



HAL
open science

Développement de supports d'immobilisation biosourcés pour la dégradation enzymatique de micropolluants dans un réacteur à lit fluidisé

Marine Harguindeguy

► **To cite this version:**

Marine Harguindeguy. Développement de supports d'immobilisation biosourcés pour la dégradation enzymatique de micropolluants dans un réacteur à lit fluidisé. Génie des procédés. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTG023 . tel-03414563

HAL Id: tel-03414563

<https://theses.hal.science/tel-03414563>

Submitted on 4 Nov 2021

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Génie des Procédés

École doctorale GAIA

Unité de recherche : Institut Européen des Membranes (UMR 5635)

Développement de supports d'immobilisation bio-sourcés pour la dégradation enzymatique de micropolluants dans un réacteur à lit fluidisé

Présentée par Marine HARGUINDEGUY

Le 3 novembre 2020

Sous la direction de Marie-Pierre BELLEVILLE
et Céline POCHAT-BOHATIER

Devant le jury composé de

M. Loic BLUM, Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mme. Maria Inês RE, Directrice de recherche IMT Laboratoire Rapsodee UMR CNRS 5302	Rapporteur
M. Stephan BROSILLON, Professeur, Institut Européen des Membranes	Président du jury
Mme Marie-Pierre BELLEVILLE, Maître de conférences, Institut Européen des Membranes	Directrice de thèse
Mme Céline POCHAT-BOHATIER, Maître de conférences, Institut Européen des Membranes	Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier l'ensemble du jury : Pr. Loic Blum, Dr. Maria Re et Pr. Stephan Brosillon pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Un grand merci à mes deux directrices de thèse : Marie-Pierre Belleville et Céline Pochat-Bohatier, pour m'avoir guidé durant ces trois ans avec bienveillance, et de m'avoir consacré beaucoup de temps, de conseils, et d'encouragements.

J'adresse aussi mes remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont aidé par leurs conseils et guidance scientifique : Eddy Petit, Nathalie Masquelez, et les membres permanents de l'équipe GPM : José Sanchez-Marcano, Geoffroy Lesage, François Zaviska, Jean-Pierre Mericq, Laurence Soussan, Denis Boyer, Stephanie Bocquet.

J'en profite pour remercier l'intégralité des non permanents de l'équipe GPM, (au bâtiment 40 et au bâtiment 15), pour toutes nos discussions qui ont rendu la vie au laboratoire plus chaleureuse : Aracelys, King-wo, Azariel, Louis, Ana-Luisa, Gauthier, Lucie, Estelle, Qasi, Wassim, Amine, Ahmad, Zineb, et tant d'autres que j'oublie sûrement.

Un merci tout particulier à mes stagiaires Marcos et Kyllian, pour avoir travaillé sérieusement tout en conservant votre bonne humeur (malgré les aléas de la recherche scientifique) et maintenant ainsi une excellente ambiance dans l'équipe.

J'ai eu de la chance d'avoir rencontré dès le début des personnes accueillantes et d'avoir partagé avec eux beaucoup de bons moments aussi bien à l'IEM qu'en dehors. Merci à Thomas, Mathieu, Lucie, Clément, Dana, Quike, Octavio, Carlos, Hana, Syreina, Marlene, Fanny, Raphael, Quentin, pour les pauses repas, les jeux, les soirées et autres bons souvenirs partagés. Merci à Carole la plus latina des ardéchoises ; Habib pour avoir rendu ma deuxième année plus agréable avec les soirées pâtes au pesto / netflix à la coloc ; Alice pour avoir satisfait mon amour du fromage en organisant des soirées fondues/mont d'or. Désolée Julien de ne pas avoir succombé à l'escalade, mais merci d'avoir enflammé tant de soirées sur du Shakira et du Beyonce. Je suis chanceuse d'avoir commencé le même jour que toi Marianne, on a pu se soutenir durant tous les bons et mauvais côtés de la thèse pendant ces trois ans. Merci Cyril pour toujours me faire rire

même après les longues journées, et pour être toujours partant pour boire un coup et faire des paquitos.

Merci à mon compagnon de bureau Sher, thank you for being such a good colleague, for sharing with me pictures of your lovely daughter, and for all our discussions that made me learn a bit more about your beautiful country.

Gabi, je n'ai partagé mon bureau qu'une année et demi avec toi, mais tu es très vite devenue une amie fidèle. Merci à la plus européenne des brésiliennes pour tes conseils (scientifiques ou humains), pour nos soirées crêpes, sushis, pour m'avoir nourri à coup de chocolats, gâteaux et cafés, et pour être constamment là pour moi, même depuis un autre continent. Un virus a retardé nos retrouvailles, mais elles n'en seront que plus « fantastiques » j'en suis sûre.

Ces trois années auraient été bien plus triste sans vous tous : merci aux copains de Toulouse, merci à mes bichettes adorées pour tous ces weekends de retrouvailles qui m'ont permis de déconnecter, et merci aux bayonnaises d'être toujours là, depuis toutes ces années.

Je remercie évidemment ma famille, mes parents et mes deux grandes sœurs qui m'ont toujours soutenue. Un merci particulier à Steph pour avoir agrandi la famille et pour m'avoir envoyé pleins de photos de mon adorable nièce sur lesquelles m'extasier durant ces trois ans.

Enfin, un immense merci à Maxime, pour avoir supporté mes sautes d'humeurs pendant trois ans, illuminé mes weekends, et avoir toujours cru en moi.

Remerciements.....	3
Liste des figures	10
Liste des tableaux.....	16
Introduction générale.....	19
Chapitre 1 – Etat de l’art.....	24
I) Présence de micropolluants émergents dans l’eau	24
1. Origines et régulations	24
2. Produits pharmaceutiques	27
3. Pesticides	30
II) Procédés existants pour traiter ces micropolluants.....	33
1. Techniques classiques utilisées dans les stations d’épurations.....	33
a) Coagulation – Flocculation.....	34
b) Boues activées.....	34
c) Bioréacteurs à membranes.....	36
2. Traitements tertiaires innovants	37
a) Adsorption.....	38
b) Procédés membranaires	39
c) Procédés d’oxydation avancées.....	40
d) Oxydation enzymatique	42
III) Traitements enzymatiques.....	43
IV) Immobilisation des enzymes.....	51
1. Techniques d’immobilisation.....	52
2. Supports d’immobilisation	53
3. La gélatine comme support d’immobilisation d’enzymes.....	57
a) Présentation et formation des sphères.....	57
b) Réticulation de la gélatine : mécanisme et application éventuelle pour le greffage d’enzymes.....	59
4. Caractérisation de l’immobilisation d’enzymes sur un support.	64
V) Réacteurs enzymatiques.....	65
1. Réacteur agité	65
2. Réacteur enzymatique à membrane (REM)	66
3. Réacteur à lit fixe.....	69
4. Réacteurs à lit fluidisé.	71

a) Généralités sur la fluidisation.....	71
b) Réacteur enzymatique à lit fluidisé pour la dégradation de micropolluants ..	75
5. Conclusion	76
VI) Conclusion et objectifs de la thèse	78
Chapitre 2 – Matériel et méthodes.....	79
I) Matériel	79
1. Enzyme.....	79
2. Substrats et médiateurs	79
3. Réactifs chimiques utilisés pour l’élaboration des billes actives	80
4. Présentation du réacteur à lit fluidisé.....	80
II) Méthodes	81
1. Elaboration des billes actives.....	81
a) Formation des billes.....	81
b) Activation des billes.	82
c) Plan d’expérience et analyse statistique	83
d) Elaboration d’autres type de billes	85
2. Caractérisation des enzymes libres et greffées	86
a) Détermination de l’activité enzymatique.....	86
b) Détermination du rendement d’immobilisation et de l’activité exprimée	88
c) Détermination des constantes cinétiques	89
d) Profils d’activité en fonction du pH et de la température.....	90
e) Stabilité thermique et par rapport au pH	91
f) Conditions de stockage et stabilité	91
3. Dégradation enzymatique des micropolluants.....	92
a) Essais de dégradation des micropolluants en réacteur agité.....	92
b) Essais de dégradation des micropolluants en réacteur à lit fluidisé.	93
III) Analyses.....	94
1. Caractérisation du lit.....	94
a) Détermination de la masse volumique des billes	94
b) Détermination de la porosité du lit et surface spécifique de la couche	94
c) Etude de la stabilité mécanique du lit en fluidisation.....	95
2. Caractérisation des billes	95
a) Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (FTIR).....	95

b) Taux de réticulation.....	95
c) Taux de gonflement.....	97
d) Propriétés mécaniques.....	97
e) Propriétés thermiques.....	99
f) Rhéologie.....	100
g) Détermination du diamètre des billes.....	100
3. Analyses chimiques.....	101
a) Dérivatisation du glyphosate.....	101
b) Chromatographie LC-MS.....	102
4. Tests de toxicité.....	104
Chapitre 3 – Résultats et discussions.....	106
Partie I – Elaboration de supports d’immobilisation d’enzymes bio-sourcés.....	106
I) Formation des billes.....	106
1. Influence de différents paramètres sur la formation de billes.....	106
a) Influence de la formulation du bain.....	106
b) Influence de la concentration en PEG.....	108
c) Influence de la masse moléculaire du PEG.....	109
d) Influence de la concentration en gélatine.....	111
e) Influence de la température du bain de coagulation.....	112
2. Détermination du diamètre théorique des billes.....	112
3. Conclusion.....	116
II) Etude de la réticulation et son influence sur les propriétés des supports.....	116
1. Influence de la concentration en glutaraldéhyde sur le degré de réticulation.....	116
2. Influence du taux de réticulation sur le degré de gonflement.....	118
3. Influence du taux de réticulation sur les propriétés mécaniques des supports.....	120
4. Influence du taux de réticulation sur les propriétés thermiques des supports.....	124
5. Conclusion.....	126
III) Etude du greffage des enzymes sur les supports à base de gélatine.....	126
1. Elaboration des billes actives.....	126
a) Activité des enzymes greffées.....	126
b) Spectre FTIR des gels réticulés et greffées.....	127

2. Etude des paramètres du greffage : plan d'expérience 2 ⁴	129
3. Caractérisation des enzymes libres et immobilisées.....	135
a) Rendement d'immobilisation	135
b) Stabilité du greffage	137
c) Activité des enzymes en fonction du pH et de la température.....	138
d) Stabilité des enzymes vis-à-vis du pH et de la température.....	140
e) Stabilité des enzymes immobilisées au cours du stockage	143
f) Impact de l'immobilisation sur les constantes cinétiques.....	145
4. Essai d'extrapolation du greffage en fluidisation	147
5. Conclusion	149
Chapitre 3 – Résultats et discussions.....	150
Partie II – Réacteur enzymatique à lit fluidisé pour la dégradation de micropolluants	150
I) Conception et caractérisation du réacteur à lit fluidisé.....	150
1. Dimensionnement du réacteur.....	150
2. Caractérisation du lit.....	151
3. Détermination des conditions opératoires.....	154
a) Calcul de la vitesse minimale de fluidisation $U_{0,mf}$	154
b) Calcul de la vitesse limite de fluidisation $U_{0,t}$	156
c) Calcul de la perte de charge dans le domaine de la fluidisation	157
4. Impact de la fluidisation sur les supports d'immobilisation.....	158
5. Conclusion	159
II) Dégradation d'un polluant pharmaceutique : la tétracycline.....	160
1. Présentation du substrat.....	160
2. Essais de dégradation de la tétracycline en réacteur batch agité.....	161
a) Comparaison de la dégradation entre enzymes libres et immobilisées	161
b) Choix du solvant pour la dégradation	162
c) Influence de la concentration en substrat et détermination des constantes cinétiques	163
d) Tests de toxicité	165
3. Dégradation de la tétracycline dans le réacteur à lit fluidisé	169
a) Influence de la fluidisation sur la dégradation de la TC.....	168
b) Influence du débit de recirculation.....	170

c) Influence de l'ajout d'oxygène dans le système	173
d) Réutilisation des billes dans le réacteur à lit fluidisé.....	175
4. Conclusion	176
III) Dégradation d'un pesticide : le glyphosate.....	177
1. Essais préliminaires.....	177
a) Auto-dégradation du glyphosate et essai avec laccases libres	177
b) Screening de trois médiateurs différents pour la dégradation du glyphosate.....	178
c) Etude de l'apparition de l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) et de sa dégradation par les laccases.	181
2. Etude de différents systèmes laccases – ABTS	183
a) Formation et structure des billes contenant le médiateur et des billes avec co- immobilisation catalyseur-médiateur	183
b) Comparaison des différents systèmes ABTS – laccase pour la dégradation du glyphosate	185
c) Dégradation du glyphosate dans le réacteur à lit fluidisé et stabilité opératoire des billes avec co-immobilisation.....	188
3. Tests de toxicité	190
4. Conclusion	192
Conclusions et perspectives.....	193
Références bibliographiques	197
Liste des abréviations	223
Contributions scientifiques	229

Liste des figures

Figure 1-1 : Origine des micropolluants dans l'eau.....	25
Figure 1-2 : Principales étapes d'une station d'épuration classique	33
Figure 1-3 : Différentes techniques d'oxydation avancées. Adapté de E.M.N Chirwa and E.E Bamuza-Pemu, (2010).....	40
Figure 1-4 : Cycle catalytique de la laccase, adapté de Polak and Jarosz-Wilkolazka, (2012).....	45
Figure 1-5 : Structures de composés récalcitrants à la dégradation par la laccase : le diclofénac, la carbamazépine, l'atrazine, et le glyphosate.....	46
Figure 1-6 : Cycle catalytique d'un système laccase - médiateur	49
Figure 1-7 : Différents types d'immobilisation des enzymes. Adapté de Fernández-Fernández et al., (2013).....	52
Figure 1-8 : Formes possibles du GTA en solution aqueuse. Source : (Migneault et al., 2004).....	60
Figure 1-9 : Mécanisme de réticulation de la gélatine par le GTA en milieu basique. Source : Farris et al., (2010).....	61
Figure 1-10 : Mécanisme de réticulation de la gélatine par le GTA en milieu acide. Source : Farris et al., (2010).....	62
Figure 1-11 : Schéma des différentes interactions (covalentes ou ioniques) des laccases à la surface des billes de gélatine.....	64
Figure 1-12 : Réacteur enzymatique agité.	65
Figure 1-13 : Configurations possibles de réacteurs enzymatiques à membrane : (A) Un réacteur enzymatique agité couplé à une unité de filtration ; (B) Une seule unité de transformation et de séparation. Source : (Matthias de Cazes et al., 2014).	69
Figure 1-14 : Réacteur enzymatique à lit fixe, avec des enzymes greffées sur des particules sphériques.....	69
Figure 1-15 : Réacteur enzymatique à lit fluidisé, avec des enzymes greffées sur des particules sphériques.....	71
Figure 1-16 : Evolution de la perte de charge en fonction de la vitesse superficielle du fluide dans un réacteur à lit fluidisé.....	73
Figure 2-1 : Structures chimiques respectives de la tétracycline, du glyphosate et de l'AMPA.	79

Figure 2-2 : Structures chimiques de l'ABTS, du syringaldehyde et de l'acide p-coumarique utilisés comme médiateurs redox.	80
Figure 2-3 : Présentation schématique du réacteur à lit fluidisé	81
Figure 2-4 : Etapes d'élaboration des billes actives : Dissolution de la solution de gélatine (a); ajout goutte à goutte de la solution de gélatine dans la solution de PEG (b), gélification complète des billes (c)	82
Figure 2-5 : Récapitulatif des étapes d'élaboration des billes actives (Billes _{activées TvL})..	83
Figure 2-6 : Méthodes d'élaboration des deux autres types de billes : billes encapsulant un médiateur (Billes _{ATBS}) et billes avec co-immobilisation médiateur + catalyseur (billes _{activées TvL/ABTS}).....	86
Figure 2-7 : Méthodologie de vérification de la stabilité de la réactivité des billes actives vis-à-vis de l'ABTS.....	88
Figure 2-8 : Détermination de la masse volumique des billes	94
Figure 2-9 : Evolution de la couleur des solutions TNBS/gels en fonction du pourcentage de GTA utilisé lors de la réticulation (de gauche à droite : 0% ; 0,05% ; 0,1% ; 0,5% ; 1% GTA v/v ; témoin sans gélatine).....	96
Figure 2-10 : Courbe contrainte - déformation d'un gel de gélatine (22% p/p) non réticulé.....	98
Figure 2-11 : Test de compression en immersion	99
Figure 2-12 : Analyse ATG d'un échantillon de gélatine (22% (p/p) non réticulé.....	100
Figure 2-13 : Réaction de dérivatisation du glyphosate et de l'AMPA, source : Catrinck et al., 2014.....	102
Figure 2-14 : Courbe d'étalonnage de la tétracycline	103
Figure 2-15 : Courbe d'étalonnage du glyphosate	104
Figure 2-16 : Courbe d'étalonnage de l'AMPA.....	104
Figure 3-1 : Photographies des billes obtenues avec différents bain de coagulations ; (a) CaCl ₂ , (b) éthanol ; (c) Huile de tournesol ; (d) PEG ₁₀ . Certaines billes ont été colorées avec un colorant alimentaire rouge pour faciliter leur observation.	107
Figure 3-2 : Evolution de la couleur des gels en fonction du pourcentage de GTA utilisé lors de la réticulation (de gauche à droite : 0% à 5% GTA).....	117
Figure 3-3 : Evolution du degré de réticulation en fonction de la concentration en GTA utilisée (0 – 3% v/v) lors de l'étape de réticulation (1 heure à 25°C dans solution tampon citrate-phosphate (pH 7, 50 mmol.L ⁻¹)).....	118

Figure 3-4 : Evolution du taux de gonflement sur 35 heures des gels de gélatine réticulés à différentes concentrations de GTA (0 - 5% v/v).....	119
Figure 3-5 : Influence du degré de réticulation sur le taux de gonflement des gels de gélatine après 35 heures d'immersion dans de l'eau distillée à 25°C.....	120
Figure 3-6 : Courbes contraintes/déformations des gels réticulés à diverses concentrations de GTA (noir : 0% v/v ; bleu foncé : 0,5% v/v ; bleu clair : 1 % v/v ; vert : 2% v/v ; rouge : 3% v/v ; orange : 4% v/v ; rose : 5% v/v).....	121
Figure 3-7 : Influence du degré de réticulation sur les propriétés mécaniques (losanges noirs : module de compression et carrés rouges : contrainte à la rupture) des gels de gélatine.....	123
Figure 3-8 : Thermographes obtenus en DSC d'un échantillon non réticulé (courbe noire) et réticulé (courbe rouge) avec 1% GTA.....	125
Figure 3-9 : Evolution de l'absorbance d'une solution d'ABTS (1mmol.L ⁻¹ , pH 4) mise en contact avec des billes actives (carrés, courbe noire) et inactives (losanges, courbe bleue). Conditions d'immobilisations des enzymes : 1h réticulation, 3% v/v GTA ; 2h greffage avec laccases TvL : 3,82 U.mL ⁻¹	127
Figure 3-10 : Spectres FTIR : courbe (a) gélatine non traitée, (b) gélatine + GTA, (c) gélatine + GTA + laccases.....	129
Figure 3-11 : Rappel du protocole d'immobilisation des laccases à la surface des billes de gélatine.....	130
Figure 3-12 : Courbe de l'influence de chaque facteur sur l'activité des enzymes immobilisées.....	133
Figure 3-13 : Evolution de l'activité de la solution enzymatique libre avec les conditions utilisées lors de l'immobilisation durant 50 heures (pH 7, 25°C, agitation 250 rpm).....	136
Figure 3-14 : Evolution de l'activité des billes de gélatine greffées pendant 10 cycles successifs de réaction avec l'ABTS (1 mmol.L ⁻¹ , pH 4, 25°C).....	138
Figure 3-15 : Profils (A) pH (température maintenue à 25°C) et (B) température (pH maintenu à 4) des enzymes libres (losanges rouges – ligne pointillée) et immobilisées carrés noirs – ligne continue) vis-à-vis de l'ABTS (1 mmol.L ⁻¹).	140
Figure 3-16 : (A) : Stabilité par rapport au pH des enzymes libres (ligne pointillée) ou immobilisées (ligne continue) pendant 24 heures à pH 3 (losanges), pH 5 (carrés), et pH 9 (triangles) ; incubation à 25°C dans une solution tampon citrate phosphate (50 mmol.L ⁻¹). (B) : Stabilité des enzymes libres (ligne pointillée) ou immobilisées (ligne	

continue) par rapport à la température (incubation dans une solution tampon citrate phosphate (50 mmol.L ⁻¹ , pH 7) à 60°C pendant 6 heures).....	142
Figure 3-17 : Etude du choix du milieu de stockage pour les billes actives. Milieux liquides : (A) Solution tampon citrate phosphate pH 7 à 4°C ; (B) Eau distillée à 4 °C ; Milieux secs : (C) Dessiccateur à température ambiante ; (D) Pilulier fermé, 4°C.	143
Figure 3-18 : Stabilité par rapport au stockages d'enzymes libres (losanges rouges) et immobilisées (carrés noirs) stockées dans une solution de tampon citrate-phosphate (pH 7, 50 mmol.L ⁻¹) à 4°C durant 20 jours.....	145
Figure 3-19 : Exemple de détermination des constantes cinétiques des enzymes libres vis à vis de l'ABTS (1 mmol.L ⁻¹ , pH 4, 25°C).	147
Figure 3-20 : Evolution de l'activité de la solution enzymatique (<i>TvL</i> , 3,82 U.mL ⁻¹ initial, pH 7, 100 mL) durant 5 heures de greffage sur des billes actives (4 g) dans le réacteur à lit fluidisé.....	149
Figure 3-21 : Représentation schématique du réacteur enzymatique	151
Figure 3-22 : Distribution de taille des particules sur un lot de 242 billes.	154
Figure 3-23 : Stabilité mécanique des billes à l'intérieur du réacteur durant 8 jours de fluidisation.....	159
Figure 3-24 : Spectre de masse de la tétracycline.....	160
Figure 3-25 : Cinétiques de dégradation d'une solution de tétracycline (20 ppm, eau ultra pure pH 6, 25°C) par des enzymes libres (losanges rouges pleins – ligne pointillée) ou immobilisées (carrés noirs pleins – ligne continue), blancs sans enzyme (losanges rouges vides) et avec des billes inactivées (carrés noirs vides).	162
Figure 3-26 : Influence du milieu (solution tampon citrate-phosphate 50 mmol.L ⁻¹ à pHs de 2,2 à 7 ou eau ultra-pure) sur la vitesse de dégradation de la tétracycline par des laccases libres en 24 heures à 25°C.....	163
Figure 3-27 : Cinétiques de dégradation de la TC (eau ultra-pure pH 6, 25°C) par des enzymes immobilisées en fonction de la concentration initiale de substrat : 15 ppm (losanges) - 10 ppm (carrés) - 5 ppm (triangles) - 2 ppm (croix) en 25 heures.	164
Figure 3-28 : Effet d'inhibition des échantillons de tétracycline non traités (a), et après 24 heures de traitement par des enzymes libres (b) ou immobilisées (c), et sur un échantillon de <i>TvL</i> à 100 U.L ⁻¹ (d) après 5 minutes de contact (rayures) ou 15 minutes de contact (points) avec une bactérie luminescente (<i>Vibrio fischeri</i>).....	167

Figure 3-29 : Effet d'inhibition d'un échantillon témoin d'eau avant et après incubation avec des billes actives pendant 24 heures dans le réacteur à lit fluidisé après 5 minutes de contact (rayures) ou 15 minutes de contact (points) avec une bactérie luminescente (<i>Vibrio fischeri</i>).....	168
Figure 3-30 : Essai de dégradation d'une solution de TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) dans un réacteur à lit fluidisé en 24 heures, par des billes actives (carrés pleins) ou désactivées (carrés vides).....	169
Figure 3-31 : Photos des billes activées dans le réacteur pour différents débits de recirculation (de gauche à droite : 30 mL.min ⁻¹ ; 80 mL.min ⁻¹ ; 130 mL.min ⁻¹)	170
Figure 3-32 : Influence du débit de recirculation sur la dégradation de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) par les billes actives dans le réacteur à lit fluidisé en 24 heures (triangles : 0,8 U _{0,mf} soit 30 mL.min ⁻¹ ; cercles : 2,14 U _{0,mf} soit 80 mL.min ⁻¹ ; carrés : 3,48 U _{0,mf} soit 130 mL.min ⁻¹).....	171
Figure 3-33 : Influence de l'ajout d'O ₂ sur la dégradation de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) en 24 heures pour des débits différents : 30 mL.min ⁻¹ (triangles), 80 mL.min ⁻¹ (cercles), 130 mL.min ⁻¹ (carrés), marqueurs ouverts : sans ajout d'O ₂ , marqueurs pleins : avec ajout d'O ₂	174
Figure 3-34 : Stabilité opérationnelle des billes actives (100 U.L ⁻¹) sur 5 cycles de 24 h de dégradation de la TC dans le réacteur à lit fluidisé (20 ppm, eau ultra pure, 25°C, débit opératoire 80 mL.min ⁻¹).....	175
Figure 3-35 : Suivi de la concentration du glyphosate (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) sur 24 heures sans enzymes (cercles vides) ou en présence de laccases libres (cercles remplis) (<i>TvL</i> , 0,3 U.mL ⁻¹ , agitation 250 rpm).....	178
Figure 3-36 : Structure du glyphosate et mise en évidence des groupements électrons accepteurs : phosphonate (encerclé) et carboxyle (encadré).	178
Figure 3-37 : Suivi sur 24h de la concentration du glyphosate (20 ppm, eau ultra-pure pH 6, 25°C) dans un réacteur agité en présence d'un médiateur : Syringaldéhyde (1 mmol.L ⁻¹ , losanges); Acide p-coumarique (1 mmol.L ⁻¹ , carrés); ou ABTS (1 mmol.L ⁻¹ , triangles) et en présence (marqueurs remplis) ou absence (marqueurs vides) de laccases (0,3 U.mL ⁻¹).....	180
Figure 3-38 : Suivi sur 24 h de la disparition du glyphosate (20 ppm, eau ultra pure, pH 6, losanges noirs) et de l'apparition simultanée de son sous-produit principal (AMPA,	

carrés rouges) lors d'un essai de dégradation en présence de laccases (0,3 U.mL ⁻¹) et d'ABTS (1 mmol.L ⁻¹) (réacteur agité (250 rpm); température 25°C)	182
Figure 3-39 : Suivi de la dégradation d'une solution d'AMPA (20 ppm, eau ultra pure, pH 6) en présence de laccases (0,3 U.mL ⁻¹) et d'ABTS (1 mmol.L ⁻¹) (réacteur agité (250 rpm); température 25°C).....	182
Figure 3-40 : Photographies des différents systèmes de catalyseurs : (a) billes de gélatine activées par greffage de la laccase de <i>Trametes Versicolor</i> (billes activées <i>TvL</i>) (b) billes de gélatine avec de l'ABTS encapsulé (billes _{ABTS}) (c) billes de gélatine activées par une co-immobilisation ABTS/ <i>TvL</i> (billes _{activées <i>TvL</i>/ABTS}).....	184
Figure 3-41 : Spectre FTIR des billes de gélatine sans ABTS (noir) ; des billes de gélatine contenant l'ABTS (rouge) et des billes de gélatine avec co-immobilisation ABTS- <i>TvL</i> (violet)	185
Figure 3-42 : Essais de dégradation d'une solution de glyphosate (20 ppm, eau ultra pure pH 6) avec différents systèmes laccases - médiateurs : Billes _{ABTS} (croix noires) ; Billes _{ABTS} + Billes _{activées <i>TvL</i>} (cercles rouges) ; ABTS libre + Billes _{activées <i>TvL</i>} (triangles verts) ; Billes _{activées <i>TvL</i>/ABTS} (carrés violets) ; laccase libres + Billes _{ABTS} (losanges bleus). (réacteurs agités sur table agitante (80 rpm), température 25°C).....	187
Figure 3-43 : Cycles successifs de dégradation du glyphosate (20 ppm, eau ultra-pure) en présence de billes _{activées <i>TvL</i>/ABTS} dans un réacteur à lit fluidisé (concentration enzymatique : 100 U.L ⁻¹ , volume réactionnel : 100 mL ; débit de recirculation 80 mL.min ⁻¹ , température 25°C)).....	189
Figure 3-44 : Effet d'inhibition d'une solution de glyphosate à 1 ppm non traité (a), après 24 heures de traitement par <i>TvL</i> libres (0,3 U.mL ⁻¹) et d'ABTS libre (1 mmol.L ⁻¹) (b), après 24h de traitement en réacteur à lit fluidisé en présence de billes _{activées <i>TvL</i>/ABTS} (c) ; et d'une solution d'AMPA à 1 ppm non traité (d) et après 24 heures de traitement par <i>TvL</i> libres (0,3 U.mL ⁻¹) et d'ABTS libre (1 mmol.L ⁻¹) (e) après 5 minutes de contact (rayures) ou 15 minutes de contact (points) avec une bactérie luminescente (<i>Vibrio fischeri</i>).....	191

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Substances comprises dans la « watch list » de la directive européenne de 2018.....	26
Tableau 1-2 : Concentrations de molécules pharmaceutiques dans les influents et effluents de stations d'épurations.....	28
Tableau 1-3 : Concentrations de tétracycline dans les eaux de surface à différents endroits du globe.....	30
Tableau 1-4 : Occurrences du glyphosate et de l'AMPA à différents endroits du globe.	32
Tableau 1-5 : Avantages et inconvénients des traitements tertiaires existants.....	38
Tableau 1-6 : Exemples de dégradation de micropolluants par des laccases libres purifiées.....	48
Tableau 1-7 : Essais de dégradation de micropolluants récalcitrants par des systèmes laccase-médiateurs.....	50
Tableau 1-8 : Exemples de dégradation de polluants par des laccases immobilisées sur des supports à base de biopolymères.	56
Tableau 1-9 : Essais de dégradation de micropolluants par des laccases dans des réacteurs enzymatiques à membranes.....	68
Tableau 1-10 : Essais de dégradation de micropolluants à l'aide de réacteurs à lit fixe ou lit fluidisé.....	70
Tableau 1-11 : Corrélations empiriques entre le nombre d'Archimède et le nombre de Reynolds, selon le régime de fluidisation. Source : (Perry and Green, 1973).....	75
Tableau 1-12 : Avantages et inconvénients des différents types de réacteurs enzymatiques	77
Tableau 2-1 : Liste des 19 expériences réalisées pour le plan d'expérience 2 ⁴	84
Tableau 2-2 : Correspondance entre les niveaux et les valeurs réelles pour chaque facteur.....	85
Tableau 3-1 : Influence de la concentration en PEG ₁₀ sur la formation des billes de gélatine; [gélatine] = 22% p/p.....	109
Tableau 3-2 : Influence de la masse moléculaire des PEGs (M _w) sur la viscosité de la solution de PEG (μ) et sur la formation des billes de gélatine, [gélatine] = 22% p/p ; [PEG] = 40% p/v.....	110

Tableau 3-3 : Influence de la concentration en gélatine sur la formation des billes de gélatine; [PEG ₁₀] = 40% p/v.....	111
Tableau 3-4 : Paramètres choisis pour l'élaboration des billes.....	112
Tableau 3-5 : Facteurs correctifs de la loi de Tate. Source : (Worley, 1992).....	114
Tableau 3-6 : Comparaison du diamètre des billes théorique et expérimental.....	115
Tableau 3-7 : Comparaison des propriétés mécaniques (module de compression, contrainte à la rupture et déformation à la rupture) des gels réticulés à différentes concentrations de GTA (0 – 5% v/v) sans et après 24 heures d'immersion dans l'eau.	122
Tableau 3-8 : Propriétés thermiques (Température de dénaturation de la triple hélice T_d , et enthalpie de dénaturation ΔH) des gels réticulés en fonction de la concentration en GTA obtenues par analyse DSC.....	125
Tableau 3-9 : Valeurs des longueurs d'ondes aux pics d'absorbance FTIR pour les gels non traités, réticulés, et greffés.	128
Tableau 3-10 : Résultats du plan d'expérience, comparaison entre réponses expérimentales et prédites par le modèle.....	131
Tableau 3-11 : Analyse de la régression linéaire par ANOVA.	132
Tableau 3-12 : Paramètres optimisés pour l'étape de greffage des laccases sur les billes.	134
Tableau 3-13 : Constantes cinétiques (V_{max} et K_m) de la laccase libre ou immobilisée vis à vis de l'ABTS (1 mmol.L ⁻¹ , pH 4, 25°C).....	147
Tableau 3-14 : Dimensions et caractéristiques du réacteur	151
Tableau 3-15 : Caractéristiques du lit de billes	153
Tableau 3-16 : Calcul de la perte de charge ΔP dans le domaine de fluidisation en fonction des différentes hauteurs de lit fixe H_0 étudiées (2 cm – 5 cm).....	157
Tableau 3-17 : Caractéristiques du domaine de fluidisation	158
Tableau 3-18 : Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de dégradation moyenne de TC en réacteur agité sur 25 heures (25°C, eau ultra pure pH 6).....	165
Tableau 3-19 : Constantes cinétiques des laccases libres et immobilisées vis à vis de la tétracycline et de l'ABTS.....	166
Tableau 3-20 : Dégradation d'une solution de tétracycline (20 ppm, eau ultra pure pH 6, 25°C) après 24 heures de réaction dans deux types de réacteurs (batch agité et lit fluidisé).....	170

Tableau 3-21 : Calcul à différents temps des vitesses moyennes de dégradation en $\text{mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) par les billes activées dans le réacteur à lit fluidisé à différents temps de réaction (2h, 8h, et 24h) pour chaque débit utilisé (30 mL.min^{-1} , 80 mL.min^{-1} , 130 mL.min^{-1}).....	172
Tableau 3-22 : Vitesses de dégradation en $\text{mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) en 24 heures selon les débits et l'ajout d'air dans le système (par un débit de 15 mL.min^{-1}).....	174
Tableau 3-23 : Vitesses moyenne de dégradation du glyphosate sur 8 heures en fonction du système laccase-médiateur utilisé.....	187
Tableau 3-24 : Performances de dégradation d'une solution de glyphosate (20 ppm, eau ultra pure pH 6, 25°C) en présence de billes _{activées TvL/ABTS} en réacteur agité et en lit fluidisé)	189

Introduction générale

Introduction générale

On estime aujourd'hui à plus de 100 000 le nombre de substances chimiques homologuées en Europe, et 200 à 300 nouvelles molécules s'y ajoutent chaque année. Une partie de ces composés sont peu ou non biodégradables et ont une forte tendance à s'accumuler dans l'environnement, on peut ainsi les retrouver dans les eaux souterraines ou de surface à des concentrations faibles variant du ng.L^{-1} au $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Tran et al., 2018). La présence de ces molécules appelées polluants émergents ou micropolluants est une question de santé publique qui gagne de plus en plus de visibilité depuis ces deux dernières décennies, en partie grâce à l'amélioration des techniques analytiques et à une prise de conscience globale pour les problèmes environnementaux (Deblonde et al., 2011; Geissen et al., 2015; Gogoi et al., 2018). Les micropolluants peuvent être des résidus de produits pharmaceutiques, de produits d'hygiène personnelle, de produits ménagers, de pesticides ou encore de produits dérivés de l'industrie chimique. L'élimination de ces composés représente un enjeu essentiel pour une gestion de l'eau durable et équitable dans un contexte d'accroissement de la population. En effet, nombre de ces substances peuvent engendrer une toxicité chronique et des conséquences néfastes sur les écosystèmes aquatiques et la santé humaine (Sousa et al., 2018). Par exemple, la persistance de résidus d'antibiotiques dans l'environnement est à l'origine de l'une des plus grosses menaces sanitaires de ce siècle : l'apparition de bactéries anti-bio résistantes (Cacace et al., 2019; Corno et al., 2019; Manaia et al., 2018; Voigt et al., 2020).

Pour lutter contre ce problème environnemental, deux types de mesures peuvent être prises : à la source, ou en bout de chaîne. Les mesures « à la source » consistent à imposer pour certaines molécules, des contraintes de rejets en amont du traitement. Dans cette optique, la France a lancé en 2009 le premier plan « micropolluant », qui vise à surveiller et limiter certaines substances listées comme prioritaires. L'autre stratégie est d'agir en bout de chaîne, en équipant les stations d'épuration de traitements spécifiques pour éliminer ces molécules. La Suisse espère ainsi atteindre d'ici 2035 un objectif d'abattement de 80% des micropolluants en sortie de chacune de ses 120 stations d'épuration spécialement équipées dans ce but. Ces deux types de solutions sont néanmoins complémentaires et les recherches scientifiques s'intensifient afin de trouver

des traitements efficaces pour éliminer ces molécules des eaux traitées. En effet, les traitements classiques que l'on retrouve dans une station d'épuration des eaux usées (STEP) conventionnelle, comme les réacteurs de boues activées ou la coagulation-floculation, ne sont pas complètement adaptés pour la dégradation de ces composés récalcitrants (Luo et al., 2014; Stackelberg et al., 2007; Vogelsang et al., 2006). Cela explique les taux d'abattement très variables de ces composés en station classique, qui peuvent pour certains produits, ne pas dépasser les 30% d'élimination.

Plusieurs voies (chimiques, physiques ou biologiques) sont actuellement étudiées. Parmi elles, l'utilisation de biocatalyseurs enzymatiques est une piste prometteuse (Marco-Urrea et al., 2009). En effet, les enzymes de type oxydoréductases (notamment les laccases ou peroxydases), forment des radicaux très réactifs capables d'oxyder une large gamme de substrats en composés moins toxiques (Alneyadi et al., 2018; Naghdi et al., 2018; Varga et al., 2019). La laccase possède trois sites catalytiques (T1, T2, T3) sur lesquels sont répartis quatre atomes de cuivre ayant la capacité d'oxyder un substrat parallèlement avec la réduction d'une molécule d'oxygène dissous en eau (Alcalde, 2007; Madhavi and Lele, 2009; Shekher et al., 2011). Ce biocatalyseur est particulièrement intéressant par comparaison aux autres enzymes du même type puisqu'il ne nécessite aucun autre produit que l'oxygène déjà dissous dans la solution, et réagit facilement en conditions ambiantes (température, pH). L'utilisation de la laccase pour catalyser la dégradation de micropolluants de diverses origines (produits pharmaceutiques, pesticides, perturbateurs endocriniens...) fait l'objet de nombreuses recherches depuis quelques années. Les résultats semblent confirmer l'efficacité du procédé sur les polluants phénoliques de faible potentiel d'oxydoréduction E° (le potentiel redox de la laccase est évalué entre 0,4 et 0,8 V) (Bilal et al., 2019a; Morsi et al., 2020; Unuofin et al., 2019); mais certains composés à haut potentiel redox restent récalcitrants. Il est néanmoins possible d'ajouter des molécules appelées médiateurs pour permettre ou améliorer l'avancement de la réaction (Ashe et al., 2016; Cañas and Camarero, 2010).

Deux limitations principales freinent cependant l'extrapolation de ce type de procédé à échelle industrielle. Tout d'abord, le fait d'utiliser ce catalyseur dans sa forme dissoute en solution nécessite une étape de séparation de l'enzyme à la fin du procédé, augmentant l'impact économique de celui-ci et ce d'autant plus que les enzymes

récupérées ne sont pas toujours réutilisables. De plus, la baisse d'activité des enzymes au cours du temps liée à un manque de stabilité génère un problème supplémentaire. Pour pallier ces limitations, le catalyseur peut être greffé sur un support, par différentes techniques comme l'adsorption, l'encapsulation ou encore la création de liaisons covalentes (Ba et al., 2013; Mateo et al., 2007; Mohamad et al., 2015). Le choix de la technique d'immobilisation est indissociable du choix du support. Divers matériaux peuvent servir en tant que support enzymatique, aussi bien inorganiques (minéraux, matériau à base de silice...) qu'organiques (polymères synthétiques comme l'alcool polyvinylique, ou organiques comme le chitosan, l'alginate) (Zdarta et al., 2018a, 2018b). Un bon support possède une aire surfacique importante, une bonne stabilité structurelle, de nombreux groupements fonctionnels ; il doit également être biocompatible et non toxique.

L'immobilisation des enzymes sur un support solide rend possible l'utilisation de différents types de réacteurs : le réacteur agité, le réacteur enzymatique à membrane, le réacteur à lit fixe ou le réacteur à lit fluidisé. Dans les deux derniers cas, le lit est constitué de particules sur lesquelles est greffé le catalyseur. Le choix de la forme du support (billes, membranes, nanoparticules...) va donc également dépendre du type de réacteur visé.

L'objectif de cette thèse est de développer des supports d'immobilisation d'enzymes biosourcés pouvant être utilisés dans un réacteur à lit fluidisé afin de dégrader des micropolluants récalcitrants présents dans l'eau. L'étude rapportée dans ce manuscrit tente de répondre à plusieurs questionnements, dont certains se sont révélés au cours du projet :

- Des billes de gélatine réticulées chimiquement peuvent-elles former des liaisons covalentes robustes avec les laccases pour atteindre une stabilité et une activité enzymatique suffisante ?
- La réticulation par le glutaraldéhyde permet-elle une bonne tenue mécanique des billes pour une utilisation continue en milieu aqueux fluidisé ?
- Quels paramètres influent sur un greffage efficace des enzymes à la surface des billes et dans quelle mesure ? Comment quantifier l'efficacité du greffage ?

- La fluidisation améliore-t-elle la dégradation des micropolluants par rapport à un réacteur agité ? Quels paramètres opératoires influent sur l'efficacité de cette dégradation ?
- Peut-on adapter ce procédé pour dégrader un micropolluant non phénolique plus récalcitrant ? L'immobilisation d'un médiateur est-elle envisageable pour éviter l'ajout d'une molécule supplémentaire dans la solution ?

Le chapitre 1 de cette thèse constitue l'état de l'art et présente dans un premier temps l'occurrence et le devenir des micropolluants dans l'environnement, puis les traitements classiques et plus innovants retrouvés en STEP. Le traitement enzymatique est ensuite détaillé, tout comme les différents supports et techniques d'immobilisation. Ce chapitre se termine par la présentation des différents réacteurs enzymatiques, en insistant sur les phénomènes mis en jeu à l'intérieur d'un réacteur à lit fluidisé.

Le chapitre 2 décrit le matériel, les méthodes et les analyses utilisés pour ce travail de recherche.

Le chapitre 3 développe l'ensemble des résultats obtenus, il se compose de plusieurs parties :

- L'élaboration des supports à base de gélatine et l'étude des propriétés de ces supports avant et après réticulation. Cette partie étudie l'influence de différents paramètres sur la formation des billes, et l'impact de la concentration en glutaraldéhyde utilisé pour la réticulation sur les propriétés mécaniques et thermiques des billes.
- L'étude des paramètres influents sur le greffage des enzymes à la surface des billes par un plan d'expérience 2^4 et l'étude de la stabilité des enzymes immobilisées. Cette partie étudie l'effet de plusieurs paramètres (la concentration en glutaraldéhyde, le temps de réticulation, la concentration en enzyme, le temps de greffage) sur l'activité des billes activées. Les enzymes immobilisées sont ensuite comparées aux enzymes libres en termes de stabilité par rapport au pH, par rapport à la température, et par rapport au temps de stockage. Les constantes cinétiques vis-à-vis d'un substrat modèle (l'ABTS) ont aussi été discutées.

- La conception d'un réacteur à lit fluidisé et l'étude de la faisabilité de la dégradation d'un composé pharmaceutique phénolique : la tétracycline. Les performances de dégradation en réacteur batch agité et en lit fluidisé ont été comparées, et l'impact de divers paramètres opératoires (pH, débit de recirculation du milieu réactionnel, concentration en micropolluants, ajout d'oxygène) sur l'efficacité de la réaction ont été discutés.
- La dégradation d'un pesticide non phénolique récalcitrant : le glyphosate, est étudiée en réacteur batch et en réacteur à lit fluidisé en ajoutant un médiateur pour accélérer la réaction. La co-immobilisation du biocatalyseur et du médiateur sur une même bille a été testée, afin de limiter la toxicité et de faciliter la séparation des médiateurs utilisés.

Enfin, le manuscrit se termine par les principales conclusions tirées du projet, et les perspectives d'études qui en découlent.

Chapitre 1

Etat de l'art

Chapitre 1 – Etat de l’art

I) Présence de micropolluants émergents dans l’eau

1. Origines et régulations

Les polluants émergents (EPs, aussi appelés micropolluants) regroupent l’ensemble des molécules naturelles ou synthétiques qui ne font pas forcément l’objet de surveillance ou de traitement spécifique dans l’environnement et les stations d’épuration, mais qui sont susceptibles de représenter un danger pour les écosystèmes et/ou pour la santé humaine (Geissen et al., 2015). Ce problème est relativement nouveau, pour plusieurs raisons. Tout d’abord, la croissance démographique mondiale depuis le siècle dernier, a entraîné une augmentation de la production des industries pharmaceutiques, chimiques, et agroalimentaires. On estime notamment que la consommation mondiale en antibiotiques a augmenté d’au moins 65% entre 2000 et 2015, passant de 21,1 à 34,8 milliards de doses quotidiennes (Klein et al., 2018). De plus, les techniques d’analyses se sont considérablement améliorées lors des dernières décennies et on est aujourd’hui capable de détecter des composés dont les concentrations dans l’environnement sont de l’ordre du ng.L^{-1} (Borah et al., 2020). Le nom « micropolluant » provient en effet de la faible concentration de ces molécules qui est généralement comprise entre le $\mu\text{g.L}^{-1}$ et le ng.L^{-1} . Par exemple, le développement de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS, voir la LCMS-MS) a permis de se rendre compte de la persistance de plus de 3000 molécules d’origine pharmaceutique dans les effluents de stations d’épuration, dans les eaux souterraines ou les eaux de surface (Richardson, 2012; Rivera-Utrilla et al., 2013). Aussi, bien que la présence de certains composés dans l’eau soit connue depuis longtemps, ce n’est que récemment que leur potentiel impact négatif sur la santé humaine et sur les écosystèmes n’a été relevé, c’est le cas des hormones telles que l’œstrogène, dont la présence est liée notamment à la prise de pilules contraceptives (McKeown and Bugyi, 2016).

On peut diviser ces micropolluants en plusieurs grandes catégories : les produits pharmaceutiques (PPs), les pesticides, les produits de soin et d’hygiène personnelle (PCPs), les surfactants, les produits issus de l’industrie chimique et les perturbateurs endocriniens (EDCs) (Luo et al., 2014). La dernière catégorie regroupe tous les

composés, naturels ou synthétiques, capables d’altérer les systèmes hormonaux et homéostatiques de l’organisme (ils peuvent aussi appartenir à une autre classe, comme souvent des PCPs ou pesticides). (Wee and Aris, 2017). Dans ces travaux de thèse, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux deux premières catégories citées, à savoir les produits pharmaceutiques et les pesticides.

La Figure 1-1 regroupe les différentes sources de ces polluants émergents. Les effluents domestiques et hospitaliers concentrent la majeure partie des micropolluants pharmaceutiques et de produits d’hygiène personnelle. Les stations d’épuration n’étant pas conçues pour traiter spécifiquement ces composés, la plupart se retrouve dans les eaux de surface, voire l’eau potable (Rivera-Utrilla et al., 2013).

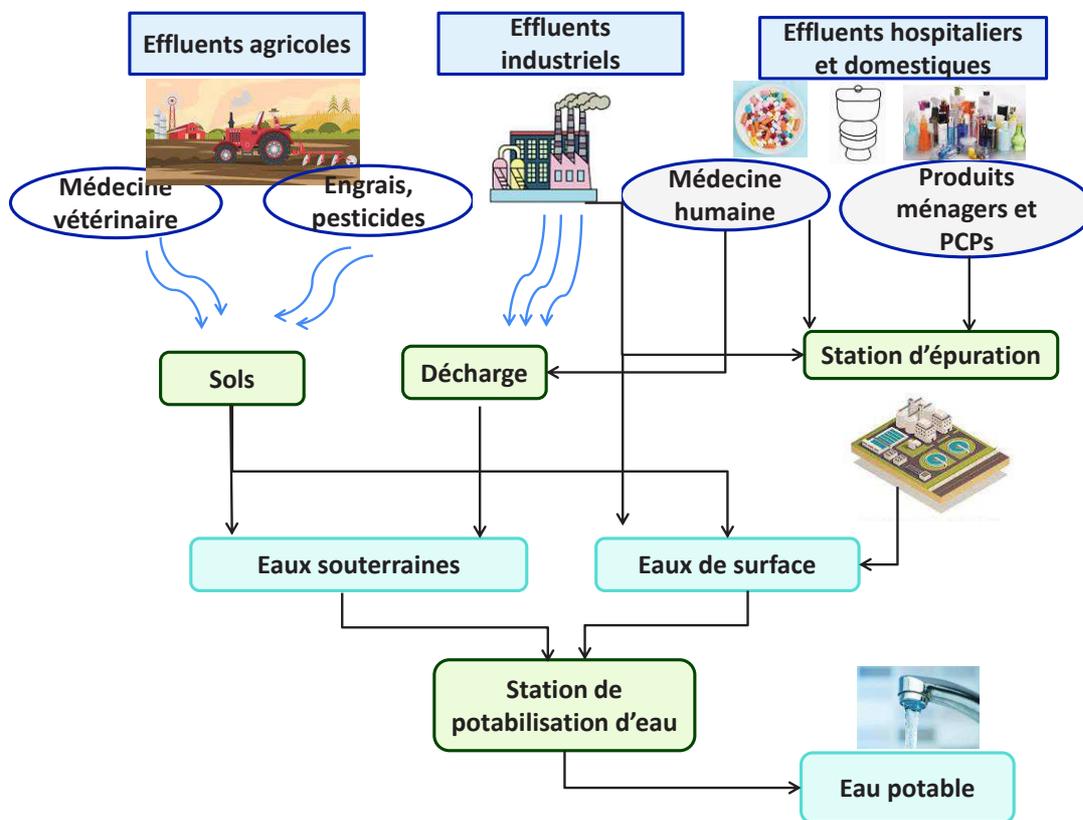


Figure 1-1 : Origine des micropolluants dans l'eau

En ce qui concerne la réglementation, bien qu’il n’y ait aucune limitation de décharge de micropolluants dans l’environnement au niveau européen, la directive cadre sur l’eau (DCE) 2000/60/EC a défini une stratégie pour détecter les substances à haut risque nécessitant d’être surveillées (Directive, 2000). 33 molécules ou groupes de molécules ont donc été choisis et considérés comme prioritaires en 2008 par la directive

2008/105/EC (Directive, 2008). En 2013, une première « watch list » a été établie, comprenant 10 substances ou groupes de substances, pour un total de 17 molécules organiques (Barbosa et al., 2016; Directive, 2013). La liste a été actualisée en 2018, en ajoutant notamment deux antibiotiques : l’amoxiciline, la ciprofloxacine, et en retirant 5 composés. La liste actualisée est détaillée dans le Tableau 1-1. Parmi ces substances, on retrouve des hormones, des produits pharmaceutiques, des produits de soin personnels et des pesticides. Les molécules de cette liste qu’on retrouve le plus fréquemment dans les eaux de surface sont l’azithromycine, et l’imidaclopride (Sousa et al., 2018).

Tableau 1-1 : Substances comprises dans la « watch list » de la directive européenne de 2018

Nom de la molécule ou du groupe de molécules	Classe	Présence
17- α -ethinylestradiol (EE2)	Hormones Perturbateurs endocriniens	Pilules contraceptives
17- β -estradiol (E2) Estrone (E1)	Hormones Perturbateurs endocriniens	Hormones naturelles
Azithromycine Clarithromycine Erythromycine	Produits pharmaceutiques	Antibiotiques macrolides
Methiocarbe	Pesticide	Pesticide carbamate
Imidaclopride Thiaclopride Thiamethoxamee Clothianidim Acetamipride	Pesticide	Neonicotinoïdes (Insecticides)
Metaflumizone	Pesticide	Insecticide
Amoxiciline	Produit pharmaceutique	Antibiotique
Ciprofloxacine	Produit pharmaceutique	Antibiotique

2. Produits pharmaceutiques

Les produits pharmaceutiques, (incluant par exemple les antibiotiques, les médicaments anti inflammatoires, anti épileptiques, anti déprimeurs), font partie du quotidien de la population mondiale et se retrouvent ainsi dans les égouts, les eaux de drainage, les effluents industriels, ou encore les sols lorsqu’ils sont utilisés en médecine vétérinaire (Archer et al., 2017). La présence de ces substances dans les sols peut altérer les fonctions écologiques clés, comme le cycle du carbone (Pino-Otín et al., 2017). En ce qui concerne la santé humaine, certaines de ces molécules peuvent causer des pathologies graves comme des allergies, des cancers, et des maladies respiratoires. Mais surtout, la présence d’antibiotiques dans l’environnement est à l’origine du développement de bactéries anti-bio résistantes ce qui peut, à terme, poser de réels problèmes de santé publique (Couto et al., 2019).

Le Tableau 1-2 regroupe certaines des molécules d’origine pharmaceutique les plus couramment rencontrées dans l’environnement et leurs concentrations avant et après traitement en station d’épuration. On observe qu’excepté l’ibuprofène et la norfloxacine dont les taux de dégradation dans les stations d’épuration sont assez élevés (ici entre 90-99%), les taux de dégradation des autres micropolluants restent bas (autour de 20-30% pour la carbamazépine et la tétracycline, entre 40-80% pour les autres). Le traitement classique, (voire supplémenté d’un traitement chimique) ne suffit pas pour éliminer ces molécules et leurs concentrations résiduelles dans les effluents ne sont pas négligeables. Par ailleurs, on observe que certains composés (ici le diclofénac et le triclosan) ont un bilan massique négatif, c’est-à-dire que leur concentration est plus élevée en sortie qu’à l’entrée de la station d’épuration.

Tableau 1-2 : Concentrations de molécules pharmaceutiques dans les influents et effluents de stations d'épurations.

Classe	Molécule	[Influent] µg.L ⁻¹	[Effluent] µg.L ⁻¹	Lieu	Type de traitement	Méthode d'analyse	Référence
Anti inflammatoires	Diclofenac	0,249	0,545	Pologne, Cracovie	CSTEP	GC-MS	(Nosek et al., 2014)
	Ibuprofène	1,56-7,28	0,006-0,284	France, Orléans	CSTEP	GC-MS	(Thiebault et al., 2017)
Antibiotiques	Tétracycline	<MDL-0,032	<MDL-0,023	Portugal	CSTEP	LC-MS	(Santos et al., 2013)
		<0,10	<0,02	Australie, Queensland	CSTEP	LC-MS-MS	(Watkinson et al., 2009)
	Sulfaméthoxazole	0,280-0,740	0,17-0,24	Italie	CSTEP + TT*	LC-MS	(Verlicchi et al., 2012a)
	Norfloxacin	0,320	0,032	Suède	CSTEP + TT**	LC-MS-MS	(Zorita et al., 2009)
Désinfectant	Triclosan	0,339	0,433	Pologne, Cracovie	CSTEP	GC-MS	(Nosek et al., 2014)
Anti épileptique	Carbamazépine	0,215	0,163	France, Orléans	CSTEP	GC-MS	(Thiebault et al., 2017)
Bétabloquant	Atenolol	1,8-2,4	0,55-0,98	Italie	CSTEP + TT*	LC-MS	(Verlicchi et al., 2012a)

CSTEP : Traitement conventionnel (pré traitement + boues activées) ; TT : Traitement tertiaire ; *Traitement chimique par NaClO ;

**Traitement chimique par FeCl₃

Cela s’observe généralement dans le cas de la mise en œuvre de réacteurs à boues activées (traitement secondaire classique d’une STEP) et est vraisemblablement lié à une recombinaison de métabolites en composés parents, mais peut aussi résulter du rejet dans la phase liquide et sous l’action des microorganismes, de micropolluants piégés dans des particules fécales (Blair et al., 2015; Grandclément et al., 2017).

Parmi les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire, la tétracycline (TC) est sans doute l’un des plus employés au monde, notamment pour les volailles (Ling et al., 2013). Or d’après la littérature, le taux de dégradation moyen de la TC dans les stations d’épuration n’est que de 30% seulement (Watkinson et al., 2009). Ceci explique pourquoi on en retrouve à des concentrations assez élevées dans les eaux de surface à divers endroits de la planète (cf Tableau 1-3) (Wang et al., 2019).

Le risque environnemental d’une substance correspond à la valeur du quotient de risque (RQ), défini par le ratio entre la moyenne de la concentration de la substance mesurée dans les effluents secondaires et la plus forte concentration de cette substance sans risque pour l’environnement (PNEC). Un $RQ < 0,1$ signifie un risque faible pour les organismes aquatiques, le risque est moyen si $0,1 \leq RQ \leq 1$ et élevé si $RQ \geq 1$. La PNEC de la TC a été évaluée à $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$, soit 90 ng.L^{-1} (Kümmerer and Henninger, 2003). D’après les valeurs de concentrations rapportées dans le Tableau 1-3, les eaux de certains sites renferment des quantités de TC supérieures à la PNEC. Selon Verlicchi et al., (2012b), le RQ de la tétracycline est supérieur à 1, faisant donc de cette molécule l’une des plus préjudiciables pour les écosystèmes aqueux.

Tableau 1-3 : Concentrations de tétracycline dans les eaux de surface à différents endroits du globe.

Concentration en TC (ng.L ⁻¹)	Lieu	Référence
≤ 32	Rivière Haihe, Chine	(Luo et al., 2011)
≤ 2,37	Estuaire Yangtse, Chine	(Yan et al., 2013)
≤ 623,43	Rivière Tiaoxi, Chine	(Jia Li et al., 2016)
≤ 10,14	Rivière Meijiang, Chine	(Chen et al., 2017)
30-497	Hong Kong, Chine	(Selvam et al., 2017)
≤ 100	6 rivières du Queensland, Australie	(Watkinson et al., 2009)
≤ 140	Eaux de surface, Etats Unis	(Deo, 2014)
≤ 2093	Rivière Han, Corée du Sud	(Kim et al., 2016)
5,4-8,1	Yaft Abad, Iran	(Javid et al., 2016)

3. Pesticides

Les pesticides sont utilisés en agriculture pour lutter contre les nuisibles et les mauvaises herbes, afin d’améliorer les productions et répondre à la demande toujours croissante liée à l’augmentation démographique mondiale. Cependant, quand elles sont utilisées en grande quantité, ces substances n’affectent plus seulement les organismes ciblés, mais la totalité de leur environnement, comme l’atmosphère, le sol, les eaux souterraines, et les eaux de surface par pulvérisation et infiltration (Nsibande and Forbes, 2016). Du fait de leur biopersistance et de leur bioaccumulation dans l’environnement, les pesticides sont considérés comme très toxiques (de Souza et al., 2020). On leur attribue notamment d’être à l’origine de problèmes de santé comme des cancers, des malformations, des problèmes d’infertilité, et des mutations d’ADN, pouvant aboutir à l’apparition de maladies comme Parkinson et Alzheimer (Bolognesi, 2003; Norman et al., 2020; Sabarwal et al., 2018).

En 2014, la France était le second pays d’Europe le plus grand consommateur de pesticides avec 70 000 tonnes de pesticides utilisées pour l’année (Béranger et al., 2020). Parmi les pesticides, on retrouve principalement les herbicides, les insecticides et les fongicides. Les herbicides sont la classe de pesticides la plus utilisée aujourd’hui,

avec par exemple 112 000 tonnes d’herbicides vendues en Europe en 2016, soit 32% de la quantité totale de pesticides vendue en Europe cette même année (Ravier et al., 2019).

L’herbicide non sélectif le plus vendu au monde est le glyphosate, un composé organophosphoré produit par la société Monsanto sous le nom commercial de Roundup® depuis 1974. Cet herbicide inhibe une enzyme essentielle à la plante, la 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate-synthase (EPSPS), l’empêchant de produire des acides aminés aromatiques nécessaires à la synthèse de protéines. Comme le glyphosate n’est pas sélectif, il est soit utilisé sur des champs avant culture soit sur des cultures génétiquement modifiées capables de résister à l’herbicide (Valavanidis, 2018). La quantité totale de glyphosate utilisée dans 140 pays différents est passée de 3 200 tonnes/an en 1974 à 825 000 tonnes/an en 2014 (Benbrook, 2016).

L’utilisation commerciale de cet herbicide est de plus en plus controversée, notamment depuis la publication d’un rapport du Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC), regroupant les recherches de plusieurs organismes indépendants et qualifiant le glyphosate de « potentiellement cancérigène » (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2017).

De nombreuses recherches consacrées à l’impact du glyphosate sur la santé humaine ont mis en évidence des risques de prolifération des cellules T47D tumorales (à l’origine de cancers du sein) (Thongprakaisang et al., 2013), des dommages neurologiques à haut niveau d’exposition (Martinez and Al-Ahmad, 2019), ou encore une augmentation de dommages sur l’ADN corrélée à une augmentation de la dose d’exposition de glyphosate, suggérant ainsi une génotoxicité de la molécule (Alvarez-Moya et al., 2014). De nombreuses études rapportent néanmoins que la toxicité du roundup n’est pas due à la présence du seul glyphosate mais résulte aussi de la présence du surfactant ajouté, (très souvent le polyoxyéthylène amine ou POEA), qui serait plus toxique que l’herbicide lui-même (Meftaul et al., 2020; Mesnage et al., 2013).

Le glyphosate est particulièrement persistant dans l’air et peut donc ainsi être transporté sur de longues distances (Mattei et al., 2018; Socorro et al., 2016). Dans les sols (pH ≈ 4-8), le glyphosate est présent sous forme anionique et peut se combiner avec les cations présents dans l’argile et/ou les oxydes de fer et d’aluminium ; cette forte

sorption dans les sols est à l’origine de sa grande persistance (Borggaard and Gimsing, 2008; Okada et al., 2019). Le principal métabolite de la biodégradation du glyphosate est l’acide aminométhylphosphonique (AMPA). Bento et al., (2016) ont montré que l’AMPA est jusqu’à 21 fois plus persistant que le glyphosate dans des sols humides, d’où la nécessité de surveiller ce métabolite au moins autant que le glyphosate lui-même. Des exemples d’occurrence du glyphosate et de l’AMPA dans les eaux à différents endroits de la planète sont rapportés dans le Tableau 1-4.

Tableau 1-4 : Occurrences du glyphosate et de l’AMPA à différents endroits du globe.

Concentration en glyphosate ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentration en AMPA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Lieu	Référence
$\leq 35,2$	$\leq 0,6$	Rivière Suquia, Argentine	(Bonansea et al., 2017)
$\leq 8,1$	$\leq 5,6$	70 sites aux Etats-Unis	(Medalie et al., 2020)
$\leq 14,2$	≤ 10	Marécages, Australie	(Okada et al., 2020)
0,11	0,2	Eaux secondaires, Zurich, Suisse	(Poiger et al., 2016)
1,7-3,6	$\leq 0,8$	Eaux de surface, Buenos Aires, Argentine	(Aparicio et al., 2013)

La PNEC du glyphosate a été évaluée entre $28 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $60 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Bonansea et al., 2017; Di Guardo and Finizio, 2018), le RQ du glyphosate varie en fonction des sites mais il est en moyenne compris entre 0,1 et 1, ce qui engendre un risque modéré pour les organismes aqueux, il peut cependant être supérieur à 1 pour les sites où la concentration en glyphosate est plus élevée que la moyenne. La PNEC de l’AMPA a été évaluée autour de $80 \mu\text{g.L}^{-1}$, ce qui correspond à un risque faible à modéré selon les sites (Dulio and Adres, 2013).

Dans le cadre de cette thèse, la dégradation de deux micropolluants (la tétracycline et le glyphosate) appartenant à deux classes différentes (un produit pharmaceutique et un pesticide) sera étudiée.

II) Procédés existants pour traiter ces micropolluants

Cette partie est consacrée à la présentation des différents procédés de traitement des eaux conventionnels et/ou plus originaux, ainsi que leur capacité à éliminer les micropolluants.

1. Techniques classiques utilisées dans les stations d’épurations.

Bien que chaque station d’épuration possède son fonctionnement propre, il existe un enchaînement de procédés que l’on retrouve dans la plupart des STEP et qui est représenté schématiquement sur la Figure 1-2. Les traitements préliminaires permettent d’éliminer les matières les plus volumineuses par dégrillage, tamisage ou encore dessablage. L’utilisation d’un seul ou plusieurs prétraitements dépend de la qualité de l’eau brute à traiter. Le traitement primaire est un traitement physique, généralement composé d’une décantation souvent associée au procédé de coagulation – floculation, détaillé ci-après. Le traitement secondaire est un traitement biologique, généralement basé sur un réacteur à boues activées, ou un bioréacteur à membrane. Une clarification permet la séparation finale entre l’eau traitée, renvoyée dans l’environnement, et les boues qui seront traitées et recyclées.

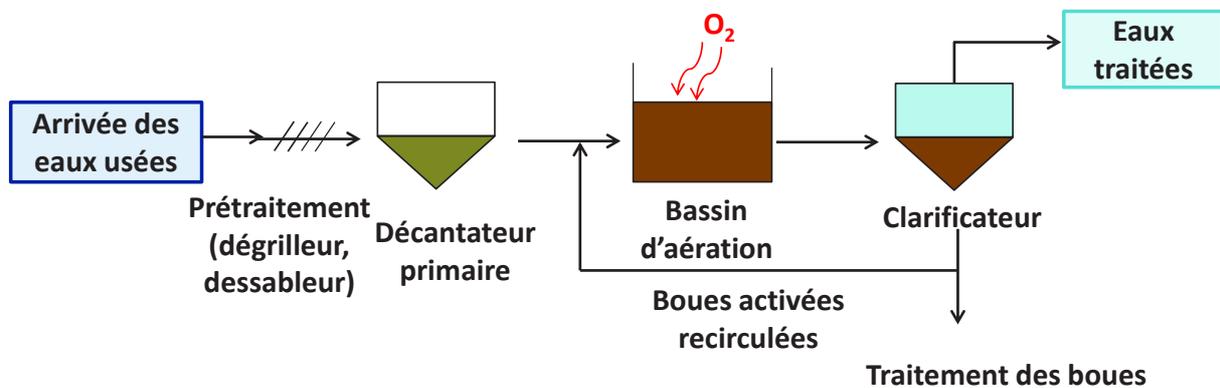


Figure 1-2 : Principales étapes d'une station d'épuration classique

a) Coagulation – Floculation

Les procédés de coagulation et floculation font partie des traitements conventionnels trouvés en station d’épuration, généralement appliqués en traitement primaire. Leur but premier est d’éliminer les composés colloïdaux (de diamètre compris entre 0,001 et 1 μm de diamètre) afin de faciliter les traitements suivants. La coagulation repose sur

l’ajout d’un produit chimique (le coagulant) qui déstabilise ces particules colloïdales en réduisant leurs charges répulsives pour former des microparticules. Le sulfate d’aluminium, le sulfate de fer, ou encore le chlorure de fer sont des composés régulièrement utilisés pour ce rôle. Au cours de l’étape suivante (étape de floculation), ces microparticules vont s’assembler pour former des floccs qui pourront ensuite être facilement séparés de l’eau à traiter durant l’étape de sédimentation.

Les taux d’abattelements des micropolluants lors de ce procédé sont très variables, les coagulants habituellement choisis n’étant pas spécialement adaptés pour réagir avec ces molécules particulières. Le comportement hydrophobe de certains polluants (notamment les composés pharmaceutiques), avec un $\log K_{ow}^1 > 3$, peut expliquer la faible élimination de ces molécules pendant cette étape (Couto et al., 2019). Toutefois, en associant des ions Al(III), ainsi qu’un surfactant anionique (le sodium dodecyl sulfate) et un polyélectrolyte cationique (poly(allylamine hydrochloride)), Saitoh et al., (2017) ont réussi à atteindre, à l’échelle du laboratoire (100 mL), une élimination de la tétracycline ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) quasi complète (>99%) en moins de 5 minutes. L’ajout de surfactants dans un procédé à grande échelle peut néanmoins poser des problèmes dus à leur impact sur l’environnement lié à leurs propriétés moussantes et à leur faible biodégradabilité (Palmer and Hatley, 2018).

b) Boues activées

Le procédé de boues activées (CAS : Conventional Activated Sludge) est le traitement biologique le plus souvent utilisé dans les stations d’épuration. Il consiste en l’aération et l’agitation de l’effluent pour permettre la croissance d’un consortium de microorganismes capables de dégrader des molécules organiques dans des conditions spécifiques. Deux mécanismes permettent l’élimination des polluants dans les boues activées : la sorption puis la biodégradation.

