



HAL
open science

Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant

Ana-Maria Dospinescu Dospinescu-Rosu

► **To cite this version:**

Ana-Maria Dospinescu Dospinescu-Rosu. Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant. Biodiversité. Université du Littoral Côte d'Opale; Universitatea Vasile Alecsandri din Bacău (România), 2011. Français. NNT: 2011DUNK0372 . tel-01258006

HAL Id: tel-01258006

<https://theses.hal.science/tel-01258006v1>

Submitted on 18 Jan 2016

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

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

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale 104

Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Filière: Ingénierie des Fonctions Biologiques

Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant

Présentée par

Ana-Maria DOSPINESCU-ROSU

Soutenue le 18 novembre 2011 devant la commission d'examen

M. POPA M.I., Professeur, Université Technique «Gheorghe Asachi», Iasi, Roumanie	Rapporteur
M. FLEURY E., Professeur, INSA, Lyon, France	Rapporteur
Mme NISTOR D.I., Professeur, Université «Vasile Alecsandri», Bacau, Roumanie	Examineur
M. VEIGNIE E., Maître de Conférences, ULCO, France	Examineur
Mme RAFIN C., Maître de Conférences-HDR, ULCO, France	Co-Directrice
M. BRABIE G., Professeur, Université «Vasile Alecsandri», Bacau, Roumanie,	Co-Directeur

A mon époux, Lucian

A ma famille

“Intelligence without ambition is like a bird without wings”

(Salvador Dali)

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pu se dérouler sans le concours et la participation de très nombreuses personnes à qui je tiens à exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur G. SURPATEANU de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Synthèse Organique et Environnement à l'Université du Littoral Côte d'Opale et d'avoir assuré la direction de cette thèse jusqu'à son départ en retraite. Je le remercie pour m'avoir recommandée chaleureusement à Madame C. RAFIN, Maître de conférences-HDR à l'Université du Littoral Côte d'Opale, qui a été ensuite ma directrice de thèse. Je tiens témoigner à Mme RAFIN toute ma gratitude pour son implication et l'attention toute particulière qu'elle a portée à ce travail de recherche. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait partager son expérience et pour ses nombreux conseils tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier vivement Monsieur E. VEIGNIE, Maître de conférences à l'Université du Littoral Côte d'Opale, pour m'avoir suivie, encadrée et aidée pendant toute la durée de ce travail. Les nombreuses discussions et encouragements ont permis la faisabilité de cette thèse dans un contexte plus que favorable.

Merci également à Monsieur le Professeur G. BRABIE, de l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, Roumanie, pour l'attention qu'il a portée à ce travail en tant que co-directeur de thèse.

Je remercie également Monsieur le Professeur P. SHIRALI pour son accueil au sein de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV).

Monsieur le Professeur M.I. POPA de l'Université « Gheorghe Asachi » de Iasi, Roumanie, et Monsieur le Professeur E. FLEUY de l'INSA de Lyon, France, ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Qu'ils veuillent trouver ici l'expression de mon entière gratitude.

Je remercie également Madame le Professeur D.I. NISTOR, de l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, Roumanie, de me faire l'honneur de participer à ce jury en qualité d'examineur.

Passons maintenant aux remerciements plus personnels. Tout d'abord que Monsieur le Professeur N.D. MIRON, de l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, Roumanie, reçoive tous mes remerciements pour m'avoir comprise d'un point de vue didactique à l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau où je suis assistante universitaire.

Merci également aux personnes qui ont pris part à l'avancement de ces travaux et notamment au collectif du Laboratoire Protection d'Environnement et Matériaux Hydrides de Bacau, Roumanie, pour les analyses de FTIR, ainsi qu'à Madame L. COURCOT, Ingénieur d'Études au Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, Wimereux, France, pour la microscopie électronique et à Monsieur S. RUELLAN, Ingénieur d'Études à l'UCEIV pour les analyses RMN.

Ce travail a bénéficié lors de ma dernière année de thèse d'un financement de bourse d'excellence Programme Eiffel Doctorat (2010-2011, Domaine Sciences), délivré par le Ministère des Affaires Étrangères et Européennes, France que je tiens à remercier chaleureusement.

Je n'oublie pas mes collègues doctorantes et stagiaires avec qui j'ai passé d'excellents moments: je pense à Antoine, Rémi, Késia, Axel, Anca, Pierre-Edouard, Amadou et Pauline.

Un très grand merci à ma famille et à tous mes amis pour leur soutien sans faille. Je tiens enfin à associer à l'accomplissement de ce travail celui qui partage ma vie et qui a été particulièrement présent durant toutes ces années de thèse et qui m'a comprise.

Résumé

Mes recherches s'inscrivent dans une problématique de remédiation des sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) avec comme modèle de polluant organique persistant le benzo[a]pyrène (BaP). La persistance de ce type de molécules dans les sols est principalement due à deux paramètres limitants : leur faible biodisponibilité en raison de leur faible solubilité aqueuse et la difficulté pour les microorganismes d'amorcer l'oxydation de molécules aussi stables. Notre approche a consisté en l'utilisation de polysaccharides à base d'amidon comme matrice permettant de stimuler la solubilisation du BaP et comme support à la réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^*$) en tant que producteur d'un puissant oxydant: le radical hydroxyl OH^* .

Une étude théorique de modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence dans la molécule d'amidon des sites de fixation préférentiels aussi bien pour le BaP que pour le cation Fe^{2+} . Par la suite, l'étude expérimentale a eu pour objectif la synthèse chimique d'amidon modifié utilisant deux types d'agent alkylant, des époxydes et des anhydrides d'acides carboxyliques. Après la caractérisation chimique de ces molécules par spectroscopie RMN et FTIR, les études de relation structure activité (par fluorescence, MEB et MEB-EDS) entre les amidons modifiés, le BaP et le cation Fe^{2+} ont permis le criblage d'une vingtaine de molécules d'amidons modifiés et la sélection des amidons modifiés les plus solubles et les plus efficaces dans la solubilisation du BaP. Par exemple, la molécule d'amidon (P17) bialkylé par un époxyde à trois carbones et un anhydride à onze carbones présente une solubilité aqueuse de 4,41 g/l (amidon natif 0,4 g/l) et une capacité à stimuler la solubilité du BaP d'un facteur 20.

La dernière étape de mon travail de thèse aborde, *in vitro*, les applications potentielles des amidons modifiés pour la dégradation du BaP. Les essais réalisés avec la réaction de Fenton nous ont suggéré une hypothèse originale dans laquelle il semblerait que la matrice polysaccharique produirait des radicaux carbohydrates possédant un temps de demi-vie largement supérieur comparé à celui de l'hydroxyl radical leur conférant une meilleure capacité à atteindre et à oxyder le BaP. Les premiers essais couplant l'oxydation chimique et les potentialités de dégradation par des champignons saprotrophes doivent être encore optimisés afin d'utiliser tout le potentiel de la biodiversité des champignons.

Mots clé : amidon modifié, Fenton, benzo[a]pyrène, biodégradation, champignons saprotrophes

Abstract

My researchs concern remediation of polluted soil by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) with the benzo[a]pyrene (BaP) as a model of persistent organic pollutant. The persistence of these molecules into soil is mainly due to both limiting parameters: their weak biodisponibility due to their low aqueous solubility and the difficulty for microorganisms of starting the oxidation of such stable molecules. Our approach consisted in the use of polysaccharides like starch matrix for stimulating the solubilization of BaP and allowing on such support the Fenton reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^$) as a producer of high oxidant i.e. the hydroxyl radicals OH^* .*

A theoretical computer modelling study conducted on potato starch permits to identify the preferential sites for BaP and iron complexation. Thereafter, the experimental study aimed the chemical modification of starch using two types of alkylated agents i.e. epoxides and anhydrides of carboxylic acids. After the chemical characterization of these molecules by NMR and FTIR spectroscopy, the structure activity relationship between the modified starches, BaP and Fe^{2+} (as studied by fluorescence, SEM and SEM-EDS) allowed the screening of modified starches and the selection of the most soluble starches and the most effective one in BaP solubilization. For example, the molecule of starch (P17) bi-alkyl substituted by an epoxy group with three carbons and an anhydride with eleven carbons has an aqueous solubility of 4,41 g/L (native starch 0,4 g/L) and a capacity to stimulate the BaP solubility by a 20-factor.

The last step of this work approaches, in vitro, the potential application of the modified starch for BaP degradation. The tests carried out with Fenton reaction suggested an original hypothesis based on the production of carbohydrate radicals having a higher half-life time compared with that of the hydroxyl radical itself, conferring them a better capacity to reach and to oxidize BaP. The first tests coupling chemical oxidation and the potentialities of fungal degradation must be still optimized in order to use all the potential biodiversity of fungi.

Key words: *modified starch, Fenton, benzo[a]pyrene, biodegradation, saprotrophic fungi*

Rezumat

Cercetările acestei teze se înscriu în cadrul unei probleme de remediere a solurilor poluate cu hidrocarburi aromatice policiclice (HAP), având ca model de poluare benzo [a] pirenul (BaP). Persistența acestor moleculelor, de acest tip, în soluri este dată în principal de doi parametri limitanți: biosponibilitatea lor scăzută, datorită solubilității apoase scăzute, și dificultatea, pentru microorganisme de a oxida aceste molecule stabile. Abordarea noastră constă în utilizarea polizaharidelor, având ca suport amidonul: ca matrice permanentă de stimulare a solubilității BaP-ului și ca suport în reacția Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$) producătoare de un oxidant foarte puternic precum radicalul hidroxil OH^\bullet .

Un studiu teoretic de modelare moleculară a permis punerea în evidență în molecula de amidon a unor site-uri de fixare preferențiale atât pentru BaP cât și pentru cationul Fe^{2+} . Apoi, un studiu experimental a avut ca obiectiv sinteza chimică a amidonului modificat utilizând două tipuri de agenți de alchilare: epoxizii și anhidridele acizilor carboxilici. După caracterizarea chimică a acestor molecule prin spectroscopie RMN și FTIR, studiile de relație structură-activitate (prin fluorescență, MEB și MEB-EDS) între amidonurile modificate, BaP și cationul Fe^{2+} au permis verificarea a douăzeci de molecule de amidon modificate și selecționarea amidonurilor modificate cele mai solubile și mai eficiente în solubilizarea BaPului. De exemplu, molecula de amidon (P17) bialchilată printr-un epoxid cu trei atomi de carbon și o anhidridă cu unsprezece carboni, prezintă o solubilitate apoasă de 4,41 g/L (față de amidonul nativ 0,4 g/L) și o capacitate de stimulare a solubilității BaP de un factor 20.

Ultima etapă a acestei teze de doctorat abordează, in vitro, aplicațiile potențiale ale amidonurilor modificate pentru degradarea BaPului. Încercările realizate cu reacția Fenton ne sugerează o ipoteză originală în care se pare că matricea polizaharidică produce radicali carbohidrați posedând un timp de viață superior, comparativ cu cel al radicalului hidroxil, conferind o mai bună capacitate de captare și oxidare a BaPului. Primele încercări cuplând oxidarea chimică și potențialitatea de degradare prin fungi saprotrofi mai trebuie încă optimizată pentru utilizarea întregului potențial de biodiversitate a fungilor.

Cuvinte cheie : amidon modificat, Fenton, benzo[a]piren, biodegradare, fungi saprotrofi

Sommaire

Résumé

Sommaire

<i>Chapitre 1 – Introduction générale.....</i>	8
<i>Chapitre 2 – Etude par modélisation moléculaire de la formation d'un complexe entre des polysaccharides, le benzo[a]pyrène et le cation Fe²⁺</i>	26
<i>Chapitre 3 – Synthèse des amidons modifiés.....</i>	47
<i>Chapitre 4 – Relation structure activité des amidons modifiés et leurs applications dans des procédés d'oxydation du Benzo[a]pyrène.....</i>	89
<i>Conclusions générales et Perspectives.....</i>	126
<i>Liste d'acronymes.....</i>	129
<i>Liste des figures.....</i>	131
<i>Liste des tableaux.....</i>	135
<i>Liste des annexes.....</i>	136
<i>Annexes.....</i>	137

Chapitre 1

Introduction générale

Sommaire

1.1. Généralités sur le sol.....	10
1.2. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.....	13
1.3. Les processus d'oxydation.....	16
1.4. Les polysaccharides naturels, agents de solubilisation du B _a P.....	18
1.5. Les processus de biodégradation du B _a P.....	19
1.6. Plan de thèse.....	21
Références bibliographiques.....	23

1.1. Généralités sur le sol

Cette thèse s'inscrit dans une thématique qui concerne la protection des sols et de leurs fonctions indispensables aux écosystèmes et aux sociétés humaines. Le sol et le sous-sol constituent le support de toutes les activités humaines qui vont entre autres de l'agriculture aux infrastructures urbaines et industrielles. Les sols sont en effet intimement liés aux autres compartiments de l'environnement: hydrosphère, atmosphère et biosphère. Ils remplissent également des fonctions essentielles pour l'économie: production de matériaux, production agricole, support des infrastructures, etc. Ils jouent aussi un rôle important dans l'environnement : épuration de l'eau, biodiversité, etc. Tant d'un point de vue physique que fonctionnel, il s'agit d'une ressource non renouvelable. Pour toutes ces raisons, en ménager l'utilisation et en préserver les fonctionnalités sont une manière de protéger durablement les autres milieux et ressources [1].

Le sol est constitué de la couche superficielle qui recouvre l'écorce terrestre. Il se forme sous l'effet de l'altération de la roche-mère (ou minéraux primaires) soumise à des agressions physico-chimiques, mécaniques et climatiques (température, humidité ...) et biologiques [2]. Le sol est un milieu constitué de trois fractions dont les proportions, la structure et l'organisation sont variables:

- ✓ Une *fraction solide* composée de minéraux (sables, limons, argiles, oxydes et hydroxydes métalliques) et d'une fraction organique (organismes vivants, débris végétaux et animaux, humus);
- ✓ Une *fraction liquide* représentant l'eau contenue dans le sol au sein de laquelle sont dissoutes les substances solubles;
- ✓ Une *fraction gazeuse* de composition très proche de celle de l'atmosphère terrestre mais généralement enrichie en CO₂ par l'activité respiratoire des microorganismes du sol.

Le sol est traversé de flux de matières et d'énergie, liés aux grands cycles biogéochimiques et très dépendants des caractéristiques des sols. Selon ses propriétés physico-chimiques et biologiques, le sol va plus ou moins interagir avec ces flux et en modifier les caractéristiques. Vis-à-vis de substances polluantes, il peut notamment jouer un rôle de dépollution ou de stockage. Dans ce dernier cas, le temps de résidence des substances est plus ou moins long et les pollutions peuvent être remises en mouvement si les propriétés du sol sont modifiées. Le sol est également traversé par des flux d'énergie, issus du rayonnement solaire ou terrestre.

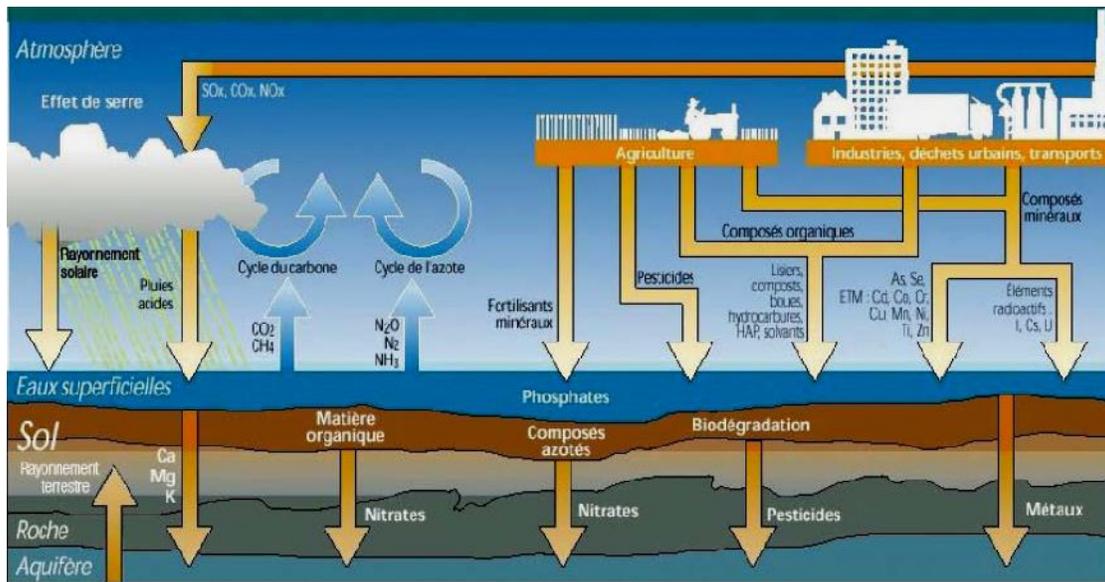


Figure 1.1. L'illustration du sol traversé par de nombreux flux de matières [1]

Cette prise de conscience de l'importance de la préservation des sols relève tant d'une politique nationale qu'internationale. Par exemple, dans le cadre de travaux liés à la communication sur les sols «Vers une stratégie thématique pour la protection des sols», adoptée par le Conseil européen de juin 2002, la Commission européenne a dressé la liste, par ordre de gravité décroissante, des principales menaces qui pèsent sur les sols:

- ✓ **érosion**, qui affecterait 17 % du territoire européen;
- ✓ **diminution** des teneurs en matières organiques, qui a pour conséquence la baisse de productivité agricole et la fragilisation des sols vis-à-vis de l'érosion;
- ✓ **contamination**, diffuse et locale;
- ✓ **salinisation**;
- ✓ **diminution de la biodiversité**;
- ✓ **tassement**, c'est-à-dire compaction des sols;
- ✓ **imperméabilisation**, sous l'effet de la croissance urbaine;
- ✓ **inondations et glissements de terrain** [3].

Dans le cadre de cette thèse réalisée en co-tutelle (ULCO France, Université «Vasile Alecsandri» de Bacau, Roumanie), cette problématique des pollutions des sols, plus précisément par des pollutions organiques de type hydrocarbures aromatiques polycycliques, a retenu notre attention en particulier concernant ces deux pays. Comme la plupart des pays

industrialisés, la France a hérité d'un long passé industriel durant lequel les préoccupations et les contraintes environnementales n'étaient pas celles d'aujourd'hui. Les conséquences de l'introduction de polluants dans l'eau, l'air et/ou les sols sans précaution particulière, étaient alors peu connues. Consciente de cette problématique, la France s'est attachée, dès le début des années 1990 à cerner l'ampleur des enjeux via la mise en place d'une politique nationale de réhabilitation et de surveillance des sites pollués en conjuguant des approches techniques et administratives (circulaire ministérielle du 3 décembre 1993 et suivantes) ce qui s'est traduit par une démarche exemplaire au niveau européen grâce à la réalisation d'inventaires de sites qui a donné naissance à deux bases de données BASIAS (inventaire des anciennes activités industrielles et activités de service), ainsi que BASOL, base des sites pollués ou potentiellement pollués qui appellent une action de l'administration. Ces deux outils, régulièrement mis à jour, constituent aujourd'hui des outils précieux de gestion des sols pollués et d'aménagement du territoire. Les enjeux d'une telle politique sont multiples et intègrent des préoccupations de santé humaine et d'environnement, d'aménagement du territoire, des coûts de réhabilitation et des enjeux technologiques et s'accompagnent en amont du développement d'une recherche scientifique.

Cette thématique de réhabilitation des sols est également en plein essor en Roumanie depuis son entrée dans l'union européenne le 1^{er} janvier 2007. En effet, le pays s'est doté d'une Stratégie Nationale pour la gestion des Sites Contaminés dont les deux principaux objectifs sont:

- ✓ de protéger la santé humaine et l'environnement en regard de la politique de la Roumanie et de l'Union Européenne,
- ✓ de veiller à un usage et à une gestion des ressources en sol et eaux dans un concept de développement durable.

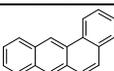
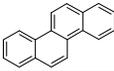
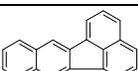
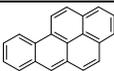
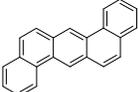
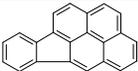
Du fait de l'industrialisation de la Roumanie, il existe une très grande diversité d'activités industrielles (industries minières et métallurgiques, industries pétrolières, chimiques, autres ...) ayant engendré des pollutions des sols et des eaux souterraines. Mon sujet de thèse s'inscrit dans la problématique des pollutions organiques liées aux activités pétrolières. Même si la situation est complexe du fait de la diversité des cas rencontrés, la Roumanie va bénéficier des expériences acquises dans d'autres pays européens tant d'un point de vue législatif que scientifique et technique. Un des objectifs de cette thèse est aussi, par mon intermédiaire, de permettre le transfert de cette expérience française en matière de sols pollués, de continuer à la fois cette collaboration et de stimuler le développement de cette thématique en Roumanie, mon pays d'origine [4-6].

1.2. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont une famille de composés organiques neutres et relativement stables, constitués exclusivement de carbone et d'hydrogène, et dont la structure moléculaire comprend au moins deux noyaux benzéniques non substitués, fusionnés dans un arrangement linéaire, angulaire ou en amas. On distingue deux catégories: les HAP dits «alternants», qui sont constitués uniquement de noyaux benzéniques, et les « non alternants », qui contiennent un cycle à cinq carbones.

Parmi les HAP, une liste restreinte est généralement considérée pour les études environnementales. Il s'agit de la liste des 16 HAP inscrits depuis 1976 sur la liste des polluants prioritaires établis par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement US-EPA, en raison de leurs propriétés toxiques (génotoxiques et cancérigènes). Leurs structures ainsi que leurs propriétés physico-chimiques sont présentées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP de la liste US-EPA [7-9]

Nom	Nb de cycles	Structure	Masse molaire (g·mol ⁻¹)	Coefficient de partage octanol-eau Log Kow	Solubilité aqueuse (mg·l ⁻¹)
Naphtalène	2		128,2	3,3	32
Acénaphtylène	3		152,2	4,07	3,93
Acénaphthène	3		154,2	3,98	3,42
Fluorène	3		166,2	6,58	1,9
Phénanthrène	3		178,2	4,45	1
Anthracène	3		178,2	4,45	0,07
Fluoranthène	4		202,3	4,9	0,27
Pyrène	4		202,3	4,88	0,16
Benzo(a)anthracène	4		228,3	5,61	0,0057
Chrysène	4		228,3	5,16	0,06
Benzo(b)fluoranthène	5		252,3	6,04	0,001
Benzo(k)fluoranthène	5		252,3	6,06	0,008
Benzo(a)pyrène	5		252,3	6,06	0,0038
Dibenzo(ah)anthracène	5		278,3	6,84	0,0005
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	6		276,3	6,58	0,0008
Benzo(ghi)pérylène	6		276,3	6,5	insoluble

En particulier, les fluoranthène, benzo(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenz(a,h)anthracène, indéno(1,2,3-c,d)pyrène et benzo(g,h,i)perylène sont des HAP référencés parmi les polluants organiques persistants (POP) selon deux textes internationaux, le protocole d'Aarhus signé en juin 1998 et la convention de Stockholm signée en mai 2001 [10, 11].

Les POP (dont les représentants les plus connus appartiennent à la famille des dioxines/furannes) sont des molécules complexes qui, contrairement aux autres polluants

atmosphériques, ne sont pas définies à partir de leur nature chimique mais à partir de quatre propriétés qui sont les suivantes [12]:

- ✓ *Toxicité* : elles présentent un ou plusieurs impacts prouvés sur la santé humaine.
- ✓ *Persistance dans l'environnement* : ce sont des molécules résistantes aux dégradations biologiques naturelles. Ces molécules se dégradent de 50 % sur une durée de 7 à 8 ans.
- ✓ *Bioaccumulation* : ce sont des molécules qui s'accumulent dans les tissus vivants et dont les concentrations augmentent le long de la chaîne alimentaire.
- ✓ *Transport longue distance*: de par leurs propriétés de persistance et de bioaccumulation, ces molécules ont tendance à se déplacer sur de très longues distances et se déposer loin des lieux d'émission, typiquement des milieux chauds (à forte activité humaine) vers les milieux froids (en particulier l'Arctique).

Les substances qui font partie de ces POP se répartissent en trois catégories:

- ✓ substances produites non intentionnellement par des activités humaines (par exemple les HAP);
- ✓ substances issues de la fabrication et de l'utilisation de produits chimiques;
- ✓ substances issues de l'utilisation de pesticides.

Les HAP sont des contaminants omniprésents dans l'environnement du fait de différents processus soit naturels (incendies de forêts et d'herbage, activités volcaniques, biosynthèse par des organismes vivants) soit anthropogéniques: accidents d'exploitation, de transport ou lors de l'utilisation de carburants fossiles, pyrolyse des matières organiques à haute température, combustion des charbons et pétroles. Ce dernier processus constitue la principale voie d'introduction des HAP dans l'environnement et concerne les sites industriels suivants: usines de cokéfaction et de liquéfaction du charbon, usines pétrochimiques, usines de produits asphaltés et de l'industrie du traitement et de la préservation du bois (utilisation de la créosote). Avec les solvants chlorés et les alcanes, ces molécules font partie des familles de polluants organiques majoritaires et représentent 17,80% des cas de sites pollués en France et 23,5% en région Nord-Pas de Calais (environ 120 cas sur un total de 511 sites répertoriés en région Nord-Pas de Calais). La plupart des sites pollués par les HAP se trouvent le plus souvent à proximité et parfois au sein même des agglomérations urbaines ce qui peut engendrer des risques pour les populations avoisinantes.

Le devenir des HAP dans l'environnement dépend notamment de leurs propriétés physico-chimiques, comme par exemple la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la constante de Henry, le coefficient de partage octanol/eau et le coefficient de partage du

carbone organique. D'une manière générale, à l'exception du naphthalène, la plupart des HAP sont peu volatils, peu solubles dans l'eau, hydrophobes et ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et notamment les matières organiques. Ces propriétés les rendent résistants à la biodégradation naturelle et par conséquent très persistants dans les différents compartiments de l'environnement (atmosphère, sol, sédiment, eaux continentales et marines) d'où leur appartenance aux polluants organiques persistants. Par ailleurs, les HAP sont toxiques et certains d'entre eux sont susceptibles d'être cancérigènes et mutagènes (i.e. benzo[a]pyrène).

Les HAP, d'après leur nombre de carbones, peuvent être séparées en deux catégories:

- ✓ *faible poids moléculaires* (jusqu'à trois cycles)
- ✓ *haut poids moléculaires* (plus de trois cycles)

Notre étude s'est focalisée sur une molécule de haut poids moléculaire: le benzo[a]pyrène (BaP). Ce polluant est composé de cinq noyaux aromatiques où les cycles sont arrangés de façon groupée. Le BaP a une très faible solubilité aqueuse (0,0038 mg/L), une pression de vapeur des $5 \cdot 10^{-7}$ torrs, et un coefficient octanol/eau élevé (6,06), qui implique sa préférence aux phases non aqueuses. Ce produit chimique présente des caractéristiques très toxiques pour la santé humaine et l'environnement. Il a pour origine les processus pyrolytiques et le stockage de pétrole, d'où sa présence dans le sol. En raison de ses propriétés physico-chimiques, le BaP présente des difficultés importantes pour être enlever de l'environnement. Sa dégradation peut se réaliser par différents processus.

1.3. Les processus d'oxydation

L'oxydation est une réaction électrochimique, dans laquelle un composé perd un ou plusieurs électrons. L'oxydation chimique est un processus innovateur prometteur pour dégrader une variété de composés dangereux dans la remédiation du sol. La remédiation des sols par oxydation peut s'appliquer au traitement des polluants en zone saturée et en zone insaturée. Depuis quelques années, des procédés d'oxydation avancés ont été développés pour la remédiation des sols. Les oxydants employés doivent être capables de dégrader les composants organiques en composés non nocifs. L'oxydation chimique peut être appliquée *in situ* c'est-à-dire directement dans le milieu contaminé sans excavation des sols ou pompage des eaux préalable, et *ex situ* c'est-à-dire hors du milieu (zone non saturée et zone saturée) contaminé [13].

Le permanganate est un agent oxydant qui agit préférentiellement sur la double liaison carbone-carbone des composés organiques. Les composés intermédiaires de la dégradation de la plupart des polluants sont instables et éphémères. La cinétique de la réaction est rapide pour la plupart des polluants. Il peut oxyder les alcènes, les composés aromatiques, les HAP, les phénols, les pesticides et les acides organiques [14].

L'ozone est un des oxydants gazeux, il a un potentiel d'oxydation élevé. Cependant, comme pour le peroxyde, les réactions d'oxydation ne font pas seulement appel à des échanges d'électrons, mais aussi, à la formation de radicaux libres; les deux voies pouvant s'effectuer simultanément avec des efficacités différentes. Les radicaux libres formés sont des hydroxyles OH[•] [15].

Le persulfate de sodium (Na₂S₂O₈) est un oxydant qui émerge, son utilisation est en phase de commercialisation. La cinétique de l'ensemble de la chaîne réactionnelle de dégradation des polluants organiques, est plus lente que pour les autres oxydants. Les réactions mises en jeu varient en fonction des conditions du milieu: pH, température, présence d'autres constituants, etc. Les activateurs de production de radicaux sont : la présence de fer, la présence de H₂O₂, une température élevée et un pH élevé [13].

La réaction de Fenton a été la plus utilisée comme agent de remédiation. En particulier, plusieurs essais *in situ* à grande échelle ont montré son efficacité comme traitement pour la remédiation des sols avec un coût raisonnable [16, 17].

La réaction de Fenton produit, par voie chimique, des radicaux hydroxyles OH[•] qui sont des espèces chimiques très réactives:



Ils réagissent avec la quasi totalité des composés organiques. Le système de Fenton classique consiste en un simple mélange de deux réactifs, le fer ferreux et le peroxyde d'hydrogène. D'autres systèmes Fenton ont été développés ces dernières années pour améliorer les performances de ce procédé et réduire le coût d'utilisation dans certains cas. Il s'agit des procédés photo-Fenton et électro-Fenton [18]. Si l'oxydation chimique présente l'avantage d'une très forte réactivité, deux inconvénients majeurs sont à souligner :

- ✓ le manque de spécificité, conduisant à la destruction quasi-totale du pool organique du sol (matière organique, faune et microflore endogènes), qui peut conduire également à la formation de composés plus toxiques que le polluant initial.
- ✓ la nécessité que le polluant soit en phase aqueuse pour être dégradé par les radicaux hydroxyles [17].

Pour améliorer l'efficacité de cette réaction de Fenton, récemment, des auteurs ont utilisé des polysaccharides comme surfactants pour ces polluants.

1.4. Les polysaccharides naturels, agents de solubilisation du BaP

Dans des travaux récents, l'intérêt d'utiliser des oligosaccharides (de type cyclodextrines) possédant une cavité hydrophobe qui encapsule des polluants par complexation a été étudié. Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques constitués de 5 à 12 motifs de glucose reliés par des liaisons α (1 \rightarrow 4). Ces molécules se présentent sous une forme conique tronquée (Figure 1.2.) qui implique l'existence de deux faces de dimensions différentes: la périphérie bordée par les groupements hydroxyles primaires constitue la face plus étroite, alors que les groupements hydroxyles secondaires font partie de la face la plus large [19]. Si la présence de ces fonctions alcool explique le caractère fortement hydrophile de l'extérieur du cône, l'existence des deux séries de protons H_3 et H_5 (globalement disposés en cercles) à l'intérieur du macrocycle confère à la cavité un caractère apolaire et donc hydrophobe. Cette combinaison de zones hydrophile et hydrophobe est d'ailleurs à l'origine du phénomène d'inclusion en solution aqueuse. Par exemple, la formation du complexe HAP/cyclodextrine entraîne la modification des propriétés physico-chimiques des molécules invitées, notamment leur solubilité et par conséquent augmente leur transfert en phase aqueuse [20].

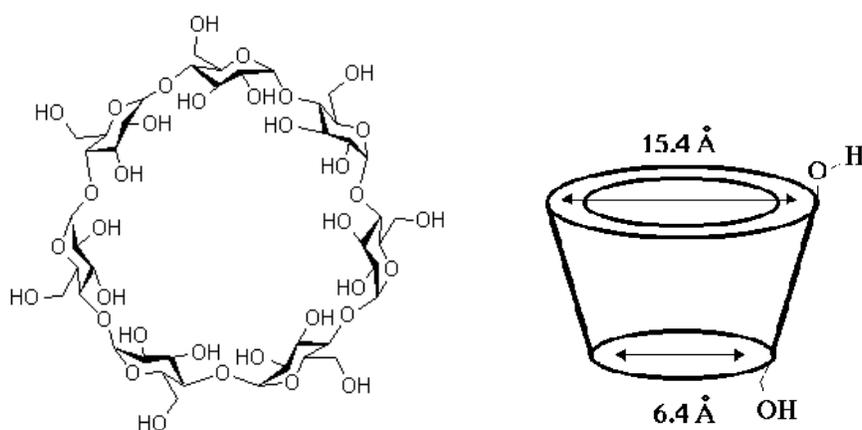


Figure 1.2. Structure des β -cyclodextrines [19]

Le transfert des polluants en phase aqueuse augmente ainsi leur sensibilité aux agents d'oxydation tels que les radicaux hydroxyles impliqués dans les premières étapes d'oxydation [2, 3]. Cependant, l'utilisation des cyclodextrines dans des procédés de remédiation des sols

se heurte à un double handicap: le coût élevé de telles molécules et leur unique cavité limitant ainsi leurs propriétés surfactantes.

Rappelons que les HAP en particulier ceux de haut poids moléculaire présentent une faible solubilité, ils sont donc fortement adsorbés sur la matière organique des sols ce qui limite leur transfert en phase aqueuse et par conséquent leur dégradation. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous envisageons de développer une approche utilisant des polysaccharides naturels tels que l'amidon, abondant et peu onéreux, de taille moléculaire importante, possédant de nombreuses cavités hydrophobes ce qui pourrait augmenter l'efficacité de la réaction de Fenton mais l'oxydation du benzo[a]pyrène par voie biologique (Chapitres 2, 3 & 4).

1.5. Les processus de biodégradation du BaP

La biodégradation est un phénomène naturel basé sur le rôle important des microorganismes dans l'environnement, en tant qu'agents biogéochimiques, intervenant dans la conversion partielle ou totale de molécules organiques complexes en métabolites allant parfois jusqu'à la production de CO₂ et d'H₂O. Dans ce cas où la biodégradation est complète, le terme de minéralisation est alors employé [21].

La bioremédiation est le procédé biotechnologique qui consiste à utiliser intentionnellement la diversité du métabolisme des microorganismes présents dans un compartiment de l'environnement pour dégrader les polluants. Cela consiste à stimuler les processus naturels existants pour en augmenter l'efficacité et le rendement. La bioremédiation peut se réaliser dans tous les milieux (sol, eau et air). Les étapes pour faire une bioremédiation d'un sol sont les suivantes:

- ✓ vérifier si la flore microbienne autochtone est compétente;
- ✓ sélectionner parmi les microorganismes présents ceux capables de survivre à une forte concentration du toxique et capables de le dégrader;
- ✓ améliorer de façon ciblée les conditions de l'environnement sur place (par l'apport de nutriments par exemple) [22].

Le développement de nouveaux procédés biotechnologiques pour épurer les sols des toxiques est décliné selon deux principes:

Biostimulation: optimisation des conditions du milieu afin d'accélérer le développement des micro-organismes, et par conséquent les processus de biodégradation (apports de nutriments, oxygénation,...).

Bioaugmentation: augmentation des populations microbiennes d'un environnement par inoculation de micro-organismes (soit autochtones, soit allochtones).

En ce qui concerne les HAP, les processus biotiques, tels que la biodégradation, représentent les phénomènes prépondérants de la transformation de ces polluants, en particulier dans les sols et les sédiments. Parmi les différentes techniques de réhabilitation des sols pollués actuellement disponibles, la bioremédiation s'est développée lors de ces dernières décades comme une alternative rentable et prometteuse en complément de la phytoremédiation, technologie basée sur l'utilisation de plantes et de leurs micro-organismes associés pour extraire, contenir ou immobiliser les polluants d'un sol contaminé [23]. D'une manière générale, les travaux conduits sur la bioremédiation ont souligné d'une part les capacités de différents types d'organismes vivants (bactéries, champignons, algues), qui possèdent des capacités cataboliques à dégrader les HAP de faible poids moléculaire tel que le naphthalène, l'acénaphène et le phénanthrène [24, 25]. Cependant, ces recherches soulignent également les limites des systèmes biologiques pour la dégradation des HAP de haut poids moléculaire (contenant plus de trois noyaux aromatiques) qui sont généralement récalcitrants à l'attaque microbienne [21, 26]. La persistance des HAP à la dégradation microbienne augmente directement avec la masse molaire et leur hydrophobicité. Cette difficulté et cette lenteur des processus de dégradation des HAP les plus récalcitrants (> 4 cycles) sont dues essentiellement à deux facteurs limitants: la faible biodisponibilité des HAP et la difficulté d'amorcer l'oxydation de molécules aussi stables chimiquement, ce qui limite encore souvent les applications en termes de volumes et de cas traités [21]. En ce qui concerne les HAP de haut poids moléculaire tel que le benzo[a]pyrène, de nombreux travaux soulignent une efficacité accrue des champignons [21, 27] comparée à celle des bactéries [27].

D'après la littérature, les champignons métabolisent les HAP grâce à deux voies d'oxydation (figure 1.3). Le premier mécanisme fait intervenir des systèmes enzymatiques extracellulaires (de type Lignines Peroxydases, Peroxydases Manganèse-dépendantes et Laccases) mis en œuvre chez les champignons de la pourriture blanche tels que *Phanerochaete chrysosporium*. Il a été rapporté que ce champignon dégrade le phénanthrène, le fluorène, l'anthracène et le pyrène dans les cultures en conditions limitantes en azote [28]. La dégradation du BaP en anhydride carbonique et en eau a été également rapportée: on parle alors de minéralisation [29, 30]. Le second mécanisme de dégradation met en œuvre des

systèmes enzymatiques caractéristiques des cellules eucaryotes de type cytochrome P450 qui oxydent les HAP en arènes oxydes.

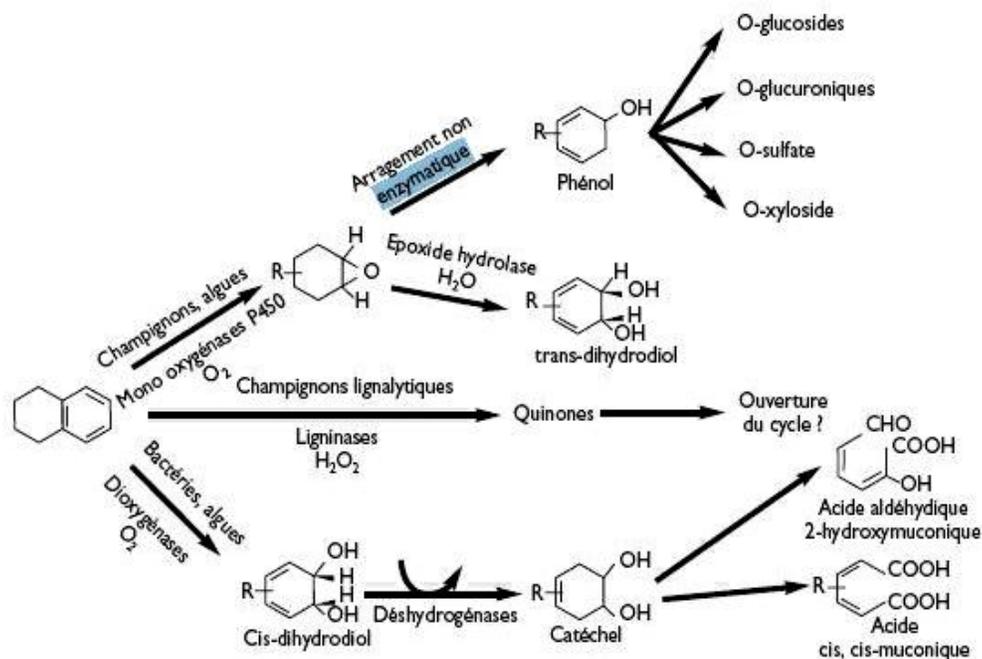


Figure 1.3. Voies métaboliques microbiennes de dégradation des HAP [31]

La plupart des mécanismes rapportés résultent d'un co-métabolisme, c'est à dire en présence d'une autre source de carbone utilisée pour l'énergie et la croissance.

J'ai réalisé l'ensemble de ces travaux au sein de l'équipe de mycologie de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) à l'ULCO. L'axe principal de cette équipe de recherche est basé sur l'étude des activités de biodégradation de *Fusarium solani* et d'autres champignons saprotrophes telluriques sur les HAP et plus particulièrement sur le BaP [30, 32-34].

1.6. Plan de thèse

La thèse est structurée en quatre chapitres principaux. Après le premier chapitre consacré à l'introduction générale qui resitue la problématique de la dégradation de molécules hydrophobes dans un sol, le second chapitre comporte une étude théorique par modélisation moléculaire des interactions entre le BaP, le Fe^{2+} et des polysaccharides comme acteurs de la réaction de Fenton. Ces études de modélisation nous guideront dans notre approche expérimentale.

Dans le troisième chapitre, des modifications par synthèse chimique sont réalisées avec pour principaux objectifs d'accroître la solubilité des matrices polysaccharidiques et de stimuler les propriétés catalytiques de ces matrices en améliorant la proximité spatiale entre le polluant et l'agent oxydant.

Suite à ces modifications chimiques réalisés, le chapitre quatre présente dans un premier volet l'étude des propriétés physico-chimiques de ces nouvelles matrices polysaccharidiques. Le second volet restitue les premiers essais d'utilisation de ces polysaccharides modifiés dans des procédés de dégradation couplant une réaction d'oxydation chimique par réaction de Fenton: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ et un processus biologique utilisant des champignons. Le développement de tels systèmes catalytiques éco-compatibles préservant l'intégrité de la structure et des fonctions du sol pourrait être valorisé dans des processus de réhabilitation des sols pollués.

Références bibliographiques

- [1] Ifen, d'après Robert M. (1996). *Le sol : interface dans l'environnement, ressource pour le développement*. In Masson, Paris, p. 244.
- [2] Stegmann R., Brunner G., Calmano W., Matz G. (2011). *Treatment of contaminated soil*, Fundamentals Analysis Applications, Berlin, Springer-Verlag.
- [3] Institut Français de l'Environnement (2006). *Le sol et le sous-sol*. In Les synthèses, p. 251-272.
- [4] Bullock P., Jones R.J.A., Houšková B., Montanarella L. (2003) *Soil Resources of Europe: An Overview*, Research bureau, vol. Report N° 9., p. 15-34.
- [5] Ministry of Environment and Sustainable Development (2008). *National Strategy for Management of Contaminated Sites*, Romania, Second Report, vol. 9S2318.
- [6] Ministry of Environment and Sustainable Development (2008). *National Strategy for Management of Contaminated Sites*, Romania, In 5th Report, vol. 9S2318.01.
- [7] Manoli E., Samara C. (1999). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis*. Trends Analytical Chemistry, 18, p. 417-428.
- [8] Martens D.A., Frankenberger Jr.W.T. (1995). *Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil treated with an advanced oxidative process-Fenton's reagent*. Journal of Soil Contamination, 4, p. 175-190.
- [9] Verschueren K. (1996). *Handbook of environmental data on organic chemicals*, New York, Edition Pub.Co.3ème.
- [10] United Nations Economic Commission for Europe (2009). *The 1998 Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants (POPs)*, Appendice ECE/EB.AIR/2009/14
- [11] *Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs)* (2009), Published by the Secretariat of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
- [12] <http://www2.ademe.fr/servlet/getDoc?id=11433&m=3&cid=96>, (POP), Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, consulté le 2.09.2011.
- [13] Goi A., Trapido M., Kulik N. (2009). *Contaminated Soil Remediation with Hydrogen Peroxide Oxidation*. World Academy of Science, Engineering and Technology, 52, p. 185-189.
- [14] Rivas, F.J. (2006). *Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments*. Journal of Hazardous Materials, 138, p. 234-251.

-
- [15] Rivas F.J., De la Calle G.R., Álvarez, P., Acedo B. (2008). *Polycyclic aromatic hydrocarbons sorption on soils: Some anomalous isotherms*. Journal of Hazardous Materials, 158, p. 375-383.
- [16] Fenton H.J.H. (1894). *Oxidation of tartaric acid in the presence of iron*. Journal of the Chemical Society Transactions, 65, p. 899-911.
- [17] Flotron V., Delteil C., Padellec Y., Camel, V. (2005). *Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process*. Chemosphere, 59, p. 1427-1437.
- [18] Flotron V. (2004). *La réaction de Fenton comme procédé de réhabilitation dans le traitement des eaux: application à la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux et les boues résiduaires*, Thèse de doctorat, Institut National Agronomique, Paris-Grignon, 330 p.
- [19] Szejtli J. (1998). *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. Chemical Reviews, 98, p. 1743-1753.
- [20] Veignie E., Rafin C., Landy D., Fourmentin S., Surpateanu G. (2009). *Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene*. Journal of Hazardous Materials, 168, p. 1296-1301.
- [21] Cerniglia C.E. (1992). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biodegradation, 3, p. 351-368.
- [22] Sutton N.B., Grotenhuis J.T.C., Langenhoff A.A.M., Rijnaarts H.H.M. (2010) *Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: A review of optimization strategies*. Journal of Soils and Sediments, 11, p. 129-140.
- [23] Mench M., Lepp N., Bert V., Schwitzguébel J.P., Gawronski S.W., Schröder P., Vangronsveld J. (2009) *Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859*. Journal of Soils and Sediments, 10, p. 1039-1070.
- [24] Kästner M., Breuer-Jammali M., Mahro B. (1998). *Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil*. Applied and Environmental Microbiology, 64, p. 359-362.
- [25] Kästner M., Breuer-Jammali M., Mahro B. (1994). *Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41, p. 267-273.

-
- [26] Erickson D.C., Loehr R.C., Neuhauser E.F. (1993). *PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils*. Water Research, 27, p. 911-919.
- [27] Jouanneau Y., Meyer C., Jakoncic J., Stojanoff V., Gaillard J. (2006). *Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biochemistry, 45, p. 12380-12391.
- [28] Bumpus J.A. (1989). *Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 55, p. 154-158.
- [29] Sanglard D., Leisola M.S.A., Fiechter A. (1986). *Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo(a)pyrene by Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme and Microbial Technology, 8, p. 209-212.
- [30] Veignie E., Rafin C., Woisel P., Sahraoui A.L.H., Cazier F. (2002). *Metabolization of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo(a)pyrene by a non-white rot fungus (Fusarium solani) in a batch reactor*. Polycyclic Aromatic Compounds, 22, p. 87-97.
- [31] Augustin J., Muncnerova D. (1994). *Degradation pathways of aromatic hydrocarbons fungi and bacteria*. Biologia, 49, p. 289-299.
- [32] Potin O., Rafin C., Veignie E. (2004). *Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil*. International Biodeterioration & Biodegradation, 54, p. 45-52.
- [33] Rafin C., Potin O., Veignie E., Lounes-Hadj Sahraoui A., Sancholle M. (2000). *Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, Fusarium solani*. Polycyclic Aromatic Compounds, 21, p. 311-329.
- [34] Rafin C., Veignie E., Woisel P., Cazier F. (2004). *Intérêt des champignons telluriques dans des processus de bioremédiation de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques*. Déchets, Revue francophone d'écologie industrielle, vol. 33. p. 37-11.

Chapitre 2

*Etude par modélisation moléculaire de la formation d'un complexe
entre des polysaccharides, le benzo[*a*]pyrène et le cation Fe^{2+}*

Sommaire

2.1.	<i>Introduction</i>	28
2.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	29
2.2.1.	<i>Méthodes de modélisation moléculaire</i>	29
2.2.2.	<i>Présentation des molécules étudiées</i>	29
2.2.3.	<i>Présentation des techniques d'inclusion</i>	32
2.2.3.1.	<i>Etude d'inclusion du cation Fe^{2+}</i>	32
2.2.3.2.	<i>Etude d'inclusion de la molécule de Sa\bar{D}</i>	34
2.3.	<i>Résultats et discussion</i>	35
2.3.1.	<i>Réactivité de la molécule de Sa\bar{D}</i>	35
2.3.2.	<i>Inclusion de la molécule de Sa\bar{D} dans les polysaccharides</i>	37
2.3.3.	<i>Inclusion du cation Fe^{2+} dans les polysaccharides</i>	41
2.4.	<i>Conclusion</i>	44
	<i>Références bibliographiques</i>	45

2.1. Introduction

Contrairement aux domaines classiques de la chimie qui ont une longue tradition, la chimie informatique et la modélisation moléculaire sont relativement nouvelles. Malgré leur jeunesse, ces méthodes sont de plus en plus utilisées et ont un avenir prometteur. On classe les méthodes actuelles de calcul en plusieurs catégories selon le niveau de théorie qu'elles utilisent ou bien selon le type de calcul qu'elles réalisent. On définit la mécanique quantique et la mécanique moléculaire qui sont les deux approches limites par rapport à la théorie utilisée. On distingue les calculs « single-point » et les optimisations de géométrie des molécules, les calculs de diverses propriétés chimiques ou les calculs de recherche conformationnelle [1]. On peut utiliser chacune de ces approches aux différents niveaux de la théorie utilisée. La seule limitation est la taille du système étudié et l'équipement de calcul disponible. Toutefois, il faut se rendre compte que la modélisation moléculaire chimique ne produit que des résultats numériques; l'évaluation de la qualité de ces résultats et l'appréciation de leur fiabilité sont du ressort du scientifique qui emploie cet outil [2].

La modélisation moléculaire s'affirme donc aujourd'hui comme un outil de choix pour la compréhension des systèmes de plus en plus complexes. Nos études sont menées sur des systèmes moléculaires comme le couplage entre un polysaccharide et le benzo[a]pyrene (BaP). Les polysaccharides étudiés sont l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HPBCD), l'amidon et ses deux polymères constitutifs (amylose et amylopectine).

L'amidon se présente sous forme de granules semi-cristallins composés principalement de deux homopolymères d' α -D-glucopyranose: l'amylose et l'amylopectine. L'amylose représente 15 à 30% de la plupart des amidons. C'est une molécule linéaire composée d'unités D-glucopyranose liées par des liaisons de type α (1-4). L'amylopectine est le constituant principal de la plupart des amidons (70 à 100%). Contrairement à la longue chaîne linéaire d'amylose, l'amylopectine est composée de multiples courtes chaînes d'unités glucose, reliées entre elles par des liaisons α (1-6) pour former une molécule arborescente [3, 4].

L'objectif de cette étude de modélisation moléculaire est de déterminer la possibilité de formation d'un complexe tripartite entre le polysaccharide, la molécule de BaP et le cation ferreux (Fe^{2+}), afin d'optimiser la réaction de Fenton par la proximité spatiale des réactifs. Pour cela, nous avons d'abord étudié la réactivité chimique de la molécule de BaP, puis

l'inclusion du BaP et du Fe²⁺ dans les polysaccharides en s'intéressant aux énergies de complexation de chaque produit obtenu.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Méthodes de modélisation moléculaire

Les molécules étudiées ont été construites à partir des données fournies par la base de données «Structural Database System of Cambridge Crystallographic Data Center» [5]. Ensuite, les calculs ont été développés en utilisant les bibliothèques PDB-CaChe [6].

Pour obtenir les conformères les plus stables des molécules étudiées, nous avons utilisé une procédure basée sur une recherche multiconformationnelle de la mécanique moléculaire (MM3), puis des calculs semi-empiriques AM1 et le modèle de solvation AM1-COSMO [7].

La mécanique moléculaire a pour objectif d'estimer l'énergie d'une molécule en appliquant les lois de la mécanique classique à l'échelle atomique. La recherche des conformères plus stables avec MM3 consiste en l'étude de la variation de l'énergie potentielle de l'ensemble moléculaire, en fonction de la variation des angles de torsion. Le rôle de la fonction d'énergie potentielle est de reproduire les interactions du système aussi fidèlement que possible [8]. Quand le minimum énergétique est atteint par la recherche multiconformationnelle MM3, la conformation obtenue est minimisée, sans imposer de restriction, en utilisant Hamiltonian semi-empirique AM1 (en phase gazeuse ou en milieu aqueux). Certes, la valeur de l'énergie obtenue par AM1 en milieu aqueux (AM1-COSMO) peut être considérée comme le paramètre le plus souhaitable pour décrire les conformations des molécules dans des milieux aqueux [9, 10].

2.2.2. Présentation des molécules étudiées

Notre étude s'est focalisée sur la complexation des polysaccharides avec les molécules impliquées dans la réaction de Fenton : le BaP, comme polluant étudié, et le cation Fe²⁺, comme acteur dans la réaction de Fenton. Nous avons étudié l'HPBCD et la molécule d'amidon, dont les structures spatiales obtenues avec le logiciel CaChe sont respectivement présentées figure 2.1. et figure 2.2.

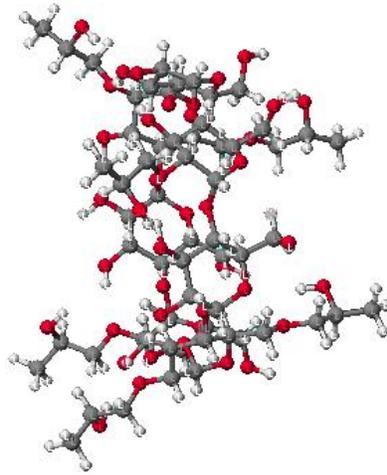


Figure 2.1. La géométrie spatiale de la molécule d'HPBCD donnée par le logiciel CaChe

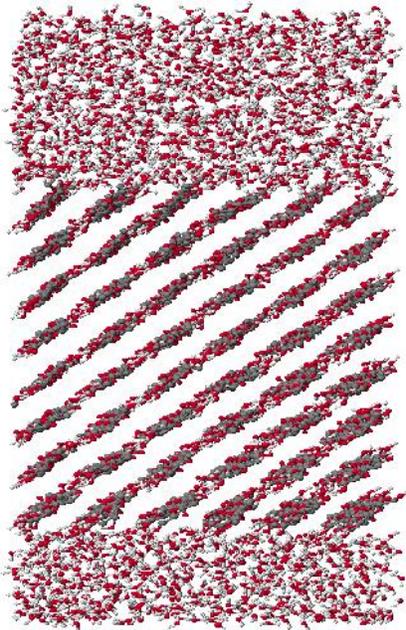


Figure 2.2. La géométrie spatiale d'un fragment d'amidon donnée par le logiciel CaChe

Plus précisément, la structure de l'amidon est composée de deux homopolymères de D-glucose. L'amidon est composé de deux polymères de structure primaire différente: l'amylose, molécule linéaire, et l'amylopectine, molécule ramifiée. Les unités D-glucosyl (conformation chaise) sont liées majoritairement par des liaisons de type α (1-4) (95-96%) et, dans une moindre mesure, par des liaisons de type α (1-6) (4-5%) [3].

La structure de l'amylose donné par le logiciel CaChe est présentée dans la figure 2.3. comme une spirale.

