

# Université de Limoges

## Faculté des Sciences et Techniques

*Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles*

*Ecole Doctorale Gay Lussac*

THESE [74-2010]

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Chimie Appliquée – Chimie des Substances Naturelles

Présentée par

**Cédric ASTIER**

Soutenue confidentiellement le 7 décembre 2010

# **Adsorption des éléments traces métalliques par les écorces forestières, un co-produit de la filière bois. Optimisation des propriétés par modifications induites par voies chimique et biologique.**

*Thèse effectuée sous la direction de M. Vincent Gloaguen et Mme Céline Faugeron*

*Rapporteurs :*

M. Stanley LUTTS, Professeur, Université de Louvain la Neuve

Mme Véronique COMA, Maitre de Conférences - HDR, Université de Bordeaux 1

*Examineurs :*

M. Jean Claude MOLLET, Professeur, Université de Rouen

M. Pierre KRAUSZ, Professeur, Université de Limoges

M. Vincent GLOAGUEN, Professeur, Université de Limoges

Mme Céline FAUGERON, Maitre de Conférences, Université de Limoges

*Invité :*

M. Jean Louis DECOSSAS, Professeur, président de la SAS Pe@rl



## Remerciements

Tout d'abord mes plus sincères remerciements s'adressent au Professeur Pierre Krausz qui m'a permis dans un premier temps d'effectuer des stages de Master 1 puis Master 2 avant de m'accueillir en thèse au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles qu'il dirige. Est-il encore nécessaire de rappeler ses immenses compétences scientifiques qu'il sait si bien faire partager ? Je souhaiterais souligner autant ses qualités d'enseignant, d'acteur comme il se laisse désigner, que ses qualités humaines. C'est un honneur qu'il m'a fait de présider le jury ; je s'assure de ma profonde reconnaissance.

Une attention particulière pour ceux qui tous les jours ont su m'orienter, me soutenir, m'encadrer comme il convient de dire.

Le Professeur Vincent Gloaguen que j'ai eu la chance d'avoir comme enseignant, comme encadrant lors du stage de Master Recherche puis comme directeur de thèse. Outre ses compétences scientifiques, j'ai pu apprécier ses qualités humaines, sa gentillesse, sa bonne humeur et son optimisme sans faille. Ses nombreuses fonctions n'ont jamais perturbé le déroulement de la thèse et sa disponibilité pour les discussions.

Le Docteur Céline Faugeron, codirectrice, a également largement contribué au travail. Souvent réservée, elle s'est largement investie et a su apporter son aide dans les moments les plus difficiles. Son rôle de jeune maman n'a perturbé en rien le bon déroulement de la rédaction ; en organisant des séances de travail chez elle, elle m'a permis de poursuivre dans les meilleures conditions.

À vous deux, pour la confiance, l'appui, les conseils et le temps que vous m'avez consacré, je vous assure de ma profonde reconnaissance et souhaite simplement vous dire « Merci Chefs » !

J'adresse également ma reconnaissance au Professeur Stanley Lutts, de l'Université de Louvain la Neuve ainsi qu'au Docteur HDR Véronique Toma de l'Université de Bordeaux d'avoir accepté d'assister au jury en temps que rapporteurs, au Professeur Jean Claude Mollet de l'Université de Reuen d'avoir accepté d'examiner ce travail et au Professeur Jean Louis Decossas de participer au jury en temps qu'invité.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Vincent Chaleix qui a participé de près aux travaux de modifications d'oligosaccharides ; il s'est investi sans réserve dans cette tâche. Nos nombreuses discussions ont fini par avancer sur ce sujet qui nous a bien causé des galères.

Mon initiation à la caractérisation des sels est largement due à l'implication du Docteur Emmanuel Joussein. En acceptant de participer à ces travaux, ses compétences m'ont permis d'avancer plus vite dans un domaine qui m'était étranger. Qu'il en soit ici remercié.

*Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées au Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université de Nantes par David Repartz. Je vous remercie pour la pertinence de votre travail et la qualité du service rendu.*

*Je tiens à remercier le Professeur Michel Guilleton pour son esprit critique et pour le temps consacré à la rédaction et à la correction de l'article.*

*Je remercie également le docteur Raphaël Decou pour l'initiation à la microscopie, et le temps qu'il a consacré à ce travail.*

*Je remercie le Conseil Régional du Limousin pour le financement de ces trois années de thèse sur le programme du Fond Social Européen, ce qui m'a permis de travailler dans des conditions optimales.*

*Enfin, un grand merci à mes collègues, ceux qui m'ont côtoyé au quotidien. Merci à Loïc (« René ») et Vincent (« Mr. Delpék ») qui travaillent sur un sujet proche et avec qui de nombreuses discussions ont eu lieu, merci à Stéphanie (« Mamy ») pour son aide technique précieuse et pour m'avoir supporté pendant la rédaction ; je remercie également Aline, partie aux Pays Bas, Muriel et Amandine (« Dédé ») qui ont participé à la récolte des « Doodoo ». Merci au Docteur Yves Champavier pour les analyses RMN, merci à Chris (« Mr. Beautiful ») pour son soutien et sa joie de vivre qu'il sait si bien faire partager, merci à Carmen pour l'initiation à la titration automatique, merci au Dr. Robert Granet pour ses immenses connaissances qu'il aime faire partager durant la pause café, merci à Cyril et son accent qui rappelle le soleil, merci aux rescapés du bâtiment de biologie, Gaëlle, Charlotte, Julien, Fred. Je remercie également l'ensemble du personnel du Laboratoire, permanents et étudiants, qui a contribué de près ou de loin aux travaux mais qui en tout cas a entretenu une atmosphère de travail agréable. Merci à vous tous pour ces bons moments passés au labo et en dehors.*

# Sommaire

<b>Sommaire .....</b>	<b>III</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>XI</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>XV</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>XVII</b>
<b>Introduction générale.</b>	
<b>Première partie : Etat de la question.</b>	
<b>Chapitre 1 : L'écorce et le bois, de la structure à la composition.</b>	
<b>1 Structure.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Aspects morphologiques. ....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Approche macroscopique. ....	5
1.1.2 Approche microscopique.....	6
<b>1.2 La paroi végétale.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 La paroi primaire.....	9
1.2.2 La paroi secondaire.....	10
<b>2 Composition chimique.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Les polysaccharides.....</b>	<b>11</b>
2.1.1 La cellulose.....	11
2.1.2 Les hémicelluloses. ....	12
2.1.3 Les pectines.....	13
2.1.3.1 Les homogalacturonanes. ....	13
2.1.3.2 Les rhamnogalacturonanes. ....	14
2.1.3.3 Les chaînes latérales : arabinanes, galactanes, arabinogalactanes.....	15
<b>2.2 La lignine. ....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Les composés extractibles. ....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Les tanins. ....	18
2.3.2 Autres composés organiques.....	18

2.3.3	Les composés inorganiques. ....	19
-------	---------------------------------	----

**Chapitre 2 : La biosorption.**

<b>1</b>	<b>Le phénomène de biosorption. ....</b>	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>Les acteurs de la biosorption. ....</b>	<b>21</b>
1.1.1	Les biosorbants. ....	21
1.1.2	Les polluants. ....	23
1.1.2.1	Le plomb. ....	23
1.1.2.2	Le cadmium. ....	24
<b>1.2</b>	<b>Les causes de la biosorption. ....</b>	<b>24</b>
<b>1.3</b>	<b>Les paramètres influençant la biosorption. ....</b>	<b>25</b>
1.3.1	Les paramètres intrinsèques. ....	25
1.3.2	Les paramètres extrinsèques. ....	26
<b>2</b>	<b>Modélisation mathématique. ....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Représentation de la biosorption. ....</b>	<b>27</b>
2.1.1	L'isotherme d'adsorption. ....	27
2.1.2	Le modèle de Langmuir. ....	28
2.1.3	Autres modèles mathématiques. ....	30
<b>2.2</b>	<b>Aspects thermodynamiques. ....</b>	<b>30</b>

**Chapitre 3 : La phytoremédiation.**

<b>1</b>	<b>Les techniques de réhabilitation des sols. ....</b>	<b>34</b>
<b>1.1</b>	<b>La phytoremédiation. ....</b>	<b>34</b>
1.1.1	La phytoextraction. ....	34
1.1.2	Autres techniques de phytoremédiation. ....	35
<b>1.2</b>	<b>Approche chimique et physique. ....</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>Le cadmium et les plantes. ....</b>	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>L'absorption des ions par les plantes. ....</b>	<b>37</b>
<b>2.2</b>	<b>Cas de l'accumulation du Cadmium. ....</b>	<b>38</b>
2.2.1	Toxicité. ....	38
2.2.2	Les mécanismes de tolérance. ....	39
2.2.3	Plantes étudiées. ....	42

## **Chapitre 4 : Stratégie de modification des biosorbants induite par voie biologique et chimique.**

<b>1</b>	<b>Modification chimiques des biosorbants. ....</b>	<b>43</b>
1.1	Modification de polymères purifiés. ....	43
1.2	Modification des biosorbants. ....	45
1.3	Intérêt des modifications. ....	47
<b>2</b>	<b>Modifications biochimiques des parois cellulaires de plantes soumises à un stress. ....</b>	<b>49</b>

### **Deuxième partie : Résultats.**

#### **Chapitre 1 : Propriétés biosorbantes des écorces brutes.**

<b>1</b>	<b>Adsorption du plomb et du cadmium par les écorces brutes. ....</b>	<b>51</b>
1.1	Conditions expérimentales optimales pour la biosorption du plomb et du cadmium. ....	51
1.1.1	Temps de contact avec la solution métallique. ....	51
1.1.2	pH de la solution métallique et nature du contre ion. ....	52
1.2	Les isothermes d'adsorption : une méthode de choix pour l'étude de la biosorption. ....	53
1.2.1	Aspect général. ....	53
1.2.2	Résultats. ....	55
<b>2</b>	<b>Inertion des écorces. ....</b>	<b>61</b>
2.1.1	Procédés d'inertion des écorces. ....	61
2.1.1.1	Bilan massique. ....	61
2.1.1.2	Influence du procédé d'inertion sur le relargage de substances phénoliques. ....	62
2.1.1.3	Caractérisation des écorces obtenues par spectrométrie IRTF. ....	63
2.1.2	Influence des procédés d'inertion sur les capacités d'adsorption. ....	64
<b>3</b>	<b>Bilan. ....</b>	<b>66</b>

#### **Chapitre 2 : Obtention et caractérisation de matériaux biosorbants d'origine forestière.**

<b>1</b>	<b>Modification chimique des écorces. ....</b>	<b>67</b>
1.1	Voie de l'oxydation. ....	67
1.1.1	Schéma général de synthèse. ....	67
1.1.2	Rendements de réaction. ....	68
1.1.2.1	Rendements massiques d'oxydation. ....	69
1.1.2.2	Caractérisation chimique des matériaux obtenus. ....	69

1.1.2.2.1	Evaluation du nombre de fonctions aldéhyde formées. ....	69
1.1.2.2.2	Dosage de l'acidité selon la méthode de Boehm. ....	70
1.1.3	Caractérisation des écorces oxydées par spectroscopie infrarouge. ....	72
<b>1.2</b>	<b>Voie de l'amination réductrice. ....</b>	<b>74</b>
1.2.1	Stratégie de synthèse. ....	74
1.2.2	Préparation d'oligosaccharides aminés. ....	75
1.2.2.1	Stratégie de synthèse. ....	75
1.2.2.2	Obtention d'oligosaccharides. ....	75
1.2.2.2.1	Cas des pectines. ....	75
1.2.2.2.2	Cas des carraghénanes. ....	79
1.2.2.3	Fonctionnalisation de l'extrémité réductrice des oligosaccharides par amination réductrice. ....	80
1.2.2.3.1	Cas des oligogalacturonates. ....	80
1.2.2.3.2	Cas des oligocarraghénanes. ....	82
1.2.3	Fonctionnalisation des écorces. ....	83
1.2.3.1	Rendement massique. ....	83
1.2.3.2	Propriétés acido-basiques des écorces fonctionnalisées. ....	84
1.2.4	Caractérisation par spectroscopie infrarouge. ....	84
<b>2</b>	<b><i>Conséquences d'un stress métallique sur la composition de la fraction pariétale des écorces et du bois de sapin de Douglas. ....</i></b>	<b>85</b>
<b>2.1</b>	<b>Caractérisation des substrats de culture. ....</b>	<b>87</b>
2.1.1	Caractéristiques générales. ....	87
2.1.2	Répartition du cadmium dans les sols. ....	88
2.1.2.1	Schéma général de quantification. ....	88
2.1.2.2	Teneurs en Cd dans les fractions extraites des sols de culture. ....	88
2.1.2.3	Phytodisponibilité du Cd au cours du temps. ....	89
<b>2.2</b>	<b>Adaptation du sapin de Douglas au stress métallique. ....</b>	<b>90</b>
2.2.1	Effet du cadmium sur la croissance des plants de sapin de Douglas. ....	91
2.2.2	Distribution du cadmium dans les arbres. ....	93
2.2.2.1	Par compartiment. ....	94
2.2.2.2	Par année de croissance. ....	95
<b>2.3</b>	<b>Caractérisation des composants pariétaux du bois et des écorces. ....</b>	<b>96</b>
2.3.1	Protocole général d'extraction. ....	96
2.3.2	Analyses des constituants pariétaux des écorces. ....	97
2.3.2.1	Fractionnement. ....	97
2.3.2.2	Composition monosaccharidique des constituants pariétaux extraits d'écorces. ....	98
2.3.2.3	Degré de méthylation des pectines extraites d'écorces de sapin de Douglas. ....	100

2.3.3	Analyses des constituants pariétaux du bois. ....	101
2.3.3.1	Fractionnement. ....	101
2.3.3.2	Composition monosaccharidique des composés pariétaux extraits du bois. ....	102
<b>3</b>	<b><i>Bilan.</i></b> .....	<b>103</b>
 <b><i>Chapitre 3 : Evaluation des capacités d'adsorption des matériaux biosorbants d'origine forestière.</i></b>		
<b>1</b>	<b><i>Evaluation des capacités d'adsorption des écorces oxydées.</i></b> .....	<b>105</b>
<b>1.1</b>	<b>Détermination des paramètres caractéristiques de l'adsorption des écorces oxydées par l'obtention d'isotherme de Langmuir.</b> .....	<b>105</b>
1.1.1	Essai d'adsorption. ....	105
1.1.1.1	Effet du degré d'oxydation. ....	105
1.1.1.2	Effet de la stratégie d'oxydation. ....	106
1.1.2	Récapitulatif. ....	107
<b>1.2</b>	<b>Mise en évidence des complexes « ion métallique-carboxylate »</b> .....	<b>108</b>
<b>2</b>	<b><i>Evaluation des capacités d'adsorption des écorces greffées par l'obtention d'isotherme d'adsorption.</i></b> .....	<b>110</b>
<b>2.1</b>	<b>Sur les écorces greffées par des molécules carboxylées.</b> .....	<b>110</b>
<b>2.2</b>	<b>Comparaison des capacités de rétention des écorces greffées par des carboxylates et par des sulfates.</b> .....	<b>111</b>
<b>3</b>	<b><i>Evaluation des capacités d'adsorption du bois et des écorces d'arbres exposés à une contamination métallique.</i></b> .....	<b>113</b>
<b>3.1</b>	<b>Variabilité des propriétés d'adsorption en fonction de l'arbre.</b> .....	<b>113</b>
<b>3.2</b>	<b>Adsorption du plomb et du cadmium sur les écorces d'arbres exposés à une contamination métallique.</b> .....	<b>114</b>
<b>3.3</b>	<b>Adsorption du plomb et du cadmium sur le bois.</b> .....	<b>115</b>
<b>3.4</b>	<b>Synthèse.</b> .....	<b>115</b>
<b>4</b>	<b><i>Bilan.</i></b> .....	<b>116</b>

***Troisième partie : Discussions.***

<b>1</b>	<b><i>Le sapin de Douglas absorbe le cadmium.</i></b> .....	<b>117</b>
----------	---	------------

1.1	Phytoextraction du cadmium par le sapin de Douglas. ....	117
1.2	Adaptation du sapin de Douglas à la contamination par les ETM. ....	119
<b>2</b>	<b><i>Le bois et les écorces de sapin de Douglas adsorbent les cations métalliques. ....</i></b>	<b>121</b>
2.1	Modélisation du phénomène.....	121
2.2	Inertion des écorces. ....	124
<b>3</b>	<b><i>Les propriétés de biosorption du plomb par les écorces peuvent être optimisées. ....</i></b>	<b>125</b>
3.1	Approche chimique.....	125
3.1.1	Optimisation par oxydation directe des écorces. ....	125
3.1.2	Optimisation par greffages covalents d'oligosaccharides. ....	127
3.2	Approche biologique.....	131
 <b><i>Conclusion et perspectives.</i></b>		
 <b><i>Quatrième partie : partie expérimentale.</i></b>		
<b>1</b>	<b><i>Matériel biologique et réactifs. ....</i></b>	<b>139</b>
1.1	Matériel biologique.....	139
1.1.1	Origine et prétraitement des écorces de scierie.....	139
1.1.2	Origine et culture des jeunes plants de sapin de Douglas. ....	139
1.2	Réactifs et solvants utilisés.....	139
<b>2</b>	<b><i>Modification chimique des écorces. ....</i></b>	<b>141</b>
2.1	Traitements chimiques des écorces. ....	141
2.1.1	Traitement des écorces par l'acide sulfurique : obtention des écorces-H <sup>+</sup> . ....	141
2.1.2	Oxydation dans les conditions de Fenton : obtention des écorces-Fenton.....	141
2.1.3	Stabilisation par le NoTox <sup>®</sup> : obtention des écorces-NoTox.....	142
2.2	Greffage chimique de molécules anioniques sur les écorces. ....	143
2.2.1	Préparations d'oligosaccharides modifiés. ....	143
2.2.1.1	Obtention d'oligogalacturonates par hydrolyse des pectines. ....	143
2.2.1.2	Saponification et purification du tétramère d'acide galacturonique. ....	144
2.2.1.3	Obtention d'oligocarraghénanes par hydrolyse acide des iota-carraghénanes.....	145
2.2.1.4	Synthèse du ter-butyl-3-aminopropylcarbamate.....	145
2.2.2	Synthèses des amines greffées. ....	146
2.2.2.1	Par réaction avec l'ammoniaque.....	146
2.2.2.1.1	Méthode générale. ....	146

2.2.2.1.2	Application à la synthèse de l'acide 6-amino-2,3,4,5-tetrahydroxyhexanoïque. ....	146
2.2.2.1.3	Application à la synthèse du tétramère aminé. ....	146
2.2.2.1.4	Application à la synthèse du mélange d'oligogalacturonates aminés. ....	147
2.2.2.2	Par réaction avec le ter-butyl-3-aminopropylcarbamate. ....	147
2.2.2.2.1	Méthode générale. ....	147
2.2.2.2.2	Application à la synthèse du tétramère aminé muni d'un bras espaceur. ....	148
2.2.2.2.3	Application à la synthèse du mélange d'oligogalacturonates aminés munis d'un bras espaceur. ....	149
2.2.2.2.4	Application à la synthèse du mélange d'oligocarraghénanes aminés munis d'un bras espaceur. ....	150
2.2.3	Synthèse des écorces greffées. ....	151
2.2.3.1	Obtention des écorces dialdéhydes : oxydation periodique. ....	151
2.2.3.2	Greffage par amination réductrice : méthode générale. ....	151
2.2.3.3	Application à la synthèse d'écorces acide galacturonique. ....	152
2.2.3.4	Application à la synthèse d'écorces oligogalacturonates. ....	152
2.2.3.5	Application à la synthèse d'écorces oligogalacturonates munis d'un bras espaceur. ....	153
2.2.3.6	Application à la synthèse d'écorces oligogalacturonates DP4 munis d'un bras espaceur. ....	153
2.2.3.7	Application à la synthèse d'écorces oligocarraghénanes munis d'un bras espaceur. ....	154
2.2.4	Synthèse des écorces oxydées. ....	154
2.2.4.1	Oxydation directe des écorces brutes – Formation des écorces carboxyliques. ....	154
2.2.4.2	Oxydation des écorces dialdéhydes. ....	155
2.2.4.2.1	Oxydation directe des écorces dialdéhydes - Formation des écorces di-carboxyliques. ....	155
2.2.4.2.2	Formation des écorces tricarboxyliques. ....	155
<b>3</b>	<b>Protocoles et dispositifs expérimentaux. ....</b>	<b>157</b>
<b>3.1</b>	<b>Etude de l'adsorption des cations métalliques par les écorces. ....</b>	<b>157</b>
3.1.1	Dispositif expérimental. ....	157
3.1.2	Adsorption des ions $Pb^{2+}$ et $Cd^{2+}$ . ....	157
3.1.2.1	Adsorption sur les écorces brutes issues de scierie. ....	157
3.1.2.2	Adsorption sur les écorces modifiées ou les écorces et bois issus de la culture sous serre. ....	158
<b>3.2</b>	<b>Etude de la phytoextraction du cadmium par le sapin de Douglas. ....</b>	<b>158</b>
3.2.1	Mise en place et conduite de la culture. ....	158
3.2.2	Caractérisation des sols. ....	158
3.2.2.1	Extraction par l'eau ultra pure. ....	159
3.2.2.2	Extraction par $CaCl_2$ . ....	159
3.2.2.3	Extraction par le mélange RHIZO A. ....	159
3.2.2.4	Extraction par l'EDTA. ....	159
3.2.2.5	Extraction des cations fixés aux oxydes. ....	159

3.2.2.6	Extraction préalable au dosage du cadmium total.....	160
3.2.3	Récolte des sapins de Douglas.....	160
3.2.3.1	Extraction puis dosage du cadmium dans les échantillons végétaux.....	160
3.2.3.2	Extraction séquentielle des constituants pariétaux du bois et des écorces.....	160
3.2.3.2.1	Principe général.....	161
3.2.3.2.2	Extraction par l'éthanol à 80%.....	162
3.2.3.2.3	Extraction des pectines.....	162
3.2.3.2.4	Élimination des lignines.....	162
3.2.3.2.5	Extraction des hémicelluloses.....	163
3.2.3.2.6	Obtention du résidu cellulosique.....	163
<b>4</b>	<b>Caractérisations et méthodes analytiques.....</b>	<b>164</b>
<b>4.1</b>	<b>Méthodes quantitatives.....</b>	<b>164</b>
4.1.1	Dosage direct des fonctions aldéhyde des écorces par la réaction de Cannizzaro.....	164
4.1.2	Caractérisation chimique des écorces par mesure de l'acidité selon la méthode de Boehm.....	165
4.1.3	Dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique.....	166
4.1.3.1	Lors d'adsorption : dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme.....	166
4.1.3.2	Minéralisation des échantillons.....	167
4.1.3.3	Dosage au spectromètre d'absorption atomique à four.....	168
4.1.4	Dosage des hydroxyles phénoliques totaux relargués au cours de l'adsorption par spectrophotométrie.....	168
4.1.5	Analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.....	169
4.1.5.1	Préparation des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés.....	169
4.1.5.1.1	Méthanolyse.....	169
4.1.5.1.2	Triméthysilylation.....	170
4.1.5.2	Analyse des dérivés TMS en CPG.....	170
4.1.6	Évaluation du degré de méthylestérification des pectines S2 et S3.....	171
4.1.7	Évaluation de la capacité d'échange cationique.....	172
<b>4.2</b>	<b>Caractérisations.....</b>	<b>172</b>
4.2.1	Analyse spectrale des écorces par spectrométrie infrarouge.....	172
4.2.2	Analyse par spectrométrie de masse.....	172
4.2.3	Analyse par spectroscopie de RMN.....	172
<b>4.3</b>	<b>Analyse statistique.....</b>	<b>173</b>

**Références bibliographiques.**

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma de coupe transversale de tronc : structure de l'écorce.....	6
Figure 2 : Observation en microscopie photonique d'une coupe transversale de bois de sapin de Douglas âgé de 4 ans. ....	7
Figure 3 : Observation en microscopie photonique d'une coupe transversale d'écorce de sapin de Douglas âgé de 4 ans. ....	8
Figure 4 : Représentation schématique de la paroi. ....	9
Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation des polymères au sein de la paroi primaire. ....	10
Figure 6 : Structure du cellobiose. ....	11
Figure 7 : Liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires dans la cellulose.....	12
Figure 8 : Structure d'un homogalacturonane (a), et d'un rhamnogalacturonane (b) : chaîne principale d'acide $\alpha$ -D-galacturonique avec insertion d' $\alpha$ -L-rhamnose. ....	13
Figure 9 : Schéma de chaînes homogalacturonanes stabilisées par l'intermédiaire d'ions calcium : Structure dite « boîte à œuf » ....	14
Figure 10 : Représentation schématique de la structure primaire des pectines.....	15
Figure 11 : Structures des monolignols.....	16
Figure 12 : Exemple de structure proposée de lignine.....	17
Figure 13 : Exemple de structure de tanins catéchiques (a) et de gallotanins (b).....	18
Figure 14 : Schématisation de la biosorption. ....	25
Figure 15 : Classification des isothermes d'adsorption. ....	28
Figure 16 : Schéma des différentes stratégies de décontamination d'un sol pollué grâce à un arbre.....	33
Figure 17 : Structure d'une phytochélatine, $2 < n < 11$ .....	40
Figure 18 : Rôle des transporteurs de métaux à l'échelle cellulaire.....	41
Figure 19 : Cinétique de rétention du plomb par les écorces de sapin de Douglas. <sup>61</sup> ....	51
Figure 20 : Diagramme de spéciation du plomb (a) et du cadmium (b) en présence de nitrates. .	53
Figure 21 : Isotherme d'adsorption du plomb (a) et du cadmium (b) sur les écorces brutes à différentes températures. ....	55
Figure 22 : Linéarisation de l'adsorption par les écorces brutes selon le modèle mathématique de Langmuir. ....	56

Figure 23 : Représentation graphique de $\ln b = f(1/T)$ , détermination des paramètres thermodynamiques $\Delta H^\circ$ et $\Delta S^\circ$ de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces brutes de sapin de Douglas.....	58
Figure 24 : Représentation graphique des tangentes à l'isotherme d'adsorption.....	59
Figure 25 : Représentation graphique de $\ln K_c = f(1/T)$ lors de l'adsorption du plomb et du cadmium par des écorces brutes de sapin de Douglas.....	60
Figure 26 : Schéma adapté <sup>144</sup> du mécanisme réactionnel de l'oxydation d'un cycle aromatique dans les conditions de Fenton.....	62
Figure 27 : Spectres infrarouge en transmittance.....	64
Figure 28 : Isotherme d'adsorption du plomb par les écorces brutes et inertées. ....	65
Figure 29 : Linéarisation selon le modèle mathématique de Langmuir de l'adsorption du plomb par les écorces brutes et inertées. ....	65
Figure 30 : Stratégie de synthèse des écorces oxydées. ....	68
Figure 31 : Réaction de Cannizzaro intramoléculaire. ....	70
Figure 32 : Spectres infrarouge des écorces brutes et oxydées. ....	72
Figure 33 : Spectres infrarouge des écorces tricarboxyliques.....	73
Figure 34 : Schéma général de synthèse des écorces greffées. ....	74
Figure 35 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse enzymatique d'homogalacturonanes. ....	75
Figure 36 : Spectre de masse MALDI-TOF des oligogalacturonates (8) obtenus par hydrolyse enzymatique. ....	76
Figure 37 : Profil CCM d'élution des différents oligomères d'acide galacturonique.....	76
Figure 38 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du tétramère d'acide galacturonique (9) dans D <sub>2</sub> O. ....	77
Figure 39 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse acide de carraghénanes.....	79
Figure 40 : Spectre de masse ESI du mélange d'oligocarraghénanes (10) obtenu par hydrolyse acide. ....	79
Figure 41 : Schéma général de synthèse d'oligogalacturonates fonctionnalisés.....	80
Figure 42 : Schéma de synthèse du ter-butyl-3-aminopropylcarbamate.....	81
Figure 43 : Schéma général de synthèse d'oligocarraghénanes fonctionnalisés.....	82
Figure 44 : Spectres infrarouge en transmittance.....	85
Figure 45 : Culture de sapins de Douglas mise en place sous serre.....	86
Figure 46 : pH des différents sols après 9 mois de culture des sapins de Douglas.....	87
Figure 47 : Quantité de cadmium extrait lors des différentes extractions.....	89
Figure 48 : Phytodisponibilité du Cd au cours du temps. ....	90
Figure 49 : Schéma de découpe d'un sapin de Douglas.....	91

Figure 50 : Masse sèche des différents compartiments des sapins de Douglas à la récolte. ....	92
Figure 51 : Teneurs moyennes en cadmium des arbres issus des différentes conditions de cultures. ....	93
Figure 52 : Répartition du cadmium dans les différentes parties des plants de sapins de Douglas exprimée en pourcentage de la quantité totale de cadmium dans l'ensemble des plants en fonction de la teneur en Cd du sol. ....	94
Figure 53 : (a) Teneurs moyennes en cadmium dans les parties souterraines et aériennes en fonction de la teneur en Cadmium du sol, (b) Teneurs en Cadmium dans les parties aériennes exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche.....	95
Figure 54 : Teneurs moyennes en cadmium dans les différents compartiments et par année de croissance sur un arbre cultivé sur un sol contaminé à 100 $\mu\text{M}$ de Cd. ....	95
Figure 55 : Analyses des fractions extraites d'écorces d'arbres cultivés sur des sols contaminés par des concentrations croissantes en Cadmium. ....	97
Figure 56 : Compositions monosaccharidiques des fractions polysaccharidiques extraites d'écorces d'arbres exposés à différentes concentrations de cadmium dans le sol. ....	98
Figure 57 : Analyses des fractions extraites du bois d'arbres cultivés sur des sols contaminés par des concentrations croissantes en cadmium. ....	101
Figure 58 : Compositions monosaccharidiques des fractions polysaccharidiques extraites d'écorces d'arbres exposés à différentes concentrations de cadmium dans le sol. ....	102
Figure 59 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces tricarboxyliques (5) (a), carboxyliques (7) (b), dicarboxyliques (6) (c), brutes (d). ....	106
Figure 60 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces tricarboxyliques (4) (a), (5) (b), (2) (c), (3) (d) et les écorces brutes (e). ....	106
Figure 61 : Spectres IR d'écorces oxydées et ayant adsorbé des concentrations croissantes de plomb ; suivi de l'adsorption du plomb. ....	108
Figure 62 : Représentation graphique de l'absorbance à $1580\text{ cm}^{-1}$ en fonction de la quantité de plomb fixé sur les écorces. ....	109
Figure 63 : (a) Isotherme d'adsorption du plomb par les écorces oxydées (5), (b) Absorbance des fonctions carboxylates complexées par le plomb. ....	109
Figure 64 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces greffées (19) (a), (20) (b), (18) (c), (17) (d) et sur les écorces brutes (e).....	111
Figure 65 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces greffées (19 d) (a), (21) (b) et les écorces brutes (c). ....	112

Figure 66 : Isotherme d'adsorption du cadmium sur les écorces des sapins de Douglas cultivés sur un substrat contaminé à 50 $\mu\text{M}$ (a), Linéarisation des isothermes précédentes selon le modèle de Langmuir (b).	113
Figure 67 : Isothermes d'adsorption du plomb (a) et du cadmium (b) sur les écorces issues de sapins de Douglas cultivés sur des sols témoin et contaminés par des solutions croissantes de Cadmium.	114
Figure 68 : Isothermes d'adsorption du plomb (a) et du cadmium (b) sur le bois issu de sapins de Douglas cultivés sur des sols témoin et contaminés par des solutions croissantes de Cadmium.	115
Figure 69 : Schéma réactionnel général de l'amination réductrice.	128
Figure 70 : Synthèse de la résine $\text{NaBH}_3\text{CN}$ .	129
Figure 71 : Observation d'une coupe transversale d'écorces issues des sapins de Douglas cultivés sur sol témoin obtenue par microscopie électronique à balayage.	133
Figure 72 : Schéma de l'extraction séquentielle des constituants pariétaux des poudres végétales.	161
Figure 73 : Puissance appliquée aux échantillons en fonction du temps (minéralisation micro-onde).	167
Figure 74 : Préparation de méthylglycosides selon la méthode proposée par Kamerling <i>et al.</i> <sup>195</sup>	170
Figure 75 : Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides, d'après Kamerling <i>et al.</i> <sup>195</sup>	170
Figure 76 : Schéma réactionnel du dosage du méthanal.	171