La sorption dépend des propriétés physico-chimiques des micropolluants, et notamment de leur coefficient de partition octanol-eau K_{ow} . Plus ce coefficient est élevé, meilleure sera la sorption des composés. Les interactions électrostatiques jouent également un rôle important dans la capacité de sorption des molécules. En effet, les polluants qui

¹ K_{ow} : Coefficient de partage octanol/eau, représente la solubilité relative de composés chimiques dans deux solvants.

existent majoritairement sous les formes zwitterions et cations dans la gamme de pH 6-8 ont tendance à former des interactions électrostatiques qui permettent leur sorption sur la boue. C’est notamment le cas pour les tétracyclines qui malgré leur K_{ow} négatif ($\log K_{ow} TC = - 1,37$) sont adsorbées sur les boues (Tran et al., 2016; Tran and Gin, 2017).

L’efficacité de la biodégradation repose sur la bonne croissance de la biomasse, et donc de la composition du consortium microbien. En effet, dans un procédé de biodégradation conventionnel, les microorganismes utilisent dans leur métabolisme les composés organiques comme substrat primaire pour leur croissance cellulaire. Cependant à cause de leur très faible concentration, les micropolluants ne participent généralement pas à la croissance de la biomasse et ne sont pas considérés comme substrat primaire. La présence d’un substrat de croissance est donc indispensable pour développer la biomasse en vue d’une dégradation par co-métabolisme des micropolluants (Nguyen et al., 2019; Tran et al., 2013). La biodégradation des polluants émergents dépend aussi des propriétés physico-chimiques et structurales des polluants, mais également de paramètres opératoires comme le pH, la température, le temps de rétention hydraulique (HRT), et le temps de rétention des matières solides (SRT) (Tran et al., 2018). Un autre problème rédhibitoire est lié à la toxicité de la plupart des micropolluants qui peuvent être inhibiteurs de la croissance microbienne.

L’efficacité de ce procédé est extrêmement variable selon les micropolluants. On connaît l’existence de micro-organismes (par exemple *Bacillus subtilis* Bs-15 et *Achromobacter* sp.Kg 16) capables de dégrader le glyphosate, en utilisant celui-ci comme source primaire de phosphore, carbone et azote. Cependant, le glyphosate est, dans la majorité des cas, dégradé en AMPA, plus récalcitrant, et donc très souvent rejeté dans l’environnement (Birsa et al., 2018; Zhan et al., 2018). De hauts taux d’abattements (>80%) sont atteints avec des micropolluants facilement biodégradables comme par exemple l’ibuprofène, le methylparaben, le galaxolide, la caféine, mais de nombreux composés restent récalcitrants comme la carbamazépine, l’ofloxacine, la pénicilline, le sulfaméthoxazole, l’EDTA (Oppenheimer et al., 2007).

c) Bioréacteurs à membranes

Les bioréacteurs à membranes (BRMs) combinent la biodégradation avec une étape de séparation membranaire, afin de retenir les solides et la biomasse en suspension dans le système. Cette technologie présente de nombreux avantages comme la réduction de la production de boues, une diminution significative de la concentration de solides en suspension dans l’effluent traité, et l’élimination de virus et de pathogènes. Les BRMs ont également des avantages par rapport aux CAS pour éliminer des polluants émergents (Goswami et al., 2018). En effet, le SRT plus long des BRMs comparé à celui des CAS, combiné à une plus forte concentration de la biomasse, favorise l’élimination des micropolluants dont la dégradation est lente (Nguyen et al., 2017). De plus, cette plus forte concentration de la biomasse impose un ratio nutriments/microorganismes (F/M) plus faible, et donc les microorganismes devront métaboliser tous les substrats mis à leur disposition, dont les composés plus récalcitrants, pour assurer leur croissance. Enfin, du fait de la forte concentration en boue, le diamètre moyen des floccs est plus faible ce qui entraîne une augmentation de l’aire surfacique des microorganismes, et donc favorise le contact entre ces derniers et les micropolluants préalablement absorbés sur la boue (Sipma et al., 2010). Il est cependant important de noter que l’amélioration de la dégradation concerne seulement les composés dont la dégradation dans les CAS est moyenne, mais pour les composés très récalcitrants ou très biodégradables, aucun effet n’est observé. En conclusion, le taux d’abattement des micropolluants est donc globalement meilleur dans les BRMs que dans les CAS mais reste variable selon la nature et les propriétés du polluant (Tadkaew et al., 2011). Par exemple, Bernhard et al., (2006) ont montré une amélioration de l’élimination de polluants récalcitrants (le diclofenac, l’acide clofibrique et l’acide méthylchlorophénoxypropionique) entre 50-93% dans un BRM contre 13%-24% dans un CAS, mais une élimination d’EDTA et de carbamazépine nulle dans les deux réacteurs. D’après Ahmed et al (Ahmed et al., 2017), l’efficacité des BRMs est fonction de la classe du polluant émergent selon l’ordre suivant : EDCs > PCPs > beta bloquant > PPs > Pesticides.

Ainsi, à cause des structures moléculaires complexes de la plupart de ces polluants et de leur faible concentration, les traitements classiques mis en œuvre dans les stations d’épuration ne suffisent pas et le pourcentage de dégradation de ces molécules peut ne

pas dépasser 10% (Rivera-Utrilla et al., 2013). La nécessité de trouver de nouvelles techniques visant à dégrader ces molécules est donc forte.

2. Traitements tertiaires innovants

Il existe diverses voies innovantes, plus spécifiques pour traiter les micropolluants ; mais elles n’ont pas pour but de remplacer les procédés existants et seraient utilisées en complément (traitement tertiaire), après le traitement biologique. Ce paragraphe détaille ces nouveaux traitements, et le Tableau 1-5 rassemble les avantages et inconvénients de chacun.

Tableau 1-5 : Avantages et inconvénients des traitements tertiaires existants.

Type de traitement	Avantages	Inconvénients
Adsorption	Elimination d’une large variété de polluants Pas de création de sous produits	Problème de régénération des matériaux adsorbants. Coûts de régénération élevés.
Procédés membranaires	Elimination de nombreux micropolluants	Coûts opératoire et énergétique élevés. Colmatage de membranes. Faible élimination des composés hydrophobiques. Pas de dégradation, nécessité de traiter le rétentat.
Procédés d’Oxydation Avancés (POAs)	Elimination de nombreux micropolluants pouvant aller jusqu’à la minéralisation. Cinétiques souvent rapides.	Coûts opératoire, énergétique et de maintenance élevés. Production de sous-produits parfois toxiques.
Oxydation enzymatique	Transformation d’une large gamme de micropolluants.	Coût opératoire élevé lié à la séparation du biocatalyseur. Production de sous-produits parfois toxiques.

a) Adsorption

L’adsorption est un procédé simple permettant le transfert de molécules de la phase liquide à la phase solide, entraînant ainsi une élimination de la molécule sans transformation en sous-produits potentiellement toxiques (Qu, 2008). L’efficacité de ce procédé dépend surtout des propriétés du matériau adsorbant et de la nature du polluant. Le charbon actif (sous forme de poudre : PAC ou granulaire : GAC) est le matériau le plus couramment utilisé. Du fait de sa structure particulière, le charbon actif possède une aire surfacique de pores importante ($>1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) à l’origine de propriétés adsorbantes très importantes (Tadda et al., 2016). Putra et al., (2009) ont atteint un taux

d’abattement en amoxicilline de 95% d’une eau synthétique à 300 mg.L⁻¹ en utilisant du GAC comme adsorbant, et Altmann et al., (2014) ont obtenu un taux d’adsorption de sulfaméthoxazole (de concentration initiale 0,6 µg.L⁻¹) de 60% sur du PAC. Pour le glyphosate ayant un log K_{ow} négatif (= -3,4), l’adsorption n’est probablement pas le traitement le plus adapté à son élimination, comme en témoigne les taux d’abattement compris entre 10-20% sur du PAC rapportés par Jonsson (Jönsson et al., 2013). Cependant, l’utilisation de biochar (charbon issu de la pyrolyse de biomasse) a permis d’obtenir un abattement de 100% de glyphosate (solution initiale à 0,2 mg.L⁻¹) en 2 heures (Dissanayake Herath et al., 2019).

D’autres matériaux moins conventionnels ont été également utilisés dans le but d’adsorber des micropolluants, comme le graphène et des nanotubes de carbone. Par exemple, Borthakur et al., (2018) ont atteint une adsorption de 98,46% et 97,19% de deux perturbateurs endocriniens, respectivement 17a-ethynylestradiol et b-estradiol sur des feuilles de graphène, et Avci et al., (2020) ont éliminé 88% de la ciprofloxacine par adsorption sur des nanotubes de carbone.

b) Procédés membranaires

Les procédés membranaires sont de plus en plus utilisés pour purifier l’eau. Différents procédés existent, en fonction de la sélectivité de la membrane. Ainsi, on retrouve la microfiltration (MF, membrane poreuse (diamètres de 0,1 - 5µm)), l’ultrafiltration (UF, membrane poreuse (diamètres de 0,01 - 0,1µm)), la nanofiltration (NF, membrane poreuse (diamètres de 1-10 nm) et l’osmose inverse (OI, membrane dense) (Dharupaneedi et al., 2019). Les deux derniers procédés cités sont ceux qui permettent une meilleure exclusion des micropolluants du fait de la haute sélectivité des membranes mises en œuvre. L’efficacité du traitement dépend des propriétés de la membrane (nature, morphologie, charge, hydrophobicité) et du polluant (poids moléculaire, charge, hydrophobicité, volatilité). La bonne rétention des composés est basée sur une compétition entre des phénomènes d’exclusions stériques, de répulsions électrostatiques, d’interactions hydrophobes et de mécanismes de sorption/diffusion pour les composés hydrophiles (l’influence du pH du milieu est donc aussi à prendre en compte) (Khanzada et al., 2020; Licona et al., 2018). Si l’osmose inverse peut sembler plus sélective et donc plus efficace que la nanofiltration, les hautes pressions mises en

jeu en OI (entre 500 et 7000 kPa pour l’OI contre 400 et 1400 kPa pour la NF) entraînent une consommation d’énergie bien plus importante, ainsi qu’un risque de colmatage plus rapide de la membrane (Foureaux et al., 2019).

Un taux de réjection de plus de 80% de glyphosate est observé avec une membrane de nanofiltration (NF-300, TFC² polyamide) lors du traitement d’une eau potable contaminée avec ce pesticide (Saitúa et al., 2012) et d’autres chercheurs ont obtenu une rétention de glyphosate entre 82,9% et 91,5% et d’AMPA entre 73,5% et 86,7% sur une membrane de nanofiltration (NFX, TFC polyamide) (Yuan et al., 2018).

c) Procédés d’oxydation avancées

L’oxydation chimique consiste à générer des radicaux, espèces très réactives qui peuvent oxyder une large gamme de molécules organiques ou inorganiques, en allant éventuellement jusqu’à la minéralisation de ces composés. On peut diviser ces procédés en différentes catégories qui sont présentées sur la Figure 1-3 (E.M.N Chirwa and E.E Bamuza-Pemu, 2010; Ghatak, 2014).

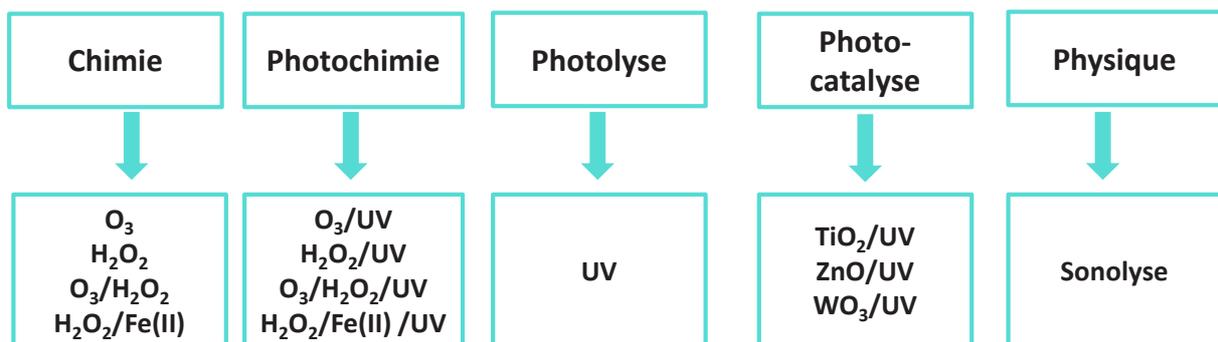


Figure 1-3 : Différentes techniques d’oxydation avancées. Adapté de E.M.N Chirwa and E.E Bamuza-Pemu, (2010).

L’ozone (O_3) est une molécule électrophile qui réagit spécifiquement avec les sites des molécules dont la densité électronique est haute, comme les liaisons insaturées et les cycles aromatiques. Par contre, les radicaux OH^\bullet que l’ozone génère sont beaucoup moins spécifiques et peuvent oxyder tous genres de groupements fonctionnels organiques (Gomes et al., 2017). La cinétique de dégradation de l’ozone est très rapide. Par exemple, l’ozone peut réagir avec le cycle aromatique de la tétracycline et dégrader

² TFC : Thin film composite : Membrane composite à couche mince.

la molécule en quelques minutes (Hopkins and Blaney, 2014; Iakovides et al., 2019; Khan et al., 2010; Wang et al., 2011).

Le principal inconvénient de l’ozonation est la formation de sous-produits dangereux. Ce procédé est donc souvent couplé à d’autres procédés comme l’adsorption sur charbon actif pour éliminer les composés toxiques formés (Guillossou et al., 2020).

Pour accroître l’efficacité du procédé d’ozonation, du peroxyde d’hydrogène (H_2O_2) peut être ajouté, comme en témoigne les travaux de Rosal et al., (2009), qui ont observé une minéralisation totale du COT (Carbone Organique Total) au bout d’une heure, contre seulement 35% de minéralisation sans ajout de H_2O_2 .

Combiner l’ozonation avec un rayonnement UV peut également améliorer l’oxydation. Par exemple, l’élimination de trois micropolluants relativement résistants à l’ozone (l’ibuprofène, l’acide clofibrique, et le chloramphenicol) a été améliorée de 15-43% pour l’ibuprofène, de 5-15% pour l’acide clofibrique, et de 5-10% pour le chloramphénicol avec un procédé O_3/UV comparé à une ozonation classique (Yao et al., 2018).

La photolyse (UV) est également un moyen de plus en plus utilisé pour traiter les micropolluants. Ce procédé dépend de nombreux paramètres comme la longueur d’onde, l’intensité lumineuse, la présence d’autres polluants ou de solides en suspension pouvant absorber la lumière. La photo dégradation de sept micropolluants a été étudiée avec une irradiation naturelle du soleil, mais seuls le sulfaméthoxazole et le triclosan ont été rapidement dégradés par irradiation directe dans une eau ultrapure (moins de 3% de concentration de triclosan après 4h d’irradiation). La dégradation des autres molécules a été grandement améliorée dans une eau d’effluent secondaire, par irradiation indirecte, prouvant le rôle des radicaux hydroxyl OH^\bullet dans le mécanisme (Wang et al., 2017). La photolyse de trois hormones (l’estrone E1, le 17- β -estradiol E2 et le 17- α -éthinyloestradiol EE2) a été étudiée, et seule E1 a été partiellement dégradée par une photolyse UV. En ajoutant du H_2O_2 dans le milieu, une dégradation totale des trois molécules a été observée, ainsi qu’une forte réduction de l’activité oestrogénique (>90%) (Cédat et al., 2016).

Pour améliorer la photo dégradation de molécules, un catalyseur tel que des nanoparticules de dioxyde de titane TiO_2 ou d’oxyde de zinc ZnO peut également être ajouté. En effet, ces particules fonctionnent comme un semi-conducteur et permettent de transformer l’énergie photonique en énergie chimique. La taille nanoparticulaire de ces catalyseurs pose néanmoins un vrai problème de régénération du catalyseur et de

toxicité. Fixer le TiO_2 (ou le catalyseur choisi) permettrait de réutiliser le support catalytique et ainsi de réduire les coûts du procédé. L’utilisation de films minces de TiO_2 est actuellement à l’étude mais il reste encore beaucoup d’inconnues sur le comportement de ces films lors de la purification d’un effluent réel (décrochage du photocatalyseur, photodissolution...) (Rueda-Marquez et al., 2020).

Parmi les autres procédés chimiques existants aujourd’hui, les procédés électrochimiques d’oxydation font l’objet d’attentions particulières, et deux techniques principales émergent, à savoir l’oxydation directe (la dégradation a lieu directement à la surface de l’électrode), et l’oxydation indirecte qui nécessite l’ajout d’un oxydant (l’hypochlorite est souvent utilisé) (Gonzalez-Rivas et al., 2019; Martínez-Huitle and Ferro, 2006).

La sonochimie consiste à émettre un ultrason à haute fréquence pouvant dissocier les molécules d’eau H_2O au moyen d’un phénomène de cavitation afin de produire des radicaux hydroxyl OH^\bullet (Arvaniti et al., 2020). L’antibiotique oxacilline a été complètement dégradé par ce procédé, et l’antidépresseur fluoxetine a été totalement éliminé et minéralisé à 15% après 360 minutes d’irradiation ultrasonique (Serna-Galvis et al., 2016, 2015).

d) Oxydation enzymatique

L’utilisation d’enzymes comme catalyseurs verts pour la dégradation de polluants émergents est de plus en plus étudiée, car ce sont des catalyseurs permettant d’atteindre des cinétiques de réactions très rapides en conditions ambiantes (pression, température, pH, force ionique) avec un faible impact environnemental (Bilal et al., 2019a; Rao et al., 2014). De plus, les enzymes ont moins de risque d’être inhibées par les EPs que les microorganismes des procédés de CAS ou MBRs.

Tous les procédés innovants cités ci-dessus sont prometteurs pour l’élimination de micropolluants dans les effluents et présentent chacun des avantages et des inconvénients (cf Tableau 1-5). Cette thèse s’est focalisée sur la faisabilité du procédé enzymatique pour le traitement des micropolluants en phase aqueuse. La partie suivante développe donc les traitements des micropolluants par voie enzymatique, et plus particulièrement sur les traitements mettant en œuvre des laccases.

III) Traitements enzymatiques

Différents classes d’enzymes ont été étudiées pour la dégradation des micropolluants, comme des oxydoreductases EC1 (laccases, peroxidases, tyrosinases) ; des hydrolases EC3 (cellulases, lipases, proteases) et des lyases EC 4 (décarboxylases, déhydratases) (Demarche et al., 2012; Jung et al., 2002; Krah et al., 2016).

Les oxydoréductases sont les enzymes les plus prometteuses en raison de leur faible sélectivité qui leur permet de réagir avec une grande variété de substrats (Rodríguez et al., 2004; Wen et al., 2009). Ce sont des enzymes extracellulaires provenant généralement de champignons lignivores (qui dégradent de la lignine). Parmi les oxydoréductases, les peroxydases (lignine peroxydase, manganèse peroxydase ou encore versatile peroxydase) et les laccases ont prouvé leur efficacité pour la biodégradation de différentes classes de polluants comme les crésols, les phénols, les herbicides, les pesticides, les colorants, les PPs ou encore les PCPs (Falade et al., 2018; Kües, 2015; Martínková et al., 2016; Mir-Tutusaus et al., 2018). Ces enzymes forment des radicaux qui dégradent le polluant parent en produits moins complexes présentant généralement une meilleure biodégradabilité et une toxicité amoindrie (Alneyadi et al., 2018; Morsi et al., 2020).

Les peroxydases peuvent catalyser une large variété de composés organiques et inorganiques en utilisant le peroxyde d’hydrogène H_2O_2 comme co-substrat (Morsi et al., 2020). La réaction est initiée par l’oxydation de l’enzyme par une molécule d’ H_2O_2 , générant un radical cationique, que l’on appelle composé I, et la réduction simultanée de H_2O_2 en H_2O . Le composé I subit ensuite une réduction, et oxyde un substrat organique pour former le composé II, ainsi qu’un radical organique. Le composé II va finalement oxyder une deuxième molécule du substrat organique pour donner un second radical organique, et l’enzyme sera réduite à sa forme initiale. Les radicaux organiques libres formés seront ensuite responsables de la dégradation des polluants (Battistuzzi et al., 2010; Na and Lee, 2017). Une peroxydase de soja a été testée pour la dégradation de plusieurs EPs et une dégradation supérieure à 95% a été atteinte pour le nonylphenol, l’octylphenol, le triclosan et trois hormones (l’estrone E1, le 17- β -estradiol E2 et le 17- α -éthinyloestradiol EE2), le sulfaméthoxazole s’est montré un peu plus récalcitrant avec seulement 80% de dégradation (Mashhadi et al., 2019). Une manganèse peroxydase a

été étudiée pour dégrader des colorants azoïque, triphenylmethane, anthraquinone, et indigo et a montré des taux de dégradation variables, entre 42% et 95% pour 8 colorants différents (Rekik et al., 2019). Cependant, la matrice de dégradation (présence de solides en suspension ou de matière organique dissoute (DOM)) peut affecter l’efficacité de l’oxydation des polluants. En effet, Auriol et al., (2008, 2007) ont montré que l’élimination d’hormones (E1, E2, E3, EE2) a diminué de 30% dans les échantillons d’effluents réels comparés aux échantillons d’eaux synthétiques, probablement à cause d’autres composés organiques qui concurrencent les substrats visés pour l’accès aux sites catalytiques de l’enzyme. Des résultats similaires ont été trouvés pour la transformation de l’hormone E2 par une peroxydase en présence de DOM (Huang et al., 2013). De plus, le principal inconvénient à l’utilisation de peroxydases est la nécessité d’ajouter du peroxyde d’hydrogène dans le milieu, contrairement aux laccases qui utilisent l’oxygène dissous. (Unuofin et al., 2019).

Les laccases représentent le plus large sous-groupe des polyphénols oxydases, elles sont largement distribuées dans les organismes eucaryotes comme les plantes et champignons mais également chez certains organismes procaryotes (bactéries). La laccase possède 4 atomes de cuivre répartis sur 3 sites catalytiques (T1, T2, T3), et utilise la capabilité redox des ions cuivre pour pouvoir catalyser l’oxydation d’une large gamme de substrats aromatiques (comme les polyphénols, les aminophénols, les diaphénols, les polyamines, les aryl diamines, les anilines...) simultanément avec la réduction d’une molécule d’oxygène en eau (Alcalde, 2007; Giardina et al., 2010). Les trois sites actifs de la laccase sont différenciés par leurs propriétés spectroscopiques : le site T1 possède un atome de cuivre et absorbe intensément à 600 nm (responsable de la couleur bleue de la laccase), le site T2 possède un atome de cuivre et n’absorbe quasiment pas dans l’UV visible, et le site T3 possède deux atomes de cuivre et absorbe à 330 nm. Les sites T2 et T3 sont liés entre eux et forment ainsi un cluster triatomique. Le site T1 est impliqué dans l’oxydation du substrat visé, et capture les électrons qui sont ensuite transférés au cluster triatomique T2/T3, dans lequel la molécule d’oxygène O₂ est réduite en H₂O (Madhavi and Lele, 2009; Riva, 2006; Spina et al., 2019). La Figure 1-4 représente le cycle catalytique de la laccase vis-à-vis d’un substrat phénolique, qui comprend trois étapes principales : la réduction du site T1 par le substrat ; un transfert d’électron du site T1 vers le cluster T2/T3 ; et la réduction d’une molécule d’oxygène par

R) et acyl (-COR)) va faciliter l’attaque électrophile de la laccase (Tadkaew et al., 2011; Yang et al., 2013).

La laccase peut être utilisée soit brute, (c’est-à-dire directement prélevée d’une culture microbienne), soit après purification. Le principal avantage d’utiliser la laccase brute est d’éliminer les étapes de purification et donc de réduire le coût total du procédé. L’utilisation d’extrait brut implique l’existence de paramètres pouvant améliorer ou altérer la dégradation, en jouant le rôle de médiateurs redox ou au contraire d’inhibiteurs. Wehaidy et al., (2018) n’ont cependant pas montré de grande différence d’efficacité de dégradation d’un colorant avec la même laccase, brute ou purifiée. Le choix d’utiliser des enzymes préalablement purifiées a été fait dans cette thèse, la suite de ce chapitre ne traitera donc que de travaux basés sur l’utilisation d’enzymes commerciales ou purifiées.

Le Tableau 1-6 présente des exemples de dégradation de micropolluants avec des laccases purifiées. Les taux de dégradation de la laccase sont assez variables selon les composés. Si les taux sont très élevés pour la plupart des composés phénoliques et des produits pharmaceutiques, certains composés restent récalcitrants comme le glyphosate, l’atrazine, la carbamazépine et le diclofénac qui ont les taux de dégradation les plus faibles (0-24%). Les structures de ces quatre composés sont représentées sur la Figure 1-5.

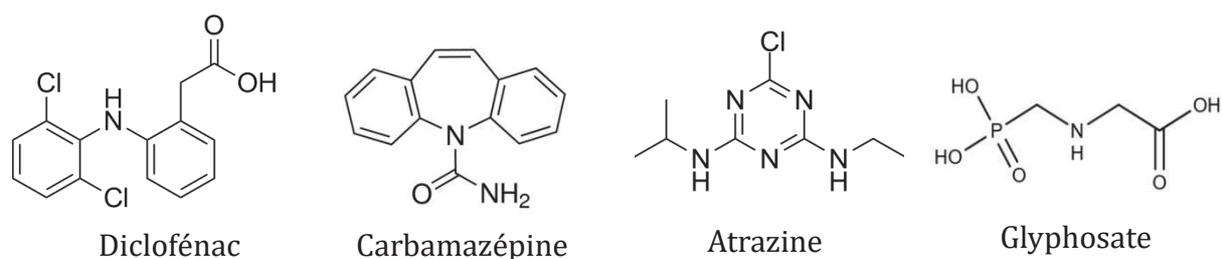


Figure 1-5 : Structures de composés récalcitrants à la dégradation par la laccase : le diclofénac, la carbamazépine, l’atrazine, et le glyphosate.

On remarque que tous ces composés possèdent des groupements accepteurs d’électrons, (chloro, amide, carboxylique...), ce qui confirme l’importance de ce paramètre dans l’efficacité de la dégradation par les laccases. L’utilisation de médiateurs redox peut améliorer la capacité de dégradation de molécules récalcitrantes (structure complexe et/ou potentiel redox élevé) en agissant comme un intermédiaire d’électrons entre

l’enzyme et le substrat. Le mécanisme est représenté sur la Figure 1-6 et consiste en l’oxydation du médiateur par la laccase. Il en résulte la production de radicaux très réactifs qui diffusent loin du site actif de l’enzyme pour réagir avec le substrat visé (Ashe et al., 2016; Parra Guardado et al., 2019).

Tableau 1-6 : Exemples de dégradation de micropolluants par des laccases libres purifiées.

Micropolluants			Laccase		Conditions de réaction	Taux de dégradation	Réf
Nom	Classe	Concentration	Souche	Activité			
Phénol	Industrie chimique	4 mmol.L ⁻¹	<i>Paraconiothyrium variable</i>	5 U.mL ⁻¹	30 min, pH 5, 35°C, 50 rpm	80%	a
Phénol	Industrie chimique	500 µmol.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	2,8 U.mL ⁻¹	6h, pH 6, 25°C	89%	b
Bisphénol A	Industrie chimique	4 mmol.L ⁻¹	<i>Paraconiothyrium variable</i>	5 U.mL ⁻¹	30 min, pH 5, 35°C, 50 rpm	59,7%	a
Bisphénol A	Industrie chimique	200 mg.L ⁻¹	<i>Fusarium incarnatum UC-14</i>	400 U.mL ⁻¹	2h, pH 6, 30°C	91,43%	c
Triclosan	PPs	2 mmol.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	3 U.mL ⁻¹	3h, pH 5, 25°C	100%	d
Diclofénac	PPs	20 mg.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	730 U.L ⁻¹	20h, pH 7, 26°C	24%	e
Carbamazépine	PPs	100 µg.L ⁻¹	<i>Aspergillus ozyzae</i>	180 U.L ⁻¹	24h, pH 6,8, 25°C	2,8% ± 3,9%	f
Estrone	EDC	100 µg.L ⁻¹	<i>Aspergillus ozyzae</i>	180 U.L ⁻¹	24h, pH 6,8, 25°C	94,8% ± 3,1%	
Atrazine	Pesticides	100 µg.L ⁻¹	<i>Aspergillus ozyzae</i>	180 U.L ⁻¹	24h, pH 6,8, 25°C	0%	
4-chlorophénol	Industrie chimique	30 mg.L ⁻¹	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	300 U.L ⁻¹	24h, pH 4,5, 30°C	30%	g
Tétracycline	PPs	20 mg.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>		24h, pH 6, 25°C	30% ± 7%	h
Glyphosate	Pesticides	0,06 mmol.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	150 U.L ⁻¹	24h, pH 6, 35°C	0% ± 4,2%	i

a = Asadgol et al., 2014 ; b = Kurniawati and Nicell, 2008; c = Chhaya and Gupte, 2013; d = Kim and Nicell, 2006; e = Margot et al., 2013; f = L. N. Nguyen et al., 2015 ; g = Chakroun et al., 2010; h = de Cazes et al., 2014 ; i = Pizzul et al., 2009

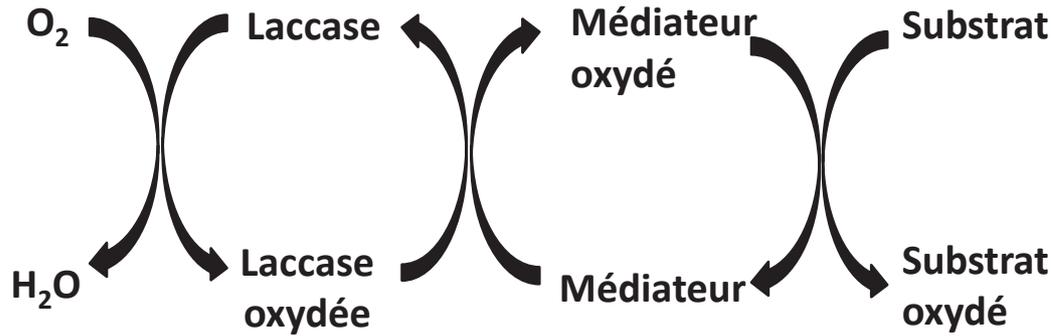


Figure 1-6 : Cycle catalytique d'un système laccase - médiateur

Les médiateurs redox doivent donc être des molécules à faible poids moléculaire pouvant ainsi facilement accéder au site actif de la laccase. Ils doivent être capables de générer des radicaux stables qui n'inactivent pas l'enzyme, et dont la réactivité permet le recyclage du médiateur (Cañas and Camarero, 2010). L'ABTS, le 1-hydroxybenzotriazole (HBT), le 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy (TEMPO) et l'acide violurique (VA) sont des exemples de médiateurs synthétiques couramment utilisés dans les études publiées. Le syringaldéhyde (SYR), la vanilline (VAN) et l'acide p-coumarique (PCA) sont quant à eux les médiateurs naturels les plus utilisés. On distingue principalement trois mécanismes majeurs pour expliquer le fonctionnement des systèmes laccase-médiateur : le transfert d'atome d'hydrogène (HAT), le transfert d'électron (ET) et l'oxydation ionique (IO).

Le mécanisme HAT implique des médiateurs contenant au moins un groupe fonctionnel N-OH (e.g. médiateurs HBT et VA). A la suite d'une abstraction d'un atome d'hydrogène, ces médiateurs vont former des radicaux nitroxyl N-O• qui pourront réagir avec les substrats visés.

Le médiateur ABTS agit selon le mécanisme ET. Quand l'ABTS est oxydé par la laccase, il produit des radicaux cationiques ABTS^{•+} ou ABTS²⁺ qui serviront de transporteurs d'électrons entre le substrat visé et la laccase. Il permet l'oxydation de composés à faible potentiel redox.

Enfin, dans le mécanisme ionique, la laccase oxyde le médiateur (e.g. médiateur TEMPO) en un ion oxoammonium N=O• qui va à son tour oxyder le substrat puis sera réduit en N-hydroxy-TEMPO. Ce composé sera ensuite oxydé à nouveau par la laccase induisant ainsi la régénération de l'ion oxoammonium (Kurniawati and Nicell, 2007).

Tableau 1-7 : Essais de dégradation de micropolluants récalcitrants par des systèmes laccase-médiateurs.

Micropolluant		Laccase		Médiateur		Conditions de réaction	Efficacité (%)	Réf
Nom	Concentration	Souche	Activité enzymatique	Nom	Concentration			
Glyphosate	0,06 mmol.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	150 U.L ⁻¹	ABTS	1 mmol.L ⁻¹	24h, 35°C, pH 6	40,9% ± 3,6 %	a
Tétracycline	50 mg.L ⁻¹	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5 U.mL ⁻¹	HBT	400 ppm	24h, 22°C, pH 7	100%	b
Isoproturon	100 mg.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	0,30 U.mL ⁻¹	HBT	1 mmol.L ⁻¹	24h, 30°C, pH 5	100%	c
Isoproturon	20 mg.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	0,30 U.mL ⁻¹	VA	1 mmol.L ⁻¹	24h, pH 4, 30°C	100%	d
Carbamazépine	0,02 mmol.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	600 U.mL ⁻¹	HBT	0,2 mmol.L ⁻¹	48h	60%	e
Atrazine	500 µg.L ⁻¹	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5,2 U.mL ⁻¹	VA	0,1 mmol.L ⁻¹	24h, 25°C, pH 4,5	73%	f
Atrazine	20 mg.L ⁻¹	<i>Trametes versicolor</i>	0,05 U.mL ⁻¹	HBT	1 mmol.L ⁻¹	8 jours, pH 4, 30°C	90%	d

a = Pizzul et al., 2009 ; b = Sun et al., 2017 ; c = Zeng et al., 2017 ; d = Jin et al., 2016 ; e = Hata et al., 2010 ; f = Ashe et al., 2016

ABTS = 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) ; HBT = 1-hydroxibenzotriazole ; VA = acide violurique.

Le Tableau 1-7 rassemble des essais de dégradation de différents micropolluants récalcitrants impliquant l’utilisation d’un système laccase-médiateur. On remarque que les taux de dégradation des micropolluants récalcitrants s’améliorent nettement en présence d’un médiateur. Par exemple, Pizzul et al., (2009) ont remarqué une augmentation de la dégradation de glyphosate de l'ordre de 40% en présence de 1 mmol.L⁻¹ d’ABTS. Hata et al., (2010) ont également atteint un taux d’élimination de la carbamazépine de 60% en 48 heures avec de l’HBT contre 39% de dégradation en présence de laccase seule.

Cependant, l’ajout du médiateur dans le système présente plusieurs inconvénients. Tout d’abord, les radicaux formés par l’oxydation du médiateur peuvent augmenter la toxicité de l’effluent traité. En effet, Nguyen et al., (2016) ont rapporté qu’un ajout de syringaldéhyde à plus de 10 µmol.L⁻¹ augmente la toxicité de l’effluent traité. Les radicaux générés par la réaction peuvent aussi inactiver la laccase lors du traitement (Ashe et al., 2016; Hata et al., 2010). De plus, l’addition de composé dans le système rend le procédé plus compliqué à mettre en place et plus coûteux.

En conclusion, le traitement de micropolluants par enzymes et notamment par des laccases est prometteur, et montre une grande efficacité vis-à-vis de nombreux substrats, et la possibilité d’ajouter des médiateurs augmente encore la gamme des substrats à éliminer. Cependant, le principal inconvénient de ce procédé est le coût, car l’ajout d’enzymes libres dans le milieu entraîne l’ajout d’une étape de séparation du biocatalyseur à la fin du procédé. Pour pallier cet inconvénient, il existe néanmoins la possibilité d’immobiliser l’enzyme sur divers supports, permettant ainsi de faciliter la séparation et de régénérer le catalyseur et donc de diminuer considérablement le coût du procédé (Brady and Jordaan, 2009).

IV) Immobilisation des enzymes

L’immobilisation résulte de la création d’interactions entre l’enzyme et une matrice solide, et permet donc le passage d’un système homogène en un système hétérogène. Ces interactions peuvent aussi dans certains cas stabiliser la structure de l’enzyme, améliorant sa stabilité vis-à-vis des changements environnementaux de pH, de

température ou encore envers la présence de solvants organiques (DiCosimo et al., 2013; Zdarta et al., 2018c).

1. Techniques d’immobilisation

Il existe plusieurs techniques d’immobilisation d’enzymes, mettant en jeu soit des interactions physiques, soit des interactions chimiques. Les différents types d’immobilisation sont regroupés sur la Figure 1-7 et sont détaillés ci-après.

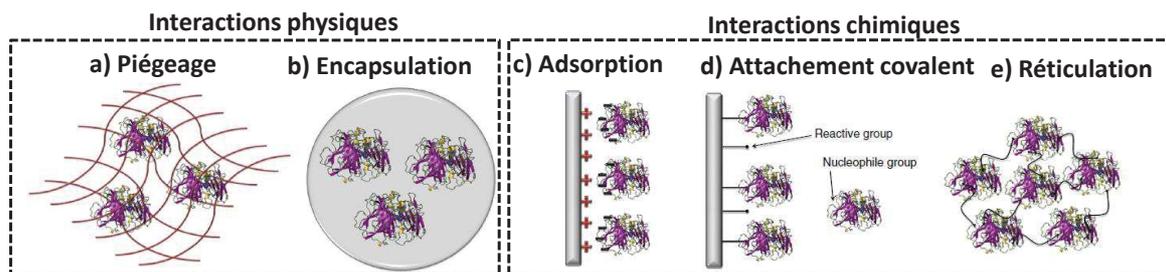


Figure 1-7 : Différents types d’immobilisation des enzymes. Adapté de Fernández-Fernández et al., (2013)

L’immobilisation dite physique des enzymes repose sur le piégeage du catalyseur dans une matrice tridimensionnelle, ou sur l’encapsulation de l’enzyme à l’intérieur de sphères polymériques. Ces deux techniques similaires sont les méthodes d’immobilisation les plus simples et n’entraînent aucune altération structurale de l’enzyme. Cependant, elles ne permettent qu’un faible chargement d’enzymes dans la matrice choisie ce qui engendre d’importantes limitations au transfert de matières (Fernández-Fernández et al., 2013).

L’adsorption est basée sur la création d’interactions faibles, liaisons ioniques ou liaisons de Van der Waals. Le pH, la force ionique du milieu et l’hydrophobicité du support sont les principaux paramètres influant sur l’immobilisation par adsorption. Cette technique n’induit pas non plus d’altération de la structure de l’enzyme, et est peu chère. Néanmoins, les interactions faibles mises en jeu ne sont pas suffisantes pour éviter et/ou limiter le décrochage des enzymes ; cette technique n’est donc pas la plus efficace.

L’attachement covalent permet de créer des liaisons covalentes, plus fortes que les liaisons ioniques, entre les groupements fonctionnels du support et ceux de l’enzyme. Les principaux groupements mis en jeu sont les groupements $-NH_2$, $-SH$, $-COOH$ et $-OH$. L’inconvénient majeur de cette technique réside dans l’altération possible du site

actif de l’enzyme durant l’immobilisation, entraînant une baisse de son activité. Ce défaut est cependant compensé par l’amélioration de la stabilité enzymatique et la minimisation du décrochage des enzymes grâce aux liaisons covalentes mises en jeu.

Il existe aussi une technique d’immobilisation sans support solide, la réticulation, où l’enzyme forme à l’aide d’un réticulant bi fonctionnel des agrégats ou des cristaux, abrégés respectivement CLEAs ou CLECs. L’agent de réticulation le plus utilisé pour l’auto-réticulation des enzymes est le glutaraldéhyde. Cette technique offre l’avantage de ne pas mettre en jeu de support solide, et donc de réduire le coût du procédé. De plus, les interactions mises en jeu sont fortes. Le principal inconvénient de cette technique reste l’ajout d’un agent de réticulation, qui peut également causer une modification structurelle de l’enzyme.

2. Supports d’immobilisation

Choisir la technique d’immobilisation ne peut pas se faire indépendamment du choix du support, paramètre essentiel d’une immobilisation efficace. En effet, un bon support se doit d’avoir de nombreux groupes fonctionnels, une large aire surfacique, être biocompatible, non toxique, et posséder une bonne stabilité structurelle et mécanique (Zdarta et al., 2018c). Les supports d’immobilisation sont variés et peuvent être inorganiques, organiques, ou hybrides.

Les matériaux inorganiques sont utilisés en tant que supports d’enzymes en raison de leurs stabilités chimique et mécanique souvent excellentes. Ils ont aussi l’avantage de posséder des aires surfaciques importantes, et d’être relativement peu chers. Selon les propriétés de surface des supports, l’adsorption d’enzymes est souvent envisageable. Cependant, pour pouvoir créer des liaisons covalentes avec les enzymes, les supports inorganiques doivent la plupart du temps être activés par des agents de fonctionnalisation comme le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) (Zucca and Sanjust, 2014).

Les matériaux à base de silice sont les matériaux inorganiques les plus utilisés pour l’immobilisation des oxydoréductases pour les applications environnementales. Le caractère hydrophile de la surface de silice ainsi que le nombre important de groupes hydroxyles qu’elle contient permet au biocatalyseur de se lier aussi bien par adsorption que par attachement covalent (Debaste et al., 2014; Hommes et al., 2012; Sola-Rabada et

al., 2018). Une laccase de *Cerreana unicolor* immobilisée sur des billes de silice via du glutaraldéhyde a démontré, par rapport à la même enzyme sous forme libre, une stabilité améliorée vis-à-vis du pH (pH 4-9) et de la température (jusqu’à 70°C). Ce système a également permis la dégradation à 80% du bisphénol A, 40% du nonylphénol et 60% du triclosan présents dans une solution à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de chaque micropolluant (Songulashvili et al., 2012).

D’autres oxydes inorganiques ont également été largement étudiés en tant que supports d’immobilisation d’enzymes pour la bio remédiation de micropolluants, comme les oxydes de titane, zinc, aluminium, et fer. Par exemple, la laccase de *Trametes versicolor* a été immobilisée par adsorption sur des nanoparticules de titane. Outre l’amélioration de la stabilité chimique et thermique de l’enzyme, une capacité de dégradation de deux composés phénoliques (2,4-dichlorophénol et 2,6-diméthoxyphénol) de 85% et 60% a été obtenue (Hou et al., 2014). Des supports à base de minéraux (comme le kaolin, la bentonite, l’halloysite ou l’argile) ont également prouvés leur efficacité et ont l’avantage d’être abondants dans la nature et peu chers (Chao et al., 2013; Cheng et al., 2006; Lvov et al., 2014).

Par rapport aux matériaux inorganiques, les matériaux organiques (polymères) sont des supports d’immobilisation de choix grâce à la présence de nombreux groupements fonctionnels, à leur biocompatibilité et la haute affinité qu’ils présentent vis-à-vis des protéines. Ils ont également peu d’impacts négatifs sur la structure de l’enzyme. On distingue dans cette catégorie les polymères synthétiques et les bio-polymères.

L’alcool polyvinylique (PVA) est l’un des polymères synthétiques les plus utilisés, notamment du fait de ses nombreux groupements hydroxyles et du caractère hydrophile de sa surface, le rendant facilement modifiable. Ses formes polyvalentes (fibres, billes ou encore microsphères) le rendent aussi bien adéquat à l’immobilisation par attachement covalent, par piégeage ou encore par encapsulation. Par exemple, Chhabra et al., (2015) ont piégé une laccase de *Cyathus bulleri* dans des billes de PVA pour dégrader un colorant (Acid Red 27). Les enzymes immobilisées ont conservé une bonne activité relative de 70% après 5 mois de stockage, et ont permis une dégradation de près de 90% du colorant présent dans un effluent à une concentration de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Le polyacrylamide, le polyacrylonitrile et le polyethersulfone sont d’autres polymères

synthétiques régulièrement utilisés comme supports d’enzymes pour la bioremédiation (Koklukaya et al., 2016; Nicolucci et al., 2011).

Les biopolymères font l’objet de plus en plus de recherches, car ils créent un microenvironnement biocompatible autour de l’enzyme et sont largement abondants dans la nature. Ils sont également très variés et on compte parmi eux l’alginate, le chitosane, la cellulose, le dextrane, l’agarose, l’agar-agar, la gélatine ou encore le carraghénane (Bilal and Iqbal, 2019). Le Tableau 1-8 présente un récapitulatif des différents biopolymères utilisés comme supports d’immobilisation d’enzymes pour la dégradation de micropolluants.

On remarque que l’immobilisation des laccases sur des supports à base de biopolymères permet généralement d’améliorer la stabilité des enzymes par rapport à la température, et/ou pH au cours du temps. La stabilité opératoire est aussi un paramètre majeur de l’enzyme immobilisée, car pouvoir réutiliser le biocatalyseur plusieurs fois sans avoir à le séparer permet un vrai gain économique en industrie.

Tableau 1-8 : Exemples de dégradation de polluants par des laccases immobilisées sur des supports à base de biopolymères.

Souche laccase	Immobilisation	Support	Stabilité des supports	Nom du polluant	[Polluant]	%dégradation	Réf
<i>Bacillus subtilis</i> <i>MTCC 2414</i>	Piégeage	Sodium alginate	Amélioration de la stabilité pH – T°C	Orange 3R, yellow GR, Tblue	0,1 % p/v	74%, 79%, 71%	a
<i>Ganoderma sp KU- Alk4</i>	Piégeage	Billes cuivre- alginate	Amélioration de la stabilité pH – T°C + Activité de 100% après 9 cycles	Indigo carmine	25 mg.L ⁻¹	100%	b
<i>Trametes versicolor</i>	Attachement covalent	Chitosan	Activité de 100% après 9 cycles	2,4 DCP, 4- chlorophénol, 2- chlorophénol	25 mg.L ⁻¹	74%, 75%, 69%	c
<i>Trametes versicolor</i>	Attachement covalent	Billes de chitosan	90% d’activité après 28 jours de stockage à 4°C + 71,24% d’activité au 10 ^{ème} cycle	BPA	10 mg.L ⁻¹	99%	d
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Adsorption ionique	Monoaminoethyl- N-aminoethyl MANAE-agarose	Amélioration de la stabilité T°C et stockage + 90% d’activité après 15 cycles	BPA	100 mg.L ⁻¹	100%	e
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	Piégeage	Gel alginate- gelatine	Amélioration de la stabilité T°C + 80% d’activité après 5 cycles	Colorant (crystal violet)	0,083 mmol.L ⁻¹	90%	f

a = Narayanan et al., 2015 ; b = Teerapatsakul et al., 2017 ; c = Zhang et al., 2008 ; d = Bilal et al., 2019c ; e = Brugnari et al., 2018 ; f = Mogharabi et al., 2012. 2,4 DCP = 2,4-dichlorophénol ; BPA : Bisphénol A

Asgher et al., (2017) ont comparé les performances de trois polymères utilisés pour le piégeage de la laccase de *Trametes versicolor*: un polymère synthétique (le polyacrylamide) et deux bio-polymères (l’agar-agar et la gélatine). Les trois polymères ont montré une stabilité largement améliorée (température, pH, stockage) comparée à celle de la même enzyme sous sa forme libre.

Relativement peu de recherches sont dédiées à l’utilisation de la gélatine comme support d’immobilisation d’enzymes par rapport à d’autres bio-polymères comme l’alginate et le chitosan. Mais sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et l’abondance dans sa structure de groupements fonctionnels $-NH_2$ font de ce matériau un support prometteur et respectueux de l’environnement. Ce biopolymère a été choisi pour ces travaux de thèse. La prochaine partie se concentre donc exclusivement sur la formation de supports à base de gélatine et sur les mécanismes probables mis en jeu lors du greffage d’enzymes à leur surface.

3. La gélatine comme support d’immobilisation d’enzymes

a) Présentation et formation des sphères

La gélatine est une protéine issue de la dénaturation du collagène. Elle est obtenue par chauffage du collagène suivi d’un traitement acide ou basique selon l’origine du collagène. La gélatine provenant de couennes de porcs (appelée type A) subit un traitement acide ; la gélatine issue des os et des peaux de bovins (appelée type B) subit un traitement basique. La gélatine est particulièrement adéquate pour former des supports solides d’immobilisation grâce à ses propriétés gélifiantes à température ambiante. Aussi, son caractère biocompatible et biodégradable font de la gélatine l’un des bio polymères les plus utilisés dans l’industrie agroalimentaire (comme agent émulsifiant, épaississant, gélifiant), et pharmaceutique (micro encapsulation de substances actives) (Mariod and Adam, 2013). En effet, lors d’un abaissement de la température en dessous de la température de gélification de la gélatine, les chaînes de polymères subissent une transformation structurelle et passent d’une conformation amorphe à ordonnée en régénérant la structure en triple hélice du collagène ; cela permet notamment la fabrication de films ou de membranes à base de gélatine (Biscarat et al., 2015). La formation de microsphères de gélatine a été largement étudiée notamment pour des applications pharmaceutiques, et les procédés les plus

couramment utilisés sont l'ionisation à pression atmosphérique (électrospray), l'atomisation (spray drying) et l'émulsification (Bruschi et al., 2003; Esposito et al., 1996; Gómez-Estaca et al., 2015). L'électrospray consiste en la dispersion d'un liquide sous forme de gouttelettes chargées électriquement, ce procédé est déjà largement utilisé pour former des nano/microparticules de différentes substances. Les principaux avantages de ce procédé sont l'obtention de particules avec une distribution étroite de tailles, et l'absence d'étape de séparation des particules d'un solvant. Ce procédé est cependant coûteux en énergie.

Le procédé de spray-drying consiste en la transformation d'une solution liquide en une poudre par une étape de séchage par atomisation. Cette technique peut se dérouler en continu et s'applique à de nombreuses solutions de biopolymères. Cependant, beaucoup de paramètres opératoires sont à contrôler pour éviter des rendements faibles, et les problèmes d'adhésion du produit sur l'appareil (Billon et al., 2000).

Beaucoup de chercheurs utilisent aussi l'émulsification voire l'émulsification membranaire pour former des microsphères de gélatine (Cortesi et al., 1999; Jian Li et al., 2016; A. H. Nguyen et al., 2015; Vandelli et al., 2001). Si l'utilisation d'une phase organique et donc d'une émulsion eau dans huile (w/o) est la plus courante, la possibilité de former des billes de gélatine dans une phase aqueuse est plus en plus étudiée car elle permet d'éviter l'étape de rinçage des sphères pour éliminer les solvants organiques souvent toxiques (Kong et al., 2011). Le mélange de deux solutions aqueuses de polymère concentrées non miscibles peut aboutir à une séparation de phases et à une ségrégation de gouttelettes d'un polymère par rapport à l'autre formant ainsi une émulsion eau dans eau (w/w).

En mélangeant deux polymères à concentrations assez élevées, on peut observer un système aqueux à deux phases (SADP), avec une séparation de phase entre les deux phases hydrophiles.

Ce procédé est compliqué à mettre en place car la plupart des émulsions eau/eau sont instables en raison d'une faible tension superficielle à l'interface (Esquena, 2016). Néanmoins, utiliser un polymère ayant la capacité de gélifier sous l'effet d'un stimulus (e.g. un changement de température, de force ionique ou de pH selon le composé) comme phase dispersée permet de favoriser la création des microsphères ou de billes

(Millqvist-Fureby, 2014). Pour la phase continue, le polyéthylène glycol est intéressant car il possède un large volume d’exclusion envers les protéines et permet la coacervation des molécules de gélatine (Harris, 1992; Jizomoto, 1985). De plus, il est non toxique, biocompatible et permet de préserver l’activité biologique dans le cas d’encapsulation de substances actives comme des enzymes ou peptides. Ainsi, la séparation de phase induite par le polyéthylène glycol a permis de préparer des microsphères à partir de plusieurs biopolymères comme le dextrane, l’amidon, l’agarose et la gélatine (Stenekes et al., 1999; Li et al., 2018; Li and Liu, 2018; Lee et al., 2020).

b) Réticulation de la gélatine : mécanisme et application éventuelle pour le greffage d’enzymes.

La gélatine étant hydrosoluble, un traitement des billes formées est nécessaire pour assurer la résistance à l’eau du support au cours du temps. La réticulation chimique consiste à créer des liaisons covalentes au sein d’un polymère, soit par une activation physico-chimique (irradiation, changement de pression, de température, de pH), soit par l’ajout d’une molécule appelée agent de réticulation permettant la formation de liaisons covalentes entre les chaînes. Le glutaraldéhyde (GTA) est le réticulant le plus utilisé pour les protéines, car il est extrêmement réactif et peu cher. Il possède deux fonctions aldéhydes et a une structure monomérique assez simple, mais en solution aqueuse selon le pH de la solution il se présente sous de multiples formes (cf Figure 1-8).

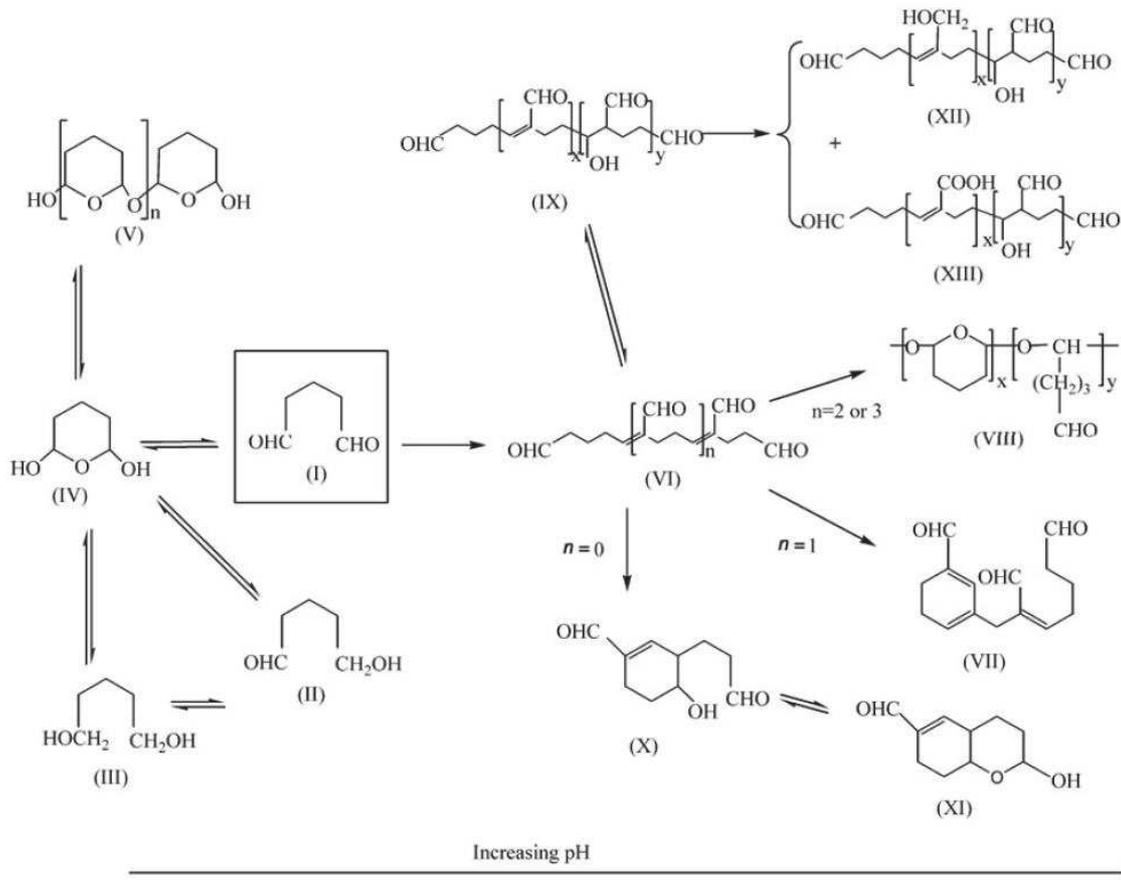


Figure 1-8 : Formes possibles du GTA en solution aqueuse. Source : (Migneault et al., 2004)

Il est donc difficile de donner un mécanisme simple pour la réticulation de la gélatine par le GTA, plusieurs réactions se déroulent probablement en même temps, et elles ne seront pas les mêmes selon le pH de la solution.

En milieu basique, l’hypothèse la plus couramment acceptée dans la littérature est la réaction entre les groupements aldéhydes du GTA et les résidus lysines de la gélatine pour former une base de Schiff, simultanément avec la polymérisation des molécules de GTA par aldolisation. Les groupements imines des bases de Schiff formées seront ainsi stabilisés grâce à la conjugaison des doubles liaisons créées par l’aldolisation (Dardelle et al., 2011; Farris et al., 2010; Monsan et al., 1975). La Figure 1-9 représente le mécanisme entre les résidus lysine de la gélatine et le GTA sous conditions basiques.

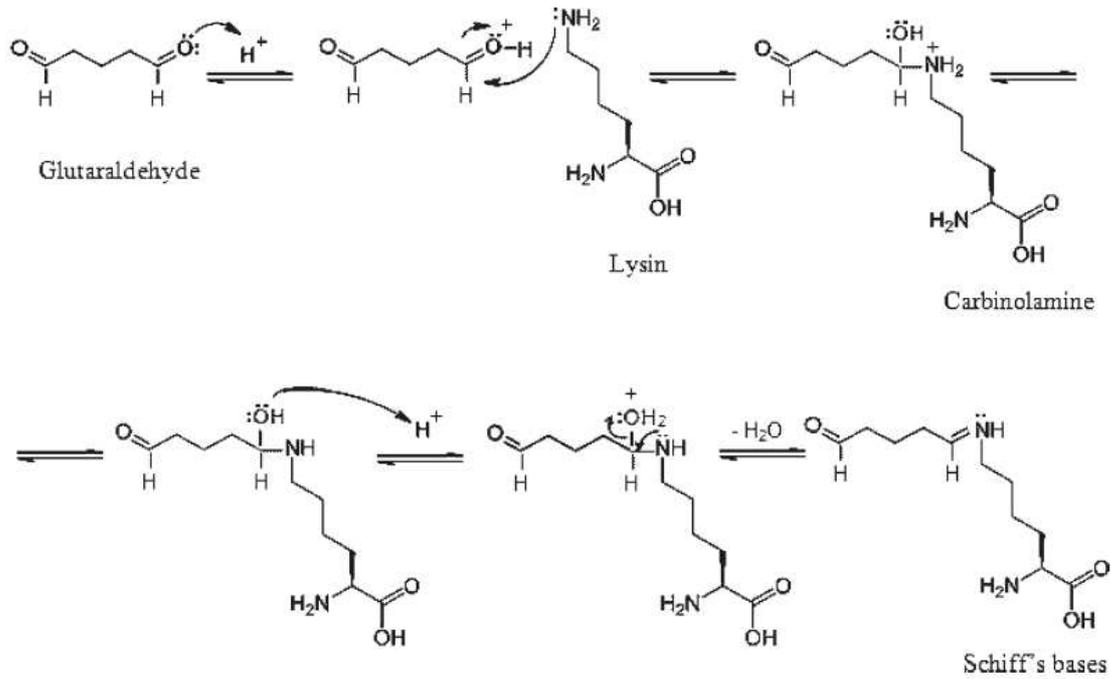


Figure 1-9 : Mécanisme de réticulation de la gélatine par le GTA en milieu basique. Source : Farris et al., (2010).

En milieu basique, on peut aussi observer un autre mécanisme impliquant une addition nucléophile de Michael sur la double liaison C-C des oligomères α - β -insaturés (forme VI du GTA représenté sur la Figure 1-8). Cette réaction résulte cependant en la formation d'un produit moins stable, car sans effet de conjugaison des double liaisons C-C (Migneault et al., 2004).

En milieu acide, la protonation des groupements amines de la gélatine défavorise les réactions nucléophiles. Ce sont ici plutôt les groupements hydroxyles des hydroxyproline et des hydroxylysine qui seraient en jeu, formant des hémiacétales. La Figure 1-10 représente le mécanisme correspondant.

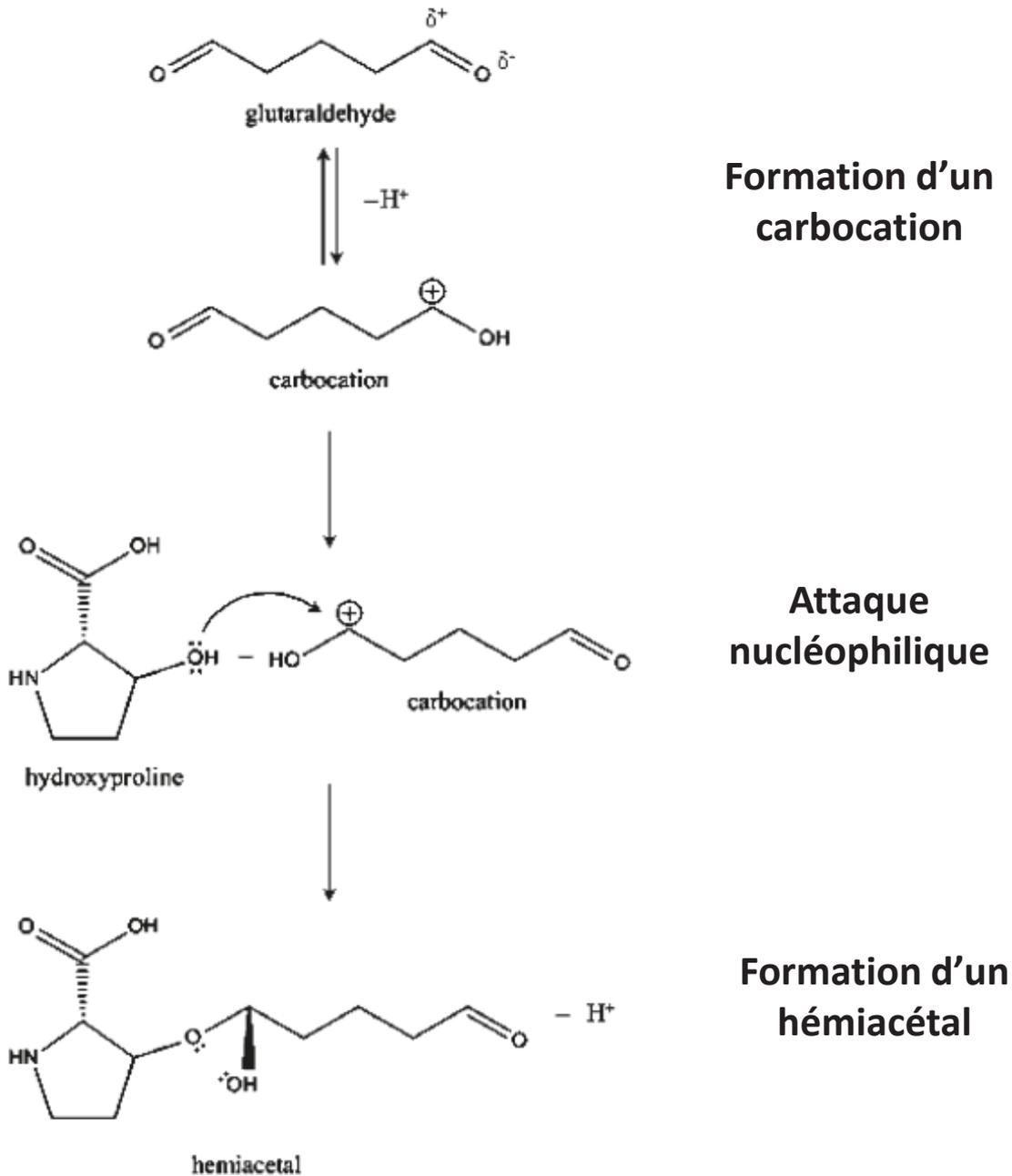


Figure 1-10 : Mécanisme de réticulation de la gélatine par le GTA en milieu acide. Source : Farris et al., (2010)

La laccase possédant des groupements amines tout comme la gélatine, il est probable qu'un groupement aldéhyde restant libre après la réaction de réticulation de la gélatine puisse se lier avec un groupement NH_2 de l'enzyme par le même mécanisme. Dans le cas idéal, un premier groupement aldéhyde est lié de façon covalente avec un groupement amine de la gélatine, et le deuxième est lié avec un groupement amine de l'enzyme.

Cependant, en réalité il est compliqué de savoir précisément quels mécanismes sont mis en jeu et dans quelle mesure les enzymes sont bien fixées de façon covalente à la surface

du support. En effet, la surface de la bille de gélatine activée par le GTA est en fait un support hétérofonctionnel, sur lequel trois interactions différentes peuvent se dérouler : (1) formation de liaisons covalentes, (2) interactions hydrophobiques (provenant du GTA dimérique), et (3) interactions ioniques (par un échange d’anions provenant des groupements amines cationiques) (Barbosa et al., 2014, 2013). La Figure 1-11 représente ces trois interactions possibles sur des supports activés par le GTA. Le mécanisme d’adsorption ionique étant bien plus rapide à mettre en place que le mécanisme d’attachement covalent, une grande partie des enzymes est donc dans un premier temps probablement adsorbée sur le support, puis des liaisons covalentes se mettent en place. Cela a néanmoins des avantages car cette réaction ionique rapide stabilise l’enzyme, on évite ainsi des causes d’inactivation de l’enzyme comme l’autolyse ou une distorsion du site actif (Mateo et al., 2007).

Les paramètres choisis lors du greffage de l’enzyme sont donc primordiaux car ils peuvent influencer la réaction prédominante. Par exemple, augmenter fortement la force ionique de la solution permettra de privilégier une première adsorption hydrophobique, et au contraire utiliser une très faible force ionique favorisera l’adsorption ionique (Barbosa et al., 2014; López-Gallego et al., 2005). Les concentrations en réticulant et en laccase, et les temps de contact sont également à surveiller pour un greffage efficace. Plusieurs manières existent justement pour qualifier et quantifier ce greffage et sont détaillées dans la prochaine partie.

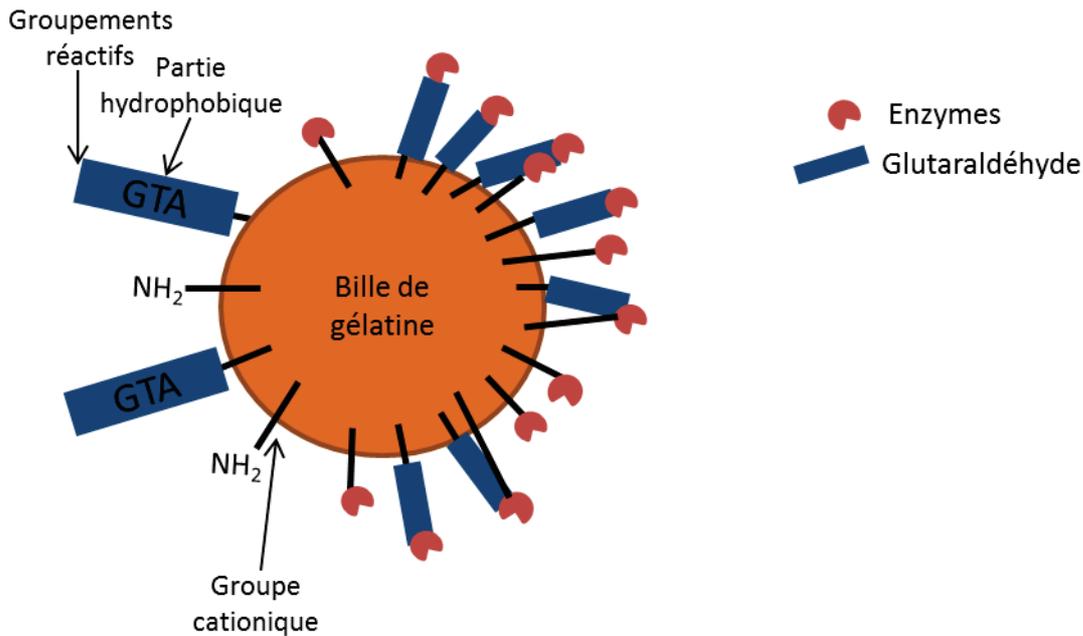


Figure 1-11 : Schéma des différentes interactions (covalentes ou ioniques) des laccases à la surface des billes de gélatine.

4. Caractérisation de l'immobilisation d'enzymes sur un support.

Pour s'assurer de l'efficacité du protocole d'immobilisation, il est important de s'assurer que les conditions opératoires sont sans effet sur l'activité de l'enzyme libre. En effet les conditions d'immobilisation sur certains supports nécessitent des pH très basiques (par exemple les glyoxal), ou l'ajout de détergents (le cas des lipases par exemple) peuvent conduire à la dénaturation du biocatalyseur (Mateo et al., 2005; Palomo et al., 2002).

Le rendement d'immobilisation est le paramètre le plus utilisé pour quantifier le greffage et correspond au ratio entre la quantité résiduelle d'enzymes dans le surnageant après immobilisation sur la quantité d'enzyme présente dans la solution initiale.

