%. En effet, celle-ci étant plus condensée que la

**[TRAITEMENT ACIDE DE LA BIOMASSE]**

fraction isolée à partir d'HCl 10%, les acides gras emprisonnés dans sa structure son plus difficilement accessibles par l'eau subcritique.

**Tableau 4-IV : Récapitulatif des conditions de liquéfaction testées sur la fraction insoluble en milieu acide (- : non déterminé)**

<b>Essai</b>	<b>Fraction étudiée</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (min)</b>	<b>P<sub>i</sub> (MPa)</b>	<b>P<sub>max</sub> (MPa)</b>	<b>Rdt 1 huile (%)</b>	<b>Rdt 2 huile (%)</b>
1	Insoluble HCl 10%, 48 h	275	30	10	60	50,4	14,2
2	Insoluble HCl 37%, 48 h	275	30	10	61	20,1	6,8

Des expériences similaires ont été menées sur les mêmes fractions, desquelles les acides gras ont été extraits par Soxhlet (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 2 : 1, v/v, Tableau 4-V).

**Tableau 4-V : Récapitulatif des conditions de liquéfaction testées sur la fraction insoluble en milieu acide débarrassée de ses acides gras (- : non déterminé)**

<b>Essai</b>	<b>Fraction étudiée</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (min)</b>	<b>P<sub>i</sub> (MPa)</b>	<b>P<sub>max</sub> (MPa)</b>	<b>Rdt 1 huile (%)</b>	<b>Rdt 2 huile (%)</b>	<b>Rdt Soxhlet (%)</b>
1	Insoluble HCl 37%, 48 h	300	30	20	110	11,7	3,8	16,8
2	Insoluble HCl 10%, 48 h	340	35	Purge N <sub>2</sub>	152	22,5	6,9	16,2
3	Insoluble HCl 10%, 48 h	320	50	Purge N <sub>2</sub>	-	19,9	6,1	16,2
4	Insoluble HCl 10%, 48 h	340	30	Purge N <sub>2</sub>	128	22,1	6,8	16,2
5	Insoluble HCl 10%, 48 h	320	30	Purge N <sub>2</sub>	119	13,4	3,7	15,8
6	Insoluble HCl 10%, 48 h	330	30	Purge N <sub>2</sub>	142	19,6	5,4	15,8

Des rendements modestes en bio-huile ont été obtenus, de l'ordre de 22% au maximum. Ces rendements ont été obtenus pour des températures réactionnelles élevées (340 °C). Les rendements les plus faibles, de l'ordre de 10%, ont été obtenus pour les températures les plus faibles testées (300 °C). Le facteur température apparait donc être celui influençant le plus la

liquéfaction des fractions enrichies en algaenans. Des rendements d'autant plus importants sont obtenus que cette température est élevée. Le temps réactionnel, quant à lui, semble également avoir une influence sur les rendements en bio-huile. En effet, pour deux expériences réalisées à 320 °C, un gain de rendement de 6% peut-être obtenu en augmentant le temps réactionnel de 20 minutes.

Ces résultats sont accord avec les données issues de la littérature. En effet, un processus similaire a déjà été appliqué sur des microalgues de type *Scenedesmus sp.* et *Botryococcus braunii*. [8] Une hydrolyse acide au reflux d'une solution aqueuse d'HCl 6N a été réalisée pendant 18 heures. Une caractérisation des différentes fractions par RMN du solide a permis aux auteurs de conclure à un enrichissement en algaenans de la fraction insoluble en milieu acide, à l'instar des résultats présentés dans le paragraphe précédent. Deux conditions de liquéfaction ont été testées :

- 260 °C, pendant 72 heures : un rendement modeste en huile de 8,5 % a été obtenu ;
- 360 °C, pendant 72 heures : un rendement légèrement plus élevé, mais toujours modeste, de 16,7 % a été obtenu.

En cumulant les rendements en huile obtenus par extraction Soxhlet des fractions insolubles en milieu acide avec ceux obtenus par liquéfaction hydrothermale des résidus non extractibles par Soxhlet, des rendements compris entre 19,5% (essai 5) et 23,1% (essai 2) sont obtenus. Ces rendement sont donc du même ordre de grandeur que les rendements obtenus par extraction Soxhlet sur la biomasse non traitée par une solution acide.

## 2) Fraction hydrophile

Afin de conférer des propriétés hydrophobes aux fractions solubles en milieu acide, celles-ci ont également été engagées dans des processus de liquéfaction hydrothermale, connus pour désoxygéner la matière engagée. Celles-ci ont d'abord été lyophilisées avant d'être placées dans l'enceinte de liquéfaction avec une quantité connue d'eau. Les divers résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4-VI.

Tableau 4-VI : Récapitulatif des conditions de liquéfaction testées sur la fraction soluble en milieu acide  
 (- : non déterminé ; \* : essais réalisés sur des masses inférieures à 500 mg)

Essai	Fraction étudiée	T (°C)	t (min)	P <sub>i</sub> (MPa)	P <sub>max</sub> (MPa)	P <sub>résid</sub> (MPa)	Rdt huile (%)
1	Soluble HCl 37% 48h	330	30	Purge N <sub>2</sub>	160	46	2,9
2	Soluble HCl 37% 48h	250	48 h	Purge N <sub>2</sub>	130	40	0,9
3	Soluble HCl 10% 48h	300	0	Purge N <sub>2</sub>	100	13	6,4
4	Soluble HCl 37% 48h	300	60	Air	90	< 5	14,0*
5	Soluble HCl 37% 48h	270	30	Purge N <sub>2</sub>	-	< 5	14,0*

Ces résultats montrent que la liquéfaction hydrothermale ne semble pas être la voie adéquate pour valoriser la fraction aqueuse issue des traitements acides. En effet, de faibles rendements de conversion en bio-huile sont obtenus (généralement inférieurs à 10%, sauf pour les expériences réalisées sur de petites prises d'échantillon). La création de gaz, aux dépens de la création de bio-huile, semble favorisée, comme l'indiquent les pressions résiduelles élevées pouvant être obtenues (entre 40 et 50 MPa). De plus, une grande fraction des produits de liquéfaction (environ 75% en masse) sont isolés en phase aqueuse.

### 3) Conclusions

La valorisation par liquéfaction hydrothermale de la biomasse fractionnée après un traitement acide a été étudiée. Il apparaît que des conditions drastiques de température et de pression semblent être nécessaires pour liquéfier la fraction insoluble en milieu acide. Dans les conditions pouvant être testées ( $T \leq 350$  °C ;  $P \leq 180$  MPa), de faibles rendements de conversion en bio-huile ont été obtenus (23% de la matière engagée en liquéfaction hydrothermale, soit environ 7% de rendement par rapport à la quantité de microalgues engagées dans le traitement acide). Ainsi, à partir d'une fraction insoluble en milieu acide, et en cumulant une extraction Soxhlet et une liquéfaction hydrothermale, un rendement maximal de 23% peut être obtenu, rendement similaire au rendement d'extraction Soxhlet de la biomasse non prétraitée. Des rendements nettement meilleurs sont donc obtenus par

liquéfaction hydrothermale des microalgues n'ayant pas subi de prétraitement. De même, la conversion en bio-huile de la fraction soluble en milieu acide semble difficile, celle-ci ayant plutôt tendance à subir à une gazéification, ou à se resolubiliser en milieu aqueux, plutôt qu'à se déshydrater pour former une phase hydrophobe.

## IV – Conclusions

Initialement, le traitement acide appliqué aux microalgues avait pour but de fragiliser les parois cellulaires, afin de faciliter l'extraction lipidique. D'une part, cela aurait permis d'augmenter les rendements d'extraction, et d'autre part, de moduler les propriétés rhéologiques des phases extraites, grâce à la présence d'espèces chimiques nouvelles.

Néanmoins, il s'est avéré que les conditions testées (HCl 10% ou 37%, durée de réaction de 48 h ou 96 h) n'ont pas permis d'augmenter les rendements d'extraction des lipides. Au contraire, les rendements se sont avérés être abaissés par rapport à une extraction Soxhlet classique sans traitement acide. En effet, les algaenans extraits par Soxhlet sur la biomasse non traitée sont absents des huiles extraites par Soxhlet sur la biomasse traitée. Ainsi, ces huiles montrent un comportement trop peu visqueux pour pouvoir être utilisées en tant que substituant à un liant routier bitumineux.

De plus, bien que cette fraction soit composée majoritairement de composés lipidiques, elle ne présente aucun caractère thermofusible, empêchant son utilisation directe en tant que liant routier.

Si la voie Soxhlet ne semble donc pas être adaptée à la valorisation de la fraction insoluble en milieu acide, la liquéfaction hydrothermale offre un potentiel plus important. En effet, elle aurait pu permettre de liquéfier la fraction insoluble en milieu acide, lui conférant des propriétés viscoélastiques permettant de la mettre en œuvre en tant que liant routier. Cependant, cette approche ne s'est pas avérée concluante, du fait des limites techniques imposées par l'appareillage (température inférieure à 350 °C et pression inférieure à 180 MPa). L'application de conditions plus sévères pourrait éventuellement permettre de liquéfier cette fraction.

De plus, il est important de noter que les phases aqueuses issues des liquéfactions hydrothermales des fractions insolubles en milieu acide sont incolores et ne contiennent aucun

produit de liquéfaction. En trouvant une voie de valorisation des fractions solubles en milieu acide, il pourrait donc potentiellement s'agir d'un processus plus « vert » que la liquéfaction hydrothermale appliquée directement à la biomasse non prétraitée.

Enfin, concernant les fractions solubles en milieu acide, formées de molécules dérivant de monosaccharides, leur liquéfaction en conditions subcritiques ne s'est également pas avérée concluante. En effet, au lieu d'observer une déshydratation pour former une fraction hydrophobe, celles-ci ont eu tendance à se resolubiliser en milieu aqueux, ou à subir une gazéification.

## Bibliographie

- [1] R. Harun, M. K. Danquah. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry* **2011**, *46*, 304 – 309.
- [2] J. Miranda, P. Passarinho, L. Gouveia. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology* **2012**, *104*, 342–348.
- [3] S.-H. Ho, S.-W. Huang, C.-Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, J.-S. Chang. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology* **2013**, *135*, 191 – 198.
- [4] M. M. R. Talukder, P. Das, J. C. Wu. Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid. *Biochemical Engineering Journal* **2012**, *68*, 109 – 113.
- [5] Z. Dubinsky, S. Aaronson. Increase of lipid yields from some algae by acid extraction. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 51 – 52.
- [6] AIST, *EnglishSpectral Database for Organic Compounds*, **2013**. [http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng).
- [7] B. Girisuta, L. Janssen, H. Heeres. Green Chemicals: A kinetic study on the conversion of glucose to levulinic acid. *Chemical Engineering Research and Design* **2006**, *84*, 339 – 349, International Conference on Sustainable (Bio)Chemical Process Technology.
- [8] S. E. Hatcher, P. G., *Process for the selective production of hydrocarbon based fuels from algae utilizing water at subcritical conditions*, WO2011163111 (A2), **2011**.





# **Chapitre 5**

## **Partie expérimentale**



## I – Généralités

Tous les solvants ont été utilisés sans purification préalable.

Les purifications par chromatographies ont été réalisées sur gel de silice (Kieselgel-60 silica gel, 230-400 mesh, Merck). Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été réalisées sur feuilles d'aluminium (silice, 60 F<sub>254</sub>, Merck).

Les spectres RMN en solution ont été enregistrés sur :

- un spectromètre Avance 300 UltraShield – Bruker, équipé d'une sonde ATMA 1H/BB grad 5 mm, pour les spectres <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P ;
- un spectromètre Avance 400 – Bruker, équipé d'une sonde BBFO ATMA grad 5 mm, pour l'acquisition des spectres <sup>13</sup>C.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en prenant le signal du solvant comme pic de référence :

- CDCl<sub>3</sub> : 7,26 ppm (spectre <sup>1</sup>H) ; 77,16 ppm (spectre <sup>13</sup>C) ;
- D<sub>2</sub>O : 4,79 ppm (spectre <sup>1</sup>H).

La multiplicité des signaux est indiquée à l'aide des abréviations suivantes : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet, m pour multiplet.

