

# Dégradation des dioxines ou du benz[a]pyrène par une approche tripartite: oxydation chimique / oxydation biologique par des champignons telluriques saprotrophes / amidon difonctionnalisé aux propriétés surfactantes

Isabelle Delsarte

#### ▶ To cite this version:

Isabelle Delsarte. Dégradation des dioxines ou du benz[a]pyrène par une approche tripartite : oxydation chimique / oxydation biologique par des champignons telluriques saprotrophes / amidon difonctionnalisé aux propriétés surfactantes. Biotechnologies. Université du Littoral Côte d'Opale, 2017. Français. NNT : 2017DUNK0447 . tel-01846162

# HAL Id: tel-01846162 https://theses.hal.science/tel-01846162

Submitted on 21 Jul 2018  $\,$ 

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale 104 Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement Filière Ingénierie des Fonctions Biologiques

Dégradation des dioxines ou du benzo[a]pyrène par une approche tripartite : oxydation chimique / oxydation biologique par des champignons telluriques saprotrophes / amidon difonctionnalisé aux propriétés surfactantes

Présentée par

# Isabelle Delsarte

Soutenue publiquement le 20 janvier 2017 devant la commission d'examen

M. MARTIN-LAURENT F.	Directeur de Recherche INRA, Dijon	Rapporteur
M. MALLET J-M.	Directeur de Recherche CNRS, ENS, Paris	Rapporteur
M. LEN C.	Professeur, UTC, Compiègne	Examinateur
Mme LORS C.	Professeur, EDM, Douai	Examinateur
M. VEIGNIE E.	Maître de Conférences, ULCO	Co-encadrant
Mme RAFIN C.	Maître de Conférences-HDR, ULCO	Directrice



« Tout obstacle renforce la détermination.

Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »

Léonard de Vinci

#### Remerciements

Tout d'abord, Je tiens à exprimer ma gratitude à Mr. F. Martin-Laurent Directeur de Recherche à l'INRA, Dijon et Mr. J-M. Mallet Directeur de Recherche au CNRS-ENS, Paris qui ont accepté de juger mon travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Mme la Professeur C. Lors et Mr le Professeur C. Len d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Mme Catherine Rafin, Maître de conférences-HDR, à l'ULCO et mon co-encadrant, Etienne Veignie Maître de conférences à l'ULCO pour leur précieux encadrement pendant ces années passionnantes. Merci pour votre disponibilité, votre soutien, votre confiance, votre patience, votre écoute et votre investissement. Vous m'avez beaucoup apporté aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel, je vous remercie profondément.

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

Je tiens à remercier les co-financeurs, le PMCO et la région Hauts-de-France pour avoir soutenu ce projet scientifique.

Je remercie les différents acteurs du projet « Dioxines : contamination et biodégradation », coordonné par Halluin 3R et pour le soutien financier conjoint de l'EUROPE (PO FEDER), de l'ADEME et de la MEL.

Je voudrais également adresser des remerciements à M. Dr. Pierre-Edouard Danjou pour tous ses conseils, son aide et sa bonne humeur.

Mes remerciements vont aussi aux personnes qui ont pris part à l'avancement de ces travaux. Je pense notamment à Mr. Dr. C. Slomianny, Mr. Dr. C. Pirez, Mr. Dr. F. Delattre et Mr. Dr. Y. Landkocz pour leurs précieux conseils et leur aide technique.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à mes collègues Cloé, Sara, Atallah, Jihane, Eléonore, Clémence, Eliane, Joyce, Tarek, Clémence, Guitta et Gauthier qui m'ont permis de travailler dans la bonne humeur durant ces trois années. Je n'oublie pas mes amies d'enfance, Marine C., Flavie, Marine V. Noémie, Inès, Sophie sans lesquelles la vie serait moins fun et moins facile.

Et naturellement, je remercie Benoît qui partage ma vie et a su me soutenir contre vents et marées. Merci pour tes précieux conseils, tu as participé à ta façon à ce travail. 113.

Enfin, mes pensées reconnaissantes vont à ma famille qui a toujours été là pour moi. Je remercie mes parents sans qui je ne serais pas où j'en suis actuellement. Merci de m'avoir épaulé, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir accordé votre soutien sans faille. Je remercie mon frère sur qui j'ai toujours pu compter, merci de m'avoir supportée et protégée durant toutes ces années.

## Abréviations

ADEME : l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

AGU : Unité d'anhydroglucose

AS : activité spécifique

BaP : benzo[a]pyrène

BASIAS : Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service

BASOL : Base de données sur les sites et sols pollués

BP : Biphényle

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

BS: 1,4-butane-sultone

CD : cyclodextrine

CMC : Concentration Micellaire Critique

CMR : Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique

COHV : Composés Organiques Halogénés Volatils

DCM : dichlorométhane

DF : Dibenzofurane

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMSO-d6 : diméthylsulfoxyde deutéré

D<sub>2</sub>O : oxyde de deutérium

CE<sub>50-48h</sub> : concentration d'oxydant où 50% d'inhibition de la biomasse est observé après 48h

EDA : association Environnement Développement Alternatif

EEA : Agence Européenne pour l'Environnement

EIONET-SOIL : European Environment Information and Observation Network for soil

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ESDAC : European Soil Data Centre

FAO : Food and Agriculture Organisation

Fe<sup>2+</sup>: fer (II)

FEDER : Fonds Européen de Développement Economique et Régional

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HS : hors site

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IPCR : Interactions Plantes-Champignons et Remédiation

KMnO<sub>4</sub>: Permanganate de potassium

LAS d'Arras : Laboratoire d'Analyses des Sols d'Arras

LMCU : Lille Métropole Communauté Urbaine

M0 : amidon natif de maïs cireux

MEA : Malt Extract Agar

- MeOH : méthanol
- MET : Miscroscopie électronique à transmission
- MM1 : milieu minéral
- MS : matière sèche
- NaOH : hydroxyde de soude
- NR : Nile Red
- OCDD : Octachlorodibenzo-p-dioxine
- OH : groupement hydroxyle
- OH : radical hydroxyle
- **ONU** : Organisation des Nations Unies
- OS : groupements octényl succiniques
- OSA : anhydride 2-octén-1-ylsuccinique
- PO : amidon natif de pomme de terre
- P0\* : amidon natif de pomme de terre prétraité
- POP : Polluants Organiques Persistants
- PCB : Polychlorobiphényles
- PCDD/F : dioxines
- PCDD : Polychlorodibenzo-p-dioxines
- PCDF : Polychlorodibenzofuranes
- R : Rapport apparent entre les groupements OS et BS greffés
- Rpm : rotation par minute
- RMN : spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
- TCDD : Tétrachlorodibenzo-p-dioxine
- TEF : Toxic Equivalent Factor ou facteur d'équivalence toxique
- TEQ : Toxic Equivalent Quantity ou équivalent toxique
- UCEIV : Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant
- ULCO : Université du Littoral Côte d'Opale
- UE : Union Européenne
- US-EPA : United States Environmental Protection Agency

# Sommaire général

Introduction générale 2
Chapitre 1. Synthèse et caractérisation d'amidons modifiés pour la solubilisation du
benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant
Chapitre 2. Etude de la dégradation du benzo[a]pyrène en milieu minéral77
Chapitre 3. Etude de la dégradation des dioxines en milieu minéral et en microcosme de
sol au laboratoire115
Conclusion générale169
Annexes175
Tables

# Chapitre 1. Synthèse et caractérisation d'amidons modifiés pour la solubilisation du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant

### <u>Sommaire</u>

Introduct	ion 34
Matériels	s et méthodes
1.	Produits chimiques
1.1.	Produits de réaction
1.2.	Solvants
1.3.	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
1.4.	Colorant
2.	Prétraitement des amidons natifs
2.1.	Traitement thermique
2.2.	Traitement par ultrasons
3.	Amidons difonctionnalisés
3.1.	Principe de l'éthérification entre l'amidon et la 1,4-butane-sultone
3.2.	Principe de l'estérification entre l'amidon et l'anhydride 2-octén-1-
ylsud	ccinique 39
3.3.	Synthèse des amidons difonctionnalisés 40
4.	Préparation des nanosphères d'amidon difonctionnalisé
5.	Caractérisation des amidons difonctionnalisés par spectroscopie de résonance
magn	étique nucléaire
6.	Détermination de la solubilité aqueuse apparente des amidons modifiés
7.	Solubilisation du benzo[a]pyrène en présence d'amidons modifiés
8.	Activité spécifiques des produits et la solubilité maximum du BaP43
9.	Détermination de la concentration micellaire critique par spectroscopie de
fluore	escence
9.1.	Préparation de la solution de Nile Red43
9.2.	Préparation des solutions d'amidons43
9.3.	Détermination de la concentration micellaire critique
10.	Etude de l'encapsulation du benzo[a]pyrène par les nanosphères d'amidon 44

10.1.	Evaluation de l'encapsulation dune solution aqueuse de benzo[a]pyrène par
les nanosphère	es d'amidon
10.2.	Evaluation de la solubilisation du benzo[a]pyrène adsorbé en fonction de la
concentration	en nanosphères d'amidon 44
11. Observat	ion des amidons en microscopie44
11.1.	Microscopie photonique
11.2.	Microscopie confocale 45
11.3.	Miscroscopie électronique à transmission 45
Résultats et Discus	sion 45
1. Conditior	ns expérimentales45
1.1.	Prétraitement des amidons natifs 45
1.1.1.	Gélatinisation de l'amidon natif en présence de solvant 46
1.1.1.1.	Optimisation du protocole de prétraitement 48
1.1.1.2.	Observation des amidons après prétraitement 49
1.1.2.	Protocoles de pré-gélatinisation des amidons natifs51
2. Etude de	s amidons modifiés de pomme de terre52
2.1.	Caractérisation des structures moléculaires des amidons par RMN 53
2.1.1.	Amidon natif de pomme de terre54
2.1.2.	Caractérisation de l'amidon modifié 55
2.2.	Solubilité aqueuse apparente
2.3.	Solubilité apparente des amidons modifiés vs solubilisation aqueuse du
benzo[a]pyrèn	e 60
2.4.	Etude de la désorption du BaP par les amidons modifiés62
3. Nanosph	ères d'amidon65
3.1.	Détermination de la solubilité apparente du produit et de la solubilisation
aqueuse du Ba	Ρ65
3.2.	Caractérisation des nanosphères d'amidon 66
3.3.	Etude de l'encapsulation du benzo[a]pyrène dans les nanosphères 69
Conclusion partiell	e 71
Bibliographie	

#### **Introduction**

L'amidon est la réserve de glucides la plus importante chez les plantes et représente l'un des principaux produits de l'agriculture pour l'homme (Amagliani et al., 2016). En 2012, 75 millions de tonnes d'amidon ont été produits dans le monde entier et commercialisés sous forme native mais également sous forme modifiée physiquement ou chimiquement (Waterschoot et al., 2014). Parmi les 75 millions de tonnes d'amidon produits dans le monde, plus de la moitié est produite par les Etats Unis et 10 millions de tonnes par l'UE (Starch Europe, 2016).

L'amidon se présente sous forme de granules de 1 à 100  $\mu$ m dont la taille varie selon l'origine botanique (Figure I 1).



Figure I 1. Schéma de la structure d'un granule d'amidon, de l'amylose et de l'amylopectine (adapté de Sweedman et al., 2013)

Ces granules sont principalement constituées de deux types de polymères de Dglucose : l'amylose et l'amylopectine. Ces deux polymères représentent environ 98-99 % du poids net des granules d'amidon. L'amylose est essentiellement un polymère linéaire composé d'unités D-glucosyl liées par des liaisons de type  $\alpha$  (1,4) (99 %) ramifié à 1 % en  $\alpha$ (1,6). L'amylopectine est un polymère très ramifié ayant environ 5-6 % de liaisons de type  $\alpha$ (1,6) et 95 % en  $\alpha$  (1,4) (Figure I 1). Des petites quantités de protéines et de lipides sont également présentes dans l'amidon. Le rapport de ces deux polysaccharides varie selon l'origine botanique de l'amidon. Par exemple, l'amidon de pomme de terre est composé d'environ 23 % d'amylose et 77 % d'amylopectine alors que le pourcentage d'amylopectine dans le maïs cireux est supérieur à 99 % (Boursier, 2005).

L'amidon est présent dans des milliers de produits alimentaires et non-alimentaires de notre quotidien (Starch Europe, 2016). Il représente la plus importante source de glucides

dans le régime alimentaire humain. Dans les pays développés, l'amidon représente au moins 35 % de l'apport calorifique journalier par contre dans de nombreuses régions de l'Afrique et de l'Extrême Orient, il fournit plus de 80 % de l'apport calorique quotidien principalement sous forme de riz. Il est ainsi largement consommé sous sa forme native (céréales, pomme de terre). L'amidon natif est un matériau possédant de nombreux avantages : il est nontoxique, abondant, peu onéreux, renouvelable, biodégradable (Sweedman et al., 2013). Cependant, les applications industrielles des amidons natifs sont généralement limitées du fait de la très faible solubilité de l'amidon natif dans l'eau à température ambiante, de leur instabilité sous différentes conditions de températures ou de pH. Afin d'obtenir les propriétés souhaitées, les amidons natifs sont en général modifiés chimiquement et/ou physiquement.

La présence d'un grand nombre de groupements hydroxyles sur l'amidon fournit de nombreux sites réactifs pour la modification chimique de l'amidon. Ainsi, les modifications chimiques comme le greffage et/ou la réticulation par l'estérification et l'éthérification ont généralement lieu par l'addition de groupements fonctionnels permettant de changer les propriétés de l'amidon (Haroon et al., 2016). La modification physique de l'amidon est souvent réalisée par l'action simultanée de plusieurs facteurs comme la température, l'humidité, la pression... Les traitements physiques de l'amidon incluent le traitement hydrothermique, la sonication, le broyage et l'irradiation gamma. Ces différentes façons de modifier les amidons natifs permettent de les adapter aux besoins des industriels (Boursier, 2005).

Les amidons modifiés sont ainsi utilisés dans les aliments (les produits de boulangerie, les produits à base de viande, les sauces) et comme substrat pour la production de produits d'hydrolyse (maltodextrines et les sirops de glucose) (Copeland et al., 2009). L'amidon est également exploité dans d'autres applications non-alimentaires incluant les médicaments, les engrais, le papier, le carton, les adhésifs, les textiles, les cosmétiques, les matériaux de constructions. Dans le domaine de l'environnement, l'amidon est utilisé comme un absorbant pour l'élimination des métaux lourds et des colorants organiques provenant des eaux usées dont leur présence dans l'eau est nocive pour l'homme, la faune et la flore (Haroon et al., 2016). Dans le cadre de cette étude, nous proposons une autre utilisation potentielle de l'amidon modifié chimiquement en vue d'une application éco-technologique pour la réhabilitions des sols pollués par les POP. En effet, l'objectif de la thèse est d'élaborer une méthode de remédiation des sites historiquement contaminés par les POP par le couplage simultané d'une oxydation chimique douce à une oxydation biologique par les champignons telluriques saprotrophes. Cependant, comme indiqué dans l'introduction générale, ces deux méthodes d'oxydation nécessitent le passage en phase aqueuse du polluant dans l'écosystème contaminé (sols, sédiments, boues) pour être accessible puis dégradé. Nous proposons donc de développer une approche stimulant le passage de ces polluants en phase aqueuse par l'intermédiaire d'amidons modifiés. L'existence de cavités hydrophobes dans les amidons a été mise en évidence au cours de précédentes études réalisées au sein de notre équipe (UCEIV, ULCO, Dunkerque) (Rosu et al., 2011, 2013). De ce fait, l'amidon représente un matériel de choix pour la production de molécules polysaccharidiques possédant une activité surfactante.

Les recherches réalisées précédemment au sein de l'équipe ont montré que la modification des amidons natifs par l'anhydride 2-octén-1-ylsuccinique (OSA) permet d'obtenir un produit capable de désorber des molécules hydrophobes comme le BaP (Rosu et al., 2013). Cependant, ce produit a une très faible solubilité dans l'eau. Ce résultat indique que les propriétés amphiphiles de l'OSA ne sont pas suffisantes pour augmenter la solubilité aqueuse de l'amidon natif. De plus, Rosu et al. (2013) ont montré que les amidons modifiés par la 1,4-butane sultone (BS) stimulent la solubilité de l'amidon dans l'eau grâce à l'apport des groupements chargés en sulfonates (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Ces groupements permettent d'augmenter la polarité de l'amidon ainsi modifié. Cependant, l'alkylation uniquement par la BS est inefficace pour permettre la désorption du BaP. Ces résultats nous ont conduits à envisager une difonctionalisation de l'amidon par la BS et l'OSA qui pourrait permettre d'obtenir un amidon modifié ayant à la fois de bonnes propriétés hydrophobes et hydrophiles. Cette stratégie est donc utilisée comme ligne directrice pour nos synthèses d'amidons modifiés.

Dans ce chapitre de thèse, nous exposerons les différentes méthodes utilisées pour la synthèse chimique des amidons modifiés. Dans un second temps, nous caractériserons la structure moléculaire des produits obtenus par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Les capacités surfactantes des amidons seront évaluées selon les deux critères suivants : leur solubilité aqueuse apparente et leur capacité à augmenter la solubilité dans l'eau d'un polluant hydrophobe, le BaP, utilisé comme modèle d'HAP. Pour finir, des études complémentaires seront réalisées afin d'étudier et de comprendre l'interaction entre l'amidon modifié et le Nile Red (NR), une molécule invité hydrophobe. Une partie du travail

présenté dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans Carbohydrate Polymers (Delsarte et al., 2016).

#### Matériels et méthodes

#### 1. Produits chimiques

#### 1.1. Produits de réaction

L'amidon de pomme de terre (Panreac Quimica SAU, Espagne) et l'amidon de maïs cireux (Sigma Aldrich, USA) sont utilisés comme matière première pour la réalisation des synthèses. La base employée est l'hydroxyde de sodium (Carlo Erba Réactifs-SDS, France). Les réactions d'alkylation des amidons sont effectuées avec la 1,4-butane-sultone (à 99 %) et l'anhydride 2-octén-1-ylsuccinique (à 97 %) fournis par Sigma Aldrich, France. L'élimination des sous-produits de synthèse ayant une masse inférieure à 14000 Da est effectuée par une membrane de dialyse (MWCO de 12-14000 Da-Medicell International Ltd, Grande Bretagne).

#### 1.2. <u>Solvants</u>

Les solvants utilisés dans les synthèses sont le diméthylsufoxyde (DMSO, à 99,5 %, Panreac Quimica SAU, Espagne) et l'eau déminéralisée. L'oxyde de deutérium (D<sub>2</sub>O, à 99,8 %, Carlo Erba Reagents, France) et le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d6, Acros organics, Belgique) sont employés pour la caractérisation des amidons modifiés par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. Le dichlorométhane qualité HPLC (DCM, Fisher Scientific SAS, France) et le méthanol qualité HPLC (MeOH, VWR Chemicals, France) sont utilisés pour réaliser les solutions étalons de benzo[a]pyrène (BaP).

#### 1.3. <u>Hydrocarbure Aromatique Polycyclique</u>

Le BaP (Sigma Aldrich, USA) est utilisé comme modèle d'HAP de haute masse molaire.

#### 1.4. <u>Colorant</u>

Le Nile Red (9-diethylamino-5-benzo[α]phenoxazinone) utilisé en tant que fluorophore en spectroscopie de fluorescence moléculaire de la concentration micellaire critique (CMC) des amidons synthétisés provient de Acros Organics, Belgique (à 99 %).

#### 2. Prétraitement des amidons natifs

Le prétraitement des amidons natifs est une condition nécessaire pour l'optimisation de la réactivité moléculaire de l'amidon. Plusieurs méthodes de dispersion ont été testées sur l'amidon natif de pomme de terre (**P0**) et de maïs cireux (**M0**).

#### 2.1. Traitement thermique

Une solution d'amidon natif est initialement préparée dans l'eau déminéralisée à une concentration de 6 g.L<sup>-1</sup>. Selon l'origine botanique de l'amidon, la plage de température de dispersion varie (Ratnayake and Jackson, 2007; Miao et al., 2010). La solution est mélangée puis chauffée pendant 30 min respectivement à 75°C pour **P0** et à 95°C pour **M0**. La solution dispersée est ensuite centrifugée à 5000 rpm à 40°C pendant 15 min afin d'éliminer les résidus fantômes présents (Li et al., 2004). Cette opération est répétée 3 fois. Le surnageant est ensuite congelé à l'azote liquide afin de minimiser les risques de rétrogradation de l'amylose libéré lors de la dispersion des grains d'amidon puis lyophilisé pendant 4 jours (Debet and Gidley, 2007).

#### 2.2. Traitement par ultrasons

Une solution d'amidon natif est préparée dans 50 mL d'eau déminéralisée à une concentration de 60 g.L<sup>-1</sup>. Les échantillons sont traités aux ultrasons pendant 30 min avec une sonde Branson Sonifier 450 (13 mm de diamètre, 20 kHz de fréquence et 400 W de puissance maximale) de la compagnie Branson ultrasonic Corporation (Danbury, Connecticut, CT 06810, USA). La sonde est immergée dans la solution à environ 1 cm sous la surface et la température est enregistrée grâce à un thermocouple. Au cours du traitement, la température augmente de façon exponentielle de 20 à 80°C. La solution dispersée est centrifugée à 5000 rpm à 40°C pendant 15 min et cette opération est répétée 3 fois. Le surnageant est ensuite lyophilisé.

#### 3. Amidons difonctionnalisés

Afin d'obtenir un produit ayant les deux propriétés recherchées : une meilleure solubilité aqueuse et une capacité à solubiliser des polluants hydrophobes, l'amidon natif est modifié par deux substituants. Ainsi, la BS et l'OSA sont utilisés comme réactifs de départ pour la synthèse des amidons de pomme de terre difonctionnalisés.

#### 3.1. Principe de l'éthérification entre l'amidon et la 1,4-butane-sultone

L'éthérification de l'amidon natif par la BS est basée sur la synthèse des sulfobutyléther-β-cyclodextrines qui a fait l'objet de deux brevets déposés en 1992 et 1994 par Stella et Rajewski (Stella and Rajewski, 1992). Cette synthèse a été développée pour la formulation pharmaceutique dans le but de solubiliser et stabiliser des principes actifs peu solubles dans l'eau (Blach, 2005).

Dans le cadre de nos travaux présentés en introduction, nous nous sommes inspirés des brevets de Stella et Rajewski (1992) ainsi que des travaux réalisés au sein de l'équipe (UCEIV, ULCO, Dunkerque) (Rosu et al., 2011) pour effectuer l'éthérification de l'amidon natif par la BS.

La synthèse consiste à faire réagir l'amidon natif avec la BS en présence de soude comme base (Figure I 2).



Figure I 2. Mécanisme de substitution nucléophile de l'amidon par la BS

# 3.2. <u>Principe de l'estérification entre l'amidon et l'anhydride 2-octén-1-ylsuccinique</u>

Il s'agit d'une réaction d'estérification entre les groupements hydroxyles (OH) présents sur la molécule d'amidon (natif ou sulfobutylé obtenu précédemment) et OSA (Figure I 3).





La modification de l'amidon par l'OSA a été brevetée par Cadwell et Wurzburg en 1953 (Bao et al., 2003). Grâce à la combinaison du caractère hydrophobe de l'OSA et de la structure macromoléculaire hautement ramifiée de l'amidon, ces dérivés d'amidon disposent de bonnes propriétés de stabilisation, d'encapsulation, thermique et nutritionnelles utilisées dans de nombreuses applications (Sweedman et al., 2013).

#### 3.3. Synthèse des amidons difonctionnalisés

Les synthèses ont été conduites selon trois protocoles distincts dont les méthodes représentatives sont décrites pour les produits **P1**, **P3** et **P8**.

**P1** : **P0** (1,00 g ; 6 mmol par unité d'anhydroglucose (AGU)) est dissous dans une solution de 5 mL d'eau déminéralisée et 20 mL de DMSO. Une quantité de soude (NaOH, 0,10 g ; 2,5 mmol) est ajoutée dans le milieu afin de faciliter la déprotonation des hydroxyles primaires et secondaires. Le milieu réactionnel est mis sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24 h. Après solubilisation complète de l'amidon, la BS (0,92 mL ; 9 mmol) est ajoutée. Les groupements hydroxyles de la molécule ainsi déprotonés vont attaquer le réactif BS par un mécanisme de substitution nucléophile (Figure I 2). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante. L'OSA (1,90 mL ; 9 mmol) est ensuite ajouté et le mélange obtenu est agité pendant 24 h. Une quantité totale de 400 mg (10 mmol) de soude est additionnée afin de maintenir le pH de la réaction entre 8 et 9.

**P3** : **P0** (1,00 g ; 6 mmol AGU) est dissous dans 5 mL d'eau déminéralisée additionné de 300 mg de NaOH (7,5 mmol), sous agitation, à 70°C. Lorsque le milieu devient limpide, la BS (1,85 mL ; 18 mmol) est ajoutée à ce mélange et la réaction est maintenue sous agitation pendant 24 h. L'OSA (1,90 mL ; 9 mmol) ainsi que 5 mL de DMSO sont ensuite ajoutés et le mélange obtenu est agité pendant 24 h. Une quantité totale de 960 mg (24 mmol) de NaOH est additionnée à la réaction afin de maintenir le pH entre 8 et 9.

**P8** : **P0** (1,00 g ; 6 mmol AGU) est dissous dans 5 mL d'eau déminéralisée, 20 mL de DMSO et 100 mg de NaOH (2,5 mmol), sous agitation, à 70°C pendant 24 h. A ce mélange, la BS (1,85 mL ; 18 mmol) et l'OSA (1,90 mL ; 9 mmol) sont ajoutés simultanément et la réaction est conduite pendant 24 h. Une quantité totale de 400 mg (10 mmol) de NaOH est ajoutée pour stabiliser le pH entre 8 et 9.

Après réaction, les amidons modifiés sont dialysés dans l'eau déminéralisée durant 3 jours. L'eau est changée deux fois par jour et les produits sont ensuite congelés et lyophilisés. (Rosu et al., 2013).

Les paramètres réactionnels nécessaires à la réalisation des différentes synthèses sont résumés dans le Tableau I 1. Les réactions sont réalisées de façon séquentielle ou en « one pot », c'est-à-dire que les substituants BS et OSA sont ajoutés simultanément. Dans le but d'obtenir les conditions de synthèse optimales, d'autres paramètres sont testés tels que : le prétraitement de l'amidon natif, la température de synthèse, le rapport DMSO/H<sub>2</sub>O et le rapport BS/AGU. Au total, neuf produits sont synthétisés.

Produit	T (°C)	Durée (h)	DMSO/H <sub>2</sub> O	NaOH/AGU	BS/AGU
- Dad			. / .	. /2	. /2
P 1	20	48	4/1	1/2	1/2
P1* <sup>b</sup>	20	48	4/1	1/2	1/2
P2	20	48	4/1	1/2	1/1
P3	70	48	1/1	4/3	1/1
P4	70	48	1/1	4/3	1/2
P5	70	48	1/1	1/2	1/2
P6	70	48	1/1	1/2	1/6
<b>P7</b> <sup>c</sup>	20	24	4/1	1/2	1/1
P8 <sup>c</sup>	70	24	4/1	1/2	1/1

Tableau I 1. Paramètres des synthèses des amidons difonctionnalisés (rapport OSA/AGU = 1/2)

a : Amidon de pomme de terre

b : Amidon natif de pomme de terre préalablement dispersé dans l'eau à 70°C pendant 30 min

c : Réaction « one-pot »

#### 4. Préparation des nanosphères d'amidon difonctionnalisé

Les nanosphères d'amidon sont synthétisées selon une adaptation de la méthode de dialyse de Liu et al. (2007). 500 mg d'amidon difonctionnalisé (3 mmol AGU) sont dissous dans une solution de 5 mL d'eau déminéralisée et 20 mL de DMSO sous agitation, à 70°C pendant 12 h. Le mélange est ensuite transféré dans un boudin de dialyse placé dans 2 L d'eau déminéralisée. L'eau est renouvelée 6 fois en 48 h. La solution contenant les nanosphères est centrifugée à 5000 rpm à 20°C pendant 45 min, puis lyophilisée.

#### 5. <u>Caractérisation des amidons difonctionnalisés par spectroscopie de résonance</u> <u>magnétique nucléaire</u>

Les différents produits obtenus sont caractérisés par RMN du proton (RMN <sup>1</sup>H). Les analyses sont réalisées avec un spectromètre Bruker Avance III 400. Les spectres sont enregistrés à 400 MHz avec les paramètres d'acquisition suivants : 25°C ou 60°C, un temps de relaxation de 1 s, un angle de pulsation de 30°, un temps d'acquisition de 6 s et un total de 16 scans. Cette méthode RMN de routine ne permet pas d'obtenir des spectres RMN quantitatifs, ainsi les valeurs de rapport (R) déterminées sont des valeurs apparentes de R. Cela permet toutefois une comparaison qualitative entre les échantillons, à condition que les spectres RMN soient enregistrés dans les mêmes conditions pour l'ensemble des échantillons comparés.

R détermine le rapport apparent entre les groupements octényl succiniques (OS) et BS, des substituants greffés. R est calculé par l'équation suivante :

$$R = (I_{OS}/3) / (I_{BS}/4) Eq (1)$$

L'intégration du pic ( $I_{OS}$ ) est déterminée à 0,89 ppm correspondant aux protons ( $CH_3$ )<sub>a</sub> des résidus alkyl de l'OS. L'intégration de la BS à 1,70-1,95 ppm correspondant aux protons de ( $CH_2$ )<sub>B-C</sub> du résidu alkyl de la BS est utilisée pour déterminer  $I_{BS}$ .

#### 6. Détermination de la solubilité aqueuse apparente des amidons modifiés

Une solution saturée de chaque produit est préparée dans l'eau déminéralisée à température ambiante (21-22°C). Cette solution est mélangée pendant 1 h. Après 24 h de décantation, la saturation de la solution est confirmée visuellement par la présence de particules non dissoutes. Un volume précis de 10 mL de surnageant est prélevé, lyophilisé et pesé. La détermination de la solubilité aqueuse apparente est réalisée en triplicata pour chaque amidon modifié afin d'évaluer la répétabilité de la mesure (Rosu et al., 2013). La solubilité moyenne du triplicata est calculée et exprimée en g.L<sup>-1</sup>.

#### 7. Solubilisation du benzo[a]pyrène en présence d'amidons modifiés

Une solution de BaP est initialement préparée dans le DCM à une concentration de 40 mg.L<sup>-1</sup>. 375  $\mu$ L de cette solution sont introduits dans des tubes à hémolyse et placés dans une étuve à 60°C jusqu'à évaporation complète du solvant. 3 mL d'une solution aqueuse d'amidon à 0,45 g.L<sup>-1</sup> sont ajoutés dans les tubes à hémolyse. Parallèlement à ces solutions,

un témoin est préparé dans le but de mesurer la fluorescence du BaP en milieu aqueux. 3 mL d'eau déminéralisée sont donc introduits dans un tubes à hémolyse (Rosu et al., 2013). Les tubes sont incubés 24 h à l'obscurité. La fluorescence du BaP présent dans les solutions d'amidon est mesurée grâce à un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS B50, à une excitation de 295 nm, une émission de 406 nm et un temps d'intégration de 10 s (Veignie et al., 2009). La solubilisation du BaP est évaluée en triplicata pour chaque produit.

#### 8. Activité spécifiques des produits et la solubilité maximum du BaP

Pour chaque solution d'amidon modifié (0,45 g.L<sup>-1</sup>), l'activité spécifique (AS) de la solubilisation du BaP est calculée. L'AS représente la quantité de BaP solubilisé (en μg) par gramme d'amidon modifié. Ce paramètre permet de calculer, pour chaque produit obtenu, la quantité théorique maximale de BaP solubilisé par l'équation suivante :

Solubilisation maximale de BaP = Activité spécifique X Solubilité aqueuse apparente Eq (2)

#### 9. <u>Détermination de la concentration micellaire critique par spectroscopie de</u> <u>fluorescence</u>

#### 9.1. Préparation de la solution de Nile Red

Une solution mère de NR est préparée dans l'éthanol à 0,318 g.L<sup>-1</sup>. 500  $\mu$ L de cette solution sont dilués dans 50 mL d'eau déminéralisée afin d'obtenir une solution final à 3,18 mg.L<sup>-1</sup> (Bigot et al., 2010).

#### 9.2. Préparation des solutions d'amidons

Pour la solution mère de nanosphères d'amidon à 10 g.L<sup>-1</sup>, 100 mg d'amidon sont dilués dans 10 mL de solution de NR préalablement préparée. Cette solution permet de réaliser une gamme de concentrations de l'amidon dans le NR (concentration finale d'amidon : 0,000 - 0,001 - 0,003 - 0,010 - 0,032 - 0,083 - 0,100 - 0,178 - 0,316 - 0,450 - 1,000 - 1,580 - 2,500 g.L<sup>-1</sup>).

#### 9.3. <u>Détermination de la concentration micellaire critique</u>

La fluorescence du NR encapsulé dans les nanosphères d'amidon est mesurée grâce à un spectrophotomètre de fluorescence Varian Cary Eclipse, à une excitation de 530 nm, une émission de 625 nm et un temps d'intégration de 10 s (Bigot et al., 2010). La CMC est déterminée graphiquement par l'intersection des deux tangentes obtenues.

#### 10. Etude de l'encapsulation du benzo[a]pyrène par les nanosphères d'amidon

#### 10.1. <u>Evaluation de l'encapsulation dune solution aqueuse de benzo[a]pyrène par</u> <u>les nanosphères d'amidon.</u>

L'objectif est d'étudier l'encapsulation du BaP présent en solution par les nanosphères d'amidon. Nous appliquons le même principe que pour la détermination de la CMC par le NR, une solution de BaP et des solutions d'amidon à différentes concentrations sont tout d'abord préparées.

Une solution mère de BaP est préparée dans le MeOH à 0,4 g.L<sup>-1</sup>. 666  $\mu$ L de cette solution sont dilués dans 20 mL de MeOH afin d'obtenir une solution intermédiaire à 13,3 mg.L<sup>-1</sup>. 125  $\mu$ L de cette solution sont dilués dans 50 mL d'eau déminéralisée afin d'obtenir une solution final à 33,3  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>.

Pour la solution mère de nanosphères d'amidon à 2,5 g.L<sup>-1</sup>, 62,5 mg d'amidon sont dilués dans 25 mL de solution de BaP préalablement préparée. Différentes dilutions de la solution mère d'amidon sont effectuées (entre 0,001 et 2,500 g.L<sup>-1</sup>) avec la solution de BaP.

La fluorescence du BaP présent dans les solutions d'amidon est mesurée grâce au spectrofluorimètre Varian Cary Eclipse, comme décrit précédemment.

# 10.2. <u>Evaluation de la solubilisation du benzo[a]pyrène adsorbé en fonction de la concentration en nanosphères d'amidon</u>

375 μL d'une solution BaP-DCM (40 mg.L<sup>-1</sup>) sont introduits dans un tube à hémolyse. Après l'évaporation complète du solvant, 3 mL de solution aqueuse d'amidon sont ajoutés à différentes concentrations : entre 0,002 et 20 g.L<sup>-1</sup>. Les tubes sont incubés pendant 24 h à l'obscurité, à température ambiante. La fluorescence du BaP présent dans les solutions d'amidon est mesurée grâce à un spectrofluorimètre (5.1). Chaque concentration en amidon est évaluée en duplicata. Les valeurs obtenues permettent de déterminer la quantité de BaP solubilisée en fonction de la concentration en amidon utilisée (Veignie et al., 2009).

#### 11. Observation des amidons en microscopie

#### 11.1. <u>Microscopie photonique</u>

Les images de microscopie photonique sont réalisées à l'aide d'un microscope Axiostar plus HB050 et d'un appareil photo numérique (Canon Power Shot A640).

#### 11.2. Microscopie confocale

Les images de microscopie confocale sont réalisées en collaboration avec l'équipe INSERM U1003 de Lille (France). L'appareil utilisé est un microscope confocal à balayage laser LSM 780 (Zeiss, Le Pecq, France) connecté à un statif inversé motorisé AxioObserver Z1 comprenant un objectif de contraste en interférence de phase (Plan-Apochromat X40/1,3 oil). Les différents canaux sont excités et collectés séparément en mode "line scan". Les mêmes conditions instrumentales sont utilisées au cours des différentes expériences.

#### 11.3. Miscroscopie électronique à transmission

Les analyses en microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées en collaboration avec l'équipe INSERM U1003 de Lille (France). Une goutte de solution diluée d'amidon est déposée sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone puis séchée à l'air. L'échantillon est coloré négativement par l'acétate d'uranyle (à 2 %), ce qui permet d'observer les nanosphères d'amidon qui apparaissent blanches sur un fond noir.

#### **Résultats et Discussion**

#### 1. <u>Conditions expérimentales</u>

Les synthèses sont inspirées des recherches réalisées précédemment au sein de notre équipe (Rosu et al., 2013). Dans le but d'optimiser les conditions de synthèse, différents paramètres sont testées : prétraitement de l'amidon natif, température de synthèse, rapport DMSO/H<sub>2</sub>O et BS/AGU (Tableau I 1).

#### 1.1. Prétraitement des amidons natifs

Le prétraitement est une condition nécessaire pour l'optimisation de la réactivité moléculaire de l'amidon. En effet, le but du prétraitement est de désorganiser la structure cristalline des molécules d'amidon et par conséquent d'améliorer leur réactivité, en favorisant une distribution la plus homogène possible des substituants greffés sur les polymères d'amidon (Richardson and Gorton, 2003). Cette étape de prétraitement correspond au procédé de gélatinisation.

La gélatinisation de l'amidon est une étape majeure pour de nombreux procédés industriels. La définition du terme de gélatinisation est assez controversée dans la littérature. Dans cette étude, nous nous basons sur la définition d'Atkin et al. (1998) et de Ratnayake and Jackson (2007). La gélatinisation est donc définie comme étant la perte de la structure semi-cristalline (Figure I 4) et le gonflement simultané des grains d'amidon (Debet and Gidley, 2007) (Figure I 4 : Etapes 1 à 3) conduisant à la dispersion complète des polymères d'amidon (Figure I 4 : étapes 1 à 5).



Figure I 4. Illustration hypothétique du phénomène de gélatinisation et de formation de résidus fantômes (Debet and Gidley, 2007; Ratnayake and Jackson, 2007; Miao et al., 2010)

La plupart des procédés de gélatinisation se déroule en présence d'excès d'eau à des températures de gélatinisation (Parada and Aguilera, 2012). La gélatinisation de l'amidon peut également se produire à température ambiante nécessitant cependant la présence de certains produits chimiques tels que les électrolytes, le DMSO ou l'urée (Yamamoto et al., 2013). Le traitement physique par ultrasons peut aussi être utilisé pour la dispersion des grains d'amidon natif (lida et al., 2008; Cheng et al., 2010). Dans cette partie, nous avons testé plusieurs de ces méthodes.

#### 1.1.1. Gélatinisation de l'amidon natif en présence de solvant

La première étape de la synthèse des amidons difonctionnalisés consiste à disperser l'amidon natif. En raison de la très faible solubilité des amidons natifs dans l'eau à température ambiante, l'amidon est dans un premier temps dissous dans un mélange DMSO/eau/NaOH pendant 24 h.

Le DMSO est un solvant très utilisé dans la chimie de l'amidon car il est l'un des rares à solubiliser facilement l'amidon (Jackson, 1991). En effet, le DMSO est un puissant accepteur de liaisons hydrogènes, cassant les liaisons hydrogènes formées entre les polymères d'amidon et entre les molécules d'eau et d'amidon (Cooreman et al., 1995). Cependant, pour une dispersion efficace de l'amidon, il est connu que l'ajout d'une petite quantité d'eau améliore la solubilisation de l'amidon dans le DMSO (Shon et al., 2005). En effet, Leach et

Schoch (1962) démontrent qu'à température ambiante, 90 % des grains d'amidon de maïs sont solubilisés dans les 20 premières heures. Durant les 30 heures suivantes, la solubilisation complète des amidons est atteinte. Ces auteurs rapportent également que la présence d'une petite quantité d'eau (entre 2 et 17 %) permet d'augmenter considérablement la capacité du DMSO à solubiliser les grains d'amidon natif. Après 20 h d'agitation, l'amidon de maïs est ainsi soluble à plus de 95 % quand le pourcentage de DMSO dans l'eau se situe entre 83-98 %.

Selon Chamberlain et Rao (1999), les deux hydroxyles impliqués dans les deux liaisons intermoléculaires d'hydrogène peuvent se complexer avec le DMSO, ce qui entraînerait la dispersion de l'amidon dans ce solvant. De plus, l'ajout d'une petite quantité d'eau est nécessaire pour empêcher temporairement le gonflement rapide des grains d'amidon. Sans ce ralentissement du gonflement, une couche de gel se formerait à la surface du grain qui empêcherait le DMSO de pénétrer dans tout le grain et ayant pour conséquence une dispersion incomplète de l'amidon (Figure I 5) (Chamberlain and Rao, 1999; Shon et al., 2005).



Figure I 5. Illustration de la gélatinisation du grain d'amidon en présence de DMSO et d'un mélange DMSO/eau (Shon et al., 2005)

Dans nos expérimentations, ce procédé de prétraitement est optimisé sur l'amidon natif de pomme de terre. Dans un second temps, le prétraitement est intégré dans le protocole de synthèse d'amidons modifiés et ces amidons sont observés au microscope photonique.

#### 1.1.1.1. Optimisation du protocole de prétraitement

Pour l'optimisation du protocole de prétraitement, deux paramètres sont pris en compte : la séquence d'addition des solvants et la quantité de soude.

Deux ordres d'ajouts des solvants sont testés et nommés respectivement A et B. Pour l'ordre A, 1 g de **P0** est tout d'abord placé dans un ballon et 5 mL d'eau sont ensuite ajoutés sous agitation. Puis, une quantité connue de soude (1,25, 2,50 et 5,00 mmoles) sont ajoutées. Enfin, 20 mL de DMSO sont additionnés au milieu.

L'ordre B diffère de l'ordre A par l'ajout du DMSO avant l'eau et le NaOH. Pour l'ordre B, deux quantités de soude sont testées : 2,50 et 5,00 mmoles.

Au total, cinq produits d'amidon natif prétraité sont obtenus. L'homogénéité des différentes solutions d'amidon natif de pomme de terre prétraité (**P0\***) est évaluée après 24 h par un contrôle visuel au microscope photonique (Figure I 6).



Figure I 6. Images en microscopie photonique des grains d'amidon natif de pomme de terre (**P0**) obtenus au bout de 24 h selon deux prétraitements (X 160). Prétraitement A : Eau, NaOH et DMSO avec des quantités variables en NaOH : **A1** : 1,25 mmoles de NaOH, **A2** : 2,50 mmoles NaOH, **A3** : 5,00 mmoles NaOH. Prétraitement B : DMSO, eau et NaOH avec des quantités variables de NaOH : **B1** : 2,50 mmoles NaOH, **B2** : 5,00 mmoles NaOH

La Figure I 6 montre que l'ordre d'ajout des solvants joue un rôle sur la dispersion des grains d'amidon. Lorsque l'eau et la soude sont d'abord ajoutées dans le milieu (ordre A), la dispersion des grains d'amidons est observée (Figure I 6 : A2 et A3) contrairement à l'ordre B où les grains semblent rester intacts (Figure I 6 : B1 et B2). Quand le DMSO est directement mis au contact des grains d'amidons (ordre B), ces derniers restent entiers après 24 h de prétraitement et un contour noir autour des grains est observé (Figure I 6 : B1 et B2). Ce contour noir correspondrait à la formation d'un gel à la surface des grains. Ce gel protégerait la structure granulaire, empêchant le DMSO de pénétrer à l'intérieur du granule et entraînerait une dispersion incomplète des grains d'amidon (Shon et al., 2005). Par conséquent, il est indispensable d'ajouter l'eau et NaOH avant le DMSO.

Pour obtenir une dispersion optimale, il est également nécessaire d'ajouter une quantité de soude suffisante. En effet, des grains d'amidon intacts peuvent être observés sur la photographie A1 de la Figure I 6 pour 1,25 mmoles de NaOH. Ainsi, l'ajout d'une quantité de NaOH supérieure à 1,25 mmoles est nécessaire pour disperser totalement les grains d'amidon. Pour la suite de l'étude, une quantité totale de 2,50 mmoles de NaOH sera donc utilisée dans l'étape de prétraitement des amidons natifs.