Il est possible d'exprimer ces quantités soit en termes d'activité enzymatique ou en quantités de protéines greffées (souvent déterminée par un dosage de Lowry). La deuxième possibilité est plus problématique car l'enzyme même commerciale est rarement pure, elle peut même correspondre dans certains cas à moins de 30% de la quantité totale de protéines (Boudrant et al., 2019). De plus, cette méthode n'est pas envisageable si le support est aussi de nature protéique (comme c'est le cas avec la

gélatine). Le rendement d’immobilisation dépend également des volumes et des concentrations mises en jeu.

Un autre paramètre moins souvent rapporté dans les publications est l’activité exprimée qui correspond au ratio entre la quantité d’enzymes immobilisées et la quantité d’enzymes présentes dans la solution initiale.

L’immobilisation des enzymes permet en général une augmentation de la stabilité des biocatalyseurs même si elle peut engendrer parfois, en parallèle une diminution de leur réactivité (Bilal et al., 2019b). Néanmoins son avantage majeur est lié à la possibilité de réutiliser les enzymes facilitant ainsi grandement leur mise en œuvre à l’échelle industrielle. La prochaine partie se concentre sur la présentation de ces types de réacteurs (le réacteur agité, le réacteur membranaire, ou encore le réacteur à lit fixe ou fluidisé) et leurs avantages pour la biorémediation de micropolluants.

V) Réacteurs enzymatiques

1. Réacteur agité

Le réacteur agité, représenté sur la Figure 1-12, est le réacteur enzymatique le plus simple.

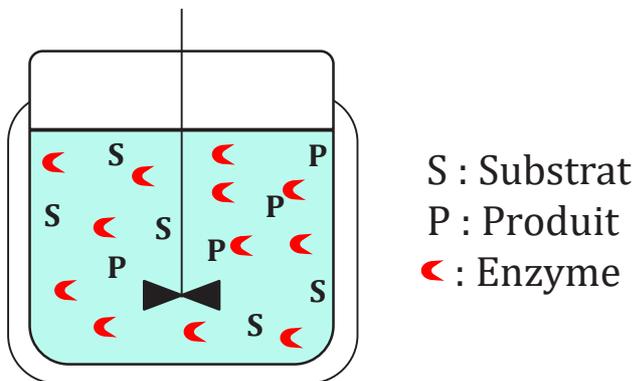


Figure 1-12 : Réacteur enzymatique agité.

Il est souvent réalisé en configuration batch comme représenté sur le schéma, sans entrée ni sortie. Les réacteurs agités peuvent contenir des enzymes sous leur forme libre ou immobilisée. Dans les réacteurs agités batch avec des enzymes libres, l’agitation assure une bonne homogénéité de la solution et un contact optimal entre le substrat et le catalyseur. Cependant, il faut songer à une séparation du catalyseur à la fin du procédé,

ce qui complique l’extrapolation à grande échelle. De plus, l’agitation peut provoquer des contraintes de cisaillement entraînant une inactivation des enzymes. Ces réacteurs sont néanmoins très intéressants à l’échelle laboratoire quand des petits volumes sont en jeu. La forme immobilisée de l’enzyme facilite la séparation et permet sa réutilisation mais représente quand même un challenge pour l’extrapolation à échelle industrielle (Arca-Ramos et al., 2018).

Les réacteurs agités continu (RAC) existent également et consistent juste à rajouter une entrée (la solution de substrat) et une sortie (contenant les produits de réaction). Le principal avantage des RAC réside dans la simplicité de mise en place, son faible coût, et dans la facilité de contrôle de la température et du pH. Le temps de rétention hydraulique (HRT) est ici le paramètre le plus influent sur l’efficacité de la réaction. Dans ce cas, l’enzyme ne doit pas être sous sa forme soluble, et il faut prévoir un dispositif pour conserver le catalyseur dans le réacteur, comme par exemple une membrane.

2. Réacteur enzymatique à membrane (REM)

Deux configurations de réacteur enzymatique à membrane existent dans la littérature. La première configuration, (représentée sur la Figure 1-13 A), consiste en fait au couplage d’un réacteur enzymatique agité à une boucle de filtration. La membrane permet de retenir le catalyseur libre à l’intérieur du réacteur qui est alimenté en continu par la solution de substrat, et les produits de réactions sont transférés avec le perméat. Le choix de seuil de coupure de la membrane est donc primordial, car il faut dans le même temps assurer la rétention du biocatalyseur et du substrat et le transfert des produits de réaction. Ce type de réacteur convient plus particulièrement au cas où les produits de la réaction présentent une taille très inférieure à celles de l’enzyme et du substrat. Le principal inconvénient de ce type de réacteur réside dans la perte d’activité enzymatique liée à la mise en circulation du biocatalyseur. Des problèmes de colmatage de la membrane sont aussi à prévoir, soit par la formation d’une couche des protéines, soit par des réactions de polymérisation qui peuvent se produire dans le cas d’oxydation de certains composés phénoliques côté réacteur (Lema Rodicio et al., 2014; L. N. Nguyen et al., 2015). Cela peut entraîner une perte de productivité suite à la réduction du flux. Aussi, cette proximité engendrée entre les sous-produits et l’enzyme peut causer des problèmes d’inhibition enzymatique.

Dans la seconde configuration (Figure 1-13 B), la membrane agit à la fois comme barrière sélective pour les produits et comme support d’immobilisation des enzymes (par adsorption, liaison covalente ou encore piégeage selon les propriétés du matériau membranaire). Ce procédé permet de limiter beaucoup d’inconvénients. Tout d’abord, l’amélioration de la stabilité enzymatique est assurée par l’immobilisation du catalyseur sur et/ou à l’intérieur des pores de la membrane. De plus, la réaction se déroule à l’interface de la membrane, chaque pore devient un microréacteur, les distances de diffusions sont donc réduites et la rencontre enzyme-substrat en est facilitée. (Matthias de Cazes et al., 2014).

Le Tableau 1-9 présente quelques exemples de dégradation de micropolluants par des réacteurs enzymatiques des deux configurations.

Ces réacteurs sont intéressants car leur extrapolation à grande échelle est assez simple, et plusieurs REMs en série peuvent être installés en cas de faible conversion sur une seule étape. Plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour améliorer l’efficacité du procédé. Par exemple, en passant d’une membrane d’ultrafiltration de seuil de coupure 30 kDa à une membrane de nanofiltration de seuil de coupure 200 Da, le taux de dégradation de 5 micropolluants récalcitrants (l’atrazine, la carbamazépine, le sulfaméthoxazole, le diclofénac et l’oxybenzone) a été largement amélioré, passant d’un taux de dégradation moyen compris entre 20-85% à 92-99,9% (Asif et al., 2018).

Tableau 1-9 : Essais de dégradation de micropolluants par des laccases dans des réacteurs enzymatiques à membranes.

Souche laccase	Configura- tion	Membrane		Dégradation micro-polluant			Réf
		Type de membrane	Type d’immobilisation	Nom	[polluant]	% dégradation	
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	UF PAN à fibre creuse, 6 kDa.	/	BPA / Diclofénac	570 / 480 $\mu\text{g.L}^{-1}$	85%/60%	a
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	UF PVDF, 30 kDa	/	Atrazine, CBZ, SMX, diclofénac, oxybenzone	1 mg.L^{-1}	20-85%	b
		NF PA TFC, 200 Da			1 mg.L^{-1}	92-99,9%	
<i>Myceliophthora thermophila</i>	A	UF PESU, 10 kDa	/	E1 / E2	5 mg.L^{-1}	95-99%	c
<i>Trametes versicolor</i>	A	NF 270, PP-PA TFC, 300 Da	/	BPA	20 mg.L^{-1}	95%	d
<i>Myceliophthora thermophila</i>	A	Céramique (TiO_2), $\Phi_{\text{pores}} = 1 \text{ nm}$	/	BPA	75 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97%	e
<i>Trametes versicolor</i>	B	Céramique (α -alumina), $\Phi_{\text{pores}} = 0,2 \mu\text{m}$	Attachement covalent (gélatine + GTA)	TC	20 mg.L^{-1}	87%	f
<i>Trametes versicolor</i>	B	PVDF; $\Phi_{\text{pores}} = 0,1 \mu\text{m}$	Attachement covalent (nanoparticules de TiO_2 , APTES + GTA)	CBZ + médiateur : PCA	20 $\mu\text{g.L}^{-1}$	71%	g
<i>Trametes versicolor</i>	B	Céramique (TiO_2), $\Phi_{\text{pores}} = 1,4 \mu\text{m}$	Attachement covalent (gélatine + GTA)	BPA	20 mg.L^{-1}	100%	h

UF : Ultrafiltration ; NF : Nanofiltration ; PAN : Polyacrylonitrile ; PVDF : Polyvinylidene fluoride ; PA : Polyamide ; PESU : Polyethersulfone ; PP-PA : polyamide à base de piperazine ; TFC : Thin film composite.

a = Nguyen et al., 2014 ; b = Asif et al., 2018 ; c = Lloret et al., 2012a ; d = Escalona et al., 2014 ; e=Arca-Ramos et al., 2015 ; f = de Cazes et al., 2015 ; g = Ji et al., 2016 ; h = Barrios-Estrada et al., 2017.

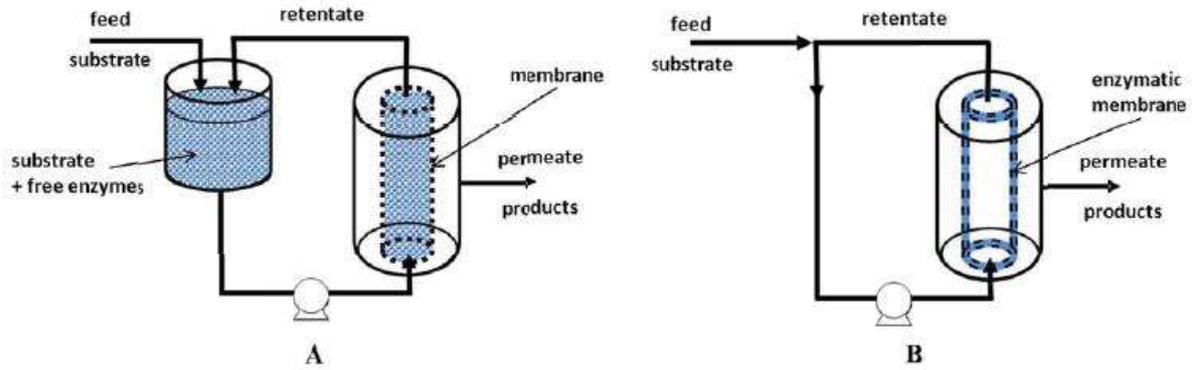


Figure 1-13 : Configurations possibles de réacteurs enzymatiques à membrane : (A) Un réacteur enzymatique agité couplé à une unité de filtration ; (B) Une seule unité de transformation et de séparation. Source : (Matthias de Cazes et al., 2014).

3. Réacteur à lit fixe.

Un autre réacteur enzymatique couramment utilisé est le réacteur à lit fixe, représenté sur la Figure 1-14. Les enzymes immobilisées sont greffées sur des particules composant le lit du réacteur, et la solution de substrat traverse ce lit. Ce réacteur peut être configuré en mode batch ou continu et l'extrapolation à l'échelle industrielle est facilitée grâce à une importante aire surfacique par rapport au volume de réaction, et à un coût opérationnel relativement bas (Dal Magro et al., 2020). Le Tableau 1-10 regroupe quelques essais de bio remédiation de micropolluants en réacteur à lit fixe.

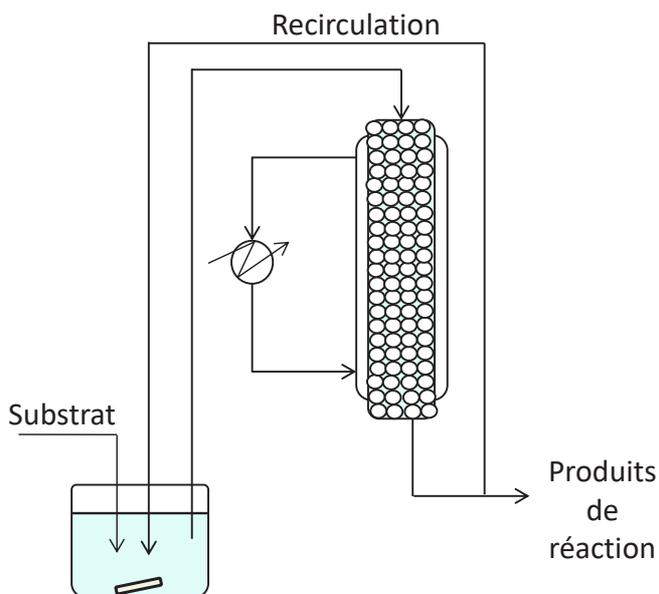


Figure 1-14 : Réacteur enzymatique à lit fixe, avec des enzymes greffées sur des particules sphériques.

Tableau 1-10 : Essais de dégradation de micropolluants à l'aide de réacteurs à lit fixe ou lit fluidisé.

Type de réacteur	Souche laccase	Immobilisation		Micropolluant			Ref
		Support	Technique	Nom	[polluant]	Taux de dégradation	
Lit fixe	<i>Aspergillus oryzae</i>	GAC	Adsorption	SFX, CBZ, diclofénac, BPA	2,5 mg.L ⁻¹	94%, 92%, 95%, 97%	a
Lit fixe	<i>Polyporus rubidus</i>	Billes sodium-alginate	Encapsulation	Réactive blue, Remazol black 5, Réactive orange, Congo red	100 mg.L ⁻¹	85%, 100%, 90%, 100%	b
Lit fixe	<i>Streptomyces psammoticus</i>	Billes calcium-alginate	Encapsulation	Phénol	1 mg.mL ⁻¹	70%	c
Lit fixe	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Eupergit c	Attachement covalent	Estrone, 17-b-estradiol, 17-a-éthynylestradiol	5 mg.L ⁻¹	65%, 80%, 80%	d
Lit fluidisé	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Eupergit c	Attachement covalent	Estrone, 17-b-estradiol, 17-a-éthynylestradiol	5 mg.L ⁻¹	76-90%	e
Lit fluidisé	<i>Trametes versicolor</i>	Particules de silice mésoporeuses	Attachement covalent	BPA	25 mg.L ⁻¹	90%	f
Lit fluidisé	<i>Trametes versicolor</i>	Billes de polyacrylonitrile	Attachement covalent	Bisphénols : BPA, BPB, BPF, TCBPA	1 mmol.L ⁻¹	≈ 100%	g
Lit fluidisé	<i>Trametes versicolor</i>	Microbilles d’acrylate fonctionnalisées	Attachement covalent	Bleu de méthylène Carbaryl	100 mg.L ⁻¹	63% 71%	h

a = Nguyen et al., 2016a ; b = Dayaram and Dasgupta, 2008 ; c = Niladevi and Prema, 2008 ; d = Lloret et al., 2012c ; e = Lloret et al., 2012b; f = Piao et al., 2019 ; g = Nicolucci et al., 2011 ; h = Bayramoglu and Arica, 2019.

Cependant, un fort risque de colmatage du lit existe, causant l’apparition de chemins préférentiels à travers la colonne et des problèmes d’homogénéité. De plus, en alimentant la solution de substrat par le haut de la colonne, on a une compaction du lit et des pertes de charge importantes sont à prévoir.

4. Réacteurs à lit fluidisé.

Pour pallier les inconvénients rencontrés avec les réacteurs à lit fixe, les réacteurs à lit fluidisés sont souvent utilisés. Le colmatage est limité grâce à la fluidisation et la bonne homogénéisation du milieu favorise la réaction. Le majeur inconvénient de ce réacteur est la dépense supplémentaire d’énergie nécessaire pour fluidiser le lit.

La Figure 1-15 représente un réacteur enzymatique à lit fluidisé.

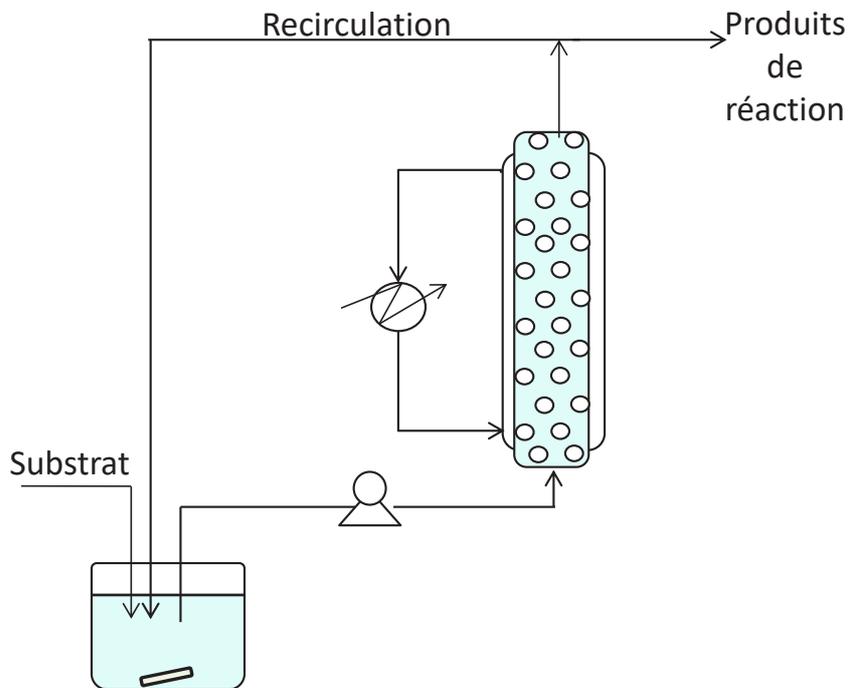


Figure 1-15 : Réacteur enzymatique à lit fluidisé, avec des enzymes greffées sur des particules sphériques.

a) Généralités sur la fluidisation

La fluidisation permet la mise en suspension de particules solides à l’aide d’un courant ascendant d’un fluide. On parle de fluidisation hétérogène si le fluide est un gaz, (souvent de l’air, ou de l’oxygène) et de fluidisation homogène si le fluide est un liquide (le cas de notre projet). Le contact privilégié entre les phases en présence dans le réacteur permet d’éviter la formation de chemins préférentiels, d’obtenir des

coefficients de transfert de matière très élevés et ainsi de considérer le milieu comme parfaitement mélangé (Ray, 2012).

Plusieurs paramètres influencent la fluidisation, comme la forme du réacteur (généralement des colonnes cylindriques ou carrées), les dimensions (notamment la hauteur du lit et le diamètre de la colonne, qui influent sur ce qu’on appelle le ratio d’aspect), les propriétés des particules (taille des particules, densité, propriétés de surface), et la vitesse superficielle du fluide U_0 (Bello et al., 2017). Cette vitesse (aussi appelée vitesse en fût vide) est définie par le rapport du débit volumique du fluide sur la section droite de la colonne. Ce paramètre est primordial car il est responsable de la fluidisation des particules et influe donc sur le mélange des particules, et sur le transfert de matière et de chaleur. On distingue en effet trois phases selon la valeur de la vitesse superficielle mise en jeu :

- Lorsque la valeur de U_0 est faible, le lit est considéré comme fixe et les particules ne bougent pas. La perte de charge à travers la couche augmente linéairement en fonction de U_0 , cette évolution correspond à la partie linéaire de la courbe présentée sur la Figure 1-16.
- Lorsque U_0 dépasse la valeur $U_{0,mf}$ correspondant à la vitesse minimale de fluidisation, le lit subit une expansion et la hauteur de lit augmente avec la vitesse. La perte de charge devient constante et est définie par la relation (1.1) explicitée ci-dessous.
- Si la vitesse superficielle dépasse une valeur limite U_t appelée vitesse terminale, les particules sont entraînées avec le fluide à l’extérieur de la colonne, la perte de charge décroît et on parle de transport pneumatique (Figure 1-16).

Au sein du lit fluidisé, la perte de charge est régie selon l’équation (1.1) (obtenue par un bilan des forces sur une particule du lit) :

$$\Delta P = H_{mf} * (1 - \varepsilon_{mf}) * (\rho_s - \rho) * g \quad (1.1)$$

Avec ΔP : la perte de charge en Pa

H_{mf} : Hauteur de couche du lit au minimum de fluidisation en m

ε_{mf} : Porosité du lit au minimum de fluidisation

ρ_s : Masse volumique de la couche en kg.m^{-3}

ρ : Masse volumique du fluide en kg.m^{-3}

g : la constante gravitationnelle ($9,81 \text{ m.s}^{-2}$)

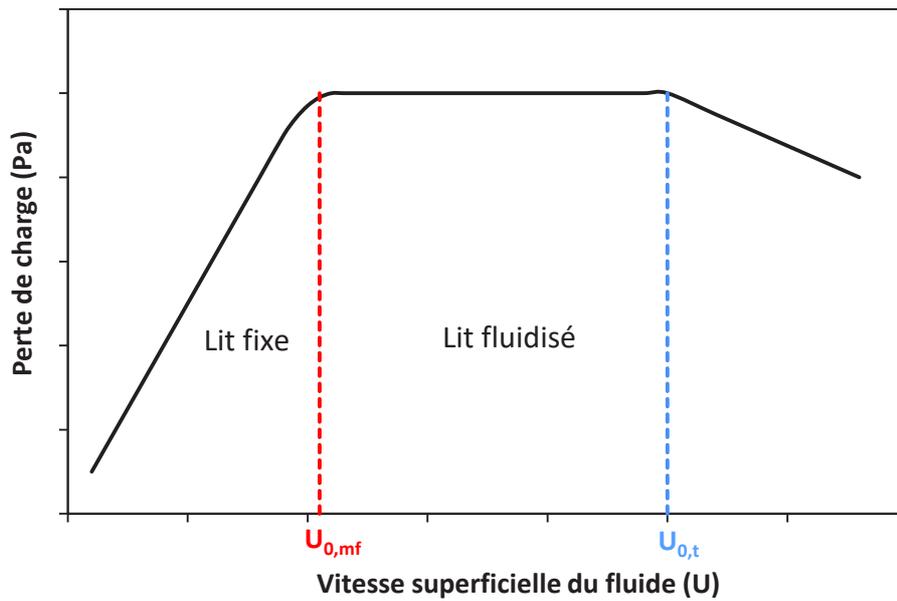


Figure 1-16 : Evolution de la perte de charge en fonction de la vitesse superficielle du fluide dans un réacteur à lit fluidisé.

Pour déterminer la vitesse minimale de fluidisation, Ergun a établi une loi valable (équation (1.2)) quel que soit le régime d’écoulement (Ergun, 1952) :

$$\frac{\Delta P}{H_{mf}} = \frac{150 * \mu}{d_p^2} * \frac{(1 - \varepsilon_{mf})^2}{\varepsilon_{mf}^3} * U_{0,mf} + 1,75 * \frac{\rho}{d_p} * \frac{(1 - \varepsilon_{mf})}{\varepsilon_{mf}^3} * U_{0,mf}^2 \quad (1.2)$$

La perte de charge par unité de longueur est égale à la somme de 2 termes : le premier terme correspond à la composante laminaire, alors que le second terme correspond à la composante turbulente.

Ainsi, si le régime est laminaire ; c’est-à-dire lorsque le nombre de Reynolds de la particule Re_p est inférieur à 20, on obtient l’expression simplifiée suivante (1.3) :

$$U_{0,mf} = \frac{d_p^2}{150} * \frac{\varepsilon_{mf}^3}{(1 - \varepsilon_{mf})} * \frac{(\rho_s - \rho)}{\mu} * g \quad (1.3)$$

Avec μ : la viscosité du fluide en Pa.s

Lorsque le Re_p est supérieur à 1000, le régime est dit turbulent et on peut donc simplifier l’équation d’Ergun de la façon suivante (1.4) :

$$U_{0,mf}^2 = \frac{d_p}{1,75} * \varepsilon_{mf}^3 * \frac{(\rho_s - \rho)}{\rho} * g \quad (1.4)$$

La vitesse limite terminale $U_{0,t}$ est la borne supérieure du domaine de fluidisation et correspond à la vitesse à partir de laquelle les particules sont entraînées hors de la colonne. Elle est définie par l’équation (1.5) :

$$U_{0,t} = \sqrt{\frac{4}{3} * g * d_p * \frac{1}{C_d} * \frac{\rho_s - \rho}{\rho}} \quad (1.5)$$

C_d représente le coefficient de traînée, calculé à partir du nombre de Reynolds selon les équations (1.6) ; (1.7) ; (1.8).

Si $Re_p < 0,4$:

$$C_d = \frac{24}{Re_p} \quad (1.6)$$

Si $0,4 < Re_p < 500$:

$$C_d = \frac{10}{\sqrt{Re_p}} \quad (1.7)$$

Si $500 < Re_p < 200000$:

$$C_d = 0,43 \quad (1.8)$$

Le nombre de Reynolds à la limite de fluidisation $Re_{p,t}$ est lui aussi lié à la vitesse terminale $U_{0,t}$ (équation (1.9)).

$$Re_{p,t} = \frac{\rho * U_{0,t} * d_p}{\mu} \quad (1.9)$$

Le nombre empirique d’Archimède Ar est quant à lui, indépendant de la vitesse, et est défini par l’équation (1.10) (Perry and Green, 1973):

$$Ar = \frac{(g * \rho * d_p^3 * (\rho_s - \rho))}{\mu^2} \quad (1.10)$$

Il est ensuite possible de revenir au nombre de Reynolds $Re_{p,t}$ à l’aide des corrélations empiriques suivantes (1.11); (1.12); (1.13), utilisées en fonction du régime adéquat (Tableau 1-11).

Tableau 1-11 : Corrélations empiriques entre le nombre d'Archimède et le nombre de Reynolds, selon le régime de fluidisation. Source : (Perry and Green, 1973)

Régime	Domaine de validité	Forme adimensionnelle
Régime laminaire : loi de Stokes	$Ar < 32,8$	$Re = \frac{Ar}{18}$ (1.11)
Régime transitoire : loi de Van Allen	$32,9 < Ar < 1,04 \cdot 10^5$	$Re = 0,153 * Ar^{0,714}$ (1.12)
Régime turbulent : loi de Newton	$Ar > 1,04 * 10^5$	$Re = \sqrt{3 * Ar}$ (1.13)

Le rapport $\frac{U_{0,lim}}{U_{0,mf}}$ permet de définir l’étendue du domaine de fluidisation. Ce rapport est généralement compris entre 10 et 100.

Pour des petites particules et/ou lorsque le fluide est un gaz, $\frac{U_{0,lim}}{U_{0,mf}} \approx 100$

Pour des particules plus grosses en milieu liquide, $\frac{U_{0,lim}}{U_{0,mf}} \approx 10$

b) Réacteur enzymatique à lit fluidisé pour la dégradation de micropolluants

De la même manière que les autres réacteurs enzymatiques ; ce type de réacteur peut être utilisé en continu et/ou avec recirculation de la solution. Ce type de réacteur a déjà été utilisé pour diverses applications, comme la production de biodiesel, la biosynthèse d’esters ou encore la clarification de jus de fruits (Fidalgo et al., 2016; Poppe et al., 2015; Kumar et al., 2013; Dal Magro et al., 2020).

Les applications concernant la dégradation de micropolluants dans un réacteur enzymatique à lit fluidisé sont plus rares et celles trouvées dans la littérature sont regroupés dans le Tableau 1-10. Lloret et al., (2012b, 2012c), ont comparé les performances d’un réacteur à lit fixe et un réacteur à lit fluidisé pour la dégradation de trois hormones (Estrone, 17-b-estradiol, 17-a-ethinylestradiol), avec des laccases de *Myceliophthora thermophila* greffées sur des eupergit c (billes créées par copolymérisation de N,N'-methylene-bis-(methacrylamide), glycidyl methacrylate, allyl

glycidyl ether et de methacrylamide) (Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000). Ils ont observé une amélioration de la dégradation de ces trois hormones dans le réacteur à lit fluidisé comparé au lit fixe (65-80% pour le lit fixe contre 76-90% pour le lit fluidisé), ainsi qu’une diminution plus marquée de l’activité œstrogénique de l’effluent dans le réacteur à lit fluidisé (plus de 90% contre 63% dans le réacteur à lit fixe).

Piao et al., (2019) ont étudié la dégradation d’une solution de bisphénol A à 25 mg.L⁻¹ par des laccases de *Trametes versicolor* greffées par attachement covalent ou par simple adsorption sur des particules de silice mésoporeuses. Un taux de dégradation du BPA de 90% a été atteint en 8 heures avec les laccases immobilisées par attachement covalent, contre 75,4% pour les laccases adsorbées et 69,9% pour les laccases libres. Après 10 cycles de réactions consécutifs, il est toujours possible de dégrader 50% du micropolluant avec les enzymes immobilisées par liaisons covalentes alors que plus aucune dégradation n’était observée dès le 6^{ème} cycle de réaction successif pour les enzymes adsorbées, mettant en évidence la plus grande stabilité induite par l’attachement covalent. La baisse d’activité subie par les enzymes greffées par liaisons covalentes est probablement due aux contraintes de cisaillement imposées durant la fluidisation et le rinçage du catalyseur. Le débit du substrat imposé pour la fluidisation doit ainsi être choisi avec attention, afin de permettre la fluidisation du lit sans affecter drastiquement son activité catalytique.

5. Conclusion

Les avantages et inconvénients des différents types de réacteurs enzymatiques sont regroupés dans le Tableau 1-12. Bien que chaque réacteur représente une piste intéressante pour la biorémédiation des micropolluants dans l’eau, ce projet de thèse se concentre exclusivement sur la conception d’un réacteur à lit fluidisé.

Tableau 1-12 : Avantages et inconvénients des différents types de réacteurs enzymatiques

Type de réacteur	Avantages	Inconvénients
Réacteur agité batch	<p>Activité enzymatique souvent plus élevée.</p> <p>Grande homogénéisation et contact optimal entre catalyseur et substrat.</p>	<p>Problème de séparation du catalyseur.</p> <p>Extrapolation à grande échelle compliquée.</p> <p>Contrainte de cisaillement, baisse de stabilité du catalyseur.</p>
Réacteur enzymatique à membrane (Configuration A)	<p>Transformation + séparation des sous produits.</p> <p>Activité enzymatique souvent plus élevée.</p>	<p>Colmatage de la membrane important.</p> <p>Coût élevé.</p> <p>Problème de stabilité du catalyseur.</p> <p>Hétérogénéité des conditions de réaction entre la solution et la surface de la membrane.</p>
Réacteur enzymatique à membrane (Configuration B)	<p>Recyclage du biocatalyseur.</p> <p>Diminution des limitations diffusionnelles.</p> <p>Stabilité améliorée du catalyseur.</p> <p>Transformation + séparation des sous produits</p>	<p>Activité enzymatique parfois faible.</p> <p>Colmatage de la membrane.</p> <p>Coût élevé.</p>
Réacteur à lit fixe	<p>Recyclage du biocatalyseur</p> <p>Contrainte de cisaillement diminuée</p>	<p>Pertes de charge importantes.</p> <p>Chemins préférentiels.</p> <p>Activité enzymatique parfois faible.</p> <p>Limitations diffusionnelles.</p>
Réacteur à lit fluidisé	<p>Recyclage du biocatalyseur</p> <p>Diminution des pertes de charges</p> <p>Amélioration de l’homogénéité entre l’enzyme et le substrat</p>	<p>Activité enzymatique parfois faible.</p> <p>Limitations diffusionnelles.</p> <p>Contraintes de cisaillement plus importantes que dans le lit fixe.</p>

VI) Conclusion et objectifs de la thèse

A l'issue de cette étude bibliographique, plusieurs choix ont été effectués pour la suite de ce projet. Tout d'abord, deux micropolluants appartenant à deux classes différentes ont été retenus : un composé pharmaceutique, la tétracycline, et un pesticide, le glyphosate. Ces deux composés causent des problèmes de bio accumulation et toxicité pour l'environnement et les organismes vivants, mais diffèrent par leurs structures. En effet, la tétracycline est un composé phénolique et possède plusieurs groupements électrons donateurs qui pourraient favoriser l'oxydation enzymatique, alors que le glyphosate est un composé non phénolique et possède des groupements électrons accepteurs le rendant plus récalcitrant à l'oxydation. Il pourra donc être intéressant d'étudier la différence de performance d'un même procédé enzymatique vis-à-vis de ces deux molécules. La voie de dégradation de ces micropolluants choisie sera la voie enzymatique, en présence d'une laccase immobilisée sur un support à base de biopolymère. La gélatine a été choisie pour l'élaboration de ce support car ce biopolymère est abondant dans la nature, biodégradable, peu cher, et possède de nombreux groupements fonctionnels qui le rendent adéquat pour une immobilisation de type covalente avec des enzymes. L'immobilisation covalente a en effet été retenue afin de limiter le risque de décrochage du biocatalyseur. De plus, grâce aux propriétés gélifiantes de la gélatine il est possible en jouant sur la température d'induire la formation de billes pouvant être utilisées dans un réacteur à lit fluidisé. Ce type de réacteur permet d'assurer un contact optimal entre le substrat et l'enzyme, et un recyclage du biocatalyseur. L'objectif de cette thèse sera donc d'étudier les conditions d'élaboration de billes de gélatine activées par greffage d'enzymes d'une part et d'autre part d'étudier la mise en œuvre de ces billes dans un réacteur à lit fluidisé vis-à-vis de la dégradation des deux micropolluants choisis.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Chapitre 2 – Matériel et méthodes

I) Matériel

1. Enzyme

La préparation commerciale de laccase, issue d'un champignon filamentueux *Trametes versicolor* (TvL) a été procurée par Sigma Aldrich ($\geq 0,5 \text{ U.mg}^{-1}$, ref 38429) ; elle se présente sous la forme d'une poudre à conserver au congélateur à -20°C . Selon Sigma Aldrich, une unité enzymatique correspond ici à la conversion d'une μmol de catéchol par minute à 25°C et à pH 5.

2. Substrats et médiateurs

Deux micropolluants différents ont été sélectionnés dans ce projet : un composé phénolique d'origine pharmaceutique, la tétracycline (TC, Sigma Aldrich, $\geq 98\%$, ref 87128) et un pesticide non phénolique, le glyphosate (Sigma Aldrich, $\geq 98\%$, ref 45521). L'acide aminométhylphosphonique (appelé AMPA), produit de dégradation principal du glyphosate (Sigma Aldrich, 99%, ref 324817) a été utilisé comme standard afin de suivre son apparition lors des essais de biodégradation. Les structures chimiques de ces 3 produits sont présentées sur la Figure 2-1.

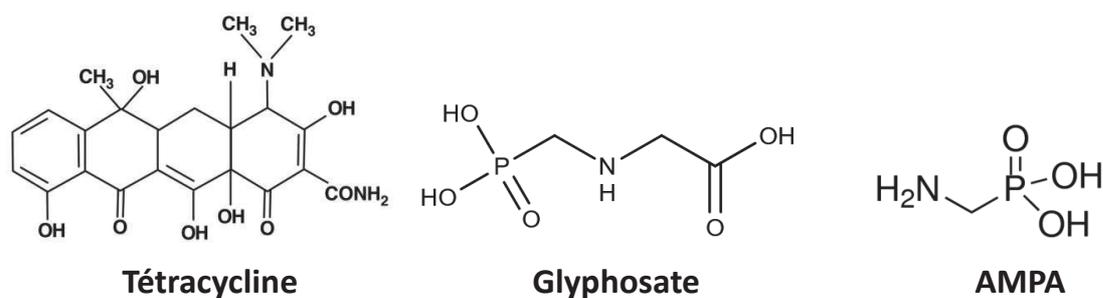


Figure 2-1 : Structures chimiques respectives de la tétracycline, du glyphosate et de l'AMPA.

L'ABTS (2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt, Sigma Aldrich, $\geq 98\%$, ref A1888) est le substrat modèle choisi pour déterminer l'activité des laccases. Il a également été utilisé en tant que médiateur d'oxydoréduction pour des essais de dégradation du glyphosate. Deux autres médiateurs : le syringaldéhyde (Sigma Aldrich, $\geq 98\%$, ref S7602) et l'acide p-coumarique (Sigma Aldrich, $\geq 98\%$, ref C9008) ont

aussi été testés. Les structures chimiques de ces 3 produits sont présentées sur la Figure 2-2.

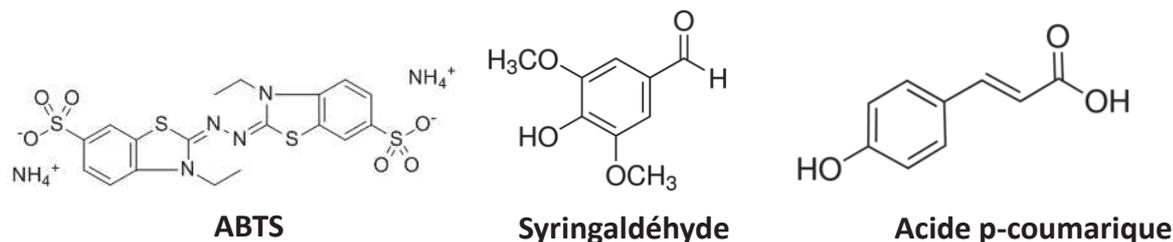


Figure 2-2 : Structures chimiques de l'ABTS, du syringaldéhyde et de l'acide p-coumarique utilisés comme médiateurs redox.

Les solutions d'enzyme et de substrats sont préparées en tampon citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹) à pH variables selon l'utilisation souhaitée. Ces solutions tampons ont été réalisées à partir d'une solution d'acide citrique C₆H₈O₇ (Sigma Aldrich, ref C0759) préparée à 0,1 mol.L⁻¹ dans de l'eau distillée, et d'une solution de phosphate de sodium dibasique Na₂HPO₄.2H₂O (Sigma Aldrich, ref RES0974S-A702X) préparée à 0,2 mol.L⁻¹ dans de l'eau distillée.

3. Réactifs chimiques utilisés pour l'élaboration des billes actives

La gélatine utilisée pour la formation des billes provient de peaux de porc (Sigma Aldrich, ref. G2500) ; c'est une gélatine de type A et de bloom 300. Le bloom caractérise la force du gel et correspond à une distribution de masses molaires comprises entre 50 000 et 100 000 g.mol⁻¹. Pour le bain de coagulation, plusieurs polyéthylène glycol de masses moléculaires différentes ont été utilisés ; ils proviennent tous de Sigma Aldrich (ref 8.07491 pour 6 kDa, ref 8.218811 pour 10 kDa, ref 8.17018 pour 20 kDa, ref 8.18892 pour 35 ka).

L'agent de réticulation utilisé dans ce projet est le glutaraldéhyde (GTA) commercialisé sous forme de solution aqueuse (Sigma Aldrich, grade II, 25% in H₂O, ref G6257).

4. Présentation du réacteur à lit fluidisé

La conception et mise en place du réacteur à lit fluidisé sera détaillée dans la 2^{ème} partie du chapitre 3. Le réacteur à lit fluidisé est constitué d'une colonne cylindrique double enveloppe en pyrex pour permettre un contrôle de la température par une circulation d'eau. Sa hauteur est de 23 cm et son diamètre de 2 cm (Figure 2-3). La circulation de la

solution à traiter est assurée dans le sens ascendant par une micro pompe (n° de série 951990005), munie d'une tête de pompe de Cole Parmer à débit variable (0-300 mL.min⁻¹).

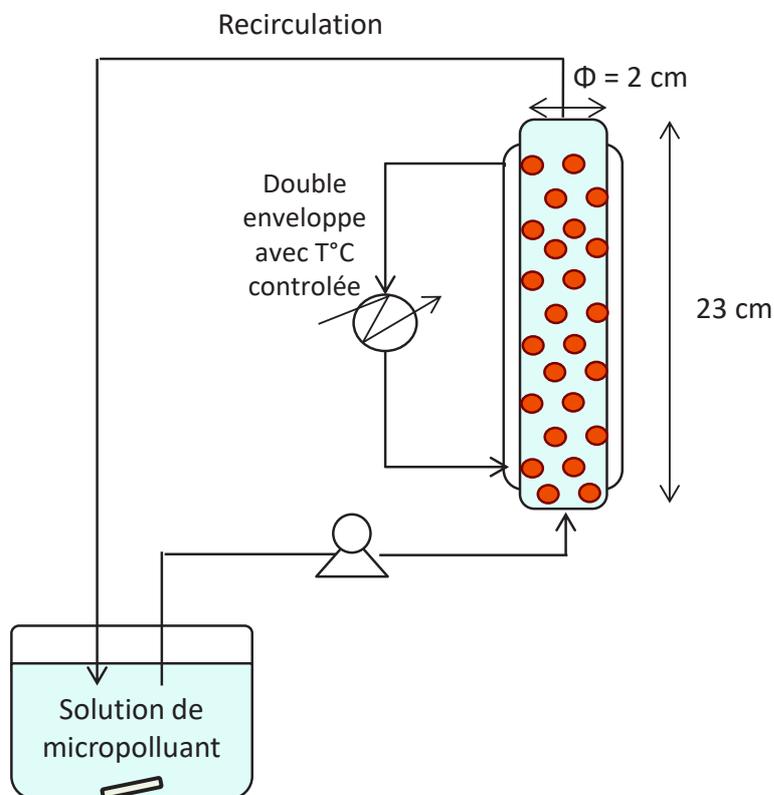


Figure 2-3 : Présentation schématique du réacteur à lit fluidisé

II) Méthodes

1. Elaboration des billes actives.

a) Formation des billes

Des solutions de gélatine ont été préparées en ajoutant la masse de gélatine nécessaire à 30 grammes d'eau pour atteindre des concentrations de 15, 18, 20 et 22% (p/p), ces suspensions ont ensuite été chauffées à 60°C pendant 2 heures. Des solutions de polyéthylène glycol ont été préparées en amont, à partir de PEG de masses moléculaires variées (6, 10, 20, 35 kDa) à une concentration de 40% (p/v), puis à des concentrations différentes (20%, 30%, 40%, 50% (p/v)) au poids moléculaire 10 kDa. Toutes les solutions ont été préparées dans de l'eau distillée et sont laissées sous agitation toute la nuit à 50°C. La formation des billes s'effectue en ajoutant goutte à goutte la solution de gélatine à 60°C dans la solution de polyéthylène glycol maintenue à 50°C à l'aide d'un

pousse-seringue SP200 au débit de $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. L'ensemble est ensuite transféré dans un bain de glace pour laisser les gouttes solidifier pendant 20 minutes. Les billes formées sont ensuite filtrées sur Büchner et rincées avec de l'eau trois fois pour éliminer le PEG en excès. La Figure 2-4 résume les étapes d'élaboration des billes.

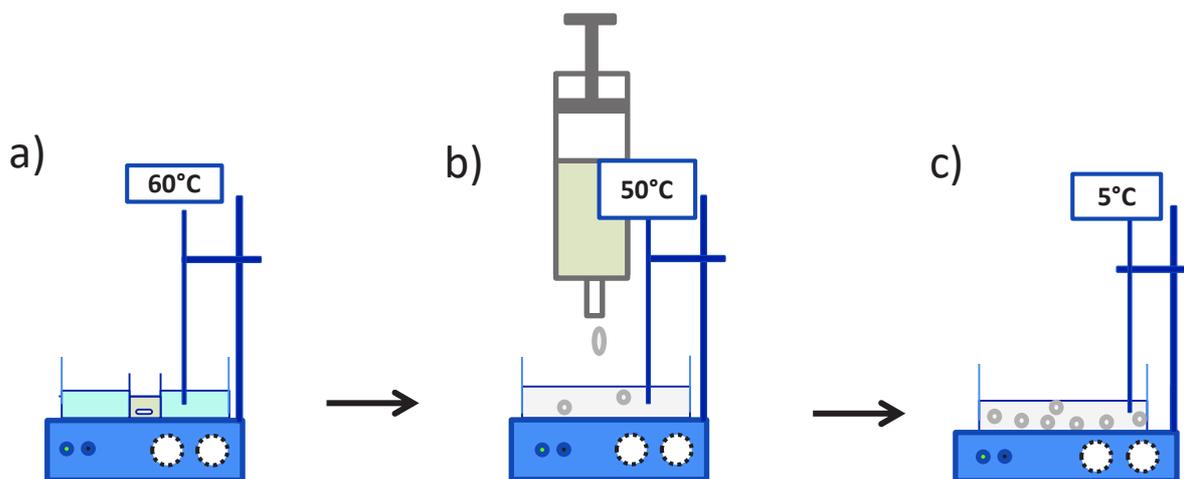


Figure 2-4 : Etapes d'élaboration des billes actives : Dissolution de la solution de gélatine (a); ajout goutte à goutte de la solution de gélatine dans la solution de PEG (b), gélification complète des billes (c)

b) Activation des billes.

Une fois les billes formées, une première étape de réticulation est nécessaire pour, d'une part, augmenter la résistance des billes et d'autre part permettre le greffage covalent des enzymes à la surface de ces supports. Les billes sont ainsi immergées dans une solution aqueuse de GTA (de concentration 3%, 5% ou 7% (v/v)) préparée en tampon citrate-phosphate ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7) à 25°C pour une durée de 1, 1,5, ou 2 heures. Les billes sont ensuite rincées avec ce même tampon pour éliminer le GTA qui n'a pas réagi.

Puis dans un second temps, on procède au greffage des enzymes. Pour cela, les billes traitées par le GTA sont plongées dans 50 mL de solution enzymatique de *TvL* ($2,18 ; 3 ; 3,82 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) pendant 1, 1,5, ou 2 heures. La solution enzymatique a été préparée dans du tampon citrate phosphate ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7) la veille pour que la solution soit bien homogène et l'activité enzymatique stabilisée. Les billes actives sont ensuite rincées trois fois par 50 mL de solution tampon, et des échantillons de solution de rinçage sont récupérés.

Les étapes d'activation des billes sont résumées sur la Figure 2-5.

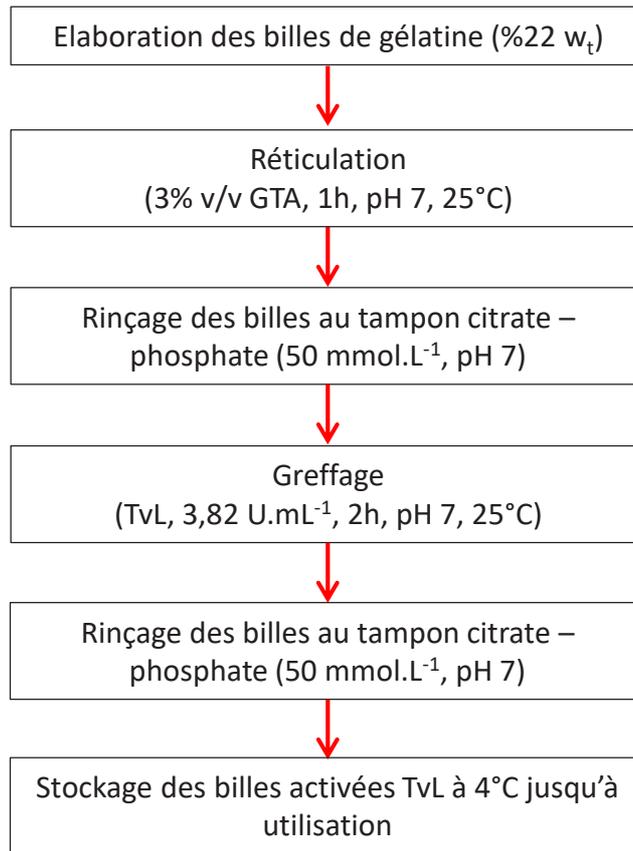


Figure 2-5 : Récapitulatif des étapes d'élaboration des billes actives (Billes_{activées TvL}).

c) Plan d'expérience et analyse statistique

Afin d'étudier l'étape de greffage des laccases sur les billes de gélatine, un plan d'expérience factoriel à 4 facteurs et 2 niveaux (2^4) a été réalisé, la réponse étant l'activité des billes actives obtenues en $U.g^{-1}$. Les facteurs étudiés sont la concentration en GTA (X_1), le temps de réticulation (X_2), la concentration de la solution enzymatique (X_3), et le temps de greffage (X_4). 19 expériences ont été réalisées au total, en comprenant 3 répétitions du point central (niveaux 0,0,0). La liste des 19 expériences réalisées est récapitulée dans le Tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Liste des 19 expériences réalisées pour le plan d'expérience 2⁴.

Expérience	Concentration de GTA	Temps de réticulation	Concentration de laccase	Temps de greffage
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Pour créer la matrice, les valeurs ont été codées en suivant l'équation suivante (2.1):

$$x_i = \frac{X_i - \bar{X}_l}{\frac{\Delta X_i}{2}} \quad (2.1)$$

Avec x_i la valeur de la matrice, X_i la valeur du facteur réel, \bar{X}_l la moyenne entre le maximum et le minimum des valeurs réelles et ΔX_i la différence entre le maximum et le minimum des valeurs réelles. Les valeurs correspondant à chaque niveau pour les trois facteurs sont présentées dans le Tableau 2-2. D'un point de vue statistique, l'analyse de la variance (ANOVA) a été obtenue en utilisant le logiciel RStudio (Version 1.2.1335, RStudio, Inc.).

Tableau 2-2 : Correspondance entre les niveaux et les valeurs réelles pour chaque facteur.

Facteur	-1	0	+1
X ₁ : [GTA] (% v/v)	3	5	7
X ₂ : temps de réticulation (h)	1	1,5	2
X ₃ : [TvL] (U.mL ⁻¹)	2,18	3	3,82
X ₄ : temps de greffage (h)	1	1,5	2

d) Elaboration d'autres type de billes

Les étapes d'activation des billes décrites dans le paragraphe II-1.b) de ce chapitre ont été adaptées pour l'élaboration de deux autres systèmes de catalyseurs.

Des billes encapsulant un médiateur (l'ABTS) sont réalisées en ajoutant une masse d'ABTS adéquate pour donner une concentration de 1 mmol.L⁻¹ dans une solution de gélatine (22% p/p, 60°C). Ces billes sont ensuite formées comme expliqué au paragraphe II-1.a). Ces billes sont réticulées avec du GTA (3% v/v, 1h), rincées avec une solution tampon citrate phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH 7), puis stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

Des billes avec co-immobilisation médiateur-catalyseur ont été élaborées en reprenant le même protocole cité juste au-dessus. Puis ces billes contenant l'ABTS et réticulées avec du GTA sont immergées dans une solution de laccase de TvL (3,82 U.mL⁻¹, 2h, 25°C). Les billes sont ensuite rincées par trois fois avec une solution tampon citrate phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH 7), puis stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les étapes d'élaboration de ces deux types de billes sont récapitulées sur la Figure 2-6.

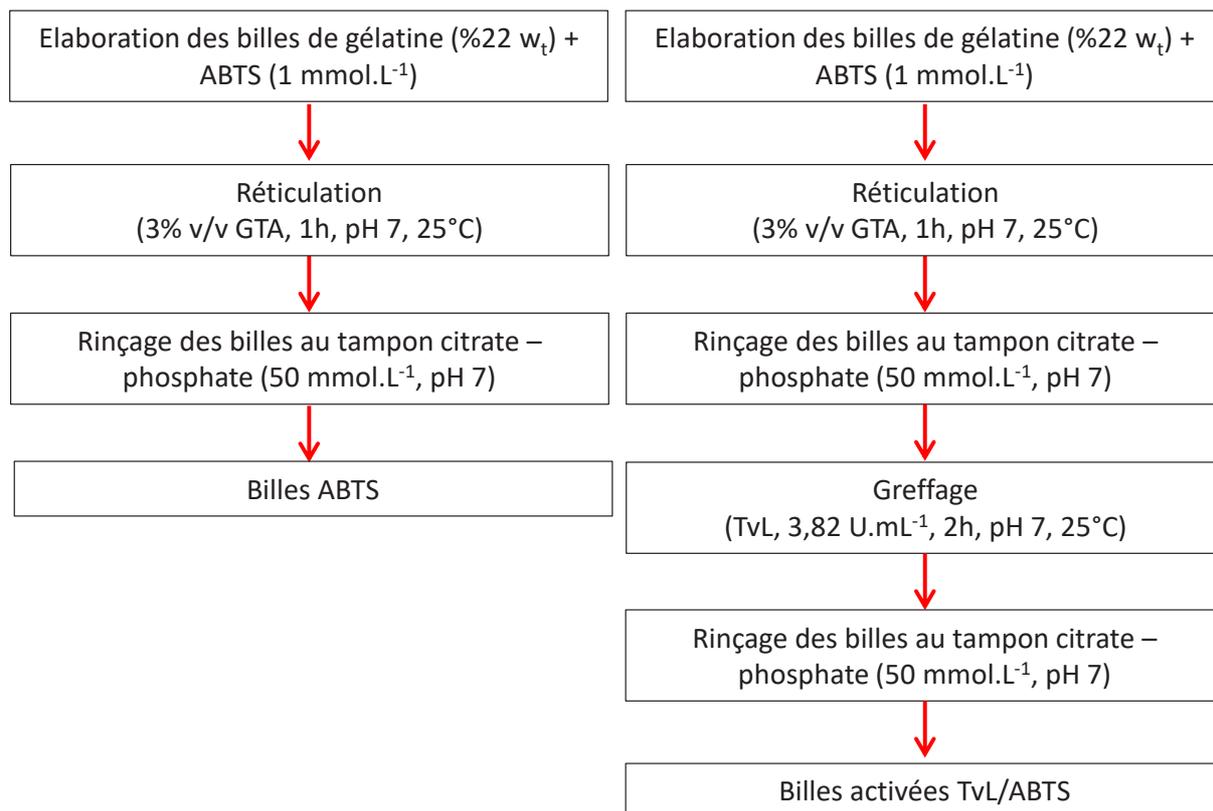


Figure 2-6 : Méthodes d'élaboration des deux autres types de billes : billes encapsulant un médiateur (Billes_{ATBS}) et billes avec co-immobilisation médiateur + catalyseur (billes_{activées TvL/ABTS})

2. Caractérisation des enzymes libres et greffées

a) Détermination de l'activité enzymatique.

L'activité de la laccase de *TvL* a été évaluée en suivant l'oxydation à 25°C d'une solution d'ABTS (1 mmol.L⁻¹ préparée dans un tampon citrate phosphate 50 mmol.L⁻¹, pH 4) au cours du temps par spectrophotométrie (spectrophotomètre Shimadzu UV-2401 PC). Ce substrat modèle a été choisi car les produits d'oxydation de l'ABTS sont de coloration bleue, il est donc aisé de suivre leur apparition par spectrophotométrie à 420 nm. L'ABTS étant photosensible, il est donc essentiel de préparer toutes les solutions à l'abri de la lumière et de recouvrir de papier d'aluminium toute la verrerie utilisée.

Pour la mesure de l'activité de la laccase libre, 100 µL de solution enzymatique sont directement ajoutés dans une cuve spectrophotométrique à 900 µL de solution d'ABTS et l'évolution de l'absorbance est suivie pendant une minute. Chaque analyse est répétée

3 fois. Une unité enzymatique (1 U) est définie comme la quantité de laccase nécessaire pour oxyder une micromole d'ABTS par minute à 25°C.

Pour la mesure de l'activité de la laccase immobilisée, on ajoute 0,8 g de billes actives dans un bécher contenant 25 mL d'une solution d'ABTS (1 mmol.L⁻¹, pH 4) maintenue sous agitation (250 rpm). 1 mL de solution est prélevé chaque minute et placé dans une cuve spectrophotométrique pour mesurer l'absorbance puis remis dans la solution. Le suivi de la réaction dure 15 minutes à 25°C.

A l'aide de la loi de Beer-Lambert rappelée ci-dessous (2.2), on peut revenir à la concentration en produits d'oxydation d'ABTS formés par minute, et donc à la définition de l'activité enzymatique.

$$Abs = \varepsilon_{ext} * l * c \quad (2.2)$$

ε_{ext} correspond au coefficient d'extinction molaire, valant 36000 mol.L⁻¹.cm⁻¹ pour l'ABTS,

l correspond à la longueur de la cuve en cm

c correspond à la concentration en produits d'oxydation de l'ABTS formés en mol.L⁻¹.

La stabilité du greffage a été estimée en mesurant plusieurs fois de suite l'activité d'un même lot de billes selon le protocole décrit ci-dessus. Entre chaque mesure, les billes ont été rincées avec du tampon citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH 7) pour éliminer toutes traces de substrat et/ou produit ou encore d'enzymes qui se seraient désorbées. 10 cycles successifs ont ainsi été réalisés. La méthodologie utilisée pour la vérification de la stabilité de l'activité est résumée sur la Figure 2-7.

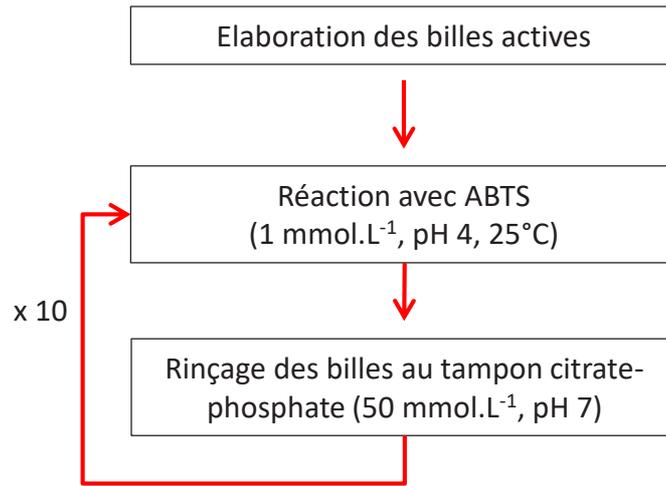


Figure 2-7 : Méthodologie de vérification de la stabilité de la réactivité des billes actives vis-à-vis de l'ABTS

b) Détermination du rendement d'immobilisation et de l'activité exprimée

Le rendement d'immobilisation ($\eta_{\text{immobilisation}}$) est défini à partir de l'estimation de l'activité de la solution enzymatique avant et après mise en contact avec les billes et en prenant en compte l'activité retrouvée dans les solutions de rinçage. Il est calculé en utilisant les équations (2.3) et (2.4) :

$$A_{\text{immo, théorique}} = A_{\text{initiale}} - (A_{\text{finale}} + \sum A_{\text{rinçages}}) \quad (2.3)$$

$$\eta_{\text{immobilisation}} = \frac{A_{\text{immo, théorique}}}{A_{\text{initiale}}} * 100 \quad (2.4)$$

$A_{\text{immo, théorique}}$ correspond à l'activité des enzymes greffées théorique
 A_{initiale} correspond à l'activité de la solution enzymatique avant greffage
 A_{finale} correspond à l'activité de la solution enzymatique après greffage
 $A_{\text{rinçages}}$ correspond à l'activité enzymatique des solutions de rinçage

Les solutions enzymatiques avant et après greffage étant très concentrées, elles sont diluées par un facteur 100 pour la mesure d'activité. Cette étape n'est pas nécessaire pour les solutions de rinçage, contenant une quantité d'enzymes beaucoup plus faible.

L'activité exprimée est défini par le ratio entre l'activité réelle des enzymes immobilisées sur l'activité enzymatique de la solution initiale (équation (2.5)) :

$$A_{\text{exprimée}} = \frac{A_{\text{immo, exp}}}{A_{\text{initiale}}} * 100 \quad (2.5)$$

$A_{\text{immo, exp}}$ correspond à l'activité réelle des enzymes greffées déterminée par essai avec l'ABTS (voir paragraphe II-2.a) de ce chapitre), rapportée en U.L⁻¹

A_{initiale} correspond à l'activité de la solution enzymatique avant greffage, en U.L⁻¹

c) Détermination des constantes cinétiques

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} dépendent du substrat, il est donc nécessaire de les déterminer à la fois pour l'ABTS et pour la TC dans le cas des enzymes libres et immobilisées. Le paramètre K_m traduit l'affinité d'un biocatalyseur vis-à-vis d'un substrat donné.

Le modèle choisi dans cette thèse est celui de Michaelis-Menten, qui se traduit par l'équation (2.6) et les constantes sont déterminées par résolution graphique à partir de l'équation de Lineweaver-Burk (2.7), découlant de la précédente.

v_0 représente la vitesse initiale de la réaction pour une concentration donnée en substrat S ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), v_{max} représente la vitesse maximale de la réaction obtenue ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), K_m représente la concentration en substrat donnant une vitesse de dégradation égale à la moitié de v_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), et S est la concentration en substrat conduisant à la vitesse de dégradation v_0 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

$$v_0 = \frac{v_{\text{max}} * [S]}{K_m + [S]} \quad (2.6)$$

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{v_{\text{max}}} * \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{\text{max}}} \quad (2.7)$$

Ainsi, en traçant la courbe $\frac{1}{v_0} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$, l'ordonnée à l'origine correspond à l'inverse de v_{max} , et le coefficient directeur correspond à $\frac{K_m}{v_{\text{max}}}$.

Pour la détermination des constantes cinétiques vis-à-vis de l'ABTS, des solutions d'ABTS de 10 – 15 – 25 – 50 -100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ont été préparées en tampon citrate-phosphate (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4). Les réactions se sont déroulées comme décrit précédemment, directement dans une cuve d'1 mL pour la laccase libre, ou dans un bécher de 25 mL pour la laccase immobilisée, à température contrôlée à 25°C. Pour comparer le comportement du biocatalyseur libre ou immobilisé, une même

concentration en enzymes a été utilisée dans les 2 cas, cette concentration correspond à une activité de 30 U.L⁻¹.

Pour les constantes cinétiques vis-à-vis de la TC, des solutions de 2 – 5 – 10 – 15 – 25 ppm ont été préparées dans de l'eau ultra-pure (pH environ 6). 30 U.L⁻¹ de laccase libre ou immobilisée sont ajoutés à 25 mL de solution contenue dans un bécher placé dans un bain marie à température contrôlée de 25°C et sous agitation (250 rpm). Des échantillons de 100 µL sont prélevés toutes les 15 minutes durant 2h. Les échantillons sont directement congelés à -20 °C jusqu'à analyse par chromatographie HPLC-MS dans le cas des essais avec l'enzyme immobilisée. Par contre, en ce qui concerne les essais avec la laccase libre, l'enzyme est dénaturée par la température directement après le prélèvement en plongeant les échantillons prélevés dans un bain marie à 100°C pendant 5 minutes avant de les congeler.

d) Profils d'activité en fonction du pH et de la température

Pour déterminer le profil d'activité en fonction du pH des laccases libres ou immobilisées, des solutions d'ABTS à 1 mmol.L⁻¹ ont été préparées en solutions tampon citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹) à divers pH : 2,2 - 3 – 4 – 5 – 6. Les réactions se sont déroulées comme décrites précédemment en batch à 25°C. La détermination de l'activité des enzymes libres ou immobilisées a été répétée 3 fois pour chaque condition. La valeur référence de 100% correspond à l'activité maximale trouvée pour les enzymes libres ou immobilisées.

Le profil pH de la tétracycline a également été étudié. Pour ce faire, des solutions de 50 mL de TC à 20 ppm ont été préparées dans des solutions tampons citrate-phosphate préparées à différents pH 2,2 – 3 – 4 – 5 – 6. Une solution de TC a été également préparée dans de l'eau ultra pure (pH 6). A ces solutions, 100 U.L⁻¹ de laccase libre ont été ajoutés et la réaction a été suivie à 25°C sous agitation (250 rpm) pendant 24 heures. Les échantillons ont été analysés par HPLC-MS. La valeur référence de 100% correspond à l'activité maximale trouvée pour les enzymes libres ou immobilisées.

Pour le profil d'activité en fonction de la température, des solutions d'ABTS à 1 mmol.L⁻¹ ont été préparées en tampon citrate-phosphate pH 4 (50 mmol.L⁻¹) et les réactions se sont déroulées en batch à 20 – 25 – 35 – 45 – 55°C. La détermination de l'activité des enzymes libres ou immobilisées a été répétée 3 fois pour chaque température. La valeur

référence de 100% correspond à l'activité maximale trouvée pour les enzymes libres ou immobilisées.

e) Stabilité thermique et par rapport au pH

Pour comparer la stabilité thermique des enzymes libres et immobilisées vis-à-vis de la température, les activités de laccases libres et immobilisées ont été déterminées à intervalles de temps réguliers pendant 6 heures lors d'une incubation à 60°C. Chaque mesure d'activité a été répétée trois fois. La valeur référence de 100% correspond à l'activité initiale pour les enzymes libres et immobilisées respectivement.

La stabilité par rapport au pH a également été comparée, en incubant des enzymes libres et immobilisées dans trois solutions de tampons citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹) de pH respectifs 3 - 5 - 9. L'activité des solutions a été mesurée à intervalles de temps réguliers pendant 24 heures. La valeur référence de 100% correspond à l'activité initiale pour les enzymes libres ou immobilisées respectivement.

f) Conditions de stockage et stabilité

La stabilité des enzymes dans le temps est un paramètre essentiel pour une utilisation durable du système. Il est au préalable nécessaire de trouver les conditions qui permettront de conserver au mieux les performances du biocatalyseur. Quatre milieux de conservations différents ont été étudiés : une phase aqueuse à 4 °C (pilulier rempli d'eau pure ou de tampon citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH7)) ou de l'air humide à 4°C (pilulier fermé au réfrigérateur) ou sous atmosphère sèche à 20°C (coupelle dans un dessiccateur avec gel de silice).

L'activité des enzymes immobilisées a ensuite été déterminée chaque jour pendant 7 jours, dans les conditions standards décrites au paragraphe II-2.a) de ce chapitre.

L'évolution de l'activité des billes a été suivie pendant 20 jours afin d'estimer la stabilité des enzymes immobilisées et libres au cours du temps, en fonction des conditions de stockage. 3 analyses ont été effectuées à chaque fois. La valeur référence de 100% correspond à l'activité initiale pour les enzymes libres ou immobilisées respectivement.

3. Dégradation enzymatique des micropolluants.

a) Essais de dégradation des micropolluants en réacteur agité

Une concentration en micropolluant (TC ou glyphosate) de 20 ppm a été choisie pour les essais de dégradation en bécher agité et en réacteur à lit fluidisé. Bien que cette concentration soit élevée en comparaison à celles des effluents réels (entre le $\mu\text{g.L}^{-1}$ et le ng.L^{-1}), cette valeur nous permet d'analyser avec plus de précision les échantillons et de vérifier dans un premier temps la faisabilité et l'efficacité de notre réacteur.

Différents témoins ont été réalisés pour s'assurer qu'il n'y avait pas auto-dégradation des micropolluants ni adsorption de ces derniers sur les billes suite à des interactions avec la gélatine. L'absence d'auto dégradation a été vérifiée par le suivi de l'évolution de la concentration d'une solution de micropolluant à 20 ppm placée dans les mêmes conditions de température et d'agitation. Pour vérifier et/ou quantifier l'adsorption du polluant sur les billes, des enzymes préalablement dénaturées en les immergeant dans un bain marie à 100°C pendant 15 minutes ont été greffées sur des billes de gélatine pour obtenir des billes dites inactivées (billes_{inactivées}). Après avoir vérifié par une mesure d'activité selon le protocole décrit au paragraphe II-2.a) que les billes_{inactivées} n'étaient pas actives, ces dernières ont été placées dans une solution de TC ou glyphosate à 20 ppm sous agitation à 25°C pendant 24 heures, des échantillons ont été prélevés chaque heure et congelés jusqu'à analyse HPLC-MS.

Les essais de dégradation de la TC ou du glyphosate en réacteur agité (enzymes libres ou immobilisées) ont été contrôlés à 25°C sous 250 rpm d'agitation. Des échantillons de 100 μL ont été prélevés toutes les 30 minutes pendant 2 heures, puis toutes les heures jusqu'à 8 heures, et enfin à 23 et 24 heures. Les échantillons contenant des enzymes libres ont été passés au bain marie à 100°C avant congélation comme expliqué précédemment.

Trois molécules ont été testées comme médiateurs redox pour améliorer la dégradation du glyphosate : l'acide p-coumarique, le syringaldéhyde, et l'ABTS (structures chimiques représentées sur la Figure 2-2. Chaque médiateur a été ajouté à une concentration de 1 mmol.L^{-1} à des solutions de glyphosate préparées à 20 ppm dans de l'eau ultra pure, contenant des enzymes libres à une activité de 0,3 U.mL^{-1} . Des échantillons ont été prélevés durant 24 heures, stockés à -20°C avant analyse.

Des essais de dégradation du glyphosate en réacteur agité ont été réalisés avec différentes associations médiateurs/enzymes :

- Billes_{ABTS} + TvL libres
- Billes_{activées TvL} + ABTS libre,
- Billes_{activées TvL} + Billes_{ABTS}
- Billes_{activées TvL/ABTS}

Dans chacun des cas, la solution de glyphosate est préparée dans de l'eau ultra pure à 20 ppm, l'équivalent enzymatique de TvL est de 0,3 U.mL⁻¹ et l'ABTS libre est à une concentration finale de 1 mmol.L⁻¹. Les réactions se sont déroulées à 25°C pendant 24 heures.

b) Essais de dégradation des micropolluants en réacteur à lit fluidisé.