Les spectres RMN solide ont été enregistrés sur un spectromètre Avance 850 – Bruker, basé au laboratoire CEMHTI à Orléans, en collaboration avec le Dr. Franck Fayon :

- un rotor de 4 mm a été utilisé pour l'acquisition des spectres <sup>13</sup>C, avec une vitesse de rotation de 14 kHz ;
- un rotor de 3,2 mm a été utilisé pour l'acquisition des spectres <sup>31</sup>P, avec une vitesse de rotation de 20 kHz.

Tous les spectres RMN ont été analysés avec le logiciel TopSpin.

## II – Techniques de caractérisation

### 1) Chromatographie d'exclusion stérique

Les huiles de liquéfaction sont analysées sur un appareillage Waters, équipé d'une colonne Waters ultra styragel 50A, pour laquelle les particules possèdent une taille de 5  $\mu\text{m}$ . Les huiles sont mises en solution dans le THF à une concentration de 0,2%. 10  $\mu\text{L}$  de solution sont injectés, avec un débit de solvant de 1 mL/min. La détection est réalisée par UV à 230 nm.

Le volume d'exclusion est mesuré par injection d'un étalon polystyrène de masse moléculaire 195 000 Da. Le volume de perméation totale est mesuré par injection d'acétone.

### 2) Calorimétrie différentielle à balayage

Les analyses par calorimétrie différentielle à balayage sont réalisées sur un appareil Netzsch DSC 204. Environ 20 mg de l'échantillon à analyser sont placés dans une capsule en aluminium, elle-même placée dans un four. Une capsule vide, située dans le même four, sert de référence. Pour chaque cycle de température appliqué, les différences de flux de chaleur entre la référence et l'échantillon sont mesurées, permettant ainsi de déterminer les transitions (fusion, cristallisation, transition vitreuse, réticulation d'un polymère...).

Les capsules en aluminium ne résistant pas en pression, le suivi par DSC d'expériences de liquéfaction hydrothermale est réalisé dans des capsules spécifiquement conçues pour résister à des pressions élevées (achetées à la société Swissi), et présentant les caractéristiques suivantes :

- hauteur : 5,9 mm ;
- diamètre : 6,0 mm ;
- pression maximale de travail : 217 MPa ;
- température maximale de travail : 400 °C ;
- volume de travail : 20  $\mu\text{L}$

Les expériences sont réalisées à partir de 3,0 mg de microalgues et de 12  $\mu\text{L}$  d'eau. La rampe de température appliquée a été la suivante :

- chauffage de 25 °C à 300 °C à 2 °C/min ;
- maintien de la température à 300 °C pendant 1 heure ;
- refroidissement de l'enceinte ;
- chauffage de 25 °C à 300 °C à 2 °C/min ;
- maintien de la température à 300 °C pendant 1 heure.

Les courbes DSC ont été analysées avec le logiciel TA Analysis NETZCH DSC 204.

### 3) Spectroscopie infrarouge

Les caractérisations infrarouges sont menées sur un appareillage Bruker Vector 22. Les spectres ont été acquis entre 400  $\text{cm}^{-1}$  et 4000  $\text{cm}^{-1}$  par pas de 1  $\text{cm}^{-1}$ , et les échantillons sont préparés suivant différentes techniques selon leur état physique :

- les huiles sont analysées en solution dans  $\text{CCl}_4$  ou en film mince sur fenêtre de KBr ;
- les échantillons solides sont analysés en solution dans  $\text{CCl}_4$  si leur solubilité le permettait, ou sous forme de pastille solide dans KBr.

Les spectres infrarouge ont été analysés à l'aide du logiciel Opus.

### 4) Analyse élémentaire

Les caractérisations par analyse élémentaire sont réalisées sur un appareil FLASH 2000 Series CHNS/O Analyzers – Thermo Scientific, permettant de quantifier simultanément le carbone, l'hydrogène, l'azote et le soufre. Le principe de cette analyse est basé sur la combustion totale de l'échantillon, à 1050 °C, sous une atmosphère d' $\text{O}_2$ . Le carbone, l'hydrogène, l'azote et le soufre sont alors respectivement oxydés sous forme de dioxyde de carbone, d'eau, de dioxyde d'azote et de dioxyde de soufre. Ces différents gaz, après séparation sur colonne chromatographique et détection par conductibilité thermique, peuvent alors être quantifiés, permettant ainsi de déterminer les teneurs massiques de chaque élément au sein de l'échantillon.

## 5) RMN

### *a- En milieu liquide*

La RMN, qu'elle soit appliquée à l'état liquide ou solide, est une technique basée sur l'interaction entre les moments magnétiques des noyaux ayant un spin nucléaire  $I$  non nul et un champ magnétique.

En l'absence de champ magnétique, les orientations des moments magnétiques sont aléatoires. En présence d'un champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$ , les moments magnétiques adoptent des orientations préférentielles, dites parallèles ou antiparallèles. La différence de population entre ces deux états engendre l'apparition d'une aimantation macroscopique  $\vec{M}_0$ . Le changement d'orientation des moments magnétiques se fait selon un mouvement de précession autour du champ magnétique  $\vec{B}_0$ , à une vitesse  $\omega_0$ .

La mesure du signal RMN consiste à émettre un champ magnétique  $\vec{B}_1$  à la fréquence  $\omega_0$ , afin de basculer l'aimantation macroscopique, et d'observer son signal de résonance généré par le retour à l'équilibre. Celui-ci est acquis sous forme d'un Free Induction Decay (FID) et la transformée de Fourier de ce signal permet de générer un spectre RMN. Chaque signal du spectre est alors caractérisé par :

- son intensité : dans des conditions d'acquisition quantitative, elle dépend du nombre de noyaux résonants une fréquence donnée ;
- son déplacement chimique  $\delta$  (exprimé en ppm) : il est calculé à partir de la fréquence  $\nu$  obtenue après transformée de Fourier du FID, dépendante du champ  $\vec{B}_0$ , et de la fréquence d'un composé de référence (généralement, le tétraméthylsilane en RMN du proton). Ce déplacement chimique, indépendant champ  $\vec{B}_0$ , est fonction de l'environnement chimique du noyau et plus spécifiquement de la constante d'écrantage  $\sigma$  générée par le nuage électronique des noyaux à proximité ;

$$\delta = 10^6 \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}$$

$$\nu = \gamma(1 - \sigma)B_0$$

Avec  $\gamma$  : rapport gyromagnétique de l'élément étudié

- sa multiplicité : elle dépend du nombre d'atomes avec lesquels le noyau est couplé.

*b- En milieu solide*

La principale différence entre la RMN en solution et la RMN du solide repose sur la liberté de mouvement des molécules présentes au sein de l'échantillon. En milieu liquide, l'agitation permanente des molécules (mouvement brownien) est telle qu'un signal moyen est observé, sous forme de raies fines. Le spectre RMN d'une poudre, lui, reflète les signaux correspondant à toutes les orientations possibles des molécules vis-à-vis du champ magnétique. Ceci engendre un élargissement des raies en RMN du solide statique (Figure 5-1) : c'est l'anisotropie de déplacement chimique (CSA pour « Chemical-Shift Anisotropy »).

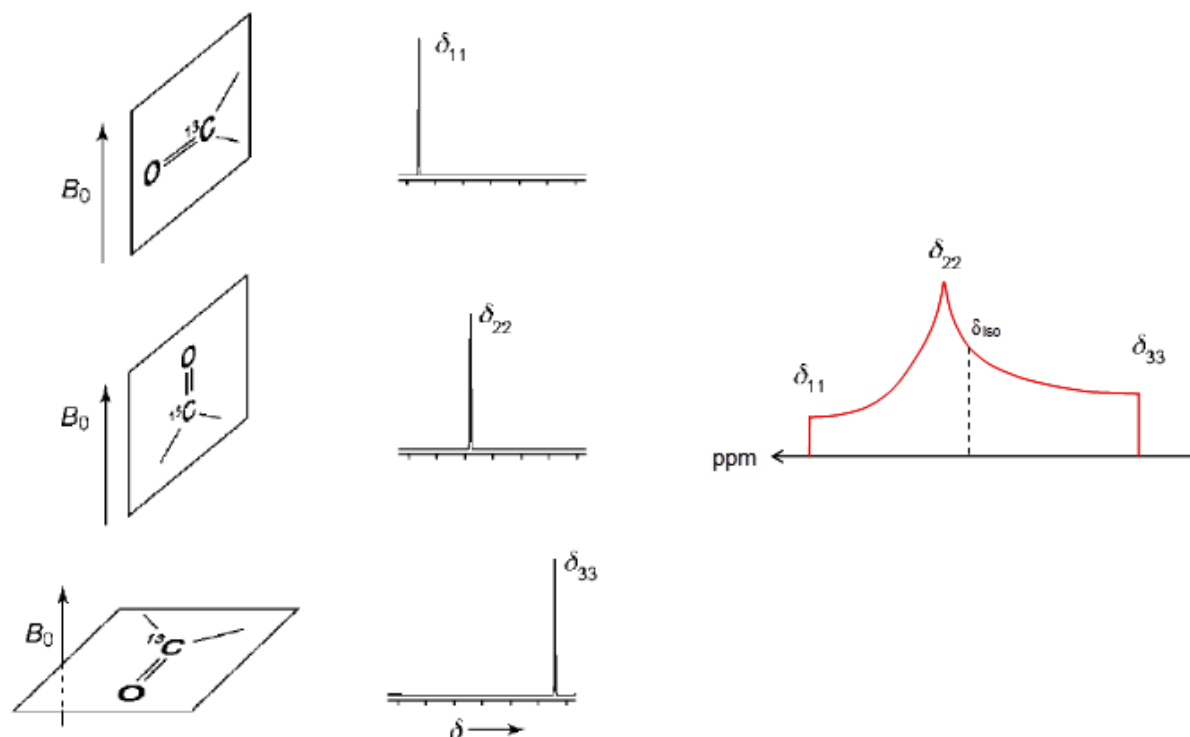


Figure 5-1 : A gauche : Représentation schématique de la dépendance du déplacement chimique à l'orientation des cristallites (adapté de [1]) ; à droite : forme des raies en RMN solide statique

Afin de diminuer cet élargissement, la technique de rotation à l'angle magique (MAS pour « Magic Angle Spinning) a été développée. Elle permet de simuler, sur un échantillon solide, le mouvement aléatoire des molécules en solution. Pour cela, l'échantillon est placé en rotation rapide (plusieurs kHz à dizaines de kHz) autour d'un axe orienté à  $54,7^\circ$  (angle magique) par rapport au champ  $\vec{B}_0$  (Figure 5-2).

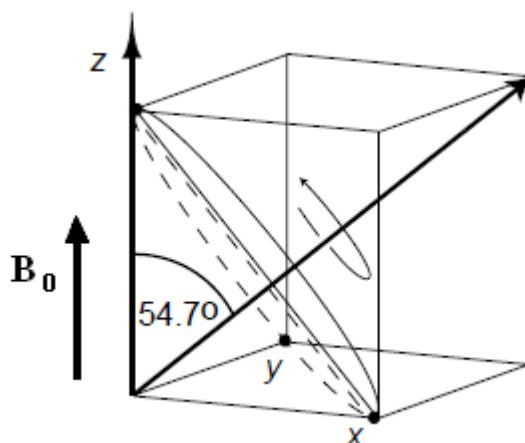


Figure 5-2 : Représentation schématique de la rotation à l'angle magique (adapté de [1])

Dans ces conditions, l'écrantage subit par la molécule est égal à l'écrantage isotrope que cette molécule subirait en solution, et son déplacement chimique est ainsi égal au déplacement chimique isotrope observé en solution, à savoir :

$$\delta_{iso} = \frac{\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}}{3}$$

En RMN MAS  $^{13}\text{C}$ , une séquence semble particulièrement intéressante : il s'agit de la polarisation croisée. En effet, le  $^{13}\text{C}$  est un atome ayant une faible abondance naturelle, un faible rapport gyromagnétique et des temps de relaxation élevés. Dans ces conditions, en RMN en solution, mais tout particulièrement en RMN du solide, il est difficile de concilier un rapport signal/bruit suffisant avec un temps d'analyse raisonnable. C'est pourquoi le transfert de polarisation d'un noyau fortement polarisé (e.g.  $^1\text{H}$ ) vers un noyau faiblement polarisé ( $^{13}\text{C}$ ) permet d'augmenter l'intensité des signaux liés au noyau faiblement polarisé d'un facteur égal au rapport de leur rapport gyromagnétique.