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique des écorces et du bois de sapin de Douglas exprimée en pourcentage massique de la masse sèche. ....	11
Tableau 2 : Capacité de rétention du plomb ou du cadmium de quelques biosorbants. ....	22
Tableau 3 : Classification de quelques groupements fonctionnels selon la théorie HSAB. ....	26
Tableau 4 : Exemples de grandeurs thermodynamiques de l'adsorption de cations métalliques sur les écorces.....	31
Tableau 5 : Exemples de quelques facteurs de bioconcentration d'arbres vis-à-vis du Cd. ....	42
Tableau 6 : Exemples de modifications chimiques de quelques familles de polymères en vue d'une utilisation pour adsorption des cations métalliques. ....	44
Tableau 7 : Exemples de modifications chimiques de quelques biosorbants et leurs capacités de rétention du plomb et/ou du cadmium. ....	45
Tableau 8 : Exemples de capacités maximales d'adsorption du plomb et du cadmium par des résines commerciales.....	47
Tableau 9 : Exemples de coûts de récupération de plomb et cadmium par différentes techniques d'extraction. ....	48
Tableau 10 : Influence du pH sur la quantité maximale de plomb et de cadmium adsorbée par les écorces brutes de sapin de Douglas. ....	52
Tableau 11 : Influence de la température sur les paramètres de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces brutes.....	56
Tableau 12 : Paramètres thermodynamiques de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces de sapin de Douglas.....	58
Tableau 13 : Détermination des constantes d'équilibre et paramètres thermodynamiques de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces de sapin de Douglas.....	60
Tableau 14 : Rendements massiques selon le traitement d'inertion appliqué aux écorces.....	61
Tableau 15 : Quantité de phénols relargués au cours de la biosorption en fonction du traitement d'inertion des écorces.....	63
Tableau 16 : Paramètres ( $q_{\max}$ et $b$ ) des isothermes d'adsorption du plomb de type Langmuir. ..	66
Tableau 17 : Rendements massiques des différents matériaux obtenus par oxydation. ....	69
Tableau 18 : Mesures d'acidité selon la méthode de Boehm sur les écorces oxydées.....	71
Tableau 19 : Caractérisation des fonctions de surface des écorces brutes et oxydées. ....	71

Tableau 20 : Données RMN $^1\text{H}$ (a) et RMN $^{13}\text{C}$ (b) ( $\delta$ en ppm, $J$ en Hz) du tétramère d'acide galacturonique (9) obtenues dans $\text{D}_2\text{O}$ à 25 °C.....	78
Tableau 21 : Rendements massiques des réactions d'amination réductrice.....	83
Tableau 22 : Mesure de l'acidité et du taux de substitution des écorces fonctionnalisées. ....	84
Tableau 23 : Données morphologiques des sapins de Douglas avant et après la période de culture.....	92
Tableau 24 : Pourcentage de Cadmium absorbé par les sapins de Douglas, facteur de bioconcentration du Cd. ....	93
Tableau 25 : Degré de méthylestérification des pectines (fractions S2 et S3) d'écorces de sapin de Douglas en fonction de la concentration en cadmium du sol de culture.....	100
Tableau 26 : Paramètres cinétiques des isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces oxydées obtenus après linéarisation selon le modèle de Langmuir.....	107
Tableau 27 : Paramètres cinétiques des isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces greffées obtenus après linéarisation selon le modèle de Langmuir.....	112
Tableau 28 : Tableau récapitulatif des paramètres de l'adsorption du plomb et du cadmium sur le bois et les écorces des sapins de Douglas issus des cultures sous serre. ....	116
Tableau 29 : Quelques caractéristiques physiques et chimiques de cations métalliques. ....	123
Tableau 30 : Impact de la modification chimique sur les propriétés biosorbantes du plomb des écorces oxydées.....	127
Tableau 31 : Réactifs et solvants utilisés. ....	139
Tableau 32 : Paramètres utilisés pour le dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique à flamme.....	167
Tableau 33 : Paramètres utilisés pour le dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique à four. ....	168

## Liste des abréviations

Ara : arabinose  
ATP : adénosine triphosphate  
b : constante de Langmuir  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CPG : chromatographie en phase gazeuse  
DM : degré de méthylestérification  
DP : degré de polymérisation  
EC : écart type  
Endo PG : endopolygalacturonase  
ESI : electrospray ionisation  
ETM : éléments traces métalliques  
FM : faiblement méthylestérifié  
Fuc : fucose  
Gal : galactose  
Gal A: acide galacturonique  
Glc : glucose  
Glc A : acide glucuronique  
HM : hautement méthylestérifié  
HSAB : Hard and soft acids and bases  
IR : infrarouge  
MALDI : matrix assisted laser desorption ionisation  
Man : mannose  
MT : métallothionéines  
Nramp : Natural resistance associated macrophage protein  
PCs : phytochélatines  
q : capacité de rétention  
q<sub>max</sub> : capacité maximale de rétention  
Rf : rapport frontal  
Rha : rhamnose  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
ROS : reactive oxygen species

TA : température ambiante

TEMPO : oxyde de 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine

TFA : acide trifluoroacétique

UV : ultra violet

Xyl : xylose

ZIP : Zinc regulated transporter – Iron regulated transporter-like Protein

# **Introduction générale**



Suite à l'essor des activités minières et industrielles du siècle dernier, des dégâts considérables sur l'environnement ont été engendrés. Héritiers de ces contaminations et contemporains des rejets industriels actuels, il est devenu nécessaire de trouver des solutions à moindre coût permettant de limiter les risques associés à la pollution par les éléments traces métalliques (ETM).

Dans le cadre d'une politique de développement durable, la chimie des substances renouvelables fait l'objet d'une attention particulière. En effet, la biomasse trouvera à moyen terme une place de choix non seulement de par sa contribution dans le secteur énergétique (biocarburant par exemple), mais aussi parce qu'elle constitue la seule matière première renouvelable substituable au pétrole pour la pétrochimie. Entre autres caractéristiques, les activités agricoles et forestières génèrent des quantités considérables de sous produits ou produits connexes lignocellulosiques qui proviennent de la transformation des matières premières d'origine végétale. L'éco matériau bois génère lui aussi des déchets - *essentiellement écorces et sciures* - qui devront être traités de façon appropriée. Les voies actuelles de valorisation des écorces et des sciures apparaissent cependant limitées tant par le volume des stocks utilisés pour ces valorisations que par la nature elle-même des solutions mises en œuvre essentiellement liées à l'exploitation de la valeur énergétique de ces dérivés du bois et à la production de matériaux bois (aggloméré et panneaux de particules). Pourtant des applications commerciales existent ; elles sont variées et de dimensions très diverses. Outre les marchés traditionnels du bois, du papier, des fibres textiles, de la lipochimie, de l'alcool..., citons quelques exemples de marchés émergents : matières plastiques à base de cellulose, biocarburants, tensioactifs pour l'industrie cosmétique, laine de chanvre pour isolation, acide polylactique pour bioplastiques. Depuis une dizaine d'années, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges s'intéresse à la valorisation chimique et biologique des écorces dans le domaine de la biosorption. Un tel phénomène repose sur les capacités de nombreux matériaux biologiques à adsorber les cations métalliques qui sont présents dans les eaux polluées. Passé du stade du laboratoire où le phénomène a été modélisé, au stade pilote qui a servi de base à son développement technologique, ce projet de recherche est actuellement en phase de pré industrialisation.

Ainsi que le montrent les résultats antérieurs obtenus par le LCSN, les écorces brutes de sapin de Douglas présentent intrinsèquement de bonnes capacités d'adsorption des métaux. L'échange d'ions est, dans ce cas, le mécanisme privilégié. Il met en jeu les macromolécules essentiellement polysaccharidiques et polyphénoliques qui entrent dans la composition chimique des parois cellulaires végétales. Les écorces de sapin de Douglas demeurent néanmoins un matériau hétérogène dont il convient tout d'abord de stabiliser la structure afin d'éviter le relargage de substances extractibles parfois nocives. Par ailleurs, les propriétés biosorbantes des écorces pourront être améliorées tant dans le registre des capacités d'adsorption (aspect quantitatif) que de la sélectivité (aspect qualitatif) par modifications chimiques. C'est ce que nous avons étudié en nous appuyant sur deux approches complémentaires :

- **Stratégie chimique.** Cette première stratégie repose sur l'augmentation de la densité de charge anionique des écorces et, plus particulièrement, du nombre de fonctions acide carboxylique. Ces dernières peuvent être générées soit directement sur la structure par oxydation des polysaccharides constitutifs des écorces dont, notamment la cellulose, soit apportées par greffage covalent d'oligosaccharides carboxylés tels que les oligogalacturonates. Par ailleurs, une telle stratégie pourrait offrir la possibilité d'orienter la sélectivité des écorces modifiées vis-à-vis des cations métalliques en diversifiant la nature chimique des groupements échangeurs d'ions greffés.
- **Stratégie biologique.** Une telle stratégie s'appuie sur un phénomène biologique naturel observé chez quelques plantes capables de tolérer et/ou de se développer sur des sols contaminés en ETM : la phytoextraction. Afin de résister à la toxicité des ETM qu'elles prélèvent dans le sol, ces végétaux - *qu'ils soient tolérants ou hyperaccumulateurs* - ont développé des processus physiologiques qui leur permettent de s'adapter à cet environnement contaminé en ajustant notamment la composition chimique de leurs parois cellulaires, premières barrières physico-chimique de la cellule avec son environnement. C'est ce que nous avons souhaité caractériser dans le cas du sapin de Douglas cultivé sous serre. Notre objectif est d'apprécier tout d'abord les modifications chimiques des composés pariétaux des écorces et du bois induites par un stress métallique puis, d'évaluer dans un second temps, les conséquences de ces ajustements chimiques bioinduits sur la capacité des écorces et du bois à adsorber les cations métalliques en solution.

C'est en prenant appui sur les travaux préliminaires du LCSN, en intégrant les objectifs de développement de la filière bois interrégionale et des entreprises partenaires du laboratoire que nous avons débuté ce travail dont nous souhaitons qu'il constitue une référence académique détaillée de l'utilisation du sapin de Douglas - et des écorces qu'il produit - dans des processus de phytoextraction et de biosorption des cations métalliques tout comme un argument scientifique démontrant la faisabilité technologique de tels processus. Le choix des cations métalliques retenus s'est orienté vers d'une part un élément tel que le cadmium présentant les caractéristiques physiques d'oligoéléments tels que le Zn et le Ca mais présentant une grande toxicité même à de faibles teneurs, et d'autre part le plomb, également toxique, qui constitue un modèle souvent décrit dans la littérature pour caractériser les propriétés des biosorbants.

Enfin, ce mémoire s'articule en quatre parties. Après quelques rappels bibliographiques et un état de la question, les résultats des travaux effectués sont présentés. Dans un premier temps, il s'agit d'induire et de caractériser les modifications des biosorbants, pour dans un second temps de déterminer les propriétés biosorbantes des écorces modifiées. La troisième partie, consacrée à une discussion globale, compare les différents résultats et permettra de conclure quant à l'efficacité des modifications prospectées. Enfin une dernière partie précise l'aspect pratique des expérimentations effectuées.



**Première partie : Etat de la question.**



# **Chapitre 1 : L'écorce et le bois, de la structure à la composition.**



# 1 **Structure.**

## 1.1 **Aspects morphologiques.**

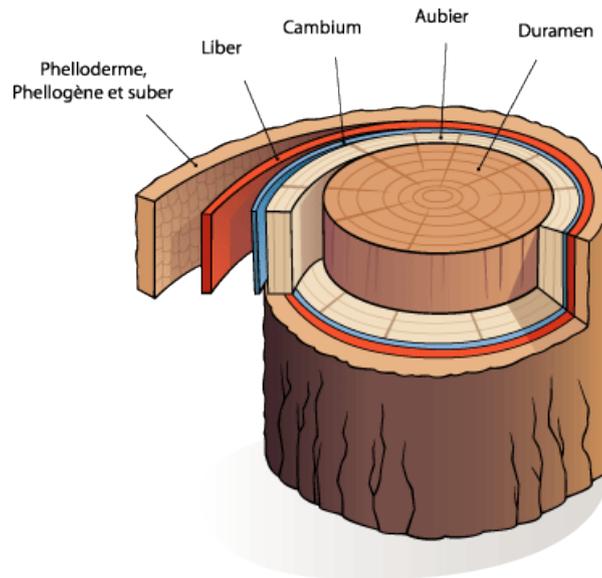
L'écorce représente la partie superficielle des troncs, des branches et des racines. Elle est constituée d'un ensemble tissulaire complexe, hétérogène et hautement spécialisé. Elle est assimilée principalement à une barrière physico-chimique. L'écorce assure la défense primaire de l'arbre contre les agressions par les insectes phytopathogènes, les animaux et les autres êtres vivants (plantes parasites, champignons et bactéries) et protège également le cambium, zone de croissance, des pertes d'eau et des dommages causés par les facteurs climatiques. A côté de ses fonctions protectrices, elle intervient dans le transport des substances nutritives et constitue le siège du dépôt des substances nocives au métabolisme de l'arbre. Cristaux, tannins, mucosités et résines sont accumulés dans des zones de l'écorce qui mourront ensuite. Ces différentes fonctions protectrices et physiologiques conditionnent la vie de l'arbre. Soumise constamment à la croissance en circonférence de l'arbre et afin de maintenir toutes ses propriétés, l'écorce a développé un réseau structural et une composition chimique complexes.

Le bois est pour sa part un tissu conducteur à l'intérieur duquel circule la sève brute, ou sève ascendante. Composée d'eau et de sels minéraux elle est puisée dans le sol par les racines et est entraînée principalement par évapotranspiration jusqu'aux parties aériennes. Formé par couches successives appelées cernes, le bois se différencie au cours de la vie de l'arbre. Les couches les plus profondes forment le bois parfait qui est constitué de cellules mortes alors que les couches superficielles correspondant à l'aubier sont formées de cellules vivantes.

### 1.1.1 **Approche macroscopique.**

L'écorce constitue la partie extérieure des branches, du tronc et des racines de l'arbre. Les écorces issues des déchets de scierie proviennent de l'écorce située autour des troncs constitués du duramen (ou bois de cœur) formé de cellules mortes et de l'aubier formé de cellules vivantes, correspondant aux zones d'accroissement les plus récentes. Le bois, ou xylème secondaire, est un tissu issu du fonctionnement vers l'intérieur de l'assise cambiale, située sous l'écorce. Dans les régions tempérées, le cambium ne fonctionne que pendant la saison de végétation au printemps et en été. Il produit chaque année une couche de bois,

appelée cerne annuel, dans laquelle le bois formé au printemps (bois initial) et le bois formé en été (bois final) sont différenciables. Typiquement, l'écorce comprend l'ensemble des tissus produits par l'assise cambiale vers l'extérieur plus l'écorce externe. La structure générale de l'écorce d'un arbre mature, présentée en Figure 1 permet de différencier les différents tissus. Elle est composée d'une écorce interne (ou liber ou phloème secondaire) et d'une écorce externe (ou périderme ou suber) pouvant donner naissance au rhytidome (ou phloème âgé).<sup>1</sup>



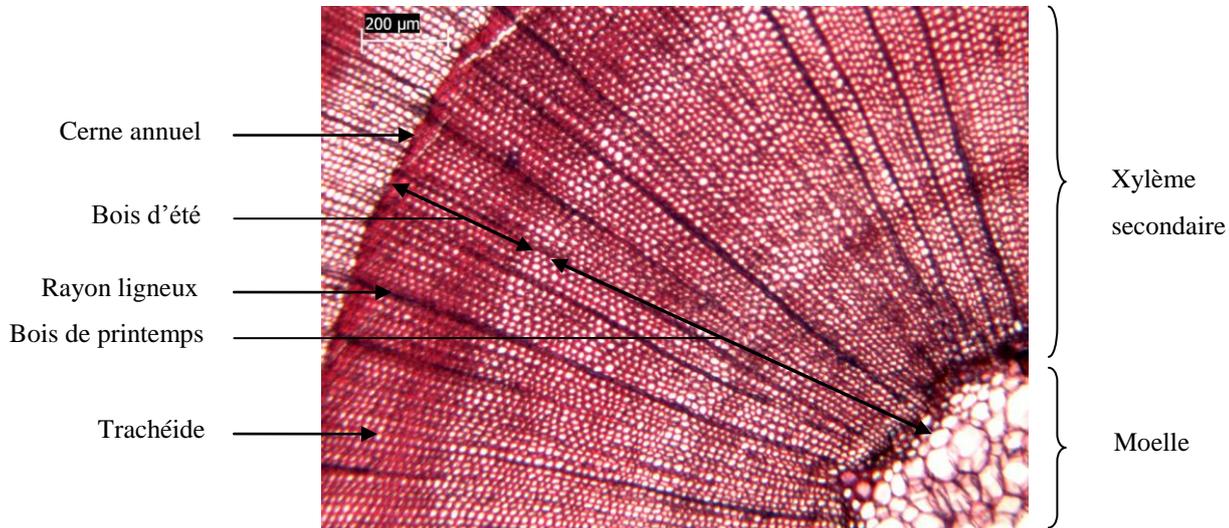
**Figure 1 : Schéma de coupe transversale de tronc<sup>2</sup> : structure de l'écorce.**

source : <http://www.sirtin.fr>

### 1.1.2 Approche microscopique.

La formation du bois, tout comme celle de l'écorce, se produit au niveau du cambium : les tissus végétaux sont formés à partir de tissus spécialisés dans la division cellulaire, les méristèmes. On distingue les méristèmes primaires situés à l'extrémité des racines et dans les bourgeons qui assurent la croissance des plantes en hauteur et les méristèmes secondaires qui apparaissent dans le végétal au cours du développement post-embryonnaire et se présentent sous forme de couches continues de cellules, appelées assises. Ils assurent la croissance en diamètre en produisant des cellules alignées dans le prolongement de la cellule méristématique qui leur a donné naissance.

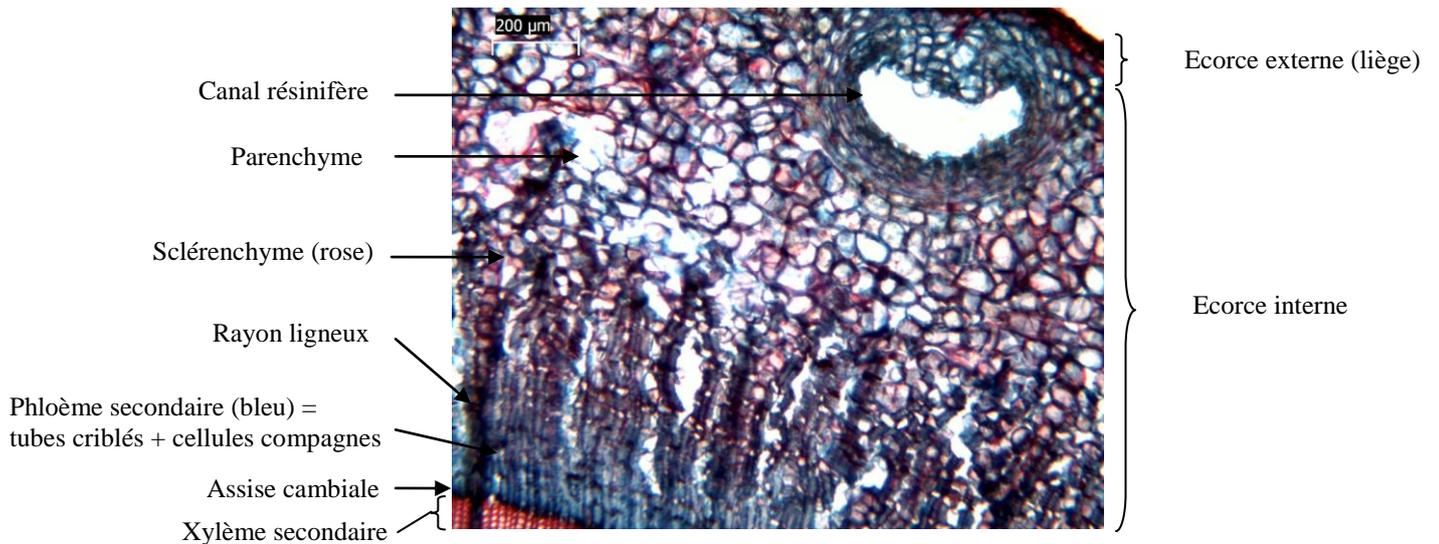
Au premier aspect, l'anatomie des résineux (ou Gymnospermes) semble bien plus homogène et simple que celle des feuillus (ou Angiospermes), 90% de leur bois est constitué de trachéides (Figure 2). Elles servent à la fois au soutien et à la conduction de la sève brute.



**Figure 2 : Observation en microscopie photonique d'une coupe transversale de bois de sapin de Douglas âgé de 4 ans.** Coloration au fasga<sup>3</sup>, mélange de deux colorants : la safranine (coloration rouge des zones lignifiées) et le bleu alcian (couleur bleue après fixation sur les monosaccharides carboxylés).

On distingue deux types de bois grâce au diamètre des trachéides, le bois de printemps (trachéides plus larges car besoin en eau et disponibilité plus importante) et le bois d'été (trachéides plus fines car l'eau est plus rare généralement). Les trachéides se chevauchent au niveau des extrémités, les ponctuations permettent la communication entre trachéides et donc le passage de la sève brute. Chez les Gymnospermes, les ponctuations ont un aspect d'auréole : on dit qu'elles sont aréolées. Hormis les trachéides, les rayons ligneux sont observables ; ils sont composés de parenchyme radial et dans certains cas de trachéides radiales. Ils jouent un rôle dans le stockage des réserves (comme l'amidon) et dans le stockage des déchets. De plus, certains résineux (comme le sapin de Douglas) présentent également des canaux résinifères longitudinaux et radiaux. Les canaux résinifères sont bordés de cellules sécrétrices. Enfin, au centre, se situe la moelle constituée à l'origine de parenchyme. Ces cellules mortes sont parfois totalement dégradées dans le cas d'arbres âgés donnant des arbres creux.

En ce qui concerne l'écorce, le phloème (Figure 3) transporte la sève élaborée (les sucres et autres substances organiques).



**Figure 3 : Observation en microscopie photonique d'une coupe transversale d'écorce de sapin de Douglas âgé de 4 ans.**

Coloration au fasga<sup>3</sup>, mélange de deux colorants : la safranine (coloration rouge des zones lignifiées) et le bleu alcian (couleur bleue après fixation sur les monosaccharides carboxylés).

Les parenchymes sont les tissus de remplissage présents dans tous les organes de la plante. Ils ont pour fonction essentielle de réaliser la photosynthèse et de stocker en réserve différentes substances. Ils sont formés de cellules vivantes mais incapables de se diviser. Le sclérenchyme est formé de cellules mortes, certaines cellules du sclérenchyme sont très allongées et peuvent mesurer plusieurs centimètres de long : c'est un tissu de soutien.

## 1.2 La paroi végétale.

Toutes les cellules végétales ont la particularité d'être entourées par une matrice extracellulaire appelée paroi, composée par un réseau tridimensionnel essentiellement constitué de polymères cellulosiques polysaccharidiques et phénoliques. Les structures et les compositions sont variables et fonctions de différents paramètres. Les diversités variétale et tissulaire sont des facteurs influençant la nature et la composition chimique des parois. De plus, les différences peuvent apparaître en fonction de l'âge des cellules, leur niveau de différenciation et leur fonction.<sup>4</sup> La biosynthèse de la cellulose, des hémicelluloses et des pectines est largement décrite<sup>5</sup> dans la littérature ; cependant, la régulation de leur synthèse est moins documentée.<sup>6,7</sup> La paroi évolue en fonction du stade de développement de la cellule : on distingue généralement la paroi primaire et la paroi secondaire (Figure 4).

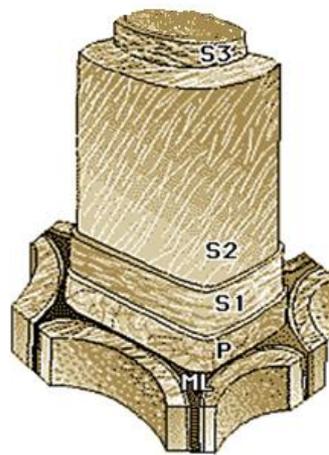
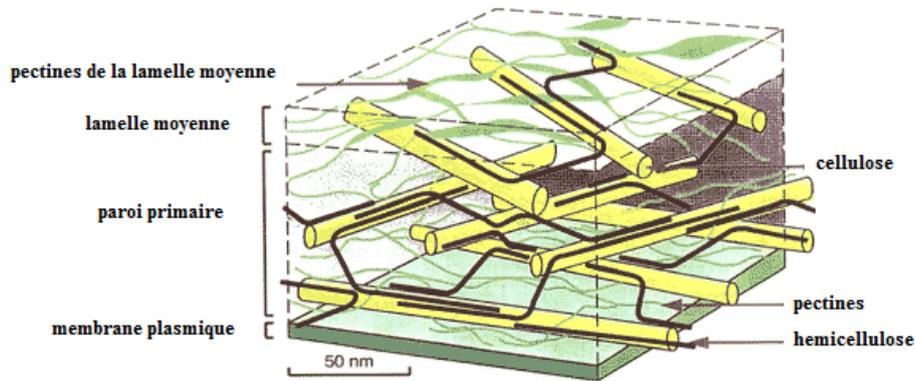


Figure 4 : Représentation schématique de la paroi.

ML : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, et S3 : paroi secondaire.

### 1.2.1 La paroi primaire.

Le premier niveau d'organisation correspond à la lamelle moyenne qui est à l'origine la partie commune entre deux cellules adjacentes. Elle est principalement constituée de substances pectiques. La paroi primaire est ensuite formée, elle est élaborée par les cellules méristématiques et caractérise les cellules en phase de croissance. Elle reste fine et flexible pendant la croissance et permet l'élongation cellulaire.<sup>8</sup> Elle est composée majoritairement d'eau (jusqu'à 90%) et de polysaccharides (Figure 5). Les microfibrilles de cellulose d'environ 3 nm de diamètre forment le squelette des parois cellulaires : ces microfibrilles résultent de l'assemblage parallèle de 36 chaînes de cellulose.<sup>9</sup> Les microfibrilles de cellulose sont alors reliées entre elles par des hémicelluloses qui s'y associent par l'intermédiaire de liaisons non covalentes (hydrogènes principalement) et des pectines afin d'assurer le maintien de la structure.



**Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation des polymères au sein de la paroi primaire.<sup>10</sup>**

(source : adapté de M. Mc Cann et K. R. Roberts, 1991, *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*, p. 126).

### 1.2.2 La paroi secondaire.

Dans certains tissus, une paroi secondaire se développe et incruste progressivement la paroi primaire. Elle se forme lorsque la croissance cellulaire est terminée et constitue des épaisissements multiples. Cette paroi est constituée majoritairement de cellulose microcristalline et d'hémicelluloses ; ces structures polysaccharidiques déjà présentes dans la paroi primaire sont renforcées par le dépôt de polymères hydrophobes : les lignines. Ces dernières confèrent de nouvelles propriétés comme une meilleure cohésion et une plus forte rigidité, la paroi secondaire a la particularité d'être moins perméable à l'eau. Après avoir synthétisé la paroi secondaire, la plupart des cellules meurent ; ces structures sont présentes dans les tissus de soutien (sclérenchyme) ou conducteurs (xylème).

## 2 Composition chimique.

L'écorce et le bois sont composés majoritairement de polysaccharides tels que la cellulose, les hémicelluloses et les pectines, de substances phénoliques telles que les tannins et les lignines et dans de plus faibles proportions de composés minéraux, de cires et de terpènes. Le Tableau 1 représente la répartition des différents constituants du bois et écorces de sapin de Douglas. Leur répartition est fonction de l'espèce ou encore de l'âge de l'arbre.

Tableau 1 : Composition chimique des écorces et du bois de sapin de Douglas<sup>11</sup> exprimée en pourcentage massique de la masse sèche.

	polysaccharides					composés extractibles	lignines
	arabinanes	galactanes	glucanes <i>dont cellulose</i>	mannanes	xylanes		
bois	1,1	2,6	47,8	12,9	3,8	1,7	27,3
écorces	3,4	1,6	27,7	3	2,3	25,9	34,5

### 2.1 Les polysaccharides.

#### 2.1.1 La cellulose.

La cellulose est la molécule la plus abondamment synthétisée sur Terre en représentant au moins la moitié de la biomasse. C'est aussi le polymère naturel le plus valorisé, que ce soit sous forme de fibres textiles, de papier ou à l'état modifié d'esters (acétates ou nitrates de cellulose) ou encore d'éthers. Cet homopolymère linéaire a pour unité de répétition le cellobiose (Figure 6), motif composé de deux D-glucopyranoses en conformation <sup>1</sup>C<sub>4</sub> liés par une liaison glucidique β (1→4).

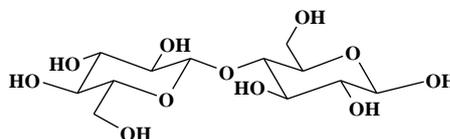


Figure 6 : Structure du cellobiose.

Le degré de polymérisation (DP), qui représente le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose, est difficile à estimer et est très variable selon sa provenance et sa localisation au sein de la paroi puisqu'il varie de 300 à 15000 : la cellulose est considérée comme un polymère de haut poids moléculaire (jusqu'à  $2,5 \cdot 10^6$  Da). Afin de déterminer le DP de la cellulose, elle doit être solubilisée sans la dégrader : en effet, malgré la présence de

nombreux groupes hydroxyle, ce polymère est insoluble dans l'eau. La disposition des hydroxyles libres des unités glucoses permet l'établissement de liaisons hydrogènes intramoléculaires, stabilisant la cellulose dans son orientation linéaire ce qui lui confère une certaine rigidité, et des liaisons intermoléculaires qui relient plusieurs macromolécules entre elles et les maintiennent disposées parallèlement (Figure 7). Ainsi, l'association de nombreuses chaînes de cellulose favorise l'établissement d'un état solide ordonné, pseudocristallin et permet la formation de microfibrilles. La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau.

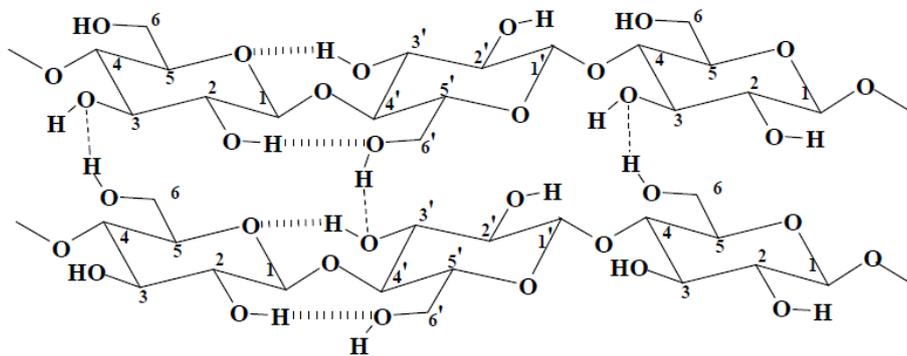


Figure 7 : Liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires dans la cellulose.