L'alimentation du réacteur est composée d'une solution (100 mL) de polluant à 20 ppm qui recircule à travers le lit à un débit de 80 mL.min⁻¹ à 25°C. La dégradation est suivie pendant 24 heures à l'aide d'une prise régulière d'échantillons de 100 µL. L'influence du débit de recirculation sur la dégradation de la TC a été étudiée en modifiant le débit à 30 mL.min⁻¹, 80 mL.min⁻¹ et 130 mL.min⁻¹.

Pour étudier l'influence de l'oxygène sur l'avancement de la réaction, des essais ont été réalisés en injectant de l'air comprimé dans le milieu réactionnel à un débit de 15 mL.min⁻¹. Le taux d'oxygène dans le système a été relevé à l'aide d'une sonde à oxygène Hamilton, couplée au logiciel Hamilton Device Manager, pour s'assurer que ce taux restait à 100% durant la dégradation.

Après chaque essai et après l'avoir vidé des billes actives, le réacteur est nettoyé de la façon suivante : rinçage avec de l'eau distillée, circulation d'une solution de NaOH à 0,1 mol.L⁻¹, rinçage avec de l'eau distillée, circulation d'une solution d'acide HCl à 0,1 mol.L⁻¹, puis rinçage à l'eau distillée.

La réutilisation des billes actives (environ 4 grammes, pour un équivalent enzymatique de 100 U.L⁻¹) a également été testée en réacteur à lit fluidisé en répétant 5 cycles de dégradation successifs de 24 heures chacun, soit 120 heures de réaction au total. Après chaque cycle de 24 heures, la solution de TC partiellement dégradée est éliminée, les billes actives sont rincées abondamment au tampon citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH

4) et le réacteur est nettoyé selon le protocole décrit ci-dessus. Puis il est à nouveau rempli avec les billes et alimenté par une solution fraîche de TC pour un nouveau cycle de dégradation.

III) Analyses

1. Caractérisation du lit

a) Détermination de la masse volumique des billes

La masse volumique des billes a été déterminée selon l'équation (2.8). On pèse une fiole jaugée vide et sèche (m_1), puis on la remplit de billes jusqu'au trait de jauge (m_2). On ajoute ensuite dans cette même fiole remplie de billes de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge (m_3) (cf Figure 2-8).

$$\rho_s = \frac{m_{solide}}{V_{solide}} = \frac{m_2 - m_1}{V_{fiole} - V_{eau}} = \frac{m_2 - m_1}{V_{fiole} - \frac{m_{H_2O}}{\rho_{H_2O}}} = \frac{m_2 - m_1}{V_{fiole} - \frac{m_3 - m_2}{\rho_{H_2O}}} \quad (2.8)$$

La mesure est faite en triplicata et la moyenne des trois mesures est conservée.

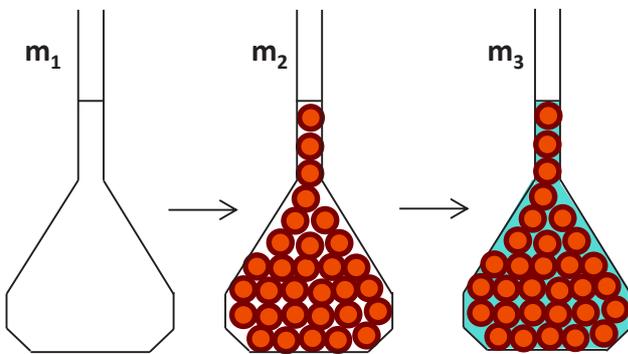


Figure 2-8 : Détermination de la masse volumique des billes

b) Détermination de la porosité du lit et surface spécifique de la couche

La porosité d'une couche de particule ϵ_0 se définit à partir de la part de « vide » qui la compose (équation (2.9)). On la détermine de la façon suivante : après avoir mesuré la masse d'une éprouvette graduée vide (masse m_1) et remplie avec 20 mL d'eau (masse m_2), l'éprouvette graduée est vidée, séchée puis remplie avec les billes jusqu'au même volume que précédemment et pesée (masse m_3). Enfin, on ajoute de l'eau pour remplir

les espaces laissés libres par les billes puis on pèse l'ensemble (masse m_4). A partir de ces différentes pesées, on calcule la valeur de ε selon l'équation (2.10).

$$\varepsilon_0 = \frac{V_{pores}}{V_{total}} \quad (2.9)$$

$$\varepsilon_0 = \frac{\frac{m_4 - m_3}{\rho_{H_2O}}}{\frac{m_2 - m_1}{\rho_{H_2O}}} = \frac{m_4 - m_3}{m_2 - m_1} \quad (2.10)$$

c) Etude de la stabilité mécanique du lit en fluidisation

Pour s'assurer que la mise en fluidisation n'endommage pas les billes, un lot de billes a été pesé initialement (m_0) puis mis en fluidisation à l'intérieur du réacteur pendant 7 heures par jour, avec recirculation d'une solution tampon citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH 7). Après chaque cycle de fluidisation, le même lot de billes a été pesé (m_t) puis conservé à 4°C dans une solution tampon jusqu'au cycle suivant. Ce protocole a été répété durant 7 jours.

2. Caractérisation des billes

a) Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (FTIR).

Les mesures de spectres infrarouges ont été collectées à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (modèle Nicolet 710), équipé d'un accessoire de réflectance totale atténuée (ATR) de Thermo-Electron avec un diamant crystal. Pour chaque spectre, 128 scans ont été collectés avec une résolution de 4 cm⁻¹.

b) Taux de réticulation.

Pour connaître le taux de réticulation des billes de gélatine après immersion dans le GTA, la détermination du nombre de groupes amines libres à la surface de la bille de gélatine après réticulation a été effectuée par dosage avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique (TNBS), d'après une méthode reportée dans la littérature (A Bigi et al., 2001; Ofner and Bubnis, 1996).

1 mg de billes de gélatine réticulées est solubilisé dans 1 mL de borax pendant 3 heures à 60°C. 1 mL de TNBS à 1% (v/v) est ensuite ajouté et la solution obtenue est laissée à

60°C sous agitation pendant 2h30. Lors de la réaction, le TNBS réagit avec les groupements amines libres de la gélatine pour former des groupements chromophores qui absorbent à 347 nm. Les solutions se colorent en orangé comme on peut le voir sur la Figure 2-9, et l'intensité de la couleur dépend du nombre de groupements réticulés avec le TNBS. 3 mL d'acide chlorhydrique HCl à 1 mol.L⁻¹ sont ensuite ajoutés pour arrêter la réaction. Après 30 minutes d'attente, les solutions sont diluées par 10 avec de l'eau ultra pure et les absorbances à 347 nm des échantillons ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-2401 PC. Deux contrôles ont également été effectués, un échantillon avec la gélatine non réticulée (appelé Abs_G) ayant réagi avec le TNBS de la même façon que les échantillons réticulés, et un échantillon de TNBS/Borax/HCl sans gélatine (appelé Abs_{TNBS}).

Le taux de réticulation est ensuite calculé par l'aide de l'équation (2.11) suivante :

$$\text{Taux de réticulation} = 100 * \left[1 - \frac{100 * (Abs - Abs_G)}{Abs_G - Abs_{TNBS}} \right] \quad (2.11)$$

Chaque échantillon est réalisé en triplicat et la moyenne sera reportée au chapitre 3, partie I, paragraphe II-1.

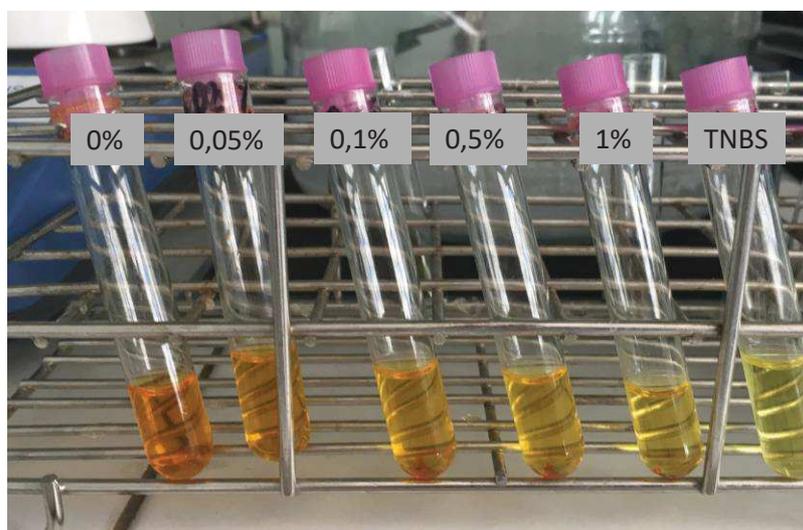


Figure 2-9 : Evolution de la couleur des solutions TNBS/gels en fonction du pourcentage de GTA utilisé lors de la réticulation (de gauche à droite : 0% ; 0,05% ; 0,1% ; 0,5% ; 1% GTA v/v ; témoin sans gélatine).

c) Taux de gonflement.

Afin de déterminer la capacité de gonflement des billes de gélatine après traitement par diverses concentrations en GTA, et donc à des taux de réticulation différents, les billes de gélatine ont été placées dans un dessiccateur pendant 48 heures jusqu'à atteindre une masse constante (w_d). Les billes sont ensuite immergées dans 15 mL d'eau distillée à 25°C et leurs masses sont contrôlées à intervalles de temps réguliers (w_t) avec une balance de précision Presica XB 320 M. Le taux de gonflement est défini d'après l'équation (2.12) suivante :

$$SW(\%) = \frac{w_d - w_t}{w_d} * 100 \quad (2.12)$$

Chaque expérience est réalisée en triplicat. Un contrôle est également réalisé avec des billes de gélatine non réticulées.

d) Propriétés mécaniques.

Les propriétés mécaniques des gels réticulés (ou non) ont été évaluées par analyse dynamique mécanique (DMA) en compression.

Pour cela, des cylindres de gels de 0,8 cm de diamètre et 2 cm de hauteur ont été réalisés en versant une solution de gélatine (22% p/p, 60°C) dans des moules cylindriques en téflon, puis en les laissant gélifier à 5°C pendant 1 heure. Les gels ont ensuite été réticulés en les immergeant dans une solution de GTA pendant 1 heure à 25°C. Des solutions à diverses concentrations de GTA (0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% v/v) ont été préparées pour étudier l'influence de la concentration en GTA et donc du degré de réticulation sur les propriétés mécaniques des gels.

Des tests de compression uniaxial ont été réalisés avec un équipement d'analyse mécanique dynamique (Metravib, 50 dB) équipé du logiciel Dynatest version 6.93. Les gels ont tous été comprimés à une vitesse de 10^{-5} m.s^{-1} avec une force de cellule de 40 N. Pour chaque type de gel, 5 essais ont été réalisés. Le logiciel donne après chaque essai le déplacement D (en m) en fonction de la force F (en N). On peut ensuite obtenir la courbe de la contrainte σ en fonction de la déformation ϵ_d à l'aide des deux formules suivantes (2.13) et (2.14) :

$$\sigma = \frac{F}{S_0} \quad (2.13)$$

$$\varepsilon_d = \frac{L - L_0}{L} \quad (2.14)$$

Avec S_0 la surface initiale du gel (en m^2), et L_0 la longueur initiale du gel (en m).

La Figure 2-10 montre une courbe contrainte-déformation typique obtenue après chaque essai. A l'aide de ces données, le module de compression E, la contrainte à la rupture σ_b ainsi que la déformation à la rupture ε_b ont pu être déterminés. En effet, la pente de la partie linéaire correspond au module de Young, également appelé module d'élasticité linéaire.

Pour vérifier la résistance mécanique des gels en utilisation prolongée en milieu aqueux, des gels ont été immergés plusieurs heures dans l'eau puis leur comportement mécanique a été étudié en immersion. Pour ce faire, la configuration de l'équipement de DMA a été modifiée (cf Figure 2-11) afin de faire des essais de compressions en immersion dans une solution aqueuse (ici de l'eau distillée).

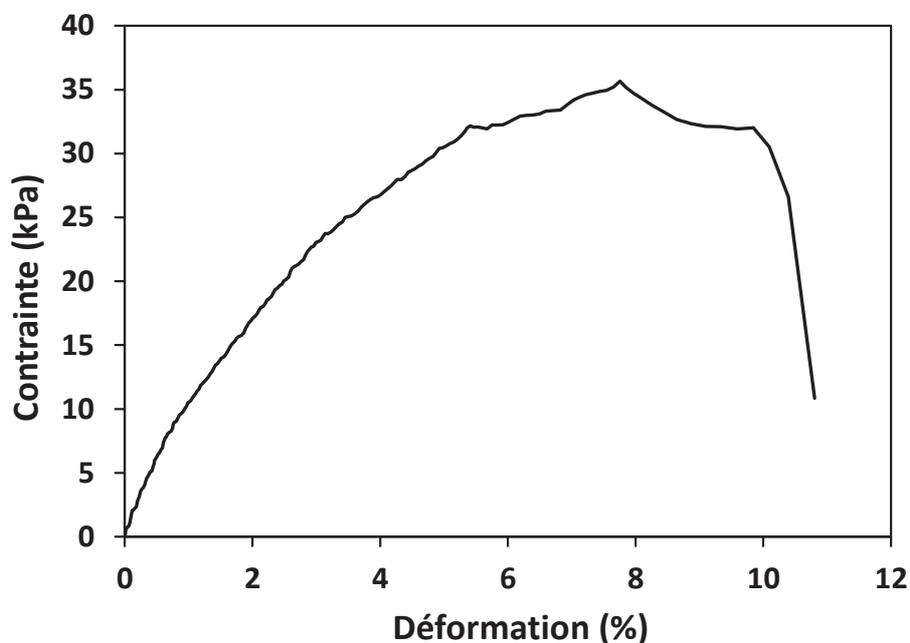


Figure 2-10 : Courbe contrainte - déformation d'un gel de gélatine (22% p/p) non réticulé



Figure 2-11 : Test de compression en immersion

e) Propriétés thermiques

Des analyses thermogravimétriques (ATG) ont été réalisées pour déterminer la température de dégradation de la gélatine. Ces tests ont été effectués sur un équipement TA Instruments TGA G500 équipé du logiciel TA instruments. Chaque échantillon d'environ 10 mg est chauffé de 20°C jusqu'à 1000°C avec une vitesse de chauffe de 10°C.min⁻¹ sous un flux d'azote de 60 mL.min⁻¹. La Figure 2-12 représente une courbe obtenue avec un échantillon de gélatine non réticulé. La première partie de la courbe représente l'évaporation de l'eau, puis la dégradation de la gélatine prend place à partir d'environ 250 degrés.

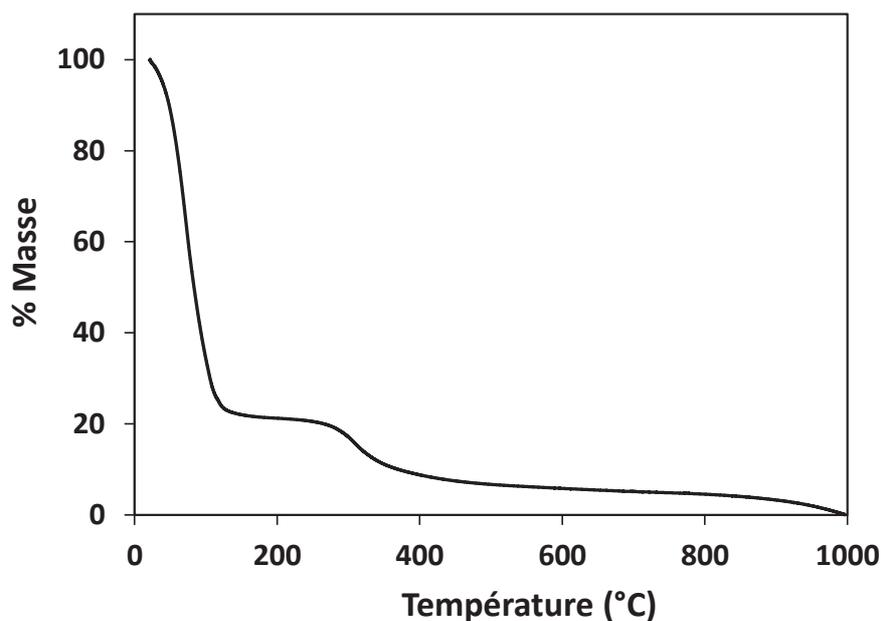


Figure 2-12 : Analyse ATG d'un échantillon de gélatine (22% (p/p) non réticulé).

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été utilisée pour caractériser le comportement thermique des gels, comme la température de transition vitreuse, et les phénomènes endothermiques (par exemple une fusion) ou exothermiques (par exemple une cristallisation). Chaque échantillon (environ 3 mg) est analysé à l'aide du calorimètre DSC 2920 équipé du système de refroidissement RCS90 (TA instruments). L'instrument a été calibré avec de l'indium pur et un creuset d'aluminium vide a servi comme référence. Les gels ont été chauffés de -40°C à 200°C avec une vitesse de chauffe de 20°C.min⁻¹. 3 triplicatas ont été réalisés pour chaque type d'échantillon.

f) Rhéologie

Les viscosités des solutions de gélatine et de polyéthylène glycol (à diverses concentrations et poids moléculaires de PEG) ont été déterminées à l'aide d'un rhéomètre MCR (Anton Paar), muni d'une géométrie cône-plan de diamètre 50 mm et d'angle 1°. Les mesures ont été effectuées à 60°C pour la solution de gélatine et à 50°C pour les solutions de PEG, à une contrainte de cisaillement choisie de 500 s⁻¹. Chaque échantillon a été analysé en triplicata.

g) Détermination du diamètre des billes

Un comparateur d'épaisseur Mitutoyo 547-401 a été utilisé pour mesurer le diamètre des billes.

3. Analyses chimiques

a) Dérivatisation du glyphosate

Le glyphosate est une molécule très polaire, soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques, et ne contenant aucun groupement chromophore. Ces caractéristiques rendent compliqué son analyse par les techniques classiques. Pour pallier à ce problème, une réaction de dérivation consistant à ajouter un groupement chromophore sur la molécule de glyphosate a été mise en oeuvre (Nedelkoska and Low, 2004). 500 μL d'échantillon de glyphosate sont prélevés, puis y sont ajoutés 100 μL d'eau ultra pure, 100 μL de solution tampon borate (pH 9, 40 mmol.L^{-1}), et 100 μL de chlorure de fluorénylméthoxycarbonyl (également appelé FMOC-Cl, préalablement préparé à 6 mmol.L^{-1} dans de l'acétonitrile). L'échantillon est mixé au vortex pendant 1 minute puis 200 μL de méthanol y sont ajoutés. Une fois dérivatisés, les échantillons ne sont stables que 48 heures à -20°C , la dérivation n'est réalisée qu'après stockage et juste avant l'analyse.

L'acide aminométhylphosphonique (appelé AMPA), est le sous-produit de dégradation principal du glyphosate. Il est bio persistant et sa toxicité est similaire à celle du glyphosate, sa concentration est donc pour cette raison contrôlée dans chaque échantillon. Sa structure étant très proche de celle du glyphosate, le même protocole de dérivation est appliqué. Les mécanismes réactionnels impliqués lors de la dérivation des molécules de glyphosate et d'AMPA sont explicités sur la Figure 2-13.

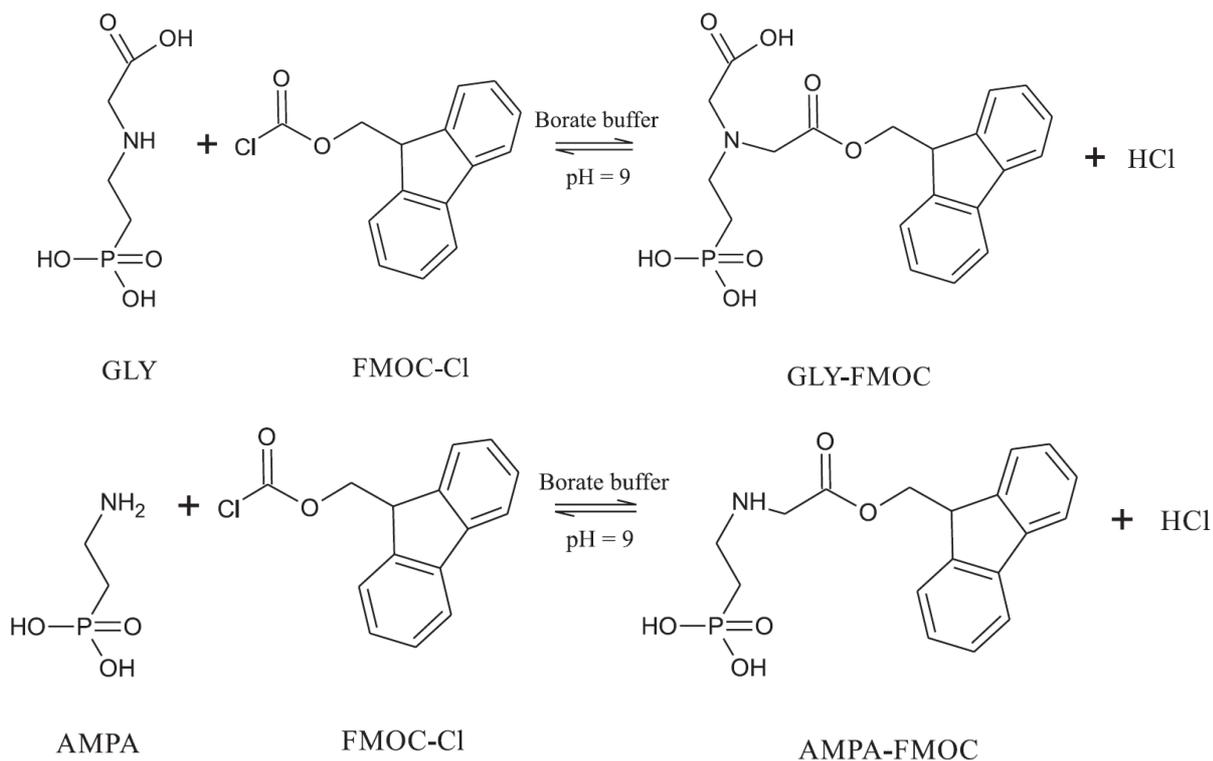


Figure 2-13: Réaction de dérivation du glyphosate et de l'AMPA, source : Catrinck et al., 2014.

b) Chromatographie LC-MS

Les concentrations en micropolluant des échantillons prélevés au cours des essais de dégradation sont estimées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Les échantillons sont injectés sur une colonne Machery-Nagel C18 (50*2mm) à l'aide d'un injecteur Alliance (Waters e2695) et élués à 0,25 mL.min⁻¹. La TC a été analysée à l'aide d'une phase mobile composée d'eau de qualité HPLC (Chem Lab, ref. CL0202212500), d'acétonitrile (CH₃CN Chromaslov, grade 99,9%, Sigma-Aldrich, ref. SAF348512500) et d'acide formique (HCOOH à 99%, Carlo Ebra, ref. 405792) dans les proportions respectives 85,5/14,4/0,1%. Les échantillons contenant du glyphosate ont été préalablement dérivatisés (cf paragraphe III-3.a) de ce chapitre) avant d'être injectés et élués à l'aide d'une phase mobile isocratique composée d'eau qualité HPLC (Chem Lab, ref. CL0202212500), d'acétonitrile (CH₃CN Chromaslov, grade 99,9%, Sigma-Aldrich, ref. SAF348512500) et d'acide formique (HCOOH à 99%, Carlo Ebra, ref. 405792), en appliquant le gradient d'éluion présenté ci-dessous :

Temps	A%	B%
0,00	100,0	0,0
0,50	100,0	0,0
4,50	0,0	100,0
5,50	0,0	100,0
6,00	100,0	0,0
10,00	100,0	0,0

Avec A : 95% H₂O/5% ACN + 0,1% HCOOH

B : 100% ACN + 0,1% HCOOH

En sortie de colonne, les échantillons sont ionisés dans une source par électrospray puis analysés par un analyseur triple quadripôle dans lequel les ions sont fragmentés puis détectés avec un multiplicateur d'électrons (Micromass Quattro micro-API). Le fragment étudié pour la tétracycline a une masse de 445,2 m/z, les fragments étudiés pour le glyphosate ont une masse de 170 m/z et 214 m/z. La courbe d'étalonnage de la TC (Figure 2-14) est réalisée en diluant une solution mère à 20 ppm dans de l'eau ultra pure (pH 6) à l'aide d'un diluteur automatique (Hamilton Microlab 1000). Les courbes d'étalonnage du glyphosate (Figure 2-15) et de l'AMPA (Figure 2-16) sont réalisées suivant le même protocole à partir de solutions de glyphosate et d'AMPA à 10 ppm préalablement dérivatisées.

Avec l'équipement utilisé, la limite de quantification (LOQ) de la tétracycline est de 0,3 ppm et la limite de détection (LOD) est de 0,04 ppm. Pour le glyphosate, la LOQ est de 0,2 ppm et la LOD est inférieure à 0,1 ppm.

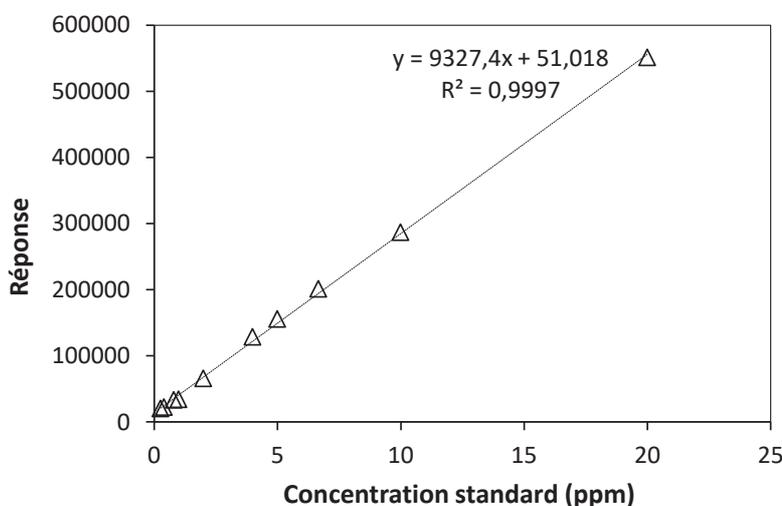


Figure 2-14 : Courbe d'étalonnage de la tétracycline

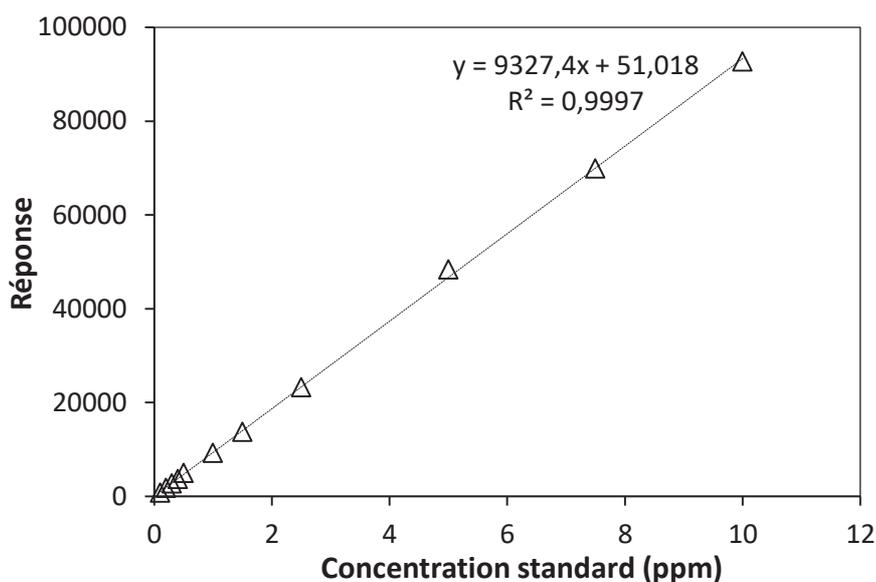


Figure 2-15 : Courbe d'étalonnage du glyphosate

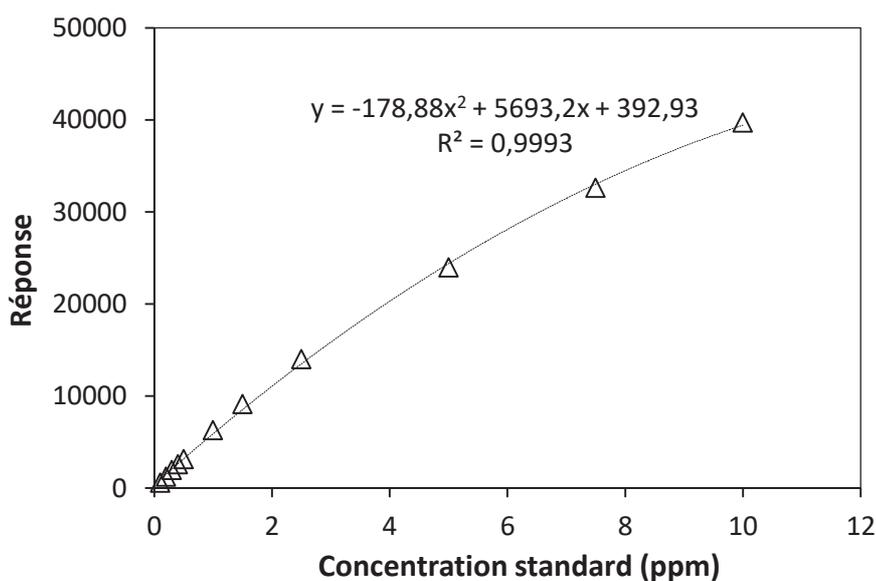


Figure 2-16 : Courbe d'étalonnage de l'AMPA

4. Tests de toxicité

La toxicité des solutions a été évaluée avant et après traitement enzymatique (par enzymes libres ou immobilisées) par un test Microtox®, basé sur la méthode de Bulich et Isenberg (1981). Ces essais reposent sur l'étude de l'impact d'une solution sur la luminescence d'une bactérie, (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177). Plus l'échantillon sera toxique, plus l'effet d'inhibition de la luminescence de la bactérie sera élevé. Ces mesures

ont été réalisées sur l'équipement Microtox® Model 500 Analyzer (Moder Water Inc, Royaume Uni).

Afin de se placer dans des conditions de toxicité proches de celles des effluents réels, les mesures de toxicité ont été réalisées sur des solutions de TC et de glyphosate à 1 ppm avant et après dégradation enzymatique. Le pH de chaque échantillon a été ajusté entre 6,5 et 7,5 avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium avant les analyses. Les échantillons sont maintenus à 15°C et l'effet d'inhibition (I) est calculé après 5 minutes puis 15 minutes de contact avec la bactérie selon l'équation (2.15). Un contrôle avec une solution saline a été effectué à chaque essai. De plus, la toxicité d'un échantillon de solution enzymatique de *Trametes Versicolor* libre à la même concentration en enzyme que celle utilisée lors les essais de dégradation (100 U.L⁻¹) a également été évaluée par le même protocole. La toxicité d'un échantillon d'ABTS, utilisé comme médiateur à la concentration d'1 mmol.L⁻¹, a également été mesurée.

$$I\% = \frac{E_0 - E_i}{E_0} * 100 \quad (2.15)$$

Avec E_0 l'intensité lumineuse de chaque contrôle,
et E_i l'intensité lumineuse de chaque échantillon.

Chapitre 3

Résultats et discussions

Chapitre 3 – Résultats et discussions

Partie I – Elaboration de supports d'immobilisation d'enzymes biosourcés

I) Formation des billes

1. Influence de différents paramètres sur la formation de billes.

La gélatine a été choisie comme support d'immobilisation d'enzymes dans ce projet car c'est un bio polymère possédant de nombreux groupements fonctionnels, biodégradable, peu cher et non toxique. De plus, des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré que la laccase de *Trametes versicolor* pouvait être immobilisée de façon covalente via le glutaraldéhyde sur une couche de gélatine déposée à la surface de membranes céramique poreuses (de Cazes et al., 2015). Pour assurer l'utilisation des supports élaborés en réacteur à lit fluidisé, un procédé de goutte à goutte qui permet d'obtenir des billes de diamètre de l'ordre du millimètre a été retenu. Le principe consiste à déposer des gouttes de solution de gélatine dans un bain composé d'une solution non-miscible avec la gélatine, de sorte que par un phénomène de séparation de phase, ou agrégation des protéines, des billes puissent se former. Les étapes du procédé sont schématisées sur la Figure 2-4 du chapitre 2. Plusieurs paramètres ont été étudiés pour optimiser le procédé et le rendre le plus simple et le plus respectueux de l'environnement possible.

a) Influence de la formulation du bain.

Des essais préliminaires ont été effectués pour choisir la formulation du bain de gélification des gouttes de gélatine. Quatre formulations différentes ont d'abord été testées :

- Une solution aqueuse saline de CaCl_2 (20% p/p) (a)
- Une solution d'éthanol absolu (b)
- Une huile de tournesol commerciale (c)
- Une solution aqueuse de polymère, PEG₁₀ (d)



Figure 3-1 : Photographies des billes obtenues avec différents bain de coagulations ; (a) CaCl_2 , (b) éthanol ; (c) Huile de tournesol ; (d) PEG_{10} . Certaines billes ont été colorées avec un colorant alimentaire rouge pour faciliter leur observation.

Après la mise en œuvre du procédé de goutte-à-goutte, les billes récoltées ont été rincées par un solvant approprié (du pentane pour les billes formées dans l'huile de tournesol, de l'eau distillée pour les autres) et sont présentées sur la Figure 3-1.

Le chlorure de calcium CaCl_2 est un bain de sphérification très efficace pour les billes d'alginate en raison de réaction de gélification instantanée et irréversible de l'alginate de calcium (Blandino, 1999; Chan et al., 2009; Kamaruddin et al., 2014). On observe cependant que les gouttes de gélatine s'étalent à l'interface du bain de solution saline (Figure 3-1, a) sans se solidifier. Les réactions mises en jeu pour la gélification de la gélatine sont différentes, et il n'y a probablement pas suffisamment d'exclusion stérique pour permettre à la protéine de gélifier correctement.

Un test avec l'éthanol a été réalisé car on connaissait la coacervation simple de la gélatine dans l'éthanol (Crewther, 1951; Khalil et al., 1968). C'est également une solution aqueuse non toxique, peu chère, qui ne nécessite pas d'étape de rinçage avec des solvants organiques. Les premiers essais ont montrés une précipitation de gélatine en forme de disque similaire à celle des hématies (Figure 3-1, b). La forme ne correspondant pas à celle souhaitée, cette solution n'a pas été retenue pour la suite des essais.

L'immiscibilité de la gélatine avec l'huile est bien connue et ce phénomène est d'ailleurs utilisé en cuisine moléculaire pour l'obtention de sphères de gélatine comestibles. Les émulsions créées par un biopolymère dans une phase huileuse sont également largement utilisées pour former des microsphères, notamment pour l'industrie pharmaceutique (A. H. Nguyen et al., 2015; Vandelli et al., 2001). On observe en effet que ce bain permet la formation de billes sphériques (Figure 3-1, c). Cependant, l'utilisation d'une phase organique comme l'huile de tournesol nécessite une étape de rinçage par des solvants

organiques souvent toxiques. Ici, l'huile en excès a été éliminée par 3 rinçages successifs avec du pentane.

Comme cela a été détaillé dans le chapitre 1, paragraphe IV-3.a), le polyéthylène glycol a lui aussi la capacité d'induire une agrégation des molécules de gélatine pour donner des gouttelettes (Harris, 1992; Kong et al., 2011). Le polyéthylène glycol et la gélatine peuvent ainsi former deux phases distinctes grâce aux larges volumes d'exclusion du PEG et à l'absence sur le PEG de sites acides sur lesquels pourraient se fixer les protéines. On observe en effet la formation de billes sphériques (Figure 3-1, d). Ce composé offre l'avantage supplémentaire d'être miscible dans l'eau ce qui permet de remplacer les solvants organiques par de l'eau distillée lors du rinçage.

En conclusion, seuls l'huile de tournesol et la solution aqueuse de polyéthylène glycol ont donné des résultats prometteurs mais comme ce projet s'inscrit dans un objectif d'impact environnemental le plus neutre possible, la solution de PEG a été retenue pour la suite du projet. Plusieurs paramètres vont à présent être étudiés pour améliorer la formation des billes.

b) Influence de la concentration en PEG.

Comme on vient de le voir, le bain de PEG₁₀ à 40% p/v permet la formation de billes sphériques. Il pourrait néanmoins être intéressant de voir si cette concentration peut être diminuée pour réduire les coûts et l'impact environnemental, ou si au contraire une augmentation de la concentration permettrait d'améliorer les qualités des billes. L'effet de la concentration des solutions de PEG₁₀ sur la formation des billes est donc étudié ici. Le Tableau 3-1 regroupe les résultats obtenus.

Aux plus faibles concentrations de PEG₁₀ (20% et 30% v/v), les billes formées ne sont pas sphériques mais ovales et leur plus grande longueur est ici dénommée « longueur caractéristique ». La sphéricité est améliorée avec l'augmentation de la concentration en PEG₁₀ et la taille des particules (diamètre) est réduite. Cependant, si la solution de PEG₁₀ est trop concentrée (50% p/v), les gouttelettes sont bloquées à la surface de la solution de PEG et il se forme des demi-sphères. Ces différences de comportement peuvent s'expliquer en prenant en compte des considérations physico-chimiques et cinétiques. En effet, quand la concentration en PEG augmente, les chaînes de ce polymère sont plus nombreuses et plus proches les unes des autres, favorisant alors le phénomène

d'exclusion des protéines par le polymère (Bhat and Timasheff, 1992). Des concentrations plus importantes en PEG₁₀ favorisent aussi le repliement de la protéine, permettant de former des billes de plus petit diamètre (Harris, 1992). De plus, avec l'augmentation de la concentration en polymère, on observe une diminution de la vitesse de chute des gouttes de gélatine à l'intérieur de la solution, ce qui permet de limiter leur déformation pendant le phénomène de séparation de phase, et ainsi d'améliorer la sphéricité des billes. Il faut cependant faire attention à ne pas augmenter excessivement la concentration de PEG, car, à 50% p/v, les gouttes ne pénètrent plus dans la solution et restent à la surface. Une concentration de 40% p/v en PEG a donc été retenue pour la suite.

Tableau 3-1 : Influence de la concentration en PEG₁₀ sur la formation des billes de gélatine; [gélatine] = 22% p/p.

Concentration (%p/v)	20	30	40	50
Observations	Billes non sphériques	Billes non sphériques	Billes sphériques	Gouttelettes bloquées à la surface
Diamètre ou longueur caractéristique (mm)	5,0 ± 0,75	2,7 ± 0,11	1,9 ± 0,19	N/A

c) Influence de la masse moléculaire du PEG.

La masse moléculaire du polyéthylène glycol dépend du nombre de groupes oxyéthyléniques présents dans la molécule et joue sur la viscosité de la solution, modifiant probablement la possibilité de formation des billes et leur forme finale. L'impact de ce paramètre sur la formation des billes a été étudié en utilisant des PEG de masses moléculaires comprises entre 6 et 35 kDa. Les caractéristiques des solutions de PEG utilisées et des billes obtenues sont regroupées dans le Tableau 3-2.

Tableau 3-2 : Influence de la masse moléculaire des PEGs (M_w) sur la viscosité de la solution de PEG (μ) et sur la formation des billes de gélatine, [gélatine] = 22% p/p ; [PEG] = 40% p/v.

PEG M_w (KDa)	PEG μ (mPa.s)	Formation des billes de gélatine	Diamètre des billes (mm)
6	20,0 ± 0,3	Les gouttes pénètrent dans le bain et forment des billes sphériques	3,0 ± 0,5
10	60,1 ± 1,0	Les gouttes pénètrent dans le bain et forment des billes sphériques	1,9 ± 0,19
20	220,5 ± 2,5	Les gouttes restent bloquées à la surface	N/A
35	649,5 ± 2,5	Les gouttes restent bloquées à la surface	N/A

La viscosité μ d'une solution de gélatine (22% p/p) a été mesurée à 60°C et vaut 133 mPa.s. Il semble que si la viscosité de la solution de PEG à 50°C est supérieure à celle de la gélatine (comme c'est le cas pour les PEGs de masse moléculaire 20 et 35 kDa), les gouttelettes de gélatine en chute libre n'ont pas assez d'énergie pour pénétrer dans le bain et contrer les phénomènes d'exclusion stérique ; elles restent alors bloquées à la surface de la solution. Les PEGs de masse moléculaire 6 et 10 kDa permettent tous les deux la formation de billes mais le diamètre des billes est légèrement plus élevé avec le PEG de masse moléculaire 6 kDa. Des études sur le phénomène d'exclusion des protéines par le PEG ont montré que, quand le degré de polymérisation (et donc le poids moléculaire) du PEG augmente, l'entropie de mélange est réduite, ce qui favorise la formation de deux phases distinctes (Harris, 1992). Les chaînes de PEG se regroupent sur elles-mêmes et excluent probablement également une partie de l'eau libre de leur environnement ce qui revient à réduire le gonflement des billes et aboutit à des diamètres de bille plus faibles. Les billes de plus petit diamètre présentant une surface spécifique plus grande sont plus intéressantes pour notre application ; le PEG₁₀ a été choisi pour la suite des expériences.

d) *Influence de la concentration en gélatine*

L'influence de la concentration en gélatine a également été étudiée pour voir si cette concentration peut être réduite, toujours dans le souci de limiter l'impact économique et environnemental du procédé. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 3-3. Quand la concentration en gélatine est inférieure à 20% p/p, la goutte s'étale à la surface et ne forme pas de bille. Cela résulte vraisemblablement du fait que la viscosité de la gélatine est inférieure à celle de la solution à 40% de PEG₁₀ ($60,1 \pm 1,0$ mPa.s). La goutte n'a peut-être pas assez d'énergie pour rompre l'interface et pénétrer dans la solution. Mais cela peut aussi être en relation avec la densité de la gélatine, qui augmente avec la concentration. Il semble nécessaire que la densité de la solution de gélatine atteigne une certaine valeur pour permettre aux billes de traverser l'interface et que la viscosité du bain collecteur soit plus faible que celle de la solution de gélatine pour permettre le déplacement des billes dans le bain. Des résultats similaires avaient été obtenus lors de l'étude de la formation de billes d'alginate dans un bain de CaCl₂ ; il avait été montré que plus la concentration (et donc la viscosité) de la solution d'alginate était grande, moins les gouttes étaient sensibles à une déformation dans le bain ce qui facilitait ainsi la création de sphères solides (Davarcı et al., 2017). On a donc gardé pour la suite du projet une concentration de gélatine de 22% (p/p).

Tableau 3-3 : Influence de la concentration en gélatine sur la formation des billes de gélatine; [PEG₁₀] = 40% p/v.

[Gélatine] (% p/p)	Densité de la solution ρ (g.mL ⁻¹)	Viscosité de la solution μ à 60°C (mPa.s)	Observations	Diamètre des billes (mm)
15	1,034	39,4	Les gouttes s'étalent sur la surface	N/A
18	1,039	61,8	Les gouttes s'étalent sur la surface	N/A
20	1,045	78,2	Les gouttes pénètrent dans le bain et forment des billes	$2,5 \pm 0,48$
22	1,053	133	Les gouttes pénètrent dans le bain et forment des billes	$1,9 \pm 0,19$

e) Influence de la température du bain de coagulation

La température du bain de gélification jouant sur les valeurs de viscosité, et par voie de conséquences sur la forme et la tailles des billes, des essais ont été réalisés à une température inférieure (4°C) et supérieure (50°C) à la température de gélification de la gélatine, les concentrations de la solution de PEG₁₀ et de gélatine étant fixées respectivement à 40% (p/v) et 22% (p/p). Les résultats obtenus ont révélé un diamètre plus élevé et une plus grande hétérogénéité dans la distribution de taille des billes quand la température du bain est égale à 4°C, avec une moyenne de diamètre de billes de 3,2 mm ± 0,5 mm, contre une moyenne de diamètre de billes de 1,9 mm ± 0,19 mm quand le bain est à 50°C. La sphéricité est également améliorée quand la température du bain est à 50°C. Cela peut s'expliquer car, lorsque que le bain est chaud, les billes s'immergent plus profondément dans la solution alors qu'elles restent attachées à la surface lorsqu'il est froid. L'influence de la viscosité de la solution de PEG, supérieure à 4°C qu'à 50°C peut également jouer un rôle ici. Pour cette raison, la température du bain de coagulation a été fixée à 50°C pour la suite des essais.

En résumé, les paramètres choisis pour l'élaboration des billes utilisées pour la suite des travaux de cette thèse sont regroupés dans le Tableau 3-4. Ces conditions permettent la formation de billes dont le diamètre déterminé expérimentalement selon la méthode décrite au chapitre 2, paragraphe III-2.g) est égale à 1,9 mm ± 0,19 mm..

Tableau 3-4 : Paramètres choisis pour l'élaboration des billes.

[Gélatine] (% p/p)	22
PEG M _w (kDa)	10
[PEG] (% p/v)	40
Température de la solution de PEG (°C)	50
Débit du pousse-seringue (mL.min ⁻¹)	4

2. Détermination du diamètre théorique des billes.

Le modèle de Kamaruddin et al. (2014), basé sur la loi de Tate pour prédire le diamètre de billes d'alginate élaborées par ce même procédé de goutte à goutte dans une solution de CaCl₂, (cf équation (3.1)) a également été utilisé pour estimer le diamètre de nos billes.

$$d_p = K_{SF} K_{LF} \left(\frac{0,06r\gamma}{\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (3.1)$$

Avec r le rayon de l'embout utilisé en m

γ la tension de surface de la gélatine en N.m^{-1}

ρ la densité de la solution de gélatine en kg.m^{-3}

g la constante gravitationnelle ($9,81 \text{ m.s}^{-2}$)

K_{LF} le coefficient de perte liquide

K_{SF} le coefficient de rétrécissement

Et d_p le diamètre de la particule obtenue en m.

En effet, la loi de Tate peut prédire une taille de bille obtenue par une technique de goutte à goutte. Cette loi est régie par la simple hypothèse qu'une goutte tombe au moment où la force gravitationnelle est égale à la force de tension de surface (Tate T., 1864). La loi de Tate est représentée dans l'équation (3.2).

$$\gamma = \frac{mg}{2\pi r f} \quad (3.2)$$

Avec m la masse d'une goutte en kg,

γ la tension superficielle de la goutte en N.m^{-1} ,

r le rayon de l'extrémité de l'embout, en m

f facteur correctif

La loi de Tate sans facteur correctif donne généralement des valeurs plus petites que la réalité, car quand la goutte se détache, une petite fraction de la goutte reste attachée au cône, les mesures des masses des gouttes s'en retrouvent donc faussées. Pour pallier ce défaut, un facteur correctif f a été ajouté par Harkins et Browns dès 1919 (Harkins and Browns, 1918). Ce facteur est corrélé au rapport du rayon du capillaire sur la racine cubique du volume idéal de la goutte ($r/V^{1/3}$), et les valeurs sont affichées dans le Tableau 3-5.

Tableau 3-5 : Facteurs correctifs de la loi de Tate. Source : (Worley, 1992)

f	r/V ^(1/3)	f	r/V ^(1/3)	f	r/V ^(1/3)
0,98171	0,02	0,89024	0,12	0,81707	0,2
0,96341	0,04	0,87195	0,14	0,77133	0,25
0,94512	0,06	0,85365	0,16	0,72560	0,3
0,92682	0,08	0,8536	0,18	0,72368	0,3021**
0,90853	0,1	0,83285	0,1827*	0,71856	0,3077***

*Eau

** n-Butyl alcohol

*** Toluene

Avant de pouvoir utiliser le modèle de Kamaruddin pour estimer la taille des billes, il faut utiliser la loi de Tate pour déterminer le rayon de l'extrémité de l'embout en m.

Dans notre cas, la solution de gélatine tombe dans la solution de PEG via un cône fixé à l'extrémité d'une seringue. La première étape de ce calcul est donc de déterminer avec précision le diamètre de sortie du cône. Pour cela, on suit le protocole établi par Worley (1992), basé sur la mesure gravimétrique de gouttes d'eau, que l'on fait tomber goutte à goutte par le même embout que celui utilisé pour l'élaboration des billes. Chaque goutte est pesée individuellement à l'aide d'une balance de précision et la masse obtenue à 20°C ($m_{1\text{goutte}} = 11,5 \text{ mg} \pm 1,05 \text{ mg}$) est introduite dans l'équation de Tate réarrangée (équation (3.3)) afin de trouver la valeur de r.

$$r = \frac{mg}{2\pi\gamma} \quad (3.3)$$

En prenant la valeur de la tension superficielle de l'eau $\gamma_{\text{eau/air}}$ à 20°C égale à 72,75 mN.m⁻¹, on trouve, en première estimation et sans facteur correctif, un rayon de 0,25 mm \pm 0,018 mm. Le volume d'une goutte idéale (rapport de la masse moyenne d'une goutte sur la masse volumique (ici de l'eau)) étant égale à $V = 0,01 \text{ cm}^3$, le ratio $r/V^{1/3}$ est donc égal à 0,11. D'après les valeurs rapportées dans le Tableau 3-5, la valeur du facteur correctif f peut être estimée égale à 0,89939.

Le rayon de l'embout, estimé par la loi de Tate (équation (3.2)) est égal à 0,276 mm \pm 0,023 mm.

En parallèle, nous avons également déterminé expérimentalement ce rayon par photographie macroscopique (macroscopie Perfex science, muni du logiciel Panasis

version 2.1). On trouve un rayon de 0,27 mm ce qui est quasiment identique avec la valeur théorique calculée.

Une valeur reste inconnue pour l'application du modèle de Kamaruddin et al, il s'agit de la tension superficielle gélatine/air à 60°C ($\gamma_{\text{gélatine/air}}$).

Cette tension superficielle a été estimée à l'aide d'une balance de Langmuir-Blodgett (KSV NIMA, Biolin Scientific) et la valeur trouvée est égale à 41 mN.m⁻¹.

Tableau 3-6 : Comparaison du diamètre des billes théorique et expérimental.

Tension de surface $\gamma_{\text{gélatine/air}}$ (mN.m ⁻¹)*	40,9 ± 1,8
Diamètre des billes expérimental $\Phi_{\text{expérimental}}$ (mm)	1,9 ± 0,19
Diamètre des billes théorique $\Phi_{\text{théorique}}$ (mm)**	1,3

* déterminée par la méthode décrite par Worley (1992) basée sur la loi de Tate.

** calculée avec la méthode décrite par Kamaruddin et al (2014).

Le diamètre des billes théorique déterminé par le calcul est 1,3 mm. Or celui trouvé expérimentalement est 1,9 ± 0,19 mm. Il y a donc un écart entre ces deux valeurs (Tableau 3-6). Ce calcul a été réalisé avec un coefficient de déformation volumique de 1, en faisant l'hypothèse qu'aucun retrait ou gonflement des billes n'apparaît lors de la gélification. Dans notre cas, il semble qu'il n'y ait pas de léger retrait comme dans l'étude de Kamaruddin (où $K_{SF} = 0,98$) mais au contraire un gonflement du polymère dans le bain entraînant une augmentation de la taille de la bille (le volume réel des billes (3.59 mm³) est trois fois plus important que le volume théorique (1,15 mm³)). La gélatine est en effet connue pour ses propriétés hygroscopiques et à sa capacité à former des gels qui développent un fort taux de gonflement. Il est probable que le diamètre théorique trouvé correspond plutôt au diamètre des gouttes à la sortie du cône, avant qu'elles ne tombent dans le bain de polymère.

En l'absence de caméra haute résolution il ne nous a pas été possible de vérifier cette hypothèse mais si c'est le cas, d'après l'équation de Kamaruddin et al, le diamètre d'une bille avant immersion dans le bain dépend de la tension superficielle $\gamma_{\text{gélatine/air}}$ et du diamètre de l'embout du pousse-seringue. Le diamètre de sortie de ce dernier devra être inférieur à la taille souhaitée pour tenir compte du gonflement consécutif à l'immersion des billes.

3. Conclusion

Des billes de gélatine présentant un diamètre de l'ordre de 2 mm ont été obtenues selon un procédé de goutte à goutte par immersion de la solution de gélatine dans une solution aqueuse de PEG, ce choix permettant d'éviter l'usage de solvants organiques toxiques. Plusieurs paramètres comme la formulation et la concentration du bain de coagulation, la concentration de la solution de gélatine ont été étudiés, et un calcul de prédiction théorique du diamètre des billes a été réalisé. Pour envisager l'usage de ces billes en milieu aqueux en présence de micropolluants, il faut à présent étudier l'étape de réticulation permettant à la fois de renforcer le réseau du gel et d'assurer le greffage ultérieur des laccases sur les billes.

II) Etude de la réticulation et son influence sur les propriétés des supports.

L'étape de réticulation des billes de gélatine par le GTA a un double objectif : permettre en premier lieu de renforcer le réseau interne des billes de gélatine afin d'empêcher leur solubilisation en milieu aqueux, et créer des points d'ancrage entre les laccases et la surface des billes. Dans cette partie, nous étudierons plus spécifiquement l'influence de la concentration en GTA sur les propriétés mécaniques et thermiques des billes de gélatine, dans le but de choisir une concentration de GTA adéquate pour la réticulation. Pour tous les résultats présentés ci-après, la durée de l'étape de réticulation a été fixée à 1 heure.

1. Influence de la concentration en glutaraldéhyde sur le degré de réticulation.

Nous avons vu dans l'état de l'art qu'un seul mécanisme ne permet pas de résumer les interactions possibles entre le GTA et la gélatine ; plusieurs réactions sont envisageables et peuvent probablement se dérouler en parallèle. La réaction prédominante semble cependant avoir lieu entre les groupements aldéhydes du GTA et les groupements NH_2 libres présents sur la chaîne latérale des acides aminés basiques (lysines et arginine) de la gélatine pour former des bases de Schiff qui peuvent ensuite être stabilisées par conjugaison. Cette conjugaison entre les doubles liaisons va générer une absorption de la lumière et donc un changement de couleur (Dardelle et al., 2011; Monsan et al., 1975).

La Figure 3-2 montre l'évolution de la couleur des gels réticulés avec différentes concentrations en GTA après une heure de réticulation. Ce changement de couleur de plus en plus marqué en fonction de la quantité de GTA utilisé pour la réticulation semble indiquer une augmentation du nombre de liaisons imines des bases de Schiff, entraînant ainsi un plus grand nombre de systèmes conjugués. Pour vérifier et quantifier cette hypothèse, un dosage par le TNBS a été réalisé (selon le protocole expliqué au chapitre 2, paragraphe III-2.b)). Ce dosage permet d'évaluer la proportion de groupements amines libres en surface de la gélatine (Ofner and Bubnis, 1996). Moins il reste de groupements amines libres en surface, plus le degré de réticulation sera grand.

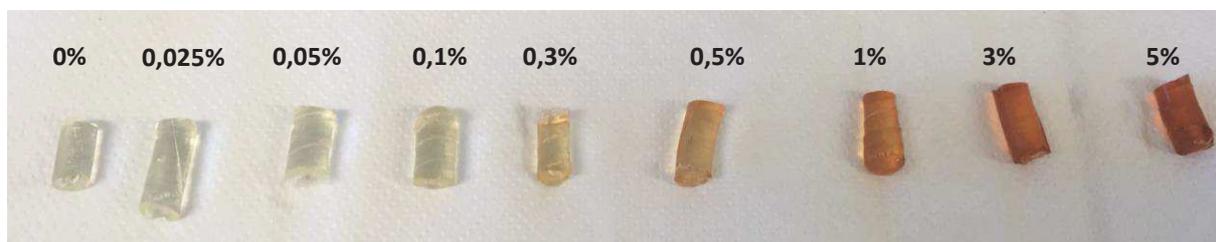


Figure 3-2 : Evolution de la couleur des gels en fonction du pourcentage de GTA utilisé lors de la réticulation (de gauche à droite : 0% à 5% GTA).

Les résultats obtenus sont reportés sur la Figure 3-3. On observe une nette augmentation du degré de réticulation lorsqu'on augmente la concentration en GTA. Avec une solution de GTA à seulement 0,025%, un degré de réticulation de plus de 20% est observé. Ce taux augmente rapidement pour atteindre 80% de réticulation lorsque la concentration en GTA est égale à 1%, puis il semble atteindre un plateau à partir d'une concentration de 2% en GTA. On peut supposer alors que tous les groupements amines libres ont réagi.

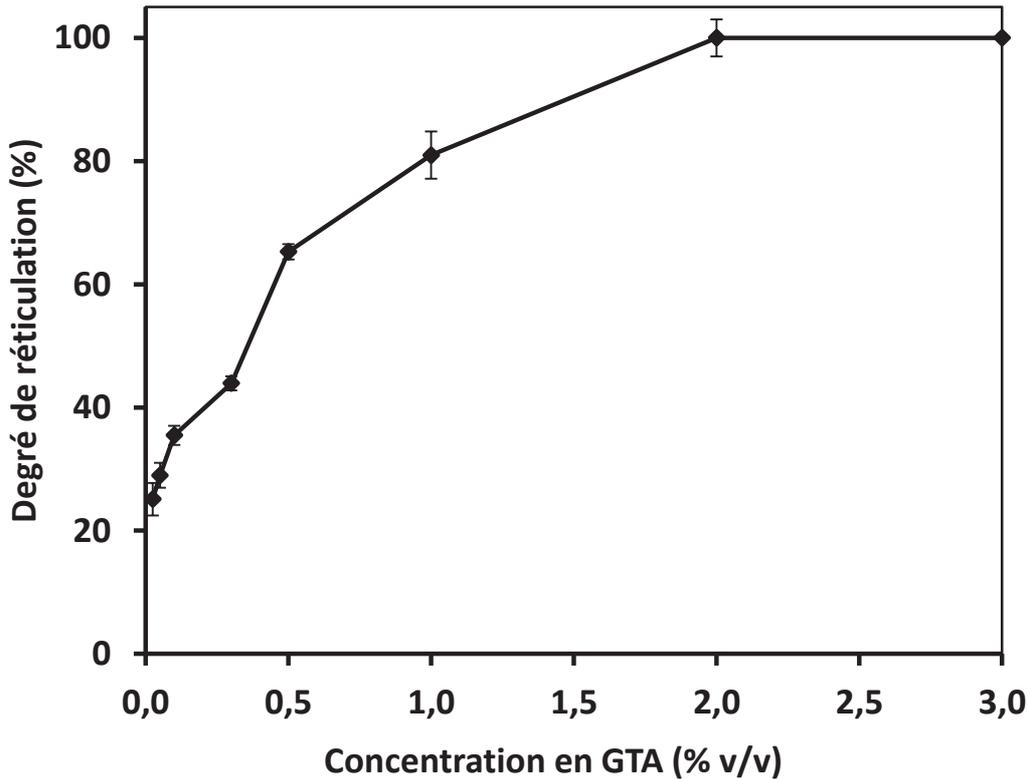


Figure 3-3 : Evolution du degré de réticulation en fonction de la concentration en GTA utilisée (0 – 3% v/v) lors de l'étape de réticulation (1 heure à 25°C dans une solution tampon citrate-phosphate (pH 7, 50 mmol.L⁻¹)).

2. Influence du taux de réticulation sur le degré de gonflement.

Le but de ce projet étant d'élaborer des supports de biocatalyseurs pour le traitement de l'eau, le comportement de ces gels en immersion est donc primordial pour la suite. Pour étudier ce paramètre, les gels réticulés à différentes concentrations en GTA ont été immergés pendant 35 heures dans l'eau. L'évolution du taux de gonflement qui en résulte est représentée sur la Figure 3-4.

On remarque que la réticulation par le GTA a un effet très important sur le taux de gonflement des gels. Sans réticulation, le gel de gélatine présente un taux de gonflement de 485% après 35 heures d'immersion. Ce taux est réduit de moitié (250%) quand le gel est réticulé avec une solution à 0,5% de GTA. Ce taux de gonflement n'est plus que de 135% quand le gel est complètement réticulé. Ce résultat n'est pas surprenant car après réticulation, les fonctions amines de la gélatine sont liées et ne peuvent plus créer des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. D'autres études avaient déjà rapporté que

la réticulation réduit cette capacité du gel à absorber de grandes quantités d'eau (Martucci et al., 2012; Matsuda et al., 1998).

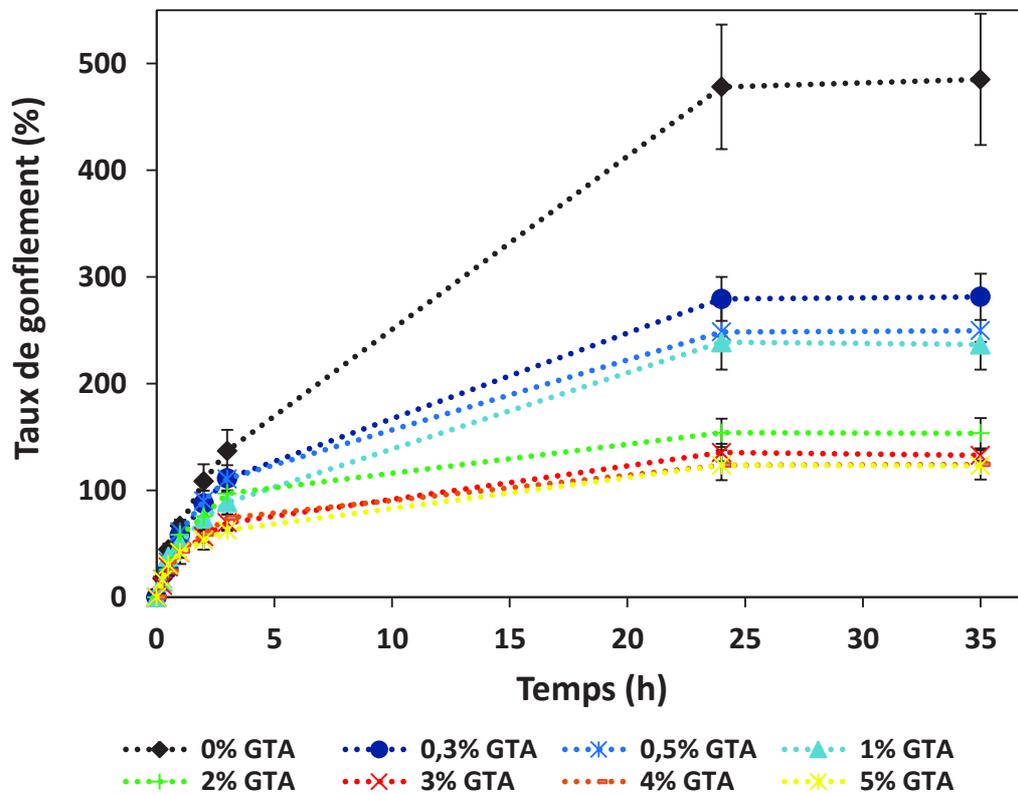


Figure 3-4 : Evolution du taux de gonflement sur 35 heures des gels de gélatine réticulés à différentes concentrations de GTA (0 - 5% v/v).

La Figure 3-5 représente la corrélation existant entre le degré de réticulation (estimé par l'essai avec le TNBS) et le taux de gonflement d'un gel au bout de 35 heures d'immersion dans l'eau. On observe une diminution d'environ 50% du taux de gonflement pour un degré de réticulation d'environ 50%. Par ailleurs, alors que le taux de réticulation de 100 % semblait avoir été atteint pour une concentration en GTA de 2%, les résultats de l'étude du gonflement montre que le gel réticulé avec 2% de GTA affiche un taux de gonflement de 154%, et que pour les gels réticulés avec des solutions à 3%, 4% et 5% en GTA, ce taux n'est plus que de 125%. Le réseau semble être complètement réticulé à partir de 3%.

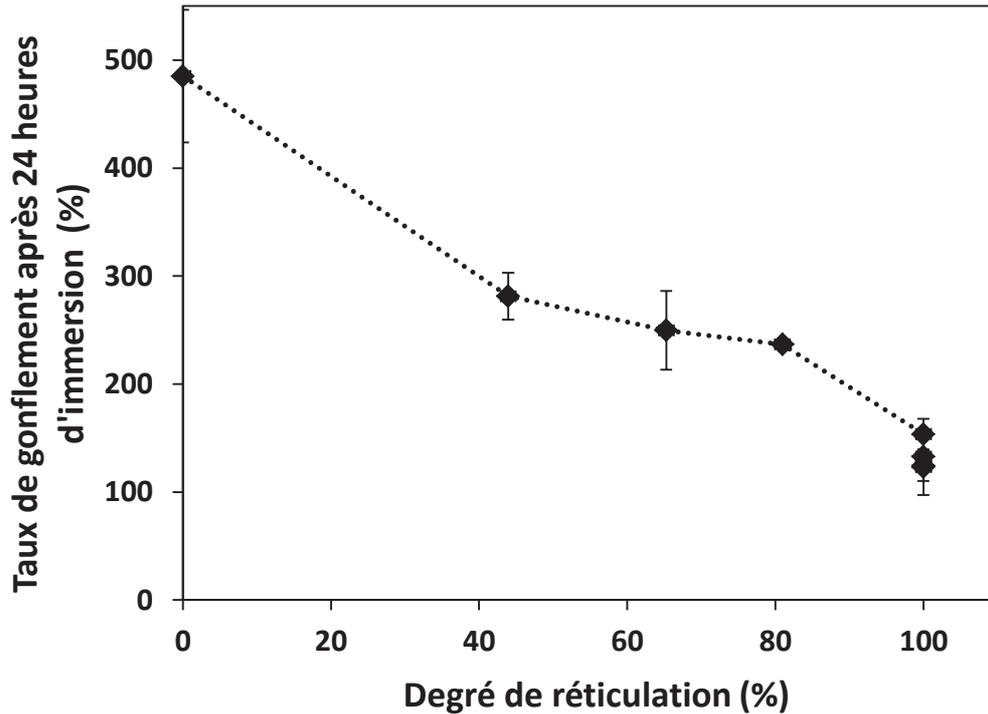


Figure 3-5 : Influence du degré de réticulation sur le taux de gonflement des gels de gélatine après 35 heures d'immersion dans de l'eau distillée à 25°C.

3. Influence du taux de réticulation sur les propriétés mécaniques des supports.

En vue d'une utilisation dans un réacteur à lit fluidisé, il est important de s'assurer que les billes possèdent une bonne tenue mécanique. Des tests de compression ont été réalisés, pour des gels réticulés à différentes concentrations en GTA, et donc à différents degrés de réticulation.

Les courbes contrainte/déformation pour chaque concentration en GTA sont représentées sur la Figure 3-6. A partir de chaque essai, le module de compression, la contrainte à la rupture et l'élongation à la rupture ont été calculés. 5 échantillons ont été analysés pour chaque concentration en GTA testée, et les moyennes des trois paramètres calculés sont regroupées dans le Tableau 3-7 (colonnes avant immersion).

Les résultats montrent que sans réticulation, le module de compression d'un gel de gélatine est relativement faible ($0,8 \pm 0,05$ MPa). La contrainte à la rupture est de $36,3 \pm 1,25$ kPa pour un gel non réticulé. Après réticulation, les propriétés sont nettement améliorées. En effet, le module de compression est trois fois plus important ($2,3 \pm 0,24$

MPa) pour un gel réticulé à une concentration de GTA de 3%. Cela peut s'expliquer par le fait que lorsque le degré de réticulation augmente, le nombre de liaisons covalentes entre les chaînes de gélatine augmente également, ce qui renforce le gel et améliore sa résistance à la compression. Bigi et al., (2001) et Talebian et al., (2007) ont aussi remarqué que le module de compression et la contrainte à la rupture de gels de gélatine augmentent avec le % de GTA utilisé lors de la réticulation.