## 6) Rhéologie

Les caractérisations rhéologiques des huiles sont réalisées à l'aide d'un viscoanalyseur MetraviB Dynamic Mechanical Analyser 450 Newtons (DMA<sup>+</sup> 450). Une déformation sinusoïdale de type cisaillement annulaire est appliquée aux échantillons, pour des températures comprises entre 0 °C et 150 °C, et pour des fréquences de sollicitation comprises entre 1 Hz et 125 Hz (Figure 5-3). Le niveau de déformation est choisi afin de rester dans le domaine viscoélastique linéaire. Le module complexe est calculé à partir des signaux de déformation et de la contrainte résultante, elle-même de forme sinusoïdale.

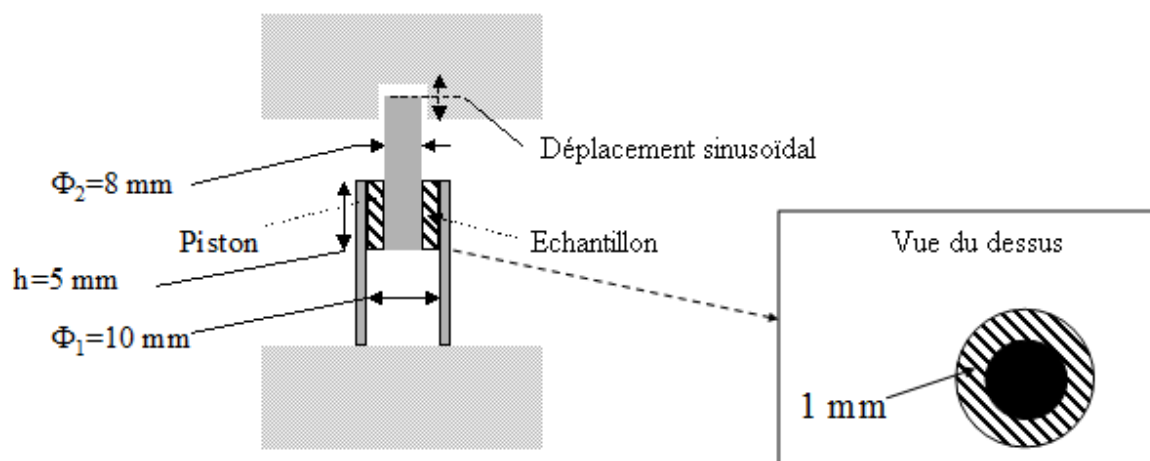


Figure 5-3 : Représentation schématique du MetraviB Dynamic Mechanical Analyser

Ce type de mesure donne accès aux valeurs de  $G$ .  $E$  est ensuite calculé à partir de  $G$ , à l'aide du coefficient de Poisson.

## II – Caractérisation des lipides

### 1) Isolement des lipides

Deux protocoles d'isolement des lipides par Soxhlet sont appliqués :

- le premier protocole consiste en une extraction par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2/1, v/v) d'une quantité de microalgues comprise entre 500 mg et 15 g ;

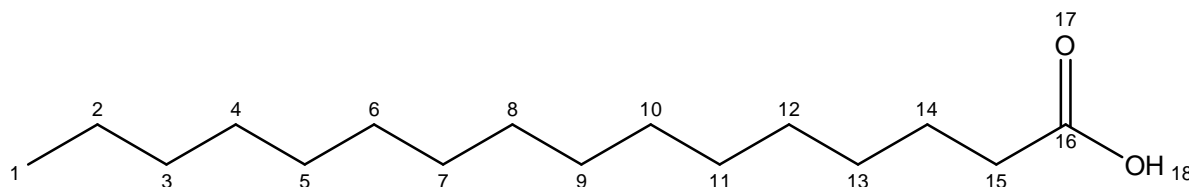
- le second protocole consiste en trois extractions successives par l'hexane, le  $\text{CHCl}_3$  puis le  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2/1, v/v) d'une quantité de microalgues comprise entre 500 mg et 15 g.

La masse désirée de microalgues est placée dans la cartouche d'extraction, et est extraite avec le ou les solvants choisis (90 mL de solvant lorsque le volume du Soxhlet est de 70 mL). L'extraction est stoppée lorsque le solvant présent dans la cartouche d'extraction est limpide. Les solvants d'extractions sont évaporés sous pression réduite, puis l'extrait est séché sous vide et une huile noire est obtenue. Le rendement d'extraction est défini comme la masse d'extrait rapportée à la masse de microalgues placées dans la cartouche d'extraction.

## 2) Analyses RMN

Les extraits Soxhlet sont analysés par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  dans le  $\text{CDCl}_3$  et leurs spectres ont été comparés avec des lipides de référence commerciaux :

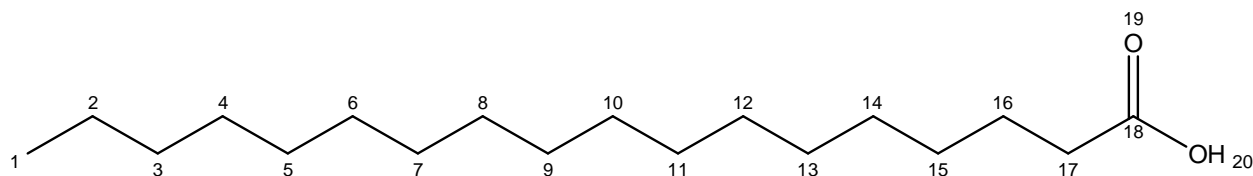
Acide palmitique  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$  (MW =256,4 g/mol)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,88 ppm (t, 3H, J = 6,8 Hz, H1); 1,25 ppm (m, 24H, H2 à H13); 1,63 ppm (q, 2H, J = 7,3 Hz, H14); 2,34 ppm (t, 2H, J = 7,4 Hz, H15).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) : 14,2 ppm (C1); 22,8 ppm (C2); 24,8 ppm (C14); 29,2 ppm (C13); 29,4 ppm (C12); 29,5 ppm (C4); 29,6 ppm (C11); 29,8 ppm (C5 à C10); 32,1 ppm (C3); 34,2 ppm (C14); 180,5 ppm (C15).

Acide stéarique  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$  (MW =284,5 g/mol)

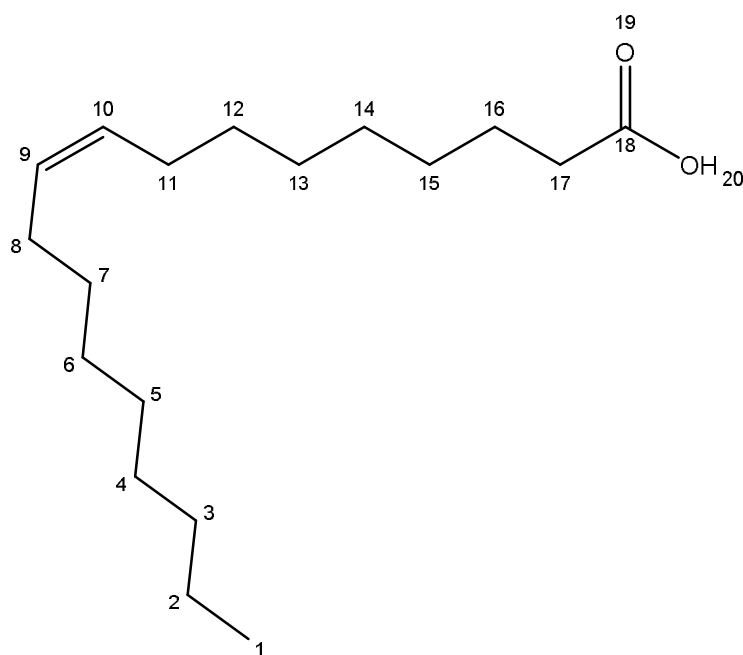


[PARTIE EXPERIMENTALE]

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,88 ppm (t, 3H,  $J = 6,7$  Hz, H1); 1,25 ppm (m, 28H, H2 à H15); 1,63 ppm (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H16); 2,35 ppm (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, H17).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) : 14,3 ppm (C1); 22,8 ppm (C2); 24,8 ppm (C16); 29,2 ppm (C15); 29,4 ppm (C14); 29,5 ppm (C); 29,6 ppm (C13); 29,8 ppm (C5 à C12); 32,1 ppm (C3); 34,2 ppm (C17); 180,0 ppm (C18).

Acide oléique  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$  (MW =282,5 g/mol)

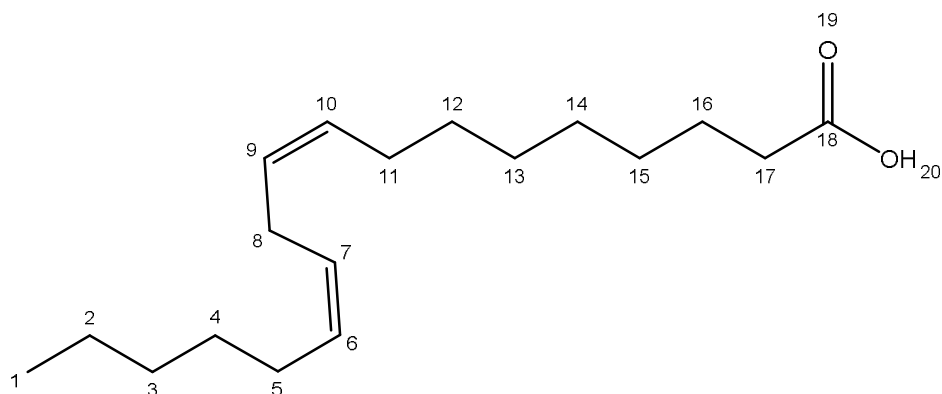


RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,88 ppm (t, 3H,  $J = 6,6$  Hz, H1); 1,28 ppm (m, 20H, H2 à H7 et H12 à H15); 1,61 ppm (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H16); 2,00 ppm (m, 4H, H8 et H11); 2,35 ppm (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, H17); 5,34 ppm (m, 2H, H9 et H10).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) : 14,3 ppm (C1); 22,8 ppm (C2); 24,8 ppm (C16); 27,3 ppm (C8, C11); 29,3 ppm (C13, C14, C15); 29,5 ppm (C4, C6); 29,7 ppm (C5); 29,8 ppm (C7, C12); 32,1 ppm (C3); 34,2 ppm (C17); 129,9 ppm (C10); 130,2 ppm (C9); 180,2 ppm (C18).

Acide linoléique  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$  (MW =280,4 g/mol)

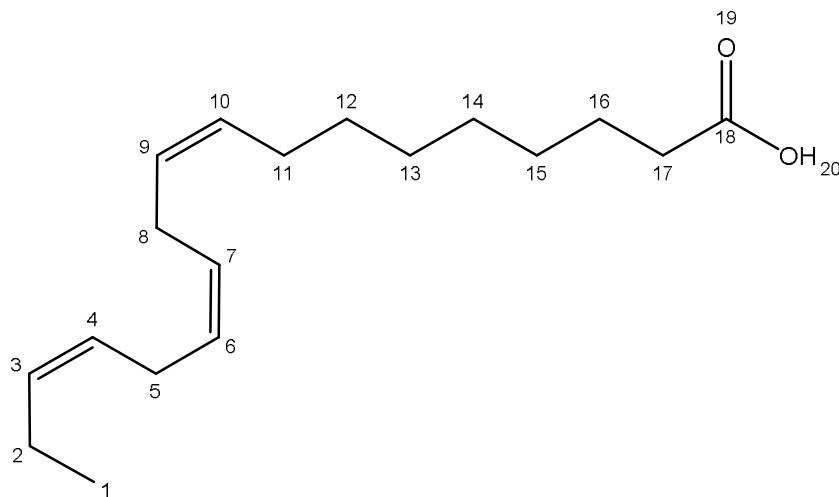
[PARTIE EXPERIMENTALE]



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,88 ppm (t, 3H,  $J = 6,7$  Hz, H1); 1,31 ppm (m, 14H, H2 à H5, H12 à H15); 1,63 ppm (q, 2H,  $J = 6,9$  Hz, H16); 2,04 ppm (m, 4H, H5, H11); 2,34 ppm (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H17); 2,77 ppm (t, 2H,  $J = 5,7$  Hz, H8); 5,36 ppm (m, 4H, H6, H7, H9, H10).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) : 14,2 ppm; 22,7 ppm; 24,8 ppm; 25,8 ppm; 27,3 ppm; 29,1 ppm; 29,2 ppm; 29,3 ppm; 29,5 ppm; 29,7 ppm; 31,6 ppm; 34,2 ppm; 128,0 ppm; 128,2 ppm; 130,1 ppm; 130,3 ppm; 180,6 ppm.