### 2.1.2 Les hémicelluloses.

Les hémicelluloses sont une classe de polysaccharides hétérogènes plus ou moins ramifiés dont les unités osidiques sont de nature variée et reliées entre elles par des liaisons osidiques  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ces monomères essentiellement présents sous forme pyranose, sont des hexoses (glucose, galactose, mannose), des pentoses (rhamnose, xylose), des déoxyhexoses (rhamnose, fucose) et des acides uroniques<sup>12</sup> (acide galacturonique, acide glucuronique). Concernant la nomenclature des hémicelluloses, le suffixe "ane" désigne la nature polymérique de l'axe osidique, précédé directement par le nom de la chaîne principale. Par exemple, les arabinoglucuronoxylanes et des glucogalactomannanes, qui sont des hémicelluloses caractéristiques du sapin de Douglas<sup>13</sup>, sont respectivement construits sur des chaînes de xylose et de mannose.

Deuxième polysaccharide le plus abondant après la cellulose, la valorisation des hémicelluloses est en plein essor. Citons par exemple la valorisation des glucuronoxylanes de bois de châtaignier en oncologie cellulaire et moléculaire<sup>14</sup> ou la synthèse de matériaux filmogènes.<sup>15</sup>

### 2.1.3 Les pectines.

Les pectines constituent un groupe d'hétéropolysaccharides. Très peu présentes dans le bois, elles représentent environ un tiers de la masse d'écorces. Elles possèdent une structure polymérique dont la chaîne principale est formée par la liaison d'unités acide  $\alpha$ -D-galacturonique et sur laquelle s'insèrent des résidus  $\alpha$ -L-rhamnosyles donnant naissance à des « coudes pectiques » (Figure 8).

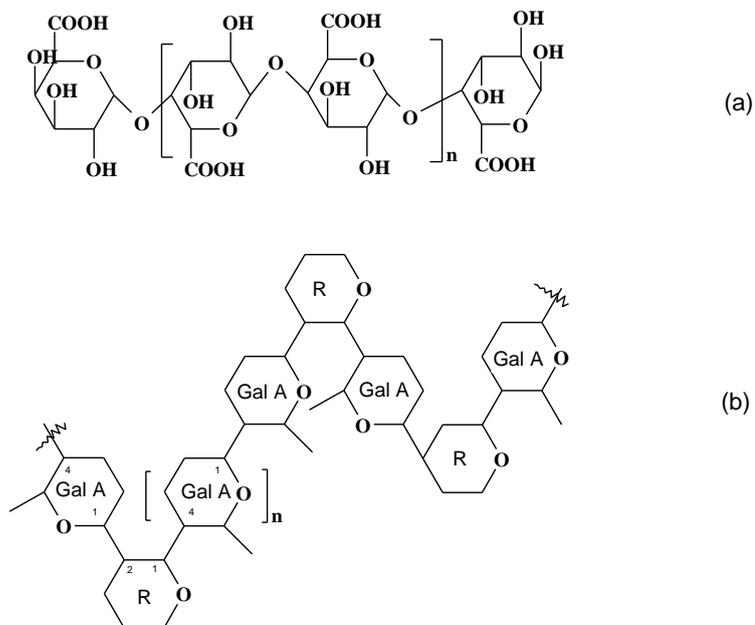


Figure 8 : Structure d'un homogalacturonane (a), et d'un rhamnogalacturonane (b) : chaîne principale d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique avec insertion d' $\alpha$ -L-rhamnose.

Des chaînes latérales peuvent substituer cette structure ; on distingue ainsi les homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes (RGI), les rhamnogalacturonanes (RGII) et les chaînes latérales.<sup>16</sup>

#### 2.1.3.1 Les homogalacturonanes.

Les homogalacturonanes sont essentiellement des polymères d'acide galacturonique dont l'estérification des fonctions acide carboxylique par le méthanol permet de les classer en deux catégories en fonction de leur degré de méthylestérification (DM). Ce dernier est défini comme le pourcentage d'acide galacturonique estérifié rapporté à la totalité de l'acide galacturonique ; on trouve les pectines faiblement méthylestérifiées, FM, de  $DM < 50$  et les pectines hautement méthylestérifiées, HM, de  $DM > 50$ .

Le degré de méthylestérification influe sur l'extractibilité des pectines : en effet, la présence d'acide galacturonique permet par l'intermédiaire du calcium de lier deux chaînes homogalacturonanes entre elles. Dans ce cas la structure est dite " boîte à œuf " ou " egg box " (Figure 9). Outre les fonctions carboxylates, on considère généralement que 4 fonctions

alcool interagissent avec le calcium ; de plus, cette stabilisation peut faire intervenir les atomes d'oxygène anomériques voire hémiacétals par des liaisons de faible énergie de type Van der Waals. Contrairement aux pectines HM qui ne peuvent pas être ainsi stabilisées et peuvent être extraites à l'eau chaude, cette configuration nécessite l'utilisation de chélateurs de calcium comme l'EDTA pour permettre l'extraction des pectines FM.

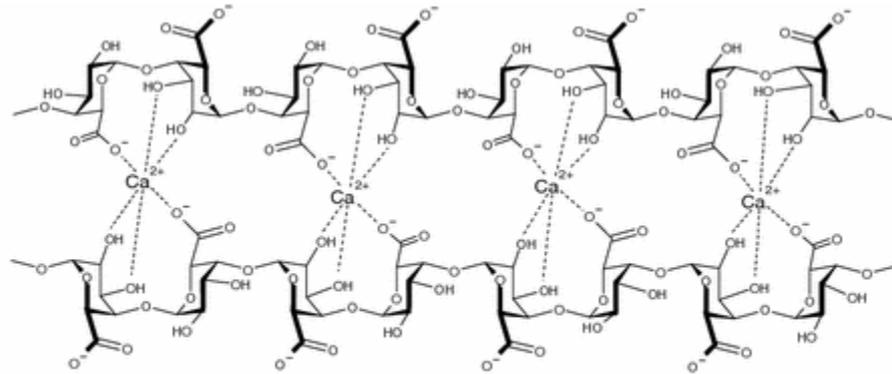


Figure 9 : Schéma de chaînes homogalacturonanes stabilisées par l'intermédiaire d'ions calcium<sup>17</sup> : Structure dite « boîte à œuf »

Plusieurs méthodes ont été développées afin de calculer leur degré de méthylestérification. Une méthode ancienne, la titrimétrie<sup>18</sup>, peut être utilisée pour les pectines purifiées. Des méthodes colorimétriques existent également comme par exemple le dosage du méthanol<sup>19</sup> libéré après saponification des fonctions ester par la soude. Cette méthode repose sur la formation du méthanal par action d'une alcool oxydase, puis couplage de l'aldéhyde avec le Purpald afin d'obtenir un chromophore dosé à 520 nm. Une méthode spectroscopique comme la spectroscopie infrarouge<sup>20</sup> (IR) peut être citée.

### 2.1.3.2 Les rhamnogalacturonanes.

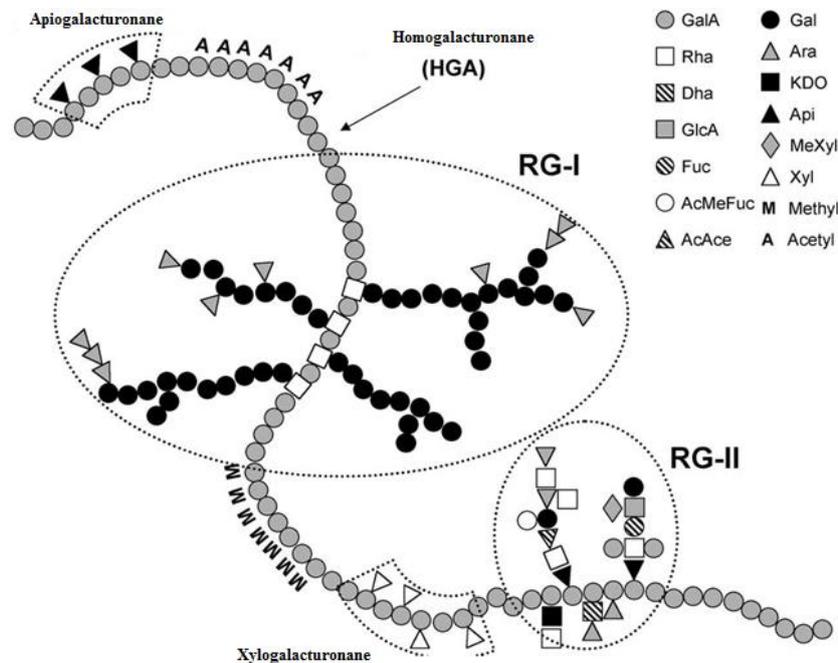
Les rhamnogalacturonanes I (RGI) sont constitués d'une chaîne principale formée de l'alternance de résidus  $\alpha$ -D-galactopyranosyles et  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyles liés respectivement en O-4 et O-2. La distribution de ces résidus rhamnosyles branchés le long de la chaîne principale n'apparaît pas régulière. De plus, la variété des rhamnogalacturonanes I réside dans celle des chaînes latérales ; en effet, près de 50% des unités L-rhamnose sont substituées en O-4 par des chaînes latérales variées d'arabinane, de galactane, ou d'arabinogalactane.

Les rhamnogalacturonanes II (RGII) sont des polymères très ramifiés comportant de nombreux oses rares. Le RG se fixe en O-3 de l'acide galacturonique de la chaîne pectique principale. Ils sont majoritairement rencontrés sous forme dimérisée par l'intermédiaire du bore.

### 2.1.3.3 Les chaînes latérales : arabinanes, galactanes, arabinogalactanes.

Ce sont les polymères glucidiques qui composent les chaînes latérales des polysaccharides pectiques. De tailles variables, elles s'insèrent sur la chaîne pectique principale en O-4 du rhamnose du RGI. Les arabinanes ( $\alpha$ -5-arabinanes) sont formés principalement par la liaison (1 $\rightarrow$ 5) de résidus  $\alpha$ -L-arabinofuranosyles qui sont souvent substitués en O-3 et parfois en O-2 par les mêmes résidus. Le degré de branchement et la présence des résidus arabinopyranosyles dépendent de l'origine du polysaccharide. Le galactane ( $\beta$ -4-galactane) est une chaîne linéaire de résidus  $\beta$ -D-galactopyranosyles liés en (1 $\rightarrow$ 4). Substitué en O-3 par des arabinanes, il forme l'arabinogalactane.

Une représentation schématique d'un modèle de structure pectique a été proposée par Perez *et al.*<sup>21</sup> (Figure 10).



**Figure 10 : Représentation schématique de la structure primaire des pectines.**

GalA : acide galacturonique, Gal : galactose, Rha : rhamnose, Ara : arabinose, Dha : acide 3-désoxy-D-lyxo-2-heptulosarique, KDO : acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique, GlcA : acide glucuronique, Api : apiose, Fuc : fucose, MeXyl : 2-O-méthyl-xylose, Xyl : xylose, AcMeFuc : 2,4-O-acétylméthylfucose.

## 2.2 La lignine.

La lignine est un composant majeur des végétaux, sa proportion varie en fonction de l'espèce variétale. Dans son état naturel, la lignine est une macromolécule amorphe issue de la polymérisation aléatoire oxydative de trois monolignols (alcool phénylpropénoïques) : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique.

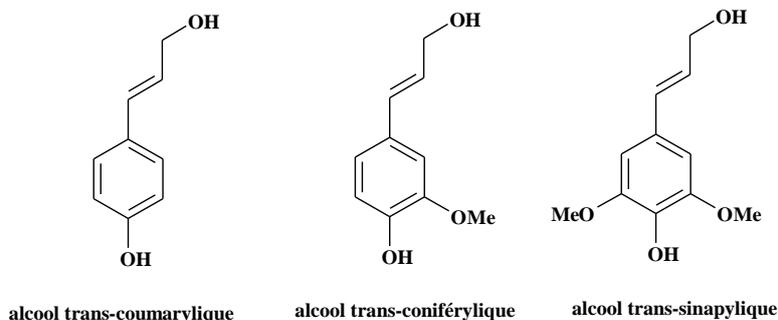


Figure 11 : Structures des monolignols.

Contrairement à d'autres polymères végétaux, tels que la cellulose, pour lesquels une formule structurale générale existe, la structure des lignines ne peut pas être définie de manière claire par la répétition d'unités caractéristiques car elles sont liées entre elles de façon multiple et en fonction de l'espèce variétale. De plus, dans la paroi cellulaire, les monolignols peuvent être oxydés en radicaux libres sous l'influence d'enzymes (laccases et peroxydases), et ce, de façon aléatoire expliquant ainsi la grande diversité structurale des lignines. La proportion des trois monomères et les liaisons intramoléculaires sont très variables selon l'origine botanique, le tissu et la localisation au sein de la paroi. Chez les résineux, la structure de la lignine (Figure 12) dérive à plus de 95% de l'alcool coniférylique tandis que chez les feuillus, elle provient de l'alcool coniférylique mais aussi de l'alcool sinapylique. La lignification est associée au développement des systèmes vasculaires des plantes et cette polymérisation *in situ* s'accompagne de liaisons covalentes avec la cellulose et les hémicelluloses, ce qui assure la bonne rigidité de la paroi, mais s'oppose à une bonne extractibilité des constituants pariétaux, en général et des hémicelluloses, en particulier. Les lignines sont très résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques ; cependant, elles sont difficiles à extraire et les lignines extraites ont des structures souvent différentes des lignines présentes à l'état naturel (protolignines). De plus, leur grande hétérogénéité de structure en fait un polymère abondant peu valorisé. Nous pouvons citer l'extraction par le bisulfite en milieu acide qui conduit aux composés couramment appelés lignosulfates, utilisés à l'échelle industrielle comme plastifiant ou complexant, par exemple. De manière générale,

les lignines sont aussi utilisées comme additifs dans des matériaux adhésifs. La principale valorisation de la lignine, possédant un pouvoir calorifique élevé, reste la combustion.

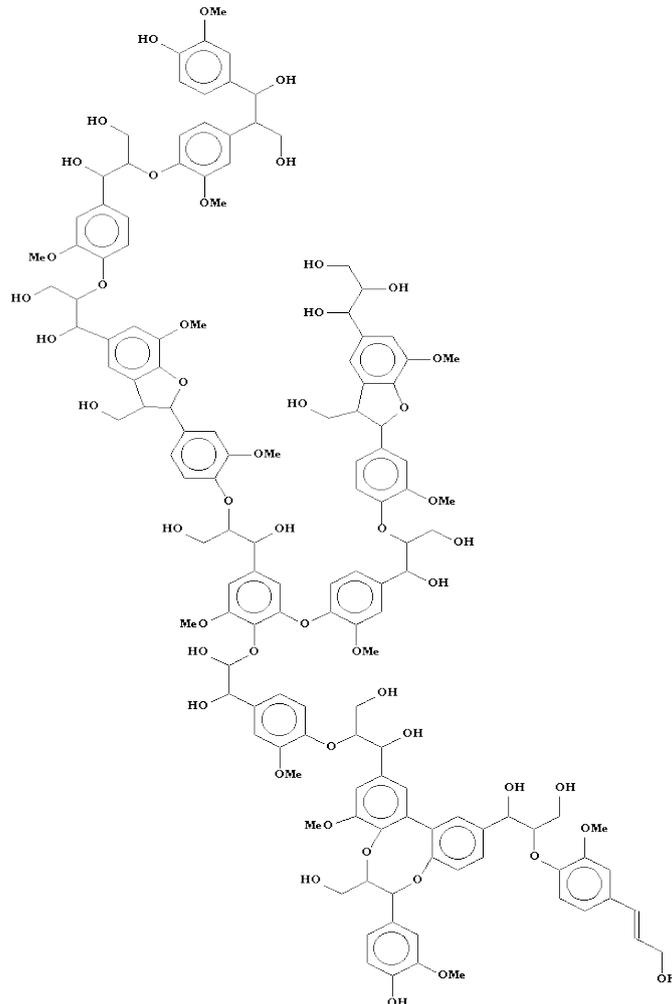


Figure 12 : Exemple de structure proposée de lignine.<sup>22</sup>

### 2.3 Les composés extractibles.

Les écorces et le bois sont également composés de molécules solubles dans l'eau ou dans des solvants organiques (alcool, éther...) nommées extractibles. Ces constituants sont de nature organique ou inorganique (sels minéraux à base de calcium, de magnésium ou de potassium). Les principaux constituants organiques sont les tanins hydrolysables et condensés, les terpènes, les sucres circulants et des composés aliphatiques comme les cires et les acides gras. Ces derniers apportent aux écorces et au bois une couleur, une odeur ou encore l'hygroscopie.

### 2.3.1 Les tanins.

Les tanins sont par définition, des substances polyphénoliques d'origine végétale dont la masse moléculaire est comprise entre 500 et 3000 Da. Contrairement aux lignines, ces composés sont solubles. On peut les classer en deux catégories : les tanins hydrolysables (ou gallotanins) et les tanins condensés<sup>23</sup> (ou tanins catéchiés). La Figure 13 illustre la structure de tanins.

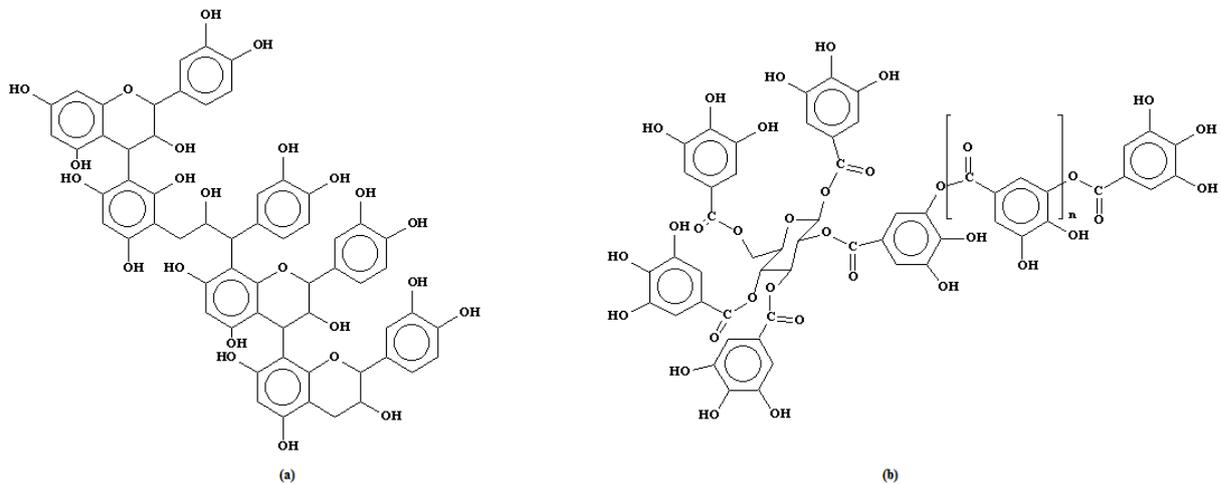


Figure 13 : Exemple de structure de tanins catéchiés (a) et de gallotanins (b).

Les gallotanins sont considérés comme des polyesters de saccharides avec un ou plusieurs acides phénoliques.<sup>24</sup> Le principal monosaccharide identifié est le glucose ; la liaison ester est facilement hydrolysable par l'action d'acides, de bases ou d'enzymes et conduit à la formation de monomères constitutifs comme le glucose, l'acide gallique, l'acide ellagique...

Les tanins condensés sont des polymères composés d'unités flavonoïdes, et en particulier de procyanidine chez le sapin de Douglas, constitués d'oligomères de catéchine et d'épicatéchine.<sup>25</sup>

### 2.3.2 Autres composés organiques.

Les terpènes sont des molécules organiques extrêmement volatiles et sont responsables de l'odeur dégagée par une plante fraîchement coupée. Ils sont biosynthétisés à la suite du couplage d'entités moléculaires à cinq atomes de carbone. La structure de ces entités dérive du 2-méthylbuta-1,3diène ou isoprène. Les terpènes sont subdivisés en fonction du nombre d'unités isoprène qui les constitue : les monoterpènes sont généralement des molécules olfactives comme le limonène par exemple, les di et triterpènes sont des résines, les tétraterpènes sont des pigments comme les caroténoïdes.

Les sucres circulants et oligosaccharides sont des molécules également présentes dans les écorces et le bois dans une moindre mesure. On rencontre à la fois des monomères (D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, L-arabinose, D-xylose, L-rhamnose et D-fucose), des dimères (saccharose) voire des trimères tels que le raffinose.

Les composés aliphatiques, représentés en partie par les cires et les acides gras, sont largement minoritaires dans les écorces et le bois. Les acides gras sont divisés en deux catégories : les acides gras saturés comme l'acide palmitique ( $C_{15}H_{31}COOH$ ) et les acides gras insaturés comme l'acide oléique ( $C_{17}H_{33}COOH$ ). Les cires sont des esters de l'éthylène glycol et de deux acides gras ou un ester de d'acide gras et d'alcool à longue chaîne.

### 2.3.3 Les composés inorganiques.

La proportion relative de la matière inorganique contenue dans l'écorce est généralement déterminée par la teneur en cendres de ce même matériau. Les cendres représentent une faible part dans la composition chimique de l'écorce ; à titre indicatif, elles constituent de 0.7 % de la masse sèche du pin (*Pinus taeda*)<sup>26</sup> à 10.7 % de celle du chêne (*Quercus alba*).<sup>27</sup> Les éléments minéraux de l'écorce et du bois sont de nature très variée. Les plus représentés sont le calcium, le potassium et le magnésium. Ces principaux éléments sont souvent trouvés sous forme de sels associés aux carbonates, silicates, phosphates ou encore oxalates. Une étude menée sur huit espèces d'arbres a montré que les éléments minéraux sont répartis équitablement entre l'écorce et le bois.<sup>28</sup> L'écorce ne représentant que 16 % de la masse du tronc, elle peut donc être considérée comme un lieu de stockage privilégié des éléments minéraux de l'arbre.



## **Chapitre 2 : La biosorption.**



# **1 Le phénomène de biosorption.**

Les principales méthodes conventionnelles employées pour l'épuration des eaux contaminées en métaux lourds reposent sur la neutralisation et la précipitation<sup>29</sup>, l'oxydation ou la réduction chimique, les traitements électrochimiques<sup>30</sup>, les techniques de séparation membranaire<sup>31</sup> comme l'osmose inverse, l'échange d'ions<sup>29</sup> et l'adsorption.<sup>32</sup> Bien que très efficaces, ces méthodes sont parfois coûteuses à grande échelle et nécessitent la création d'installations spécifiques. Par ailleurs, dans un contexte de développement durable, les grands noms de l'industrie du traitement de l'eau semblent promouvoir le développement des écotechnologies, ce qui explique sans doute l'émergence d'alternatives technologiques privilégiant le recours à l'utilisation d'adsorbants d'origine naturelle.

La mise en œuvre de la biosorption fait appel aux technologies déjà existantes dans le secteur de l'échange d'ions ou de l'adsorption sur charbon actif. La biosorption met en jeu des mécanismes complexes et variables qui sont le reflet à la fois de la diversité chimique du matériau biosorbant mais aussi du type de métal à adsorber.

## **1.1 Les acteurs de la biosorption.**

### **1.1.1 Les biosorbants.**

La littérature est riche de nombreux exemples de biosorbants de natures diverses (Tableau 2) aptes à la rétention des cations métalliques. De nature végétale, fongique, algale ou minérale, les biosorbants ont des capacités de rétention très variées comprises entre 0,049 méq.g<sup>-1</sup> (adsorption du cadmium par le bois de genévrier) et 1,951 méq.g<sup>-1</sup> (adsorption du plomb par les coquilles de noix de pécan). Les écorces, qu'elles soient issues d'essences exploitées ou non, figurent parmi les candidats de capacités intermédiaires. Il est cependant délicat de comparer ces données en l'état car les conditions opératoires sont très variables.

Tableau 2 : Capacité de rétention du plomb ou du cadmium de quelques biosorbants.

Biosorbants	Cations métalliques	Capacité maximale de rétention (méq.g <sup>-1</sup> )	Références bibliographiques
Paille d'orge	Pb <sup>2+</sup>	0,213	33
Symphorine <i>Symphoricarpus albus</i>	Pb <sup>2+</sup>	0,572	34
Son de riz	Pb <sup>2+</sup>	0,535	35
Coques de noisettes <i>Corylus avellana</i>	Pb <sup>2+</sup>	0,259	36
Coquilles de noix de pékans <i>Carya illinoensis</i>	Pb <sup>2+</sup>	1,951	37
Macromycètes <i>Amanita rubescens</i>	Pb <sup>2+</sup>	0,353	38
Graines de Strychnos potatorum <i>Strychnos potatorum</i>	Pb <sup>2+</sup>	0,151	39
Sciure de pin sylvestre <i>Pinus sylvestris</i>	Pb <sup>2+</sup>	0,204	40
Ecorce d'acacia <i>Acacia leucocephala</i>	Pb <sup>2+</sup>	0,707	41
Pleurote <i>Pleurotus platypus</i>	Cd <sup>2+</sup>	0,624	42
Bois du papayer <i>Carica papaya</i>	Cd <sup>2+</sup>	0,307	43
Champignons <i>Aspergillus niger</i>	Cd <sup>2+</sup>	0,066	44
Algues du Nil	Cd <sup>2+</sup>	0,533	45
Ecorce de genévrier <i>Juniperus monosperma</i>	Cd <sup>2+</sup>	0,183	46
Bois de genévrier <i>Juniperus monosperma</i>	Cd <sup>2+</sup>	0,049	46
Dolomie	Pb <sup>2+</sup> / Cd <sup>2+</sup>	0,433 / 0,048	47
Goethite	Pb <sup>2+</sup>	0,102	48
Montmorillonite	Pb <sup>2+</sup>	0,096	48
Acides humiques	Pb <sup>2+</sup>	0,209	48

Certains auteurs ont souhaité quantifier la participation des différents constituants des biosorbants organiques afin d'étudier la contribution de chaque polymère. Une étude effectuée sur les fibres de grignons<sup>49</sup> de pommes, de poires, de roses musquées et d'aronia a

montré des différences significatives liées à la nature des polymères et des métaux considérés voire de l'espèce utilisée. Néanmoins, cette étude montre une contribution principale des pectines puis des polyphénols et des hémicelluloses dans le cas de l'adsorption du plomb. Concernant le cadmium, les pectines sont également le principal polysaccharide d'adsorption mais dans une moindre mesure ; l'adsorption sur les autres polymères est plus ou moins répartie en fonction de l'espèce. Dans ce cas, la contribution des lignines et de la cellulose dans le processus d'adsorption est relativement faible. Ces résultats sont cependant à modérer car la répartition des différentes classes de polysaccharides au sein des espèces est variable. C'est ce qu'ont montré Casterline et Yuoh<sup>50</sup> qui ont mis en évidence des niveaux de contribution des polysaccharides différents lors de l'adsorption.

### **1.1.2 Les polluants.**

Les polluants sont de natures diverses et fonction de la nature du site à dépolluer. De nombreux travaux concernent la biosorption de composés organiques comme les acides gras<sup>51</sup> ou les herbicides.<sup>52</sup> Une autre application connue est la biosorption atmosphérique<sup>53</sup> par les écorces par exemple qui permet de renseigner l'état de pollution d'un lieu précis. Notre étude s'est orientée vers l'élimination des éléments métalliques tels que le plomb et le cadmium. Classés parmi les éléments de transition, ils ne sont pas connus comme oligoéléments contrairement à d'autres éléments métalliques comme le cuivre, le zinc, le cobalt... Anciennement appelés métalloïdes puis métaux lourds, ils sont désormais connus sous le nom d'éléments traces métalliques (ETM).

#### **1.1.2.1 Le plomb.**

Le plomb est un élément chimique de la famille des cristallogènes. Il existe à l'état naturel à des teneurs variées dans des zones géographiques réparties à travers le monde. Il se manifeste surtout sous forme de sulfure dans la galène, principal minerai duquel il est extrait. Sous forme métallique, il apparaît d'aspect gris-blanchâtre. Actuellement utilisé pour la fabrication de batteries, d'accumulateurs, de munitions, de dispositifs de protection contre les rayonnements nucléaires..., il entre également dans la composition chimique de certains alliages comme le laiton et le bronze. Son utilisation ancienne dans la conception des canalisations d'eau a causé de nombreux dégâts sur la santé. Très toxique à faible dose, il est responsable de maladies connues sous le nom général de saturnisme. Il existe à deux états d'oxydation (II et V), cependant la forme II est la plus couramment rencontrée.

### 1.1.2.2 *Le cadmium.*

Le cadmium existe à l'état naturel, à différentes teneurs ; présent sous forme de sulfure dans la greenockite, minéral très rare, il est principalement extrait comme sous-produit des minerais de zinc, de plomb ou de cuivre. C'est un métal blanc qui ternit au contact de l'air se recouvrant ainsi d'une couche protectrice le rendant inoxydable par les conditions atmosphériques. Cette propriété lui confère de nombreuses applications dans le domaine du traitement de surface. Le cadmium est principalement utilisé dans les piles et accumulateurs, dans divers composants électroniques et, dans de faibles quantités, dans certains alliages avec le cuivre. Outre sa forme métallique, il n'existe qu'à l'état d'oxydation II.

Les principales sources de rejet sont la sidérurgie, la métallurgie et les industries extractives<sup>54</sup>. Bien que son utilisation soit en déclin, les apports de cadmium dans les milieux aquatiques vont perdurer en raison notamment de la présence d'apports diffus très importants causés par des utilisations anciennes.

## 1.2 **Les causes de la biosorption.**

La biosorption est définie comme un état d'équilibre entre un biosorbant et un cation métallique en solution. Le phénomène de biosorption est souvent présenté comme un échange d'ion où les cations métalliques présents en solution sont échangés contre un proton à la surface de l'écorce (Figure 14). Un tel mécanisme trouve son origine dans la composition chimique des écorces où les fonctions acide carboxylique des pectines<sup>55,56</sup>, les fonctions phénoliques des tanins condensés<sup>57</sup> et des lignines<sup>58</sup> sont désignées comme les principaux sites d'adsorption. L'adsorption sur les autres constituants des écorces est aussi envisageable. C'est notamment le cas des hémicelluloses<sup>59</sup> ou de la cellulose.<sup>60</sup> D'autres types d'interactions existent avec d'autres grandes classes de molécules telles que les protéines par exemple ; cependant, ces dernières n'interviennent que de manière négligeable du fait de leur très faible proportion dans les écorces.

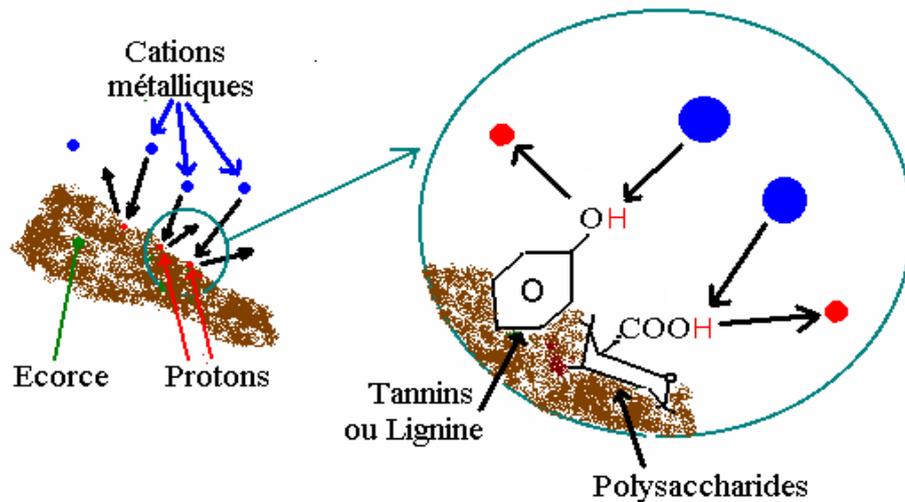


Figure 14 : Schématisation de la biosorption.

### 1.3 Les paramètres influençant la biosorption.

La biosorption est due à deux types de facteurs : les facteurs intrinsèques liés directement aux caractéristiques des biosorbants et les facteurs extrinsèques liés aux conditions expérimentales.