#### 1.1.1.2. Observation des amidons après prétraitement

La Figure I 7 montre les images en microscopie photonique des grains de **PO** et de **MO** ainsi que leur forme difonctionnalisée.



Figure I 7. Images d'amidons en microscopie photonique (x160). A : grains d'amidon natif de pomme de terre, B : grains d'amidon natif de maïs cireux, C : amidons de maïs cireux difonctionnalisés

Les structures granulaires de **P0** et de **M0** montrent des variations significatives de taille et de forme. Boursier (2005) a fait des observations similaires. En effet, les grains d'amidon de pomme de terre présentent une forme lisse, ovale dite ellipsoïdale (Figure I 7.A) tandis que les granules d'amidon de maïs cireux ont des formes plus angulaires (Figure I 7.B). Concernant la modification de ces amidons, il semble que les grains d'amidon de pomme de terre aient été entièrement dispersés lors du processus de synthèse. Ce processus, comprenant l'étape de prétraitement optimisée ci-dessus et l'étape de greffage des substituants, permet pour cette étude d'obtenir un produit homogène. Il n'en est pas de même pour l'amidon de maïs cireux modifié car la présence de résidus est observée (Figure I 7.C). Ces résidus sont communément appelés « résidus fantômes ». Ils sont constitués d'un mélange hétérogène de débris de l'enveloppe des grains d'amidon (Figure I 4. Etape 4 et 5). (Debet and Gidley, 2007). Cette différence observée entre les deux amidons étudiés montre que les propriétés présentées par l'amidon lors de gélatinisation sont régies par plusieurs facteurs, y compris la taille des granules et leur forme (Ratnayake and Jackson, 2008).

Le principal mécanisme de formation des résidus fantômes se déroule pendant la gélatinisation (Paes et al., 2008) (Figure I 4). En effet, la formation des résidus fantômes va dépendre principalement du résultat de la compétition entre la vitesse du gonflement des grains d'amidon et celle du réarrangement intramoléculaire des liaisons hydrogènes (réticulation). Ainsi, lorsque le gonflement granulaire est très rapide et important comme pour les grains de pomme de terre, le temps nécessaire pour la formation de liaisons réticulées est trop court pour aboutir à une structure résistante de résidus fantômes. A contrario, le gonflement des grains d'amidons de blé et de maïs est plus lent ce qui laisse suffisamment de temps à la formation des liaisons réticulées (Atkin et al., 1998; Debet and Gidley, 2007; Miao et al., 2010). Ainsi, les caractéristiques des résidus fantômes diffèrent en fonction de l'origine botanique de l'amidon, ce qui explique la différence observée entre les deux amidons testés dans cette étude (Figure I 7).

La présence de ces résidus fantômes au sein des amidons modifiés de maïs cireux pourrait gêner la solubilisation de l'amidon en phase aqueuse à température ambiante (Debet and Gidley, 2007; Paes et al., 2008). Pour pallier à ce problème, un protocole supplémentaire de dispersion des amidons natifs, en particulier pour l'amidon de maïs cireux, est élaboré dans le cadre de ce travail. Ce protocole est appliqué en amont de la synthèse.

50

#### 1.1.2. Protocoles de pré-gélatinisation des amidons natifs

Deux méthodes de pré-gélatinisation de l'amidon sont testées. La première méthode est le procédé thermique. La plupart des phénomènes de gélatinisation étudiés se produisent dans un excès d'eau à température de gélatinisation. Ainsi, à l'intérieur des granules d'amidon, les liaisons hydrogènes formées entre les macromolécules sont détruites par les fluctuations thermiques et l'augmentation de la mobilité des molécules d'eau par chauffage. L'ensemble conduit à perturber l'intégrité structurale des grains d'amidon, entrainant leur gonflement et la disparition des zones cristallines (Yamamoto et al., 2013). La température de dispersion complète de l'amidon de pomme de terre utilisée dans cette étude est 75°C (Ratnayake and Jackson, 2007). A cette température, les grains d'amidon de maïs cireux sont partiellement dispersés et la présence de beaucoup de résidus fantômes est observée (Miao et al., 2010). Ainsi, nous nous plaçons à la température de gélatinisation de l'amidon de maïs cireux, à 95°C.

En parallèle à ce traitement de base, la méthode de dispersion des grains d'amidon par ultrasons est également testée dans ce travail. Les ultrasons sont largement utilisés lors de la dernière décennie dans de nombreux procédés de l'industrie alimentaire (Jambrak et al., 2010). Le traitement par ultrasons de l'amidon a été effectué pour la première fois en 1933 par Szent-Gyergi (lida et al., 2008). Depuis, de nombreux chercheurs ont montré que ce traitement a des effets importants sur les propriétés physiques des amidons en suspension. En effet, la dispersion des amidons aux ultrasons a pour effet une augmentation de la solubilité aqueuse de l'amidon, une amélioration du pouvoir de gonflement et d'adsorption de l'eau. La viscosité des solutions d'amidon est aussi grandement diminuée (Bel Haaj et al., 2013). Enfin, les ultrasons provoquent également une déformation des régions cristallines facilitant la désintégration du grain (Cheng et al., 2010; Jambrak et al., 2010).

Le Tableau I 2 montre le pourcentage d'amidon natif solubilisé après différents traitements de dispersion

51

Produit	Température (°C)	Surnageant (%)	
Traitement thermique			
Pt <sup>a</sup>	75	92,0	
Mt <sup>b</sup>	95	3,4	
Traitement par ultrasons			
Pus <sup>c</sup>	20-80	60,6	
Mus <sup>d</sup>	20-80	94,0	

Tableau I 2. Caractéristiques des différentes méthodes de dispersion des amidons natifs et le pourcentage d'amidon soluble dans l'eau

a : Pt = Amidon natif de pomme de terre gélatinisé dans l'eau à 70°C pendant 30 min

b : Mt = Amidon natif de maïs cireux gélatinisé dans l'eau à 95°C pendant 30 min

c : Pus = Amidon natif de pomme de terre dispersé par ultrasons

d : Mus = Amidon natif de maïs cireux dispersé par ultrasons

Le traitement thermique semble être plus efficace pour disperser l'amidon de pomme de terre comparé au traitement physique par ultrasons. En effet, presque la totalité de l'amidon de pomme de terre est solubilisée (92,0 %) alors qu'une perte significative de matière est constatée pour le traitement par ultrasons (60,6 %).

Pour la dispersion de l'amidon de maïs cireux, le traitement par ultrasons est la méthode la plus efficace. En effet, 94,0 % d'amidon dispersé sont obtenus contre 3,4 % pour le traitement thermique. Cependant, nous nous sommes heurtés à des problèmes de répétabilité du prétraitement des amidons de mais cireux. La mise au point de ce prétraitement prometteur nécessite une étude plus approfondie. Des synthèses préliminaires d'amidons difonctionnalisés ont été cependant menées sur l'amidon natif. Les premiers produits obtenus sont complètement insolubles dans l'eau. Compte tenu des difficultés rencontrées et du temps nécessaire pour mettre au point les synthèses d'amidon modifié, nous avons préféré focaliser nos recherches sur **P0**.

#### 2. Etude des amidons modifiés de pomme de terre

L'objectif de cette partie est de synthétiser des amidons difonctionnalisés par la BS et l'OSA. Les synthèses sont réalisées sur l'amidon natif de pomme de terre (**PO**) et l'amidon natif de pomme de terre prétraité (**PO\***). Dans le but d'obtenir un produit ayant le bon équilibre entre les caractères hydrophobes et hydrophiles, différents paramètres de synthèses ont été testés. Pour chaque produit obtenu, le rapport apparent (R) entre les groupements OS et BS greffés est déterminé par spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H. Les amidons modifiés sont ensuite évalués pour leur solubilité aqueuse apparente et leur capacité à solubiliser dans l'eau un polluant hydrophobe le BaP, notre modèle d'HAP.

#### 2.1. Caractérisation des structures moléculaires des amidons par RMN

Rappelons que l'amidon est principalement composé de simples résidus de glucose, cependant il possède une structure moléculaire et supramoléculaire extrêmement complexe. Sa complexité se démontre sur 6 échelles de grandeur allant des macromolécules (nanomètres) aux granules d'amidon (millimètres) (Figure I 8).





Cette complexité structurale donne des propriétés fonctionnelles uniques pour chaque type d'amidon mais rend son analyse difficile.

L'objectif de cette étude est de synthétiser des amidons difonctionnalisés par la BS et l'OSA. La structure chimique des produits obtenus est caractérisée par RMN <sup>1</sup>H. D'après la littérature, la RMN est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour la caractérisation des amidons (Schmitz et al., 2009; Tizzotti et al., 2011). De plus, cette technique est disponible au sein du laboratoire de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque).

Dans cette partie, nous ne présentons qu'un spectre RMN <sup>1</sup>H de l'amidon sulfobutylé et un spectre de l'amidon difonctionnalisé puisque seules les intégrations des pics correspondant aux protons des produits greffés varient d'une synthèse à l'autre.

#### 2.1.1. Amidon natif de pomme de terre

Dans un premier temps, la structure moléculaire de **P0** est étudiée par RMN <sup>1</sup>H dans le  $D_2O$  et dans le DMSO (Figure I 9).



Figure I 9.A. Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, 25°C) 400 MHz de l'amidon natif de pomme de terre (**P0**) dans le DMSO-d6. B. Spectre RMN <sup>1</sup>H de l'amidon natif de pomme de terre dispersé (**P0**\*) dans le  $D_2O$ 

La Figure I 9.B présente le spectre RMN <sup>1</sup>H de **P0\*** dans le D<sub>2</sub>O, montrant les déplacements chimiques des différents protons spécifiques au résidu de glucose. Le spectre RMN <sup>1</sup>H de l'amidon natif est caractérisé par un large et complexe signal de résonance de proton situé entre 3,50 et 4,20 ppm, correspondant aux protons H<sub>2</sub>-H<sub>6</sub>. Les signaux à 4,98 et à 5,41 ppm sont spécifiques aux déplacements chimiques des protons anomériques correspondant respectivement aux liaisons internes  $\alpha$  1-6 et  $\alpha$  1-4 (De Graaf et al., 1995; Gaborieau et al., 2009).

Le spectre de **P0** dans le DMSO-d6 (Figure I 9.A) a une résolution médiocre comparé au spectre de **P0\*** effectué dans le  $D_2O$  (Figure I 9.B). Cependant, nous pouvons constater que le spectre de l'amidon natif dans le DMSO-d6 présente des résonances supplémentaires.

En effet, ces résonances invisibles dans le  $D_2O$  correspondent aux protons des hydroxyles présents sur la structure de l'AGU. Le signal à 4,61 ppm correspond au proton de la fonction hydroxyle situé en position 6. Le massif compris entre 5,40 et 5,70 ppm est typique des groupements hydroxyles en position 2 et 3 (Zhang et al., 2013). Les pics correspondants aux protons  $H_{\alpha 1-4}$  et  $H_{\alpha 1-6}$  sont plus difficilement interprétables du fait de la présence des trois protons OH dans la même région présentant des larges signaux liés aux protons labiles des groupements hydroxyles (Tizzotti et al., 2011).

#### 2.1.2. Caractérisation de l'amidon modifié

Après l'étape de sulfobutylation de l'amidon, un aliquote du milieu réactionnel est dialysé et lyophilisé pour l'analyse par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. La Figure I 10 présente le spectre RMN <sup>1</sup>H de l'amidon sulfobutylé dans le  $D_2O$ .



Figure I 10. Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C) de l'amidon sulfobutylé

Par rapport au spectre RMN <sup>1</sup>H de **PO\*** (Figure I 9.B), ce spectre indique clairement l'apparition de larges signaux de résonance dans la région 1,50-3,50 ppm attribués aux groupements sulfobutyles greffés. En effet, les pics à 1,70-1,95 ppm résultent des quatre protons de  $(CH_2)_B$  et  $(CH_2)_C$  tandis que le large triplet à 2,96 ppm est attribué aux protons de  $(CH_2)_A$  de BS (Qu et al., 2002). L'autre pic spécifique à BS sort dans le massif compris entre 4,20 et 3,50 ppm pour les H du  $(CH_2)_D$ . Sur le spectre de l'amidon sulfobutylé, un petit pic aux alentours de 5,8 ppm est également observé, correspondant aux groupements sulfobutylés greffés sur l'extrémité réductrice des chaînes (Tizzotti et al., 2011). A la fin de la réaction, les spectres RMN des dérivés d'amidon modifié sont enregistrés dans le  $D_2O$  à température ambiante. Cependant, les pics sont trop larges et impossibles à exploiter (Figure I 11).



Figure I 11. Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C) de l'amidon difonctionnalisé P1\*

Par conséquent, les spectres sont enregistrés à 60°C selon Gidley (1985). La Figure I 12.A présente le spectre RMN de **P1\*** réalisé dans le  $D_2O$  à 60°C.



Figure I 12. Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ,60°C) de l'amidon difonctionnalisé **P1\*** réalisé dans le D<sub>2</sub>O. B. Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ,60°C) de **P1\*** dans le DMSO-d6

Aux alentours de 1.67 ppm, nous retrouvons le groupement  $(CH_2)_B$  spécifique de la fonction alkyle de la BS. Les autres pics caractéristiques de la BS sortent entre 2 et 3 ppm. L'amidon modifié par l'OS est confirmé par l'apparition d'un pic à 0,89 ppm, incluant les trois protons du groupe méthyle terminal  $(CH_3)_a$  de la chaine alkyl de l'OS (Figure I 12.A). Les autres pics spécifiques à l'OSA CH et  $(CH_2)_n$  sont attribués de la façon suivante : 1,30 ppm pour  $(CH_2)_{b-d}$ ; 2,00 ppm pour  $(CH_2)_e$  et entre 2,13 à 2,95 ppm pour  $(CH)_i$ ,  $(CH_2)_h$  and j (Zhang et al., 2013). R est déterminé par l'intégration des pics de 0,89 ppm et 1,70-1,95 ppm.

Selon la solubilité aqueuse apparente des amidons obtenus, certains spectres sont enregistrés dans le DMSO-d6. Afin de vérifier que le solvant n'a pas d'influence sur l'intensité des pics, un spectre RMN <sup>1</sup>H de **P1\*** est enregistré dans le DMSO-d6 à 60°C (Figure I 12.B). L'ensemble des signaux spécifiques aux déplacements chimiques des protons de la BS et de l'OS est de nouveau identifié. Les intégrations des pics correspondant aux protons (CH<sub>3</sub>)<sub>a</sub> des résidus alkyles de l'OS et des protons (CH<sub>2</sub>)<sub>B-C</sub> des résidus alkyles de la BS sont identiques à celles déterminées dans le D<sub>2</sub>O.

D'après Tizzoti et al. (2011), la présence des nombreux groupements hydroxyles différents peuvent parfois compliquer l'interprétation des spectres RMN <sup>1</sup>H enregistrés dans le DMSO-d6. Les protons labiles des fonctions alcools ou tout autre groupe contenant des protons échangeables présentent généralement de larges signaux qui peuvent masquer d'autres pics d'intérêt. Dans cette étude, les spectres d'amidon difonctionnalisé obtenus dans le DMSO-d6 présentent ce problème (Figure I 12.B). Les déplacements chimiques des trois protons OH se retrouvent dans la même région que celui du proton H<sub>1</sub> anomérique. De ce fait, l'intégration correcte du pic correspondant au proton anomérique est rendue extrêmement difficile. Les calculs des degrés de substitution et des degrés de branchement n'ont donc pas été réalisés.

De plus, la méthode de RMN utilisée en routine (voir partie 5 du matériels et méthodes) ne permet pas d'obtenir des spectres RMN <sup>1</sup>H quantitatifs, quel que soit le solvant utilisé.

Compte tenu de l'ensemble de ces facteurs, nous avons choisi délibérément de comparer qualitativement les produits obtenus en fonction de leur valeur apparente de R. Rappelons que R détermine le rapport apparent entre les substituants OS et BS greffés.

57

#### 2.2. <u>Solubilité aqueuse apparente</u>

Pour chaque produit obtenu, la solubilité aqueuse ainsi que R des dérivés d'amidons sont exprimés dans le Tableau I 3. De manière générale, excepté pour **P3**, **P4** et **P5**, la solubilité aqueuse apparente des amidons modifiés de pomme de terre diminue avec l'augmentation du greffage d'OS.

Produit	Solubilité aqueuse apparente (g.L <sup>-1</sup> )	R
P0	0,35 (± 0,07)	0,00
P1	1,41 (± 0,07)	5,78
P1*	1,33 (± 0,19)	9,78
P2	3,50 (± 0,13)	2,78
P3	28,00 (± 0,28)	0,00
P4	47,74 (± 0,47)	0,00
P5	21,7 (± 0,27)	0,00
P6	8,45 (± 0,14)	0,01
P7	0,75 (± 0,04)	13,21
P8	3,87 (± 0,11)	2,53

Tableau I 3. Caractéristiques des amidons difonctionnalisés de pomme de terre

En comparaison avec l'ensemble des produits obtenus, **P3**, **P4** et **P5** sont caractérisés par une solubilité aqueuse apparente élevée, supérieure à 28,00 g.L<sup>-1</sup>. Les spectres RMN <sup>1</sup>H de ces produits montrent que seule la BS a été greffée (Figure I 13). Les conditions réactionnelles de **P3**, **P4** et **P5** permettent de greffer uniquement la BS, ce qui pourrait donc expliquer leur solubilité aqueuse très élevée (80 à 137 fois plus grande que **P0**). D'après, Rogmann, Seidel, & Mischnick (2000), la sulfobutylation de la ß-cyclodextrine par la BS donne des produits solubles dans l'eau en raison du caractère ionique des résidus d'acides sulfoniques. Rosu et al., (2013) ont également synthétisé des amidons modifiés par la BS ayant une solubilité aqueuse 60 fois plus grande que l'amidon natif. Pour les produits **P3**, **P4** et **P5**, le protocole d'éthérification de l'amidon par la BS s'est inspiré des travaux de Blach (2005). Contrairement aux autres produits synthétisés, la réaction s'est déroulée dans 5 mL d'eau déminéralisée à 70°C et en présence d'un excès de soude pendant 24 h (Tableau I 1). Par la suite, 5 mL de DMSO suivi de l'OSA ont été additionnés dans le milieu. Les paramètres solvant, température et soude ont ainsi favorisé le greffage de la BS au détriment du

greffage de l'OS, en raison du faible nombre d'OH restant disponibles et de l'encombrement stérique.



Figure I 13. Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz,  $D_2O$ , 25°C) des amidons monofonctionnalisés A : **P4** ; B : **P3** et C : **P5** 

**P6** possède une très faible valeur de R (0,01) proche de celles des amidons monofonctionnalisés (**P3 P4** et **P5**). Cependant, sa solubilité apparente aqueuse diminue radicalement à 8,45 g.L<sup>-1</sup>. Au niveau des paramètres de synthèse, **P6** diffère uniquement de **P5** par la proportion de BS/AGU ajoutée dans le milieu réactionnel (Tableau I 1). En effet, la quantité de BS utilisée pour **P6** est trois fois moins importante que pour **P5**. Dans ces conditions, une petite quantité d'OS a été greffée. La faible présence d'OS greffé pourrait expliquer la diminution de sa solubilité aqueuse.

Pour la réalisation de la synthèse de **P1\***, l'amidon natif de pomme de terre dispersé par traitement thermique est utilisé comme matière première. **P1\*** diffère de **P1** par l'utilisation d'amidon préalablement dispersé. Cette étape de dispersion n'a pas conféré au produit obtenu de meilleures propriétés. En effet, la solubilité aqueuse apparente de **P1\*** est aussi faible que celle de **P1**. La première étape de la synthèse consistant à solubiliser l'amidon natif dans les solvants est donc suffisante pour disperser efficacement l'amidon et
obtenir un milieu réactionnel homogène. Pour cette raison, l'étape de prétraitement thermique de **PO** n'a plus été utilisée pour les synthèses suivantes.

Pour P2, la quantité de BS initialement ajoutée dans le milieu est deux fois plus importante que celle utilisée pour la synthèse de P1 (Tableau I 1). Les rapports apparents R de P2 (2,78) et de P1 (5,78) permettent de constater que les paramètres de réaction de P2 sont plus efficaces pour le greffage de BS que ceux utilisés pour P1. Cette augmentation du greffage de BS a pour conséquence l'augmentation de la solubilité aqueuse apparente du produit. Ainsi, P2 présente une solubilité aqueuse apparente 2,5 fois plus élevée que celle de P1.

**P7** et **P8** ont été obtenus après une réaction en « one pot ». **P7** possédant un R élevé en corrélation avec un greffage d'OS élevé, montre une importante diminution de la solubilité aqueuse. **P8** diffère de **P7** par la température de réaction et ce paramètre semble influencer les propriétés de l'amidon obtenu. En effet, **P8** présente une solubilité aqueuse apparente 5 fois plus élevée que celle de **P7**. La diminution d'OS greffé sur **P8** est en relation avec le greffage important de BS, un groupe alkyl présentant un groupement polaire plus soluble dans le solvant que l'OSA. Dans les conditions de réaction de **P8**, BS pourrait être un meilleur compétiteur qu'OSA pour le greffage sur les OH de l'AGU.

De manière générale, les produits (**P1**, **P1\***, **P2**, **P7**, **P8**) ont une solubilité dans l'eau inférieure à 4 g.L<sup>-1</sup> qui pourrait être expliquée par la forte présence d'OS greffé sur l'amidon (R > 2.53).

Pour optimiser la sélection des meilleurs produits synthétisés, ces derniers sont évalués vis-à-vis d'un critère supplémentaire : la capacité des amidons à désorber et à solubiliser efficacement le BaP dans l'eau. En effet, notre stratégie de synthèse vise à obtenir un produit répondant aux deux critères suivants : une solubilité aqueuse et une capacité à solubiliser le BaP importantes. Ces deux critères sont ainsi confrontés dans la suite de l'étude.

# 2.3. <u>Solubilité apparente des amidons modifiés vs solubilisation aqueuse du</u> <u>benzo[a]pyrène</u>

La Figure I 14 illustre la solubilité aqueuse apparente des dérivés d'amidon versus la solubilité du BaP. Les amidons modifiés peuvent être classés en 3 groupes, marqués de I à III, selon ces deux paramètres.



Figure I 14. Relation entre la solubilité aqueuse apparente (g.L<sup>-1</sup>) et la solubilisation du BaP (μg.L<sup>-1</sup>) pour les produits d'amidon synthétisés

L'amidon natif de pomme de terre **PO** est caractérisé par une très faible solubilité dans l'eau et également une faible capacité à désorber le BaP (6.75  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>).

Le groupe I est composé de quatre produits (**P3**, **P4**, **P5**, **P6**) caractérisés par une solubilité aqueuse apparente élevée, 24 à 136 fois plus grande (> à 8 g.L<sup>-1</sup>) que celle de **P0** et une très faible efficacité à désorber le BaP (< à 10  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>). Comme expliqué précédemment (partie 3.2.), ces composés sont fortement alkylés par le substituent BS qui permet d'augmenter leur caractère hydrophile. Cependant, ils ne sont pas ou très faiblement substitués par l'OS, limitant ainsi leur capacité à solubiliser le BaP. Les conditions de réaction de ces produits, en particuliers celles de **P4**, ont permis d'obtenir des dérivés d'amidon 2 fois plus solubles dans l'eau (47,74 g.L<sup>-1</sup>) que ceux obtenus par Rosu et al. (2013) (20,63 g.L<sup>-1</sup>).

Le groupe II regroupe trois produits (**P1**, **P1\*** et **P7**) qui présentent de grandes capacités à désorber le BaP (> à 244  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>) et une faible solubilité dans l'eau (< à 1.5 g.L<sup>-1</sup>). En comparaison avec la solubilité du BaP dans l'eau (3,00  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>) ou en présence de **P0**, ces produits d'amidon sont capables de stimuler jusqu'à 93 fois la solubilisation aqueuse du BaP soulignant leur propriétés tensioactives élevées. Ainsi, les modifications de l'amidon par l'OSA stimule ses propriétés hydrophobes et par conséquent son efficacité à désorber le BaP, un modèle de polluant hydrophobe. Cependant, plus l'OS est greffé, moins les produits

obtenus sont solubles. Remarquons que **P1**<sup>\*</sup> a une très forte capacité à désorber le BaP en phase aqueuse (278,38  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>), deux fois plus efficace que les produits d'amidon obtenus lors des études précédentes au sein de l'équipe (Rosu et al., 2013).

Le groupe III contient deux produits, **P2** et **P8**, caractérisés par un R similaire ainsi qu'une solubilité aqueuse apparente comparable (Tableau I 3). La solubilité aqueuse de ces produits est dix fois plus importante que celle de **P0** (0,35 g.L<sup>-1</sup>). **P8** est caractérisé par une capacité intermédiaire à désorber le BaP (88,69 µg.L<sup>-1</sup>). Ce produit, présentant à la fois des propriétés hydrophobes et hydrophiles intermédiaires, pourrait être considéré comme un bon compromis. De même, **P3** stimule 77 fois la solubilisation aqueuse du BaP (232,97 µg.L<sup>-1</sup>) soulignant sa très grande propriété tensioactive. **P3** correspond aux deux critères requis pour obtenir une matrice d'amidon modifié optimisée pour la solubilisation du BaP.

#### 2.4. Etude de la désorption du BaP par les amidons modifiés

La Figure I 15 montre la solubilisation du BaP en phase aqueuse en fonction des valeurs de R de chaque dérivé d'amidon.



Figure I 15. La solubilisation du BaP ( $\mu$ g.L<sup>-1</sup>) versus R (IOS/IBS) de chaque produit d'amidon synthétisé

**P3**, **P4**, **P5** and **P6** présentent de faible valeur de R. En effet, ces produits ne sont pas ou très faiblement substitués par OS et sont donc inefficaces pour désorber le BaP (Figure I 14 ; Tableau I 3). Ainsi, une quantité minimum d'OS greffé semble être nécessaire pour stimuler le transfert du BaP dans la phase aqueuse.

En revanche, **P1**, **P1\*** et **P7** sont caractérisés par une grande capacité à désorber le BaP entre 244 et 280  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>. La valeur de R de ces produits est entre 5,78 et 13,21. Dans les conditions de synthèses de ces produits, OS a été greffé avec succès.

La comparaison entre **P2** et **P8** est particulièrement intéressante pour la compréhension des rôles respectifs de BS et d'OSA. En effet, ces deux produits sont caractérisés par un R similaire (Tableau I 3). Mais, ils différent par leur capacité à solubiliser le BaP avec respectivement 232,97 and 88,69  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> (Figure I 14). La zone optimale visée du rapport I<sub>OS</sub>/I<sub>BS</sub> semble être très étroite pour obtenir les critères requis, en particulier pour l'obtention d'une capacité élevée à désorber le BaP. Si R est inférieur à 2,53, les dérivés d'amidons sont très solubles dans l'eau mais peu performants pour solubiliser le BaP. A l'opposé, si R était supérieur à 2,78, les produits obtenus sont faiblement solubles et ont une solubilisation du BaP élevée. Cependant, il est important de préciser que la solubilisation du BaP atteint une valeur limite, comme le montre la partie asymptotique de la sigmoïde de la Figure I 15. D'un point de vue structurel, la zone cible R (2,53 < R < 2,78) serait en corrélation avec une répartition optimale des greffages des substituants BS et OS, le long des structures macromoléculaires de l'amidon.

Par conséquent, il est nécessaire de trouver un bon compromis entre l'OS et le BS greffé pour obtenir un bon équilibre entre les propriétés hydrophobe et hydrophile des amidons modifiés. Nos résultats montrent que les quantités greffés d'OS et de BS ont été fortement influencés par les conditions de réaction. En effet, l'éthérification de l'amidon par la BS est plus efficace avec une solution aqueuse de NaOH utilisée comme solvant, tandis que l'estérification de l'amidon avec l'OSA est plus performante dans une solution de DMSO. Par ailleurs, l'estérification de l'OSA pourrait être entravée si un nombre restreint de groupes OH est disponible par AGU selon le nombre de BS greffés (Heinze et al., 2007). Ainsi, des dérivés d'amidon avec des caractères amphiphiles différents leur conférant diverses propriétés tensioactives pourraient être synthétisé, en contrôlant le nombre de substituants hydrophobes et hydrophiles (Heinze et al., 2007).

Broduit	Activité spécifique	Solubilisation maximal du		
Produit	(µg.g⁻¹)	BaP (µg.L⁻¹)ª		
P0	15,00	5,25		
P1	589,40 (± 6,04)	876,22 (± 37,04)		
P1*	618,62 (± 65,68)	860,62 (± 31,44)		
P2	517,71 (± 18,39)	1880,99 (± 54,92)		
Р3	12,43 (± 2,37)	348,13 (± 57,47)		
P4	14,56 (± 1,70)	695,77 (± 63,80)		
Р5	16,24 (± 1,13)	352,50 (± 21,64)		
P6	12,78 (± 0,23)	107,72 (± 2,30)		
P7	543,67 (± 20,90)	386,55 (± 21,94)		
P8	197,09 (± 6,52)	763,39 (± 29,24)		

Tableau I 4. Valeurs théoriques des capacités maximales des amidons à solubiliser le BaP

a : Solubilisation maximale de BaP = Activité spécifique X Solubilité aqueuse apparente Eq (2)

Pour chaque produit, la valeur théorique de la solubilisation maximale du BaP a été calculée (Tableau I 4). Cette valeur permet d'évaluer la capacité maximale d'un amidon modifié à désorber et à solubiliser le BaP. Pour calculer cette valeur, il faut prendre en compte les valeurs de solubilité aqueuse apparente obtenue pour chaque produit, afin de se placer dans les conditions d'une solution saturée en produit. Les résultats obtenus pour déterminer la solubilisation du BaP par des solutions à 0,45 g.L<sup>-1</sup> d'amidon ont également été nécessaires pour le calcul. D'après ces calculs, P2 possède la plus grande capacité théorique à désorber le BaP (1880,99 µg.L<sup>-1</sup>) par rapport aux autres produits, en parvenant à solubiliser 604 fois plus le BaP (3,00  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>).

En résumé, la mesure de la solubilité aqueuse apparente et de la désorption du BaP ont été utilisées pour évaluer l'équilibre hydrophobe et hydrophile de chaque composé. Il a été démontré que P2 possède le meilleur équilibre avec une solubilité aqueuse de 3,50 g.L<sup>-1</sup> et une capacité à désorber de 232,97  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de BaP.

Pour la suite du travail, une quantité plus importante de produit est nécessaire. Ainsi, plusieurs synthèses d'amidon ont été réalisées, en suivant exactement les conditions de synthèse appliquées pour P2. Les amidons obtenus n'ont cependant pas présenté les mêmes propriétés hydrophobes que pour P2, mais se sont rapprochées des propriétés hydrophobes/hydrophiles de P8. En effet, la solubilisation du BaP par ces produits est en moyenne de 100 µg.L<sup>-1</sup>. Ce panel de synthèse souligne la difficulté de se retrouver précisément dans la zone très étroite du rapport OS/BS (2,53 < R < 2,78). Les difficultés rencontrées seraient en grande partie inhérentes à l'hétérogénéité du matériel qui est un polymère biosourcé (Copeland et al., 2009). Afin d'obtenir un produit homogène pour notre application, les amidons modifiés obtenus selon les conditions de synthèse de **P2** sont regroupés et solubilisés dans les solvants de réaction (eau/DMSO) à 70°C, puis purifiés par dialyse.

#### 3. Nanosphères d'amidon

# 3.1. <u>Détermination de la solubilité apparente du produit et de la solubilisation</u> <u>aqueuse du BaP</u>

Les principales propriétés du pool d'amidon sont déterminées avant (**P9**) et après le post-traitement (**P9\***) (Tableau I 5).

Tableau I 5. Caractéristique du produit avant et après le post traitement

Produit	Solubilité aqueuse	Solubilisation du BaP	Solubilisation maximale
	apparente (g.L⁻¹)	(µg.L⁻¹)	du BaP (µg.L⁻¹)
P9	2,06 (± 0,10)	104,39 (± 5,27)	477,87 (± 30,00)
P9*	22,60 (± 0,23)	99,06 (± 8,16)	4975,01 (± 357,62)

Le post-traitement n'a pas altéré les capacités de l'amidon à solubiliser le BaP. En effet, la concentration de BaP solubilisé par l'amidon modifié avant (**P9**) et après traitement (**P9\***) est similaire (Tableau I 5). Cependant, le post-traitement a permis d'améliorer la solubilité aqueuse apparente du produit initiale (**P9**) d'un facteur 10. Ce gain en solubilité donne des capacités théoriques à désorber le BaP plus importantes à **P9\***. D'après les valeurs théoriques de solubilisation maximale du BaP, **P9\***pourrait solubiliser 10 fois plus le BaP que **P9**. De plus, **P9\*** possède une capacité théorique à désorber le BaP (4975,01 µg.L<sup>-1</sup>) plus importante que le produit précédemment sélectionné **P2** (1880,99 µg.L<sup>-1</sup>).

La méthode utilisée pour homogénéiser le produit est l'une des techniques couramment employées pour la préparation de nanoparticules, à partir de biopolymères modifiés et de matériaux amphiphiles (Letchford and Burt, 2007). La méthode en question repose sur la technique de dialyse (Namazi et al., 2011). Dans cette méthode, le polymère modifié est dissous dans un solvant organique miscible à l'eau. Cette solution est ensuite placée dans une membrane de dialyse pour être dialysée dans l'eau déminéralisée. Le principe repose sur l'échange du solvant et de l'eau par diffusion au travers de la membrane de dialyse. Le polymère précipite sous forme de nanoparticules au fur et à mesure que le solvant organique passe au travers de la membrane (Handke, 2011). Le caractère amphiphile d'un biopolymère est responsable de la production de nanosphères auto-assemblées par le processus de dialyse. En solution aqueuse, les polymères amphiphiles s'auto-assemblent spontanément en une structure (micellaire) de type nanosphérique cœur-enveloppe. Ainsi, ces nanosphères contiennent des régions hydrophobes au sein de leur noyau et des régions hydrophiles sur leur enveloppe. Le cœur hydrophobe crée un microenvironnement pouvant contenir certaines molécules hydrophobes. Parallèlement, l'enveloppe hydrophile des nanosphères permet de fournir une interface stable entre le noyau hydrophobe et le milieu aqueux (Gu et al., 2015).

Au cours des dernières années, les nanoparticules dérivées de polysaccharides naturels sont devenus un sujet de recherche intensif avec de multiples applications potentielles dans de nombreuses filières (Bel Haaj et al., 2013). Les micro/nanoparticules à base d'amidon ont montré de grands potentiels pour les applications alimentaires, médicales, industrielles et agricoles (Li et al., 2016). Ils sont par exemple largement utilisées comme support pour la microencapsulation des pesticides (Liu et al., 2016).

Dans la prochaine partie, la formation de micelles en milieu aqueux des polymères amphiphiles d'amidon est d'abord vérifiée par spectroscopie de fluorescence moléculaire. La morphologie des nanosphères d'amidon ainsi obtenues est ensuite étudiée à l'aide de la microscopie électronique en transmission (MET).

#### 3.2. <u>Caractérisation des nanosphères d'amidon</u>

La concentration micellaire critique (CMC) est l'un des paramètres les plus importants dans la détermination des nanosphères de polymère (Gu et al., 2015). En effet, les micelles issues de l'auto-assemblage des polymères amphiphiles commencent uniquement à se former à partir d'une certaine concentration en tensioactif communément appelée CMC.

La CMC est souvent déterminée par spectroscopie de fluorescence grâce à l'utilisation de fluorophores. Les fluorophores sont des molécules sondes fluorescentes hydrophobes, telles que le pyrène (Gu et al., 2015) et le Nile Red (NR) (Sambe et al., 2011), qui se logent dans les régions hydrophobes des nanosphères. L'évolution de la fluorescence de la sonde dépendra en partie de son environnement physico-chimique, il est donc important de choisir un fluorophore approprié. En solution aqueuse, le NR est couramment utilisé comme sonde fluorescente hydrophobe pour déterminer la CMC de systèmes micellaires. Le NR présente une faible solubilité dans l'eau (environ 5.10<sup>-7</sup> mol.L<sup>-1</sup>) et une grande sensibilité à la polarité de son environnement (Brown and Poujol, 2011). Ces caractéristiques permettent d'utiliser

cette molécule comme sonde fluorescente afin de déterminer la CMC de micelles du polymère d'amidon amphiphile.

La dépendance de l'intensité relative de fluorescence du NR vis à vis du logarithme de la concentration de notre amidon (**P9\***) est présentée dans la Figure I 16.



Figure I 16. Intensité de la fluorescence du NR en fonction du logarithme de la concentration de l'amidon modifié ( $\lambda ex=530$  nm et  $\lambda em=625$  nm)

En raison de sa très faible solubilité aqueuse en milieu aqueux, le NR présente une intensité de fluorescence extrêmement faible. Ainsi en dessous de la CMC, le NR affiche une faible émission de fluorescence indiquant que le NR est dans l'eau, dans un environnement polaire (Figure I 16). Cependant, nous pouvons observer que l'intensité de fluorescence du NR augmente fortement à partir d'une concentration en amidon d'environ 0,250 g.L<sup>-1</sup>. Par conséquent, cette soudaine augmentation de l'intensité de fluorescence suggère l'auto-assemblage des nanoparticules et la présence du NR à l'intérieur du cœur hydrophobe des particules d'amidon (Nizri and Magdassi, 2005). Cette rupture de pente nous permet de déterminer la CMC à 0,250 g.L<sup>-1</sup>.

L'encapsulation du NR à l'intérieur des micelles peut être visualisée par microscopie confocale (Figure I 17.). La Figure I 17.B montre des images prises en microscopie confocale du NR dans deux solutions aqueuses d'amidon (**P9\***). Les solutions diffèrent l'une de l'autre

uniquement par leur concentration en **P9\***. Lorsque la concentration de la solution d'amidon est supérieure à la CMC, l'apparition d'un ensemble de petits points rouges est observée (Figure I 17). Il n'en est pas de même pour la solution à une concentration en **P9\*** inférieure à la CMC (Figure I 17).



Figure I 17. Marquage fluorescent rouge entraîné par le NR au niveau des micelles formées par l'amidon modifié observé en microscopie confocale

Afin d'obtenir des preuves supplémentaires de l'auto-assemblage des amidons modifiés, nous avons également utilisé le MET pour visualiser directement les tailles et les morphologies des nanoparticules de **P9\*** (Figure I 18).



Figure I 18. A. Image au MET des nanoparticules d'amidon. B. agrandissement d'une grande micelle

Le cliché MET obtenu montre des micelles sphériques de taille nanométrique (Figure I 18). La Figure I 17 permet de visualiser différentes tailles de nanosphères ayant approximativement des diamètres compris entre 9 et 300 nm. Un agrandissement de la photographie (Figure I 18.A) révèle de petites structures à l'intérieur de la grande micelle. Il se pourrait donc que la grande micelle soit composée de petites micelles (de diamètre 9 nm) (Figure I 18.B) (Chakraborty et al., 2005; Tan et al., 2009). Tan et al., (2011) ont déjà démontré l'existence de ce type de structure. De plus, pour les polymères dendritiques, il a été également souligné que les grandes micelles sont des agrégats multimicellaires composé de petites micelles. Par conséquent, selon la dimension des micelles, nous pouvons identifier les grandes comme des agrégats multimicellaires et les plus petites comme des micelles unimoléculaires.

#### 3.3. Etude de l'encapsulation du benzo[a]pyrène dans les nanosphères

Les nanosphères d'amidon vont être utilisées pour encapsuler et donc solubiliser le BaP. Une méthode simple pour encapsuler un composé non hydrosoluble est de l'incuber en présence de micelles. Ainsi, tout comme le NR utilisé pour déterminer la CMC, le BaP devrait se nicher dans un environnement qui lui est plus favorable, donc hydrophobe, c'est-à-dire au cœur des micelles (Handke, 2011).

Dans un premier temps, une solution de BaP à 33,3 µg.L<sup>-1</sup> est préparée. L'intensité de la fluorescence d'émission du BaP est mesurée en fonction de différentes concentrations en **P9\*** (Figure I 19).



Figure I 19. Intensité de la fluorescence d'émission du BaP en fonction du logarithme de la concentration de l'amidon modifié

La courbe indique que l'intensité de la fluorescence du BaP atteint rapidement une valeur limite, comme le montre la partie asymptotique de la sigmoïde (Figure I 19). Cette valeur limite indique que presque la totalité du BaP (environ 85 %) a été encapsulée dans les nanosphères d'amidon et ceci dès 0,178 g.L<sup>-1</sup> d'amidon (log ([**P9\***])=-0,75). De plus, l'intensité de fluorescence mesurée du BaP est très élevée (572,45 u.a) par rapport à celle obtenue dans l'eau (2,23 u.a), indiquant que cette molécule hydrophobe s'est logée massivement dans le cœur des nanosphères.

Ne pouvant réaliser une solution aqueuse plus concentrée en BaP, nous avons ajouté 375  $\mu$ L d'une solution de BaP à 40 mg.L<sup>-1</sup> ce qui correspond à un dépôt de 15  $\mu$ g de BaP par tube (Rosu et al., 2013). Cette expérience permet d'évaluer la capacité des nanosphères à désorber et à solubiliser le BaP. Ainsi, la Figure I 20 montre la quantité de BaP solubilisé en fonction de différentes concentrations de **P9\***.



Figure I 20. Relation entre l'intensité de la fluorescence d'émission du BaP et la concentration de **P9\*** 

Nous pouvons observer que la solubilisation du BaP augmente en fonction de la concentration de **P9\***. Cependant, la solubilisation du BaP tend vers une valeur limite (1350 µg.L<sup>-1</sup>), comme le montre la partie asymptotique de la sigmoïde de la Figure I 19. En effet, au-delà de sa solubilité aqueuse apparente (22,90 g.L<sup>-1</sup>) l'amidon ne peut pas solubiliser une plus grande quantité de BaP. L'observation de ce phénomène renforce l'intérêt d'avoir un produit ayant un bon équilibre entre les propriétés hydrophobes et hydrophiles.

# **Conclusion partielle**

Les différentes conditions de synthèses décrites au sein de ce chapitre ont permis dans un premier temps d'obtenir neuf produits distincts en utilisant l'OSA et la BS comme réactifs. L'efficacité des conditions de réaction ainsi que le rapport apparent des substituants greffés (R) ont ensuite été évalués par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. Cette technique de caractérisation a nécessité préalablement une étape de mise au point sur nos composés obtenus. En effet, l'amidon est principalement composé de simples résidus de glucose, cependant il possède une structure moléculaire et supramoléculaire extrêmement complexe.

Dans un second temps, les amidons modifiés ont été évalués pour leur solubilité aqueuse apparente et leur capacité à augmenter la solubilité du BaP, utilisé comme polluant

hydrophobe modèle. Ces critères sont choisis pour évaluer la balance du caractère hydrophile / hydrophobe de chaque composé obtenu. En comparaison avec l'amidon natif de pomme de terre, il s'est avéré que **P9\*** possède le meilleur équilibre entre les caractères hydrophobes et hydrophiles. Ainsi, **P9\*** augmente la solubilité aqueuse de l'amidon par un facteur de 65 (22,60 g.L<sup>-1</sup>) et stimule 33 fois la solubilisation aqueuse du BaP, soulignant de très bonnes propriétés surfactantes.

Enfin, des études complémentaires en spectroscopie moléculaire de fluorescence et en MET ont été réalisés afin d'étudier et de comprendre l'interaction entre l'amidon modifié et une molécule invité hydrophobe. Nous avons montré grâce à ces méthodes que l'amidon P9\* modifié par l'OSA (en rouge) et la BS (en bleu) peut s'auto-assembler dans l'eau en formant des structures de type nanosphères (Figure I 21). Ces nanosphères sont capables d'encapsuler au sein de leur cœur hydrophobe des molécules invités de type NR et BaP.



Figure I 21. Représentation schématique de l'auto-assemblage de l'amidon modifié en présence d'une molécule invité

Dans le chapitre suivant, l'amidon ainsi modifié sera utilisé dans des études de dégradation du BaP réalisées par des traitements d'oxydation biologique par les champignons telluriques saprotrophes et/ou chimique, en milieu minéral, au laboratoire. Ces études seront conduites afin d'élaborer un protocole innovant de bioremédiation des sols historiquement contaminés par les HAP.