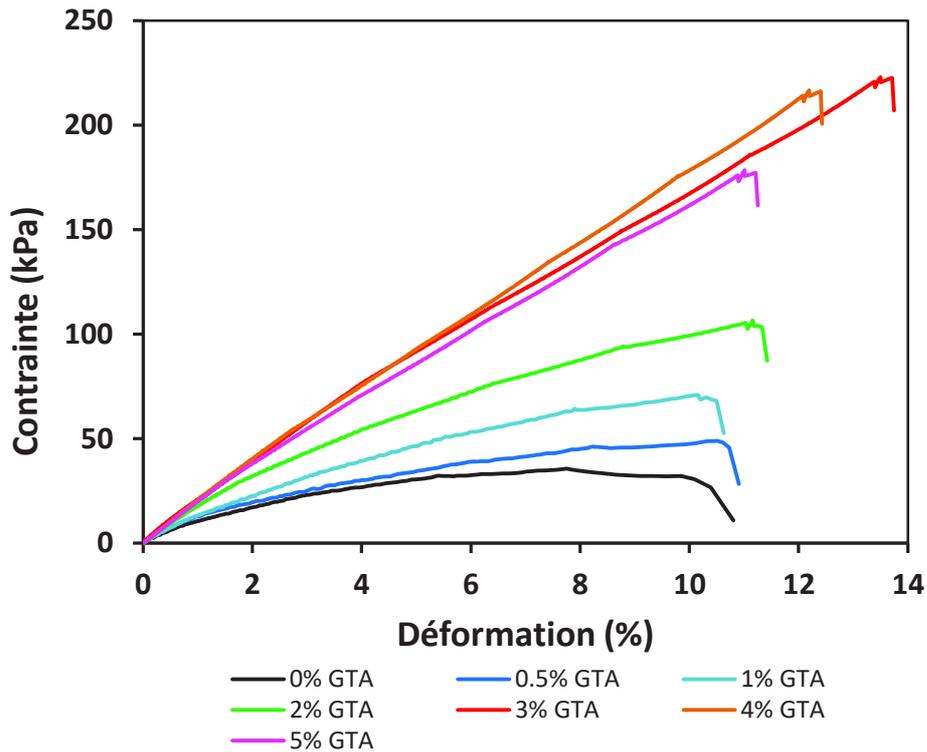


Figure 3-6 : Courbes contraintes/déformations des gels réticulés à diverses concentrations de GTA (noir : 0% v/v ; bleu foncé : 0,5% v/v ; bleu clair : 1 % v/v ; vert : 2% v/v ; rouge : 3% v/v ; orange : 4% v/v ; rose : 5% v/v).

Tableau 3-7 : Comparaison des propriétés mécaniques (module de compression, contrainte à la rupture et déformation à la rupture) des gels réticulés à différentes concentrations de GTA (0 – 5% v/v) sans et après 24 heures d'immersion dans l'eau.

[GTA] (%)	Module de compression (MPa)		Contrainte à la rupture (kPa)		Déformation à la rupture (%)	
	Avant immersion	Après 24 h d'immersion	Avant immersion	Après 24h d'immersion	Avant immersion	Après 24h d'immersion
0	0,8 ± 0,05	0,7 ± 0,06	36,3 ± 1,25	20,0 ± 1	10,3 ± 0,5	9,0 ± 0,5
0,5	1,27 ± 0,06	1,09 ± 0,26	55,3 ± 3,8	40 ± 16,3	10,6 ± 0,5	9,0 ± 0,9
1	1,32 ± 0,11	1,59 ± 0,10	66,7 ± 2,4	73,3 ± 4,7	11,0 ± 0,2	11,0 ± 0,01
2	1,62 ± 0,13	1,84 ± 0,16	96 ± 12	156,7 ± 4,7	11,7 ± 0,5	12,0 ± 0,5
3	2,30 ± 0,24	2,01 ± 0,01	227,5 ± 6,0	133,3 ± 57,0	12,0 ± 0,1	10,0 ± 0,9
4	2,13 ± 0,08	2,32 ± 0,22	223,3 ± 20	223,3 ± 57,0	13,7 ± 0,5	12,0 ± 1,2
5	1,92 ± 0,30	1,90 ± 0,19	180 ± 43	183 ± 15	12,0 ± 0,9	11,0 ± 0,9

La Figure 3-7 représente le module de compression et la contrainte à la rupture en fonction du degré de réticulation (estimé par dosage au TNBS). Contrairement au taux de gonflement, on remarque que ces propriétés continuent d'évoluer alors même que le degré de réticulation est identique et égal à 100%. On observe en effet une nette augmentation des propriétés entre les gels préparés à 2% et à 3% de GTA (le module de compression augmente de $1,62 \pm 0,13$ MPa à $2,30 \pm 0,24$ MPa lorsque la concentration de GTA augmente de 2 à 3% puis il diminue pour atteindre $1,92 \pm 0,30$ MPa à la concentration de GTA de 5%. Une tendance similaire est observée pour la contrainte à la rupture. On peut supposer qu'une fois que tous les groupements amines libres à la surface sont liés, ajouter du GTA finit par fragiliser le réseau.

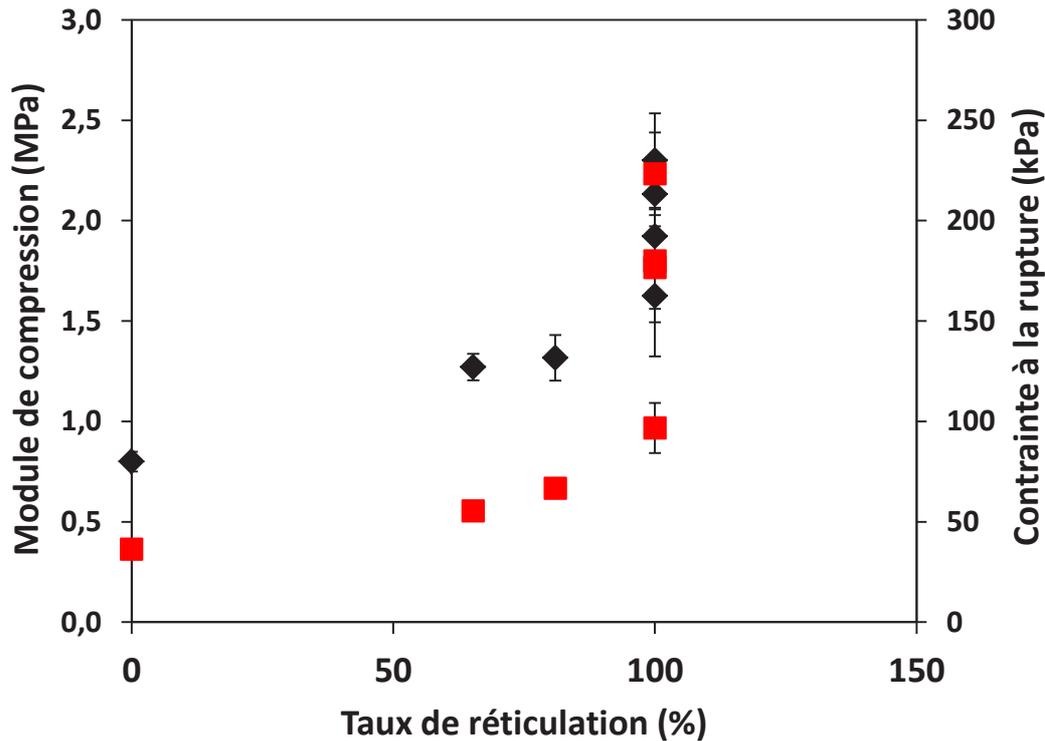


Figure 3-7 : Influence du degré de réticulation sur les propriétés mécaniques (losanges noirs : module de compression et carrés rouges : contrainte à la rupture) des gels de gélatine.

Comme ces billes de gélatine vont être utilisées en milieu aqueux pour une longue durée, il fallait vérifier la résistance à la compression des gels en immersion. Les gels ont donc été plongés dans de l'eau pendant 24 heures, puis des tests de compression ont été réalisés en immersion (en retournant la machine). Les valeurs des propriétés mécaniques mesurées au bout de 24 heures d'immersion, sont regroupées dans le Tableau 3-7 (colonnes après 24h d'immersion). D'après les résultats obtenus, l'immersion ne semble pas avoir un impact significatif sur les propriétés mécaniques des billes. La tendance est la même après immersion (augmentation des propriétés mécaniques avec le degré de réticulation, puis diminution quand la concentration en GTA atteint 5%). On peut donc conclure que réticulation avec du GTA améliore le module de compression et la contrainte à la rupture des gels, et permet une utilisation des billes même en immersion prolongée en milieu aqueux. Cependant il est inutile d'utiliser une solution trop concentrée car cela diminue les paramètres mécaniques caractéristiques de la résistance des billes à la compression.

4. Influence du taux de réticulation sur les propriétés thermiques des supports.

Outre l'impact sur les propriétés mécaniques, la réticulation peut également avoir un effet sur les propriétés thermiques des gels de gélatine. La température de dégradation de la gélatine étant d'environ 200°C (Voir la courbe d'ATG présentée au chapitre 2, paragraphe III-2.e)), on a étudié le comportement des gels réticulés ou non de -50°C à 200°C en calorimétrie différentielle à balayage. L'analyse DSC permet la détermination de la température de dénaturation de la triple hélice T_d des gels de gélatine. La Figure 3-8 représente les thermographes d'un échantillon de gélatine non réticulée et réticulée avec une solution à 1% v/v de GTA. Le pic endothermique observé autour de 100°C pour l'échantillon non réticulé et autour de 130°C pour l'échantillon réticulé correspond au point de fusion, c'est-à-dire à la dénaturation de la triple hélice accompagnée des ruptures des liaisons hydrogènes. La température de transition vitreuse T_g est difficile à observer ici, sûrement cachée par le pic de fusion pour la courbe de l'échantillon non réticulé, mais on la devine aux alentours de 100°C pour l'échantillon du gel réticulé. Cette analyse a été effectuée pour des gels réticulés avec des concentrations en gélatine de 0,5% ; 1% ; 3% ; et 5% et toutes les valeurs T_d , et d'enthalpie de dénaturation ΔH sont regroupées dans le Tableau 3-8.

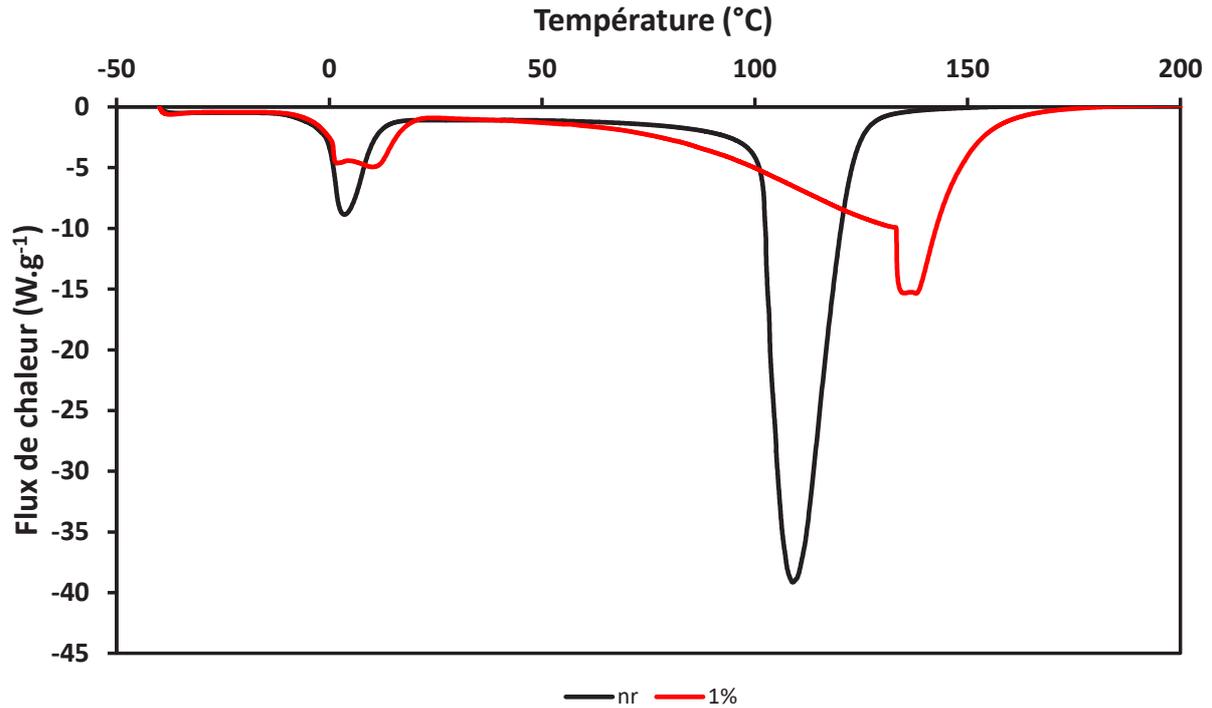


Figure 3-8 : Thermogrammes obtenus en DSC d'un échantillon non réticulé (courbe noire) et réticulé (courbe rouge) avec 1% GTA.

Tableau 3-8 : Propriétés thermiques (Température de dénaturation de la triple hélice T_d , et enthalpie de dénaturation ΔH) des gels réticulés en fonction de la concentration en GTA obtenues par analyse DSC.

GTA (% v/v)	T_d (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
0	110 ± 4	21 ± 4
0,5	123 ± 5	11 ± 3
1	133 ± 5	10 ± 4
3	133 ± 6	7 ± 2
5	136 ± 2	6 ± 1

On peut observer que l'augmentation du degré de réticulation entraîne une augmentation de la température de dénaturation de la triple hélice (T_d) et une diminution de l'enthalpie de dénaturation qui en découle (ΔH). On peut expliquer ce comportement par l'augmentation du nombre de liaisons covalentes entre les molécules de GTA et de gélatine lors de la réticulation. En effet, la stabilité de la structure s'en

trouve améliorée et la température de dénaturation de la triple hélice augmente. De plus, comme la rupture des liaisons hydrogènes est un phénomène endothermique alors que la rupture des liaisons covalentes est un phénomène exothermique, l'enthalpie de dénaturation diminue car le nombre de liaisons hydrogène diminue alors que le nombre de liaisons covalentes augmente. (Bigi et al., 2002; Dai et al., 2006).

5. Conclusion

D'après l'étude du taux de réticulation et de diverses caractérisations, une concentration de 3% v/v en GTA permet d'obtenir un taux de réticulation de la gélatine égal à 100% et des propriétés mécaniques et thermiques des billes optimisées. Il faut à présent s'intéresser à l'étape de greffage des enzymes pour voir si cette concentration permet également un greffage convenable des laccases sur la surface des billes.

III) Etude du greffage des enzymes sur les supports à base de gélatine.

1. Elaboration des billes actives

a) *Activité des enzymes greffées*

Pour s'assurer que la dégradation de l'ABTS soit bien due à l'oxydation par les laccases, et non à une auto dégradation de l'ABTS ou à une adsorption de l'ABTS sur la surface des billes, un essai a été réalisé avec des billes greffées avec des enzymes inactives (billes inactivées). Pour cela, une solution enzymatique a été dénaturée thermiquement (chauffage à 100°C pendant 15 minutes) puis utilisée pour le greffage selon la procédure habituelle sur les billes de gélatine. Ces billes ont ensuite été mises en contact avec une solution d'ABTS pendant 15 minutes. La Figure 3-9 représente l'évolution sur 15 minutes de l'absorbance à 420 nm d'une solution d'ABTS (1 mmol.L⁻¹, pH 4, 25°C) lors de sa réaction avec des billes actives ou inactivées. Une évolution d'absorbance quasi-nulle est observée lorsque l'ABTS est en contact avec des billes inactivées. L'auto-dégradation et/ou l'adsorption de l'ABTS est donc négligeable sur la durée des analyses et par conséquent, on peut conclure que l'évolution de l'absorbance suite à l'oxydation de l'ABTS n'est due qu'aux laccases présentes à la surface des billes.

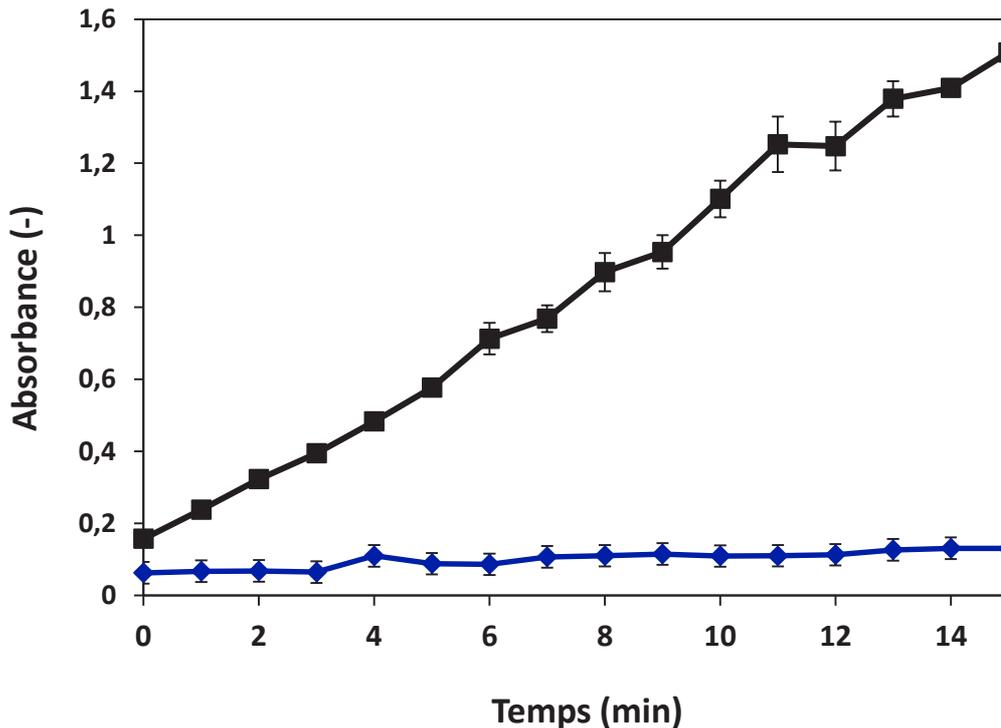


Figure 3-9 : Evolution de l'absorbance d'une solution d'ABTS (1mmol.L^{-1} , pH 4) mise en contact avec des billes actives (carrés, courbe noire) et inactives (losanges, courbe bleue). Conditions d'immobilisations des enzymes : 1h réticulation, 3% v/v GTA ; 2h greffage avec laccases TvL : $3,82\text{ U.mL}^{-1}$.

b) Spectre FTIR des gels réticulés et greffés

Les spectres FTIR des hydrogels obtenus avant et après réticulation ainsi que celui des billes après greffage des enzymes sont présentés sur la Figure 3-10. Cette analyse a pour objectif de vérifier la présence d'enzymes greffées sur la surface des billes de gélatine réticulées. Sur le spectre obtenu avant réticulation (spectre noir), on retrouve les bandes correspondantes aux liaisons caractéristiques de la gélatine. En effet, la large bande aux alentours de 3300 cm^{-1} correspond au pic de l'amide A (liaison N-H), ainsi qu'à l'eau libre, présente en abondance dans ces hydrogels. L'amide I (liaison C=O) est détecté grâce au pic aux alentours de 1630 cm^{-1} . L'amide II (liaison N-H) est représenté par le pic aux alentours de 1550 cm^{-1} . Les petits pics aux alentours de 1200 cm^{-1} correspondent aux liaisons de l'amide III (C-N, N-H). Ces observations sont en cohérence avec les spectres trouvés dans la littérature (Tengroth et al., 2005; You et al., 2016). Aucune autre bande qui pourrait suggérer la présence de PEG n'est détectable sur ce spectre, ce qui signifie que le polyéthylène glycol a été correctement éliminé à la fin de l'étape d'élaboration et qu'il n'affecte pas la structure chimique des billes de gélatine. En

comparant le spectre de la gélatine non traitée, avec celui de la gélatine réticulée (spectre vert) et celui de la gélatine réticulée et greffée (spectre bleu), on remarque d'abord une diminution d'intensité de l'absorbance, pouvant correspondre à la diminution du nombre de groupements libres NH_2 et de liaisons hydrogènes, remplacés par des liaisons covalentes. De plus, on aperçoit, surtout pour les pics amide I, amide II, et amide III, un décalage vers des longueurs d'ondes plus faibles lorsque la gélatine est réticulée, et ce décalage est encore plus marqué lorsque l'enzyme est greffée à la surface de la gélatine. Les valeurs des longueurs d'ondes de chaque pic sont rapportées dans le Tableau 3-9. Ce phénomène peut s'expliquer par l'apparition de liaisons intermoléculaires, cela a déjà été observé par Lin et al., (2019) lors de la réticulation de films de gélatine via des ponts covalents avec le glutaraldéhyde, et par Staroszczyk et al., (2012) lors de la réticulation de gélatine en présence de transglutaminase. On remarque également un épaulement bien visible aux alentours de 3400 cm^{-1} lorsque la gélatine n'est pas réticulée, correspondant à la bande d'élongation $-\text{OH}$. Cet épaulement diminue lorsque la gélatine est réticulée par le glutaraldéhyde, et n'est plus visible lorsque les enzymes sont greffées à la surface, cela laisse supposer que des liaisons OH sont également impliquées dans le mécanisme de réticulation (Farris et al., 2010).

Tableau 3-9 : Valeurs des longueurs d'ondes aux pics d'absorbance FTIR pour les gels non traités, réticulés, et greffés.

Pics	Gélatine	Gélatine + GTA	Gélatine + GTA + laccases
Amide A	3302 cm^{-1}	3304 cm^{-1}	3322 cm^{-1}
Amide B	2922 cm^{-1}	2920 cm^{-1}	2918 cm^{-1}
Amide I	1636 cm^{-1}	1634 cm^{-1}	1634 cm^{-1}
Amide II	1552 cm^{-1}	1550 cm^{-1}	1548 cm^{-1}
Amide III	1246 cm^{-1}	1244 cm^{-1}	1240 cm^{-1}

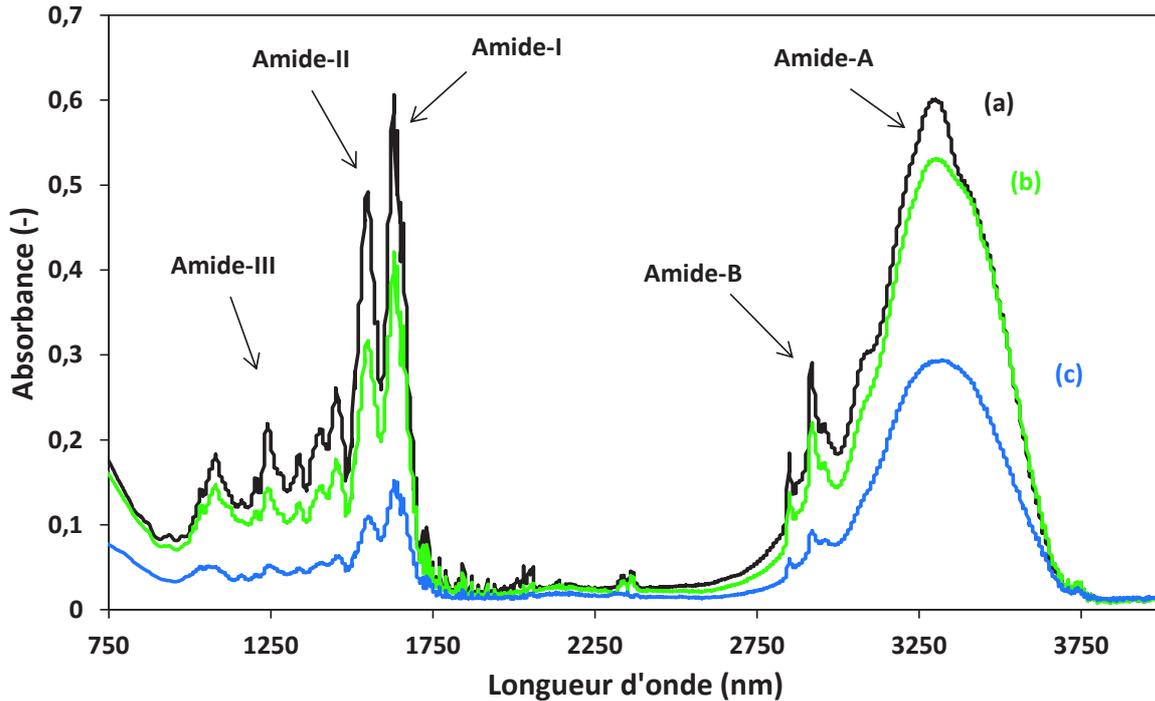


Figure 3-10 : Spectres FTIR : courbe (a) gélatine non traitée, (b) gélatine + GTA, (c) gélatine + GTA + laccases.

2. Etude des paramètres du greffage : plan d'expérience 2^4

Les étapes d'immobilisation des laccases sur les billes de gélatine sont rappelées schématiquement sur la Figure 3-11. Comme vu dans l'état de l'art, (chapitre I, paragraphe III), l'efficacité d'une immobilisation d'enzymes dépend de plusieurs facteurs, dont les concentrations en agent de réticulation, en biocatalyseur et les temps de contact. Le pH des solutions est également un paramètre important mais dans notre cas nous avons décidé de le fixer à 7, pour éviter une protonation des groupements amines de la gélatine et maximiser ainsi la réaction entre le glutaraldéhyde et le support. De plus, un pH trop basique pourrait affecter négativement la stabilité des enzymes, ce paramètre sera discuté plus tard.

Le but de cette partie est d'identifier les paramètres importants afin de préparer des billes les plus actives possibles.

Pour cela, un plan d'expérience factoriel 2^4 a été réalisé, avec 4 facteurs : X_1 la concentration en glutaraldéhyde (en %v/v), X_2 le temps de réticulation (en h), X_3 la concentration en laccase (en U.mL⁻¹) et X_4 le temps de greffage (en h). La réponse

étudiée est l'activité des enzymes immobilisées après greffage, en U.g⁻¹. Les correspondances entre chaque niveau et la valeur réelle pour chaque paramètre sont rappelées au chapitre 2, paragraphe II-1.c), Tableau 2-2.

Les choix pour les intervalles pour chaque facteur se sont basés sur des essais préliminaires et une lecture de la littérature. Par exemple, la concentration minimale en glutaraldéhyde a été choisie à 3% v/v car c'est la valeur pour laquelle la réticulation de la gélatine est maximale (cf paragraphe II-1 de ce chapitre, Figure 3-3).

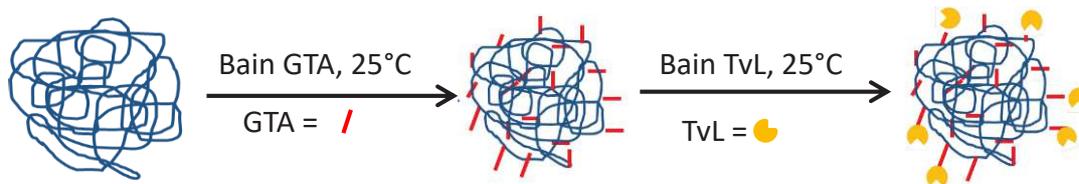


Figure 3-11 : Rappel du protocole d'immobilisation des laccases à la surface des billes de gélatine.

Le Tableau 3-10 regroupe les résultats du plan d'expérience, avec pour chaque essai la réponse expérimentale, et celle prédite par le modèle.

Les trois dernières expériences réalisées sont les points centraux du modèle (niveaux 0,0,0). Les 3 répétitions de cet essai avec les trois points centraux permettent d'estimer l'erreur expérimentale des analyses, qui vaut ici 0,002.

Une analyse statistique (ANOVA) a été effectuée et les résultats de cette analyse sont rassemblés dans le Tableau 3-11. Tout d'abord, le coefficient de régression linéaire élevé ($r=0,9934$), ainsi que un $p = 0,006 < 0,05$ indique qu'une relation statistique existe entre la réponse et les variables sélectionnées à un niveau de confiance de 95%. De plus, l'indépendance des résidus, la normalité des résidus et l'homogénéité de la variance ont été vérifiées par des tests statistiques, confirmant la validité du modèle.

L'analyse ANOVA permet également d'évaluer si les facteurs étudiés et leurs interactions sont significatifs ou non. Un facteur ou une interaction est considérée comme significatif si la valeur de « Prob(>t) » est inférieure à 0,05. D'après les valeurs rapportées, un facteur et trois interactions ne sont pas significatifs, il s'agit du facteur X₁, soit la concentration

en glutaraldéhyde ($\text{Prob}(> t) = 0,6051$) et des interactions $X_2.X_4$ (0,0864) , $X_3.X_4$ (0,5994), et $X_1.X_2.X_4$ (0,9455).

Tableau 3-10 : Résultats du plan d'expérience, comparaison entre réponses expérimentales et prédites par le modèle.

Numéro de l'essai	Concentration en GTA (%v/v)	Temps de réticulation (h)	Concentration en laccases (U.mL ⁻¹)	Temps de greffage (h)	Activité des enzymes immobilisées (U.g ⁻¹)	
					Expérimental	Modèle
1	3	1	2,18	1	0,051	0,051
2	7	1	2,18	1	0,059	0,057
3	3	2	2,18	1	0,027	0,027
4	7	2	2,18	1	0,018	0,016
5	3	1	3,82	1	0,036	0,037
6	7	1	3,82	1	0,034	0,033
7	3	2	3,82	1	0,032	0,033
8	7	2	3,82	1	0,077	0,077
9	3	1	2,18	2	0,069	0,069
10	7	1	2,18	2	0,076	0,076
11	3	2	2,18	2	0,032	0,033
12	7	2	2,18	2	0,063	0,062
13	3	1	3,82	2	0,091	0,090
14	7	1	3,82	2	0,051	0,050
15	3	2	3,82	2	0,081	0,080
16	7	2	3,82	2	0,050	0,049
17	5	1.5	3	1.5	0,049	0,052
18	5	1.5	3	1.5	0,048	0,052
19	5	1.5	3	1.5	0,054	0,052

Tableau 3-11 : Analyse de la régression linéaire par ANOVA.

Termes	Coefficients	Erreur standard	t _i	Prob (>t)
Intercept				
X ₀	5,26E-02	0,82	63,97	8,42E-06
X ₁	5,20E-04	0,89	0,58	0,6051
X ₂	-5,47E-03	0,89	-6,11	0,0088
X ₃	3,64E-03	0,89	4,06	0,0269
X ₄	1,12E-02	0,89	12,46	0,0011
X ₁ .X ₂	3,90E-03	0,89	4,35	0,0224
X ₁ .X ₃	-3,92E-03	0,89	-4,38	0,0221
X ₂ .X ₃	8,94E-03	0,89	9,98	0,0021
X ₁ .X ₄	-4,54E-03	0,89	-5,07	0,0148
X ₂ .X ₄	-2,25E-03	0,89	-2,52	0,0864
X ₃ .X ₄	5,20E-04	0,89	0,59	0,5994
X ₁ .X ₂ .X ₃	3,19E-03	0,89	3,57	0,0377
X ₁ .X ₂ .X ₄	7,00E-05	0,89	0,07	0,9455
X ₁ .X ₃ .X ₄	-9,61E-03	0,89	-10,73	0,0017
X ₂ .X ₃ .X ₄	-4,04E-03	0,89	-4,51	0,0204
X ₁ .X ₂ .X ₃ .X ₄	-4,96E-03	0,89	-5,53	0,0116

$R^2 = 0,9934$; $\text{Adj-}R^2 = 0,9803$; $p\text{-value} = 0,006$.

Les effets principaux de chaque facteur sur la réponse sont affichés sur la Figure 3-12.

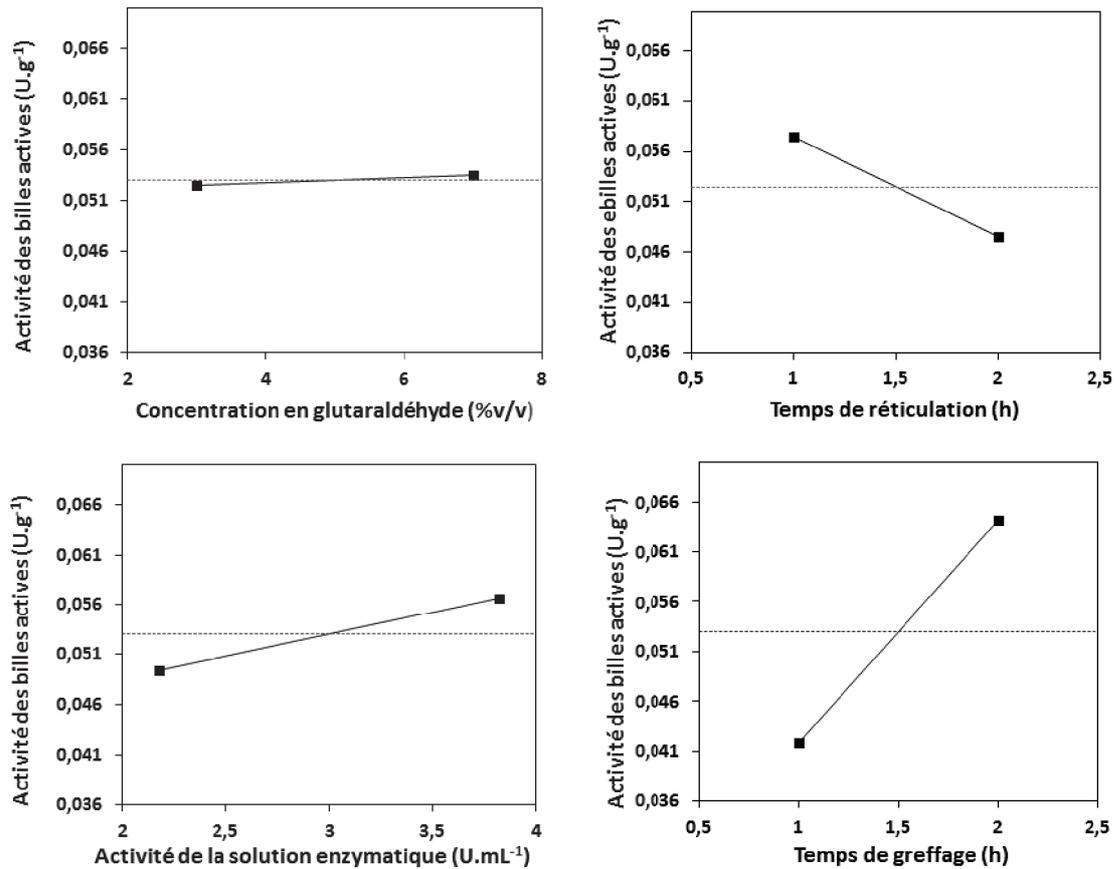


Figure 3-12 : Courbe de l'influence de chaque facteur sur l'activité des enzymes immobilisées.

D'après les résultats, la concentration en agent de réticulation n'a pas d'impact sur l'activité des enzymes immobilisées. On choisit donc la concentration testée la plus faible, à savoir 3% v/v, et cette concentration nous permet également d'avoir un taux de réticulation égal à 100% et des propriétés mécaniques optimisées (montrés au paragraphe II-1, II-2, et II-3 de ce chapitre). De plus, une concentration trop élevée en glutaraldéhyde peut entraîner une modification de la structure de l'enzyme accompagnée donc d'une perte d'activité (Spinelli et al., 2013).

Le temps de réticulation a un effet significatif : l'activité des enzymes immobilisées augmente lorsque le temps de contact avec le glutaraldéhyde diminue. En effet si le temps d'activation est trop long, une fois que tous les groupements amines de la gélatine sont impliqués avec une fonction aldéhydique de GTA, il est possible que les 2nde fonctions aldéhydique de 2 GTA proches interagissent pour former un pont entre deux chaînes de gélatine. Il est en effet connu que le GTA polymérise, comme cela a été discuté dans le paragraphe IV-3.b) du chapitre 1. Si cela se reproduit à grande échelle, il y aura

donc moins de sites actifs disponibles pour le greffage de l'enzyme. Un temps de réticulation de 1 heure est le plus adapté pour notre application.

La concentration en enzymes a un effet plus modéré sur l'activité des billes ; cette dernière augmente lorsque la concentration de la solution enzymatique augmente. Une concentration plus élevée entraîne un plus grand nombre de groupements amines de résidus de lysine disponibles pour créer des liaisons covalentes avec les molécules de glutaraldéhyde. On peut remarquer que même à concentration enzymatique élevée (3,82 U.mL⁻¹), il y a assez de groupements aldéhydiques libres pour réagir avec les enzymes, l'optimum ne semble donc pas encore atteint. Par souci de coût, on se limitera à la concentration en enzymes maximale testée ici, qui est de 3,82 U.mL⁻¹.

Le temps de greffage semble être le paramètre ayant le plus d'impact sur l'activité finale des enzymes immobilisées. L'activité des billes augmente quand le temps de greffage augmente. Ce résultat n'est pas surprenant car les enzymes vont avoir plus de temps pour créer des liaisons covalentes avec les groupements aldéhydes du glutaraldéhyde à la surface des billes. Fortes et al., (2017) ont observé le même effet du temps de greffage lors de l'immobilisation de laccases sur des nanoparticules magnétiques. Un temps de contact de 2 heures sera donc conservé pour la suite du projet.

Les paramètres conservés pour l'étape de greffage après l'étude de ce plan d'expérience sont rassemblés dans le Tableau 3-12.

Tableau 3-12 : Paramètres optimisés pour l'étape de greffage des laccases sur les billes.

Facteur	Niveau	Valeur
X ₁ : Concentration en glutaraldéhyde (% v/v)	-1	3
X ₂ : Temps de réticulation (h)	-1	1
X ₃ : Concentration en enzymes (U.mL ⁻¹)	+1	3,82
X ₄ : Temps de greffage (h)	+1	2

Après élimination des termes non significatifs, on obtient le modèle défini par l'équation (3.4).

$$\begin{aligned}
 & \text{Activité (U.g}^{-1}\text{)} \\
 & = 52.58 * 10^{-2} - 5.47 * 10^{-3} * X_2 + 3.64 * 10^{-3} * X_3 \\
 & + 11.16 * 10^{-3} X_4 - 3.92 * 10^{-3} * X_1 X_2 + 8.94 * 10^{-3} * X_2 X_3 - 4.54 \\
 & * 10^{-3} * X_1 X_4 + 3.19 * 10^{-3} * X_1 X_2 X_3 - 9.61 * 10^{-3} * X_1 X_3 X_4 - 4.04 \\
 & * 10^{-3} * X_2 X_3 X_4 - 4.96 * 10^{-3} * X_1 X_2 X_3 X_4
 \end{aligned} \quad (3.4)$$

Pour obtenir un plan plus poussé et une équation du second ordre, on pourrait réaliser un plan de surface de réponse (MSR) avec des expériences supplémentaires aux niveaux extrêmes ($-\alpha$; $+\alpha$). Mais ce n'était pas l'objectif ici, qui était d'identifier les paramètres les plus influents sur l'activité des enzymes greffées sur des billes de gélatine.

3. Caractérisation des enzymes libres et immobilisées.

a) Rendement d'immobilisation

Avant toute chose, il a été nécessaire de vérifier la stabilité de notre laccase dans les conditions de greffage. En effet, d'après la littérature, une faible activité des enzymes immobilisées peut être due à des dénaturations de l'enzyme causées par les conditions d'immobilisation (Boudrant et al., 2019). La Figure 3-13 représente l'évolution de l'activité d'une solution de laccase à 25°C, sous agitation constante (250 rpm) en tampon citrate-phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH 7). On observe une augmentation de l'activité de la solution enzymatique au cours des 5 premières heures après la mise en suspension des enzymes. Cela est sûrement lié à la solubilisation progressive des enzymes et au temps nécessaire pour la réhydratation complète des chaînes protéiques. La solution enzymatique de greffage est donc toujours préparée 24 heures avant l'immobilisation pour s'assurer que l'activité de cette dernière n'évoluera pas durant le greffage et qu'elle correspond bien à l'activité maximale de la solution.

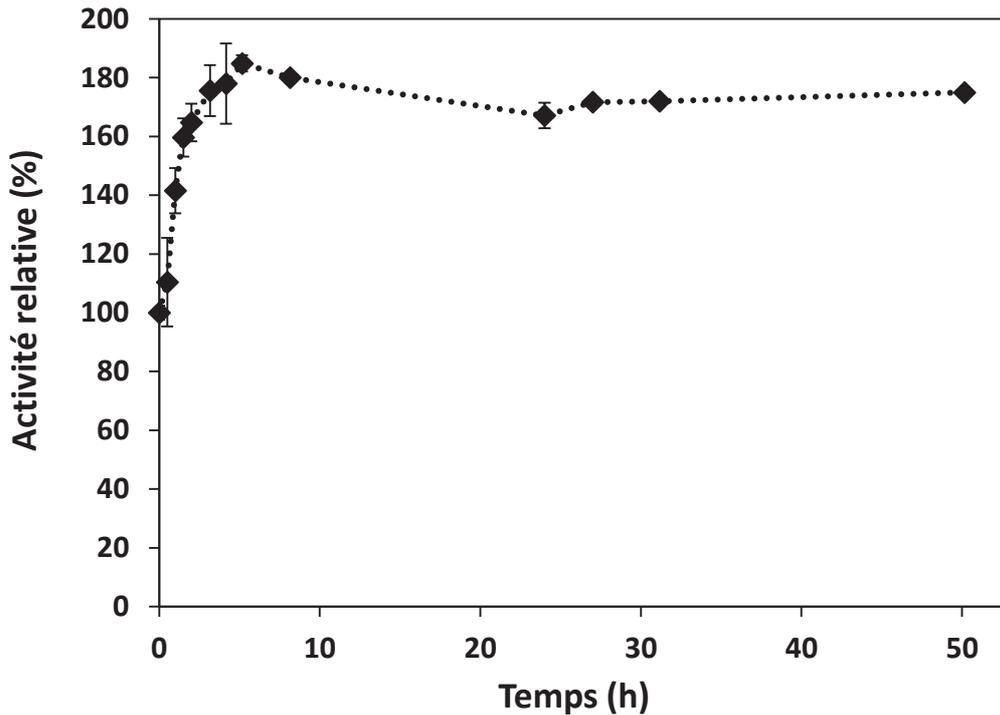


Figure 3-13 : Evolution de l'activité de la solution enzymatique durant 50 heures dans les conditions identiques à celle de l'immobilisation (pH 7, 25°C, agitation 250 rpm).

Vu la nature protéique du support (bille de gélatine), la quantification des enzymes immobilisées par une méthode de dosage de protéines (méthode de Lowry) n'était pas possible en raison des risques de relargage de chaînes de gélatine pouvant fausser les analyses. Nous avons choisi d'estimer le rendement d'immobilisation à partir de la différence entre les activités de la solution enzymatique avant et après greffage.

A la fin de l'étape de greffage réalisée dans les conditions fixées par le plan d'expérience, la solution enzymatique mise en contact avec les billes et les solutions de rinçages des billes sont récupérées et les activités enzymatiques résiduelles de ces solutions sont mesurées afin d'être comparées à celle de la solution enzymatique avant greffage (Chapitre 2, paragraphe II-2.b)).

Le rendement d'immobilisation ($\eta_{\text{immobilisation}}$) et l'activité exprimée ($A_{\text{exprimée}}$, ratio entre l'activité des enzymes immobilisées sur l'activité enzymatique de la solution initiale) sont estimés respectivement à partir des équations (2.4) et (2.5) du chapitre 2, paragraphe II-2.b). Les valeurs du rendement d'immobilisation et de l'activité exprimée sont égales à $31\% \pm 6\%$ et à $50 \pm 5\%$ respectivement.

Ces deux taux sont bien inférieurs à 100% et cela est principalement dû au rapport existant entre la masse de billes (environ 1 g) et le volume de solution (50 mL) mis en jeu lors de l'immobilisation. La quantité d'enzymes disponibles est sans doute très supérieure au nombre de sites de greffage présents à la surface des billes. Ce rapport devra être revu et optimisé en vue de l'industrialisation du procédé mais ce n'est pas l'objet de notre étude.

L'activité des billes activées est de 0,09 U.g⁻¹ de billes humides.

b) Stabilité du greffage

D'après la littérature, les supports riches en groupements fonctionnels comme le sont les billes de gélatine présentent, après activation avec le glutaraldéhyde, des propriétés d'hétérofonctionnalité qui leur permettent d'interagir avec les enzymes via différents types de liaisons (liaisons ionique, liaisons de Van der Waals) (Barbosa et al., 2014). Il est donc fort possible qu'une partie des enzymes ne soit attachée aux billes que par des liaisons ioniques faibles et non pas par des liaisons covalentes.

Pour s'assurer de l'installation de liaisons covalentes entre les surfaces des billes et les laccases et donc vérifier l'efficacité du greffage, 10 cycles successifs de réaction avec une solution fraîche d'ABTS (1 mmol.L⁻¹, pH 4) ont été réalisés en prenant soin, entre chaque cycle, de rincer les billes au tampon citrate phosphate (pH 7, 50 mmol.L⁻¹). La Figure 3-14 représente l'évolution de l'activité des enzymes durant ces 10 cycles.

On remarque que l'activité des billes actives diminue drastiquement de 100% à 60% au cours des deux premiers cycles de réaction. Cette diminution d'activité est probablement liée à un décrochage des enzymes ou à des modifications conformationnelles entraînant une dénaturation de l'enzyme (Simón-Herrero et al., 2019; Ye et al., 2006). Ainsi, cela semble renforcer l'hypothèse précédemment émise selon laquelle une partie des laccases était simplement adsorbée via des interactions physiques faibles (probablement ioniques), et que ces dernières se sont décrochées au cours des deux premiers cycles. Ensuite, l'activité des billes se maintient aux alentours de 60% de l'activité initiale et ce jusqu'au 10^{ème} cycle; ces résultats confirment l'existence de liaisons chimiques covalentes entre les enzymes et la surface des billes de gélatine.

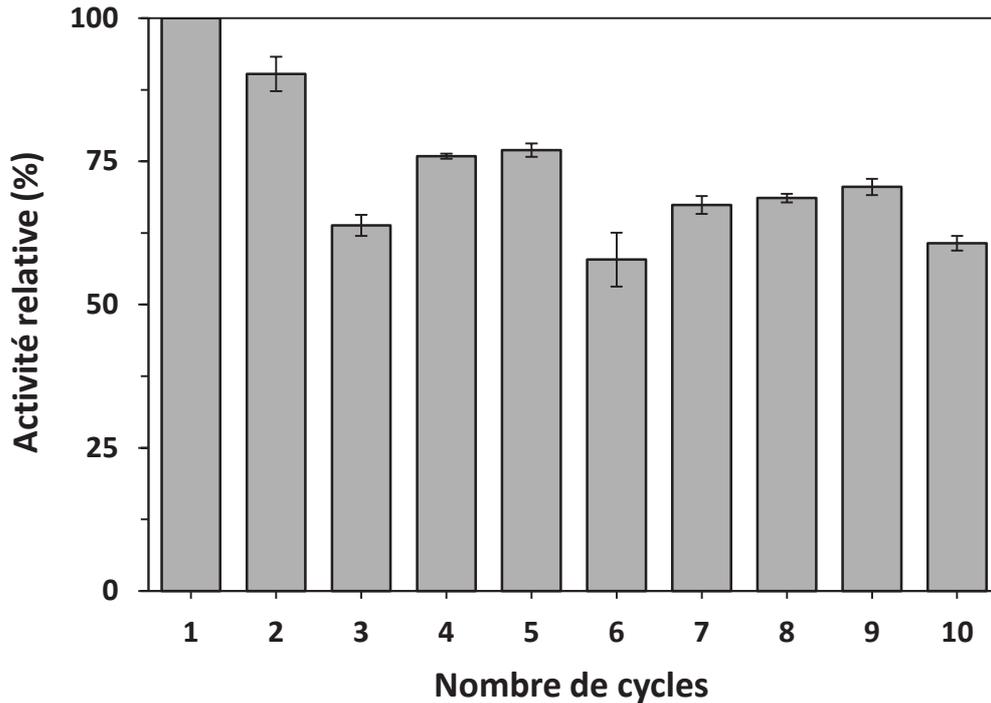


Figure 3-14 : Evolution de l'activité des billes de gélatine greffées pendant 10 cycles successifs de réaction avec l'ABTS (1 mmol.L^{-1} , pH 4, 25°C).

c) Activité des enzymes en fonction du pH et de la température

Le pH optimal d'une enzyme dépend de son origine (souche microbienne), du substrat utilisé mais il peut également être modifié lors de l'immobilisation (Chen et al., 2015). L'oxydation de l'ABTS par la laccase libre ou immobilisée a été étudiée pour une gamme de pH variant de 2,2 à 6 (Figure 3-15 A). Les résultats obtenus montrent un léger changement de la courbe de pH, le pH optimal est de 3 pour les enzymes libres et de 4 pour les enzymes immobilisées. Un décalage du pH optimal est courant lors de l'immobilisation. En effet, les modifications structurales de l'enzyme liées au greffage permettent de maintenir au voisinage du site actif de l'enzyme un micro environnement dont le pH peut être différent de celui du milieu. Ainsi, le pH observé localement près du site actif reste proche du pH optimal de l'enzyme, ce qui explique un élargissement du profil pH lorsque les enzymes sont immobilisées (Zhang et al., 2012). Asgher et al., (2017) ont observé un changement similaire de pH optimal vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS : 5,6 pour des laccases encapsulées dans une matrice de gélatine contre 4,6 pour des laccases libres. De plus, une baisse nette de l'activité est observée pour les enzymes libres et immobilisées à partir de pH 5. Pour les laccases libres, seulement $10\% \pm 3\%$ d'activité relative est relevée à pH 5 et plus aucune activité n'est détectée à pH 6. La

diminution est moins drastique pour les enzymes immobilisées, il reste $52\% \pm 4\%$ de l'activité initiale à pH 5 et $10\% \pm 2\%$ à pH 6. Le greffage permet donc d'améliorer la résistance de la laccase face à des changements de pH du milieu, notamment vis-à-vis des pHs plus alcalins comme cela a déjà été rapporté dans la littérature (Mazlan and Hanifah, 2017).

La Figure 3-15 B) représente le profil température des enzymes libres et greffées. L'immobilisation n'a pas d'influence sur la température optimale (35°C) pour l'oxydation de l'ABTS. On remarque néanmoins que la plage de températures est plus large pour les enzymes immobilisées. L'activité relative des enzymes libres diminue à $75\% \pm 9\%$ à 45°C et jusqu'à $32\% \pm 5\%$ à 55°C alors qu'il reste $98\% \pm 5\%$ d'activité relative à 45°C et $79\% \pm 4\%$ à 55°C pour les enzymes greffées. L'immobilisation semble donc protéger le site actif des enzymes de modifications structurelles responsables de la perte d'activité lors d'une mise en œuvre à une température supérieure à 40°C . Plusieurs chercheurs ont observés ce phénomène lors d'immobilisation de laccases sur divers supports (Lu et al., 2007; Mogharabi et al., 2012; Zhu et al., 2007).

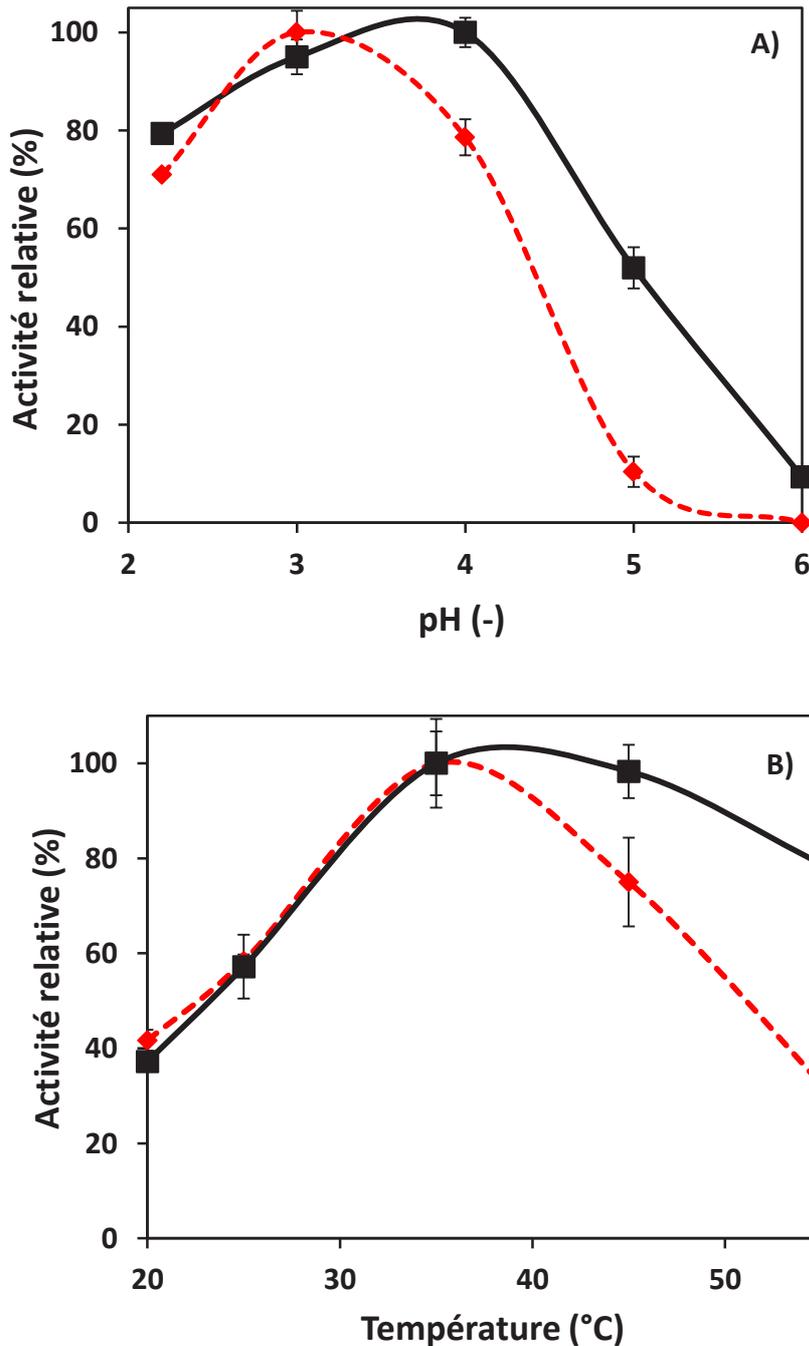


Figure 3-15 : Profils (A) pH (température maintenue à 25°C) et (B) température (pH maintenu à 4) des enzymes libres (losanges rouges – ligne pointillée) et immobilisées (carrés noirs – ligne continue) vis-à-vis de l'ABTS (1 mmol.L⁻¹).

d) Stabilité des enzymes vis-à-vis du pH et de la température

La stabilité des enzymes vis-à-vis du pH a été étudiée pour trois pH différents (3, 5 et 9) durant 24 heures, et l'évolution de l'activité des enzymes libres et immobilisées durant l'incubation à ces trois pHs est représentée sur la Figure 3-16 A). On remarque que l'incubation à pH 3 a l'effet le plus néfaste sur l'activité des enzymes, libres et

immobilisées. Cet effet est cependant moins important lorsque les enzymes sont greffées, il reste ainsi $51,8 \pm 3\%$ d'activité relative pour les enzymes immobilisées contre $29,7\% \pm 3\%$ pour les enzymes libres après 24 heures d'incubation à pH 3. La tendance est la même à pH 5 et pH 9, la conservation de l'activité des enzymes greffées est légèrement meilleure que celle des enzymes libres lors de l'incubation à ces différents pH. Cela confirme l'hypothèse évoquée précédemment, selon laquelle le greffage permet de protéger le site actif des changements de pHs du milieu.

La stabilité enzymatique peut être grandement détériorée avec l'augmentation de la température. Ce phénomène est cependant dépendant de l'origine de l'enzyme, et peut être limité par l'immobilisation. L'influence du greffage sur la stabilité thermique des enzymes a ici été étudiée au cours de 6 heures d'incubation à 60°C (dans une solution tampon citrate phosphate pH 7), et les résultats sont représentés sur la Figure 3-16 B). On retrouve ici l'effet négatif d'une température élevée sur l'activité enzymatique, la perte d'activité étant probablement due à des altérations du site actif de l'enzyme (Daniel, 1996). Après 1h d'incubation à 60°C , l'activité relative des enzymes libres chute à $40\% \pm 2\%$ et il ne reste que $12\% \pm 1\%$ après 6 heures d'incubation. L'effet de la température sur les enzymes greffées est un peu moins marqué et il reste encore $38\% \pm 1\%$ après 6 heures d'incubation. Le phénomène observé lors de l'étude du profil de température est confirmé et le greffage semble donc bien avoir un effet stabilisateur sur l'enzyme, empêchant les déformations structurelles liées aux modifications de pH et de température du milieu (Gonzalez-Coronel et al., 2017).

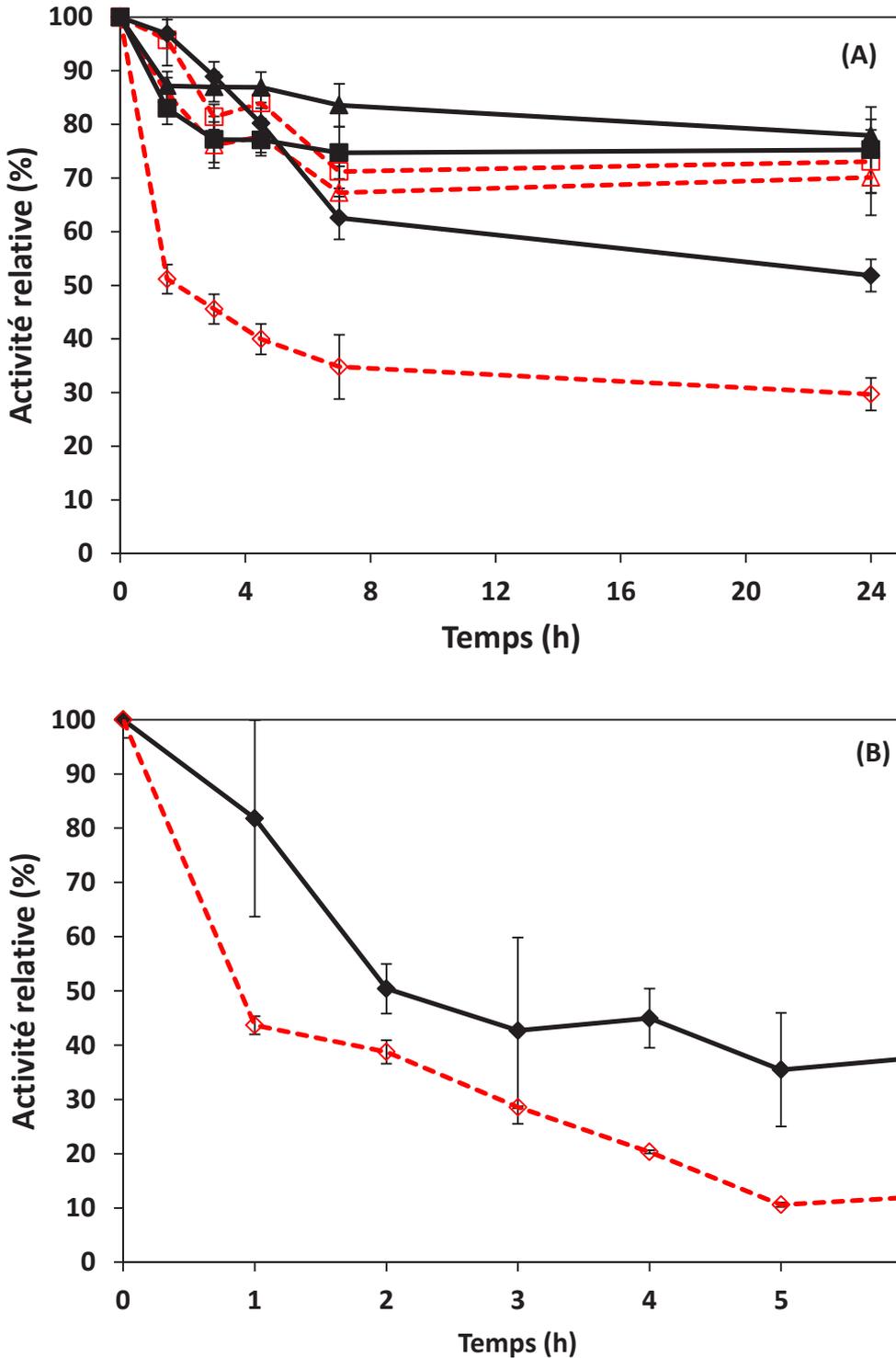


Figure 3-16: (A) : Stabilité par rapport au pH des enzymes libres (ligne rouge pointillée) ou immobilisées (ligne noire continue) pendant 24 heures à pH 3 (losanges), pH 5 (carrés), et pH 9 (triangles) ; incubation à 25°C dans une solution tampon citrate phosphate (50 mmol.L⁻¹). (B) : Stabilité des enzymes libres (ligne rouge pointillée) ou immobilisées (ligne noire continue) par rapport à la température (incubation dans une solution tampon citrate phosphate (50 mmol.L⁻¹, pH 7) à 60°C pendant 6 heures).

e) *Stabilité des enzymes immobilisées au cours du stockage*

Tout d'abord, une étude préliminaire a été effectuée pour déterminer les conditions adéquates pour le stockage des billes. Pour cela, des billes actives ont été stockées dans quatre conditions différentes : deux lots ont été conservés en milieu liquide à 4°C : (A) dans un pilulier rempli de tampon pH 7, (B) dans de l'eau distillée ; et deux lots ont été stockés en milieu sec : (C) dans un dessiccateur à température ambiante, et (D) dans un pilulier fermé à 4°C. La Figure 3-17 représente l'évolution de l'activité de chacun des lots durant 4 jours. D'après ces résultats, seul le lot conservé dans une solution tampon citrate phosphate (pH 7, 50 mmol.L⁻¹) permet de conserver une activité correcte des billes au cours du temps. Ce milieu de stockage sera donc celui gardé pour toute la suite des expériences.

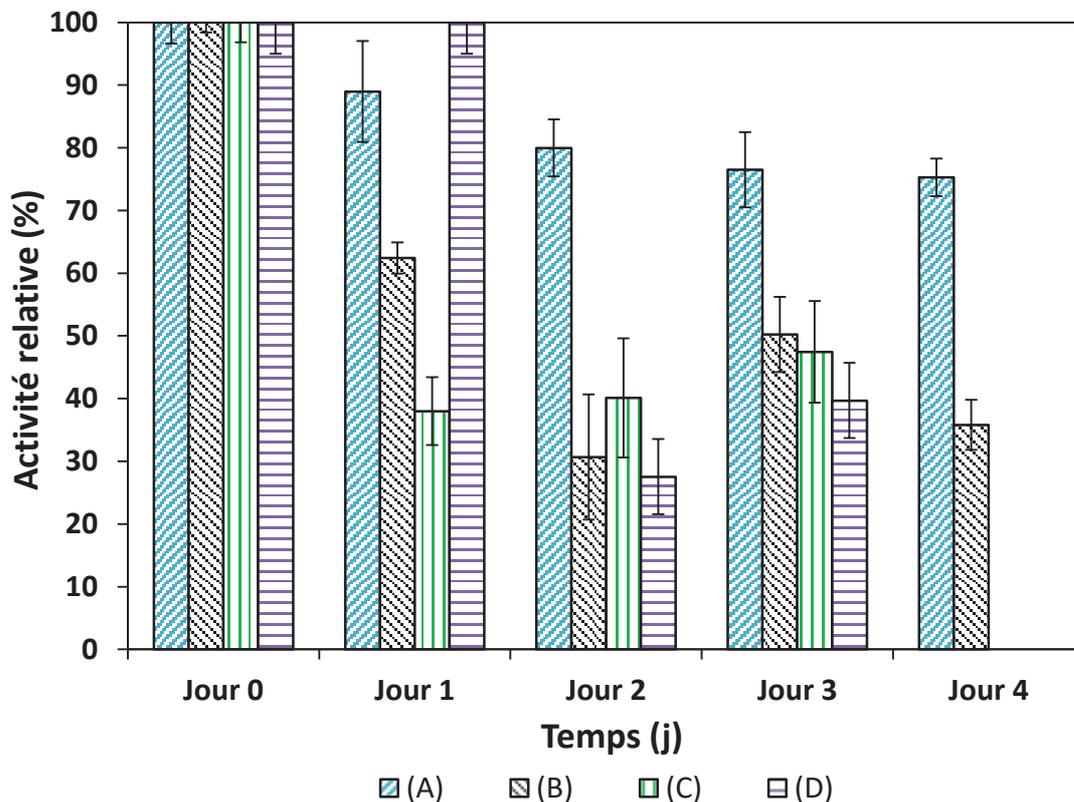


Figure 3-17 : Etude du choix du milieu de stockage pour les billes actives. Milieux liquides : (A) Solution tampon citrate phosphate pH 7 à 4°C ; (B) Eau distillée à 4 °C ; Milieux secs : (C) Dessiccateur à température ambiante ; (D) Pilulier fermé, 4°C.

La stabilité des enzymes libres et greffées a été étudiée pendant 20 jours (stockées dans une solution tampon pH 7 à 4°C) et les résultats sont présentés sur la Figure 3-18. Après 20 jours de stockage, l'activité relative des enzymes libres a légèrement diminué mais

est restée égale à $90\% \pm 5\%$ de l'activité initiale. Pour les enzymes immobilisées, cette baisse est également présente et l'activité diminue rapidement les 2 premiers jours puis tend à se stabiliser au bout de 20 jours à une valeur égale à $85\% \pm 4\%$ de l'activité initiale. Cette perte d'activité durant le stockage est probablement due à un décrochage des enzymes qui n'étaient pas immobilisées par liaisons covalentes mais par des liaisons de faibles énergies (liaisons ioniques), comme on a pu le constater dans la partie précédente. Si on fait le rapport de l'activité restante au 20^{ème} jour sur celle restante au 2^{ème} jour, on trouve un pourcentage de perte pour les enzymes immobilisées de 6% en 18 jours. Si on fait le même calcul pour les enzymes libres, on trouve une perte d'activité de 4% en 18 jours. Ces deux pertes d'activités sont très proches, donc on peut conclure qu'une fois les enzymes adsorbées par liaisons ioniques décrochées, les enzymes immobilisées par liaison covalente restent actives conférant ainsi une bonne stabilité aux billes actives.

Il n'est pas surprenant que les enzymes perdent de l'activité pendant le stockage. Fortes et al., (2017) ont immobilisés des laccases sur des nanoparticules magnétiques et ont observé une diminution d'activité important au début du stockage puis une stabilisation autour de 30% par rapport à l'activité initiale au bout de 30 jours de stockage. Asgher et al., (2017) ont noté 60% d'activité relative après 3 semaines et 40% après 6 semaines de stockage pour des laccases encapsulées dans de la gélatine; et Tavares et al., (2015) ont reporté une activité résiduelle de 60% après 30 jours de stockage.