#### 1.3.1 Les paramètres intrinsèques.

Ces paramètres sont dus au couple biosorbant / métal en solution considéré. Dans l'étude sur la biosorption des cations métalliques par les écorces brutes, il a été montré au LCSN<sup>61</sup> que les capacités et l'affinité des écorces pour les métaux étaient sélectives et dépendantes,

- d'une part pour les métaux : de leurs caractéristiques physicochimiques (polarisabilité, enthalpie d'hydratation, nombre d'électrons célibataires),

- d'autre part pour les écorces : de leur composition chimique et plus précisément de la présence de fonctions carboxyliques (pectines et hémicelluloses) ou hydroxyles phénoliques (lignines) désignées comme responsables de l'adsorption.

Outre les interactions coulombiennes qui sont proportionnelles à la charge électrique de chaque entité et inversement proportionnelles au carré de la distance qui les sépare, un tel comportement peut être expliqué par la théorie HSAB établie par Person.<sup>62</sup> En effet, outre la classification de Bronsted qui caractérise les acides et les bases par leurs aptitudes respectives à donner ou fixer un proton, et la classification de Lewis qui caractérise les acides et les bases par leurs aptitudes respectives à attirer ou donner un doublet d'électrons, la classification selon la force (dure ou molle) renvoie aux propriétés intrinsèques du site acide ou basique. Cette classification est établie selon la taille du site, la charge électronique de la couche de

valence et l'électronégativité des éléments. Par conséquent, un acide dur sera de faible électronégativité, de petite taille et de charge positive importante ; de même une base dure sera de forte électronégativité, de petite taille et de charge négative (Tableau 3). Il découle de cette classification la règle suivante : les acides durs réagissent principalement avec les bases dures et les acides mous avec les bases molles. L'affinité du plomb (acide de force moyenne) est donc meilleure pour des sites basiques moyens tels que les amines conjuguées à un cycle aromatique et les sulfates que pour des sites carboxylates (sites basiques durs). A l'inverse, le cadmium présente une meilleure affinité pour les sites acides durs.

Tableau 3 : Classification de quelques groupements fonctionnels selon la théorie HSAB.

Acides			Bases		
durs	moyens	mous	durs	moyennes	molles
$H^+$ , $Li^+$ , $Na^+$ , $K^+$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $Sn^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Sc^{3+}$ , $Ga^{3+}$ , $In^{3+}$ , $UO_2^{2+}$ , $Cr^{3+}$ , $Fe^{3+}$ , $As^{3+}$	$Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Pb^{2+}$	$Cs^+$ , $Ag^+$ , $Hg^{2+}$ , $Cd^{2+}$	$H_2O$ , $NH_3$ , $RNH_2$ , $Cl^-$ , $NO_3^-$ , $RO^-$ , $OH^-$ , $F^-$ , $RCOO^-$ , $PO_4^{3-}$ , $SO_4^{2-}$	$\phi NH_2$ , $NO_2^-$ , $SO_3^-$	$C_6H_6$ , $CO$ , $CN^-$ , $H^-$ , $R^-$ , $RS^-$ , $I^-$ , $SCN^-$ , $S_2O_3^{2-}$

### 1.3.2 Les paramètres extrinsèques.

Contrairement aux paramètres intrinsèques pour lesquels l'expérimentateur ne peut agir, les paramètres extrinsèques ont fait l'objet de nombreuses recherches afin d'identifier les conditions expérimentales optimales. Ces études portent sur la taille des particules, la nature des contre ions en solution, la présence d'autres contaminants susceptibles de s'adsorber, le pH des solutions ou encore le rapport solide/liquide dans le cas d'une adsorption en batch.

- ✓ Si la taille des particules ne devrait pas, en théorie, influencer les propriétés d'adsorption, de manière générale, plus la granulométrie est faible, plus la capacité de rétention est élevée.<sup>63</sup>
- ✓ La nature des contre ions en solution conditionne la disponibilité des cations métalliques en solution.<sup>64</sup> En effet, au cours de l'échange d'ions, les protons relargués dans le milieu vont s'apparier avec les anions ; les paires d'ions formées sont d'autant plus dissociées que l'acide conjugué est fort : dans ce cas, les protons seront plus disponibles pour l'adsorption et entreront davantage en compétition avec

les cations métalliques. C'est pourquoi les solutions de chlorure, sulfate ou nitrate défavorisent l'adsorption par rapport aux solutions d'acétate par exemple.

- ✓ La compétition avec d'autres éléments limite la biosorption ; elle peut avoir lieu avec des composés organiques<sup>65</sup> ou des solutions métalliques multiéléments.<sup>66</sup>
- ✓ Le pH<sup>67</sup> conditionne la forme d'une espèce en solution. Les ions métalliques doivent être présents sous forme soluble (non précipités sous forme d'hydroxydes par exemple) en milieu légèrement acide. Cependant, l'activité des protons ne doit pas être trop forte pour ne pas trop interférer avec les cations à adsorber. La plupart des expériences mises en place dans la littérature sont effectuées pour des pH compris entre 4 et 6 avec des différences fonction des cations métalliques.
- ✓ Si dans le cas d'une adsorption en colonne, la masse de biosorbant est fixée, en batch la quantité de biosorbant en solution influe sur les capacités de rétention<sup>41</sup> La littérature distingue deux cas : plus la quantité de biosorbant en solution est élevée, plus la capacité de rétention est faible ; à l'inverse plus la quantité de biosorbant est élevée, plus la solution est dépolluée (la concentration résiduelle en ions métalliques à l'équilibre est faible).

## 2 Modélisation mathématique.

La capacité maximale d'adsorption en cations métalliques par un biosorbant donné est l'une des caractéristiques souvent recherchée par les auteurs. Elle est exprimée en termes de quantité de cations métalliques fixés par unité de masse du biosorbant utilisé. Cependant les données de la littérature sont parfois difficilement comparables du fait de la diversité des conditions opératoires mises en œuvre.

### 2.1 Représentation de la biosorption.

#### 2.1.1 L'isotherme d'adsorption.

Depuis de nombreuses années, plusieurs équipes ont souvent souhaité modéliser la biosorption. Les isothermes d'adsorption sont souvent utilisées pour décrire ce phénomène. Dans ce contexte, l'adsorption définit des réactions de surface permettant l'accumulation des matières organiques ou inorganiques à l'interface solide-liquide. Les isothermes d'adsorption traduisent l'existence ou non d'un équilibre dynamique qui s'établit, à température fixe, entre la fraction des cations métalliques fixés au biosorbant et la fraction des cations restant libres

en solution. La connaissance des isothermes d'adsorption des corps purs permet de déterminer la quantité de produit adsorbé tout comme la sélectivité d'un solide vis-à-vis des composés du mélange. La description de l'équilibre d'adsorption est fondamentale pour caractériser un couple adsorbat/adsorbant solide. Les isothermes d'adsorption d'un composé peuvent présenter plusieurs formes ; elles sont divisées en cinq groupes (Figure 15) suivant la classification proposée par Brunauer.<sup>68</sup>

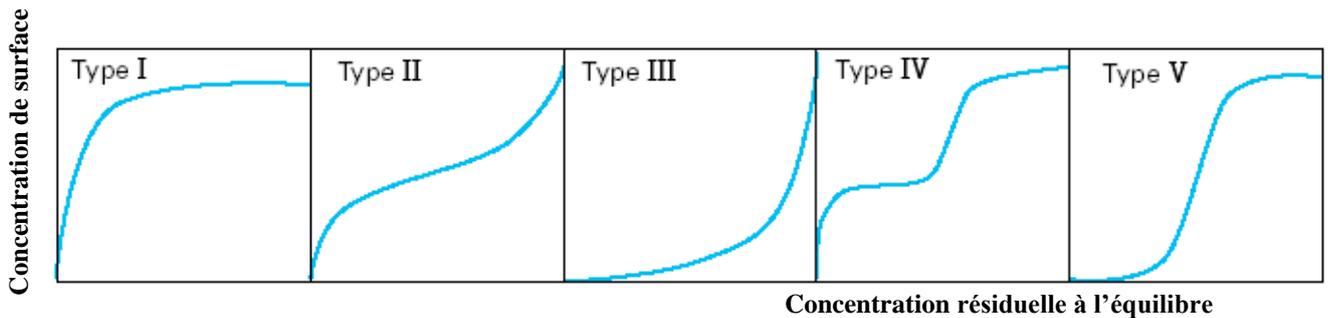


Figure 15 : Classification des isothermes d'adsorption.

- ✓ Isotherme de type I : adsorption favorable sur des solides microporeux. La quantité adsorbée est importante même pour de faibles concentrations de polluant.
- ✓ Isothermes de type II et III : elles sont généralement observées pour des adsorbants ayant une large gamme de tailles de pores. Pour chaque système, il y a une progression continue avec la création de multicouches d'adsorption. Elle est due à une condensation capillaire dans les mésopores.
- ✓ Isothermes de type IV et V : dans ces cas, l'adsorption est dite défavorable puisqu'il faut une forte concentration de composé en phase liquide pour avoir des quantités adsorbées importantes.

### 2.1.2 Le modèle de Langmuir.

L'isotherme d'adsorption de Langmuir a été initialement établie pour modéliser l'adsorption de molécules gazeuses par un matériau solide. Elle a été par la suite appliquée à l'adsorption de molécules en solution. Son expression est obtenue à partir d'une équation de conservation du nombre total de sites et de la constante d'un équilibre d'adsorption. L'hypothèse en matière d'adsorption est que le nombre de sites d'adsorption « S », à la surface d'un solide devient occupé par l'adsorbat de la solution «  $C_{\text{éq}}$  ». En employant une stoechiométrie 1:1, l'équation de Langmuir est obtenue à partir de l'équilibre suivant :



où «SC» constitue l'adsorbat sur un site d'absorption. La constante d'équilibre pour la réaction précédente peut être représentée par la relation suivante :

$$[SC] / [S] [C_{\text{éq}}] = b$$

(1)

où « b » correspond à la constante d'équilibre de la réaction. Avec comme hypothèse que le nombre de sites d'absorption total «ST» est fini, l'expression ci-dessous peut alors être employée :

$$[ST] = [S] + [SC]$$

(2)

En combinant les équations (1) et (2), la relation mathématique suivante est obtenue :

$$[SC] = b [ST] [C_{\text{éq}}] / (1 + b [C_{\text{éq}}])$$

(3)

En définissant la concentration de surface « q » par l'expression ci-dessous :

$$q = [SC] / \text{masse d'adsorbant}$$

(4)

$$q_{\text{max}} = [ST] / \text{masse d'adsorbant}$$

(5)

Le modèle de l'isotherme de Langmuir repose néanmoins sur les hypothèses suivantes :

- l'équilibre de l'adsorption s'établit jusqu'à la formation d'une monocouche ;
- la matrice est composée de sites d'adsorption tous équivalents et qui se répartissent de manière uniforme à sa surface ;
- l'énergie d'adsorption qui régit les équilibres d'échanges microscopiques de chaque site est identique et indépendante de l'état d'occupation des sites voisins ;
- les espèces adsorbées interagissent avec un seul site.

Le principal inconvénient associé à l'utilisation de ce modèle est que d'un point de vue théorique, il ne s'applique qu'à un milieu où la force ionique, le pH et les concentrations des ligands sont constants. Par ailleurs, la présence d'un seul type de site d'adsorption n'est pas toujours vraie.

### 2.1.3 Autres modèles mathématiques.

Le modèle de Langmuir n'est pas le seul à être utilisé par les auteurs travaillant dans le domaine de la biosorption. Le modèle de Freundlich<sup>69</sup> est également souvent développé. Ce dernier tient compte de l'éventualité de plusieurs sites d'adsorption mais son équation mathématique, basée sur un modèle empirique, ne permet pas de travailler en conditions saturantes car l'adsorption est mathématiquement infinie ce qui est expérimentalement impossible. Ce modèle empirique s'appuie sur la représentation mathématique suivante :

$$q = m [M]^n$$

(6)

La comparaison des modèles de Langmuir et Freundlich a fait l'objet de nombreux travaux<sup>70,71</sup> ; il est difficile de conclure quant à la meilleure modélisation car elle est fonction du biosorbant et des conditions opératoires.

D'autres modèles mathématiques sont parfois signalés dans la littérature. Souvent plus complexes, ils demeurent moins utilisés. Ils résultent parfois de modèles existants comme celui de Reddlich-Peterson<sup>72</sup> qui découle du modèle de Freundlich, ou celui proposé par Sips<sup>73</sup> qui découle de la combinaison des modèles de Langmuir et Freundlich. D'autres traduisent des phénomènes différents en permettant l'étude d'une adsorption en multicouches<sup>74</sup> ou indépendante de la température.<sup>75</sup>

## 2.2 Aspects thermodynamiques.

La notion de thermodynamique est très importante en chimie car cette science s'intéresse au bilan énergétique des réactions. Le phénomène de biosorption est le plus souvent décrit par les auteurs au travers de la capacité maximale de rétention et par l'affinité. Cette dernière traduit l'état d'équilibre d'adsorption et permet de calculer l'énergie mise en jeu lors du processus de biosorption. Le Tableau 4 donne quelques exemples de grandeurs thermodynamiques calculées au cours de la biosorption d'ETM par les écorces. Les valeurs négatives de l'énergie libre traduisent un phénomène spontané de l'adsorption. Cependant, l'enthalpie, représentant l'énergie mise en jeu lors de la réaction, peut être négative (phénomène endothermique) ou positive (phénomène exothermique). Les valeurs de l'entropie sont pour leur part très faibles.

Tableau 4 : Exemples de grandeurs thermodynamiques de l'adsorption de cations métalliques sur les écorces.

Biosorbants	Cations métalliques	T (K)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/mol/K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	Références bibliographiques
<b>Ecorces d'acacia</b> <i>Acacia leucocephala</i>	Cd <sup>2+</sup>	303	-1,892	-0,032	-11,588	41
		313	-2,198	-0,032	-12,214	
		323	-2,522	-0,032	-12,858	
<b>Ecorces d'acacia</b> <i>Acacia leucocephala</i>	Pb <sup>2+</sup>	303	-3,876	-0,057	-21,147	41
		313	-4,379	-0,057	-22,220	
		323	-4,997	-0,057	-23,408	
<b>Ecorces de pin</b> <i>Pinus brutia Ten</i>	Pb <sup>2+</sup>	293	-3,080			71
		303	-3,250	0,017	1,970	
		313	-3,420			
<b>Ecorces d'acacia</b> <i>Acacia leucocephala</i>	Ni <sup>2+</sup>	203	-6,147			76
		313	-6,945	-0,055	10,389	
		323	-7,847			
<b>Ecorces d'eucalyptus</b>	Cr <sup>3+</sup>	333	-0,737			77
		343	-1,850	0,101	33,00	



## **Chapitre 3 : La phytoremédiation.**



Si la biosorption des ETM est un phénomène passif, la phytoextraction est un phénomène actif présent chez les plantes. Le stress métallique engendré par la présence de polluants dans l'environnement implique une adaptation des végétaux afin de résister à cette contamination. Les stratégies de défense permettent aux plantes de coloniser la plupart des anciens sites miniers ou des friches industrielles. Celles qui s'y développent sont parfois capables de stocker les ETM à des teneurs élevées : elles sont alors qualifiées d'hyperaccumulatrices. Les plantes développent des stratégies de décontamination à différents niveaux comme la phytostabilisation, la phytovolatilisation, voire dans certains cas, la phytodégradation des composés organiques (Figure 16).

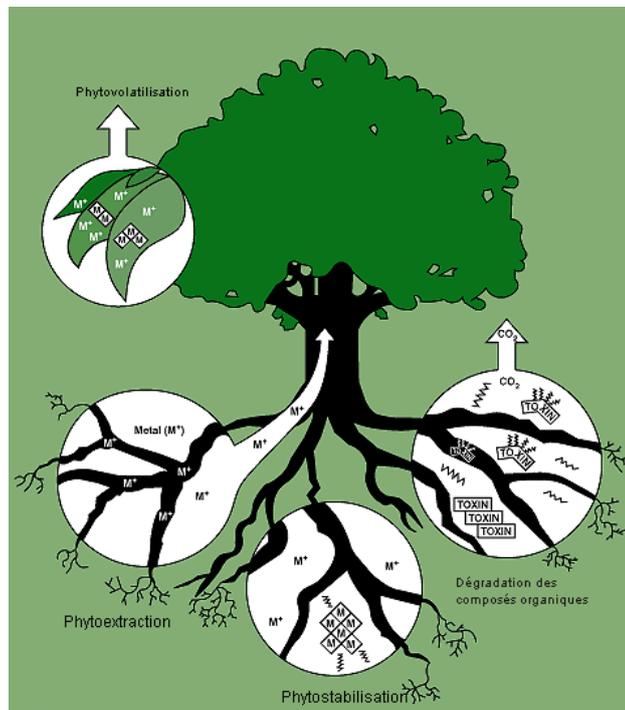


Figure 16 : Schéma des différentes stratégies de décontamination d'un sol pollué grâce à un arbre.<sup>78</sup>

(source : <http://taste.versailles.inra.fr>)

# 1 Les techniques de réhabilitation des sols.

## 1.1 La phytoremédiation.

### 1.1.1 La phytoextraction.

La phytoextraction est l'utilisation de végétaux qui peuvent absorber les ETM ou les polluants organiques du sol et les accumuler dans différents organes, notamment dans les parties aériennes.<sup>79</sup> Cette technique peut être améliorée en ajoutant des amendements au sol pour augmenter la biodisponibilité et l'absorption des contaminants par les plantes : ce sont des agents chélatants ou acidifiants. L'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) est très efficace pour améliorer la phytoextraction du Cd mais aussi du Pb, Cu, Ni et Zn. D'autres chélateurs sont plus spécifiques du Cd : c'est le cas de l'acide nitrilotriacétique (NTA). Des acides organiques comme l'acide citrique, l'acide malique ou l'acide oxalique<sup>80</sup> sont aussi utilisés, mais ils semblent moins efficaces. Cependant, le choix des plantes doit être effectué en fonction des objectifs de la phytoextraction : l'utilisation d'espèces à feuilles caduques par exemple peut conduire à un retour au sol des ETM qu'elles ont absorbés. Pour être efficaces, les plantes mises en œuvre dans le cadre de la phytoextraction doivent présenter une croissance rapide et accumuler de fortes quantités d'ETM dans les parties aériennes.<sup>81</sup>

Les avantages de la phytoextraction sont multiples. Outre l'aspect esthétique évident, les végétaux introduits permettront de limiter la dispersion des ETM par érosion éolienne et lessivage. L'utilisation de végétaux hyperaccumulateurs et donc l'extraction des polluants au cours du temps permet le retour d'une vie fongique, bactérienne et finalement le retour d'autres espèces végétales plus sensibles aux contaminations. Un autre intérêt de la phytoextraction est la simplicité de sa mise en œuvre. Cela se traduit par un coût très faible de traitement pour la gestion de grandes superficies.

Comme toute technique, la phytoextraction présente quelques limites. Le processus peut être considéré comme long et prend plusieurs années : c'est un réel handicap lors qu'un site doit être réhabilité rapidement pour une utilisation nouvelle. De plus, il est souvent difficile de récupérer les éléments en profondeur. En effet, la croissance et le développement racinaire sont ralentis sur un substrat contaminé. Par ailleurs, il est peu fréquent de rencontrer un sol contaminé par un seul élément qui plus est réparti de manière homogène. La nature des pollutions observées tout comme la concentration des polluants est souvent complexe. La phytoextraction est plus adaptée pour des sols moyennement et faiblement contaminés.

Les ETM accumulés par les plantes peuvent être récupérés par incinération de la matière végétale dans la limite où les conditions ne conduisent pas à la volatilisation des éléments.<sup>82</sup> Des travaux effectués notamment sur l'extraction du nickel par *Streptanthus polygaloides* à grande échelle mettent en avant à la fois la valorisation de la biomasse par combustion et transformation en électricité, et la récupération du métal suite à la combustion de la biomasse.<sup>83</sup> Cette étude compare cette culture à une culture traditionnelle de blé sur des terres arables et montre une plus forte rentabilité pour la phytoextraction. Cette technique pourrait s'avérer d'autant plus rentable que l'ETM récupéré est coûteux, ce qui est le cas pour l'or par exemple.

### 1.1.2 Autres techniques de phytoremédiation.

Ainsi qu'en atteste la Figure 16, les techniques de phytoremédiation sont multiples et comprennent : la phytostabilisation, la phytodégradation et la phytovolatilisation. **La phytostabilisation** diminue la fraction échangeable des ETM en stockant le contaminant dans le système racinaire ou en favorisant son insolubilisation dans la rhizosphère. Elle limite l'érosion et le lessivage du sol. Ce n'est pas une dépollution au sens strict car elle ne permet pas d'extraire le contaminant mais cette technique est utilisable sur des sites pour lesquels les autres méthodes ne sont pas applicables. Comme pour la phytoextraction, l'efficacité de cette technique peut être améliorée par l'apport d'amendements au sol qui vont immobiliser les contaminants ; on parle alors de **phytostabilisation aidée**.<sup>84</sup> Cette technique est utilisée lorsque les sols sont fortement contaminés ou que la phytoextraction serait très longue. Au final, la mobilité du contaminant et son entrée dans la chaîne alimentaire sont réduites, et le couvert végétal va permettre d'accélérer le processus d'atténuation naturelle du sol.<sup>85</sup> **La phytodégradation** (ou rhizodégradation), correspond à la dégradation des polluants organiques dans la plante elle-même ou grâce aux microorganismes associés aux plantes dans leur rhizosphère ou dans leurs racines (mycorhizes, endophytes bactériens). Les plantes peuvent dégrader des composés organiques grâce à leurs enzymes ; dans certains cas, la dégradation peut avoir lieu dans les parties aériennes. Ces dernières contribuent différemment à l'élimination de certains composés par **phytovolatilisation**. Dans ce cas, les contaminants sont relargués dans l'atmosphère ; il peut s'agir d'éléments minéraux tels que le sélénium et le mercure<sup>79</sup>. Par ailleurs, une autre technique s'est développée ces dernières années reposant sur l'activité racinaire des plantes : **la rhizofiltration**. Elle est basée sur la capacité des systèmes racinaires de certains végétaux à prélever et/ou dégrader les polluants à partir d'un milieu

liquide. Cette méthode s'applique dans les zones humides, artificielles ou naturelles, et pour des plantes telles que les roseaux dont les racines supportent la vie en milieu aquatique.

Enfin, citons une technique, **l'atténuation naturelle**, qui consiste à laisser réduire la toxicité des contaminants par dilution, dispersion, biodégradation, sorption, échange d'ions, complexation, compétition, humification et volatilisation, en laissant l'écosystème contaminé réagir sans intervention. Elle est basée sur les capacités du milieu à se remédier seul, c'est la résilience. Cette technique est de loin la moins coûteuse mais très lente et peu efficace à moyen terme.

## 1.2 Approche chimique et physique.

Il existe également des techniques physiques, comme **l'excavation**, qui consiste à enlever la couche de sol contaminé et à la déposer ailleurs. Cette méthode n'est pas une décontamination mais un déplacement de la zone contaminée. **La solidification** est l'ajout au sol d'un élément de cimentation pour former un matériel non poreux, non lessivable et solide<sup>86</sup>. Le même résultat peut être obtenu en chauffant le sol pour le transformer en verre (vitrification). **L'encapsulation** ou la couverture du sol (capping) consiste à recouvrir le sol contaminé avec une couche imperméable. Dans certains cas, le labourage des horizons profonds est effectué afin de mélanger les couches superficielles contaminées avec les couches profondes non contaminées ; cette méthode consiste en une dilution de la contamination.

Par ailleurs, des techniques chimiques existent : souvent considérée à éviter, **la lixiviation** (washing) consiste à lessiver les contaminants de manière contrôlée à l'aide de chélateurs. **L'immobilisation** des contaminants dans le sol est réalisée par l'apport d'amendements qui provoque des réactions de précipitation, d'échange d'ions et d'adsorption sur les colloïdes du sol.<sup>87</sup> Les modifications du pH sont essentielles car la solubilité des cations diminue quand le pH augmente. Le chaulage peut donc être une technique efficace : les cations précipitent sous forme d'hydroxydes ou carbonates. Cependant, ces techniques présentent de nombreux inconvénients : elles sont souvent difficiles à mettre en place, coûteuses, destructrices pour les écosystèmes et ne permettent pas la récupération des éléments.

## 2 Le cadmium et les plantes.

De manière générale, ce sont les racines (zone en contact avec la contamination) qui accumulent les ETM. Les parties reproductrices (fleurs, fruits, graines) sont généralement épargnées et les autres parties aériennes (tiges et feuilles) contribuent de manière intermédiaire à l'accumulation des ETM. Lorsque les ETM parviennent jusqu'aux parties aériennes, ils peuvent être stockés préférentiellement dans les feuilles âgées<sup>88</sup> au détriment des feuilles jeunes voire dans certains cas au niveau des trichomes.<sup>89</sup>

Après leur absorption par les plantes, les cations métalliques se fixent dans un premier temps au niveau des parois cellulaires ; c'est pourquoi une grande partie n'est pas transportée jusqu'aux parties aériennes et restent dans les parties souterraines. Cependant, de grandes différences existent d'une espèce à l'autre. Si la majorité des plantes concentre les ETM dans les racines, certaines ont la particularité de les véhiculer vers les parties aériennes et de les accumuler à de fortes teneurs. Pour les plantes dont ces dernières dépassent  $1 \text{ mg.g}^{-1}$  de matière sèche, on parle de plantes hyperaccumulatrices.<sup>90</sup> Cependant des exceptions existent : dans le cas du cadmium, une plante est dite hyperaccumulatrice si la teneur en Cd dépasse  $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$  de matière sèche. Ces espèces sont rares (environ 450), certaines sont spécifiques d'un seul élément, d'autres de plusieurs, et présentent généralement une production de biomasse faible car elles utilisent leur énergie dans des mécanismes de défense contre les ETM.

### 2.1 L'absorption des ions par les plantes.

Pour se développer, les plantes ont besoin de macroéléments tels que l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium, le soufre mais également d'oligoéléments comme le fer, le zinc, ou le cuivre... L'absorption des nutriments par les plantes est effectuée au niveau racinaire. Les plantes ont développé des mécanismes très spécifiques pour absorber, déplacer et stocker ces éléments nutritifs. Bien que le mécanisme de l'absorption des ions par les plantes soit un phénomène sélectif, il est souvent constaté une adsorption de certains contaminants en surface des racines et des cellules comme les ETM non essentiels, c'est le cas du Cd. Les mécanismes de l'absorption par les plantes reposent sur :

- ✓ **la diffusion simple** : les ions empruntent les canaux ioniques et passent au travers de la membrane, entraînés par un gradient de concentration, ce qui limite la concentration maximale possible de l'ion à l'intérieur de la cellule ;
- ✓ **le transport facilité** qui requiert la présence de transporteurs membranaires sélectifs. La vitesse de transport des ions au travers de la membrane est augmentée mais limitée par le nombre de transporteurs disponibles ;
- ✓ **le transport actif** permet de transporter les ions. Un tel mécanisme est énergétiquement coûteux pour la plante. Il nécessite la consommation de molécules d'ATP (adénosine triphosphate). L'absorption de Cd par les plantes non-accumulatrices est considérée comme opportuniste. Dans ce cas, le Cd emprunte les transporteurs spécifiques des ions  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$ , ou via les canaux calciques<sup>91</sup>. Quelques exemples de transporteurs peuvent être cités comme ceux de la famille ZIP qui permettent le transport des éléments de transition<sup>92</sup> comme le Fe(II), le Zn, le Mn et le Cd.<sup>93</sup>

Un autre mode d'absorption au niveau foliaire est possible, notamment lors de retombées atmosphériques. Cependant, dans le cas de l'absorption des ETM, ce processus reste limité sauf dans des zones situées à proximité de complexes métallurgiques et demeure largement controversé. Les ETM pénétreraient dans les plantes au niveau des stomates ou de la cuticule des feuilles.<sup>94</sup>

## 2.2 Cas de l'accumulation du Cadmium.

### 2.2.1 Toxicité.

L'accumulation du cadmium dans les plantes induit des stress à différents niveaux. Sur le plan visuel, un ralentissement de la croissance, une chlorose voire une coloration brunâtre des feuilles, des taches rougeâtres sur les tiges, des nécroses pouvant entraîner la mort des individus, sont observables. Une diminution de la nutrition minérale<sup>95</sup> est parfois identifiable lors de l'exposition à des teneurs élevées de Cd ; en effet, le cadmium entre en compétition avec des oligoéléments. Dans le cas de teneurs plus faibles, les changements au niveau du métabolisme cellulaire sont fréquemment observés avant l'apparition de symptômes visuels. La photosynthèse et la respiration cellulaire sont alors altérées.<sup>95</sup>

L'activité des enzymes a été utilisée afin d'évaluer la toxicité des ETM.<sup>96</sup> L'un des principaux effets toxiques des ETM est le stress oxydatif.<sup>97</sup> Une étude effectuée sur *Phaseolus vulgaris* L. exposé en condition naturelle à une concentration de 2  $\mu$ M en cadmium a montré qu'une telle contamination suffisait à induire un stress oxydatif.<sup>98</sup> Même si les espèces

réactives de l'oxygène (ROS) sont formées au cours du métabolisme normal des plantes (lors de la réduction incomplète de l'oxygène au cours de la respiration), l'augmentation, et leur concentration intracellulaire est souvent accrue par des stress comme la sécheresse, la salinité, les rayonnements UV, les chocs thermiques ou la présence d'ETM dans le milieu<sup>99</sup>... Les formes réactives de l'oxygène ( $O_2^{\cdot -}$  : radical superoxyde,  $HO_2^{\cdot}$  : radical perhydroxyle,  $HO^{\cdot}$  : radical hydroxyle, des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène...) sont de puissants agents oxydants capables d'altérer l'activité enzymatique, de perturber le métabolisme végétal (photosynthèse et respiration), d'oxyder les protéines, d'altérer les membranes cellulaires via le phénomène de peroxydation lipidique, d'endommager l'ADN et ainsi de générer des dommages irréversibles pouvant conduire à la mort cellulaire.<sup>100</sup> Pour ces raisons, les ROS sont généralement considérées comme des entités phytotoxiques et il est reconnu que leur accumulation joue un rôle dans la mort des cellules végétales.<sup>101</sup> Par ailleurs, il a été montré<sup>102</sup> que la présence de ROS, et notamment de  $H_2O_2$ , joue le rôle de signalisation de l'attaque d'un pathogène et induit la lignification des parois cellulaires. Le rôle des ETM dans la formation de ROS peut être lié à une de leur propriété qui est d'exister sous plusieurs états d'oxydation pour certains d'entre eux. Cependant, le cadmium, qui n'existe qu'à l'état d'oxydation (II), pourrait induire une accumulation des ROS en perturbant certaines voies métaboliques ou en inactivant des enzymes du système antioxydant, contribuant ainsi à l'épuisement des réserves cellulaires de molécules antioxydantes.<sup>103</sup>

### 2.2.2 Les mécanismes de tolérance.

Si le cadmium induit la production de ROS, les plantes ont développé des mécanismes de défense spécifiques et appropriés. Trois enzymes jouent un rôle fondamental dans la détoxification ; il s'agit des **superoxydes dismutases, des catalases et des peroxydases**.<sup>104</sup> Ces enzymes ont des actions complémentaires et permettent la dégradation des ROS en eau et dioxygène. Outre l'élimination des ROS susceptibles de se former, certains végétaux ont développé d'autres mécanismes de tolérance et en particulier la chélation ou la complexation des ETM. Les principaux ligands intracellulaires sont des ampholytes organiques ou de petits peptides chélateurs comme les **métallothionéines (MT)** et les **phytochélatines**<sup>105</sup> (PCs). Les PCs (Figure 17) sont riches en cystéine et leur synthèse est effectuée à partir du glutathion par la phytochélatine synthase en présence d'ETM.<sup>106</sup>

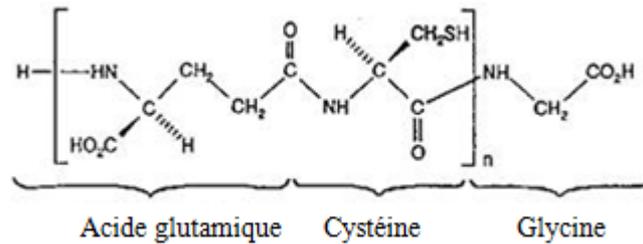


Figure 17 : Structure d'une phytochélatine,  $2 < n < 11$ .