# **Bibliographie**

Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A.L., and O'Mahony, J.A. (2016). Chemistry, structure, functionality and applications of rice starch. J. Cereal Sci. 70, 291–300.

Atkin, N.J., Abeysekera, R.M., and Robards, A.W. (1998). The events leading to the formation of ghost remnants from the starch granule surface and the contribution of the granule surface to the gelatinization endotherm. Carbohydr. Polym. *36*, 193–204.

Bao, J., Xing, J., Phillips, D.L., and Corke, H. (2003). Physical properties of octenyl succinic anhydride modified rice, wheat, and potato starches. J. Agric. Food Chem. *51*, 2283–2287.

Bel Haaj, S., Magnin, A., Pétrier, C., and Boufi, S. (2013). Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. Carbohydr. Polym. *92*, 1625–1632.

Bigot, J., Charleux, B., Cooke, G., Delattre, F., Fournier, D., Lyskawa, J., Sambe, L., Stoffelbach, F., and Woisel, P. (2010). Tetrathiafulvalene End-Functionalized Poly(N-isopropylacrylamide): A New Class of Amphiphilic Polymer for the Creation of Multistimuli Responsive Micelles. J. Am. Chem. Soc. *132*, 10796–10801.

Blach, P. (2005). Nouveaux absorbants pour le traitement des émissions de composés organiques volatils.

Boursier, B. (2005). Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires | Techniques de l'Ingénieur.

Brown, S., and Poujol, C. (2011). Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie. Microsc. Confocale Form. Perm. CNRS Gif-Sur-Yvette.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. Int. J. Biol. Macromol. 23, 85–112.

Chakraborty, S., Sahoo, B., Teraoka, I., and Gross, R.A. (2005). Solution properties of starch nanoparticles in water and DMSO as studied by dynamic light scattering. Carbohydr. Polym. *60*, 475–481.

Chamberlain, E.K., and Rao, M.A. (1999). Rheological properties of acid converted waxy maize starches in water and 90% DMSO/10% water. Carbohydr. Polym. *40*, 251–260.

Cheng, W., Chen, J., Liu, D., Ye, X., and Ke, F. (2010). Impact of ultrasonic treatment on properties of starch film-forming dispersion and the resulting films. Carbohydr. Polym. *81*, 707–711.

Cooreman, F.L., van Rensburg, H., and Delcour, J.A. (1995). Pasting Profiles and Solubility of Native and Cross-Linked Corn Starch inDimethylsulfoxide-Water Mixtures. J. Cereal Sci. *22*, 251–257.

Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., and Tang, M.C. (2009). Form and functionality of starch. Food Hydrocoll. 23, 1527–1534.

De Graaf, R.A., Lammers, G., Janssen, L.P.B.M., and Beenackers, A. a. C.M. (1995). Quantitative Analysis of Chemically Modified Starches by 1H-NMR Spectroscopy. Starch -Stärke 47, 469–475.

Debet, M.R., and Gidley, M.J. (2007). Why Do Gelatinized Starch Granules Not Dissolve Completely? Roles for Amylose, Protein, and Lipid in Granule "Ghost" Integrity. J. Agric. Food Chem. *55*, 4752–4760.

Delsarte, I., Danjou, P.-E., Veignie, E., and Rafin, C. (2016). Synthesis of modified potato starches for aqueous solubilization of benzo[a]pyrene. Carbohydr. Polym. 144, 83–88.

Gaborieau, M., De bruyn, H., Mange, S., Castignolles, P., Brockmeyer, A., and Gilbert, R.G. (2009). Synthesis and characterization of synthetic polymer colloids colloidally stabilized by cationized starch oligomers. J. Polym. Sci. Part Polym. Chem. *47*, 1836–1852.

Gidley, M.J. (1985). Quantification of the structural features of starch polysaccharides by n.m.r. spectroscopy. Carbohydr. Res. *139*, 85–93.

Gu, F., Li, B.-Z., Xia, H., Adhikari, B., and Gao, Q. (2015). Preparation of starch nanospheres through hydrophobic modification followed by initial water dialysis. Carbohydr. Polym. *115*, 605–612.

Handke, N. (2011). Elaboration de nanoparticules de poly (acide lactique) multifonctionnelles comme adjuvants potentiels de vaccination.

Haroon, M., Wang, L., Yu, H., Abbasi, N.M., Zain-ul-Abdin, Saleem, M., Khan, R.U., Ullah, R.S., Chen, Q., and Wu, J. (2016). Chemical modification of starch and its application as an adsorbent material. RSC Adv. *6*, 78264–78285.

Heinze, T., Rensing, S., and Koschella, A. (2007). Starch Derivatives of High Degree of Functionalization. 13. Novel Amphiphilic Starch Products. Starch - Stärke *59*, 199–207.

lida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., and Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. *9*, 140–146.

Jackson, D.S. (analytic) (1991). Solubility behavior of granular corn starches in methyl sulfoxide (DMSO) as measured by high performance size exclusion chromatography (English). Stärke *43*, 422–427.

Jambrak, A.R., Herceg, Z., Šubarić, D., Babić, J., Brnčić, M., Brnčić, S.R., Bosiljkov, T., Čvek, D., Tripalo, B., and Gelo, J. (2010). Ultrasound effect on physical properties of corn starch. Carbohydr. Polym. *79*, 91–100.

Leach, H.W., and Schoch, T.J. (1962). Cereal Chem 1962 | Structure of the Starch Granule. III. Solubilities of Granular Starches in Dimethyl Sulfoxide.

Letchford, K., and Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur. J. Pharm. Biopharm. *65*, 259–269.

Li, D., Liu, B., Yang, F., Wang, X., Shen, H., and Wu, D. (2016). Preparation of uniform starch microcapsules by premix membrane emulsion for controlled release of avermectin. Carbohydr. Polym. *136*, 341–349.

Li, J.H., Vasanthan, T., Hoover, R., and Rossnagel, B.G. (2004). Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. Food Chem. *84*, 621–632.

Liu, B., Wang, Y., Yang, F., Wang, X., Shen, H., Cui, H., and Wu, D. (2016). Construction of a controlled-release delivery system for pesticides using biodegradable PLA-based microcapsules. Colloids Surf. B Biointerfaces *144*, 38–45.

Liu, M., Zhou, Z., Wang, X., Xu, J., Yang, K., Cui, Q., Chen, X., Cao, M., Weng, J., and Zhang, Q. (2007). Formation of poly(I,d-lactide) spheres with controlled size by direct dialysis. Polymer *48*, 5767–5779.

Miao, M., Zhang, T., Mu, W., and Jiang, B. (2010). Effect of controlled gelatinization in excess water on digestibility of waxy maize starch. Food Chem. *119*, 41–48.

Namazi, H., Fathi, F., and Dadkhah, A. (2011). Hydrophobically modified starch using longchain fatty acids for preparation of nanosized starch particles. Sci. Iran. *18*, 439–445.

Nizri, G., and Magdassi, S. (2005). Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymer–surfactant interactions. J. Colloid Interface Sci. *291*, 169–174.

Paes, S.S., Yakimets, I., and Mitchell, J.R. (2008). Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. Food Hydrocoll. *22*, 788–797.

Parada, J., and Aguilera, J.M. (2012). Effect of native crystalline structure of isolated potato starch on gelatinization behavior and consequently on glycemic response. Food Res. Int. *45*, 238–243.

Qu, Q., Tucker, E., and Christian, S.D. (2002). Sulfoalkyl ether  $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Synthesis and characterizations. J. Incl. Phenom. 43, 213–221.

Ratnayake, W.S., and Jackson, D.S. (2007). A new insight into the gelatinization process of native starches. Carbohydr. Polym. *67*, 511–529.

Ratnayake, W.S., and Jackson, D.S. (2008). Chapter 5 Starch Gelatinization. B.-A. in F. and N. Research, ed. (Academic Press), pp. 221–268.

Richardson, S., and Gorton, L. (2003). Characterisation of the substituent distribution in starch and cellulose derivatives. Anal. Chim. Acta *497*, 27–65.

Rogmann, N., Seidel, J., and Mischnick, P. (2000). Formation of unexpected substitution patterns in sulfonylbutylation of cyclomaltoheptaose promoted by host–guest interaction. Carbohydr. Res. *327*, 269–274.

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

Rosu, A.-M., Rafin, C., Surpateanu, G., Brabie, G., Miron, D.N., and Veignie, E. (2013). Synthesis of alkylated potato starch derivatives and their potential in the aqueous solubilization of benzo[a]pyrene. Carbohydr. Polym. *93*, 184–190.

Sambe, L., Stoffelbach, F., Lyskawa, J., Delattre, F., Fournier, D., Bouteiller, L., Charleux, B., Cooke, G., and Woisel, P. (2011). Host-Guest Modulation of the Micellization of a

Tetrathiafulvalene-Functionalized Poly(N-isopropylacrylamide). Macromolecules 44, 6532–6538.

Schmitz, S., Dona, A.C., Castignolles, P., Gilbert, R.G., and Gaborieau, M. (2009). Assessment of the Extent of Starch Dissolution in Dimethyl Sulfoxide by 1H NMR Spectroscopy. Macromol. Biosci. *9*, 506–514.

Shon, K.-J., Lim, S.-T., and Yoo, B. (2005). Rheological Properties of Rice Starch Dispersions in Dimethyl Sulfoxide. Starch - Stärke *57*, 363–369.

Starch Europe (2016). Site internet http://www.starch.eu/ consulté le 26/10/2016.

Stella, V., and Rajewski, R. (1992). Derivatives of cyclodextrins exhibiting enhanced aqueous solubility and the use thereof. Univ. Kans. Lawrence *vol 07*, 469 http://www.patents.com/us–5134127.html.

Sweedman, M.C., Tizzotti, M.J., Schäfer, C., and Gilbert, R.G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. Carbohydr. Polym. *92*, 905–920.

Tan, Y., Xu, K., Li, L., Liu, C., Song, C., and Wang, P. (2009). Fabrication of Size-Controlled Starch-Based Nanospheres by Nanoprecipitation. ACS Appl. Mater. Interfaces *1*, 956–959.

Tan, Y., Xu, K., Lu, C., Liu, C., and Wang, P. (2011). Thermally Induced Multimicellar-Aggregate-to-Vesicle Transition for a Dentritic Starch Ester. Chem. – Eur. J. *17*, 8277–8280.

Tizzotti, M.J., Sweedman, M.C., Tang, D., Schaefer, C., and Gilbert, R.G. (2011). New 1H NMR procedure for the characterization of native and modified food-grade starches. J. Agric. Food Chem. *59*, 6913–6919.

Veignie, E., Rafin, C., Landy, D., Fourmentin, S., and Surpateanu, G. (2009). Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. J. Hazard. Mater. *168*, 1296–1301.

Waterschoot, J., Gomand, S.V., Fierens, E., and Delcour, J.A. (2014). Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. Starch - Stärke n/a-n/a.

Yamamoto, H., Sawai, N., and Seo, K. (2013). Classification and kinetic analysis of viscosity growth processes for NaOH-gelatinized rice starches. Carbohydr. Polym. *97*, 558–564.

Zhang, Z., Zhao, S., and Xiong, S. (2013). Molecular properties of octenyl succinic esters of mechanically activated Indica rice starch. Starch - Stärke *65*, 453–460.

# Chapitre 2. Etude de la dégradation du benzo[a]pyrène en milieu minéral

# Sommaire

Intro	oductio	on7	9
Mat	ériels (	et méthodes	1
1.	Pro	oduits chimiques	51
	1.1.	Solvants	31
	1.2.	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique8	\$1
	1.3.	Antibiotiques	31
2.	Etu	de en milieu minéral	51
	2.1.	Milieux de culture	31
	2.2.	Souches étudiées	32
	2.3.	Inoculation des milieux de culture et conditions d'incubation	32
	2.4.	Etude de la réponse de souches fongiques à une gamme de concentrations	
	d'oxyo	dant 8	3
	2.5.	Etude comparative de la dégradation du benzo[a]pyrène par différents processus	
	d'oxyo	dation (biologique et/ou chimique)8	5
	2.5.	1. Réalisation de l'expérience 8	35
	2.5.	2. Extraction et dosage du benzo[a]pyrène	36
	2.5.	3. Evaluation de la dégradation du benzo[a]pyrène8	37
	2.6.	Etude de la localisation intracellulaire du benzo[a]pyrène au microscope à	
	épiflu	orescence	57
	2.7.	Etude de l'efficacité de méthodes d'oxydation (chimique et/ou biologique) du	
	benzo	a]pyrène en présence de nanostructures d'amidon8	8
	2.7.	1. Etudes préliminaires	8
	2	2.7.1.1. Etude de la capacité de l'amidon <b>P9*</b> à solubiliser le benzo[a]pyrène en milieu	
	n	ninéral 88	
	2	2.7.1.2. Etude de la croissance fongique en présence d'amidon modifié	39
	2.7.	2. Etude comparative de la dégradation du benzo[a]pyrène par les deux processus	
	d'o	xydation (biologique et/ou chimique) en présence d'amidon	0
	2	2.7.2.1. Conditions expérimentales	0

2.8. Traitements statistiques	91
Résultats et Discussion	92
1. Etude de la toxicité des oxydants sur différentes souches fongiques	92
1.1. Effet du permanganate de potassium sur la croissance fongique	92
1.2. Effet du réactif de Fenton sur la croissance fongique	93
1.3. Conclusion des tests de toxicité du réactif de Fenton et du permanganate de	
potassium sur les souches fongiques	94
2. Etude comparative de la dégradation du benzo[a]pyrène par différents processus	
d'oxydation (biologique et/ou chimique)	95
2.1. Dégradation du benzo[a]pyrène par traitement biologique (en présence de la	
souche D19) et/ou chimique	95
2.2. Dégradation du benzo[a]pyrène par oxydation biologique par S19 et/ou par	
oxydation chimique1	01
3. Etude de l'efficacité de méthodes d'oxydation (chimique et/ou biologique) du	
benzo[a]pyrène en présence de matrices d'amidons modifiés1	04
3.1. Influence du milieu minéral sur la capacité de l'amidon <b>P9*</b> à solubiliser le	
benzo[a]pyrène1	04
3.2. Optimisation du protocole expérimental de la dégradation du benzo[a]pyrène en	
présence d'amidon1	06
3.2.1. Biodégradation de l'amidon modifié par <i>Fusarium solani</i>	06
3.3. Etude comparative des tests de dégradations du benzo[a]pyrène en présence ou	
non d'amidon modifié1	08
Conclusion partielle1	11
Bibliographie1	12

# **Introduction**

L' objectif de la thèse est de mettre au point une méthode innovante de réhabilitation des sols historiquement pollués (industriels et urbains) par des POP couplant une oxydation chimique douce pour initier l'ouverture des cycles aromatiques des polluants et une oxydation biologique par des champignons telluriques saprotrophes. Ces deux méthodes d'oxydation nécessitent le passage en phase aqueuse du polluant dans l'écosystème contaminé (sols, sédiments, boues) pour être accessible puis dégradé. Le passage du polluant en phase aqueuse sera donc stimulé par l'intermédiaire d'amidon modifié **P9\*** obtenu dans le Chapitre 1. La faisabilité d'un tel procédé est élaborée et testée à l'échelle du laboratoire, en milieu minéral avec le BaP comme HAP modèle. Rappelons que le BaP est classé en tant que polluant prioritaire par l'Agence Américaine de l'Environnement (US EPA) et CMR de catégorie 2 par l'UE est choisi pour cette étude comme molécule modèle

Pour mettre en place cette méthode, le choix de l'oxydant ainsi que les doses d'utilisation sont d'abord déterminés afin d'être compatibles avec le développement des champignons sélectionnées pour leur capacité à dégrader les POP. Une étude comparative de la dégradation du BaP par les processus d'oxydation choisis (biologique et/ou chimique) est ensuite réalisée avec les paramètres optimaux retenus (souches fongiques et dose d'oxydant). Dans le but d'améliorer la disponibilité du polluant en phase aqueuse, l'amidon modifié **P9\*** (synthétisé et sélectionné dans le chapitre 1) sera évalué pour ses propriétés surfactantes dans les différents traitements de dégradation.

La Figure II 1 présente la démarche expérimentale suivie au sein du chapitre 2 selon la problématique scientifique étudiée.



Figure II 1. Schéma récapitulatif des expérimentations menées dans le chapitre 2

L'ensemble des expérimentations sont conduites au laboratoire en milieu minéral. Dans une première étape expérimentale, les doses des différents oxydants (permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>) et réactif de Fenton) sont déterminées afin d'être compatibles avec le développement des champignons. Des courbes de toxicité de type dose/réponse d'oxydants sont réalisées sur la croissance et la sporulation des souches suivantes : *Fusarium solani* (S19), *Lecanicillium lecanii* (E1), *Penicillium brasilianum* (D19), *Paecilomyces lilacinus* (S6). Chaque souche est exposée à une gamme de doses croissantes de KMnO<sub>4</sub> et de réactif de Fenton. La mesure qualitative de la biomasse sèche après filtration a permis de déterminer l'EC<sub>50-48h</sub> (concentration d'oxydant où 50 % d'inhibition de la biomasse est observé après 48h). La concentration d'oxydant biocompatible est ainsi déterminée et utilisée pour les expériences suivantes.

Lors d'une seconde étape, des tests de dégradations chimique et/ou biologique du BaP sont donc réalisés en milieu minéral sur les souches fongiques (D19 et S19). La quantité de BaP dégradé dans les différents traitements est évaluée après 12 jours d'incubation par comparaison avec le témoin abiotique. Ces différents traitements permettent de vérifier la faisabilité et le potentiel de cette méthode combinant une oxydation biologique et une oxydation chimique sur la dégradation du BaP.

La troisième étape consiste à évaluer l'influence de l'amidon **P9\*** sur la dégradation du BaP dans les traitements d'oxydation biologique et/ou chimique. Pour cette expérience,

seule la souche S19 et le réactif de Fenton sont utilisés comme variables d'étude. La dégradation du BaP est conduite en milieu minéral en présence ou non d'amidon. Rappelons que l'amidon **P9\*** est un produit difonctionnalisé aux propriétés surfactantes (chapitre 1). Cette expérience est conduite afin de déterminer l'influence de la disponibilité dans la dégradation du BaP.

# Matériels et méthodes

# 1. Produits chimiques

1.1. <u>Solvants</u>

L'acétone de qualité HPLC (Panreac Química S.A., Barcelone, Espagne) est utilisée pour réaliser les solutions étalons de BaP. Le DCM et le MeOH (qualité HPLC) utilisés pour l'extraction des HAP sont obtenus auprès de Fisher Scientific SAS (Illkirch Cedex, France).

#### 1.2. <u>Hydrocarbure Aromatique Polycyclique</u>

Le BaP utilisé comme HAP modèle de haute masse molaire est obtenu auprès d'Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France).

### 1.3. Antibiotiques

Le chloramphénicol (Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France) et la néomycine sulfate (Sigma Aldrich, France) sont des antibiotiques utilisés pour empêcher le développement bactérien.

#### 2. Etude en milieu minéral

#### 2.1. Milieux de culture

Les souches de la mycothèque sont conservées sur milieu solide MEA (Malt Extract Agar) : Extrait de malt - 20 g.L<sup>-1</sup>; Extrait de levure (Fisher Scientific) 2 g.L<sup>-1</sup>; Agar (Fisher Scientific) 15 g.L<sup>-1</sup>.

Le milieu minéral utilisé (MM1) de pH 7 non tamponné est constitué des macroéléments suivants:

 $\label{eq:KCl-0,250 g.L^{-1}; NaH_2PO_4 . 2H_2O - 0,646 g.L^{-1}; Na_2HPO_4 . 2H_2O - 1,040 g.L^{-1}; MgSO_4 - 0,244 g.L^{-1}; NO_3NH_4 - 1,000 g.L^{-1}$ 

Auxquels on ajoute 10 mL d'une solution d'oligoéléments par litre de MM1 contenant :  $ZnSO_4 . 7H_2O - 1,0 mg.L^{-1}$ ;  $MnCl_2 . 4H_2O - 0,1 mg.L^{-1}$ ;  $FeSO_4 . 7H_2O - 1,0 mg.L^{-1}$ ;  $CuSO_4 . 5H_2O$  $- 0,5 mg.L^{-1}$ ;  $CaCl_2 . 2H_2O - 0,1 mg.L^{-1}$ ;  $MoO_3 - 0,2 mg.L^{-1}$ .

Un volume d'une solution mère stérile de glucose (500 g.L<sup>-1</sup>) est ajouté après autoclavage afin d'obtenir une concentration finale de glucose à 10 g.L<sup>-1</sup>.

#### 2.2. <u>Souches étudiées</u>

L'étude est conduite sur 4 souches fongiques d'origine différente, provenant de la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque). Ces dernières sont présentées dans le Tableau II 1 ci-dessous :

Numéro de souche	Champignon	Origine
D19	Penicillium brasilianum	Sol pollué (dioxines)
E1	Lecanicillium lecanii	Sol pollué (dioxines)
S6	Paecilomyces lilacinus	Matériel végétal
S19	Fusarium solani	Sol pollué (HAP)

Tableau II 1. Souches fongiques utilisées dans le cadre de cette étude

Les souches D19 et E1 isolées à partir de sols de la ferme du Noir-Pot d'Halluin historiquement contaminés par les PCDD/F ont été identifiées par des techniques de biologie moléculaire au sein du BCCM/MUCL de l'Université Catholique de Louvain (Belgique), respectivement par comparaison de séquences partielles d'ADN du gène codant pour la ß-tubulin et par séquençage de la zone ITS de l'ADN ribosomal (Chapitre 3). Les deux autres souches provenant de la mycothèque de l'UCEIV de Dunkerque ont été identifiées lors d'études antérieures (Rafin et al., 2000, 2013). Ces souches ont été préalablement sélectionnées sur différents critères : croissance, efficacité à utiliser des sources de carbone non conventionnelles et morphologie (chapitre 3).

### 2.3. Inoculation des milieux de culture et conditions d'incubation

Les milieux liquides sont inoculés par une suspension de spores de la souche fongique étudiée. Cette suspension de spores est réalisée par rinçage d'une pré-culture de 15 jours sur milieu solide (MEA + 200 mg.L<sup>-1</sup> de chloramphénicol) avec une solution d'eau distillée stérile et de Tween 80 (0,01 %). La concentration en spores est déterminée au microscope optique par comptage en cellule de Malassez. Les volumes d'ensemencement sont calculés afin d'obtenir une concentration finale de 10<sup>4</sup> spores.mL<sup>-1</sup>. Pour les souches ne produisant

pas suffisamment de spores, l'inoculation se fait par ajout de 3 explants de mycélium calibrés de 7 mm. L'incubation des cultures est réalisée à température ambiante sous agitation à rotation orbitale (Roucaire, 175 rpm).

# 2.4. <u>Etude de la réponse de souches fongiques à une gamme de concentrations</u> <u>d'oxydant</u>

Dans une première expérimentation, les doses des différents oxydants sont déterminées afin d'être compatibles avec le développement des champignons. Des courbes de toxicité de type dose/réponse sont réalisées sur la croissance et la sporulation des 4 souches choisies.

L'étude est réalisée en erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL de MM1 et 10 g.L<sup>-1</sup> de glucose. Après stérilisation à l'autoclave, l'inoculation des différentes souches est réalisée par une suspension de spores à 10<sup>4</sup> spores.mL<sup>-1</sup>.

Au bout de 3 jours d'incubation, des quantités croissantes d'oxydant sont introduites dans les erlenmeyers, pour chacune des 4 souches choisies, afin de réaliser une gamme de concentrations croissantes. Les concentrations étudiées pour le réactif de Fenton et le KMnO<sub>4</sub> sont présentées dans le Tableau II 2.

-	Permanganate de	Réactif de Fenton (mM)		
Oxydant	potassium $(g.L^{-1})$	$H_2O_2$	$FeSO_4 . 7H_2O$	
	0,00	0	0,00	
	0,10	1	0,10	
Concentration finale	0,25	5	0,50	
	0,50	10	1,00	
	0,75	25	2,50	
	1,00	50	5,00	

Tableau II 2. Gamme de concentrations étudiées pour chaque oxydant

Pour le réactif Fenton,  $H_2O_2$  et  $FeSO_4$ .  $7H_2O$  sont ajoutées selon un rapport  $H_2O_2$ : Fe de 10 : 1. De plus, les quantités de Fenton sont ajoutées deux fois à J3 et J4 contrairement au permanganate de potassium ajouté uniquement à J3 (Figure II 2).

Après 5 jours d'incubation (J5), les cultures sont filtrées sur papier-filtre préalablement séché et taré (Fisherbrand, Ø 55 mm, 25  $\mu$ m de porosité) avec un entonnoir Büchner monté sur une fiole à vide. Les biomasses sont pesées (Precisa XT220A, limite de détection 0,0001

g) après 7 jours de séchage dans une étuve à 60°C. Le déroulement de l'expérience est résumé dans la Figure II 2.



Figure II 2. Schéma du déroulement des tests de toxicité du permanganate de potassium (A) et du réactif de Fenton (B) sur les souches fongiques

Les valeurs des pesées obtenues permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition de la croissance des souches soumises à des doses croissantes d'oxydant par rapport à la croissance témoin (sans oxydant), calculé selon la formule suivante :

% d'inhibition de croissance=
$$\frac{m_{témoin} - m_{traitement}}{m_{témoin}} \times 100$$

Ces résultats permettent de tracer les courbes de toxicité de chacune des souches étudiées. Ces courbes représentent le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique en fonction de la concentration en oxydant, ce qui nous permet de déterminer graphiquement la concentration efficace (CE<sub>50</sub>) de chacun des oxydants. La CE<sub>50</sub> est la concentration en oxydant inhibant 50 % de la croissance fongique après 48 heures d'incubation. Les CE<sub>50-48h</sub> des oxydants seront utilisées ultérieurement lors des tests de dégradation des POP.

# 2.5. <u>Etude comparative de la dégradation du benzo[a]pyrène par différents</u> processus d'oxydation (biologique et/ou chimique)

L'étude de la dégradation du BaP en milieu minéral est réalisée en couplant simultanément ou séquentiellement une oxydation chimique à un procédé d'oxydation biologique par voie fongique. Ces expériences sont menées sur les souches S19 et D19 préalablement sélectionnées et sur deux types d'oxydants chimiques : le permanganate de potassium et le réactif de Fenton. Pour chacune des souches, différents traitements sont réalisés en triplicata par traitement : biologique (B) où seule la souche fongique est ensemencée (D19 ou S19), chimique où seule une oxydation chimique est réalisée (soit en présence de KMnO<sub>4</sub> (K) ou du réactif de Fenton (F)) et biologique-chimique où l'oxydation biologique est couplée à l'oxydation chimique (avec KMnO<sub>4</sub> (B+K) ou avec le réactif de Fenton (B+F)). Les différents traitements réalisés pour une souche sont résumés dans le Tableau II 3. Par souche, sept traitements distincts sont réalisés en triplicata.

Tableau II 3. Résumé des différents traitements réalisés pour une souche dans le cadre de l'étude de la dégradation du BaP par l'oxydation biologique et/ou chimique

Traitement	Code	Souche	BaP	KMnO₄	Réactif de Fenton
Abiotique	т	$\checkmark$	$\checkmark$		
Biologique	В*	$\checkmark$	$\checkmark$		
Chimique	K F		√ √	$\checkmark$	✓
Couplage	B+K	$\checkmark$	$\checkmark$	✓	
biologique + chimique	B+F	$\checkmark$	$\checkmark$		$\checkmark$
*** ***	•				

\*B : D19 ou S19

# 2.5.1. Réalisation de l'expérience

Dans des erlenmeyers de 100 mL, 1 mL d'une solution mère de BaP (à 0,25 g.L<sup>-1</sup> dans l'acétone) est introduit afin d'obtenir une quantité finale de 250 µg par erlenmeyer. Après évaporation du solvant à l'étuve (70°C), 25 mL de MM1 sont ajoutés puis stérilisés par autoclave. 0,5 mL de solution stérile de glucose à 500 g.L<sup>-1</sup> sont ensuite ajoutés.

Les erlenmeyers où le traitement nécessite la présence du champignon (B ; B+F ou B+K) sont inoculés à J0 par une suspension de spores à  $10^4$  spores.mL<sup>-1</sup> (Tableau II 3).

Les traitements d'oxydation chimique par le réactif de Fenton (F ; B+F) sont réalisés en introduisant un volume d'une solution aqueuse de  $FeSO_4$ .  $7H_2O$  à une concentration finale de 5 mM puis un volume d'une solution aqueuse d' $H_2O_2$  à une concentration finale de 50 mM, à J3 et J4.

Pour les traitements d'oxydation chimique par KMNO<sub>4</sub> (K ; B+K), un volume d'une solution aqueuse de KMnO<sub>4</sub> à une concentration finale de 0,50 g.L<sup>-1</sup> est ajouté au milieu à J3.

Les traitements sont incubés sous agitation orbitale (175 rpm) à température ambiante pendant 12 jours. Le déroulement des tests de dégradation du BaP est récapitulé dans la Figure II 3.



Figure II 3. Schéma du déroulement des tests de dégradation du BaP dans les traitements combinés oxydation chimique/biologique (A : avec le permanganate de potassium (B+K) ; B : avec le réactif de Fenton (B+F)). Pour le traitement oxydation biologique (B), seul l'ensemencement des spores est réalisé, pour le traitement oxydation chimique (F et K), seul l'ajout d'oxydant est réalisé

#### 2.5.2. Extraction et dosage du benzo[a]pyrène

Après 12 jours d'incubation, les cultures sont congelées et lyophilisées pendant 5 jours. Le BaP présent au sein de la biomasse fongique est ensuite extrait avec un appareil Soxhlet pendant 16 heures à l'aide de dichlorométhane. L'extrait obtenu est concentré sous vide à 42°C avec un évaporateur rotatif (Laborota 4003, Heidolph Instruments). Les erlenmeyers sont ensuite lavés avec une solution de DCM/méthanol (50/50), afin de récupérer le reliquat de BaP et de l'ajouter à l'extrait concentré. L'extrait total de BaP est

récupéré dans 20 ml d'un mélange DCM/MeOH (50/50) et filtré à 0,45 µm (filtre PTFE). Les quantités de BaP non dégradé sont mesurées en chromatographie liquide à haute performance (HPLC waters 600 Control). Le système contient une colonne greffée en C18 Waters XTerra®, RP 18,5 µm et Waters 996 Photo Diode Array Detector. Les paramètres de la séparation des molécules extraites sont les suivants : une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile/eau de 90/10, un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> et une durée d'analyse de 7 minutes. Pour chaque traitement, l'intégration de l'aire du pic obtenu à une absorbance UV mesurée à 254 nm permet de déterminer la concentration de BaP par comparaison au témoin.

Ce protocole d'extraction est également appliqué à des traitements témoins dans le but de mesurer les pertes abiotiques du BaP par photooxydation et par adsorption sur le mycélium. Un erlenmeyer contenant 25 mL de MM1 et 250 µg de BaP est incubé pendant 12 jours. Une culture fongique de 12 jours est ajoutée extemporanément dans cet erlenmeyer avant congélation et lyophilisation (Tableau II 3). Ce témoin est réalisé en triplicata pour chaque souche fongique.

#### 2.5.3. Evaluation de la dégradation du benzo[a]pyrène

Les valeurs obtenues par HPLC permettent de calculer les pourcentages de dégradation de la quantité initiale de BaP selon la formule suivante :

% BaP dégradé= 
$$\frac{m_{témoin} - m_{traitement}}{m_{témoin}} \times 100$$

Ces taux de dégradation prennent en compte les pertes abiotiques déterminées grâce aux témoins abiotiques. m<sub>témoin</sub> correspond à la quantité de BaP dans le traitement témoin abiotique et m<sub>traitement</sub> à la quantité de BaP présente dans chaque traitement.

# 2.6. <u>Etude de la localisation intracellulaire du benzo[a]pyrène au microscope à épifluorescence</u>

Grâce à ses propriétés de fluorescence dans le domaine de l'UltraViolet (UV), nous pouvons observer si le BaP est localisé dans le mycélium des champignons lors des différents traitements à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axiostar Plus, Zeiss ; puissance 50W). Les échantillons du traitement biologique ensemencé avec D19 sont observés sous un filtre DAPI à l'objectif 50x à immersion. Le BaP excité en UV émet une fluorescence entre le bleu et le vert (450-490 nm).

# 2.7. <u>Etude de l'efficacité de méthodes d'oxydation (chimique et/ou biologique) du</u> <u>benzo[a]pyrène en présence de nanostructures d'amidon</u>

La bibliographie et l'évaluation de techniques existantes soulignent l'importance du paramètre biodisponibilité des POP qui s'adsorbent à la matière organique du sol, limitant ainsi leur biodégradation par les microorganismes mais aussi leur dégradation par oxydation chimique (Flotron et al. 2005; Rosu et al. 2011). Pour tenter de lever ce verrou technologique, la première partie de cette thèse (chapitre 1) a consisté à modifier des amidons natifs avec pour objectif principal d'accroître leur capacité à désorber et à solubiliser le BaP, un polluant hydrophobe modèle. Le produit obtenu **P9**\*, se présentant sous forme de nanosphères, est le plus prometteur des produits synthétisés pour ses propriétés surfactantes. Dans cette expérimentation, nous allons étudier en milieu minéral la dégradation du BaP par les procédés d'oxydation précédemment décrits en présence d'amidon modifié **P9**\*.

### 2.7.1. Etudes préliminaires

Ces études préliminaires permettent de vérifier si la capacité à solubiliser le BaP par l'amidon **P9\*** en MM1 est identique à celle obtenue dans l'eau déminéralisée. De plus, il est nécessaire de vérifier si *Fusarium solani* (S19) est capable de croître en présence d'amidon modifié **P9\***, comme seule source de carbone.

# 2.7.1.1. <u>Etude de la capacité de l'amidon **P9\*** à solubiliser le benzo[a]pyrène en milieu minéral</u>

Le test de dégradation du BaP en présence d'amidon se déroule en MM1. Ce milieu minéral est composé de macroéléments et d'oligoéléments. La capacité à solubiliser le BaP par l'amidon **P9\*** a été évaluée dans l'eau déminéralisée dans les études précédentes (Chapitre 1). Il est donc nécessaire de vérifier ses propriétés en MM1. Cette étude est réalisée en mesurant la fluorescence du BaP selon les différents traitements décrits dans le Tableau II 4.

	Composition des solutions			
Traitament	Concentration en			
Traitement	amidon <b>P9*</b>	Milieu liquide		
	(g.L <sup>-1</sup> )			
1	0,00	Eau*		
2	0,45	Eau		
3	0,00	MM1 à 10 mM		
4	0,45	MM1 à 10 mM		
5	0,90	Eau + MM1 à 20 mM		

Tableau II 4. Description des différents traitements menés lors de l'étude évaluant la capacité de l'amidon **P9\*** à solubiliser le BaP en MM1

\*Eau = eau déminéralisée

Cette expérience est réalisée d'après le protocole expérimental appliqué dans le chapitre 1 pour mesurer la capacité des amidons modifiés à solubiliser le BaP. Pour les traitements 1 à 4, 3 mL de solution sont introduits dans les tubes à hémolyse contenant du BaP. Pour le traitement 5, 1,5 mL d'une solution aqueuse d'amidon 0,90 g.L<sup>-1</sup> sont introduits dans les tubes à hémolyse. Après 24 heures d'incubation, le traitement 5 est complété à 3 mL par MM1 à 20 mM. La fluorescence du BaP présent dans les différents traitements est ensuite mesurée au spectrofluorimètre.

# 2.7.1.2. <u>Etude de la croissance fongique en présence d'amidon</u> <u>modifié</u>

Dans les expérimentations précédentes, la croissance de *Fusarium solani* (S19) a été réalisée en présence de glucose comme source de carbone facilement assimilable. Il est donc nécessaire de vérifier sa capacité à croître en présence d'amidon modifié **P9\***, comme seule source de carbone.

Cette étude consiste à évaluer la croissance de S19 en présence d'amidon en comparaison avec celle obtenue en présence de glucose. Les expériences sont réalisées dans 25 mL de MM1 contenant des antibiotiques (5 mg.L<sup>-1</sup> de chloramphénicol et 5 mg.L<sup>-1</sup> de néomycine). Après autoclavage du milieu, l'amidon modifié (**P9\***) ou l'amidon natif (**P0**) est ajouté comme seule source de carbone de façon à obtenir une concentration de 5 g.L<sup>-1</sup> équivalent glucose (eq glc). Un témoin est également préparé avec du glucose à 5 g.L<sup>-1</sup>.

L'inoculation des cultures est réalisée avec une suspension de spores de S19 à une concentration initiale de 10<sup>4</sup> spores.mL<sup>-1</sup> selon la méthode décrite dans la partie 2.2. Les cultures sont incubées pendant 9 jours à 22°C sur un agitateur orbital (Infors, Massy, France)

à 175 rpm. Après incubation, la croissance fongique est évaluée par pesée de la biomasse produite, selon le mode opératoire décrit dans la partie 2.3.

# 2.7.2. <u>Etude comparative de la dégradation du benzo[a]pyrène par les deux</u> processus d'oxydation (biologique et/ou chimique) en présence d'amidon

Dans cette partie, nous voulons étudier si l'amidon **P9\*** peut influencer ou non la dégradation du BaP dans les traitements d'oxydation biologique et/ou chimique. L'étude de la dégradation du BaP est donc conduite en MM1 en présence ou non d'amidon. Ces expériences sont menées sur la souche S19 et le réactif de Fenton. Trois traitements sont comparés : la biodégradation (B), l'oxydation chimique par le réactif de Fenton (F) et le traitement combiné biologique-chimique (B+F). Les différents traitements réalisés sont résumés dans leTableau II 5.

Tableau II 5. Résumé des différents traitements réalisés dans l'étude de la dégradation du BaP par l'oxydation biologique et/ou chimique par le réactif de Fenton pour *Fusarium solani* (S19) en présence d'amidon modifié **P9\*** 

Traitement*	Code	S19	BaP	Amidon <b>P9*</b>	Réactif de Fenton
Abiotique	т	$\checkmark$	$\checkmark$		
	Ta*	√	$\checkmark$	~	
Biologique	В	✓	$\checkmark$		
	Ba*	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$	
Chimiana Fantan	F		$\checkmark$		$\checkmark$
Chimique renton	Fa*		$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$
Couplage biologique – Fenton	B+F	✓	$\checkmark$		$\checkmark$
	(B+F)a*	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$

\* Traitement en présence d'amidon

### 2.7.2.1. <u>Conditions expérimentales</u>

Nous avons suivi une démarche expérimentale comme celle décrite dans les tests de dégradation du BaP. Une quantité finale de 250 µg de BaP est introduite par erlenmeyer. 12,5 mL d'eau déminéralisée sont ajoutés puis stérilisés. Pour les traitements en présence d'amidon (Ta; Ba; Fa; (B+F)a), 125 mg d'amidon **P9\*** sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 4,5 g.L<sup>-1</sup>. Cette concentration finale d'amidon modifié a été préalablement déterminée dans le chapitre 1. L'amidon est mis en contact pendant 24 heures avec le BaP préalablement adsorbé sur le verre. 12,5 mL de milieu minéral stérilisé (MM1 deux fois plus concentré) sont ensuite additionnés dans les erlernmeyers afin d'avoir un milieu minéral à pH 7. Un volume adéquat de glucose est ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 10 g.L<sup>-1</sup> de glucose assimilable dans tous les traitements.

Pour les traitements biologiques, les erlenmeyers sont inoculés par addition d'une suspension de spores de S19 à J0 à une concentration de 10<sup>4</sup> spores.mL<sup>-1</sup> selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.2.

Les traitements d'oxydation chimique par le réactif de Fenton (F ; Fa ; B+F ; (B+F)a) sont réalisés en introduisant un volume d'une solution aqueuse de  $FeSO_4$ .  $7H_2O$  à une concentration finale de 5 mM puis un volume d'une solution aqueuse d' $H_2O_2$  à une concentration finale de 50 mM, à J3 et J4.

Un traitement abiotique supplémentaire est réalisé en présence d'amidon P9\*.

L'ensemble des traitements sont incubés sous agitation orbitale (175 rpm) à température ambiante pendant 13 jours. Le déroulement des tests de dégradation du BaP en présence d'amidon est récapitulé dans la Figure II 4.



Figure II 4. Schéma du déroulement des tests de dégradation du BaP en présence d'amidon **P9\*** dans les traitements combinés oxydation chimique/biologique ((B+F)a). Pour le traitement oxydation biologique (Ba), seul l'ensemencement des spores est réalisé, pour le traitement oxydation chimique (Fa), seul l'ajout d'oxydant est réalisé

# 2.8. Traitements statistiques

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel SPSS (SPSS 20.0, IBM France). Après vérification de la normalité des données par le test de Shapiro-Wilk, le test U de Mann Whitney a été utilisé pour comparer les différents traitements avec le témoin abiotique. Les

résultats sont considérés comme significatif lorsque  $p \le 0,05$ . Des lettres permettent de distinguer les traitements significativement différents du témoin.

# **Résultats et Discussion**

# 1. Etude de la toxicité des oxydants sur différentes souches fongiques

L'objectif de cette partie est de mettre au point, en milieu minéral, une méthode de dégradation du BaP couplant simultanément ou séquentiellement une oxydation chimique à un procédé d'oxydation biologique.

Nous étudions dans un premier temps la croissance de différentes souches fongiques soumises à une gamme croissante de concentrations d'oxydant. Le but de cette étude est de déterminer les doses d'oxydants biocompatibles et de sélectionner les souches fongiques capables de résister aux oxydants étudiés. Les deux oxydants préalablement sélectionnés sont KMnO<sub>4</sub> et le réactif de Fenton. La toxicité de ces oxydants est évaluée sur 4 souches fongiques.

### 1.1. Effet du permanganate de potassium sur la croissance fongique

La toxicité du KMnO<sub>4</sub> est évaluée pendant la phase exponentielle de croissance des quatre champignons suivants : *Fusarium solani* (S19), *Lecanicillium lecanii* (E1), *Penicillium brasilianum* (D19), *Paecilomyces lilacinus* (S6). Les résultats sont présentés Figure II 5.



Figure II 5. Pourcentages d'inhibition de croissance en milieu minéral de souches fongiques (E1 : *Lecanicillium lecanii*, D19 : *Penicillium brasilianum*, S6 : *Paecilomyces lilacinus*) soumises à une gamme de concentrations croissantes de KMnO<sub>4</sub> par rapport au témoin sans oxydant après 48h d'incubation

La souche S19 est résistante à toutes les concentrations de KMnO<sub>4</sub> testées donc nous avons choisi de ne pas la représenter sur la Figure II 5. Cet oxydant n'a donc pas d'effet toxique sur la croissance de cette souche. De plus, une disparition rapide (en 1 à 2 h) de la coloration violette du KMnO<sub>4</sub> est constatée en présence de S19 indiquant la réduction du KMnO<sub>4</sub> en dioxyde de manganèse probablement liée à une action enzymatique du mycélium de S19 sur l'oxydant. Par conséquent, l'efficacité oxydante de KMnO<sub>4</sub> est diminuée.

La Figure II 5 montre que les 3 autres souches testées présentent des sensibilités différentes vis-à-vis de l'oxydant. La croissance des souches E1 et S6 est très rapidement inhibée. En effet, sur la gamme de concentrations testées (de 0 à 1 g.L<sup>-1</sup>), les souches E1 et S6 présentent une  $CE_{50-48h}$  respective de 0,06 et 0,19 g.L<sup>-1</sup> de KMnO<sub>4</sub>.

La souche D19 présente une résistance au KMnO<sub>4</sub> supérieure à E1 et S6. De fait, pour la souche D19, KMnO<sub>4</sub> n'entraîne pas d'inhibition de croissance importante sur la gamme de concentrations choisies ( $CE_{50} = 0.71 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### 1.2. Effet du réactif de Fenton sur la croissance fongique

Une étude similaire est conduite pour déterminer le pourcentage d'inhibition de croissance des souches fongiques en présence du réactif de Fenton, utilisé comme agent oxydant. Pour cette expérience, nous avons choisi d'ajouter le réactif de Fenton en deux fois (à J3 et J4) car les radicaux hydroxyles générés présentent une demi-vie extrêmement limitée ( $\approx 10^{-9}$  s). La Figure II 6 représente la courbe d'inhibition de la croissance des souches S6, S19, E1 et D19 sous l'action du réactif de Fenton.