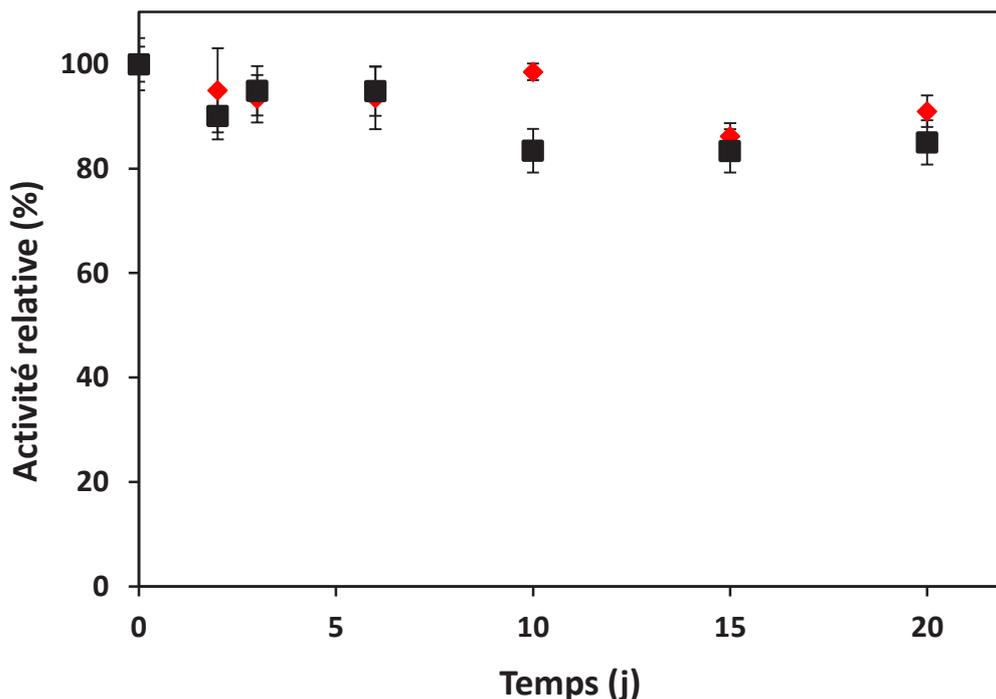


Figure 3-18 : Stabilité par rapport au stockages d'enzymes libres (losanges rouges) et immobilisées (carrés noirs) stockées dans une solution de tampon citrate-phosphate (pH 7, 50 mmol.L⁻¹) à 4°C durant 20 jours.

f) Impact de l'immobilisation sur les constantes cinétiques

Les paramètres cinétiques de Michaelis-Menten K_m et V_{max} caractérisent l'activité d'un biocatalyseur vis-à-vis d'un substrat donné. Pour étudier l'impact de l'immobilisation sur l'activité catalytique de notre laccase, les constantes cinétiques des laccases libres et immobilisées sur les billes de gélatine ont été déterminées vis à vis de l'oxydation de l'ABTS. Ces constantes ont été estimées à partir l'équation de Lineweaver-Burk (équation (2.7) du paragraphe II-2.c) du chapitre 2), dont un exemple de représentation graphique est donné sur la Figure 3-19. Les essais ont été réalisés en triplicats et les résultats sont consignés dans le Tableau 3-13. La constante K_m représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction sera égale à la moitié de la vitesse maximale (V_{max}). Ainsi, plus K_m est petit, meilleure est l'affinité entre l'enzyme et le substrat. Cette valeur est indépendante de la concentration en enzymes utilisée, alors que la valeur de V_{max} dépend de cette concentration. Les essais en enzymes libres et en enzymes immobilisées ont été réalisés à la même concentration en enzymes exprimée en unité d'activité (30 U.L⁻¹), cela explique que les valeurs de V_{max} sont proches pour les

deux formes de laccase. Cependant, il n'a pas été possible ici de déterminer avec précision la quantité d'enzymes présente dans les deux formes, on ne peut donc pas conclure sur l'influence du greffage sur la valeur de V_{max} . En ce qui concerne le K_m , sa valeur est ici plus faible quand les enzymes sont immobilisées sur les billes de gélatine que lorsqu'elles sont libres en solution. Ce résultat est surprenant car il est souvent reporté dans la littérature que l'immobilisation d'enzymes sur des supports polymères ou inorganiques entraîne des limitations diffusionnelles et diminue la flexibilité de la protéine (Ma et al., 2018; Olajuyigbe et al., 2019; Sun et al., 2015). Cependant, d'autres études ont montré une diminution du K_m lorsque des laccases de *Trametes Versicolor* sont immobilisées sur des supports de gélatine. Asgher et al., (2017) ont remarqué une légère diminution du K_m pour des laccases encapsulées dans de la gélatine, et De Cazes et al., (2014) ont décrit un K_m 5 fois plus petit lorsque la laccase est immobilisée par liaison covalente sur des membranes céramiques recouvertes par une couche de gélatine réticulée au glutaraldéhyde. Ainsi, les résultats obtenus ici semblent confirmer un effet positif de la gélatine créant un environnement favorable à la catalyse et protégeant l'enzyme de la dénaturation. La diminution du K_m peut aussi être expliquée par le fait que les enzymes sont certainement greffées en surface et non dans la masse de la bille.

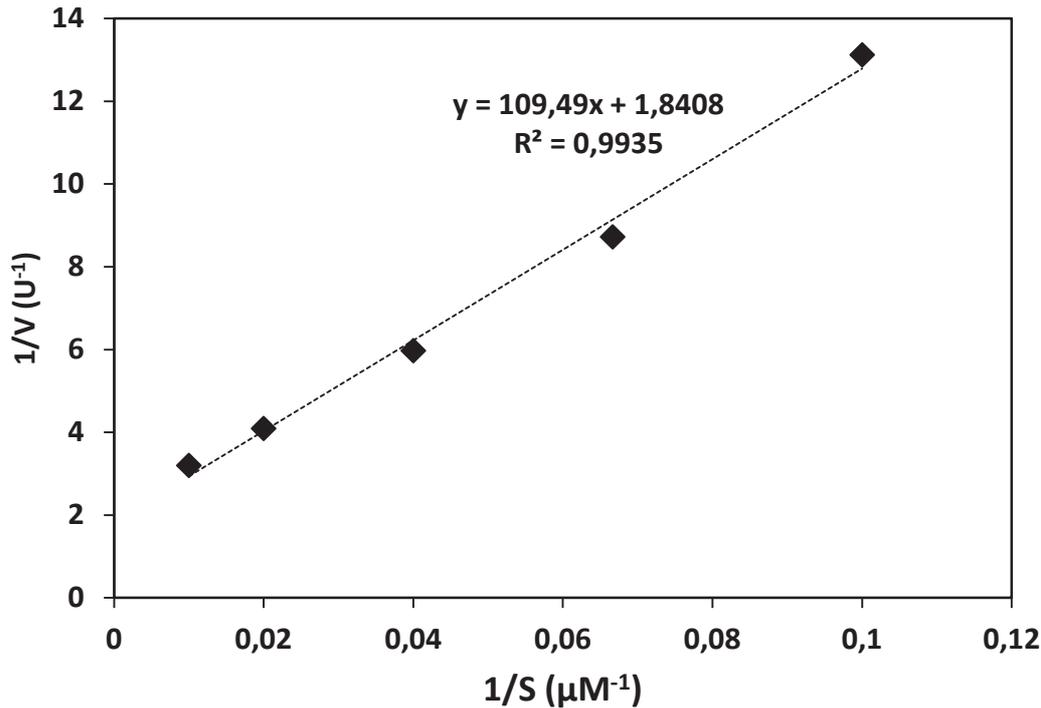


Figure 3-19 : Exemple de détermination des constantes cinétiques des enzymes libres vis à vis de l'ABTS (1 mmol.L⁻¹, pH 4, 25°C).

Tableau 3-13 : Constantes cinétiques (V_{\max} et K_m) de la laccase libre ou immobilisée vis à vis de l'ABTS (1 mmol.L⁻¹, pH 4, 25°C).

	V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Enzymes libres	$0,029 \pm 0,001$	$55,6 \pm 0,73$
Enzymes immobilisées	$0,033 \pm 0,005$	$38,0 \pm 2,6$

4. Essai d'extrapolation du greffage en fluidisation

Si l'immobilisation en réacteur batch permet effectivement le greffage de laccases à la surface des billes de gélatine, le volume employé de solution enzymatique (50 mL) est très important comparé à la masse de billes actives mises en jeu (environ 0,7 grammes), rendant une extrapolation à l'échelle industrielle difficilement envisageable. Ce volume important engendre ainsi des coûts économiques non négligeables, et des temps de production très longs pour pouvoir immobiliser des lots plus importants de billes.

Notre réflexion s'est donc porté sur la possibilité d'augmenter le rapport masse de billes greffées sur le volume de solution enzymatique en réalisant le greffage en lit fluidisé. Des premiers essais ont été réalisés dans la colonne de fluidisation conçue pour la réaction et qui sera présentée dans la partie suivante, au paragraphe I).

Après avoir placé les billes réticulées (4 g) dans la colonne, 100 mL d'une solution de laccase préparée à la concentration de $1,9 \text{ U.mL}^{-1}$ dans une solution tampon citrate phosphate (50 mmol.L^{-1} , pH 7) ont été mis en recirculation dans la colonne à un débit de 80 mL.min^{-1} de façon à assurer la fluidisation du lit. A intervalles de temps réguliers sur une durée de 5h, l'activité de la solution a été mesurée et l'évolution de cette dernière est reportée sur la Figure 3-20.

On remarque qu'au cours du temps, la solution enzymatique perd peu à peu son activité pour atteindre 60% d'activité relative au bout de 5 heures.

Après calcul, le rendement de l'immobilisation est de 40%, ce qui a augmenté par rapport au greffage en batch (31%, paragraphe III-3.a)). L'activité enzymatique calculée après cet essai est de $0,15 \text{ U.g}^{-1}$ de billes humides, ce qui est également plus important que celle reportée après une immobilisation en réacteur batch ($0,09 \text{ U.g}^{-1}$, paragraphe III-3.a)). Ces valeurs sont néanmoins difficiles à comparer comme le temps de contact a ici été augmenté (5 heures au lieu de 2 heures). Mais surtout, cette technique permet de greffer une masse bien plus importante de billes pour une activité finale au moins équivalente. Cette méthode aboutit donc à un gain de temps et de ressource considérable (la solution enzymatique pourra être réutilisée tant que son activité enzymatique le permet) dans une perspective d'extrapolation à plus grande échelle.

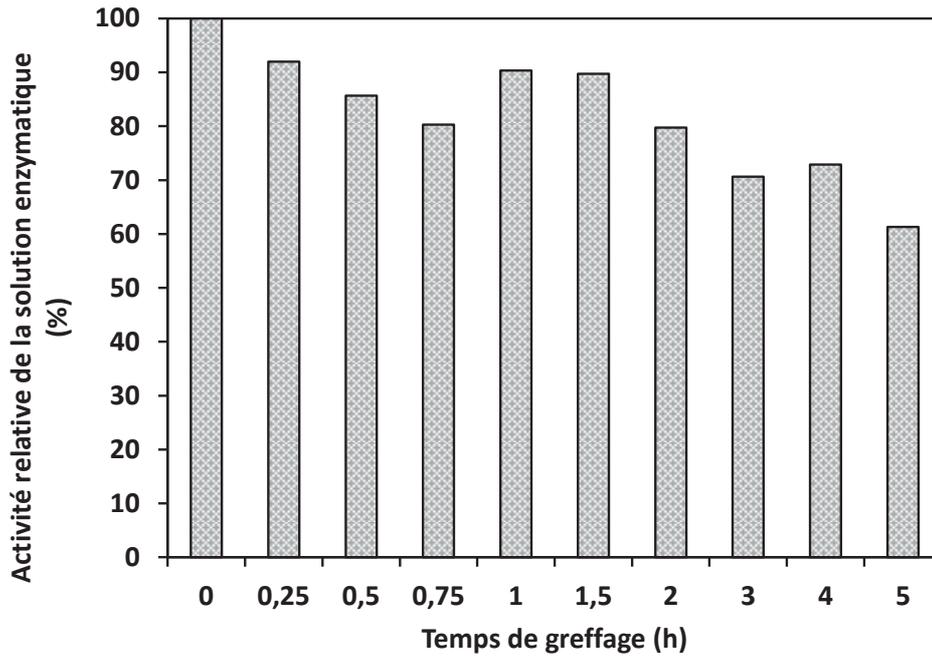


Figure 3-20 : Evolution de l'activité de la solution enzymatique (TvL , $3,82 \text{ U.mL}^{-1}$ initial, pH 7, 100 mL) durant 5 heures de greffage sur des billes actives (4 g) dans le réacteur à lit fluidisé.

5. Conclusion

Des billes actives ont été obtenues par greffage covalent de laccases à la surface de billes de gélatine réticulées avec du GTA. Un plan d'expérience à 4 facteurs et deux niveaux 2^4 a permis d'étudier l'étape de greffage des billes actives et de choisir les paramètres permettant de maximiser l'activité des billes dans le domaine de conditions étudié. La présence de liaisons covalentes entre les laccases et la surface des billes a été vérifiée. L'influence du pH et de la température sur l'activité des enzymes a été mesurée pour les deux formes de la laccase. La stabilité par rapport au pH et à la température des enzymes greffées est améliorée par rapport à celle des enzymes libres. Les enzymes immobilisées démontrent également une bonne stabilité dans le temps et les constantes cinétiques démontrent une bonne affinité des enzymes immobilisées vis-à-vis de l'ABTS. L'élaboration, la réticulation et le greffage du biocatalyseur à base de gélatine étant étudiés, la possibilité d'utiliser ces biocatalyseurs dans un réacteur à lit fluidisé pour la dégradation de micropolluants en milieu aqueux constitue maintenant l'étape suivante de ces travaux de thèse.

Chapitre 3 – Résultats et discussions

Partie II – Réacteur enzymatique à lit fluidisé pour la dégradation de micropolluants

I) Conception et caractérisation du réacteur à lit fluidisé

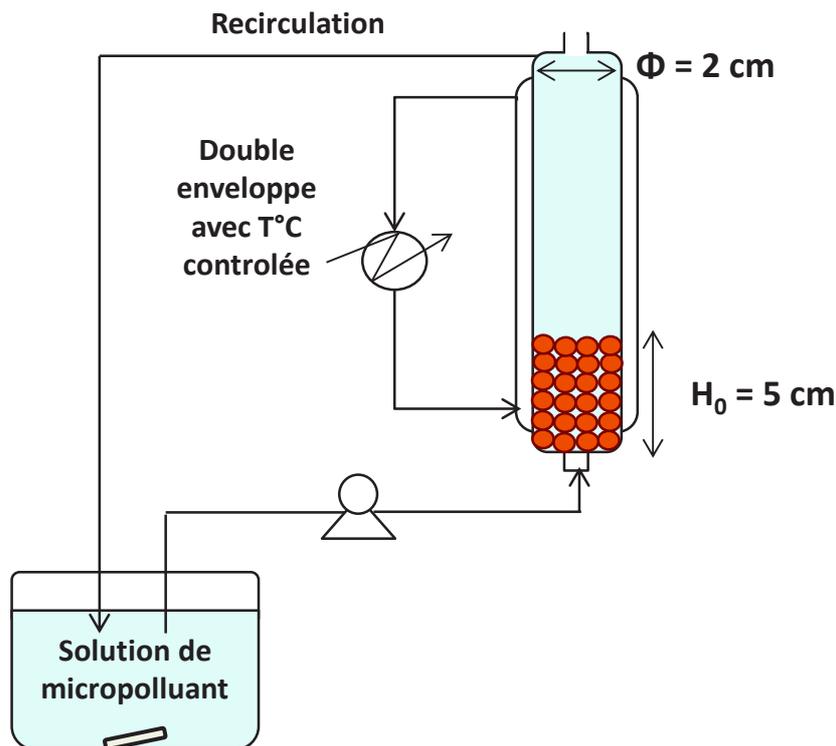
1. Dimensionnement du réacteur

Le réacteur à lit fluidisé utilisé dans ce projet est une colonne de verre, comportant à sa base un fritté de taille 0 (correspondant à des diamètres de pores entre 160 et 250 μm) faisant office de distributeur, et une double enveloppe permettant la circulation d'eau à température contrôlée (voir schéma Figure 3-21). Le matériau choisi pour les connections et les tuyaux est l'acier inoxydable afin d'éviter tout phénomène d'adsorption des polluants durant la réaction.

La première étape du dimensionnement est le choix de la hauteur et du diamètre de la colonne. Comme on l'a vu dans la partie concernant l'élaboration des billes, le diamètre moyen de celles-ci est d'environ 1,9 mm \pm 0,19 mm. Pour éviter des effets de paroi, c'est-à-dire des écoulements préférentiels dus à des porosités non homogènes au sein de la couche, il est nécessaire que le diamètre de la colonne Φ soit supérieur à 10 d_p (diamètre des particules). On a finalement choisi un diamètre interne de 2 cm. Il n'a pas été possible d'augmenter beaucoup plus ce diamètre. En effet, un autre ratio important est la hauteur du lit fixe H_0 comparé au diamètre de la colonne Φ (appelé ratio d'aspect). Plus ce ratio est élevé, meilleur est le transfert de matière (Bello et al., 2017). Ainsi, si le diamètre est plus grand, la quantité de biocatalyseur nécessaire pour obtenir un ratio suffisamment élevé serait très grande, rendant alors le coût des expériences trop élevé. Il a donc été choisi de fixer le diamètre à 2 cm, pour une hauteur de lit fixe d'environ 5 cm, et donc un ratio H_0/Φ supérieur à 2. Les dimensions du réacteur sont regroupées dans le Tableau 3-14.

Tableau 3-14 : Dimensions et caractéristiques du réacteur

Hauteur de la colonne (cm)	23
Diamètre interne de la colonne Φ (cm)	2
Volume de la colonne (mL)	72,26
Diamètre moyen des billes d_p (mm)	1,9
Hauteur du lit fixe H_0 (cm)	5

**Figure 3-21** : Représentation schématique du réacteur enzymatique

2. Caractérisation du lit

La masse volumique des particules ρ_s a été déterminée comme explicité au chapitre 2, paragraphe III-1.a). La valeur obtenue est $\rho_s = 1112 \pm 13 \text{ kg.m}^{-3}$.

La porosité d'une couche ε_0 est le rapport entre le volume laissé libre entre les particules sur le volume total de la couche (Eq 3-5). Si l'arrangement des particules suit une maille organisée, comme un empilement cubique par exemple, il est possible de calculer mathématiquement la valeur de la porosité. Pour un empilement aléatoire de particules sphériques comme c'est le cas ici, on trouve habituellement $0,36 < \varepsilon_0 < 0,4$.

La mesure de la porosité de la couche ε_0 est décrite au chapitre 2, paragraphe III-1.b), équation (2.9).

$$\varepsilon_0 = \frac{V_{pores}}{V_{total}} \quad (2.9)$$

On obtient une valeur de $0,36 \pm 0,015$. Cette valeur est assez classique pour un empilement aléatoire.

Une corrélation existe entre la surface spécifique de la couche S_c et la surface spécifique des particules S_p (équation (3.5)).

$$S_c = \frac{A_c}{V_c} = (1 - \varepsilon_0) * \frac{A_p}{V_p} = (1 - \varepsilon_0) * S_p \quad (3.5)$$

Avec A_c : la surface de la couche (en m^2)

V_c : le volume de la couche (en m^3)

S_c : la surface spécifique de la couche (en $m^2.m^{-3}$)

S_p : la surface spécifique des particules (en $m^2.m^{-3}$)

A_p : la surface des particules (en m^2)

V_p : le volume des particules (en m^3)

La surface spécifique des particules S_p est reliée au diamètre des billes d'après l'équation (3.6):

$$S_p = \frac{6}{d_p} \quad (3.6)$$

Avec la valeur du diamètre moyen des particules, on trouve $S_p = 3158 m^2.m^{-3}$

On peut ainsi calculer la surface spécifique de la couche $S_c = 2021 m^2.m^{-3}$

La masse volumique apparente de la couche est calculée selon l'équation (3.7):

$$\rho_A = \frac{M_c}{V_c} = \varepsilon_0 * \rho + (1 - \varepsilon_0) * \rho_s \quad (3.7)$$

Avec M_c : la masse de la couche (en kg)

ρ est la masse volumique du fluide à 25°C, soit ici l'eau, on prendra $\rho = 10^3 kg.m^{-3}$.

En prenant les valeurs trouvées précédemment, on trouve une masse volumique apparente de couche ρ_A de 1070 kg.m^{-3} .

Le Tableau 3-15 regroupe l'ensemble des caractéristiques du lit.

Tableau 3-15 : Caractéristiques du lit de billes

Diamètre moyen des billes d_p (mm)	1,9
Masse volumique des billes ρ_s (kg.m^{-3})	1112
Porosité du lit fixe ε_0	0,36
Hauteur du lit fixe H_0 (m)	0,05
Surface spécifique des particules S_p ($\text{m}^2.\text{m}^{-3}$)	3158
Surface spécifique de la couche S_c ($\text{m}^2.\text{m}^{-3}$)	2021
Masse volumique apparente de la couche ρ_A (kg.m^{-3})	1070

Le diamètre moyen des billes est connu (1,9 mm), mais il est nécessaire de connaître la répartition de taille précise au sein du lit pour fixer un débit opératoire assurant la fluidisation de la totalité du lit. Pour ce faire, une analyse granulométrique a été réalisée sur un lot de 242 billes en mesurant chaque diamètre avec un comparateur d'épaisseur Mitutoyo 547-401. La distribution de taille qui en résulte est affichée sur la Figure 3-22. La dispersion de taille est assez importante et le diamètre des particules est compris entre 0,3 et 3,3 mm. Plus de 50% des billes ont un diamètre compris entre 1,9 et 2,1 mm, mais une partie non négligeable des billes (25%) possèdent un diamètre plus important, compris entre 2,3 et 2,7 mm. Cette donnée sera prise en compte pour la détermination des conditions opératoires.

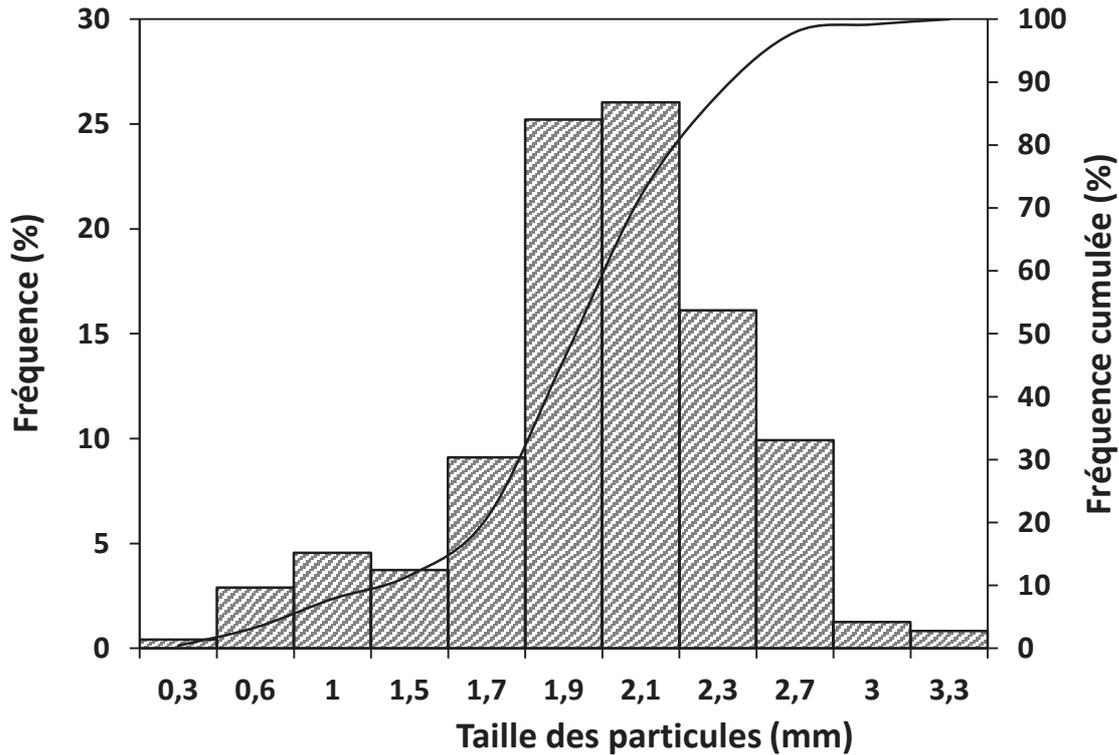


Figure 3-22 : Distribution de taille des particules sur un lot de 242 billes.

3. Détermination des conditions opératoires

a) Calcul de la vitesse minimale de fluidisation $U_{0,mf}$

Il est indispensable de connaître la vitesse minimale de fluidisation du lit pour choisir un débit opératoire adéquat, permettant une bonne homogénéisation et donc un meilleur contact entre le substrat et le catalyseur.

Pour calculer cette vitesse, on établit plusieurs hypothèses :

- Le régime est supposé laminaire.

La vitesse minimale de fluidisation se calcule donc selon l'équation 1-4 (détaillée dans le chapitre 1, paragraphe V-4.a) et rappelée ici), résultant de la simplification de la relation d'Ergun (équation (1.3)), en ne gardant que le terme prépondérant du régime laminaire :

$$U_{0,mf} = \frac{d_p^2}{150} * \frac{\varepsilon_{mf}^3}{(1 - \varepsilon_{mf})} * \frac{(\rho_s - \rho)}{\mu} * g \quad (1.3)$$

Avec g la constante gravitationnelle ($9,81 \text{ m.s}^{-2}$)

d_p le diamètre moyen des particules en m

ρ_s la masse volumique du solide en kg.m^{-3}

ρ la masse volumique de l'eau en kg.m^{-3}

ε_{mf} la porosité de la couche au minimum de fluidisation

μ la viscosité dynamique du fluide en Pa.s

- On considère que la porosité de la couche au minimum de fluidisation ε_{mf} est égale à la porosité du lit fixe ε_0 calculée plus haut, soit 0,36.
- On prend pour la valeur de la viscosité dynamique du fluide μ la valeur de la viscosité de l'eau, c'est-à-dire 10^{-3} Pa.s.
- On prend ici $d_p = 1,9$ mm, soit le diamètre moyen des billes.

Finalement, on trouve $U_{0,mf} = 1,98 \cdot 10^{-3} \text{ m.s}^{-1} = 0,2 \text{ cm.s}^{-1}$.

Le débit correspondant est $D_{mf} = 0,63 \text{ mL.s}^{-1} = 38 \text{ mL.min}^{-1}$.

Cependant à cette vitesse, d'après la distribution de taille détaillée plus haut (Figure 3-22), seules 75% des billes seront fluidisées.

Toujours d'après la Figure 3-22, 95% des particules ont un diamètre inférieur ou égal à 2,8 mm. Pour fluidiser des billes de ce diamètre, il faut une vitesse $U_{mf,0}$ de $0,43 \text{ cm.s}^{-1}$, correspondant à un débit de 80 mL.min^{-1} . En travaillant à ce débit, seule une petite portion de particules (<5%) risque de ne pas être fluidisée, mais on limite aussi un surcoût inutile d'énergie (un débit de 134 mL.min^{-1} serait nécessaire pour fluidiser des billes de 3,3 mm). De plus, un débit élevé engendre une augmentation des contraintes de cisaillement, ce qui peut causer l'inactivation et le décrochage des enzymes greffées à la surface des billes.

Afin de s'assurer que ces vitesses sont correctes, il faut à présent vérifier le postulat de départ selon lequel le régime d'écoulement du fluide est laminaire. Comme le fluide ne traverse pas une colonne cylindrique simple mais un milieu poreux, la nature du régime est évaluée par le calcul du nombre de Reynolds rapporté à la particule $Re_{p,mf}$ (équation (3.8)).

$$Re_{p,mf} = \frac{U_{0,mf} * d_p * \rho}{\mu} \quad (3.8)$$

$Re_{p,mf} \approx 4$. Le régime est considéré comme laminaire pour $Re_p < 20$ et turbulent pour $Re_p > 200$.

L'hypothèse du régime laminaire évoquée précédemment est donc vérifiée et le débit opératoire choisi pour la suite des essais a été fixé à $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

b) Calcul de la vitesse limite de fluidisation $U_{0,t}$

La vitesse limite de fluidisation, également appelée vitesse terminale est un paramètre important car il permet de connaître l'étendue du domaine de fluidisation en délimitant sa borne supérieure. Au-dessus de cette valeur, les particules composant le lit seront entraînées avec le fluide. Comme ce sont les particules les plus petites qui sont susceptibles d'être entraînées les premières, les calculs suivants sont réalisés pour une particule de diamètre 1 mm (car plus de 95% des billes ont un diamètre supérieur ou égal à cette valeur selon la distribution de taille des billes).

On commence par calculer le nombre adimensionnel Ar , qui est corrélé au nombre de Reynolds particulaire à la limite de fluidisation $Re_{p,t}$ par une relation empirique (équation (1.10)).

$$Ar = \frac{(g * \rho * d_p^3 * (\rho_s - \rho))}{\mu^2} \quad (1.10)$$

$Ar \approx 1125$

On a donc $27,6 < Ar < 4,4 * 10^5$. Comme explicité dans l'état de l'art (chapitre 1, paragraphe V-4.a)), on se trouve ici dans le régime de Van Allen, la corrélation adéquate est donc la suivante (équation (1.12)):

$$Re_{p,t} = 0,153 * Ar^{0,714} \quad (1.12)$$

$Re_{p,t} \approx 24$.

$20 < Re_{p,t} < 200$, on se trouve dans le régime transitoire.

On peut ainsi revenir à la vitesse limite de fluidisation à l'aide de la valeur du nombre de Reynolds (équation (3.9)):

$$U_{0,t} = \frac{Re_{p,t} * \mu}{d_p * \rho} \quad (3.9)$$

$U_{0,t} = 1,2 \cdot 10^{-2} \text{ m.s}^{-1}$, ce qui correspond à un débit maximal D_t de 230 mL.min^{-1} .

Par conséquent, pour assurer une fluidisation homogène de 95% des billes, le débit opératoire doit être fixé entre 80 mL.min^{-1} et 230 mL.min^{-1} .

c) Calcul de la perte de charge dans le domaine de la fluidisation

Sur tout le domaine de fluidisation, la perte de charge est constante. A l'aide d'un simple bilan de force, on obtient l'équation (1.2) explicitée dans le chapitre 1 et rappelée ici :

$$\Delta P = H_{mf} * (1 - \varepsilon_{mf}) * (\rho_s - \rho) * g \quad (1.2)$$

Avec H_{mf} la hauteur de la couche au minimum de fluidisation (en m).

On établit encore une fois des hypothèses pour le calcul :

- On considère comme précédemment que la porosité au minimum de fluidisation ε_{mf} est égal à la porosité du lit fixe ε_0
- De la même manière, on considère que la hauteur de lit au minimum de fluidisation H_{mf} est égal à la hauteur du lit fixe H_0 .

La perte de charge a été calculée pour différents H_0 et les valeurs sont regroupées dans le Tableau 3-16.

Tableau 3-16 : Calcul de la perte de charge ΔP dans le domaine de fluidisation en fonction des différentes hauteurs de lit fixe H_0 étudiées (2 cm – 5 cm).

Hauteur du lit fixe H_0 (m)	Perte de charge ΔP (Pa)
0,02	14
0,03	22
0,04	29
0,05	36

Plusieurs hauteurs de lit fixe ont en effet été envisagées mais une hauteur H_0 de 5 cm a été retenue, d'abord pour assurer un ratio d'aspect supérieur à 2 comme cela a été évoqué dans le paragraphe I-1. de ce chapitre, mais également pour permettre une plus grande activité enzymatique du lit.

Pour une hauteur de lit fixe de 5 cm, $\Delta P = 36$ Pa.

En raisonnant en perte de charge par unité de longueur, on obtient environ 720 Pa.m^{-1} . Cette valeur est assez faible : une colonne de 1 mètre donnerait une perte de charge égale à $7 \cdot 10^{-3}$ atm. On peut donc conclure qu'un changement d'échelle ne serait pas limité par le surcoût énergétique lié à la hausse de la perte de charge due à l'augmentation de la hauteur du lit.

Le Tableau 3-17 regroupe les caractéristiques du domaine de fluidisation calculées dans ce paragraphe.

Tableau 3-17 : Caractéristiques du domaine de fluidisation

Vitesse minimale de fluidisation $U_{0,mf}$ (en cm.s^{-1})	0,2
Vitesse terminale $U_{0,t}$ (en cm.s^{-1})	1,2
Débit minimal de fluidisation D_{mf} (en mL.min^{-1})	38
Débit terminal D_t (en mL.min^{-1})	230
Nombre de Reynolds particulaire au minimum de fluidisation $Re_{p,mf}$	4
Nombre de Reynolds particulaire au maximum de fluidisation $Re_{p,t}$	24
Nombre d'Archimède Ar	1125
Perte de charge dans le domaine de fluidisation ΔP (en Pa)	36

4. Impact de la fluidisation sur les supports d'immobilisation.

Avant de réaliser les essais de dégradation, un essai préliminaire a été effectué pour s'assurer que les billes gardaient leur tenue mécanique durant la fluidisation. Pour ce faire, un lot de billes a été pesé initialement, puis ce lot a été mis en fluidisation 7 heures par jour pendant 8 jours. Le lot a été pesé chaque soir. La Figure 3-23 présente l'évolution de la masse du lot de billes au fil des fluidisations, et on remarque qu'il n'y a aucune incidence de la fluidisation sur ce paramètre. On peut donc supposer que les conditions hydrodynamiques et les chocs éventuels des particules entre elles n'entraînent pas d'effets d'attrition.

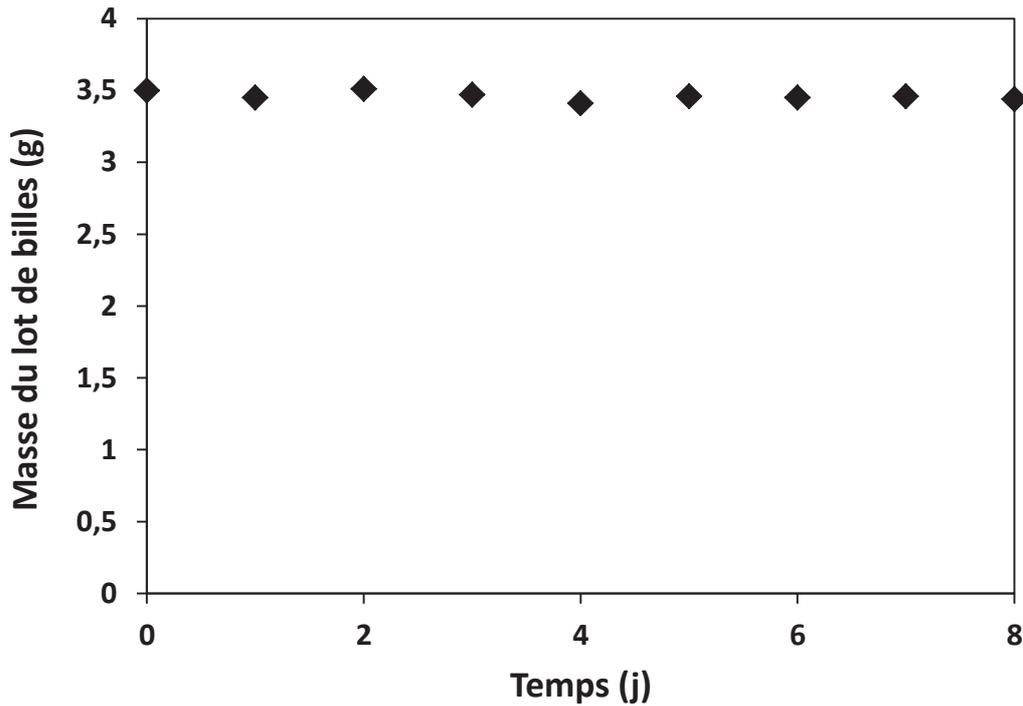


Figure 3-23 : Stabilité mécanique des billes à l'intérieur du réacteur durant 8 jours de fluidisation.

5. Conclusion

On a conçu un réacteur à lit fluidisé, dans lequel le lit sera composé de billes actives pour la dégradation de micropolluants en milieu aqueux. Le réacteur a été dimensionné dans le but de faciliter les échanges entre le fluide et le catalyseur, et le débit opératoire a été choisi pour s'assurer de la mise en fluidisation d'au moins 95% des billes. Seules les plus grosses billes de diamètre supérieur à 2,8 mm ne fluidiseront pas. La stabilité mécanique des billes a également été vérifiée et aucune attrition n'a été à déplorer durant 8 jours de fluidisation consécutifs. Il faut maintenant étudier l'influence de ces paramètres notamment le débit opératoire sur la dégradation des micropolluants, ainsi que la stabilité et la réutilisation des enzymes greffées à l'intérieur du réacteur.

II) Dégradation d'un polluant pharmaceutique : la tétracycline

1. Présentation du substrat

La tétracycline (TC) a été choisie comme substrat pharmaceutique modèle dans ce projet. Les tétracyclines appartiennent à la classe d'antibiotiques la plus utilisée pour traiter les bovins, les porcs et les animaux domestiques. Cela explique leur occurrence dans les influents et effluents de stations d'épuration, à des concentrations de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Deblonde et al., 2011). Pour faciliter les analyses chromatographiques et valider la faisabilité du procédé, on utilisera dans ce projet des concentrations en solution de tétracycline plus élevées, de l'ordre du mg.L^{-1} (ppm).

De plus la TC est un composé sensible à l'oxydation par les laccases du fait de la présence de groupements phénoliques. Enfin, c'est un composé moins dangereux à manipuler que d'autres composés pharmaceutiques, ce qui limite les risques lors des expériences de dégradation et des analyses.

Le spectre de masse de la TC est représenté sur la Figure 3-24.

L'ion 445,2 m/z étant le plus intense, il est sélectionné pour quantifier la molécule.

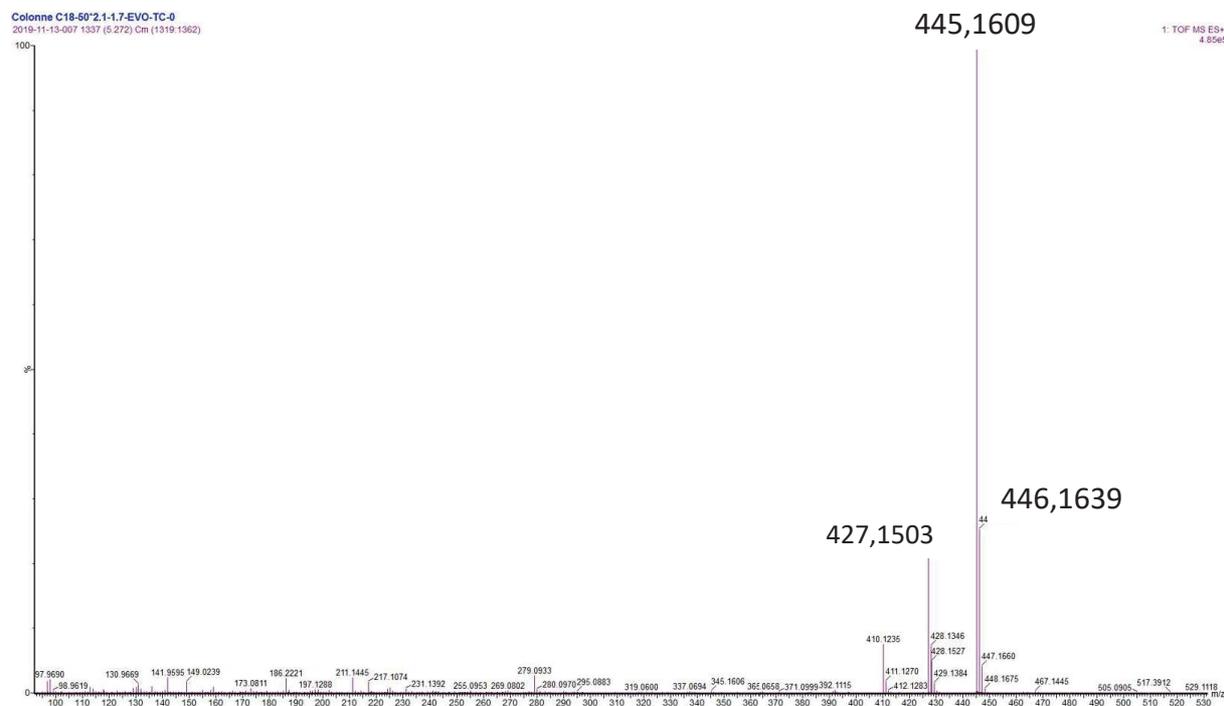


Figure 3-24 : Spectre de masse de la tétracycline

2. Essais de dégradation de la tétracycline en réacteur batch agité

a) Comparaison de la dégradation entre enzymes libres et immobilisées

Dans un premier temps, des essais préliminaires ont été réalisés pour s'assurer qu'il n'y avait pas d'auto-dégradation de la TC. La concentration d'une solution de TC sans enzymes a donc été suivie durant 24 heures (Figure 3-25, losanges rouges vides). Pour vérifier qu'il n'y ait pas d'adsorption de tétracycline sur les billes, l'évolution de la concentration d'une solution à 20 ppm de TC dans laquelle ont été ajoutées des billes de gélatine greffées avec des enzymes au préalable dénaturées a aussi été suivie pendant 24 heures (Figure 3-25, carrés noirs vides). Pour éviter une éventuelle photo-dégradation, les parois des erlenmeyers ont été protégées par du papier d'aluminium. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une très faible auto dégradation de la TC (2% en 24h) et une adsorption limitée de la TC (5%) dès la mise en contact mais qui n'augmente pas par la suite. Ce résultat n'est pas surprenant car la tétracycline possède un coefficient de partitionnement négatif ($-2,2 < \log K_{ow} < -1,3$), qui traduit une haute hydrophilicité, et ainsi une faible capacité d'adsorption (Chang et al., 2015).

La dégradation d'une solution de tétracycline (20 ppm, en eau ultra pure) a été réalisée en réacteur batch, en présence d'enzymes libres ou immobilisées, à la concentration de 100 U.L⁻¹. Les cinétiques de dégradation sur 24 heures sont également représentées sur la Figure 3-25. On observe d'abord que, quelle que soit la forme de l'enzyme, la concentration en TC diminue significativement au cours du temps, ce qui couplé aux deux expériences témoins évoquées précédemment, démontre l'action de la laccase de *Trametes versicolor* sur la TC. En 24 heures, on atteint 70% ± 1% de dégradation par les enzymes greffées et 50% ± 2% de dégradation quand les enzymes sont libres. On remarque aussi que la vitesse moyenne de réaction sur 24 heures est meilleure avec les enzymes immobilisées (0,36 ± 0,08 mg.L⁻¹.h⁻¹) qu'avec les enzymes libres (0,28 ± 0,03 mg.L⁻¹.h⁻¹). De Cazes et al., (2014) ont observé des résultats similaires pour la dégradation d'une solution de tétracycline par des laccases de *Trametes Versicolor* greffées sur des membranes céramiques préalablement recouvertes d'une couche de gélatine : 56% ± 8% de dégradation pour les enzymes immobilisées contre 30% ± 7% pour les enzymes libres sur 24 heures.

Ces résultats montrent la capacité des laccases, à la fois sous forme libre et immobilisée à oxyder la tétracycline.

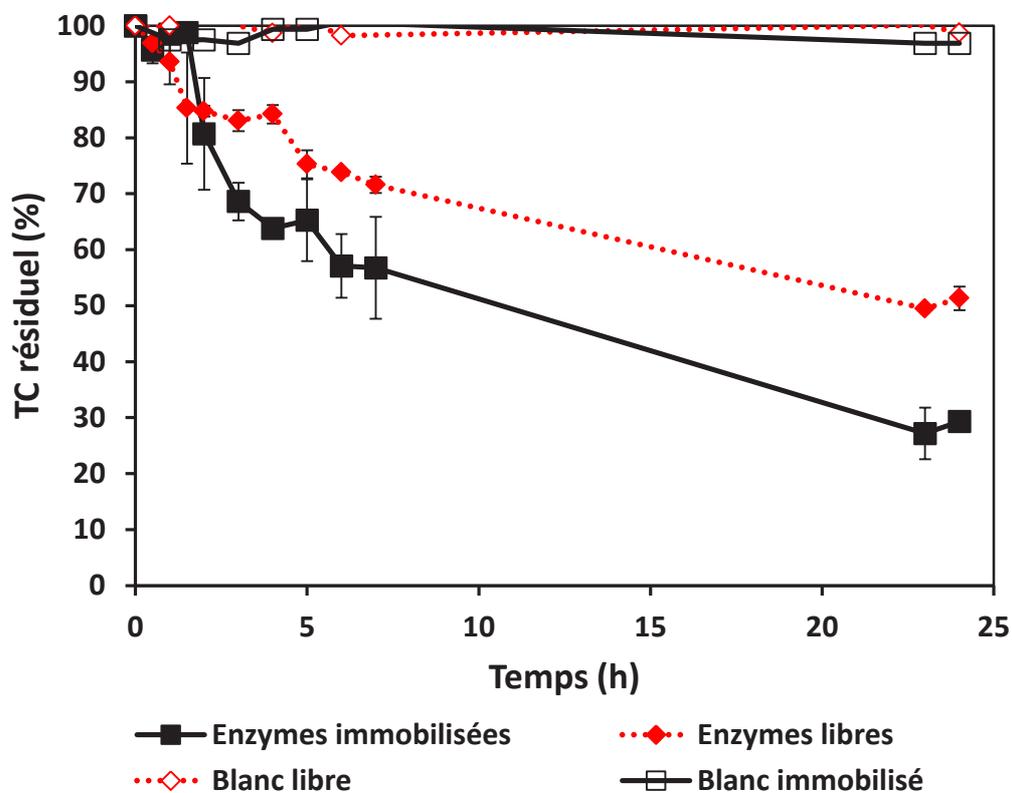


Figure 3-25 : Cinétiques de dégradation d'une solution de tétracycline (20 ppm, eau ultra pure pH 6, 25°C) par des enzymes libres (losanges rouges pleins – ligne pointillée) ou immobilisées (carrés noirs pleins – ligne continue), blancs sans enzyme (losanges rouges vides) et avec des billes inactivées (carrés noirs vides).

b) Choix du solvant pour la dégradation

Comme on l'a vu dans la partie I du chapitre 3 (paragraphe III-3,c)), le pH influe sur la réactivité d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat, et le choix du milieu de dégradation doit donc être étudié. 5 solutions tampons citrate phosphate (50 mmol.L^{-1}) de pHs différents ont été testés : 2,2 – 3 – 4 – 5 – 6 -7 et une solution d'eau ultra-pure (pH 6). La Figure 3-26 représente la vitesse moyenne de dégradation de la tétracycline sur 24 heures en $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en fonction des différents milieux. Le pH optimal de la dégradation de la tétracycline par la laccase semble ici être 6. L'eau ultra pure, ayant également un pH proche de 6, semble être un solvant approprié pour étudier la dégradation de la tétracycline. De plus la simplicité de cette matrice facilite également les analyses LC-MS, tous les essais ont donc été réalisés dans l'eau ultra-pure.

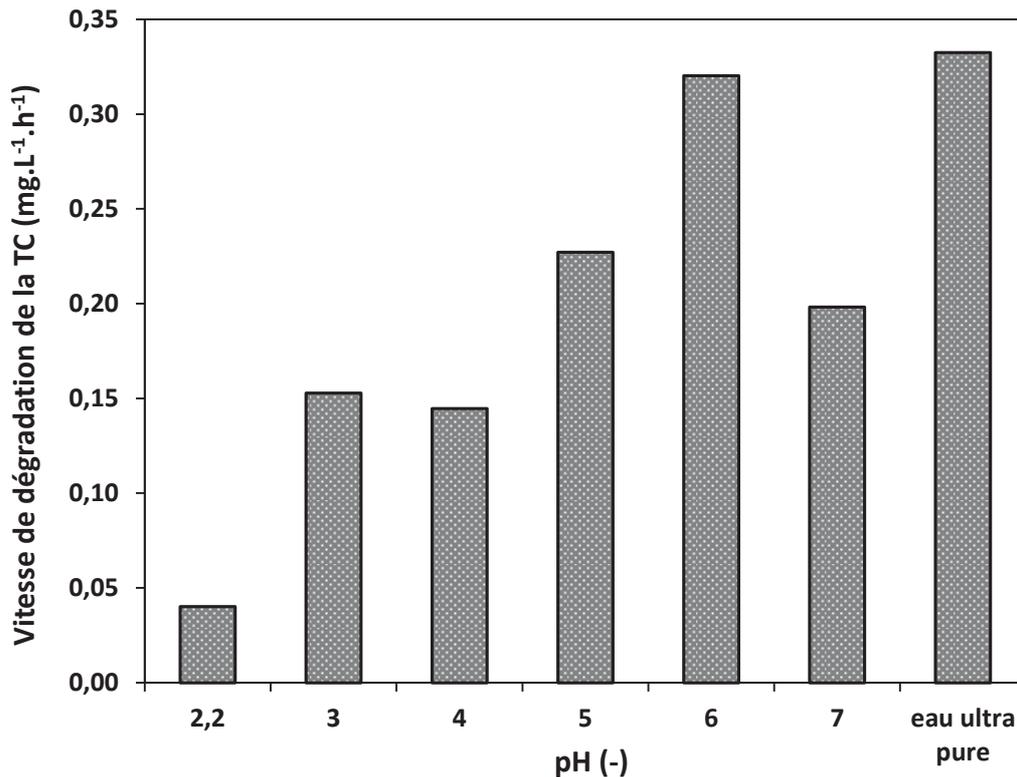


Figure 3-26 : Influence du milieu (solution tampon citrate-phosphate 50 mmol.L⁻¹ à pHs de 2,2 à 7 ou eau ultra-pure) sur la vitesse de dégradation de la tétracycline par des laccases libres en 24 heures à 25°C.

c) Influence de la concentration en substrat et détermination des constantes cinétiques

L'incidence de la concentration initiale en substrat sur la dégradation de la TC a été étudiée. La Figure 3-27 représente les cinétiques de dégradation de la TC par des enzymes immobilisées sur 25 heures, pour des concentrations initiales en tétracycline de 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm et 2 ppm (équivalent respectivement à 33,75 – 22,50 – 11,25 – 4,50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). La vitesse initiale de réaction est supérieure lorsque la concentration en substrat est plus élevée, comme le montrent les pentes initiales des courbes et les vitesses de dégradation moyennes sur 25 heures regroupées dans le Tableau 3-18 en $\text{mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Cela traduit une limitation de la réaction par manque de substrat. Cependant, à des concentrations initiales faibles en tétracycline (5 et 2 ppm), même si la vitesse de réaction est moins élevée qu'à des concentrations initiales supérieures, la totalité de la TC est dégradée, en moins de 4 heures pour une concentration initiale de 2 ppm, et en moins de 7 heures pour une concentration initiale de 5 ppm. Ces essais sont prometteurs et prouvent la faisabilité du procédé enzymatique de dégradation de la TC, même à des concentrations faibles et donc plus proches de celles qu'on trouve dans les

effluents réels. Ces résultats permettent également d'envisager l'utilisation de ce biocatalyseur pour la dégradation d'un effluent concentré en polluant, comme par exemple le retentat d'étapes d'ultrafiltration ou de nanofiltration.

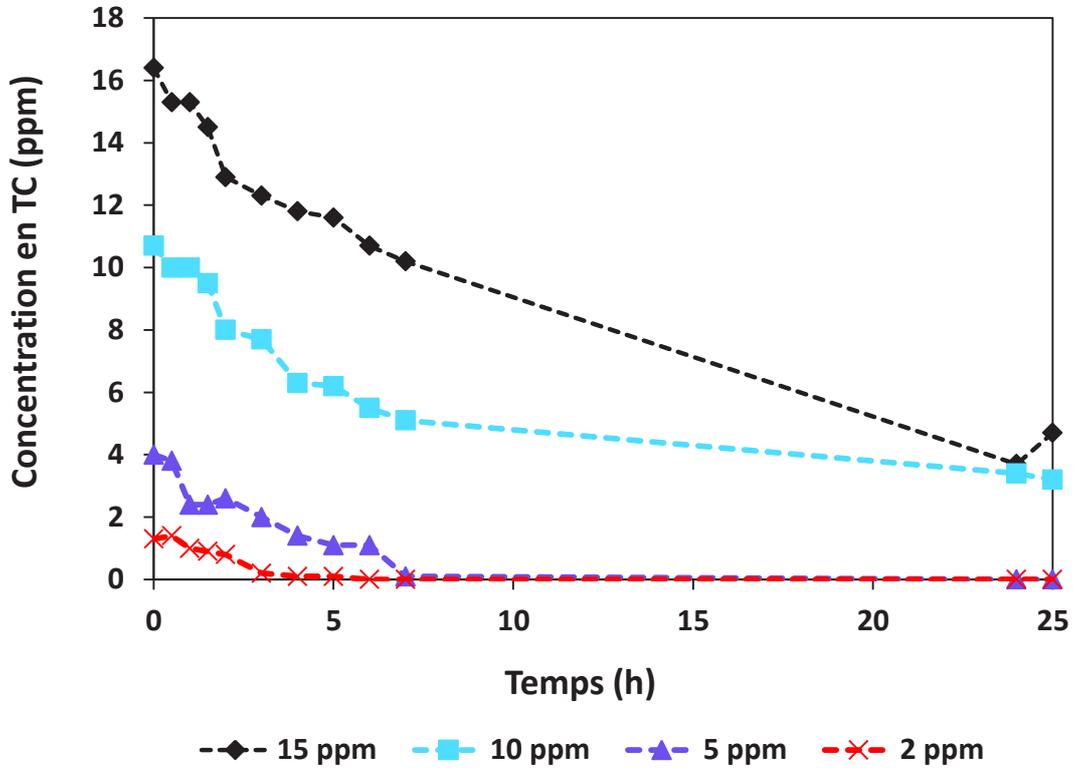


Figure 3-27 : Cinétiques de dégradation de la TC (eau ultra-pure pH 6, 25°C) par des enzymes immobilisées en fonction de la concentration initiale de substrat : 15 ppm (losanges) - 10 ppm (carrés) - 5 ppm (triangles) - 2 ppm (croix) en 25 heures.

Tableau 3-18 : Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de dégradation moyenne de TC en réacteur agité sur 25 heures (25°C, eau ultra pure pH 6).

Concentration en TC (ppm)	Vitesse de dégradation de TC (mg.h ⁻¹ .L ⁻¹)
25	0,62
15	0,23
10	0,20
5	0,12
2	0,04

Cette série d'expériences nous permet également de déterminer les constantes cinétiques de la laccase vis-à-vis de la TC en prenant en compte les vitesses initiales de chaque cinétique. Les essais sous forme libre et immobilisées ont été réalisés avec le même équivalent enzymatique (30 U.L⁻¹). Le protocole est explicité au chapitre 2, paragraphe II-2.c) et les résultats sont regroupés dans le Tableau 3-19. Les constantes cinétiques vis-à-vis de l'ABTS déterminées lors du chapitre précédent y sont également rappelées. On s'aperçoit sans surprise, que l'affinité des enzymes (libres et immobilisées) est plus importante vis-à-vis de l'ABTS que de la TC. L'ABTS est en effet connu pour être un substrat spécifique des laccases, alors que l'oxydation de la tétracycline par les laccases est bien plus lente. On remarque que pour la tétracycline aussi, l'affinité des enzymes immobilisées est plus importante que celle des enzymes libres. Cela confirme donc les résultats obtenus précédemment, la gélatine semble ainsi maintenir le site actif de l'enzyme dans une conformation plus favorable pour la réaction d'oxydation avec la TC.

Tableau 3-19 : Constantes cinétiques des laccases libres et immobilisées vis à vis de la tétracycline et de l'ABTS

	TC		ABTS	
	V _{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	K _m ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	V _{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	K _m ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Enzymes libres	0,001	88,2	0,029	55,6
Enzymes immobilisées	0,002	62,8	0,033	38,0

d) Tests de toxicité

La dégradation de molécule ne signifie pas toujours une baisse de toxicité de l'effluent traité. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été reporté dans la littérature (Becker et al., 2016). Il est donc important de vérifier l'efficacité du traitement de dégradation enzymatique par un test de toxicité ; nous avons choisi ici le test Microtox. L'évaluation de la toxicité des solutions avant et après dégradation enzymatique de la TC a été réalisée avec une solution de concentration initiale en TC égale à 1 ppm, afin de se rapprocher des conditions réelles des effluents. Les essais de dégradation ont été

réalisés en présence d'une quantité équivalente (100 U.L^{-1}) d'enzymes libres ou immobilisées. Les résultats des tests de toxicité (Microtox) avant et après 24h de traitement sont présentés sur la Figure 3-28. On constate qu'une solution de tétracycline à 1 ppm (a) engendre un effet d'inhibition de $29\% \pm 2\%$ après 5 minutes de contact, et $42\% \pm 1\%$ au bout de 15 minutes de contact. Après 24 heures de traitement par des laccases libres, les effets d'inhibition sont presque doublés ($57\% \pm 0,15\%$ après 5 minutes et $74\% \pm 0,7\%$ après 15 minutes de contact). On pourrait conclure que les produits de dégradation de la TC sont plus toxiques que la TC elle-même. Cependant, si la dégradation est réalisée en présence d'enzymes greffées sur les billes de gélatine, la toxicité de la solution est diminuée. L'effet d'inhibition est en effet réduit par rapport à la solution initiale ($19\% \pm 0,7\%$ après 5 minutes de contact et $25\% \pm 2,5\%$ après 15 minutes de contact). Au regard de ces résultats, il semblerait que les enzymes (ou la solution enzymatique) présentent une toxicité pour la bactérie *Vibrio fischeri*. Cela a été confirmé par un test de toxicité réalisé avec la solution de *TvL* préparée à la même concentration que lors des essais de dégradation (100 U.L^{-1}). On observe dans ce cas une toxicité légèrement supérieure à celle de la solution de tétracycline initiale ($39\% \pm 1,7\%$ après 5 minutes de contact et $51\% \pm 2,2\%$ après 15 minutes de contact). Le cumul des toxicités liées à la TC et à l'enzyme explique certainement la forte toxicité des échantillons après 24h de dégradation avec la forme libre de l'enzyme. Néanmoins on peut aussi émettre l'hypothèse d'une différence de mécanismes de dégradation entre les formes libres et immobilisées du biocatalyseur, amenant à des sous-produits différents, plus ou moins toxiques. De plus, comme on a vu plus haut, la dégradation est plus rapide avec les enzymes greffées que libres, il est possible qu'au bout de 24 heures, la concentration en tétracycline encore présente soit plus importante dans l'échantillon traité par des enzymes libres, expliquant une toxicité plus élevée.

Ces résultats sont intéressants car ils mettent en évidence un intérêt supplémentaire à l'immobilisation des enzymes. Néanmoins ils doivent être relativisés car ils ne concernent que la toxicité vis-à-vis d'un seul micro-organisme.

Zhang et al., (2020) ont étudié la dégradation de la TC par des laccases de souche *B. subtilis*, sous forme libre et immobilisées dans un réseau organométallique à base de cuivre (Cu-BTC), et se sont intéressés à l'activité antibiotique ainsi qu'à l'écotoxicité des produits formés. Les produits de dégradation ont démontré une action antibiotique

nulle vis-à-vis d'une bactérie gram négative (*E. coli*) et gram positive (*B. subtilis*), alors que la solution de TC montrait un effet antibactérien significatif envers ces deux bactéries. L'écotoxicité de la TC et de la solution contenant les produits de dégradation a également été étudiée par incubation au contact de deux bactéries (*E. coli* et *B. subtilis*). La toxicité était réduite après traitement par la laccase (libre et immobilisée) en comparaison à la toxicité de la solution initiale de TC, mais l'écotoxicité de la solution traitée par les enzymes immobilisées était plus faible que celle traitée par les enzymes libres. Ce résultat est similaire aux nôtres et comme pour nos essais, ils ont également noté une dégradation de la TC plus rapide par les laccases greffées que les laccases libres, pouvant expliquer cette différence de toxicité.

Les tests microtox ont également été réalisés pour s'assurer qu'aucun élément toxique (comme par exemple du glutaraldéhyde) n'était relargué dans le milieu réactionnel. Un test microtox a été réalisé sur de l'eau avant et après 24 heures de circulation dans le réacteur à lit fluidisé au contact des billes activées. Les résultats sont affichés sur la Figure 3-29. Aucun effet significatif d'inhibition de la solution d'eau incubée avec les billes n'est visible, ce qui confirme la supposition précédente et ainsi la possibilité d'utiliser ces billes actives comme bio catalyseur à plus grande échelle.

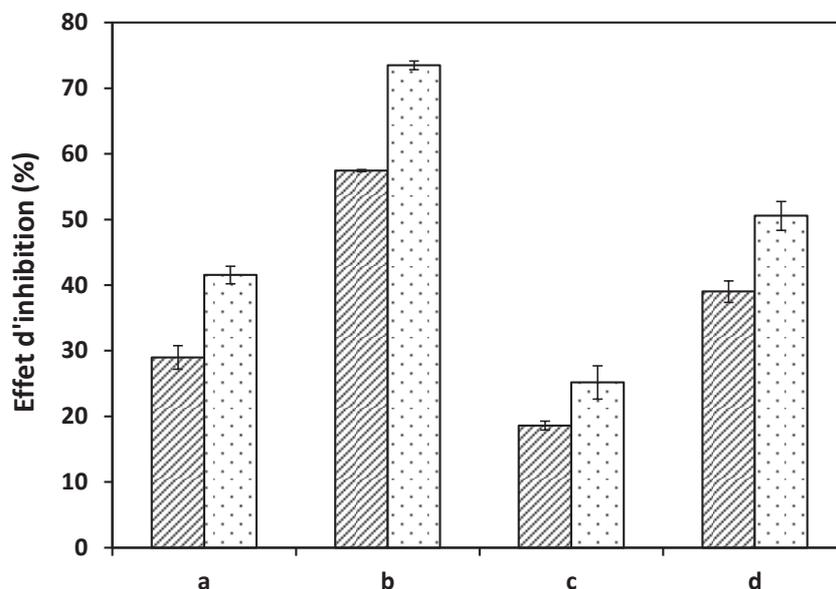


Figure 3-28 : Effet d'inhibition des échantillons de tétracycline non traités (a), et après 24 heures de traitement par des enzymes libres (b) ou immobilisées (c), et sur un échantillon de *TvL* à 100 U.L⁻¹ (d) après 5 minutes de contact (rayures) ou 15 minutes de contact (points) avec une bactérie luminescente (*Vibrio fischeri*).

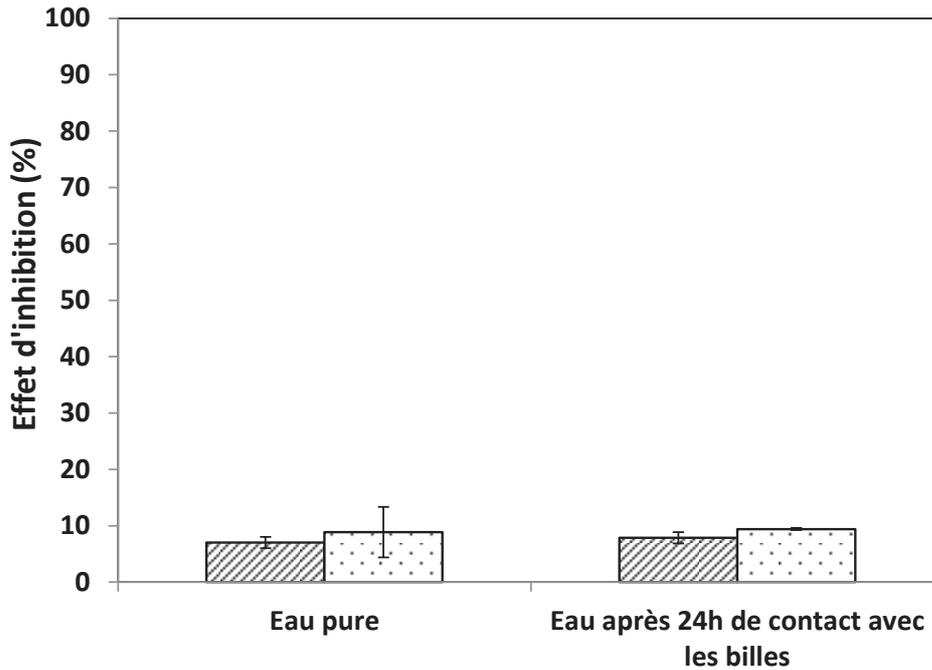


Figure 3-29 : Effet d'inhibition d'un échantillon témoin d'eau avant et après incubation avec des billes actives pendant 24 heures dans le réacteur à lit fluidisé après 5 minutes de contact (rayures) ou 15 minutes de contact (points) avec une bactérie luminescente (*Vibrio fischeri*).

3. Dégradation de la tétracycline dans le réacteur à lit fluidisé

a) Influence de la fluidisation sur la dégradation de la TC

La dégradation d'une solution de tétracycline (20 ppm) a été étudiée dans un réacteur à lit fluidisé en recirculant le milieu réactionnel. La Figure 3-30 présente le suivi cinétique de la dégradation sur 24 heures, lors d'essais réalisés en présence de billes actives, et de billes inactivées pour s'assurer qu'il n'y a pas d'adsorption de la tétracycline sur les parois du réacteur ou des tuyaux. On s'aperçoit que, comme pour le réacteur batch, la disparition de la TC par adsorption est faible ($2\% \pm 2\%$). La concentration en TC diminue rapidement en début d'expérience en présence de billes actives puis semble ralentir pour atteindre $56\% \pm 4\%$ de TC résiduel au bout de 24 heures. Cette valeur est supérieure à celle observée lors des essais en réacteur batch agité ($35 \pm 1\%$).

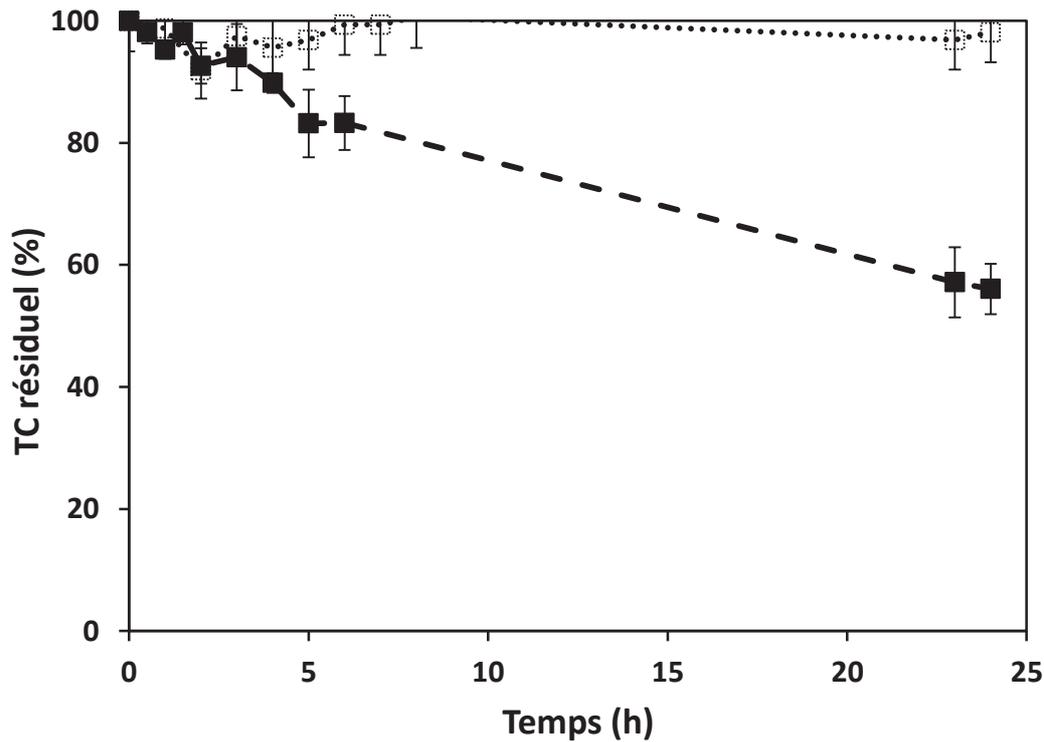


Figure 3-30 : Essai de dégradation d'une solution de TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) dans un réacteur à lit fluidisé en 24 heures, par des billes actives (carrés pleins) ou désactivées (carrés vides).

Cependant, d'après les valeurs rapportées dans le Tableau 3-20, si on regarde la vitesse moyenne de dégradation sur 24 heures, normalisée par la quantité d'enzymes mises en jeu (en U), on se rend compte que la vitesse de dégradation est en fait 5 fois plus rapide dans le réacteur à lit fluidisé ($1,59 \text{ mg.h}^{-1} \cdot \text{U}_{\text{enzymes}}^{-1}$) que dans le réacteur batch agité ($0,35 \text{ mg.h}^{-1} \cdot \text{U}_{\text{enzymes}}^{-1}$). En effet, si la même activité enzymatique initiale est utilisée dans les deux réacteurs, le volume mis en jeu dans le réacteur fluidisé est 10 fois plus important que dans le réacteur batch, ce qui signifie que le ratio substrat/enzyme est 10 fois plus grand dans le réacteur à lit fluidisé. Cette différence de ratio peut entraîner des limitations de substrat dans le réacteur batch qui explique cette différence de vitesse de dégradation. On a en effet déjà montré dans ce chapitre (paragraphe II-2.c)) que la concentration initiale d'un substrat impacte fortement la performance de la dégradation et que plus elle est basse, plus la vitesse sera réduite. De Cazes et al., (2014) ont observé le même phénomène lors de la dégradation d'une solution de TC (20 ppm, eau ultra pure) dans un réacteur enzymatique à membrane où des laccases de *Trametes versicolor* étaient greffées directement sur la membrane par liaison covalente.

On peut donc supposer que grâce à la recirculation, on apporte en permanence du nouveau substrat au voisinage de l'enzyme ce qui permet de maintenir au niveau du site catalytique un niveau de concentration élevé qui favorise la réaction. Nous avons vérifié cette hypothèse en étudiant l'influence du débit de recirculation sur la dégradation de la TC.

Tableau 3-20 : Dégradation d'une solution de tétracycline (20 ppm, eau ultra pure pH 6, 25°C) après 24 heures de réaction dans deux types de réacteurs (batch agité et lit fluidisé).