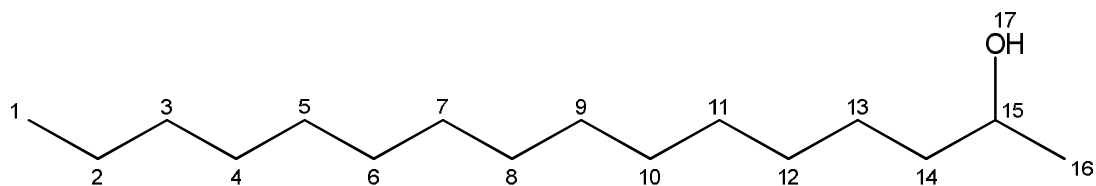
Acide linoléique  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$  (MW =278,4 g/mol)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,97 ppm (t, 3H,  $J = 7,5$  Hz, H1); 1,32 ppm (m, 8H, H12 à H15); 1,63 ppm (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H16); 2,06 ppm (m, 4H, H2, H11); 2,34 ppm (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H17); 2,80 ppm (t, 4H,  $J = 5,6$  Hz, H5, H8) ; 5,36 ppm (m, 6H, H3, H4, H6, H7, H9, H10).

2-héxadécanol  $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}$  (MW =242,4 g/mol)

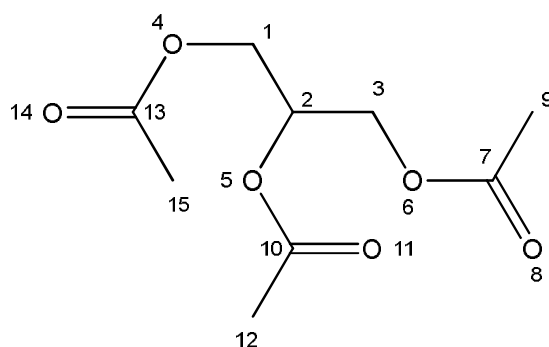
## [PARTIE EXPERIMENTALE]



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,88 ppm (t, 3H,  $J = 6,7$  Hz, H1); 1,18 ppm (d, 3H,  $J = 6,2$  Hz, H16); 1,25 ppm (m, 24H, H2 à H13); 1,42 ppm (m, 2H, H14); 1,56 ppm (s, 1H, H17); 3,78 ppm (m, 1H, H15).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) : 14,3 ppm (C1); 22,8 ppm (C2); 23,6 ppm (C16); 25,9 ppm (C13); 29,5 ppm (C4); 29,8 ppm (C5 à C12); 32,1 ppm (C3); 39,5 ppm (C14); 68,4 ppm (C15).

Triacétate de glycérol  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_6$  (MW =218,2 g/mol)



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) : 2,00 ppm (s, 6H, H9, H15); 2,04 ppm (s, 3H, H12); 4,12 ppm (dd, 2H,  $J = 12,1, 5,8$  Hz, H1); 4,25 ppm (dd, 2H,  $J = 12,0, 4,3$  Hz, H3); 5,20 ppm (tt, 1H,  $J = 5,8, 4,4$  Hz, H2).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) : 20,7 ppm (C9 et C15); 20,9 ppm (C12); 62,3 ppm (C1 et C3); 69,2 ppm (C2); 170,1 ppm (C10); 170,5 ppm (C7 et C13).

Extraits Soxhlet

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,87 ppm (t,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 0,98 ppm (t,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=}$ ); 1,26 ppm (m,  $(\text{CH}_2)_n$ ); 1,63 ppm (m,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ ); 2,01 ppm (m,  $-\text{CH}_2\text{-CH=}$ ); 2,32 ppm (t,  $J = 7,4$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{-C=O}$ ); 2,80 ppm (m,  $=\text{HC-CH}_2\text{-CH=}$ ); 5,34 ppm (m,  $-\text{HC=CH-}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) : 14,2 ppm; 14,4 ppm; 19,9 ppm; 20,7 ppm; 22,8 ppm; 24,6 ppm; 24,9

ppm; 25,2 ppm; 25,8 ppm; 27,4 ppm; 28,1 ppm; 29,3 ppm; 29,5 ppm; 29,7 ppm; 29,8 ppm; 32,1 ppm; 33,0 ppm; 34,0 ppm; 34,6 ppm; 36,8 ppm; 37,5 ppm; 39,5 ppm; 40,0 ppm; 128,4 ppm; 130,2 ppm; 177,6 ppm.

### Extraits Soxhlet estérifiés

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,87 ppm (t,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 0,98 ppm (t,  $J = 7,8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=}$ ); 1,26 ppm (m,  $(\text{CH}_2)_n$ ); 1,63 ppm (m,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ ); 2,01 ppm (m,  $-\text{CH}_2\text{-CH=}$ ); 2,32 ppm (t,  $J = 7,4$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{-C=O}$ ); 2,80 ppm (m,  $=\text{HC-CH}_2\text{-CH=}$ ); 3,66 ppm (s,  $-\text{COO-CH}_3$ ); 5,34 ppm (m,  $-\text{HC=CH-}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) : 14,2 ppm; 14,4 ppm; 19,9 ppm; 20,7 ppm; 22,8 ppm; 24,6 ppm; 24,9 ppm; 25,2 ppm; 25,8 ppm; 27,4 ppm; 28,1 ppm; 29,3 ppm; 29,5 ppm; 29,7 ppm; 29,8 ppm; 32,1 ppm; 33,0 ppm; 34,0 ppm; 34,6 ppm; 36,8 ppm; 37,5 ppm; 39,5 ppm; 40,0 ppm; 51,4 ppm; 128,4 ppm; 130,2 ppm; 174,3 ppm.

### 3) Analyses infrarouge

Les spectres infrarouges des extraits Soxhlet et d'acides gras de référence présentent les caractéristiques suivantes :

#### Acide palmitique $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (MW =256,4 g/mol)

IR : 2958  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C-H) dans  $\text{CH}_2$ ) ; 2928  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C-H) dans  $\text{CH}_3$ ) ; 2855  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_s$  (C-H) dans  $\text{CH}_2$ ) ; 1710  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C=O)) ; 1467  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$ (OH) dans le plan associé par liaisons H) ; 1416  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_a$  ( $\text{CH}_3$ )) ; 1295  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  (C-O)) ; 948  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$ (OH) hors du plan associé par liaisons H).

#### Acide oléique $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (MW =282,5 g/mol)

IR : 3007  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C-H) dans  $\text{CH}_2$ ) ; 2929  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C-H) dans  $\text{CH}_3$ ) ; 2856  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_s$  (C-H) dans  $\text{CH}_2$ ) ; 1712  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C=O)) ; 1466  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$ (OH) dans le plan associé par liaisons H) ; 1414  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_a$  ( $\text{CH}_3$ )) ; 1288  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  (C-O)) ; 948  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$ (OH) hors du plan associé par liaisons H).

#### Extraits Soxhlet

IR : 3014  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C-H) dans  $\text{CH}_3$ ) ; 2959  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C-H) dans  $\text{CH}_2$ ) ; 2929  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_s$  (C-H) dans  $\text{CH}_3$ ) ; 2856  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_s$  (C-H) dans  $\text{CH}_2$ ) ; 1711  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_a$  (C=O)) ; 1465  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$ (OH) dans le plan associé par liaisons H) ; 1260  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  (C-O)) ; 1105  $\text{cm}^{-1}$  ; 1023  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4) Analyses GC-FID

##### *a- Conversion des acides gras libres en esters méthyliques*

Les extraits Soxhlet sont placés dans un tube scellé et une solution méthanolique à 12% de  $\text{BF}_3$  est ajoutée. Le milieu est chauffé à 90 °C pendant 24 h. Après retour à température ambiante, les esters méthyliques d'acides gras sont extraits par de l'hexane, puis la phase organique est lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée, évaporée sous pression réduite, puis séchée sous vide. Une huile jaune est obtenue, avec un rendement de 67,6%.

##### *b- Conditions chromatographiques*

Les esters méthyliques d'acides gras sont séparés sur une colonne capillaire SGE (70% cyanopropyl) possédant les caractéristiques suivantes :

- longueur : 30 m
- diamètre interne : 320  $\mu\text{m}$
- épaisseur de phase stationnaire : 0,25  $\mu\text{m}$
- température maximale d'utilisation : 250 °C
- débit d' $\text{H}_2$  : 1,6 mL/min

Les conditions appliquées à l'injecteur sont les suivantes :

- température : 250 °C
- ratio de split : 50 : 1
- débit d' $\text{H}_2$  : 86,7 mL

Le gradient de température permettant une séparation optimale des composés de référence est le suivant :

- 3 minutes à 120 °C

- montée à 220 °C à 8 °C/min puis 220 °C pendant 5 minutes
- montée à 250 °C à 15 °C/min puis 250 °C pendant 17,5 minutes

Les conditions appliquées au détecteur à ionisation de flamme sont les suivantes :

- température : 270 °C
- débit d'H<sub>2</sub> : 40 mL/min
- débit d'air : 400 mL/min
- gaz make-up : N<sub>2</sub>

Avant injection, les esters méthyliques d'acides gras sont repris dans de l'isooctane, puis filtrés sur un filtre de 0,45 µm de porosité. Leur identification est réalisée par comparaison des temps de rétention avec ceux des composés de référence.

### *c- Analyse quantitative*

La chromatographie en phase gazeuse permet également de réaliser le dosage des acides gras. La première étape consiste à réaliser une courbe de calibration, afin de calculer le facteur de réponse du détecteur et de vérifier la linéarité de la plage de concentration choisie. A partir d'une solution mère à exactement 1 mg/mL de chacun des cinq acides gras à doser, trois dilutions à 0,15 mg/mL, 0,10 mg/mL et 0,05 mg/mL en esters méthyliques d'acides gras ont été préparées, permettant d'avoir accès à une droite d'étalonnage en trois points pour chaque acide à doser. Pour chacune de ces solutions, la concentration en étalon interne est d'exactly 1 mg/mL. La méthode de calcul des facteurs de réponse des acides gras est la suivante :

$$m_i = K_i A_i$$

$$m_e = K_e A_e$$

$$K_{i/e} = \frac{K_i}{K_e}$$

Avec  $m_i$  et  $m_e$  : masse de l'analyte et masse de l'étalon interne respectivement

$K_i$  et  $K_e$  : coefficient de réponse de l'analyte et coefficient de réponse de l'étalon interne respectivement

$A_i$  et  $A_e$  : aire du pic de l'analyte et aire du pic de l'étalon interne respectivement

$K_{i/e}$  : coefficient de réponse relatif de l'analyte par rapport à l'étalon interne

Or, il y a proportionnalité entre les masses d'analyte et d'étalon interne dans le mélange et les aires mesurées :

$$\frac{m_i}{m_e} = \frac{K_i A_i}{K_e A_e}$$

D'où :

$$K_{i/e} = \frac{m_i A_e}{m_e A_i}$$

L'étape de quantification consiste par la suite à ajouter une quantité connue d'étalon interne ( $m'_e$ ) à une quantité connue du mélange à analyser, d'où le pourcentage massique d'acide gras  $x_i$  (%) :

$$x_i = 100 \times K_{i/e} \times \frac{m'_e A_i}{m A_e}$$

### III – Caractérisation des algaenans

#### 1) Isolement

##### *a- Protocoles*

Deux protocoles ont été appliqués pour isoler les algaenans à partir des microalgues :

- protocole 1 : les microalgues subissent tout d'abord une extraction Soxhlet par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2 : 1, v/v) afin d'extraire les lipides. 5 g de résidus non extractibles sont ensuite mis en présence de 100 mL d'une solution aqueuse d'HCl 6N, puis placés au reflux de cette solution pendant 18 h. Après filtration sur Büchner, le rétentat est placé au reflux d'une solution de KOH à 5% dans un mélange 2-méthoxyéthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (88 : 12, v/v) pendant 1 h. Une filtration sur Büchner permet d'isoler les algaenans comme étant le rétentat. [32]

- protocole 2 : les microalgues subissent tout d'abord une extraction Soxhlet par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2 : 1, v/v) afin d'extraire les lipides. 5 g de résidus non extractibles subissent ensuite trois lavages successifs au reflux d'une solution aqueuse de TFA pendant 18 h. Après filtration, le rétentat est mis en présence de 100 mL d'une solution aqueuse d'HCl 6N, puis placé au reflux de cette solution pendant 18 h. Après filtration sur Büchner, le rétentat est placé au reflux d'une solution de KOH à 5% dans un mélange 2-méthoxyéthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (88 : 12, v/v) pendant 1 h. Une filtration sur Büchner permet d'isoler les algaenans comme étant le rétentat. [25]

#### *b- Caractérisation infrarouge*

IR (Protocole 1) :  $3460\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{O-H})$  ou  $\nu(\text{N-H})$ ) ;  $2926\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s(\text{C-H})$  dans  $\text{CH}_3$ ) ;  $2854\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s(\text{C-H})$  dans  $\text{CH}_2$ ) ;  $1588\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s(\text{COO}^-)$ ) ;  $1467\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_a(\text{CH}_2)$ ) ;  $1386\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_a(\text{COO}^-)$ ).