La complexation des métaux par les PCs permet de réduire la toxicité des ions métalliques en diminuant leur concentration libre et donc la possibilité d'activer la production de ROS. L'hypothèse de leur implication dans les processus de tolérance vient d'une observation expérimentale concernant leur accumulation chez de nombreuses plantes en réponse à une contamination en ETM dont le Cd, leur accumulation a été montrée au laboratoire chez *Arabidopsis thaliana*.<sup>107</sup> Les MT sont des protéines caractérisées par leur richesse en cations métalliques comme le Cu et le Zn ; par ailleurs, elles présentent de fortes proportions en résidus cystéiques comme les PCs. De nombreuses études ont montré que les MT peuvent être impliquées dans le processus de détoxification des ETM.<sup>108</sup> Cependant, elles ne constituent probablement pas une réponse significative puisque ces protéines s'accumulent également dans le cas d'autres stress. **Les acides organiques** (acide citrique, acide oxalique...) participent également à la chélation des ETM. En effet, leur synthèse est stimulée en présence d'ETM. Ces molécules sont clairement impliquées dans les processus de détoxification.<sup>109</sup> Il a été montré également dans certains cas une accumulation **d'acides aminés** libres comme la proline ou la cystéine en réponse à un stress métallique<sup>110</sup>.

Par ailleurs la vacuole est largement décrite pour être le siège du dépôt des substances nocives à la vie cellulaire ; c'est pourquoi une des hypothèses les plus fréquemment rencontrées est la compartimentation des éléments métalliques sous forme ionique dans la vacuole (Figure 18). En effet, ces derniers, complexés par les PCs, sont transportés jusqu'à la vacuole où ils seront pris en charge par les acides organiques après dissociation des complexes.<sup>111</sup> Les transporteurs peuvent également jouer un rôle dans la remobilisation des éléments en cas de carences.

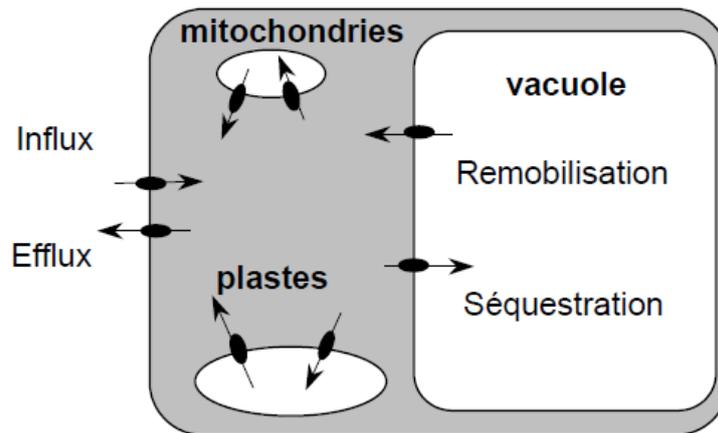


Figure 18 : Rôle des transporteurs de métaux à l'échelle cellulaire.<sup>112</sup>

Une approche différente et complémentaire présentée par certains auteurs a permis d'évaluer les différentes variations engendrées au niveau de la composition chimique des différents constituants des végétaux. Au niveau des pigments, une étude effectuée sur *Arabis paniculata* F. a mis en évidence une diminution de la quantité de pigments<sup>113</sup> (chlorophylle et caroténoïdes) lorsque la teneur en cadmium augmente dans le substrat. Par ailleurs, les ETM entrent en compétition avec les oligoéléments ce qui se traduit par une diminution de leur teneur<sup>114</sup> ; cependant en culture hydroponique, aucune modification n'est observée.

Concernant la phytoextraction par les arbres, les réponses sont variables d'une espèce à l'autre<sup>115</sup>. Le développement des racines vers des zones où les teneurs en ETM sont plus faibles est démontré sur le sycomore<sup>116</sup> et le ralentissement de leur développement est observé chez le mélèze<sup>107</sup>. Par ailleurs, les réponses en fonction de l'âge des arbres ou la durée d'exposition sont différentes. Une étude<sup>117</sup> effectuée sur des gymnospermes (épicéa et pin sylvestre) et angiospermes a montré une diminution de la quantité de polysaccharides non structuraux comme l'amidon et une modification des hémicelluloses. Les hémicelluloses sont dans cette étude prises en compte non pas pour leur rôle structural mais pour leur fonction de polysaccharide de réserve<sup>118</sup> lors du débourrage des bourgeons (lorsque la photosynthèse est moins active). Concernant les sucres circulants, même si leur quantité diminue lorsque les teneurs en ETM augmentent dans le sol, une augmentation<sup>119</sup> du taux de galactose est observée chez *Populus nigra* L..

### 2.2.3 Plantes étudiées.

Depuis de nombreuses années, l'utilisation des plantes accumulatrices ou hyperaccumulatrices est largement étudiée. Cependant, le cadmium est un élément pour lequel très peu d'espèces hyperaccumulatrices sont recensées. Il est souvent difficile de comparer les résultats publiés entre eux du fait d'une grande variabilité de conditions expérimentales comme les cultures sur sites, en pots, hydroponiques, *in vitro*... Parmi les exemples de plantes hyperaccumulatrices de Cd, la littérature recense *Thlaspi caerulescens*<sup>120</sup>, *Arabidopsis halleri*<sup>121</sup>, *Solanum nigrum*.<sup>122</sup>

Par ailleurs, l'utilisation d'arbres pour la phytoextraction suscite un attrait croissant. Les arbres présentent des caractéristiques physiologiques intéressantes comme un système racinaire développé permettant de décontaminer les sols en profondeur et en produisant une biomasse importante qui permettrait finalement l'accumulation de grandes quantités d'ETM même chez les espèces faiblement accumulatrices. Une étude effectuée sur douze espèces d'arbres<sup>123</sup> a montré des différences significatives de teneur dans les différents compartiments de l'arbre ; en accumulant jusqu'à 116 µg de cadmium par gramme de matière sèche, les bouleaux et les peupliers semblent être les meilleurs candidats. La répartition est inégale en fonction des tissus. Au niveau des parties aériennes, le cadmium s'accumule préférentiellement dans les feuilles, puis viennent les écorces et dans une moindre mesure le bois. Dans un but d'améliorer la comparaison entre les différents travaux, certains auteurs présentent les résultats sous forme de rapport entre la quantité d'ETM fixée par la plante (en mg.kg<sup>-1</sup>) et la quantité d'ETM dans le sol (en mg.kg<sup>-1</sup>) ; il est appelé facteur de bioconcentration. Cependant, ce facteur dépend également des conditions opératoires (Tableau 5) : en effet, en fonction des teneurs dans le sol, le facteur est plus ou moins élevé.

Tableau 5 : Exemples de quelques facteurs de bioconcentration d'arbres vis-à-vis du Cd.

Plantes	Facteur de bioconcentration	Références bibliographiques
<i>Salix viminalis</i>	2,8	124
<i>Salix viminalis</i>	Tiges : 2,9 - 16,8 Feuilles : 4,8 - 27,9	125
<i>Betula pendula</i>	Tiges : 0,11 Feuilles : 0,06	126

**Chapitre 4 : Stratégie de modification des biosorbants  
induite par voie biologique et chimique.**



# **1 Modification chimiques des biosorbants.**

Les propriétés naturelles des biosorbants ont été mises en évidence précédemment. Le phénomène de biosorption est lié à la composition chimique du matériau utilisé. C'est pourquoi certains auteurs ont souhaité modifier les biosorbants pour leur conférer de nouvelles propriétés. Le relargage de composés solubles dans l'eau au cours de l'adsorption, le gonflement du matériau, la sélectivité vis-à-vis d'un ion d'intérêt ou l'optimisation des capacités de rétention sont autant d'objectifs qui ont largement orienté les stratégies de modification. De plus, la présence d'autres cations présents sur les biosorbants (dans la plupart des cas des oligoéléments comme le calcium, le sodium...) naturellement fixés sur des sites échangeurs d'ions contribue à une diminution des capacités de rétention du fait de l'occupation des sites,<sup>127</sup> ce qui a conduit certains auteurs à éliminer les oligoéléments avant l'utilisation d'un matériau en tant que biosorbant.

## **1.1 Modification de polymères purifiés.**

Certains auteurs se sont attachés à augmenter le nombre de fonctions acide carboxylique démontrant ainsi une relation de proportionnalité entre leur nombre et la quantité d'ions fixés<sup>128</sup> ; ce constat est valable lorsque l'adsorption est exclusivement due aux fonctions acide carboxylique et de même acidité dans le cas de matériaux homogènes tels que la cellulose. Le Tableau 6 propose quelques exemples de modifications de polymères naturels en vue de leur utilisation en tant qu'adsorbants.

**Tableau 6 : Exemples de modifications chimiques de quelques familles de polymères en vue d'une utilisation pour adsorption des cations métalliques.**

<b>Matériau</b>	<b>Traitement</b>	<b>Cations métalliques</b>	<b>q<sub>max</sub> (méq.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Références bibliographiques</b>
<b>Cellulose</b>	1) acide succinique, 2) NaHCO <sub>3</sub>	Pb <sup>2+</sup>	2,71	128
		Cd <sup>2+</sup>	2,92	
	1) NaOH, 2) acide succinique, 3) NaHCO <sub>3</sub>	Pb <sup>2+</sup>	4,61	
		Cd <sup>2+</sup>	4,46	
<b>Tanins de mimosa</b>	Condensation par CHO	Pb <sup>2+</sup>	0,60	129
		Cd <sup>2+</sup>	0,30	
<b>Tanins de Valonia</b>	Condensation par CHO	Pb <sup>2+</sup>	0,91	129
		Cd <sup>2+</sup>	0,65	
		Pb <sup>2+</sup>	0,91	
<b>Pectines de pulpe de betterave</b>	Gélification par CaCl <sub>2</sub>	Cd <sup>2+</sup>	0,81	131
		Pb <sup>2+</sup>	0,96	
<b>Lignine de noix de palmier à huile</b>	1) Extraction par la soude, 2) précipitation par H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Cu <sup>2+</sup>	0,25	132

Une revue a été consacrée aux modifications chimiques de la cellulose et des biosorbants qui en découlent.<sup>133</sup> Des stratégies d'estérification, d'halogénéation, d'éthérisation, d'oxydation ont été étudiées ; la plupart d'entre elles a été transposée à des biosorbants constitués de proportions diverses de cellulose comme le bois par exemple. Sur le plan quantitatif, les résultats d'adsorption dépendent de la modification chimique réalisée tout comme du métal considéré. Ils sont par ailleurs difficilement comparables du fait d'une grande variabilité des conditions expérimentales entre les différents auteurs. Les meilleures capacités de rétention sont obtenues, dans le cas du Cd, suite au greffage d'acide acrylique ou succinique. Si la cellulose native est insoluble dans la plupart des solvants, les lignines, les tanins ou les pectines présentent de meilleures propriétés hydrophiles. De telles molécules ont des structures variées et le spectre des modifications décrites par la littérature est plus restreint. La plupart consiste à les condenser pour les rendre insolubles (cas des tanins) ou à les précipiter ou gélifier (cas des lignines ou pectines). Ces contraintes rendent leur domaine d'application plus faible du fait d'une resolubilisation partielle possible.

## 1.2 Modification des biosorbants.

Les biosorbants sont par nature des matériaux hétérogènes, c'est pourquoi les différentes modifications recensées dans la littérature affectent des fonctions chimiques ou classes de molécules particulières. Le Tableau 7 rend compte de quelques modifications de biosorbants en vue d'une amélioration de leurs propriétés vis-à-vis du plomb et du cadmium.

Tableau 7 : Exemples de modifications chimiques de quelques biosorbants et leurs capacités de rétention du plomb et/ou du cadmium.

Biosorbant	Traitement	Cations métalliques	q <sub>max</sub> (méq.g <sup>-1</sup> )	Références bibliographiques
<b>Ecorces de Monterey</b> <i>Pinus radiata</i>	CHO acidifié	Pb <sup>2+</sup>	1,04	134
		Cd <sup>2+</sup>	1,02	134
<b>Ecorces de noir d'Europe</b> <i>Pinus nigra</i>	HCl NaOH Oxydation de Fenton Chloroforme Acétone Ether diéthylique Ethanol Tétraéthylène glycol Polyacrylamide	Cd <sup>2+</sup> / Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> / Pb <sup>2+</sup>	135
			0,06 / 0,04	
			0,24 / 0,12	
			0,24 / 0,11	
			0,16 / 0,09	
			0,13 / 0,08	
			0,19 / 0,11	
			0,12 / 0,07	
<b>Bois d'épicéa commun</b> <i>Picea abies</i>	Acide succinique	Cd <sup>2+</sup>	3,54	136
<b>Pelure d'orange</b>	Isopropanol Isopropanol + NaOH Isopropanol + NaOH + acide citrique Acide citrique	Pb <sup>2+</sup>	0,68	137
			1,02	
			1,10	
			0,68	
<b>Ecorces de sapin de Douglas</b> <i>Pseudotsuga mensiezzi</i>	Acide 4,4'-diamino-2,2'-stilbene disulfonique Acide aspartique Chlorite de sodium Asparagine Acide sulfamique	Pb <sup>2+</sup>	1,81	138
			1,04	
			1,51	
		Pb <sup>2+</sup>	1,00	61
			0,77	
<b>Bois de genévrier</b> <i>Juniperus monosperma</i>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Cd <sup>2+</sup>	0,16	139
<b>Epi de maïs</b>	MeOH 1) MeOH, 2) NaOH	Pb <sup>2+</sup>	0,08	140
			0,42	
<b>Feuilles de Moringa</b> <i>Moringa oleifera</i>	1) NaOH, 2) Acide citrique	Pb <sup>2+</sup>	1,80	141

L'utilisation du formaldéhyde sur les biosorbants se justifie par la présence de tanins hydrosolubles extractibles au cours du processus de biosorption. Le formaldéhyde permet la réticulation des tanins par des liaisons éther voire C-C entre leurs cycles aromatiques, conduisant ainsi la stabilisation de la matrice organique. Les traitements par les différents acides forts ont pour rôle d'éliminer les cations constitutifs des biosorbants (les oligoéléments par exemple) et les tanins solubles, augmentant ainsi la porosité et la surface spécifique rendant les sites plus accessibles.<sup>142</sup> Les traitements par les solutions basiques permettent l'élimination d'éventuels lipides et protéines ; elles permettent également d'augmenter l'accessibilité des sites échangeurs d'ions et donc d'augmenter les forces d'interaction, ce qui se traduit par une amélioration de l'affinité.<sup>143</sup> Les traitements par des solvants organiques ont pour but d'extraire certains composés comme les tanins, les sucres circulants... Les acides carboxyliques ou leurs dérivés (citrique ou succinique) sont utilisés afin d'estérifier les polysaccharides. Leur rôle est double : d'une part, la présence de plusieurs fonctions acide carboxylique permet de réticuler les chaînes entre elles, et d'autre part, d'augmenter le nombre de sites acide carboxylique de surface grâce aux fonctions n'ayant pas réagi. L'utilisation du méthanol sur l'épi de maïs permet dans un premier temps d'estérifier les fonctions acide carboxylique. Si cette étape *a priori* est défavorable à l'augmentation du nombre de sites échangeurs d'ions, les esters ainsi formés sont saponifiés par la soude libérant de nouveau les sites acide carboxylique. Cette méthode combine deux types de modification : l'extraction par solvant organique (MeOH) effectuée lors de l'estérification et le traitement par la soude effectué lors de la saponification.

Une réaction d'oxydation sur le principe de Fenton est fréquemment employée<sup>144</sup>. Utilisée à l'origine pour la dégradation des composés organiques en solution, elle est aujourd'hui employée pour dégrader les polymères phénoliques comme les tanins et les lignines. Son principe repose sur une réaction radicalaire impliquant le radical hydroxyle produit à partir du peroxyde d'hydrogène. Les initiateurs sont variés, les plus fréquemment utilisés sont un rayonnement UV ou le fer(II) mais d'autres cations métalliques<sup>145</sup> ont été prospectés. La réaction est pH dépendante et son efficacité est fonction du ratio Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Par ailleurs, Argun *et al.*<sup>146</sup> ont montré l'évolution de la composition des écorces suite à leur oxydation. Ils notent une diminution de la proportion de composés extractibles traduisant l'efficacité de l'oxydation.

Une stratégie développée au LCSN consiste à oxyder la fraction polysaccharidique des écorces par le *periodate* de sodium qui permet la formation de fonctions aldéhyde ; ces dernières peuvent être oxydées à nouveau par action du chlorite de sodium ou forment un site d'attache à de nouvelles molécules greffées par réaction d'amination réductrice. Une telle stratégie a permis de greffer des acides aminés carboxylés et des molécules possédant des charges sulfates comme des dérivés du stilbène par exemple.

Le tableau précédent rassemble différentes classes de modification mais ces données sont loin d'être exhaustives, une étude<sup>147</sup> effectuée sur les déchets de biomasse de *Citrus reticulata* rassemble 26 modifications chimiques. En conduisant au doublement des valeurs de  $q_{\max}$ , ces dernières ne s'avèrent que d'une efficacité limitée. Joseph et *al.* proposent des modifications par fermentation<sup>148</sup> de la bagasse de canne à sucre. Les résultats obtenus conduisent à un matériau dont les capacités de rétention sont multipliées par 2,3. D'autres transformations, physiques cette fois-ci, ont été proposées comme c'est le cas pour la carbonisation de la matière végétale. Citons par exemple les coquilles de noix de Coco<sup>149</sup>, les coquilles de fruit de *Ceiba pentandra*, ou fromager<sup>150</sup>, le son de riz<sup>151</sup> ou bois divers<sup>152</sup> : les propriétés des charbons actifs obtenus sont également fonction du mode d'activation (par HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>...).

### 1.3 Intérêt des modifications.

Les biosorbants sont pour la plupart des sous-produits ou coproduits agricoles ou industriels et ont pour caractéristique majeure un faible coût à l'achat ; ils présentent également de bonnes propriétés biosorbantes par rapport à certaines résines commerciales (Tableau 8).

Tableau 8 : Exemples de capacités maximales d'adsorption du plomb et du cadmium par des résines commerciales.

Résines	cation métallique	$q_{\max}$ ( $\text{még}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Références bibliographiques
Amberlite IR 120	Pb <sup>2+</sup>	0,024	47
	Cd <sup>2+</sup>	0,010	
Dowex 50W	Pb <sup>2+</sup>	4,1	153
	Cd <sup>2+</sup>	4,8	
Amberlite IRC 718	Pb <sup>2+</sup>	0,096	154
	Cd <sup>2+</sup>	2,12	
Chelex-100	Pb <sup>2+</sup>	0,22	
	Cd <sup>2+</sup>	2,00	

Il est certain que de telles propriétés peuvent être optimisées (paragraphe 1.2. Modification des biosorbants.) ; cependant, une question se pose du point de vue de l'aspect à la fois scientifique et économique. Sur le plan méthodologique, les modifications chimiques devraient, pour être plus facilement transposables à grande échelle, répondre à des critères de chimie verte : ce pourrait être le cas des oxydations de type Fenton. Il semble difficile de valoriser des traitements par des solvants chlorés comme le chloroforme d'autant qu'il n'améliore que modérément les propriétés. L'intérêt des modifications se justifie cependant lors d'un greffage ou une estérification ; ces réactions permettent d'apporter directement sur la structure des sites échangeurs d'ions de même nature et donc de cibler la sélectivité d'un métal particulier. Cette stratégie permet l'extraction sélective d'un métal dans une solution multimétallique. De plus, les sites d'adsorption étant équivalents et plus nombreux, l'adsorption est réversible (il s'agit d'échange d'ions) ; cela permet la désorption des métaux par des solutions d'acides (HNO<sub>3</sub>) ou chélatantes (EDTA). Ces techniques, contrairement à la carbonisation ne détruisent pas le matériau et implique sa réutilisation au cours de cycles suivants. L'avantage est d'autant plus marqué que le coût de la modification est important. Lors de l'évaluation du coût d'un procédé d'adsorption, il est nécessaire de déterminer la quantité d'adsorbant requise pour respecter les objectifs du procédé. Ensuite, les coûts annuels sont répartis entre l'amortissement de l'installation, l'entretien et la maintenance, la consommation énergétique, le remplacement du biosorbant... Ces coûts sont différents en fonction du domaine d'application (échelle laboratoire ou traitement de rejet industriel). Le Tableau 9 met en avant les bons résultats obtenus pour les écorces : leur utilisation est dix fois moins coûteuse qu'une résine échangeuse d'ion et cent fois moins que la précipitation. Cependant, les installations par rapport à celles des résines doivent être surdimensionnées du fait de capacités maximales de rétention inférieures.

Tableau 9 : Exemples de coûts de récupération de plomb et cadmium par différentes techniques d'extraction.

Méthodes	$q_{\max}$ (méq.g <sup>-1</sup> )		Coût \$.g <sup>-1</sup> récupéré		Références bibliographiques
	Cd <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	
<b>Précipitation</b>	0,11	0,07	10,10	10,00	135
<b>Résine échangeuse d'ions</b>	4,82	3,91	1,64	1,74	136
<b>Ecorces HCl</b>	0,19	0,11	0,13	0,12	135
<b>Ecorces NaOH</b>	0,89	0,45	0,08	0,08	135
<b>Ecorces Fenton</b>	0,63	0,28	0,53	0,61	135

## 2 Modifications biochimiques des parois cellulaires de plantes soumises à un stress.

Lorsque les plantes sont soumises à des stress biotique ou abiotique, leurs cellules sont capables de générer des réactions métaboliques qui participent à l'adaptation et à la lutte du végétal face aux agressions extérieures. Trois catégories de réactions sont généralement distinguées : la production de protéines de défense, la stimulation de certaines voies métaboliques en réponse à la dégradation des parois par les pathogènes et celle qui fait l'objet de notre étude, la modification qualitative et quantitative des parois cellulaires.

Les attaques fongiques sont responsables de nombreuses modifications<sup>157</sup> à la fois de composition (évolution des teneurs en polymères pariétaux et de leurs teneurs monosaccharidiques) et d'organisation de la paroi des cellules végétales (épaississement et remodelage de certains polymères).

Les rayons UV causent également des dégâts sur les végétaux, ils contribuent à la dégradation des parois cellulaires, comme par exemple chez le fraisier<sup>158</sup> en favorisant la dégradation des pectines et des hémicelluloses permettant la solubilisation d'acides uroniques et/ou sucres simples.

Des études ont montré qu'un stress causé par le sel induit l'augmentation de la quantité de cellulose et induit une organisation plus anarchique des fibres de cette dernière.<sup>159</sup> De plus, l'exposition de *Cornus stolonifera* à un environnement salin induit une augmentation du contenu hémicellulosique sans modification de sa composition alors que la quantité de pectine reste constante avec, cependant, des teneurs en Gal A et Man qui diminuent.<sup>160</sup>

Concernant les ETM, même si les mécanismes de défense développés par les plantes en réaction à leur présence sont encore mal connus, la littérature propose quelques observations précieuses. Au niveau pariétal, la présence d'aluminium induit l'augmentation des taux d'hémicelluloses dans les racines de citrons<sup>161</sup> ou de blé.<sup>162</sup> Dans le cas du blé, une augmentation de la quantité en pectines et composés phénoliques est également observée.<sup>163</sup> Par ailleurs, au niveau de la fraction pectique, une augmentation du degré de méthylestérification est observée sur la suspension cellulaire de tomate.<sup>164</sup>

Concernant les capacités d'adsorption, peu d'études font état de leurs caractérisations après modification ; dans le cas de la suspension cellulaire de tomates<sup>164</sup>, la capacité d'échange cationique (CEC) diminue suite à une augmentation de la teneur en Zn, Cd, ou Pb dans le substrat de culture.



## **Deuxième partie : Résultats.**



# **Chapitre 1 : Propriétés biosorbantes des écorces brutes.**



# 1 Adsorption du plomb et du cadmium par les écorces brutes.

Les données préliminaires présentées dans l'introduction bibliographique renseignent sur les capacités naturelles des écorces à adsorber les cations métalliques. Cependant, afin de pouvoir comparer les capacités d'adsorption de différents lots d'écorces et de déterminer l'influence d'un traitement chimique sur celles-ci, il est nécessaire au préalable de fixer les conditions expérimentales de la biosorption.

## 1.1 Conditions expérimentales optimales pour la biosorption du plomb et du cadmium.

### 1.1.1 Temps de contact avec la solution métallique.

La cinétique d'adsorption du plomb et des écorces brutes est un phénomène rapide ainsi qu'en atteste la Figure 19. La saturation des écorces est obtenue après 4 heures de contact avec la solution métallique ; cependant, le temps de contact retenu est de 2 h car plus de 99% de saturation sont atteints. Ces résultats sont conformes avec ceux disponibles dans la littérature<sup>165,166</sup> et ceux déjà obtenus au laboratoire.<sup>61</sup>

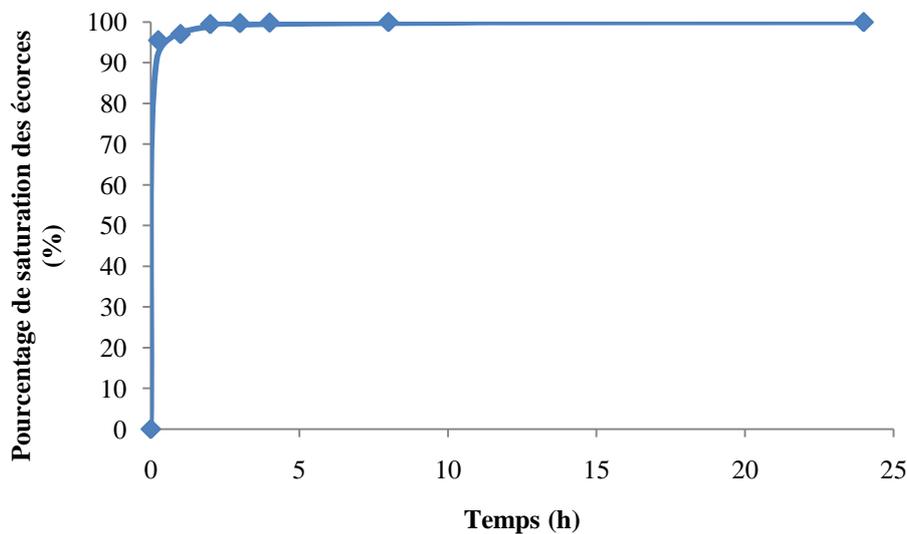


Figure 19 : Cinétique de rétention du plomb par les écorces de sapin de Douglas.<sup>61</sup>

### 1.1.2 pH de la solution métallique et nature du contre ion.

Le Tableau 10 montre un effet du pH de la solution métallique sur les capacités de rétention des écorces ; les meilleures valeurs de  $q_{\max}$  (soit 0,264  $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q}\cdot\text{g}^{-1}$  et 0,199  $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q}\cdot\text{g}^{-1}$  pour le plomb et le cadmium respectivement) sont obtenues à pH 5.

**Tableau 10 : Influence du pH sur la quantité maximale de plomb et de cadmium adsorbée par les écorces brutes de sapin de Douglas.**

pH	Plomb	Cadmium
	Quantité maximale adsorbée ( $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Quantité maximale adsorbée ( $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	0,050	0,061
3	0,122	0,113
5	0,264	0,199
7	0,030	0,099

La forme d'un élément à adsorber dépend du pH et des anions présents. Les résultats présentés dans la littérature<sup>165</sup> soulignent que des pH légèrement acides favorisent la biosorption : en effet, les métaux sont sous leurs formes cationiques. Par ailleurs, le contre ion est choisi afin de favoriser l'adsorption ; il doit donc avoir de mauvaises capacités complexantes et entrera moins en compétition avec les sites échangeurs d'ions des écorces, ce qui est le cas du nitrate. De plus, lors de la préparation des solutions à adsorber, le pH est ajusté avec de l'acide nitrique afin de préserver l'homogénéité des contre ions. Les diagrammes de spéciation présentés Figure 20 mettent en évidence que pour des pH inférieurs à 5.5, les formes  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Pb}(\text{NO}_3)^+$  prédominent dans le cas du plomb en milieu acide nitrique ; de même, dans le cas du cadmium les formes  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Cd}(\text{NO}_3)^+$  prédominent. Ainsi, pour l'ensemble des expériences, le pH est systématiquement ajusté à 5, les solutions métalliques seront formées à partir de leur sel nitrique.

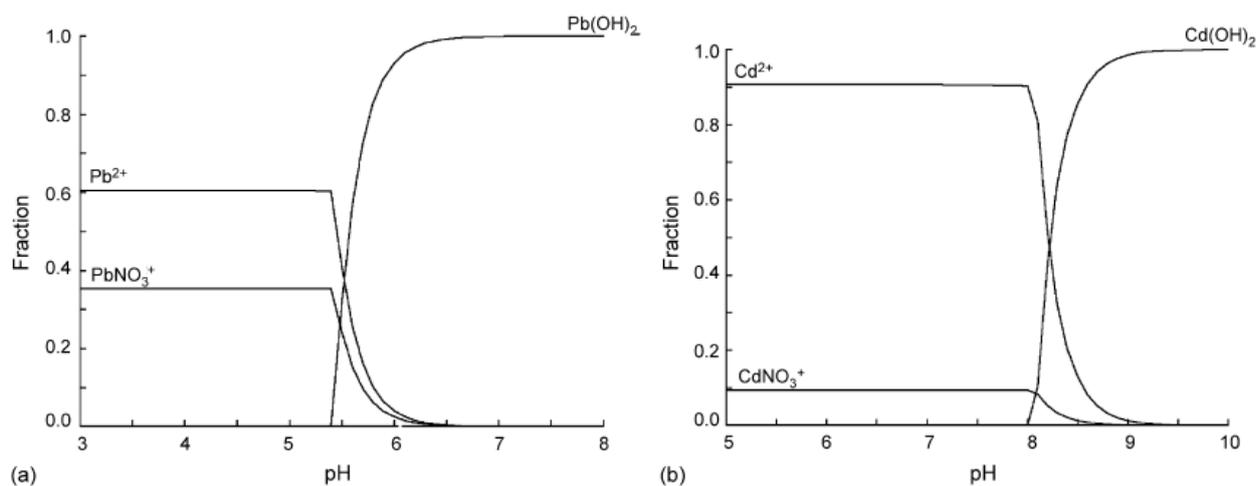


Figure 20 : Diagramme de spéciation<sup>167</sup> du plomb (a) et du cadmium (b) en présence de nitrates.

## 1.2 Les isothermes d'adsorption : une méthode de choix pour l'étude de la biosorption.

### 1.2.1 Aspect général.

La méthode des isothermes d'adsorption est l'outil sélectionné dans ces travaux pour étudier les équilibres de biosorption mis en jeu lors du contact entre les écorces et les cations métalliques. Elle constitue un moyen d'estimer aisément et rapidement la capacité de rétention maximale ( $q_{max}$ ). Les isothermes d'adsorption peuvent également être modélisées à l'aide de formules empiriques qui permettent d'accéder aux constantes caractéristiques de l'équilibre. Elles sont susceptibles de caractériser tant les aspects quantitatifs que qualitatifs de l'interaction entre les cations métalliques et les écorces. Ce dernier aspect est probablement le plus intéressant puisqu'il contribue à améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la fixation des cations métalliques par les écorces. Il donne accès aux valeurs thermodynamiques de l'adsorption et nous renseigne quant à l'énergie mise en jeu lors du processus de biosorption.