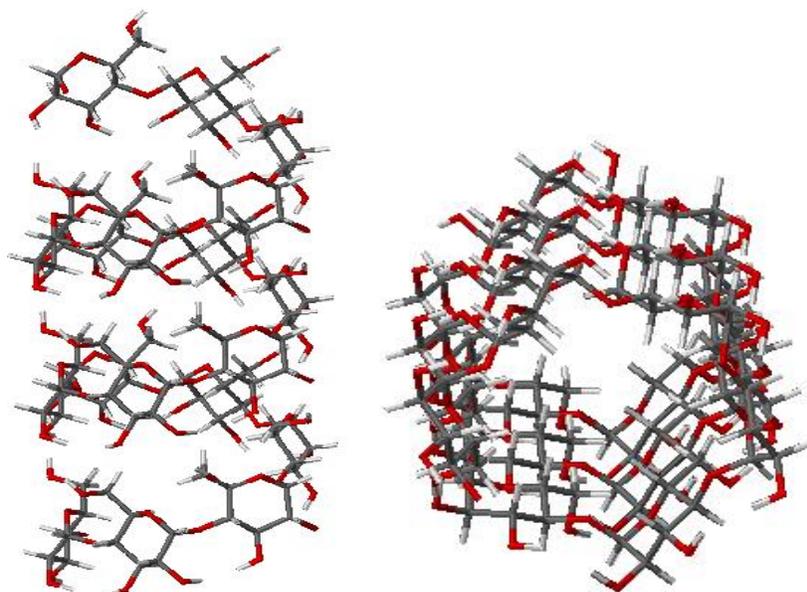


Figure 2.3. La conformation en spirale de l'amylose donnée par le logiciel CaChe

La structure ramifiée de l'amylopectine est présentée dans la figure 2.4.

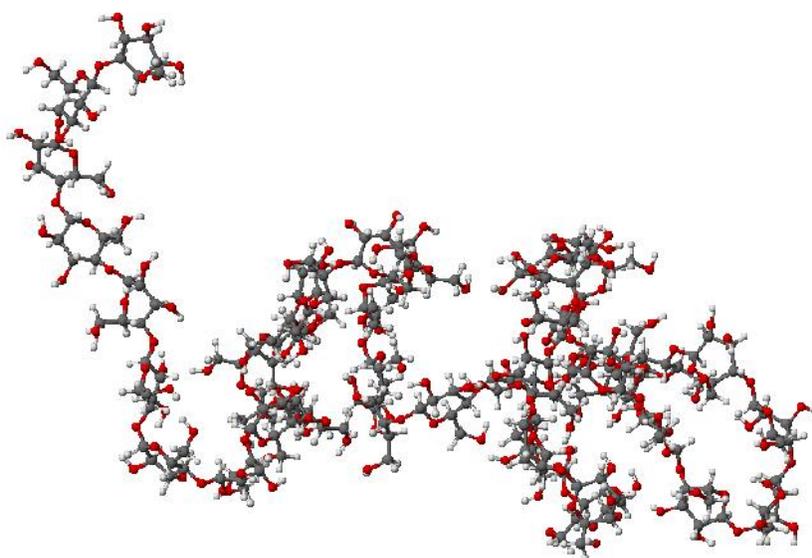


Figure 2.4. La structure de l'amylopectine donnée par le logiciel CaChe

Ces molécules de polysaccharides nous ont servi de matrice pour les études de complexation avec la molécule de BaP et avec le cation Fe^{2+} .

La géométrie spatiale de la molécule de BaP avec la numérotation donnée par le logiciel CaChe est présentée dans la figure 2.5.

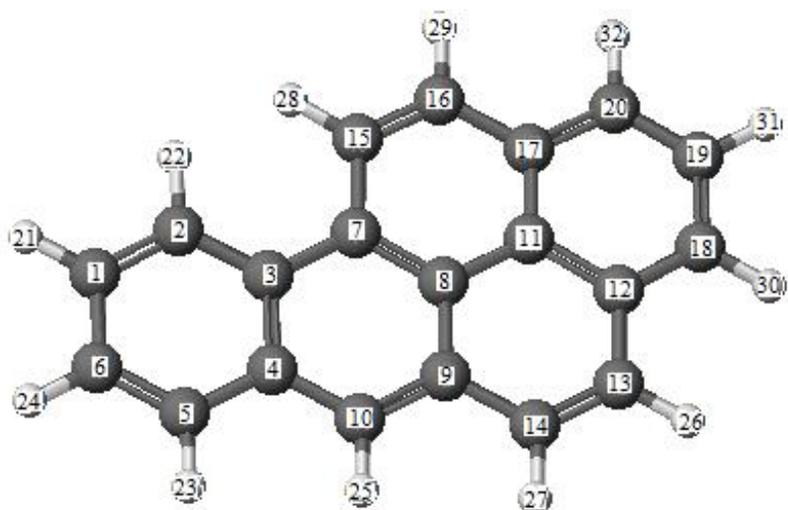


Figure 2.5. La géométrie spatiale de la molécule de BaP avec la numérotation des atomes donnée par le logiciel CaChe

2.2.3. Présentation des techniques d'inclusion

La complexation entre le cation Fe^{2+} et le BaP est réalisée par l'élaboration d'une procédure spécifique de docking pour étudier l'inclusion des invités (Fe^{2+} et BaP) dans les molécules étudiées [11], notre but étant de déterminer si le complexe peut se former.

2.2.3.1. Etude d'inclusion du cation Fe^{2+}

La complexation avec le cation Fe^{2+} est testée pour la molécule d'HPBCD et les deux composants d'amidon. Dans le cas de l'HPBCD, la complexation est réalisée sur les deux faces (primaire et secondaire).

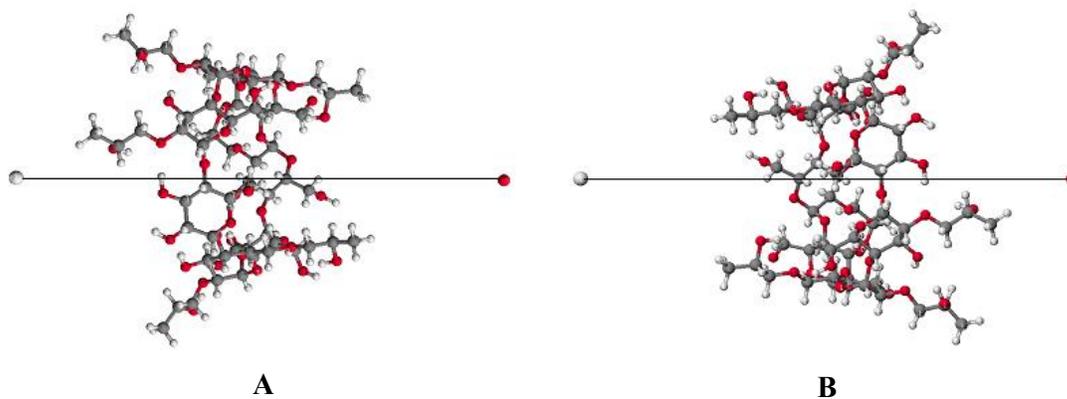


Figure 2.6. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du Fe^{2+} avec l'HPBCD. **A.** Face primaire, **B.** Face secondaire

Dans le cas du fragment d'amidon, nous avons supposé l'existence de deux sites potentiels de fixation du cation Fe^{2+} , comme présentés dans la figure 2.7.

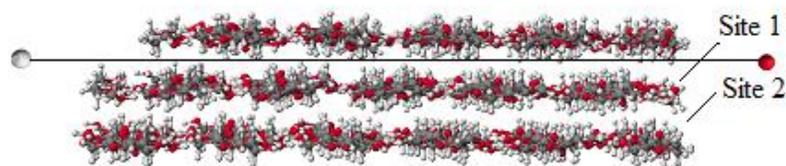


Figure 2.7. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du Fe^{2+} avec le fragment d'amidon

La complexation du Fe^{2+} est ensuite étudiée sur un fragment d'amylose d'une part et d'autre de la spirale.

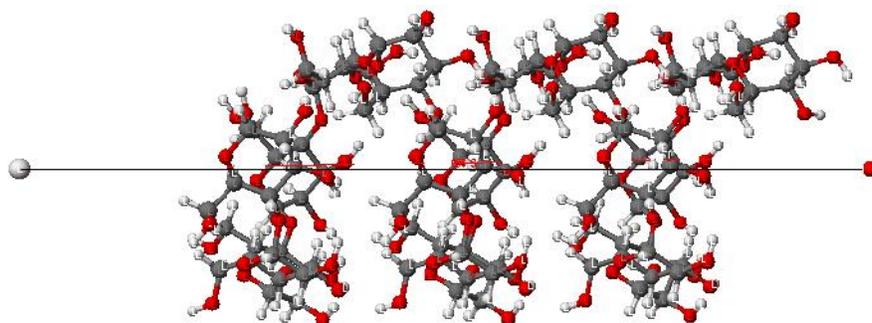


Figure 2.8. La technique stéréochimique utilisée pour la complexation du Fe^{2+} avec l'amylose

Dans le cas du fragment d'amylopectine présenté figure 2.9., nous avons supposé l'existence de six sites capables de former des complexes avec le cation Fe^{2+} .

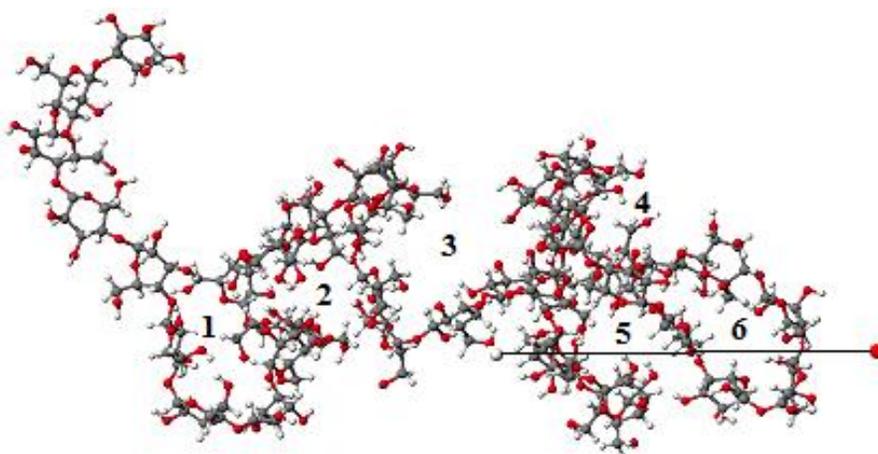


Figure 2.9. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du Fe^{2+} avec l'amylopectine

2.2.3.2. Etude d'inclusion de la molécule de BaP

Cette même étude d'inclusion est ensuite conduite avec la molécule de BaP vis à vis de tous les sites précédemment considérés. Dans la figure 2.10. sont présentées les techniques d'inclusion pour la molécule d'HPBCD.

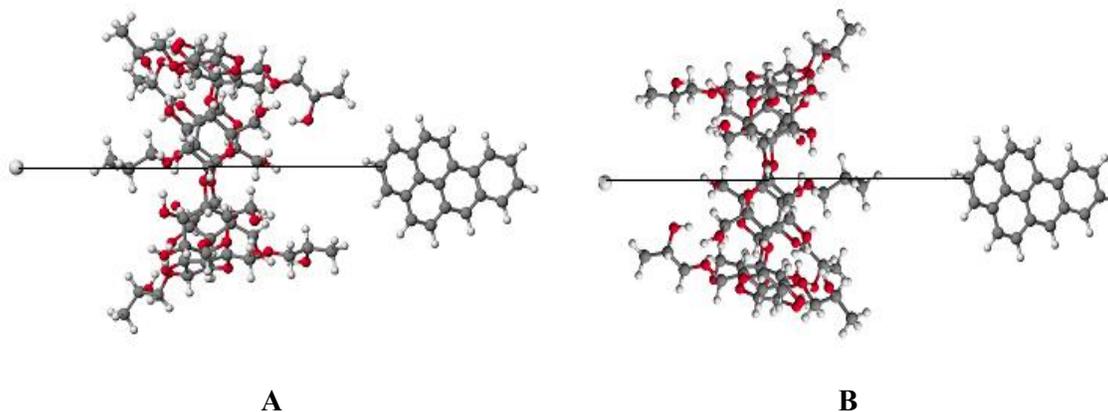


Figure 2.10. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du BaP avec l'HPBCD. **A.** Face primaire, **B.** Face secondaire

La complexation de la molécule de BaP est ensuite étudiée pour l'amylose d'une part et d'autre de la spirale (figure 2.11.), que nous appellerons dans la suite voie droite et voie gauche.

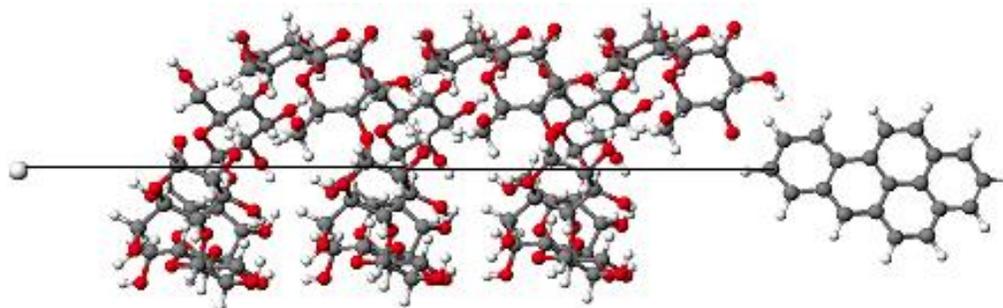


Figure 2.11. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du BaP avec l'amylose

Comme dans le cas de la complexation du cation Fe^{2+} avec le fragment considéré de l'amylopectine, nous avons supposé aussi l'existence de six sites capables de former des complexes avec la molécule de BaP.

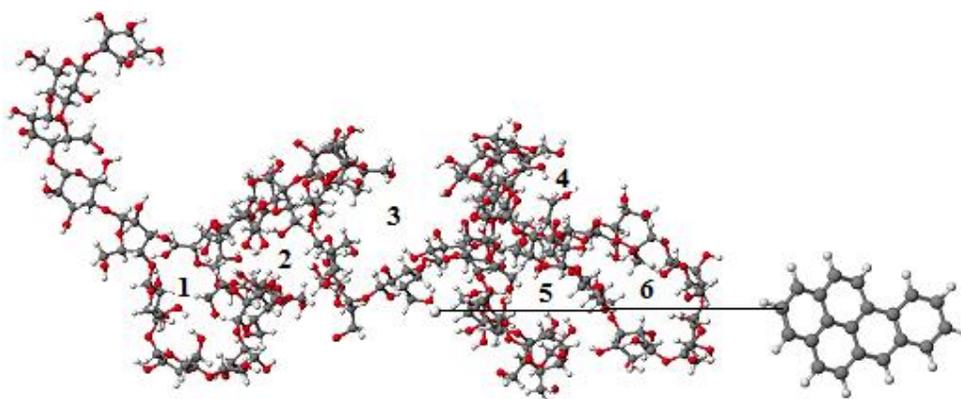


Figure 2.12. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation de BaP avec l'amylopectine

Après ces inclusions, nous avons employé une recherche conformationnelle en utilisant le champ des forces MM3 incorporé dans les bibliothèques CaChe. L'hôte est maintenu rigide et l'invité est laissé libre, sans restriction [12]. La structure la plus stable obtenue par cette procédure est ensuite minimisée sans aucune contrainte par des procédures de mécanique moléculaire (MM3) et mécanique quantique.

2.3. Résultats et discussion

2.3.1. Réactivité de la molécule de BaP

Sur la molécule de BaP plus stable trouvée par la méthode AM1-COSMO, nous avons calculé les coefficients atomiques de tous les atomes correspondants aux orbitales moléculaires frontières. Les orbitales moléculaires frontières sont l'orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée par au moins un électron (Highest Occupied Molecular Orbital - HOMO) et l'orbitale la plus basse en énergie non occupée par un électron (Lowest Unoccupied Molecular Orbital - LUMO). Les HOMO mettent l'accent sur le caractère électro-donneur de la molécule. Une énergie d'orbitale moléculaire élevée indique que la molécule perd plus facilement des électrons. Les LUMO mettent l'accent sur la nature de la molécule en tant qu'électro-accepteur. Plus l'énergie de l'orbitale moléculaire est faible, plus la molécule acceptera facilement des électrons [13].

Le coefficient atomique représente la magnitude de chaque orbitale moléculaire. Les coefficients atomiques peuvent avoir des valeurs positives ou négatives en fonction de la symétrie d'orbitale. Dans le tableau 2.1. sont présentées les données obtenues avec le logiciel CaChe, rappelons que la numérotation reste la même que celle présentée dans la figure 2.5.

Tableau 2.1. Les données caractéristiques de la molécule de BaP par le logiciel CaChe

Nombre d'atome	Charge (Q)	C _{HOMO}	C _{LUMO}
C1	-0,125933	-0,0743	-0,0750
C2	-0,118854	-0,0625	0,0605
C3	-0,016117	0,0594	0,0622
C4	-0,035289	0,0109	-0,0102
C5	-0,117123	0,0760	0,0754
C6	-0,127043	0,0282	-0,0266
C7	-0,017252	0,0924	-0,0944
C8	-0,012233	0,0484	0,0497
C9	-0,031228	-0,0763	0,0749
C10	-0,103638	-0,1348	-0,1365
C11	-0,014809	-0,0055	0,0062
C12	-0,033329		
C13	-0,113595		
C14	-0,115279		
C15	-0,115470		
C16	-0,115547		
C17	-0,034084		
C18	-0,113858		
C19	-0,126677		
C20	-0,113645		
H21	0,132762		
H22	0,132333		
H23	0,132945		
H24	0,133515		
H25	0,135028		
H26	0,133396		
H27	0,132855		
H28	0,133214		
H29	0,133701		
H30	0,133883		
H31	0,133454		
H32	0,133918		

L'examen de ces données numériques quantitatives nous permet de formuler quelques idées concernant la réactivité de la molécule de BaP:

- ✓ Parmi les différents atomes de la molécule de BaP, il n'est pas facile de différencier quels sont les atomes de carbone réactifs. Avec un degré plus élevé d'approximation, l'atome plus réactif dans une réaction de transfert de charge peut être considéré comme étant l'atome H32, le radical OH[·] est susceptible d'attaquer le BaP par l'intermédiaire de cet atome d'hydrogène.
- ✓ D'autre part, les valeurs des coefficients orbitaux atomiques dans les orbitales moléculaires de frontière HOMO et LUMO semblent être plus évidents.

Pour l'orbitale HOMO, l'ordre croissant de la réactivité suivante : C₇ > C₅ > C₃ > C₈, d'autre part, pour l'orbitale LUMO, nous observons un ordre croissant différent: C₅ > C₉ > C₃ > C₂ > C₈.

Dans la figure 2.13. sont représentées les structures du BaP avec les orbitales moléculaires HOMO et LUMO.

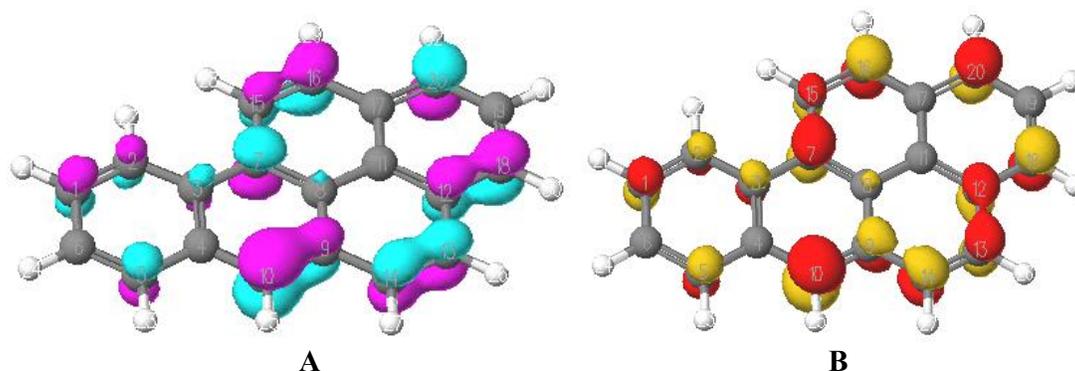


Figure 2.13. Représentation des orbitales moléculaires de frontière du BaP. **A.** L'orbitale moléculaire HOMO, **B.** L'orbitale moléculaire LUMO

La superdélocalisation la plus importante de la molécule de BaP est présentée dans la figure 2.14.

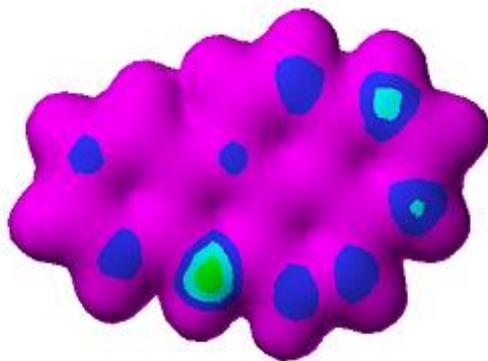


Figure 2.14. La superdélocalisation de la molécule de BaP donnée par le logiciel CaChe

Donc, la figure 2.14., qui illustre la réactivité du BaP, permet de conclure que la réaction la plus rapide se fait au niveau des atomes suivants H32, C7 et C5.

2.3.2. Inclusion de la molécule de BaP dans les polysaccharides

Pour chaque complexe d'inclusion le plus stable trouvé précédemment, nous avons réalisé les calculs par les méthodes utilisées: MM3, AM1 et AM1-COSMO. Les enthalpies sont calculées d'après les données numériques présentées dans l'annexe I appliquant la formule 1:

$$E_c = \Delta H_c - (\Delta H_A + \Delta H_B) \quad (\text{équation 1})$$

Où : E_c = l'énergie de complexation
 ΔH_A = l'enthalpie de formation de la molécule hôte A
 ΔH_B = l'enthalpie de formation de la molécule invitée B
 ΔH_c = l'enthalpie de formation du complexe C

Dans ce travail, les molécules hôtes sont l'HPBCD, l'amylose et l'amylopectine et les molécules invitées étudiées sont le BaP et Fe^{2+} . Dans un premier temps les enthalpies du complexe formé entre le BaP et l'HPBCD sont données dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2. Les énergies de complexation pour le complexe stable du BaP et de l'HPBCD

Complexe	MM3 ΔE [kcal/mol]	AM1 ΔE_a [kcal/mol]	AM1-COSMO ΔE_c [kcal/mol]
HPBCDp + BaP	-3,323	-29,809	-29,240
HPBCDs + BaP	-18,001	-166,826	-159,985

HPBCDp – La complexation a été réalisée sur la face primaire
 HPBCDs – La complexation a été réalisée sur la face secondaire

A la lecture de tableau, nous observons que la molécule d'HPBCD forme un complexe plus stable avec le BaP sur la face secondaire et le complexe est présenté dans la figure 2.15.

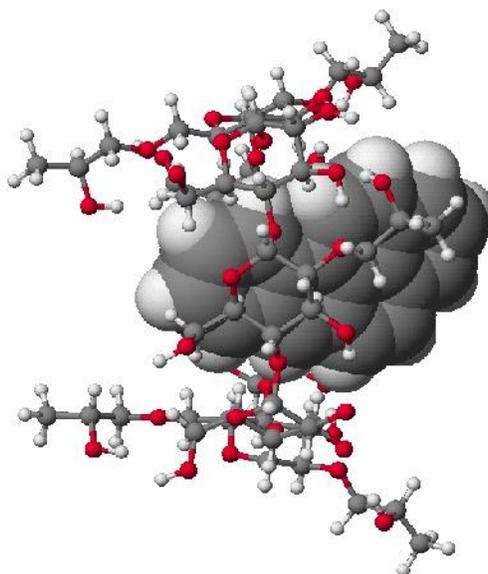


Figure 2.15. Le complexe le plus stable du BaP avec l'HPBCD réalisé par la méthode MM3

Ce résultat intéressant montre la formation d'un complexe stable entre une molécule d'HAP (le BaP) et un oligoside cyclique (l'HPBCD), comme confirmé aussi dans l'étude réalisée par Veignie et al. [14]. Ces interactions stables entre ces deux familles de molécules nous permettent d'envisager l'utilisation de polysaccharides comme l'amidon dans la suite de notre étude. En effet, l'amidon est une molécule composée de deux polymères de structures

primaires différentes. Avec l'amylose, suite aux calculs de complexation, nous avons trouvé les valeurs présentées dans le tableau 2.3. par la méthode MM3. Les calculs pour les autres méthodes n'ont pas été réalisés en raison de la dimension importante de la molécule d'amylose [15].

Tableau 2.3. Les énergies de complexation pour le complexe stable entre le BaP et l'amylose

Complexe	MM3 ΔE [kcal/mol]	AM1 ΔE_a [kcal/mol]	AM1-COSMO ΔE_c [kcal/mol]
Amylose1 + BaP	-0,826	-	-
Amylose2 + BaP	4,322	-	-

Amylose1 – La complexation a été réalisée par la voie droite

Amylose2 – La complexation a été réalisée par la voie gauche

Vu par l'axe central, l'amylose présente une cavité ayant une structure semblable à la cavité des cyclodextrines, mais les données du tableau 2.3. montrent une complexation différente de celle présentée avec l'HPBCD. En raison de la valeur positive d'énergie de complexation, l'amylose par la voie gauche ne forme pas de complexe stable avec la molécule de BaP. La valeur d'énergie de complexation entre le BaP et l'amylose, par la voie droite, donne une faible complexation (valeur -0,826 kcal/mol). Le complexe stable trouvé est présenté dans la figure 2.16.

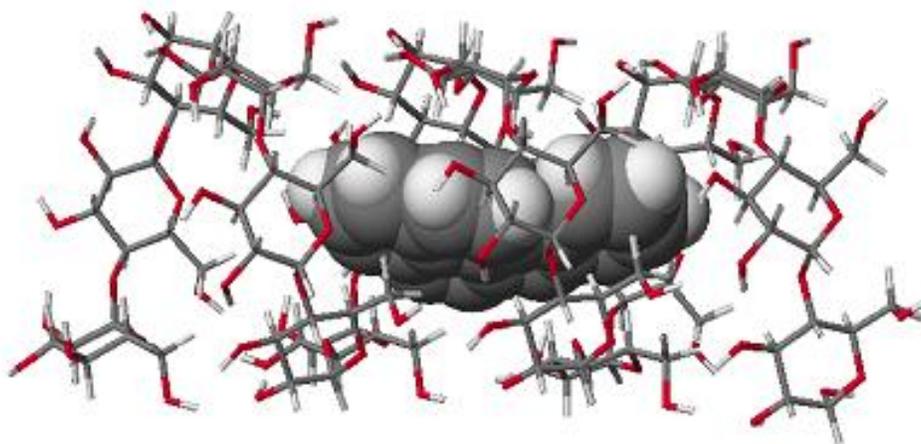


Figure 2.16. Le complexe le plus stable du BaP avec l'amylose réalisé par la méthode MM3

Sur le complexe formé, nous observons une déformation de l'amylose mais aussi du BaP, permettant d'expliquer la faible complexation. C'est pourquoi nous avons axé le développement de notre étude d'inclusion de la molécule de BaP dans l'amylopectine. L'inclusion est réalisée sur les six sites possibles du fragment étudié. Dans le tableau 2.4. sont présentées les énergies de complexation de chaque complexe formé pour les six sites d'amylopectine.

Tableau 2.4. Les énergies de complexation pour les complexes formés dans les six sites

Complexe	MM3 ΔE [kcal/mol]
Amylopectine1 + BaP	-43,340
Amylopectine2 + BaP	-40,429
Amylopectine3 + BaP	-137,499
Amylopectine4 + BaP	525,990
Amylopectine5 + BaP	66,880
Amylopectine6 + BaP	503,120

Pour le fragment d'amylopectine, l'énergie de complexation qu'il est possible de calculer est effectuée seulement par la méthode MM3. Les méthodes AM1 et AM1-COSMO sont des méthodes complexes qui ne peuvent pas être appliquées dans ce cas de molécules très grandes. En fonction de la dimension de la cavité du chaque site, nous avons déterminé que les sites 1, 2 et 3 se révèlent favorables pour l'inclusion du BaP, d'un point de vue énergétique, ce qui n'est pas le cas des sites 4, 5 et 6. Dans la figure 2.17. sont présentés les complexes stables formés avec les sites 1, 2 et 3.

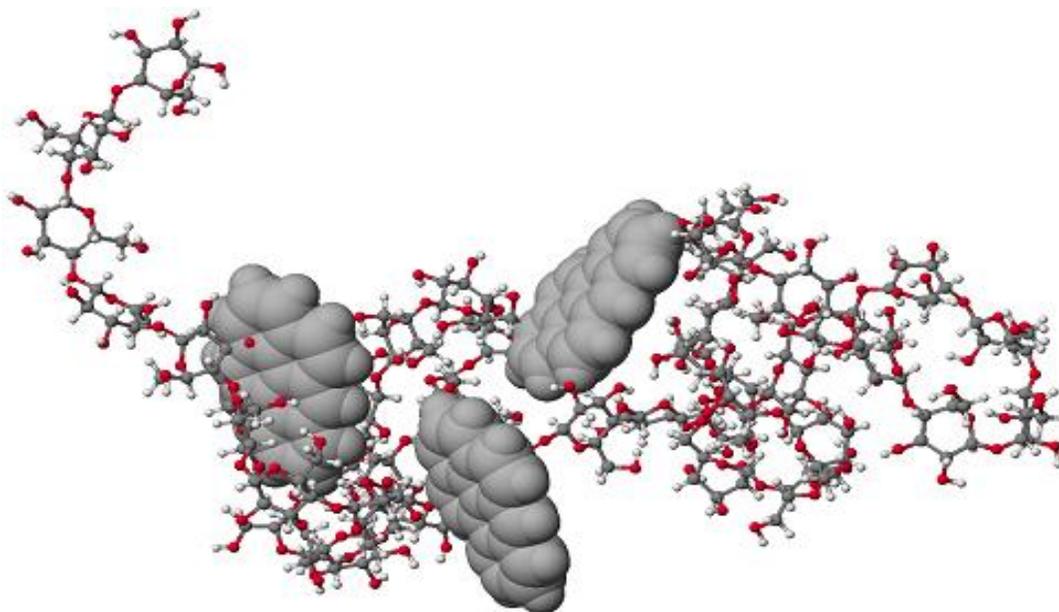


Figure 2.17. Les complexes les plus stables du BaP avec l'amylopectine dans les sites favorables réalisés par la méthode MM3

Les interactions de type van der Waals semblent prépondérants dans la formation du complexe. La structure désordonnée d'amylopectine permettrait d'expliquer la stabilité des complexes obtenus avec le BaP. L'amylopectine se révèle le composant polysaccharidique le plus favorable à la complexation du BaP, comparativement à l'amylose [16].

2.3.3. Inclusion du cation Fe^{2+} dans les polysaccharides

Généralement, le cation Fe^{2+} forme des complexes de la géométrie sd^3 avec les ligands hydroxyliques. Aussi, une telle structure implique donc deux liaisons covalentes O-Fe et deux liaisons coordinatives $\text{O} \rightarrow \text{Fe}$. Les distances entre les liaisons O-Fe sont comprises entre 1,90-2,263 Å. Ce type de complexation a besoin de valeurs de pH comprises entre 5 et 7 [2].

La complexation avec le cation Fe^{2+} peut être considérée comme possible au niveau des groupes hydroxyles. Nous avons continué le développement de notre étude théorique avec les polysaccharides comme l'HPBCD, l'amylose et l'amylopectine. Suite aux calculs effectués d'après les données numériques présentées dans l'annexe II, nous avons trouvé les énergies de complexation présentées dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5. Les énergies numériques des complexes formés entre Fe^{2+} et l'HPBCD

Complexe	MM3 ΔE [kcal/mol]	AM1 ΔE_a [kcal/mol]	AM1 - COSMO ΔE_c [kcal/mol]
HPBCD p+Fe	-53,382	-4,611	-1,043
HPBCD s+Fe	-15,191	-3,379	-1,662

HPBCDp – La complexation a été réalisée sur la face primaire
HPBCDs – La complexation a été réalisée sur la face secondaire

Dans le tableau 2.5. pour la molécule d'HPBCD, nous avons pu calculer des énergies pour tous les modèles théoriques MM3, AM1 et AM1-COSMO. Sur la face secondaire, le complexe formé n'est pas stable en raison des valeurs des énergies obtenues. Le complexe plus stable formé entre le cation Fe^{2+} et la molécule d'HPBCD est trouvé pour la face primaire. Ce complexe est présenté dans la figure 2.18.

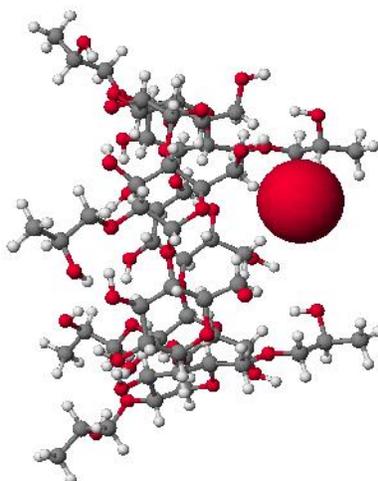


Figure 2.18. Le complexe plus stable avec le cation Fe^{2+} et l'HPBCD réalisé par la méthode MM3

L'étude est poursuivie avec le calcul d'énergie de complexation du complexe formé entre l'amylose et le cation Fe^{2+} présenté dans le tableau 2.6.

Tableau 2.6. Les énergies numériques des complexes formés entre Fe^{2+} et l'amylose

Complexe	MM3 ΔE [kcal/mol]	AM1 ΔE_a [kcal/mol]	AM1 - COSMO ΔE_c [kcal/mol]
Amylose1+Fe	57,869	9,155	-
Amylose2+Fe	64,347	9,058	-

Amylose1 – La complexation a été réalisée par la voie droite
 Amylose2 – La complexation a été réalisée par la voie gauche

La structure du complexe donné entre Fe^{2+} et l'amylose est présentée dans la figure 2.19.

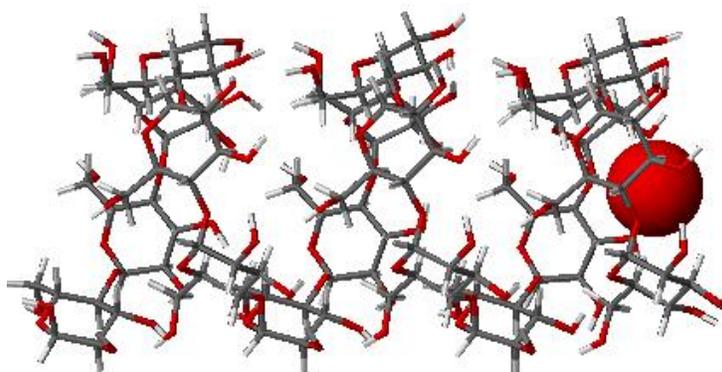


Figure 2.19. Le complexe formé avec le cation Fe^{2+} et l'amylose réalisé par la méthode MM3

Nous constatons une faible complexation par la voie droite, d'après les calculs et aussi par le logiciel Cache.

Comme l'amylopectine présente différents sites d'inclusion, les énergies de complexation trouvées, pour chaque site où existe la possibilité de complexation, sont présentées dans le tableau 2.7.

Tableau 2.7. Les énergies numériques des complexes formés entre Fe^{2+} et les sites d'amylopectine

Complexe	MM3 ΔE [kcal/mol]
Amylopectine1 + Fe	-64,733
Amylopectine2 + Fe	-143,227
Amylopectine3 + Fe	-104,345
Amylopectine4 + Fe	103,524
Amylopectine5 + Fe	94,145
Amylopectine6 + Fe	134,461

Comme nous avons trouvé dans le cas d'inclusion de la molécule de BaP, les sites 4, 5 et 6 confirment une nouvelle fois la difficulté de former des complexes stables avec des

molécules invitées. Par contre les valeurs présentées pour les sites 1, 2 et 3 se révèlent plus favorables pour former un complexe stable. Ces complexes sont présentés ensuite dans la figure 2.20.

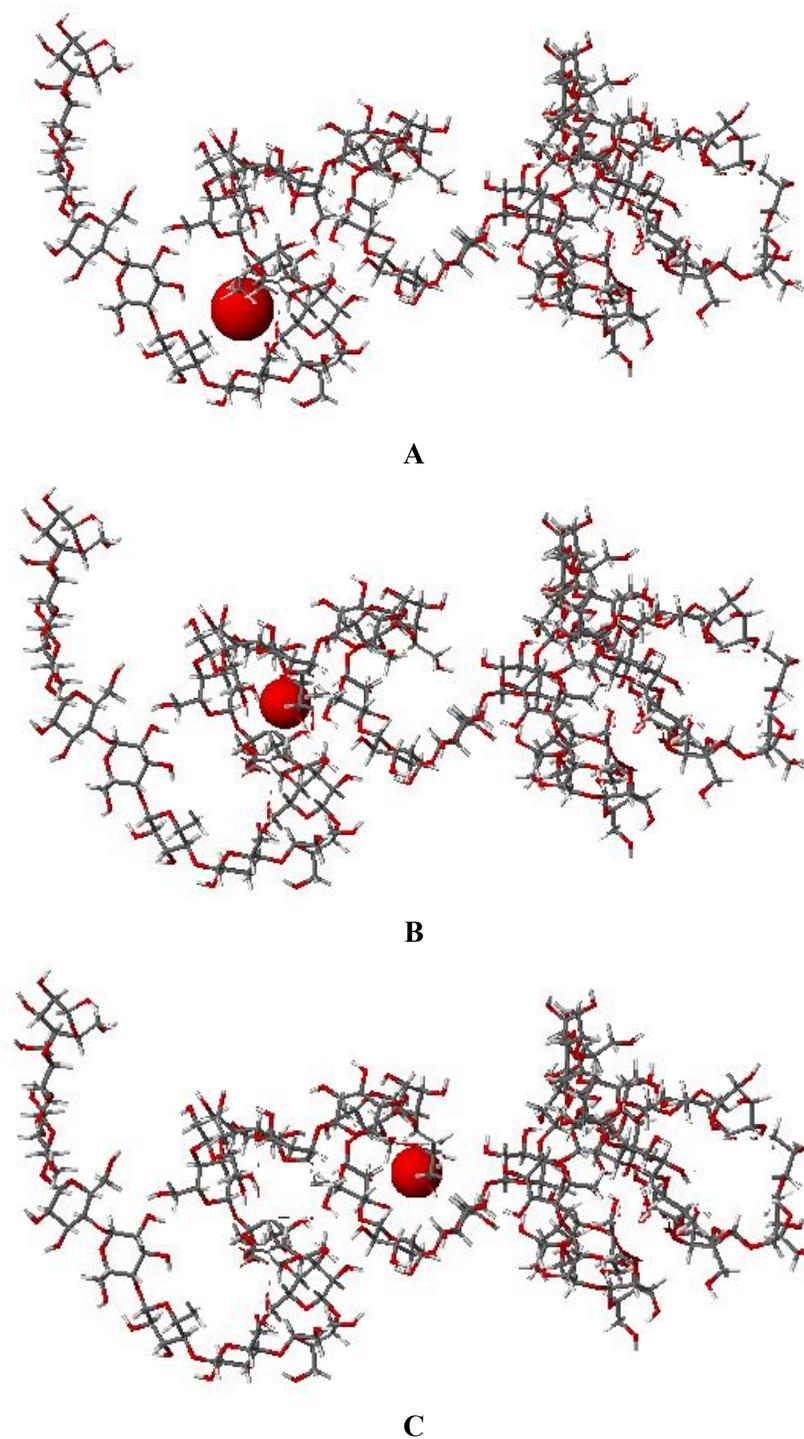


Figure 2.20. Les complexes plus stables avec les sites 1, 2 et 3 d'amylopectine et le cation Fe^{2+} . **A.** Site 1, **B.** Site 2, **C.** Site 3.

La stabilité de formation du complexe avec le cation Fe^{2+} se retrouve aussi pour l'amylopectine et l'amidon.

2.4. Conclusion

Cette étude théorique réalisée par modélisation moléculaire met en évidence les conclusions suivantes pour chaque molécule étudiée.

Pour la molécule d'HPBCD et le cation Fe^{2+} , les complexes les plus stables sont trouvés pour la face primaire. Par contre, concernant l'interaction entre l'HPBCD et le BaP, il s'avère que les complexes les plus stables se forment sur la face secondaire. Cependant l'HPBCD présente des limites quantitatives de complexation en raison de son unique cavité [14]. De plus, son coût relativement élevé en restreint son utilisation à une échelle plus importante. C'est pourquoi nous avons voulu valoriser l'interaction polluant – polysaccharide en étudiant la formation de complexe avec des polysaccharides possédant plusieurs sites potentiels d'inclusion pour un coût économique moindre. Notre choix s'est porté sur la molécule d'amidon, composé principalement de deux homopolymères d' α -D-glucopyranose, comme l'amylose et l'amylopectine.

Nos études de modélisation moléculaire soulignent que l'amylose, avec sa structure tridimensionnelle en spirale (hélice α), ne forme pas de complexes stables avec les molécules invitées (la molécule de BaP et le cation Fe^{2+}). Quant à l'amylopectine, qui représente de 70% à 100% de l'amidon, notre étude met en évidence l'existence de six sites disponibles de complexation sur le fragment étudié. Ces calculs de modélisation moléculaire montrent que les sites 1, 2 et 3 forment un complexe stable avec la molécule de BaP et le cation Fe^{2+} .

Ces résultats intéressants soulignent la possibilité de formation d'un complexe amidon-BaP-Fe recherché pour une optimisation de la réaction de Fenton. Néanmoins, l'écueil principal de la réalisation expérimentale de cette réaction de Fenton est la faible solubilité de l'amidon (0,56 g/L) [17]. Nous avons donc envisagé pour la suite de ce travail la modification chimique de l'amidon afin d'obtenir des molécules plus solubles.

Références bibliographiques

- [1] Snajdrova L. (2006). *Modélisation Moléculaire des lectines et des glycosyltransferases*, Thèse de doctorat, Université Grenoble I Joseph Fourier, Grenoble, 156 p.
- [2] Causse B. (2009). *Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides bactériens: Le système Xanthane – Cuivre comme modèle d'étude*, Thèse de doctorat, Université Grenoble I Joseph Fourier, Grenoble, 245 p.
- [3] Boursier B. (2005). *Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires*, Référence F4690, <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/agroalimentaire-ti700/amidons-natifs-et-amidons-modifies-alimentaires-f4690/>, consulté le 15 janvier 2011.
- [4] Joshi S.S., Mebel A.M. (2007). *Computational modeling of biodegradable blends of starch amylose and poly-propylene carbonate*. Polymer 48, p. 3893-3901.
- [5] Surpateanu G.G., Delattre F., Woisel P., Vergoten G., Surpateanu G. (2003). *Structure and reactivity of cycloimmonium ylides. Theoretical study in triazolium ylides by AM1, PM3 and DFT procedure methods*, Journal of Molecular Structure 645, p. 29-36.
- [6] CaChe (2003). WorkSystem Pro, V.6.01; PC ELONEX XP Pro, Intel(R), Pentium(R)DCPU 2,8 GHz, 2,79 GHz, 1,99 Go de RAM.
- [7] Surpateanu G.G., Landy D., Lungu C.N., Fourmentin S., Surpateanu G., Réthoré C., Avarvari N. (2006). *Synthesis and inclusion capability of a [beta]-cyclodextrin-tetrathiafulvalene derivative*. Tetrahedron 62, p. 9701-9704.
- [8] Pogrebnyak A.V., Stepanova É.F. (2003). *Quantum-Chemical Modeling of the Process of Drug Adsorption and the Immobilization of Phytocomponents in Medicinal Forms*. Pharmaceutical Chemistry Journal 37, p. 374-378.
- [9] Stewart J.J.P. (2004). *Optimization of parameters for semiempirical methods IV: extension of MNDO, AM1, and PM3 to more main group elements*. Journal of Molecular Modeling 10, p. 155-164.
- [10] Surpateanu G.G., Decock G., Fourmentin S., Landy D., Dron P.I., Surpateanu G. (2007). *Theoretical Study on the Inclusion of Allergens with Partially Methylated Crystallized β -cyclodextrin and Hydroxypropyl β -cyclodextrin*. Internet Electronic Journal of Molecular Design 6, p. 96-105.

-
- [11] Dron P.I. (2007). *Cyclopyridinophanes, capteurs moléculaires : synthèse, structure et propriétés électriques*, Thèse de doctorat, Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, 154 p.
- [12] Sánchez-Ruiz X., Ramos M., Jaime C. (1998). *Conformational equilibria and cyclodextrin inclusion complexes. Computational study by force field calculations (MM3(92))*. Journal of Molecular Structure 442, p. 93-101.
- [13] Richer J.C., Lomas J.S., Ruasse M.F., Toullec J (2010). *Glossaire des termes utilisés en chimie organique physique*, Référence K245, <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/constantes-physico-chimiques-i500/glossaire-des-termes-utilises-en-chimie-organique-physique-k245/>, consulté le 21.01.2010.
- [14] Veignie E., Rafin C., Landy D., Fourmentin S., Surpateanu, G. (2009). *Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene*. Journal of Hazardous Materials 168, p. 1296-1301.
- [15] Pérez S., Kouwijzer M., Mazeau K., Engelsen S.B. (1996). *Modeling polysaccharides: Present status and challenges*. Journal of Molecular Graphics 14, p. 307-321.
- [16] Rosu A.M., Veignie E., Surpateanu G., Brabie G., Miron D.N., Rafin C. (2011). *Synthesis and evaluation of hydroxypropylated potato starch as polymeric support for benzo[a]pyrene degradation by Fenton reaction*. Carbohydrate Polymers 83, p. 1486-1491.
- [17] Leveque E., Haye B., Belarbi A. (2000). *L'amidon et ses dérivés - Applications industrielles*. Editions Elsevier, collection biocampus, 120 p.

Chapitre 3

Synthèse des amidons modifiés

Sommaire

3.1. Introduction	50
3.1.1. Généralités sur l'amidon.....	50
3.1.2. Les polysaccharides d'amidon de pomme de terre.....	52
3.1.2.1. Amylopectine.....	52
3.1.2.2. Amylose.....	54
3.1.3. Les amidons modifiés.....	55
3.1.3.1. Amidons modifiés chimiquement.....	55
3.1.3.2. Amidons modifiés physiquement.....	57
3.1.4. Applications.....	57
3.2. Matériels et méthodes	60
3.2.1. Les produits chimiques.....	60
3.2.2. Propoxylation des amidons.....	61
3.2.2.1. Principe de la réaction.....	61
3.2.2.2. Synthèse dans l'acétone.....	62
3.2.2.3. Synthèse dans le DMSO.....	62
3.2.3. Alkylation avec les époxydes.....	63
3.2.3.1. Principe de la réaction.....	63
3.2.3.2. Synthèse chimique d'alkylation avec les époxydes.....	63
3.2.4. Alkylation avec les sulfones.....	64
3.2.4.1. Principe de la réaction.....	64
3.2.4.2. Synthèse chimique d'alkylation avec les sulfones.....	64
3.2.5. Alkylation avec les anhydrides.....	65
3.2.5.1. Principe de la réaction.....	65
3.2.5.2. Synthèse chimique d'alkylation avec les anhydrides.....	65

3.2.6. <i>Etude RMN des produits</i>	65
3.2.7. <i>Etude FTIR des produits</i>	66
3.2.8. <i>Mesure de la solubilité aqueuse</i>	67
3.3. <i>Résultats et discussion</i>	67
3.3.1. <i>Choix des paramètres réactionnels</i>	67
3.3.2. <i>Les amidons modifiés obtenus</i>	69
3.3.3. <i>Caractéristiques des produits synthétisés</i>	71
3.3.3.1. <i>Caractéristiques des amidons modifiés</i>	71
3.3.3.2. <i>Caractéristiques des amidons bialkylés</i>	76
3.4. <i>Conclusion</i>	85
<i>Références bibliographiques</i>	86

3.1. Introduction

3.1.1. Généralités sur l'amidon

L'amidon est le composant principal des tubercules de pomme de terre et représente approximativement 15-20% du poids des tubercules. Comparé aux amidons provenant d'autres végétaux, l'amidon de pomme de terre présente la particularité d'exister sous forme de granules très grands et lisses. Ces caractéristiques combinées font de l'amidon de pomme de terre une source importante de biopolymère fonctionnel pour la nourriture et la science des matériaux [1]. L'amidon est une substance hétérogène constituée de deux composants principaux de nature polysaccharidique, l'amylose et l'amylopectine, dont les proportions varient selon l'origine végétale de l'amidon. Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur la modification chimique de l'amidon de pomme de terre.

L'amidon se présente sous forme de granules intracellulaires de 1 à 100 μm , qui varient en forme selon le végétal considéré, l'âge de la plante et parfois selon les conditions environnementales. Des composants mineurs (lipides, protéines, minéraux) sont présents en quantités variables en fonction de l'origine botanique et de la technologie d'extraction. Dans le tableau 3.1. sont présentées les caractéristiques principales des amidons [2].

Tableau 3.1. Caractéristiques principales des amidons et féculés [2]

Origine botanique	Forme du grain d'amidon	Diamètre (μm)	Humidité à 66 % HR* et 20 °C	Amylose (%)	Amylopectine (%)
Blé	lenticulaire, rond	2 – 38	13	24 – 26	76 – 74
Maïs	angulaire, polyédrique	5 – 25	13	24 – 28	76 – 72
Maïs cireux	angulaire, polyédrique	5 – 25	13	< 1	> 99
Amylomaïs	Sphérique, déformé	4 – 22	13	70	30
Riz	polyédrique	3 – 8	13	17	73
Pois	réniforme	5 – 10	13	35	65
Pomme de terre	ellipsoïdale	15 – 100	18	23	77
Manioc	rond, tronqué	5 – 35	13	17	83

*HR – humidité relative

À l'état natif, les grains d'amidons ont une cristallinité faible qui varie de 15 à 45%. En fonction de l'origine botanique de l'amidon et dans une moindre mesure des traitements technologiques, deux types d'amidon sont connus:

✓ type A: pour les amidons de céréales présentant une teneur en amylose inférieure à 40%;

✓ type B: pour la fécule de pomme de terre et les amidons riches en amylose, ainsi que pour les amidons rétrogradés, c'est à dire réorganisés en structure semi-cristalline lorsque la température de la solution aqueuse diminue.

L'observation microscopique des granules (après hydrolyse acide ou enzymatique) montre la présence de stries concentriques à partir d'un point appelé hile, qui est le centre initial de croissance du grain. Les stries correspondent à une succession de zones dites amorphes, peu résistantes à l'hydrolyse, et de zones présentant une structure semi-cristalline comportant une alternance de lamelles cristallines et de lamelles amorphes (composées en majorité des points de jonction des molécules d'amylopectine et éventuellement d'amylose). L'empilement des lamelles cristallines et amorphes formerait des ensembles appelés *blocklets* d'une taille comprise entre 300 et 500 nm qui s'assembleraient pour constituer les couches cristallines (figure 3.1.) [2].

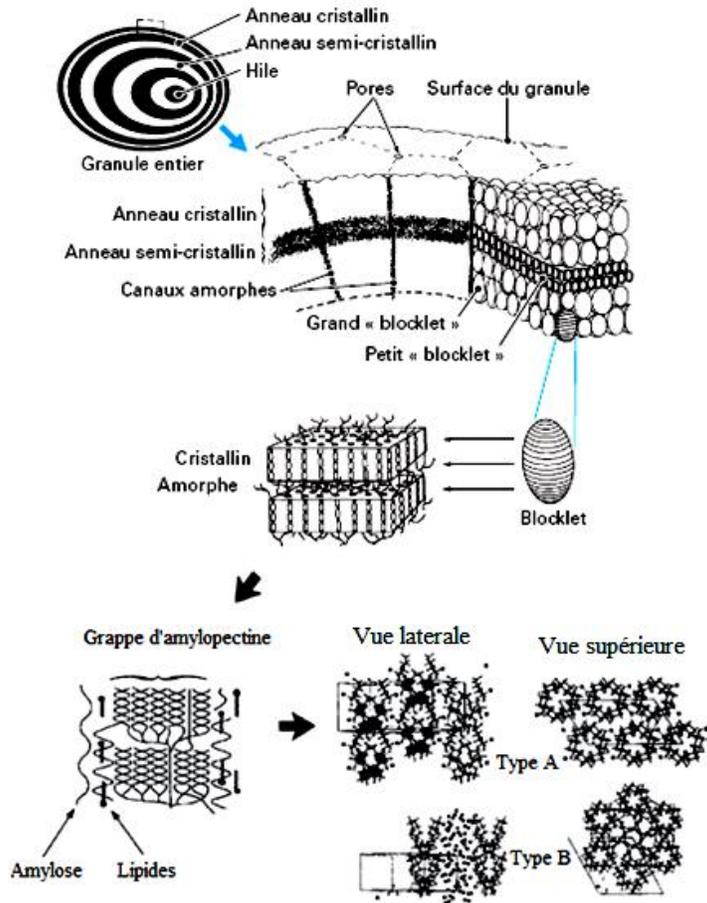


Figure 3.1. Schéma illustrant les différents degrés d'organisation moléculaire d'un granule d'amidon [2]

D'après certains travaux [3], les zones amorphes pourraient contenir des ensembles cristallins composés d'amylopectine de structure identique mais de taille réduite de 50 à 70 nm. Ces ensembles dispersés dans l'amylose constitueraient avec les complexes amylose-lipides les parties dites amorphes du granule. Le développement limité des blocklets pourrait être lié à la présence de l'amylose.

D'un point de vue biochimique, l'amidon est un homopolymère formé par l'assemblage de très nombreuses unités d'une même molécule, un sucre à six carbones, ou hexose, nommé α -D-glucopyranose. Les unités α -D-glucopyranose se trouvent dans leur conformation chaise la plus stable et les groupements hydroxyles portés par les carbones C2, C3, C4 et C6 se situent en position équatoriale comme le montre la figure 3.2. [4].

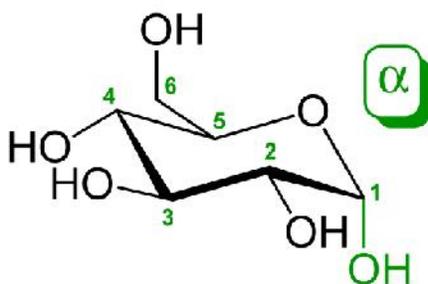


Figure 3.2. La structure chimique de α -D-glucopyranose avec une conformation chaise[4]

Parmi les extrémités de chaque chaîne qui constitue la molécule d'amidon, il existe une seule molécule de glucose terminale dont le carbone C1 n'est pas engagé dans une liaison glucosidique et qui présente une fonction hémiacétal réductrice [5].

3.1.2. Les polysaccharides d'amidon de pomme de terre

3.1.2.1. Amylopectine

L'amylopectine est le polysaccharide principal des amidons en général et, dans le cas de la pomme de terre, représente jusqu'à 70-80% en poids, indépendamment de la taille des granules. La masse molaire de l'amylopectine est beaucoup plus importante que celle de l'amylose et se situe entre 10^7 et 10^8 Daltons. Les chaînes d'amylopectine sont arrangées pour faciliter l'organisation des sections cristallines et amorphes. La structure chimique de l'amylopectine est présentée dans la figure 3.3 [2].