Figure II 6. Pourcentages d'inhibition de croissance en milieu minéral de souches fongiques (S6 : *Paecilomyces lilacinus*, S19 : *Fusarium solani*, E1 : *Lecanicillium lecanii*, D19 : *Penicillium brasilianum*) soumises à une gamme de concentrations croissantes de réactif de Fenton par rapport au témoin sans oxydant après 48h d'incubation. Par souci de lisibilité, ce pourcentage d'inhibition est représenté en fonction de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seulement

La Figure II 6 montre que les souches n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de l'oxydant testé. Les résultats indiquent également que les concentrations choisies en FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne sont pas toxiques pour la majorité des souches testées. En effet, pour la gamme de concentrations étudiées, la CE<sub>50</sub> n'a pu être déterminée graphiquement que pour la souche E1 (avec un rapport en [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]/[FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O] de 6,96/0,70 mM).

# 1.3. <u>Conclusion des tests de toxicité du réactif de Fenton et du permanganate de potassium sur les souches fongiques</u>

Les résultats obtenus lors des tests de toxicité nous ont permis de déterminer la CE<sub>50-48h</sub> pour chaque souche fongique et pour chaque oxydant. Les différentes CE<sub>50-48h</sub> sont récapitulées dans le Tableau II 6 ci-dessous :

Souche fongique	CE <sub>50-48h</sub> KMnO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	CE <sub>50-48h</sub> [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]/[FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O] (mM)
E1	0,06	7,00/0,70
S6	0,19	ND
S19	ND	ND
D19	0,71	ND*

Tableau II 6. Concentrations Efficaces (CE<sub>50-48h</sub>) des deux oxydants déterminées pour chaque souche

\*ND : Non Déterminée dans les conditions de l'expérience

En résumé, les résultats montrent que la souche E1 est rapidement inhibée pour les deux oxydants à de faibles concentrations. De même, la souche S6 est sensible à une faible concentration de KMnO<sub>4</sub>. D'autre part, la souche S19 résistante à l'action de KMnO<sub>4</sub> semblerait présenter des capacités à neutraliser cet oxydant. Pour ces différentes raisons notre choix s'est donc porté, pour la suite de l'étude, sur la souche D19.

Ainsi, la souche D19 est sélectionnée pour la réalisation des tests de dégradation chimique et/ou biologique du BaP (HAP modèle) en MM1 avec la quantité d'oxydant déterminée par les tests de toxicité. Les doses d'oxydants sélectionnées pour l'expérience de dégradation de polluants en MM1 sont respectivement de 0,50 g.L<sup>-1</sup> pour KMnO<sub>4</sub>, 50 mM pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 5 mM pour Fe<sup>2+</sup> car elles inhibent la croissance de D19 d'environ 40 %, ce qui rend ces concentrations biocompatibles avec le développement fongique.

- 2. <u>Etude comparative de la dégradation du benzo[a]pyrène par différents processus</u> <u>d'oxydation (biologique et/ou chimique)</u>
  - 2.1. <u>Dégradation du benzo[a]pyrène par traitement biologique (en présence de la souche D19) et/ou chimique</u>

La Figure II 7 présente les pourcentages de dégradation du BaP (introduits à 500 µg dans 25 mL de MM1) obtenus après 12 jours d'incubation. Cinq traitements sont comparés : la biodégradation (B) où seul D19 est ensemencé, l'oxydation chimique où seul le réactif de Fenton (F) ou KMnO<sub>4</sub> (K) sont utilisés et les traitements combinés, biologique-chimique où l'oxydation biologique est couplée avec le réactif de Fenton (B+F) ou avec KMnO<sub>4</sub> (B+K) (cf Matériels et méthodes : Tableau II 3).


Figure II 7. Pourcentage de dégradation du BaP en MM1 après 12 jours d'incubation en fonction des traitements : biologique (B) par D19, ou/et chimique par le réactif de Fenton (F ou B+F) ou par KMnO<sub>4</sub> (K ou B+K). Pour chaque traitement, les pourcentages de dégradation du BaP sont calculés par rapport au témoin abiotique (non représenté sur la figure). Les astérisques (\*) indiquent une dégradation significative par rapport au témoin abiotique (p<0,05)

Dans les conditions expérimentales retenues, la souche D19 (B, Figure II 7) ne dégrade pas le BaP. L'absence de dégradation lors du traitement biologique semble indiquer l'absence ou l'incapacité des systèmes enzymatiques de D19 à dégrader le BaP dans les conditions expérimentales. A notre connaissance, la souche D19 identifiée comme un isolat de *Penicillium brasilianum* n'est pas une espèce décrite dans la littérature pour posséder des capacités à dégrader les HAP et en particulier le BaP. Cependant, d'autres isolats du genre *Penicillium* ont été étudiées pour leur capacité à dégrader les HAP (Da Silva et al., 2003; Leitão, 2009). Par exemple, Machín-Ramírez et al. (2010) ont montré que le genre *Penicillium sp* dégradait 83,8 % de BaP (introduit à 25 mg L<sup>-1</sup>) après 5 jours d'incubation en MM. Selon Saraswathy et Halberg (2002), *Penicillium terrestre* dégraderait 67 % de pyrène (introduit à 100 mg.L<sup>-1</sup>) après 28 jours d'incubation en MM. Cependant, pour information D19 a été sélectionnée pour ses capacités à mobiliser et à assimiler des polluants hydrophobes tel que l'hexadécane (chapitre 3). De plus, l'observation en microscopie à épifluorescence nous a permis de constater la capacité de cette souche à mobiliser le polluant en phase aqueuse et à l'incorporer dans ces hyphes (Figure II 8). Ce phénomène se visualise par la présence de vésicules lipidiques fluorescentes dans le mycélium de D19. Ce transfert du BaP en phase aqueuse et ce stockage du polluant dans les hyphes ont déjà été observés chez *Fusarium solani* et chez d'autres champignons (Fayeulle et al., 2013; Rafin et al., 2000). Il semblerait donc que malgré sa capacité à mobiliser le BaP au sein de ses hyphes, cette souche soit incapable de dégrader ce polluant dans les conditions expérimentales retenues.



Figure II 8. Observation au microscope à épifluorescence (filtre DAPI, grossissement 500) du mycélium fongique de D19 dans le traitement biologique seul (D19). La fluorescence verte à l'intérieur du mycélium correspond aux molécules de BaP incorporées dans les vésicules lipidiques

Une dégradation significative par l'oxydation chimique est mesurée avec une efficacité similaire des deux oxydants (24,2 % et 22,8 % pour F et K respectivement). Les résultats de dégradation obtenus dans les traitements chimiques seuls (F et K) semblent indiquer que le pourcentage de BaP dégradé correspondrait non seulement au BaP en phase aqueuse mais aussi et principalement à une partie du BaP insoluble. En effet, la faible solubilité aqueuse du BaP (3µg/L) limite la quantité de BaP disponible en phase aqueuse dans nos différents traitements en MM1. Ce paramètre limite l'efficacité des traitements de dégradation car de nombreux auteurs tels que Rivas (2006) et Flotron et al., (2005) soulignent l'importance de solubiliser en phase aqueuse les HAP afin qu'ils soient dégradés par les oxydants. Cependant, la quantité de BaP dégradé par le traitement chimique (F) est largement supérieure (60,5 µg) à la quantité de BaP soluble (0,075 µg). Rappelons que les radicaux hydroxyles impliqués dans la réaction de Fenton sont caractérisés par une durée de vie très courte et ne seraient, par conséquent, capables d'oxyder qu'une faible quantité de BaP, principalement la partie

soluble. Un autre mécanisme que l'action direct des radicaux hydroxyles sur le polluant semble être impliqué dans la dégradation du BaP par le traitement Fenton.

Dans l'ensemble des traitements dont le traitement F, nous avons ajouté initialement une quantité identique de glucose (10 g.L<sup>-1</sup>). Il se pourrait que les radicaux hydroxyles issus de la réaction de Fenton, qui sont non spécifiques, aient pu réagir avec le glucose en produisant des radicaux. Ainsi, ces radicaux issus du glucose présentant un temps de vie plus long atteindraient et dégraderaient le BaP adsorbé sur le verre de l'erlenmeyer. Par conséquent, lors du traitement chimique par le réactif de Fenton, la quantité de BaP dégradé serait nettement plus importante en présence de glucose. Cette hypothèse est représentée dans la Figure II 9. Cette hypothèse a déjà été émise avec l'amidon au cours d'études antérieures de l'équipe (Dospinescu-Rosu, 2011).



Figure II 9. Schéma hypothétique de la transformation du BaP par les radicaux issus du glucose (Dospinescu-Rosu, 2011) modifié par Delsarte, 2016

En ce qui concerne les couplages oxydation biologique-oxydation chimique (B+F, B+K), les taux de dégradation obtenus sont de 46,8 % et 11,8 % pour B+F et B+K respectivement.

Le traitement combiné biologique-KMnO<sub>4</sub> est moins efficace que le traitement chimique seul (K). En effet, pour ce traitement combiné, le pourcentage de dégradation du BaP diminue d'un facteur 2 par rapport au traitement K, passant de 22,8 % (K) à 11,8 % (B+K). Ce résultat peut être expliqué par les hypothèses suivantes. Comme tout agent d'oxydation chimique, KMnO<sub>4</sub> peut réagir avec la matière organique carbonée présente dans le milieu. La biomasse fongique présente pourrait interférer et rentrer en compétition avec le BaP comme cible finale de l'oxydation chimique. D'autre part, nous avons observé la présence du BaP à l'intérieur de la biomasse fongique. Cette internalisation du polluant pourrait par contre entraîner un phénomène de protection du BaP vis-à-vis de l'oxydant. En effet, les biomolécules constituant la paroi fongique seraient les cibles d'une partie de l'oxydant chimique au détriment du polluant.

Dans la littérature, peu de données sont disponibles sur des modèles similaires couplant oxydation chimique par le KMNO<sub>4</sub> et oxydation biologique par les champignons. Zang et al., (2007) ont démontré que le traitement *Penicillium chrysogenum* couplé avec KMnO<sub>4</sub> présente de meilleurs taux de dégradation du BaP par rapport à ceux obtenus en présence uniquement du champignon. Ce gain de dégradation serait peut-être dû à l'utilisation d'une concentration en oxydant 10 fois plus élevée que celle utilisée dans cette étude et à l'utilisation de l'oxydation chimique seule comme prétraitement de l'oxydation biologique. Nos résultats montrent clairement que dans nos conditions expérimentales, le couplage B+K n'entraîne pas une augmentation de la dégradation du BaP par rapport au traitement B.

En revanche, les résultats obtenus pour le traitement B+F s'avèrent particulièrement prometteurs pour la dégradation du BaP. En effet, le traitement biologique suivi du traitement chimique par le réactif de Fenton (B+F) permet une augmentation significative du taux de dégradation du BaP d'environ 20 % par rapport à l'oxydation chimique seule (F). Cette complémentarité se traduit par l'obtention d'un pourcentage de dégradation 2 fois supérieur au traitement chimique seul (F).

Il est possible que D19 produise des molécules ayant des propriétés biosurfactantes (Figure II 10 : Etape 1). Ces molécules biosurfactantes permettraient de transférer le BaP adsorbé sur le verre vers la phase aqueuse (Figure II 10 : Etape 2). Le BaP solubilisé dans la phase aqueuse serait ainsi plus accessible au champignon pour l'incorporer au sein de ses hyphes (Figure II 10 : Etape 3). L'hypothèse de la biosynthèse de molécules extracellulaires surfactantes améliorant la solubilisation du BaP et son incorporation au sein des cellules fongique grâce à des mécanismes de transport actif a déjà été émise au cours de recherches réalisées précédemment sur *Fusarium solani* au sein de notre équipe (Fayeulle et al., 2013; Veignie et al., 2012) (Figure II 10). La production de composés extracellulaires avec des propriétés émulsifiantes ont également été décrites chez des isolats de *Penicillium sp* en

présence de composés hydrophobes. Par exemple, Camargo-de-Morais et al., (2003) ont montré que *Penicillium citrinum* produisait un glycolipide avec des propriétés émulsifiantes en milieu minéral en présence de 1 % (v/v) d'huile d'olive comme source de carbone. Luna-Velasco et al.,(2007) ont également montré qu'un isolat du genre *Penicillium sp* synthétisait des molécules bioémulsifiantes dans un milieu minéral enrichi avec 300 mg.L<sup>-1</sup> de phénanthrène. Cette hypothèse est récapitulée dans le schéma Figure II 10.



Figure II 10. Schéma récapitulatif de l'hypothèse résultant de l'étude du mode d'incorporation des HAP chez le champignon filamenteux *Fusarium solani* en MM1 (Fayeulle et al., 2013).

De plus, la capacité de la biomasse fongique à fixer des métaux lourds en utilisant des mécanismes d'échange d'ions et/ou de chélation a également été démontrée chez certains champignons comme chez *Penicillium cyclopium* (Tsekova et al., 2011; Goltapeh et al., 2013). Les groupements ioniques (COO<sup>-</sup> ; NH3<sup>+</sup>) présents dans la paroi fongique seraient mis à contribution dans ce type de biosorption de métaux lourds (Gardea-Torresdey et al., 1996). Il se pourrait donc que, dans notre expérimentation, cette propriété à fixer des ions métalliques tels que Fe<sup>2+</sup> puisse exister dans la paroi fongique de *Penicillium brasilianum* (D19).

La combinaison de ces deux propriétés c'est-à-dire la capacité à mobiliser des substrats hydrophobes et à fixer des ions métalliques sur/dans les parois fongiques conduirait à créer une proximité spatiale optimale des trois acteurs de la réaction de dégradation (Champignon, BaP, Fe<sup>2+</sup>). Cette hypothèse est récapitulée sur la Figure II 11.



Figure II 11. Schéma hypothétique de la proximité spatiale entre le mycélium fongique, le BaP et les cations Fe<sup>2+</sup> résultant des hypothèses précitées (mécanisme d'incorporation du BaP et de fixation des ions métalliques sur le mycélium des champignons)

Les résultats concernant le couplage biodégradation et oxydation chimique par le réactif de Fenton sont intéressants. Ces résultats nous ont encouragés à reproduire cette étude en utilisant une autre souche, *Fusarium solani* (S19). Ce choix repose sur les travaux antérieurs de notre équipe ayant démontré les capacités de ce champignon à dégrader le BaP (Rafin et al., 2000; Veignie et al., 2002, 2004) et aussi à l'incorporer grâce à des mécanismes de transport actif (Fayeulle et al., 2013). Compte tenu des résultats de dégradation obtenus au cours du traitement B+K (Figure II 7), l'étude de la dégradation du BaP en présence de la souche S19 se fera uniquement en présence du réactif de Fenton comme oxydant chimique. Ce choix est conforté par la littérature. En effet, l'oxydant KMnO<sub>4</sub> est moins efficace que le réactif de Fenton pour la dégradation des HAP et moins utilisé pour le couplage oxydation chimique/biologique (Keijzer and van Gool, 2014).

# 2.2. <u>Dégradation du benzo[a]pyrène par oxydation biologique par S19 et/ou par</u> oxydation chimique

La Figure II 12 présente les pourcentages de dégradation du BaP par S19 et/ou le réactif de Fenton, obtenus après 12 jours d'incubation en MM1.



Figure II 12. Pourcentage de dégradation du BaP en MM après 12 jours d'incubation en fonction des traitements : biologique (B) par S19, chimique par le réactif de Fenton (F) et couplage biologique et chimique (B+F) pour chaque traitement Les pourcentages de dégradation du BaP sont calculés par rapport au témoin abiotique (T). Les astérisques (\*) indiquent une dégradation significative par rapport au témoin abiotique avec un p<0,05

La souche S19 seule présente une dégradation significative par rapport au témoin abiotique. En effet, S19 entraîne un taux de dégradation de 16,8 %. Ce résultat est en accord avec les résultats de dégradation obtenus lors d'études précédentes réalisées au sein de notre équipe (Rafin et al., 2013; Veignie et al., 2002). Un taux de dégradation de 21,7 % est obtenu pour le traitement chimique seul (F). Ce pourcentage est similaire au résultat obtenu lors des expérimentations précédentes (Figure II 7 : traitement F).

Pour le traitement B+F, le couplage de l'oxydation biologique et chimique conduit à un taux de dégradation de 41,8 %. Ce résultat semble indiquer un effet additif des deux traitements : biologique (16,8 %) et chimique (21,7 %). Cet effet additif a également été observé au cours du traitement combiné en présence de D19. Dans le cas des traitements combinés où le réactif de Fenton est couplé à l'oxydation biologique (avec D19 ou S19), des résultats similaires sont obtenus (~ 40 %). Cependant, même si les taux de dégradation sont similaires, les deux souches testées semblent avoir des cinétiques de croissance et de dégradation différentes lorsqu'elles sont mises en présence du BaP. En effet, D19 est capable de mobiliser le polluant en phase aqueuse et de l'incorporer dans ces hyphes (Figure II 13) tandis que S19 peut à la fois mobiliser le BaP, l'incorporer et le dégrader (Figure II 13).

Malgré deux comportements différents, la quantité de BaP dégradé est la même en présence du réactif de Fenton. Il semblerait que la quantité disponible pour l'oxydation (chimique et/ou biologique) soit le facteur limitant pour la dégradation. Nous nous proposons dans une dernière partie, d'utiliser les propriétés surfactantes des amidons préalablement synthétisés (chapitre 1) pour des expérimentations de dégradation afin de tenter de lever ce verrou technologique.



Figure II 13. Schéma récapitulatif des taux de dégradation du BaP obtenus lors des deux traitements combinés de dégradation (B+F) en fonction de la souche testée (D19 ou S19)

De plus, il est difficile de comparer les résultats des traitements combinés (B+F) obtenus avec la littérature existante du fait de la variabilité des conditions d'expériences. Cependant, de manière générale, les résultats obtenus dans cette partie vont dans le sens de plusieurs travaux qui ont montré l'effet positif des traitements combinés biologique/chimique sur la dégradation des HAP (Venny et al., 2012). Par exemple, Nadarajah et al., (2002) ont étudié en milieu minéral l'influence du réactif de Fenton

(prétraitement) sur la biodégradation de deux HAP, l'anthracène et le BaP. Ainsi, les taux de transformation des HAP varient entre 9,2 et 12,4 mg/jour pour le traitement combiné chimique-biologique comparé à 2,1 et 7,4 mg/jour pour le traitement biologique seul. Valderrama et al., (2009) ont appliqué un traitement chimique par le réactif de Fenton  $([H_2O_2 : Fe] = 20 : 1)$  suivi du traitement biologique sur des échantillons de sol contaminés par le créosote. Un taux de dégradation des HAP totaux de 75 % a été obtenu par traitement combiné, soit 30 % de plus que le traitement chimique seul (43 %).

Enfin, il est connu que des traitements chimiques comme le réactif de Fenton sont favorables à un post-traitement biologique car ils libèrent de l'oxygène nécessaire à l'activité microbienne en conditions aérobies (Sutton et al., 2011). Zawierucha et Malina (2011) ont montré que l'ajout d'une solution aqueuse à 3 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des sols contaminés par les hydrocarbures provoque une amélioration significative des taux de biodégradation par rapport au témoin (en moyenne 260 %). En effet, la biodégradation aérobie des hydrocarbures bénéficierait de la présence d'oxygène libéré lors de la décomposition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kulik et al., (2006) ont également montré que la libération d'oxygène lors de la décomposition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours d'un traitement d'oxydation par la réactif de Fenton pourrait fournir l'oxygénation nécessaire pour la transformation biologique des polluants dans la matrice sol.

- 3. <u>Etude de l'efficacité de méthodes d'oxydation (chimique et/ou biologique) du</u> <u>benzo[a]pyrène en présence de matrices d'amidons modifiés</u>
  - 3.1. <u>Influence du milieu minéral sur la capacité de l'amidon P9\* à solubiliser le benzo[a]pyrène</u>

Les traitements de dégradation du BaP en présence d'amidon se déroulent en MM1. Ce milieu minéral est composé de plusieurs macroéléments et oligoéléments qui sont nécessaires au développement des microorganismes. La détermination de la capacité de l'amidon modifié **P9\*** à solubiliser le BaP a été évaluée dans les expérimentations précédentes dans l'eau déminéralisée. Il est donc nécessaire de vérifier si les capacités de l'amidon à solubiliser le BaP peuvent varier en fonction de la nature du milieu liquide choisi.

Traitement	Amidon	Solvant	Solubilisation du BaP (en µg/L)
1		Fou déminéralisée	3
2	$\checkmark$		97
3			3
4	✓	MM1	33
5	$\checkmark$		95

Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel

Dans un premier temps, la solubilité du BaP est mesurée dans l'eau déminéralisée (1) et dans le MM1 (3) (Tableau II 7). Le Tableau II 7 montre que la solubilité du BaP est de 3 µg.L<sup>-1</sup> dans les deux milieux réactionnels étudiés. Nous pouvons donc en déduire que les macroéléments présents dans le MM1 n'influencent pas la solubilisation du BaP.

Dans un second temps, la capacité de l'amidon **P9\*** à solubiliser le BaP est mesurée dans l'eau déminéralisée et dans le MM1 (Tableau II 7). Dans le traitement 2, la quantité de BaP solubilisé par l'amidon est de 97 µg.L<sup>-1</sup>, soit 32 fois plus importante que la solubilité initiale du BaP dans l'eau. En revanche, lorsque l'amidon est en MM1, la concentration de BaP désorbé est de 33 µg.L<sup>-1</sup>. La capacité de l'amidon à solubiliser le BaP se retrouve divisé par 3 par rapport au traitement 2. Les macroéléments présents dans le MM1 semblent diminuer les capacités de cet amidon à désorber et à solubiliser le polluant.

Pour rappel, l'amidon est composé de deux homopolymères : l'amylose et l'amylopectine. Rosu et al. (2011) ont montré par des études de modélisation moléculaire que l'amylopectine possède plusieurs sites de complexation pour les molécules invitées de type BaP et cations Fe<sup>2+</sup>. Ainsi, la diminution de la capacité de l'amidon **P9\*** à solubiliser le BaP en MM1 pourrait être liée à la présence des éléments minéraux au sein de la matrice polysaccharidique qui perturberaient l'accès aux sites de complexation du BaP. Par conséquent, ces macroéléments diminueraient le nombre de sites disponibles pour les molécules de BaP.

Afin d'exploiter au maximum les cavités présentes au sein de l'amidon, il est nécessaire de réaliser l'étape de solubilisation du BaP par l'amidon dans l'eau déminéralisée. L'ajout d'une étape supplémentaire aux différents traitements de dégradation du BaP est donc envisagé. Cette étape devrait être réalisée dans l'eau déminéralisée, 24 heures avant l'ajout du MM1 et des différents oxydants. Nous vérifions préalablement cette stratégie pour nous assurer que les macroéléments ne perturbent pas la quantité de BaP solubilisée préalablement par l'amidon (Tableau II 7, traitement 5). Le traitement 5 indique que la stratégie envisagée permet d'utiliser l'intégralité des capacités de l'amidon à solubiliser le BaP. En effet, la concentration de BaP solubilisée est identique à celle obtenue en milieu minéral (traitement 2) (Tableau II 7).

Cette étude préliminaire nous permet de déterminer les conditions expérimentales pour la dégradation du BaP par l'oxydation chimique et/ou biologique en présence d'amidon **P9\***. Les conditions retenues sont les suivantes : 12,5 mL d'une solution d'amidon à 9 g.L<sup>-1</sup> sont ajoutés dans les erlenmeyers contenant le BaP. Après 24 heures, 12,5 mL de MM1 concentré (X2) sont ajoutés et les différents traitements sont réalisés.

# 3.2. <u>Optimisation du protocole expérimental de la dégradation du benzo[a]pyrène</u> <u>en présence d'amidon</u>

#### 3.2.1. Biodégradation de l'amidon modifié par Fusarium solani

La croissance de *Fusarium solani* (S19) a été réalisée jusqu'à présent en présence de glucose comme source de carbone facilement assimilable. Il est donc nécessaire de vérifier sa croissance en présence d'amidon modifié **P9\*** et de la comparer à celle obtenue en présence de glucose. La Figure II 14 montre la biomasse sèche obtenue en présence de glucose (traitement témoin), d'amidon natif (**P0**) ou d'amidon modifié (**P9\***) en MM1 après 9 jours d'incubation.



Figure II 14. Biomasse sèche produite par S19 en MM1 après 9 jours d'incubation, en présence de glucose (glc) ; d'amidon natif (**P0**) ou d'amidon modifié (**P9**\*) comme seule source de carbone (5 g.L<sup>-1</sup>)

Le glucose permet le développement d'une biomasse fongique sèche de 46,2 mg après 9 jours d'incubation. Dans ces mêmes conditions, seul PO permet une croissance fongique avec une biomasse légèrement inférieure (34,7 mg) à celle obtenue en présence de glucose. S19 ne se développe pas en présence de **P9\*** comme seule source de carbone. En effet, une biomasse fongique sèche de 3,6 mg est obtenue soit 8 % de la biomasse fongique produite en présence de glucose. Comme la souche S19 métabolise PO comme seule source de carbone, ce champignon produit donc des enzymes dégradant l'amidon natif. Ainsi, il est vraisemblable que ces enzymes sont également produites en présence d'amidon modifié. Cependant, l'activité de ces enzymes serait probablement bloquée par la présence des liaisons éthers (des groupements BS greffés) sur l'amidon P9\*. De plus, ces enzymes pourraient ne pas être produites en raison de la quantité insuffisante de source de carbone disponible facilement assimilable par le champignon. En effet, pour cette étape seule les faibles réserves carbonées de la spore sont mobilisées et rapidement épuisée au cours de la germination des spores. Le carbone disponible est donc insuffisant pour le développement de la biomasse et pour l'activité enzymatique de la souche. Un cas similaire a été observé lors d'études réalisées antérieurement au sein de l'équipe (Rafin et al., 2009). En effet, Rafin et al. (2009) ont montré que Fusarium solani métabolise la béta-cyclodextrine (ß-CD) comme seule source de carbone tandis que les dérivés de CD (RAMEB et HPBCD) sont plus résistants.

Pour ces raisons, le produit **P9\*** ne peut pas être utilisé comme seule source de carbone dans les traitements de biodégradation (S19 et S19+F) du BaP en présence d'amidon. Il est donc nécessaire d'ajouter du glucose comme source de carbone supplémentaire dans chacun de ces traitements. Rappelons que les traitements de dégradation du BaP en présence d'amidon vont être comparés aux traitements sans amidon (traitements témoins). Afin d'évaluer le rôle de l'amidon dans les procédés de biodégradation, la quantité de glucose ajoutée dans les traitements en présence d'amidon est calculée afin d'obtenir une biomasse équivalente aux traitements témoins. D'après les résultats obtenus dans cette partie (Figure II 14), il y a une différence de 92 % entre la biomasse produite en présence de glucose ajoutés dans les traitements témoins (soit 9,2 g.L<sup>-1</sup>) sont ajoutés dans les traitements en présence d'amidon.

# 3.3. <u>Etude comparative des tests de dégradations du benzo[a]pyrène en présence</u> <u>ou non d'amidon modifié</u>

Les résultats sur la dégradation du BaP conduite en MM1 avec ou sans amidon modifié sont présentés dans la Figure II 15. Les trois traitements suivants : biodégradation (B), oxydation chimique par le réactif de Fenton (F) et traitement combiné biologique-chimique (B+F) sont comparés avec les traitements en présence d'amidon **P9\*** (Ba, Fa et (B+F)a).



Figure II 15. Dégradation du benzo[a]pyrène après 12 jours d'incubation en MM1. en fonction des traitements : biologique : (B) en présence de glucose et avec amidon (Ba), oxydation chimique par le réactif de Fenton (F et Fa), biologique et chimique par le réactif de Fenton (B+F ou (B+F)a). Les astérisques (\*) indiquent une dégradation significative par rapport au témoin abiotique (p<0,05)

En absence d'amidon, les résultats obtenus pour les trois traitements (B, F et B+F) sont identiques à ceux obtenus précédemment (Figure II 7 et Figure II 12). Ces premiers résultats permettent de souligner la répétabilité des traitements.

En présence d'amidon, la dégradation du BaP dans le traitement chimique (Fa) est de 95 %, soit une augmentation d'un facteur 4 comparé au traitement témoin sans amidon (F). Ce résultat permet de confirmer l'augmentation de l'efficacité du traitement Fenton en présence d'amidon **P9\***. Cependant, la présence de l'amidon **P9\*** ne permet pas une augmentation de la biodégradation du BaP par la souche S19. En effet, les taux de dégradation obtenus lors du traitement biologique seul (B) ou en présence d'amidon (Ba) sont respectivement de 15,7 % et 19,4 % (B et Ba) (Figure II 15). Un résultat similaire a également été démontré dans des études antérieures au sein de l'équipe (Rafin et al., 2009). En effet, Rafin et al., (2009) ont mis en évidence que les capacités de la RAMEB (un dérivé de CD) à solubiliser le BaP en phase aqueuse ne permettait pas d'améliorer la biodégradation du BaP par *Fusarium solani*. En présence et en absence de la RAMEB, le taux de biodégradation du BaP a été ainsi identique (5 %).

Les traitements Fa et (B+F)a présentent des pourcentages de dégradation du BaP similaires, respectivement de 94,6 % et 92,0 %. Dans ces deux traitements, la quasi-totalité du BaP est dégradée. Il est cependant impossible de déterminer le rôle du traitement biologique sur la dégradation du BaP. Dans cette étude, l'oxydation chimique par le réactif de Fenton conduit à des taux de dégradation de 39,5 % et 94,6 % pour F et Fa respectivement. Ainsi, le traitement Fa dégrade 2,4 fois plus que le traitement F. Comme la différence entre le taux de dégradation du traitement Fa et celui du traitement F est de 55 % (équivalent à 138 µg), nous pouvons donc en déduire que l'amidon a permis la désorbtion d'au minimum 138 µg de BaP de la surface du verre de l'erlenmeyer vers la phase aqueuse.

Les cavités hydrophobes et les groupements greffés (BS et OS) sur la structure de l'amidon **P9\*** permettraient de complexer à la fois le BaP et les cations Fe<sup>2+</sup>. Ce complexe tripartite amidon/BaP/Fe<sup>2+</sup> conduirait à une proximité spatiale optimale entre Fe<sup>2+</sup> et le polluant. Cette proximité spatiale faciliterait ainsi la dégradation du BaP par l'attaque directe des radicaux hydroxyles (OH°) provenant de la décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au contact du Fe<sup>2+</sup> sur le complexe préalablement formé. En effet, lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est catalysé par les ions Fe<sup>2+</sup>, des radicaux OH° aspécifiques agissant avec la plupart des composés organiques sont générés (Rivas, 2006). Cette hypothèse a déjà été émise sur l'amidon au cours d'études antérieures au sein l'équipe (Rosu et al., 2011).

La seconde hypothèse repose sur le fait que les radicaux hydroxyles (OH°) aspécifiques générés au cours de la réaction de Fenton pourraient également réagir avec l'amidon présent dans le milieu. La réaction entre les OH° et l'amidon générerait ainsi des radicaux carbohydrates avec un temps de vie plus long que les OH°. Ainsi, ces radicaux posséderaient un temps de contact avec le BaP plus important et pourraient dégrader par conséquent le BaP adsorbé sur la phase solide (ici la surface du verre de l'erlenmeyer) (Dospinescu-Rosu,

109

2011). La quantité de BaP dégradé serait ainsi nettement plus importante en présence d'amidon. Cette hypothèse est synthétisée par la Figure II 16.



Figure II 16. Schéma hypothétique de la transformation du BaP par les radicaux carbohydrates selon Dospinescu-Rosu (2011)et complété par Delsarte (2016)

Nous présentons dans le Tableau II 8 un récapitulatif des travaux réalisés au sein de notre équipe (Rafin et al., 2009; Rosu et al., 2011) indiquant la quantité de BaP dégradé lors de procédé d'oxydation chimique par le réactif de Fenton.

Tableau II 8. Compilation des études réalisées au sein de l'équipe sur la dégradation du BaP par le réactif de Fenton en présence de molécules surfactantes

Composé	Quantité de composé utilisé (g.L <sup>-1</sup> )	Quantité initiale de BaP (mg)	Quantité de BaP dégradé par la réaction de Fenton (µg)	Quantité de BaP dégradé par composé (µg/g)
HPBCD (Rafin et al., 2009)	7,3	1	160	21,9
Amidon modifié (Rosu et al., 2011)	11,3	1	384	34,0
<b>P9*</b> (résultat de l'étude actuelle)	4,5	0,250	238	52,9

Les conditions expérimentales ne nous permettent pas de faire une réelle comparaison entre ces différents travaux. Cependant, ces résultats peuvent nous donner un ordre d'idée sur l'efficacité des méthodes de remédiation étudiées dans cette partie. D'après les quantités de BaP dégradé par gramme de molécule surfactante (HPBCD ou amidon), la méthode d'oxydation chimique combinée à l'amidon **P9\*** semble être la plus efficace tout en étant la plus avantageuse (Tableau II 8). En effet, cette méthode est plus efficace que la méthode chimique combinée à l'HPBCD en utilisant 2,5 fois moins de composé. Il en est de même pour la méthode avec les amidons modifiés (Rosu et al., 2011). Ainsi, l'amidon **P9\*** serait plus efficace et de surcroît, moins coûteux que les cyclodextrines (tels que les HPBCD) pour des applications environnementales.

Les résultats obtenus *in vitro* semblent prometteurs pour le développement de méthode de remédiation de sols historiquement contaminés par les POP. Il sera cependant nécessaire de répéter cette expérience sur une quantité de BaP plus importante afin d'exploiter et d'évaluer la totalité des capacités de dégradation de traitement combiné (oxydation biologique/chimique).

#### **Conclusion partielle**

L'utilisation d'un système simplifié où le champignon est en conditions axéniques nous a d'abord permis de déterminer les paramètres (souches fongiques, type et dose d'oxydants) optimaux.

L'étude de la dégradation du BaP en présence de la souche D19 montre que l'oxydant KMnO<sub>4</sub> est moins efficace que le réactif de Fenton pour la dégradation du BaP. De plus, les tests de dégradation du BaP par les traitements chimique (réactif de Fenton) et/ou biologique montrent que les souches D19 et S19 ont des capacités différentes. En effet, D19 est capable de mobiliser le polluant en phase aqueuse et de l'incorporer dans ces hyphes tandis que S19 peut à la fois mobiliser le BaP, l'incorporer et le dégrader. Malgré, ces deux cinétiques de croissance et de dégradation différentes, la quantité de BaP dégradé au cours du traitement combiné chimique/biologique est similaire. Cette observation permet de souligner l'existence d'un facteur limitant commun pour l'oxydation chimique et/ou biologique : la quantité de BaP disponible. Les propriétés surfactantes d'un amidon préalablement synthétisé (chapitre 1) sont donc utilisées dans une dernière étape dans les expériences de dégradation afin de tenter de lever ce verrou technologique.

Ainsi, cette étude montre l'efficacité du traitement Fenton en présence d'amidon comparé au traitement Fenton sans amidon. Ce résultat souligne l'importance du paramètre quantité de polluant disponible dans le milieu pour les différents procédés de dégradation. De plus, l'amidon **P9\*** est plus efficace et de surcroît, moins coûteux que les CD (tels que les HPBCD) pour des applications environnementales.

Nos résultats en milieu minéral ne peuvent pas prédire le taux d'abattement des polluants dans le sol où de nombreux paramètres doivent être pris en compte (présence de matière organique qui rentre en compétition avec les polluants pour l'oxydation par les radicaux hydroxyles, contaminations multiples, interactions avec les organismes vivants du sol...). Néanmoins, Les résultats obtenus *in vitro* semblent prometteurs et constituent une base solide pour le développement de méthode de remédiation de sols historiquement contaminés par les POP.

# **Bibliographie**

Camargo-de-Morais, M.M., Ramos, S. a. F., Pimentel, M.C.B., Jr, M.A. de M., and Filho, J.L.L. (2003). Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by Penicillium citrinum. World J. Microbiol. Biotechnol. *19*, 191–194.

Da Silva, M., Cerniglia, C.E., Pothuluri, J.V., Canhos, V.P., and Esposito, E. (2003). Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. World J. Microbiol. Biotechnol. *19*, 399–405.

Dospinescu-Rosu, A.-M. (2011). Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant.

Fayeulle, A., Veignie, E., Slomianny, C., Dewailly, E., Munch, J.-C., and Rafin, C. (2013). Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus Fusarium solani. Environ. Sci. Pollut. Res. *21*, 3515–3523.

Flotron, V., Delteil, C., Padellec, Y., and Camel, V. (2005). Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process. Chemosphere *59*, 1427–1437.

Gardea-Torresdey, J.L., Tang, L., and Salvador, J.M. (1996). Copper adsorption by esterified and unesterified fractions of Sphagnum peat moss and its different humic substances. J. Hazard. Mater. *48*, 191–206.

Goltapeh, E.M., Danesh, Y.R., and Varma, A. (2013). Fungi as Bioremediators (Springer Science & Business Media).

Keijzer, T., and van Gool, M. (2014). ISCO : l'oxydation chimique in situ.

Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., and Tuhkanen, T. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. J. Environ. Manage. *78*, 382–391.

Leitão, A.L. (2009). Potential of Penicillium Species in the Bioremediation Field. Int. J. Environ. Res. Public. Health *6*, 1393–1417.

Luna-Velasco, M.A., Esparza-García, F., Cañízares-Villanueva, R.O., and Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading Penicillium sp. Process Biochem. *42*, 310–314.

Machín-Ramírez, C., Morales, D., Martínez-Morales, F., Okoh, A.I., and Trejo-Hernández, M.R. (2010). Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. Int. Biodeterior. Biodegrad. *64*, 538–544.

Nadarajah, N., Hamme, J.V., Pannu, J., Singh, A., and Ward, O. (2002). Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. *59*, 540–544.

Rafin, C., Potin, O., Veignie, E., Lounes-Hadj, S., and Sancholle, M. (2000). Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, Fusarium solani. Polycycl. Aromat. Compd. *21*, 311–329.

Rafin, C., Veignie, E., Fayeulle, A., and Surpateanu, G. (2009). Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with Fusarium solani and cyclodextrins. Bioresour. Technol. *100*, 3157–3160.

Rafin, C., Foucault, B. de, and Veignie, E. (2013). Exploring micromycetes biodiversity for screening benzo[a]pyrene degrading potential. Environ. Sci. Pollut. Res. *20*, 3280–3289.

Rivas, F.J. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments. J. Hazard. Mater. *138*, 234–251.

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

Saraswathy, A., and Hallberg, R. (2002). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. FEMS Microbiol. Lett. *210*, 227–232.

Sutton, N.B., Grotenhuis, J.T.C., Langenhoff, A.A.M., and Rijnaarts, H.H.M. (2011). Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: A review of optimization strategies. J. Soils Sediments *11*, 129–140.

Tsekova, K., Christova, D., Todorova, D., and Ivanova, S. (2011). Removal of Cu(II), Co(II) and Fe(III) Ions from Ternary Solution by Free and Entrapped in PVA-Hydrogel Biomass of Penicillium Cyclopium. Biotechnol. Biotechnol. Equip. *25*, 41–46.

Valderrama, C., Alessandri, R., Aunola, T., Cortina, J.L., Gamisans, X., and Tuhkanen, T. (2009). Oxidation by Fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-comtaminated soil. J. Hazard. Mater. *166*, 594–602.

Veignie, E., Rafin, C., Woisel, P., Sahraoui, A.L.-H., and Cazier, F. (2002). Metabolization of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Benzo( A )Pyrene by a Non-White Rot Fungus ( Fusarium Solani ) in a Batch Reactor. Polycycl. Aromat. Compd. *22*, 87–97.

Veignie, E., Rafin, C., Woisel, P., and Cazier, F. (2004). Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus Fusarium solani. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 *129*, 1–4.

Veignie, E., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Coulon, C., and Rafin, C. (2012). Preliminary Characterizations of a Carbohydrate from the Concentrated Culture Filtrate from & amp;lt;i>Fusarium solani</i&amp;gt; and Its Role in Benzo[a]Pyrene Solubilization. Adv. Microbiol. *2*, 375–381.

Venny, Gan, S., and Ng, H.K. (2012). Current status and prospects of Fenton oxidation for the decontamination of persistent organic pollutants (POPs) in soils. Chem. Eng. J. *213*, 295–317.

Zang, S., Li, P., Yu, X., Shi, K., Zhang, H., and Chen, J. (2007). Degradation of metabolites of benzo[a]pyrene by coupling Penicillium chrysogenum with KMnO4. J. Environ. Sci. *19*, 238–243.

Zawierucha, I., and Malina, G. (2011). Effects of oxygen supply on the biodegradation rate in oil hydrocarbons contaminated soil. J. Phys. Conf. Ser. *289*, 12035.

# Chapitre 3. Etude de la dégradation des dioxines en milieu minéral et en microcosmes de sols au laboratoire

# <u>Sommaire</u>

Intro	oductio	on		17
Mat	ériels e	et mét	hodes11	9
1.	Pro	duits c	himiques11	9
	1.1.		Solvant11	19
	1.2.		Polluants	19
2.	Ech	antillo	ns de sol11	9
	2.1.		Présentation du site atelier de la ferme du Noir Pot11	19
	2.2.		Conditions d'échantillonnage 12	20
	2.3.		Conservation des échantillons de sols 12	21
	2.4.		Caractérisation pédologique des échantillons de sols 12	22
	2.5.		Détermination de la capacité au champ du sol12	22
	2.6.		Dosage des dioxines en sol 12	23
3.	. Mé	thodes	s d'isolement de souches fongiques12	23
	3.1.		Milieu de culture 12	23
	3.2.		Méthode de dilutions12	23
	3.3.		Méthode d'enrichissement 12	23
	3.4.		Conservation des souches fongiques 12	24
	3.5.		Techniques d'identification 12	24
4.	Etu	de en i	milieu minéral 12	24
	4.1.		Sélection des champignons filamenteux saprotrophes potentiellement	
	capab	les de o	dégrader les dioxines 12	24
	4.1.	1.	Etude de la croissance fongique en présence de polluants hydrophobes modèles	
				5
	4	.1.1.1.	Etude de la croissance fongique en présence d'hexadécane comme seule source	ce
	d	le carbo	one	25
	4	.1.1.2.	Etude de la croissance fongique en présence du dibenzofurane12	25
	4	.1.1.3.	Evaluation de la biomasse fongique12	27

	4.2.	Etude comparative de la dégradation de l'OCDD par différents processus	
	d'oxydatior	n (biologique et/ou chimique)	127
	4.2.1.	Conditions de l'expérience	128
	4.2.2.	Extraction et dosage de l'OCDD	129
5	. Expérien	ces de dégradation des dioxines en sols historiquement contaminés par	
d	ifférents pro	ocessus d'oxydation	129
	5.1.	Préparation de l'inoculum	130
	5.2.	Préparation de la solution nutritive	131
	5.3.	Réalisation des microcosmes de sols historiquement contaminés par les	
	dioxines		131
6	. Traiteme	ents statistiques	133
Rés	ultats et Dis	cussion	133
1	. Informat	ions sur le site atelier de la ferme du Noir Pot	133
2	. Analyses	physico-chimiques des échantillons de sols	136
	2.1.	Propriétés pédologiques des sols	136
	2.2.	Analyse de la contamination des sols par les dioxines	137
3	. Démarch	ne expérimentale pour l'obtention de souches efficaces pour la dégradation	n
d	es dioxines.		140
	3.1.	Isolement de souches fongiques à partir de sols historiquement contaminés	5
	par les diox	ines	141
	3.2.	Sélection des isolats selon leur capacité à croître en présence de molécules	
	modèles en	milieu minéral	142
	3.2.1.	Etude de la croissance fongique en présence d'hexadécane	142
	3.2.2.	Identification fongique des souches sélectionnées	145
	3.2.3.	Etude de la croissance fongique en présence de dibenzofurane	146
	3.3.	Etude bibliographique sur la biodégradation des dioxines par les champigno	ons
	telluriques	saprotrophes	148
	3.4.	Etude comparative de la dégradation de l'octachlorodibenzodioxine par	
	différents p	rocessus d'oxydation (biologique et/ou chimique) en milieu minéral	150
4	. Expérien	ces de dégradation des dioxines en sols historiquement contaminés par	
0	xydation bio	logique et/ou chimique	151
	4.1.	Justification des paramètres expérimentaux choisis	152
	4.1.1.	Pour le traitement biologique	152

	4.1.2.	Pour le traitement chimique	154
Z	1.2.	Influence des différents traitements sur la dégradation des dioxines dans les	5
S	ols historiq	uement contaminés	155
Concl	usion parti	elle1	164
Biblio	graphie	1	165
BIDIIO	graphie		162

# **Introduction**

Dans ce chapitre, nous allons tester le protocole de remédiation mis au point dans le chapitre 2 sur une autre famille de POP : les PCDD/F. Le procédé est dans un premier temps testé à l'échelle du laboratoire, en milieu minéral avec l'OCDD comme PCDD/F modèle puis en microcosmes de sols historiquement contaminés par les PCDD/F. La Figure III 1 présente la démarche expérimentale suivie au sein de chapitre.