Les isothermes d'adsorption traduisent, à température constante, la relation à l'équilibre entre la concentration résiduelle de cations dans la phase aqueuse et la quantité de cations adsorbés par les écorces. Les résultats quantitatifs d'adsorption sont déterminés par la relation suivante :

$$q = \frac{C_0 - C_{\text{éq}}}{X} \quad (7)$$

Avec :

- q : capacité de rétention des cations métalliques par unité de masse d'écorces ( $\text{még} \cdot \text{g}^{-1}$ )
- $C_{\text{éq}}$  : concentration de cations métalliques à l'équilibre dans la phase aqueuse ( $\text{még} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ;
- $C_0$  : concentration initiale en cations métalliques dans la phase aqueuse ( $\text{még} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ;
- X : concentration des écorces en suspension ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Ce phénomène peut être modélisé en utilisant l'isotherme d'adsorption de Langmuir. Parmi les modèles couramment utilisés, celui de Langmuir monocomposé présente l'avantage de prévoir la saturation des écorces ; c'est la raison pour laquelle il a été choisi pour cette étude. Ce modèle suppose que la fixation des cations métalliques sur les sites d'adsorption soit un phénomène de surface conduisant à la formation d'une monocouche dans laquelle un cation métallique interagit seulement avec un seul site d'adsorption et ceci indépendamment de l'état de fixation des sites environnants. L'équation de Langmuir est décrite par la relation suivante :

$$q = \frac{q_{\text{max}} b C_{\text{éq}}}{1 + b C_{\text{éq}}} \quad (8)$$

où  $q_{\text{max}}$  ( $\text{még} \cdot \text{g}^{-1}$ ) est la capacité de rétention maximale des cations métalliques traduisant la concentration de surface maximale des sites d'adsorption et  $b$  ( $\text{L} \cdot \text{még}^{-1}$ ) est la constante de Langmuir. Cette dernière est liée à l'état d'équilibre par la loi d'action de masse. La constante d'équilibre  $b$  est fonction de l'énergie d'adsorption. Elle reflète dans ce cas l'affinité de l'écorce pour un type de cation métallique. Les valeurs des paramètres  $q_{\text{max}}$  et  $b$  sont déterminées graphiquement à partir de la représentation en doubles inverses de l'équation précédente :

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{b q_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{C_{\text{éq}}} + \frac{1}{q_{\text{max}}} \quad (9)$$

### 1.2.2 Résultats.

La mise en œuvre du procédé de biosorption suppose l'établissement d'une interaction entre cations métalliques et écorces. Des expériences d'isothermes monocomposées ont été réalisées à différentes températures pour le plomb et le cadmium (Figure 21). Les isothermes obtenues sont d'allure hyperbolique et mettent en évidence un pallier de saturation.

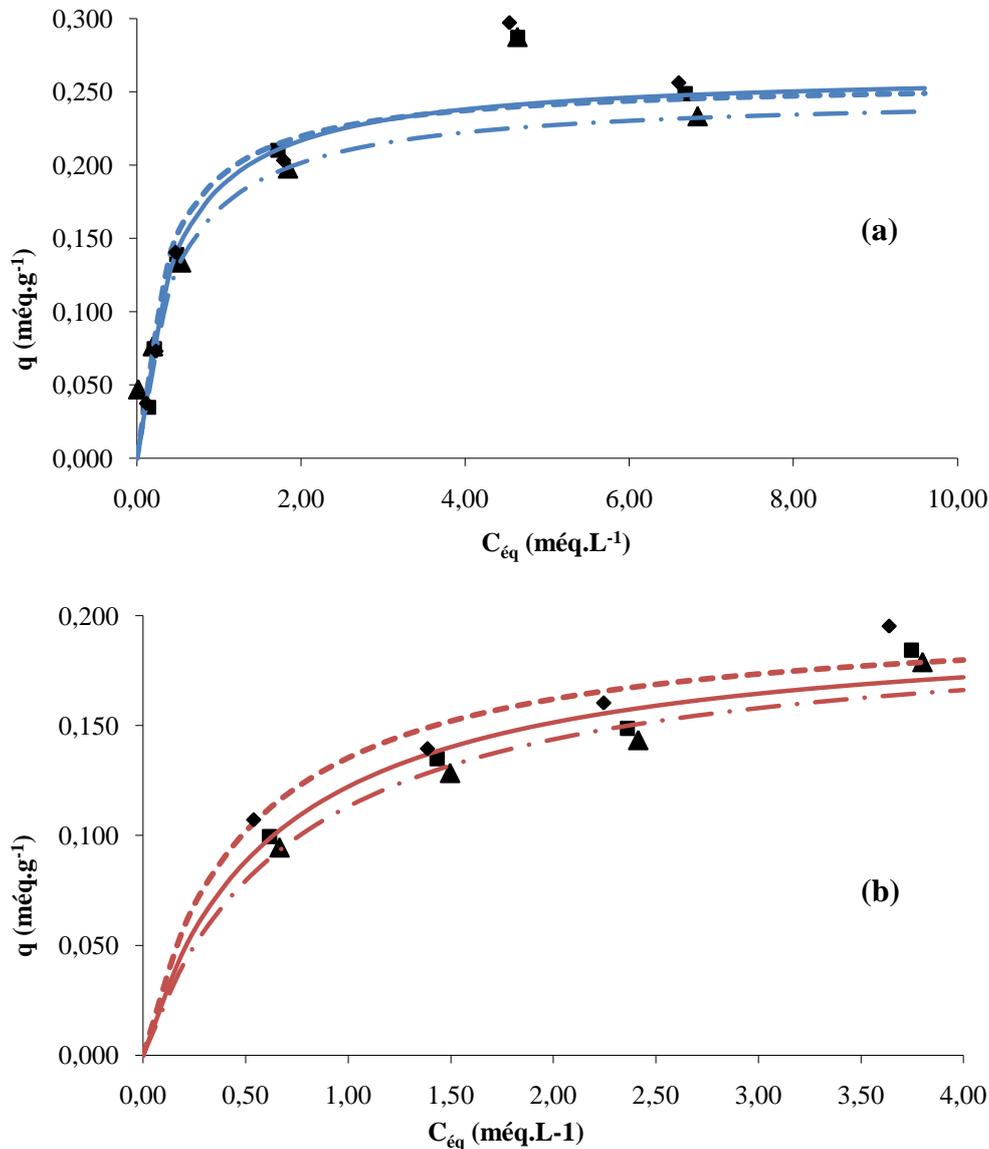


Figure 21 : Isotherme d'adsorption du plomb (a) et du cadmium (b) sur les écorces brutes à différentes températures. - · · · · · 7 °C, ——— 27 °C, - - - - - 45 °C, conditions expérimentales : 100 mg d'écorces dans 10 mL de solution de Pb ou de Cd de concentration comprise entre 0 et 19,3 méq.g<sup>-1</sup>, temps de contact de 2 h.

Une analyse rapide pourrait se traduire par une mauvaise interprétation des résultats. En effet si à première vue, les courbes décrites ne diffèrent que modérément, l'interprétation mathématique (Figure 22) de ces données selon le modèle de Langmuir permet de caractériser

l'adsorption pour chaque température. Le calcul du coefficient de corrélation par la méthode des moindres carrés donne des valeurs supérieures à 0,98 ce qui confirme la validité de l'interprétation par le modèle de Langmuir. Le Tableau 11 recense les valeurs obtenues.

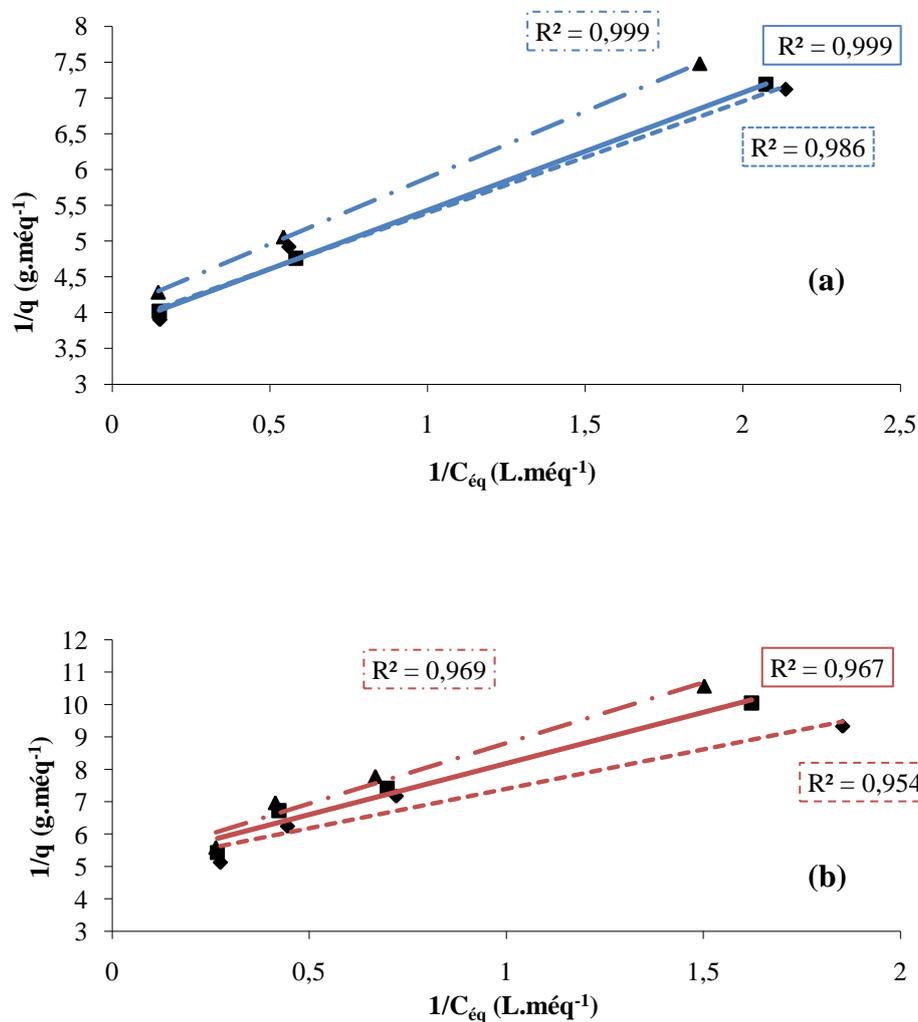


Figure 22 : Linéarisation de l'adsorption par les écorces brutes selon le modèle mathématique de Langmuir.

(a) plomb, (b) cadmium; ······ 7 °C, ——— 27 °C, - - - - - 45 °C.

Tableau 11 : Influence de la température sur les paramètres de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces brutes.

T (°C)	plomb		cadmium	
	$q_{max}$ (méq.g <sup>-1</sup> )	b (L.méq <sup>-1</sup> )	$q_{max}$ (méq.g <sup>-1</sup> )	b (L.méq <sup>-1</sup> )
7	0,248	2,17	0,197	1,35
27	0,264	2,30	0,199	1,59
45	0,261	2,46	0,202	2,03

Même si de faibles écarts entre les différents paramètres sont observés, ils sont suffisants pour permettre une étude thermodynamique. Il apparaît que le processus d'adsorption dépend de la température,  $q_{\max}$  et  $b$  augmentant avec l'élévation de la température, ceci pour les deux métaux étudiés, ce qui permet d'évaluer la spontanéité de la biosorption. La variation d'enthalpie libre ( $\Delta G^\circ$ ) ou fonction de Gibbs renseigne ce phénomène ; en effet, une valeur négative de cette dernière permet d'étayer la nature spontanée de la biosorption par les écorces de sapin de Douglas. La valeur de l'enthalpie libre peut être calculée par l'équation suivante :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln b$$

(10)

Avec  $R$  : constante des gaz parfaits ( $R=8.32 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ )

$T$  : température (K)

$b$  : constante de Langmuir ( $\text{L.mol}^{-1}$ )

Compte tenu de la formule donnant la définition de l'enthalpie libre :

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

(11)

Il vient en combinant (10) et (11) :

$$-\ln b = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT}$$

(12)

La représentation graphique (Figure 23) de cette dernière forme mathématique ( $\ln b = f(1/T)$ ) permet la détermination graphique des paramètres thermodynamiques de la biosorption : la valeur de l'ordonnée à l'origine permet de calculer l'entropie, l'enthalpie dérive pour sa part de la valeur de la pente de la droite.

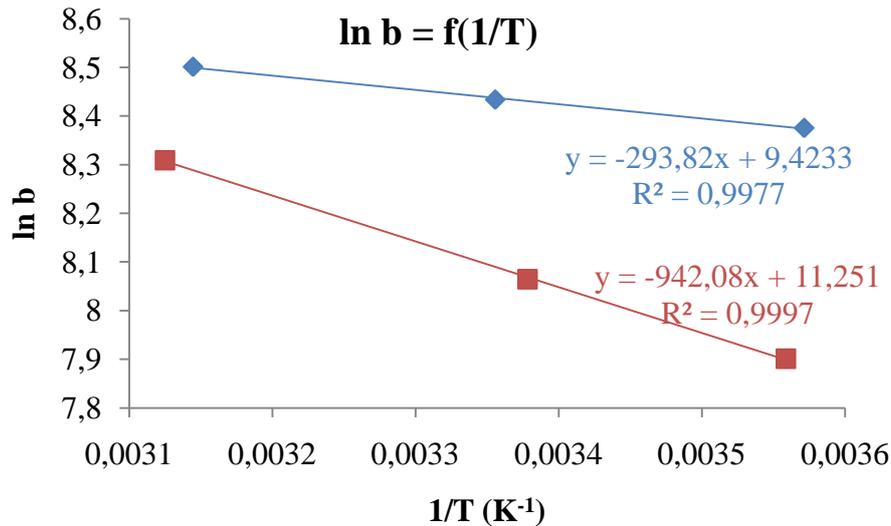


Figure 23 : Représentation graphique de  $\ln b = f(1/T)$ , détermination des paramètres thermodynamiques  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$  de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces brutes de sapin de Douglas.

— plomb, — cadmium

Un coefficient de corrélation proche de 1 justifie la relation entre les trois valeurs thermodynamiques. Les différents paramètres pris en considération et les résultats obtenus sont recensés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Paramètres thermodynamiques de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces de sapin de Douglas.

T (°C)	plomb			cadmium		
	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
7	-19,51	2444	78	-18,47	7837	94
27	-21,05			-19,86		
45	-22,49			-22,12		

L'enthalpie libre de la réaction est négative ce qui met en évidence l'aspect spontané de l'adsorption : les données de la littérature sur des matériaux de ce type sont comparables (cf partie bibliographique). Par ailleurs, une valeur positive de  $\Delta H^\circ$  indique que la réaction est exothermique ce qui explique un réchauffement de 2 à 3°C des solutions métalliques suite au contact avec les écorces.

Les paramètres thermodynamiques peuvent également être calculés par la constante d'équilibre  $K_c$  :

$$K_c = \frac{q}{C_{\text{éq}}} \quad (13)$$

Avec :  $q$  : la capacité de rétention du plomb par les écorces ( $\text{mmol.g}^{-1}$ ).

$C_{\text{éq}}$  : la concentration résiduelle en plomb en solution à l'équilibre ( $\text{mmol.mL}^{-1}$ ).

Ce rapport peut être établi en tout point de l'isotherme pour chaque condition opératoire ; il suffit d'exprimer l'équation de la tangente à l'isotherme (Figure 24).

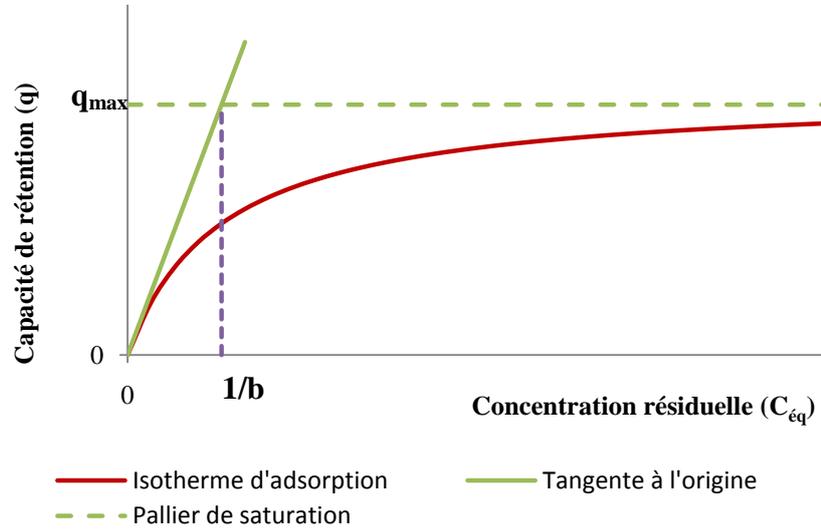


Figure 24 : Représentation graphique des tangentes à l'isotherme d'adsorption.

Le point d'intersection entre les tangentes à l'origine et en l'infini a pour abscisse  $1/b$ .

Avec l'expression générale de la dérivée de la fonction représentée par l'équation (8) :

$$\frac{dq}{dC_{\text{éq}}} = \frac{q_{\text{max}}b \cdot (1 + bC_{\text{éq}}) - q_{\text{max}}b^2C_{\text{éq}}}{(1 + bC_{\text{éq}})^2}$$

(14)

Donc la tangente à l'origine a pour pente  $q_{\text{max}}b$ .

D'où l'équation de la tangente à l'origine :

$$q(C_{\text{éq}}) = q_{\text{max}}b \cdot C_{\text{éq}}$$

(15)

Compte tenu de l'équation (13) :

$$K_c = q_{\text{max}}b$$

(16)

Comme dans le cas de la constante de Langmuir, les trois grandeurs thermodynamiques peuvent être calculées par le même type de relation :

$$-\ln K_c = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (17)$$

La représentation graphique  $\ln(K_c) = f(1/T)$  (Figure 25) permet la détermination graphique des paramètres thermodynamiques de la biosorption.

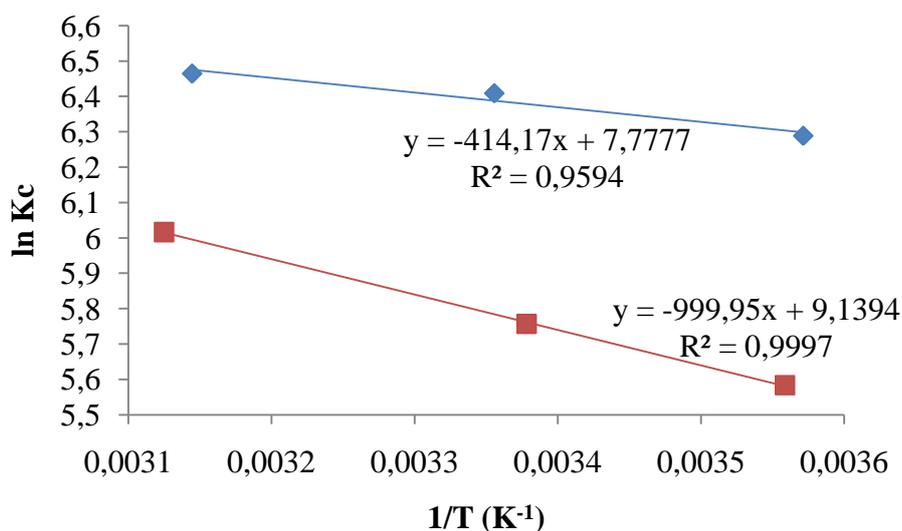


Figure 25 : Représentation graphique de  $\ln K_c = f(1/T)$  lors de l'adsorption du plomb et du cadmium par des écorces brutes de sapin de Douglas.  
— plomb, — cadmium

Un coefficient de corrélation proche de 1 justifie la relation entre les trois valeurs thermodynamiques. Les différents paramètres pris en considération et les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Détermination des constantes d'équilibre et paramètres thermodynamiques de l'adsorption du plomb et du cadmium par les écorces de sapin de Douglas.

	T (°C)	$K_c$ (mL.g <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )
plomb	7	538,16	-14,65		
	27	607,2	-16,00	3444	65
	45	642,06	-17,10		
cadmium	7	230,49	-12,72		
	27	270,64	-13,79	8319	76
	45	359,56	-15,67		

En comparant les deux méthodes de calcul, il apparaît que par la tangente les valeurs de  $\Delta G^\circ$  sont plus grandes et *a fortiori* les valeurs de  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$  plus faibles. Cependant, les deux méthodes conduisent aux mêmes conclusions : la biosorption est spontanée et le phénomène est exothermique.

## 2 Inertion des écorces.

Les écorces, matériau hétérogène, ont une composition chimique complexe, avec notamment la présence de composés hydrosolubles (comme les substances phénoliques) susceptibles de contaminer la solution au cours de leur utilisation en tant que biofiltre. Il convient donc de stabiliser cette biomatrice afin d'en conserver les capacités. Un tel résultat peut être obtenu par activation chimique (traitement à l'acide), par dégradation oxydative des phénols (oxydation de Fenton), ou stabilisation des phénols dans la matrice par réticulation (NoTox®).

### 2.1.1 Procédés d'inertion des écorces.

#### 2.1.1.1 Bilan massique

Le NoTox® est décrit dans la littérature pour être un produit de substitution du formaldéhyde, dont les propriétés toxiques sont avérées. Le NoTox® permettrait de stabiliser la matière organique en la réticulant ce qui, dans ce cas, devrait induire la conservation de la totalité des constituants des écorces dans le matériau modifié. Cependant, l'analyse du rendement massique montre une perte de masse de 12% au cours du traitement (Tableau 14). Cela peut être expliqué, compte tenu de la présence d'une solution éthanolique en début de protocole de traitement, par un phénomène de solubilisation de certains tanins, sucres circulants, pigments, éléments minéraux présents initialement dans les écorces brutes.

Tableau 14 : Rendements massiques selon le traitement d'inertion appliqué aux écorces.

Traitement	Rendement massique
	(%)
<i>brutes</i>	100
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	96
<b>NoTox®</b>	88
<b>Fenton</b>	66

L'oxydation dans les conditions de Fenton est largement utilisée pour la décomposition photochimique des matières organiques en suspension. Dans ce cas, elle vise à oxyder directement dans les écorces les composés phénoliques solubilisés au cours des expériences de biosorption. La Figure 26 présente le mécanisme réactionnel de l'oxydation d'un composé aromatique simple.

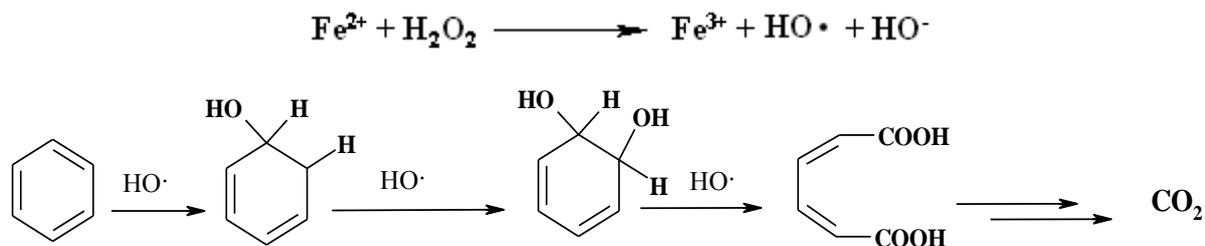


Figure 26 : Schéma adapté<sup>144</sup> du mécanisme réactionnel de l'oxydation d'un cycle aromatique dans les conditions de Fenton.

Le traitement à l'acide sulfurique, connu pour activer les sites échangeurs d'ions, a aussi pour conséquence de solubiliser les tanins solubles dans ces conditions (Tableau 14) ; il conduit cependant au rendement massique le plus élevé soit 96%.

#### 2.1.1.2 Influence du procédé d'inertion sur le relargage de substances phénoliques.

L'élimination des substances hydrosolubles préalablement à la mise en contact du matériau avec les solutions métalliques a pour but de limiter voire supprimer le relargage de substances phénoliques au cours du processus de biosorption. Pour les trois stratégies étudiées (activation, réticulation et oxydation), une estimation de la quantité de composés phénoliques relargués au cours de l'adsorption a été effectuée. La quantité de composés phénoliques est estimée par dosage colorimétrique, l'acide gallique étant choisi comme référence. Les résultats obtenus (Tableau 15) montrent un réel impact des traitements sur la quantité de phénols relargués à partir des écorces lors du phénomène d'adsorption

**Tableau 15 : Quantité de phénols relargués au cours de la biosorption en fonction du traitement d'inertion des écorces.**

Le pourcentage représente la quantité relarguée par les écorces inertées par rapport à celle relarguée par des écorces brutes prises par référence. L'acide gallique est pris par référence lors du dosage, les masses de phénols relargués sont estimées par rapport à sa masse molaire.

Traitement	Phénols relargués	
	(mg.g <sup>-1</sup> )	% de la masse totale
<i>brutes</i>	8.65	100
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	3.00	35
<b>NoTox®</b>	< 0.01	< 0,1
<b>Fenton</b>	0.14	2

Si le traitement à l'acide sulfurique présente un intérêt limité, la stabilisation des écorces selon l'oxydation de Fenton ou le traitement par le Notox® conduit à l'obtention d'un matériau parfaitement stable. Les quantités de phénols relargués sont, dans ces deux derniers cas, négligeables.

### 2.1.1.3 *Caractérisation des écorces obtenues par spectrométrie IRTF.*

Les spectres IR (Figure 27) des écorces inertées selon les trois méthodes retenues ne mettent pas en évidence des variations significatives de composition chimique dans la mesure où aucune évolution des spectres IR n'est constatée par rapport aux écorces brutes. Il est à noter que les trois traitements montrent une augmentation de l'intensité de la bande correspondant aux fonctions C=O des aldéhydes à 1740 cm<sup>-1</sup>. Dans le cas du traitement acide, cela correspond à la disparition des fonctions hémiacétales. Dans le cas de l'oxydation de Fenton, il pourrait s'agir d'une diminution de l'intensité de la bande C=C correspondant à la diminution de la quantité de cycles aromatiques suite à leur dégradation : la proportion de fonctions aldéhyde serait alors accrue.

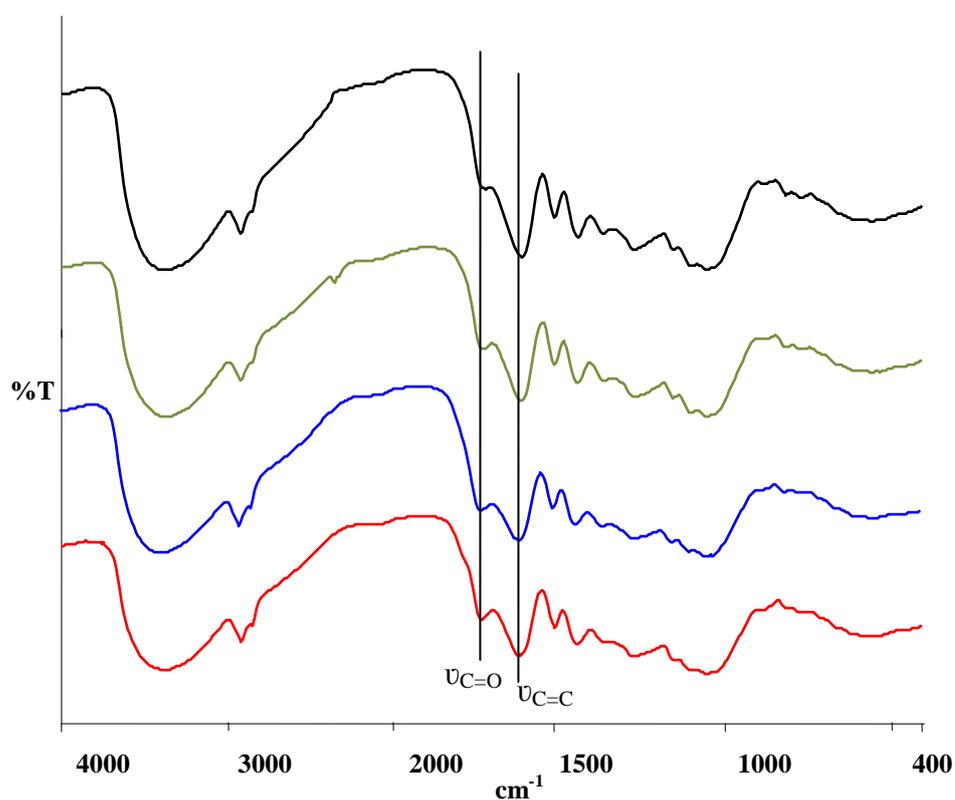


Figure 27 : Spectres infrarouge en transmittance.

—écorces brutes, —écorces-H<sup>+</sup>, —écorces-Fenton et —écorces-NoTox.

### 2.1.2 Influence des procédés d'inertion sur les capacités d'adsorption.

Afin de caractériser l'effet du traitement chimique d'inertion sur les capacités d'adsorption, la méthodologie des isothermes a été employée. Les Figure 28 et Figure 29 représentent respectivement les isothermes d'adsorptions du plomb par les écorces brutes et inertées et leurs traitements mathématiques selon le modèle de Langmuir. Les coefficients de corrélation élevés indiquent une bonne validité des données. L'adsorption du plomb par les écorces brutes de sapin Douglas sert de référence à cette étude.

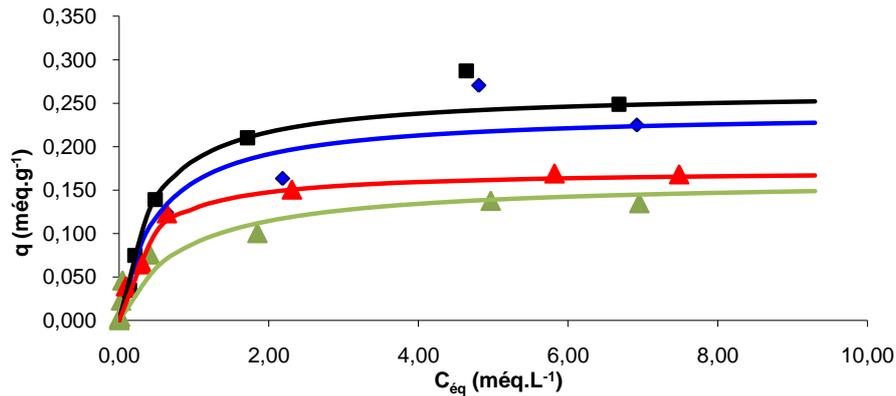


Figure 28 : Isotherme d'adsorption du plomb par les écorces brutes et inertées.

— écorces brutes, — écorces-H<sup>+</sup>, — écorces-Fenton et — écorces-NoTox

L'allure hyperbolique des isothermes d'adsorption décrites met en évidence un comportement comparable des matériaux obtenus à celui des écorces brutes. La représentation en doubles inverses (Figure 29) permet d'apprécier les paramètres cinétiques -  $q_{\text{max}}$  et  $b$  - de chacun des matériaux biosorbants. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 16.

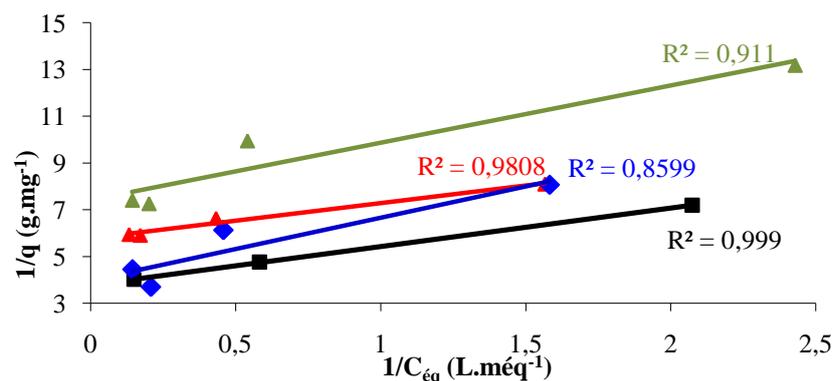


Figure 29 : Linéarisation selon le modèle mathématique de Langmuir de l'adsorption du plomb par les écorces brutes et inertées.