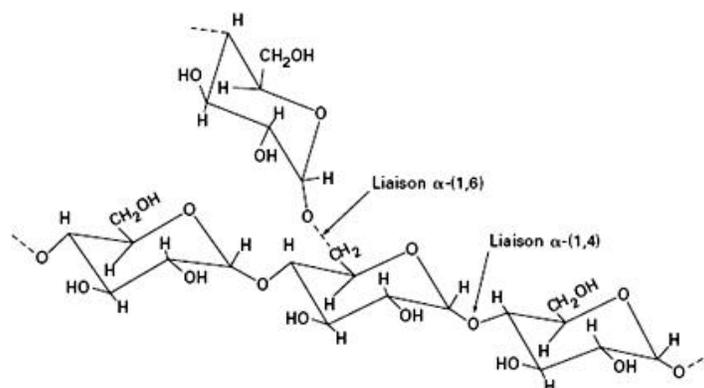


Figure 3.3. Structure chimique de l'amylopectine [2]

A côté des liaisons α -(1,4), 5 à 6 % de liaisons α -(1,6) sont à l'origine des ramifications. L'amylopectine est constituée par 3 chaînes différentes. Le premier type de chaîne porte le résidu de D-glucopyranose ayant sa fonction hémiacétale libre (expression du pouvoir réducteur – chaîne C). Sur cette chaîne viennent se greffer d'autres chaînes en position plus ou moins externe. Les chaînes B les plus internes sont constituées par des enchaînements de l'ordre de 40 à 45 résidus de glucose. Enfin les chaînes A qui se greffent sur les chaînes B sont plus courtes et renferment de l'ordre de 15 à 20 résidus de glucose. A l'intérieur de cette structure, il y a des zones où se retrouve la quasi-totalité des points de branchement (liaisons α -(1,6) glucosidiques) et des zones où se retrouve la quasi-totalité des enchaînements par les liaisons α -(1,4) glucosidiques (figure 3.4.) [6].

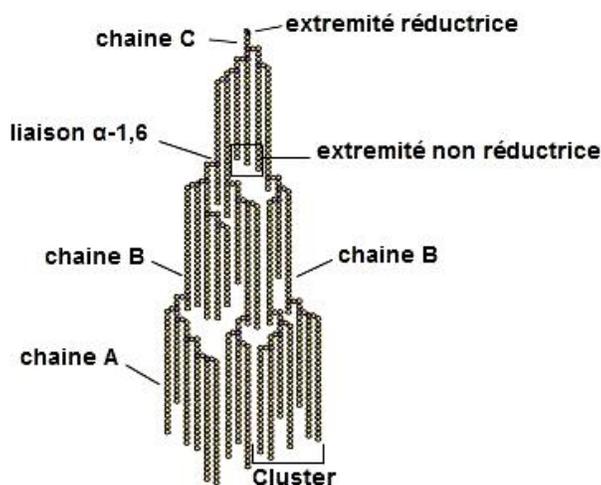


Figure 3.4. La structure de l'amylopectine [6]

Cette dernière association entraîne une orientation parallèle des chaînes. L'étude de l'amylopectine par diffraction de rayons X montre que la zone de ramification α -(1,6) est une région amorphe (désordonnée) alors que la région renfermant les enchaînements en α -(1,4)

présente une structure semi-cristalline. L'ensemble des chaînes A appartenant à une même chaîne B forme un cluster ou grappe élémentaire. Les chaînes A ont la possibilité de s'associer entre elles pour se mettre sous la forme de double hélice gauche à six résidus de glucose par tour de spire. Cette propriété permet de caractériser l'origine des amidons et en grande partie leurs propriétés physico-chimiques: cristallinité de type A (système monoclinique, peu hydraté à quatre moles de molécules d'eau) pour l'amidon de céréales, et de type B (système hexagonal, fortement hydraté à 30 moles de molécules d'eau) pour l'amidon de tubercule, de banane et les amidons à forte teneur en amylose (figure 3.1.) [6].

3.1.2.2. Amylose

Le composant mineur de l'amidon est l'amylose qui représente 15 à 30 % de la plupart des amidons. Elle est considérablement plus petite que l'amylopectine et est essentiellement un polymère se composant de chaînes d'environ 2000-5000 résidus [6]. La masse molaire de l'amylose est de 10^5 à 10^6 Daltons. C'est une molécule essentiellement linéaire composée d'unités D-glucose liées par des liaisons de type α -(1,4) (figure 3.5.). Sa conformation et son mode de liaison permettent à l'amylose d'adopter des formes hélicoïdales comportant 6, 7 ou 8 unités glucose par tour, stabilisées par des liaisons hydrogène entre les unités glucosyls. Cette simple hélice forme une cavité hydrophobe dans laquelle peuvent se complexer des alcools, des matières grasses, l'iode, etc.

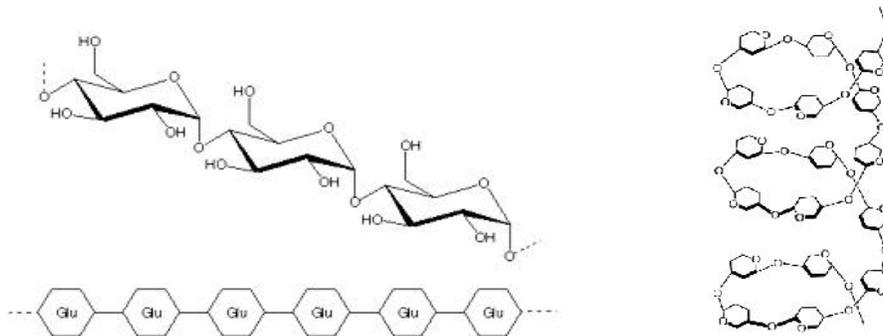


Figure 3.5. Structure chimique d'amylose et l'hélice formée [7]

Chaque polymère peut être caractérisé par son degré moyen de polymérisation (DP). Le DP correspond au nombre moyen de monomères par polymère. En fonction de DP, trois types de chaînes sont décrits :

- ✓ chaînes courtes: DP compris entre 12 et 20 ;
- ✓ chaînes longues: DP compris entre 30 et 45 ;
- ✓ chaînes de DP supérieur à 60.

Les degrés de polymérisation pour certains amidons sont présentés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2. Degré moyen de polymérisation (DP) des fractions amylose et amylopectine de différents amidons [2]

Végétal	Amylose	Amylopectine
Riz	1100	13000
Maïs	990	7200
Pomme de terre	4920	9800
Blé	1180	–

3.1.3. Les amidons modifiés

Les amidons modifiés sont des amidons indigènes qui ont été changés soit chimiquement soit physiquement afin d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles (viscosité, apparence et morphologie, résistance aux enzymes, etc.) pour un usage spécifique. Le taux et l'efficacité de n'importe quel procédé de modification d'amidon dépendent de l'origine botanique de l'amidon, de la taille et la structure de ses granules.

3.1.3.1. Amidons modifiés chimiquement

✓ Après extraction, la suspension d'amidon peut être séchée, précuite ou soumise à des traitements chimiques pour fabriquer les amidons modifiés. Les premières modifications chimiques visant à réticuler l'amidon furent réalisées après 1940, le but recherché était de modifier la texture du maïs cireux pour la rendre équivalente à celle du manioc [8]. Les modifications de l'amidon ont été ensuite développées pour corriger les défauts des amidons natifs, c'est-à-dire pour les adapter aux besoins des industriels de l'alimentation et aux exigences des consommateurs. Certaines réactions (de dégradation et de réticulation) agissent principalement en modifiant la masse molaire du polymère, d'autres réactions agissent essentiellement sur certaines propriétés spécifiques du polymère (réactions de stabilisation et de fonctionnalisation).

La dérivatisation est la méthode la plus généralement appliquée pour la modification à échelle industrielle de l'amidon. Elle comporte l'introduction de groupes fonctionnels dans l'amidon ayant pour résultat de modifier les propriétés physico-chimiques [4]. Les substitutions sont réalisées au niveau des groupements hydroxyles libres par l'intermédiaire de liaisons:

- ✓ esters: pour les succinates (E1450), les acétates (E1420) d'amidons, les monophosphates (E1410);
- ✓ éthers: pour les amidons hydroxypropylés (E1440).

Le tableau 3.3. décrit les principales modifications chimiques possibles pour obtenir des amidons alimentaires [2].

Tableau 3.3. Modification des amidons alimentaires [2]

	Nature de la modification	Modification chimique	Statut réglementaire en Europe	Principales propriétés
Réduction de la masse molaire	Réduction du degré de polymérisation par hydrolyse	<ul style="list-style-type: none"> • Fluidification par acide • Pyrolyse • Dextrinification hydrolyse Amidon oxydé E1404 • Polymérisation • Oxydation 	Amidon natif	Viscosité réduite
Augmentation de la masse molaire	Introduction de liaisons inter- et intramoléculaires (diestérification)	<ul style="list-style-type: none"> • Réticulation phosphate • Réticulation adipate 	Phosphate de diamidon E1412 Adipate de diamidon	Résistance à la température, à l'acidité, aux cisaillements
Stabilisation	Greffage de groupements chimiques à la place des fonctions hydroxyyles	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilisation acétate (ester) • Stabilisation phosphate (ester) • Stabilisation hydroxypropyl (éther) 	Amidon acétylé E1420 Amidon phosphaté E1410 Amidon hydroxypropylé (HP) E1440	Peu ou pas de rétrogradation
Fonctionnalisation	Greffage de groupement hydrophobe	-	Octényl succinate amidon (OSA) E1450	Émulsifiant

Pour un même amidon, plusieurs modifications peuvent être réalisées. Les combinaisons autorisées de traitements conduisent à l'obtention des amidons suivants:

- ✓ amidon oxydé acétylé: E1451;
- ✓ phosphate de diamidon phosphaté: E1413;
- ✓ phosphate de diamidon acétylé: E1414;
- ✓ phosphate de diamidon hydroxypropylé: E1442;
- ✓ adipate de diamidon acétylé: E1422.

Des traitements légers d'oxydation dits traitements de blanchiment sont utilisés pour améliorer la couleur (action sur les pigments), le goût et la qualité bactériologique des amidons. Ces traitements sont repris par la législation (sur les traces d'oxydants résiduels), mais ces amidons ne sont pas considérés comme modifiés. Ce type de traitement a également un effet réticulant des amidons et améliore donc leur résistance aux traitements industriels (cuisson, cisaillement...).

3.1.3.2. Amidons modifiés physiquement

Aux traitements chimiques peuvent être associés des traitements physiques qui, n'étant pas considérés comme modification, ne donneront pas lieu à des déclarations particulières. Les traitements physiques appliqués aux amidons conduisent à des modifications importantes de structure qui peuvent améliorer le comportement des amidons natifs jusqu'à leur conférer des propriétés d'amidon modifié et ouvrir ainsi le champ des applications en rendant les amidons par exemple solubles. Les traitements s'appliquent à des amidons granulaires et ne modifient pas leur état. Ces amidons présentent des profils de cuisson (température et vitesse de gonflement) modifiés et peuvent être utilisés dans des applications comme les soupes et les sauces instantanées pour lesquelles un gonflement différé de l'amidon assure une meilleure hydratation de tous les autres ingrédients de la formule.

Deux traitements vont permettre d'induire des réarrangements moléculaires ou des cristallisations en plaçant les amidons dans les zones comprises entre les températures de transition vitreuse et les températures de fusion: ce sont l'*annealing* et le *Heat Moisture Treatment* (HMT).

L'*annealing* ou traitement à chaud en milieu aqueux se réalise sur des suspensions d'amidon à 40-50 % de matière sèche, à des températures légèrement inférieures (35°C) aux températures de gélatinisation pendant des temps variables (entre 12 h et 24 h) suivant le degré de transformation souhaité. Ce traitement provoque une croissance et un perfectionnement des cristallites sans modifier le type cristallin de l'amidon, ce qui rend l'amidon plus difficile à cuire. Les amidons présentent alors des températures de gélatinisation plus élevées (2 à 5°C par rapport à l'amidon natif) et un gonflement moins important [2].

Le traitement HMT est réalisé en présence d'une quantité d'eau réduite à 15-30% et donc à des températures plus élevées de 100 à 120°C (les fours micro-ondes permettent aussi de réaliser ce type de modification). Une modification des cristaux peut être ici obtenue: passage du type B au type A, et diminution du taux de cristallinité pour les amidons de type A. Les résultats les plus intéressants sont obtenus avec la fécule de pomme de terre qui présente une température de gélatinisation élevée et un gonflement limité.

3.1.4. Applications

Les propriétés des amidons sont très larges et les applications sont nombreuses. La difficulté rencontrée réside dans ce choix. Chaque application alimentaire ayant plusieurs

solutions amyliques, il sera donc nécessaire, pour chaque développement, de définir précisément les contraintes de l'application, de procéder à des essais, des analyses et de nouveaux essais avant d'obtenir la solution. Les applications d'amidon natif sont présentées dans la figure 3.6.

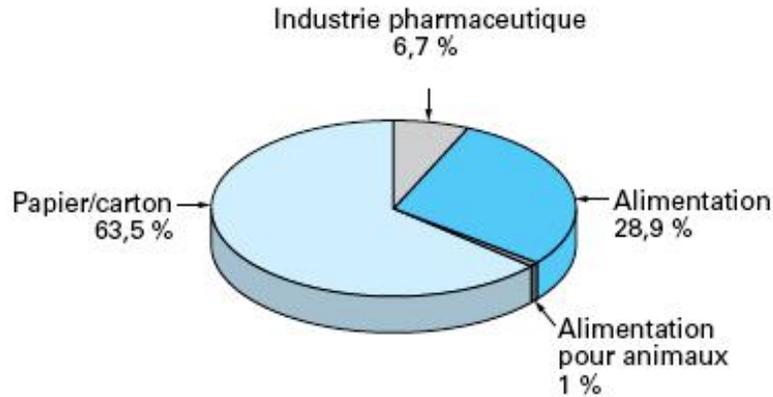


Figure 3.6. Les applications d'amidon natif dans différentes industries (1990)[2]

Les applications des amidons sont définies à partir des propriétés recherchées de l'amidon :

- ✓ propriétés générales: épaississant ou gélifiant;
- ✓ propriétés particulières de la poudre, comme émulsifiant, comme liant et adhésif.

Le choix de la base amyliques revêt une importance secondaire puisque dans les applications concernées, les structures de microgel sont recherchées. Les amidons de pomme de terre qui ont des volumes de gonflement important apportent un aspect non lisse à la préparation, ce qui peut être recherché dans le cas de certaines sauces tomate par exemple, ou au contraire peut nuire à la présentation du produit comme dans les produits laitiers. Il est possible de trouver sur le marché des féculés réticulés, soit tamisés pour éliminer les grosses particules (supérieures à 60 μm), soit micronisés (broyage des plus grosses particules). Dans les préparations présentant peu d'eau disponible et subissant des cuissons à des températures inférieures à 100 °C (préparations de fruits, charcuterie, nouilles...), les amidons stabilisés sont employés pour leur plus faible température de gélatinisation.

Les produits substitués de l'amidon sont les esters et les éthers de l'amidon qui empêchent la formation des structures initiales dans une régression de pâte. Le phosphate d'amidon et l'acétate d'amidon sont des exemples des esters commerciaux, alors que les éthers hydroxyalkyliques, les amidons cationiques et l'amidon carboxyméthylé sont des exemples des éthers commerciaux. Les utilisations principales des esters et des éthers de féculé de pomme de terre sont dans l'industrie textile (classement par taille de chaîne :

lubrification et résistance d'abrasion, impression), papier (enduit de surface : force, rigidité et résistance d'encre), adhésifs (adhésifs de bande gommée, de papier, de papier cartonné et de sac ; adhésifs de bâche de mur), traitement de l'eau (floculation), industrie pétrolière (réducteur de perte liquide) et inhibition de balance [9]. Dans la figure 3.6. sont présentées les industries et le pourcentage d'utilisation des amidons modifiés.

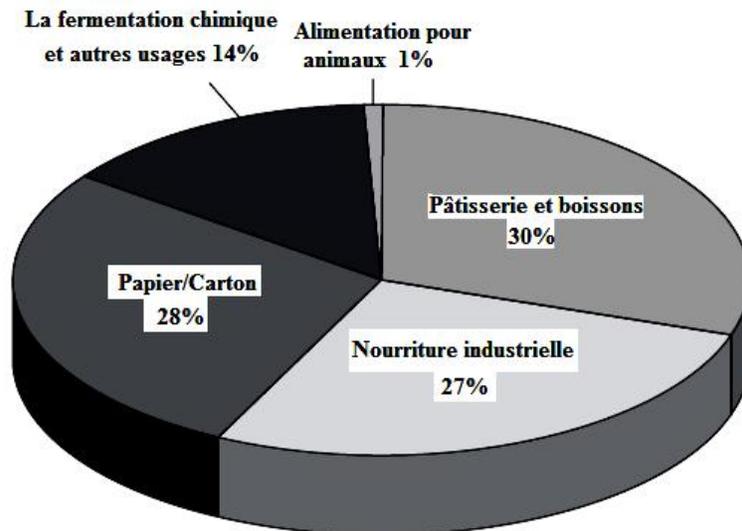


Figure 3.7. Les industries et le pourcentage d'utilisation des amidons modifié (2008) [8]

La fécule de pomme de terre et ses dérivés ont des propriétés spéciales, telles qu'une basse température de gélatinisation et une uniformité élevée de pâte. La fécule de pomme de terre est préférée dans l'industrie alimentaire parce que ses pâtes ont une bonne clarté (due à la présence d'un peu de lipides et de protéines). Dans l'industrie du papier, il y a également une préférence pour la fécule de pomme de terre en raison de la masse de l'amylose et de sa bonne solubilité. Les dextrines de fécule de pomme de terre ont également un avantage par rapport à d'autres amidons comme adhésif, en raison d'une rhéologie adéquate.

Cette bioressource est très utilisée dans l'industrie alimentaire soit dans l'état natif soit dans l'état modifié. Comme le souligne notre étude bibliographique, une des applications les plus courantes est l'utilisation des amidons modifiés pour leurs propriétés à la fois émulsifiantes et stabilisantes. Cependant, dans le domaine de l'environnement, l'utilisation de l'amidon est encore très peu développée. Dans le cadre de cette étude, nous nous proposons d'élargir les domaines d'utilisation potentielle de l'amidon modifié chimiquement en vue d'une application éco-technologique pour la réhabilitations des sols pollués. Pour cela, l'objectif de l'étude a deux principales directions :

-
- ✓ une modification chimique de cette molécule pour réaliser une matrice avec une grande solubilité dans l'eau ;
 - ✓ une augmentation des propriétés désorbantes vis à vis de molécules hydrophobes comme les HAP, notre molécule d'étude étant le BaP.

3.2. Matériels et méthodes

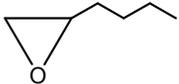
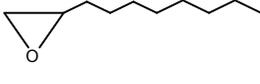
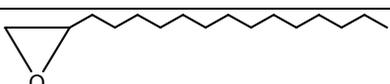
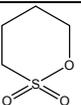
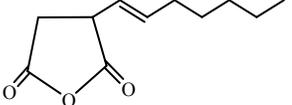
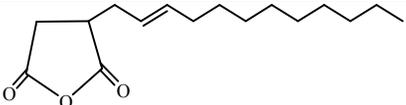
3.2.1. Les produits chimiques

Le substrat principal de ce travail est l'amidon de pomme de Terre (Panreac Quimica SAU, Espagne). Les solvants utilisés dans les synthèses réalisées sont le diméthyle sulfoxyde (DMSO) et l'acétone, fournis par Panreac Quimica SAU, Espagne. Le DMSO est caractérisé par la formule chimique C_2H_6OS , une masse molaire de 78,13 g/mol, un point de congélation $\geq 18^\circ C$. L'acétone est caractérisé par la formule chimique C_3H_6O , une masse molaire de 58,08 g/mol, la densité de 0,7925 g/cm³, la température de fusion $-94,6^\circ C$ et la température d'ébullition de $56,05^\circ C$.

Les catalyseurs utilisés en fonction des réactions sont soit l'hydroxyde de sodium (NaOH) soit la pyridine (C_5H_5N). L'hydroxyde de sodium (CAS 1310-73-2) a une masse molaire de 40,00 g/mol, une densité de 2,13 g/cm³, le point de fusion de $324^\circ C$ et une solubilité dans l'eau de 1090 g/L. Ce produit a été fourni par Carlo Erba Réactifs – SDS, Val de Reuil Cedex, France. La pyridine (CAS 110-86-1) de formule chimique C_5H_5N a une masse molaire de 79,10 g/mol (Fisher Scientific, France), une densité 0,983 g/ml et une température de fusion de $-41,15^\circ C$.

L'alkylation des amidons est réalisée avec l'oxyde de propylène; 1,2-époxyhexane; 1,2-époxydécane; 1,2-époxyhexadécane; 1,4-butane-sultone; 2-octen-1-ylsuccinic anhydride et 2-dodécen-1-ylsuccinic anhydride.

Tableau 3.4. Les caractéristiques des produits d'interaction utilisés pour l'alkylation

Produit chimique	Formule chimique	Fournisseur	Pureté	Masse molaire (g/mol)
Oxyde de propylène (C ₃ H ₆ O)		Acros Organics, France	99%	58,08
1,2-époxyhexane (C ₆ H ₁₂ O)		Acros Organics, France	97%	100,16
1,2-époxydécane (C ₁₀ H ₂₀ O)		Acros Organics, France	96%	156,27
1,2-époxyhexadécane (C ₁₆ H ₃₀ O)		Sigma-Aldrich, Allemagne	85%	240,42
1,4-butane-sultone (C ₄ H ₈ SO ₃)		Acros Organic, France	99%	136,17
2-octen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₁ H ₁₆ O ₃)		Sigma Aldrich, Allemagne	97%	270,27
2-dodécen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₆ H ₂₆ O ₃)		Sigma Aldrich, Allemagne	95%	266,38

Pour la neutralisation des produits, nous avons utilisé l'acide chlorhydrique 37% fourni par Panreac Quimica SAU, Espagne.

3.2.2. Propoxylation des amidons

3.2.2.1. Principe de la réaction

La modification par substitution chimique de l'amidon dépend, entre autres, de la source d'amidon, des états de réaction (concentration en réactif, temps de réaction, pH, présence des catalyseurs), du type de substituant et du taux de substitution ainsi que de la distribution du substituant dans la molécule d'amidon. La synthèse chimique concernant la réaction avec l'oxyde de propylène est principalement celle présenté dans la figure 3.8. :

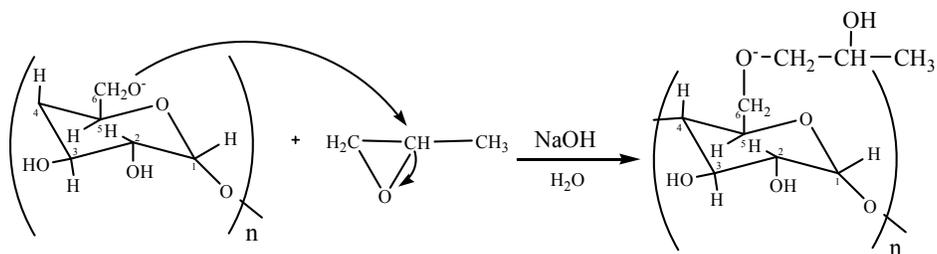


Figure 3.8. Représentation de la synthèse chimique entre l'amidon et le propylène oxyde

L'attaque du groupement propoxylé est de type nucléophile principalement à partir de l'alcool primaire d'anhydroglucose vers le carbone 2 de l'oxyde de propylène. Dans cette étude, nous avons fait varier différents paramètres pour trouver les meilleures conditions de réaction pour réaliser un macropolymère soluble dans l'eau.

3.2.2.2. Synthèse dans l'acétone

La modification chimique de l'amidon de pomme de terre utilisant comme solvant l'acétone est réalisée à une température de 50°C. Dans cette synthèse, l'amidon est ajouté dans un volume d'acétone et en parallèle, une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (7,4%) est ajoutée. L'addition de NaOH perturbe les liaisons hydrogène de l'amidon natif entraînant un gonflement des fibres d'amylopectine et d'amylose. La suspension est maintenue en forte agitation. L'oxyde de propylène (26%) est ajouté pour avoir le produit désiré. Après 24 heures de réaction, le produit est purifié par filtration sous vide et par un lavage avec un mélange acétone/méthanol (1:1) puis par un mélange méthanol/eau (4 :1) afin d'éliminer les sous-produits de synthèse et l'excédent de réactifs. Le produit filtré est passé sous vide et séché pendant 48 heures. Le produit final est ensuite caractérisé par RMN.

3.2.2.3. Synthèse dans le DMSO

La deuxième voie pour modifier chimiquement l'amidon natif utilise le diméthyl sulfoxyde (DMSO) comme solvant. Dans ce cas, nous avons fait varier les conditions afin d'optimiser la synthèse. Dans une étape préliminaire, l'optimisation des conditions de synthèse est réalisée en faisant varier les paramètres suivants : le pourcentage d'oxyde de propylène et la température de la réaction. Après solubilisation complète de l'amidon (48 heures), nous avons fait varier la proportion d'oxyde de propylène ajouté (entre 32% et 64%). Dans cet essai, nous avons laissé réagir l'oxyde de propylène avec l'amidon pendant 6 heures. Après ce temps de réaction, la proportion de 0,66% de NaOH est ajoutée sous forme

de poudre. Les températures de réaction sont 21°C et 50°C. A la fin de la réaction, le pH est ajusté entre 4 et 6 avec l'acide chlorhydrique (HCl) concentré. Le solvant DMSO est ensuite évaporé à une très basse pression pour récupérer l'amidon modifié. Le produit solide est solubilisé et est placé dans une membrane de dialyse (MWCO de 12-14000 Da–Medicell International Ltd, London), pour éliminer les dextrans et les sous-produits avec une masse molaire inférieure à 14000. La dialyse est réalisée sur une durée minimale de 3 jours, avec un changement régulier de l'eau. Après dialyse complète, le produit synthétisé est lyophilisé et caractérisé par RMN.

3.2.3. Alkylation avec les époxydes

3.2.3.1. Principe de la réaction

La réaction d'alkylation se réalise par l'addition de 1,2-époxyalcanes sur l'amidon propoxylé. La réaction est une attaque nucléophile entre les produits. Les époxyalcanes étudiés présentent des chaînes de longueurs différentes : C6, C10, C16. Le schéma de la réaction chimique préférentielle entre l'amidon propoxylé et l'époxyalcane est présenté ci-dessous dans la figure 3.9. :

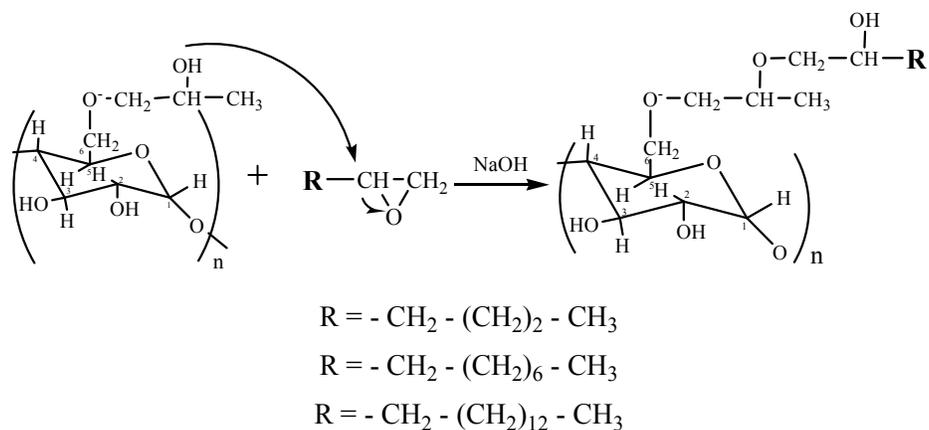


Figure 3.9. Le schéma réactionnel entre l'amidon propoxylé et les époxyalcanes

3.2.3.2. Synthèse chimique d'alkylation avec les époxydes

La réaction se déroule dans le DMSO, comme solvant, où l'amidon propoxylé est solubilisé pendant au maximum 4 heures. La réaction est effectuée à une température de 21°C. Après solubilisation complète de l'amidon, nous avons ajouté 3 moles des différents produits d'alkylation comme: 1,2-époxyhexane; 1,2-époxydécane et 1,2-époxyhexadécane. Ensuite, les produits sont mélangés intimement pendant 6 heures sous une forte agitation.

Cette seconde alkylation est démarrée par l'addition de NaOH en poudre comme catalyseur. Toute la réaction se déroule pendant 48 heures à température constante de 21°C. Après ce temps de réaction, la solution est acidifiée avec HCl jusqu'à un pH de 6. Le solvant est ensuite évaporé et le produit sec est mis à dialyser pendant 4 jours. Après dialyse, le produit est préparé pour lyophilisation et caractérisation par RMN.

3.2.4. Alkylation avec les sultones

3.2.4.1. Principe de la réaction

Depuis le brevet déposé par Rajewski et Stella [10] concernant la synthèse et l'utilisation des polymères sulfobutylés, le nombre de publications relatant leurs utilisations ne cesse d'augmenter.

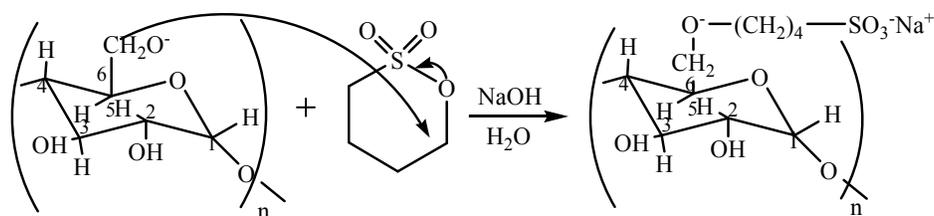


Figure 3.10. Le schéma réactionnel entre l'amidon propoxylé et 1,4-butane sultone

Les groupes hydroxyles de la molécule d'amidon, déprotonés par la solution basique, vont attaquer le réactif 1,4-butane sultone par un mécanisme de substitution nucléophile (figure 3.10.).

3.2.4.2. Synthèse chimique d'alkylation avec les sultones

Dans cette partie, nous faisons soit la synthèse de sulfobutylation de l'amidon natif, soit la synthèse de sulfobutylation de l'amidon propoxylé. La réaction se déroule dans le DMSO comme solvant où l'amidon (natif ou propoxylé) est complètement soluble. La réaction est effectuée à une température de 21°C. Après solubilisation complète d'amidon, nous avons ajouté 3 moles de 1,4-butane sultone pendant 6 heures en forte agitation. Comme catalyseur, nous avons utilisé NaOH en poudre (0,1 moles). Toute la réaction se déroule pendant 48 heures à la même température. Le pH final de la réaction est 6 (donc il n'est pas nécessaire de le neutraliser avec HCl). Le solvant (DMSO) est ensuite évaporé et le produit dialysé pendant 4 jours est lyophilisé.

3.2.5. Alkylation avec les anhydrides

3.2.5.1. Principe de la réaction

Une des modifications chimiques communes de l'amidon est l'estérification de la fonction hydroxyle du glucose par des acides ou des anhydrides d'acide.

Les réactions chimiques caractéristiques pour chaque produit d'interaction sont présentées dans la figure 3.11. :

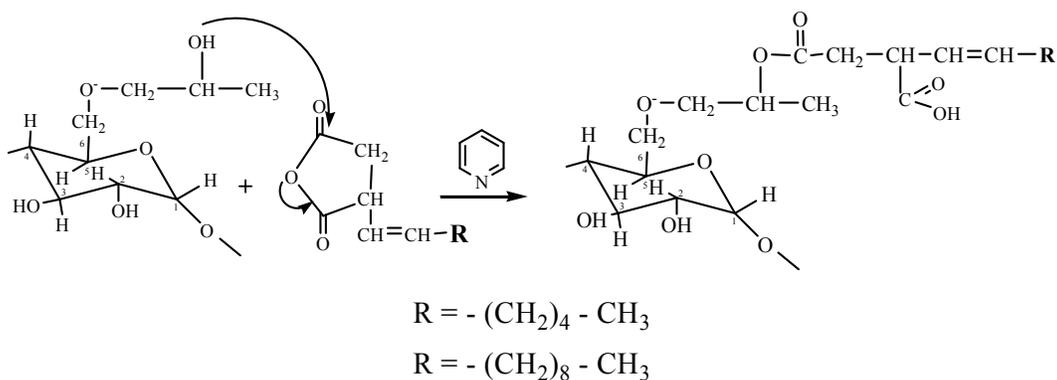


Figure 3.11. La réaction chimique caractéristique de l'interaction entre l'amidon propoxylé et l'anhydride

3.2.5.2. Synthèse chimique d'alkylation avec les anhydrides

La réaction d'alkylation avec les anhydrides est réalisée entre l'amidon natif et propoxylé et les différents anhydrides étudiés. Comme solvant, nous utilisons le DMSO qui solubilise l'amidon propoxylé en 4 heures. Dans cette réaction, la pyridine est utilisée comme catalyseur [11], elle est ajoutée (1,5 moles) avant l'addition d'anhydride. Nous avons fait varier les anhydrides en qualité (2-octen-1-ylsuccinic anhydride et 2-dodécen-1-ylsuccinic anhydride) et en quantité (de 0,01 à 3 moles). Toute la réaction se déroule à température ambiante sous atmosphère d'azote pendant 24 heures.

3.2.6. Etude RMN des produits

Après synthèse de ces différents produits, la caractérisation des produits est réalisée d'abord par spectre RMN du proton. Les analyses sont réalisées à la Maison de la recherche en Environnement Industriel (MREI 1) à Dunkerque au sein de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), sur un appareil de type AVANCE DPX 250 (et DPX 300) BRUKER. Les spectres de RMN 1H sont enregistrés à 250,13 MHz.

Les échantillons sont dissous soit dans l'eau deutérée (D₂O) pour les produits solubles dans l'eau, soit dans le diméthyle sulfoxyde deutéré (DMSO-D), pour les produits non hydrosolubles. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm. Grâce à l'aide des spectres RMN du proton, nous pouvons exprimer la substitution molaire (MS) moyen de chaque produit.

Le degré de substitution (DS) représente le nombre moyen de groupes d'hydroxyle sur chaque unité d'anhydroglucose, qui dérive par des groupes de substituant. Le DS est exprimé en tant que nombre moyen de substituant par unité d'anhydroglucose. Comme chaque unité d'anhydroglucose possède trois groupes d'hydroxyle disponibles pour la substitution, le DS possible maximum est donc de 3. Cependant, les substances sont capables de réagir entre elles donnant naissance à un phénomène de polyalkylation. Ainsi, par contraste avec le degré de substitution, la valeur de la substitution molaire (MS) peut être plus grande que 3.

Le MS pour l'amidon propoxylé est calculé avec la formule [12] :

$$MS = \frac{I_A}{3 \cdot I_{AGU}} \quad (1)$$

I_A = la surface du pic RMN correspondant au groupement hydroxypropylé

I_{AGU} = la surface du pic RMN correspondant au proton équatorial de l'unité anhydroglucose d'amidon

Le MS pour les produits bifonctionnels est calculé avec une autre formule [13] :

$$MS = \frac{10 \cdot K}{2 \cdot n - 3 - 3 \cdot K} \quad K = \frac{I_{alk}}{I_{rest}} \quad (2)$$

n = nombre d'atomes de carbone de 1,2 époxyalcanes

I_{alk} = l'intégrale du pic RMN correspondant aux protons alkyl

I_{rest} = l'intégrale du pic RMN correspondant aux protons restant

3.2.7. Etude FTIR des produits

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Les analyses sont réalisées à l'Université «Vasile Alecsandri» de Bacau, Roumanie. La spectroscopie FTIR permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans la molécule étudiée. L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à Transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les

longueurs d'ondes absorbées par la molécule et les intensités de l'absorption. L'appareil utilisé est un FTIR BRUKER TENSOR 27. Le domaine IR correspondant à nos molécules se situe 500 et 4000 cm^{-1} . 60 spectres avec une résolution de 2 cm^{-1} sont acquis et moyennés.

3.2.8. Mesure de la solubilité aqueuse

La solubilité aqueuse des produits est une autre caractérisation importante pour les produits finaux synthétisés. Elle est déterminée par la réalisation d'une solution saturée de produit synthétisé dans un volume précis d'eau distillée à température ambiante. Après 24 heures de repos, 10 ml de chaque solution est prélevé, lyophilisé et ensuite pesé. La solubilité est évaluée dans trois réplicats pour chaque produit synthétisé et exprimée en gramme de produit/l de solvant inorganique (l'eau).

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Choix des paramètres réactionnels

Le choix des paramètres réactionnels est fait par l'évaluation qualitative et quantitative du greffage d'oxyde de propylène à l'aide du spectre proton RMN. Le spectre représentatif d'amidon natif gélatinisé est présenté dans la figure 3.12.

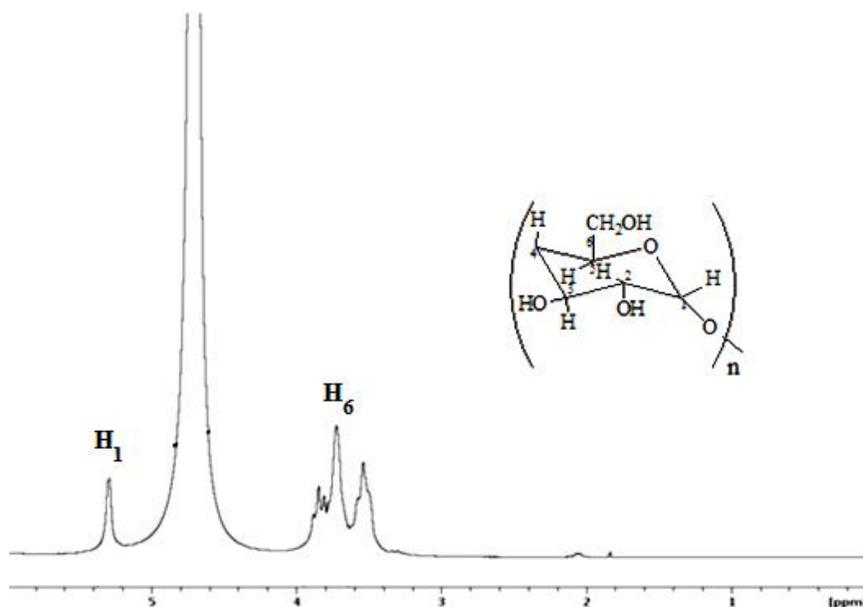


Figure 3.12. Le spectre RMN du ^1H d'amidon natif gélatinisé dans D_2O [14]

Dans le spectre d'amidon natif, le massif entre 3 et 4 ppm est spécifique des protons d'unité d'anhydroglucose. Un autre pic caractéristique de l'amidon est compris entre 5 et 6 ppm est correspond au déplacement chimique du proton équatorial du carbone 1 de l'anhydroglucose.

Dans un premier temps, une étude préliminaire nous a permis de trouver les paramètres pour la suite de la synthèse des dérivés propoxylés de l'amidon [14]. Dans la figure 3.13. sont présentés les spectres du proton des amidons obtenus avec différentes conditions et paramètres réactionnels. Le pic caractéristique des protons du groupement méthyle (CH₃) de l'hydroxypropyl sort entre 1,1 et 1,2 ppm [12]. En fonction de chaque modification, nous avons trouvé grâce à la formule de calcul (1) les différents MS.

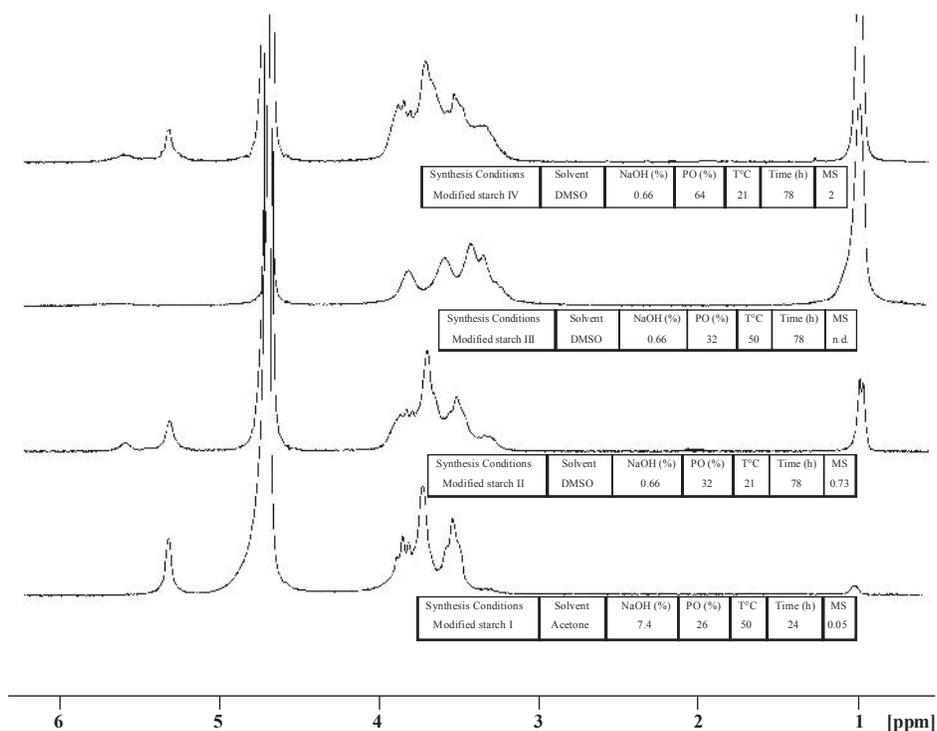


Figure 3.13. Les spectres RMN ¹H des amidons dans différentes conditions dans D₂O [14]

L'utilisation d'acétone (amidon modifié I) comme agent de synthèse conduit à un très faible degré de substitution dans la réaction de propoxylation (MS = 0,05). Pour cette raison, nous avons abandonné ce solvant. Comme solvant, pour la suite des réactions, le DMSO est choisi [15]. L'optimisation de la réaction de propoxylation est réalisée sur deux paramètres principaux (température et concentration d'oxyde de propylène). La température varie entre 21°C et 50°C et la concentration d'oxyde de propylène entre 32% et 64%. Les amidons modifiés III et IV sont des produits pour lesquels les conditions de leur synthèse dégradent la

structure de l'amidon natif. En effet, on constate une déformation du massif caractéristique des protons de l'anhydroglucose, vraisemblablement liée à un taux d'hydrolyse élevé de l'amidon, en raison d'une température réactionnelle importante (50°C) dans le cas de l'amidon modifié III. Cette hypothèse est renforcée par la disparition du pic d'absorption H1 à 5,1 ppm, caractéristique du proton équatorial de la liaison α -1,4 [12]. Pour le produit IV, le spectre RMN obtenu met en évidence un phénomène de polypropoxylation se traduisant par un MS de 2. Le spectre RMN du produit II, proche de celui de l'amidon natif, nous permet de conclure que les conditions réactionnelles de cette synthèse respectent le plus la structure moléculaire de l'amidon natif. En conclusion, la structure d'amidon est respectée si la modification chimique est réalisée dans les conditions suivantes : DMSO comme solvant de la réaction, 0,66% NaOH (en fonction de la quantité d'amidon), 32% oxyde de propylène, une température de 21°C et le temps de réaction de 78 heures [14]. Ces conditions expérimentales ont été retenues dans la suite du travail.

3.3.2. Les amidons modifiés obtenus

La présentation de tous les produits synthétisés obtenus figure dans le tableau 3.4. Les principales caractéristiques de ces amidons sont le MS moyen et le rendement de la réaction. Sachant que l'amidon est un macropolymère d'origine biologique, il est très difficile d'avoir une bonne reproductibilité de produit synthétisé. Les produits synthétisés sont obtenus par des réactions, d'une part entre l'amidon natif (P0) et les époxydes, le butane sultone et les anhydrides et d'autre part entre l'amidon propoxylé (P2) et les mêmes réactifs d'alkylations décrits ci-dessus. P1 synthétisé dans l'acétone présente un taux de propoxylation faible (MS = 0,07) ce qui reflète une faible modification des propriétés physico-chimiques de l'amidon. Bien que le rendement de P1 soit élevé (64,23%), ce produit n'est pas retenu dans la suite de l'étude. Pour la suite, toutes les synthèses sont réalisées dans le DMSO, à partir soit de l'amidon natif P0, soit de l'amidon propoxylé P2 (MS = 1,7) dans le cas des amidons bifonctionnels. P6 est obtenu par la réaction entre l'amidon propoxylé (MS = 0,7) (voir figure 3.9.) et le 1,2-époxydécane. Bien que le MS soit intéressant, il nous a été impossible de reproduire cette réaction même en respectant les conditions expérimentales. Ce résultat peut traduire la difficulté d'obtenir une reproductibilité stricte sur des molécules naturelles et aussi complexes que l'amidon. Les autres produits de synthèse obtenus sont caractérisés et discutés dans les paragraphes qui suivent.

Tableau 3.5. Les produits obtenus après les synthèses chimiques de modification

Code	Produits	Solvant	Hydroxypropoxylation	MS	Alkylation	MS	Rendement (%)
P0	Amidon natif	-	-	-	-	-	-
P1	Amidon-C3	Acetone	3 moles-C ₃ H ₆ O	0,07	-	-	64,23
P2	Amidon-C3	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	-	-	42
P3	Amidon-C6	DMSO	-	-	3 moles-C ₆ H ₁₂ O	0,06	80,33
P4	Amidon prop. ^a -C6	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	3 moles-C ₆ H ₁₂ O	0,04	43,14
P5	Amidon-C10	DMSO	-	-	3 moles-C ₁₀ H ₂₀ O	0,03	68,02
P6	Amidon prop.-C10	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	0,7	3 moles-C ₁₀ H ₂₀ O	0,2	62,7
P7	Amidon prop.-C10	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	5 moles-C ₁₀ H ₂₀ O	0,01	20,36
P8	Amidon-BS ^b	DMSO	-	-	3 moles-C ₄ H ₈ SO ₃	1	53,11
P9	Amidon prop.-BS	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	3 moles-C ₄ H ₈ SO ₃	2,8	38,98
P10	Amidon prop.-C10 (e) ^c	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	3 moles-C ₁₀ H ₂₀ O	0,01	37,67
P11	Amidon prop.-C16 (e)	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	3 moles-C ₁₆ H ₃₀ O	0,02	60,22
P12	Amidon prop.-C16 (a) ^d	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	3 moles-C ₁₆ H ₂₆ O ₃	0,95	24,71
P13	Amidon prop.-C16 (a)	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	0,5 moles-C ₁₆ H ₂₆ O ₃	2,83	15,53
P14	Amidon prop.-C16 (a)	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	0,1 moles-C ₁₆ H ₂₆ O ₃	2,38	32,92
P15	Amidon prop.-C16 (a)	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	0,01 moles-C ₁₆ H ₂₆ O ₃	0,14	66,87
P16	Amidon prop.-C16 (a)	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	0,05 moles-C ₁₆ H ₂₆ O ₃	0,97	41,15
P17	Amidon prop.-C11 (a)	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	0,1 moles-C ₁₁ H ₁₆ O ₃	1,63	42,86
P18	Amidon prop.-C11 (a)	DMSO	3 moles-C ₃ H ₆ O	1,7	0,05 moles-C ₁₁ H ₁₆ O ₃	0,49	63,29
P19	Amidon-C11 (a)	DMSO	-	-	0,1 moles-C ₁₁ H ₁₆ O ₃	0,32	63,9
P20	Amidon-C16 (a)	DMSO	-	-	0,1 moles-C ₁₆ H ₁₆ O ₃	0,63	67,97

^aAmidon prop. – Amidon propoxylé^bAmidon-BS – Amidon natif qui réagit avec 1,4-butane sultone^cAmidon prop.-Cx (e) – Amidon propoxylé qui réagit avec des époxydes avec différentes chaînes (de 6 à 16)^dAmidon prop.-Cx (a) – Amidon propoxylé qui réagit avec des anhydrides avec différentes chaînes (11 et 16)

3.3.3. Caractéristiques des produits synthétisés

3.3.3.1. Caractéristiques des amidons modifiés

Les amidons modifiés représentent les produits qui sont obtenus par une réaction d'alkylation, décrite dans la figure ci-dessous:

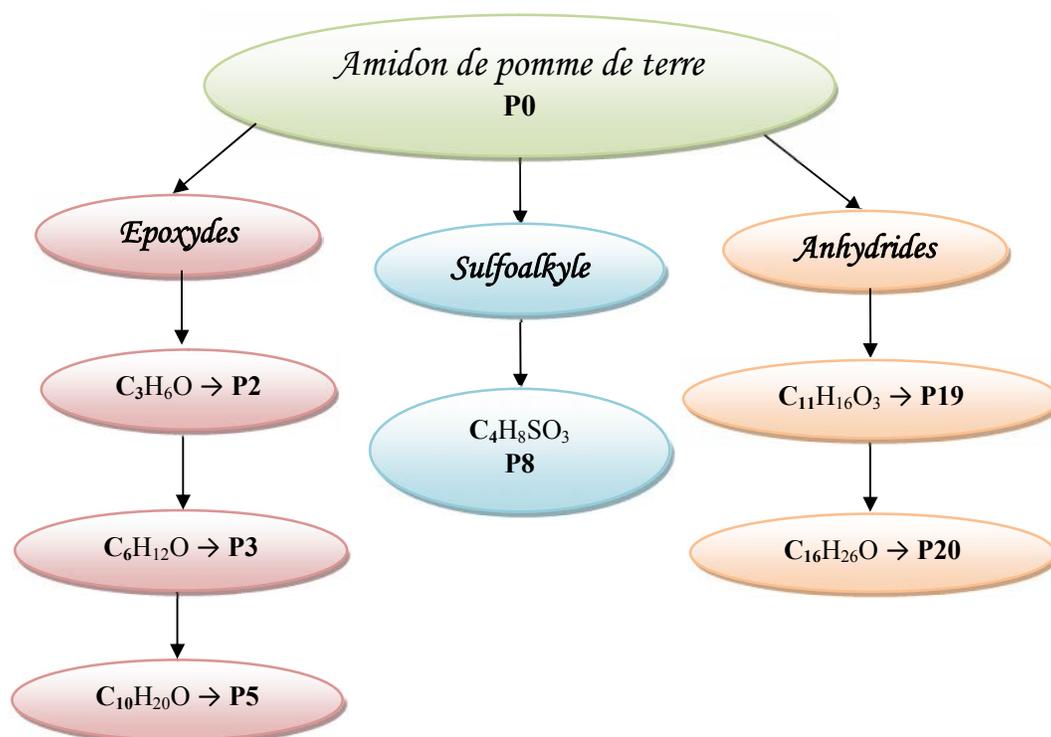


Figure 3.84. Stratégie de synthèse des amidons modifiés à partir de l'amidon natif (P0)

Le produit de départ, l'amidon natif (P0), est caractérisé par le spectre FTIR (figure 3.15.).

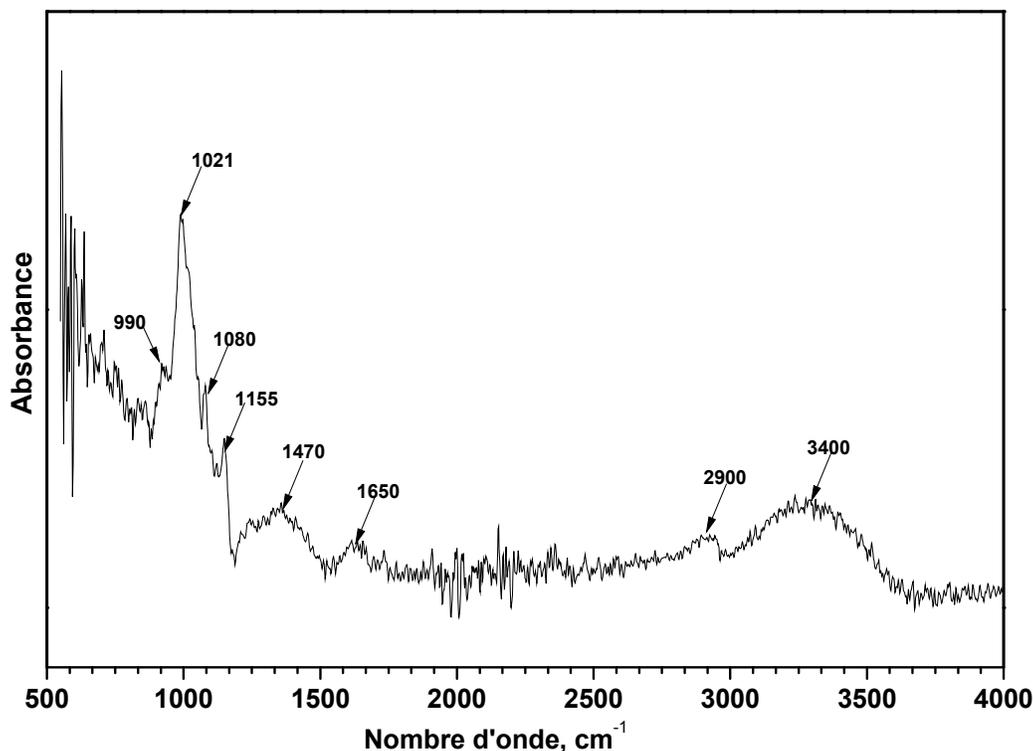


Figure 3.95. Le spectre FTIR de l'amidon natif de pomme de terre (P0)

Le spectre montre les vibrations de toutes les liaisons chimiques spécifiques à l'amidon natif. L'absorption à 990 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation pour le cycle pyranique du glucose présent dans l'amidon. D'autres bandes d'absorption caractéristiques sont les bandes vers 1021 , 1080 et 1155 cm^{-1} attribuées aux liaisons qui existent dans le groupement -C-O-C- du glucose [16]. L'absorption de l'eau qui existe dans l'amidon est spécifique des bandes vers 1470 et 1650 cm^{-1} [17]. La bande à 2900 cm^{-1} est caractéristique de la vibration d'élongation C-H [16]. Une bande d'absorption importante située à l'extrémité du spectre de 3400 cm^{-1} , attribuée à la liaison d'hydrogène qui existe dans le groupement hydroxyle, contribue au complexe vibrationnel des élongations associées avec les liaisons libres inter- et intramoléculaire des groupes hydroxyles spécifiques de la macrostructure d'amidon [18].

Tous les produits obtenus sont caractérisés par les principales propriétés auxquelles nous sommes intéressés pour la suite des expériences: le MS calculé d'après les spectres RMN du ^1H et la solubilité dans l'eau. Les caractéristiques des produits obtenus sont présentées dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6. Présentation des caractéristiques des amidons modifiés selon la stratégie présentée dans la figure 3.10.

Code	MS	Solubilité aqueuse (g/L)
P0	-	0,35
P2	1,70	14,41
P3	0,06	15,64
P5	0,03	3,98
P8	1,00	20,63
P19	0,32	2,79
P20	0,63	0,82

Dans la figure 3.16. est présenté le spectre RMN du proton d'amidon natif et les spectres des produits obtenus par l'interaction d'amidon avec les produits d'alkylation. Les spectres indiquent la modification de la molécule d'amidon natif, mais aussi grâce aux intégrations, nous pouvons calculer le MS correspondant pour chaque produit.