Figure III 1. Schéma récapitulatif des étapes expérimentales menées dans ce chapitre

Des échantillons de sols contaminés par les PCDD/F sont dans un premier temps prélevés sur le site atelier de la ferme du Noir-Pot de la ville d'Halluin située dans le Nord de la France (étape 1). Afin d'utiliser des souches endogènes de sols historiquement contaminés pour le développement de méthodes de bioremédiation, nous réalisons d'abord des isolements de souches fongiques à partir de ces sols pour constituer une mycothèque de souches (étape 2).

Puis, nous évaluons, en milieu minéral, les capacités de ces souches à croître et à assimiler des molécules modèles ayant des propriétés physico-chimiques communes aux PCDD/F (étape 3).

Des tests de dégradation chimique et/ou biologique de l'OCDD sont ensuite réalisés en milieu minéral au laboratoire avec les doses de réactif de Fenton biocompatibles. Les souches fongiques retenues à l'issue des tests de sélection sont : D19, S6 et S19 (étape 4). La quantité d'OCDD dégradée dans les différents traitements est évaluée après 15 jours d'incubation en comparaison avec le témoin abiotique. Ces différents traitements permettent de vérifier la faisabilité et le potentiel de cette méthode combinée oxydation biologique - oxydation chimique sur la dégradation des PCDD/F.

Enfin, nous complexifions notre milieu expérimental en passant d'une étude de dégradation conduite en milieu minéral à une étude de dégradation réalisée en sols historiquement contaminés par les PCDD/F (étape 5). Ces expériences sont conduites en microcosmes de sols au laboratoire.

#### Matériels et méthodes

- 1. Produits chimiques
  - 1.1. <u>Solvant</u>

Le toluène (VWR, France) est utilisé pour l'extraction de l'OCDD.

1.2. Polluants

L'hexadécane (à 99 %, Acros organics, Belgique) et le dibenzofurane (>98 %, TCI, Belgique) sont utilisés comme polluants hydrophobes modèles. L'OCDD (AccuStandard, USA) est utilisé comme dioxine modèle.

#### 2. Echantillons de sol

Nous travaillons sur des échantillons de sols historiquement contaminés par les PCDD/F provenant du site atelier de la ferme du Noir-Pot de la ville d'Halluin située dans le

Nord-Pas-de-Calais. L'historique des contaminations du site et les collaborations dans le cadre de ce projet de recherche seront développés dans la partie Résultats et Discussion.

### 2.1. Présentation du site atelier de la ferme du Noir Pot

Le site atelier de la ferme du Noir Pot est une parcelle de 3500 m<sup>2</sup>. Cette parcelle a été échantillonnée par le Laboratoire d'Analyses des Sols d'Arras (LAS d'Arras, INRA) en une seule fois selon un échantillonnage "non aligné" composé de 72 échantillons de terre (3 prélèvements élémentaires par échantillon) (Figure III 2).



Figure III 2. Représentation de la parcelle expérimentale d'Halluin 3R avec les 72 points de prélèvement sur lesquels le LAS d'Arras (l'INRA d'Arras) a réalisé les mesures. Cette cartographie est réalisée par l'Unité InfoSol de l'INRA d'Orléans

Le sol ayant été labouré au moins une fois depuis l'arrêt de l'incinérateur tenu pour responsable de la contamination, il a été décidé d'effectuer les prélèvements sur une profondeur de 30 cm. Chaque point a été géo-référencé par l'Unité InfoSol de l'INRA d'Orléans. Chaque échantillon a été ensuite caractérisé à la fois pour évaluer ses caractéristiques pédologiques, mais aussi pour en mesurer les teneurs en PCDD/F. Ce travail réalisé par le LAS (INRA d'Arras) et InfoSol (INRA d'Orléans) nous a permis d'effectuer des prélèvements de sol sur les zones les plus concentrées en PCDD/F (points : 28 ; 30 ; 41) et sur des zones plus faiblement concentrées (points : 58 ; 59) (Figure III 2).

# 2.2. Conditions d'échantillonnage

Chaque prélèvement est effectué sur les cinq zones préalablement choisies (Figure III 2), selon un protocole standardisé mis au point par notre équipe. Pour chaque point de prélèvement, un périmètre de 50 cm sur 1 m est délimité. Dans ce périmètre, l'herbe est retirée et trois prélèvements de terre sont réalisés à la tarière manuelle sur 30 cm de profondeur et homogénéisés afin d'avoir un échantillon représentatif (Figure III 3).



Figure III 3. Récapitulatif des différentes étapes pour le prélèvement des échantillons de sol

Les échantillons sont ensuite regroupés en deux lots selon leur concentration (Tableau III 1). La concentration totale moyenne en PCDD/F de nos deux lots de sol est calculée à partir des teneurs en PCDD/F mesurées par le LAS d'Arras (Tableau III 1). Pour chaque lot, nous avons une quantité totale de sol de 10 kg.

Tableau III 1. Répartition des échantillons de sol en deux lots selon leur concentration

Lot	1	2
Echantillon sol Halluin 3R	Moyenne [PCDD/F] élevée	Moyenne [PCDD/F] faible
(points)	(28;30;41)	(58 ; 59)
PCDD/F total (Teq)	18,23 ± 4,20	0,75 ± 0,04
PCDD/F total (ng.kg <sup>-1</sup> )	260,09 ± 37,10	67,64 ± 3,20

# 2.3. Conservation des échantillons de sols

Une aliquote de 1 g de chaque échantillon de sol est conservée à 4°C pour la réalisation des isolements de souches fongiques. Le reste de l'échantillon est séché une semaine sous hotte chimique avec une homogénéisation régulière tous les 2 jours et est ensuite tamisé à 2 mm avant conservation à température ambiante. Il sera destiné aux expériences de dégradation en microcosmes de sols.

# 2.4. <u>Caractérisation pédologique des échantillons de sols</u>

L'analyse des paramètres pédologiques des échantillons de sols est réalisée par le LAS d'Arras. Les paramètres évalués sont représentés dans le Tableau III 2.

Tableau III 2. Paramètres pédologiques par échantillon et normes des méthodes d'analyses

Paramètre étudié	Méthode
Humidité	Méthode INRA
Granulométrie	NF X 31-107
Azote (N) total	NF ISO 13878
Carbone (C) organique	NF ISO 10694
рН	NF ISO 10390
Calcaire (CaCO <sub>3</sub> ) total	NF ISO 10693
Phosphore ( $P_2O_5$ ) olsen	NF X 31-160
Capacité d'Echange cationique (CEC) cobaltihexammine	
Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn, Al échangeables à la cobaltihexammine	NF ISO 23470
(ICP-AES/EAF)	
Eléments totaux	
Aluminium (Al) Mehra Jackson	
Fer (Fe) Mehra Jackson	INI ISO 22030
Silicium (Si) Mehra Jackson	

#### 2.5. Détermination de la capacité au champ du sol

Selon la méthode Forster (1995), 20 g de sol tamisés sont déposés dans un entonnoir muni d'un filtre en cellulose (Whatmann 2V) disposé sur un erlenmeyer de 250 mL préalablement taré. 100 mL d'eau distillée sont ensuite ajoutés. L'ensemble est recouvert d'une feuille d'aluminium afin d'éviter toute évaporation et laissé 12 h à température ambiante. La quantité d'eau non retenue par l'échantillon de sol est déterminée par pesée. La capacité au champ du sol représentant la capacité de rétention maximale en eau est calculée de la façon suivante :

Capacité au champ = 
$$\frac{((100 - wp) + wi)}{dw} \times 100$$

wp : masse de l'eau non retenue (en g)

wi : quantité d'eau initiale de l'échantillon de sol (en g)

dw : masse de l'échantillon de sol sec

#### 2.6. Dosage des dioxines en sol

L'analyse chimique des PCDD/F est réalisée par le LAS d'Arras. Le protocole d'analyse est présenté en annexe 1.

#### 3. Méthodes d'isolement de souches fongiques

Afin d'étudier la capacité des champignons saprotrophes présents dans le sol de la ferme du Noir Pot d'Halluin à dégrader les dioxines, les souches cultivables sont dans un premier temps isolées. Deux méthodes sont employées pour l'isolement de souches fongiques à partir des échantillons de sols : la méthode de dilutions et la méthode d'enrichissement. La méthode de dilutions permet d'isoler des souches fongiques cultivables sur milieu gélosé. La méthode d'enrichissement permet d'isoler des souches capables de rendre biodisponible un substrat hydrophobe modèle et de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie (Rafin et al., 2013).

#### 3.1. Milieu de culture

Le milieu solide utilisé pour les expériences et la conservation des souches fongiques est le MEA (Malt Extract Agar). Le milieu minéral utilisé de pH 7 constitué de macroéléments, d'oligoéléments et d'un tampon phosphate à 10 mM est le MM1 (Chapitre 2).

#### 3.2. <u>Méthode de dilutions</u>

La méthode de dilutions consiste à mettre en suspension 5 g de sol (équivalent masse sèche) dans 100 mL d'eau gélosée (0,05 % en agar) pendant 20 min d'agitation à 90 rpm, puis de laisser décanter 30 min avant d'effectuer 4 dilutions au dixième. 100  $\mu$ L de chaque dilution de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup> sont étalés sur milieu solide (MEA + 200 mg.L<sup>-1</sup> de chloramphénicol) en triple exemplaire.

Cette méthode permet de réaliser une collection d'isolats par purification des souches via des repiquages successifs.

#### 3.3. Méthode d'enrichissement

La méthode consiste à préparer une solution contenant 10 g de sol humide, 50 ml de milieu minéral (MM1 + 200 mg.L<sup>-1</sup> de chloramphénicol) et 4 g.L<sup>-1</sup> équivalent carbone

d'hexadécane ou de dibenzofurane. Ces polluants sont ajoutés de façon à obtenir la même concentration de carbone qu'une solution de glucose à 10 g.L<sup>-1</sup>, soit 4 g.L<sup>-1</sup> équivalent carbone (g.L<sup>-1</sup> éq C). Lorsque la croissance fongique est visible, une aliquote représentant 10 % de la culture précédente est prélevée et introduite dans un erlenmeyer contenant 25 ml de milieu minéral additionné d'hexadécane ou du dibenzofurane à la même concentration. Cette opération est répétée plusieurs fois pendant 1 mois. Les souches visibles sont ensuite étalées sur milieu solide (MEA + 200 mg.L<sup>-1</sup> de chloramphénicol) et sont purifiées via des repiquages successifs.

# 3.4. Conservation des souches fongiques

Les souches isolées sont conservées sur milieu solide MEA en étuve thermostatée à 22°C avec une photopériode 12h/12h. Elles sont ultérieurement conservées dans la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque).

# 3.5. <u>Techniques d'identification</u>

Les souches d'intérêt sont identifiées par des techniques de biologie moléculaire. L'analyse moléculaire se fait par séquençage de la zone ITS de l'ADN ribosomal ou par comparaison de séquences partielles d'ADN du gène codant pour la ß-tubuline. Ces analyses sont réalisées par le BCCM<sup>™</sup>/MUCL (Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique).

# 4. Etude en milieu minéral

# 4.1. <u>Sélection des champignons filamenteux saprotrophes potentiellement</u> <u>capables de dégrader les dioxines</u>

Ce travail est réalisé sur les souches isolées précédemment et sur des souches de référence de la Mycothèque (UCEIV, ULCO, Dunkerque). Cette étude consiste à évaluer la capacité des champignons étudiés à produire de la biomasse en MM1 en présence d'une molécule hydrophobe.

# 4.1.1. <u>Etude de la croissance fongique en présence de polluants hydrophobes</u> <u>modèles</u>

# 4.1.1.1. <u>Etude de la croissance fongique en présence d'hexadécane</u> <u>comme seule source de carbone</u>

Dans un premier temps, la croissance fongique des différentes souches sélectionnées est étudiée en présence d'hexadécane. Les expériences sont réalisées en erlenmeyers de 100 mL contenant 25 mL de MM1. Après stérilisation du milieu à l'autoclave, 150  $\mu$ L d'une solution stérile d'hexadécane à 3,41 mol.L<sup>-1</sup> sont ajoutés de façon à avoir dans le milieu une concentration équivalente à 4 g.L<sup>-1</sup> éq C (Tableau III 3). L'inoculation des différentes souches est ensuite réalisée selon les méthodes décrites dans le paragraphe 2.2 de la partie Matériels et Méthodes du chapitre 2. Pour chaque souche, un témoin en carbone facilement assimilable est également réalisé. Ainsi 142,5  $\mu$ L d'huile d'olive sont ajoutés dans les erlenmeyers comme seule source de carbone de sorte à obtenir une concentration finale de 4 g.L<sup>-1</sup> éq C. Les traitements sont incubés sous agitation orbitale (175 rpm) à température ambiante pendant 15 jours.

		Dans 25 mL de MM1					
Solution de source de carbone	Nombre de C	n C pour 4 g.L⁻¹ éq C* (mol)	Masse ajoutée de la solution (mg)	Volume ajouté (μL)			
Glucose (500 g.L⁻¹)	6	0,00833	250	500			
Hexadécane (3,41 mol.L <sup>-1</sup> )	16	0,00833	111,6	150			
Huile d'olive	74,25 %	0,00833	130	142,5			

Tableau III 3. Volume d'hexadécane et d'huile d'olive ajouté dans le milieu pour une concentration à 4 g.L<sup>-1</sup> éq C

\* L'hexadécane et l'huile d'olive sont ajoutés de façon à obtenir la même concentration de carbone qu'une solution de glucose à 10 g.L<sup>-1</sup>, soit 4 g.L<sup>-1</sup> équivalent carbone (g.L<sup>-1</sup> éq C).

#### 4.1.1.2. <u>Etude de la croissance fongique en présence du dibenzofurane</u>

Dans un second temps, la croissance fongique des souches précédemment sélectionnées est ensuite évaluée en présence du dibenzofurane. Pour cette étude, nous avons choisi de ne pas utiliser le dibenzofurane comme seule source de carbone mais d'ajouter une source de carbone facilement assimilable par les champignons. 75 % des 4 g.L<sup>-1</sup>

équivalent carbone vont provenir du dibenzofurane et 25 % du carbone sont apportés par une source facilement assimilable. La solution contient donc 3 g.L<sup>-1</sup> éq C de dibenzofurane et 1 g.L<sup>-1</sup> éq C d'huile d'olive comme sources de carbone.

Le Tableau III 4 permet de déterminer le volume des différentes sources de carbone à ajouter afin d'avoir une concentration totale de 4 g.L<sup>-1</sup> éq C.

Colution do course do	Nombro	Dans 25 mL de MM1				
carbone	de C	n C pour 3 g.L <sup>-1</sup> éq C* (mol)	Masse ajoutée (mg)	Volume ajouté (µL)		
Glucose (500 g.L <sup>-1</sup> )	6	0,00625	187,5	500		
Dibenzofurane (87,6 g.L <sup>-1</sup> )	12	0,00625	83,7	1000		
		n C pour 1 g.L <sup>-1</sup> éq C** (mol)	Masse ajoutée (mg)	Volume ajouté (μL)		
Glucose (500 g.L <sup>-1</sup> )	6	0,00208	62,5	167		
Huile d'olive	74,25 %	0,00208	32,5	35,6		

Tableau III 4. Volumes de dibenzofurane et d'huile d'olive ajoutées dans le milieu pour une concentration respectivement de 3 et  $1 \text{ g.L}^{-1}$  éq C

\* Le dibenzofurane est ajouté de façon à obtenir la même concentration de carbone qu'une solution de glucose à 7,5 g.L<sup>-1</sup>, soit 3 g.L<sup>-1</sup> équivalent carbone (g.L<sup>-1</sup> éq C)

\*\* L'huile d'olive est ajoutée de façon à obtenir la même concentration de carbone qu'une solution de glucose à 2,5 g.L<sup>-1</sup>, soit 1 g.L<sup>-1</sup> équivalent carbone (g.L<sup>-1</sup> éq C)

Ainsi, dans les 25 mL de MM1, 1 mL de la solution mère de dibenzofurane (à 87,6 g.L<sup>-1</sup> dans l'acétone) est ensuite ajouté, afin d'avoir une quantité finale de 3 g.L<sup>-1</sup> éq C (Tableau III 4). L'huile d'olive comme source de carbone facilement assimilable est ajoutée à hauteur de 36  $\mu$ L soit une concentration égale à 1 g.L<sup>-1</sup> éq C (Tableau III 4).

Pour chaque souche, un témoin en carbone facilement assimilable est également réalisé. 36  $\mu$ L d'huile d'olive sont ajoutés dans les erlenmeyers comme seule source de carbone de sorte à obtenir une concentration finale de 1 g.L<sup>-1</sup> éq C. L'inoculation des différentes souches est ensuite réalisée selon les méthodes décrites dans le paragraphe 2.2 de la partie Matériels et Méthodes du Chapitre 2. Les traitements sont incubés sous agitation orbitale (175 rpm) à température ambiante pendant 15 jours.

#### 4.1.1.3. Evaluation de la biomasse fongique

Après 15 jours d'incubation (J15), les cultures sont filtrées sur des filtres de papier préalablement séchés et tarés (Fisherbrand, Ø 55 mm, 25  $\mu$ m de porosité) avec un entonnoir Büchner monté sur une fiole à vide. Les biomasses sont pesées (Precisa XT220A, limite de détection 0,0001 g) après 7 jours de séchage dans une étuve à 60°C. L'objectif est d'évaluer la biomasse fongique produite en présence des molécules hydrophobes afin de sélectionner les souches qui sont capables de les assimiler en tant que source de carbone. Les résultats de biomasse sont exprimés en pourcentages calculés par les formules suivantes :

- (m<sub>C16</sub>/m<sub>ol</sub>) x 100 où m<sub>C16</sub> représente la biomasse sèche obtenue en présence de l'hexadécane comme seule source de carbone et m<sub>ol</sub> la biomasse obtenue avec l'huile d'olive.
- (m<sub>DF+ol</sub>/m<sub>ol</sub>) x 100 où m<sub>DF+ol</sub> représente la biomasse sèche obtenue en présence du dibenzofurane (75 % C) et de l'huile d'olive (25 %) comme source de carbone et m<sub>ol</sub> la biomasse obtenue avec l'huile d'olive.

# 4.2. <u>Etude comparative de la dégradation de l'OCDD par différents processus</u> <u>d'oxydation (biologique et/ou chimique)</u>

L'étude de la dégradation de l'OCDD en milieu minéral est réalisée en couplant simultanément ou séquentiellement une oxydation chimique à un procédé d'oxydation biologique par voie fongique. Ces expériences sont menées sur les souches D19, S19 et S6 préalablement sélectionnées. Le réactif de Fenton a été sélectionné comme oxydant chimique (grâce aux résultats obtenus dans le Chapitre 2). Pour chacune des souches, différents traitements sont réalisés à raison de triplicata par traitement : biologique (B) où une souche fongique (D19, S19 ou S6) est ensemencée, chimique où seul le réactif de Fenton (F) est utilisé et biologique-chimique (B+F) où l'oxydation biologique est couplée à l'oxydation chimique par réactif de Fenton. Les différents traitements réalisés pour une souche sont résumés dans le Tableau III 5. Ces expériences vont permettre d'évaluer l'efficacité du traitement biologique-chimique en MM1 avant de passer en microcosmes de sols.

Traitement	Code	Souche	Réactif de Fenton	OCDD
Abiotique	Т	$\checkmark$		$\checkmark$
Biologique	В*	$\checkmark$		✓
Chimique	F		$\checkmark$	$\checkmark$
Chimique + biologique	B+F	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$

Tableau III 5. Résumé des traitements réalisés pour une souche dans le cadre de l'étude de la dégradation de l'OCDD par l'oxydation biologique et/ou chimique par le réactif de Fenton

\*B : D19, S19 ou S6

#### 4.2.1. Conditions de l'expérience

Cette expérimentation est conduite selon une micro-méthode de culture. Dans des flacons de 22 mL, 2mL d'une solution mère d'OCDD (à 0,0625 g.L<sup>-1</sup> dans le toluène) sont ajoutés afin d'obtenir une quantité finale de 125 µg par flacon. Après évaporation totale du solvant, 10 mL de MM1 sont ajoutés et stérilisés par autoclave.

Dans les flacons correspondants aux traitements biologiques (B ou B+F), 0,5 mL d'une solution stérile de glucose à 500 g.L<sup>-1</sup> sont ensuite ajoutés, afin d'obtenir une concentration finale de 10 g.L<sup>-1</sup>. Les flacons sont inoculés à J0 selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.2 de la partie Matériels et Méthodes du Chapitre 2.

Les traitements chimiques par le réactif Fenton (F ou B+F) sont réalisés en introduisant à J3, J7 et J14 un volume d'une solution aqueuse de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  à une concentration finale de 5 mM suivi d'un volume d'une solution aqueuse d' $H_2O_2$  à une concentration finale de 50 mM.

Les traitements sont incubés sous agitation orbitale (175 rpm) à température ambiante pendant 15 jours. Le déroulement des tests de dégradation de l'OCDD est récapitulé dans la Figure III 4.



Figure III 4. Schéma du déroulement des tests de dégradation de l'OCDD dans les traitements combinés oxydation chimique/biologique (B+F). Pour le traitement oxydation biologique (B), seule l'étape 1 est réalisée, pour le traitement oxydation chimique par le réactif de Fenton (F), seule l'étape 2 est réalisée

#### 4.2.2. Extraction et dosage de l'OCDD

Après 15 jours d'incubation, les cultures sont congelées et lyophilisées pendant 5 jours. L'extraction de l'OCDD présent au sein de la biomasse fongique se fait directement dans le flacon de culture afin de limiter les manipulations de l'OCDD. L'extraction est réalisée avec 10 mL de toluène à chaud (5 min, 80°C). La dernière étape de cette extraction consiste en un traitement aux ultrasons (puissance 70 W) pendant 3 min. Cette opération est réalisée deux fois. Les deux extraits sont regroupés et concentrés dans 25 mL de toluène. Les quantités d'OCDD non dégradées sont déterminées par HPLC (HPLC Waters 600 control). Le système contient une colonne Waters XTerra®, RP 18,5 μm et Waters 996 Photo Diode Array Dectector. Les paramètres de la séparation des molécules extraites sont les suivants : une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile/eau de 90/10, un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> et une durée d'analyse de 8 minutes. L'intégration de l'aire des pics obtenus à une absorbance UV mesuré à 250 nm permet de déterminer les quantités d'OCDD restantes correspondantes aux différents traitements par comparaison aux témoins. La solution initiale d'OCDD est également dosée afin d'évaluer le rendement de ce protocole d'extraction, qui est mesuré en moyenne à 95 %.

L'évaluation de la dégradation de l'OCDD est réalisée selon la méthode décrite dans le Chapitre 2.

# 5. <u>Expériences de dégradation des dioxines en sols historiquement contaminés par</u> <u>différents processus d'oxydation</u>

L'ensemble des expériences réalisées en MM1 nous a permis de déterminer les paramètres optimaux (souche fongique, oxydant et dose d'oxydant) pour mener les expériences de dégradation des PCDD/F en microcosmes de sols historiquement contaminés. Ainsi, la souche D19 (*Penicillium brasilianum*) isolée du sol d'Halluin et la souche S19 (*Fusarium solani*) provenant de la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque) sont sélectionnées pour la réalisation des essais de dégradation en sol. Le réactif de Fenton est également sélectionné comme oxydant chimique. Les tests de dégradation des PCDD/F en sol sont réalisés en laboratoire sur le lot d'échantillons de sols le plus concentré en dioxines ([PCDD/F total] = 266,8 ± 37,1 ng.kg<sup>-1</sup>; Lot : 1).

Pour cette étude en sol, différents traitements sont réalisées : biologiques (B), chimique (F) et biologique et chimique (B+F). Pour les traitements biologiques (B), deux

types de traitements sont testés : la biostimulation et la bioaugmentation. Le traitement biologique des sols contaminés repose principalement sur ces deux stratégies de remédiation. La biostimulation a pour objectif de promouvoir le métabolisme des microorganismes autochtones des matrices contaminées. Dans notre étude, la biostimulation est réalisée par l'ajout d'une solution nutritive et d'un agent structurant communément appelé par le terme anglo-saxon « bulking agent ». Deux agents structurants sont testés : les copeaux de bois de peuplier et de carton. La bioaugmentation a pour principe d'inoculer le milieu contaminé par une ou plusieurs population(s) microbienne(s) ayant des capacités à pousser en présence des polluants et à les dégrader. Pour les traitements de bioaugmentation, les souches D19 et S19 sont testées. Pour le traitement chimique, seul le réactif Fenton est ajouté. Pour le traitement biologique-chimique (B+F), l'oxydation biologique (bioaugmentation) est couplée à l'oxydation chimique. Les différents traitements réalisés sont résumés dans le Tableau III 6. Par souche, 4 traitements distincts sont réalisés en triplicata. Dans la partie suivante, nous détaillons les conditions expérimentales.

Tra	aitement	Code	numéro	D19	S19	Solution nutritiv e	Copeaux de bois	Copeaux de carton	Fenton	
T	émoin	Т	1							
Biostimulation			2			✓	$\checkmark$			
	Biostimulation	Biostimulation		3			$\checkmark$		$\checkmark$	
Dielesieure		B	4	$\checkmark$		$\checkmark$	$\checkmark$			
Biologique	Biologique Bioaugmentation		5	$\checkmark$		$\checkmark$		$\checkmark$		
			6		$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$			
			7		$\checkmark$	$\checkmark$		$\checkmark$		
Cl	nimique	F	8						$\checkmark$	
			9	$\checkmark$		✓	$\checkmark$		$\checkmark$	
Couplage Biologique – Chimique		D . 5	10	$\checkmark$		$\checkmark$		$\checkmark$	$\checkmark$	
		B+F	11		$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$		$\checkmark$	
			12		$\checkmark$	$\checkmark$		$\checkmark$	$\checkmark$	

Tableau III 6. Résumé des traitements réalisés dans le cadre de l'étude de la dégradation des dioxines sur des échantillons d'un sol historiquement contaminé

#### 5.1. <u>Préparation de l'inoculum</u>

Afin de permettre le développement mycélien dans les microcosmes de sols, le mycélium est d'abord développé sur un matériel porteur. Les matériaux utilisés sont les agents structurants (les copeaux de bois et les copeaux de carton).

Ainsi, dans un erlenmeyers de 2 L, 100 g d'agent structurant sont ajoutés. Une quantité de glucose (25 g) et un certain volume de MM1 sont également ajoutés afin de travailler à 70 % de la capacité au champ de l'agent structurant (Tableau III 7).

Souche	Agent structurant	Volume de milieu minéral ajouté (mL)
D10	Copeaux de carton	125
019	Copeaux de bois	112
610	Copeaux de carton	125
519	Copeaux de bois	170

Tableau III 7. Récapitulatif des préparations d'inoculum sur les agents structurants

Après stérilisation par autoclavage, 5 explants de mycélium (S19 ou D19) sont prélevés à l'emporte-pièce (Ø 7 mm) sur une culture de la souche fongique en boîte de Petri sur MEA âgée de 15 jours et sont placés dans les erlenmeyers. L'incubation des cultures est réalisée à température ambiante pendant 15 jours.

# 5.2. <u>Préparation de la solution nutritive</u>

Pour biostimuler les microorganismes indigènes du sol et/ou la croissance de la souche fongique introduite dans le sol, une solution nutritive est également ajoutée. Le Tableau III 8 décrit la composition de cette solution. La solution nutritive contient les différents nutriments nécessaires au développement des champignons (Tableau III 8).

Nutriments	Quantités ajoutées (g.L <sup>-1</sup> )		
Huile d'olive	10,00		
Nitrate d'ammonium	1,51		
Dihydrogénophosphate de sodium	0,45		
KCI	0,25		
MgSO <sub>4</sub>	0,25		

Tableau III 8.	Composition	de la	solution	nutritive
----------------	-------------	-------	----------	-----------

# 5.3. <u>Réalisation des microcosmes de sols historiquement contaminés par les</u> <u>dioxines</u>

Les microcosmes sont réalisés dans des microboxes rondes transparentes en polypropylène de 520 mL avec un couvercle emboitant à filtre pour faciliter les échanges
gazeux. Chaque microcosme contient 150 g de sol historiquement contaminé par les PCDD/F.

Dans chaque microcosme, à J0, le sol est humidifié à 70 % de sa capacité au champ. Pour les traitements biologiques (B ; B+F), 35 mL de solution nutritive (Tableau III 8) et 1,5 g de marc de café sont ajoutés. 35 mL d'eau déminéralisée sont ajoutés pour les traitements chimiques seuls (F). Pour les traitements de biostimulation, 13,5 g d'agent structurant (copeaux de bois ou de carton) sont introduits dans les microcosmes. Pour la bioaugmentation, 13,5 g d'agent structurant inoculé par le champignon (D19 ou S19) sont ajoutés.

Les traitements d'oxydation chimique par le réactif de Fenton (F ; B+F) sont réalisés en introduisant à J15, J30 et J45 un volume d'une solution aqueuse de FeSO<sub>4</sub> .  $7H_2O$  à une concentration finale de 10 mM puis un volume d'une solution aqueuse d' $H_2O_2$  à une concentration finale de 100 mM. L'application de l'oxydant au sein des microcosmes se fait par plusieurs injections espacées sur l'échantillon de sol au sein de chaque microcosme afin d'assurer une distribution uniforme de l'oxydant sur la zone à traiter. Ainsi, les injections se font en 5 points d'injection et en 2 profondeurs, soit sur 10 points au total (Figure III 5).



Figure III 5. Représentation des points d'injection au sein d'un microcosme de sol pour le traitement chimique

Les traitements sont incubés à température ambiante pendant 2 mois. Les déroulements des tests de dégradation des PCDD/F sont récapitulés dans la Figure III 6.



Figure III 6. Schéma du déroulement des tests de dégradation des dioxines sur des échantillons d'un sol historiquement contaminé avec les traitements combinés oxydation chimique/biologique (B+F)

## 5.4. Extraction et dosage des dioxines

Après 60 jours d'incubation, les sols sont séchés pendant une semaine sous hotte chimique, puis homogénéisés par mélange manuel et tamisés à 2 mm. Ce traitement préliminaire des sols est réalisé au laboratoire UCEIV à Dunkerque. 20 g de chaque échantillon sont ensuite envoyés au LAS d'Arras afin de réaliser l'analyse chimique des PCDD/F. L'analyse des PCDD/F est effectuée selon le protocole décrit en annexe 1.

#### 6. Traitements statistiques

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel SPSS (SPSS 20.0, IBM France). Après vérification de la normalité des données par le test de Shapiro-Wilk, le test U de Mann Whitney a été utilisé pour comparer les différents traitements avec le témoin abiotique. Les résultats sont considérés comme significatif lorsque  $p \le 0,05$ . Des lettres permettent de distinguer les traitements significativement différents du témoin.

## **Résultats et Discussion**

#### 1. Informations sur le site atelier de la ferme du Noir Pot

La Ville d'Halluin a accueilli pendant trente ans une usine d'incinération d'ordures ménagères qui a émis dans l'atmosphère des PCDD/F. Les rejets atmosphériques ont pollué un large territoire urbain, mais aussi agricole, notamment les prairies destinées à l'élevage bovin. Les PCDD/F sont principalement caractérisées par les propriétés suivantes : toxicité avérée sur la faune, la flore et l'homme, persistance dans l'environnement, peu biodégradables et fortement lipophiles (solubles dans les solvants et les graisses dont le lait). En 1998 puis en 2002, l'industrie laitière a révélé la présence de taux de dioxines supérieurs aux directives européennes en vigueur dans le lait des vaches de cette zone. De par sa responsabilité en matière de traitements des déchets ménagers, Lille Métropole Communauté Urbaine (LMCU) a fait cesser le fonctionnement de l'incinérateur. Par mesure de précaution, LMCU a également fait arrêter les activités d'élevage situées dans la zone la plus contaminée. Les terres contaminées ont fait l'objet d'une maîtrise foncière communautaire dans l'attente d'un projet d'aménagement et/ou de requalification. La Ville d'Halluin et les services de l'État ont été étroitement associés à la gestion de cette crise. Le secteur de l'agriculture / élevage a été particulièrement impacté par cette pollution à Halluin et les terres les plus contaminées sont aujourd'hui en friches.

Des acteurs aussi divers que la ville d'Halluin (territoire concerné), Triselec Lille (entreprise jouxtant la Ferme du Noir pot, ayant racheté à LMCU les bâtiments ainsi qu'une des parcelles fortement contaminées par les dioxines) et l'association Environnement Développement Alternatif (EDA) se sont mobilisés pour tenter de développer des méthodes innovantes de dépollution de sol contaminé par les dioxines.

En 2007, l'association Halluin 3R (Recherche, Réseau, Requalification) a été créée pour proposer un projet sur un terrain d'expérimentation de la ferme du Noir pot situé juste à l'arrière du site de l'ancien incinérateur d'Halluin d'une superficie de 4,9 ha (Figure III 7).



Site atelier du site d'Halluin : ferme du Noir Pot

Figure III 7. Terrain de la ferme du Noir Pot situé à l'arrière de l'ancien incinérateur d'Halluin. Le trait rouge délimite le site atelier où les différentes expérimentations ont lieu

Ce terrain a été exploité par le passé en tant que prairie pour le pâturage de bovins jusqu'en 2002. Depuis cette date, il est en friche. Une convention a été signée entre Halluin 3R et Triselec Lille propriétaire du terrain pour mener des expérimentations sur une zone de 3500 m<sup>2</sup> (zone atelier, Figure III 7). Afin de concrétiser ses objectifs, Halluin 3R a constitué un réseau de chercheurs, ainsi qu'un comité scientifique autour du thème des dioxines et à élaborer avec eux un projet. Le projet « Dioxines : contamination et biodégradation », coordonné par Halluin 3R, a débuté en janvier 2012, en collaboration avec deux équipes de l'ULCO : UCEIV-Calais et UCEIV-Dunkerque et deux équipes de l'INRA : LAS d'Arras et Infosol. L'ADEME, le Conseil Régional Nord Pas de Calais et le LMCU ont apporté leur soutien financier. L'enjeu majeur du projet « Dioxines : contamination et biodégradation », coordonné par Halluin 3R, est de restaurer la ressource sol afin de retrouver des espaces de nature et une activité agricole de qualité, précieuse pour répondre aux besoins alimentaires des populations locales.

Pour ce faire, ce projet visait en particulier à :

 Evaluer la teneur éventuelle en PCDD/F des légumes cultivées sur terrain contaminé (sousprojet 1), en collaboration avec l'unité Infosol de l'INRA d'Orléans, le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA d'Arras et l'association Coin de Terre Halluinois

- Expérimenter deux techniques de bioremédiation de sol contaminé aux dioxines, impliquant chacune un type particulier de champignons telluriques :

 Sous-projet 2 : Développement de méthodes de remédiation biocompatible de sol pollué par des dioxines, couplant un procédé d'oxydation chimique avancée à la biodégradation par des champignons telluriques saprotrophes (sous la direction scientifique de C. Rafin et E. Veignie à l'UCEIV-Dunkerque).

 Sous-projet 3 : Rôle de la mycorhization arbusculaire dans la phytoremédiation des sols contaminés par des PCDD/F (sous la direction scientifique de A. Lounès-Hadj
Sahraoui et J. Fontaine à l'UCEIV-Calais).

Ainsi cette thèse s'inscrit dans le cadre de ce projet « Dioxines : contamination et biodégradation – deuxième phase » et plus précisément dans le cadre du sous-projet 2, financé par la Région Nord-Pas-de-Calais et les Fonds Européens de Développement Economique et Régional (FEDER). Ce travail de thèse s'inscrit dans la prolongation de mon stage de master 2 « Chimie Energie Environnement » financé par le premier Programme Chercheurs Citoyens de la Région Nord-Pas-de-Calais.

## 2. Analyses physico-chimiques des échantillons de sols

## 2.1. <u>Propriétés pédologiques des sols</u>

Le Tableau III 9 donne le descriptif de chaque paramètre pédologique mesuré dans les 2 lots de sols par le LAS d'Arras.

Tableau III 9. Paramètres physico-chimiques des 2 lots de sols du site atelier de la ferme du Noir Pot. Les grandeurs sont exprimées par rapport au sol séché à 105 °C, sauf pour le pH et les différentes classes granulométriques exprimées en g.kg<sup>-1</sup> de fraction minérale

Paramètres physico-chimiques	Unité	Lot 1	Lot 2
Humidité		15,50	15,55
Argile (< 2 μm)	g.kg⁻¹	152,00	145,00
Limons fins (2/20 μm)	g.kg⁻¹	172,00	158,00
Limons grossiers (20/50 μm)	g.kg <sup>-1</sup>	429,00	457,50
Sables fins (50/200 μm)	g.kg <sup>-1</sup>	217,00	215,50
Sables grossiers (200/2000 μm)	g.kg <sup>-1</sup>	29,00	24,00
Azote (N) total	g.kg <sup>-1</sup>	1,75	1,23
C/N	-	15,50	15,10
Carbone (C) organique	g.kg <sup>-1</sup>	26,77	18,60
рН	-	6,48	6,24
Calcaire (CaCO <sub>3</sub> ) total	g.kg <sup>-1</sup>	<1,00	<1,00
Phosphore (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) olsen	g.kg <sup>-1</sup>	0,03	0,01
CEC cobaltihexamine	cmol⁺.kg⁻¹	11,80	10,35
Aluminium (Al) cohex	cmol⁺.kg⁻¹	0,066	0,095
Calcium (Ca) cohex	cmol⁺.kg⁻¹	11,30	9,40
Fer (Fe) cohex	cmol⁺.kg⁻¹	0,006	0,012
Magnésium (Mg) cohex	cmol⁺.kg⁻¹	1,28	1,11
Manganèse (Mn) cohex	cmol⁺.kg⁻¹	0,03	0,02
Potassium (K) cohex	cmol⁺.kg⁻¹	0,19	0,21
Sodium (Na) cohex	cmol⁺.kg⁻¹	0,097	0,083
Aluminium (Al) total	g.100g <sup>-1</sup>	3,69	3,68
Calcium (Ca) total	g.100g <sup>-1</sup>	0,55	0,52
Fer (Fe) total	g.100g <sup>-1</sup>	2,01	1,92
Magnésium (Mg) total	g.100g <sup>-1</sup>	0,29	0,29
Manganèse (Mn) total	mg.kg⁻¹	393,00	380,00
Potassium (K) total	g.100g <sup>-1</sup>	1,41	1,47
Sodium (Na) total	g.100g <sup>-1</sup>	0,68	0,68
Aluminium (Al) Mehra Jackson	g.100g <sup>-1</sup>	0,12	0,14

Nous avons affaire à un sol limono-sableux non calcaire. Le pH légèrement acide et les teneurs en carbone organique sont classiques pour un sol de prairie. Les paramètres mesurés sur les 2 lots de sol montrent que le sol est relativement homogène

## 2.2. <u>Analyse de la contamination des sols par les dioxines</u>

De la même manière que pour les paramètres pédologiques, les teneurs en PCDD/F de chaque lot sont mesurées. Parmi les 210 molécules de PCDD/F, la teneur de 17 congénères (7 PCDD et 10 PCDF) est analysée dans les sols par le LAS (Inra, Arras) car ces congénères possèdent un potentiel toxique vis-à-vis des récepteurs AhR (aryl hydrocarbon receptors). Comme ces molécules ne possèdent pas la même toxicité, la toxicité de chaque congénère est donc définie par un facteur d'équivalence toxique (ou TEF pour Toxic Equivalent Factor) (Tableau III 10).

Tableau III 10. Facteurs d'équivalence toxique (TEF) des 17 congénères de PCDD/F de l'OMS (2005)

Congénères	TEF (OMS 2005)
PCDF	
2378-TCDF	0,1
12378-PeCDF	0,03
23478-PeCDF	0,3
123478-HxCDF	0,1
123678-HxCDF	0,10
234678-HxCDF	0,10
123789-HxCDF	0,10
1234678-HpCDF	0,01
1234789-HpCDF	0,01
OCDF	0,0003
PCDD	
2378-TCDD	1,00
12378-PeCDD	1,00
123478-HxCDD	0,10
123678-HxCDD	0,10
123789-HxCDD	0,10
1234678-HpCDD	0,01
OCDD	0,0003

Aux molécules les plus toxiques 2378-TCDD et 12378-PeCDD est attribué le TEF maximal de 1. Pour un mélange de congénères, le calcul en équivalent toxique (ou TEQ pour Toxic Equivalent Quantity) consiste à multiplier la concentration de chaque molécule par son TEF puis d'en faire la somme :

Concentration en TEQ =  $\sum_{1-17} (TEF \times concentration massique du PCDD/F)$ 

L'analyse des sols contaminés par les PCDD/F peut être représentée selon les trois façons suivantes :

- La concentration des 17 congénères généralement exprimée en ng.kg<sup>-1</sup> de matière sèche (MS)
- La toxicité, calculé dans les deux systèmes OTAN et OMS, exprimée par exemple en ng OMS-TEQ.kg<sup>-1</sup> MS lorsque le facteur de toxicité de chaque molécule se rapporte aux valeurs OMS (2005).
- la concentration des homologues (molécules tétra à octachlorées).

Pour l'étude, la représentation des résultats se fera selon les deux premières façons. Les caractéristiques des deux lots de sols prélevés sur le site atelier de la ferme du Noir Pot sont résumées dans le Tableau III 11.

## Tableau III 11. Concentration en PCDD/F des deux lots de sols

Bonrécontation	Va	leurs
Representation	Lot 1	Lot 2
Somme des concentrations des 17 congénères toxiques (ng.kg <sup>-1</sup> MS)	260,09	67,64
Toxicité OMS (ng OMS-TEQ.kg <sup>-1</sup> MS)	18,23	0,75

La Figure III 8.A. représente les concentrations relatives des 17 PCDD/F dans le sol 1. Cet histogramme cumulé met en évidence la prédominance des molécules les plus chlorés : hepta (2) et octa (1)-dibenzodioxine, hepta (4) et octa(3)-dibenzofurane, repérées par des chiffres sur la Figure III 8. La représentation relative de ces même données mais sous forme de données toxiques (Figure III 8.B.) met en évidence des profils nettement différents.



Figure III 8. A. Teneurs cumulées des 17 congénères de PCDD/F dans le lot 1 exprimé par rapport au sol séché à 105°C. B. Toxicité relative des différents congénères de PCDD/F dans le lot 1 exprimé rapport au sol séché à 105°C

Par exemple, en TEQ, l'OCDD est l'une des dioxines les moins présentes alors qu'en quantitatif, l'OCDD est prédominante. Cette observation est liée au très faible TEF de l'OCDD (0,0003) et est repérée par une flèche verte sur la Figure III 8. Inversement, le profil des toxicités relatives montre que la TCDD est le plus présent des congénères alors que sa concentration est faible par rapport aux autres PCDD/F (Figure III 8 : flèche rouge). Ces exemples montrent que du fait de la variabilité des TEF de chaque molécule, la part de chaque PCDD/F est importante dans le calcul de la toxicité.

# 3. <u>Démarche expérimentale pour l'obtention de souches efficaces pour la dégradation</u> <u>des dioxines</u>

Pour la réalisation des expériences de bioremédiation des PCDD/F en sols historiquement contaminés, il faut dans un premier temps sélectionner des souches fongiques potentiellement efficaces pour la dégradation de ce type de polluant. Pour atteindre ce premier objectif, deux démarches sont conduites en parallèle (Figure III 9). Une première approche consiste à sélectionner expérimentalement les souches préalablement isolées du sol d'Halluin sur leur capacité à pousser et à assimiler des molécules ayant des propriétés communes aux PCDD/F (l'hexadécane pour le caractère hydrophobe et le dibenzofurane pour la structure chimique de base de la famille des PCDF). La deuxième approche consiste à mener une étude bibliographique sur la biodégradation des PCDD/F par les champignons telluriques saprotrophes et de croiser les données recueillies avec les espèces fongiques présentes dans la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque) afin de choisir des souches potentiellement intéressantes.