— écorces brutes, — écorces-H<sup>+</sup>, — écorces-Fenton et — écorces-NoTox.

De manière globale les traitements chimiques prospectés ont induit la diminution des capacités de rétention des écorces, l'affinité pour sa part ne semble pas être affectée de manière significative. Dans le cas de l'inertion par le NoTox®, la capacité de rétention est diminuée d'environ 30% du fait de l'implication probable de certains sites d'adsorption dans le phénomène de réticulation ; la constante de Langmuir est pour sa part augmentée de 2.3 L.méq<sup>-1</sup> pour les écorces-brutes à 3.89 L.méq<sup>-1</sup> pour les écorces-NoTox®. De telles observations suggèrent que la modification chimique induite par le NoTox® pourrait affecter préférentiellement les sites d'adsorption pour lesquelles le plomb a une affinité moindre. Ce pourrait être le cas des fonctions hydroxyle des lignines ou tanins, ou des polysaccharides.

Tableau 16 : Paramètres ( $q_{\max}$  et  $b$ ) des isothermes d'adsorption du plomb de type Langmuir.

Traitement	$q_{\max}$ ( $\text{m}\acute{\text{e}}\text{q}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$b$ ( $\text{L}\cdot\text{m}\acute{\text{e}}\text{q}^{-1}$ )
<i>brutes</i>	0,242	2,30
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,162	0,89
<b>NoTox®</b>	0.173	3.89
<b>Fenton</b>	0,220	1,97

Concernant le traitement par l'acide sulfurique, la solubilisation de certains tanins se traduit par une diminution de l'affinité du matériau obtenu vis-à-vis du plomb de 2.3 L.méq<sup>-1</sup> pour les écorces-brutes à 0.89 L.méq<sup>-1</sup> pour les écorces-H<sup>+</sup>. Par ailleurs, la capacité de rétention maximale obtenue dans pour les écorces-Fenton, bien qu'inférieure à celle des écorces brutes, reste la plus forte (0.220 méq.g<sup>-1</sup>) parmi celles des traitements effectués. La réaction d'oxydation est aussi le seul des traitements étudiés pouvant induire la formation de fonctions acide carboxylique dont leur contribution dans le phénomène d'échange d'ion a par ailleurs été démontrée.

### 3 Bilan.

Les écorces brutes de sapin de Douglas présentent des propriétés intéressantes d'échange d'ions. D'une part, déterminées pour le cadmium et le plomb par la méthode des isothermes d'adsorption, les valeurs de capacité et d'affinité montrent un effet limité de la température des solutions métalliques permettant un large domaine d'utilisation de cette biomatrice allant des eaux d'exhaure aux rejets industriels. De plus une étude thermodynamique permet de conclure un aspect spontané du processus et la nature exothermique de l'adsorption. Enfin les valeurs positives de l'entropie traduisent l'irréversibilité de la réaction d'échange d'ions. D'autre part, le phénomène de biosorption sur les écorces brutes s'accompagne d'un relargage en solution de composés hydrosolubles tels que certains tanins. Les trois traitements effectués ont permis de limiter voire de s'affranchir de ce phénomène : un traitement à l'acide sulfurique consiste à éliminer les sels minéraux, certains tanins et sucres circulants, un traitement d'oxydation dans les conditions de Fenton vise à dégrader de manière plus ou moins poussées les cycles phénoliques et un traitement par le NoTox® qui est ici utilisé comme substitut du formaldéhyde permet de réticuler les composés hydrosolubles directement sur la matrice. Les différentes propriétés des matériaux obtenus (capacité de rétention, rendement massique) désignent l'oxydation de Fenton comme étant le meilleur compromis.

**Chapitre 2 : Obtention et caractérisation de matériaux biosorbants d'origine forestière.**



# 1 Modification chimique des écorces.

Nos travaux, tout comme les travaux antérieurs du laboratoire<sup>168</sup>, démontrent les bonnes capacités des écorces brutes à adsorber les cations métalliques en solution. De telles propriétés pourront toutefois être optimisées selon des stratégies de modifications chimiques dont l'objectif serait d'améliorer la sélectivité tout comme la capacité des écorces à adsorber les cations métalliques.

Nous nous proposons de modifier chimiquement les écorces de sapin de Douglas au niveau des groupements hydroxyle de leurs polysaccharides constitutifs, principalement la cellulose, afin d'en améliorer qualitativement et quantitativement leurs capacités fixatrices de cations métalliques. Les protocoles envisagés visent, d'une part, à former directement sur la structure polysaccharidique des fonctions acide carboxylique et, d'autre part, à introduire des groupements fonctionnels acides échangeurs d'ions tels que des oligosaccharides chargés comme les pectines ou les carraghénanes.

## 1.1 Voie de l'oxydation.

### 1.1.1 Schéma général de synthèse.

L'objectif de ces modifications est d'augmenter les capacités de rétention des cations métalliques vis-à-vis des écorces. La technique d'oxydation directe de la fraction polysaccharidique vise en particulier la cellulose, polysaccharide constitutif des écorces qui sert de référence pour cette étude. Son oxydation à l'état microcristallin, largement décrite dans la littérature<sup>169</sup>, nous a permis de transférer puis d'optimiser ces protocoles à l'oxydation sur les écorces. Cependant, les protocoles utilisés ne sont pas sélectifs et peuvent affecter d'autres constituants des écorces comme les hémicelluloses, les pectines voire les lignines.

Cette stratégie a pour objectif de produire des matériaux plus ou moins oxydés en faisant apparaître une, deux ou trois fonctions acide carboxylique par unité glucidique de la cellulose ; la Figure 30 présente les différentes voies de synthèse étudiées.

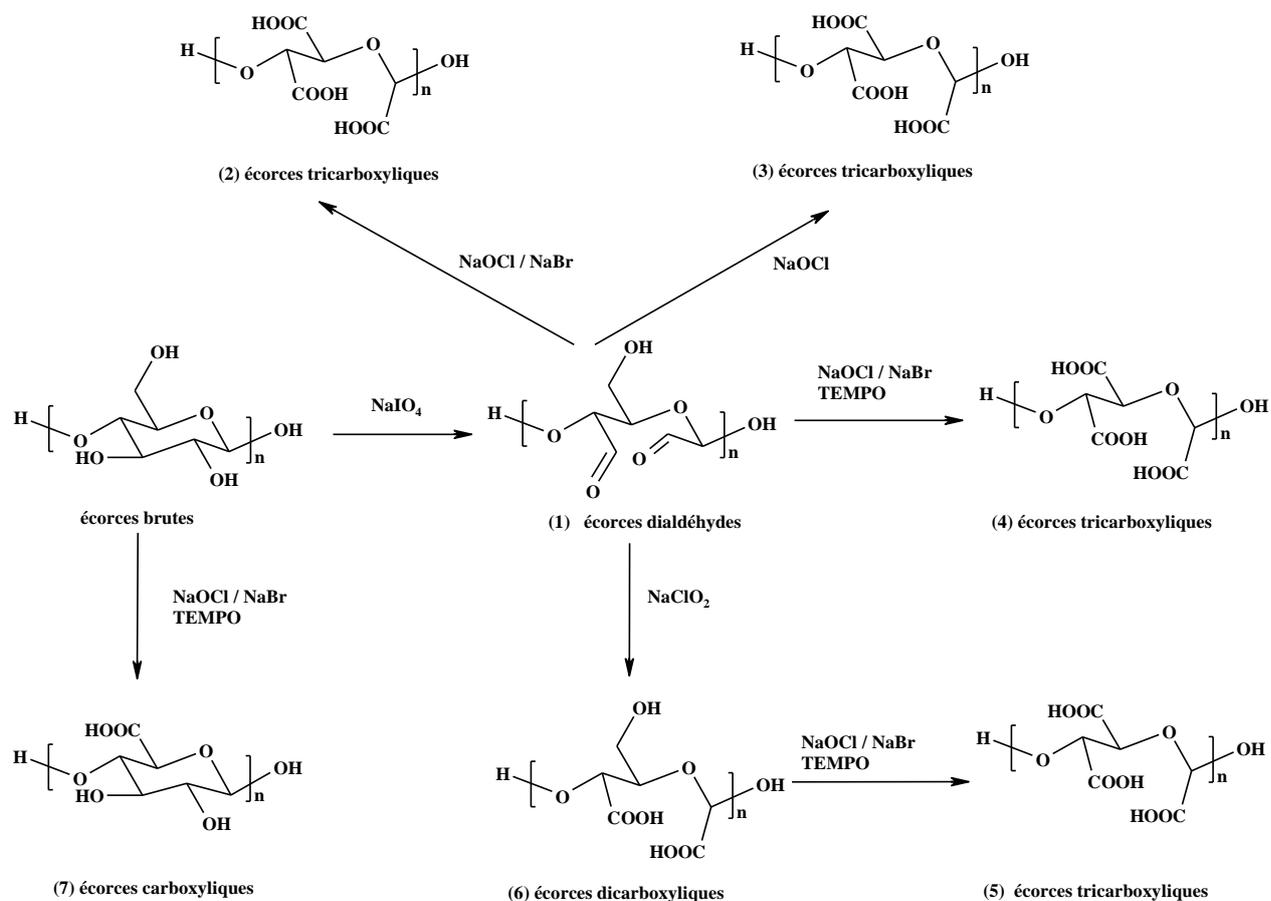


Figure 30 : Stratégie de synthèse des écorces oxydées.

### 1.1.2 Rendements de réaction.

Les rendements peuvent se décliner selon deux formes : le rendement massique qui traduit l'agressivité de l'oxydant vis-à-vis des autres constituants et le rendement de l'oxydation qui traduit réellement la quantité de fonctions acide carboxylique produites au cours de l'oxydation. Cette dernière grandeur est difficile d'accès. En effet, au cours des modifications, la solubilisation et la dégradation de certains constituants des écorces ne permettent pas de la déterminer avec précision, c'est pourquoi nous présenterons les concentrations en aldéhydes ou acides carboxyliques sur les matériaux obtenus.

### 1.1.2.1 Rendements massiques d'oxydation.

Le Tableau 17 rassemble l'ensemble des rendements obtenus après oxydation. Si sur le plan théorique, l'oxydation des fonctions alcool en fonctions acide carboxylique doit conduire à l'augmentation de la masse du produit final. Les résultats expérimentaux obtenus, avec des pertes de masse comprises entre 18 et 93%, mettent en lumière la fragilité chimique de l'écorce au cours des réactions d'oxydation.

Tableau 17 : Rendements massiques des différents matériaux obtenus par oxydation.

Ecorces / numéro de composé	Rendement massique (%)				
	étape 1	étape 2	étape 3	global	
<b>dialdéhydes</b>	<b>1</b>	54	-	-	54
<b>carboxyliques</b>	<b>7</b>	82	-	-	82
<b>dicarboxyliques</b>	<b>6</b>	54	64	-	35
<b>tricarboxyliques</b>	<b>2</b>	54	37	-	20
	<b>3</b>	54	59	-	32
	<b>4</b>	54	22	-	12
	<b>5</b>	54	64	20	7

L'oxydation directe en une étape produisant les écorces (7) conduit à un rendement massique élevé égal à 82%. L'augmentation du nombre d'étapes conduit naturellement à la diminution des rendements massiques. L'oxydation *periodique* préalable des écorces induit une perte de masse de 54% à laquelle se rajoutent les pertes de masse liées notamment à l'utilisation de NaClO<sub>2</sub>, oxydant couramment employé lors de la délignification du bois.

### 1.1.2.2 Caractérisation chimique des matériaux obtenus.

#### 1.1.2.2.1 Evaluation du nombre de fonctions aldéhyde formées.

Cette estimation repose sur la réaction de Cannizzaro intramoléculaire.<sup>170,171</sup> Le dosage de la quantité des fonctions aldéhyde générées sur les écorces est un moyen de vérifier l'efficacité de la réaction d'oxydation des polysaccharides par le *periodate* de sodium. La réaction de Cannizzaro met en jeu une dismutation des fonctions aldéhyde par action de la soude conduisant à l'établissement d'un rapport stœchiométrique entre la concentration d'ions hydroxyle consommés et la concentration initiale des groupes dialdéhyde. Cette réaction va conduire à partir d'un même groupe dialdéhyde, à la formation d'un acide carboxylique par oxydation et à un alcool par réduction comme le montre le schéma réactionnel présenté en Figure 31.

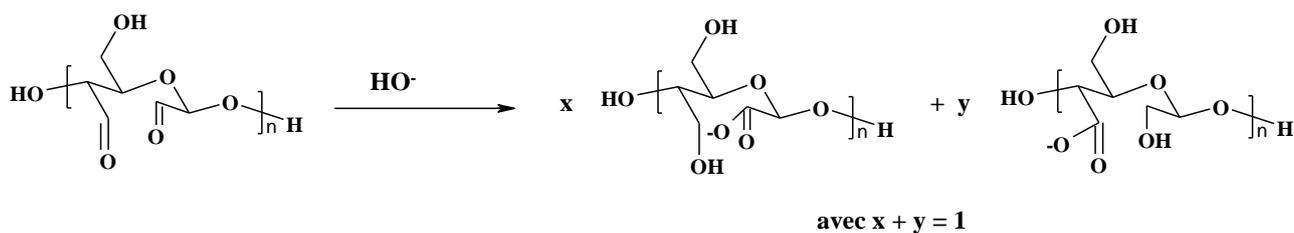


Figure 31 : Réaction de Cannizzaro intramoléculaire.

Appliquée aux écorces oxydées, la mise en œuvre de la réaction de Cannizzaro permet d'estimer à 7 mmol la teneur en fonctions aldéhyde formées par gramme d'écorces oxydées. Cette valeur est supérieure à la valeur théorique qui peut être calculée, ce qui suggère l'oxydation d'autres catégories de polysaccharides comme les hémicelluloses par exemple. Pour plus de détails méthodologiques, on se rapportera à la partie expérimentale.

#### 1.1.2.2.2 *Dosage de l'acidité selon la méthode de Boehm.*

La mesure de l'acidité selon la méthode de Boehm<sup>172</sup> est un moyen d'apprécier quantitativement l'effet d'une modification chimique et, qualitativement, l'état de dégradation des composants phénoliques des écorces oxydées. La méthode historique qui consiste à utiliser quatre bases de force croissante a été adaptée aux écorces. Le dosage par l'hydrogénocarbonate de sodium donne directement accès à la quantité de fonctions acide carboxylique. Pour sa part, le dosage par la soude traduit indirectement la quantité de fonctions phénol. C'est pourquoi, dans un premier temps une estimation du nombre de fonctions lactone + acide carboxylique est recherchée par dosage au carbonate de sodium. La quantité de fonctions phénol est alors appréciée par différence entre l'acidité mesurée par la soude et celle mesurée par le carbonate de sodium. Les fonctions carbonyle n'étant pas impliquées dans le processus d'échange d'ions, leur dosage par l'éthanolate de sodium n'a pas été effectué. Le Tableau 18 rassemble l'ensemble des résultats issus de la mesure de l'acidité selon la méthode de Boehm.

Tableau 18 : Mesures d'acidité selon la méthode de Boehm sur les écorces oxydées.

Ecorces / numéro de composé	Acidité (méq.g <sup>-1</sup> )		
	NaHCO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaOH
<b>Brutes</b>	1,248	3,000	3,925
<b>Dialdéhydes</b> <b>1</b>	1,358	2,750	3,430
<b>Carboxyliques</b> <b>7</b>	1,954	2,962	3,910
<b>Dicarboxyliques</b> <b>6</b>	1,621	2,643	3,023
<b>Tricarboxyliques</b>	<b>2</b>	1,405	2,437
	<b>3</b>	1,603	2,526
	<b>4</b>	1,782	2,745
	<b>5</b>	1,841	2,743
			3,127

Au cours des modifications, une évolution des propriétés acido-basiques des matériaux est observable. Avec une acidité de 1,954 méq.g<sup>-1</sup>, l'oxydation des écorces brutes par NaBr catalysée par le TEMPO conduit à la formation du matériau le plus acide vis-à-vis de l'hydrogénocarbonate de sodium. Pour cette même série de dosage, les écorces obtenues en plusieurs étapes d'oxydation produisent des valeurs plus faibles. Néanmoins, comparées aux écorces brutes, les écorces oxydées sont dans ce cas plus acides. Par ailleurs, l'acidité totale des matériaux titrée par la soude est, pour les écorces carboxyliques (7), comparable à celle des écorces brutes, et pour les écorces di et tricarboxyliques (2-6) inférieure, ce qui traduit dans ce cas la diminution du nombre total de sites acides (Tableau 19). Les quantités en fonctions phénol sont plus faibles dans le cas de l'oxydation par le chlorite de sodium traduisant l'agressivité de cet oxydant vis-à-vis des lignines. C'est aussi le cas pour l'oxydation *periodique* qui conduit à la perte de plus d'un tiers des lignines.

Tableau 19 : Caractérisation des fonctions de surface des écorces brutes et oxydées.

Ecorces / numéro de composé	n (mmol.g <sup>-1</sup> )	
	n COOH	n phénol
<b>brutes</b>	1,248	0,925
<b>dialdéhydes</b> <b>1</b>	1,358	0,680
<b>carboxyliques</b> <b>7</b>	1,954	0,948
<b>dicarboxyliques</b> <b>6</b>	1,621	0,380
<b>tricarboxyliques</b>	<b>2</b>	1,405
	<b>3</b>	1,603
	<b>4</b>	1,782
	<b>5</b>	1,841
		0,690

### 1.1.3 Caractérisation des écorces oxydées par spectroscopie infrarouge.

En mettant en évidence l'évolution qualitative des fonctions chimiques présentes à la surface des écorces, la spectroscopie infrarouge permet d'apprécier l'impact de la modification chimique en général et des réactions d'oxydation en particulier, sur la structure chimique des écorces. En raison de l'hétérogénéité moléculaire des écorces, les spectres obtenus sont souvent complexes. Ils présentent toutefois des signaux caractéristiques, c'est ce qu'illustre la Figure 32. Lors de l'oxydation *periodique*, le signal correspondant à l'élongation des fonctions C=O à  $1740\text{ cm}^{-1}$  est facilement mis en évidence. L'intensité de ce dernier diminue lors de la formation des écorces di et tricarboxyliques (2-6) au profit d'une large bande aux alentours de  $1650\text{ cm}^{-1}$  traduisant ainsi l'oxydation des fonctions aldéhyde en fonctions acide carboxylique (ou ion carboxylate à pH neutre). Toutefois, la réaction n'étant pas quantitative, la totalité des fonctions aldéhyde n'est pas oxydée. Outre les fonctions carboxylates, la bande à  $1650\text{ cm}^{-1}$  est formée de plusieurs vibrations correspondant en particulier aux liaisons C=C des cycles aromatiques restant et de l'eau résiduelle.

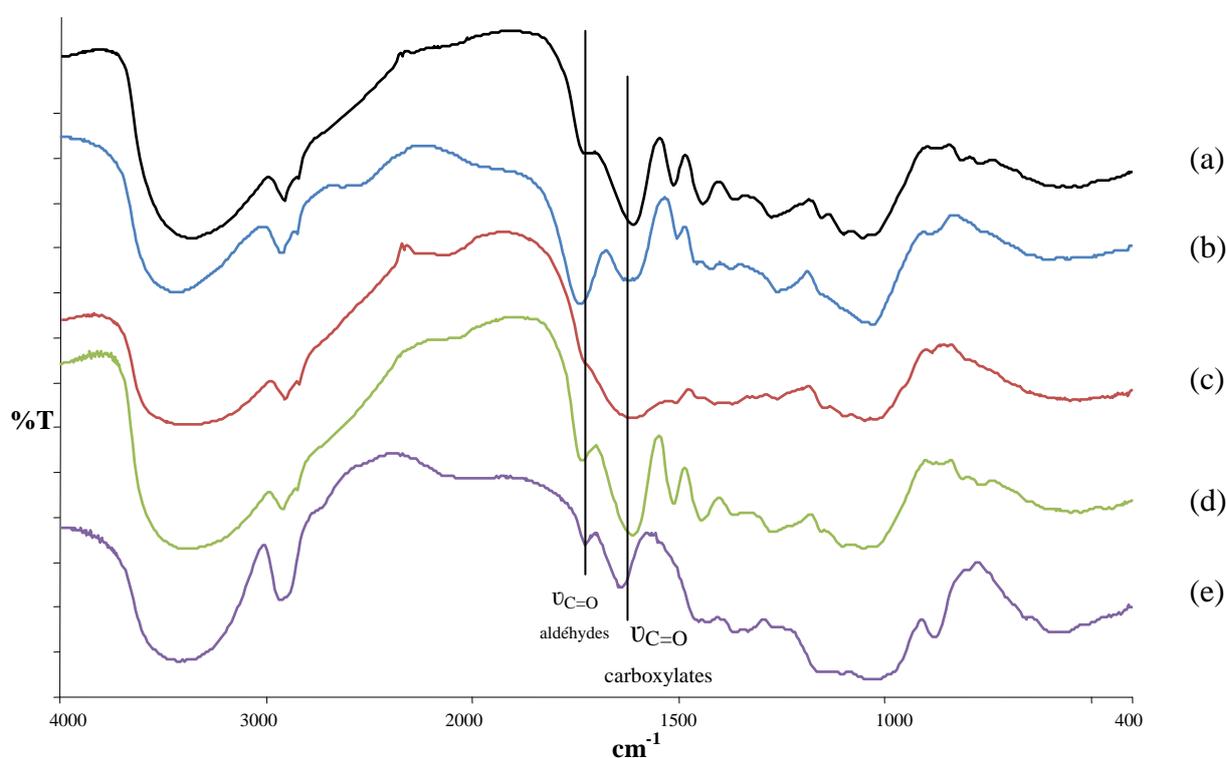


Figure 32 : Spectres infrarouge des écorces brutes et oxydées.

Ecorces brutes (a), écorces dialdéhydes (1) (b), écorces carboxyliques (7) (c), écorces dicarboxyliques (6) (d), écorces tricarboxyliques (5) (e).

Si pour une molécule purifiée le spectre infrarouge est indépendant de son mode d'obtention, il n'en est pas de même dans le cas des écorces tricarboxyliques (2-5) obtenues selon plusieurs approches chimiques. C'est ce qu'illustre les spectres infrarouge présentés Figure 33. En effet, les réactions d'oxydation ne sont pas sélectives des polysaccharides et peuvent affecter les lignines par exemple. Par ailleurs, la structure théorique attendue n'est pas forcément obtenue, la totalité des unités glucidiques n'étant pas systématiquement affectée lors de l'utilisation des oxydants les plus faibles (comme l'hypochlorite).

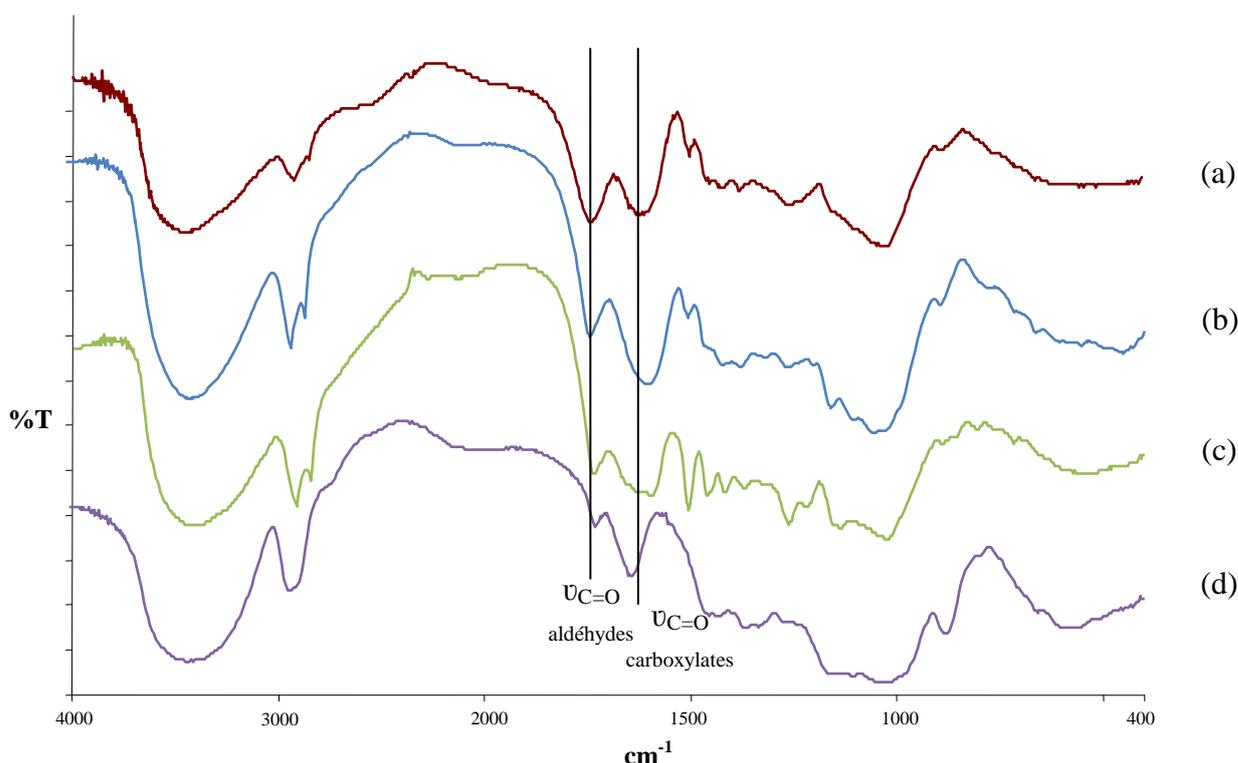


Figure 33 : Spectres infrarouge des écorces tricarboxyliques.

(2) (a), (3) (b), (4) (c) et (5) (d).

L'oxydation des fonctions aldéhyde par l'hypochlorite de sodium semble faible alors que celles par l'hypobromite de sodium convertit une grande majorité des fonctions aldéhyde en fonctions acide carboxylique : ceci se traduit sur le spectre infrarouge par une diminution de l'intensité de la bande à  $1740\text{ cm}^{-1}$  au profit de la bande à  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Par ailleurs lors des étapes d'oxydation par le chlorite de sodium, les spectres infrarouge témoignent d'une forte diminution voire disparition des bandes correspondant à l'élongation des liaisons C=C aromatiques entre  $1600$  et  $1450\text{ cm}^{-1}$ .

## 1.2 Voie de l'amination réductrice.

Nous venons de montrer qu'une oxydation directe de la fraction polysaccharidique des écorces était envisageable afin d'obtenir un matériau possédant un nombre de sites échangeurs d'ions plus important. Cependant, les résultats concernant les rendements massiques, soulignent une agressivité de certains systèmes oxydants vis-à-vis des écorces. Cette tendance est d'autant plus marquée que le nombre d'étapes d'oxydation est important. C'est pourquoi une stratégie de modification plus douce a été développée. Elle repose sur deux étapes : l'oxydation de la fraction cellulosique des écorces suivie du greffage de groupements échangeurs d'ions sur ces dernières. Enfin, le choix des molécules greffées s'est orienté vers des oligosaccharides acides qui présentent l'avantage d'apporter des sites échangeur d'ions plus accessibles et en nombre variable. La présence d'une extrémité réductrice leur confère des propriétés chimiques permettant une fonctionnalisation simple à mettre en œuvre.

### 1.2.1 Stratégie de synthèse.

Outre l'oxydation directe des écorces, nous proposons d'augmenter la quantité de sites échangeurs d'ions par greffage covalent de molécules chargées sur les écorces. Cette stratégie repose sur la réaction d'amination réductrice entre les écorces dialdéhydes et des molécules possédant une fonction amine primaire obtenue par fonctionnalisation d'oligosaccharides. La stratégie de synthèse est présentée en Figure 34. Cette stratégie, déjà mise en œuvre dans le cas d'acides aminés ou de dérivés du stilbène<sup>138</sup>, est désormais envisagée avec des molécules polyanioniques tels que les oligogalacturonates<sup>173</sup> issus de pectines et les oligogalactanes issus de carraghénanes.

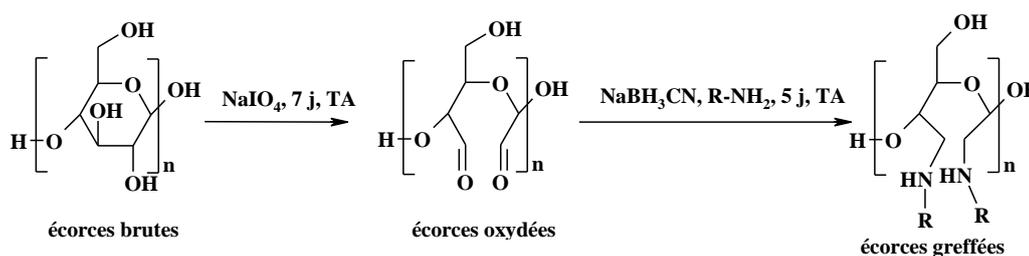


Figure 34 : Schéma général de synthèse des écorces greffées.

## 1.2.2 Préparation d'oligosaccharides aminés.

### 1.2.2.1 Stratégie de synthèse.

La stratégie retenue pour la préparation d'oligosaccharides aminés repose sur deux étapes.

- ✓ La production, à partir de polysaccharides naturels, d'oligosaccharides par hydrolyse acide ou enzymatique et,
- ✓ la modification chimique de leur extrémité réductrice.

Cette dernière est réalisée par réaction d'amination réductrice entre l'ammoniaque ou une diamine aliphatique et la fonction aldéhyde de l'extrémité réductrice des oligosaccharides. Pour cette étude, deux polysaccharides naturels ont été choisis : les pectines et les carraghénanes. Ainsi, deux familles d'oligosaccharides ont été produites : des oligogalacturonates porteurs de fonctions carboxylate et des oligocarraghénanes riches en fonctions sulfate.

### 1.2.2.2 Obtention d'oligosaccharides.

#### 1.2.2.2.1 Cas des pectines.

- ✓ Hydrolyse enzymatique

Les oligogalacturonates (8) sont obtenus par hydrolyse enzymatique d'homogalacturonanes commerciaux extraits d'albêdo d'agrumes. L'action d'une endopolygalacturonase (endo PG) Pectinex® conduit à l'hydrolyse aléatoire de la chaîne (Figure 35).

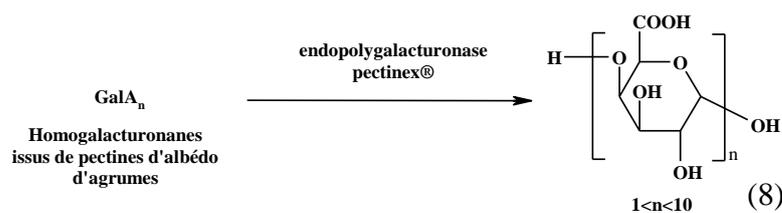


Figure 35 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse enzymatique d'homogalacturonanes.

Un mélange d'oligogalacturonates (8) est obtenu avec un rendement massique de 33%. Le spectre de masse de la fraction conservée est présenté Figure 36.