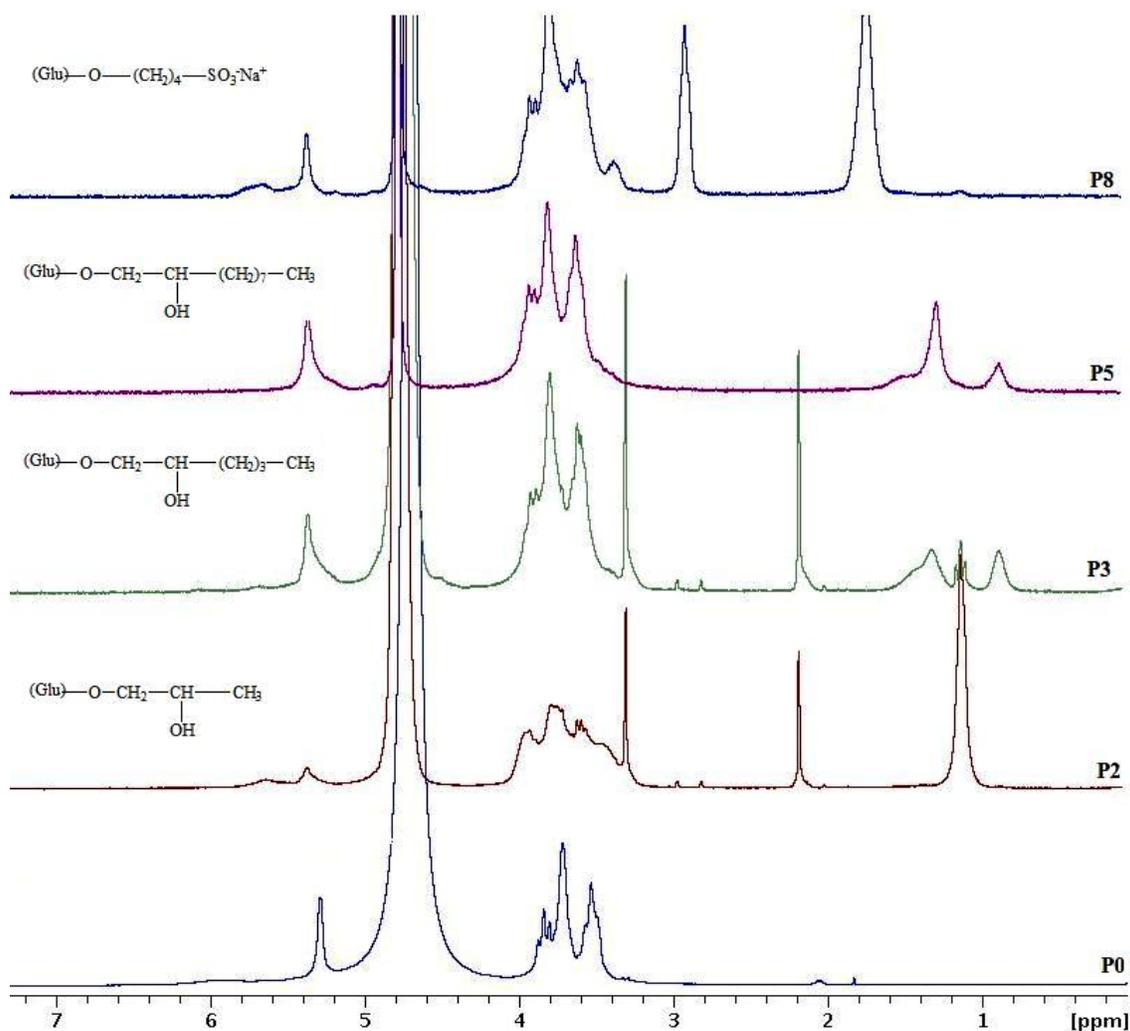


Figure 3.106. Les spectres RMN ^1H d'amidon natif et des éthers d'amidon dans D_2O

Rappelons que les éthers d'amidon sont obtenus par réaction chimique entre l'amidon natif de pomme de terre et 1,2 époxyalcanes (P2, P3 et P5) et 1,4 butane sultone (P8). Les spectres sont réalisés dans le D₂O comme solvant et le pic caractéristique sort à 4,9 ppm. Les pics entre 0,75 et 1,60 ppm correspondent au groupement chimique CH₃- et CH₂- de la chaîne alkyle greffée sur la molécule d'amidon [13]. Entre 1,3 et 2,8 ppm, nous trouvons le pic correspondant au proton de groupement méthylène formé dans la réaction d'alkylation [19]. Le signal entre 3 et 6 ppm appartient aux protons de la structure glycosidique d'amidon. Nous observons aussi dans la figure 3.16. que la synthèse des ces produits respecte le plus la structure native de l'amidon natif.

Ces spectres servent à la détermination de MS correspondant pour chaque produit, après l'application de la formule (1) décrite dans le paragraphe 3.2.6. Pour les produits P2, P3 et P5, la réaction est réalisée entre les groupes hydroxyalkyliques d'époxydes et l'amidon. Le MS diminue en fonction de la longueur de la chaîne de carbone greffée. P2 présente un MS moyen de 1,7 ce qui est la valeur la plus élevée comparativement aux autres MS obtenus. Quand la modification est faite avec une chaîne alkyle plus grande (P3 et P5), le MS diminue de 0,06 à 0,03 sans doute en raison de la difficulté de pénétration d'époxydes dans la molécule d'amidon. Une autre hypothèse serait liée à la diminution de la réactivité chimique des liaisons époxydes du à l'effet mésomère donneur de la chaîne alkyle.

Les solubilités aqueuses sont différentes en fonction de la molécule greffée. Le greffage d'amidon avec les époxydes (P2, P3 et P5) donne l'information que l'amidon devient plus soluble, lorsqu'on y greffe une chaîne jusqu'à 6 carbones (15,64 g/L). Lorsqu'on augmente le nombre de carbones greffés directement sur l'amidon (par exemple 10 carbones pour P5), nous observons une très forte diminution de la solubilité (3,98 g/L). Cela peut s'expliquer par le fait que le greffage de 1,2-époxydécane se réalise à la surface de la molécule car la longueur de la chaîne carbonée limite, en raison d'un encombrement stérique plus important, la diffusion à l'intérieur de la molécule d'amidon. Les chaînes greffées en C10 pourraient également stimuler l'agrégation de molécules d'amidon par des liaisons hydrophobes entraînant ainsi une diminution importante de la solubilité. Les produits qui possèdent une chaîne alkyle inférieure à 6 carbones (P2 et P3) présentent une solubilité importante dans l'eau.

Concernant l'interaction entre l'amidon et 1,4 butane sultone (P8), le greffage de groupement sultone est préféré sur les positions 3 et 6 de la molécule d'anhydroglucose [20]. Le signal caractéristique sort entre 1,8 et 3 ppm. Ce produit P8 présente un MS de 1. De plus, P8 présente une solubilité aqueuse élevée (20,63 g/L). En effet, l'extrémité de la chaîne

alkylée de 1,4-butane sultone possède un groupement sulfonate possédant une charge négative, ayant pour conséquence une augmentation probable de la polarité de l'amidon modifié, ce qui lui confère une solubilité élevée.

Les spectres RMN ^1H de l'amidon natif et des produits obtenus en réaction avec les anhydrides sont présentés dans la figure 3.17. Ils sont réalisés dans le DMSO deutérée (DMSO-D), comme solvant, en raison de la faible solubilité des produits étudiés. Le signal du solvant sort à 2,85 ppm.

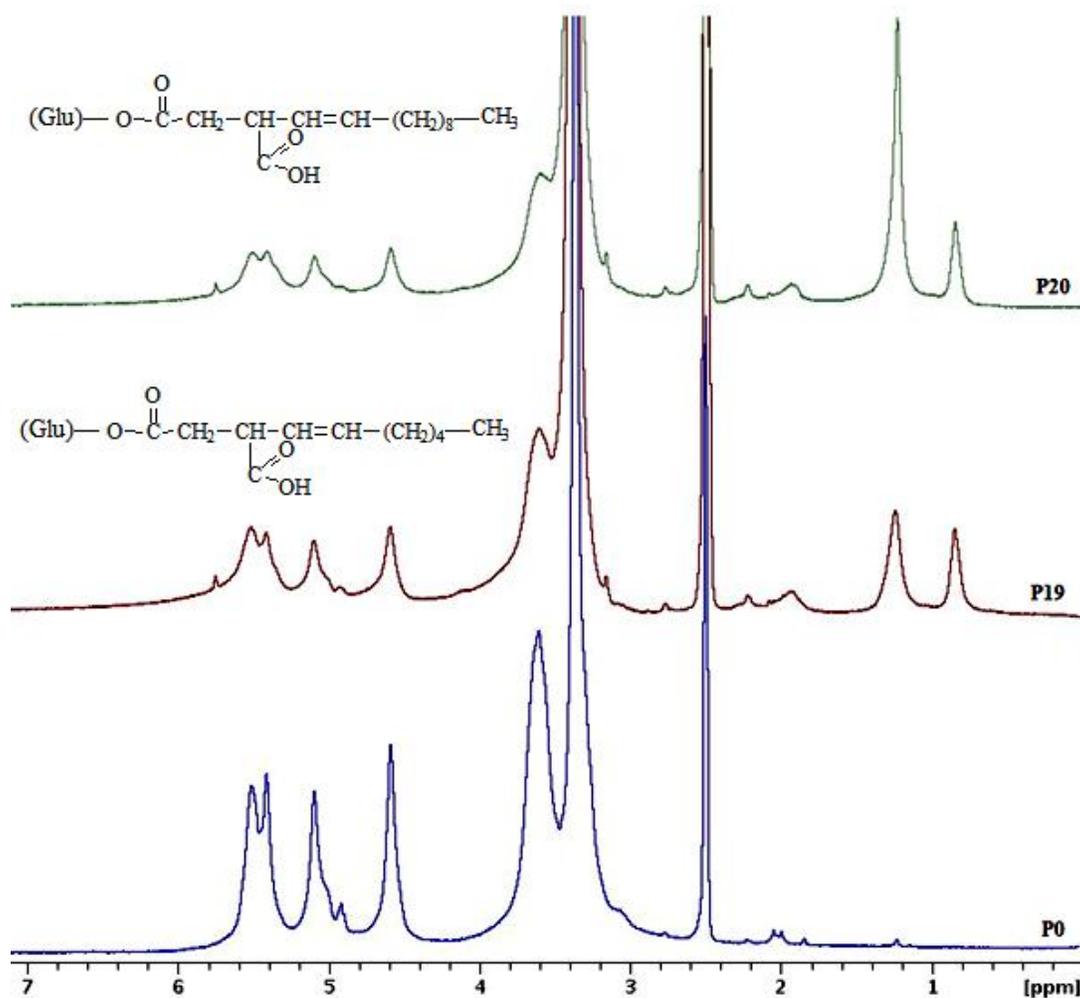


Figure 3.17. Les spectres RMN ^1H de l'amidon natif et des esters d'amidon dans DMSO-D

L'amidon modifié avec les anhydrides présente des signaux additionnels différents. Le groupement spécifique aux anhydrides est présenté par les pics du proton de méthyl entre 0,8 et 1,3 ppm. A 0,8 ppm, nous observons le déplacement chimique caractéristique du CH_3 -de la chaîne alkyl d'anhydride. Les pics pour les groupement chimiques spécifiques aux

groupements alkyls des anhydrides $-\text{CH}-$, $-(\text{CH}_2)_n-$ et $-\text{CH}_3$ sortent à 1,8 ; 1,3 et 0,85 ppm. Entre 4,5 et 6 ppm, nous trouvons les signaux du proton spécifique à la molécule d'anhydroglucose [21]. Le MS pour ces produits est calculé à l'aide de la formule (2) décrite dans le paragraphe 3.2.6. Contrairement aux époxydes, le MS des produits résultants (P19 et P20) augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée. Lors de la synthèse avec une chaîne de 11 atomes de carbone (P19), on obtient un MS de 0,32 comparativement au 0,63 dans le cas d'une modification avec 16 atomes (P20). De plus, les modifications chimiques d'amidon natif avec les anhydrides donnent des produits très complexes. Les solvants utilisés (le DMSO et la pyridine) nous permettent de mieux respecter la molécule de polymère étudié.

Dans le cas des anhydrides (P19 et P20), le greffage sur la molécule d'amidon confirme aussi la diminution de la solubilité lorsque la chaîne de carbones augmente (de 2,79 g/L à 0,82 g/L). La pénétration d'anhydride avec un bras de 16 atomes de carbone dans la structure ramifiée d'amidon se réalise très difficilement en raison de la masse molaire relativement élevée d'anhydride. Les anhydrides augmentent l'hydrophobicité des amidons modifiés [22]. En attachant les groupes hydrophobes à la répétition des unités de glucose, les molécules modifiées d'amidon deviennent amphiphiles et fonctionnent comme stabilisateurs d'émulsion. Une espèce chimique est dite amphiphile ou bien amphipathique lorsqu'elle possède à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe. La longueur du groupe alkényle et le degré de substitution déterminent finalement le caractère hydrophobe d'amidon modifié.

3.3.3.2. Caractéristiques des amidons bialkylés

Nous avons continué notre étude en développant de nouveaux produits bifonctionnels ayant comme molécule de départ l'amidon propoxylé (P2). La stratégie caractéristique de synthèse est présentée dans la figure 3.18.:

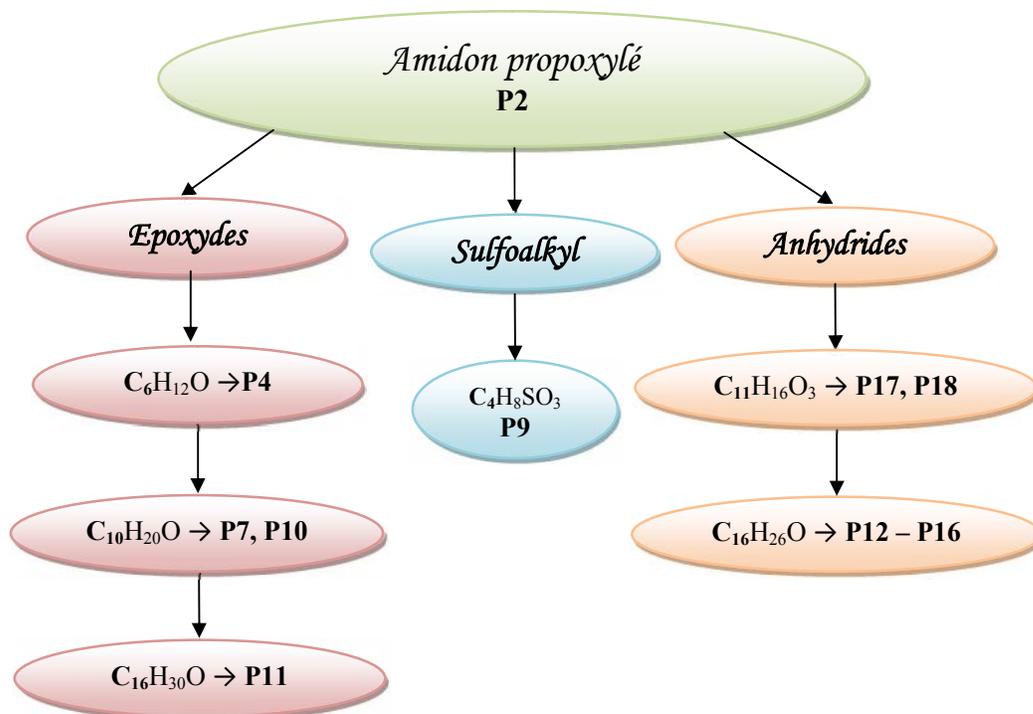


Figure 3.118. Stratégie de synthèse des amidons bialkylés à partir de l'amidon propoxylé (P2)

Le produit de départ (P2) est caractérisé par le spectre FTIR pour montrer la propoxylation d'amidon natif et le spectre est présenté dans la figure 3.19.

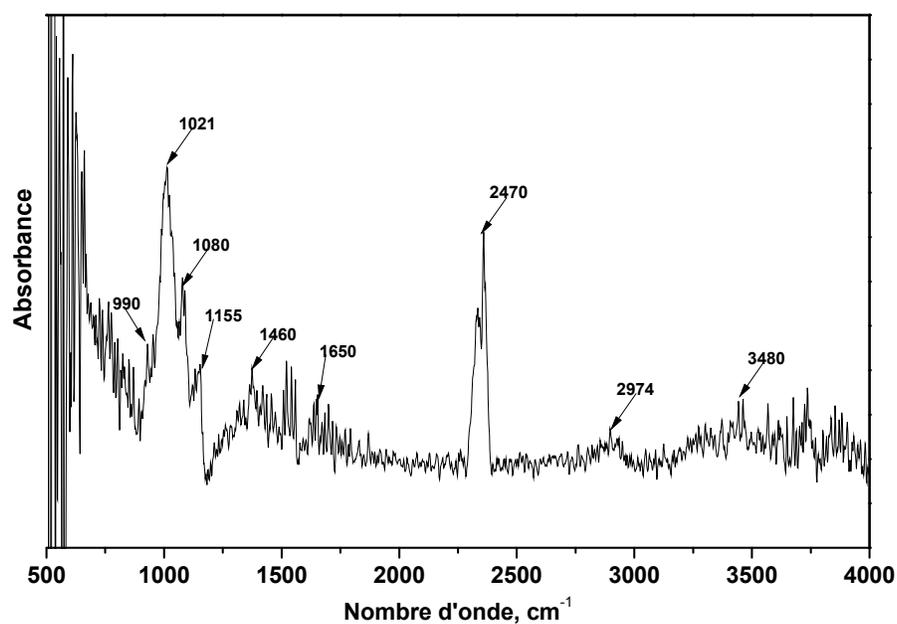


Figure 3.129. Le spectre FTIR d'amidon propoxylé (P2)

Rappelons que l'amidon propoxylé est obtenu par la réaction entre l'amidon de pomme de terre et l'oxyde de propylène. Les bandes spécifiques à 990, 1021, 1080 et 1155 cm^{-1} présentent des vibrations d'élongations caractéristiques de la structure de l'amidon. A 1460 cm^{-1} , nous observons une bande moyenne et fine spécifique de l'élongation de la liaison C-H de l'hydroxypropylène [23]. L'absorption de l'eau vers 1650 cm^{-1} est faible et fine en comparaison avec l'amidon natif de pomme de terre où elle est très large. La bande intense et fine vers 2470 cm^{-1} est caractéristique du groupe OH d'oxyde de propylène lié avec les unités d'anhydroglucose d'amidon [24]. L'absorption vers 2974 cm^{-1} appartient au groupement CH asymétrique [17]. La bande spécifique à un nombre d'onde de 3480 cm^{-1} devient faible et fine, expliquant la réaction entre l'oxyde de propylène et les groupes hydroxyle d'amidon avec des liaisons inter- et intramoléculaires.

Après cette hydroxypropoxylation, nous avons réalisé de nouvelles synthèses sur la structure d'amidon modifié avec différents groupements chimiques (figure 3.18.). Cet amidon hydropropoxylé nous a servi de molécule initiale pour la synthèse d'amidon plus complexe.

Les produits synthétisés sont caractérisés par le MS calculé à l'aide du spectre RMN du proton de chaque produit, par la solubilité aqueuse et par le rendement de la réaction. Dans le tableau 3.7. sont présentées leurs caractéristiques spécifiques.

Tableau 3.7. Les caractéristiques des produits synthétisés selon la stratégie présentée dans la figure 3.18.

Code	MS	Solubilité aqueuse (g/L)	Rendement (%)
P2	1,70	14,41	42,00
P4	0,04	16,72	43,14
P7	0,01	18,83	20,36
P9	2,80	18,63	38,98
P10	0,01	15,64	37,67
P11	0,02	2,68	60,22
P12	0,95	NS*	24,71
P13	2,83	NS	15,53
P14	2,38	2,26	32,92
P15	0,14	3,58	66,87
P16	0,97	2,62	41,15
P17	1,63	4,41	42,86
P18	0,49	3,26	63,29

*NS – non soluble

L'interaction entre l'amidon propoxylé P2, les époxydes et le butane sultone donne des produits bialkylés qui ont les spectres RMN ^1H présentés dans la figure 3.20.

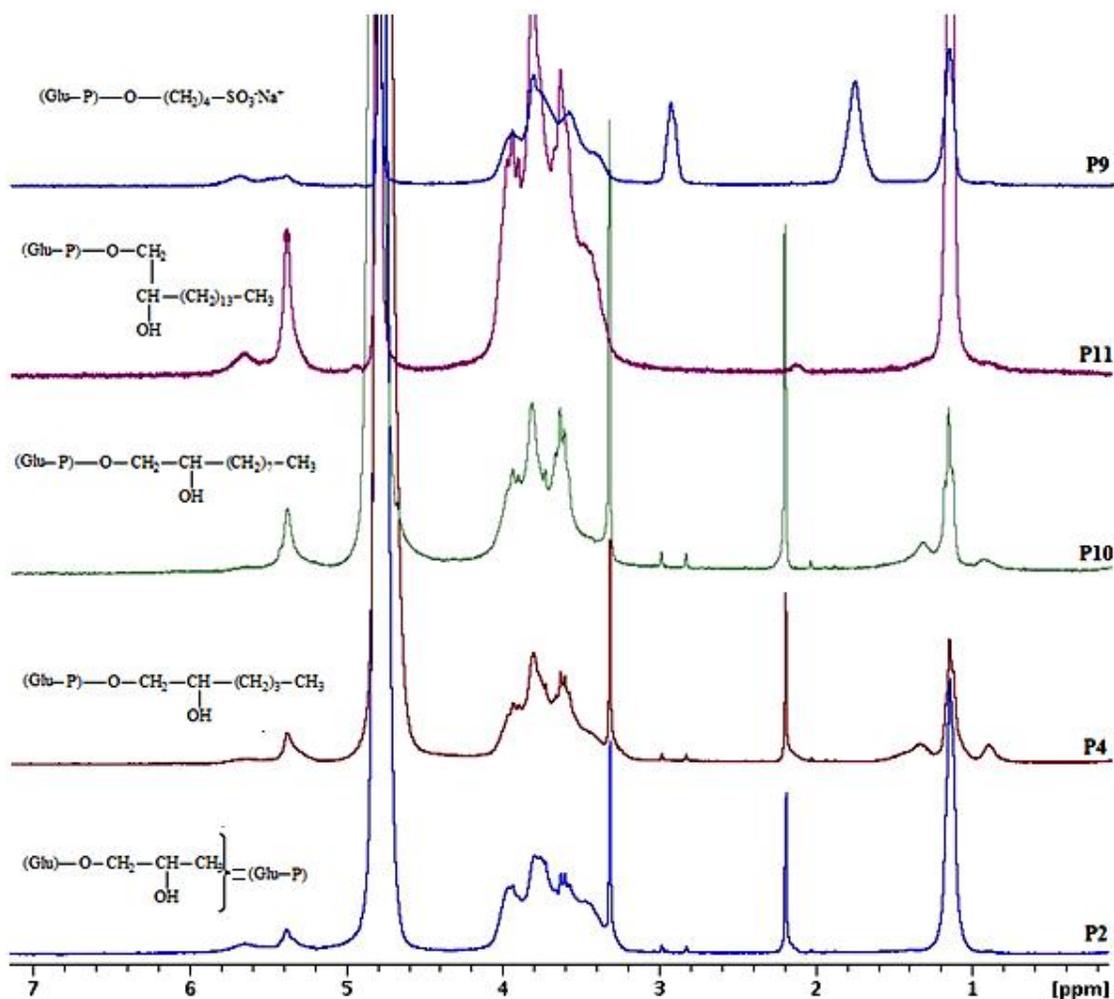


Figure 3.2013. Les spectres RMN ^1H de l'amidon propoxylé et ses éthers dans D_2O

Nous avons choisi de présenter les produits caractéristiques de chaque synthèse. Les produits caractéristiques choisis sont solubilisés dans D_2O . Le pic du solvant sort à 4,9 ppm. Les déplacements chimiques de protons entre 3 et 4 ppm et entre 5 et 6 ppm confirment la structure d'amidon natif. La modification d'amidon propoxylé par le greffage des différentes chaînes d'atomes de carbone est mise en évidence grâce aux pics entre 0,8 et 1,5 ppm. Le pic spécifique à la propoxylation reste sur la même valeur de 1,2 ppm. A 2,2 ppm, nous trouvons le proton spécifique au groupement OH d'oxyde de propylène lié à l'amidon. Grâce aux spectres RMN du proton, nous pouvons calculer le MS correspondant pour chaque produit. Le produit P4 présente le MS le plus élevé de 0,04 parmi les produits synthétisés avec les époxydes (figure 3.20.). Lorsque la chaîne alkyle d'époxyde augmente, le greffage se réalise plus difficilement et le MS diminue environ de moitié, ce qui est illustré dans la figure 3.21.

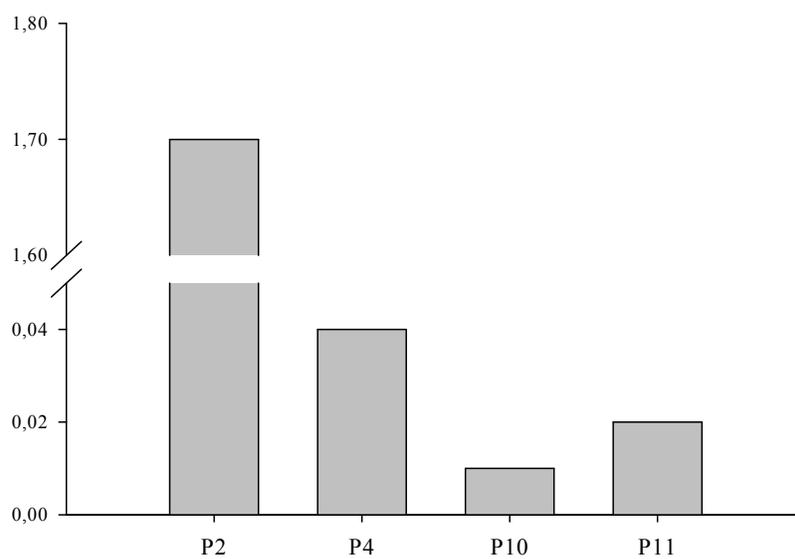


Figure 3.21. Représentation du MS en fonction de la molécule d'époxyde greffée

Dans la figure nous observons une chute de MS à 0,01 pour P10 et 0,02 pour P11. Cette faible réactivité serait due à l'effet mésomère donneur de la chaîne alkylée.

Les solubilités aqueuses de ces produits sont différentes en fonction de la longueur de la chaîne greffée. Par le greffage d'un époxyhexane avec 6 atomes de carbone, la solubilité dans l'eau présente une faible augmentation (16,72 g/L) en comparaison avec P2 (14,41 g/L). La réaction avec une molécule plus grande, comme 1,2-époxydécane influence positivement la solubilité aqueuse: P2 présente en effet une solubilité de 15,64 g/L. Le greffage d'une molécule, comme 1,2-époxyhexadécane ($C_{16}H_{30}O$), sur l'amidon propoxylé forme un produit (P11) qui présente une solubilité très faible (2,68 g/L) par rapport au produit de départ (P2). Il y a deux paramètres qui influencent la solubilité des amidons modifiés : la longueur de la chaîne alkyle et le taux de greffage. En effet, nous constatons que pour un taux de greffage semblable, nous avons une chute importante de la solubilité des amidons greffés avec des chaînes alkyles différentes. Le taux de greffage influence aussi les solubilités des amidons. En effet, l'amidon P2 qui possède une faible chaîne alkyle avec trois atomes de carbones présente une solubilité de 14,41 g/L et un MS de 1,7. Par contre P10 qui possède une chaîne alkyle avec dix atomes de carbones et un taux de greffage de 0,01 présente une solubilité dans l'eau de 15,64 g/L (figure 3.22.).

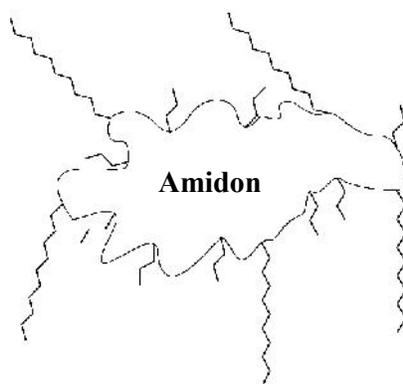


Figure 3.22. La représentation graphique du greffage de la chaîne alkyle

L'hypothèse proposée est la suivante : lorsqu'on attache un bras supérieur à dix carbones sur l'amidon propoxylé, la molécule obtenue forme un agrégat de molécules d'amidon par des liaisons hydrophobes qui précipite dans l'eau. Cette précipitation a comme répercussion une forte diminution de sa solubilité dans l'eau.

La réaction entre P2 et le 1,4-butane sultone forme un produit P9 avec un MS de 2,8. Cette valeur donne l'information que le bras sulfobutylé est bien fixé sur la molécule d'amidon propoxylé. Attachant un bras sulfobutyle, la solubilité du produit obtenu augmente jusqu'à 18,63 g/L. Cette solubilité importante s'explique par l'apport des groupements chargés sulfonates (SO_3^-) entraînant une stimulation de la polarité de la molécule obtenue.

L'étude est poursuivie par le greffage des anhydrides sur P2. L'alkylation avec les anhydrides est réalisée en respectant le principe de réaction décrit dans le paragraphe 3.2.5. Dans la figure 3.23. sont présentés les spectres superposés de P2 et de ses esters dans le DMSO-D. Le pic caractéristique du solvant sort environ à 2,58 ppm. Rappelons que le catalyseur utilisé est la pyridine, un catalyseur avec une faible action sur l'amidon permettant de préserver la structure du produit P2. Les produits choisis, qui sont étudiés par spectre RMN, sont P14 et P17.

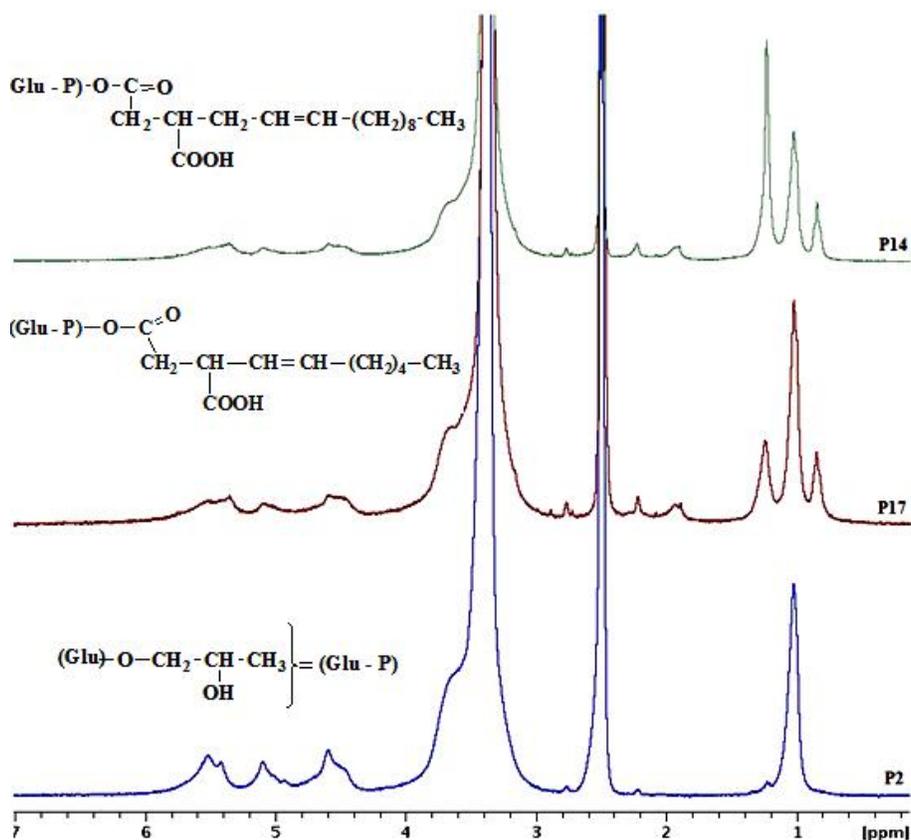


Figure 3.23. Les spectres RMN ^1H de P2 et ses éthers dans DMSO-D

Les produits P2, P17 et P14 sont solubilisés dans le DMSO-D en raison de leur faible solubilité dans l'eau (pour P17 et P14). Le massif entre 0,8 et 1,4 ppm est caractéristique du groupement chimique attaché au l'amidon propoxylé, qui est présent dans les produits synthétisés. Les pics spécifiques au groupement anhydroglucose sort entre 3,5 et 5,5 ppm. Nous trouvons une variation de MS de 2,38 (P14) à 1,63 (P17) en fonction de la longueur de chaîne. Parallèlement à l'hypothèse, émise pour les époxydes (l'effet mésomère donneur), il est probable de trouver le même mécanisme dans le cas d'anhydride.

Les solubilités aqueuses sont différentes en fonction de la molécule obtenue. L'alkylation avec 2-dodecen-1-ylsuccinic anhydride donne différents produits obtenus par une variation de nombre de moles d'anhydride. Parmi les produits obtenus, le produit P17 est retenu pour être caractérisé. Ce produit présente une solubilité aqueuse de 4,41 g/L. L'alkylation avec un anhydride qui présente 16 atomes de carbones disponibles permet d'obtenir le produit P14. Ce produit présente une solubilité dans l'eau de 2,26 g/L. Cette diminution de solubilité par rapport au P17 pourrait être liée probablement à des interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles conduisant à l'agrégation des molécules d'amidon obtenues.

Pour la suite d'étude nous avons choisi de caractériser à l'aide des spectres FTIR les produits P10 et P17.

Le spectre FTIR du produit P10 est présenté dans la figure 3.24.

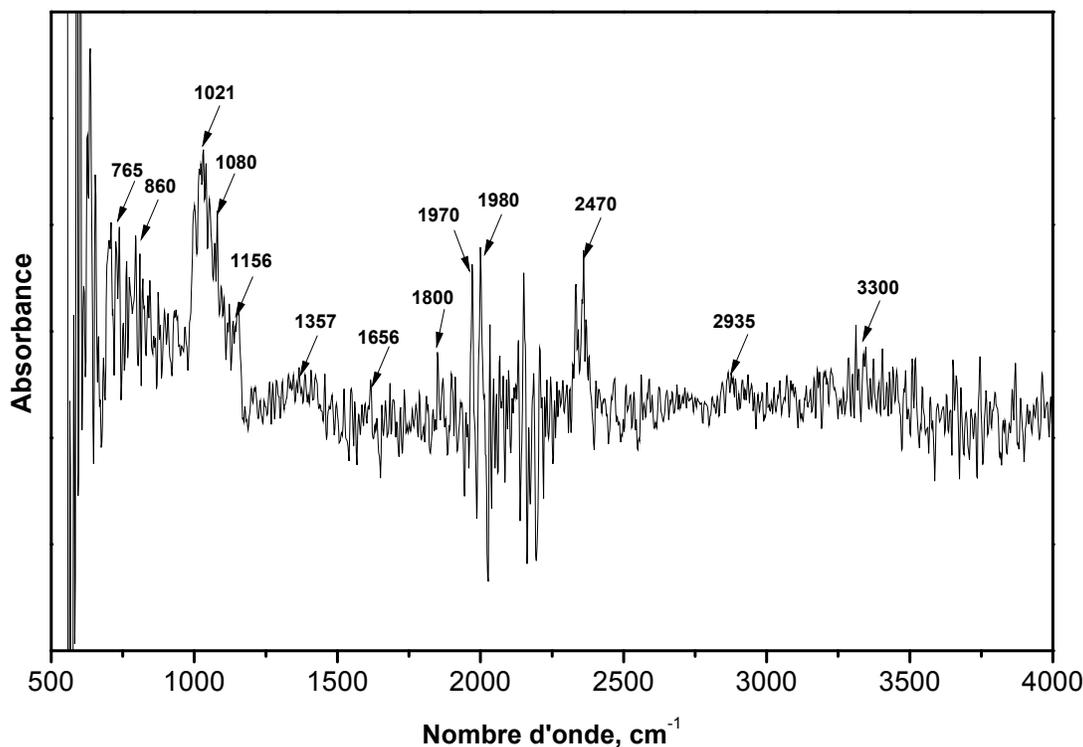


Figure 3.144. Le spectre FTIR caractéristique pour P10

Rappelons que P10 est obtenu par une réaction d'alkylation entre l'amidon propoxylé et 3 moles de 1,2-époxydécane. La structure d'amidon subit différentes modifications qui sont montrées dans le spectre. Les bandes vers 765 et 860 cm⁻¹ sont spécifiques à l'ensemble des structures de glucopyranose présentes dans l'amidon [16]. La bande avec les vibrations d'élongations à 1021, 1080 et 1156 cm⁻¹ est caractéristique du groupement -C-O-C- de glucose, qui semble être faible et moins intense [16]. A 1357 cm⁻¹ nous trouvons la vibration de la déformation du groupement CH présent dans la structure de la molécule étudiée [17]. Vers 1656 cm⁻¹ sort l'élongation spécifique de l'eau absorbée dans la molécule, et qui est très faible en comparaison avec P2 [17]. Au groupement CH insaturé correspond les absorptions 1800, 1970 et 1980 cm⁻¹. Nous trouvons la bande moyenne et fine spécifique au groupement OH d'époxyde vers 2470 cm⁻¹ [24]. L'absorption 2935 cm⁻¹ est caractéristique de l'absorption asymétrique du groupement C-H [25]. A un nombre d'onde de 3300 cm⁻¹ la bande d'absorption devient faible et très fine. Cette bande est spécifique au groupement OH

présent dans l'amidon. Ceci peut expliquer par le fait que les OH ont réagi avec l'époxyde. Une autre hypothèse peut être due à la double alkylation qui a permis d'occuper la plupart des groupements hydroxyles disponibles.

Le deuxième produit étudié par spectre FTIR est le produit P17. Ce produit est obtenu par une réaction entre l'amidon propoxylé (P2) et 2-octen-1-ylsuccinic anhydride. Le spectre spécifique est présenté dans la figure 3.25.

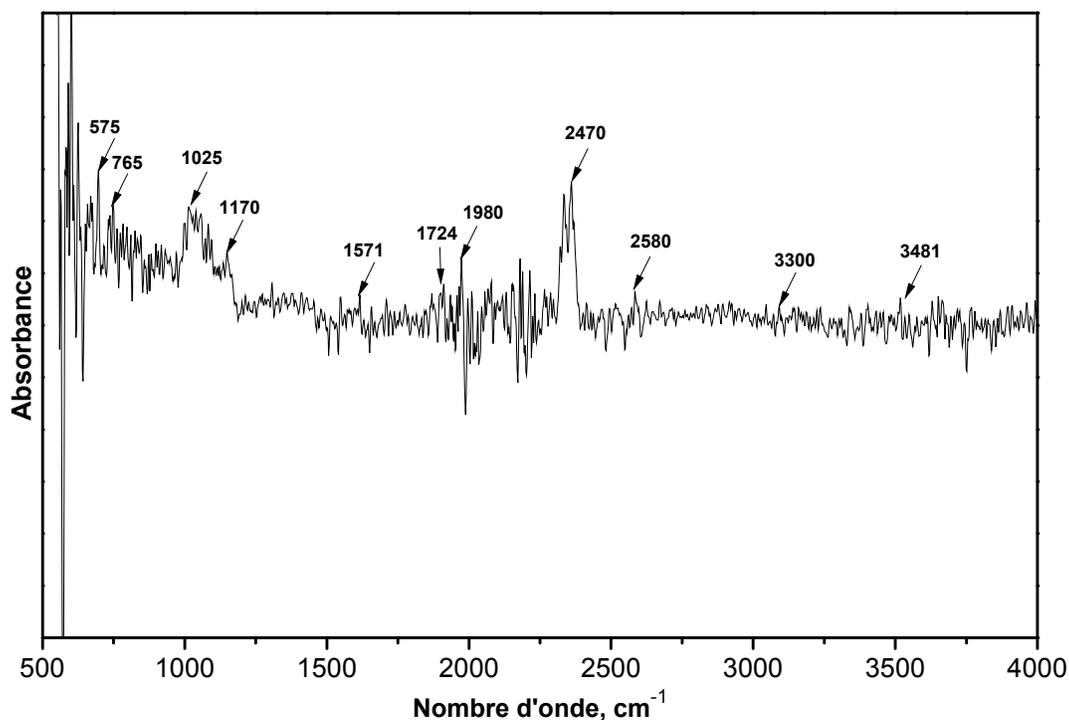


Figure 3.155. Le spectre FTIR caractéristique pour P17

Le spectre FTIR présente les modifications de notre produit de départ (P2). La configuration de la molécule d'amidon est représentée par les bandes spécifiques entre 575 et 1170 cm^{-1} , 1980 cm^{-1} , 2580 et 3481 cm^{-1} [25]. Ces bandes sont caractéristiques de l'ensemble glucosidique présent dans la structure de la molécule d'amidon. Les absorptions correspondantes à la molécule greffée sont à 1571 cm^{-1} et à 1724 cm^{-1} [25]. Le premier nombre d'onde correspond à l'élongation asymétrique du groupement carboxylate RCOO^- de l'anhydride et le second à l'élongation du groupement ester carbonyle [16]. Comme le greffage d'anhydride est réalisé sur l'amidon propoxylé, la bande spécifique au groupement OH d'époxyde reste à 2470 cm^{-1} . Nous observons que l'intensité de cette bande montre que les groupes hydroxyles réagissent avec l'anhydride. Donc, le greffage d'anhydride est bien

confirmé dans le cas du produit P17, par la diminution des élongations spécifiques à l'amidon et par l'apparition des nouvelles bandes spécifiques à l'anhydride.

3.4. Conclusion

Notre étude de modification chimique de l'amidon a eu comme but la synthèse d'une matrice soluble dans l'eau et avec des propriétés d'adsorption vis-à-vis de molécules insolubles, comme le BaP par des interactions hydrophobes. Nous avons choisi de travailler sur l'amidon qui est une bioressource renouvelable. Suite à cette étude nous mettons en évidence les conclusions suivantes.

L'amidon natif de pomme de terre présente une très faible solubilité dans l'eau (0,35 g/L), ce qui limite la diversité des applications potentielles. Pour cette raison, il est nécessaire de modifier sa structure afin d'obtenir l'apparition de nouvelles propriétés physico-chimiques ouvrant le champ des applications.

L'amidon est utilisé dans le domaine d'applications très variés telle que l'alimentaire, le domaine pharmaceutique et plastifiante. Pour réaliser des applications dans ces domaines, l'amidon est modifié par différentes voies de synthèse parmi lesquelles on trouve l'alkylation soit par les éthers (époxydes), soit par les esters (anhydrides). Les molécules obtenues après ces modifications chimiques ont différentes applications.

Nous avons choisi ces deux voies comme agent d'alkylation de l'amidon pour permettre le greffage d'une chaîne carbonée possédant des interactions hydrophobes. Notre objectif est que le bras alkyle joue le rôle de l'agent absorbant du polluant hydrophobe (HAP) et facilite ainsi le transfert de ces polluants à la phase aqueuse, condition *sine qua non* de leur dégradation.

Dans la réaction avec les époxydes, l'amidon natif donne naissance à une molécule soluble dans l'eau comme le P2. Ce produit, P2, présente une solubilité dans l'eau augmentée de 40 fois en comparaison avec celle de l'amidon natif. Cette solubilisation élevée nous a servi de critère déterminant pour le choix de cette molécule dans notre étude. Nous avons envisagé, à partir de cette molécule, la synthèse des matrices bifonctionnalisées à l'aide d'agents alkyles possédant un nombre de carbone plus élevé (C6, C10 et C16). En utilisant les synthèses par étherification, nous avons obtenu le produit P10 ayant des propriétés très importantes, comme la solubilité aqueuse (15,64 g/L). Cependant il s'avère que les coûts économiques des réactifs sont élevés, réduisant l'espoir d'une application à grande échelle, dans le domaine de l'environnement. Il en est de même, pour le greffage de 1,4-butane

sultone, malgré l'intérêt de l'addition d'une charge négative (SO_3^\ominus) augmentant le caractère polaire et par conséquent une solubilité élevée (environ 18 g/L).

La voie de synthèse des anhydrides se relève prometteuse conduisant à une famille de dérivés très variés. Parmi ces dernières molécules, l'amidon modifié P19 se révèle possédant des propriétés intéressantes tant sur le point de la solubilisation (2,79 g/L) que d'un point de vue économique. En effet, cette réaction avec l'anhydride qui présente une masse molaire importante, nécessite des quantités minimales de réactif, ce qui réduit les coûts et permet ainsi une application environnementale envisageable. De plus, l'apparition de la fonction carboxylique lors du greffage des anhydrides conduit à une augmentation de la polarité des molécules d'amidon modifié grâce à la charge du groupement carboxylate (COO^\ominus).

Les deux voies de synthèse utilisées dans cette étude (époxyde et anhydride) nous a permis d'obtenir une grande diversité de produits pour une application environnementale. Les critères qui nous semblent importants sont l'utilisation d'une bioressource renouvelable, modifiée par synthèse chimique de faible coût avec un rendement de synthèse importante et conduisant à l'obtention d'un amidon modifié présentant une solubilité aqueuse élevée.

Ces résultats soulignent la complexité de chaque molécule obtenue. Nous avons donc envisagé pour la suite de ce travail, d'étudier l'activité des matrices obtenues en présence du polluant choisi, le BaP.

Références bibliographiques

- [1] Bradshaw J.E., Ramsay G. (2009). *Advances in potato chemistry and technology*, In Singh J., Kaur L. (Eds), Elsevier, p. 1-26.
- [2] Boursier B. (2005). *Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires*, Référence F4690, <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/agroalimentaire-ti700/amidons-natifs-et-amidons-modifies-alimentaires-f4690/>, consulté le 15 janvier 2011.
- [3] Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S. (1998). *Starch granules: structure and biosynthesis*, International Journal of Biological Macromolecules 23, p. 85-112.
- [4] Leveque E., Haye B., Belarbi A. (2000). *L'amidon et ses dérivés - Applications industrielles*. Editions Elsevier, collection biocampus, 120 p.
- [5] David S. (1995). *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres - Introduction chimique aux glycosciences*. Paris, InterEditions et CNRS Editions, 293 p.

-
- [6] http://biochim-agro.univ-lille1.fr/polysaccharides/co/Contenu_1_b_2.html, USTL Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille1, consulté le 12.06.2011.
- [7] Patrick F. (1998). *Les amidons modifiés chimiquement*. In *Formation ADRIA*, Paris.
- [8] Bertolini A.C. (2010). *Starches: characterization, properties, and applications*. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, USA, 271 p.
- [9] BeMiller J., Whistler R. (2009). *Starch: Chemistry and Technology, 3rd Edition*. Elsevier, Burlington, USA, 879 p.
- [10] Stella V., Rajewski R. (1992). *Derivatives of cyclodextrins exhibiting enhanced aqueous solubility and the use thereof*, University of Kansas, Lawrence, vol. 07, 469 p., <http://www.patents.com/us-5134127.html>.
- [11] Biswas A., Shogren R.L., Kim S., Willett J.L. (2006). *Rapid preparation of starch maleate half-esters*. *Carbohydrate Polymers*, 64, p. 484-487.
- [12] De Graaf R.A., Lammers G., Janssen L.P.B.M., Beenackers A.A.C.M. (1995). *Quantitative analysis of chemically modified starches by H-NMR Spectroscopy*. *Starch – Stärke*, 47, p. 469–475.
- [13] Bien F., Wiege B., Warwel S. (2001). *Hydrophobic Modification of Starch by Alkali-Catalyzed Addition of 1,2-Epoxyalkanes*. *Starch - Stärke*, 53, p. 555-559.
- [14] Rosu A.M., Veignie E., Surpateanu G., Brabie G., Miron D.N., Rafin C. (2011). *Synthesis and evaluation of hydroxypropylated potato starch as polymeric support for benzo[a]pyrene degradation by Fenton reaction*. *Carbohydrate Polymers*, 83, p. 1486-1491.
- [15] Kavitha R., BeMiller J.N. (1998). *Characterization of hydroxypropylated potato starch*. *Carbohydrate Polymers*, 37, p. 115-121.
- [16] Chi H., Xu K., Xue D., Song C., Zhang W., Wang P. (2007). *Synthesis of dodecanyl succinic anhydride (DDSA) corn starch*. *Food Research International* 40, p. 232-238.
- [17] Dragunski D.C., Pawlicka A.P. (2001). *Preparation and characterization of starch grafted with toluene*. *Materials Research*, 4, p. 77-81.
- [18] Mathew S., Abraham T.E. (2007). *Physico-chemical characterization of starch ferulates of different degrees of substitution*. *Food Chemistry*, 105, p. 579-589.
- [19] Kiatkamjornwong S., Thakeow P., Sonsuk M. (2001). *Chemical modification of cassava starch for degradable polyethylene sheets*. *Polymer Degradation and Stability*, 73, p. 363-375.
- [20] Rogmann N., Jones P., Mischnick, P. (2000). *Determination of the substituent distribution in O-sulfonylbutyl-(1-4)-glucans*. *Carbohydrate Research*, 327, p. 275-285.

-
- [21] Bai Y., Shi Y.C. (2006) *Structure and preparation of octenyl succinic esters of granular starch, microporous starch and soluble maltodextrin*. Carbohydrate Polymers, 83, p. 520-527.
- [22] Shogren R.L., Viswanathan A., Felker F., Gross R.A. (2000). *Distribution of Octenyl Succinate Groups in Octenyl Succinic Anhydride Modified Waxy Maize Starch*. Starch - Stärke, 52, p. 196-204.
- [23] Azronnizan Aziz R.D., Maaruf A. G.i, Nik I.N.D., Bohari M.Y. (2004). *Hydroxypropylation and acetylation of sago starch*. Malaysian Journal of Chemistry, 6, p. 048-054.
- [24] Teramoto N., Motoyama T., Yosomiya R., Shibata M. (2003). *Synthesis, thermal properties, and biodegradability of propyl-etherified starch*. European Polymer Journal, 39, p. 255-261.
- [25] Song X., He G., Ruan,H., Chen Q. (2006). *Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Early Indica Rice Starch*. Starch - Stärke, 58, p. 109-117.

Chapitre 4

*Relation structure activité des amidons modifiés et leurs
applications dans des procédés d'oxydation du
Benzo[a]pyrène*

Sommaire

4.1. Introduction.....	92
4.2. Matériels et méthodes.....	94
4.2.1. Les produits chimiques.....	94
4.2.2. Solubilité du BaP en présence des polymères.....	95
4.2.3. Interactions entre le BaP, l'amidon modifié et le cation Fe ²⁺	95
4.2.3.1. Etude par fluorescence.....	95
4.2.3.2. Etude par Microscope Electronique à Balayage (MEB) équipé de sondes EDX (Energy Dispersive Spectroscopy).....	96
4.2.4. Etude par Microscope Electronique à Balayage (MEB) des amidons modifiés.....	96
4.3. Applications.....	97
4.3.1. Oxydation chimique par la réaction de Fenton.....	97
4.3.2. Oxydation biologique.....	98
4.3.2.1. Milieux de cultures.....	98
4.3.2.2. Microorganismes.....	98
4.3.2.3. Identification des souches.....	99
4.3.2.4. Inoculation et conditions de culture.....	99
4.3.2.5. Etude de la réponse de souches fongiques à une gamme H ₂ O ₂	99
4.3.2.6. Etude comparative des différents processus d'oxydation en présence d'amidon modifié.....	100
4.4. Résultats et discussion.....	101
4.4.1. Solubilité du BaP en présence des polymères.....	101
4.4.2. La proximité du cation Fe ²⁺ et du BaP en présence d'amidons modifiés.....	103
4.4.2.1. Etude par fluorescence.....	103

4.4.2.2. <i>Etude par M.E.B.F.D.S.</i>	105
4.4.3. <i>Etude M.E.B. des produits choisis (P0, P2, P10, P17 et P19)</i>	105
4.4.4. <i>Applications</i>	109
4.4.4.1. <i>Oxydation chimique par réaction de Fenton</i>	109
4.4.4.2. <i>Dégradation biologique du Sa P</i>	112
4.5. <i>Conclusion</i>	121
<i>Références bibliographiques</i>	122

4.1. Introduction

Les HAP sont des contaminants omniprésents dans l'environnement qui sont largement distribués dans les sols et les sédiments, les eaux souterraines et l'atmosphère. Dans ce chapitre, nous sommes intéressés en particulier au benzo[a]pyrène (BaP), qui persiste dans l'environnement en partie en raison de sa très faible solubilité dans l'eau et de sa tendance à être adsorbé sur la matière organique du sol [1, 2]. Des technologies efficaces sont ainsi nécessaires pour dépolluer les sols contaminés par ce polluant [3]. Parmi les processus existants, l'oxydation joue un rôle important dans la remédiation. Historiquement, les traitements employés étaient surtout utilisés pour la dépollution des eaux usées [4], mais ils sont de plus en plus appliqués aux matrices solides polluées, telles que les sols, les sédiments et les cambouis [5, 6]. La dégradation des HAP nécessite une première étape d'oxydation, qui peut être produite par un processus chimique ou biologique.

Parmi des techniques chimiques, les procédés d'oxydation avancés (ou AOP de l'anglais Advanced Oxidation Process) sont utilisés comme procédés chimiques de dégradation des polluants organiques pour le traitement des eaux, boues, et sols. Ils sont basés sur la production dans le milieu d'entités très réactives et très oxydantes comme par exemple les radicaux hydroxyles OH^\bullet [6]. Ces radicaux sont de plus relativement non sélectifs et réagissent rapidement avec la plupart des composés organiques (constantes de vitesse de l'ordre de 10^7 à $10^9 \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$), ce qui leur permet d'oxyder, voire de minéraliser, des contaminants organiques avec des temps de réaction de quelques minutes à quelques heures. Les oxydants employés peuvent être capables de dégrader les composants organiques, en composés non nocifs. L'oxydation chimique peut être appliquée soit *in situ* c'est-à-dire directement dans le milieu contaminé sans excavation préalable soit *ex situ* c'est-à-dire après enlèvement préalable de la matrice polluée [7]. Un exemple d'oxydation chimique est l'oxydation par la réaction de Fenton qui est actuellement une des réactions d'oxydation les plus puissantes disponibles. Bien que le réactif de Fenton ait été découvert à la fin du 19^{ème} siècle [7], son application comme procédé d'oxydation avancé pour détruire des composés toxiques n'a pas été expérimentée avant la fin des années 1960. Le système de Fenton classique consiste en un simple mélange de deux réactifs, le fer ferreux et le peroxyde d'hydrogène : $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. La réaction principale permettant la génération dans le milieu de radicaux hydroxyles et des réactions radicalaires en chaîne, est la suivante:



Un autre exemple d'oxydation est l'oxydation biologique. L'approche que nous désirons développer est l'utilisation du potentiel de dégradation des champignons filamenteux telluriques saprotrophes pour dégrader le BaP. Actuellement, la bioremédiation s'est avérée efficace dans les sols pollués par les HAP de faible poids moléculaire tel que le naphthalène, l'acénaphène et le phénanthrène [8, 9]. Cependant, les HAP de haut poids moléculaire (comme le BaP) sont généralement récalcitrants à l'attaque microbienne [1, 10].

Enfin, dans le cas de couplage de méthodes d'AOP et d'oxydation biologique, les faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène utilisées ne sont pas suffisantes pour oxyder les contaminants organiques qui ne sont pas en solution aqueuse. Il est donc nécessaire de trouver d'autres conditions de mise en œuvre de cet AOP. Une des solutions envisagées est de désorber préalablement les HAP de leur matrice solide grâce à des matrices polysaccharidiques fonctionnalisées pour augmenter la solubilité du BaP, étape préliminaire nécessaire avant une phase d'oxydation que ce soit par voie chimique ou biologique.