Réacteur utilisé	Taux de TC résiduel après 24 heures (%)	Vitesse de dégradation (mg.h ⁻¹ .U _{enzymes} ⁻¹)
Réacteur agité	35 (± 1%)	0,35
Réacteur à lit fluidisé	56 (± 4%)	1,59
Blanc (batch)	96 (± 3%)	-
Blanc (lit fluidisé)	98 (± 2%)	-

b) Influence du débit de recirculation

3 débits de recirculation différents ont été testés ; 30 mL.min⁻¹, 80 mL.min⁻¹ et 130 mL.min⁻¹. Le débit correspondant à la vitesse minimale de fluidisation étant 38 mL.min⁻¹, les débits testés correspondent respectivement à 0,8 U_{0,mf}, 2,1 U_{0,mf} et 3,4 U_{0,mf}. La Figure 3-31 présente les photographies du réacteur et du lit catalytique aux trois débits testés.



Figure 3-31 : Photos des billes activées dans le réacteur pour différents débits de recirculation (de gauche à droite : 30 mL.min⁻¹; 80 mL.min⁻¹; 130 mL.min⁻¹)

La Figure 3-32 présente les cinétiques de dégradation à l'intérieur du réacteur sur 24 heures. On peut remarquer que les trois courbes suivent une trajectoire similaire au début de la réaction (environ les deux premières heures). Ensuite, on observe un ralentissement très marqué de la vitesse de dégradation lorsque le débit est le plus faible (30 mL.min⁻¹), et un ralentissement moins important lorsque le débit est intermédiaire (80 mL.min⁻¹) ou fort (130 mL.min⁻¹). Les vitesses de réaction au bout de 2 heures, 8 heures et 24 heures de réaction regroupées dans le Tableau 3-21 en témoignent.

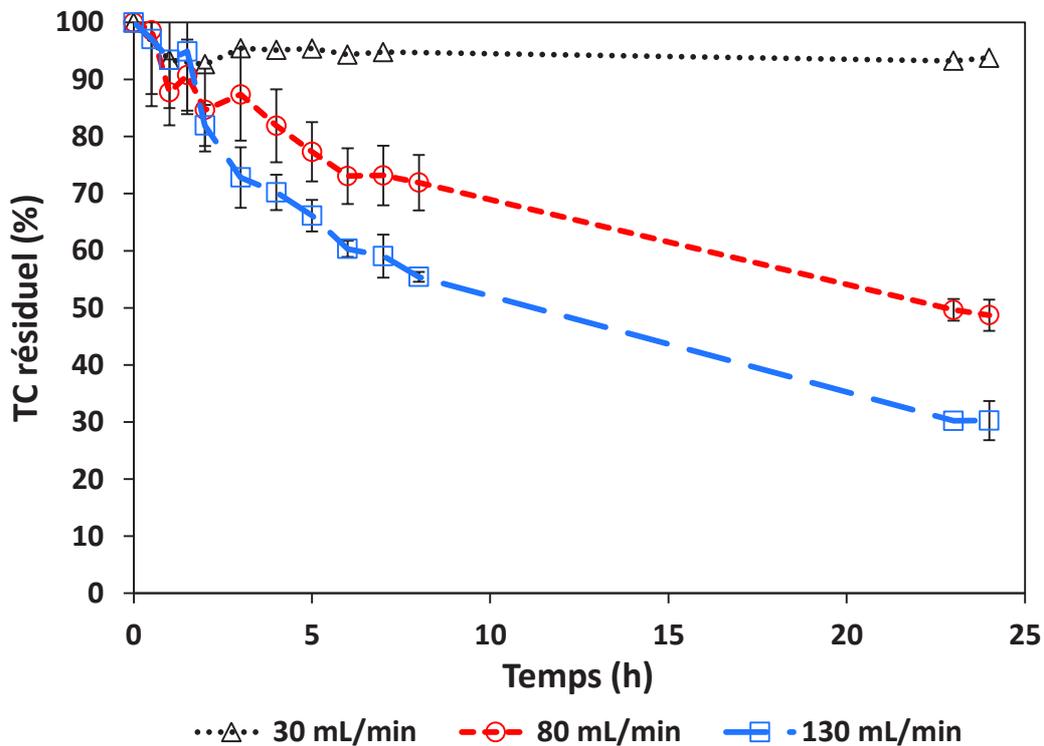


Figure 3-32 : Influence du débit de recirculation sur la dégradation de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) par les billes actives dans le réacteur à lit fluidisé en 24 heures (triangles : 0,8 $U_{0,mf}$ soit 30 mL.min⁻¹; cercles : 2,1 $U_{0,mf}$ soit 80 mL.min⁻¹ ; carrés : 3,4 $U_{0,mf}$ soit 130 mL.min⁻¹).

Lorsque la vitesse du fluide est inférieure à la vitesse minimale de fluidisation (0,8 $U_{0,mf}$), la dégradation de la tétracycline à l'intérieur du réacteur est très faible et seulement 7% \pm 2% de la TC sont dégradés en 24 heures. Cependant, le pourcentage de dégradation est augmenté à 56% \pm 4% quand le débit est augmenté à 2,1 $U_{0,mf}$, et à 70% \pm 4% de dégradation avec le débit de 130 mL.min⁻¹ (soit une vitesse égale à 3,4 $U_{0,mf}$).

Tableau 3-21 : Calcul à différents temps des vitesses moyennes de dégradation en $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) par les billes activées dans le réacteur à lit fluidisé à différents temps de réaction (2h, 8h, et 24h) pour chaque débit utilisé (30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 80 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 130 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Durée utilisée pour le calcul de la vitesse	30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	80 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	130 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
2h	1,29 ± 0,03	1,23 ± 0,05	1,26 ± 0,1
8h	0,07 ± 0,09	0,47 ± 0,01	0,83 ± 0,14
24h	0,02 ± 0,01	0,25 ± 0,04	0,41 ± 0,03

On peut assimiler l'essai à 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ à un essai en réacteur à lit fixe et on observe que passer en lit fluidisé permet d'améliorer nettement la dégradation de la TC. Le renouvellement plus rapide du substrat semble ainsi grandement améliorer les performances, ce qui confirme l'hypothèse établie précédemment. Lloret et al., (2012b, 2012a) ont étudié la dégradation de trois hormones (estrone, 17- β -estradiol, 17- α -éthinyloestradiol) au sein d'un réacteur à lit fixe et d'un réacteur à lit fluidisé. Les résultats qu'ils ont obtenus sont similaires, avec une dégradation de ces composés de 65-80% pour le lit fixe contre 76-90% pour le lit fluidisé, ce qui confirme les meilleures performances d'un lit catalytique fluidisé comparé à un lit catalytique fixe.

De plus, augmenter le débit semble permettre une meilleure circulation des billes à l'intérieur du lit, et ainsi faciliter l'échange entre le substrat et le catalyseur. D'autres chercheurs ont obtenu des résultats similaires, comme Piao et al., (2019), qui ont remarqué une augmentation dans la dégradation du bisphénol A de 50% à 80% en 6 heures, en augmentant le débit de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ à 7,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ à l'intérieur d'un réacteur à lit fluidisé mettant en œuvre des particules de silice poreuses comme supports d'immobilisation de laccases. Il faut cependant faire attention car de trop grands débits peuvent altérer la structure du site actif de l'enzyme, et il existe aussi le risque de dépasser la vitesse limite d'entraînement des billes dont le diamètre serait plus petit que le diamètre moyen des billes.

Aussi, même si la vitesse de dégradation est améliorée en augmentant le débit, on a dans chaque cas un ralentissement de la vitesse de réaction et une dégradation totale de la TC

n'est jamais atteinte. Comme l'oxydation par la laccase est indissociable de la réduction d'une molécule d'oxygène en H_2O , on peut supposer que l'oxygène dissous vient à manquer dans le milieu et est responsable de cette limitation. Pour vérifier cette hypothèse, une alimentation en oxygène a été ajoutée au réacteur.

c) Influence de l'ajout d'oxygène dans le système

Comme on l'a vu dans l'état de l'art (chapitre 1, paragraphe III), la laccase se sert de l'oxygène dissous comme accepteur d'électron pour pouvoir ensuite oxyder le substrat. Dans cette partie, on étudie l'influence de l'ajout d'air supplémentaire dans le système pour voir si ce paramètre joue sur l'efficacité de la dégradation et permet de limiter le ralentissement de la réaction.

Différents débit d'aération ont été testés et il a été vérifié qu'un débit d'air de $15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ permettait d'assurer la saturation en oxygène de la solution pendant toute la durée des expériences (24h). La Figure 3-33 représente les cinétiques de dégradation pour chaque débit étudié avec ou sans aération. A faible débit, l'injection d'oxygène dans le système améliore considérablement le taux de dégradation de la tétracycline. En effet, lorsque l'on travaille en lit fixe (vitesse de circulation inférieure à la vitesse minimale de fluidisation), l'ajout d'oxygène dans le système permet de dégrader $40\% \pm 2\%$ de la TC en 24 heures contre $7\% \pm 2\%$ sans ajout d'air. L'air supplémentaire semble aussi aider le lit de particules à s'expanser, favorisant les échanges entre le catalyseur et le substrat. La tendance est la même au débit opératoire de $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($2,1 U_{0,mf}$), où la dégradation de TC atteint $72\% \pm 1\%$, soit autant qu'à $130 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sans ajout d'air. Cependant, pour un haut débit ($130 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ soit $3,4 U_{mf}$), ajouter de l'oxygène dans le système n'aide pas la dégradation de la TC, et semble au contraire affecter l'efficacité du réacteur. Dans ce cas en effet, l'air supplémentaire combiné à un grand débit semble induire des contraintes de cisaillement défavorables pour les enzymes ; leur activité est réduite tout comme l'efficacité du procédé de dégradation. On retrouve les mêmes tendances pour les vitesses de dégradation en $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, regroupées dans le Tableau 3-22. La vitesse maximale de dégradation obtenue est $0,41 \text{ mg}_{TC}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, obtenue avec le débit $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en présence d' O_2 , mais aussi quand le débit de recirculation est de $130 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sans ajout d' O_2 .

Ainsi, l'ajout d'oxygène assure le maintien d'une haute concentration en co-substrat (O_2) par un constant renouvellement, ce qui amoindrit le ralentissement de la vitesse de réaction à faible et moyen débit. Cela permet d'améliorer l'efficacité de la dégradation sans avoir à augmenter le débit de recirculation, limitant ainsi la dépense énergétique générée liée à la circulation du fluide.

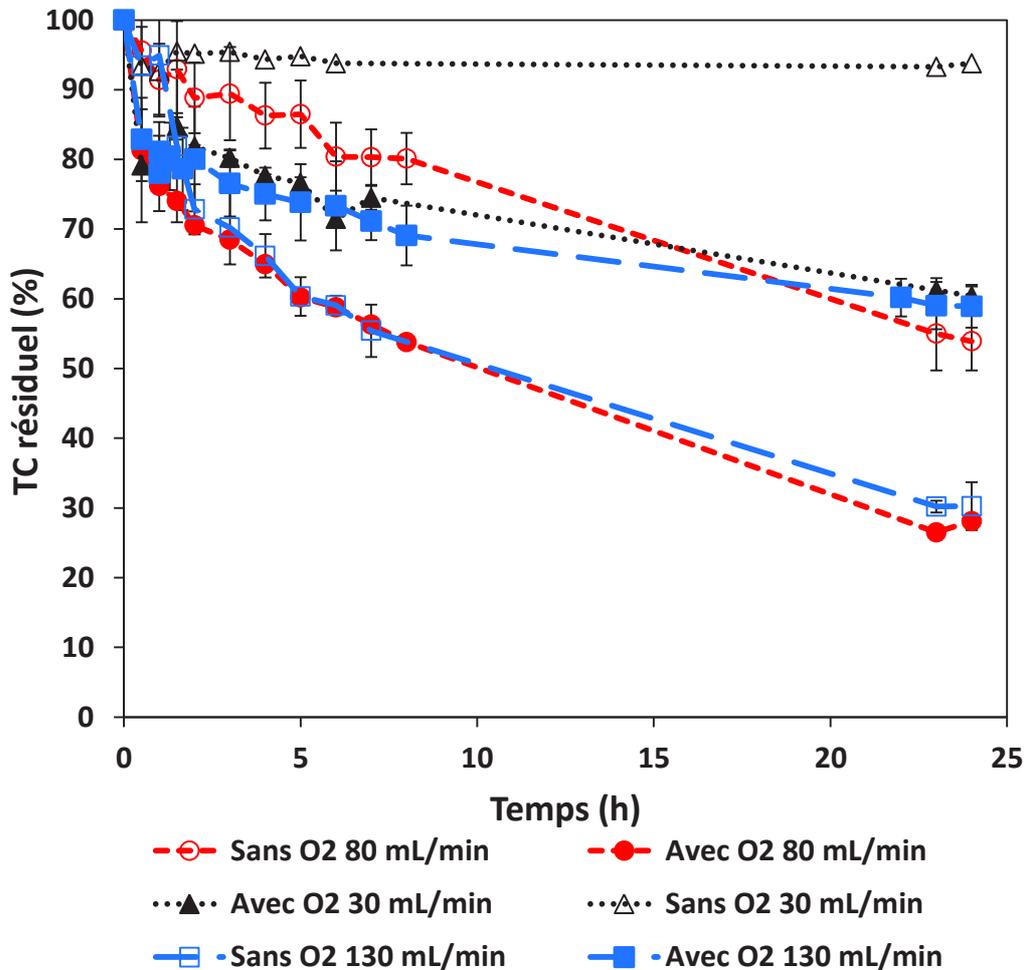


Figure 3-33 : Influence de l'ajout d' O_2 sur la dégradation de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) en 24 heures pour des débits différents : 30 mL.min⁻¹ (triangles), 80 mL.min⁻¹ (cercles), 130 mL.min⁻¹ (carrés), marqueurs ouverts : sans ajout d' O_2 , marqueurs pleins : avec ajout d' O_2 .

Tableau 3-22 : Vitesses de dégradation en mg.h⁻¹.L⁻¹ de la TC (20 ppm, eau ultra pure, 25°C) en 24 heures selon les débits et l'ajout d'air dans le système (par un débit de 15 mL.min⁻¹).

	30 mL.min ⁻¹	80 mL.min ⁻¹	130 mL.min ⁻¹
Sans ajout d' O_2	0,016 ± 0,01	0,25 ± 0,04	0,41 ± 0,03
Avec ajout d' O_2	0,20 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,26 ± 0,03

d) Réutilisation des billes dans le réacteur à lit fluidisé

Enfin, pour terminer cette étude, nous avons vérifié la stabilité opérationnelle du biocatalyseur lors de son utilisation au sein du réacteur à lit fluidisé pendant 5 cycles de 24 heures chacun. Entre chaque cycle, la solution de tétracycline (préparée à 20 ppm dans de l'eau ultra pure), est remplacée, et le biocatalyseur rincé par une solution tampon citrate phosphate (pH 7, 50 mmol.L⁻¹). La Figure 3-34 montre les résultats de dégradation de la TC sur les 5 cycles successifs. On remarque que la cinétique de dégradation est reproductible sur les 3 premiers cycles de dégradation. Au bout de 24 h, la concentration finale est identique et correspond à un pourcentage de dégradation de 55%. Les résultats obtenus lors des cycles 4 et 5 mettent en évidence une diminution des performances du réacteur puisque le taux de dégradation à 24h n'est plus que de 45%. Cette baisse de dégradation provient probablement d'une légère perte de l'activité enzymatique au cours des cycles de réaction.

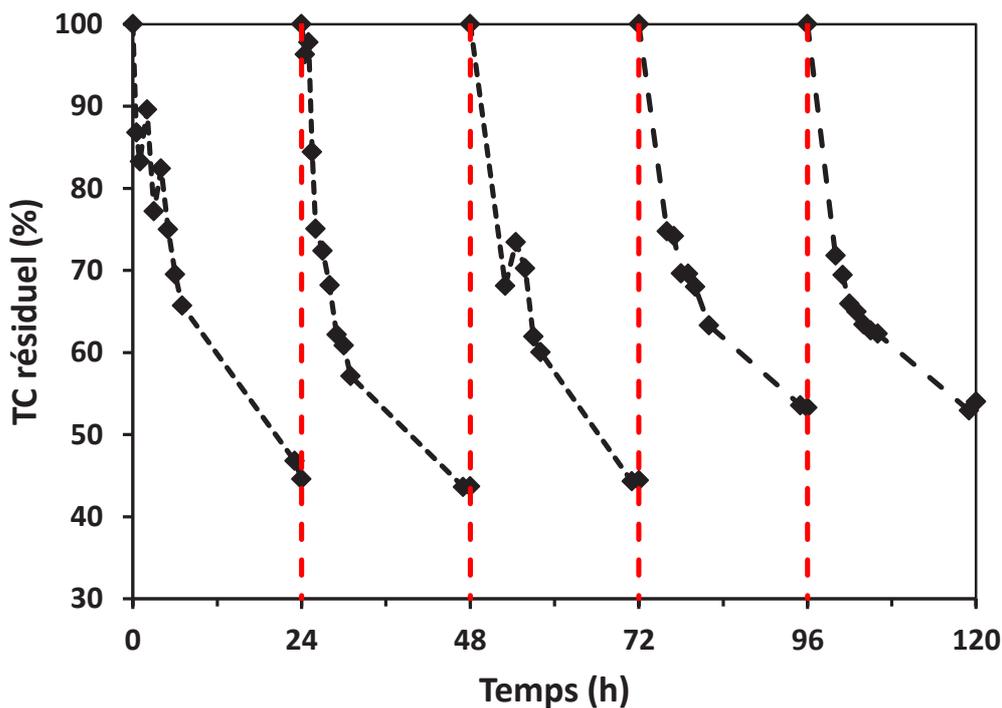


Figure 3-34 : Stabilité opérationnelle des billes actives (100 U.L⁻¹) sur 5 cycles de 24 h de dégradation de la TC dans le réacteur à lit fluidisé (20 ppm, eau ultra pure, 25°C, débit opératoire 80 mL.min⁻¹).

4. Conclusion

La dégradation d'un antibiotique, la tétracycline, a été étudiée dans un réacteur agité en présence de laccases libres ou immobilisées. Des essais préliminaires ont permis de choisir la meilleure matrice pour la dégradation de cet antibiotique, soit l'eau ultra-pure, ainsi que de confirmer l'absence d'auto-dégradation ou d'adsorption de la TC sur les billes. Les laccases immobilisées à la surface des billes de gélatine ont permis une dégradation plus rapide de la TC que les laccases libres et l'étude des constantes cinétiques ont confirmé la bonne affinité des laccases immobilisées sur les billes de gélatine vis-à-vis de ce substrat. Des essais dans le réacteur à lit fluidisé ont permis d'augmenter le volume mis en jeu et la vitesse de dégradation du polluant. Le lit fluidisé permet de maintenir une haute concentration en substrat au voisinage de l'enzyme, améliorant ainsi la réaction en comparaison à un lit catalytique fixe. L'amélioration de la dégradation lorsque le débit de recirculation augmente confirme l'importance d'une bonne homogénéisation et fluidisation du lit. L'ajout d'air dans le système confirme la nécessité d'une bonne saturation en oxygène du milieu comme en témoigne l'amélioration de l'efficacité de la dégradation en présence d'air supplémentaire à faible débit. Il faut néanmoins faire attention car la présence de bulles d'air dans le milieu à trop fort débit peut entraîner une inactivation de l'enzyme et donc une diminution des performances du réacteur enzymatique. La stabilité opérationnelle du catalyseur dans le réacteur à lit fluidisé a également été vérifiée et il a été montré qu'après 120 heures d'utilisation les billes activées permettent d'éliminer encore 45% de la TC d'une solution à 20 ppm en 24 heures.

III) Dégradation d'un pesticide : le glyphosate

1. Essais préliminaires

a) Auto-dégradation du glyphosate et essai avec laccases libres

Le glyphosate est un pesticide hautement persistant dans l'environnement à des concentrations de l'ordre du ng.L^{-1} au $\mu\text{g.L}^{-1}$. Comme pour la tétracycline, les concentrations mises en jeu dans cette partie seront plus élevées pour faciliter le suivi analytique et ainsi valider la faisabilité de notre procédé.

Un essai préliminaire a été effectué en réacteur agité sans enzyme pour étudier l'auto-dégradation du glyphosate (20 μM , eau ultra-pure pH 6, 25°C), et avec des enzymes libres pour étudier la faisabilité de l'oxydation du glyphosate par des laccases de *Trametes Versicolor* (0,3 U.mL^{-1}). La Figure 3-35 représente l'évolution du taux de glyphosate résiduel pendant 24 heures. On remarque que le glyphosate ne s'auto-dégrade pas au cours du temps. Cependant, on remarque également que l'oxydation du glyphosate par la laccase est très faible et n'atteint que 15% au bout de 24 heures. Ce résultat n'est pas surprenant. En effet, on sait que les laccases peuvent avoir des difficultés à oxyder les composés non phénoliques. Comme on peut le voir sur la Figure 3-36, le glyphosate possède un groupement phosphonate et un groupement carboxyle, tous deux accepteurs d'électrons, générant une déficience électronique de la molécule, l'empêchant de participer convenablement au cycle catalytique (Parra Guardado et al., 2019; Yang et al., 2013).

Pizzul et al., (2009) ont également étudié la dégradation du glyphosate (0,06 mmol.L^{-1} , pH 6, 35°C) en présence de laccase de *Trametes Versicolor* (0,15 U.mL^{-1}) et ont obtenu un taux de dégradation de $0\% \pm 4\%$ en 24 heures.

Ainsi, la laccase seule n'est pas capable d'oxyder de façon significative le glyphosate.

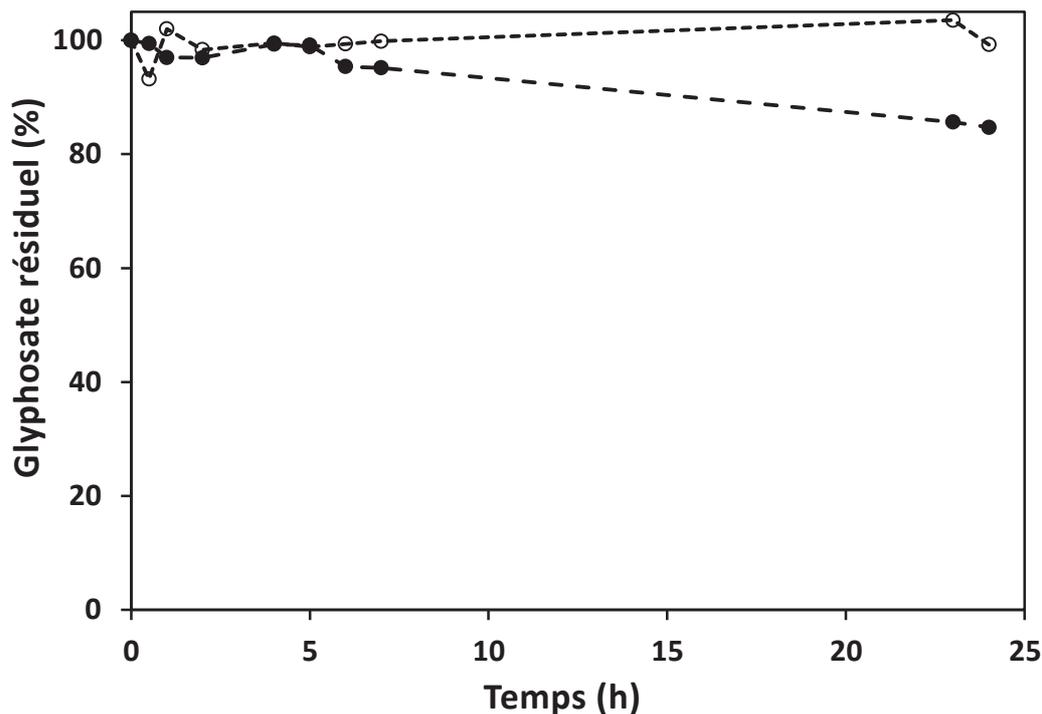


Figure 3-35 : Suivi de la concentration du glyphosate (20 ppm, eau ultra-pure, 25°C) sur 24 heures sans enzymes (cercles vides) ou en présence de laccases libres (cercles remplis) (*TvL*, 0,3 U.mL⁻¹, agitation 250 rpm).

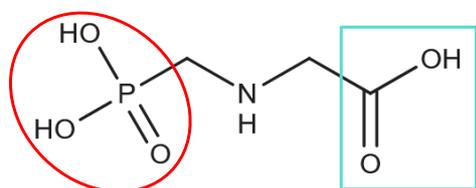


Figure 3-36 : Structure du glyphosate et mise en évidence des groupements électrons accepteurs : phosphonate (encerclé) et carboxyle (encadré).

b) Screening de trois médiateurs différents pour la dégradation du glyphosate.

L'utilisation de médiateurs redox permet souvent d'améliorer la dégradation enzymatique de composés non-phénoliques. Trois médiateurs ont été testés pour favoriser l'oxydation du glyphosate : un médiateur synthétique : l'ABTS, et deux médiateurs naturels : le syringaldéhyde et l'acide p-coumarique. La Figure 3-37 représente les cinétiques de dégradation du glyphosate en présence de trois systèmes laccases-médiateurs : Laccase (*TvL*) + ABTS ; Laccase (*TvL*) + acide-p coumarique ; et Laccase (*TvL*) + syringaldéhyde. Dans ces trois cas, le catalyseur et le médiateur sont

dissous dans un réacteur agité en présence de 20 ppm de glyphosate (eau ultra pure). Des blancs ont également été réalisés sans enzymes pour éliminer toute hypothèse de dégradation par le médiateur seul. Ainsi on a pu remarquer qu'il n'y a aucun impact de la présence seule des médiateurs sur une éventuelle dégradation ou auto-dégradation du pesticide.

Les médiateurs phénoliques syringaldéhyde et acide p-coumarique ont peu d'influence sur la dégradation du glyphosate par la laccase et ne conduisent qu'à une diminution de la concentration en glyphosate de 10% environ. Cependant, l'action combinée de l'ABTS avec la laccase améliore nettement l'oxydation, permettant d'atteindre un taux de dégradation de $82,55 \% \pm 9,7\%$ en 24 heures, soit une vitesse moyenne de dégradation de $0,25 \text{ mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Il y a peu de littérature concernant la biorémédiation de glyphosate par des systèmes médiateurs-laccases. Pizzul et al., (2009), déjà évoqués précédemment, ont étudié la dégradation du glyphosate par une laccase de *Trametes Versicolor* en présence d'ABTS, et ont noté une amélioration de la dégradation du pesticide jusqu'à $40,9 \pm 3,6 \%$ en 24 heures. La différence de performance est certainement due à la différence de concentration en biocatalyseur ; les essais rapportés ont été réalisés avec moitié moins d'activité enzymatique que dans notre étude ($0,15 \text{ U.mL}^{-1}$ contre $0,3 \text{ U.mL}^{-1}$ dans cet essai).

Une nette différence de performance entre les trois médiateurs est à noter ici. Chaque système médiateur-laccase est dépendant du substrat utilisé. L'ABTS s'est déjà illustré pour être un médiateur efficace pour favoriser l'action oxydative des laccases vis-à-vis des pesticides : par exemple, une dégradation de plus de 90% du pesticide dymron en 24 heures a été reportée en présence d'ABTS (Maruyama et al., 2006). Les médiateurs synthétiques ont cependant l'inconvénient non seulement d'augmenter le coût du procédé mais aussi la potentielle toxicité de la solution à traiter. C'est pour cette raison que deux médiateurs naturels (le syringaldéhyde et l'acide p-coumarique), pouvant baisser l'impact environnemental et économique du procédé ont été testés. Néanmoins, les résultats montrent que ces médiateurs ne sont pas efficaces pour cette molécule. Des résultats similaires ont été trouvés lors de l'étude de la dégradation du pesticide isoproturon par trois systèmes laccases-médiateurs synthétiques (ABTS, 1-hydrobenzotriazole, et acide violurique) et trois systèmes laccases-médiateurs naturels (vanilline, syringaldéhyde et acetosyringone). Le syringaldéhyde et la vanilline

n'ont montré aucun effet sur la dégradation du pesticide, contre 20% pour l'acétosyringone. En revanche, des taux de dégradation entre 70 et 95 % ont été atteints pour les trois médiateurs synthétiques (Zeng et al., 2017). Cette différence provient sans doute du mécanisme impliqué qui diffère selon les médiateurs. En effet, comme cela a été explicité au paragraphe III) du chapitre 1, l'ABTS suit un mécanisme de type transfert d'électron ET alors que le syringaldéhyde et l'acide p-coumarique suivent un mécanisme de type transfert d'hydrogène HAT. Le glyphosate semble donc être plus sensible au traitement de type transfert d'électron. Les médiateurs dérivés de la lignine comme le syringaldéhyde, et les médiateurs de types acides hydroxycinnamique comme l'acide p-coumarique sont particulièrement efficaces pour dégrader les colorants, ou les composés hydrocarbures aromatiques polycycliques, dont les structures sont complètement différentes de celle du glyphosate, ce qui peut expliquer leur activité faible voire nulle vis-à-vis du glyphosate (Camarero et al., 2008, 2005).

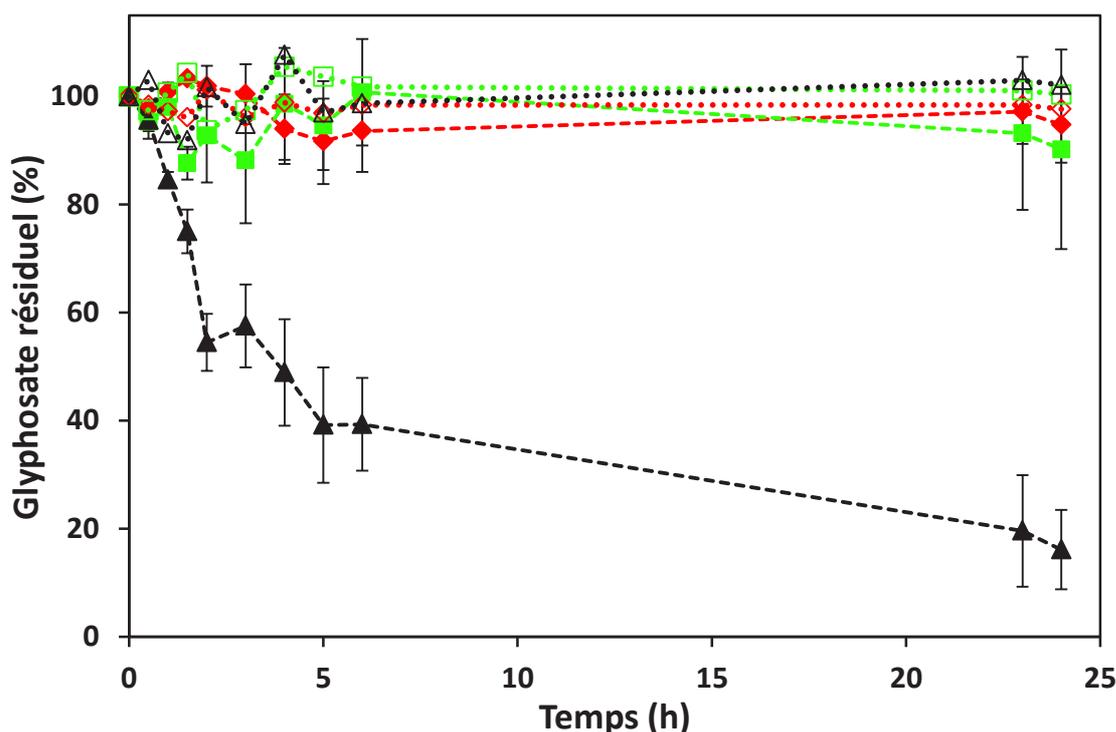


Figure 3-37 : Suivi sur 24h de la concentration du glyphosate (20 ppm, eau ultra-pure pH 6, 25°C) dans un réacteur agité en présence d'un médiateur : Syringaldéhyde (1 mmol.L⁻¹, losanges); Acide p-coumarique (1 mmol.L⁻¹, carrés); ou ABTS (1 mmol.L⁻¹, triangles) et en présence (marqueurs remplis) ou absence (marqueurs vides) de laccases (0,3 U.mL⁻¹).

c) Etude de l'apparition de l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) et de sa dégradation par les laccases.

Le sous-produit principal de la dégradation du glyphosate par les laccases est l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), dont les propriétés bio-accumulatrices dans les sols humides peuvent être jusqu'à 21 fois plus importantes que celles du glyphosate (Bento et al., 2016). Pour vérifier son apparition lors de l'oxydation du glyphosate par la laccase en présence d'ABTS, un essai de dégradation d'une solution de 20 ppm de glyphosate a été réalisé en suivant simultanément pendant 24 heures l'évolution des concentrations de glyphosate et d'AMPA (Figure 3-38). On remarque que la concentration en AMPA augmente durant les 6 premières heures de réaction pour atteindre un optimum aux alentours de 10 heures, cela correspond à la période durant laquelle la diminution du glyphosate est la plus importante. On peut donc en conclure que c'est bien l'action de laccase combinée au médiateur qui transforme le glyphosate en AMPA. Ensuite, durant les 10 dernières heures, la dégradation du glyphosate est beaucoup plus lente, ce qui peut s'expliquer par une diminution de la quantité de substrat disponible et donc des limitations diffusionnelles, mais aussi par une compétition avec l'AMPA, qui est également dégradé par la laccase. On remarque en effet que pendant cette même période, la concentration en AMPA diminue, ce qui semble résulter d'une action possible de la laccase sur la molécule d'AMPA.

Pour confirmer cette hypothèse, un test de dégradation d'une solution d'AMPA en présence de laccase et d'ABTS a été réalisé (Figure 3-39). Le résultat montre que l'action combinée de la laccase et du médiateur permet de dégrader également l'AMPA, confirmant ainsi l'hypothèse évoquée précédemment, selon laquelle après un certain temps de dégradation, il y a une compétition entre le glyphosate et l'AMPA formé pour réagir avec l'ABTS oxydé par la laccase.

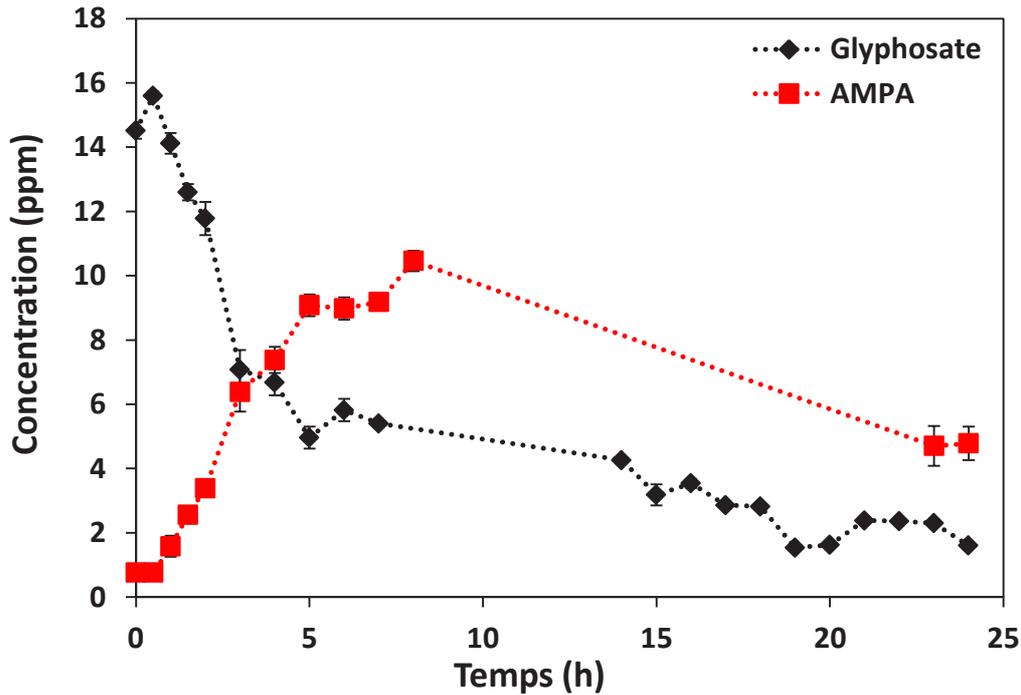


Figure 3-38 : Suivi sur 24 h de la disparition du glyphosate (20 ppm, eau ultra pure, pH 6, losanges noirs) et de l'apparition simultanée de son sous-produit principal (AMPA, carrés rouges) lors d'un essai de dégradation en présence de laccases (0,3 U.mL⁻¹) et d'ABTS (1 mmol.L⁻¹) (réacteur agité (250 rpm); température 25°C)

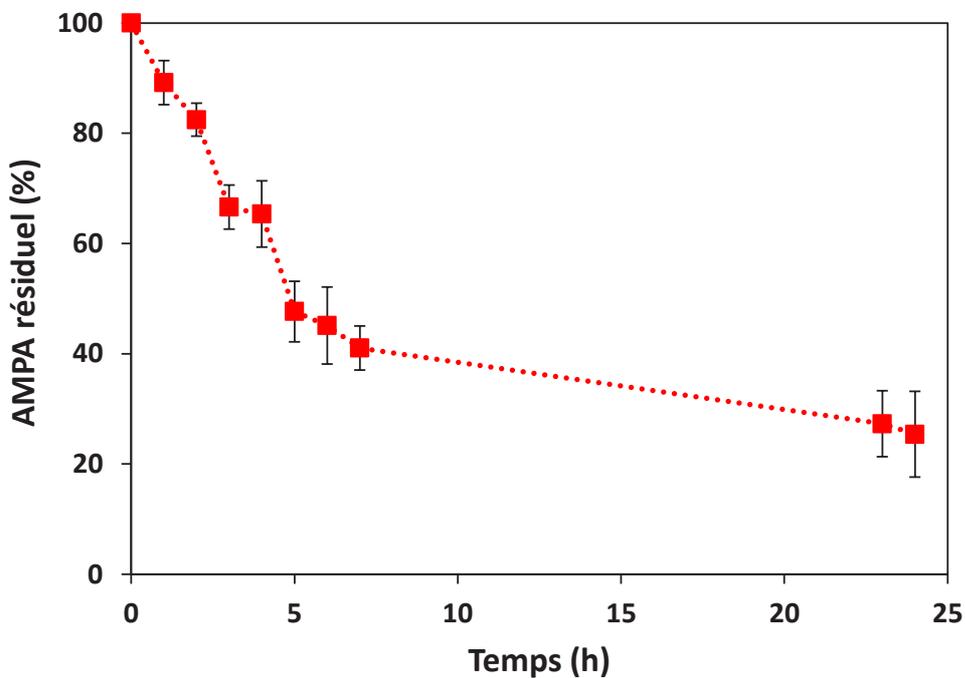


Figure 3-39 : Suivi de la dégradation d'une solution d'AMPA (20 ppm, eau ultra pure, pH 6) en présence de laccases (0,3 U.mL⁻¹) et d'ABTS (1 mmol.L⁻¹) (réacteur agité (250 rpm) ; température 25°C)

2. Etude de différents systèmes laccases – ABTS

La faisabilité de dégradation du glyphosate et de son produit de dégradation principal l'AMPA a été démontré dans un réacteur agité en présence de laccase et du médiateur ABTS, tous les deux sous forme libre. Cependant, comme on l'a vu plus tôt, une extrapolation à l'échelle supérieure semble limitée avec un bio-catalyseur dissous, et l'addition d'un médiateur synthétique dans la solution a un impact économique non négligeable et peut induire une augmentation de la toxicité de la solution traitée. Ashe et al., (2016) ont en effet observé une augmentation de la toxicité d'un mélange de quatre micropolluants récalcitrants (l'oxybenzone, le pentachlorophenol, l'atrazine et le naproxène) après ajout d'ABTS à une concentration d'1 mmol.L⁻¹.

Pour pallier ces limitations, une immobilisation du médiateur dans les billes de gélatine, a été envisagée. Comme l'ABTS ne possède pas de groupements fonctionnels propices à une immobilisation covalente à la surface des billes de gélatine comme les laccases, il a été choisi d'encapsuler ce médiateur à l'intérieur des billes (selon le protocole détaillé au chapitre 2, paragraphe II-1.d)).

a) Formation et structure des billes contenant le médiateur et des billes avec co-immobilisation catalyseur-médiateur

En plus de billes activées par greffage des laccases (billes_{activées TvL}, Figure 3-40, a), deux nouveaux types de billes ont ainsi été formées : des billes contenant seulement le médiateur encapsulé (billes_{ABTS}, Figure 3-40, b), et des billes résultant de la co-immobilisation du médiateur et du bio-catalyseur (billes_{activées TvL/ABTS}, Figure 3-40, c), dans laquelle l'ABTS est encapsulé et les laccases sont greffées par liaisons covalentes à la surface. Peu de différences sont à remarquer entre les billes_{activées TvL} et les billes_{ABTS}. Cependant, on remarque un changement de couleur vers le bleu-violet sur les billes_{activées TvL/ABTS}, témoignant d'une réaction entre l'ABTS et la laccase. Cette couleur est en effet caractéristique des radicaux formés lors de l'oxydation de l'ABTS.



Figure 3-40 : Photographies des différents systèmes de catalyseurs : (a) billes de gélatine activées par greffage de la laccase de *Trametes Versicolor* (billes activées TvL) (b) billes de gélatine avec de l'ABTS encapsulé (billes_{ABTS}) (c) billes de gélatine activées par une co-immobilisation ABTS/ TvL (billes_{activées $TvL/ABTS$})

Les spectres FTIR de ces trois différents types de billes sont regroupés sur la Figure 3-41. On retrouve les bandes caractéristiques de la gélatine déjà explicitées dans le paragraphe III-1.b) de la première partie de ce chapitre. Peu de différences sont aussi à noter ici entre les billes de gélatine simples et les billes de gélatine encapsulant l'ABTS. On observe cependant la diminution de l'intensité des signaux ainsi qu'un décalage vers des longueurs d'ondes plus faibles pour les billes_{activées $TvL/ABTS$} , résultant de l'apparition de liaisons covalentes liant la gélatine et l'enzyme.

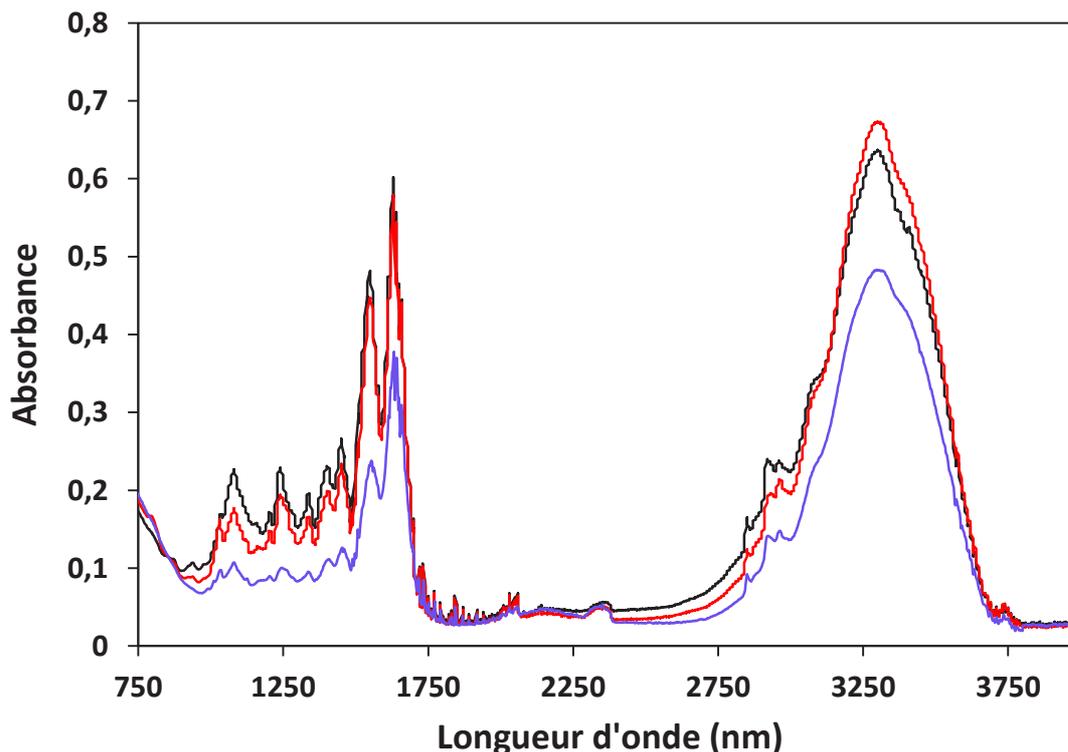


Figure 3-41 : Spectre FTIR des billes de gélatine sans ABTS (noir) ; des billes de gélatine contenant l'ABTS (rouge) et des billes de gélatine avec co-immobilisation ABTS-TvL (violet)

b) Comparaison des différents systèmes ABTS – laccase pour la dégradation du glyphosate

Des essais de dégradation du glyphosate ont été réalisés en réacteur batch agité en présence de : 1) laccases libres + billes_{ABTS}, 2) billes_{activées TvL} + ABTS libre, 3) billes_{ATBS} + billes_{activées TvL} et 4) billes_{activées TvL/ABTS}. Un blanc mettant en œuvre uniquement des billes_{ABTS} a également été réalisé. Les évolutions de la concentration en glyphosate sur 24 heures sont représentées sur la Figure 3-42. Les vitesses moyenne de dégradation calculées en $\text{mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ sur 8 heures sont regroupées dans le Tableau 3-23. Les résultats de l'essai blanc réalisé en présence des seules billes d'ABTS seules permettent de conclure que le glyphosate ne s'adsorbe pas sur les billes de gélatine. L'essai conduit avec un mélange de billes ABTS et de billes laccases ne permet de dégrader que $32\% \pm 2\%$ de glyphosate en 24 heures. La vitesse de dégradation sur 8 heures est également la plus faible observée ici, avec $0,27 \pm 0,1 \text{ mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Les distances existant entre les constituants du triptique laccase/méiateur/substrat semblent induire des limitations diffusionnelles probablement trop grandes pour que la réaction puisse se dérouler efficacement. Par contre, les essais réalisés avec les systèmes avec laccases libres/ABTS

encapsulé, et ABTS libre/laccases greffées donnent de meilleurs résultats avec environ 50% de dégradation en 24 heures pour les deux cas. Cependant, la comparaison des vitesses moyennes de dégradation sur 8 h montrent que la dégradation est plus rapide lorsque que les laccases sont libres et le médiateur immobilisé ($0,85 \pm 0,04 \text{ mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$) que le contraire ($0,63 \pm 0,08 \text{ mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$).

Enfin lorsqu'on utilise des billes_{activées TvL/ABTS}, le taux de dégradation atteint est de $43 \pm 3\%$ et la vitesse moyenne de dégradation sur 8h est égale à $0,41 \pm 0,07 \text{ mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$). Ces performances sont un peu moins bonnes que lorsque le médiateur ou le catalyseur est sous forme dissoute, mais ce résultat est prometteur et a l'avantage de ne pas ajouter de substances dissoutes dans le milieu. Il existe à notre connaissance très peu d'exemples d'immobilisation de médiateur ou de co-immobilisation du système médiateur-enzymes, et aucun ne traite de la dégradation de pesticide. Sondhi et al., (2018) ont encapsulé à la fois des laccases de *Bacillus sp. MSK-01* et de l'ABTS dans des billes d'alginate et les ont utilisées dans un réacteur à lit fixe pour la décoloration d'un effluent textile. Ils ont pu obtenir une réduction de la couleur de l'effluent de 66%. Yaohua et al., (2019) ont encapsulé de l'ABTS dans des billes de cellulose sur lesquelles ils ont greffé des laccases de *Trametes Versicolor* pour la biorémédiation du colorant indole. La dégradation de ce composé, hautement récalcitrant en l'absence de médiateur, a atteint 99,7% en présence de ces billes co-immobilisées.

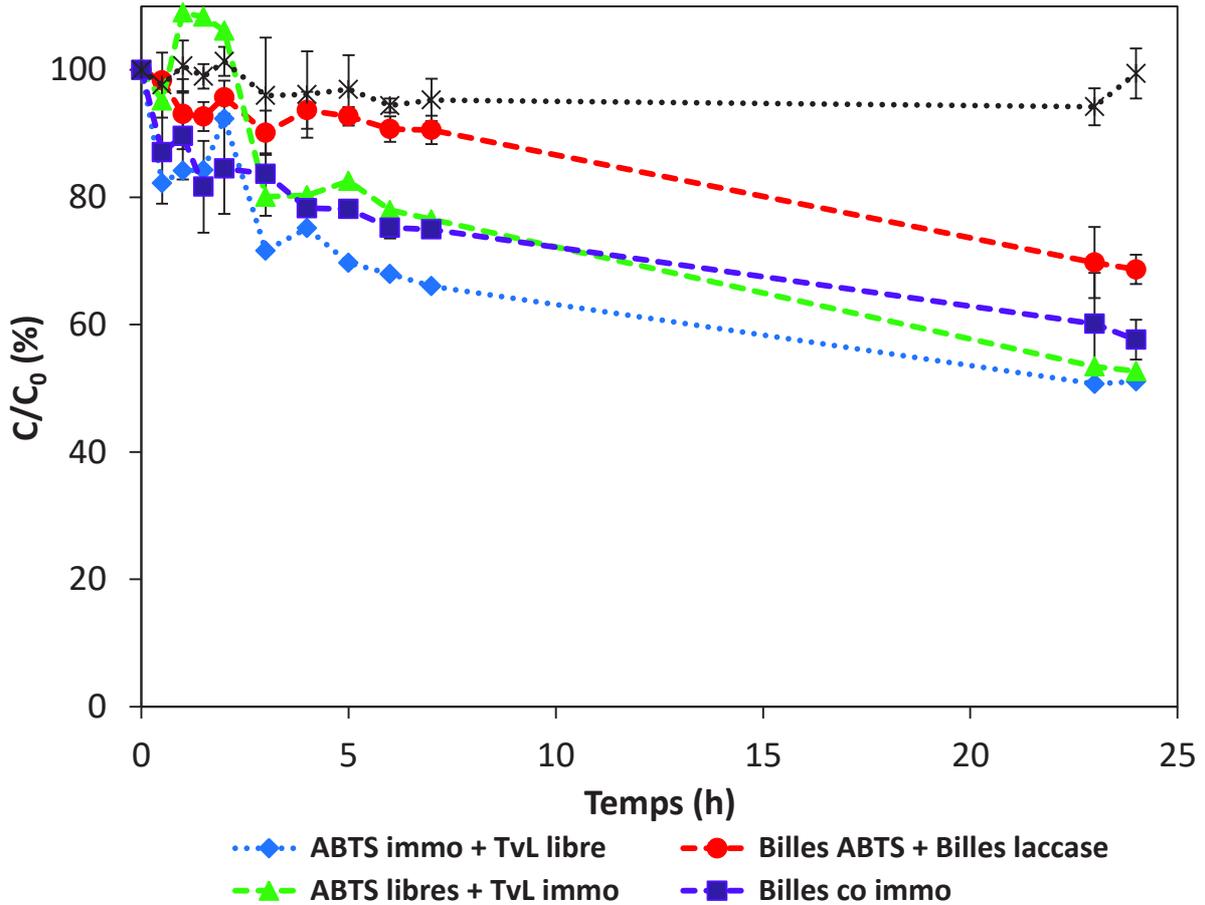


Figure 3-42 : Essais de dégradation d'une solution de glyphosate (20 ppm, eau ultra pure pH 6) avec différents systèmes laccases - médiateurs : Billes_{ABTS} (croix noires) ; Billes_{ABTS} + Billes_{activées TvL} (cercles rouges) ; ABTS libre + Billes_{activées TvL} (triangles verts) ; Billes_{activées TvL/ABTS} (carrés violets) ; laccase libres + Billes_{ABTS} (losanges bleus). (réacteurs agités sur table agitante (80 rpm), température 25°C)

Tableau 3-23 : Vitesses moyenne de dégradation du glyphosate sur 8 heures en fonction du système laccase-médiateur utilisé.

Système utilisé	Vitesse (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Billes _{ABTS} + billes _{activées TvL}	0,27 ± 0,1
ABTS libre + billes _{activées TvL}	0,63 ± 0,08
Billes _{ABTS} + laccases libres	0,85 ± 0,04
Billes _{activées TvL/ABTS}	0,41 ± 0,06

c) Dégradation du glyphosate dans le réacteur à lit fluidisé et stabilité opératoire des billes avec co-immobilisation.

Des essais de dégradation du glyphosate ont été réalisés dans le réacteur à lit fluidisé, dont le lit catalytique est constitué de billes activées *TvL/ABTS*. Pour vérifier la possibilité de réutiliser ces billes, permettant de recycler à la fois le médiateur et les enzymes, 4 cycles de dégradation successifs ont été réalisés avec entre chaque cycle le renouvellement du milieu réactionnel par une solution fraîche de glyphosate (20 ppm, eau ultra-pure) et le rinçage des billes au tampon phosphate-citrate pH 7. Les résultats sont présentés sur la Figure 3-43. On observe que le taux de dégradation n'atteint que 31% au bout de 24 heures pour le premier cycle. Ce taux est néanmoins cohérent car le volume a été multiplié par 10 comparé au réacteur batch agité (100 mL contre 10 mL). Le même travail de normalisation de la vitesse par le volume de solution et la quantité d'enzymes greffées a été réalisé que dans le paragraphe II-3.a) de ce chapitre, et les vitesses obtenues sont regroupées dans le Tableau 3-24. On remarque donc que même si le taux de glyphosate dégradé en 24 heures est plus faible en réacteur à lit fluidisé qu'en réacteur agité, la vitesse moyenne sur 8 heures a elle été multipliée par 6 (de 0,27 à 1,67 $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{U}_{\text{enzymes}}$). On peut donc supposer que la fluidisation améliore ici aussi la dégradation, en maintenant une haute concentration en substrat au voisinage du système catalytique.

On remarque aussi que si la vitesse est assez rapide sur 8 heures, la réaction semble s'arrêter de 8 à 24 heures, et le glyphosate n'est plus dégradé. Ce ralentissement est ici bien plus marqué que celui observé lors de la dégradation de la TC. On peut supposer une limitation en oxygène, ou une compétition avec la dégradation de l'AMPA.

On observe également une bonne reproductibilité sur 4 cycles, avec un taux de dégradation qui varie entre 26 et 31%. Ces résultats sont assez encourageants et montrent la possibilité de co-immobiliser le biocatalyseur et son médiateur sur un même support et ainsi dégrader des micropolluants récalcitrants.

Il faut à présent évaluer la toxicité des échantillons avant et après traitement enzymatique.

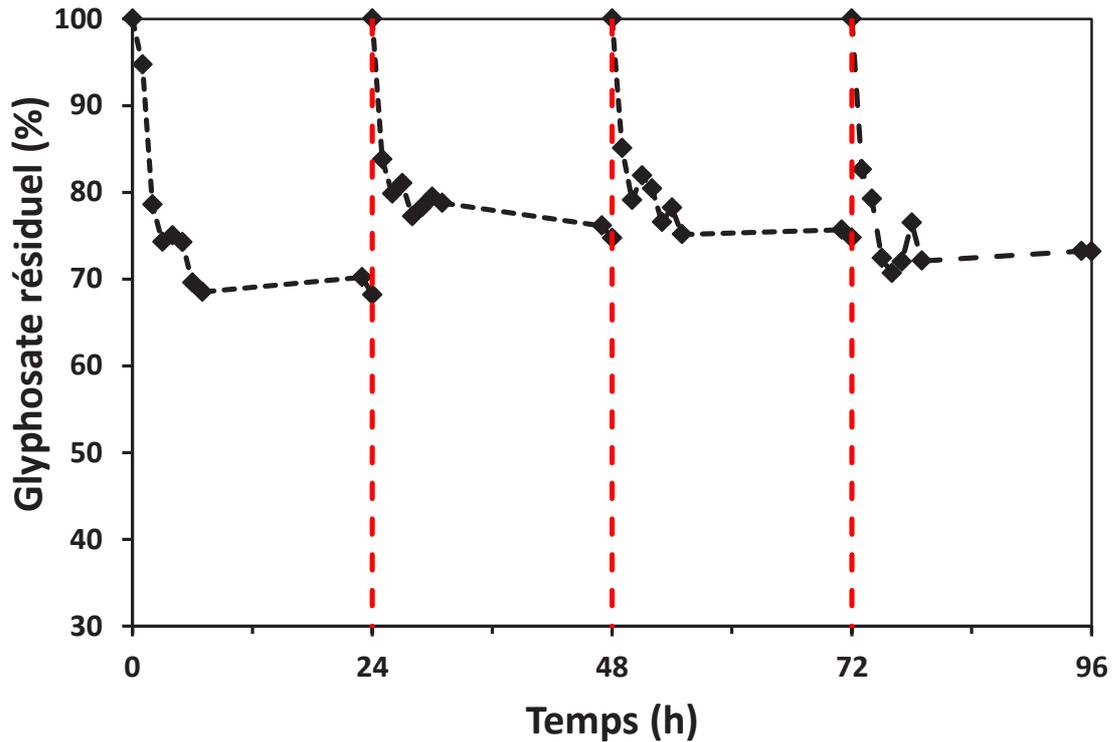


Figure 3-43 : Cycles successifs de dégradation du glyphosate (20 ppm, eau ultra-pure) en présence de billes_{actives TvL/ABTS} dans un réacteur à lit fluidisé (concentration enzymatique : 100 U.L⁻¹, volume réactionnel : 100 mL ; débit de recirculation 80 mL.min⁻¹, température 25°C)).

Tableau 3-24 : Performances de dégradation d'une solution de glyphosate (20 ppm, eau ultra pure pH 6, 25°C) en présence de billes_{actives TvL/ABTS} en réacteur agité et en lit fluidisé)

Réacteur utilisé	Taux de glyphosate résiduel après 24 heures	Vitesse moyenne sur 8 heures (mg.h ⁻¹ .U _{enzymes} ⁻¹)
Réacteur agité	57% ± 3%	0,27 ± 0,03
Réacteur à lit fluidisé	69%	1,67

3. Tests de toxicité

Comme on l'a vu précédemment, il est nécessaire d'étudier la toxicité de la solution après traitement car une dégradation de la molécule n'entraîne pas toujours une réduction de la toxicité finale de la solution. L'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio fischeri* induite par une solution de glyphosate traitée par des billes_{activées TvL/ABTS} a été comparée à celles de solutions de glyphosate et d'AMPA avant et après traitement par un mélange enzyme/médiateur utilisés sous forme libre. Les résultats des tests microtox sont regroupés sur la Figure 3-44. La toxicité d'une solution à 1 mmol.L⁻¹ d'ABTS libre a également été évaluée mais les résultats n'ont pu être présentés sur la Figure 3-44 car l'effet d'inhibition était de 100% dès 5 minutes de contact. D'après les résultats obtenus, on observe tout d'abord que la toxicité de la solution de glyphosate envers la bactérie *Vibrio fischeri* ne diminue pas par rapport à l'échantillon initial (échantillon a) après 24 heures de traitement en présence de laccases et d'ABTS, tous deux sous forme dissoute (échantillon b).

L'absence d'effet visible du traitement enzymatique qui permettait pourtant d'éliminer 80% du glyphosate est vraisemblablement dû à la présence de l'ABTS et peut être à l'enzyme ou aux solutés présents dans la solution enzymatique comme on l'a vu plus haut (cf Chapitre 3, partie II, paragraphe II-2.d)). En effet, lorsque la solution est traitée avec des billes_{activées TvL/ABTS}, la toxicité de l'échantillon est réduite de presque 50% (échantillon c) pour un abattement de la concentration de glyphosate de 43% après 24h de réaction. On peut en conclure que le traitement est efficace et il semblerait que l'AMPA, lui-même sensible à l'action des laccases, ne s'accumule pas dans le milieu. Il n'a pas été possible de le confirmer par l'analyse en raison de problèmes techniques, mais les tests microtox montrent que la toxicité de l'AMPA (échantillon d) est à peine plus faible que celle du glyphosate (18 contre 22% et 27 contre 32% d'inhibition après 5 et 15 min de contact). Si cette molécule s'était accumulée dans le milieu réactionnel, la réduction de l'inhibition aurait été moins importante. De plus, en raison de la présence d'ABTS libre dans le milieu (échantillon e), l'absence ou la faible toxicité des produits de dégradation de l'AMPA n'a pas pu être vérifiée.

Ces résultats sont donc prometteurs car même si la dégradation est plus lente avec le système médiateur-catalyseur immobilisée, l'encapsulation de l'ABTS tout comme le greffage de l'enzyme permettent de réduire les coûts suite à la réutilisation du

catalyseur et du médiateur tout en apportant une réelle solution au problème de toxicité induite par l'utilisation d'un médiateur.

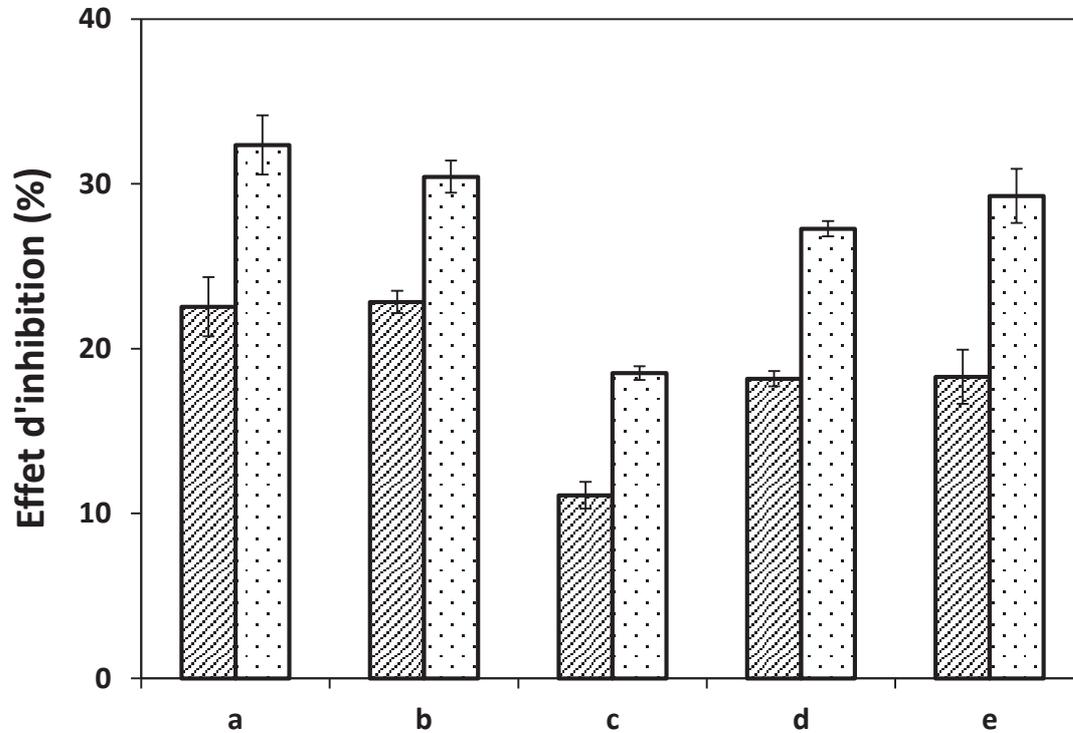


Figure 3-44 : Effet d'inhibition d'une solution de glyphosate à 1 ppm non traité (a), après 24 heures de traitement par *TvL* libres (0,3 U.mL⁻¹) et d'ABTS libre (1 mmol.L⁻¹) (b), après 24h de traitement en réacteur à lit fluidisé en présence de billes_{activées} *TvL/ABTS* (c) ; et d'une solution d'AMPA à 1 ppm non traité (d) et après 24 heures de traitement par *TvL* libres (0,3 U.mL⁻¹) et d'ABTS libre (1 mmol.L⁻¹) (e) après 5 minutes de contact (rayures) ou 15 minutes de contact (points) avec une bactérie luminescente (*Vibrio fischeri*).

4. Conclusion

Du fait de la présence de groupements « électrons accepteurs », l'oxydation du glyphosate par la laccase de *Trametes versicolor* n'est possible qu'en présence de médiateurs tel que l'ABTS. Il a été ainsi montré qu'un taux de dégradation de 80% du glyphosate peut être atteint en 24 h dans un réacteur batch agité en présence de laccase de *Trametes Versicolor* ($0,3 \text{ U.mL}^{-1}$) et d'ABTS (1 mmol.L^{-1}) sous forme soluble. Pour limiter les coûts et l'augmentation de la toxicité liée à l'utilisation d'un médiateur, l'encapsulation de celui-ci a été envisagée. En particulier, la co-immobilisation de l'enzyme et du médiateur dans une même bille (billes_{activées TvL/ABTS}) a permis de réduire de 43% la concentration d'une solution à 20 ppm de glyphosate en 24 heures dans un réacteur batch agité. La vitesse de réaction a également pu être améliorée en utilisant un réacteur à lit fluidisé, même si le taux de dégradation résultant est plus faible (26-31%). La toxicité réduite d'un échantillon de glyphosate après 24h de traitement avec des billes_{activées TvL/ABTS} ainsi que la bonne stabilité opératoire de ces billes sur 4 cycles de 24h rendent prometteur l'utilisation de celles-ci pour la dégradation de polluants récalcitrants.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Le but de cette thèse était d'élaborer des supports biosourcés d'immobilisation d'enzymes en vue de la biorémédiation de micropolluants dans l'eau.

La gélatine a été choisie comme support pour ses propriétés biodégradables, biocompatibles, ses nombreux groupements fonctionnels et son abondance dans la nature. Des billes de gélatine de diamètre moyen 1,9 mm ont été élaborées par un procédé de goutte à goutte, dans un bain de gélification composé d'une solution aqueuse de polymère, permettant d'éviter l'utilisation de solvants organiques pour le rinçage des billes. L'impact de différents paramètres sur la formation des billes a été étudié, comme la concentration en gélatine, la concentration en PEG, le poids moléculaire du PEG ou encore la température du bain.

Pour assurer une bonne tenue mécanique des billes en fluidisation dans un milieu aqueux, une réticulation est assurée par le glutaraldéhyde. Une concentration de 3% v/v a été retenue, permettant la réticulation totale de la gélatine (vérifié par un essai au TNBS) et des propriétés mécaniques suffisantes (déterminées par tests de compression en immersion). Un autre paramètre essentiel dans cette optique est le taux de gonflement après 24 heures d'immersion, et il a été réduit par 5 par comparaison à un gel non réticulé.

Le greffage de la laccase de *Trametes versicolor* a été réalisé via des liaisons covalentes établies entre l'agent de réticulation et les groupements amines libres de l'enzyme. Un plan d'expérience 2⁴ a été effectué pour étudier l'influence des paramètres d'immobilisation sur l'activité finale des billes actives. Le temps de greffage et la concentration initiale de la solution enzymatique ont été identifiés comme les paramètres les plus influents sur l'efficacité du greffage.

Si les enzymes immobilisées démontrent une activité plus faible que les enzymes libres, la stabilité enzymatique des billes obtenues vis-à-vis du pH, de la température et du temps a été améliorée en comparaison à celle des enzymes libres. Les constantes cinétiques démontrent également une bonne affinité des enzymes greffées vis-à-vis d'un substrat modèle, l'ABTS.

Bien que la toxicité du glutaraldéhyde soit élevée lorsqu'il est en solution, elle semble devenir nulle une fois le glutaraldéhyde fixé sur les billes de gélatine. En effet, la toxicité d'un échantillon d'eau avant et après 24 heures de contact avec les billes de gélatine réticulées et greffées a été évaluée au moyen d'un test microtox, et aucune incidence sur la bactérie *Vibrio Fischeri* n'a été constaté.

Les billes actives se sont révélées efficaces pour dégrader un substrat pharmaceutique : la tétracycline. La dégradation de ce composé a atteint les 70% en 24 heures dans un réacteur batch agité à 25°C.

Un réacteur à lit fluidisé a été conçu et les paramètres opératoires (diamètre et hauteur de la colonne, débit opératoire) ont été choisis pour assurer une bonne fluidisation de la totalité du lit. La fluidisation a considérablement améliorée la dégradation de l'antibiotique. Tout d'abord, ce changement d'échelle permet d'augmenter le volume de la solution, et donc le ratio substrat/enzyme, entraînant une hausse de la vitesse de dégradation, passant de $0,35 \text{ mg.h}^{-1} \cdot \text{U}_{\text{enzymes}}^{-1}$ en réacteur batch agité à $1,59 \text{ mg.h}^{-1} \cdot \text{U}_{\text{enzymes}}^{-1}$ en réacteur à lit fluidisé. De plus, la recirculation assure un haut niveau de concentration de substrat permanent au voisinage du site actif de l'enzyme, et une augmentation du débit de recirculation entraîne une augmentation de la dégradation de la TC. Il faut néanmoins trouver un compromis car un trop haut débit peut entraîner une perte d'activité de l'enzyme.