IR (Protocole 2) :  $3460\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{O-H})$  ou  $\nu(\text{N-H})$ ) ;  $2926\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s(\text{C-H})$  dans  $\text{CH}_3$ ) ;  $2854\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s(\text{C-H})$  dans  $\text{CH}_2$ ) ;  $1710\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C=O})$ ) ;  $1636\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C=C})$ ) ;  $1466\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_a(\text{CH}_2)$ ) ;  $1388\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_a(\text{COO}^-)$ ) ;  $1106\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C-O})$ ) ;  $725\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}})_{n>4}$ ).

#### 2) Clivage par $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

Le protocole appliqué a été adapté d'une méthode de clivage des kérogènes. [42] 250 mg d'algaenans broyés sont placés en présence de 30 mL d'une solution de toluène/ $\text{Ac}_2\text{O}$  (2 : 1, v/v) et de 2 mL de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . Le milieu réactionnel est placé sous argon, et agité pendant 1 h à température ambiante. Après refroidissement du milieu réactionnel à  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 mL d'une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$  sont ajoutés. Après centrifugation (2 X 13 000 tr/min pendant 20 minutes), puis filtration sur Büchner, la phase organique est extraite par 2 X 20 mL d' $\text{Et}_2\text{O}$ . L'ensemble de ces étapes (de l'hydrolyse par  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  à l'extraction de la phase organique) est répété deux fois supplémentaires sur le résidu de la filtration sur Büchner. Les trois phases organiques ainsi isolées sont réunies, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre puis filtrées. Le solvant est évaporé sous pression réduite, et un solide de couleur jaune est obtenu avec un rendement de 6,0%.

### 3) Clivage par RuO<sub>4</sub>

#### *a- Protocoles de clivage*

Trois protocoles de clivage par RuO<sub>4</sub> ont été adoptés :

- protocole 1 : 26 mg d'algaenans sont placés en présence de 10 mL d'un mélange CH<sub>3</sub>CN/CHCl<sub>3</sub> (1 : 1, v/v) et 10 mL d'une solution aqueuse à 2M de NaIO<sub>4</sub>. L'ensemble est placé sous ultrasons pendant 30 minutes. 37 mg de RuCl<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O sont ensuite ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé 4 heures sous argon sous ultrasons. A la fin de la réaction, 15 mL d'eau et 10 mL d'hexane sont ajoutés. La fraction solide non clivée est éliminée par centrifugation (10 000 tours/min, 20 minutes). La phase organique est ajoutée à 0,5 mL de MeOH et la phase aqueuse est extraite avec 10 mL d'hexane et 2 X 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont rassemblées, puis centrifugées (13 000 tours/min, 10 min) afin d'éliminer les sels de ruthénium. Le surnageant est isolé, lavé avec 0,5 mL d'une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5%, puis séché sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. Le solvant est évaporé sous pression réduite et une huile jaune est obtenu avec un rendement de 35,0% ; [29]
- protocole 2 : 500 mg d'algaenans sont placés en présence de 90 mL d'une solution de H<sub>2</sub>O/CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN (5 : 5 : 2, v/v/v), ainsi que de 10 g de NaIO<sub>4</sub>. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 30 minutes, puis 10 mg de RuCl<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O sont ajoutés. Le milieu réactionnel est alors agité sous argon pendant 48 heures. Après filtration sur Büchner, le rétentat est lavé trois fois avec 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Une solution aqueuse de NaOH 5% est ajoutée au filtrat jusqu'à ce que le pH de celui-ci atteigne une valeur comprise entre 7 et 9. Le solvant est éliminé sous pression réduite et 10 mL d'eau et une solution aqueuse de HCl 5% sont ajoutés (pour atteindre un pH final compris entre 4 et 6) afin de dissoudre le solide résiduel. La phase aqueuse est extraite avec 2 X 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Un solide de couleur noire est obtenu avec un rendement de 21,6%. [6]

### *b- Analyses RMN des produits de clivage*

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  des produits de clivage obtenus selon les différents protocoles montrent les caractéristiques suivantes :

#### Protocole 1 :

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,86 ppm (m, 7H,  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n$ ); 1,35 ppm (s, 17H,  $(\text{CH}_2)_n$ ); 1,63 ppm (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$ ); 2,35 ppm (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{-COO-}$ ).

#### Protocole 2 :

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 0,86 ppm (m, 4H,  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n$ ); 1,35 ppm (s, 14H,  $(\text{CH}_2)_n$ ); 1,63 ppm (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$ ); 2,35 ppm (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{-COO-}$ ).

### 4) Dérivatisation des produits de clivage

#### ➤ Estérification des acides

L'ensemble des produits de clivage (issus de  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  ou  $\text{RuO}_4$ ) est placé en tube scellé, en présence de 20 mL d'une solution méthanolique de  $\text{BF}_3$  (12%), sous agitation à 100 °C pendant 24 heures. Une extraction est ensuite réalisée avec 5 X 2 mL d'hexane. La phase organique est lavée avec  $\text{H}_2\text{O}$ , puis séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre. Le solvant est évaporé sous pression réduite, et une huile verdâtre est obtenue, avec un rendement de 90,5%.

#### ➤ Triméthylsilylation des alcools

L'ensemble des produits de clivage (issus de  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  ou  $\text{RuO}_4$ ) est placé dans un mélange pyridine/chlorotriméthylsilane/hexaméthylidisilazane (20 : 2 : 1, v/v/v) sous argon. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 heures, puis est extrait par du  $\text{CHCl}_3$ . La phase organique est ensuite lavée à l'eau, avec une solution saturée en  $\text{NaCl}$  puis une solution aqueuse de sulfate de cuivre jusqu'à élimination totale de la pyridine. La phase organique est ensuite séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, puis le solvant est évaporé sous pression réduite et un solide orange est obtenu, avec un rendement de 69,0%. [35]

## IV – Caractérisation des sucres

### 1) Acétylation des monosaccharides de référence

Les différents monosaccharides de référence commerciaux ont été acétylés suivant les protocoles suivants :

- xylose, arabinose, lyxose, ribose, fucose, rhamnose : 500 mg (3,33 mmol) de monosaccharides sont placés dans un ballon de 50 mL, en présence de 15 mL de pyridine. La solution est refroidie à 0 °C par un bain de glace. 8 éq. (26,6 mmol, 2,5 mL) d'anhydride acétique sont ajoutés goutte-à-goutte à la solution. Puis une pointe de spatule de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante et la réaction est suivie par CCM (éluant : éther de pétrole/AcOEt (5/1, v/v)). Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est ajouté à 20 mL d'une solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub> refroidie. La phase organique est lavée avec une solution saturée en CuSO<sub>4</sub> jusqu'à élimination totale de la pyridine, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> et filtrée. Le solvant est évaporé sous pression réduite, et des huiles jaunâtres sont isolées, avec des rendements compris entre 84,1% et 91,4%.
- glucose, fructose, galactose, mannose : 500 mg (3,33 mmol) de monosaccharides sont placés dans un ballon de 50 mL, en présence de 15 mL de pyridine. La solution est refroidie à 0 °C par un bain de glace. 10 éq. (33,3 mmol, 3,2 mL) d'Ac<sub>2</sub>O sont ajoutés goutte-à-goutte à la solution. Puis une pointe de spatule de DMAP est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante et la réaction est suivie par CCM (éluant : éther de pétrole/AcOEt (5/1, v/v)). Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est ajouté à 20 mL d'une solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub> refroidie. La phase organique est lavée avec une solution saturée en CuSO<sub>4</sub> jusqu'à élimination totale de la pyridine, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> et filtrée. Le solvant est évaporé sous pression réduite, et des huiles jaunâtres sont isolées avec des rendements compris entre 52,8% et 100%.

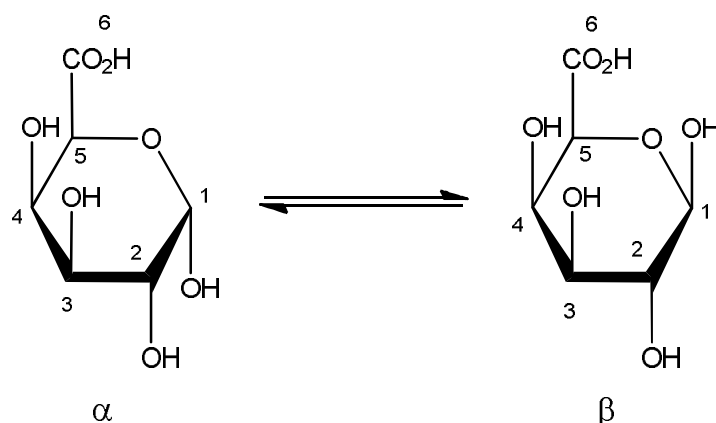
Un autre protocole est adopté pour l'acétylation de l'acide galacturonique. [8] L'acide galacturonique monohydrate (500 mg, 2,36 mmol) est séché sous vide pendant 4 heures. 30 éq. mL d'Ac<sub>2</sub>O (7 mL, 74,0 mmol) y sont ensuite ajoutés, puis 32,7 mg (0,129 mmol)

d'I<sub>2</sub>. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le brut réactionnel est évaporé jusqu'à obtenir un volume de 30 mL, dilué avec de l'Et<sub>2</sub>O puis lavé successivement avec une solution saturée en Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, de l'eau, puis une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit se présente sous la forme d'une huile. L'huile est reprise dans 40 mL d'un mélange H<sub>2</sub>O/THF (1 : 1, v/v), et agitée à température ambiante pendant 16 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Au brut réactionnel sont ajoutés 1 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mL de THF, 0,2 mL de iodure de méthyle (MeI) ainsi que quelques gouttes d'éther couronne 18-C-6. La réaction se déroule à température ambiante pendant 24 heures. Après dilution dans de l'Et<sub>2</sub>O puis après des lavages successifs à l'eau et à la saumure, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit est isolé sous forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 73,3%.

Lorsque le produit désiré n'est pas obtenu pur, le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle, 80/20 à 20/80, v/v).