Il y a un intérêt croissant récent pour la synthèse d'adsorbants nouveaux, tels que la chitine, le chitosane et l'amidon, peu coûteux, utilisés pour la dépollution [11]. La chitine est l'un des constituants de la cuticule des insectes, des araignées et des crustacés qui présente un rôle protecteur pour ces organismes. Le chitosane est produit par désacétylation chimique ou enzymatique de la chitine [12, 13]. L'amidon est un des plus abondants biopolymères sur terre et est présent comme matériel de stockage de l'énergie chez les végétaux. Ces polysaccharides, désignés sous le nom des biopolymères, présentent de nombreux avantages: ils sont très abondants, peu coûteux, renouvelables, ce sont des biopolymères stables, hydrophiles qui peuvent être modifiés. Ils présentent également des propriétés biologiques et chimiques intéressantes telles que leur : non-toxicité, biocompatibilité, biodégradabilité, polyfonctionnalité, une réactivité chimique élevée, chiralité, chélation et adsorption. Afin de respecter l'intégrité de la structure et des fonctions biologiques du sol, nous proposons d'étudier l'utilisation des propriétés de certaines matrices polysaccharidiques, comme l'amidon modifié, afin de permettre une proximité spatiale des différents acteurs (polluant, réactifs de Fenton, et agents biologiques) dans ces procédés de remédiation.

Dans le chapitre 3, nous avons réalisé des modifications chimiques d'amidon, pour obtenir un polymère avec une solubilité irréversible dans l'eau. Nous nous proposons dans cette étude de vérifier l'activité des molécules d'amidon synthétisées pour trouver celles qui sont les plus efficaces dans la solubilisation du BaP, facteur limitant de l'oxydation chimique ou biologique. Ensuite, nous voulons étudier si les amidons modifiés permettent la proximité spatiale entre l'oxydant chimique choisi (le peroxyde de hydrogène) et le cation Fe^{2+} (lors de

la réaction de Fenton). Dans le chapitre 2, nous avons montré, par modélisation moléculaire, que l'amidon peut former des complexes avec le cation Fe^{2+} et le polluant étudié BaP. La vérification expérimentale de la proximité spatiale du complexe tripartite (amidon/ Fe /BaP) sera réalisée lors d'une première étude par fluorescence et lors d'une seconde étude par des études en microscopie électronique à balayage équipé de sondes EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) – MEB-EDS. Enfin, des premières études préliminaires de dégradation du BaP par oxydation chimique et par oxydation biologique en présence d'amidon modifié seront réalisées. L'originalité de notre approche est de développer une méthode innovante de dégradation des HAP couplant simultanément une oxydation chimique par réaction de Fenton à un procédé d'oxydation biologique par voie fongique. La faisabilité d'un tel procédé a nécessité des études développées à l'échelle du laboratoire (en réacteurs) en optimisant les conditions de Fenton et en travaillant à des pH compatibles avec le développement des champignons (de l'ordre de 5-6). Ce couplage de méthodes d'oxydation chimique et biologique a également nécessité de sélectionner des souches fongiques capables de résister au peroxyde d'hydrogène, oxydant utilisé dans la réaction de Fenton.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Les produits chimiques

Les solvants utilisés sont le dichlorométhane et le méthanol. Le dichlorométhane (CAS 75-09-2) a la formule chimique CH_2Cl_2 , la masse moléculaire 84,93 g/mol, la densité 1,33 g/cm³, la température d'ébullition 39,6°C et la solubilité dans l'eau 13 g/L à 20°C. Le méthanol (CAS 67-56-1) a la formule chimique CH_4O , la masse moléculaire 32,04 g/mol, la densité 0,7910 g/cm³, la température d'ébullition 65°C et soluble dans l'eau en toute proportion. Les deux solvants sont fournis par Fisher Scientific, France. Comme produits chimiques, nous avons utilisé le benzo[a]pyrène (CAS 50-32-8) qui présente une formule chimique brute $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$, une masse moléculaire 252,3 g/mol, une densité 1,4 g/cm³ et une solubilité dans l'eau de $2,3 \cdot 10^{-3}$ mg/L (Sigma Aldrich, Allemagne). Un autre produit chimique utilisé est le sulfate de fer heptahydraté (CAS 7782-63-0) qui présente une formule chimique $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, une masse moléculaire 278,015 g/mol et une densité de 1,895 g/cm³ (Acros Organic, France). Pour réaliser la réaction de Fenton, nous avons utilisé comme oxydant le peroxyde d'hydrogène (CAS 7722-84-1) qui a la formule chimique brute H_2O_2 , une masse moléculaire de 34,01 g/mol, pureté de 35% et une densité de 1,03 g/cm³ à 25°C (Acros Organic, France).

Les amidons testés pour leur activité sont les produits synthétisés présentés dans le chapitre 3 (P0, P1, ..., P20).

4.2.2. Solubilité du BaP en présence des polymères

Le BaP est solubilisé dans le dichlorométhane pour obtenir une concentration de 0,26 mg/L. De cette solution nous avons pris 375 μ L qui sont introduits dans des tubes à hémolyse puis placés dans une étuve à 70°C pendant deux heures pour permettre l'évaporation totale du solvant (dichlorométhane). Puis, 3 mL de la solution de polymère étudié sont introduits dans le tube à une concentration finale de $5 \cdot 10^{-3}$ M équivalent glucose. Les tubes sont laissés à l'obscurité pendant 4 jours, chaque polymère est testé en triplicatas. La fluorescence du BaP dans les solutions d'amidons étudiés est analysée grâce à un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS B50, à une excitation de 295 nm, émission 406 nm et un temps d'intégration de 10 s [3]. Les résultats sont exprimés en concentration de BaP solubilisé (μ g/L).

4.2.3. Interactions entre le BaP, l'amidon modifié et le cation Fe^{2+}

4.2.3.1. Etude par fluorescence

Nous avons étudié la proximité du cation Fe^{2+} en présence d'amidon modifié et du polluant étudié, le BaP. Dans un premier temps, nous réalisons une solution mère de BaP (2 mg/50 mL) dans le méthanol. De cette solution, nous prenons un aliquote de 32 μ L complété qsp 2,5 mL avec du méthanol. Cette solution mère de BaP est utilisée pour préparer qsp 500 mL d'une solution de travail. Pour préparer toutes les solutions, nous utilisons de l'eau dégazée. Cette solution est utilisée pour solubiliser nos produits. De même, en suivant le même protocole, nous préparons une solution de $FeSO_4$ à une concentration finale de $2 \cdot 10^{-3}$ M. Cette solution est aussi utilisée pour solubiliser les amidons modifiés étudiés. Dans des tubes à hémolyse, 3 mL de chaque solution sont introduits. Pour le dosage en fluorescence, les solutions des produits étudiés ont une concentration finale de $5 \cdot 10^{-3}$ M équivalent glucose. Pour chaque polymère étudié, une mesure de la fluorescence de BaP est réalisée en présence ou en absence du cation Fe^{2+} . Tous les essais sont réalisés en triplicatas et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la fluorescence du BaP en présence de $FeSO_4$ par rapport à la fluorescence du BaP seul.

4.2.3.2. Etude par Microscope Electronique à Balayage (MEB) équipé de sondes EDS (Energy Dispersive Spectroscopy)

Les études de microscopie électronique ont été conduites à la Maison de la Recherche en Environnement Naturel (MREN, Wimereux, France). Une autre expérimentation pour étudier l'interaction avec le cation Fe^{2+} de notre matrice est réalisée à l'aide du MEB-EDS en déterminant qualitativement la présence du Fe dans la structure finale de la molécule. Cette expérimentation consiste tout d'abord à réaliser une solution de $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ équivalent glucose d'amidon modifié qui est mise en contact avec une solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1mM) pendant 2 jours. L'échantillon est ensuite dialysé (MWCO de 12-14000 Da—Medicell International Ltd, London) pendant 3 jours et lyophilisé. Le produit obtenu est métallisé au carbone avant d'être analysé au MEB-EDS. Suite aux interactions du faisceau d'électrons primaires avec les atomes du matériau analysé sont créés des photons X (phénomène de désexcitation). La collecte de ces photons par un détecteur spécifique couplé au MEB permet de compléter la partie imagerie par des analyses chimiques (EDS). En effet, l'énergie de ces photons X est caractéristique des atomes qui les ont émis, d'où la possibilité de réaliser des analyses élémentaires, qui peuvent être qualitatives (identification des éléments présents dans le matériau) ou semi-quantitatives (pourcentage atomique et/ou massique de chaque élément). Il est également possible d'accéder à la localisation des différents éléments au sein du matériau (cartographies). Les résultats sont exprimés sous forme de spectres d'énergie en rayonnement X. L'analyse du spectre est exécutée par le logiciel de Link ISIS (instruments le Ltd d'Oxford) en utilisant une méthode de déconvolution spectrale [14].

4.2.4. Etude par Microscope Electronique à Balayage (MEB) des amidons modifiés

Les produits finaux choisis sont caractérisés par une étude à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage (MEB) pour montrer leurs modifications lors de la synthèse chimique. Le MEB utilisé pour cette étude est un modèle 438 VP commercialisé par la société LEO (filament de tungstène). Le microscope est équipé d'un détecteur secondaire d'électrons (Everhart-Thornley type). Les images sont acquises en accélérant le voltage de 30 keV avec un faisceau de courant 10 pA. Il est doté d'un platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les 3 directions et de détecteurs permettant de détecter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre, l'appareil est équipé d'un système de pompes à vide, afin de générer un faisceau d'électron extrêmement fin. Pour rendre les échantillons conducteurs, il faut les recouvrir d'une couche fine de métal. La métallisation est réalisée avec la fixation des filtres collés sur les plots en aluminium, grâce à

une pastille autocollante double face en carbone. Ces plots sont placés ensuite dans une chambre hermétique. En remplissant cette chambre d'argon et en créant une atmosphère à $8 \cdot 10^{-2}$ bar, le mélange or palladium situé sur une feuille au dessus des plots va se déposer sur les échantillons (couche de quelques nanomètres d'épaisseur). Ces métaux sont utilisés à cause de leur facilité à émettre des électrons secondaires. Pour notre étude nous avons utilisé la métallisation avec de l'or palladium (Polaron SC7620).

4.3. Applications

4.3.1. Oxydation chimique par la réaction de Fenton

L'oxydation chimique du polluant étudié (le BaP) est réalisée par la réaction de Fenton. Toutes les expériences sont réalisées dans de l'eau distillée avec un pH de 5,5. Après la préparation d'une solution de BaP dans le méthanol (concentration de travail 2 g/L), nous avons introduit 500 μ L de cette solution dans des flacons à pénicilline (22 mL) pour obtenir une quantité finale de 1 mg de BaP par flacon. L'évaporation du solvant est réalisée dans une étuve. Après évaporation, dans chaque flacon est introduit 4,9 mL de la solution de polymère étudié à une concentration de $5 \cdot 10^{-3}$ M équivalent glucose, excepté pour le produit P1 ($70 \cdot 10^{-3}$ M équivalent glucose, [15]). Une réaction similaire est réalisée aussi avec l'eau comme témoin. Pour réaliser un équilibre dans la réaction, chaque flacon est agité à l'aide d'un agitateur orbital (170 rotation par minute, *rpm*) pendant 12 heures à température ambiante. La réaction de Fenton est réalisée ensuite par l'addition de 50 μ L de solution de FeSO_4 (concentration de travail $2 \cdot 10^{-3}$ M) et 50 μ L H_2O_2 (concentration de travail $10 \cdot 10^{-3}$ M). Toutes les réactions de Fenton sont conduites pendant une nuit à température ambiante. Après incubation, les flacons sont lyophilisés pendant 3 jours puis extraits pendant 16 heures avec le dichlorométhane dans l'appareil Soxhlet. Les fractions organiques extraites sont concentrées dans 20 mL d'un mélange 50/50 de dichlorométhane/méthanol. Les concentrations de BaP sont déterminées à l'aide d'un système HPLC Water 600 control avec une colonne Waters XTerra®, RP 18, 5 μ m et Waters 996 Photo Diode Array Detector. La séparation est réalisée avec une concentration dans l'acétonitrile/l'eau de 90/10 en volume, un débit de 1 mL/min pendant 10 minutes. Les concentrations sont déterminées par absorbance UV à 380 nm. Le pourcentage de BaP dégradé est calculé avec la formule suivante :

$$\%BaP \text{ dégradé} = \frac{m_{EC} - m_T}{m_{EC}} \cdot 100$$

Ou : m_{EC} = la quantité du BaP dans le traitement témoin

m_T = la quantité du BaP dans chaque traitement

Dans les témoins, le pourcentage de BaP récupéré est de 98%. Chaque traitement est réalisé en triplicatas.

4.3.2. Oxydation biologique

4.3.2.1. Milieux de cultures

Différents milieux de culture sont utilisés pour la croissance des souches fongiques. Les quantités pesées sont exprimées pour un litre de milieu. Chaque milieu est stérilisé à l'autoclave (121°C, 20 minutes).

Milieu Malt - Extrait de levure - Agar (MEA). Ce milieu permet la conservation des souches sur tube incliné et permet la production de spores nécessaires à la réalisation d'inoculum fongique (cultures en boîtes de Petri). La composition du milieu est la suivante: Malt (Merck) – 20 g, Extrait de levure (Biokar diagnostics) – 2 g, Agar (Sigma) – 15 g.

Milieu Minimum (MM1). Ce milieu est composé du milieu S1 auquel est ajouté 10 ml de milieu S2 par litre de S1 (Milieu tampon phosphate à $50 \cdot 10^{-3}M$, pH 7,5).

Composition du milieu S1 pour 1 litre: KCl – 0,250 g; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,235 g; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ – 5,205 g; $MgSO_4$ – 0,244 g; NO_3NH_4 – 1,000 g; Extrait de levure 1,000 g.

Composition du milieu S2 pour 1 litre : $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,1 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,5 mg; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,1 mg; MoO_3 – 0,2 mg.

Un volume d'une solution mère de glucose (500g/L) est ajouté après autoclavage afin d'obtenir une concentration de 10 g/L pour le MM1. Les cultures sont réalisées en étuve thermostatée à 22°C avec une photopériode de 12 heures/12 heures.

4.3.2.2. Microorganismes

L'étude est conduite sur 9 souches de champignon d'origine différente, présentées dans le tableau 4.1. ci-dessous :

Tableau 4.1. Origine des souches de champignons étudiées

Numéro de souche	Origine
S6	Matériel végétal frais
S19	Sol
S28	Sol
S34	Matériel végétal mort
S61	Joint synthétique
S62	Joint synthétique
S63	Joint synthétique
S65	Joint synthétique
S79	Compost

Les cultures fongiques sont conservées dans une étuve thermostatée à 22°C

4.3.2.3. Identification des souches

Les souches ont été identifiées au cours de cette étude selon les critères décrits par Kiffler et Morelet (1997) et par Barnett et Hunter (1998). L'identification est basée sur les caractères macroscopiques observés sur milieu MEA en boîtes de Petri: type de thalle, vitesse de croissance, forme de la culture, couleur de la face supérieure et couleur de la face inférieure. L'identification est aussi basée sur les caractères microscopiques : forme et couleur du filament, modes de reproduction sexuée (si présente) et asexuée. Les souches fongiques pures sont repiquées sur milieu MEA coulé en boîtes de Pétri et conservées en étuve thermostatée.

4.3.2.4. Inoculation et conditions de culture

Des suspensions de spores sont réalisées de la façon suivante: pour chaque isolat, 3 ml d'eau stérile additionnée de Tween 80 à 0,1% sont déposés sur une pré-culture de 15 jours sur MEA en boîte de Petri. Un lavage de la culture, à l'aide d'une pipette pasteur, est effectué afin de mettre en suspension les spores. La concentration en spores est estimée grâce à une cellule de Malassez et la concentration dans chaque erlenmeyer est de 10^4 spores/mL. Après inoculation au jour 0, les spores sont mises à germer sur un agitateur à rotation à raison de 150 rpm à température ambiante pendant 24 h. Pour les souches n'ayant pas sporulé, l'inoculation est réalisée à l'aide d'explants calibrés de 7 mm. Trois réplicats sont effectués par souche.

4.3.2.5. Etude de la réponse de souches fongiques à une gamme H_2O_2

Etude de la courbe dose (en H_2O_2)/réponse. Une solution mère d'eau oxygénée à 7,5 M est réalisée. Pour chacune des 2 souches choisies (S28 et S61), des volumes croissants d' H_2O_2 sont introduits quotidiennement pendant 4 jours, dans les erlenmeyers afin de réaliser

une gamme de 7 concentrations croissantes d'H₂O₂, à raison de 3 réplicats par concentration: 0·10⁻³M, 1,5·10⁻³M, 3·10⁻³M, 6·10⁻³M, 12·10⁻³M, 24·10⁻³M et 48·10⁻³M. Après 4 jours de traitement, les cultures sont filtrées avec un Büchner monté sur une fiole à vide sur filtre papier (Fisherbrand, 25 µm de porosité) séchés et préalablement tarés. Les biomasses sèches sont évaluées, après 48 h de séchage jusqu'à stabilisation de la masse dans une étuve à 60°C. Les résultats sont exprimés en moyenne Masse Sèche ± Ecart-Type. La courbe de toxicité de la concentration d'H₂O₂ sur les 2 souches sélectionnées (S28 et S61) nous a permis de déterminer la concentration efficace 50 (CE₅₀) qui correspond à la Concentration Effective produisant 50 % d'effet par rapport à un témoin.

Etude de la croissance des souches exposées à une dose unique d'H₂O₂. Dans une autre expérimentation, pendant les 4 jours suivants l'inoculation, 50 µL d'une solution mère H₂O₂ à 0,75 M sont ajoutés quotidiennement dans chaque erlenmeyer de manière à avoir une concentration finale de 3·10⁻³ M. Pour faire cette solution mère, 1 mL d'H₂O₂ pure à 35% a été ajouté à de l'eau distillée qsp 15,6 mL. Les biomasses sèches sont évaluées comme précédemment. La finalité consiste à évaluer la biomasse fongique produite en présence d'H₂O₂ et de retenir les souches les plus résistantes.

4.3.2.6. Etude comparative des différents processus d'oxydation en présence d'amidon modifié

Les études de dégradation biologique du BaP sont réalisées avec une micro-méthode sur 4 souches préalablement sélectionnées lors des expérimentations précédentes (N° 19, 28, 61 et 63). Dans des flacons à pénicillines (22 ml), 0,250 mL d'une solution BaP sont introduits pour avoir une quantité finale de 1 mg BaP par flacon. La solution de BaP est réalisée en solubilisant 40 mg de BaP dans 10 mL d'acétone. Après addition de cette solution de BaP dans chaque flacon, le solvant est évaporé. Puis sont ajoutés 9 mL du milieu de culture MM1 (pH=7) contenant FeSO₄·7H₂O à une concentration de 1·10⁻³M. Tous les flacons sont stérilisés à 120°C pendant 20 minutes et à une pression de 1 bar. La solution d'amidon modifié est préparée, stérilisée par filtration sur 0,22 µm et ajoutée dans les flacons autoclavés. La concentration finale d'amidon est de 5·10⁻³M équivalent glucose. Puis les flacons sont inoculés par addition d'une suspension de spores pour avoir une concentration finale de 10⁴ spores/mL. Chaque flacon est encapsulé avec un bouchon de silicone perforé avec une aiguille stérile pour assurer l'oxygénation de la culture. Parallèlement au traitement

biologique, nous avons réalisé des traitements sans inoculation, pour les traitements d'oxydation chimique du BaP. La réaction de Fenton est réalisée quotidiennement par l'introduction, à l'aide des aiguilles, d'H₂O₂ à une concentration finale de 3 mM et ceci pendant 12 jours de culture. Les cultures sont incubées à l'obscurité à température ambiante sur un agitateur rotatif (170 rpm). Dans les traitements où l'oxydation chimique est combinée avec l'oxydation biologique, l'addition d'H₂O₂ est réalisée comme dans le paragraphe 4.3.1. Tous les traitements sont réalisés en triplicatas, de plus un traitement abiotique est réalisé afin d'estimer les pertes abiotiques de BaP.

4.4. Résultats et discussion

4.4.1. Solubilité du BaP en présence des polymères

Après caractérisation chimique, les molécules d'amidon synthétisées sont caractérisées par une étude de structure/activité. Nous nous intéressons tout d'abord à l'interaction des amidons modifiés obtenus avec le polluant étudié, le BaP. Sachant que ce polluant présente une faible solubilité dans l'eau, nous voulons trouver dans un premier temps une possibilité d'augmenter, à l'aide de nos molécules, sa solubilité. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 4.1.

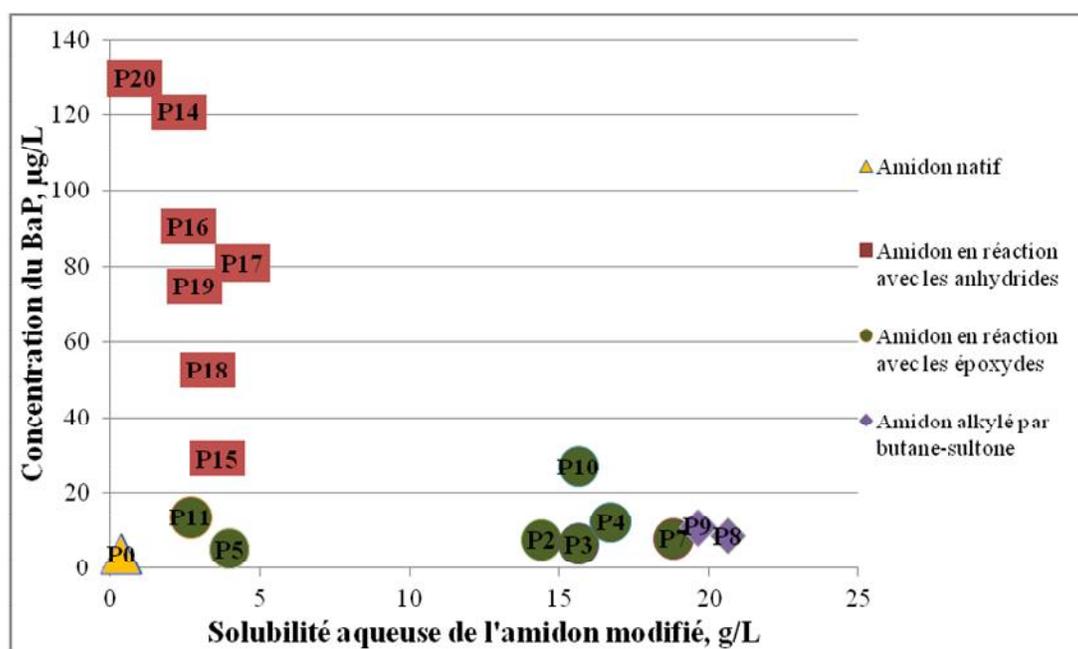


Figure 4.1. Concentration du BaP en phase aqueuse en présence d'amidon modifié [$5 \cdot 10^{-3}$ M équivalent glucose] en fonction de la solubilité aqueuse de chaque amidon modifié

Rappelons que les produits P2, P3, P5, P8, P19 et P20 sont monofonctionnels (une seule alkylation) et les produits P4, P7, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18 sont bifonctionnels (double alkylation), comme détaillé dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2. Présentation des produits mono- et bifonctionnels utilisés dans l'étude

Alkylation à partir de	P0	P2
Epoxyde	P2, P3, P5	P4, P7, P10, P11
Anhydride	P19, P20	P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18
Butane-sultone	P8	P9

Dans la figure 4.1. sont présentées les solubilités aqueuses des amidons étudiés (exprimées en g/L) en fonction de la concentration du BaP solubilisé ($\mu\text{g/L}$). Nous observons clairement une séparation très nette de comportement des molécules en fonction des deux groupes fonctionnels greffés (éther ou ester).

L'amidon natif P0 est la référence et nous avons trouvé une quantité de BaP désorbé et donc solubilisé de $3,74 \mu\text{g/L}$. Après une première modification avec les époxydes, le meilleur candidat pour la désorption du polluant et son adsorption sur le polymère modifié est le produit P10, qui permet d'obtenir une solubilisation du BaP de $27 \mu\text{g/L}$. Rappelons que ce produit P10 présente aussi une solubilité dans l'eau intéressante ($15,64 \text{ g/L}$). Bien que les amidons modifiés avec le butane-sultone soient solubles dans l'eau, ils ne permettent pas cependant d'augmenter significativement la quantité du BaP désorbé (par exemple $18,63 \mu\text{g/L}$ pour le produit P9). La troisième classe d'amidons modifiés donne naissance à des molécules très efficaces pour la solubilisation du BaP ($129,76 \mu\text{g/L}$, dans le cas du produit P20), ce qui représente une augmentation d'un facteur 40 par rapport à la très faible solubilité du BaP ($3 \mu\text{g/L}$). Par contre, la synthèse de ces amidons en présence d'anhydrides, qui stimule de façon intéressante la solubilisation du BaP, s'accompagne malencontreusement d'une faible solubilité des produits obtenus (inférieure à 3 g/L). Si on regarde la solubilité de l'amidon modifié dans l'eau versus la solubilité apparente du BaP, seul le produit P17 permet d'obtenir les résultats les plus intéressants: concentration de BaP solubilisé de $80,79 \mu\text{g/L}$ et solubilité de l'amidon modifié dans l'eau de $4,41 \text{ g/L}$. Rappelons que ce produit P17 est obtenu avec une modification chimique entre l'amidon propoxylé et l'anhydride C11. Au final, ce produit apparait comme le meilleur compromis entre une capacité à solubiliser le BaP et une solubilité intrinsèque satisfaisante.

Notre but étant de trouver une molécule capable d'adsorber une quantité importante de polluant, étape préliminaire pour réaliser une dépollution efficace d'un sol, le greffage d'un groupement alkyl moyen de 10 atomes de carbone, fait de l'amidon de pomme de terre

une matrice possédant une surface d'adsorption très hydrophobe, capable de désorber des molécules hydrophobes, comme le BaP.

4.4.2. La proximité du cation Fe^{2+} et du BaP en présence d'amidons modifiés

4.4.2.1. Etude par fluorescence

Notre objectif est d'étudier la dégradation du BaP par la réaction de Fenton. Pour cela, dans un premier temps, nous avons étudié la proximité entre le BaP et le cation Fe^{2+} . En effet, ce cation, impliqué dans la réaction de Fenton, est le lieu de production de l'hydroxyl radical $\text{OH}\cdot$, agent d'oxydation chimique qui permet la destruction du polluant. Le cation Fe^{2+} est une molécule capable d'éteindre la fluorescence des composés aromatiques tels que les HAP [16]. Ce phénomène est appelé 'quenching' – nous retiendrons ce terme anglo-saxon dans la suite de la rédaction. Nous avons réalisé une étude avec une gamme de concentrations croissantes de Fe^{2+} pour quantifier ce phénomène de quenching sur le BaP. Les résultats sont représentés figure 4.2.

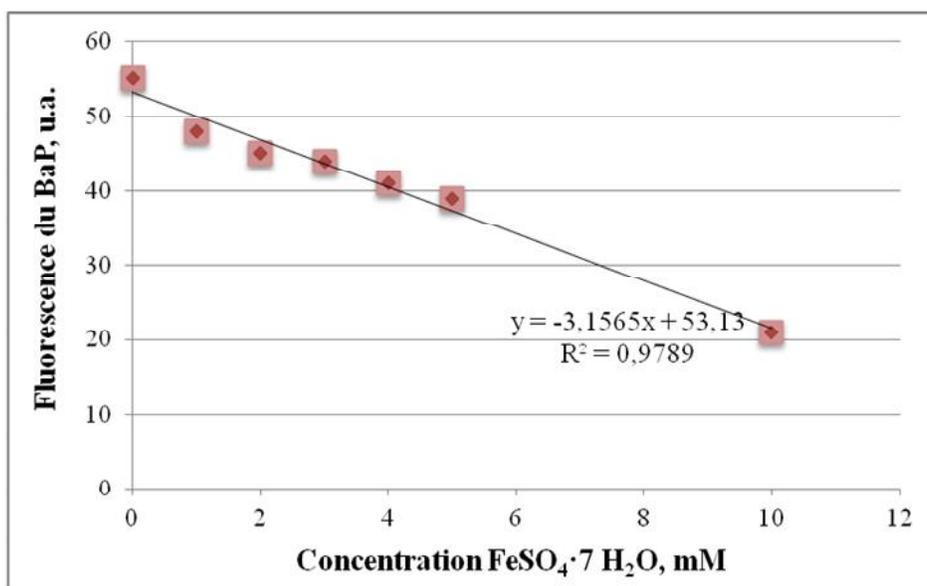


Figure 4.2. Evolution de la fluorescence du BaP en fonction de la concentration de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Sur ce graphe, nous constatons qu'à la concentration maximale testée ($\text{Fe}^{2+} 10^{-3}\text{M}$), un quenching de 64% du BaP est obtenue. A la concentration de $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ en $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, qui est notre concentration choisie pour la réaction de Fenton, la valeur de quenching du BaP n'est que de 19%. Cette concentration est utilisée ensuite, pour chaque polymère étudié (à

une concentration de $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$) pour mesurer la fluorescence du BaP en présence ou en absence du cation Fe^{2+} . Tous les essais sont réalisés en triplicatas et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la fluorescence (figure 4.3.).

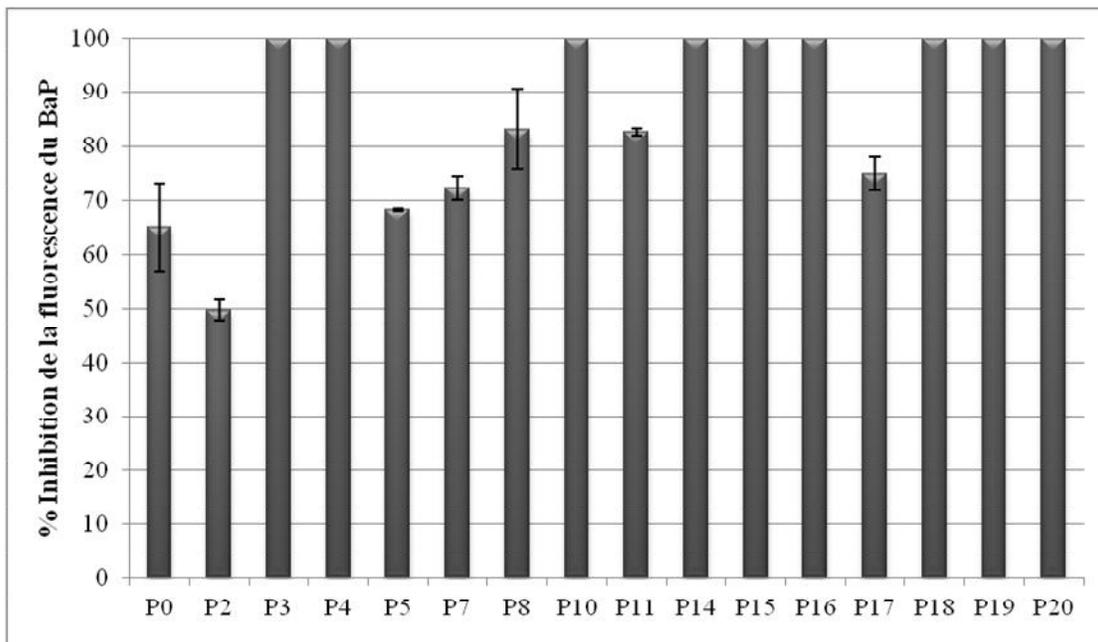


Figure 4.3. Le pourcentage d'inhibition de la fluorescence du BaP pour chaque amidon modifié étudié [$5 \cdot 10^{-3} \text{M}$]

Le pourcentage d'inhibition est compris entre 49,7% (P2) et 100% (P3, P4, P10, P15, P16, P18, P19 et P20). D'une façon globale, nous constatons, que quel que soit l'amidon étudié, une concentration en Fe de $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ est suffisante pour obtenir une inhibition supérieure à 50%. Rappelons qu'en absence d'amidon, une inhibition équivalente nécessiterait une concentration de $8 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de la solution $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}_2$. Ce travail expérimental permet de montrer l'efficacité de l'amidon modifié dans la formation d'un complexe amidon/BaP/Fe nécessaire dans les processus de dégradation. L'extinction de fluorescence du BaP par le Fe^{2+} traduit une proximité spatiale entre le cation Fe^{2+} et le polluant BaP, ce qui facilite la dégradation du polluant par les groupements $\text{OH}\cdot$ formés dans la réaction de Fenton. D'un point de vue théorique, nous avons montré dans le chapitre 2 que cette complexation entre l'amidon et le cation Fe^{2+} était possible. Dans ce chapitre, nous confirmons ce résultat par l'expérimentation.

4.4.2.2. Etude par MEB-EDS

L'interaction entre l'amidon modifié et le cation Fe^{2+} , qui permet la formation d'un complexe, est également analysée par une étude par Microscope Electronique à Balayage (MEB) équipé de sondes EDS (Energy Dispersive Spectroscopy). Cette étude est réalisée sur le produit P17. Dans la figure 4.4. sont présentés deux spectres obtenus, par MEB-EDS, en absence (A) ou en présence (B) d'amidon modifié (P17).

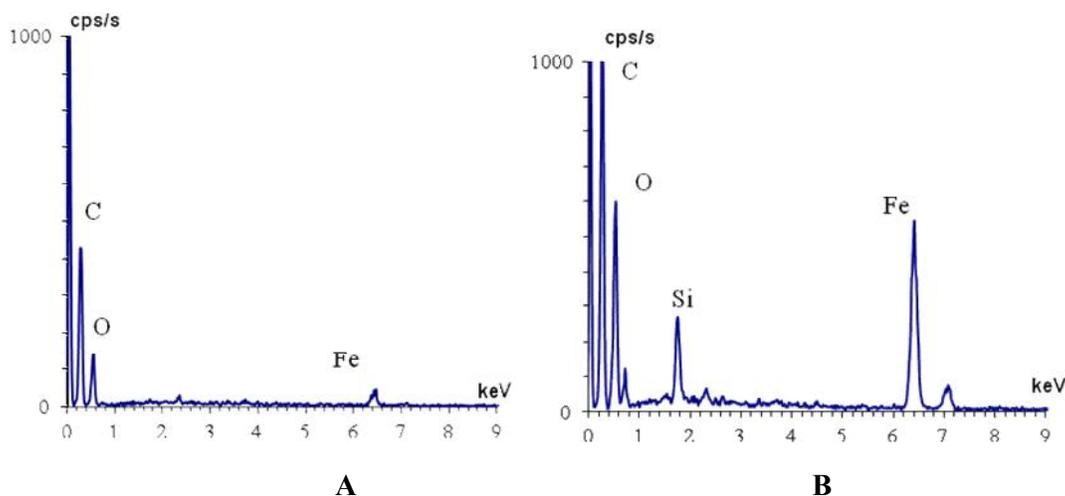


Figure 4.4. Spectres du cation Fe^{2+} par MEB-EDS sur l'amidon modifié (P17), en absence (A) ou en présence (B) du cation Fe^{2+} ajouté

Les spectres sont obtenus par l'analyse d'un échantillon global d'amidon. Dans le spectre témoin (A) il y a une quantité négligeable de Fe, mais dans le deuxième spectre, la quantité est très importante ce qui démontre que le cation présent initialement dans la solution de FeSO_4 est réellement complexé sur l'amidon P17. Cette analyse qualitative et semi-quantitative permet d'identifier les éléments présents dans le matériau étudié et de déterminer les pourcentages massiques de chaque élément.

4.4.3. Etude MEB des produits choisis (P0, P2, P10, P17 et P19)

L'étude MEB est réalisée pour quelques amidons modifiés, caractéristiques des différentes synthèses réalisées comme: l'amidon natif de pomme de terre (P0), P2, P10, P17 et P19. A l'aide de cette observation, nous voulons étudier d'une part l'effet des réactions chimiques sur la morphologie d'amidon natif (comme par exemple l'effet du traitement avec NaOH et la pyridine lors des synthèses) et la morphologie des amidons ainsi obtenus. Dans la figure 4.5. sont présentées les photographies acquises avec le MEB.

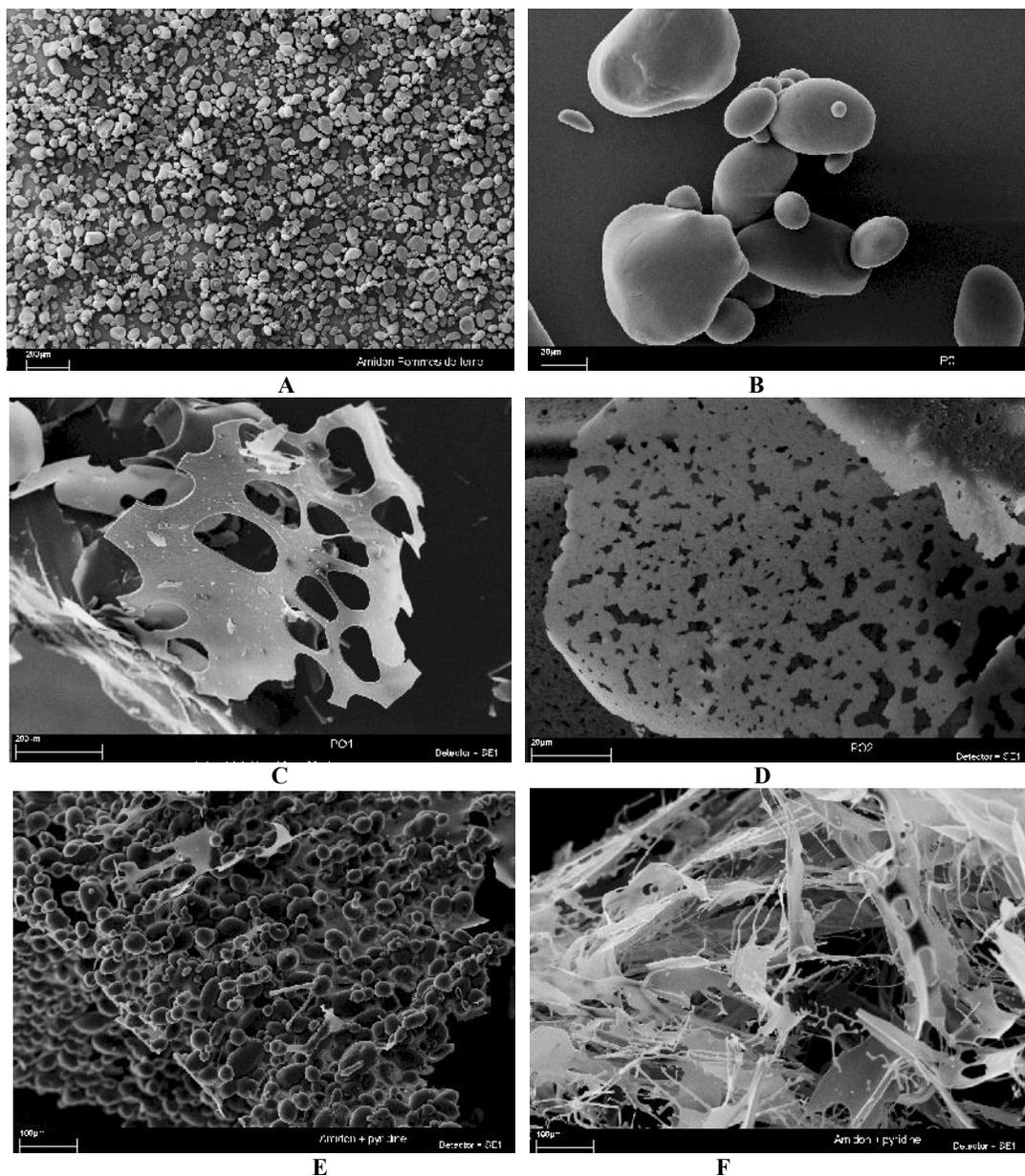


Figure 4.5. Images des amidons de pomme de terre obtenues au MEB : **A.** amidon natif, **B.** grains d'amidon, **C.** amidon qui a subi le traitement avec NaOH une seule fois, **D.** amidon qui a subi le traitement avec NaOH deux fois, **E, F.** amidon qui a subi le traitement avec la pyridine

Dans les photographies A et B sont montrés les grains d'amidon natif de pomme de terre à différentes échelles. A une échelle de 200 μm , une vue d'ensemble nous permet d'observer les grains d'amidon natif : les formes ovoïdes sont celles couramment décrites dans la littérature ainsi que les différentes tailles: ceux-ci varient de 16,29 μm à 62,87 μm . Ces variations de taille sont aussi observées sur la photographie B où nous avons des grains petits ronds et ovales, mais aussi de grands grains avec une morphologie plus irrégulière.

La photographie C montre des grains d'amidon natif, après le traitement de NaOH (une fois) à un grossissement de 200 μm . Nous observons une morphologie de l'amidon très différente, où les grains d'amidon sont détruits. Nous observons plutôt une structure en forme de feuille perforée. Sur la photographie D, l'action de la soude (après deux passages) permet de mettre en évidence la finesse de la feuille à une échelle de 20 μm . Les grains d'amidon apparaissent comme de la dentelle, ce qui montre l'action importante de NaOH sur la morphologie de l'amidon. Ces observations nous ont servi de témoins pour les molécules bifonctionnelles. Les photographies E et F montrent des structures très différentes pour des amidons ayant subi le même traitement, à savoir un traitement à la pyridine (ce qui nous a servi de témoin pour les synthèses réalisées avec les anhydrides). D'une part, les grains d'amidon sont fortement réduits en taille et semblent agglomérés (E), et d'autre part, leur morphologie devient fibrillaire (F). Donc, en présence de pyridine, nous avons deux morphologies différentes ce qui confirme la difficulté d'avoir une réaction uniforme sur les grains d'amidon natif.

Sur les photographies suivantes sont présentées les morphologies des produits synthétisés (figure 4.6.).

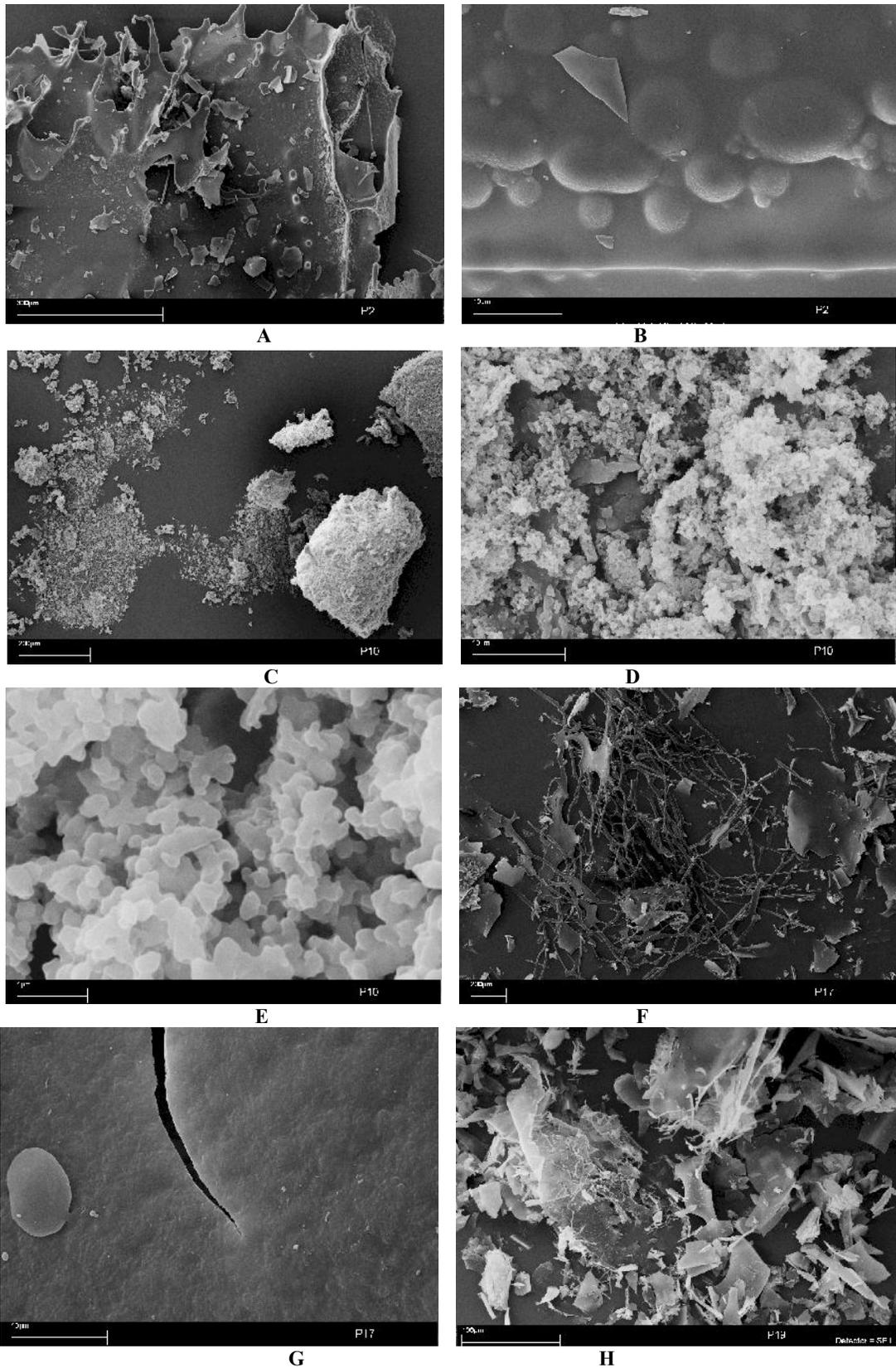


Figure 4.6. Les images MEB des amidons modifiés: A, B-amidon P2; C, D, E-amidon P10; F,G-amidon P17; H-amidon P19

Le greffage de l'oxyde de propylène sur l'amidon natif montre une morphologie particulière du produit ainsi obtenu. A une échelle de 300 μm (A), nous observons des structures en feuillets qui semblent rigides, avec des structures filamenteuses en position terminale et avec des petits grains irréguliers. L'échelle au 10 μm (B) permet de mettre en évidence que les grains sont agglomérés montrant l'apparition de l'ondulation de la surface de la feuille. Dans le cas du produit P10, nous avons une morphologie particulière. Rappelons que P10 est un produit bifonctionnel qui a subi deux fois le traitement à la soude. L'image à une échelle large (C) montre l'apparition d'agglomérats de type pelucheux ou duveteux. A des échelles plus petites (10 μm et 1 μm), nous observons des structures de type alvéolaire et une morphologie semblable à du coton. L'addition d'un époxyde C10 sur l'amidon propoxylé modifie la morphologie des grains lui conférant une structure comme une éponge (images D et E).

En greffant une molécule comme l'anhydride (avec 11 carbones disponibles), nous fabriquons un produit avec une morphologie filamenteuse (image F). Rappelons que P17 est obtenu après un traitement à la soude et à l'oxyde de propylène, ce qui nous permet d'obtenir le produit P2, qui est ensuite traité avec la pyridine et l'anhydride. Donc, les feuilles initiales de P2 (photographie A) sont déchirées (photographie G). Le produit P19 est le produit obtenu lorsque l'amidon natif est mis en contact avec la pyridine et l'anhydride C11. Nous observons l'apparition de cristaux rigides et de structures très irrégulières.

4.4.4. Applications

Les produits synthétisés sont ensuite étudiés afin d'envisager une application potentielle en termes de dégradation du BaP. Nos démarches sont réalisées à l'échelle du laboratoire : d'une part par une oxydation chimique du BaP, par la réaction de Fenton et d'autre part, par le couplage simultané de l'oxydation chimique avec une oxydation biologique par des champignons saprotrophes.

4.4.4.1. Oxydation chimique par réaction de Fenton

Tout d'abord les produits sont testés lors d'une oxydation chimique par la réaction de Fenton. Les produits choisis sont le P2, P10, P17 et P19. L'ensemble des raisons qui ont guidé notre choix sont : la longueur de la chaîne greffée (époxyde ou anhydride), le MS et le rendement de la réaction, la solubilité aqueuse et la concentration du BaP adsorbé.

Dans la figure 4.7. est présenté le pourcentage de dégradation du BaP par réaction de Fenton avec les conditions de travail suivantes: produits étudiés $5 \cdot 10^{-3}M$ équivalent glucose, solution $FeSO_4$ $2 \cdot 10^{-3}M$ et H_2O_2 $10 \cdot 10^{-3}M$, ce qui nous permet d'obtenir les résultats suivants.

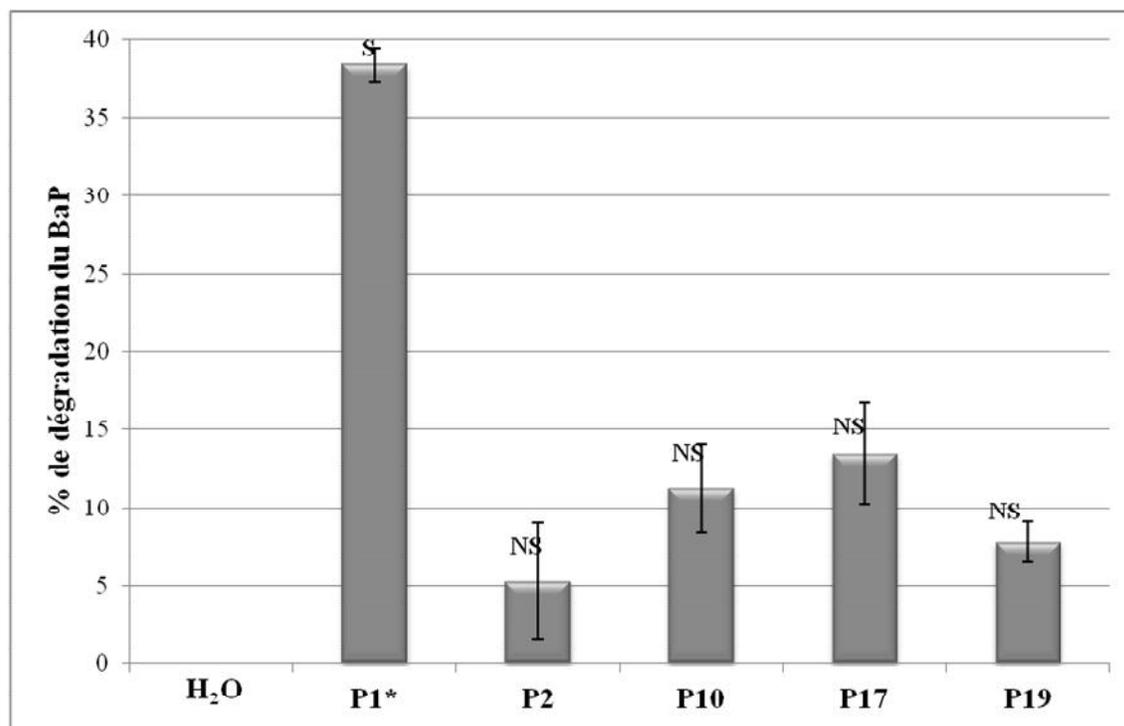


Figure 4.7. Le pourcentage de dégradation du BaP par oxydation chimique à l'aide de la réaction de Fenton pour les amidons étudiés

*Les amidons sont étudiés à une concentration de $5 \cdot 10^{-3}M$ sauf le polymère P1 qui est étudié à $70 \cdot 10^{-3}M$, dans un travail précédent [15]

Dans les études précédentes, nous avons testé le produit P1 à une concentration de travail de $70 \cdot 10^{-3}M$. Ce polymère présentait une faible capacité à solubiliser le BaP ($11,45 \mu g/L$), c'est pourquoi nous avons choisi de travailler à cette concentration élevée en amidon [15]. A cette concentration de polymère, nous avons trouvé un pourcentage de dégradation du BaP par réaction de Fenton de 38,38% [15]. Nous avons développé ensuite différentes techniques de synthèse de nouveaux polymères, qui se sont révélés plus performants dans leur capacité à solubiliser le BaP. C'est pourquoi, dans une optique d'application en termes de remédiation, nous avons choisi de travailler à une concentration plus faible à savoir $5 \cdot 10^{-3}M$.

³M. Ce choix est justifié car les concentrations de BaP solubilisé restent équivalentes voire supérieures à celles obtenues en présence de P1 (cf Figure 4.1.).

Nous observons que les résultats obtenus avec les amidons modifiés P10 (11,25%) et P17 (13,49%) semblent être intéressants à la concentration de travail choisie ($5 \cdot 10^{-3}$ M), sans être significatifs. Rappelons que les deux produits sont des molécules bifonctionnelles obtenues à partir de l'amidon propoxylé. Dans le cas des produits P2 et P19, le pourcentage de dégradation est respectivement de 5,29 et 7,8%. La quantité solubilisée du BaP est environ respectivement de 7,53 et 27 $\mu\text{g/L}$ pour P2 et P10, et de 80,79 et 74,69 $\mu\text{g/L}$ pour P17 et P19. Il a été démontré que l'efficacité du traitement de Fenton dépend de la capacité de chaque molécule à solubiliser le BaP [5]. Cependant, dans notre étude, cette condition n'est pas suffisante car il semblerait que le complexe amidon/BaP pourrait également protéger le BaP des radicaux hydroxyles. En tenant compte des résultats obtenus avec P1 [15], nous suggérons qu'en présence de carbohydrates modifiés, l'apparition de radicaux carbohydrates hydroxypropylés, ayant un temps de vie plus long que celle des radicaux hydroxyles, pourrait augmenter la quantité de BaP dégradé, même si celui-ci est adsorbé sur la matrice. Cette hypothèse du passage par l'intermédiaire d'un radical carbohydrate nécessiterait donc une concentration suffisante en amidon pour initier la production des radicaux carbohydrates.

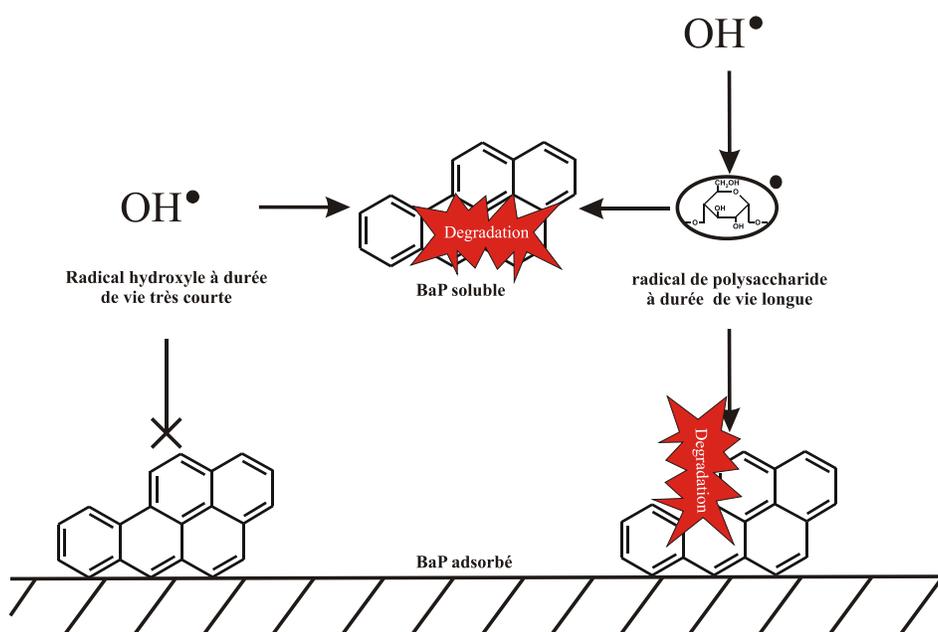


Figure 4.8. Hypothèse de la transformation du BaP par les radicaux polysaccharidiques

4.4.4.2. Dégradation biologique du BaP

Identification des souches étudiées

La dégradation biologique du polluant étudié a nécessité une démarche progressive. Notre étude a commencé par une sélection de 9 souches sur une collection de plus de 100 souches présentes au sein de la mycothèque de notre équipe (UCEIV – Mycologie Dunkerque). Ces 9 souches ont été caractérisées d'un point de vue macroscopique et microscopique au niveau de notre laboratoire, ce qui nous a permis d'identifier les souches. Pour certaines souches ne sporulant pas, l'identification a été complétée par le Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (France) et par le Laboratoire de Mycologie de Louvain-La-Neuve (Belgique).