Figure III 9. Récapitulatif de la démarche expérimentale pour sélectionner des souches efficaces pour la dégradation des dioxines présentes dans le sol historiquement contaminé d'Halluin

# 3.1. <u>Isolement de souches fongiques à partir de sols historiquement contaminés</u> par les dioxines

Le principal objectif de ces expérimentations est d'isoler des souches présentes dans les échantillons de sols historiquement contaminés par les PCDD/F. Ces souches sont ensuite soumises en milieu minéral à différentes étapes de sélection par évaluation de leur biomasse en présence de molécules hydrophobes et de leur capacité à dégrader des polluants de type POP. Il est donc nécessaire d'isoler des souches par des méthodes culturales afin d'en disposer pour conduire les tests choisis.

La méthode de dilution permet d'isoler des souches fongiques cultivables dans les échantillons de sols étudiés. Cependant, comme toutes méthodes nécessitant la mise en culture de microorganismes, cette technique présente des inconvénients. Les désavantages majeurs des méthodes de mise en culture résident par exemple dans le manque de reproductibilité et de répétabilité des techniques d'étalement (Lepoivre, 2003). Les isolements sont de plus fortement influencés par la capacité des souches à sporuler. Cette technique ne permet pas d'établir un inventaire exhaustif de la diversité microbienne. La méthode d'enrichissement est utilisée pour cibler les souches qui sont capables de se développer en présence de molécules modèles : l'hexadécane et le dibenzofurane. Cette méthode est particulièrement intéressante car elle permet de sélectionner des souches ayant des capacités à rendre biodisponible un substrat hydrophobe et à l'utiliser comme source de carbone et d'énergie (Rafin et al., 2013). Le Tableau III 12 représente les 33 isolats obtenus à partir des deux lots de sols.

Les 23 souches nommées D1 à D23 sont isolées par la méthode de dilution et les 10 souches nommées E1 à E10 sont obtenues par la technique d'enrichissement par l'hexadécane. La méthode d'enrichissement par le dibenzofurane n'a permis aucun isolement de souche quel que soit le lot de sol de la ferme du Noir-Pot d'Halluin. Parmi les 33 souches isolées, 28 sont sélectionnées ensuite sur des critères de diversité morphologique (en vert dans le Tableau III 12).

Máthada d'isalamant	Lot 1	Lot 2	
Methode a Isolement	(266,8 ± 37,1 ng.kg <sup>-1</sup> )	$(67,6 \pm 3,2 \text{ ng.kg}^{-1})$	
Méthode de dilution	D1, D2, D11, D12, D13, D15, D18	D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D14, D16, D17, D19, D20, D21, D22, D23	
Méthode d'enrichissement	E4, E6, E7, E8, E9	E1, E2, E3, E5, E10	

Tableau III 12. Récapitulatif des souches isolées (en vert : souches sélectionnées)

# 3.2. <u>Sélection des isolats selon leur capacité à croître en présence de molécules</u> <u>modèles en milieu minéral</u>

#### 3.2.1. Etude de la croissance fongique en présence d'hexadécane

La faible biodisponibilité des POP tels que les PCDD/F représente l'un des facteurs limitants majeurs à l'efficacité des traitements biologiques par voie fongique (Juhasz and Naidu, 2000). Ainsi, la première étape de sélection consiste à étudier la capacité des champignons à rendre disponible des composés hydrophobes. Nous avons choisi d'utiliser l'hexadécane comme molécule hydrophobe modèle. En effet, l'hexadécane est considéré comme un substrat carboné modèle qui présente une faible solubilité (0,9 µg.L<sup>-1</sup> dans l'eau distillée à 25°C) et par conséquent une faible biodisponibilité pour la biodégradation (Rafin et al., 2013; Volke-Sepúlveda et al., 2003). Cet alcane a déjà été utilisé pour mettre en évidence la capacité des bactéries (Puntus et al., 2005) ou de champignons (Kumar et al., 2009; Lindley and Heydeman, 1986) à adsorber des composés insolubles. De plus, la métabolisation des alcanes nécessite l'hydroxylation terminale qui représente un processus de bioconversion ayant besoin de plusieurs systèmes enzymatiques de type cytochromes P450 (Črešnar and Petrič, 2011; Seghezzi et al., 1991). Des enzymes similaires sont impliquées dans la dégradation des PCDD/F. En effet, il existe plusieurs mécanismes microbiens responsables de la biodégradation des PCDD/F, incluant la dégradation oxydative par différentes enzymes dont la famille des cytochromes P450 présente chez les bactéries et les ascomycètes (Chang, 2008). Pour ces différentes raisons, il nous a donc semblé judicieux d'utiliser l'hexadécane comme substrat carboné modèle.

Cette étape de présélection est d'abord réalisée sur les 28 souches précédemment isolées des lots de sols historiquement contaminés. La Figure III 10 présente la biomasse sèche produite en MM1 par chaque souche en présence d'hexadécane comme seule source de carbone.



Figure III 10. Biomasse sèche produite par souche en MM1 après 15 jours d'incubation en présence d'hexadécane comme seule source de carbone

Cette première étape de présélection montre que sur les 28 souches, très peu sont capables de pousser et de produire une biomasse suffisante (>0,03 g) en présence d'hexadécane. En effet, seulement 20 % des souches testées sont capables de produire une biomasse supérieure à 0,03 g : D18, D21, D22, E1, E2, E3. Ces isolats sont par la suite soumis à un test comparatif de la biomasse produite en présence d'hexadécane ou d'huile d'olive comme seule source de carbone. Cette expérience va permettre d'estimer le pourcentage de carbone d'hexadécane assimilé par la biomasse fongique par rapport à une source de carbone facilement assimilable, l'huile d'olive. La souche D19 est également sélectionnée pour l'étape suivante car nous avons constaté que cette souche se développe extrêmement rapidement sur l'hexadécane. En vue d'une bioremédiation, la capacité d'une souche à s'installer très rapidement dans le milieu contaminé nous semble en effet être un critère pertinent.

Ainsi, la Figure III 11 montre la capacité des différentes souches testées à assimiler l'hexadécane. Cette capacité est évaluée selon le calcul du rapport  $m_{C16}/m_{ol}$  X 100 où  $m_{C16}$ représente la biomasse sèche obtenue en présence d'hexadécane comme seule source de carbone et  $m_{ol}$  la biomasse obtenue avec l'huile d'olive en MM1 après 15 jours d'incubation. Ce rapport représente le pourcentage de carbone d'hexadécane assimilé par souche par rapport à l'huile d'olive. Ainsi, un rapport de 100 indique que la souche assimile autant l'hexadécane que l'huile d'olive comme source de carbone. En revanche, un rapport de 0 signifie que la souche est incapable d'assimiler l'hexadécane comme seule source de carbone.



Figure III 11. Calculs de pourcentage du rapport  $m_{C16}/m_{ol}$  après 15 jours d'incubation en MM1.  $m_{C16}$  biomasse sèche obtenue en présence d'hexadécane comme seule source de carbone,  $m_{ol}$  biomasse obtenue avec l'huile d'olive. Les valeurs en dessous du trait rouge (< à 50 %) indique que la souche présente de faibles capacités pour d'assimilation de l'hexadécane comme source de carbone

Dans le cadre de cette étude, la capacité d'une souche à pousser et à produire une biomasse suffisante est fixée pour un rapport  $m_{C16}/m_{ol}$  supérieur ou égal à 50 % (Figure III 11). Ce seuil permet d'affirmer que l'assimilation de l'hexadécane en tant que source de carbone est réalisée par le champignon. Les souches répondant à ce critère sont les suivantes : D19, D22 et E2. La souche E1 présente un rapport  $m_{C16}/m_{ol}$  de 34,5 %. Cependant, cette même souche présente une valeur de biomasse sèche produite en présence d'hexadécane de 387 mg équivalente à la souche E2 (426 mg). La différence de rapport est donc liée à la croissance des souches sur l'huile d'olive. En effet, E1 a une croissance sur l'huile d'olive (113 mg) qui est 1,5 fois plus importante que la souche E2 (70 mg respectivement). Par conséquent, les souches D19, D22, E1 et E2 sont retenues pour la suite des expérimentations.

#### 3.2.2. Identification fongique des souches sélectionnées

Le Tableau III 13 présente l'identification des espèces fongiques retenues pour leur capacité à assimiler l'hexadécane, un substrat hydrophobe. L'identification a été réalisée par le BCCM<sup>™</sup>/MUCL (Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique).

Tableau III 13. Identification génétique et classification phylogénique des souches fongiques retenues

Code	Ordre	Famille	Identification
D19	Eurotiales	Trichocomaceae	Penicillium brasilianum (Batista)
D22	Mucorales	Mucoraceae	Absidia glauca (Hagem)
E1	Hypocreales	Clavicipitaceae	Lecanicillium lecanii (Zimmermann) Zare & W. Gams
E2	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella minutissima Thieghem

Parallèlement, une étude bibliographique sur les souches identifiées est réalisée. Parmi les souches identifiées, *Penicillium brasilianum* (D19) est une espèce fongique couramment trouvée dans le sol. Plusieurs métabolites secondaires bioactifs sont issus de cette espèce comme la toxine viridicatum, la verrucologène et l'acide pénicillique (D'Mello, 1997; Tuthill et al., 2001). Ce dernier composé présente des activités antibactériennes, antivirales, cytotoxiques, cancérigènes et antifongiques tandis que la verrucologène a une activité cytotoxique *in vitro* contre les cellules tumorales Ehrlich carcinoma (Schürmann et al., 2010). De plus, les champignons du genre *Penicillium* peuvent coloniser différents environnements : les sédiments aquatiques, les habitats terrestres (sols, aliments...) et les surfaces d'eau. Ces champignons jouent également un rôle non négligeable dans la biodégradation naturelle des composés aromatiques. Plusieurs études menées sur différentes souches de *Penicillium* sp ont démontré leur capacité à dégrader différents composés xénobiotiques si elles sont stimulées par la présence d'un co-substrat (Leitão, 2009; Mancera-López et al., 2008).

Les espèces Absidia glauca (E1) et Mortierella minutissima (E2) appartiennent toutes deux au groupe des Zygomycètes, espèces caractérisées par une croissance rapide à caractère envahissant. Absidia glauca est une espèce abondante en zone tempérée qui est issu d'habitats variés : forêt, marécage, dune, eau... Mortierella minutissima est une espèce mésophile, largement distribuée dans les régions tempérées. Cette espèce se rencontre principalement dans les sols. Lecanicillium lecanii (D22) est un ascomycète se retrouvant fréquemment comme pathogène d'insectes (pucerons, cochenilles, diptères...). En effet, ce champignon capable d'infecter divers insectes nuisibles, a une large répartition géographique et est décrit comme prometteur pour le développement de biopesticides commerciaux (Goettel et al., 2008). Cette espèce se retrouve également comme parasite d'autres espèces de champignons (en particuliers les rouilles), elle peut être aussi saprotrophe dans les sols, sur les feuilles mortes et les débris végétaux.

#### 3.2.3. Etude de la croissance fongique en présence de dibenzofurane

Parmi les 28 souches sélectionnées pour le test de croissance en présence d'hexadécane comme seule source de carbone, D19, D21, E1 et E2 sont donc choisies afin d'évaluer leur capacité à croître en présence du dibenzofurane. Le dibenzofurane est utilisé comme molécule modèle pour se rapprocher de la structure moléculaire des dioxines. Rappelons que des essais préliminaires ont été menés avec le dibenzofurane comme seule source de carbone, cependant aucune des souches n'a été capable de se développer dans ces conditions. Ainsi, nous choisissons de travailler en cométabolisme avec l'huile d'olive comme substrat facilement assimilable.

La Figure III 12 montre les calculs de pourcentage du rapport  $m_{DF+ol}/m_{ol}$  où  $m_{DF+ol}$  représente la biomasse sèche obtenue en présence du dibenzofurane (75 % C) et de l'huile d'olive (25 %) comme source de carbone et  $m_{ol}$  la biomasse obtenue avec l'huile d'olive en MM1 après 15 jours d'incubation.



Figure III 12. Calculs de pourcentage du rapport  $m_{DF+ol}/m_{ol}$  après 15 jours d'incubation en MM1.  $m_{DF+ol}$  biomasse sèche obtenue en présence d'hexadécane comme seule source de carbone et  $m_{ol}$  biomasse obtenue avec l'huile d'olive

Un rapport supérieur à 100 indique que la souche est capable d'utiliser le dibenzofurane comme source de carbone. Un rapport inférieur ou égal à 100 signifie que la souche n'est pas capable d'assimiler le dibenzofurane comme source de carbone. D'après les résultats obtenus, aucune des souches ne semble utiliser le dibenzofurane comme source de carbone. D'une manière générale, le dibenzofurane ne semble pas avoir d'effet toxique sur la croissance des souches testées excepté pour la souche E2. Ce test de sélection est vraisemblablement trop sélectif et confirme le résultat obtenu lors de la méthode d'isolement par enrichissement avec le dibenzofurane.

Malgré ces résultats, nous choisissons de retenir les souches E1 et D19 pour la suite des expérimentations afin de mettre au point en milieu minéral le couplage oxydation chimique et biologique. La souche Lecanicillium lecanii (E1) est retenue pour ses capacités à utiliser l'hexadécane comme source de carbone et sa capacité à pousser en présence du dibenzofurane. Rappelons que cette souche a été isolée à partir de la méthode d'enrichissement par l'hexadécane. La souche Penicillium brasilianum (D19) est également retenue pour ses capacités à croître en présence d'hexadécane et à l'utiliser comme source de carbone non conventionnelle. De plus, D19 s'installe très rapidement dans MM1 ce qui représente un avantage non négligeable pour la bioremédiation. A notre connaissance, Penicillium brasilianum n'est pas une espèce décrite dans la littérature pour posséder des capacités à dégrader les PCDD/F, dont le dibenzofurane. Cependant, d'autres isolats du genre Penicillium ont été étudiés pour leur capacité à dégrader le dibenzofurane et les PCB qui sont des composés faisant partie de la famille des composés polychlorés comme les PCDD/F. Par exemple, Hammer et al. (2001) ont montré que dans leurs conditions expérimentales, Penicillium canescens oxyde la molécule de dibenzofurane pour produire des dérivés monohydroxylés et d'autres métabolites plus hydrophiles. Selon Mouhamadou et al. (2013), Penicillium chrysogenum dégrade 35,09 % d'un mélange de 7 congénères de PCB après 7 jours d'incubation en milieu minéral. Toutes ces raisons nous ont conduits à retenir ces deux souches.

# 3.3. <u>Etude bibliographique sur la biodégradation des dioxines par les champignons</u> <u>telluriques saprotrophes</u>

Parallèlement aux expériences d'isolement et de sélection des souches endogènes, une étude bibliographique sur la biodégradation des PCDD/F par les champignons telluriques saprotrophes est menée. Cette étude permet de montrer que le potentiel de ces champignons à dégrader les PCDD/F est actuellement peu exploré (Tableau III 14).

Tableau III 14. Synthèse des résultats bibliographiques sur l'étude de la dégradation des dioxines et des PCB par les champignons telluriques saprotrophes

Polluants	Structure moléculaire	Souches	Références
		Pseudallescheria boydii	Ishii et al., (2009)
		<i>Fusarium</i> sp.	Nam et al., (2008)
PCDD/F	$\sim$ 0 $\sim$	Cordyceps sinensis	Nakamiya et al., (2005)
		Acremonium sp.	Nakamiya $at al (2002)$
	Cl <sub>n</sub> Cl <sub>m</sub>	(Pseudallescheria boydii)	Nakaliliya et al., (2002)
		Penicillium canescens	Hammer et al., (2001)
Dibenzofurane (DE)		Paecilomyces lilacinus	
Dibenzordrane (Dr)		Fusarium oxysporum	Hammer et al.,(1997)
		Trichoderma harzianum	
	4 2 2' 3' 4'	Pseudallescheria boydii	
		Fusarium solani	Mouhamadou, et al.,
		Aspergillus fumigatus	(2013)
Polychlorobinhányle		Penicillium aurantiogriseum	
		Scedosporium apiospermum	
(100)	(Cl)n 5 6 6 5, (Cl)n	<i>Penicillium</i> sp	Tigini et al (2009)
		Aspergillus sp.	ngini et al., (2003)
		Fusarium solani	
		Paecilomyces lilacinus	Sietmann et al., (2006)
		Talaromyces helicus	Romero et al., (2005)
		Paecilomyces lilacinus	Gesell et al., (2001)
Biphényle		Asperaillus parasiticus	Cox, J. C. & Golbeck,
(BP)			(1985)
		Cunninghamella echinulufa	Smith et al., (1980)
		Cunninghamella elegans	Dodge et al., (1979)

En effet, l'étude de la biodégradation des PCDD/F par ces champignons est limitée aux ascomycètes suivants : *Pseudallescheria boydii, Cordyceps sinensis* et *Fusarium* sp. Nakamiya et al., (2002) ont montré que *P. boydii* est capable de dégrader un mélange à 2 ng.mL<sup>-1</sup> de PCDD/F tétra- à octachlorés (en moyenne 82 % par isomère) en 24 heures d'incubation. Pour le champignon *C. sinensis,* Nakamiya et al., (2005) ont obtenu des taux similaires de dégradation de la 2,3,7-trichorodibenzo-p-dioxine et de l'octachlorodibenzo-p-dioxine et (OCDD). *Fusarium* sp a été isolé afin d'étudier sa capacité à dégrader la dibenzo-p-dioxine et

le dibenzofurane. Il a par la suite été utilisé dans un biocatalyseur microbien contenant d'autres souches fongiques et bactériennes afin de dégrader PCDD/F. Cependant le rôle joué par *Fusarium* sp dans la transformation des dioxines chlorées n'a pas encore été prouvé (Nam et al., 2008).

En raison du faible nombre d'études sur la biodégradation des dioxines par les champignons non-lignolytiques, nous avons élargi les recherches sur d'autres polluants, proches des dioxines par leur structure moléculaire (Tableau III 14) :

- Le dibenzofurane représente la base de la structure chimique de la famille des polychlorodibenzofuranes (PCDF).
- Les polychlorobiphényles (PCB) font partie de la famille des composés polychlorés comme les PCDD/F. En s'appuyant sur des propriétés biologiques et toxiques proches, certaines instances internationales (OMS, EPA...) associent aux dioxines certains composés dérivés du biphényle.
- Le biphényle (BP) représente la base de la structure chimique des PCB.

Le Tableau III 14 présente les espèces fongiques dans la littérature par rapport à la dégradation des PCDD/F, DF, PCB et PB. En croisant ces données bibliographiques avec les espèces fongiques présentes dans la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque), cinq souches de la mycothèque nous semblent potentiellement intéressantes : *Paecilomyces lilacinus* (S6), *Aspergillus* sp (S11), *Fusarium solani* (S19), *Talaromyces* sp (S39) et *Pseudallescheria* sp (S71) (Tableau III 15).

Tableau III 15.	Classification	phylogénique	des souches	fongiques	présentes	dans la i	nycothèque
de l'UCEIV (UL	.CO, Dunkerqu	e) (Mycobank,	2016)				

Code	Ordre	Famille	Identification
S6	Eurotiales	Trichocomaceae	Paecilomyces lilacinus (Thom. Samson.)
S11	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus sp. (P. Micheli ex Haller)
S19	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium solani (Mart. Sacc.)
S39	Eurotiales	Trichocomaceae	Talaromyces sp. (C.R. Benj.)
S71	Microascales	Microascaceae	Pseudallescheria sp. (Negroni & I. Fisch.)

Parmi ces 5 souches sélectionnées d'après la littérature, pour la mise au point du couplage oxydation chimique et biologique en MM1, nous choisissons de retenir deux d'entre elles : *Paecilomyces lilacinus* (S6) et *Fusarium solani* (S19). En effet, des expériences préliminaires ont permis de montrer que ces deux souches présentent une croissance rapide tout en produisant une biomasse conséquente en présence de source de carbone non

conventionnelle. D'autres arguments trouvés dans la littérature ont également guidé notre choix.

*Paecilomyces lilacinus* est étudiée pour ses capacités à dégrader le dibenzofurane, le biphényle et les PCB. Par exemple, Sietmann et al. (2006) ont mis en évidence que *Paecilomyces lilacinus* dégradait la 4-chlorobiphényle et que cinq métabolites ont été identifiés durant la dégradation de cette molécule. *Fusarium solani* (S19) est retenue pour la suite des expériences car elle représente l'une des souches de référence de l'équipe de chercheurs de Dunkerque. En plus de ses capacités à dégrader la dibenzo-p-dioxine et le dibenzofurane, le genre *Fusarium* sp possède un potentiel à dégrader ce type de molécule chlorée. En effet, selon Mouhamadou et al. (2013), *Fusarium solani* dégrade 64,12 % d'un mélange de 7 congénères de PCB après 7 jours d'incubation en milieu minéral.

Dans les expérimentations conduites pour évaluer la sensibilité des 4 souches aux oxydants (Chapitre 2), la souche E1 a été rapidement inhibée. Ainsi, pour la suite de l'étude, les trois souches suivantes sont retenues : *Penicillium brasilianum* (D19), *Paecilomyces lilacinus* (S6), *Fusarium solani* (S19).

# 3.4. <u>Etude comparative de la dégradation de l'octachlorodibenzodioxine par</u> <u>différents processus d'oxydation (biologique et/ou chimique) en milieu minéral</u>

Les tests de dégradation chimique et/ou biologique de l'OCDD (dioxine modèle) sont réalisés en MM1 avec le réactif de Fenton comme oxydant chimique (50 mM pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 5 mM pour Fe<sup>2+</sup>) et sur différentes souches (D19, S6 et S19). La méthode de dégradation du BaP en MM1 (Chapitre 2) nous a guidés dans l'élaboration du protocole de dégradation de l'OCDD en MM1. En effet, du fait de la plus faible solubilité de l'OCDD et de sa plus forte récalcitrante à la dégradation, l'oxydant est ajouté trois fois (J3, J7, J14 après l'ensemencement du champignon) au lieu de deux (J3 et J4) afin de permettre à la souche fongique de reprendre sa croissance après chaque stress oxydatif. Pour les mêmes raisons, la durée d'incubation est portée à 15 jours au lieu de 12. Pour chacune des souches, différents traitements sont réalisés : biologique où seule la souche fongique est ensemencée (D19, S6, ou S19), chimique où seul le réactif de Fenton est ajouté et biologique-chimique où l'oxydation biologique est couplée à l'oxydation chimique.

Dans les conditions expérimentales utilisées, aucune dégradation de l'OCDD n'est constatée. Nous avons donc décidé de ne pas présenter les histogrammes correspondants

aux différentes expériences menées. Pour les traitements biologiques, les champignons (D19, S6 ou S19) se développent en présence de l'OCDD mais ne sont pas capables de la dégrader. Il se pourrait que la présence du champignon joue un rôle de compétiteur en captant l'essentiel des radicaux hydroxyles au détriment de l'OCDD. Cette hypothèse a déjà été détaillée dans le chapitre 2. De plus, ce résultat peut s'expliquer par la très faible solubilité de l'OCDD dans l'eau. En effet, la faible solubilité de la molécule (1000 fois plus faible que le BaP) entraînerait une très faible capacité des champignons à transférer le polluant de la phase solide vers la phase aqueuse. Il en est de même pour les traitements chimiques, l'absence de dégradation du polluant est sans doute lié au caractère très hydrophobe de la dioxine étudiée. Ces résultats confirment que le transfert des molécules telle que l'OCDD dans la phase aqueuse reste un verrou technologique à lever tant d'un point de vue fondamental pour avancer dans la compréhension des mécanismes de biodégradation mais également d'un point de vue appliqué pour favoriser le développement du marché des éco-biotechnologies de réhabilitation des sols.

Ces résultats n'excluent pas la poursuite des recherches en sols. En effet, l'OCDD est la moins soluble des PCDD/F et est très hydrophobe. Le choix de cette molécule pour les expériences en MM1 a été réalisé selon différents critères : elle est l'une des moins toxiques des PCDD/F et fait partie des rares PCDD/F disponibles commercialement. Cependant, rappelons que les échantillons de sols sont historiquement contaminés par un mélange de dioxines ayant une solubilité aqueuse moyenne supérieure à la PCDD/F modèle utilisée dans les tests en MM1. Il faut également souligner que la concentration des PCDD/F au sein du sol est 40.000 fois plus faible que la concentration testée dans cette étude en MM1. De plus, les données sur la dégradation des PCDD/F par les microorganismes en particulier les champignons telluriques saprotrophes sont limitées, ce qui complique d'autant plus ces recherches.

# 4. <u>Expériences de dégradation des dioxines en sols historiquement contaminés par</u> <u>oxydation biologique et/ou chimique</u>

L'objectif principal de cette étude est d'élaborer une méthode de remédiation des sols historiquement contaminés par les PCDD/F. Cette méthode a pour stratégie de coupler deux procédés de remédiation : l'oxydation chimique et l'oxydation biologique. La faisabilité d'un tel procédé a d'abord été testée en milieu simplifié, c'est-à-dire en MM1. Ce milieu nous a permis d'optimiser les conditions d'oxydation et de travailler dans des conditions compatibles avec le développement des champignons. Dans cette dernière partie, nous complexifions le milieu en passant en microcosmes de 150 g de sols historiquement contaminés par les PCDD/F (équivalent masse sèche) provenant du site atelier de la ferme du Noir Pot d'Halluin. Pour cette étude en sol, différents traitements sont réalisés : biologique (B), chimique (F) et biologique-chimique (B+F).

#### 4.1. Justification des paramètres expérimentaux choisis

#### 4.1.1. <u>Pour le traitement biologique</u>

Pour les traitements biologiques (B), deux types de traitements sont étudiés : la biostimulation et la bioaugmentation. Pour rappel, la biostimulation a pour objectif de stimuler la dégradation des polluants par les microorganismes endogènes au moyen d'adjuvants chimiques ou biochimiques (oxygène, éléments nutritifs...) et la bioaugmentation consiste à inoculer le milieu contaminé par un (ou des) microorganisme(s) préalablement sélectionné(s) pour ses (leurs) capacités à croître en présence des polluants et/ou à les dégrader.

Dans cette étude, la biostimulation est réalisée par l'ajout d'une solution nutritive et d'un agent structurant. L'ajout d'agent structurant (ou « bulking agent ») au sein des sols contaminés peut jouer un rôle important dans la biodégradation des polluants. En effet, l'agent structurant permet l'aération du sol ce qui peut stimuler les microorganismes endogènes du sol. Dans la littérature, une grande diversité de matériaux naturels a été utilisée comme agent structurant. Par exemple, Embar et al. (2006) ont utilisé la vermiculite comme agent structurant. Federici et al. (2012) ont ajouté simultanément des tiges de maïs et de l'huile d'olive dans les sols historiquement contaminés. Pour ces deux études, une stimulation des microorganismes endogènes et de la dégradation aérobie des polluants présents dans le sol a été démontrée. Dans notre étude, le choix s'est porté sur l'utilisation de deux autres agents structurants : les copeaux de bois et les copeaux de cartons. Pour les copeaux de bois, Covino et al. (2015) ont montré que la simple addition d'un mélange lignocellulosique à base de paille de blé et de copeaux de bois de peuplier (70 : 30, w/w) permet de biostimuler la communauté microbienne endogène, en particulier les champignons qui prolifèrent de façon rapide et abondante durant les premières phases d'incubation. Ce dernier point est particulièrement intéressant dans nos expériences pour

permettre le développement mycélien de nos souches sélectionnées au sein des microcosmes. Le second agent structurant testé, les copeaux de carton, n'est pas à notre connaissance décrit dans la littérature pour ce type d'utilisation. Cependant, ce matériau nous semble être intéressant car le carton est plus facilement assimilable que le bois par les champignons saprotrophes. Ainsi, ce matériau pourrait être une source supplémentaire de carbone.

Afin de biostimuler les microorganismes, les microcosmes sont enrichis par une solution nutritive composée de carbone, d'azote, de phosphate et de potassium. Un rapport optimal entre ces composés est nécessaire afin de favoriser une dégradation rapide et optimale des polluants par les microorganismes endogènes (Silva-Castro et al., 2013). Les différents nutriments C/N/P/K sont donc ajoutés dans les proportions suivantes : 100/10/1/1 (Embar et al., 2006; Gong, 2012; Maddela et al., 2015). L'huile d'olive est utilisée comme source de carbone dans les microcosmes. Des études ont montré que l'ajout d'huile d'olive dans un milieu contaminé pouvait jouer plusieurs rôles. Pizzul et al. (2006) ont montré que l'addition d'huile végétale augmentait la biodégradation du phénanthrène par les bactéries en milieu de culture. Ceci montre que l'huile végétale peut agir comme source de carbone et d'énergie primaire afin d'induire une dégradation cométabolique du polluant. Pour les champignons de la pourriture blanche ou « white rot fungi », l'utilisation de l'huile végétale comme source de carbone pourrait également avantager le développement du champignon dans le sol (Leonardi et al., 2008) ou en milieu minéral (Wardle and Schisler, 1969).

Les deux souches D19 (*Penicillium brasilianum*) et S19 (*Fusarium solani*) ont été sélectionnées lors des différents tests réalisés en MM1. Rappelons que ces souches ont des origines distinctes. Ainsi, D19 est une souche isolée du sol de la ferme du Noir-Pot d'Halluin. S19 provient quant à elle de la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque). Les souches sont préalablement incubées en présence d'un agent structurant (copeaux de bois ou de carton) afin de favoriser la croissance des souches, ce qui permet de générer suffisamment de mycélium pour coloniser le sol. Cette méthode va également améliorer la dispersion de l'inoculum dans le sol. Cette démarche a déjà été utilisée dans certaines études sur d'autres matériaux naturels. Ainsi, Reyes-César et al. (2014) ont employé de la bagasse de canne à sucre comme matériel de support et source de carbone pour le développement mycélien de différentes souches testées. Covino et al. (2015) ont préparé l'inoculum de *Pseudallescheria* sp sur des graines de millet avant de les ajouter dans un sol contaminé.

153

#### 4.1.2. Pour le traitement chimique

Dans le traitement biologique - chimique réalisé dans cette étude, le traitement chimique est effectué simultanément au traitement biologique. Ainsi, la toxicité du réactif de Fenton sur les souches a été préalablement étudiée en MM1 (Chapitre2) pour déterminer des doses d'oxydant compatibles avec le développement des champignons. La dose d'oxydant sélectionnée pour l'expérience de dégradation de polluants en MM1 est de : 50 mM pour  $H_2O_2$  et 5 mM pour  $Fe^{2+}$ . Cependant, les essais en milieu minéral conduit sur l'OCDD n'ont donné aucune dégradation. De plus, l'efficacité de l'oxydation chimique des polluants dans les sols va dépendre de nombreux paramètres réactionnels, par exemple l'influence des caractéristiques de la matrice solide, de la quantité de PCDD/F présentes et du système de traitement (Venny et al., 2012). En effet, la présence d'autres composés organiques dans le sol peuvent inhiber l'action des radicaux produits par la réaction de Fenton (Venny et al., 2012). Dans notre étude, le carbone organique présent dans le sol pourrait interagir avec les radicaux produits car il est présent à 26,77 g.kg<sup>-1</sup>, soit une concentration 1.10<sup>8</sup> fois plus importante que la concentration des dioxines présentes (267 ng.kg<sup>-1</sup>). Compte tenu de l'ensemble de ces paramètres, nous avons choisi d'augmenter d'un facteur 2 la concentration en oxydant par rapport aux concentrations utilisées en MM1 (100 mM pour  $H_2O_2$  et 10 mM pour  $Fe^{2+}$ ).

Le volume d'oxydant injecté tous les 15 jours est déterminé selon le pourcentage optimal d'humidité (70 %) maintenu au sein des microcosmes. Par exemple, lors de l'ajout de l'oxydant, il faut un volume de 5 mL d'eau pour maintenir l'humidité du sol à 70 %, apportés par 2,5 mL d'  $H_2O_2$  (6 M) et 2,5 mL de Fe<sup>2+</sup> (0,6 M).

La méthode d'injection est également un facteur très important pour l'application des procédés d'oxydation chimique. L'injection doit permettre un contact suffisant et suffisamment rapide entre l'oxydant et le polluant (Lemaire, 2011). L'application de l'oxydant sur la surface de nos microcosmes de sols se fait par injection en plusieurs zones et en deux profondeurs. L'injection est réalisée en différents puits espacés de façon adéquate afin d'assurer une distribution uniforme de l'oxydant sur la zone à traiter.

# 4.2. <u>Influence des différents traitements sur la dégradation des dioxines dans les</u> sols historiquement contaminés

La dégradation des PCDD/F au sein des différents microcosmes de sols historiquement contaminés est évaluée en fonction de 17 congénères mesurés par le LAS d'Arras. Rappelons qu'il existe différentes façons de représenter les résultats des PCDD/F. Ainsi, dans cette partie, les résultats obtenus sont exprimés selon la concentration des 17 congénères en ng.kg<sup>-1</sup> MS sol et en TEQ calculée selon le système OMS (2005).

La Figure III 13 montre les concentrations des différentes PCDD/F analysées dans les traitements obtenus après 2 mois d'incubation.





Pour aider à l'interprétation des résultats présentés sur la Figure III 13, un récapitulatif des différents traitements réalisés dans cette étude est présenté dans le Tableau III 16.

Traitements	numéro	D19	S19	Copeaux de bois	Copeaux de carton	Fenton
Т	1					
	2			$\checkmark$		
В	3				$\checkmark$	
	4	✓		$\checkmark$		
	5	$\checkmark$			$\checkmark$	
	6		$\checkmark$	$\checkmark$		
	7		$\checkmark$		$\checkmark$	
F	8					$\checkmark$
	9	$\checkmark$		$\checkmark$		$\checkmark$
B+F	10	$\checkmark$			$\checkmark$	$\checkmark$
	11		$\checkmark$	$\checkmark$		$\checkmark$
	12		$\checkmark$		$\checkmark$	$\checkmark$

Tableau III 16. Récapitulatif des traitements réalisés dans le cadre de l'étude de la dégradation des dioxines sur des échantillons d'un sol historiquement contaminé

De manière générale, nous pouvons observer une tendance à la baisse de la concentration en PCDD/F pour les traitements biologiques (B) par rapport au témoin (T), en particulier pour les traitements 2 (copeaux de bois), 3 (copeaux de carton) et 7 (S19, copeaux de carton). Ces traitements 2,3 et 7 conduisent respectivement à une diminution de la teneur cumulée en PCDD/F de 19,6 %, 20,2 % et 25,0 %. Pour les traitements chimiques (F) et combinés biologique-chimique (B+F), la teneur cumulée en PCDD/F ne semble globalement pas diminuer par rapport au témoin.

L'objectif principal de notre démarche est d'élaborer une méthode de dégradation des PCDD/F présents dans les sols afin de réduire leur impact sur l'homme, la faune et la flore. Cependant, les différents congénères étudiés n'ont pas la même toxicité. En effet, les TEF de chaque molécule varient de 1 à 0,0003. Ainsi, pour la suite de l'étude, les résultats sont exprimés en TEQ afin de mieux évaluer l'efficacité de nos traitements.

La Figure III 14 présente la TEQ des PCDD/F dans chaque traitement réalisé, obtenue après 2 mois d'incubation.



Figure III 14. L'équivalent toxique (TEQ) des PCDD/F dans chaque traitement de sol exprimé par rapport au sol séché à 105°C. Les astérisques (\*) indiquent une dégradation significative par rapport au témoin abiotique (p<0,05)

D'après la Figure III 14, seul le traitement 5 (D19, copeaux de carton) entraîne une diminution significative de la toxicité en PCDD/F par rapport au témoin (1). Le traitement 5 (D19, copeaux de carton) a diminué la toxicité de 40,5 % après 2 mois d'incubation. Cependant, nous pouvons observer une tendance à la baisse de la toxicité cumulée en dioxines pour les autres traitements biologiques (B) par rapport au témoin (T), en particulier pour les traitements 2 (copeaux de bois), 3 (copeaux de carton), et 7 (S19, copeaux de carton). Ces traitements 2, 3 et 7 conduisent respectivement à une diminution de la toxicité en PCDD/F par rapport au témoin (1) de 40,7 %, 35,7 % et 36,7 %. Pour les traitements chimiques (F) et combinés biologique-chimique (B+F), le TEQ en PCDD/F ne semble globalement pas diminuer par rapport au témoin. Il semble donc que le traitement par le réactif de Fenton pourrait s'avérer contre-productif en détruisant probablement l'architecture de réseau fongique. Rappelons que l'oxydation chimique par le réactif de Fenton est aspécifique. Ainsi les radicaux hydroxyles produits pourraient réagir avec la matière organique du sol et celle du vivant.

Pour chacun des traitements (B, F et B+F), la teneur de chaque congénère est comparée à celle mesurée dans le témoin. Le test Mann Whitney est utilisé pour effectuer ces comparaisons et montrer si la différence observée est significative (au seuil de p≤0,05). Ainsi, dans la première ligne du Tableau III 17 sont représentés les 17 congénères des PCDD/F et dans les deux premières colonnes les traitements excepté le témoin.





Les cases colorées en bleu dans le Tableau III 17 représentent les congénères qui sont dégradés significativement par rapport aux congénères présents dans le témoin. Par exemple, la case correspondant au traitement 2 et au congénère 23478 PeCDF colorée en bleue indique que cette molécule a été dégradée significativement dans ce traitement. Par opposition, la case située juste en-dessous est blanche ce qui montre que la 23478 PeCDF n'a pas été dégradée dans le traitement 3. Le Tableau III 17 permet de donner d'autres informations. En effet, dans la dernière colonne, le nombre de molécules dégradées significativement peut également être renseigné pour chacun des traitements. Si nous prenons par exemple le traitement 2, nous pouvons voir que 5 des congénères sont dégradés significativement. De plus, la dernière ligne du tableau indique également le nombre de traitement qui ont dégradé la même molécule. Ainsi, dans la colonne correspondant à la 23478 PeCDF, la molécule est dégradée dans 4 traitements.

Le nombre total de traitement où le congénère est dégradé indique que parmi les 17 congénères étudiés, 7 ne sont dégradés dans aucun des traitements : 2378-TCDF, 12378-PeCDF, 1234789-HpCDF, 2378-TCDD, 12378-PeCDD, 123789-HxCDD, OCDD (Tableau III 17). Les PCDD/F les plus dégradées sont la 123789-HxCDF et l'OCDF qui sont dégradés dans 10 traitements sur 12, suivis par la 123478-HxCDF (7 traitements sur 12) et la 123678-HxCDD (6 traitements sur 12). Les HxCDD/F sont majoritairement plus dégradées que les TCDD/F malgré leurs propriétés hydrophobes plus importantes (Tableau III 18). En effet, le Tableau III 18 montre que les 2378-TCDD/F sont plus solubles dans l'eau que les 123478-HxCDD/F.

Congénère	a 2378-TCDF	a a 123478-HxCDF	cl c	CI CI CI CI CI CI CI CI CI CI CI CI CI C
Solubilité aqueuse à 25°C (mg.m <sup>-3</sup> )	0,02	0,003	0,4	0,01
T <sub>1/2</sub> dans le sol* (en années)	100	280	60	70
Pression de vapeur à 25°C (Pa)	0,00009	0,000001	0,0002	0,000003
Log K <sub>ow</sub>	6,8	7,8	6,5	7,0

Tableau III 18. Propriétés physico-chimiques de quatre congénères étudiés (Haglund, 2007)

\*T<sub>1/2</sub> dans le sol : représente la demi-vie de la molécule dans le sol c'est-à-dire le temps nécessaire pour que 50 % de la molécule soit dégradée

Rappelons que les PCDD/F présentent une très faible solubilité dans l'eau. Cependant, l'hydrophobie de ces molécules est proportionnelle au nombre d'atome de chlore substitué. En effet plus le nombre d'atome de chlore va augmenter, plus la molécule sera hydrophobe. La diminution de la solubilité aqueuse va s'accompagner d'une augmentation du coefficient de partage octanol/eau (exprimé en log de K<sub>ow</sub>). Les molécules hautement chlorés vont donc s'adsorber fortement dans les fractions de carbone organique présentes dans les sols, être moins biodisponibles et plus difficile à dégrader (Bunge and Lechner, 2009). La 123478-HxCDF a un temps de demi-vie dans le sol 2,8 fois plus long que la 2378-TCDF (Tableau III 18). Au vu des résultats obtenus, il se pourrait que d'autres mécanismes ainsi que d'autres microorganismes que les souches utilisées sont mis en jeu pour la dégradation des dioxines grâce à la biostimulation effectuée. Durant les expériences en microcosmes pour les traitements de biostimulation (B et B+F), nous avons pu constater par un contrôle visuel le développement de champignons différents morphologiquement initialement ensemencés (D19 ou S19). Ainsi, il se pourrait que les éléments initialement ajoutés (agent structurant, solution nutritive et souche) aient stimulé également les microorganismes endogènes présents initialement dans les échantillons de sols. En effet, rappelons que ces sols ne sont pas stérilisés dans nos expérimentations. Ces résultats sont en accord avec les hypothèses émises par Federici et al. (2012) et Bunge et Lechner (2009). En effet, Federici et al. (2012) ont montré que l'utilisation concomitante de tiges de maïs et d'huile d'olive stimulait préférentiellement la dégradation aérobie des PCB fortement chlorés présents dans les sols. Selon Federici et al. (2012), la dégradation des PCB les plus chlorés serait liée au développement rapide des champignons présents *in situ* et à l'augmentation simultanée de la biodiversité bactérienne et fongique endogènes. De plus, Bunge et Lechner (2009) ont souligné que les PCDD/F hautement chlorés ne peuvent pas être minéralisées par un seul type de microorganisme, en particulier une seule bactérie aérobie mais par l'action concertée de différents microorganismes aérobies fongiques et bactériens.

Si nous nous intéressons maintenant au nombre total de congénères dégradés par traitement, le traitement biologique 7 (S19, copeaux de carton) s'avère être le plus efficace pour la dégradation des PCDD/F avec 8 congénères significativement dégradés suivi par le traitement 5 (5 congénères dégradés) puis les traitements 4 et 11 (4 congénères). Les traitements biologiques semblent majoritairement plus efficaces pour la remédiation de ce sol historiquement contaminé par les PCDD/F.

Les données du Tableau III 17 peuvent également être représentées sous forme graphique (Figure III 15). Nous avons choisi d'utiliser la méthode de classification de Ward comme méthode de représentation des données. La méthode de Ward est une méthode de classification qui a pour objectif d'obtenir une représentation schématique simple d'un tableau de données complexes à partir d'une typologie (segmentation), c'est à dire d'une partition des n individus, définies par l'observation de p variables. Ainsi, dans cette étude les n individus sont les 12 traitements et les p variables sont les 15 congénères. Cette méthode permet donc de regrouper en classes homogènes les différents traitements.

Cette méthode va consister dans un premier temps à regrouper deux par deux les traitements les plus proches. Dans cette étude, les triplicatas de chaque traitement sont regroupés entre eux (Figure III 15 : Niveau 1). Cette première information permet de montrer que nos traitements sont répétables. Ce processus de regroupement est réitéré

jusqu'à un regroupement complet (Figure III 15 : Niveau 2). Sur la Figure III 15, deux groupes principaux sont observés. Le groupe 1 rassemble les traitements ayant peu d'effet (sousgroupe 2) ou des effets modérés (sous-groupe 1) sur la dégradation des dioxines. Le groupe 2 est composé des traitements qui sont efficaces pour la dégradation des PCDD/F. Le groupe 2 est composé des trois traitements suivants : traitement 7 (S19, copeaux de carton), 4 (D19, copeaux de bois) et 2 (copeaux de bois). Ces résultats sont en corrélation avec ceux observés sur les premiers graphiques (Figure III 13 et Figure III 14). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, les traitements biologiques semblent être les plus efficaces pour la dégradation des PCDD/F présentes historiquement dans le sol de la ferme du Noir Pot d'Halluin.