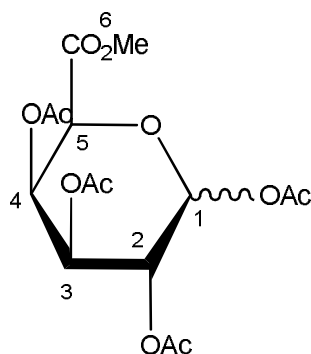
## 2) Analyse RMN des monosaccharides de référence

Acide galacturonique C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub> (MW =194,1 g/mol)



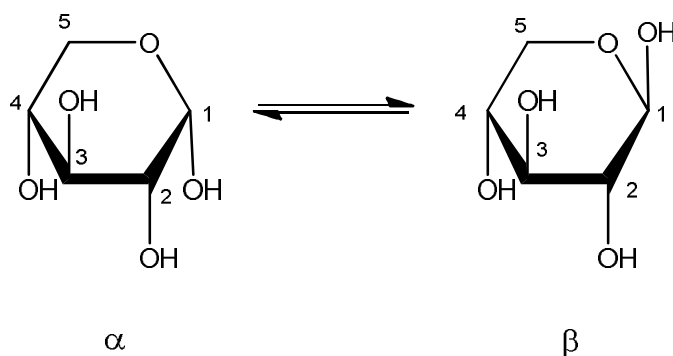
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) : 3,49 ppm (dd, 1H, J = 10,2, 7,9 Hz, H<sub>2β</sub>); 3,71 ppm (dd, 1H, J = 9,9, 3,5 Hz, H<sub>3β</sub>); 3,80 ppm (dd, 1H, J = 10,5, 3,8 Hz, H<sub>2α</sub>); 3,93 ppm (dd, 1H, J = 10,3, 3,4 Hz, H<sub>3α</sub>); 4,26 ppm (dd, 1H, J = 3,6, 1,4 Hz, H<sub>4β</sub>); 4,32 ppm (dd, 1H, J = 3,4, 1,6 Hz, H<sub>4α</sub>); 4,39 ppm (d, 1H, J = 1,5 Hz, H<sub>5β</sub>); 4,60 ppm (d, 1H, J = 7,9 Hz, H<sub>1β</sub>); 4,72 ppm (dd, 1H, J = 1,5, 0,4 Hz, H<sub>5α</sub>); 5,3 ppm (d, 1H, J = 3,8Hz, H<sub>1α</sub>).

Méthyl 1,2,3,4-tétra-O- $\alpha$ -D-galacturonate C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub> (MW=376,1 g/mol)



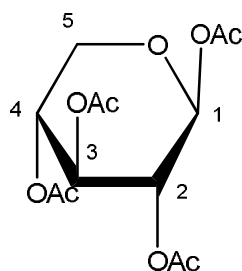
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) : 2,00 ppm (s, 6H, OAc); 2,01 ppm (s, 3H, OAc); 2,08 ppm (s, 3H, OAc); 3,74 ppm (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,74 ppm (d, 1H, J = 1,5 Hz, H5); 5,37 ppm (m, 2H, H2, H3); 5,80 ppm (m, 1H, H4) ; 6,49 ppm (d, 1H, J = 1,9 Hz, H1).

Xylose C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> (MW =164,2 g/mol)



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) : 3,22 ppm (dd, 1H, J = 9,3, 7,9 Hz, H2<sub>β</sub>); 3,32 ppm (dd, 1H, J = 11,4, 10,6 Hz, H5<sub>β</sub>); 3,43 ppm (t, 1H, J = 9,3 Hz, H3<sub>β</sub>); 3,52 ppm (dd, 1H, J = 8,9, 3,6 Hz, H2<sub>α</sub>); 3,61 ppm (m, 1H, H4<sub>β</sub>); 3,63 à 3,70 ppm (m, 4H, H5<sub>α</sub>, H4<sub>α</sub> et H3<sub>α</sub>); 3,92 ppm (m, 1H, H5<sub>β</sub>); 4,57 ppm (d, 1H, J = 7,9 Hz, H1<sub>β</sub>); 5,19 ppm (d, 1H, J = 3,8 Hz, H1<sub>α</sub>).

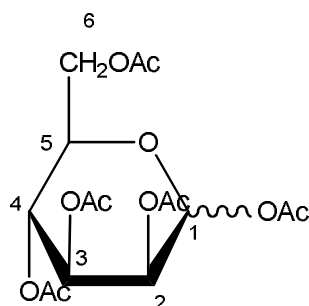
1,2,3,4-tétraacétate xylose C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub> (MW =318,1 g/mol)



$\beta$

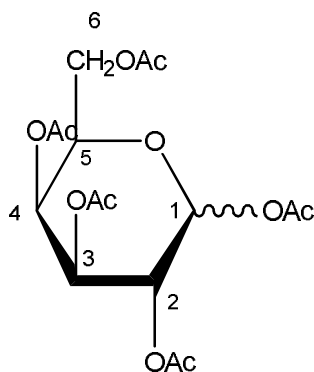
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 1,92 ppm (s, 3H, OAc); 1,94 ppm (s, 3H, OAc); 1,95 ppm (s, 3H, OAc); 2,07 ppm (s, 3H, OAc); 3,61 ppm (t, 1H,  $J = 11,0$  ppm,  $\text{H5}_\beta$ ); 3,83 ppm (dd, 1H,  $J = 11,2, 5,8$  Hz,  $\text{H5}_\beta$ ); 4,92 ppm (m, 2H,  $\text{H3}_\beta, \text{H4}_\beta$ ); 5,36 ppm (t, 1H,  $J = 9,8$  Hz,  $\text{H2}_\beta$ ); 6,14 ppm (d, 1H,  $J = 3,6$  Hz,  $\text{H1}_\beta$ ).

1,2,3,4,5-pentaacétate mannose  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  (MW =390,2 g/mol)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 2,03 ppm (m, 15H, OAc); 4,09 ppm (m, 2H,  $\text{H6}$ ); 4,28 ppm (m, 1H,  $\text{H5}$ ); 5,28 ppm (m, 3H,  $\text{H2}, \text{H3}, \text{H4}$ ); 6,08 ppm (d, 1H,  $J = 1,9$  Hz,  $\text{H5}$ ).

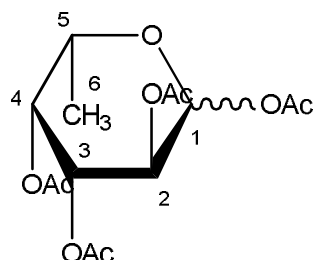
1,2,3,4,5-pentaacétate galactose  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  (MW =390,3 g/mol)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 2,00 ppm (s, 3H, OAc); 2,02 ppm (s, 3H, OAc); 2,04 ppm (s, 3H, OAc); 2,16 ppm (s, 6H, OAc); 4,10 ppm (dd, 2H,  $J = 6,8, 2,1$  Hz,  $\text{H5}, \text{H6}$ ); 4,34 ppm (m, 1H,

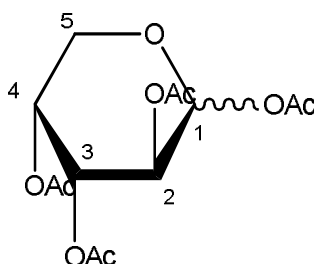
H6); 5,34 ppm (m, 2H, H2, H4); 5,50 ppm (d, 1H,  $J = 1,3$  Hz, H3); 6,38 ppm (d, 1H,  $J = 1,3$  Hz, H1).

1,2,3,4-tétraacétate fucose  $C_{14}H_{20}O_9$  (MW = 332,1 g/mol)



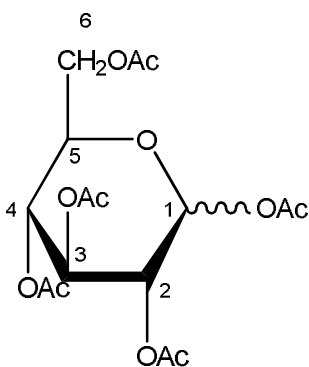
RMN  $^1H$  (300 MHz) : 1,14 ppm (d, 3H,  $J = 6,7$  Hz, H6); 1,99 ppm (s, 3H, OAc); 2,00 ppm (s, 3H, OAc); 2,13 ppm (s, 3H, OAc); 2,17 ppm (s, 3H, OAc); 4,26 ppm (q, 1H,  $J = 6,6$  Hz, H3); 5,32 ppm (m, 3H, H5, H2, H4); 6,32 ppm (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H1).

1,2,3,4-tétraacétate arabinose  $C_{13}H_{18}O_9$  (MW = 318,1 g/mol)



RMN  $^1H$  (300 MHz) : 2,03 ppm (s, 6H, OAc); 2,15 ppm (s, 6H, OAc); 3,82 ppm (dd, 1H,  $J = 13,2, 2,0$  Hz, H5); 4,06 ppm (dd, 1H,  $J = 13,4, 0,9$  Hz, H5); 5,35 ppm (m, 3H, H2, H3, H4); 6,34 ppm (d, 1H,  $J = 2,7$  Hz, H1).

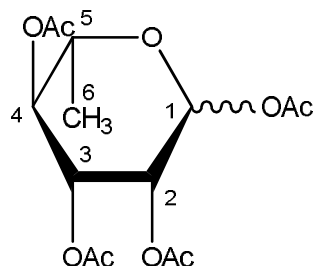
1,2,3,4-tétraacétate glucose  $C_{16}H_{22}O_{11}$  (MW = 390,1 g/mol)



[PARTIE EXPERIMENTALE]

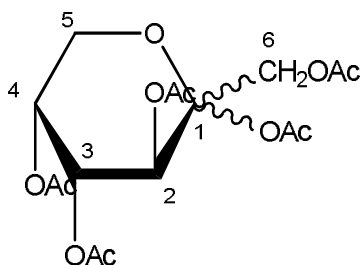
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 2,02 ppm (s, 9H, OAc); 2,09 ppm (s, 3H, OAc); 2,18 ppm (s, 3H, OAc); 4,10 ppm (m, 2H, H5, H6); 4,27 ppm (dd, 1H, J = 12,3, 4,2 Hz, H6); 5,11 ppm (m, 2H, H2, H4); 5,47 ppm (t, 1H, J = 9,6 Hz, H3); 6,32 ppm (d, 1H, J = 3,6 Hz, H1).

1,2,3,4-tétraacétate rhamnose  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_9$  (MW=332,1 g/mol)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 1,23 ppm (d, 3H, J = 6,3 Hz, H6); 2,00 ppm (s, 3H, OAc); 2,06 ppm (s, 3H, OAc); 2,15 ppm (s, 3H, OAc); 2,17 ppm (s, 3H, OAc); 3,93 ppm (m, 1H, H2); 5,11 ppm (t, 1H, J = 9,9 Hz, H5); 5,24 ppm (dd, 1H, J = 3,5, 1,9 Hz, H3); 5,30 ppm (dd, 1H, J = 10,0, 3,5 Hz, H4); 6,00 ppm (d, 1H, J = 1,84 Hz, H1).

1,2,3,4,6-pentaacétate fructose  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  (MW=390,1 g/mol)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) : 1,98 ppm (s, 3H, OAc); 2,04 ppm (s, 3H, OAc); 2,07 ppm (s, 3H, OAc); 2,15 ppm (s, 3H, OAc); 2,16 ppm (s, 3H, OAc); 3,92 ppm (t, 2H, J = 1,9 Hz, H5); 4,58 ppm (d, 1H, J = 11,9 Hz, H6); 4,68 ppm (d, 1H, J = 11,9 Hz, H6); 5,33 ppm (m, 2H, H2, H3); 5,37 ppm (m, 1H, ); 5,53 ppm (d, 1H, J=10,5 Hz, H1).

### 3) Isolement des monosaccharides

Le protocole d'isolement des monosaccharides est appliqué sur un résidu d'extraction Soxhlet, les microalgues ne contenant donc plus de lipides.