Dans le tableau 4.3. sont présentés les caractères macroscopiques et microscopiques de chaque souche étudiée.

Tableau 4.3. Caractères macroscopiques et microscopiques des souches étudiées

Numéro de souche	Origine	Type de thalle	Aspect de la culture	Couleur de la face supérieure	Couleur de la face inférieure	Cloisonnement des hyphes	Reproduction asexuée	Identification
S6	Matériel végétal frais	Ras	Concentrique	Blanchâtre	Orangé brun	Oui	Conidiophores isolés ou en verticilles portant directement des phialides. Conidies unicellulaires hyalines (2,5µm) en chaînettes divergentes et en position latérale	<i>Paecilomyces lilacinus</i> Deutéromycète
S19	Sol	Cotonneux Aérien	Homogène Régulière	Blanchâtre	Blanchâtre	Oui	Phialides isolées ou en conidiophores. Microconidies unicellulaires Macroconidies pluricellulaires incurvées en faucilles	<i>Fusarium solani</i> Deutéromycète
S28	Sol	Ras	Duveteuses	Jaunâtre	Brun	Oui	Arthrospores à parois épaisses	<i>Geotrichum candidum</i> Hémiascomycète
S34	Matériel végétal mort	Cotonneux Aérien	Homogène Régulière	Blanchâtre	Blanchâtre	Oui	Pas de sporulation observée sur les différents milieux d'identification	<i>Chaetomium</i> sp. Deutéromycète
S61	Joint synthétique	Aérien filamenteux	Duveteuse	Noire	Noire	Oui	Les conidiophores sont plus ou moins distincts du mycélium. Ils sont simples ou ramifiés. Conidies unicellulaires ou bi-cellulaires, ovales ou en citron	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Deutéromycète
S62	Joint synthétique	Ras et poudreux	Dispersée	Marron verdâtre	Jaunâtre	Oui	Mitospores exogènes unicellulaires et ovoïdes Conidiophores en pinceaux	<i>Penicillium</i> sp. Deutéromycète
S63	Joint synthétique	Aérien	Granuleuse	Brun foncé noirâtre	Incolore ou jaunâtre	Oui	Tête sphérique Conidiophore lisse, paroi épaisse Conidies lisses, brun sombre	<i>Aspergillus niger</i> Deutéromycète
S65	Joint synthétique	Aérien	Homogène Régulière	Blanchâtre	Blanchâtre	Oui	Pas de sporulation observée sur les différents milieux d'identification	<i>Pyronema</i> sp. Deutéromycète
S79	Compost	Aérien	Duveteuse	Blanchâtre	Blanchâtre	Non	Sporocystes en forme de citron Mitospores endogènes unicellulaires et ovoïdes	<i>Phytophthora</i> sp.

Etude de la réponse des souche fongiques à une gamme H₂O₂

Une première étude de la réponse des souches fongiques en contact avec H₂O₂ a d'abord été réalisée avec les deux souches suivantes: S28 et S61.

Dans la figure 4.9. sont présentées des photographies pour S61 et S28 avec la gamme d'H₂O₂ choisie.

Cladosporium sphaerospermum (S61)

Geotrichum candidum (S28)

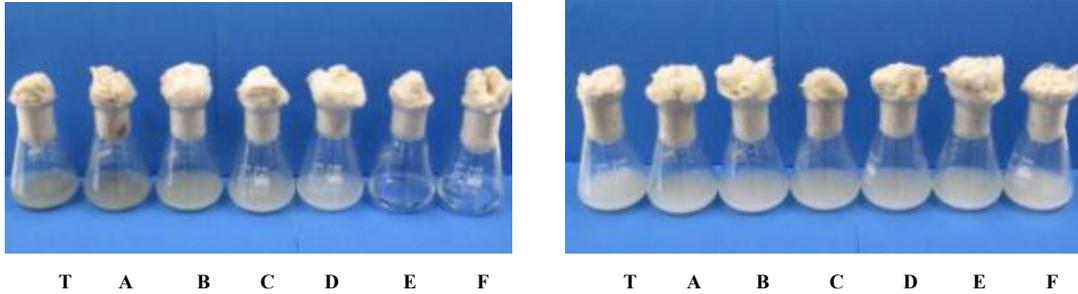


Figure 4.9. Cultures soumises à une gamme de concentrations croissantes d'H₂O₂ pendant 5 jours : **T** : témoin sans H₂O₂ ; **A** : H₂O₂ = 1,5·10⁻³ M; **B** : H₂O₂ = 3·10⁻³M; **C** : H₂O₂ = 6·10⁻³ M; **D**: H₂O₂ = 1,2·10⁻² M; **E**: H₂O₂= 2,4·10⁻² M; **F** : H₂O₂ = 4,8·10⁻² M

En ce qui concerne la biomasse fongique de S61, nous observons une légère tendance à la baisse; en effet elle varie de 91,7 mg pour le témoin sans H₂O₂ à 78,9 mg pour l'échantillon (F) ce qui correspond à la concentration en peroxyde d'hydrogène la plus élevée à savoir 4,8·10⁻² mol/L. En ce qui concerne la souche S28, les photographies (figure 4.9.) montrent clairement que la souche S28 est résistante au peroxyde d'hydrogène jusqu'à une concentration de 4,8·10⁻² mol/L. Ces résultats sont confirmés par la représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la croissance par rapport au témoin (figure 4.10.) qui ne dépasse pas 14 %. Cette gamme de concentration d'H₂O₂ ne permet donc pas de calculer la concentration efficace 50 (CE₅₀) [17].

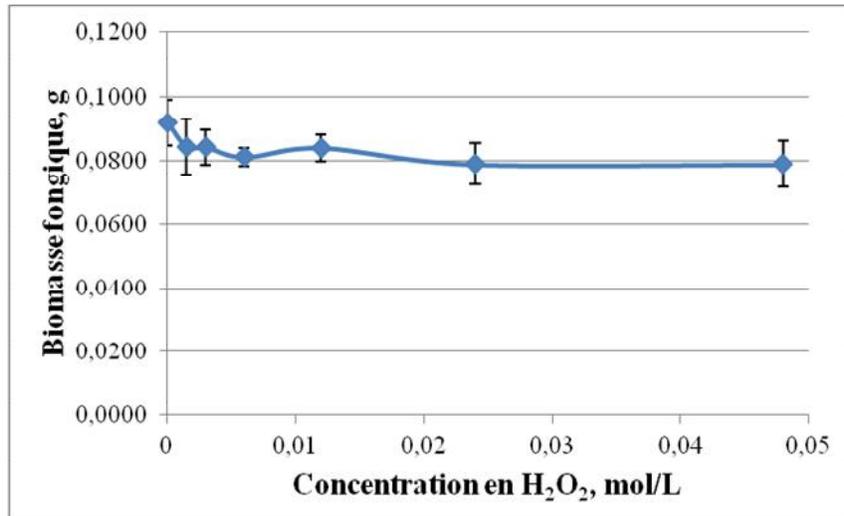


Figure 4.10. Evolution de la biomasse de *Geotrichum candidum* (S28) selon une gamme de concentration croissante d'H₂O₂

Une autre courbe représentant l'évolution de la biomasse fongique, pour S61, en fonction de la gamme de concentrations en H₂O₂ est tracée et confirme les observations des cultures en erlenmeyers (Figure 4.11.). La CE₅₀ (soit la concentration suffisante d'H₂O₂ qui inhibe 50% de la croissance par rapport à un témoin sans H₂O₂) est déterminée graphiquement en divisant la biomasse maximale par 2 et en reportant la valeur sur l'axe des abscisses. Elle correspond ici à une valeur de 0,0105 mol/L.

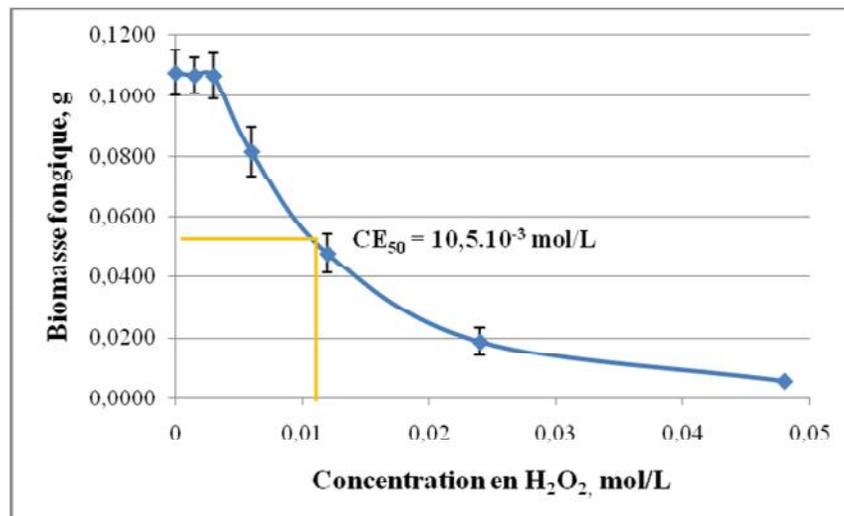


Figure 4.11. Evolution de la biomasse de *Cladosporium sphaerospermum* (S61) selon une gamme de concentration croissante d'H₂O₂

Ensuite, pour les deux souches, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition par rapport au témoin. La figure 4.12. représente la courbe pour la souche S28.

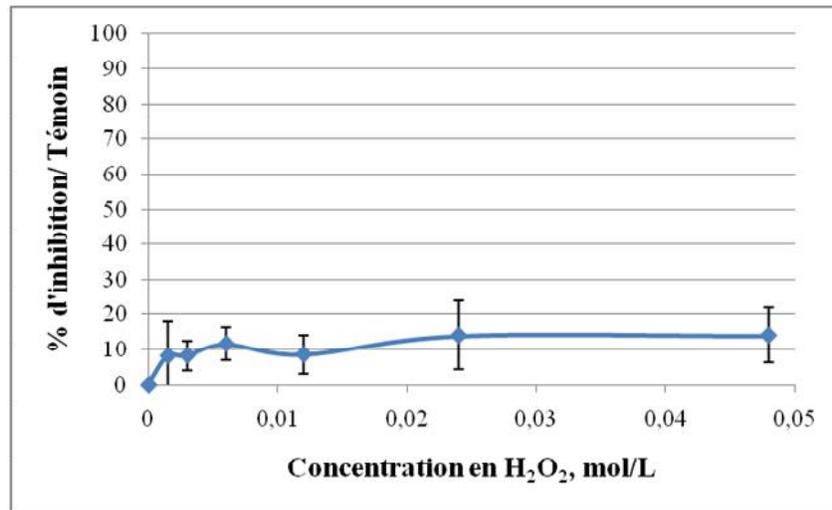


Figure 4.12. Courbe d'inhibition de la croissance de *Geotrichum candidum* (S28) sous l'action d'une gamme de concentration d'H₂O₂ par rapport à un témoin sans peroxyde d'hydrogène

Nous avons choisi de tester une autre gamme sur S28 (0 M ; 0,048 M ; 0,058 M ; 0,088 M ; 0,117 M) ce qui est représenté dans la figure 4.13. Nous avons montré que les concentrations choisies ne sont pas toxiques pour la souche étudiée.

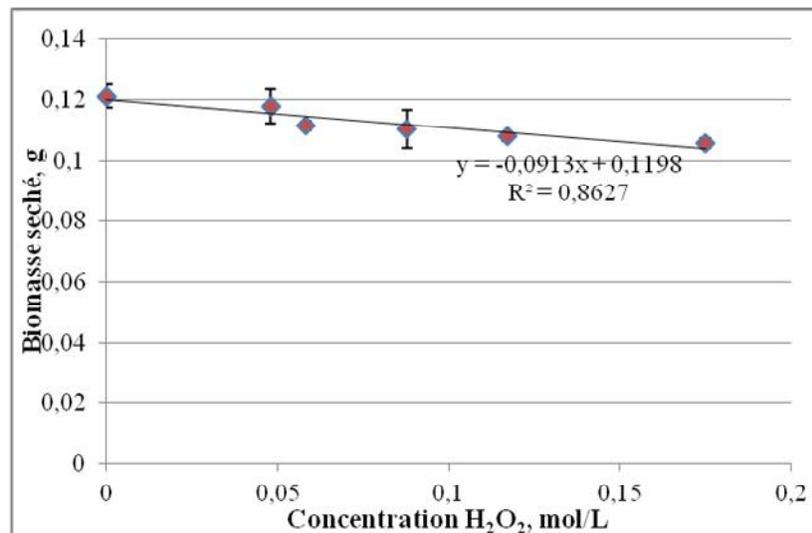


Figure 4.13. Evolution de la biomasse de *Geotrichum candidum* (S28) selon une gamme de concentration croissante d'H₂O₂

Pour le champignon S61, la courbe présente une forme sigmoïdale caractéristique des courbes de toxicité. Un premier plateau, où la souche résiste à l' H_2O_2 , est observé avec un pourcentage d'inhibition de 0,84%. Vient ensuite une phase où le taux d'inhibition de la croissance augmente de manière significative, passant de 0,84 % à 82,54 %. Et enfin, un plateau terminal se distingue avec un taux d'inhibition de la croissance proche de 100%. Cette courbe confirme la valeur de $0,0105 \text{ mol/L}$ déterminée graphiquement Figure 4.11.

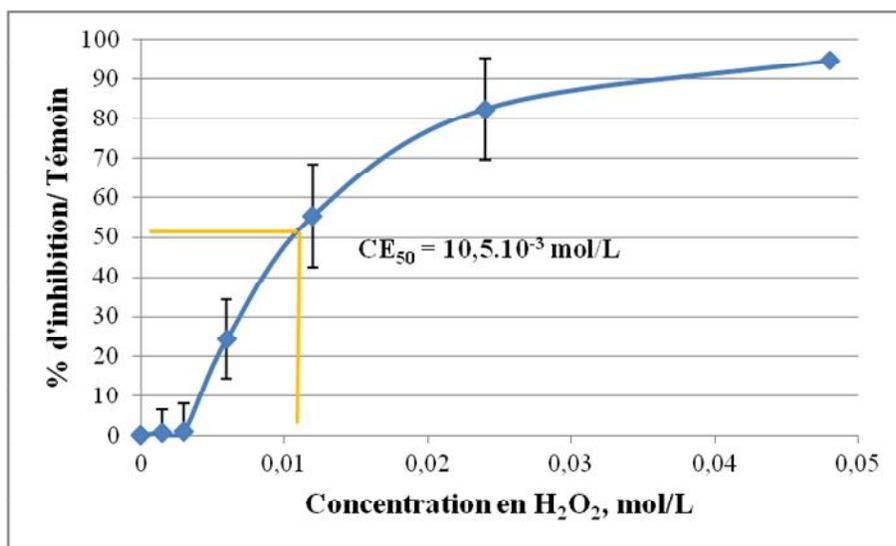


Figure 4.14. Courbe d'inhibition de la croissance de *Cladosporium sphaerospermum* (S61) sous l'action d'une gamme de concentration d' H_2O_2 par rapport à un témoin sans peroxyde d'hydrogène

Toutes ces souches sont ensuite étudiées par rapport à leur sensibilité à H_2O_2 à une concentration choisie. Pour choisir cette concentration, nous nous sommes basés sur différents résultats obtenus par nos travaux de recherche et en consultant les données relativement rares disponibles dans la littérature. D'une part, nos résultats obtenus sur *Fusarium solani* (S19) qui est notre souche de référence dans les études de dégradation du BaP nous a permis de déterminer la CE_{50} de cet isolat: $1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ [18]. De plus, les travaux réalisés lors de cette thèse mettent en évidence que *Cladosporium sphaerospermum* présente, dans les conditions expérimentales retenues, une CE_{50} de $10,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$, alors que *Geotrichum candidum* présente une véritable insensibilité vis-à-vis d' H_2O_2 jusqu'à des concentrations supérieures à 10^{-2}M . Enfin, les travaux d'Angelova et al. (2005) montrent qu'en moyenne la croissance de champignons filamenteux appartenant aux Deutéromycètes sont inhibés à 80% en présence d'une dose unique de peroxyde d'hydrogène à $30 \cdot 10^{-3} \text{M}$ [19] comme par

exemple, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. Afin de sélectionner les souches fongiques possédant des capacités de résistance à H₂O₂, nous avons choisi de travailler à une concentration de 6·10⁻³M. Dans l'expérimentation décrite, cette dose est apportée quotidiennement pendant quatre jours. Les résultats sont présentés dans la figure 4.15.

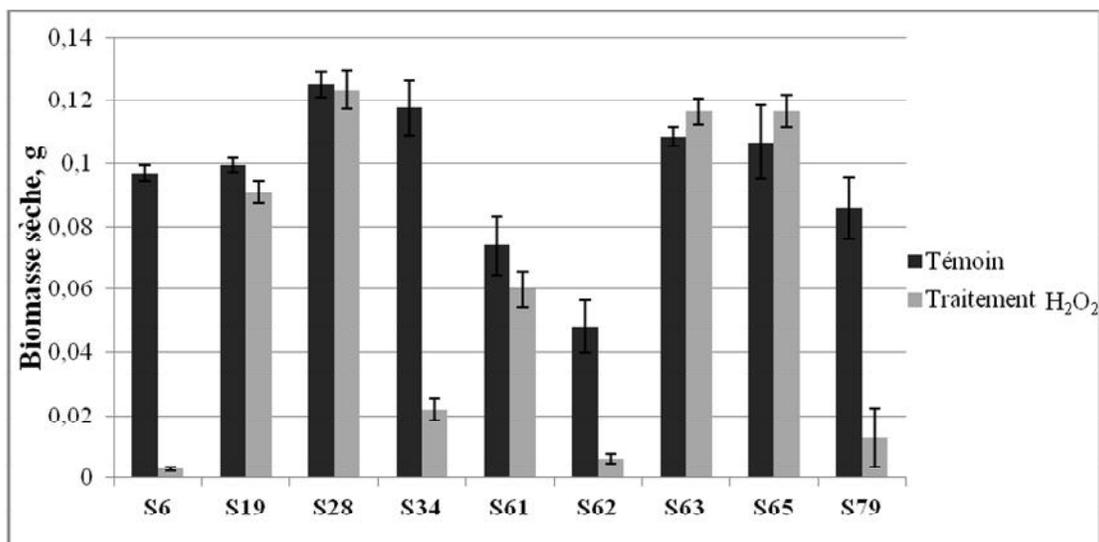


Figure 4.15. Le screening de souches à une concentration d'H₂O₂ de 6·10⁻³M

Cette figure illustre la biodiversité du monde fongique vis-à-vis d'un agent oxydant tel que H₂O₂. En effet, nous observons une gamme de réponses très variables. Concernant les souches S19, S28, S61, S63 et S65, leur biomasse produite en présence d'H₂O₂ (6·10⁻³M) est identique à celle de leur témoin respectif. Un deuxième groupe de souches se comporte différemment : il s'agit des souches S6, S34, S62 et S79 qui présentent une grande sensibilité à H₂O₂. En effet, ces souches montrent un taux d'inhibition supérieur à 75% en présence d'H₂O₂ comparativement aux cultures témoins non exposées.

Cette étude préliminaire réalisée à une concentration élevée 6·10⁻³M nous a permis de sélectionner quatre souches résistantes à H₂O₂ : S19 *Fusarium solani*, S28 *Geotrichum candidum*, S61 *Cladosporium sphaerospermum*, S63 *Aspergillus niger*. De plus, nous avons veillé à sélectionner des souches qui présentent des capacités de dégradation du BaP intéressantes [20-26]. Afin d'optimiser le couplage d'oxydation chimique et biologique, nous avons choisi de réaliser cette dernière expérimentation à une concentration d'H₂O₂ de 3·10⁻³M. Enfin, afin de stimuler le transfert du BaP en phase aqueuse, nous avons sélectionné, parmi les différentes synthèses d'amidon modifié réalisées, le produit P17 qui présente un

bon compromis entre sa solubilité aqueuse et ses capacités importantes de désorption du BaP (comme indiquée sur la figure 4.1.).

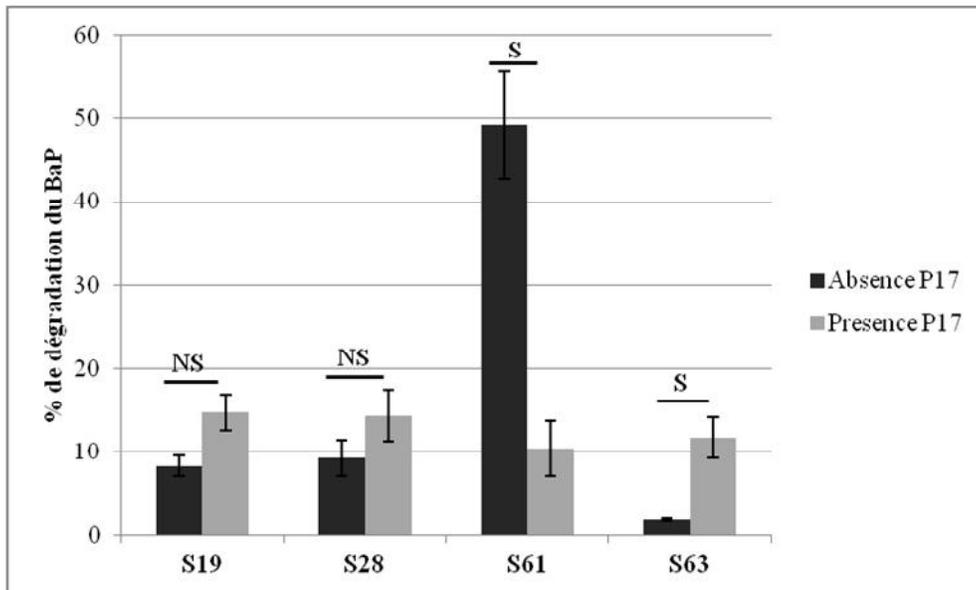


Figure 4.16. Pourcentage de dégradation de BaP pour les souches dans le traitement biologique

Sur la figure 4.16. sont présentés les pourcentages de dégradation biologique du BaP par chaque souche fongique en présence ou non du P17. Nous constatons tout d'abord une importante variabilité de capacité à dégrader le BaP entre les souches étudiées. Les souches S19 et S28 dégradent le BaP à un taux de 8% et 14% respectivement en absence ou en présence de l'amidon modifié, ces différences ne sont pas significatives. La souche S63 présente un résultat intéressant: en effet, nous constatons une augmentation significative de la dégradation du BaP en présence de l'amidon modifié P17, alors que sa capacité de dégradation intrinsèque est quasiment nulle (2%). Enfin, S61 présente un profil de dégradation opposé à celui décrit précédemment (chez S63) car elle est capable seule de dégrader le BaP à des taux très importants (50%) et ce taux diminue de façon surprenante, atteignant un taux de 10% en présence d'amidon modifié.

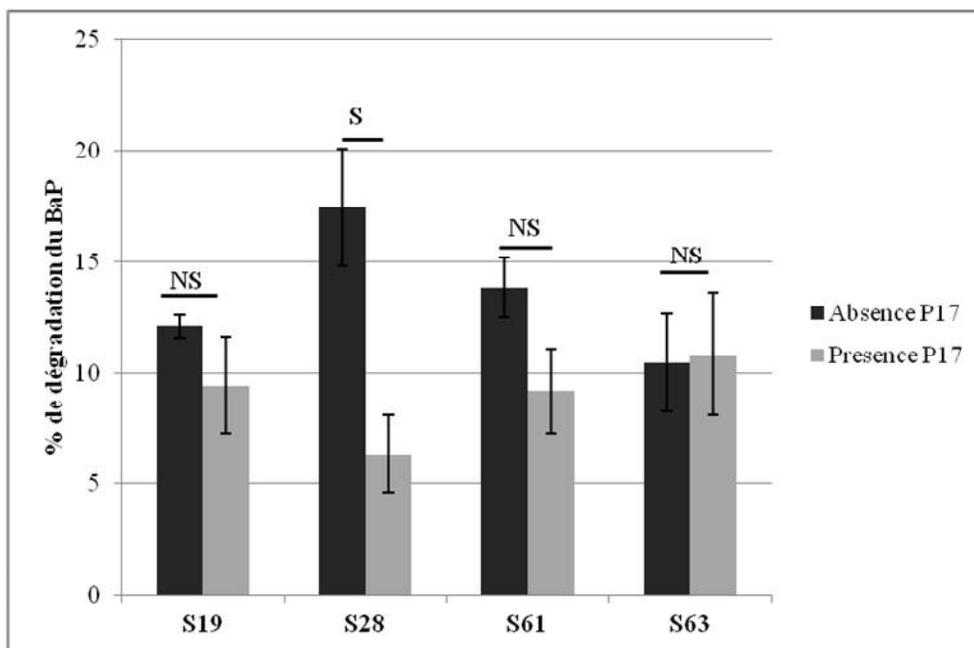


Figure 4.17. Pourcentage de dégradation de BaP pour les souches dans le traitement couplant l'oxydation chimique et biologique

Sur la figure 4.17. sont présentés les pourcentages de dégradation du BaP, couplant l'oxydation chimique et biologique, pour chaque souche fongique en présence ou non du P17, selon les conditions expérimentales décrites en Matériels et Méthodes. Pour les souches S19, S61 et S63, la présence d'amidon modifié P17 n'influence pas de façon significative le taux de dégradation du BaP par couplage oxydation chimique / oxydation biologique. Seule la souche S28 présente un profil différent. En effet, nous constatons une diminution significative du taux de dégradation du BaP en présence d'amidon modifié P17.

Ces résultats nous permettent de souligner différents points. D'une façon générale, nous constatons que la présence d'amidon modifié P17 ne stimule pas dans la plupart des cas la dégradation du BaP, que ce soit lors d'une oxydation biologique (rappel Figure 4.16.) ou lors de traitements couplés Fenton/biologique (rappel Figure 4.17.), comme nous l'espérons en accord avec les résultats obtenus en présence d'HPCD [3]. Les expériences de Fenton réalisées précédemment (amidon $5 \cdot 10^{-3}M$, H_2O_2 $10^{-3}M$ apportée en une seule dose) ne nous ont pas permis en effet d'obtenir des taux de dégradation satisfaisants (Figure 4.7.). Cependant, nous espérons que l'apport quotidien d'une dose de H_2O_2 à $3 \cdot 10^{-3}M$ pendant 12 jours serait une dose suffisante pour initier l'oxydation chimique, cette dose étant sciemment choisie pour respecter l'intégrité biologique des champignons utilisés. Il apparaît même que

l'amidon modifié P17 joue un rôle négatif pour la souche S61 puisqu'en sa présence, la dégradation du BaP diminue significativement, alors que la dégradation du BaP liée à l'action biologique de cette souche s'avère très intéressante (environ 50%). Ce résultat confirme des données obtenues précédemment sur *Cladosporium sphaerospermum* au sein de notre équipe [20-22] et chez d'autres chercheurs [27]. La souche S28 *Geotrichum candidum* présente un comportement similaire lors du couplage Fenton/dégradation biologique. Seule la souche S63 *Aspergillus niger* est stimulée en présence de l'amidon modifié P17, ce qui souligne l'intérêt de cette souche fongique [28].

4.5. Conclusion

Notre objectif dans ce chapitre était d'étudier, parmi les différents produits synthétisés (voir chapitre 3), les relations structure/activité des amidons modifiés vis-à-vis du BaP. Notre stratégie de synthèse chimique conduit à deux familles de molécules : les molécules synthétisées à partir d'une alkylation par étherification et celles synthétisées à partir d'une alkylation par estérification. Ces molécules présentent des propriétés de désorption du BaP différentes illustrées par le schéma suivant :

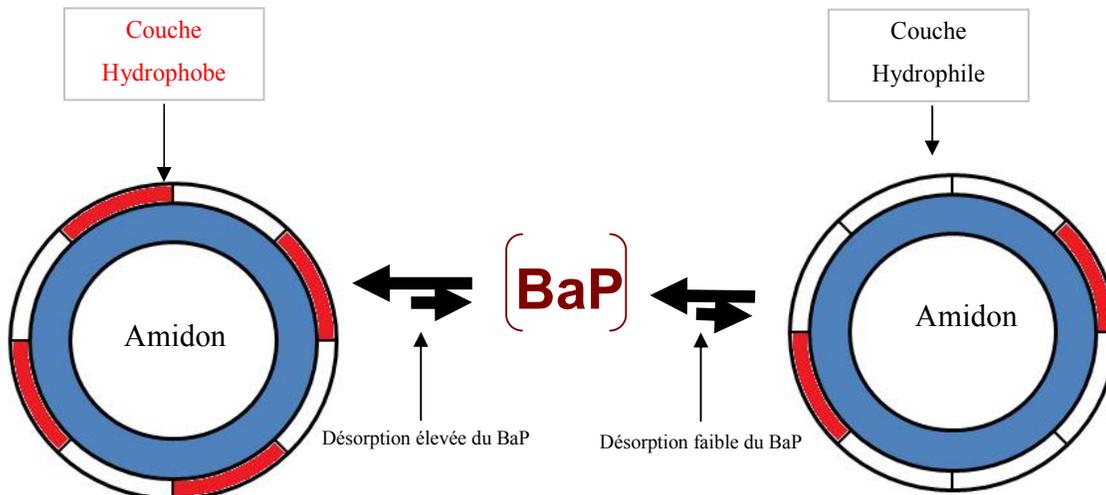


Figure 4.18. Représentation schématique des amidons modifiés et leurs propriétés de désorption du BaP

En effet, la synthèse par estérification conduit à des taux de greffage important ayant pour conséquence la formation d'une couche hydrophobe stimulant la solubilité du BaP (par exemple de 40 fois pour P17). Ces molécules présentent aussi les avantages suivants :

- ✓ un rendement de la synthèse élevé

✓ réactants utilisés dans la synthèse moins coûteux.

Par contre, la synthèse par étherification produit des molécules peu performantes en termes de solubilisation du BaP (couche hydrophobe réduite) mais a contrario, elles présentent des solubilités intrinsèques élevées.

Dans une optique d'utilisation de ces molécules pour l'oxydation chimique du BaP (par réaction de Fenton), les études d'interaction amidon/Fer/BaP (par les techniques suivantes MEB-EDS, fluorescence) montrent clairement l'existence d'un complexe tripartite dans lequel le cation Fe^{2+} et le BaP présentent une proximité spatiale sur la matrice polysaccharidique modifiée. Grâce à ces polymères synthétisés, nous avons trouvé les conditions pour rapprocher le Fe du polluant pouvant faciliter ainsi la destruction du BaP par la réaction de Fenton.

Cependant, il s'avère que l'augmentation de la solubilité du BaP n'est pas suffisante dans notre modèle amidon/Fer/BaP. Il semble que la concentration relative des ces trois acteurs joue un rôle primordial et complexe dans l'efficacité de la réaction de Fenton et nécessite donc des études complémentaires pour optimiser la dégradation des polluants. D'autres paramètres comme la nature de l'agent oxydant (perchlorate, le permanganate) pourraient être également étudiés.

Références bibliographiques

- [1] Cerniglia C.E. (1992). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Biodegradation*, 3, p. 351-368.
- [2] Wilson S.C., Jones K.C. (1993). *Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review*. *Environmental Pollution*, 81, p. 229-249.
- [3] Veignie E., Rafin C., Landy D., Fourmentin S., Surpateanu G. (2009). *Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene*. *Journal of Hazardous Materials*, 168, p. 1296-1301.
- [4] Murray C.A., Parsons S.A. (2004). *Removal of NOM from drinking water: Fenton's and photo-Fenton's processes*. *Chemosphere*, 54, p. 1017-1023.
- [5] Flotron V., Delteil C., Padellec Y., Camel V. (2005). *Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process*. *Chemosphere*, 59, p. 1427-1437.

-
- [6] Rivas F.J. (2006). *Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments*. Journal of Hazardous Materials, 138, p. 234-251.
- [7] Goi A., M.T., Kulik N. (2009). *Contaminated Soil Remediation with Hydrogen Peroxide Oxidation*. World Academy of Science, Engineering and Technology, 52, p. 185-189.
- [8] Kastner M., Breuer-Jammali M., Mahro B. (1998). *Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil*. Applied and Environmental Microbiology, 64, p. 359-362.
- [9] Kästner M., Breuer-Jammali M., Mahro B. (1994). *Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41, p. 267-273.
- [10] Erickson D.C., Loehr R.C., Neuhauser E.F. (1993). *PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils*. Water Research, 27, p. 911-919.
- [11] Crini G. (2005). *Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment*. Progress in Polymer Science, 30, p. 38-70.
- [12] Chandra R., Rustgi R. (1998). *Biodegradable polymers*. Progress in Polymer Science, 23, p. 1273-1335.
- [13] Chen J., Jo S., Park K. (1995). *Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery*. Carbohydrate Polymers, 28, p. 69-76.
- [14] Choël M, Deboudt K, Osán J, Flament P, Van Grieken R. (2005). *Quantitative Determination of Low-Z Elements in Single Atmospheric Particles on Boron Substrates by Automated Scanning Electron Microscopy-Energy-Dispersive X-ray Spectrometry*. Analytical Chemistry, 77, p. 5686-5692.
- [15] Rosu A.M., Veignie E., Surpateanu G., Brabie G., Miron D.N., Rafin C. (2011). *Synthesis and evaluation of hydroxypropylated potato starch as polymeric support for benzo[a]pyrene degradation by Fenton reaction*. Carbohydrate Polymers, 83, p. 1486-1491.
- [16] Zheng W., Tarr M.A. (2004). *Evidence for the Existence of Ternary Complexes of Iron, Cyclodextrin, and Hydrophobic Guests in Aqueous Solution*. The Journal of Physical Chemistry B, 108, p. 10172-10176.
- [17] Bouly K. (2010). *Etude de la toxicité du peroxyde d'hydrogène sur des souches fongiques pour la mise au point d'une réaction de Fenton biocompatible*, Université du Littoral Côte d'Opale, Rapport de stage de Licence de Biologie L3, Dunkerque, 22 p.

-
- [18] Rafin C., Veignie E., Fayeulle A., Surpateanu G. (2009). *Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins*. *Bioresource Technology*, 100, p. 3157-3160.
- [19] Angelova M.B., Pashova S.B., Spasova B.K., Vassilev S.V., Slokoska L.S. (2005). *Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat*. *Mycological Research*, 109, p. 150-158.
- [20] Potin O. (2000). *Utilisation de micro-organismes telluriques pour la décontamination de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)*. Thèse de Doctorat, Université du Littoral Côte d'Opale Dunkerque, 165 p.
- [21] Potin O., Rafin C., Veignie E. (2004). *Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, p. 45-52.
- [22] Potin O., Veignie E., Rafin C. (2004). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, p. 71-78.
- [23] Rafin C., Potin O., Veignie E., Lounes-Hadj Sahraoui A., and Sancholle, M. (2000). *Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani**. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 21, p. 311-329.
- [24] Rafin C., Veignie E., Woisel P., Cazier F. (2004). *Intérêt des champignons telluriques dans des processus de bioremédiation de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques*. *Déchets, Revue francophone d'écologie industrielle*, 33, p. 37-11.
- [25] Rafin C., Veignie E., Woisel P., Cazier F., Surpateanu G. (2006). *New potential of a Deuteromycete fungus *Fusarium solani* in benzo[a]pyrene degradation: an ecophysiological hypothesis?* In Glazer, M.P. (Ed.), *New Frontiers in Environmental Research*. Nova Science Publishers Inc., New York, p. 165-179.
- [26] Rafin C. (2010). *Exploration de la diversité fongique dans des écosystèmes terrestres : Modèles d'interactions plantes / champignons phytopathogènes; Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par des champignons telluriques saprophytes*, Habilitation à Diriger des Recherches, Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, 72 p.
- [27] Weber F.J., Hage K.C., De Bont J.A. (1995). *Growth of the fungus *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the sole carbon and energy source*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, p. 3562-3566.

[28] Wunder T., Kremer S., Sterner O., Anke H. (1994). *Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by Aspergillus niger SK 9317*. Applied Microbiology and Biotechnology, 42, p. 636-641.

Conclusions générales et Perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans une problématique générale sur la recherche de méthodes de dépollution des sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques et en particulier par le benzo[a]pyrène. Nous nous sommes proposés de développer une approche utilisant des polysaccharides à base d'amidon modifié comme agent de désorption du polluant, permettant d'améliorer la proximité spatiale entre le polluant et l'agent oxydant, afin d'augmenter l'efficacité de la réaction de Fenton mais aussi son oxydation par voie biologique.

Tout d'abord, une étude théorique de modélisation moléculaire utilisant les énergies de complexation a permis de mettre en évidence que le fragment d'amylopectine, constituant principal de l'amidon, présente trois sites préférentiels pour la formation d'un complexe stable avec la molécule de BaP et le cation Fe^{2+} . Cette capacité de l'amidon à présenter des sites de fixation aussi pour le fer et le BaP est un résultat encourageant pour utiliser cette matrice polysaccharidique comme support à la réaction de Fenton. Ces études de modélisation nous ont servi de base dans notre approche expérimentale.

Afin d'envisager d'utiliser l'amidon comme matrice polysaccharidique pour des applications environnementales pour la réhabilitation de sols pollués, nous nous sommes inspirés de l'utilisation des dérivés de l'amidon dans le secteur des industries agro-alimentaires. En effet, l'amidon et ses dérivés sont très utilisés dans l'industrie alimentaire soit à l'état natif soit à l'état modifié, en particulier pour ses propriétés à la fois émulsifiantes et stabilisantes. Nous avons choisi deux critères déterminants pour la sélection des molécules d'amidon modifiées : d'une part la solubilité aqueuse des amidons modifiés obtenus et d'autre part leurs propriétés désorbantes vis à vis de molécules hydrophobes comme le benzo[a]pyrène. Rappelons que l'amidon natif de pomme de terre présente une très faible solubilité dans l'eau (0,35 g/L), ce qui limite ses applications potentielles. Après la synthèse d'une vingtaine de molécules d'amidon modifiées, il apparaît clairement que la longueur de la chaîne alkyl greffée influence les propriétés visées. En effet, les chaînes alkyl à faible nombre de carbone (i.e. C3) stimule la solubilité aqueuse de l'amidon. Par contre, les chaînes alkyl présentant un nombre élevé de carbone (i.e. C16) influencent positivement les capacités à désorber le BaP. Ces résultats intéressants ouvrent des perspectives et apportent un guide pour la synthèse de nouveaux composés optimisant le couple solubilité aqueuse versus solubilité du BaP.

Suite à ces modifications chimiques réalisés, les relations structure/activité des amidons modifiés vis-à-vis du BaP (par les techniques suivantes MEB-EDS, fluorescence) montrent clairement l'existence d'un complexe tripartite dans lequel le cation Fe^{2+} et le BaP présentent une proximité spatiale sur la matrice polysaccharidique modifiée, ce qui valide les résultats obtenus par les études théoriques. Dans un dernier volet, nous avons voulu aborder les premiers essais utilisant ces matrices d'amidon modifiées dans un but de dégrader le BaP en couplant une réaction d'oxydation chimique par réaction de Fenton et une oxydation biologique par voie fongique. Les résultats préliminaires soulignent la difficulté des mécanismes impliqués dans ces réactions d'oxydation qui nécessitent une optimisation de différents paramètres tels que la concentration des réactifs, un traitement séquentiel oxydation chimique/oxydation biologique, sélection d'autres souches fongiques. Ces résultats nous ont permis de poser une hypothèse originale: il semblerait que si le radical hydroxyl impliqué dans la réaction de Fenton se caractérise par une durée de vie très courte et n'est capable d'oxyder que la faible proportion de BaP soluble, nous suggérons qu'en présence de carbohydrates modifiés, l'apparition de radicaux carbohydrates hydroxypropylés ayant un temps de vie plus long permettant d'atteindre et de dégrader le BaP adsorbé. Le développement de tels systèmes catalytiques éco-compatibles préservant l'intégrité de la structure et des fonctions du sol pourrait être valorisé dans des processus de réhabilitation des sols pollués.

Ce projet pluridisciplinaire et trans-universitaire réalisé dans le cadre d'une thèse en co-tutelle (ULCO France, Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, Roumanie) m'a permis d'acquérir une double compétence biologie/chimie qui pourrait me permettre de développer ces acquis en biotechnologies environnementales innovantes en matière de remédiation des sols pollués, secteur en plein essor en Roumanie.

Liste d'acronymes

AM1	Recherche Multiconformationnelle de la Méthode Moléculaire d'Austen
AM1-COSMO	Recherche Multiconformationnelle de Conducteur comme le Modèle Dissolvant
AOP	Procédés d'Oxydation Avancés (Advanced Oxidation Process)
BaP	Benzo[a]Pyrene
BASIAS	Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service
BASOL	Base de données sur les Sites et sols pollués
CE ₅₀	Concentration Efficace 50
DMSO	DiMéthyl SulfOxyde
DP	Degré moyen de Polymérisation
DS	Degré de Substitution
FTIR	Fourier Transformed InfraRed spectroscopy
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HMT	Heat Moisture Treatment
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HP	Amidon Hydroxypropylé
HPBCD	HydroxyPropyl- β -CycloDextrine
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
INERIS	Institut National de l'Environnement industriel et des RISques
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MEA	Milieu Malt - Extrait de levure – Agar
MEB-EDS	Microscopie Electronique à Balayage équipé de sondes EDS (Energy Dispersive Spectroscopy)
MM	Milieu Minimum

MM3	Recherche Multiconformationnelle de la Mécanique Moléculaire
MREI 1	Maison de la Recherche en Environnement Industriel
MREN	Maison de la Recherche en Environnement Naturel
MS	Substitution Molaire
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
PDB-CaChe	Structural Database System of Cambridge Crystallographic Data Center
pH	Potentiel Hydrogène
POP	Polluants Organiques Persistants
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
UCEIV	Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant
US-EPA	United States Environmental Protection Agency

Liste des figures

Figure 1.1. L'illustration du sol traversé par de nombreux flux de matières	11
Figure 1.2. Structure des β -cyclodextrines	18
Figure 1.3. Voies métaboliques microbiennes de dégradation des HAP	21
Figure 2.2. La géométrie spatiale de la molécule d'HPBCD donnée par le logiciel CaChe	30
Figure 2.3. La géométrie spatiale d'un fragment d'amidon donnée par le logiciel CaChe	30
Figure 2.4. La conformation en spirale de l'amylose donnée par le logiciel CaChe	31
Figure 2.5. La structure de l'amylopectine donnée par le logiciel CaChe	31
Figure 2.6. La géométrie spatiale de la molécule de BaP avec la numérotation des atomes donnée par le logiciel CaChe	32
Figure 2.7. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du Fe^{2+} avec l'HPBCD. A. Face primaire, B. Face secondaire	32
Figure 2.8. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du Fe^{2+} avec le fragment d'amidon	33
Figure 2.9. La technique stéréochimique utilisée pour la complexation du Fe^{2+} avec l'amylose	33
Figure 2.10. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du Fe^{2+} avec l'amylopectine	33
Figure 2.11. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du BaP avec l'HPBCD. A. Face primaire, B. Face secondaire	34
Figure 2.12. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation du BaP avec l'amylose	34
Figure 2.13. Les techniques stéréochimiques utilisées pour la complexation de BaP avec l'amylopectine	35
Figure 2.14. Représentation des orbitales moléculaires de frontière du BaP. A. L'orbitale moléculaire HOMO, B. L'orbitale moléculaire LUMO	37
Figure 2.15. La superdélocalisation de la molécule de BaP donnée par le logiciel CaChe	37

Figure 2.16. Le complexe le plus stable du BaP avec l'HPBCD réalisé par la méthode MM3	38
Figure 2.17. Le complexe le plus stable du BaP avec l'amylose réalisé par la méthode MM3	39
Figure 2.18. Les complexes les plus stables du BaP avec l'amylopectine dans les sites favorables réalisés par la méthode MM3	40
Figure 2.19. Le complexe plus stable avec le cation Fe^{2+} et l'HPBCD réalisé par la méthode MM3	41
Figure 2.20. Le complexe formé avec le cation Fe^{2+} et l'amylose réalisé par la méthode MM3	42
Figure 2.21. Les complexes plus stables avec les sites 1, 2 et 3 d'amylopectine et le cation Fe^{2+} . A. Site 1, B. Site 2, C. Site 3.	43
Figure 3.1. Schéma illustrant les différents degrés d'organisation moléculaire d'un granule d'amidon	51
Figure 3.2. La structure chimique de α -D-glucopyranose avec une conformation chaise	52
Figure 3.3. Structure chimique de l'amylopectine	53
Figure 3.4. La structure de l'amylopectine	53
Figure 3.5. Structure chimique d'amylose et l'hélice formée	54
Figure 3.6. Les applications d'amidon natif dans différentes industries	58
Figure 3.7. Les industries et le pourcentage d'utilisation des amidons modifié	59
Figure 3.8. Représentation de la synthèse chimique entre l'amidon et le propylène oxyde	62
Figure 3.9. Le schéma réactionnel entre l'amidon propoxylé et les époxyalcanes	63
Figure 3.10. Le schéma réactionnel entre l'amidon propoxylé et 1,4-butane sultone	64
Figure 3.11. La réaction chimique caractéristique pour l'interaction entre l'amidon propoxylé et l'anhydride	65
Figure 3.12. Le spectre RMN du 1H d'amidon natif gélatinisé dans D_2O	67
Figure 3.13. Les spectres RMN 1H des amidons dans différentes conditions dans D_2O	68
Figure 3.84. Stratégie de synthèse des amidons modifiés à partir de l'amidon natif (P0)	71
Figure 3.95. Le spectre FTIR de l'amidon natif de pomme de terre (P0)	72
Figure 3.106. Les spectres RMN 1H d'amidon natif et des éthers d'amidon dans D_2O	73
Figure 3.17. Les spectres RMN 1H de l'amidon natif et des esters d'amidon dans	75

DMSO-D

Figure 3.118. Stratégie de synthèse des amidons bialkylés à partir de l'amidon propoxylé (P2)	77
Figure 3.129. Le spectre FTIR d'amidon propoxylé (P2)	77
Figure 3.2013. Les spectres RMN ¹ H de l'amidon propoxylé et ses éthers dans D ₂ O	79
Figure 3.21. Représentation du MS en fonction de la molécule d'époxyde greffée	80
Figure 3.22. La représentation graphique du greffage de la chaîne alkyle	81
Figure 3.23. Les spectres RMN ¹ H de P2 et ses éthers dans DMSO-D	82
Figure 3.144. Le spectre FTIR caractéristique pour P10	83
Figure 3.155. Le spectre FTIR caractéristique pour P17	84
Figure 4.1. Concentration du BaP en phase aqueuse en présence d'amidon modifié [5·10 ⁻³ M équivalent glucose] en fonction de la solubilité aqueuse de chaque amidon modifié	101
Figure 4.2. Evolution de la fluorescence du BaP en fonction de la concentration de FeSO ₄ ·7 H ₂ O	103
Figure 4.3. Le pourcentage d'inhibition de la fluorescence du BaP pour chaque amidon modifié étudié [5·10 ⁻³ M]	104
Figure 4.4. Spectres du cation Fe ²⁺ par MEB-EDS sur l'amidon modifié (P17), en absence (A) ou en présence (B) du cation Fe ²⁺ ajouté	105
Figure 4.5. Images des amidons de pomme de terre obtenues au MEB : A. amidon natif, B. grains d'amidon, C. amidon qui a subit le traitement avec NaOH une seule fois, D. amidon qui a subit le traitement avec NaOH deux fois, E, F. amidon qui a subit le traitement avec la pyridine	106
Figure 4.6. Les images MEB des amidons modifiés: A, B-amidon P2; C, D, E-amidon P10; G, F-amidon P17; H-amidon P19	108
Figure 4.7. Le pourcentage de dégradation du BaP par oxydation chimique à l'aide de la réaction de Fenton pour les amidons étudiés	110
Figure 4.8. Hypothèse de la transformation du BaP par les radicaux polysaccharidiques	111
Figure 4.9. Cultures soumises à une gamme de concentrations croissantes d'H ₂ O ₂ pendant 5 jours : T : témoin sans H ₂ O ₂ ; A : H ₂ O ₂ = 1,5·10 ⁻³ M; B : H ₂ O ₂ = 3·10 ⁻³ M; C : H ₂ O ₂ = 6·10 ⁻³ M; D: H ₂ O ₂ = 1,2·10 ⁻² M; E: H ₂ O ₂ = 2,4·10 ⁻² M; F : H ₂ O ₂ = 4,8·10 ⁻²	114

M

Figure 4.10. Evolution de la biomasse de <i>Geotrichum candidum</i> (S28) selon une gamme de concentration croissante d'H ₂ O ₂	115
Figure 4.11. Evolution de la biomasse de <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (S61) selon une gamme de concentration croissante d'H ₂ O ₂	115
Figure 4.12. Courbe d'inhibition de la croissance de <i>Geotrichum candidum</i> (S28) sous l'action d'une gamme de concentration d'H ₂ O ₂ par rapport à un témoin sans peroxyde d'hydrogène	116
Figure 4.13. Evolution de la biomasse de <i>Geotrichum candidum</i> (S28) selon une gamme de concentration croissante d'H ₂ O ₂	116
Figure 4.14. Courbe d'inhibition de la croissance de <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (S61) sous l'action d'une gamme de concentration d'H ₂ O ₂ par rapport à un témoin sans peroxyde d'hydrogène	117
Figure 4.15. Le screening de souches a une concentration d'H ₂ O ₂ de $6 \cdot 10^{-3}M$	118
Figure 4.16. Pourcentage de dégradation de BaP pour les souches dans le traitement biologique	119
Figure 4.17. Pourcentage de dégradation de BaP pour les souches dans le traitement couplant l'oxydation chimique et biologique	120
Figure 4.18. Représentation schématique des amidons modifiés et leurs propriétés de désorption du BaP	121

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP de la liste US-EPA	14
Tableau 2.1. Les données caractéristiques de la molécule de BaP par le logiciel CaChe	36
Tableau 2.2. Les énergies de complexation pour le complexe stable du BaP et de l'HPBCD	38
Tableau 2.3. Les énergies de complexation pour le complexe stable entre le BaP et l'amylose	39
Tableau 2.4. Les énergies de complexation pour les complexes formés dans les six sites	40
Tableau 2.5. Les énergies numériques des complexes formés entre Fe ²⁺ et l'HPBCD	41
Tableau 2.6. Les énergies numériques des complexes formés entre Fe ²⁺ et l'amylose	42
Tableau 2.7. Les énergies numériques des complexes formés entre Fe ²⁺ et les sites d'amylopectine	42
Tableau 3.1. Caractéristiques principales des amidons et féculés	50
Tableau 3.2. Degré moyen de polymérisation (DP) des fractions amylose et amylopectine de différents amidons	55
Tableau 3.3. Modification des amidons alimentaires	56
Tableau 3.4. Les caractéristiques des produits d'interaction utilisés pour l'alkylation	61
Tableau 3.5. Les produits obtenus après les synthèses chimiques de modification	70
Tableau 3.6. Présentation des caractéristiques des amidons modifiés selon la stratégie présentée dans la figure 3.10.	73
Tableau 3.7. Les caractéristiques des produits synthétisés selon la stratégie présentée dans la figure 3.14.	78
Tableau 4.1. Origine des souches de champignons étudiées	99
Tableau 4.2. Présentation des produits mono- et bifonctionnels utilisés dans l'étude	102
Tableau 4.3. Caractères macroscopiques et microscopiques des souches étudiées	113

Liste des annexes

ANNEXE I – Les données numériques pour les molécules et les produits formés dans la complexation avec le BaP	136
ANNEXE II – Les données numériques pour les molécules et les produits formés dans la complexation avec Fe ²⁺	137
ANNEXE III. Les conditions de réactions pour chaque produit	138
ANNEXE IV. Les spectres RMN pour chaque produit synthétisé	140
ANNEXE V. Le Curriculum Vitae	151
ANNEXE VI.	154

ANNEXE I – Les données numériques pour les molécules et les produits formés dans la complexation avec le BaP

Molécules	Méthodes	MM3	AM1			AM1 - COSMO		
		En [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	μ [D]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	μ [D]
BaP		1,509	-246,427	854	0	-204,459	-834,259	0
HPBCDp*		407,988	-1536,403	-22262,281	12,271	-1632,576	-22258,954	15,137
HPBCDs		365,343	-1174,959	-22259,641	13,143	-1297,371	-22361,621	42,301
Amylose1**		1098,641						
Amylose2		1096,99						
Amylopectine1***		2496,943						
Amylopectine2		2496,953						
Amylopectine3		2496,984						
Amylopectine4		2359,044						
Amylopectine5		2805,584						
Amylopectine6		2302,903						

Complexe	Méthodes	MM3	AM1			AM1 - COSMO		
		En [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	En [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	En [kcal/mol]
HPBCDp+BaP		406,174	-1812,639	-576824,247	6,172	-1866,275	-576877,881	7,822
HPBCDs+BaP		384,851	-1588,212	-575970,021	7,044	-1661,815	-576043,621	50,123
Amylose1+BaP		1099,324						
Amylose2+BaP		1102,821						
Amylopectine1+BaP		2455,152						
Amylopectine2+BaP		2458,062						
Amylopectine3+BaP		2360,993						
Amylopectine4+BaP		2886,454						
Amylopectine5+BaP		2873,893						
Amylopectine6+BaP		2807,512						

*La complexation est réalisée sur la face primaire (HPBCDp) et sur la face secondaire (HPBCDs) de la molécule d'HPBCD

**La complexation est réalisée sur les deux voies de la spirale de la molécule d'amylose (Amylose1-voie droite, Amylose2 – voie gauche)

***La complexation est réalisée dans chaque site supposé de la molécule de l'amylopectine (Amylopectine 1 ... Amylopectine 6 – les six sites supposés)

ANNEXE II – Les données numériques pour les molécules et les produits formés dans la complexation avec Fe²⁺

Molécules	Méthodes	MM3			AM1			AM1 - COSMO		
		En [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	En [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	En [kcal/mol]		
Fe		0	740,666	-394,637	0	466,389	-406,531	0		
HPBCDp*		401,348	-1944,042	-22262,281	28,208	-1878,094	-22258,954	19,105		
HPBCDs		401,347	-1916,870	-22259,641	48,142	-1863,189	-22361,621	98,043		
Amylose1**		957,833	-4451,792	-42265,416	76,147					
Amylose2		957,832	-4453,927	-42269,118	45,667					
Amylopectine1***		2401,911								
Amylopectine2		2401,910								
Amylopectine3		2401,911								
Amylopectine4		2194,863								
Amylopectine5		2213,620								
Amylopectine6		2132,988								
Complexe	Méthodes	MM3			AM1			AM1 - COSMO		
		En [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	En [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	Et [kcal/mol]	En [kcal/mol]		
HPBCDp+Fe		347,966	-1207,987	-22658,889	-15,06	-1412,748	-22667,768	-4,253		
Amylose1+Fe		1015,702	-3701,971	-45921,164	-34,73					
Amylose2+Fe		1022,179	-3704,203	-45921,261	-4,253					
Amylopectine1+Fe		2337,178								
Amylopectine2+Fe		2258,683								
Amylopectine3+Fe		2297,566								
Amylopectine4+Fe		2298,387								
Amylopectine5+Fe		2307,765								
Amylopectine6+Fe		2267,449								