L'oxydation enzymatique du glyphosate, pesticide bio persistant dans l'environnement et affectant négativement les écosystèmes, a également été étudiée. Du fait de la présence de groupements électrons accepteurs dans la molécule limitant l'action du biocatalyseur, l'ajout d'un médiateur d'oxydoréduction, l'ABTS, a considérablement amélioré la dégradation du glyphosate (passant de 15% en 24 heures sans médiateur à 83% en 24 heures avec l'ABTS). Afin de réduire l'impact économique et environnemental du procédé, une immobilisation du médiateur a été envisagée sur les supports à base de gélatine. La co-immobilisation du médiateur et de l'enzyme sur une même bille s'est avérée beaucoup plus efficace que d'utiliser un mélange de billes sur lesquelles ont été immobilisées soit l'enzyme soit le médiateur. . La co-immobilisation d'ABTS et de laccases a permis d'oxyder environ 43% du glyphosate d'une solution à 20 ppm dans un réacteur batch agité. La bonne stabilité opératoire de ces billes dans le réacteur à lit fluidisé pendant 4 cycles de réaction est prometteuse pour leur utilisation

à plus grande échelle. Il est important de noter que le sous produit principal de dégradation du glyphosate, l'AMPA, peut également être oxydé par la laccase. Enfin, l'élimination simultanée de glyphosate et de l'AMPA ne semble pas conduire à la formation de produits toxiques comme l'ont montré les résultats des tests microtox.

De nombreuses perspectives d'études à développer ont néanmoins été soulevées au cours de ce projet.

Tout d'abord, si le procédé de formation de billes ne met en jeu aucune substance chimique néfaste pour l'environnement (gélatine, PEG, solution tampon), il faudrait réfléchir au changement d'échelle du procédé d'élaboration afin de produire un plus grand nombre de billes à la fois tout en réduisant l'impact environnemental et économique de cette étape.

En raison du coût des enzymes, les volumes de solution enzymatique mises en jeu pendant l'étape de greffage des billes devront être optimisés lors de l'extrapolation à plus grande échelle. L'essai de greffage dans le réacteur à lit fluidisé que nous avons réalisé est prometteur et permet de réduire la quantité de catalyseur mis en jeu. Cette piste mérite donc d'être approfondie.

En ce qui concerne l'aspect bio remédiation des polluants, les solutions utilisées durant cette thèse sont des solutions synthétiques, hautement concentrées et préparées dans des solutions tampons à pH contrôlées ou dans de l'eau ultra pure. Pour envisager l'utilisation de ce procédé en station d'épuration, il sera indispensable d'étudier l'efficacité des billes actives en contact avec des effluents réels, apportant des contraintes supplémentaires. Tout d'abord, la concentration de polluants utilisée dans ce projet était de 20 ppm, bien plus élevée que les concentrations habituelles de la TC ou du glyphosate dans l'environnement (aux alentours du ng.L^{-1} au $\mu\text{g.L}^{-1}$). Des essais réalisés en laboratoire avec une solution de 1 ppm de TC ont été prometteurs, car les laccases immobilisées sur les billes de gélatine ont dégradé 100% de cette solution. Les effluents ont également une matrice beaucoup plus complexe que les solutions tampons ou d'eau ultra-pure avec lesquelles nous avons travaillé. Des effets d'inhibition ou de compétition entre substrats peuvent jouer sur la capacité de dégradation des laccases. L'effet cocktail des différentes molécules présentes dans l'eau sera donc à étudier.

Dans le cadre de ce projet, la toxicité des solutions a été étudiée vis-à-vis d'une seule bactérie, *Vibrio Fischeri*. D'autres tests d'écotoxicité doivent être à prévoir, et l'activité antibiotique des solutions est aussi un paramètre essentiel à surveiller pour prévenir l'apparition de bactéries anti-bio résistantes.

L'addition de médiateurs d'oxydoréduction est un moyen efficace pour améliorer la dégradation enzymatique de composés à haut potentiel d'oxydoréduction ou avec une structure chimique complexe. L'étape d'immobilisation du médiateur sur un support est encore très peu exploitée dans la littérature et pourtant prometteuse en vue d'un procédé économique et respectueux de l'environnement. Des résultats encourageants ont été obtenus dans le cadre de cette thèse dans ce sens et cette piste mérite d'être approfondie. Beaucoup de paramètres restent par ailleurs à étudier pour optimiser la dégradation, comme le rapport médiateur/enzyme.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahmed, M.B., Zhou, J.L., Ngo, H.H., Guo, W., Thomaidis, N.S., Xu, J., 2017. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials* 323, 274–298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045>
- Alcalde, M., 2007. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. *Industrial enzymes* 461–476.
- Alneyadi, A.H., Rauf, M.A., Ashraf, S.S., 2018. Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water – a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology* 38, 971–988. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1423275>
- Altmann, J., Ruhl, A.S., Zietzschmann, F., Jekel, M., 2014. Direct comparison of ozonation and adsorption onto powdered activated carbon for micropollutant removal in advanced wastewater treatment. *Water Research* 55, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.025>
- Alvarez-Moya, C., Reynoso Silva, M., Valdez Ramírez, C., Gómez Gallardo, D., León Sánchez, R., Canales Aguirre, A., Feria Velasco, A., 2014. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genet. Mol. Biol.* 37, 105–110. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014000100016>
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866–1873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.041>
- Arca-Ramos, A., Eibes, G., Feijoo, G., Lema, J.M., Moreira, M.T., 2018. Enzymatic reactors for the removal of recalcitrant compounds in wastewater. *Biocatalysis and Biotransformation* 36, 195–215. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1315411>
- Arca-Ramos, A., Eibes, G., Feijoo, G., Lema, J.M., Moreira, M.T., 2015. Potentiality of a ceramic membrane reactor for the laccase-catalyzed removal of bisphenol A from secondary effluents. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 9299–9308. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6826-4>
- Archer, E., Petrie, B., Kasprzyk-Hordern, B., Wolfaardt, G.M., 2017. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. *Chemosphere* 174, 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.101>
- Arvaniti, O.S., Frontistis, Z., Nika, M.C., Aalizadeh, R., Thomaidis, N.S., Mantzavinos, D., 2020. Sonochemical degradation of trimethoprim in water matrices: Effect of operating conditions, identification of transformation products and toxicity assessment. *Ultrasonics Sonochemistry* 105139. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105139>

- Asgher, M., Noreen, S., Bilal, M., 2017. Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. *International Journal of Biological Macromolecules* 95, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.012>
- Ashe, B., Nguyen, L.N., Hai, F.I., Lee, D.-J., van de Merwe, J.P., Leusch, F.D.L., Price, W.E., Nghiem, L.D., 2016. Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity. *International Biodeterioration & Biodegradation* 113, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.027>
- Asif, M.B., Hai, F.I., Dhar, B.R., Ngo, H.H., Guo, W., Jegatheesan, V., Price, W.E., Nghiem, L.D., Yamamoto, K., 2018. Impact of simultaneous retention of micropollutants and laccase on micropollutant degradation in enzymatic membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 267, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.066>
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., Noguerol, T.-N., Piña, B., 2008. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.064>
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., 2007. Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in wastewater. *Chemosphere* 68, 1830–1837. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.045>
- Avci, A., İnci, İ., Baylan, N., 2020. Adsorption of ciprofloxacin hydrochloride on multiwall carbon nanotube. *Journal of Molecular Structure* 1206, 127711. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127711>
- Ba, S., Arsenaault, A., Hassani, T., Jones, J.P., Cabana, H., 2013. Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology* 33, 404–418. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.725390>
- Barbosa, M.O., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research* 94, 257–279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2014. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.* 4, 1583–1600. <https://doi.org/10.1039/C3RA45991H>
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2013. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules* 14, 2433–2462. <https://doi.org/10.1021/bm400762h>

- Barrios-Estrada, C., Rostro-Alanis, M. de J., Parra, A.L., Belleville, M.-P., Sanchez-Marcano, J., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R., 2017. Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.177>
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C.A., Sola, M., 2010. Redox properties of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.002>
- Bayramoglu, G., Arica, M.Y., 2019. Biodegradation of methylene blue and carbaryl by *Trametes versicolor* laccase preparations in the presence of a mediator compound. *Journal of Macromolecular Science, Part A* 56, 277–285. <https://doi.org/10.1080/10601325.2019.1565549>
- Bello, M.M., Abdul Raman, A.A., Purushothaman, M., 2017. Applications of fluidized bed reactors in wastewater treatment – A review of the major design and operational parameters. *Journal of Cleaner Production* 141, 1492–1514. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.148>
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28, 3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Bento, C.P.M., Yang, X., Gort, G., Xue, S., van Dam, R., Zomer, P., Mol, H.G.J., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2016. Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Science of The Total Environment* 572, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.215>
- Béranger, R., Hardy, E.M., Binter, A.-C., Charles, M.-A., Zaros, C., Appenzeller, B.M.R., Chevrier, C., 2020. Multiple pesticides in mothers' hair samples and children's measurements at birth: Results from the French national birth cohort (ELFE). *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 223, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.010>
- Bernhard, M., Müller, J., Knepper, T.P., 2006. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research* 40, 3419–3428. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.011>
- Bhat, R., Timasheff, S.N., 1992. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Protein Science* 1, 1133–1143. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010907>
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K., 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 23, 4827–4832.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N., 2001. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking 6.
- Bigi, Aea, Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N., 2001. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* 22, 763–768.

- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H.M.N., 2019a. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. *Environment International* 124, 336–353. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.011>
- Bilal, M., Asgher, M., Cheng, H., Yan, Y., Iqbal, H.M.N., 2019b. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. *Critical Reviews in Biotechnology* 39, 202–219. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1531822>
- Bilal, M., Iqbal, H.M., 2019. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *International journal of biological macromolecules*.
- Bilal, M., Jing, Z., Zhao, Y., Iqbal, H.M.N., 2019c. Immobilization of fungal laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads and its bio-catalytic potential to degrade bisphenol A. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 19, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101174>
- Billon, A., Bataille, B., Cassanas, G., Jacob, M., 2000. Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs. *International journal of pharmaceutics* 203, 159–168.
- Birsa, T., Kalneniece, K., Jansons, M., Kalniņš, M., Ozoliņa, I., Bērziņš, A., Švinka, V., Švinka, R., Bartkevičs, V., Muter, O., 2018. Evaluation of Glyphosate Ecotoxicity and Biodegradability in the Municipal Wastewaters. *KEM* 762, 75–80. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.762.75>
- Biscarat, J., Charmette, C., Sanchez, J., Pochat-Bohatier, C., 2015. Preparation of dense gelatin membranes by combining temperature induced gelation and dry-casting. *Journal of Membrane Science* 473, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.09.004>
- Blair, B., Nikolaus, A., Hedman, C., Klaper, R., Grundl, T., 2015. Evaluating the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment. *Chemosphere* 134, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.078>
- Blandino, A., 1999. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. *Journal of bioscience and bioengineering* 88, 686–689.
- Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 543, 251–272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Bonanse, R., Filippi, I., Wunderlin, D., Marino, D., Amé, M., 2017. The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment. *Toxics* 6, 3. <https://doi.org/10.3390/toxics6010003>
- Borah, P., n.d. Chapter 3 - Recent trends in the detection and degradation of organic pollutants 13.
- Borggaard, O.K., Gimsing, A.L., 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest. Manag. Sci.* 64, 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>

- Borthakur, P., Boruah, P.K., Das, M.R., Kulik, N., Minofar, B., 2018. Adsorption of 17 α -ethynyl estradiol and β -estradiol on graphene oxide surface: An experimental and computational study. *Journal of Molecular Liquids* 269, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.013>
- Boudrant, J., Woodley, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2019. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry* S1359511319316861. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>
- Brady, D., Jordaan, J., 2009. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters* 31, 1639–1650. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0076-4>
- Brugnari, T., Pereira, M.G., Bubna, G.A., de Freitas, E.N., Contato, A.G., Corrêa, R.C.G., Castoldi, R., de Souza, C.G.M., Polizeli, M. de L.T. de M., Bracht, A., Peralta, R.M., 2018. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. *Science of The Total Environment* 634, 1346–1351. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.051>
- Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Lucchesi, M.B., Gremião, M.P.D., 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 264, 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00386-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00386-7)
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C.M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., de Vries, D., Schwermer, C.U., Meric, S., Ozkal, C.B., Pons, M.-N., Kneis, D., Berendonk, T.U., 2019. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research* 162, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>
- Camarero, S., Cañas, A.I., Nousiainen, P., Record, E., Lomascolo, A., Martínez, M.J., Martínez, Á.T., 2008. p-Hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environmental science & technology* 42, 6703–6709.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 2005. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1775–1784. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1775-1784.2005>
- Cañas, A.I., Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28, 694–705. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.002>
- Catrinck, T.C.P.G., Dias, A., Aguiar, M.C.S., Silvério, F.O., Fidêncio, P.H., Pinho, G.P., 2014. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and AMPA Using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Spectrophotometric Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140096>
- Cédat, B., de Brauer, C., Métivier, H., Dumont, N., Tutundjan, R., 2016. Are UV photolysis and UV/H₂O₂ process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. *Water Research* 100, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.040>

- Chan, E.-S., Lee, B.-B., Ravindra, P., Poncelet, D., 2009. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.05.027>
- Chang, P.-H., Jiang, W.-T., Li, Z., Jean, J.-S., Kuo, C.-Y., 2015. Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis 4, 27.
- Chao, C., Liu, J., Wang, J., Zhang, Yanwu, Zhang, B., Zhang, Yatao, Xiang, X., Chen, R., 2013. Surface Modification of Halloysite Nanotubes with Dopamine for Enzyme Immobilization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 10559–10564. <https://doi.org/10.1021/am4022973>
- Chen, L., Zou, M., Hong, F.F., 2015. Evaluation of Fungal Laccase Immobilized on Natural Nanostructured Bacterial Cellulose. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01245>
- Chen, Q., Guo, X., Hua, G., Li, G., Feng, R., Liu, X., 2017. Migration and degradation of swine farm tetracyclines at the river catchment scale: Can the multi-pond system mitigate pollution risk to receiving rivers? *Environmental Pollution* 220, 1301–1310. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.004>
- Cheng, J., Ming Yu, S., Zuo, P., 2006. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research* 40, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.017>
- Chhabra, M., Mishra, S., Sreekrishnan, T.R., 2015. Immobilized laccase mediated dye decolorization and transformation pathway of azo dye acid red 27. *J Environ Health Sci Engineer* 13, 38. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0192-0>
- Corno, G., Yang, Y., Eckert, E.M., Fontaneto, D., Fiorentino, A., Galafassi, S., Zhang, T., Di Cesare, A., 2019. Effluents of wastewater treatment plants promote the rapid stabilization of the antibiotic resistome in receiving freshwater bodies. *Water Research* 158, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.031>
- Cortesi, R., Esposito, E., Osti, M., Menegatti, E., Squarzone, G., Davis, S.S., Nastruzzi, C., 1999. Dextran cross-linked gelatin microspheres as a drug delivery system. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 47, 153–160.
- Couto, C.F., Lange, L.C., Amaral, M.C.S., 2019. Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants—A review. *Journal of Water Process Engineering* 32, 100927. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100927>
- Crewther, W.G., 1951. The precipitation of gelatin by ethanol, and its use in the estimation of proteolytic activity. *Australian Journal of scientific research* 5, 290–301.
- Dai, C.-A., Chen, Y.-F., Liu, M.-W., 2006. Thermal properties measurements of renatured gelatin using conventional and temperature modulated differential scanning calorimetry. *Journal of Applied Polymer Science* 99, 1795–1801. <https://doi.org/10.1002/app.22711>
- Dal Magro, L., Pessoa, J.P.S., Klein, M.P., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C., 2020. Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed

- versus packed-bed reactor. *Catalysis Today* S0920586120300560. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.02.003>
- Daniel, R.M., 1996. The upper limits of enzyme thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 74–79. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00174-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00174-3)
- Dardelle, G., Subramaniam, A., Normand, V., 2011. Determination of covalent cross-linker efficacy of gelatin strands using calorimetric analyses of the gel state. *Soft Matter* 7, 3315. <https://doi.org/10.1039/c0sm01374a>
- Davarcı, F., Turan, D., Ozcelik, B., Poncelet, D., 2017. The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids* 62, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.029>
- Dayaram, P., Dasgupta, D., 2008. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using *Polyporus rubidus* 6.
- de Cazes, Matthias, Abejón, R., Belleville, M.-P., Sanchez-Marcano, J., 2014. Membrane Bioprocesses for Pharmaceutical Micropollutant Removal from Waters. *Membranes* 4, 692–729. <https://doi.org/10.3390/membranes4040692>
- de Cazes, M., Belleville, M.-P., Mougel, M., Kellner, H., Sanchez-Marcano, J., 2015. Characterization of laccase-grafted ceramic membranes for pharmaceuticals degradation. *Journal of Membrane Science* 476, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.11.044>
- de Cazes, M., Belleville, M.-P., Petit, E., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., de Gunzburg, J., Barceló, D., Sanchez-Marcano, J., 2014. Design and optimization of an enzymatic membrane reactor for tetracycline degradation. *Catalysis Today* 236, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.02.051>
- de Souza, R.M., Seibert, D., Quesada, H.B., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M.R., Bergamasco, R., 2020. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Process Safety and Environmental Protection* 135, 22–37. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.035>
- Debaste, F., Songulashvili, G., Penninckx, M.J., 2014. The potential of *Cerrena unicolor* laccase immobilized on mesoporous silica beads for removal of organic micropollutants in wastewaters. *Desalination and Water Treatment* 52, 2344–2347. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.877851>
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- Demarche, P., Junghanns, C., Nair, R.R., Agathos, S.N., 2012. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnology Advances* 30, 933–953. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.013>
- Deo, R.P., 2014. Pharmaceuticals in the Surface Water of the USA: A Review. *Curr Envir Health Rpt* 1, 113–122. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0015-y>
- Dharupaneedi, S.P., Nataraj, S.K., Nadagouda, M., Reddy, K.R., Shukla, S.S., Aminabhavi, T.M., 2019. Membrane-based separation of potential emerging pollutants.

- Separation and Purification Technology 210, 850–866.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.09.003>
- Di Guardo, A., Finizio, A., 2018. A new methodology to identify surface water bodies at risk by using pesticide monitoring data: The glyphosate case study in Lombardy Region (Italy). *Science of The Total Environment* 610–611, 421–429.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.049>
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A.J., Bohlmann, G., 2013. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6437.
<https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>
- Directive, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *J. Eur. Union.* 1–17.
- Directive, 2008. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/91/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Union.* 84–97.
- Directive, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Commun.* 1–72.
- Dissanayake Herath, G.A., Poh, L.S., Ng, W.J., 2019. Statistical optimization of glyphosate adsorption by biochar and activated carbon with response surface methodology. *Chemosphere* 227, 533–540.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.078>
- Dulio, V., Adres, S., 2013. Recommandations du Comité Experts Priorisation auprès du MEDDE pour la sélection des substances pertinentes à surveiller dans les milieux aquatiques pour le second cycle de la DCE (2016-2021). Rapport SQUAREF.
- Ergun, S., 1952. Fluid flow through packed columns. *Chemical Engineering Process* 48, 89–94.
- Escalona, I., de Grooth, J., Font, J., Nijmeijer, K., 2014. Removal of BPA by enzyme polymerization using NF membranes. *Journal of Membrane Science* 468, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.06.011>
- Esposito, E., Cortesi, R., Nastruzzi, C., 1996. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials* 17, 2009–2020.
- Esquena, J., 2016. Water-in-water (W/W) emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 25, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.09.010>
- Evans M N Chirwa, Emomotimi E Bamuza-Pemu, 2010. Investigation of photocatalysis as an alternative to other advanced oxidation processes for the treatment of filter backwash water. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1368.3042>

- Falade, A.O., Mabinya, L.V., Okoh, A.I., Nwodo, U.U., 2018. Ligninolytic enzymes: Versatile biocatalysts for the elimination of endocrine-disrupting chemicals in wastewater. *MicrobiologyOpen* 7, e00722. <https://doi.org/10.1002/mbo3.722>
- Farris, S., Song, J., Huang, Q., 2010. Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 998–1003. <https://doi.org/10.1021/jf9031603>
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.Á., Moldes, D., 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances* 31, 1808–1825. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013>
- Fidalgo, W.R.R., Ceron, A., Freitas, L., Santos, J.C., de Castro, H.F., 2016. A fluidized bed reactor as an approach to enzymatic biodiesel production in a process with simultaneous glycerol removal. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 38, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.05.005>
- Fortes, C.C.S., Daniel-da-Silva, A.L., Xavier, A.M.R.B., Tavares, A.P.M., 2017. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 117, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.009>
- Foureaux, A.F.S., Reis, E.O., Lebron, Y., Moreira, V., Santos, L.V., Amaral, M.S., Lange, L.C., 2019. Rejection of pharmaceutical compounds from surface water by nanofiltration and reverse osmosis. *Separation and Purification Technology* 212, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.11.018>
- Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., Koivula, A., Mazzei, F., 2010. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 899–908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.018>
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S.E.A.T.M., Ritsema, C.J., 2015. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research* 3, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>
- Ghatak, H.R., 2014. Advanced Oxidation Processes for the Treatment of Biorecalcitrant Organics in Wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44, 1167–1219. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.763581>
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G., 2010. Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 369–385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V.K., Tushara Chaminda, G.G., An, A.K., Kumar, M., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development* 6, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
- Gomes, J., Costa, R., Quinta-Ferreira, R.M., Martins, R.C., 2017. Application of ozonation for pharmaceuticals and personal care products removal from water. *Science of The Total Environment* 586, 265–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.216>

- Gómez-Estaca, J., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., 2015. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.004>
- Gonzalez-Coronel, L.A., Cobas, M., Rostro-Alanis, M. de J., Parra-Saldívar, R., Hernandez-Luna, C., Pazos, M., Sanromán, M.Á., 2017. Immobilization of laccase of *Pycnoporus sanguineus* CS43. *New Biotechnology* 39, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.003>
- Gonzalez-Rivas, N., Reyes-Pérez, H., Barrera-Díaz, C.E., 2019. Recent Advances in Water and Wastewater Electrodisinfection. *ChemElectroChem* 6, 1978–1983. <https://doi.org/10.1002/celec.201801746>
- Goswami, L., Vinoth Kumar, R., Borah, S.N., Arul Manikandan, N., Pakshirajan, K., Pugazhenth, G., 2018. Membrane bioreactor and integrated membrane bioreactor systems for micropollutant removal from wastewater: A review. *Journal of Water Process Engineering* 26, 314–328. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.10.024>
- Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., Roche, N., Doumenq, P., 2017. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Research* 111, 297–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>
- Guilloso, R., Le Roux, J., Brosillon, S., Mailler, R., Vulliet, E., Morlay, C., Nauleau, F., Rocher, V., Gaspéri, J., 2020. Benefits of ozonation before activated carbon adsorption for the removal of organic micropollutants from wastewater effluents. *Chemosphere* 245, 125530. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125530>
- Harkins, W.D., Browns, F.E., 1918. The determination of surface tension (free surface energy) and the weight of falling drops : the surface tension of water and benzene by the capillary height method. *Journal of American Chemical Society* 499–524.
- Harris, J.M., 1992. Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications.
- Hata, T., Shintate, H., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T., 2010. Elimination of carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Journal of Hazardous Materials* 181, 1175–1178. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.103>
- Hommel, G., Gasser, C.A., Howald, C.B.C., Goers, R., Schlosser, D., Shahgaldian, P., Corvini, P.F.-X., 2012. Production of a robust nanobiocatalyst for municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology* 115, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.129>
- Hopkins, Z.R., Blaney, L., 2014. A novel approach to modeling the reaction kinetics of tetracycline antibiotics with aqueous ozone. *Science of The Total Environment* 468–469, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.032>

- Hou, J., Dong, G., Ye, Y., Chen, V., 2014. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. *Journal of Membrane Science* 452, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.10.019>
- Huang, W., Song, H., Xie, H., Yin, Y., Yuan, E., Xiao, H., Wu, J., Zhou, G., 2013. Impacts of Dissolved Organic Matter on the Removal of 17 β -Estradiol Using Horseradish Peroxidase. *Water Air Soil Pollut* 224, 1359. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1359-2>
- Iakovides, I.C., Michael-Kordatou, I., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Fernandes, T., Pereira, M.F.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M., Silva, A.M.T., Fatta-Kassinos, D., 2019. Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant *Escherichia coli* and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. *Water Research* 159, 333–347. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.025>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2017. Some organophosphate insecticides and herbicides.
- Javid, A., Mesdaghinia, A., Nasser, S., Mahvi, A.H., Alimohammadi, M., Gharibi, H., 2016. Assessment of tetracycline contamination in surface and groundwater resources proximal to animal farming houses in Tehran, Iran. *J Environ Health Sci Engineer* 14, 4. <https://doi.org/10.1186/s40201-016-0245-z>
- Ji, C., Hou, J., Wang, K., Zhang, Y., Chen, V., 2016. Biocatalytic degradation of carbamazepine with immobilized laccase-mediator membrane hybrid reactor. *Journal of Membrane Science* 502, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.12.043>
- Jin, X., Yu, X., Zhu, G., Zheng, Z., Feng, F., Zhang, Z., 2016. Conditions Optimizing and Application of Laccase-mediator System (LMS) for the Laccase-catalyzed Pesticide Degradation. *Sci Rep* 6, 35787. <https://doi.org/10.1038/srep35787>
- Jizomoto, H., 1985. Phase Separation Induced in Gelatin-Base Coacervation Systems by Addition of Water-Soluble Nonionic Polymers II: Effect of Molecular Weight. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74, 469–472. <https://doi.org/10.1002/jps.2600740420>
- Jönsson, J., Camm, R., Hall, T., 2013. Removal and degradation of glyphosate in water treatment: a review. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua* 62, 395–408. <https://doi.org/10.2166/aqua.2013.080>
- Jung, F., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., 2002. Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters 6.
- Kamaruddin, M.A., Yusoff, M.S., Aziz, H.A., 2014. Preparation and Characterization of Alginate Beads by Drop Weight. *International Journal of Technology* 5, 121. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v5i2.409>
- Katchalski-Katzir, E., Kraemer, D.M., 2000. Eupergitw C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential 20.
- Khalil, S.A.H., Nixon, J.R., Carless, J.E., 1968. Role of pH in the coacervation of the systems: Gelatin - water - ethanol and gelatin - water - sodium sulphate*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20, 215–225. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09724.x>

- Khan, M.H., Bae, H., Jung, J.-Y., 2010. Tetracycline degradation by ozonation in the aqueous phase: Proposed degradation intermediates and pathway. *Journal of Hazardous Materials* 181, 659–665.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.063>
- Khanzada, N.K., Farid, M.U., Kharraz, J.A., Choi, J., Tang, C.Y., Nghiem, L.D., Jang, A., An, A.K., 2020. Removal of organic micropollutants using advanced membrane-based water and wastewater treatment: A review. *Journal of Membrane Science* 598, 117672. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117672>
- Kim, Y., Lee, K.-B., Choi, K., 2016. Effect of runoff discharge on the environmental levels of 13 veterinary antibiotics: A case study of Han River and Kyungahn Stream, South Korea. *Marine Pollution Bulletin* 107, 347–354.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.011>
- Klein, E.Y., Van Boeckel, T.P., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., Laxminarayan, R., 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
- Koklukaya, S.Z., Sezer, S., Aksoy, S., Hasirci, N., 2016. Polyacrylamide-based semi-interpenetrating networks for entrapment of laccase and their use in azo dye decolorization: Polyacrylamide-Based Semi-Interpenetrating Networks. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 63, 699–707.
<https://doi.org/10.1002/bab.1417>
- Kong, Y., Li, D., Wang, L., Adhikari, B., 2011. Preparation of gelatin microparticles using water-in-water (w/w) emulsification technique. *Journal of Food Engineering* 103, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.012>
- Krah, D., Ghattas, A.-K., Wick, A., Bröder, K., Ternes, T.A., 2016. Micropollutant degradation via extracted native enzymes from activated sludge. *Water Research* 95, 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.037>
- Kües, U., 2015. Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology* 33, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006>
- Kumar, D., Nagar, S., Bhushan, I., Kumar, L., Parshad, R., Gupta, V.K., 2013. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 87, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.10.002>
- Kümmerer, K., Henninger, A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection* 9, 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x>
- Kurniawati, S., Nicell, J.A., 2007. Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enzyme and Microbial Technology* 41, 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2007.03.003>
- Lema Rodicio, J.M., Teresa Moreira, M., Eibes, G., Lu-Chau, T.A., Lloret, L., Taboada, R., Arca-Ramos, A., Feijoo, G., 2014. Enzymatic Reactors Applied for the Biotransformation of Endocrine Disrupting Chemicals, in: Lambropoulou, D.A., Nolle, L.M.L. (Eds.), *Transformation Products of Emerging Contaminants in the*

- Environment. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, pp. 229–260. <https://doi.org/10.1002/9781118339558.ch07>
- Li, Jian, Ma, J., Jiang, Y., Jiang, T., Wang, Y., Chen, Y., Liu, S., 2016. Immobilizing enzymes in regular-sized gelatin microspheres through a membrane emulsification method. *Journal of Materials Science* 51, 6357–6369. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9932-5>
- Li, Jia, Zhang, Haibo, Chen, Y., Luo, Y., Zhang, Hua, 2016. Sources identification of antibiotic pollution combining land use information and multivariate statistics. *Environ Monit Assess* 188, 430. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5439-4>
- Licona, K.P.M., Geaquinto, L.R. de O., Nicolini, J.V., Figueiredo, N.G., Chiapetta, S.C., Habert, A.C., Yokoyama, L., 2018. Assessing potential of nanofiltration and reverse osmosis for removal of toxic pharmaceuticals from water. *Journal of Water Process Engineering* 25, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.08.002>
- Lin, J., Pan, D., Sun, Y., Ou, C., Wang, Y., Cao, J., 2019. The modification of gelatin films: Based on various cross-linking mechanism of glutaraldehyde at acidic and alkaline conditions. *Food Sci Nutr* 7, 4140–4146. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1282>
- Ling, A.L., Pace, N.R., Hernandez, M.T., LaPara, T.M., 2013. Tetracycline Resistance and Class 1 Integron Genes Associated with Indoor and Outdoor Aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4046–4052. <https://doi.org/10.1021/es400238g>
- Lloret, L., Eibes, G., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M., 2012a. Degradation of estrogens by laccase from *Myceliophthora thermophila* in fed-batch and enzymatic membrane reactors. *Journal of Hazardous Materials* 213–214, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.082>
- Lloret, L., Eibes, G., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M., 2012b. Continuous operation of a fluidized bed reactor for the removal of estrogens by immobilized laccase on Eupergit supports. *Journal of Biotechnology* 162, 404–406. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.007>
- Lloret, L., Hollmann, F., Eibes, G., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M., 2012c. Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor. *Biodegradation* 23, 373–386. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9516-7>
- López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2005. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology* 119, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.021>
- Lu, L., Zhao, M., Wang, Y., 2007. Immobilization of Laccase by Alginate–Chitosan Microcapsules and its Use in Dye Decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9205-6>
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment* 473–474, 619–641.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- Luo, Y., Xu, L., Rysz, M., Wang, Y., Zhang, H., Alvarez, P.J.J., 2011. Occurrence and Transport of Tetracycline, Sulfonamide, Quinolone, and Macrolide Antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1827–1833. <https://doi.org/10.1021/es104009s>
- Lvov, Y., Aerov, A., Fakhrullin, R., 2014. Clay nanotube encapsulation for functional biocomposites. *Advances in Colloid and Interface Science* 207, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.006>
- Ma, H.-F., Meng, G., Cui, B.-K., Si, J., Dai, Y.-C., 2018. Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: Laccase immobilization and characterization. *Chemical Engineering Research and Design* 132, 664–676. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.02.008>
- Madhavi, V., Lele, S.S., 2009. LACCASE: PROPERTIES AND APPLICATIONS 24.
- Manaia, C.M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovides, I.C., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., 2018. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International* 115, 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044>
- Manavalan, T., Manavalan, A., Heese, K., 2015. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Curr Microbiol* 70, 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0743-0>
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765–772. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.040>
- Mariod, A.A., Adam, H.F., 2013. REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS. *Acta Sci.Pol.* 12(2), 135–147.
- Martinez, A., Al-Ahmad, A.J., 2019. Effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid on an isogenic model of the human blood-brain barrier. *Toxicology Letters* 304, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.013>
- Martínez-Huitle, C.A., Ferro, S., 2006. Electrochemical oxidation of organic pollutants for the wastewater treatment: direct and indirect processes. *Chem. Soc. Rev.* 35, 1324–1340. <https://doi.org/10.1039/B517632H>
- Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., Homolka, L., 2016. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere* 149, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.022>
- Martucci, J.F., Accareddu, A.E.M., Ruseckaite, R.A., 2012. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde. *Journal of Materials Science* 47, 3282–3292. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-6167-3>
- Maruyama, T., Komatsu, C., Michizoe, J., Ichinose, H., Goto, M., 2006. Laccase-Mediated Oxidative Degradation of the Herbicide Dymron. *Biotechnol. Prog.* 22, 426–430. <https://doi.org/10.1021/bp050251h>

- Mashhadi, N., Taylor, K.E., Jimenez, N., Varghese, S.T., Levi, Y., Lonergan, C., Lebeau, E., Lamé, M., Lard, E., Biswas, N., 2019. Removal of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products from Wastewater using Soybean Peroxidase. *Environmental Management* 63, 408–415. <https://doi.org/10.1007/s00267-018-01132-9>
- Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2005. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.020>
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Matsuda, S., Iwata, H., Se, N., Ikada, Y., 1998. Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde 45, 20–27.
- Mattei, C., Wortham, H., Quivet, E., 2018. Heterogeneous atmospheric degradation of pesticides by ozone: Influence of relative humidity and particle type. *Science of The Total Environment* 625, 1544–1553. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.049>
- Mazlan, S.Z., Hanifah, S.A., 2017. Effects of Temperature and pH on Immobilized Laccase Activity in Conjugated Methacrylate-Acrylate Microspheres. *International Journal of Polymer Science* 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/5657271>
- McKeown, A.E., Bugyi, G. (Eds.), 2016. Impact of Water Pollution on Human Health and Environmental Sustainability; Practice, Progress, and Proficiency in Sustainability. IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-9559-7>
- Medalie, L., Baker, N.T., Shoda, M.E., Stone, W.W., Meyer, M.T., Stets, E.G., Wilson, M., 2020. Influence of land use and region on glyphosate and aminomethylphosphonic acid in streams in the USA. *Science of The Total Environment* 707, 136008. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136008>
- Meftaul, I.Md., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., Asaduzzaman, M., Parven, A., Megharaj, M., 2020. Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture? *Environmental Pollution* 263, 114372. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114372>
- Mesnage, R., Bernay, B., Séralini, G.-E., 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking 37, 12.
- Millqvist-Fureby, A., 2014. Aqueous Two-Phase Systems for Microencapsulation in Food Applications, in: *Microencapsulation in the Food Industry*. Elsevier, pp. 157–169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404568-2.00015-7>

- Mir-Tutusaus, J.A., Baccar, R., Caminal, G., Sarrà, M., 2018. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Research* 138, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056>
- Mogharabi, M., Nassiri-Koopaei, N., Bozorgi-Koushalshahi, M., Nafissi-Varcheh, N., Bagherzadeh, G., Faramarzi, M.A., 2012. Immobilization of Laccase in Alginate-Gelatin Mixed Gel and Decolorization of Synthetic Dyes. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/823830>
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A., 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29, 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Monsan, P., Puzo, G., Mazarguil, H., 1975. Etude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldehyde-protéines. *Biochimie* 57, 1281–1292.
- Morsi, R., Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Ashraf, S.S., 2020. Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. *Science of The Total Environment* 714, 136572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136572>
- Na, S.-Y., Lee, Y., 2017. Elimination of trace organic contaminants during enhanced wastewater treatment with horseradish peroxidase/hydrogen peroxide (HRP/H₂O₂) catalytic process. *Catalysis Today* 282, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.03.049>
- Naghdi, M., Taheran, M., Brar, S.K., Kermanshahi-pour, A., Verma, M., Surampalli, R.Y., 2018. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. *Environmental Pollution* 234, 190–213. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.060>
- Narayanan, P.M., Murugan, S., Eva, A.S., Devina, S.U., Kalidass, S., 2015. Application of Immobilized Laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 on Decolourization of Synthetic Dyes. *Research J. of Microbiology* 10, 421–432. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.421.432>
- Nedelkoska, T.V., Low, G.K.-C., 2004. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta* 511, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.027>
- Nguyen, A.H., McKinney, J., Miller, T., Bongiorno, T., McDevitt, T.C., 2015. Gelatin methacrylate microspheres for controlled growth factor release. *Acta Biomaterialia* 13, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.11.028>
- Nguyen, L.N., Hai, F.I., Dosseto, A., Richardson, C., Price, W.E., Nghiem, L.D., 2016a. Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by granular activated carbon-bound laccase in a packed-bed enzyme reactor. *Bioresource Technology* 210, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.014>
- Nguyen, L.N., Hai, F.I., Price, W.E., Kang, J., Leusch, F.D.L., Roddick, F., van de Merwe, J.P., Magram, S.F., Nghiem, L.D., 2015. Degradation of a broad spectrum of trace organic contaminants by an enzymatic membrane reactor: Complementary role

- of membrane retention and enzymatic degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 99, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.004>
- Nguyen, L.N., Hai, F.I., Price, W.E., Leusch, F.D.L., Roddick, F., McAdam, E.J., Magram, S.F., Nghiem, L.D., 2014. Continuous biotransformation of bisphenol A and diclofenac by laccase in an enzymatic membrane reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation* 95, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.017>
- Nguyen, L.N., Nghiem, L.D., Pramanik, B.K., Oh, S., 2019. Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac on activated sludge microbial communities. *Science of The Total Environment* 657, 739–745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.094>
- Nguyen, L.N., van de Merwe, J.P., Hai, F.I., Leusch, F.D.L., Kang, J., Price, W.E., Roddick, F., Magram, S.F., Nghiem, L.D., 2016b. Laccase–syringaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor: Removal efficiency and effluent toxicity. *Bioresource Technology* 200, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.054>
- Nguyen, T.-T., Bui, X.-T., Luu, V.-P., Nguyen, P.-D., Guo, W., Ngo, H.-H., 2017. Removal of antibiotics in sponge membrane bioreactors treating hospital wastewater: Comparison between hollow fiber and flat sheet membrane systems. *Bioresource Technology* 240, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.118>
- Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Bianco, M., Mita, L., Bencivenga, U., Mita, D.G., Diano, N., 2011. Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation* 22, 673–683. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9440-2>
- Niladevi, K.N., Prema, P., 2008. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1215–1222. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9598-x>
- Norman, J.E., Mahler, B.J., Nowell, L.H., Van Metre, P.C., Sandstrom, M.W., Corbin, M.A., Qian, Y., Pankow, J.F., Luo, W., Fitzgerald, N.B., Asher, W.E., McWhirter, K.J., 2020. Daily stream samples reveal highly complex pesticide occurrence and potential toxicity to aquatic life. *Science of The Total Environment* 715, 136795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136795>
- Nosek, K., Styszko, K., Golas, J., 2014. Combined method of solid-phase extraction and GC-MS for determination of acidic, neutral, and basic emerging contaminants in wastewater (Poland). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 94, 961–974. <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.900680>
- Nsibande, S.A., Forbes, P.B.C., 2016. Fluorescence detection of pesticides using quantum dot materials – A review. *Analytica Chimica Acta* 945, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.002>
- Ofner, C.M., Bubnis, W.A., 1996. Chemical and swelling evaluations of amino group crosslinking in gelatin and modified gelatin matrices. *Pharmaceutical Research* 13, 1821–1827.

- Okada, E., Allinson, M., Barral, M.P., Clarke, B., Allinson, G., 2020. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) are commonly found in urban streams and wetlands of Melbourne, Australia. *Water Research* 168, 115139. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115139>
- Okada, E., Costa, J.L., Bedmar, F., 2019. Glyphosate Dissipation in Different Soils Under No-Till and Conventional Tillage. *Pedosphere* 29, 773–783. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60430-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60430-2)
- Olajuyigbe, F.M., Adetuyi, O.Y., Fatokun, C.O., 2019. Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. *International Journal of Biological Macromolecules* 125, 856–864. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.106>
- Oppenheimer, J., Stephenson, R., Burbano, A., Liu, L., 2007. Characterizing the Passage of Personal Care Products Through Wastewater Treatment Processes. *Water Environment Research* 79, 2564–2577. <https://doi.org/10.2175/106143007X184573>
- Palmer, M., Hatley, H., 2018. The role of surfactants in wastewater treatment: Impact, removal and future techniques: A critical review. *Water Research* 147, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.039>
- Palomo, J.M., Fuentes, M., Ferna, G., Guisan, J.M., Ferna, R., 2002. General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality. *American Chemical Society* 4, 6.
- Parra Guardado, A.L., Belleville, M.-P., Rostro Alanis, M. de J., Parra Saldivar, R., Sanchez-Marcano, J., 2019. Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. *Process Biochemistry* 78, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.032>
- Perry, Robert.H., Green, D., 1973. Perry's chemical engineer's handbook, 6th ed.
- Piao, M., Zou, D., Ren, X., Gao, S., Qin, C., Piao, Y., 2019. High efficiency biotransformation of bisphenol A in a fluidized bed reactor using stabilized laccase in porous silica. *Enzyme and Microbial Technology* 126, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.03.006>
- Pino-Otín, M.R., Muñiz, S., Val, J., Navarro, E., 2017. Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. *Science of The Total Environment* 595, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.002>
- Pizzul, L., Castillo, M. del P., Stenström, J., 2009. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation* 20, 751–759. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9263-1>
- Poiger, T., Buerge, I.J., Bachli, A., Muller, M.D., Balmer, M.E., 2016. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (2), 1588–1596.
- Polak, J., Jarosz-Wilkolazka, A., 2012. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry* 47, 1295–1307. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.006>

- Poppe, J.K., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C., Ayub, M.A.Z., 2015. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances* 33, 511–525.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.011>
- Putra, E.K., Pranowo, R., Sunarso, J., Indraswati, N., Ismadji, S., 2009. Performance of activated carbon and bentonite for adsorption of amoxicillin from wastewater: Mechanisms, isotherms and kinetics. *Water Research* 43, 2419–2430.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.039>
- Qu, J., 2008. Research progress of novel adsorption processes in water purification: A review. *Journal of Environmental Sciences* 20, 1–13.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60001-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60001-7)
- Rao, M.A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M.C., Gianfreda, L., 2014. Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere* 107, 145–162.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.059>
- Ravier, S., Désert, M., Gille, G., Armengaud, A., Wortham, H., Quivet, E., 2019. Monitoring of Glyphosate, Glufosinate-ammonium, and (Aminomethyl)phosphonic acid in ambient air of Provence-Alpes-Côte-d’Azur Region, France. *Atmospheric Environment* 204, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.02.023>
- Ray, S., 2012. Studies on fluidized bed column reactor for the substrate conversion using immobilized extracellular alkaline lipase of isolated strain of *Serratia* sp (C4). *Journal of Microbiology and biotechnology Research* 2, 538–544.
- Rekik, H., Zraï Jaouadi, N., Bouacem, K., Zenati, B., Kourdali, S., Badis, A., Annane, R., Bouanane-Darenfed, A., Bejar, S., Jaouadi, B., 2019. Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. *International Journal of Biological Macromolecules* 125, 514–525.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.053>
- Richardson, S.D., 2012. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 84, 747–778. <https://doi.org/10.1021/ac202903d>
- Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93, 1268–1287.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059>
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 909–916.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.005>
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., 2009. Oxidation of dissolved organic matter in the effluent of a sewage treatment plant using ozone combined with hydrogen peroxide (O₃/H₂O₂). *Chemical Engineering Journal* 149, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.11.019>

- Rueda-Marquez, J.J., Levchuk, I., Fernández Ibañez, P., Sillanpää, M., 2020. A critical review on application of photocatalysis for toxicity reduction of real wastewaters. *Journal of Cleaner Production* 258, 120694.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120694>
- Sabarwal, A., Kumar, K., Singh, R.P., 2018. Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 63, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- Saitoh, T., Shibata, K., Fujimori, K., Ohtani, Y., 2017. Rapid removal of tetracycline antibiotics from water by coagulation-flotation of sodium dodecyl sulfate and poly(allylamine hydrochloride) in the presence of Al(III) ions. *Separation and Purification Technology* 187, 76–83.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.036>
- Saitúa, H., Giannini, F., Padilla, A.P., 2012. Drinking water obtaining by nanofiltration from waters contaminated with glyphosate formulations: Process evaluation by means of toxicity tests and studies on operating parameters. *Journal of Hazardous Materials* 227–228, 204–210.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.035>
- Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of The Total Environment* 461–462, 302–316.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>
- Selvam, A., Kwok, K., Chen, Y., Cheung, A., Leung, K.S.Y., Wong, J.W.C., 2017. Influence of livestock activities on residue antibiotic levels of rivers in Hong Kong. *Environ Sci Pollut Res* 24, 9058–9066. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6338-5>
- Serna-Galvis, E.A., Silva-Agredo, J., Giraldo-Aguirre, A.L., Flórez-Acosta, O.A., Torres-Palma, R.A., 2016. High frequency ultrasound as a selective advanced oxidation process to remove penicillinic antibiotics and eliminate its antimicrobial activity from water. *Ultrasonics Sonochemistry* 31, 276–283.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.007>
- Serna-Galvis, E.A., Silva-Agredo, J., Giraldo-Aguirre, A.L., Torres-Palma, R.A., 2015. Sonochemical degradation of the pharmaceutical fluoxetine: Effect of parameters, organic and inorganic additives and combination with a biological system. *Science of The Total Environment* 524–525, 354–360.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.053>
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A., 2011. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research* 2011.
- Simón-Herrero, C., Naghdi, M., Taheran, M., Kaur Brar, S., Romero, A., Valverde, J.L., Avalos Ramirez, A., Sánchez-Silva, L., 2019. Immobilized laccase on polyimide aerogels for removal of carbamazepine. *Journal of Hazardous Materials* 376, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.032>

- Sipma, J., Osuna, B., Collado, N., Monclús, H., Ferrero, G., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., 2010. Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. *Desalination* 250, 653–659.
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.06.073>
- Socorro, J., Durand, A., Temime-Roussel, B., Gligorovski, S., Wortham, H., Quivet, E., 2016. The persistence of pesticides in atmospheric particulate phase: An emerging air quality issue. *Sci Rep* 6, 33456. <https://doi.org/10.1038/srep33456>
- Sola-Rabada, A., Sahare, P., Hickman, G.J., Vasquez, M., Canham, L.T., Perry, C.C., Agarwal, V., 2018. Biogenic porous silica and silicon sourced from Mexican Giant Horsetail (*Equisetum myriochaetum*) and their application as supports for enzyme immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 166, 195–202.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.047>
- Sondhi, S., Kaur, R., Kaur, S., Kaur, P.S., 2018. Immobilization of laccase-ABTS system for the development of a continuous flow packed bed bioreactor for decolorization of textile effluent. *International Journal of Biological Macromolecules* 117, 1093–1100. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.007>
- Songulashvili, G., Jimenéz-Tobón, G.A., Jaspers, C., Penninckx, M.J., 2012. Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants. *Fungal Biology* 116, 883–889.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.05.005>
- Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials* 344, 146–162.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>
- Spina, F., Gea, M., Bicchi, C., Cordero, C., Schilirò, T., Varese, G.C., 2019. Ecofriendly laccases treatment to challenge emerging contaminants issue. *Environmental Pollution* 113579. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113579>
- Spinelli, D., Fatarella, E., Di Michele, A., Pogni, R., 2013. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. *Process Biochemistry* 48, 218–223.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.005>
- Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L., 2007. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Science of The Total Environment* 377, 255–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.095>
- Staroszczyk, H., Pielichowska, J., Sztuka, K., Stangret, J., Kołodziejaska, I., 2012. Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase. *Food Chemistry* 130, 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.047>
- Sun, H., Yang, H., Huang, W., Zhang, S., 2015. Immobilization of laccase in a sponge-like hydrogel for enhanced durability in enzymatic degradation of dye pollutants. *Journal of Colloid and Interface Science* 450, 353–360.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.037>

- Sun, K., Huang, Q., Li, S., 2017. Transformation and toxicity evaluation of tetracycline in humic acid solution by laccase coupled with 1-hydroxybenzotriazole. *Journal of Hazardous Materials* 331, 182–188.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.058>
- Tadda, M.A., Ahsan, A., Shitu, A., ElSergany, M., Arunkumar, T., Jose, B., Razzaque, M.A., Nik, N.N., 2016. A review on activated carbon: process, application and prospects 8.
- Tadkaew, N., Hai, F.I., McDonald, J.A., Khan, S.J., Nghiem, L.D., 2011. Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. *Water Research* 45, 2439–2451. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.023>
- Talebian, A., Kordestani, S.S., Rashidi, A., Dadashian, F., Montazer, M., n.d. The effect of glutaraldehyde on the properties of gelatin films. *Kemija u industriji* 11, 537–541.
- Tate T., 1864. On the magnitude of a drop of liquid formed under different circumstances. *Phil. Mag.* 176.
- Tavares, A.P.M., Silva, C.G., Dražić, G., Silva, A.M.T., Loureiro, J.M., Faria, J.L., 2015. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *Journal of Colloid and Interface Science* 454, 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.054>
- Teerapatsakul, C., Parra, R., Keshavarz, T., Chitradon, L., 2017. Repeated batch for dye degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate. *International Biodeterioration & Biodegradation* 120, 52–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.001>
- Tengroth, C., Gasslander, U., Andersson, F., Jacobsson, S., 2005. Cross-Linking of Gelatin Capsules with Formaldehyde and Other Aldehydes: An FTIR Spectroscopy Study. *Pharmaceutical Development and Technology* 10, 405–412.
<https://doi.org/10.1081/PDT-200065693>
- Thiebault, T., Boussafir, M., Le Milbeau, C., 2017. Occurrence and removal efficiency of pharmaceuticals in an urban wastewater treatment plant: Mass balance, fate and consumption assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 2894–2902. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.039>
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology* 59, 129–136.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>
- Tran, N.H., Chen, H., Reinhard, M., Mao, F., Gin, K.Y.-H., 2016. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. *Water Research* 104, 461–472.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.040>
- Tran, N.H., Gin, K.Y.-H., 2017. Occurrence and removal of pharmaceuticals, hormones, personal care products, and endocrine disrupters in a full-scale water reclamation plant. *Science of The Total Environment* 599–600, 1503–1516.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.097>

- Tran, N.H., Reinhard, M., Gin, K.Y.-H., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research* 133, 182–207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>
- Tran, N.H., Urase, T., Ngo, H.H., Hu, J., Ong, S.L., 2013. Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresource Technology* 146, 721–731. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.083>
- Unuofin, J.O., Okoh, A.I., Nwodo, U.U., 2019. Aptitude of Oxidative Enzymes for Treatment of Wastewater Pollutants: A Laccase Perspective. *Molecules* 24, 2064. <https://doi.org/10.3390/molecules24112064>
- Valavanidis, A., 2018. Glyphosate, the Most Widely Used Herbicide. 41.
- Vandelli, M.A., Rivasi, F., Guerra, P., Forni, F., Arletti, R., 2001. Gelatin microspheres crosslinked with D, L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. *International journal of pharmaceutics* 215, 175–184.
- Varga, B., Somogyi, V., Meiczinger, M., Kováts, N., Domokos, E., 2019. Enzymatic treatment and subsequent toxicity of organic micropollutants using oxidoreductases-A review. *Journal of Cleaner Production* 221, 306–322.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2012a. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment* 430, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012b. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment* 429, 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Vogelsang, C., Grung, M., Jantsch, T.G., Tollefsen, K.E., Liltved, H., 2006. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway. *Water Research* 40, 3559–3570. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.022>
- Voigt, A.M., Zacharias, N., Timm, C., Wasser, F., Sib, E., Skutlarek, D., Parcina, M., Schmithausen, R.M., Schwartz, T., Hembach, N., Tiehm, A., Stange, C., Engelhart, S., Bierbaum, G., Kistemann, T., Exner, M., Faerber, H.A., Schreiber, C., 2020. Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – An evaluation of clinical influences. *Chemosphere* 241, 125032. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125032>
- Wang, Y., Roddick, F.A., Fan, L., 2017. Direct and indirect photolysis of seven micropollutants in secondary effluent from a wastewater lagoon. *Chemosphere* 185, 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.122>

- Wang, Y., Zhang, H., Zhang, J., Lu, C., Huang, Q., Wu, J., Liu, F., 2011. Degradation of tetracycline in aqueous media by ozonation in an internal loop-lift reactor. *Journal of Hazardous Materials* S0304389411005243.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.086>
- Wang, Z., Chen, Q., Zhang, J., Dong, J., Yan, H., Chen, C., Feng, R., 2019. Characterization and source identification of tetracycline antibiotics in the drinking water sources of the lower Yangtze River. *Journal of Environmental Management* 244, 13–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.070>
- Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W., Costanzo, S.D., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment* 407, 2711–2723.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>
- Wee, S.Y., Aris, A.Z., 2017. Endocrine disrupting compounds in drinking water supply system and human health risk implication. *Environment International* 106, 207–233. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.004>
- Wehaidy, H., El-Hennawi, H., Ahmed, S., Abdel-Naby, M., 2018. Comparative study on crude and partially purified laccase from *Polyporus durus* ATCC 26726 in the decolorization of textile dyes and wastewater treatment. *Egypt Pharmaceut J* 17, 94. https://doi.org/10.4103/epj.epj_2_18
- Wen, X., Jia, Y., Li, J., 2009. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* – A white rot fungus. *Chemosphere* 75, 1003–1007.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.052>
- Worley, J., 1992. Capillary radius and surface tensions. *Journal of Chemical Education* 69, 678–680.
- Yan, C., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Nie, M., Shi, H., Gu, L., 2013. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. *Environmental Pollution* 175, 22–29.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.008>
- Yang, S., Hai, F.I., Nghiem, L.D., Price, W.E., Roddick, F., Moreira, M.T., Magram, S.F., 2013. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. *Bioresource Technology* 141, 97–108.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.173>
- Yao, W., Ur Rehman, S.W., Wang, H., Yang, H., Yu, G., Wang, Y., 2018. Pilot-scale evaluation of micropollutant abatements by conventional ozonation, UV/O₃, and an electro-peroxone process. *Water Research* 138, 106–117.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.044>
- Yaohua, G., ping, X., feng, J., keren, S., 2019. Co-immobilization of laccase and ABTS onto novel dual-functionalized cellulose beads for highly improved biodegradation of indole. *Journal of Hazardous Materials* 365, 118–124.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.076>

- Ye, P., Xu, Z.-K., Wu, J., Innocent, C., Seta, P., 2006. Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. *Biomaterials* 27, 4169–4176.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.027>
- You, Y., Sun, X., Cui, Q., Wang, B., Ma, J., 2016. The Retention and Drainage Behavior of Cross-linked Gelatin with Glutaraldehyde in a Papermaking System. *BioResources* 11, 6162–6173. <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.6162-6173>
- Yuan, J., Duan, J., Saint, C.P., Mulcahy, D., 2018. Removal of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from synthetic water by nanofiltration. *Environmental Technology* 39, 1384–1392.
<https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1329356>
- Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T., Pinelo, M., 2018a. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* 8, 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>
- Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M., 2018b. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science* 258, 1–20.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.07.004>
- Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M., 2018c. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science* 258, 1–20.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.07.004>
- Zeng, S., Qin, X., Xia, L., 2017. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. *Biochemical Engineering Journal* 119, 92–100.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.016>
- Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., Chen, S., 2018. Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 5033–5043. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>
- Zhang, C., You, S., Zhang, J., Qi, W., Su, R., He, Z., 2020. An effective in-situ method for laccase immobilization: Excellent activity, effective antibiotic removal rate and low potential ecological risk for degradation products. *Bioresource Technology* 308, 123271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123271>
- Zhang, H., Xun, E., Wang, J., Chen, G., Cheng, T., Wang, Z., Ji, T., Wang, L., 2012. Immobilization of Laccase for Oxidative Coupling of Trans-Resveratrol and Its Derivatives. *IJMS* 13, 5998–6008. <https://doi.org/10.3390/ijms13055998>
- Zhang, J., Liu, X., Xu, Z., Chen, H., Yang, Y., 2008. Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61, 351–356.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.015>
- Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage, T., van Pée, K.-H., 2007. Immobilization of *Trametes versicolor* Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres. *Chemistry of Materials* 19, 6408–6413. <https://doi.org/10.1021/cm071265g>
- Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L., 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden.

- Science of The Total Environment 407, 2760–2770.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.030>
- Zucca, P., Sanjust, E., 2014. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules* 19, 14139–14194.
<https://doi.org/10.3390/molecules190914139>

Liste des abréviations

\bar{X}_1 :	Moyenne entre le maximum et le minimum des valeurs réelles
[S] :	Concentration en substrat ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Abs :	Absorbance d'un échantillon
Abs _G :	Absorbance d'un échantillon de gélatine non réticulée
Abs _{TNBS} :	Absorbance d'un échantillon témoin sans gélatine
ABTS :	Acide 2,2-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
A _{finale} :	Activité de la solution enzymatique après greffage (U)
A _{immo, exp} :	Activité des enzymes greffées par essai avec l'ABTS (U)
A _{immo, théorique} :	Activité des enzymes greffées théorique (U)
A _{initiale} :	Activité de la solution enzymatique avant greffage (U)
AMPA :	Acide aminométhylphosphonique
A _p :	Aire des particules (en m ²)
APTES :	3-aminopropyltriéthoxysilane
Ar :	Nombre d'Archimède
A _{rinçages} :	Activité enzymatique des solutions de rinçage (U)
ATG :	Analyse thermogravimétrique
ATR :	Réflectance totale atténuée
BRM :	Bioréacteur à membrane
BPA :	Bisphénol A
BPB :	Bisphénol B
BPF :	Bisphénol F
c :	Concentration (mol.L^{-1})
CAS :	Conventional Activated Sludge
CBZ :	Carbamazépine
C _d :	Coefficient de traînée (ou nombre de Newton)

CLEA :	Agrégat d'enzyme réticulé
CLEC :	Cristaux d'enzymes réticulés
COT :	Carbone organique total
CSTEP :	Traitement de station d'épuration conventionnel
D :	Déplacement lors de la compression (en m)
DCP :	Dichlorophénol
DMA :	Analyse mécanique dynamique
DMP :	Diméthoxyphénol
DOM :	Matière organique dissolue
d_p :	Diamètre moyen des particules (en m)
DSC :	Calorimétrie différentielle à balayage
E :	Module de compression (en Pa)
E_0 :	Intensité lumineuse du contrôle lors du test microtox
E1 :	Estrone
E2 :	17-b-estradiol
E3 :	Œstriol
EDC :	Endocrine disrupting compound
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EE2 :	17-a-ethinylestradiol
E_i :	Intensité lumineuse de chaque échantillon lors du test microtox
EP :	Polluant émergent
ESPS :	5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate-synthase
ET :	Transfert d'électron
f :	Facteur correctif
F :	Force lors de compression (en N)
F/M :	Ratio food/microorganism
FMOC-Cl :	Chlorure de fluorénylméthoxycarbone
FTIR :	Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier
g :	Constante gravitationnelle (en $N.m^2.kg^{-2}$)

GAC :	Charbon actif granulaire
GTA :	Glutaraldéhyde
H ₀ :	Hauteur du lit fixe (en m)
HAT :	Transfert d'atome d'hydrogène
HBT :	1-hydroxybenzotriazole
H _{mf} :	Hauteur du lit au minimum de fluidisation (en m)
HRT :	Temps de rétention hydraulique
I :	Effet d'inhibition
IARC :	Centre international de recherche sur le cancer
IO :	Oxydation ionique
K _{LF} :	Coefficient de rétrécissement
K _m :	Constante de Michaelis (μmol.L ⁻¹)
K _{ow} :	Coefficient de partage octanol/eau
K _{SF} :	Coefficient de perte liquide
L :	Longueur du gel (en m)
l :	Longueur de la cuve spectrophotométrique (en cm)
L ₀ :	Longueur initiale du gel (en m)
LCMS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LCMS-MS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LOD :	Limite de détection
LOQ :	Limite de quantification
M _c :	Masse de la couche (en kg)
MF :	Microfiltration
M _w :	Masse moléculaire (en kDa)
NF :	Nanofiltration
NHE :	Electrode normale à l'hydrogène
OI :	Osmose inverse
PA :	Polyamide
PAC :	Charbon actif sous forme de poudre

PAN :	Polyacrylonitrile
PCA :	Acide p-coumarique
PCP :	Personal care product
PEG :	Polyéthylène glycol
PESU :	Polyethersulfone
PNEC :	Predicted no effect concentration
POA :	Procédé d'oxydation avancé
POEA :	Polyoxyéthylène amine
PP :	Produit pharmaceutique
PP-PA :	Polyamide à base de piperazine
PVA :	Alcool polyvinylique
PVDF :	Polivinyldène fluoride
r :	Rayon de l'embout (en m)
RAC :	Réacteur agité continu
REM :	Réacteur enzymatique à membrane
Re _p :	Nombre de Reynolds particulaire
Re _{p,mf} :	Nombre de Reynolds particulaire au minimum de fluidisation
Re _{p,t} :	Nombre de Reynolds particulaire au maximum de fluidisation
RQ :	Quotient de risque
S :	Section de la colonne (en m ²)
S ₀ :	Surface initiale du gel (en m ²)
SADP :	Système aqueux à deux phases
S _c :	Surface spécifique de la couche (en m ² .m ⁻³)
SMX :	Sulfaméthoxazole
S _p :	Surface spécifique des particules (en m ² .m ⁻³)
SRT :	Temps de rétention des matières solides
STEP :	Station d'épuration des eaux usées
SW :	Swelling ratio (Taux de gonflement)
SYR :	Syringaldéhyde

TC :	Tétracycline
TCBPA :	Tétrachlorobisphénol A
T _d :	Température de dénaturation de la triple hélice (en °C)
TEMPO :	2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy
TFC :	Thin film composite
T _g :	Température de transition vitreuse (en °C)
TNBS :	Acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique
TT :	Traitement tertiaire
T _{vL} :	Trametes Versicolor
U ₀ :	Vitesse superficielle du fluide, ou vitesse en fût vide (en m.s ⁻¹)
U _{0,mf} :	Vitesse superficielle du fluide au minimum de fluidisation (en m.s ⁻¹)
UF :	Ultrafiltration
U _{0,t} :	Vitesse superficielle du fluide terminale (en m.s ⁻¹)
v ₀ :	Vitesse initiale de la réaction (μmol.L ⁻¹)
VA :	Acide violurique
VAN :	Vanilline
V _c :	Volume de la couche (en m ³)
v _{max} :	Vitesse maximale de la réaction (μmol.min ⁻¹)
V _p :	Volume des particules (en m ³)
w/o :	émulsion eau dans huile
w/w :	émulsion eau dans eau
X ₁ :	Concentration en glutaraldéhyde (en % v/v)
X ₂ :	Temps de réticulation (en h)
X ₃ :	Concentration en laccase (en U)
X ₄ :	Temps de greffage (en h)
x _i :	Valeur du facteur donné par la matrice
X _i :	Valeur du facteur réel
ε ₀ :	Porosité du lit fixe
ε _b :	Déformation à la rupture

ϵ_d :	Déformation lors de la compression
ϵ_{ext} :	Coefficient d'extinction molaire ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
ϵ_{mf} :	Porosité du lit au minimum de fluidisation
$\eta_{immobilisation}$:	Rendement d'immobilisation
μ :	Viscosité du fluide (en Pa.s)
ρ :	Masse volumique du fluide (en kg.m^{-3})
ρ_A :	Masse volumique apparente de la couche (en kg.m^{-3})
ρ_S :	Masse volumique de la couche (en kg.m^{-3})
σ :	Contrainte de compression (en N.m^{-2})
σ_b :	Contrainte à la rupture (en N.m^{-2})
Υ :	Tension de surface (en N.m^{-1})
Φ :	Diamètre interne de la colonne (en cm)
ΔE° :	Potentiel d'oxydoréduction standard en Volt
ΔH :	Enthalpie de dénaturation (en J.g^{-1})
ΔP :	Perte de charge (en Pa)
ΔX_i :	Différence entre le maximum et le minimum des valeurs réelles du plan d'expérience

Contributions scientifiques

❖ Publications scientifiques :

Harguindeguy, M., Antonelli, C., Belleville, M.-P., Sanchez-Marcano, J., Pochat-Bohatier, C., 2020. Gelatin supports with immobilized laccase as sustainable biocatalysts for water treatment. *J Appl Polym Sci* 49669.

DOI : <https://doi.org/10.1002/app.49669>

Harguindeguy M., Sanchez-Marcano, J., Pochat-Bohatier, C., Belleville, M-P., Immobilization of *Trametes Versicolor* laccase on gelatin beads : application in tetracycline degradation inside a fluidized bed reactor. ***En préparation***

❖ Communications par posters :

International meeting on Material/Bioproduct interaction (MATBIM) : Harguindeguy, M., Antonelli, C., Belleville, M-P., Sanchez-Marcano, J., **Pochat-Bohatier, C.**, Preparation and characterization of bio-based enzyme immobilization supports made by combining dripping process and chemical cross-linking. 8-10 mai 2019, Milan, Italie.

International Water Association - Membrane Technology Conference & exhibition for Water and Wastewater Treatment and reuse (IWA-MTC) :

Harguindeguy, M., Sanchez-Marcano, J., Pochat-Bohatier, C., Belleville, M-P., Enzymatic removal of pollutants in water with new bio-based immobilization supports. 23-27 juin 2019, Toulouse, France.

❖ Communications orales :

XVIIème congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP) : **Harguindeguy, M.**, Pochat-Bohatier C., Sanchez-Marcano, J., Belleville, M-P., Dégradation enzymatique de micropolluants dans l'eau avec des supports d'immobilisation biosourcés. 15-17 octobre 2019, Nantes, France.

Résumé

Ce travail de thèse a pour objectif l'élaboration de supports d'immobilisation d'enzymes bio-sourcés en vue de la dégradation de micropolluants dans l'eau. Des billes de gélatine de diamètre moyen 1,9 mm ont été formées dans ce but par un procédé de goutte à goutte n'employant aucun solvant organique. La réticulation des billes par le glutaraldéhyde permet d'une part de limiter le gonflement de ce polymère dans l'eau et d'améliorer sa tenue mécanique en immersion, et d'autre part de créer des liaisons covalentes entre la gélatine et la laccase. Un plan d'expérience 2⁴ a été réalisé afin d'identifier les paramètres influant sur l'efficacité du greffage.

La dégradation de deux micropolluants par les billes activées a été étudiée en réacteur agité et dans un réacteur à lit fluidisé conçu pour ce projet. La tétracycline s'est montrée sensible à l'oxydation par les laccases greffées à la surface des billes. Divers paramètres ont été étudiés comme le pH de la solution, le débit de recirculation, ou l'addition d'oxygène dans le système. Le glyphosate s'est montré plus récalcitrant à l'action de la laccase seule à cause d'une structure plus complexe. L'ajout d'un médiateur d'oxydoréduction, l'ABTS, a néanmoins permis de faciliter son oxydation. La co-immobilisation du médiateur et du biocatalyseur sur les supports à base de gélatine a été étudiée, afin de limiter l'impact économique et environnemental du projet.

Mots-clés : Supports d'immobilisation, gélatine, laccase, réacteur enzymatique à lit fluidisé, micropolluants, traitement de l'eau.

Abstract

The aim of this thesis is to develop bio-based supports for immobilization of enzymes for micro pollutants degradation in water. Gelatin beads of around 1,9 mm diameter were formed by a dripping process using no organic solvent. A crosslinking step with glutaraldehyde was then carried out with two objectives: to improve the mechanical properties of the beads when immersed in water, and to create covalent bonds between gelatin and laccase. The parameters affecting the efficiency of the enzyme grafting were investigated using a full factorial design 2⁴.

The degradation of two micro pollutants by the activated beads was studied in a stirred tank reactor and in a fluidized bed reactor designed for this project. Tetracycline was efficiently oxidized by the grafted enzymes. The influences of pH, recirculation flowrate, and addition of supplementary oxygen on the TC degradation were studied. Glyphosate was not sensitive to laccase oxidation at first due to its complex structure, but the addition of ABTS as an oxidoreduction mediator considerably improved its removal. Mediator and bio-catalyst were co-immobilized on the gelatin beads to reduce the environmental and economical cost of the project.

Key words: Enzyme immobilization supports, gelatin, laccase, enzymatic fluidized bed reactor, micro pollutants, wastewater treatment.