- la première étape consiste à extraire les polysaccharides hydrosolubles à partir de trois reflux successifs dans de l'eau osmosée. Les trois phases aqueuses sont combinées puis concentrées sous pression réduite. L'ajout d'éthanol absolu à froid permet de faire précipiter les polysaccharides. Après isolement de ces derniers par centrifugation, les protéines sont éliminées par un lavage avec le réactif de Sevag, un mélange n-BuOH/CHCl<sub>3</sub> (4/1, v/v). Après centrifugation, la phase aqueuse contenant les polysaccharides est isolée, puis évaporée sous pression réduite. Les polysaccharides sont ensuite hydrolysés pendant une heure au reflux d'une solution aqueuse de TFA 2 M. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis engagé dans une réaction d'acétylation. Le brut est repris dans 60 mL de pyridine, puis refroidi dans un bain de glace à 0 °C. 15 mL d'anhydride acétique sont ajoutés goutte-à-goutte, puis une pointe de spatule de DMAP est ajoutée. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures. Les monosaccharides acétylés sont extraits au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et la pyridine est éliminée par des lavages successifs avec une solution saturée en CuSO<sub>4</sub>. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, puis évaporée sous pression réduite.
- la fraction des microalgues non soluble dans l'eau subit elle aussi une hydrolyse au reflux d'une solution aqueuse de TFA 2M. Après cette hydrolyse, une extraction des protéines est réalisée à l'aide du réactif de Sevag. La phase aqueuse, après évaporation, est engagée dans une réaction d'acétylation selon le protocole présenté ci-dessus.

### 4) Analyse GC-FID

Les monosaccharides acétylés sont séparés sur une colonne capillaire CP-SIL 13CB (14% phényle, 86% diméthylpolysiloxane) possédant les caractéristiques suivantes :

- longueur : 25 m
- diamètre interne : 250 µm

- épaisseur de phase stationnaire : 0,20  $\mu\text{m}$
- température maximale d'utilisation : 300  $^{\circ}\text{C}$
- débit d' $\text{H}_2$  : 1,3 mL/min

Les conditions appliquées à l'injecteur sont les suivantes :

- température : 250  $^{\circ}\text{C}$
- ratio de split : 50 : 1
- débit d' $\text{H}_2$  : 73,7 mL

Le gradient de température permettant une séparation optimale des composés de référence est le suivant :

- 5 minutes à 155  $^{\circ}\text{C}$
- montée à 170  $^{\circ}\text{C}$  à 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  puis 170  $^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes
- montée à 300  $^{\circ}\text{C}$  à 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  puis 300  $^{\circ}\text{C}$  pendant 1 minute

Les conditions appliquées au détecteur à ionisation de flamme sont les suivantes :

- température : 320  $^{\circ}\text{C}$
- débit d' $\text{H}_2$  : 40 mL/min
- débit d'air : 400 mL/min
- gaz make-up :  $\text{N}_2$

Avant injection, les échantillons sont repris dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  puis filtré sur un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité. L'identification des monosaccharides est réalisée par comparaison des temps de rétention avec ceux des composés de référence.

## 5) Dosage des sucres totaux par spectrophotométrie UV-Visible

Le dosage des sucres totaux est réalisé au sein du GEPEA, par la méthode de Dubois. [45] L'étalonnage est réalisé à partir de solutions de glucose entre 0 et 0,1 g/L, par pas de 0,02 g/L. Un litre d'une solution contenant 2,5467 g de pâte de microalgues du lot 8 (contenant 80% d'eau) est préparée. Après centrifugation 5 minutes à 6 000 tours par minute, le surnageant est éliminé, puis le culot est remis en présence d'1 L d'eau osmosée afin de le laver à nouveau. Après homogénéisation manuelle, l'ensemble est vortexé à 3 000 tours par minutes pendant quelques secondes puis centrifugé pendant 5 minutes à 6 000 tours par minute. Après

élimination du surnageant, le culot est repris dans 1 L d'eau osmosée et constituera, après homogénéisation puis dilution par deux, l'échantillon à analyser.

A 0,5 mL de cet échantillon et 0,5 mL de chaque solution étalon, est ajouté 0,5 mL d'une solution de phénol à 50 g/L, puis 2,5 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 98%. Après 10 minutes de repos, chaque mélange est vortexé à 3000 tours par minute pendant 10 secondes. Chaque tube est ensuite placé au bain-marie à 35 °C pendant 30 minutes.

Les solutions étalons, ainsi que les échantillons, sont préparés en triplicats. Elles sont ensuite analysées par spectrophotométrie à 483 nm.

## V – Dosage des protéines par spectrophotométrie UV-Visible

Le dosage des protéines est réalisé au sein du GEPEA, par la méthode de Lowry, [47] suivant un protocole mis au point sur la microalgue *Neochloris sp.*.

L'étalonnage est réalisé à partir de solutions étalons en albumine de sérum bovin de concentrations allant de 0 à 1 mg/mL, par pas de 0,1 mg/mL.

Un litre d'une solution contenant 7,2563 g de pâte de microalgues du lot 8 (contenant 80% d'eau) est préparé. Après 10 minutes de centrifugation à 13 400 tours par minute, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 1 L d'eau osmosée et constituera, après dilution par 2, l'échantillon à analyser.

1 mL de chacune de ces solutions (étalons et échantillons) est mis en présence de 1 mL de NaOH 2M. Les mélanges sont vortexés pendant 5 secondes, puis seul le blanc est mis au bain-marie à 95 °C pendant 6 minutes, avant d'être refroidi à l'eau froide. L'ajout d'1 mL d'HCl 6M à chaque échantillon permet de neutraliser l'excédent de soude, après que les échantillons soient passés au vortex pendant 5 secondes puis centrifugés pendant 10 minutes à 6000 tours par minute.

La suite du protocole nécessite plusieurs solutions distinctes :

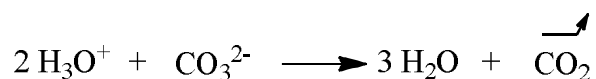
- solution A : NaOH 1N à 20 g/L en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ;
- solution B : CuSO<sub>4</sub> à 5 g/L ;

- solution C : mélange de 10 mL de la solution A avec 200 µL de la solution B vortexé pendant 10 secondes. Ce mélange est préparé extemporanément.
- solution D : solution à 1M du réactif de Folin Ciocalteu (tungstate de sodium et molybdate de sodium en solution dans un mélange d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> et d'HCl).

1 mL de la solution C est mis en présence de 0,2 mL de la solution à caractériser. Le mélange est vortexé pendant 5 secondes puis laissé reposer pendant 10 minutes. 0,1 mL de la solution D est ensuite ajouté, et le mélange est à nouveau vortexé pendant 5 secondes. Le mélange est laissé à incuber pendant 30 minutes à l'obscurité. Toutes les solutions sont préparées en triplicats. La mesure de l'absorbance est ensuite réalisée à 750 nm.

## VI – Dosage des carbonates par calcimétrie

Le calcimètre de Bernard (Figure 5-4) est un appareillage fréquemment utilisé pour le dosage des ions carbonates dans un échantillon. Le principe de fonctionnement est basé sur la libération de dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> lorsque les ions carbonates sont amenés en présence d'acide chlorhydrique, selon l'équation :



Réaction 5-1 : Equation du dosage des ions carbonates par les ions oxoniums



**Figure 5-4 : Calcimètre de Bernard**

Le système est composé d'une ampoule à décanter, dont la partie inférieure est reliée à la partie inférieure d'une burette graduée de 100 mL. L'ensemble est rempli avec de l'eau saturée en chlorure de sodium NaCl, afin d'empêcher toute dissolution du CO<sub>2</sub> dans l'eau, ce qui entraînerait une sous-estimation du volume de gaz réellement libéré. Entre 150 mg et 200 mg d'échantillons sont placés dans un erlenmeyer, ainsi qu'un tube contenant quelques millilitres d'acide chlorhydrique 32%. Cet erlenmeyer est ensuite relié à la partie supérieure de la burette graduée, et l'ensemble est positionné de telle sorte que le niveau d'eau dans la burette graduée corresponde à 0 mL. De manière précautionneuse, le tube contenant l'acide chlorhydrique est renversé, engendrant la dissolution du CaCO<sub>3</sub> et la libération de CO<sub>2</sub> gazeux. A la fin de l'effervescence, la hauteur de l'ampoule à décanter est ajustée, de telle sorte que les niveaux d'eau dans l'ampoule à décanter et la burette graduée soient similaires, afin d'assurer l'équilibre des pressions. Le volume de CO<sub>2</sub> dégagé peut par la suite être directement lu sur la burette. Dans les échantillons issus des microalgues, le CO<sub>2</sub> dégagé est supposé provenir uniquement de carbonate de calcium.

## VII– Dosage du NaCl

### 1) Détermination de la teneur en Na<sup>+</sup> par spectrophotométrie d'émission atomique

La spectrophotométrie d'émission atomique repose sur l'analyse du rayonnement émis par un atome lorsqu'il passe d'un état excité à son état fondamental. Le spectre d'émission ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$ ...Figure 5-5) d'un atome donné est caractéristique de celui-ci, l'analyse quantitative de celui-ci permet donc de remonter à la concentration en cet élément au sein d'un échantillon.

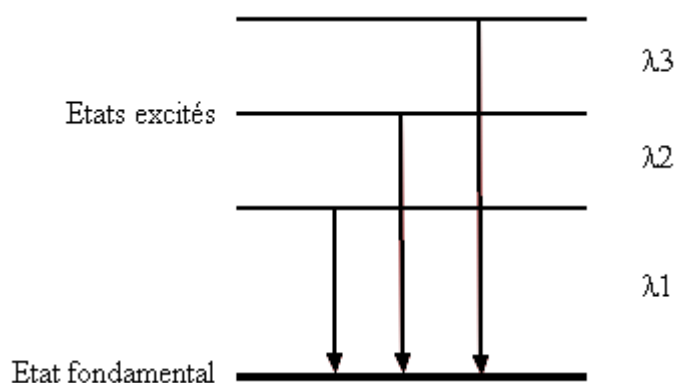


Figure 5-5 : Principe de l'émission atomique

2,6307 g de microalgues lyophilisées (lot 1) sont placées dans 200 mL d'eau osmosée. L'ensemble est placé sous agitation magnétique pendant 2 heures. Le mélange est ensuite filtré sur millipore, et le filtrat est titré par spectrophotométrie d'émission atomique après dilution au 25<sup>ème</sup>.

L'étalonnage de l'appareillage a été réalisé à partir de solutions étalons à 1, 2, 2,5, 4 et 5 ppm en Na<sup>+</sup> respectivement. La concentration en Na<sup>+</sup> de la solution échantillon a donc été évaluée à 3,94 ppm, soit une concentration massique en NaCl de 19,0 mg par gramme de microalgues sèches.

## 2) Détermination de la teneur en Cl<sup>-</sup> par dosage potentiométrique

La détermination de la teneur en Cl<sup>-</sup> dans les microalgues lyophilisées a été réalisée par un titrage potentiométrique, par précipitation de AgCl à partir d'une solution de AgNO<sub>3</sub> à 0,05 M (électrode au sulfate mercurieux pour la référence, électrode d'argent pour la mesure).

6307 g de microalgues lyophilisées (lot 1) sont placées dans 200 mL d'eau osmosée. L'ensemble est placé sous agitation magnétique pendant 2 heures. Le mélange est ensuite filtré sur millipore, et le filtrat est titré. Une prise d'essai de 20 mL a permis de déterminer un volume équivalent de 1,77 mL. Ce volume correspond à une concentration en Cl<sup>-</sup> de  $4,42 \cdot 10^{-3}$  mol/L, soit une concentration en NaCl de 19,7 mg par gramme de microalgues sèches.

## VIII – Liquéfaction hydrothermale

Le même protocole de liquéfaction hydrothermale a été appliqué lors de l'utilisation des appareils de 50 mL et de 300 mL respectivement, seule la quantité de matière initiale a été modifiée. 7 g de microalgues lyophilisées et 28 mL d'eau osmosée (respectivement 42 g de biomasse et 168 mL d'eau osmosée) sont placés dans le réacteur, puis l'enceinte est fermée. Après avoir imposé l'atmosphère de travail (air, purge en N<sub>2</sub>, ou pression initiale en N<sub>2</sub>), le système est chauffé à la température de consigne. Le temps de séjour est pris en compte à partir du moment où la température de consigne est atteinte. Lorsque le temps de séjour de consigne est atteint, le chauffage est coupé, et le réacteur est laissé à refroidir à des températures inférieures à 50 °C (température à laquelle les gaz présents sont estimés être non condensables).