*La complexation est réalisée sur la face primaire (HPBCDp) et sur la face secondaire (HPBCDs) de la molécule d'HPBCD

**La complexation est réalisée sur les deux voies de la spirale de la molécule d'amylose (Amylose1-voie droite, Amylose2 – voie gauche)

***La complexation est réalisée dans chaque site supposé de la molécule de l'amylopectine (Amylopectine 1 ... Amylopectine 6 – les six sites supposés)

ANNEXE III. Les conditions de réactions pour chaque produit

Code	Produit	Conditions des réactions
P0	Amidon natif	
P1	Amidon-C3e	10 g amidon natif + 100 ml acétone + (7,4 g + 40% excès = 10 g) NaOH + 52 ml oxyde de propylène (PO)
P2	Amidon-C3e	20 g amidon natif + 200 ml DMSO (48 h au 22°C) + 116 ml PO (6 h au 22°C) + 2 g NaOH poudre (48 h au 22°C) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P3	Amidon-C6e	1 g amidon natif + 25 ml DMSO (48 h au 22°C) + 4 ml 1,2-époxyhexane (C ₆ H ₁₂ O) (6 h au 22°C) + 0,1 g NaOH poudre (48 h au 22°C) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P4	P2-C6e	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 11,5 ml (C ₆ H ₁₂ O) (6 h au 22°C) + 0,3 g NaOH poudre (48 h au 22°C) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P5	Amidon-C10e	1 g amidon natif + 25 ml DMSO (48 h au 22°C) + 6 ml 1,2-époxydécane (C ₁₀ H ₂₀ O) (6 h au 22°C) + 0,1 g NaOH poudre (48 h au 22°C) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P6	P2-C10e	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 17 ml (C ₁₀ H ₂₀ O) + 0,3 g NaOH poudre (48 h au 22°C) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P7	P2-C10e	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 29 ml (C ₁₀ H ₂₀ O) + 0,3 g NaOH poudre (48 h au 22°C) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P8	Amidon - BS	1 g amidon natif + 10 ml DMSO + 0,6 g NaOH poudre (14 h au 50°C) + 8,5 ml 1,4-butane-sultone (C ₄ H ₈ SO ₃) (14 h au 50°C) + 0,3 g NaOH poudre → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P9	P2-BS	1 g P2 + 17 ml DMSO + 8,5 ml (C ₄ H ₈ SO ₃) + 0,35 g NaOH poudre (12 h au 40°C) + 1,7 ml (C ₄ H ₈ SO ₃) + 0,2 g NaOH poudre → pH = 8 + 0,1 g NaOH poudre → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P10	P2-C10e	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 0,3 g NaOH poudre (48 h au 22°C) + 29 ml (C ₁₀ H ₂₀ O) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation
P11	P2-C16e	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 0,3 g NaOH poudre (48 h au 22°C) + 29 ml 1,2-époxyhexadécane (C ₁₆ H ₃₀ O) → neutralisation HCl jusqu'à pH = 4-6 → évaporation du DMSO → dialyse → lyophilisation

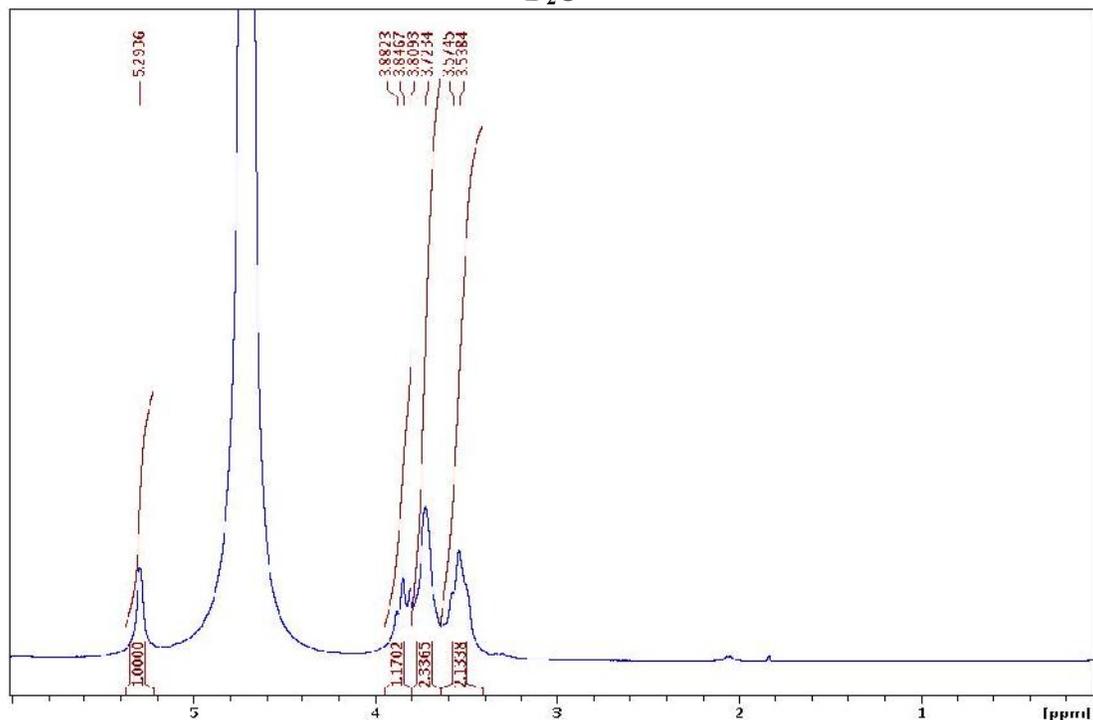
Code	Produit	Conditions des réactions
P12	P2-C16a	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 1,7 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 50 g 2-dodecen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₆ H ₂₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P13	P2-C16a	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 1,7 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 8,5 g 2-dodecen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₆ H ₂₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P14	P2-C16a	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 3,4 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 1,7 g 2-dodecen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₆ H ₂₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P15	P2-C16a	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 3,4 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 1,7 g 2-dodecen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₆ H ₂₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P16	P2-C16a	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 1,7 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 1 g 2-dodecen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₆ H ₂₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P17	P2-C11a	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 3,4 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 1,5 g 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₁ H ₁₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P18	P2-C11a	3 g P2 + 40 ml DMSO (2 h au 22°C) + 1,7 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 0,75 g 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₁ H ₁₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P19	Amidon-C11a	2 g amidon natif + 40 ml DMSO (48 h au 22°C) + 3,4 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 0,8 g 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₁ H ₁₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation
P20	Amidon-C16a	2 g amidon natif + 40 ml DMSO (48 h au 22°C) + 3,4 ml pyridine (2 h au 22°C, atm. d’N ₂ + 0,92 g 2-dodecen-1-ylsuccinic anhydride (C ₁₆ H ₂₆ O ₃) → dialyse → lyophilisation

P2-Cx (e) – Amidon propoxylé qui réagit avec des époxydes avec différentes chaînes (de 6 à 16)

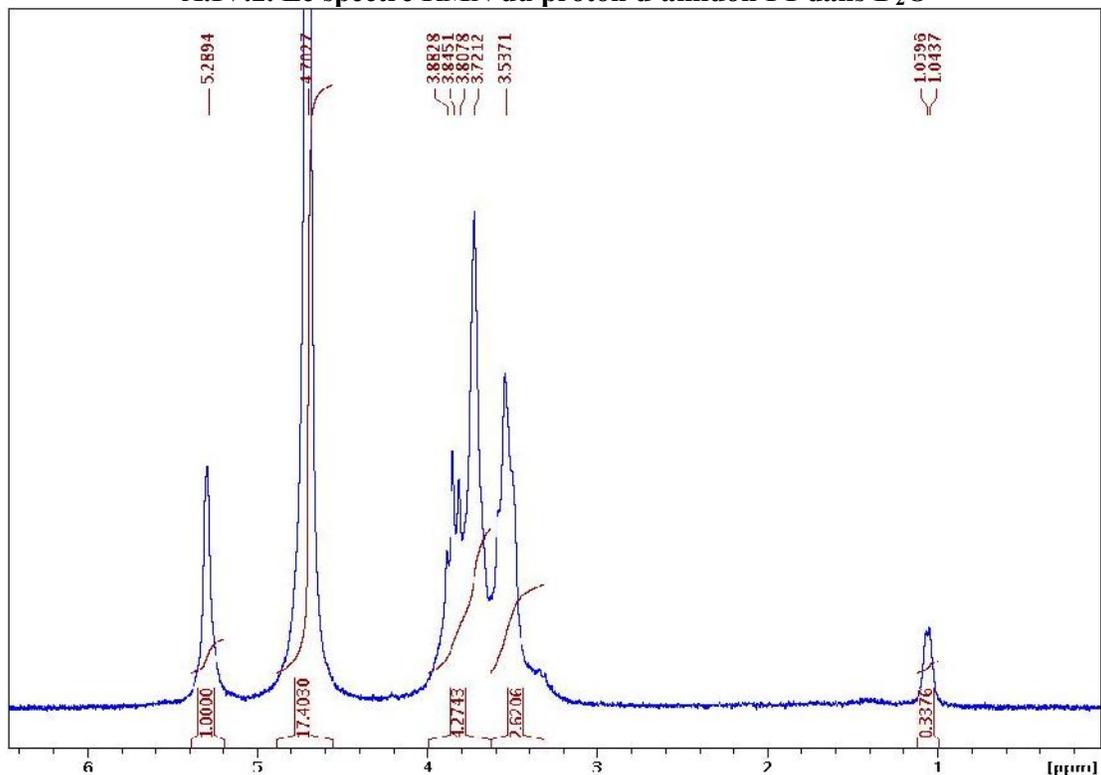
P2-Cx (a) – Amidon propoxylé qui réagit avec des anhydrides avec différentes chaînes (11 et 16)

ANNEXE IV. Les spectres RMN pour chaque produit synthétisé

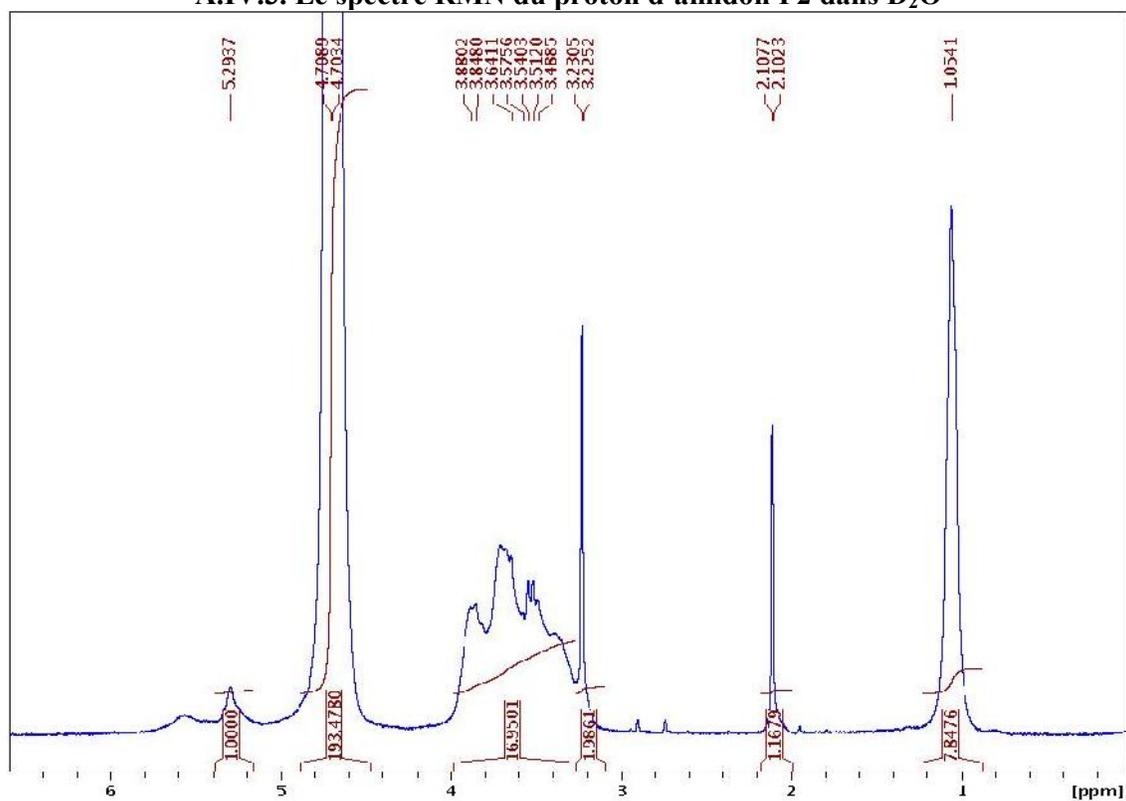
A.IV.1. Le spectre RMN du proton d'amidon natif de pomme de terre gélatinisé dans D₂O



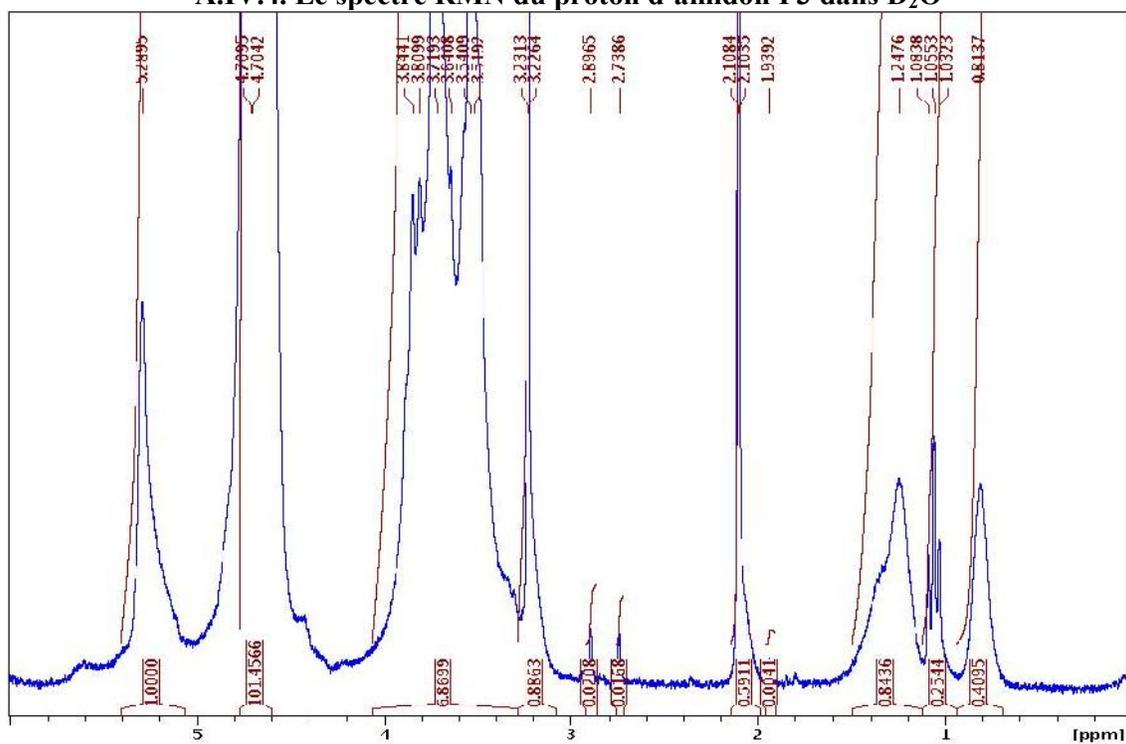
A.IV.2. Le spectre RMN du proton d'amidon P1 dans D₂O



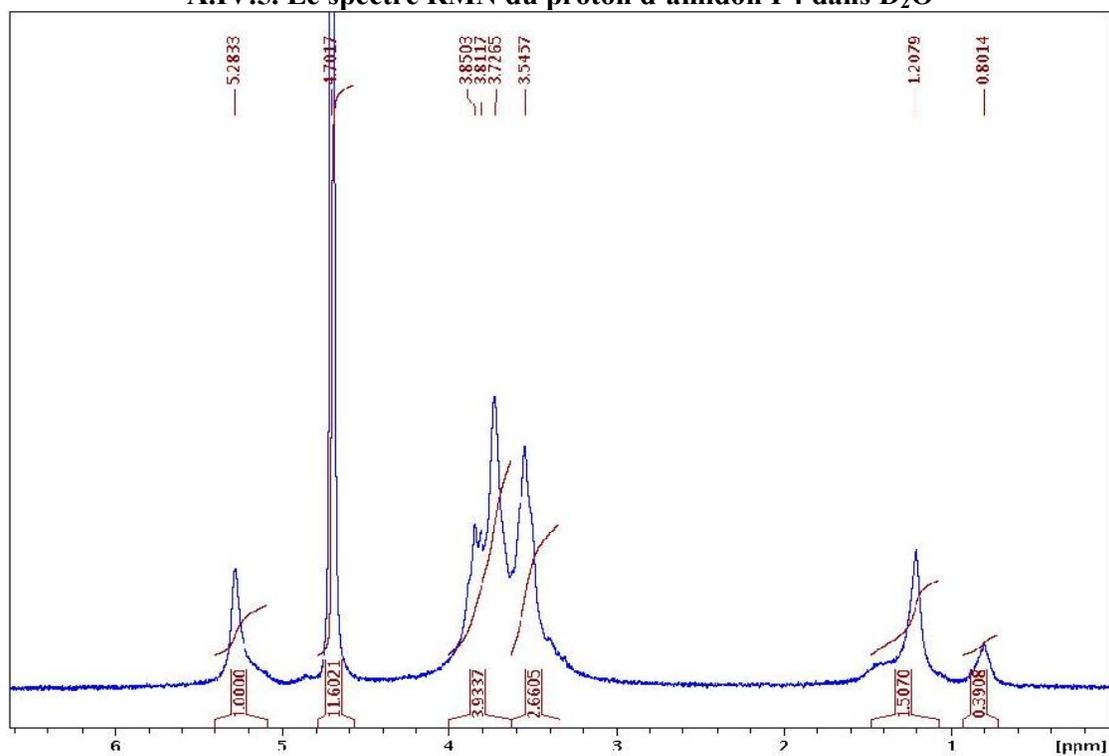
A.IV.3. Le spectre RMN du proton d'amidon P2 dans D₂O



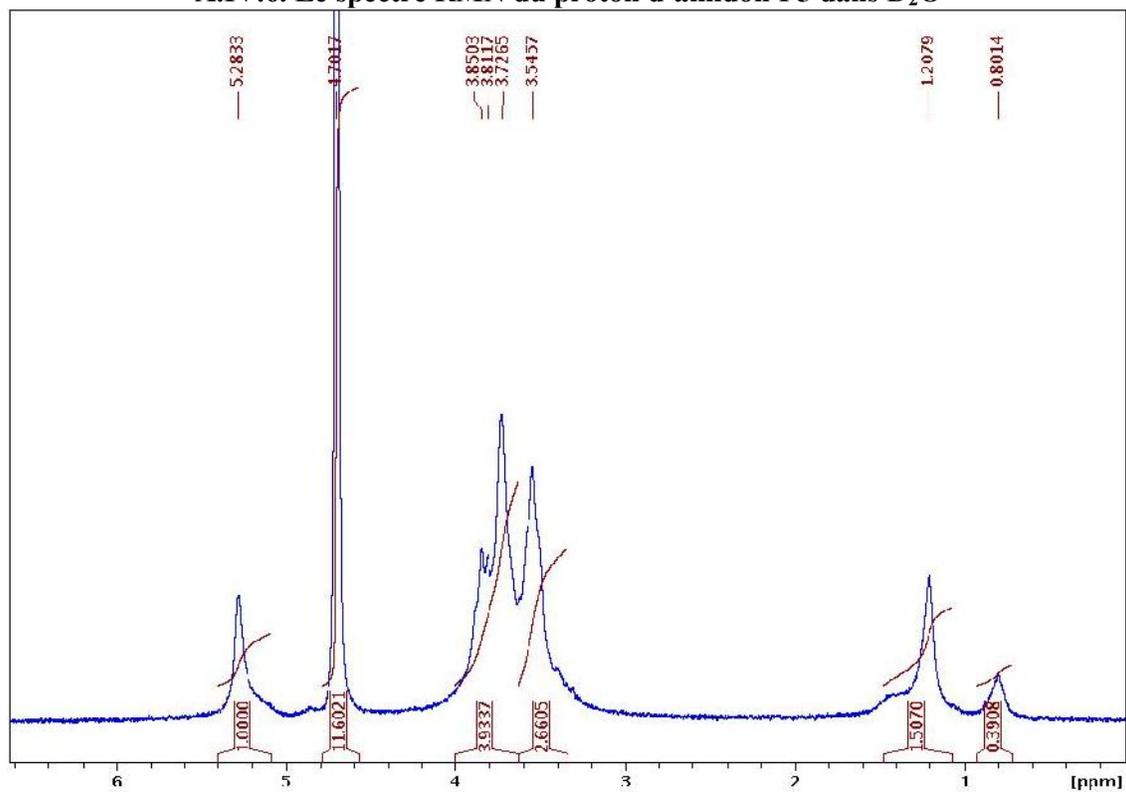
A.IV.4. Le spectre RMN du proton d'amidon P3 dans D₂O



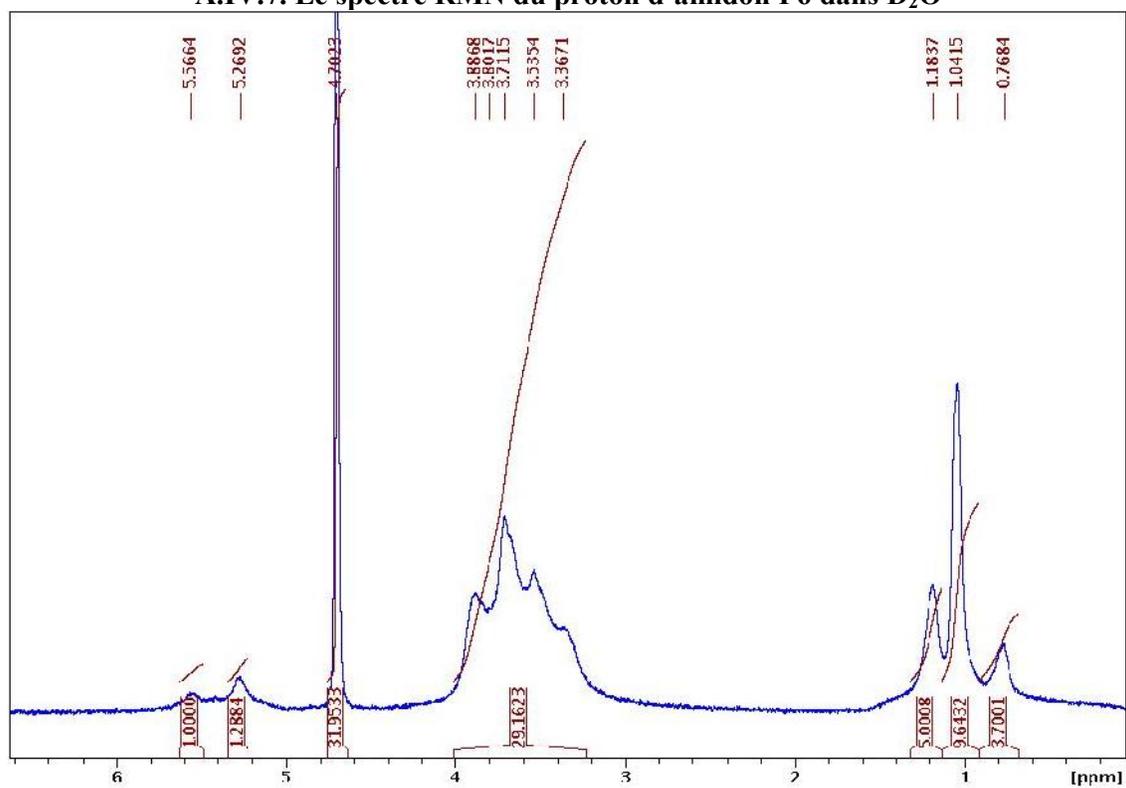
A.IV.5. Le spectre RMN du proton d'amidon P4 dans D₂O



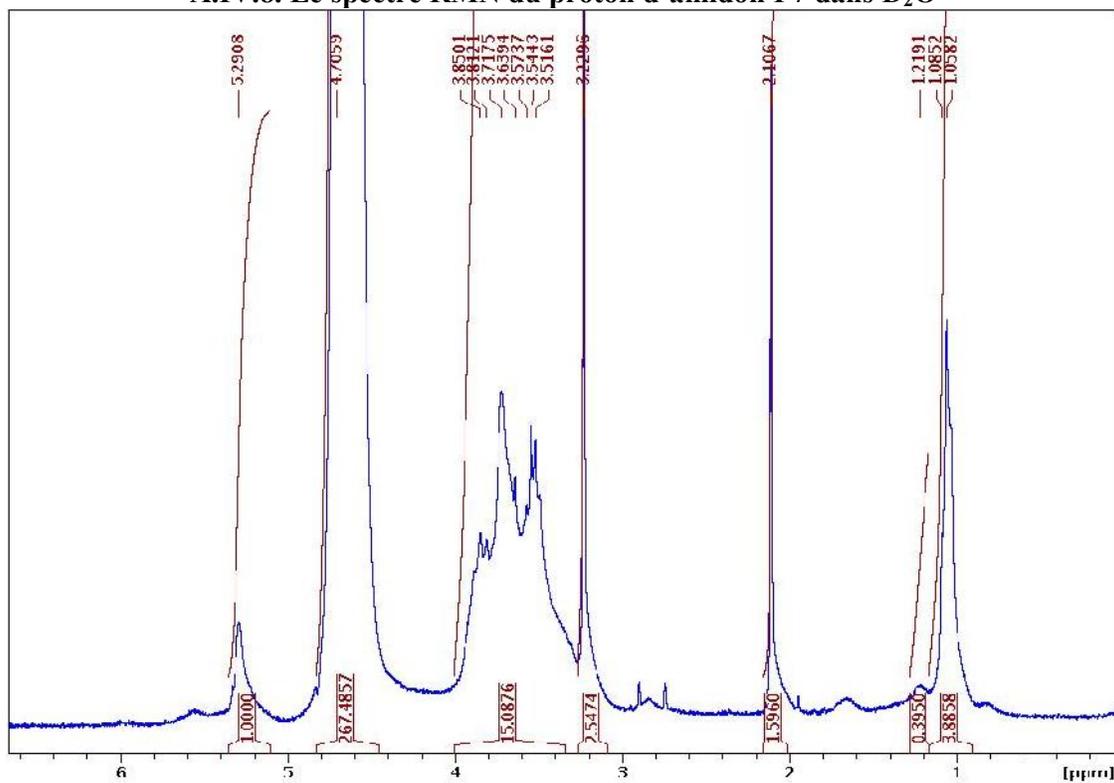
A.IV.6. Le spectre RMN du proton d'amidon P5 dans D₂O



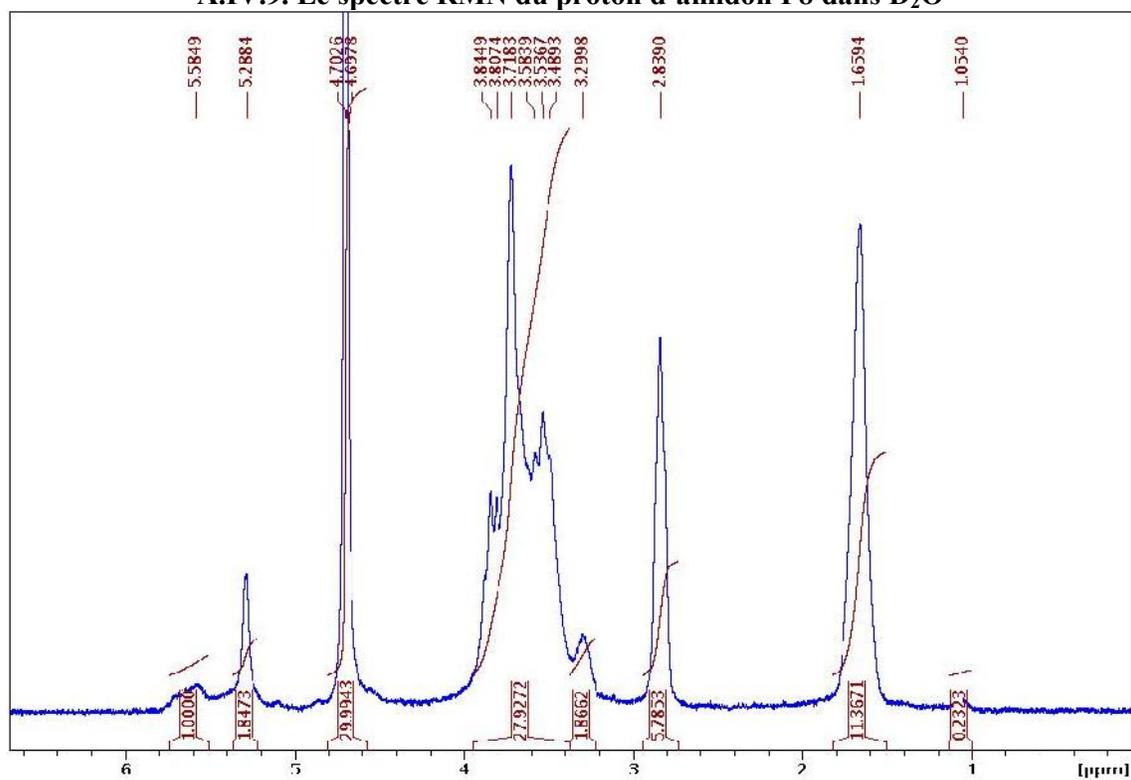
A.IV.7. Le spectre RMN du proton d'amidon P6 dans D₂O



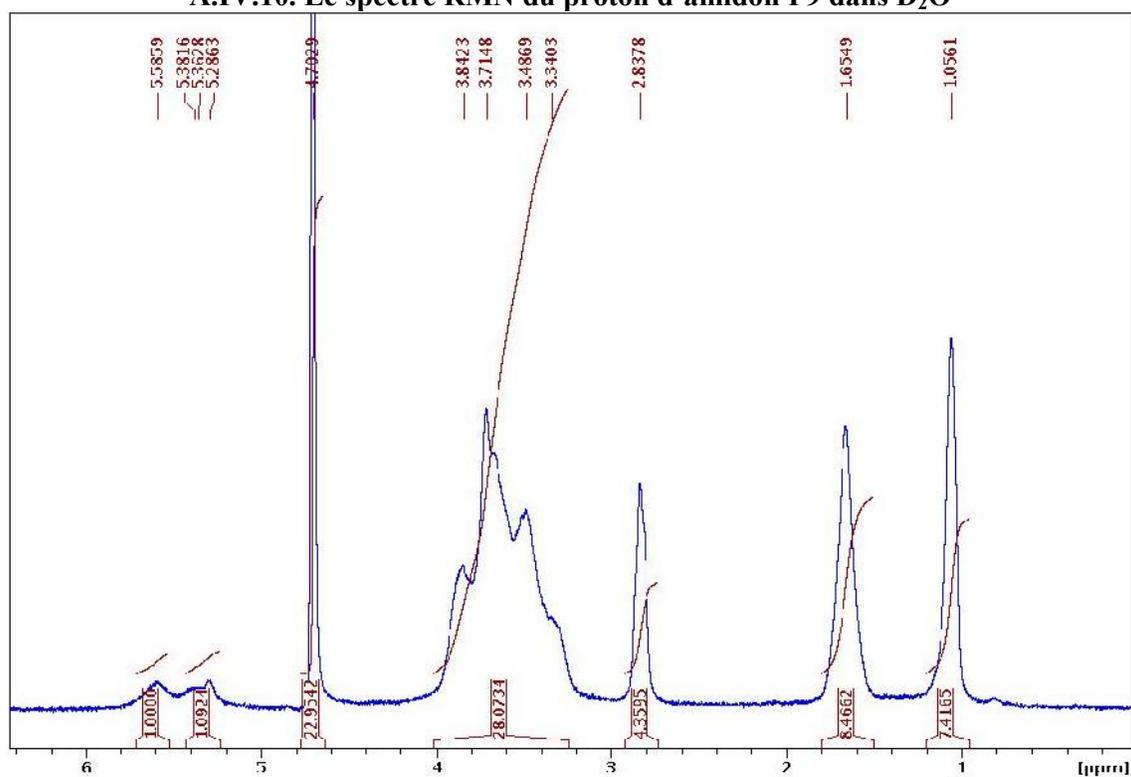
A.IV.8. Le spectre RMN du proton d'amidon P7 dans D₂O



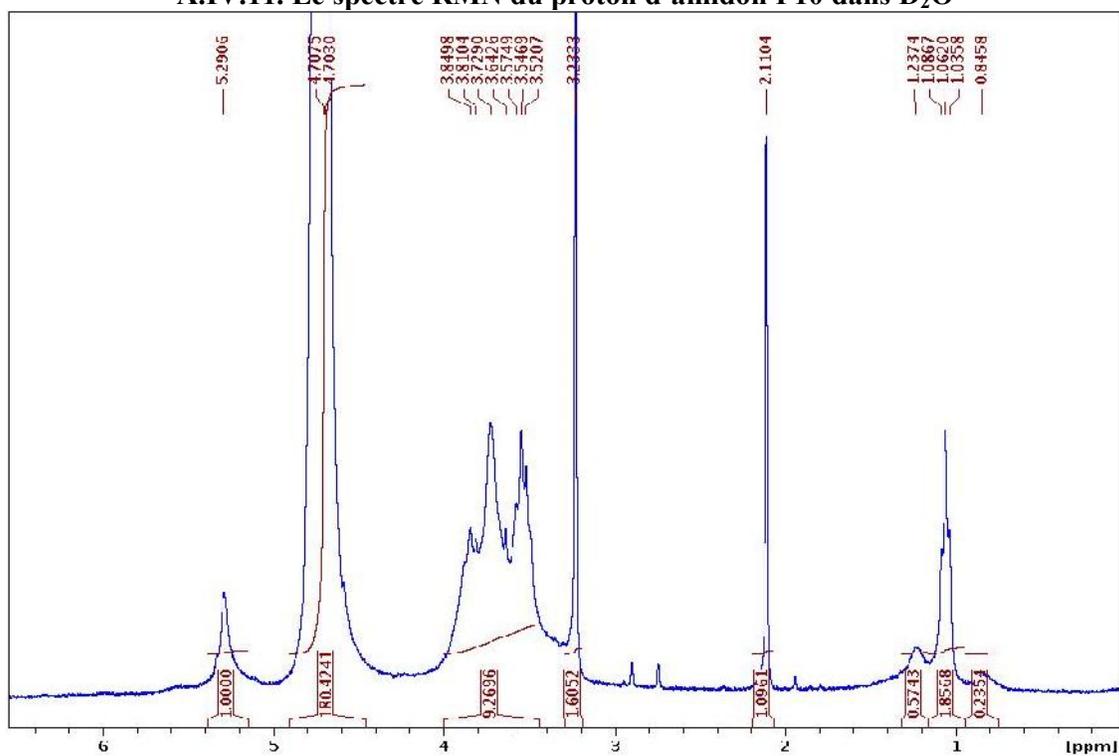
A.IV.9. Le spectre RMN du proton d'amidon P8 dans D₂O



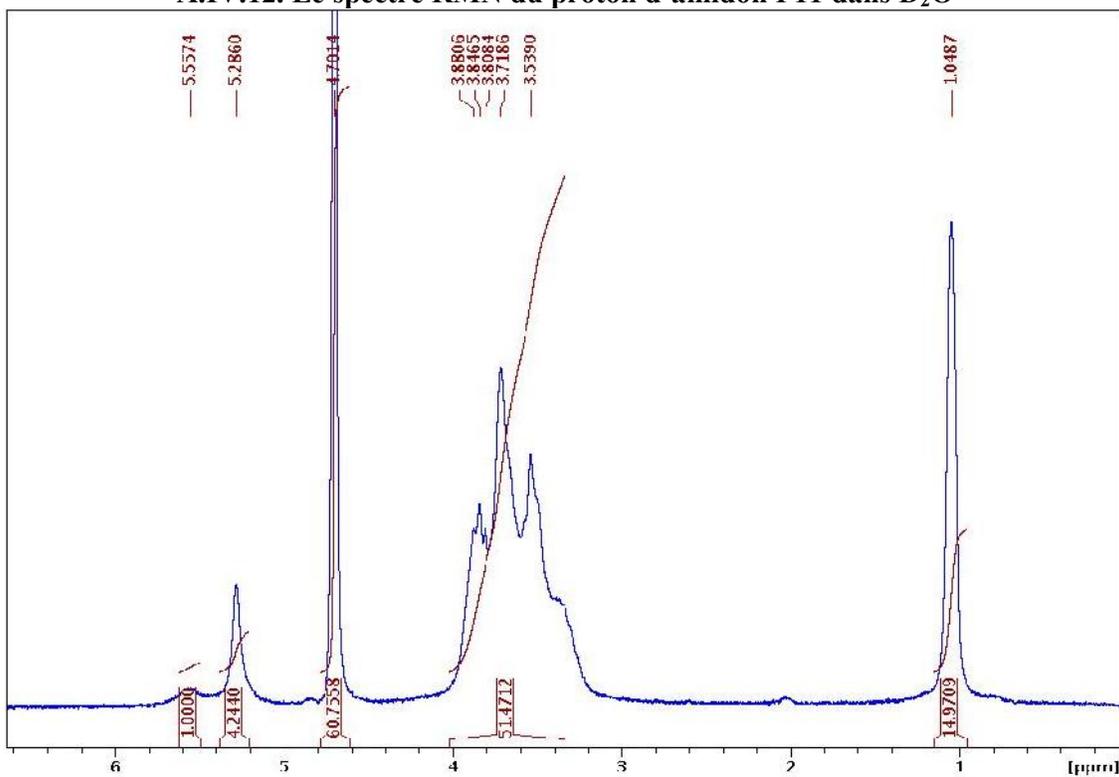
A.IV.10. Le spectre RMN du proton d'amidon P9 dans D₂O



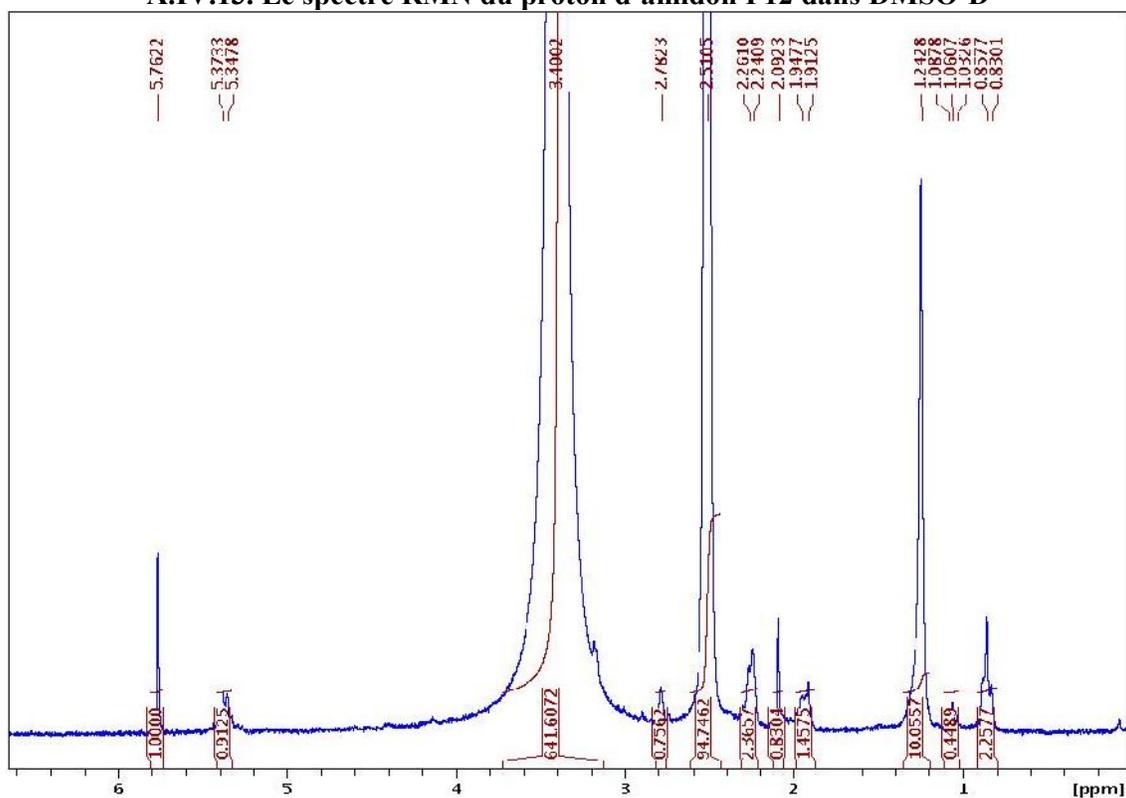
A.IV.11. Le spectre RMN du proton d'amidon P10 dans D₂O



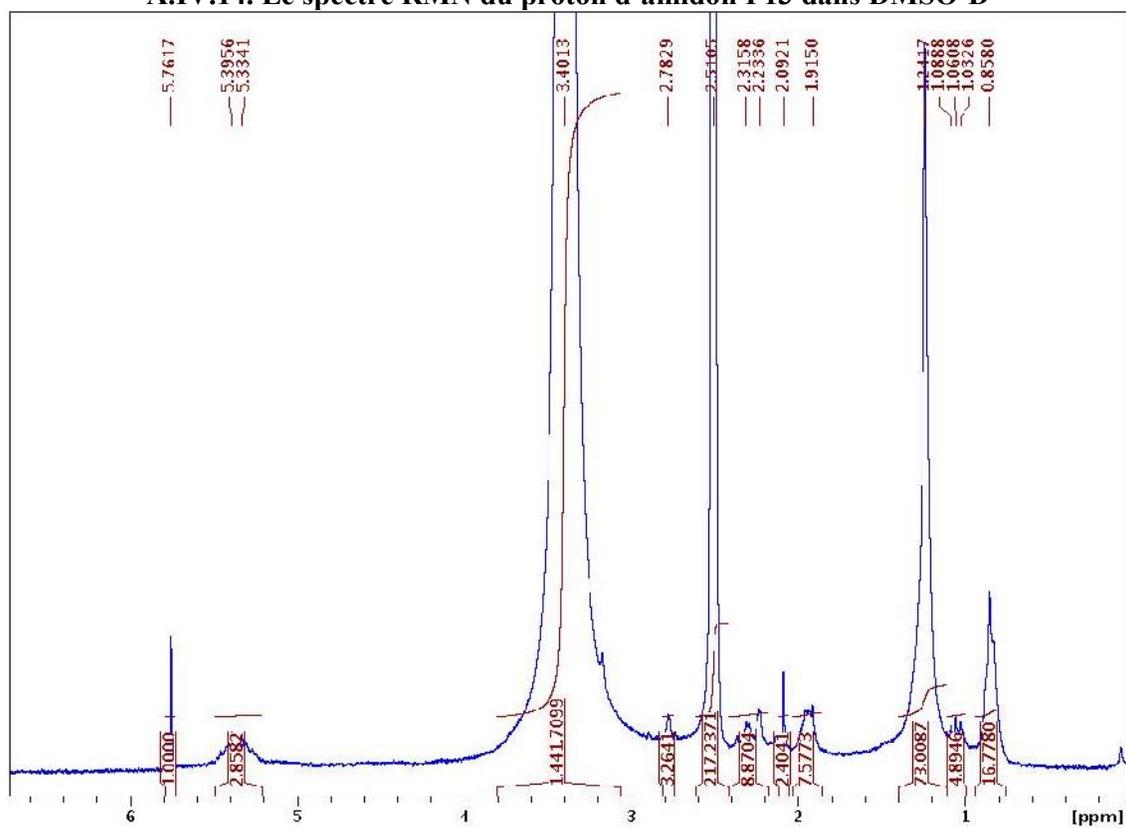
A.IV.12. Le spectre RMN du proton d'amidon P11 dans D₂O



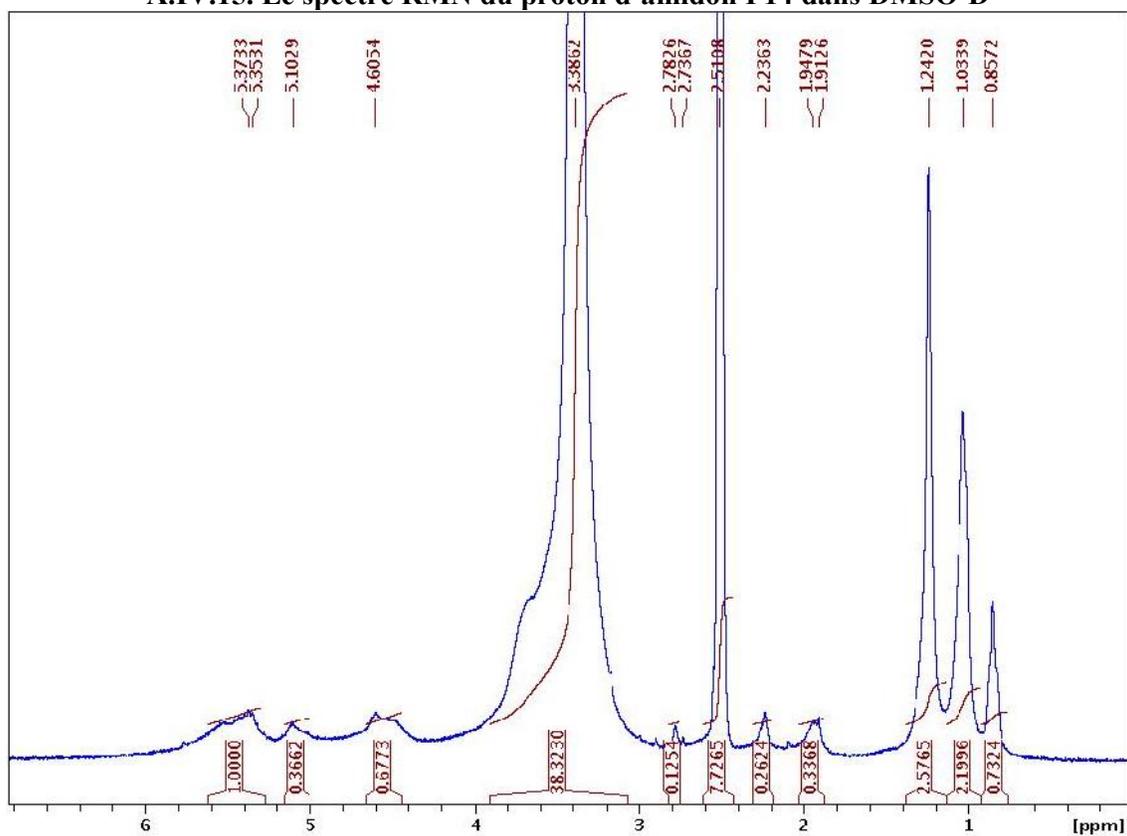
A.IV.13. Le spectre RMN du proton d'amidon P12 dans DMSO-D



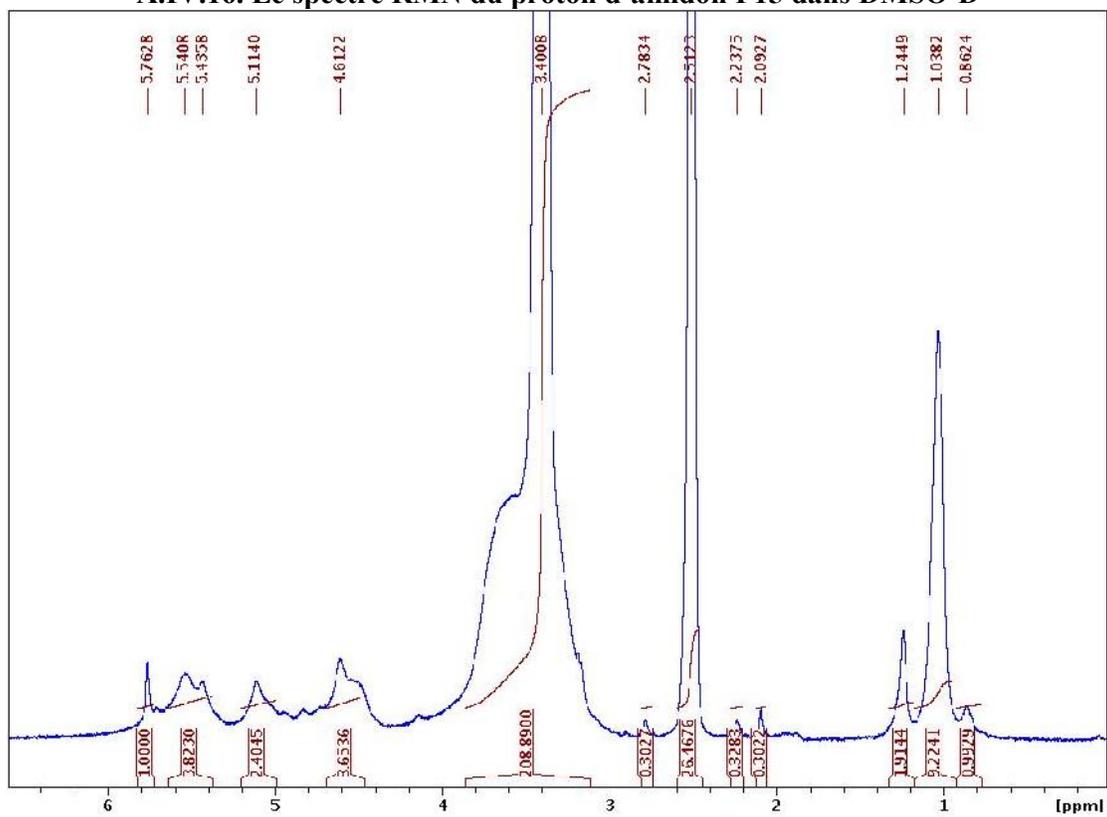
A.IV.14. Le spectre RMN du proton d'amidon P13 dans DMSO-D



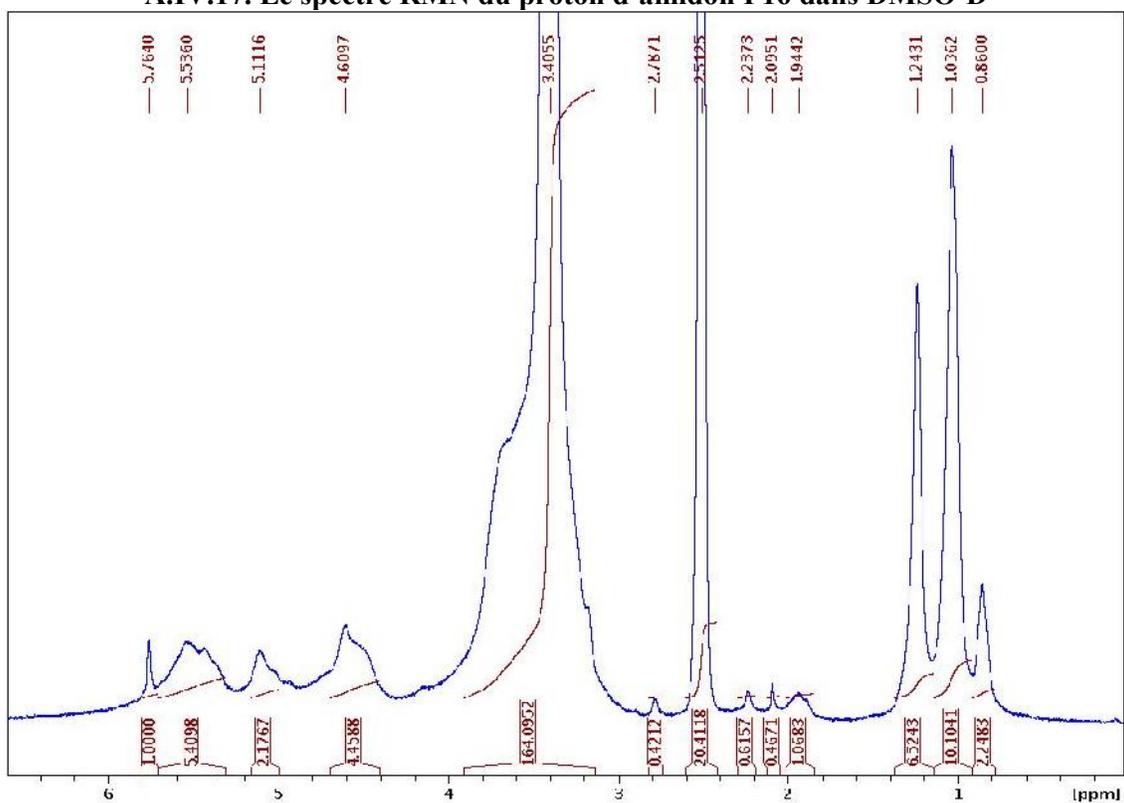
A.IV.15. Le spectre RMN du proton d'amidon P14 dans DMSO-D



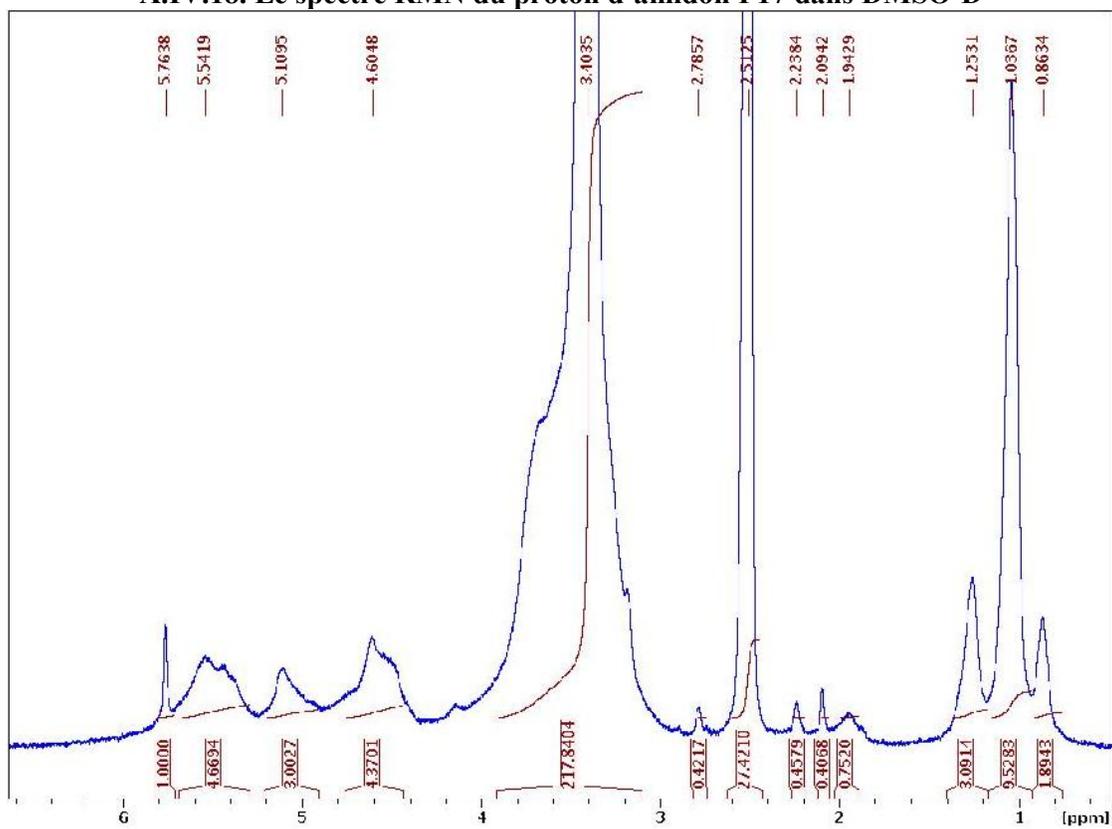
A.IV.16. Le spectre RMN du proton d'amidon P15 dans DMSO-D