Figure III 15. Diagramme de classification par analyse des triplicatas des 12 traitements de dégradation des sols historiquement contaminés par les dioxines

Cette étude permet de souligner le potentiel des traitements biologiques à dégrader les PCDD/F. Ainsi, le traitement 5 (D19, copeaux de carton) a permis de diminuer significativement le TEQ de 40,5 % et ceci après uniquement 2 mois d'incubation. Dans les autres traitements biologiques (2, 4 et 7), une diminution du TEQ a également été observée. Cependant, d'après le test de Mann Whitney, ces diminutions ne sont pas significatives par rapport au témoin (1). Ce manque de significativité pourrait être lié à la petite taille de nos échantillons car chacun des traitements testés dans cette étude a été réalisé en triplicata. Il pourrait également être causé par la dispersion des résultats obtenus pour un même traitement. Malgré le TEQ élevé des PCDD/F dans le sol, la teneur de chacun des congénères analysés dans les microcosmes de sols reste faible (< 10 ng.kg<sup>-1</sup>). Ainsi, si la teneur d'une molécule varie de 1 ng.kg<sup>-1</sup> ou plus entre les trois microcosmes du même traitement, la différence constatée n'est pas négligeable. Le Tableau III 19 présente les teneurs de certains des PCDD/F analysés dans les trois microcosmes correspondant au traitement 7. La teneur du 2378-TCDF dans les trois microcosmes varie entre 2,40 ng.kg<sup>-1</sup> et 4,37 ng.kg<sup>-1</sup>, ce qui n'est pas négligeable. Cette disparité au niveau des valeurs peut expliquer que certaines teneurs des molécules se situent à la limite du seuil de détection de l'appareil (Tableau III 19, 2378-TCDD) ou que les différentes molécules ne sont pas réparties de façon homogène dans le sol étudié.

Traitement		2378-TCDF	12378-PeCDF	23478-PeCDF	123478-HxCDF	2378-TCDD
				(ng.kg <sup>-1</sup> MS sol)		
	а	3,34	2,09	6,78	9,31	<1,05
7	b	4,37	5,74	6,78	6,2	2,08
	С	2,4	3,83	7,86	8,51	0
Ecart	type	0,99	1,83	0,62	1,61	1,20

Tableau III 19. Teneurs de certain PCDD/F dans les trois traitements 7, exprimées en ng.kg<sup>-1</sup> de matière sèche de sol

Pour ces essais en sols, nous nous sommes placés dans des conditions drastiques pour la biodégradation étant donné que la quantité de PCDD/F par gramme de sol dans les échantillons est faible. Il est connu que l'un des facteurs influençant la biodégradation est la concentration du polluant. En effet, des expériences ont démontré que la biodégradation est limitée lorsque la concentration du contaminant est très faible. Par exemple, Boethling et Alexander (1979) ont montré que le taux de minéralisation est de 20 % pour une concentration de polluants de 3,0 ng.mL<sup>-1</sup> mais si on augmente cette concentration à 30 mg.mL<sup>-1</sup>, le taux de minéralisation peut atteindre 65 %. Il existe donc une concentration seuil en dessous de laquelle la biodégradation n'est pas favorable métaboliquement. Il serait donc intéressant de tester ces traitements prometteurs sur des sols plus concentrés en PCDD/F.

## **Conclusion partielle**

Dans ce chapitre, nous sommes partis d'un sol historiquement contaminé par les PCDD/F à une étude au laboratoire en milieu minéral puis à une complexification des tests de dégradation conduits en microcosmes au laboratoire dans ce même sol.

Dans un premier temps, 28 souches isolées à partir de ce sol ont été évaluées selon leur capacité à assimiler l'hexadécane, un substrat hydrophobe. Parallèlement aux expériences d'isolement et de sélection des souches endogènes, une étude bibliographique sur la biodégradation des PCDD/F par les champignons telluriques saprotrophes a été menée. Ces démarches ont permis de sélectionner 3 souches (D19, S6 et S19) pour les tests de dégradation chimique et/ou biologique de l'OCDD (dioxine modèle) en MM1 avec le réactif de Fenton comme oxydant chimique. Les résultats obtenus confirment que le transfert des molécules telles que l'OCDD dans la phase aqueuse reste un frein véritable à la biodégradation de polluants hydrophobes. Ces résultats n'excluent cependant pas la poursuite des recherches car nous avions choisi une molécule très peu soluble et très hydrophobe, conditions très drastiques.

Ainsi dans la dernière étape de ce plan expérimental, nous avons mis au point d'une méthode de remédiation en sol. Pris dans leur ensemble, les résultats indiquent clairement une efficacité des traitements biologiques seuls comparés aux couplages chimiquesbiologiques. Le résultat d'une dégradation des dioxines obtenu dans le traitement 5 avec la souche fongique D19 associé aux copeaux de carton est très encourageant. En effet, la production d'inoculum sur ce type matériau est peu onéreuse et permet l'installation rapide de la souche condition sine qua non pour une biodégradation de polluants. Par conséquent, ces résultats ouvrent la perspective d'une technique à faible coût économique et relativement rapide (2 mois d'incubation) de remédiation fongique des sols pollués par les dioxines.

De plus, pour ces essais en sols, nous n'étions pas dans des conditions optimales. De fait, même si la toxicité des PCDD/F est élevée dans le sol d'Halluin, la quantité de PCDD/F

reste très faible, de l'ordre de 260,09 ng.kg<sup>-1</sup>. De plus, les PCDD/F sont très faiblement biodisponibles du fait de leur très faible solubilité aqueuse et de leur hydrophobie élevée. Malgré ces conditions, des taux élevés de dégradation des dioxines ont été obtenus. Nous pouvons donc espérer de meilleurs résultats dans des conditions plus favorables. Les résultats obtenus sont donc prometteurs et nécessiteraient d'être confirmés sur d'autres sites pollués par les dioxines ou par d'autres POP.

# **Bibliographie**

Boethling, R.S., and Alexander, M. (1979). Effect of Concentration of Organic Chemicals on Their Biodegradation by Natural Microbial Communities. Appl. Environ. Microbiol. *37*, 1211–1216.

Bunge, M., and Lechner, U. (2009). Anaerobic reductive dehalogenation of polychlorinated dioxins. Appl. Microbiol. Biotechnol. *84*, 429–444.

Chang, Y.-S. (2008). Recent Developments in Microbial Biotransformation and Biodegradation of Dioxins. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. *15*, 152–171.

Covino, S., D'Annibale, A., Stazi, S.R., Cajthaml, T., Čvančarová, M., Stella, T., and Petruccioli, M. (2015). Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. Sci. Total Environ. *505*, 545–554.

Cox, J.C., and Golbeck, J.H. (1985). Hydroxylation of biphenyl by Aspergillus parasiticus: Approaches to yield improvment in fermenter cultures. Biotechnol. Bioeng. *27*, 1395–1402.

Črešnar, B., and Petrič, Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics *1814*, 29–35.

D'Mello, J.P.F. (1997). Handbook of Plant and Fungal Toxicants (CRC Press).

Dodge, R.H., Cerniglia, C.E., and Gibson, D.T. (1979). Fungal metabolism of biphenyl. Biochem. J. *178*, 223–230.

Embar, K., Forgacs, C., and Sivan, A. (2006). The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil (English). Biodegrad. Dordr *17*, 369–377.

Federici, E., Giubilei, M.A., Covino, S., Zanaroli, G., Fava, F., D'Annibale, A., and Petruccioli, M. (2012). Addition of maize stalks and soybean oil to a historically PCB-contaminated soil: effect on degradation performance and indigenous microbiota. New Biotechnol. *30*, 69–79.

Forster, J.C. (1995). Soil physical analysis. In Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry., (Alef, K.A., Nannipieri, P.), pp. 105–121.

Gesell, M., Hammer, E., Specht, M., Francke, W., and Schauer, F. (2001). Biotransformation of Biphenyl by Paecilomyces lilacinus and Characterization of Ring Cleavage Products. Appl. Environ. Microbiol. *67*, 1551–1557.

Goettel, M.S., Koike, M., Kim, J.J., Aiuchi, D., Shinya, R., and Brodeur, J. (2008). Potential of Lecanicillium spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. J. Invertebr. Pathol. *98*, 256–261.

Gong, X.-B. (2012). Remediation of weathered petroleum oil-contaminated soil using a combination of biostimulation and modified Fenton oxidation. Int. Biodeterior. Biodegrad. *70*, 89–95.

Haglund, P. (2007). Methods for Treating Soils Contaminated with Polychlorinated Dibenzop-Dioxins, Dibenzofurans, and Other Polychlorinated Aromatic Compounds. AMBIO J. Hum. Environ. *36*, 467–474.

Hammer, E., and Schauer, F. (1997). Fungal hydroxylation of dibenzofuran. Mycol. Res. 101, 433–436.

Hammer, E., Schoefer, L., Schäfer, A., Hundt, K., and Schauer, F. (2001). Formation of glucoside conjugates during biotransformation of dibenzofuran by Penicillium canescens SBUG-M 1139. Appl. Microbiol. Biotechnol. *57*, 390–394.

Ishii, K., Furuichi, T., Tanikawa, N., and Kuboshima, M. (2009). Estimation of the biodegradation rate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by using dioxin-degrading fungus, Pseudallescheria boydii. J. Hazard. Mater. *162*, 328–332.

Juhasz, A.L., and Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. Int. Biodeterior. Biodegrad. *45*, 57–88.

Kumar, A.K., Vatsyayan, P., and Goswami, P. (2009). Production of Lipid and Fatty Acids during Growth of Aspergillus terreus on Hydrocarbon Substrates. Appl. Biochem. Biotechnol. *160*, 1293–1300.

Leitão, A.L. (2009). Potential of Penicillium Species in the Bioremediation Field. Int. J. Environ. Res. Public. Health *6*, 1393–1417.

Lemaire, J. (2011). Traitement par oxydation chimique de sols de friches industrielles contaminés par des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (Vandoeuvre-les-Nancy, INPL).

Leonardi, V., Giubilei, M.A., Federici, E., Spaccapelo, R., Sasek, V., Novotny, C., Petruccioli, M., and D'Annibale, A. (2008). Mobilizing agents enhance fungal degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and affect diversity of indigenous bacteria in soil. Biotechnol. Bioeng. *101*, 273–285.

Lepoivre, P. (2003). Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte (De Boeck Supérieur).

Lindley, N.D., and Heydeman, M.T. (1986). The uptake of n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon-utilizing fungus Cladosporium resinae. Appl. Microbiol. Biotechnol. *23*, 384–388.

Maddela, N.R., Scalvenzi, L., Pérez, M., Montero, C., and Gooty, J.M. (2015). Efficiency of Indigenous Filamentous Fungi for Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Medium and Soil: Laboratory Study from Ecuador. Bull. Environ. Contam. Toxicol. *95*, 385–394.

Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castañeda, G., and Barrera-Cortés, J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. Int. Biodeterior. Biodegrad. *61*, 151–160.

Mouhamadou, B., Faure, M., Sage, L., Marçais, J., Souard, F., and Geremia, R.A. (2013). Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. Fungal Biol. *117*, 268–274.

Mycobank (2016). Site internet www.mycobank.org consulté le 13/10/2016.

Nakamiya, K., Furuichi, T., and Ishii, K. (2002). Isolation of a fungus from denitrifying activated sludge that degrades highly chlorinated dioxins. J. Mater. Cycles Waste Manag. *4*, 127–134.

Nakamiya, K., Hashimoto, S., Ito, H., Edmonds, J.S., Yasuhara, A., and Morita, M. (2005). Degradation of dioxins by cyclic ether degrading fungus, Cordyceps sinensis (English). FEMS Microbiol Lett *248*, 17–22.

Nam, I.-H., Kim, Y.-M., Murugesan, K., Jeon, J.-R., Chang, Y.-Y., and Chang, Y.-S. (2008). Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst. J. Hazard. Mater. *157*, 114–121.

Pizzul, L., Castillo, M. del P., and Stenström, J. (2006). Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil. World J. Microbiol. Biotechnol. *22*, 745–752.

Puntus, I.F., Sakharovsky, V.G., Filonov, A.E., and Boronin, A.M. (2005). Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene. Process Biochem. *40*, 2643–2648.

Rafin, C., Foucault, B. de, and Veignie, E. (2013). Exploring micromycetes biodiversity for screening benzo[a]pyrene degrading potential. Environ. Sci. Pollut. Res. *20*, 3280–3289.

Reyes-César, A., Absalón, Á.E., Fernández, F.J., González, J.M., and Cortés-Espinosa, D.V. (2014). Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. World J. Microbiol. Biotechnol. *30*, 999–1009.

Romero, M.C., Hammer, E., Hanschke, R., Arambarri, A.M., and Schauer, F. (2005). Biotransformation of biphenyl by the filamentous fungus Talaromyces helicus. World J. Microbiol. Biotechnol. *21*, 101–106.
Schürmann, B.T.M., Sallum, W.S.T., and Takahashi, J.A. (2010). Austin, dehydroaustin and other metabolites from Penicillium brasilianum. Quím. Nova *33*, 1044–1046.

Seghezzi, W., Sanglard, D., and Fiechter, A. (1991). Characterization of a second alkaneinducible cytochrome P450-encoding gene, CYP52A2, from Candida tropicalis. Gene *106*, 51– 60.

Sietmann, R., Gesell, M., Hammer, E., and Schauer, F. (2006). Oxidative ring cleavage of low chlorinated biphenyl derivatives by fungi leads to the formation of chlorinated lactone derivatives. Chemosphere *64*, 672–685.

Silva-Castro, G.A., Rodelas, B., Perucha, C., Laguna, J., González-López, J., and Calvo, C. (2013). Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: Assays in a pilot plant. Sci. Total Environ. *445–446*, 347–355.

Smith, R.V., Davis, P.J., Clark, A.M., and Glover-Milton, S. (1980). Hydroxylations of Biphenyl by Fungi. J. Appl. Bacteriol. *49*, 65–73.

Tigini, V., Prigione, V., Toro, S.D., Fava, F., and Varese, G.C. (2009). Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. Microb. Cell Factories *8*, 5.

Tuthill, D.E., Frisvad, J.C., and Christensen, M. (2001). Systematics of Penicillium simplicissimum Based on rDNA Sequences, Morphology and Secondary Metabolites. Mycologia *93*, 298–308.

Venny, Gan, S., and Ng, H.K. (2012). Current status and prospects of Fenton oxidation for the decontamination of persistent organic pollutants (POPs) in soils. Chem. Eng. J. *213*, 295–317.

Volke-Sepúlveda, T.L., Gutiérrez-Rojas, M., and Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by Aspergillus niger. Bioresour. Technol. *87*, 81–86.

Wardle, K.S., and Schisler, L.C. (1969). The Effects of Various Lipids on Growth of Mycelium of Agaricus Bisporus. Mycologia *61*, 305–314.

### **Conclusion générale**

Depuis toujours, les sols sont le support des activités humaines qui vont de l'agriculture aux infrastructures urbaines et industrielles. Ces activités peuvent conduire à des altérations et à des dégradations des fonctions du sol.

Ce travail de thèse est axé sur l'élaboration de techniques de remédiation des sols contaminés par les POP en particulier sur deux familles de polluants : les HAP et les PCDD/F. Rappelons que la dégradation des POP présente deux obstacles majeurs à l'efficacité des traitements biologiques par voie fongique : la faible biodisponibilité des POP et la difficulté d'amorcer l'oxydation de molécules aussi stables chimiquement. Ces deux obstacles sont liés aux propriétés physico-chimiques des polluants étudiés : ils sont en effet très peu solubles et hydrophobes ce qui conduit à leur adsorption sur les particules de sols. De plus, leur caractère aromatique leur confère une très grande stabilité chimique. Ces limites constituent les verrous technologiques à lever tant d'un point de vue fondamental pour avancer dans la compréhension des mécanismes de biodégradation mais également d'un point de vue appliqué pour favoriser le développement du marché des éco-biotechnologies de réhabilitation des sols, secteur en plein essor porteur de métiers émergents en environnement industriel.

Ainsi, l'un des deux principaux objectifs de notre étude est d'augmenter la solubilité des POP par l'utilisation d'amidon modifié afin d'améliorer la proximité spatiale entre le polluant et les réactifs d'oxydation (chimique ou biologique). Le second objectif majeur est de coupler une oxydation chimique douce mais suffisante pour initier l'ouverture des cycles aromatiques des polluants à l'oxydation biologique par les champignons telluriques saprotrophes.

Notre approche très innovante s'inscrit dans une problématique de réhabilitation écologique des sols pollués et de leur réintégration dans les dynamiques urbaines. Cette démarche est favorable au maintien de la biodiversité en cohérence avec les initiatives nationales, régionales et territoriales (trames vertes et bleues, Schéma d'Environnement Industriel, Agenda 21 de la Communauté Urbaine de Dunkerque).

La première partie de ce travail de thèse a consisté à modifier chimiquement des amidons natifs de pomme de terre. Pour ces synthèses, nous nous sommes inspirés de précédentes études réalisées au sein de notre équipe (UCEIV, ULCO, Dunkerque) (Rosu et al., 2011, 2013). Nous avons ainsi synthétisé de nouveaux amidons bifonctionnalisés par la BS et l'OSA en testant différentes conditions de synthèses. Ces amidons modifiés ont été évalués pour leur solubilité aqueuse apparente et leur capacité à augmenter la solubilité du BaP, utilisé comme polluant hydrophobe modèle. D'après ces critères de sélections et en comparaison avec l'amidon natif de pomme de terre, il s'est avéré que **P9**\* possède des propriétés surfactantes marquées et donc très intéressantes pour notre étude. En effet, **P9**\* augmente la solubilité aqueuse de l'amidon par un facteur de 65 (22,60 g.L<sup>-1</sup>) et les propriétés surfactantes ainsi obtenues stimulent 33 fois la solubilisation aqueuse du BaP. De plus, des études complémentaires ont montré que l'amidon **P9**\* peut s'auto-assembler dans l'eau en formant des structures de type nanosphères capables d'encapsuler au sein de leurs cœurs hydrophobes des molécules invitées surfactantes marquées va permettre d'évaluer l'importance de la disponibilité des POP dans les processus de dégradation.



Figure c 1. Représentation schématique des nanosphères **P9\*** obtenues dans l'eau et de leurs capacités à encapsuler le BaP

Du fait de l'intérêt d'utiliser des souches endogènes de sols historiquement contaminés pour le développement de méthodes de bioremédiation, nous avons réalisé d'abord des isolements de souches fongiques à partir d'échantillons de sols historiquement contaminés par les PCDD/F pour constituer une mycothèque de souches. Parmi les 33 souches isolées, 28 d'entre elles ont été évaluées selon leurs capacités à croître et à assimiler des molécules modèles ayant des propriétés communes aux PCDD/F. Parallèlement à cette première approche, nous avons mené une étude bibliographique sur la biodégradation des PCDD/F par les champignons telluriques saprotrophes et croisé les données recueillies dans la littérature avec les espèces fongiques présentes dans la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque) afin de choisir des souches potentiellement intéressantes. A l'issue de ces deux démarches, 4 souches ont été sélectionnées pour la suite de l'étude : *Fusarium solani* (S19), *Lecanicillium lecanii* (E1), *Penicillium brasilianum* (D19) et *Paecilomyces lilacinus* (S6). L'utilisation d'un système simplifié où le champignon est en conditions axéniques (en milieu minéral MM1) nous a ensuite permis de déterminer les paramètres (souche fongique, type et dose d'oxydant) optimaux pour l'élaboration d'une méthode de dégradation des POP au laboratoire.

L'ensemble des paramètres déterminés en amont a été appliqué lors des études comparatives de la dégradation du BaP par différents processus d'oxydation chimiques (réactif de Fenton) et/ou biologiques réalisés en MM1. Les résultats obtenus ont montré que le couplage des deux procédés d'oxydation s'avère particulièrement prometteurs pour la dégradation du BaP. Ces tests de dégradation ont également souligné l'importance de la disponibilité du polluant comme facteur limitant. Cependant ce verrou technologique a été levé grâce aux propriétés surfactantes de l'amidon **P9\***. En effet, la dégradation du BaP par le traitement Fenton en présence d'amidon est totale comparé au traitement Fenton sans amidon. La Figure c 2 illustre l'encapsulation du BaP par les nanosphères d'amidon et la dégradation de ce dernier par le réactif de Fenton.



Figure c 2. Représentation schématique de la dégradation du BaP par le réactif de Fenton en présence de nanosphères d'amidon en milieu minéral

Ce résultat souligne l'importance du paramètre quantité de polluant disponible dans le milieu pour la dégradation. De plus, l'amidon **P9\*** s'est avéré efficace et de surcroît, moins coûteux que les cyclodextrines (tels que les HPBCD) pour des applications environnementales. Ces résultats obtenus *in vitro* semblent prometteurs nous permettent d'envisager le développement de méthodes de remédiation de sols historiquement contaminés par les POP.

Les précédents tests ont permis la sélection de deux souches (*Penicillium brasilianum* et *Fusarium solani*) pour les expériences de dégradation en échantillons de sols historiquement contaminés par les PCDD/F. Une méthode d'inoculation du sol avec du mycélium installé sur un agent texturant (copeaux de bois ou de carton) a d'abord été mise au point. Rappelons que *Penicillium brasilianum* est une souche autochtone isolée du sol de la ferme du Noir-Pot d'Halluin et *Fusarium solani* provient de la mycothèque de l'UCEIV (ULCO, Dunkerque).

Les résultats obtenus ont montré l'efficacité des traitements biologiques seuls en comparaison avec les couplages chimiques-biologiques pour la dégradation des PCDD/F, en particulier pour le traitement 5 avec *Penicillium brasilianum* associé aux copeaux de carton (Figure c 3).



Figure c 3. Représentation schématique de la dégradation des PCDD/F par les champignons telluriques saprotrophes en microcosme de sol

Il se pourrait que l'inoculation de *Penicillium brasilianum* ait eu un effet stimulateur significatif sur la dégradation des PCDD/F par rapport au témoin. La dégradation des PCDD/F pourrait également être liée à la présence d'une microflore autochtone du sol stimulée par

l'inoculum ou l'agent texturant. Dans cette expérience, les capacités de dégradation des PCDD/F des champignons telluriques saprotrophes en particulier de *Penicillium brasilianum* ont donc été mises en évidence. Dans nos conditions expérimentales, les approches de biostimulation par ajout d'un agent texturant et de nutriments ou de bioaugmentation sont performantes pour la dégradation des PCDD/F contrairement aux méthodes chimiques. C'est d'ailleurs la première fois à notre connaissance que des études de dégradation des PCDD/F par les champignons telluriques saprotrophes sont réalisées en microcosme de sols historiquement contaminés. Les résultats obtenus sont très encourageants et prometteurs. En effet, la production d'inoculum sur ce type de matériau est peu onéreuse et permet l'installation rapide de la souche dans la matrice contaminée, condition *sine qua non*, pour que la biodégradation de polluants puisse se produire. Ces résultats ouvrent donc la perspective d'une technique à faible coût économique et relativement rapide (2 mois d'incubation) de remédiation fongique des sols pollués par les PCDD/F.

Les approches développées dans ce travail de thèse ouvrent des perspectives à différents niveaux allant de la recherche fondamentale aux sciences appliquées.

<u>Nanosphères d'amidon</u> : Au cours des dernières années, les nanoparticules dérivées de polysaccharides naturels sont devenus un sujet de recherche intensif avec de multiples applications potentielles dans de nombreuses filières. Les micro/nanoparticules à base d'amidon ont montré de grands potentiels pour les applications alimentaires, médicales, industrielles et agricoles. Dans le cadre de la thèse, nous entrouvrons des perspectives pour des applications environnementales. Afin d'exploiter au mieux les nanosphères d'amidon, une caractérisation plus approfondie de ces structures serait nécessaire (détermination du diamètre par diffusion dynamique de la lumière ou de l'influence de la température sur l'auto-assemblage de ces dernières). Il serait intéressant de valider cette méthode en sol. Afin de valider la faisabilité d'un tel procédé de remédiation en sol, des études sont nécessaires pour approfondir notre compréhension de cette application en conditions réelles. Des essais en microcosmes de sol pollué seront nécessaires en présence de plusieurs HAP. La mobilité et le devenir de ces nanosphères d'amidon devront également être abordés pour évaluer leur réactivité, leur stabilité et leur écotoxicité en conditions réelles.

Rappelons que nous avons décidé de synthétiser ces nanosphères à partir d'une bioressource naturelle. Pour la modification chimique de l'amidon, nous nous sommes

173

inspirés de l'utilisation des dérivés d'amidons dans le secteur des industries agroalimentaires. Ces nanosphères, très intéressantes pour leurs propriétés surfactantes, devraient donc être rapidement biodégradables et pourraient également servir de substrat organique capable de stimuler le métabolisme des populations microbiennes autochtones et participer ainsi à la restauration de la vie microbienne dans ces sols perturbés. L'utilisation de nanosphères d'amidon dans les différents traitements d'oxydation (chimique et/ou biologique) de réhabilitation des sols pourrait donc être un procédé rentable et efficace à la dégradation.

<u>Compréhension des mécanismes de biodégradation des PCDD/F en sol</u>: Afin d'avoir une vision globale des communautés microbiennes présentes dans les différents traitements menés, des approches omiques peuvent être envisagées. En effet, au travers d'analyses génomique, transcriptomique, protéomique et/ou métabolomique, il serait possible de connaître les populations microbiennes présentes et leurs activités respectives au sein des communautés microbiennes dans les différents traitements de sols contaminés. Ces technologies permettraient de mieux identifier et comprendre les métabolismes microbiens impliqués dans la bioremédiation des sols à différentes échelles spatiales et temporelles.

Protocole de dégradation des POP en sol : Les résultats obtenus en microcosme de sols contaminés par les PCDD/F durant la thèse sont prometteurs et pourraient être exploités sur d'autres sols, soit plus concentrés en dioxines, soit contaminés par d'autres types de polluants. Pour la suite des travaux, il devient impératif de changer d'échelle. Pour cela, il est nécessaire de créer un réseau d'acteurs engagés dans la réhabilitation des sols historiquement contaminés (bureaux d'études, maîtres d'ouvrage...) afin d'engager des études de recherche et développement pour la validation de l'efficacité de cette méthode en conditions réelles.

### <u>Sommaire</u>

Annexe 1 : Publication176										
Annexe	2:	Mode	opératoire	pour	l'analyse	des	dioxines	dans	des	matrices
environn	eme	ntales	•••••			•••••				
Annexe 3 : Curriculum vitae201										

### Annexe 1 : Publication

### Accepted Manuscript

Title: Synthesis of modified potato starches for aqueous solubilization of benzo[a]pyrene

Author: Isabelle Delsarte Pierre-Edouard Danjou Etienne Veignie Catherine Rafin



 PII:
 S0144-8617(16)30035-2

 DOI:
 http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2016.01.071

 Reference:
 CARP 10750

To appear in:

 Received date:
 22-7-2015

 Revised date:
 26-1-2016

 Accepted date:
 30-1-2016

Please cite this article as: Delsarte, I., Danjou, P.-E., Veignie, E., and Rafin, C., Synthesis of modified potato starches for aqueous solubilization of benzo[a]pyrene, *Carbohydrate Polymers* (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.071

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.

Synthesis of modified potato starches for aqueous solubilization of benzo[a]pyrene

Isabelle Delsarte, Pierre-Edouard Danjou, Etienne Veignie, Catherine Rafin

ULCO, Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, Dunkerque 59140, France

\*. Tel: 33 0 3 28 65 82 78, email: rafin@univ-littoral.fr

#### Abstract

For soil rehabilitation, the surfactant-enhanced remediation has emerged as a promising technology. For this purpose, starch derivatives were difunctionalized by 1,4-butane sultone (BS) and 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (OSA). Eight distinct products were obtained under different synthesis conditions. The chemical structural characteristics were investigated by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The compounds were evaluated for their apparent aqueous solubility and their ability to increase the solubility of a hydrophobic pollutant such as benzo[a]pyrene (BaP), used as a polycyclic aromatic hydrocarbon model. In comparison with native starch, the best obtained compound increased starch apparent aqueous solubility by a factor of 10 (up to 3.50 g/L) and also stimulated 77-fold BaP aqueous solubilization (up to 232.97  $\mu$ g/L) underlining its very high surfactant property. In this study, the right balance between hydrophobic character (octenyl succinate group (OS) grafted) of starch derivatives and starch apparent aqueous solubility (BS grafted) was highlighted.

#### Keywords

Potato starch, Alkylation, Benzo[a]pyrene, Surfactant

### Chemical compounds used in this article

Potato starch (PubChem SID: 135306210), Sodium hydroxide (PubChem CID: 14798), Dimethyl sulfoxide (PubChem CID: 679), Benzo[a]pyrene (PubChem CID: 2336), 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (PuBChem CID: 5362689), 1,4butane sultone (PubChem CID: 15411), Deuterium oxide (PubChem CID: 24602), Dichloromethane (PubChem CID: 6344)

### Highlights

- Modified starches were evaluated for their benzo[a]pyrene desorption capacities
- The best starch stimulated 77-fold the aqueous solubilization of benzo[a]pyrene
- Hydrophobic/hydrophilic balance was highlighted for surfactant-enhanced remediation

#### Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) pose a real threat to environment and human health due to their high toxicity. These pollutants are mainly released into the atmosphere from anthropogenic sources before being deposited into the soil. They tend to persist in the environment because of their high chemical stability, low water solubility and tendency to be adsorbed onto soil organic matter (Cerniglia, 1993; Juhasz & Naidu, 2000). For soil rehabilitation, the surfactantenhanced remediation has emerged as a promising technology, especially for biodegradation involving saprotrophic soil fungi (Goltapeh, Danesh, & Varma, 2013). Indeed, in contaminated soils, PAHs need to be transferred from the solid soil phase to the aqueous one in order to be bioavailable to fungi and consequently be biodegraded (Flotron, Delteil, Padellec, & Camel, 2005; Rafin, De Foucault, & Veignie, 2013).

For this purpose, surfactant like nonionic ones or cyclodextrins could be used to increase the PAHs biodegradation rates in soils (Bardi, Mattei, Steffan, & Marzona, 2000; Ortega-Calvo et al., 2013). Previous studies (Molnár et al., 2005; Veignie, Rafin, Landy, Fourmentin, & Surpateanu, 2009) have demonstrated the interest of using cyclodextrins which are cyclic oligomers composed of  $\alpha$ -1,4-linked glucose units (Szejtli, 1988). For most non-polar contaminants, formation of inclusion complex between the hydrophobic cavity of cyclodextrin and the

contaminant increases the apparent solubility of pollutant (Frömming & Szejtli, 1994; Fava, Di Gioia, & Marchetti, 1998).

The existence of similar hydrophobic cavities was also highlighted in starches in our previous study (Rosu et al., 2011). These natural polysaccharides represent a material of choice for surfactant-enhanced remediation approaches owing to several advantages: they are non-toxic, abundant, cheap, renewable, biodegradable and easily modifiable (Liu & Budtova, 2013; Richardson & Gorton, 2003; Rodrigues & Emeje, 2012). Nevertheless, the weak aqueous solubility of native granular starches is also known to be a major constraint that could limit the development of such starch-based materials and derived applications (Bai, Shi, Herrera, & Prakash, 2011; Waterschoot, Gomand, Fierens, & Delcour, 2014). In our previous research, modified starches with 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (OSA) presented the highest capacity to desorb BaP despite a quite low water solubility (Rosu et al., 2013). This result indicated that amphiphilic properties of OSA were not sufficient for native starch solubilisation. Therefore, in the same study, we decided to conduct disubstitutions. So, native starches were modified with 1,4-butane sultone (BS) which stimulated starch solubility in water thanks to charged sulfonate groups solubility (Rosu et al., 2013). Moreover, for bioremediation processes, the high molecular size of starch must be preserved in order to avoid a side effect of the surfactant-enhanced remediation i.e. the pollutant discharge in the environment. That is why the acid hydrolysis of starch was not the synthesis strategy chosen in order to preserve the highest starch molecular size possible. These previous syntheses allowing a right balance between hydrophobic and hydrophilic characters of starch derivatives were promising. This strategy was used as our guideline for the present research.

The originality of the present research was to use 1,4-butane sultone (BS) and 2octen-1-ylsuccinic anhydride (OSA) as starting materials for synthesizing difunctionalized starches. These new modified starches were then evaluated for their apparent aqueous solubility and their ability to increase the solubility of hydrophobic pollutants such as benzo[a]pyrene (BaP), used as a PAH model.

#### 2. Material and methods

#### 2.1. Chemicals

Soluble potato starch (**P0** 121096, 0000108507), sodium hydroxide (NaOH) and dimethyl sulfoxide (DMSO) at 99.5% purity were provided by Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain). Benzo[a]pyrene (BaP) at 96% HPLC purity and 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (OSA) at 97% purity were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The reagent 1,4-butane sultone (BS) at 99% purity was supplied by Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France), dichloromethane (DCM) by Fisher Scientific (Illkirch, France), deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) at 99.8% purity by

Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Cellulose membrane (MWCO of 12–14 kDa) was supplied by Medicell International (London, United Kingdom). Deionized water was used throughout this work.

2.2. Synthesis of difunctionalized starch derivatives Reactions were performed sequentially (P1, P2, P3, P4, P5, P6) or in one pot (P7, P8). All the reaction parameters are given in Table 1. Representative procedures were described for P1 and P8.

**P1**: Potato starch (1.00 g, 6 mmol per anhydroglucose unit (AGU)), 5 mL H<sub>2</sub>O, 20 mL DMSO and NaOH (0.10 g, 2.5 mmol) were placed in a 100 mL round bottomed flask and were stirred at 20 °C for 24 h. To this mixture, BS (0.92 mL, 9 mmol) was added and the reaction was carried out for 24 h. Finally, OSA (1.90 mL, 9 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 24 h. A total of NaOH pellets (0.40 g, 10 mmol) was added to maintain the pH between 8 and 9.

**P8**: Potato starch (1.00 g, 6 mmol AGU), 5 mL H<sub>2</sub>O, 20 mL DMSO and NaOH were placed in a 100 mL round bottomed flask and were stirred at 70 °C. To this mixture, BS (1.85 mL, 18 mmol) and OSA (1.90 mL, 9 mmol) were simultaneously added and the reaction was carried out for 24 h. A total of NaOH (0.40 g, 10mmol) was added to maintain the pH between 8 and 9.

On completion of the reactions, the modified starches were dialyzed in water during 3 days using a cellulose membrane. The water was changed twice a day and the products were lyophilized (Rosu et al., 2013). Eight products were obtained.

#### 2.3. Structural <sup>1</sup>H NMR characterization of starch

<sup>1</sup>H NMR spectra were measured with a 400 MHz Spectrospin NMR spectrometer. The NMR spectrometer is an Avance III 400 spectrometer and the supplier is Bruker, France. Spectra were recorded in D<sub>2</sub>O with the following spectra acquisition parameters: 25 °C or 70 °C, relaxation delay 1s, pulse angle 30°, acquisition time 6 s with a total of 16 scans. The routine NMR conditions chosen did not yield quantitative NMR spectra and the ratio values (R) determined in this work were thus apparent R values. This still enabled a qualitative comparison between samples, provided the NMR spectra were recorded in the exact same conditions for the samples being compared.

The apparent ratio (R) between octenyl succinate groups (OS) and BS , which represents the apparent ratio of substituents grafted, was determined from <sup>1</sup>H NMR spectra. R is calculated by the equation:

 $R = (I_{OS} / 3) / (I_{BS} / 4) (1)$ 

The integration of the peak ( $I_{OS}$ ) was determined at 0.89 ppm matching to ( $CH_3$ )<sub>a</sub> protons in the alkyl residues as referred to Fig. 1. The integration of BS at 1.70 - 1.95 ppm corresponding to ( $CH_2$ )<sub>B-C</sub> protons in the alkyl residue of BS (Fig. 1) was used to determined  $I_{BS}$ .

### 2.4. Determination of the apparent aqueous solubility of modified starch

A saturated solution of each modified starch was prepared in deionized water at room temperature and pH 6 (21–22°C). This solution was stirring during 1 hour. After 24 hours of decantation, the saturation was confirmed by the presence of undissolved material. A precise volume (10 mL) of supernatant was lyophilized and weighed. Apparent solubility experiments were done at three replicates for each modified starch to evaluate repeatability (Rosu et al., 2013).

#### 2.5. BaP solubilization in the presence of modified starch

A BaP solution was initially prepared in DCM at a concentration of 40 mg/L. Then, 375  $\mu$ L (15  $\mu$ g) of this solution was deposited into a hemolysis tube allowing DCM solvent to completely evaporate at 60 °C. An aliquot of 3 mL of water (as reference) or of aqueous starch solution (at a concentration of 0.45 g/L) was added into the BaP coated hemolysis tube (Rosu, et al., 2013). Tubes were incubated in the dark for 24 h. BaP molecular fluorescence in carbohydrate polymer solutions was analyzed into a quartz cell on a Perkin Elmer LS50B spectrometer (excitation 295 nm, emission 406 nm, time integration 10 s)

(Veignie et al., 2009). BaP solubilization was evaluated at three replicates for each compound.

#### 2.6. Specific activity of modified starch and maximum BaP solubilization

For each modified starch solution (0.45 g/L), a specific activity (SA) for BaP solubilization was calculated. It represented the amount of solubilized BaP ( $\mu$ g) per gram of modified starch. It allowed us to calculate, for each modified starch, the maximum BaP solubilization by the equation:

Maximum BaP solubilization = specific activity X apparent aqueous solubility Eq (2)

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Synthesis conditions

Syntheses were adapted from our previous research (Rosu, et al., 2013). Due to its poor water solubility at room temperature, starch was firstly dissolved in DMSO, an aprotic polar solvent, prior to the addition of the base catalyst (NaOH) and of the reagents (Wei et al., 2011). Even if water addition was not indicated to yield an optimal dissolution of native starch in DMSO (Dona, et al., 2007), it was a necessary condition for optimizing the compound reactivity. Indeed, this pretreatment aims to disorganize the crystalline structure of starch molecules and consequently to enhance their reactivity, favoring a better uniformity of substitutions (Richardson & Gorton, 2003). The solution homogeneity of potato starch was checked after 24 hours by a visual control with a photonic microscopy. After starch solubilization obtained, BS and OSA were added simultaneously or sequentially into the reaction medium. The temperature of 70°C turned out to be necessary for enhancing BS grafted. Amounts of BS and OSA were based on the presence of the three free hydroxyl groups per AGU.

In order to optimize the process, different synthesis conditions were tested: pretreatment of native starch, temperature, reaction duration, DMSO/H<sub>2</sub>O ratio and BS/AGU ratio. Eight products were synthesized (Table 1).

3.2. Characterization of the molecular structure of starch by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy

#### 3.2.1. Characterization of the native starch

Fig. 1A presents the <sup>1</sup>H NMR spectrum in D<sub>2</sub>O of **P0** as reference. The NMR spectrum of native starch was characterized by a broad and complex multiple proton resonance signals between 3.50 and 4.20 ppm assigned to protons H<sub>2-6</sub> of the starch AGU. Signals at 4.98 and 5.41 ppm were attributed to the anomeric protons corresponding to the internal  $\alpha$ -1,6 and  $\alpha$ -1,4 linkages respectively (De Graaf, Lammers, Janssen, & Beenackers, 1995; Gaborieau et al., 2009).

### 3.2.2. Characterization of the modified starch

After the sulfobutylation step, an aliquot of the reaction medium was dialyzed and lyophilized in order to obtain a sample ready for NMR spectroscopy analysis. Fig. 1B presents the NMR spectra recorded during the synthesis of **P2** and clearly pointed out the apparition of broad resonance signals in the 1.50-3.50 ppm region attributed to the randomly grafted sulfobutyl groups. Indeed, peaks at 1.70-1.95 ppm results from the 4 protons of the  $(CH_2)_B$  and  $(CH_2)_C$  while the broad triplet at 2.96 ppm was assigned to  $(CH_2)_D$  proton of BS (Qu, Tucker, & Christian, 2002).

At the end of the reaction, NMR spectra of the modified starch derivatives were recorded in  $D_2O$  at room temperature. Unfortunately, peaks were too broad and irresolvable to be exploited. Therefore, spectra were recorded at 70 °C according to Gidley (1985). Modification of starch by OS was confirmed by the apparition of

a peak around 0.89 ppm, which included the three protons of the terminal methyl group of OS (Fig. 1C). The others peaks specific of the anhydride groups CH and  $(CH_2)_n$  are assigned as follows: 1.30 ppm to  $(CH_2)_{b-d}$ ; 2.00 ppm to  $(CH_2)_e$  and between 2.13 and 2.95 ppm to  $(CH)_i$ ,  $(CH_2)_h$  and j (Zhang, Zhao, & Xiong, 2013). R was determined by integrating pics at 0.89 ppm and 1.70-1.95 ppm.

#### 3.3. Apparent aqueous solubility of starch derivatives

For each product obtained, the R as well as the aqueous solubility of starch derivatives are expressed in Table 2. In a general way, excepted for **P4** and **P5**, the apparent aqueous solubility of modified potato starches decreased with the augmentation of grafted BS.

**P4** and **P5** are characterized by the highest apparent aqueous solubility, respectively superior to 28.00 g/L in comparison with all the products obtained. <sup>1</sup>H NMR spectra of these products showed that these compounds were only grafted by BS. Thus, the **P4** and **P5** reaction conditions only allowed the grafting of BS that could explain their very high water solubility (80 to 137-fold greater than **P0**). Indeed, according to Rogmann, Seidel, & Mischnick (2000), the sulfonylbutylation of ß-cyclodextrins with BS gave appropriate water soluble products due to the ionic character of the sulfonic acid residues. Rosu et al. (2013) also synthesized modified starches with an aqueous solubility 60-fold greater than the native one. The reaction conditions are expressed in Table 1, namely the use of an excess of NaOH, as well as the solvent parameter, promoted the BS grafting, preventing the subsequent OS grafting due to the low number of free hydroxyls as well as steric hinderance.

**P6** had a very low R value (0.01) closed to those of monofunctionalized starches (**P4** and **P5**). Nevertheless, its aqueous solubility decreased dramatically to 8.45 g/L. Synthesis parameters of **P6** differed only from those of **P4** by NaOH proportion and BS/AGU. In those conditions, a small amount of OS was grafted as judged by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The weak presence of OS grafted could explain the decrease of its aqueous solubility.

**P2** differed from **P1** only by the fact that **P2** was dispersed by a heating pretreatment before the synthesis reaction. This supplementary step did not confer to the obtained product the desired properties. In fact, its aqueous solubility was as weak as this of **P1**. For this reason, this pretreatment was subsequently abandoned during the study.

Concerning **P3**, BS/AGU was doubled in comparison with **P1**. This parameter reaction was more effective to graft BS. In fact, **P3** presented a 2.5-fold superior apparent aqueous solubility in comparison with **P1**.

Lastly, both products (**P7** and **P8**) were obtained in one pot reaction. **P7** having a high R in correlation to a high OS grafted showed an important decrease of water solubility. **P8** differed from **P7** by the temperature reaction and this parameter seems to influence the properties of starch obtained. In fact, **P8** presented a 5-fold superior apparent aqueous solubility in comparison with **P7**. The decrease of OS grafted on **P8** was in correlation with the important BS grafted. BS, as a C4 alkyl group, was more soluble in the solvent than OSA. It could be a better competitor than OSA for hydroxyl groups of AGU. This phenomenon was amplified in one pot reaction because substituents were added simultaneously. The products (**P1**, **P2**, **P3**, **P7**, **P8**) had water solubility inferior to 4 g/L, that could be explained by the high presence of OS substituted on starch (R > 2.53).

### 3.4. Solubility of starch derivatives versus BaP aqueous solubilization

Fig. 2 illustrates the aqueous solubility of starch derivatives versus BaP solubility. The starch derivatives synthesized could be classified in 3 groups, labeled from I to III, according to both parameters.

Native potato starch **P0** is characterized by a very low water solubility and also a weak ability to desorb BaP (5.16  $\mu$ g/L).

Group I contained three products (**P4**, **P5**, **P6**) characterized by a high apparent aqueous solubility, 24 to 136 times greater (> to 8 g/L) than **P0** and a very weak efficiency to desorb BaP (< to 10  $\mu$ g/L). As explained in 3.3., these compounds were highly alkylated by a BS substituent which stimulated their hydrophilic properties, but have a null or a very low rate of OS substitution limiting their BaP solubilization. Nevertheless, the reaction conditions of **P5** permitted to obtain a starch derivative 2-fold more soluble in water than those obtained by Rosu et al. (2013). Such products could be interesting for developing applications in waste water flocculation or as additives in paper manufacturing (Crini, 2005; Sorokin, Kachkarova-Sorokina, Donzé, Pinel, & Gallezot, 2004).