Après une purge du système réactionnel, l'enceinte de liquéfaction est ouverte. Plusieurs protocoles de fractionnement peuvent ensuite être appliqués :

- la phase aqueuse et la phase hydrophobe (huile + résidus solides) sont séparés par simple gravité ;
- un solvant organique (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ou toluène) est ajouté au milieu réactionnel, puis l'ensemble est filtré sur Büchner. Les résidus solides sont isolés sur le filtre. La phase organique et la phase aqueuse sont séparées en ampoule à décanter. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, et le solvant est évaporé sous pression

réduite, permettant ainsi d'isoler une bio-huile. La phase aqueuse est concentrée sous pression réduite, puis lyophilisée.

## Bibliographie

- [1] D. D. Laws, H.-M. L. Bitter, A. Jerschow. Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 3096–3129.
- [2] B. Allard, M.-N. Rager, J. Templier. Occurrence of high molecular weight lipids (C80+) in the trilaminar outer cell walls of some freshwater microalgae. A reappraisal of algaenan structure. *Organic Geochemistry* **2002**, *33*, 789 – 801.
- [3] B. Allard, J. Templier, C. Largeau. An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from microalgae. *Organic Geochemistry* **1998**, *28*, 543 – 548.
- [4] A. Amblès, L. Grasset, G. Dupas, J.-C. Jacquesy. Ester and ether bond cleavage in immature kerogens. *Organic Geochemistry* **1996**, *24*, 681 – 690.
- [5] P. Blokker, H. van den Ende, J. W. de Leeuw, G. J. Versteegh, J. S. S. Damsté. Chemical fingerprinting of algaenans using  $RuO_4$  degradation. *Organic Geochemistry* **2006**, *37*, 871 – 881.
- [6] C. Li, P. Peng, G. Sheng, J. Fu. A study of a 1.2 Ga kerogen using Ru ion-catalyzed oxidation and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry: structural features and possible source. *Organic Geochemistry* **2004**, *35*, 531 – 541.
- [7] B. Allard, J. Templier. High molecular weight lipids from the trilaminar outer wall (TLS)-containing microalgae *Chlorella emersonii*, *Scenedesmus communis* and *Tetraedron minimum*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 459 – 467.
- [8] W. Pilgrim, P. V. Murphy.  $SnCl_4^-$  and  $TiCl_4^-$ -catalyzed anomerization of acylated O- and S-glycosides: analysis of factors that lead to higher  $\alpha:\beta$  anomer ratios and reaction rates. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 6747–6755.
- [9] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **1956**, *28*, 350–356.
- [10] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **1951**, *193*, 265–275.







# **Conclusion générale**



L'industrie des microalgues étant en plein essor, la génération de sous-produits est amenée à croître dans les prochaines années. L'utilisation de ces sous-produits dans un domaine capable d'absorber d'importants volumes de matériaux, tel que le génie civil, pourrait donc être un élément-clé pour une valorisation totale de la biomasse : l'algo-raffinerie.

Le but du projet Algoroute est d'évaluer si des résidus de microalgues peuvent être utilisés pour produire un nouveau liant viscoélastique, pouvant se substituer au bitume dans le domaine des infrastructures routières.

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont montré que plusieurs voies de valorisation sont envisageables afin d'aboutir à ce liant routier.

Les fractions lipidiques extraites par Soxhlet de *Scenedesmus sp.* ont montré des comportements rhéologiques intéressants, qui peuvent être proches des bitumes pétroliers. Composées d'acides gras libres et d'un biopolymère hautement aliphatique, leurs propriétés viscoélastiques dépendent du ratio entre ces deux espèces. Après extraction des lipides les moins polaires par l'hexane (représentant environ 5% de la biomasse), puis le  $\text{CHCl}_3$  (représentant également 5% environ de la biomasse), l'extraction des microalgues par un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2 : 1, v/v) a permis d'isoler avec des rendements d'environ 12% une phase contenant approximativement 35% d'algaénans, et présentant des propriétés rhéologiques proches de celles d'un bitume routier classique.

Néanmoins, il a semblé nécessaire d'identifier une autre voie permettant d'accéder à des matériaux viscoélastiques thermofusibles hydrophobes. En effet, l'extraction Soxhlet est difficilement envisageable à une échelle industrielle, notamment du fait de l'utilisation de solvants organiques chlorés toxiques et de la nécessité de travailler sur une biomasse sèche, l'étape de séchage étant extrêmement énergivore.

C'est pourquoi la liquéfaction hydrothermale a été abordée. Connue dans la littérature pour générer des bio-huiles à partir de biomasses diverses, elle met en jeu des réactions chimiques se déroulant en phase aqueuse, permettant de travailler à partir d'une biomasse humide (ce qui représente donc un gain énergétique), et limitant l'utilisation de solvants organiques. Cette technique s'est révélée très prometteuse :

- d'une part, elle permet d'isoler une fraction hydrophobe (composée d'un mélange entre une huile et des résidus solides) avec des rendements de 55%, largement supérieurs à ceux obtenus par extraction Soxhlet. Cette technique permet donc de

valoriser des fractions autres que les fractions lipidiques de la biomasse, permettant ainsi de se rapprocher d'une valorisation globale des microalgues ;

- d'autre part, ces phases hydrophobes présentent elles aussi des propriétés rhéologiques tout à fait intéressantes, proches de celles de bitumes pétroliers. Cependant, la compréhension des relations entre les conditions expérimentales dans lesquelles les huiles ont été obtenues (temps, température, pression, mais aussi taux de chargement de l'appareillage) et leurs propriétés viscoélastiques reste encore partielle, même si certaines tendances se dégagent. En particulier, le taux de chargement de l'enceinte de liquéfaction semble avoir un effet important sur la rigidité des bio-huiles obtenues.

L'inconvénient principal de la liquéfaction réside dans la création de molécules potentiellement toxiques en phase aqueuse. Une voie de valorisation, ou tout du moins de dépollution de ces phases aqueuses devra donc être trouvée afin de rendre ce procédé viable à une échelle industrielle (gazéification, réinjection dans un système de culture de microalgues...).

Enfin, l'apport d'un prétraitement acide de la biomasse a également été envisagée. Si celui-ci permet d'isoler une fraction appauvrie en oxygène par rapport à la matière initiale, cette fraction s'est avérée non thermofusible, et non liquéfiable dans les conditions testées.

Si les huiles isolées à partir des résidus de *Scenedesmus sp.* montrent des propriétés intéressantes pour pouvoir se substituer aux bitumes, leur comportement au sein de structures granulaires reste encore à être étudié, et comparé au comportement des enrobés bitumineux, selon les tests qui leur sont classiquement appliqués (PCG - presse à cisaillement giratoire - pour évaluer l'aptitude au compactage de l'enrobé ; Duriez, pour évaluer la sensibilité à l'eau ; module complexe). Un essai qualitatif d'enrobage de granulats par des huiles extraites par Soxhlet a d'ores et déjà été réalisé, et a montré que ces huiles sont capables d'assurer la cohésion d'un mélange granulaire (Figure-conclusion 1).



**Figure conclusion - 1 : Photographie de l'enrobé réalisé à partir des extraits Soxhlet de *Scenedesmus sp.***

Des études d'analyses de cycle de vie restent également à être menées. En effet, le procédé de liquéfaction hydrothermale est globalement consommateur d'énergie. La détermination du coût global du procédé (de la culture des microalgues à l'obtention du produit final), ainsi que de son impact environnemental permettront, *in fine*, d'évaluer la faisabilité d'une montée en échelle à un niveau préindustriel.

Enfin, le comportement d'espèces de microalgues autres que *Scenedesmus sp.* demande également à être évalué, en appliquant des protocoles similaires (extraction Soxhlet, liquéfaction hydrothermale, traitement acide) afin d'élargir la validité de ces concepts.



# Évaluation du potentiel rhéologique d'huiles issues de microalgues en tant que matériaux de substitution des bitumes

## Résumé

Dans le domaine de la construction routière, la recherche de liants alternatifs au bitume constitue un enjeu tout particulier. En effet, issu de l'industrie pétrolière, le bitume est une matière première dont les ressources sont appelées être épuisées dans plusieurs dizaines d'années. Ce mémoire traite donc de l'évaluation d'une nouvelle bio-ressource pouvant se substituer au bitume : les microalgues. Une preuve de concept a été apportée par le travail mené sur *Scenedesmus sp.*. D'une part, les fractions lipidiques extraites à partir de cette espèce de microalgues (22% en poids de la biomasse, composées d'acides gras libres et d'un biopolymère aliphatique) ont montré des comportements rhéologiques intéressants, pouvant se rapprocher des propriétés de bitumes pétroliers. D'autre part, l'application d'un traitement hydrothermal permet de générer l'apparition d'une bio-huile en milieu aqueux, avec des rendements avoisinant 50%. Les propriétés rhéologiques de ces bio-huiles semblent être dépendantes des conditions expérimentales, même si aucun lien n'a pu être clairement mis en évidence.

## Mots clés

Bitume ; Bio-huile ; Extraction Soxhlet ; Enrobé ; Liant routier alternatif ; Lipides ; Liquéfaction hydrothermale ; Microalgues ; Rhéologie.

## Abstract

Asphalt is a petroleum-based product used mostly as a binder in road pavement. Because the worldwide petroleum production appears to have come to a stand still, it might become difficult to answer the need in asphalt. That's why the search for new materials has become of highest importance. This thesis deals with a new biomass : microalgae, and the focus has been made on the microalgae *Scenedesmus sp.*. From this specie, 22% of a lipid fraction can be extracted. This fraction, made of free fatty acids and aliphatic biopolymer, shows some interesting viscoelastic behavior, similar to the one of petroleum bitumen. Switching this extracting process to hydrothermal liquefaction, which occurs in aqueous media, almost 50% of the biomass can be turned into a bio-oil. Rheological properties of those bio-oils seem to be correlated to the experimental conditions, even though no proof has been provided yet.

## Keyword

Bitumen ; Bio-oil ; Soxhlet extraction ; Asphalt pavement ; Alternative road binder ; Lipids ; Hydrothermal liquefaction ; Microalgae ; Rheology.

# **Évaluation du potentiel rhéologique d'huiles issues de microalgues en tant que matériaux de substitution des bitumes**

## **Résumé**

Dans le domaine de la construction routière, la recherche de liants alternatifs au bitume constitue un enjeu tout particulier. En effet, issu de l'industrie pétrolière, le bitume est une matière première dont les ressources sont appelées être épuisées dans plusieurs dizaines d'années. Ce mémoire traite donc de l'évaluation d'une nouvelle bio-ressource pouvant se substituer au bitume : les microalgues. Une preuve de concept a été apportée par le travail mené sur *Scenedesmus sp.*. D'une part, les fractions lipidiques extraites à partir de cette espèce de microalgues (22% en poids de la biomasse, composées d'acides gras libres et d'un biopolymère aliphatique) ont montré des comportements rhéologiques intéressants, pouvant se rapprocher des propriétés de bitumes pétroliers. D'autre part, l'application d'un traitement hydrothermal permet de générer l'apparition d'une bio-huile en milieu aqueux, avec des rendements avoisinant 50%. Les propriétés rhéologiques de ces bio-huiles semblent être dépendantes des conditions expérimentales, même si aucun lien n'a pu être clairement mis en évidence.

## **Mots clés**

Bitume ; Bio-huile ; Extraction Soxhlet ; Enrobé ; Liant routier alternatif ; Lipides ; Liquéfaction hydrothermale ; Microalgues ; Rhéologie.

## **Abstract**

Asphalt is a petroleum-based product used mostly as a binder in road pavement. Because the worldwide petroleum production appears to have come to a stand still, it might become difficult to answer the need in asphalt. That's why the search for new materials has become of highest importance. This thesis deals with a new biomass : microalgae, and the focus has been made on the microalgae *Scenedesmus sp.*. From this specie, 22% of a lipid fraction can be extracted. This fraction, made of free fatty acids and aliphatic biopolymer, shows some interesting viscoelastic behavior, similar to the one of petroleum bitumen. Switching this extracting process to hydrothermal liquefaction, which occurs in aqueous media, almost 50% of the biomass can be turned into a bio-oil. Rheological properties of those bio-oils seem to be correlated to the experimental conditions, even though no proof has been provided yet.

## **Keyword**

Bitumen ; Bio-oil ; Soxhlet extraction ; Asphalt pavement ; Alternative road binder ; Lipids ; Hydrothermal liquefaction ; Microalgae ; Rheology.