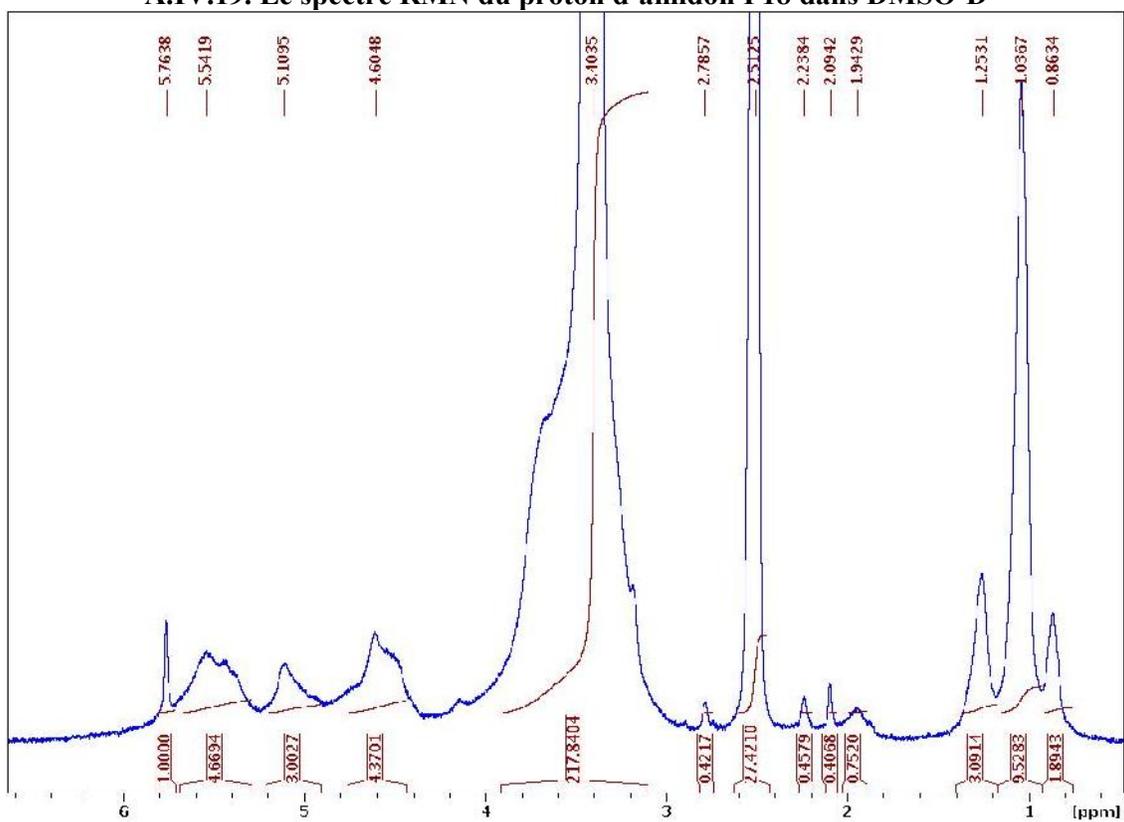
A.IV.17. Le spectre RMN du proton d'amidon P16 dans DMSO-D



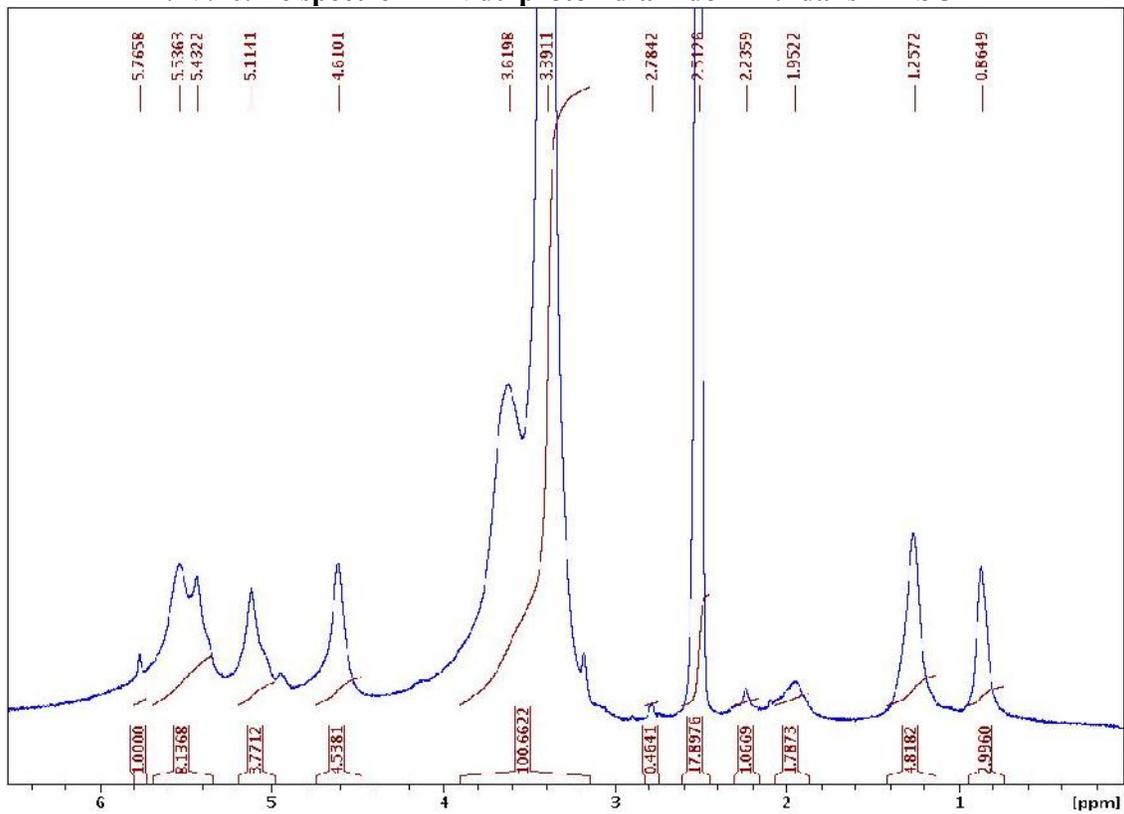
A.IV.18. Le spectre RMN du proton d'amidon P17 dans DMSO-D



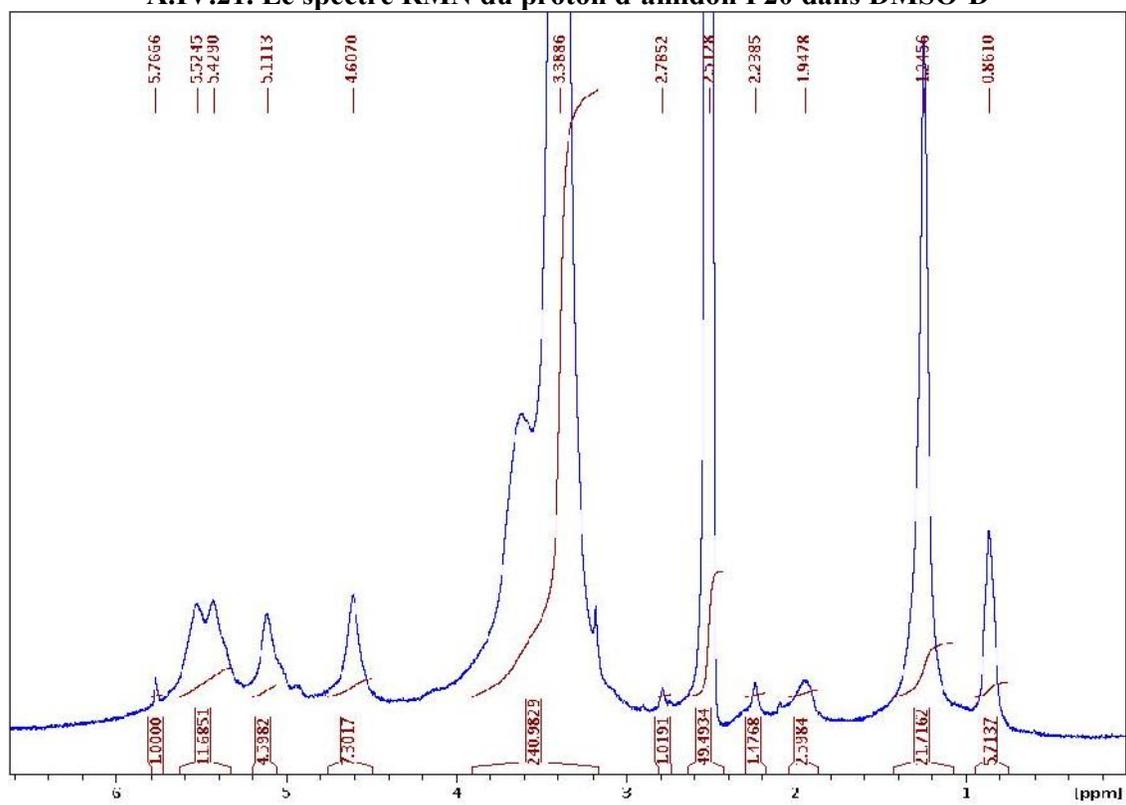
A.IV.19. Le spectre RMN du proton d'amidon P18 dans DMSO-D



A.IV.20. Le spectre RMN du proton d'amidon P19 dans DMSO-D



A.IV.21. Le spectre RMN du proton d'amidon P20 dans DMSO-D



ANNEXE V. Le Curriculum Vitae

Ana-Maria DOSPINESCU-ROSU

Cartier Gradina cu Magnolii
4, rue Lunca Bistritei, Vila 2, Ap.20
600351 Bacau
0040-744406203
ana.rosu@ub.ro
05/11/1982



Curriculum vitae

FORMATIONS

- 2007/2011** ULCO, Dunkerque, UCEIV. Candidate à la préparation d'un Doctorat
Titre : *Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant*
Financement bourse du LSOE (2007-2010) et bourse d'excellence Programme Eiffel Doctorat (2010-2011, Domaine Sciences) délivrée par le Ministère des Affaires Etrangères et Européennes, France
Thèse en co-tutelle: ULCO, Université Vasile Alecsandri de Bacau, Roumanie
ULCO : Directeur de thèse G. Surpateanu (2007-2010) puis C. Rafin (2010-2011) en co-encadrement avec E. Veignie / Bacau: Directeur de thèse G. Brabie
Situation actuelle: assistante titulaire à l'Université de Bacau (mi-temps d'enseignement assuré à Bacau, mi-temps recherche à l'ULCO dans le cadre de mon doctorat). Soutenance prévue novembre 2011
- 2006/2007** **Diplôme de master** – Note finale : 9,80, nombre d'étudiants dans la promotion : 18 - La Chimie et l'Ingénierie de la Fabrication et Exploitation des Produits Naturels (Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, le Département des Études Postuniversitaires et Formation Continue, Roumanie,)
- 2001/2006** **Diplôme d'ingénieur** – Note finale : 10/10, nombre d'étudiants dans la promotion : 80 - La technologie et le contrôle de la qualité des produits alimentaires (Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, le Département des Études universitaires, Roumanie)
- 2003/2004** **Diplôme de licence** - Université du Littoral Cote d'Opale, Dunkerque, France (Stage ERAMSUS)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2006/présent **Assistant titulaire** – Déploiement des activités didactiques avec caractère applicative (travaux pratiques) (Activité didactique dans l'enseignement supérieur)
Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, 157 Calea Marasesti, 600115, Bacau (Roumanie)

LANGUES

Français DELF niveau B2 obtenu (75 sur 100) après avoir suivi un cours de Français aux étrangers (140 heures en 2010-2011), Dunkerque, France.

Anglais Comprendre-Ecouter B2, Lire B2
Parler-prendre part à une conversation B1, S'exprimer oralement en continu A2
Ecrire-B1

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Logiciel PowerPoint Initiation et perfectionnement (1 journée en 2008 et en 2009, ULCO)
Formation Academic Search Premier (BULCO)
Informatique: Word, Excel, Power Point, R, Access, Internet, Arc View (SIG)

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles dans des revues internationales à nationales avec comité de lecture répertoriées dans les bases de données internationales

Rosu A.M., Veignie E., Surpateanu G., Brabie G., Miron D.N., Rafin, C. (2011). *Synthesis and evaluation of hydroxypropylated potato starch as polymeric support for benzo[a]pyrene degradation by Fenton reaction*. Carbohydrate Polymers 83, 1486-1491.

A.M. Rosu, C. Rafin, G. Surpateanu, G. Brabie, D.N. Miron, E. Veignie - *Synthesis of alkylated potato starch derivatives and their environmental application in persistent organic pollutants degradation*. Carbohydrate Polymers (soumis)

Communications avec actes dans un congrès international ou national

C. Rafin, **A.M. Rosu**, E. Veignie - *Exploration of telluric fungi biodiversity for developing soft remediation technologies of hydrocarbons polluted soils* - International Conference of Applied

Sciences – Chemistry and Engineering Chemistry CISA, 8-11 Avril 2010, Bacau - Slanic Moldova, Roumanie.

C. Rafin, **A.M. Rosu**, A. Fayeulle, S. Fourmentin, D. Landy, E. Veignie - *Utilisation des polysaccharides naturels ou modifiés pour la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les champignons telluriques saprotrophes* - 13^{ème} Journées du Club Français des Cyclodextrines, 9-10 Décembre 2010, Dunkerque, France.

A.M. Rosu, C. Rafin, G. Surpateanu, G. Brabie, D.N. Miron, E. Veignie - *Synthesis of alkylated potato starch derivatives and their environmental application in persistent organic pollutants degradation* - EPNOE 2011 (2nd International Polysaccharide Conference): Polysaccharides as source of advanced and sustainable products, 29 Août-2 Septembre 2011, Wageningen, The Netherlands.

Autre valorisation

Candidat au Prix Eco-innovation 2011, dans le cadre du Salon Environord, 7-9 juin 2011 à Lille.
Travail de thèse recensé dans le catalogue de l'innovation.

Accepted Manuscript

Title: Synthesis and evaluation of hydroxypropylated potato starch as polymeric support for benzo[a]pyrene degradation by Fenton reaction

Authors: Ana-Maria Rosu, Etienne Veignie, Gheorghe Surpateanu, Gheorghe Brabie, Doru Neculai Miron, Catherine Rafin

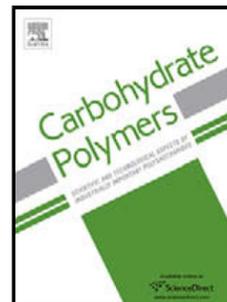
PII: S0144-8617(10)00792-7
DOI: doi:10.1016/j.carbpol.2010.09.059
Reference: CARP 5171

To appear in:

Received date: 15-6-2010
Revised date: 27-9-2010
Accepted date: 28-9-2010

Please cite this article as: Rosu, A.-M., Veignie, E., Surpateanu, G., Brabie, G., Miron, D. N., & Rafin, C., Synthesis and evaluation of hydroxypropylated potato starch as polymeric support for benzo[a]pyrene degradation by Fenton reaction, *Carbohydrate Polymers* (2010), doi:10.1016/j.carbpol.2010.09.059

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



1 **Synthesis and evaluation of hydroxypropylated potato starch as polymeric support for**
2 **benzo[a]pyrene degradation by Fenton reaction**

3

4 Ana-Maria Rosu^{a,b,c}, Etienne Veignie^{a,b}, Gheorghe Surpateanu^{a,b,c}, Gheorghe Brabie^d, Doru
5 Neculai Miron^c, Catherine Rafin^{a,b*}

6

7 ^a Univ Lille Nord de France, Lille, 59000, France

8 ^b ULCO, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, Dunkerque, 59140,
9 France

10 ^c University ‘Vasile Alecsandri’ of Bacau, Faculty of Engineering, Department of Food
11 Products Engineering, Bacau, 600115, Romania

12 ^d University ‘Vasile Alecsandri’ of Bacau, CCIMT Centre of Research, Faculty of
13 Engineering, Bacau, 600115, Romania

14 * Corresponding author: phone +33 (0)3 28 65 82 78, e-mail: rafin@univ-littoral.fr

15

16 **Abstract**

17 In order to perform an efficient Fenton reaction of benzo[a]pyrene (BaP) in presence
18 of starch as reaction matrix, a computer modelling study conducted on amylopectin as
19 component of potato starch allows to identify three more stable sites, among six ones,
20 available for BaP and iron complexation. For the purpose of enabling the formation of such a
21 stable complex, starch was irreversibly modified by hydroxypropylation for favoring the
22 accessibility of BaP to available complexation sites. The results show that such an
23 irreversible modification significantly consequently increased starch solubilization in cold
24 water. Hydroxypropyl starch derivative obtained in the optimized synthesis conditions (molar
25 substitution of 0.73) increased significantly the BaP solubility and consequently influenced

26 its degradation (38%) by Fenton oxidation. We might hypothesize that starch
27 depolymerisation occurring through a radical chain mechanism during the Fenton reaction
28 allows the formation of carbon centred radicals, permitting therefore an oxidation attack of
29 BaP.

30

31 *Keywords:* Benzo[a]pyrene, Hydroxypropyl starch, Fenton reaction

32

33 **1. Introduction**

34

35 Benzo[a]pyrene (BaP), a fused pentacyclic aromatic hydrocarbon, has a very low
36 aqueous solubility (3.8 $\mu\text{g/L}$) and a high octanol/water partitioning coefficient (6.04), which
37 suggests its preference for non-aqueous phases (Rivas, 2006). It has been classified by the US
38 Environmental Protection Agency as a priority pollutant because of its carcinogenicity,
39 teratogenicity and acute toxicity. Such polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are quite
40 recalcitrant to biodegradation in soil because of their aromatic and condensed structure
41 leading to low solubility and then high chemical stability. Among the processes whereby
42 these compounds are removed from the environment, advanced oxidation processes are
43 widely investigated and, in particular, the Fenton reaction which is currently one of the most
44 powerful oxidizing reactions available. In 1894, Fenton discovered that several metals have
45 special oxygen-transfer properties that improve the use of hydrogen peroxide (Fenton, 1894).
46 Some metals have a strong catalytic power to generate highly reactive hydroxyl radicals. The
47 Fenton reaction is used to treat a large variety of pollutants (e.g. phenols, formaldehyde,
48 benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes commonly named BTEX, pesticides and PAH) in
49 various ecosystems (water, soil) (Kulik et al. 2006; Murray & Parsons, 2004).

50 In previous work (Veignie et al. 2009), we demonstrated the interest of using
51 cyclodextrins which are a family of cyclic oligosaccharides that are composed of α -1,4-linked
52 glucopyranose subunits (Bender & Komiyama, 1978; Szejtli 1988, 1998). For most non-polar
53 contaminants, the formation of cyclodextrin-contaminant complexes in the hydrophobic
54 interior of the cyclodextrin molecule increases the apparent solubility of many low-solubility
55 organic contaminants. In our study, hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) significantly
56 increased solubilisation of BaP, a prerequisite for being oxidized by the hydroxyl radicals
57 generated during the Fenton reaction (Flotron et al. 2005). However, even if HPBCD seems
58 to be promising for developing PAH soil polluted treatment by Fenton oxidation and also
59 integrated treatment combining chemical and biological oxidation (Rafin et al. 2009), its
60 rather high cost could limit its use for large scales applications.

61 In order to explore the potential of carbohydrate substitutions by hydroxypropyl
62 groups for enhancing PAH solubilization, we chose to modify by hydroxypropylation more
63 economical carbohydrates such as starch. Starch is a natural, renewable, and biodegradable
64 polymer produced by many plants as a source of stored energy. Starches are composed of
65 unbranched and slightly branched amylose molecules (BeMiller, 1997) and highly branched
66 amylopectin (Manners, 1989). Such chemical modifications of starches with monofunctional
67 reagents, such as alkylene oxides, have been used to introduce new properties of starch and
68 extending the applications of starch for instance in food, paper and textile fields (Kshirsagar
69 & Singhal, 2008). In this work, the chemical modifications of starch was undertaken to
70 investigate the potential use of renewable resources for soil rehabilitation applications.

71 The scope of the research described here includes the following aims: firstly, a
72 computer modelling study on fragment of starch and both components (amylose and
73 amylopectin) to evaluate the potential sites of inclusion of BaP and iron (Fe); secondly, to
74 investigate optimal conditions for synthesize hydroxypropylated potato starch monitored by

75 nuclear magnetic resonance (NMR), and finally, the efficiency of obtained
76 hydroxypropylated starch ethers was studied on BaP solubilization and BaP degradation by
77 Fenton reaction.

78

79 **2. Materials and methods**

80

81 *2.1. Chemicals*

82

83 BaP at 96 % HPLC purity was purchased from Fluka (St Quentin Fallavier, France).
84 Propylene oxide (PO) at 99 % purity, sodium hydroxide (NaOH) for analysis micropearls,
85 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{SO}_4$ at 99.5 % purity and standard reagent hydrogen peroxide (H_2O_2) 30 % were
86 purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Potato starch and dimethyl
87 sulphoxide (DMSO) at 99.5 % purity were provided from Panreac Quimica SA (Barcelona,
88 Espana). Methanol (MeOH), dichloromethane (DCM), acetone and other chemicals, except
89 when specified otherwise, were obtained in the highest purity available from Fisher Scientific
90 (Illkirch, France). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) was kindly donated from
91 Roquette Frères (Lestrem, France). Distilled deionized water was used throughout this work.

92

93 *2.2. Molecular modeling*

94

95 Starch fragment was acquired from data provided by the Cambridge Structural Data
96 Base Center. The structural manipulations on amylose and amylopectin were made using the
97 CAChe library on PC-Computer. The study of complex formed was performed by applying a
98 general procedure of multiconformational search with the MM3 force field. The potential
99 energy variation (ΔE) depending on the variation of the dihedral angles (defined between

100 BaP, Fe and starch fragment) is recorded with rotational increments. Thus, using a dummy
101 atom placed in different positions, the docking of the inclusions of BaP has been performed.
102 Results obtained with amylopectin (sites available for BaP complexation and computed
103 energies of complexes) are shown respectively in Figure 1 and Table 1.

104

105 *2.3. Synthesis of hydroxypropylated starch*

106

107 The reaction was carried out in a round-bottom flask in continued high agitation under
108 either 21 °C or 50 °C. Starch, propylene oxide and sodium hydroxide were mixed in an
109 aprotic polar solvent quantity having like effect, firstly, the solubilization of starch and,
110 secondly, the reaction between starch and propylene oxide. During the reaction, the following
111 parameters varied: the solvent (DMSO or acetone), the propylene oxide concentration used
112 (26, 32 and 64 % based on starch) and the sodium hydroxide concentration (0.66 and 7.4 %
113 based on starch). On completion of reaction, hydroxypropylated starch was neutralized with
114 hydrochloric acid and solvent was removed by evaporation. Modified starch was dialyzed
115 during 4 days with a cellulose membrane from Medicell International (MWCO of 12-14 000
116 Daltons). Process parameters like temperature, solvent, starch/propylene oxide ratio, and
117 NaOH concentration were studied with respect to the Molar Substitution (MS). MS
118 represents the average number of substituents per mole of hydroxyl groups in an
119 anhydroglucose unit of starch. The MS of hydroxypropyled starch was determinate according
120 to the method of De Graaf et al. (1995). Analysis of the modified starch was carried out using
121 a 250 MHz Spectrospin NMR spectrometer (Bruker, France). ¹H-NMR spectrum of
122 gelatinised starch was presented in Figure 2, as reference, and the NMR spectra of
123 hydroxypropylated starch ethers obtained under various synthesis conditions were related in
124 Figure 3.

125

126 *2.4. Modified starch solubility*

127

128 Chemical modification of starch has like effect the solubilization of starch in
129 inorganic solvent. In order to assess this parameter, a saturated solution of modified starch
130 (either I or II) in distilled water was done at ambient temperature (21-22 °C). After 24
131 released hours, 10 ml of the solubilized starch was taken, lyophilized and weighted. The same
132 procedure was performed with native starch as control. The solubility was evaluated in three
133 replicates for each native or modified starch and the solubility mean was expressed in Table
134 2.

135

136 *2.5. BaP solubilization in presence of carbohydrate polymers*

137

138 BaP was initially dissolved in DCM (0.26 mg/L) and then deposited into a haemolysis
139 tube by addition of 375 µL of BaP solution and allowing DCM solvent to evaporate. 3 mL of
140 a solution of HPBCD as reference or one tested potato starch (native or modified one, I or II)
141 was added into the haemolysis tube. All concentrations of carbohydrate polymers were tested
142 at 70 mM equivalent glucose. Tubes were incubated in the dark for 4 days. The sample
143 concentration used for this experiment was selected for two reasons. The concentration of
144 carbohydrates polymers used for BaP solubilization should be low enough to avoid any
145 precipitation of the forms complexes. Moreover, we used carbohydrate polymer
146 concentration as high as possible in order to obtain a significant solubility enhancement after
147 4 days of incubation. Three separate experiments were conducted under same conditions and
148 the mean and standard errors were calculated. BaP fluorescence in carbohydrate polymers
149 solutions was analyzed on a Perkin Elmer LS B50 spectrofluorimeter (excitation 295 nm,

150 emission 406 nm, time integration 10 s according to Veignie et al. 2009). Results were
151 expressed as fluorescence intensity mean value \pm standard error for triplicates (Table 2).

152

153 2.6. Fenton degradation of BaP

154

155 All Fenton experiments were conducted in pure distilled deionized water at pH 5.5.
156 500 μ L of BaP-MeOH stock solution (2 g/L) were introduced into 22 mL penicillin flasks so
157 as to give a final BaP quantity of 1 mg per flask. After solvent evaporation, carbohydrate
158 polymers (either HPBCD, native or modified starch I or II) were added as solid and
159 solubilized into 4.9 mL water (working concentration 70 mM equivalent glucose). Similar
160 reaction was carried out with water control. In order to reach the equilibration of inclusion
161 complex, Fenton reactor penicillin flasks were agitated on an orbital shaker (200 rpm) for 12
162 h at room temperature (22 ± 2 °C). The Fenton reaction was performed by adding 50 μ L of
163 0.2 M FeSO₄ solution and 50 μ L of 1 M H₂O₂ in order to obtain a final concentration of $2 \times$
164 10^{-3} M FeSO₄ and 10^{-2} M H₂O₂. Adding Fenton's reagent (FeSO₄, H₂O₂) was achieved
165 through vigorous orbital shaking. The Fenton reaction experiments were conducted overnight
166 in the dark at room temperature. At the end of incubation, penicillin flasks were lyophilized
167 for three days.

168 Lyophilized flasks were introduced into a Soxhlet apparatus and extracted for 16 h
169 with DCM. Organic fractions were concentrated in 20 mL DCM/MeOH (50/50, v/v). BaP
170 concentrations were determined using HPLC Waters 600 control system fitted with a Waters
171 XTerra®, RP18, 5 μ m, and a Waters 996 Photo Diode Array Detector. The separation was
172 achieved with a 10 min isocratic condition of acetonitrile/water (90/10, v/v) at a solvent flow
173 rate of 1 mL/min. Concentrations were determined by UV absorbance at 254 nm. The
174 percentage of BaP degradation was given by the formula: $[(m_{Ec} - m_T)/m_{Ec}] \times 100$, in which

175 m_{EC} was the quantity of BaP recovered in extraction controls and m_T was the quantity of BaP
176 obtained in each treatment. In extraction controls, 98 % of initial BaP was recovered. Results
177 were expressed as mean value \pm standard error for three replicates (Table 2). Statistical
178 analysis was performed by a two-sample *t*-test comparing treatments with water control.

179

180 **3. Results and discussion**

181

182 *3.1. Molecular Modeling*

183

184 In the modeling study on fragment of starch and amylose, our docking strategy did not
185 allow us to find potential inclusion complex for BaP (data not showed). Concerning the
186 importance of Van der Waals interactions, the filling of the amylopectin cavity should be a
187 crucial factor, ordering the stability of the amylopectin-guest complexes.

188 Figure 1 showing the amylopectin structure allows us to identify six sites available for
189 BaP complexation. By our docking strategy, we found the most stable conformer for each
190 inclusion site. In Table 1, ΔE values represent the nature of the computed complexation
191 energies calculated by MM3 method. Among the six sites available in amylopectin, only
192 three are favorable based on potential energy of the inclusion complex. For the complexation
193 of BaP with amylopectin, the highest values of ΔE (-43.3, -40.4 and -137.5 kcal/mol) have
194 been calculated respectively for sites 1, 2 and 3. The last three sites (4, 5 and 6) with positive
195 values of ΔE are therefore unfavorable inclusion sites for BaP. Concerning the complexation
196 of Fe with studied amylopectin, the highest values of ΔE (-2337.2, -2258.7 and -2297.6
197 kcal/mol) have been calculated for sites 1, 2 and 3 respectively, whereas the lowest values of
198 ΔE (2298.4, 2307.7 and 2267.4 kcal/mol) have been obtained for sites 4, 5 and 6 respectively.

199 All these data presented in Table 1 underlined interesting results for our research
200 strategy. Indeed, in order to perform Fenton reaction, both composites (BaP and Fe) need to
201 be in close proximity, conditions which could be realized in sites 1, 2 and 3. In summary, this
202 theoretical study shows that amylopectin presents sites for BaP complexation. For the purpose
203 of enabling the formation of such a stable complex, we chose to modify irreversibly starch by
204 hydroxypropylation for favouring the accessibility of BaP to available complexation sites.
205 Such an irreversible modification by propylene oxide will also consequently enhance starch
206 solubilization in cold water.

207

208 *3.2. Synthesis of hydroxypropylated starch*

209

210 Figure 3 summarized the synthesis conditions used in this experiment and the
211 characterization by NMR spectra of the modified starch obtained, in comparison with NMR
212 spectrum of gelatinised starch (Figure 2). Firstly, using acetone as reaction solvent during
213 hydroxypropylation led to a low degree of substitution ($MS=0.05$) of starch (conditions I).
214 Therefore, we employed afterwards DMSO as reaction solvent, which was chosen due to its
215 ability to solubilize starch at room temperature (Kavitha & BeMiller, 1998). The optimization
216 of starch hydroxypropylation in DMSO was started by varying only one parameter at a time,
217 keeping the others constant, as summarized in Figure 3. The substituted starch so obtained
218 was analyzed for MS by NMR spectra. In order to provide a method for producing superior
219 hydroxypropylated starch ether, the first parameter studied was the reaction temperature.
220 Therefore the temperature was increased from 21 °C to 50 °C (conditions III). The NMR
221 spectrum of the modified starch obtained in these conditions showed the loss of the equatorial
222 proton signal (5.4 ppm) of the anhydroglucose unit of starch (De Graaf et al. 1995),
223 indicating probably a high degree of starch depolymerization. The temperature was fixed to a

224 lower value of 21 °C. In the last two conditions (II and IV), the concentration of propylene
225 oxide (either 32 or 64 % based on starch) was studied. Even if this last concentration (i.e. 64
226 %) gave a higher degree of substitution (MS=2) in comparison with the one (MS=0.73)
227 obtained with only 32 % PO, the enhancement of the signal intensity of hydroxypropyl group
228 (1.1-1.2 ppm) indicated probably a polymeric substitution of PO on starch instead of a
229 monomeric one (Helwig & Wilhelm, 1984). Moreover, such a high value (MS=2) has been
230 seldom reported in data reported in literature (Biswas et al. 2008). Accordingly, the optimized
231 conditions for preparing hydroxypropylated starch ethers chosen in this study were DMSO as
232 reaction solvent, 0.66 % NaOH (based on starch) and 32 % PO (based on starch), 21 °C for
233 reaction temperature and reaction time of 78 h (conditions II). In these soft conditions, the
234 NMR spectrum of the modified starch was closed to the gelatinised starch one (Figure 2),
235 indicating a quite preservation of polymeric structure of the starch. Moreover, the MS
236 obtained was 0.73, a value comparable to values reported in literature (De Graaf et al. 1995).

237

238 *3.3. Solubilization of benzo[a]pyrene in presence of carbohydrate polymers and Fenton* 239 *oxidation of benzo[a]pyrene*

240

241 This optimization of preparing hydroxypropylated starch ethers was conducted with
242 the following objectives: firstly to enhance BaP solubilization, a prerequisite to stimulate the
243 first steps of oxidation (Flotron et al. 2005) which is one of the most limiting factors for BaP
244 degradation in both chemical and biological processes; and secondly, to evaluate the
245 efficiency of Fenton's reagent on BaP degradation. This second experiment was conducted in
246 the presence of each of the selected modified starches obtained in conditions I and II in
247 comparison with the native starch and a well known cyclic oligosaccharide HPBCD (Table
248 2). Concerning the BaP solubilization (measured by relative fluorescence intensity and

249 expressed by calculus in $\mu\text{g/L}$), the results indicated that, in our experimental conditions, both
250 modified starches significantly increased the solubility of BaP. Indeed, solubility of BaP in
251 70 mM equivalent glucose solution of hydroxypropylated starch derivatives was 10.83 and
252 11.45 $\mu\text{g/L}$ respectively with modified starch I and II, a 4-fold increase compared to the BaP
253 aqueous solubility of 2.69 $\mu\text{g/L}$ (Table 2). This solubility enhancement was comparable to the
254 one obtained with randomly methylated- β -cyclodextrin (Veignie et al. 2009). Surprisingly,
255 the capacity of the hydroxypropylated starch derivatives to solubilize BaP did not seem to be
256 correlated to their hydroxypropylation degree. Nevertheless, the solubility of the
257 carbohydrate polymers obtained are strongly MS dependent. The enhancement of MS, from
258 0.05 to 0.73, is linked to an enhancement of water solubility from 6.02 g/L (modified starch I)
259 to 22.64 g/L (modified starch II). This last value is in the same order of magnitude of
260 HPBCD solubility (36.00 g/L).

261 As illustrated in Table 2, BaP solubility seemed clearly to influence the efficiency of
262 Fenton oxidation. The degradation efficiency increases in the following order: modified
263 starch I (4.01 %), HPBCD (29.00 %) and modified starch II (38.38 %). Such an efficient BaP
264 oxidation using the Fenton's reaction has already been reported (Flotron et al. 2005;
265 Kawahara et al. 1995; Nam et al. 2001). In control with water or native starch, no degradation
266 of BaP was observed. In such conditions, the low aqueous solubility of BaP limits the
267 quantity of soluble BaP and therefore the Fenton efficiency. These results indicate that the
268 efficiency of Fenton treatment is strongly dependent on the capacity of HPBCD to solubilize
269 BaP, as underlined in previous studies (Veignie et al. 2009). This result is in accordance with
270 the results obtained by Flotron et al. (2005) who assumed that only the solubilized BaP could
271 be oxidized by the hydroxyl radicals generated in the solution. Nevertheless, concerning the
272 modified starch II, the high BaP degradation rate was not correlated to its capacity to
273 solubilize BaP. The BaP fraction degraded (383.80 μg) was greatly superior to the quantity

274 solubilised (0.06 μg). The comparison of the ratio BaP degraded versus BaP solubilized
275 between HPBCD (446.15) and modified starch II (6396.67), which represent almost a ten-
276 fold enhancement, suggests the involvement of a quite different mechanism during the Fenton
277 reaction. Indeed, during the Fenton reaction, hydrogen peroxide, when catalyzed by ferrous
278 ions, generates strong non-specific oxidant hydroxyl radicals OH^\bullet that react with most
279 organic compounds. Nevertheless, due to their high reactivity, hydroxyl radicals have a very
280 short life, limiting therefore the efficiency of Fenton reaction. Consequently, as soon as
281 hydroxyl radicals OH^\bullet are formed, they react with molecules in their immediate vicinity with
282 high rate constants (on average 10^9 L/mol/s) according to Halliwell & Gutteridge (2004). In
283 presence of starch, we might hypothesize that H_2O_2 and FeSO_4 (Fenton reagents) could
284 perform starch depolymerisation following a radical chain mechanism (Wu et al. 2010).
285 Hydroxyl radicals, which are initially generated from H_2O_2 reduction by transition metal ions,
286 abstract hydrogen atoms on the starch chain, providing therefore carbon centred radicals.
287 Their decay could lead to the starch depolymerisation process, permitting probably a radical
288 attack of BaP. Such degradation of starch through the formation of free radicals have been
289 already described on cassava starch degraded by UV and gamma-irradiated (Bertolini et al.
290 2001), during thermolysis of plain starch (Ciesielski & Tomasik, 1996) or also for
291 depolymerisation of polysaccharides with metallic catalysts (Wu et al. 2010). These carbon
292 centred radicals generated during such processes are likely to be more stable due to the high
293 molecular weight of the starch.

294 This hypothesis is reinforced by our previously conducted modeling studies. Indeed,
295 the high values of ΔE calculated for sites 1, 2 and 3 underlined the complexation of Fe with
296 studied amylopectin, favoring firstly the production of hydroxyl radicals OH^\bullet near
297 carbohydrates giving therefore carbohydrate-derived radicals. Secondly, the complexation of
298 Fe by starch could block available sites on the iron (Figure 1), on which H_2O_2 might attack.

299 Such geometry of the iron-starch complex could lead to a progressive production of hydroxyl
300 radicals OH^\bullet , favoring therefore a higher efficiency of Fenton treatment with the same H_2O_2
301 quantity. The supposed longer life of carbohydrate reactive species formed permits them to
302 reach adsorbed BaP, allowing the Fenton reaction to take place at the solid-liquid interface
303 and increasing consequently the efficiency of Fenton degradation. In such conditions,
304 degradation of BaP might be due to a chain reaction occurring in starch from initiation to
305 propagation stage, similar to lipid peroxidation mechanism (Farmer et al. 1943). This chain
306 reaction mechanism might explain the high ration BaP degraded versus BaP solubility in
307 presence of modified starch II.

308

309 **4. Conclusion**

310

311 The modification of starch by hydroxypropylation lends to functional properties that
312 could be very promising for our research strategy. Hydroxypropyl starch derivatives permit
313 PAH solubilisation and were also employed as carrier matrix for complexing iron and BaP in
314 close vicinity suitable for the Fenton reaction. These two main results are the prerequisite in
315 order to develop a friendly environnementally treatment of PAHs for soil remediation
316 approaches.

317

318

319 **References**

- 320 BeMiller, N. J. (1997). Starch Modification: Challenges and Prospects. *Starch - Stärke*, 49,
321 127-131.
- 322 Bender, M.L. & Komiyama, M. (1978). *Cyclodextrin Chemistry*, Springer, Berlin.

- 323 Bertolini, A. C., Mestres, C., Colonna, P. & Raffi, J. (2001). Free radical formation in UV-
324 and gamma-irradiated cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 44, 269-271.
- 325 Biswas, A., Shogren, R. L., Selling, G., Salch, J., Willett, J. L. & Buchanan, C. M. (2008).
326 Rapid and environmentally friendly preparation of starch esters. *Carbohydrate Polymers*,
327 74, 137-141.
- 328 Ciesielski, W. & Tomasik, P. (1996). Starch radicals. Part I. Thermolysis of plain starch.
329 *Carbohydrate Polymers*, 31, 205-210.
- 330 De Graaf, R.A., Lammers, G., Janssen, L.P.B.M. & Beenackers A.A.C.M. (1995).
331 Quantitative analysis of chemically modified starches by H-NMR Spectroscopy. *Starch -*
332 *Stärke*, 47, 469-475.
- 333 Farmer, E.H., Koch, H.P., & Sutton, D.A. (1943). The course of autoxidation reactions in
334 polyisoprenes and allied compounds. Part VII. Rearrangement of double bonds during
335 autoxidation. *Journal of Chemistry Society*, 541-547.
- 336 Fenton H.J.H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *Journal of the Chemical*
337 *Society Transactions*, 65, 899-911.
- 338 Flotron, V., Delteil, C., Padellec, Y. & Camel, V. (2005). Removal of sorbed polycyclic
339 aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent
340 process. *Chemosphere*, 59, 1427-1437.
- 341 Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2004). *Free radicals in biology and medicine*. New York:
342 Oxford University Press
- 343 Helwig, T. & Wilhelm, O. (1984). Process for the production of hydroxypropyl starch. *US*
344 *Patent Office*, Pat. No. 4 451 649.

- 345 Kawahara, F., Davila, B., Al-Abed, S., Vesper, S., Ireland, J. & Rock, S. (1995). Polynuclear
346 aromatic hydrocarbon (PAH) release from soil during treatment with Fenton's reagent.
347 *Chemosphere*, 31, 4131-4142.
- 348 Kavitha, R. & BeMiller, J. N. (1998). Characterization of hydroxypropylated potato starch.
349 *Carbohydrate Polymers*, 37, 115-121.
- 350 Kulik, N., Goi, A., Trapido, M. & Tuhkanen, T. (2006). Degradation of polycyclic aromatic
351 hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote
352 contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 78 , 382-391.
- 353 Kshirsagar, A. C. & Singhal, R. S. (2008). Preparation of hydroxypropyl corn and amaranth
354 starch hydrolyzate and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Food*
355 *Chemistry*, 108, 958-964.
- 356 Manners, D. J. (1989). Recent developments in our understanding of amylopectin structure.
357 *Carbohydrate Polymers*, 11, 87-112.
- 358 Murray, C. A. & Parsons, S. A. (2004). Removal of NOM from drinking water: Fenton's and
359 photo-Fenton's processes. *Chemosphere*, 54, 1017-1023.
- 360 Nam, K., Rodriguez, W. & Kukor, J. (2001). Enhanced degradation of polycyclic aromatic
361 hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction.
362 *Chemosphere*, 45, 11-20.
- 363 Rafin, C., Veignie, E., Fayeulle, A. & Surpateanu, G. (2009). Benzo[a]pyrene degradation
364 using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani*
365 and cyclodextrins. *Bioresource Technology*, 100, 3157-3160.
- 366 Rivas, F. J. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of
367 chemical oxidation based treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 138, 234-251.
- 368 Szejtli, J. (1988). *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic, Dordrecht.

- 369 Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical*
370 *Reviews*, 98, 1743-1753.
- 371 Veignie, E., Rafin, C., Landy, D., Fourmentin, S. & Surpateanu, G. (2009). Fenton
372 degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic
373 hydrocarbon benzo[a]pyrene. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 1296-1301.
- 374 Wu, M., Xu, S., Zhao, J., Kang, H. & Ding, H. (2010). Free-radical depolymerization of
375 glycosaminoglycan from sea cucumber *Thelenata ananas* by hydrogen peroxide and
376 copper ions. *Carbohydrate Polymers*, 80, 1116-1124.
- 377

378 Figure and Table captions

379

380 **Fig. 1.**

381 Amylopectin structure with 6 sites available for BaP complexation

382

383 **Fig. 2.**

384 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of gelatinised starch

385

386 **Fig. 3.**

387 $^1\text{H-NMR}$ spectra of hydroxypropylated starch ethers under various synthesis conditions

388

389 **Table 1**

390 Computed energies of complexes

391

392 **Table 2**

393 Solubilization of benzo[a]pyrene in presence of carbohydrate polymers and Fenton oxidation

394 of benzo[a]pyrene

395

Table 1

Computed energies of complexes

Site ^a	$\Delta E^b_{\text{Amylopectin-BaP}}$ [kcal/mol]	$\Delta E_{\text{Amylopectin-Fe}}$ [kcal/mol]
1	-43.3	-2337.2
2	-40.4	-2258.7
3	-137.5	-2297.6
4	525.9	2298.4
5	66.8	2307.7
6	503.1	2267.4

^a Site number where host molecule can be included with the formation of complexes^b Computed complexation energy calculated by the MM3 method as described in materials and methods section

Table 2

Solubilization of benzo[a]pyrene in presence of carbohydrate polymers and Fenton oxidation of benzo[a]pyrene

Compound	Carbohydrate polymer		BaP Solubilization		BaP Fenton oxidation		Ratio D/S
	MS ^a	Solubility (g/L)	F.I. (a.u.) ^b [BaP, µg/L]	% BaP Degradation	Quantity of BaP (µg)		
					Degraded (D)	Solubilized (S)	
Water	-	-	32.55 ± 0.62 [2.69]	0.00 (NS ^c)	0.00	0.00	0.00
HPBCD	0.74	36.00	5282.66 ± 325.71 [131.14]	29.00 (S)	290.00	0.65	446.15
Starch	-	0.56	93.69 ± 0.59 [3.74]	0.00 (NS)	0.00	0.02	0.00
Modified starch I	0.05	6.02	118.34 ± 5.06 [10.83]	4.01 (NS)	40.10	0.05	802.00
Modified starch II	0.73	22.64	153.00 ± 13.10 [11.45]	38.38 (S)	383.80	0.06	6396.67

^a MS, molar substitution (calculated according to details precised in Materials and Methods)^b F.I. Fluorescence Intensity (a.u. arbitrary unit, excitation 295 nm, emission 406 nm) of solubilized BaP in carbohydrate polymer solution (70 mM equivalent glucose)^c Statistical analysis performed by two-sample *t*-test comparing treatment with water control (*P* = 0.01); S, significantly different; NS, not significantly different.

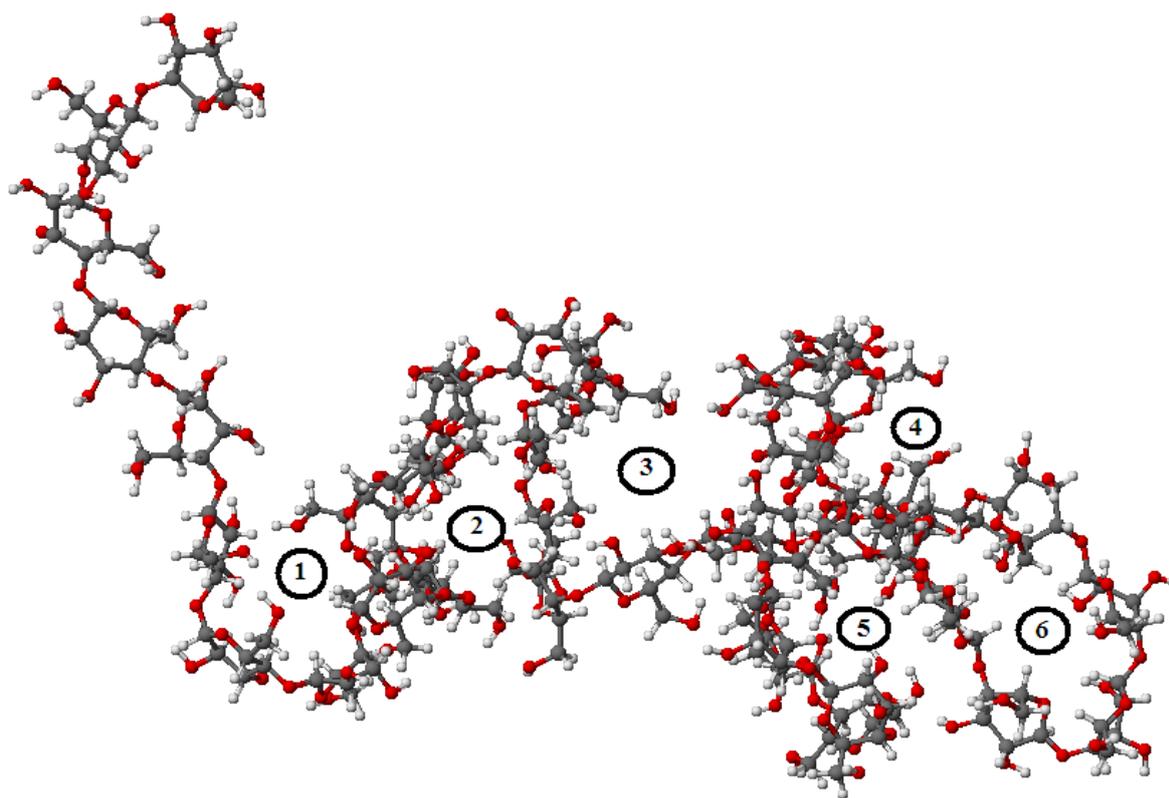


Fig. 1. Amylopectin structure with 6 sites available for BaP complexation

Accepted Manuscript

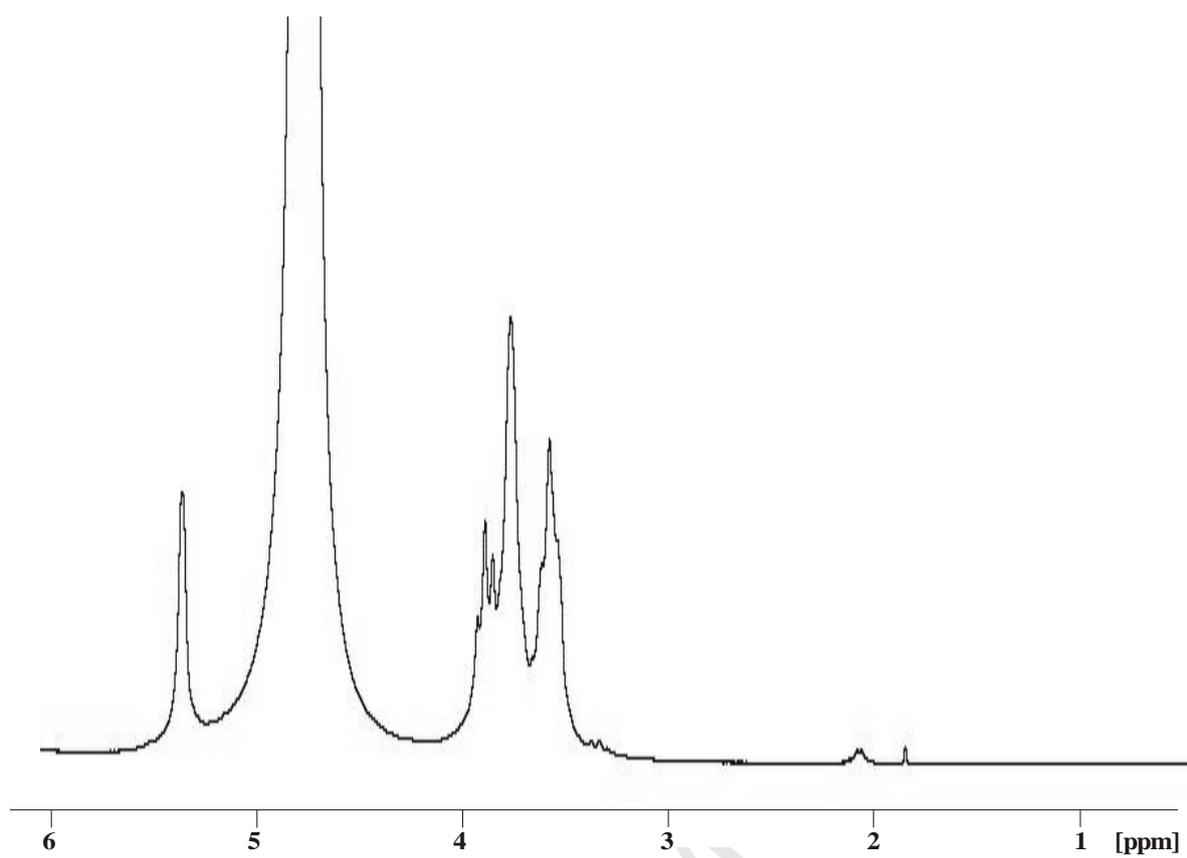


Fig. 2. ^1H -NMR spectrum of gelatinised starch

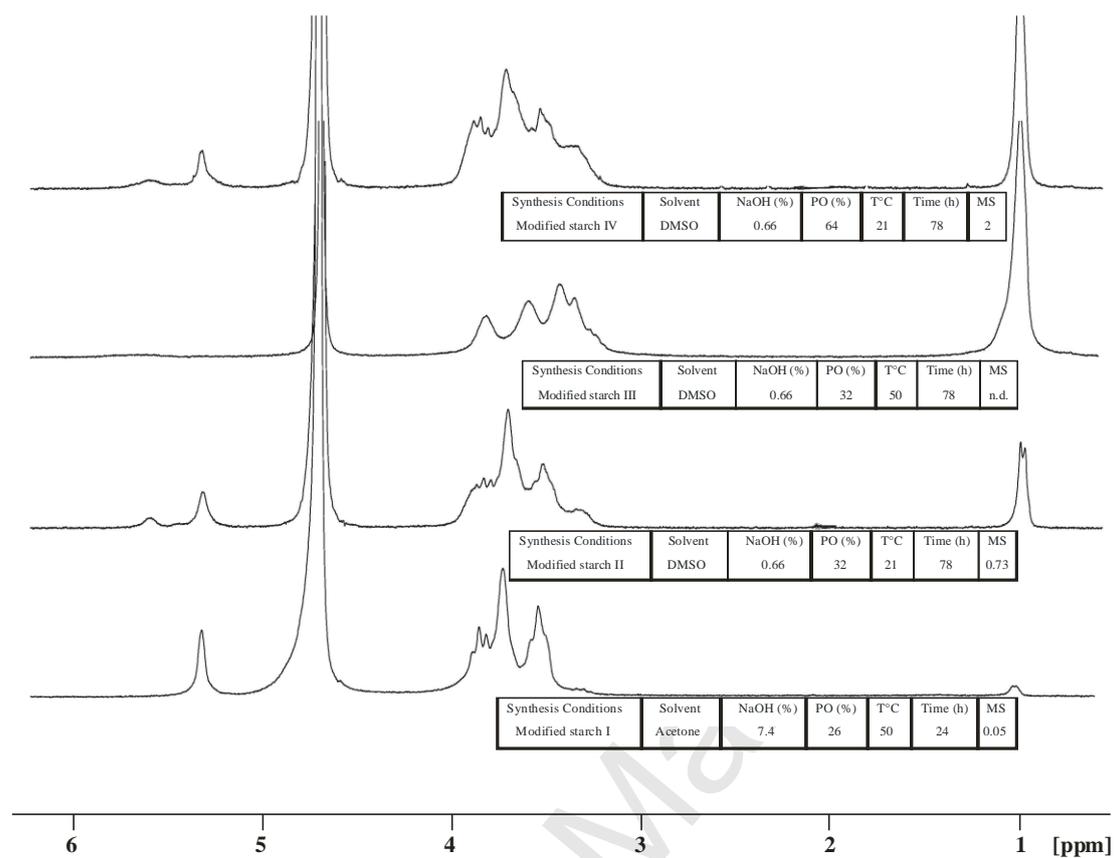


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectra of hydroxypropylated starch ethers under various synthesis conditions