Group II included three products (**P1**, **P2**, **P7**) which presented the highest capacities to desorb BaP (> to 244  $\mu$ g/L) and low water solubility (< to 1.5 g/L). In comparison with BaP solubility in water (3.00  $\mu$ g/L) or in presence of **P0**, those starch products were able to stimulate up to 93-fold BaP aqueous solubilization underlining their high surfactant properties. Thus, starch modifications with OSA stimulated hydrophobic characters and consequently, the efficiency to desorb

BaP as a hydrophobic pollutant model. However, the more grafted OS, the less soluble the obtained products. **P2**, desorbing BaP in aqueous phase at high capacity (278.38  $\mu$ g/L) was 2-fold more efficient than those found in our previous study (Rosu et al., 2013).

Group III contained two products **P3** and **P8** characterized by a similar R as well as a comparable apparent aqueous solubility, i.e. an enhancement by a factor 10 of that of native starch **P0**. **P8** is also characterized by an intermediate capacity to desorb BaP (88.69  $\mu$ g/L). This product could be considered as a good compromise presenting both hydrophobic and hydrophilic properties.

Likewise, **P3** stimulated 77-fold BaP aqueous solubilization (232.97  $\mu$ g/L) underlining its very high surfactant property. **P3** matches both criteria required to obtain a modified starch matrix to optimize BaP solubilization.

3.5. BaP solubilization in aqueous phase versus apparent OS/BS ratio Fig. 3 shows the R value of starch derivatives versus BaP solubilization in aqueous phase.

**P4**, **P5** and **P6** presented a weak R value. Indeed, these products were not or weakly substituted by OS and consequently were inefficient to desorb BaP (Fig. 2; Table 2). Thus, a minimal amount of grafted OS seems to be required to stimulate BaP transfer to aqueous phase.

In contrast, **P1**, **P2** and **P7** were characterized by a high capacity to desorb BaP between 244 and 280  $\mu$ g/L. The R value of these products was between 5.78 and 13.21. In these synthesis conditions, OS was successfully grafted.

The comparison between **P3** and **P8** was particularly interesting for the comprehension of BS and OSA roles. Indeed, both products were characterized

by a similar R. But, they differed by their capacity to solubilize BaP with 232.97 and 88.69  $\mu$ g/L respectively (Fig. 2; Table 2). The optimal target zone of I<sub>OS</sub>/I<sub>BS</sub> seemed to be very tight for obtaining the required criteria, especially high capacity to desorb BaP. If R < 2.53, starch derivatives were soluble but quite inefficient to solubilize BaP. At the opposite, R > 2.78 would conduct to weakly soluble products with an high BaP solubilization. Nevertheless, BaP solubilization reached a limit value, as illustrated by the asymptotic part of the sigmoid Fig. 3. From a structural point of view, the R target zone (2.53 < R < 2.78) would be in line with an optimal repartition of both substituting groups (BS and OS) along the macromolecular structure of the starch.

Therefore, it is necessary to find an adequate compromise between grafted OSA and BS to obtain a right balance between hydrophobic versus hydrophilic properties of starch derivatives. Our results showed that OSA and BS amounts grafted were also strongly influenced by the reaction conditions. Indeed, starch esterification with BS was more effective with NaOH aqueous solution used as solvent, while starch esterification with OSA was more performant using DMSO solution. Moreover, OSA esterification could be hindered if a reduced number of OH groups was available in AGU according to BS grafted (Heinze, Rensing, & Koschella, 2007). Starch derivatives with different amphiphilic characters conferring them various tensioactive properties could be synthesized by controlling the number of hydrophobic and hydrophilic substituents (Heinze et al., 2007).

All these results were summarized in Table 2 by calculating the maximal theorical value of BaP solubilization for each product. This value was calculated with a saturated aqueous solution of each starch related to their aqueous solubility. According to these calculations, **P3** had the highest capacity to desorb BaP (1811.99  $\mu$ g/L) compared with the other products by reaching 604-fold the BaP aqueous solubility (3.00  $\mu$ g/L).

#### Conclusion

To sum up, the synthesis of 8 new starch-based surfactants was successfully obtained using 2-octen-1-ylsuccinic anhydride (OSA) and 1,4-butane sultone (BS) as reagent. The efficiency of the reaction conditions as well as the OSA/BS ratio was monitored using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Aqueous solubility measurement and BaP desorption were used to evaluate the hydrophilic / hydrophobic balance of each compound. It was found that **P3** possessed the best equilibrium with an aqueous solubility of 3.50 g/L and a capacity to desorb 232.97  $\mu$ g/L of BAP. To our point of view, **P3** is the most promising candidate for the elaboration of surfactant-enhanced remediation of PAHs contaminated soils. Further research will be oriented towards the scale up synthesis of **P3** with the aim of its utilization in combination with fungi-based remediation process.

#### References

- Bai, Y., Shi, Y.-C., Herrera, A., & Prakash, O. (2011). Study of octenyl succinic anhydride-modified waxy maize starch by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 83, 407–413.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., & Marzona, M. (2000). Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology*, *27*, 709–713.
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, *4*, 331-338.
- Crini, G. (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science*, *30*(1), 38–70.
- 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*, 12, 469–475.

- Dona, A., Yuen, C. W. W., Peate, J., Gilbert, R. G., Castignolles, P., & Gaborieau, M. (2007). A new NMR method for directly monitoring and quantifying the dissolution kinetics of starch in DMSO. *Carbohydrate Research*, 342(17), 2604-2610.
- Fava, F., Di Gioia, D., & Marchetti, L. (1998). Cyclodextrin effects on the ex-situ bioremediation of a chronically polychlorobiphenyl-contaminated soil. *Biotechnology Bioengineering*, 58, 345–355.
- 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*, 1427–1437.
- Frömming, K.-H., & Szejtli, J. (1994). Cyclodextrins in pharmacy. Dordrecht, Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*.
- Gaborieau, M., De bruyn, H., Mange, S., Castignolles, P., Brockmeyer, A., & Gilbert, R. G. (2009). Synthesis and characterization of synthetic polymer colloids colloidally stabilized by cationized oligosaccharides. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(7), 1836-1852.
- Gidley, M. J. (1985). Quantification of the Structural Features of Starch Polysaccharides by NMR-Spectroscopy. *Carbohydrate Research*, *139*, 85-93.
- Goltapeh, E. M., Danesh, Y. R., & Varma, A. (Eds.). (2013). *Fungi as bioremediators*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Heinze, T., Rensing, S., & Koschella, A. (2007). Starch Derivatives of High Degree of Functionalization. 13. Novel Amphiphilic Starch Products. *Starch/Stärke*, 59, 199–207.
- Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *45*, 57–88.
- Liu, W., & Budtova, T. (2013). Dissolution of unmodified waxy starch in ionic liquid and solution rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 93, 199– 206.

- Molnár, M., Leitgib, L., Gruiz, K., Fenyvesi, E., Szaniszló, N., Szejtli, J., & Fava,
  F. (2005). Enhanced biodegradation of transformer oil in soils with cyclodextrin--from the laboratory to the field. *Biodegradation*, *16*, 159–168.
- Ortega-Calvo, J. J., Tejeda-Agredano, M. C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J. L., Cantos, M. (2013). Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation? *Journal of Hazardous Materials*, *261*, 733–745.
- Qu, Q., Tucker, E., & Christian, S. D. (2002). Sulfoalkyl ether β-cyclodextrin derivatives: Synthesis and characterizations. *Journal of Inclusion Phenomena*, 43, 213–221.
- Rafin, C., De Foucault, B., & Veignie, E. (2013). Exploring micromycetes biodiversity for screening benzo[a]pyrene degrading potential. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3280–3289.
- Rogmann, N., Seidel, J., & Mischnick, P. (2000). Formation of unexpected substitution patterns in sulfonylbutylation of cyclomaltoheptaose promoted by host–guest interaction. *Carbohydrate Research*, *327*, 269–274.
- Richardson, S., & Gorton, L. (2003). Characterisation of the substituent distribution in starch and cellulose derivatives. *Analytica Chimica Act*, *497*, 27–65.
- Rodrigues, A., Emeje, M. (2012). Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydrate Polymers*, *87*, 987-994.
- Rosu, A.-M., Rafin, C., Surpateanu, G., Brabie, G., Miron, D. N., & Veignie, E. (2013). Synthesis of alkylated potato starch derivatives and their potential in the aqueous solubilization of benzo[a]pyrene. *Cabohydrate Polymers*, *83*, 1486-1491.
- 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.

- Sorokin, A. B., Kachkarova-Sorokina, S. L., Donzé, C., Pinel, C., & Gallezot, P. (2004). From native starch to hydrophilic and hydrophobic products: A catalytic approach. *Topics in Catalysis*, 27(1-4), 67–76.
- Szejtli, J. (1988). Cyclodextrin technology. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Veignie, E., Rafin, C., Landy, D., Fourmentin, S., & Surpateau, G. (2009). Fenton degradation assisted by cyclodextrins of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 1296-1301.
- Waterschoot, J., Gomand, S. V., Fierens, E. & Delcour, J. A. (2014). Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. *Starch/Stärke*, *67*, 14–29.
- Wei, C., Qin, F., Zhou, W., Xu, B., Chen, C., Chen, Y., Wang, Y., Gu, M., & Liu, Q. (2011). Comparison of the crystalline properties and structural changes of starches from high-amylose transgenic rice and its wild type during heating. *Food Chemistry*, *128*, 645–652.
- Zhang, Z., Zhao, S., & Xiong, S. (2013). Molecular properties of octenyl succinic esters of mechanically activated Indica rice starch. *Starch/Stärke*, *65*, 453-460.

Fig. 1 Structure of bialkylated starch and <sup>1</sup>H NMR spectra (400 MHz,  $D_2O$ , 25 °C for A and B and 70 °C for C) of **A**: native potato starch (**P0**), **B**: sulfobutylated starch and **C**: sulfobutyl-octenyl succinate starch (**P2**).

Fig. 2 Relationship between the apparent aqueous solubility (g/L) and the BaP solubilization ( $\mu$ g/L) for the synthesized starch products.

Fig. 3 BaP solubilization ( $\mu$ g/L) versus the apparent ratio R ( $I_{OS}/I_{BS}$ ) for the synthesized starch products.

Table 1 Parameters of difunctionalized starches synthesis (OSA/AGU ratio = 1/2).

Product	Starch	T (°C)	Duration (h)	DMSO/H <sub>2</sub> O	NaOH/AGU	BS/AGU
P1	Native	20	48	4/1	1/2	1/2
P2	Dispersed <sup>a</sup>	20	48	4/1	1/2	1/2
P3	Native	20	48	4/1	1/2	1/1
P4	Native	70	48	1/1	4/3	1/1
P5	Native	70	48	1/1	4/3	1/2
P6	Native	70	48	1/1	1/2	1/6
<b>P7</b> <sup>b</sup>	Native	20	24	4/1	1/2	1/1
<b>P8</b> <sup>b</sup>	Native	70	24	4/1	1/2	1/1

<sup>a</sup> Native starch was dispersed into water and heated at 70 °C during 30 min prior

to synthesis

<sup>b</sup> One pot reaction

Table 2 Characteristics of difunctionalized starches.

Product	R <sup>a</sup>	Apparent aqueous solubility (g/L)	Specific activity (µg/g)	Maximum BaP solubilization (µg/L) <sup>b</sup>
P0	0.00	0.35 (± 0.07) <sup>c</sup>	11.47 (± 0.92)	4.01 (± 0.75)
P1	5.78	1.41 (± 0.07)	589.40 (± 6.04)	876.22 (± 37.04)
P2	9.78	1.33 (± 0.19)	618.62 (± 65.68)	860.62 (± 31.44)
P3	2.78	3.50 (± 0.13)	517.71 (± 18.39)	1880.99 (± 54.92)
P4 <sup>d</sup>	0.00	28.00 (± 0.28)	12.43 (± 2.37)	348.13 (± 57.47)
<b>P5</b> <sup>d</sup>	0.00	47.74 (± 0.47)	14.56 (± 1.70)	695.77 (± 63.80)
P6	0.01	8.45 (± 0.14)	12.78 (± 0.23)	107.72 (± 2.30)
P7	13.21	0.753 (± 0.04)	543.67 (± 20.90)	386.55 (± 21.94)
P8	2.53	3.87 (± 0.11)	197.09 (± 6.52)	763.39 (± 29.24)

R was determined according to <sup>1</sup>H NMR spectra and was calculated by the equation:  $R = (I_{OS}/3)$  <sup>b</sup> Maximum BaP solubilization = specific activity X apparent aqueous solubility
 <sup>c</sup> Value between brackets indicated standard deviation Eq (2)

<sup>d</sup> Only BS was successfully grafted







### Fig. 1.

Structure of bialkylated starch and <sup>1</sup>H NMR spectra (400 MHz,  $D_2O$ , 25 °C for A and B and 70 °C for C) of **A**: native potato starch (**P0**), **B**: sulfobutylated starch and **C**: sulfobutyl-octenyl succinate anhydride starch (**P2**).



#### Fig. 2.

Relationship between the apparent aqueous solubility (g/L) and the BaP solubilization ( $\mu$ g/L) for the synthesized starch products.





BaP solubilization ( $\mu$ g/L) versus the apparent ratio R ( $I_{OS}/I_{BS}$ ) for the synthesized starch products.

Cox

### Annexe 2 : Mode opératoire pour l'analyse des dioxines dans des matrices environnementales

### **OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION**

Ce mode opératoire décrit la détermination, dans des sols et végétaux de la teneur en 7 congénères polychlorodibenzo-p-dioxin (PCDD) et 8 congénères polychlorodibenzofuran (PCDF) appelés couramment « dioxines ».

Les échantillons de sol sont séchés dans une salle chauffée à 35°C puis tamisés à 2 mm et stockés dans des flacons en verre. Les végétaux sont lavés sous l'eau du robinet de manière à éliminer toutes traces de particules étrangères au végétal. L'échantillon est découpé en dès grossiers et déposé sur des clayettes en métal adaptable dans un lyophilisateur. Le végétal est ainsi séché par lyophilisation en 48 ou 72 heures. Le végétal à l'état sec est alors broyé à l'aide de broyeurs à couteaux.

#### **TEXTES DE REFERENCE**

- Méthode EPA 8290A "PCDD and PCDF by HRGC/HRMS",
- Méthode québécoise 400 " détermination des PCDD et PCDF; dosage par GC/MS"
- Projet horizontal Européen "Soils, sludge and treated bio-waste organic constituents PCDD/F and PCB-DL (dioxin-like)"

#### PRINCIPE

Dans des conditions déterminées :

- 1. Désorption des « dioxines » fixées dans les échantillons
- 2. Concentration et purification des extraits

3. Séparation chromatographique des congénères et dosage par spectrométrie de masse haute résolution (GC/HRMS) :

- scrutation des 2 ions moléculaires les plus abondants
- quantification sur les deux ions par dilution isotopique
- analyse réalisée à une résolution proche de 10000.

### MATERIELS

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

- Balance de portée et de précision de pesée adaptée aux prises d'essai
- Système d'extraction accélérée par solvant (Büchi Speedextractor)
- Evaporateur rotatif (BUCHI R-134)
- Evaporateur à flux d'azote (CALIPER Zymark TurboVap II 200 ml)
- Vials d'injections ambrés avec bouchon-septum à vis munis de réducteurs de 200 μL
- Chromatographe en phase gazeuse (AGILENT 6890N)
- Spectromètre de masse haute résolution (WATERS Autospec Ultima)

#### ETALONS

Les étalons servant à l'étalonnage (HRCC 0,25 à 5) sont stockés au réfrigérateur à environ 4°C directement dans les vials d'injection ambrés munis d'un réducteur de 200 µL.

La solution de fortification (SFS) est stockée au réfrigérateur à environ 4°C dans un vial ambré de 2 mL. Cette solution est ajoutée avant l'extraction, elle contient les étalons internes marqués. Elle sert à quantifier les dioxines.

La solution de recouvrement (RSS) est diluée au 1/10 dans le nonane puis stockée au réfrigérateur à environ 4°C dans des vials ambrés de 2 mL. Cette solution est ajoutée après les étapes de purification (juste avant de mettre en vial), elle contient des étalons marqués. Elle sert à vérifier le taux de récupération obtenu lors des différentes étapes.

### MODE OPERATOIRE

#### Organisation

On préparera par séquence au moins :

- 1 essai sur échantillon de référence
- 1 « double »
- 1 blanc d'extraction

#### Prise d'essai

Pour chaque échantillon :

- peser exactement 5 g  $\pm$  0,01 g d'échantillon de sol ou 2 g  $\pm$  0,01 g d'échantillon de végétal

- ajouter de la célite et homogénéiser le mélange (dans le mortier)
- transférer quantitativement la prise d'essai dans une cellule métallique de l'extracteur ASE
  - ajouter 20 µL de solution commerciale SFS

#### Extraction

Sur chaque prise d'essai (conditionnée en cellule), on réalise une extraction au moyen de l'ASE en utilisant du toluène pur comme solvant d'extraction, par chauffage des cellules et sous haute pression.

#### Concentration

Verser l'extrait dans un tube zymark de 200 mL. Concentrer l'extrait, à l'aide de l'évaporateur Zymark, jusqu'à environ 5 mL sous flux d'azote et avec le bain marie réglé à 40°C. Le débit d'azote est réglé à environ 0,8 bar.

#### Etape de purification

Des colonnes contenant de la silice acide et basique etde charbon actif sont utilisées pour purifier les extraits.

#### **Evaporation et reprise**

Evaporer à sec l'échantillon sous flux d'azote à l'aide de l'évaporateur Zymark. Reprise du résidu par du nonane et les étalons de recouvrement RSS diluée 1/10.

#### Dosages

#### - paramètres de masse

L'analyse des dioxines se fait en mode SIR (Single Ion Recording). Les fonctions sont déterminées pour chaque taux de substitution. Ces fonctions précisent la fenetre de temps, les masses des dioxines et la lock mass. L'ionisation s'effectue en impact électronique en mode positif. La résolution est fixée à 10000 avec le pfk (perfluorokérosène) à la masse 218,98.

#### - paramètres de la GC

Utilisation d'une colonne DB5-MS ((5% phényl) méthypolysiloxane) de longueur 60 m, diamètre interne 250 µm et d'épaisseur de phase active 0,25 µm. Le volume d'injection est fixé à 10 % du volume de la seringue de 10 µL (soit 1 µL). L'injection fonctionne en mode splitless (la totalité du volume injecté est envoyé dans la colonne). Les composés en mélange sont injectés dans la colonne chromatographie est séparés à l'aide d'un gradient de températures.

#### - Séquence d'analyse

- 1 blanc « chromato » (toluène)
- gamme d'étalonnage (HRCC 1 à 5)
- HRCC 3 (utilisé comme contrôle qualité)

- 1 blanc d'extraction

- 1 matrice chargée en dioxines

### **GESTION DES RESULTATS**

#### Calculs

Les résultats calculés et transférés sont exprimés en pg/g (ng/kg). Ces résultats sont corrigés de l'humidité résiduelle à 105°C dans le LIMS et ainsi exprimés en ng/kg de poids secs sur le bulletin d'essai.

### Les limites de quantification de l'appareil sont les suivantes :

<ul> <li>les tétras</li> </ul>	0,10 pg/μL,
- les pentas	0,15 pg/μL,
- les hexas	0,20 pg/μL,
- les heptas	0,30 pg/μL,
- les octas	1,00 pg/μL.

### Les limites de quantification dans les sols et les végétaux sont les suivantes :

<ul> <li>les tétras</li> </ul>	1,0 ng/kg,
- les pentas	1,5 ng/kg,
- les hexas	2,0 ng/kg
- les heptas	3,0 ng/kg
- les octas	10,0 ng/kg.

### Annexe 3 : Curriculum vitae

#### Isabelle Delsarte

14 Ilôt bagatelle villa Orion 59240 Dunkerque Email: isabelle.delsarte@univ-littoral.fr Tel. : 07.50.99.71.64 26 ans, **P**ermis : B

### Expériences professionnelles

2016-2017	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (sections CNU 32-64) ULCO – CGU Calais
2013-2016	Doctorante : Dégradation des dioxines ou du benzo[a]pyrène par une approche tripartite : oxydation chimique / oxydation biologique par des champignons telluriques saprotrophes / amidon difonctionnalisé aux propriétés surfactantes. Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) EA 4492, Dunkerque
	<b>Directrice de thèse :</b> Dr Catherine Rafin ; <b>Co-responsable :</b> Dr Etienne Veignie
	<b>Collaborations :</b> Association Halluin 3R, INRA d'Arras : Laboratoire d'Analyses des Sols, INRA d'Orléans : Unité Infosol, ULCO : équipe IPCR, UCEIV, Calais, Association Coin de Terre Halluinois
	Financements : Région Nord-Pas-de-Calais / SMCO (50/50) ; FEDER
	<b>Ecole doctorale :</b> SMRE (Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement, ED SMRE 104), Filière Ingénierie des Fonctions Biologiques (IFB), Université Lille Nord de France.
Février/Juillet 2012	Stagiaire Master 2 Chimie Energie Environnement (6 mois) : Techniques innovantes de dépollution - Synthèse et étude d'amidons modifiés pour la solubilisation des polluants organiques persistants - Responsables : Dr Catherine Rafin et Dr Etienne Veignie - ULCO, UCEIV EA 4492, Dunkerque
	<i>Financements :</i> Région Nord-Pas-de-Calais (Programme Chercheurs Citoyens), ADEME, Lille Métropole Communauté Urbaine.
Mai/Juillet 2011	Stagiaire Master 1 Chimie (3 mois) : Elaboration d'une nouvelle méthode d'analyse (calorimétrie de titration isotherme) - Responsable : Pr David Landy - ULCO, UCEIV EA 4492, Dunkerque
Avril/Juillet 2009	<b>Technicienne en R&amp;D,</b> (Stagiaire : 3 mois ; C.D.D : 1 mois) : <b>Mise en place d'une méthode analytique</b> (dosage du formaldéhyde - spectrométrie UV-Visible) / Analyses des eaux (paramètres physico- chimiques de base) - Laboratoire Flandres-Analyses, Dunkerque
	Formation
En cours	Doctorat – ULCO, UCEIV EA 4492, Dunkerque
2010/ 2012	Master Chimie Energie Environnement - Mention bien - Université des Sciences et Technologies de Lille
2009/ 2010	Licence Chimie - Mention assez bien - Université des Sciences et Technologies de Lille
2007/ 2009	DUT Chimie - Institut Universitaire de Technologie A de Lille
	Compétences
Informatique :	Maîtrise du Pack Office ; Logiciel : ChemDraw ; MestReNova
Langues :	Anglais : Niveau B1 ; Allemand - Italien : Niveau scolaire

#### Article dans des journaux internationaux à comité de lecture :

Delsarte, I., Danjou, P.-E., Veignie, E., & Rafin, C. (2016). Synthesis of modified potato starches for aqueous solubilization of benzo[a]pyrene. *Carbohydrate Polymers*, *144*, 83–88.

#### Communications orales (Nombre : 4) :

<u>Delsarte I.</u>, Delattre F., Danjou P-E, Veignie E., Rafin C. Synthesis of modified potato starches as supramolecular device for aqueous solubilization of benzo[a]pyrene. 2nd EPNOE Junior Scientists Meeting. 13-14 octobre 2016. Sophia Antipolis. France.

<u>Delsarte I.</u>, Mrad F., Veignie E., Rafin C. Relation entre le métabolisme lipidique du *Fusarium solani* et la dégradation du benzo[a]pyrène. 3èmes Journées d'Écotoxicologie Microbienne. 16-18 mars 2016. Valence, France.

<u>Rafin C.,</u> Fayeulle A., Delsarte I., Rosu A-M., Veignie Etienne. Exploration de la biodiversité de champignons telluriques saprotrophes pour la remédiation des sols pollués par des polluants organiques persistants (POP). Journées d'Ecotoxicologie microbienne. 5èmes journées thématiques de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM). 21-23 mai 2014. Banyuls sur Mer, France.

Carlier A., Lounes Hadj-Sahraoui A., <u>Fontaine J.</u>, Yu Q., <u>Rafin C.</u>, Veignie E., Delsarte I, Richard A., Caria G., Saby N. Biodégradation des dioxines par des champignons telluriques. Projet « Dioxines : contamination et biodégradation ». INTERSOL 2013. Session 4 : Techniques innovantes de dépollution. 26-28 mars 2013. Lyon, France.

#### Communications affichées (Nombre : 7) :

#### Internationales :

Delsarte I., Mrad F., Veignie E., Rafin C. Preliminary evidence of relationship between fungal lipids metabolism and benzo[a]pyrene degradation. ISPAC 2015. 13-17 septembre 2015. Bordeaux, France.

Delsarte I., Danjou P-E., Veignie E., Rafin C. Synthesis of modified starches and their evaluation for benzo[a]pyrene aqueous solubilization, a persistent organic pollutant in soils. ISGC 2015. 3-7 mai 2015. La Rochelle, France.

#### Nationales :

Delsarte I., Danjou P-E., Veignie E., Rafin C. Synthesis of modified starches and their evaluation for benzo[a]pyrene aqueous solubilization, a persistent organic pollutant in soils. SFR Condorcet. 5-6 juillet 2016. Gembloux, Belgique.

Delsarte I., Danjou P-E., Veignie E., Rafin C. Synthesis of modified starches and their evaluation for benzo[a]pyrene aqueous solubilization, a persistent organic pollutant in soils. Troisième journée des jeunes polyméristes du Nord. 4 juin 2015. Villeneuve d'Ascq, France.

Delsarte I., Danjou P-E., Veignie E., Rafin C. Synthèse et étude d'amidons modifiés pour la solubilisation aqueuse du benzo[a]pyrène (BaP), un modèle de polluant organique persistant dans les sols. Journée IRENI. 3 octobre 2014. Dunkerque, France.

Delsarte I., Danjou P-E., Veignie E., Rafin C. Synthèse et étude d'amidons modifiés pour la solubilisation aqueuse du benzo[a]pyrène (BaP), un modèle de polluant organique persistant dans les sols. Séminaire Sites et Sols Pollués Nord Pas de Calais. 25-26 septembre 2014. Villeneuve d'Ascq, France.

Delsarte I., Veignie E., Rafin R. Synthèse et étude d'amidons modifiés pour la solubilisation aqueuse du benzo[a]pyrène, un modèle de polluant organique persistant. Congrès GFP – BPG 2013. 18-21 novembre 2013. Roubaix, France.

#### Communications Grand Public :

Delsarte I. Le monde mystérieux des champignons. 4 janvier 2016. Des savoirs à Dunkerque. Dunkerque, France

Participation à la Fête de la Science, au stand ULCO coordonné par Eric Fertein et composé de plusieurs ateliers. PLUS, Palais de l'Univers et des Sciences, Cappelle-la-Grande

2015 : Stand «Climats». Réalisation et présentation d'un atelier intitulé « Les sols : un atout contre le réchauffement climatique ».

2014 : Stand intitulé « Histoire des particules fines : de l'atmosphère à nos poumons ». Réalisation et présentation d'un atelier sur la bioremédiation fongique.

Participation à La nuit des Chercheurs. Organisé par Communauté d'Universités et d'établissements Lille Nord de France et en partenariat avec l'ULCO. 25 septembre 2015. Dunkerque

Participation aux actions de sensibilisation auprès des collèges et lycées du Dunkerquois via des visites du laboratoire à la MREI1, à Dunkerque : « Découverte du monde fascinant des champignons »

#### Enseignements : Cours, TD et TP

#### 2016/2017

Mission d'enseignement à l'ULCO (Centre de Gestion Universitaire, Calais, France) ATER : en Licence Sciences de la Vie (SV ; Département de Sciences de la Vie et de la Nature), en DEUST Technicien en Milieu Littoral, en Licence Physique - Chimie et en école d'Ingénieurs du Littoral-Côte-d'Opale (EILCO) :

Discipline	Niveau	Volume horaire (h éq. TD)			
		TD	ТР	СМ	
Chimie générale	L1 SV	15,5	30	23,3	
Diachimia	L2 SV		13,33		
Biochimie	DEUST		10,67		
Chimia in arganique	L1 Physique - Chimie		10		
Chimie morganique	L3 Chimie		16		
Chimie organique	EILCO		16		

#### 2015/2016

Mission d'enseignement à l'ULCO (Centre de Gestion Universitaire, Calais, France) MIES: en Licence Sciences de la Vie (Département de Sciences de la Vie et de la Nature) et en DEUST Technicien en Milieu Littoral:

Discipline	Niveau	Volume horaire (h éq. TD)			
		TD	TP	CM	
Chimie générale	L1	7,75	11,62	11,65	
Diachimia	L2		13,33		
Biochimie	DEUST		10,67		

Encadrement d'une stagiaire Sekela Mulaji Jennifer - Stage découverte en L1 SV ULCO (du 03/06/2015 au 16/06/2015). Sujet : Stage de découverte des cultures cellulaires fongiques. (Temps d'encadrement : 100%)

#### **Formations**

Formations suivis au cours de la thèse (ED SMRE) :

Formations	Intitulé	Crédits
Drefessionnalisante	«Connaissance des entreprises et des organisations»	
Professionnalisante	« Définir et formuler son projet professionnel »	
Internationale	«Module 1 d'anglais de la communication professionnelle»	15
	UCIE : d'échanges francophones sur l'assainissement des sites et sols pollués	5
Disciplinaire	Cours de l'UE "Gestion des sols et sédiments" dispensés dans le master suivant : « Sciences, Technologies, Santé » Mention : « Risques et Environnement » Parcours : « Expertise et Traitement en Environnement ». ULCO	5
## Tables

# Table des figures

Figure i 1. Gestion (nationale ou régionale) des inventaires de sites contaminés en Europe (European Environment Agency, 2016)
Figure i 2. Sites et sols pollués recensés en France début 2012 (Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, 2016)
Figure i 3. Formules semi-développées de la dibenzodioxine et du dibenzofurane
Figure i 4. Classement 2012 des filières et techniques principales de traitement des sols pollués par tonnage décroissants (HS : hors site) (ADEME, 2014)
Figure i 5. Voies métaboliques de biodégradation des HAP (Cerniglia, 1992; Veignie et al., 2004)
Figure i 6. Schéma récapitulatif des notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité (Semple et al., 2004, 2007)
Figure i 7. Etapes clés du processus de bioremédiation fongique des POP en sol : exemple du benzo[a]pyrène (BaP), un HAP de haute masse molaire
Figure i 8. Etapes clés du processus de l'oxydation chimique des POP en sol : exemple du réactif de Fenton utilisé comme oxydant chimique et du benzo[a]pyrène, HAP de haute masse molaire
Figure i 9. Structure moléculaire et forme géométrique de l'α-cyclodextrine
Figure i 10. Représentation schématique du transfert des POP en phase aqueuse par l'amidon modifié
Figure i 11. Représentation schématique du plan de thèse 25
Figure I 1. Schéma de la structure d'un granule d'amidon, de l'amylose et de l'amylopectine (adapté de Sweedman et al., 2013)
Figure I 2. Mécanisme de substitution nucléophile de l'amidon par la BS
Figure I 3. Mécanisme de substitution nucléophile de l'amidon sulfobutylé par l'OSA
Figure I 4. Illustration hypothétique du phénomène de gélatinisation et de formation de résidus fantômes (Debet and Gidley, 2007; Ratnayake and Jackson, 2007; Miao et al., 2010)
Figure I 5. Illustration de la gélatinisation du grain d'amidon en présence de DMSO et d'un mélange DMSO/eau (Shon et al., 2005)
Figure I 6. Images en microscopie photonique des grains d'amidon natif de pomme de terre ( <b>P0</b> ) obtenus au bout de 24 h selon deux prétraitements (X 160). Prétraitement A : Eau, NaOH et DMSO avec des quantités variables en NaOH : <b>A1</b> : 1,25 mmoles de NaOH, <b>A2</b> : 2,50 mmoles NaOH, <b>A3</b> : 5,00 mmoles NaOH. Prétraitement B : DMSO, eau et NaOH avec des quantités variables de NaOH : <b>B1</b> : 2,50 mmoles NaOH, <b>B2</b> : 5,00 mmoles NaOH

Figure I 7. Images d'amidons en microscopie photonique (x160). A : grains d'amidon natif de pomme de terre, B : grains d'amidon natif de maïs cireux, C : amidons de maïs cireux difonctionnalisés
Figure I 8. Représentation schématique des différents niveaux de structure du granule d'amidon (Buléon et al., 1998)
Figure I 9.A. Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, 25°C) 400 MHz de l'amidon natif de pomme de terre ( <b>P0</b> ) dans le DMSO-d6. B. Spectre RMN <sup>1</sup> H de l'amidon natif de pomme de terre dispersé ( <b>P0</b> *) dans le D <sub>2</sub> O
Figure I 10. Spectre RMN $^{1}$ H (400 MHz, D <sub>2</sub> O, 25°C) de l'amidon sulfobutylé
Figure I 11. Spectre RMN $^{1}$ H (400 MHz, D <sub>2</sub> O, 25°C) de l'amidon difonctionnalisé <b>P1*</b>
Figure I 12. Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz ,60°C) de l'amidon difonctionnalisé <b>P1*</b> réalisé dans le D <sub>2</sub> O. B. Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz ,60°C) de <b>P1*</b> dans le DMSO-d6
Figure I 13. Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, D <sub>2</sub> O, 25°C) des amidons monofonctionnalisés A : <b>P4</b> ; B : <b>P3</b> et C : <b>P5</b>
Figure I 14. Relation entre la solubilité aqueuse apparente (g.L <sup>-1</sup> ) et la solubilisation du BaP (μg.L <sup>-1</sup> ) pour les produits d'amidon synthétisés
Figure I 15. La solubilisation du BaP (µg.L <sup>-1</sup> ) versus R (IOS/IBS) de chaque produit d'amidon synthétisé
Figure I 16. Intensité de la fluorescence du NR en fonction du logarithme de la concentration de l'amidon modifié ( $\lambda$ ex=530 nm et $\lambda$ em=625 nm)
Figure I 17. Marquage fluorescent rouge entraîné par le NR au niveau des micelles formées par l'amidon modifié observé en microscopie confocale
Figure I 18. A. Image au MET des nanoparticules d'amidon. B. agrandissement d'une grande micelle
Figure I 19. Intensité de la fluorescence d'émission du BaP en fonction du logarithme de la concentration de l'amidon modifié
Figure I 20. Relation entre l'intensité de la fluorescence d'émission du BaP et la concentration de <b>P9*</b>
Figure I 21. Représentation schématique de l'auto-assemblage de l'amidon modifié en présence d'une molécule invité
Figure II 1. Schéma récapitulatif des expérimentations menées dans le chapitre 2 80
Figure II 2. Schéma du déroulement des tests de toxicité du permanganate de potassium (A) et du réactif de Fenton (B) sur les souches fongiques
Figure II 3. Schéma du déroulement des tests de dégradation du BaP dans les traitements combinés oxydation chimique/biologique (A : avec le permanganate de potassium (B+K) ; B : avec le réactif de Fenton (B+F)). Pour le traitement oxydation biologique (B), seul l'ensemencement des spores est réalisé, pour le traitement oxydation chimique (F et K), seul l'ajout d'oxydant est réalisé
Figure II 4. Schéma du déroulement des tests de dégradation du BaP en présence d'amidon dans les traitements combinés oxydation chimique/biologique ((B+F)a). Pour le traitement oxydation biologique (Ba), seul l'ensemencement des spores est réalisé, pour le traitement oxydation

Figure II 10. Schéma récapitulatif de l'hypothèse résultant de l'étude du mode d'incorporation des HAP chez le champignon filamenteux *Fusarium solani* en MM1 (Fayeulle et al., 2013). ..... 100

Figure II 13. Schéma récapitulatif des taux de dégradation du BaP obtenus lors des deux traitements combinés de dégradation (B+F) en fonction de la souche testée (D19 ou S19) ..... 103

Figure III 1. Schéma récapitulatif des étapes expérimentales menées dans ce chapitre ...... 117

Figure III 3. Récapitulatif des différentes étapes pour le prélèvement des échantillons de sol.. 120

Figure III 9. Récapitulatif de la démarche expérimentale pour sélectionner des souches efficaces pour la dégradation des dioxines présentes dans le sol historiquement contaminé d'Halluin... 139

### Table des tableaux

Tableau i 1 Propriétés physico-chimiques des 16 HAP de la liste US EPA (ATDR, 1995)8
Tableau i 2. Propriétés physico-chimiques des 17 congénères de PCDD/F considérés commetoxiques (Haglund, 2007)10
Tableau i 3. Potentiel redox et persistance des oxydants utilisés (Sutton et al., 2011) 19
Tableau I 1. Paramètres des synthèses des amidons difonctionnalisés (rapport OSA/AGU = 1/2)41
Tableau I 2. Caractéristiques des différentes méthodes de dispersion des amidons natifs et lepourcentage d'amidon soluble dans l'eau52
Tableau I 3. Caractéristiques des amidons difonctionnalisés de pomme de terre
Tableau I 4. Valeurs théoriques des capacités maximales des amidons à solubiliser le BaP 64
Tableau I 5. Caractéristique du produit avant et après le post traitement   65
Tableau II 1. Souches fongiques utilisées dans le cadre de cette étude 82
Tableau II 2. Gamme de concentrations étudiées pour chaque oxydant 83
Tableau II 3. Résumé des différents traitements réalisés pour une souche dans le cadre de l'étude de la dégradation du BaP par l'oxydation biologique et/ou chimique
Tableau II 4. Description des différents traitements menés lors de l'étude évaluant la capacité del'amidon P9* à solubiliser le BaP en MM1
Tableau II 5. Résumé des différents traitements réalisés dans l'étude de la dégradation du BaP par l'oxydation biologique et/ou chimique par le réactif de Fenton pour <i>Fusarium solani</i> (S19) en présence d'amidon modifié
Tableau II 6. Concentrations Efficaces (CE <sub>50-48h</sub> ) des deux oxydants déterminées pour chaque
500010
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel
Tableau II 7. Quantité de BaP désorbée en fonction de la nature du milieu réactionnel

Tableau III 9. Paramètres physico-chimiques des 2 lots de sol du site atelier de la ferme du Noir
Pot. Les grandeurs sont exprimées par rapport au sol séché à 105 °C, sauf pour le pH et les différentes classes granulométriques exprimées en g.kg <sup>-1</sup> de fraction minérale
Tableau III 10. Facteurs d'équivalence toxique (TEF) des 17 congénères de PCDD/F de l'OMS   (2005) 136
Tableau III 11. Concentration en PCDD/F des deux lots de sol 137
Tableau III 12. Récapitulatif des souches isolées (en vert : souches sélectionnées) 141
Tableau III 13. Identification génétique et classification phylogénique des souches fongiques   retenues 144
Tableau III 14. Synthèse des résultats bibliographiques sur l'étude de la dégradation des dioxines et des PCB par les champignons telluriques saprotrophes
Tableau III 15. Classification phylogénique des souches fongiques présentes dans la mycothèquede l'UCEIV (ULCO, Dunkerque) (Mycobank, 2016)148
Tableau III 16. Récapitulatif des traitements réalisés dans le cadre de l'étude de la dégradationdes dioxines sur des échantillons de sol historiquement contaminé155
Tableau III 17. Représentation des congénères qui sont dégradés significativement dans les différents traitements par rapport aux congénères présents dans le témoin
Tableau III 18. Propriétés physico-chimiques de quatre congénères étudiés (Haglund, 2007) 158
Tableau III 19. Teneurs de certain PCDD/F dans les trois traitements 7, exprimées en ng.kg <sup>-1</sup> de matière sèche de sol

### Résumé

Ce travail de thèse est axé sur l'élaboration de techniques de bioremédiation des sols contaminés par les Polluants Organiques Persistants (POP) en particulier sur deux familles de polluants : les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et les dioxines (PCDD/F). La dégradation des POP présente deux obstacles majeurs à l'efficacité des traitements biologiques par voie fongique : la faible biodisponibilité des POP et la difficulté d'amorcer l'oxydation de molécules aussi stables chimiquement. Afin de lever ces verrous technologiques, nous proposons de coupler une oxydation chimique douce à l'oxydation biologique par les champignons telluriques saprotrophes et d'utiliser l'amidon pour améliorer la proximité spatiale entre le polluant et les réactifs d'oxydation.

La première partie de ce travail de thèse consiste à fonctionnaliser de l'amidon de pomme de terre par la 1,4-butane sultone et l'anhydride 2-octén-1-ylsuccinique selon différentes conditions de synthèses. En comparaison avec l'amidon natif, un des produits obtenus, **P9\***, possède des propriétés surfactantes très intéressantes pour notre étude. En effet, **P9\*** augmente la solubilité aqueuse de l'amidon par un facteur de 65 (22,60 g.L<sup>-1</sup>) et stimulent 33 fois la solubilisation aqueuse du benzo[a]pyrène (BaP).

Pour la seconde partie, l'utilisation d'un système d'étude simplifié où le champignon est cultivé en milieu minéral en conditions axéniques nous a permis de déterminer les paramètres (souche fongique, type et dose d'oxydant chimique) optimaux pour l'élaboration d'une méthode de dégradation des POP au laboratoire. Des études comparatives de dégradation du BaP sont donc réalisées *in vitro* par différents processus d'oxydation chimique (réaction de Fenton) et/ou biologique. Le couplage des deux procédés conduit à une dégradation du BaP de 40,0 %. De plus, l'encapsulation du BaP par les nanosphères d'amidon **P9\*** permet une dégradation du polluant de 94,6 % par le réactif de Fenton.

Deux souches fongiques (*Penicillium brasilianum* et *Fusarium solani*) sont ensuite utilisées pour des essais de dégradation conduits au laboratoire en microcosmes de sols historiquement contaminés par les PCDD/F. L'inoculation de la souche endogène *P. brasilianum* en présence de copeaux de carton comme agent structurant a conduit à une diminution de la toxicité des PCDD/F de 40,5 % après seulement 2 mois d'incubation par rapport au sol témoin.

Ce travail de thèse ouvre ainsi de nouvelles perspectives de techniques de remédiation des sols pollués par les POP à faible coût économique et respectueuses de l'environnement.

**Mots clés :** Bioremédiation, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, Dioxines, amidons fonctionnalisés, réactif de Fenton, champignons telluriques saprotrophes, sol

### Abstract

This thesis work deals with the development of bioremediation techniques for contaminated soils by Persistent Organic Pollutants (POPs) such as: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and dioxins (PCDD/F). The degradation of POPs has two main obstacles to efficient biological treatments by fungi: the low bioavailability of POPs and the difficulty of initiating the oxidation of molecules as stable as others. To overcome these technological barriers, we propose to couple a mild chemical oxidation to biological oxidation by saprotrophic telluric fungi and to use starch to improve the spatial proximity between the pollutant and oxidizing reagents.

The first part of this study is to functionalize native potato starch by 1,4-butane sultone and 2-octenyl-1-succinic anhydride according to different synthesis conditions. In comparison with native starch, one of the processed products, **P9\***, has very interesting surfactant properties for our study. Indeed, **P9\*** increases starch apparent aqueous solubility by a factor of 65 (22.60 g.L<sup>-1</sup>) and stimulates 33-fold benzo[a]pyrene (BaP) aqueous solubilization.

For the second part, the use of a simplified study system where the fungus is cultivated in mineral medium under axenic conditions allowed us to determine the best parameters (fungal strains, type and dose of chemical oxydant) for the development of a POPs degradation method in the laboratory. Comparative studies of BaP degradation are therefore carried out *in vitro* by different processes of chemical (Fenton's reagent) and/or biological oxidation. The coupling of the two processes leads to a BaP degradation of 40.0 %. Moroever, the BaP encapsultation by starch nanospheres **P9\*** allows a pollutant degradation of 94.6 % by the Fenton reagent.

Two fungal strains (*Penicillium brasilianum* and *Fusarium solani*) are then used for the degradation lab experiment in historically PCDD/F contaminated soil microcosms. The inoculation of the endogene strain *P. brasilianum* in presence of cardboard chips as a bulking agent led to a decrease in PCDD/F toxicity of 40.5 % after only two months of incubation compared to the control soil.

This PhD work draws new perpectives for remediation techniques of contaminated soils by POPs that are cost-effective and environmentally friendly.

**Keywords:** Bioremediation, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Dioxins, functionalized starches, Fenton's reagent, saprotrophic telluric fungi, soil