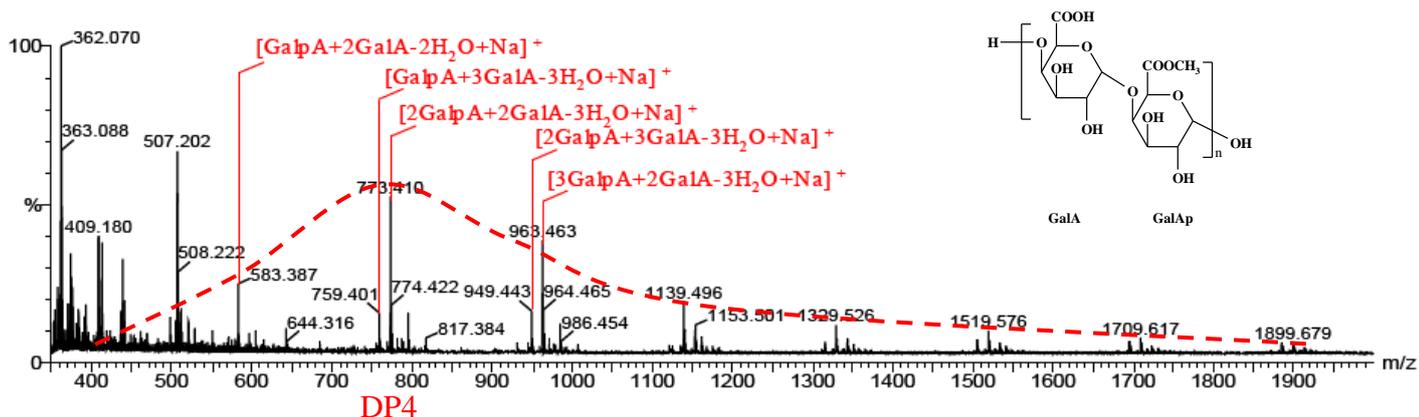


Figure 36 : Spectre de masse MALDI-TOF des oligogalacturonates (8) obtenus par hydrolyse enzymatique.

Le profil de masse montre une distribution gaussienne des différents oligosaccharides centrée sur le DP 4. Ce dernier a fait l'objet d'une purification et d'une caractérisation plus fine par spectroscopie de RMN.

✓ Purification du tétragalacturonate (9).

La nature anionique des galacturonates permet leur purification sur colonne chromatographique échangeuse d'ions. L'élution du mélange d'oligogalacturonates sur une résine Sephadex A25 par un gradient d'hydrogencarbonate d'ammonium a permis d'isoler différentes fractions appelées DP2, DP3 et DP4 (Figure 37).

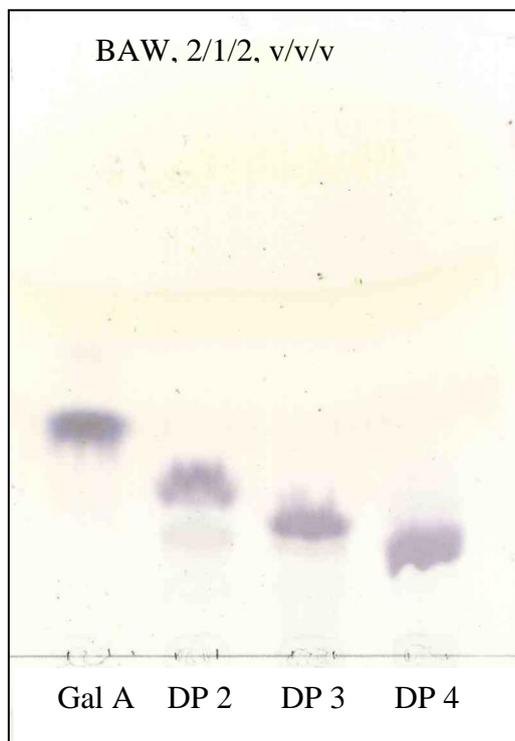


Figure 37 : Profil CCM d'élution des différents oligomères d'acide galacturonique.

(éluant : butanol/acide acétique/eau, 2/1/2, v/v/v)

La CCM montre que le tétramère (9) est obtenu pur avec un rendement massique de 23%, ce qui est confirmé par spectrométrie de masse ESI en mode négatif grâce à la présence du pic  $[M-H]^-$  à  $m/z = 721,2$  ainsi que l'adduit sodium majoritaire à  $m/z = 743,3$ . L'analyse de ce composé par spectroscopie de RMN (Figure 38) a permis de confirmer la structure.

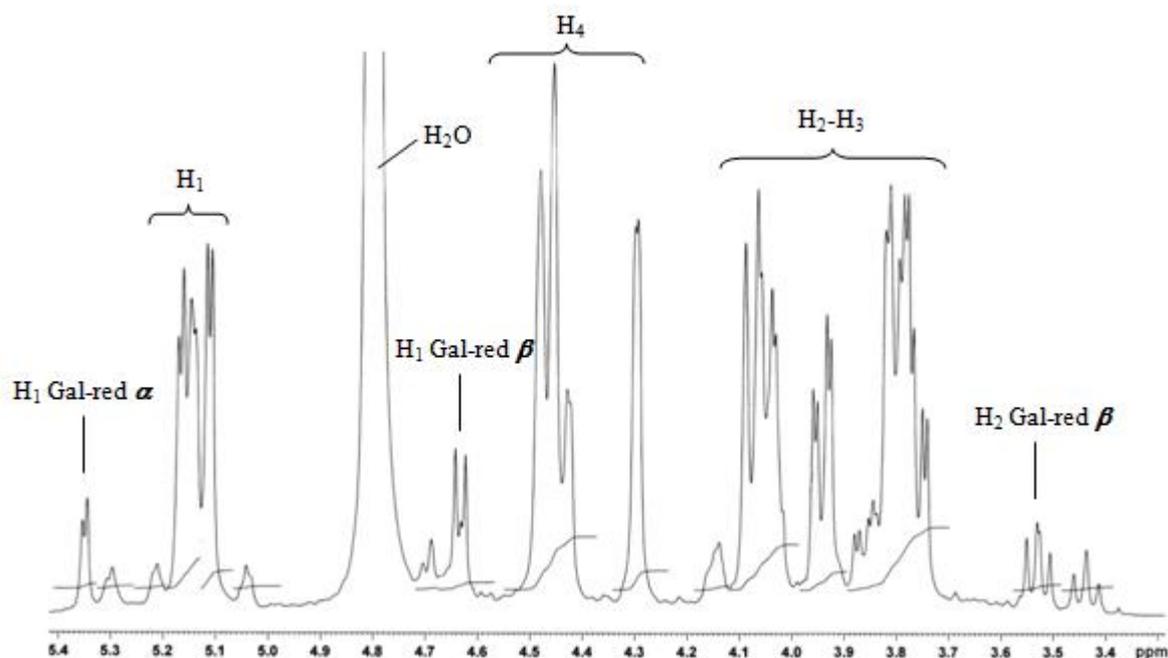


Figure 38 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du tétramère d'acide galacturonique (9) dans  $\text{D}_2\text{O}$ .

En effet, cinq doublets sont observés dans la région des protons anomériques ; deux sont attribuables à l'extrémité réductrice en distinguant les formes  $\alpha$  et  $\beta$ , le rapport d'intégration entre les signaux à 5,35 ppm et 4,58 ppm permet d'établir le rapport  $\alpha/\beta$  à 40/60. Trois autres doublets sont attribuables aux protons anomériques des extrémités réduites. Le DP de l'oligosaccharide est confirmé par rapport aux intégrations des signaux correspondant aux protons anomériques. Dans ce cas, il suffit d'établir le rapport de la somme des intégrations des protons de l'extrémité réductrice et de la somme des intégrations des protons anomériques totaux. Les autres valeurs des signaux sont recensées dans le Tableau 20 et sont en accord avec la littérature.<sup>174</sup>

**Tableau 20 : Données RMN <sup>1</sup>H (a) et RMN <sup>13</sup>C (b) ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz) du tétramère d'acide galacturonique (9) obtenues dans D<sub>2</sub>O à 25 °C.**

(a)	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> *	H <sub>4</sub> *	H <sub>5</sub> *
Gal-red $\alpha$	5.35	3.88	4.03	4.42	4.80
	d, $J_{1,2} = 3.5$	dd, $J_{2,1} = 3.5$ $J_{2,3} = 10.5$			
Gal-red $\beta$	4.63	3.55	3.79	4.45	4.80
	d, $J_{1,2} = 7.7$	dd, $J_{2,1} = 7.9$ $J_{2,3} = 9.9$			
Gal-2	5.17	3.79	4.09	4.48	4.82
	d, $J_{1,2} = 3.6$	dd, $J_{2,1} = 3.7$ $J_{2,3} = 10.7$			
Gal-3	5.14	3.81	4.05	4.45	4.82
	d, $J_{1,2} = 3.3$	dd, $J_{2,1} = 3.7$ $J_{2,3} = 10.7$			
Gal-ter	5.11	3.74	3.94	4.29	4.80
	d, $J_{1,2} = 3.7$	dd, $J_{2,1} = 3.7$ $J_{2,3} = 10.7$			

\*les constantes de couplage  $J_{3,4}$  et  $J_{4,5}$  ne peuvent pas être déterminées.

(b)	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
Gal-red $\alpha$	92.63	68.43	69.01	78.56	70.99	175.58
Gal-red $\beta$	96.6	70.85	72.89	77.64	72.89	175.67
Gal-2	99.67*	68.59	69.01	78.45	72.04	175.28
Gal-3	99.66*	68.59	69.02	78.39	72.04	175.28
Gal-ter	99.66*	68.54	69.10	79.14	72.04	175.28

\* les déplacements chimiques peuvent être inversés.

### 1.2.2.2.2 Cas des carraghénanes.

Les oligocarraghénanes sont quant à eux obtenus par hydrolyse acide de *iotacarraghénanes* commerciaux extraits d'algues rouges (Figure 39).

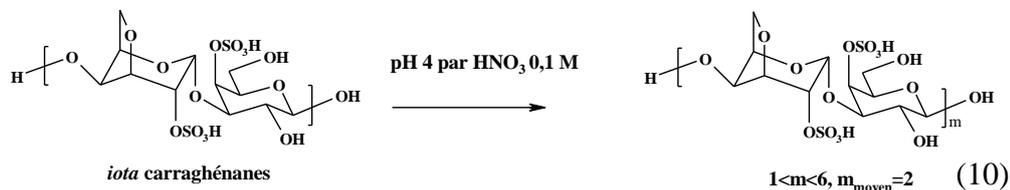


Figure 39 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse acide de carraghénanes.

Les meilleures conditions d'hydrolyse (température d'hydrolyse, durée et activité de l'acide) ont permis d'obtenir des oligocarraghénanes de DP moyen 4 ( $m=2$ ). Le profil de masse est présenté en Figure 40.

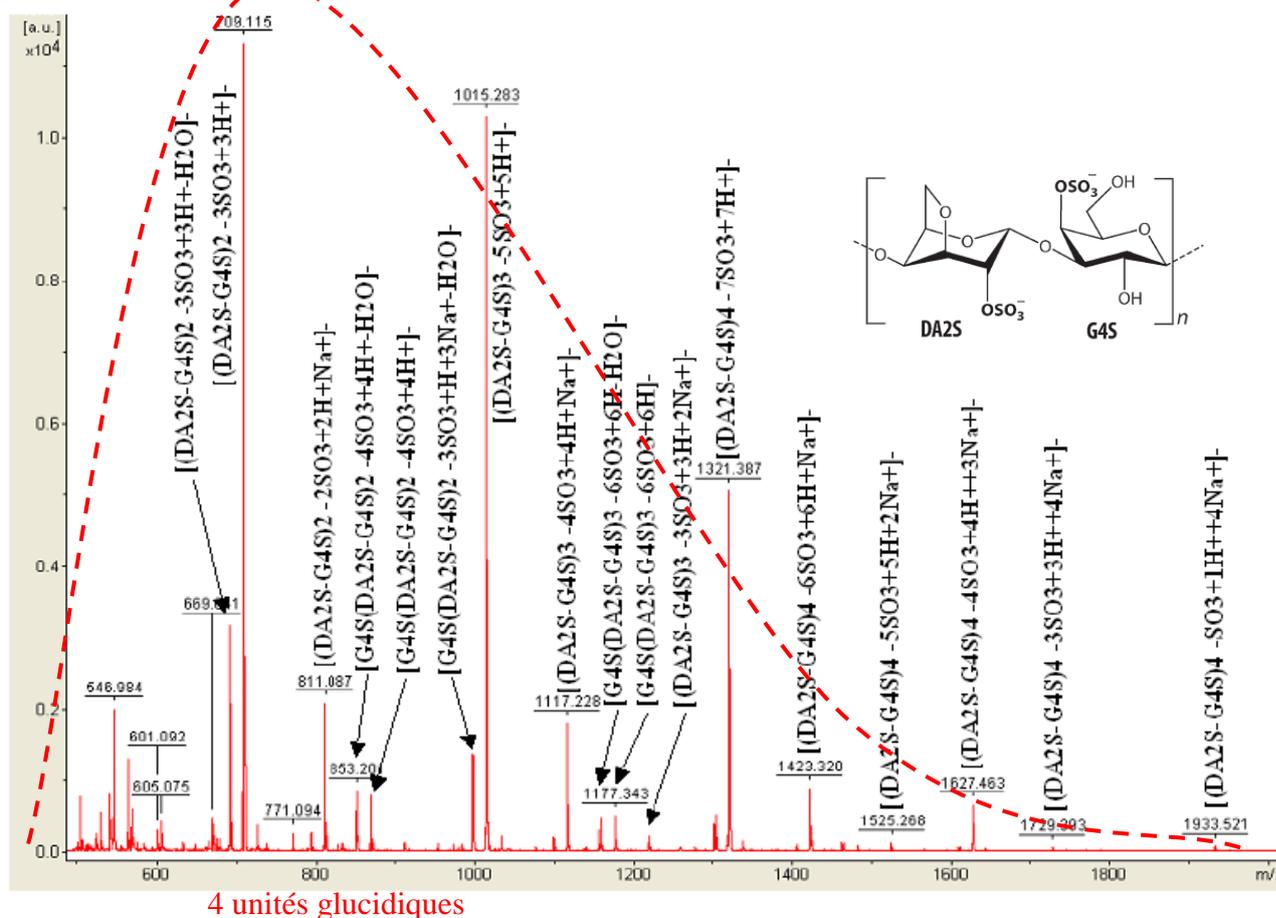


Figure 40 : Spectre de masse ESI du mélange d'oligocarraghénanes (10) obtenu par hydrolyse acide.

### 1.2.2.3 Fonctionnalisation de l'extrémité réductrice des oligosaccharides par amination réductrice.

#### 1.2.2.3.1 Cas des oligogalacturonates.

La réaction d'amination réductrice a été conduite sur le mélange d'oligogalacturonates (8) mais également sur l'oligosaccharide de DP 4 purifié (9), en utilisant comme amine l'ammoniaque ou le 1,3-diaminopropane monoprotégé (11) par un groupement tertbutylcarbamate (Boc). Dans le cas du 1,3-diaminopropane, la chaîne carbonée assure la fonction de bras espaceur. Les différentes étapes de synthèse sont présentées sur la Figure 41.

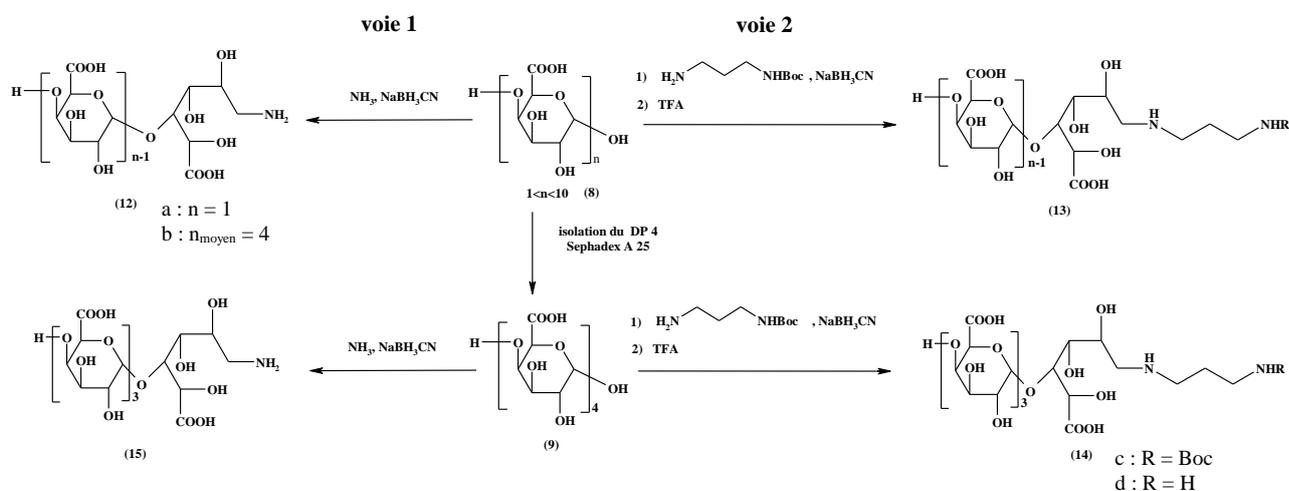


Figure 41 : Schéma général de synthèse d'oligogalacturonates fonctionnalisés.

✓ Amination réductrice par l'ammoniaque.

La réaction d'amination réductrice (Figure 41, voie 1) est effectuée à 60 °C en utilisant un large excès d'une solution d'ammoniaque à 20% (20 équivalents) et en présence de cyanoborohydrure de sodium comme agent réducteur également en large excès (16 équivalents). Le suivi CCM montre la conversion totale des oligosaccharides en produits aminés facilement identifiables par révélation à la ninhydrine. Les rendements obtenus après purification, que ce soit pour la transformation du mélange d'oligogalacturonates (8) ou l'oligogalacturonate de DP 4 (9), sont quantitatifs. L'analyse par spectrométrie de masse ESI à mode négatif a permis de confirmer les structures des produits attendus. Pour l'oligosaccharide modifié de DP 4 (15), la présence de deux pics caractéristiques à  $m/z$  705,3 et  $m/z$  721,3 correspondant aux ions  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^-$  et  $[\text{M}-\text{H}]^-$  respectivement confirme la formation des produits attendus. En revanche, la spectroscopie de RMN s'est avérée dans ce

cas, difficilement exploitable compte tenu de la complexité des spectres présentant de nombreux chevauchements de signaux les rendant de fait difficilement attribuables. Toutefois, la transformation par amination réductrice est mise en évidence par la disparition du signal correspondant au proton anomérique de l'extrémité réductrice.

- ✓ Amination réductrice par le N-Boc-1,3-diaminopropane (11).

Pour l'introduction d'un bras espaceur aminé sur les oligogalacturonates, le 1,3-diaminopropane a été choisi. L'une des deux fonctions amine de ce composé permet sa fixation par amination réductrice sur l'oligosaccharide, l'autre est destinée au greffage de l'oligosaccharide ainsi modifié sur les écorces oxydées. Une telle stratégie (Figure 41, voie 2) a au préalable nécessité la protection d'une des deux fonctions amines du 1,3-diaminopropane afin d'éviter la formation de dimères d'oligosaccharides.

- Synthèse du ter-butyl-3-aminopropylcarbamate.

Le N-Boc-1,3-diaminopropane (11) a été préparé selon la méthode décrite par Dardonville et al.<sup>175</sup> (Figure 42)

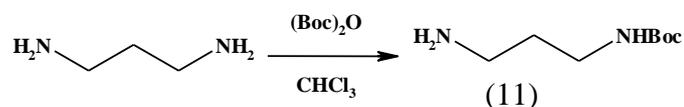


Figure 42 : Schéma de synthèse du ter-butyl-3-aminopropylcarbamate.

Un excès de 1,3-diaminopropane (5 équivalents) est mis à réagir à 0 °C dans le chloroforme fraîchement distillé avec le di-tert-butylcarbamate ajouté goutte à goutte en solution dans le chloroforme. La réaction se poursuit à température ambiante pendant 18 heures et après un simple traitement, sans autre purification, le produit attendu est obtenu avec un rendement de 92%. L'analyse RMN confirme la structure en ne révélant la présence que d'un seul groupement Boc.

- Amination réductrice.

La réaction d'amination réductrice (Figure 41, voie 2) est effectuée en mettant en jeu 16 équivalents de cyanoborohydrure de sodium comme agent réducteur et 5 équivalents d'amine, à 80 °C dans un mélange méthanol/eau, 3/1, v/v. Le suivi par CCM montre la conversion totale des oligosaccharides en produits aminés observés, comme dans le cas précédent par révélation à la ninhydrine. Les rendements obtenus sont quantitatifs et la caractérisation par spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H a permis d'identifier le signal caractéristique du groupement Boc (3H, s, 1,47 ppm). De plus, les analyses effectuées par spectrométrie de

masse MALDI ou ESI en mode négatif ont montré la conversion totale des oligomères de départ (dans le cas du tétramère (14 c), un unique signal à  $m/z = 881.3$  correspondant à l'ion  $[M+H]^+$  est observable). L'utilisation du TFA à température ambiante dans une seconde étape permet la déprotection de l'amine sans hydrolyser la chaîne glucidique. Les spectres RMN  $^1H$  ne présentent plus de signal à 1,47 ppm traduisant la déprotection de l'amine. Les analyses en spectrométrie de masse confirment ces résultats ; dans le cas du tétramère (14 d), un unique signal à  $m/z = 763.3$  correspondant à l'ion  $[(M-H_2O)+H]^+$  est observé.

### 1.2.2.3.2 Cas des oligocarraghénanes.

Les essais d'adsorption (développés par la suite au paragraphe : Evaluation des capacités d'adsorption des écorces greffées par l'obtention d'isotherme d'adsorption. page 110) effectués sur les écorces greffées par les oligogalacturonates précédemment synthétisés ont montré le rôle du bras espaceur sur les capacités de rétention. C'est pourquoi les mêmes conditions opératoires ont été transposées à la fonctionnalisation des oligocarraghénanes. La réaction d'amination réductrice (Figure 43) est effectuée sur le mélange d'oligocarraghénanes (10) en mettant en jeu 16 équivalents de cyanoborohydrure de sodium comme agent réducteur et 5 équivalents d'amine, à 80 °C dans un mélange méthanol/eau, 3/1, v/v. Le suivi par CCM montre la conversion totale des oligosaccharides en produits aminés observés, comme dans le cas précédent par révélation à la ninhydrine.

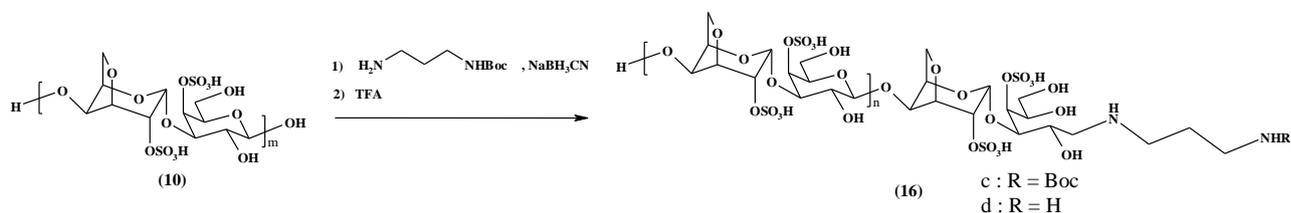


Figure 43 : Schéma général de synthèse d'oligocarraghénanes fonctionnalisés.

Après élimination du réducteur et de l'amine en excès, les caractérisations du composé (16 c) effectuées par spectrométrie de masse MALDI en mode positif indiquent la formation du produit attendu. Dans ce cas, la présence de faibles quantités d'autres produits dont les structures n'ont pu être déterminées est observée. L'analyse par spectroscopie de RMN confirme la fonctionnalisation des oligosaccharides par la présence du signal caractéristique du groupement Boc.

Compte tenu de la faible proportion d'impuretés, le produit de réaction a été utilisé tel quel pour l'étape de déprotection réalisée en conditions classiques par le TFA. Les caractérisations effectuées par spectrométrie de masse MALDI en mode négatif indiquent la formation du produit attendu (16 d), cependant, la présence d'oligocarraghénanes (10) non fonctionnalisés

traduit l'hydrolyse partielle des oligosaccharides abaissant ainsi le DP moyen des oligocarraghénanes fonctionnalisés à 3 unités glucidiques. L'analyse par spectroscopie de RMN confirme la déprotection des oligosaccharides par la disparition du signal caractéristique du groupement Boc.

### 1.2.3 Fonctionnalisation des écorces.

La fonctionnalisation des écorces (Figure 34) repose sur la réaction d'amination réductrice entre les écorces dialdéhydes (1) et les amines primaires précédemment synthétisées (Figure 41 et Figure 43). Comme dans le cas des écorces oxydées, nous proposons de caractériser le matériau par son rendement massique, et ses propriétés acides. Le greffage des oligosaccharides aminés (12 a, 12 b, 13 d, 14 d et 16 d) sur les écorces dialdéhydes (1) conduit respectivement aux structures des écorces modifiées (17, 18, 19, 20 et 21).

#### 1.2.3.1 Rendement massique.

Le Tableau 21 recense l'ensemble des rendements obtenus après amination réductrice. Si, sur le plan théorique, un greffage de molécule permettrait d'augmenter la masse de produits, les résultats expérimentaux témoignent du contraire.

Tableau 21 : Rendements massiques des réactions d'amination réductrice.

Ecorces	Témoin	Galacturonate				Carraghénane
		17	18	19	20	21
Numéro d'écorce modifiée						
<b>Rendements massiques (%)</b>	80	77	83	80	78	82

Les rendements réactionnels sont inférieurs à 100% traduisant la solubilisation de composés encore présents sur les écorces après oxydation *periodique*. La réaction d'amination réductrice dite témoin (sans amine) conduit à un rendement massique de 80% traduisant la solubilisation supplémentaire d'autres constituants. De plus, dans certains cas et malgré le greffage d'amine (12 a et 13 d), les rendements massiques sont encore inférieurs à 80%. La variation de masse ne peut donc pas traduire le rendement réactionnel du greffage ; c'est pourquoi une caractérisation des propriétés acido-basiques a été effectuée.

### 1.2.3.2 Propriétés acido-basiques des écorces fonctionnalisées.

La mesure de l'acidité a été effectuée selon une adaptation de la méthode de Boehm. Le dosage par l'hydrogénocarbonate de sodium permet d'évaluer le nombre de fonctions acide carboxylique ou d'acidité de force comparable de surface du matériau. Le Tableau 22 rassemble les propriétés acides des écorces modifiées. Ces valeurs, comprises entre 1,755 et 3,017 mmol.g<sup>-1</sup>, permettent de calculer le pourcentage d'aldéhydes substitué par les amines. Les DS sont faibles et compris entre 2 et 7%. Ils sont aussi cohérents avec les valeurs reportées dans la littérature s'agissant de modifications chimiques comparables.<sup>138</sup> Par ailleurs, le DP des molécules greffées ne semble pas avoir de conséquences significatives sur la valeur de DS.

Tableau 22 : Mesure de l'acidité et du taux de substitution des écorces fonctionnalisées.

Ecorces Numéro du composé greffé	Témoin	Galacturonate				Carraghénane
		17	18	19	20	
Acidité (mmol.g <sup>-1</sup> )	1,358	1,755	2,361	3,017	1,963	2,877
DS (%)	-	4,93	3,13	7,68	1,89	4,75

### 1.2.4 Caractérisation par spectroscopie infrarouge.

Les spectres IR présentés Figure 44 mettent en évidence une diminution de l'intensité de la bande correspondant aux fonctions aldéhyde (élongation des liaisons C=O à 1740 cm<sup>-1</sup>) confirmant indirectement le greffage après amination réductrice. Dans le cas du greffage d'oligogalacturonates, aucun signal ne peut être attribué à la modification. Compte tenu de la faible valeur de DS, les signaux caractéristiques des dérivés d'acide galacturonique se superposent, sans se différencier, aux signaux des dérivés d'acide galacturonique naturellement présents dans les pectines constitutives des écorces. Dans le cas du greffage des oligocarraghénanes (écorces 21), des signaux attribuables aux fonctions sulfates apparaissent à 1416 et 1221 cm<sup>-1</sup> et correspondent respectivement aux liaisons S-O et S=O.

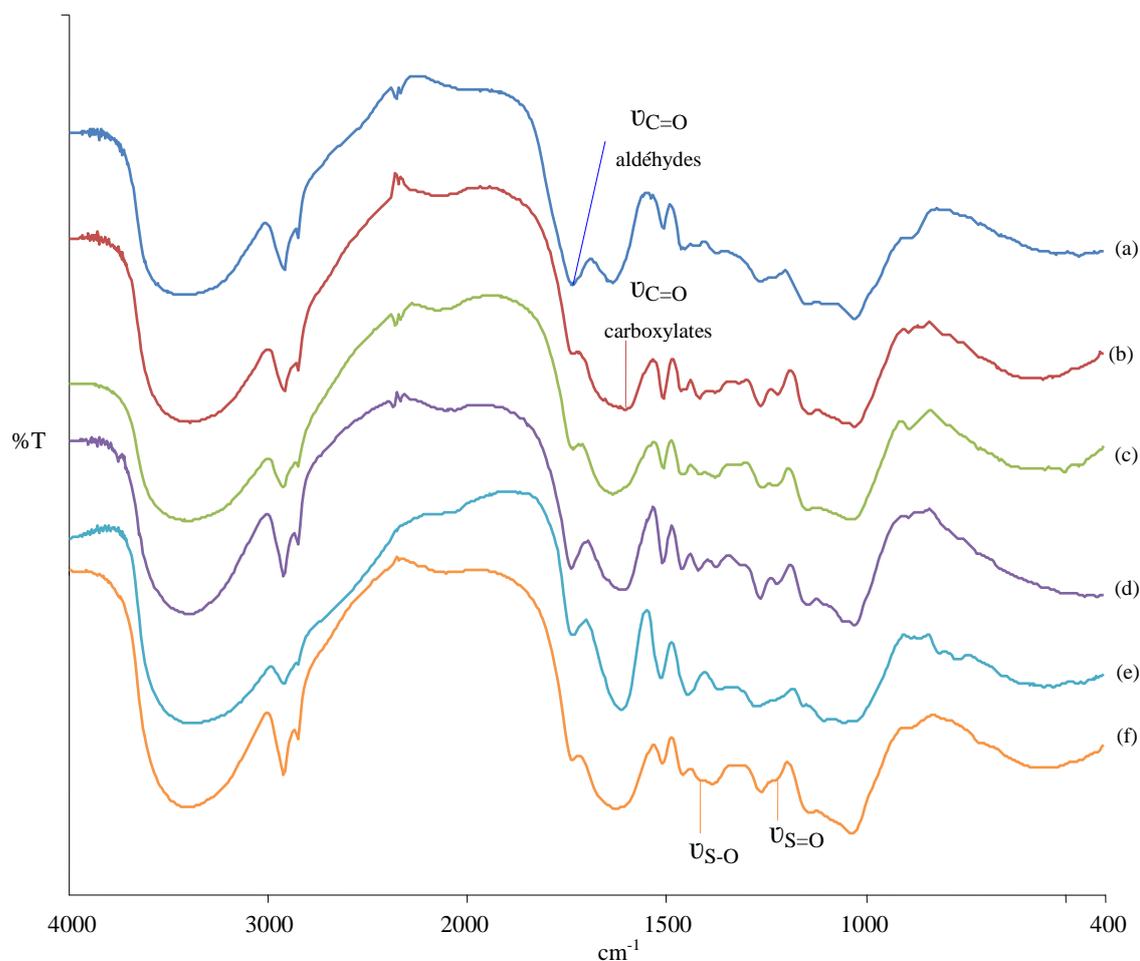


Figure 44 : Spectres infrarouge en transmittance.

écorces dialdéhydes (1) (a), écorces greffées (20) (b), (19) (c), (18) (d), (17) (e), (21) (f).

## 2 Conséquences d'un stress métallique sur la composition de la fraction pariétale des écorces et du bois de sapin de Douglas.

Les végétaux sont parfois capables de s'adapter aux stress environnementaux dont la pollution par les ETM. Les adaptations concernent, entre autres, les compositions chimiques des parois cellulaires<sup>176</sup> qui peuvent alors être considérées comme des filtres passifs. Ceci est vrai pour les cellules racinaires qui sont en contact direct avec la solution du sol et donc les ETM. C'est également vrai pour les cellules d'écorces qui sont considérées comme une zone de stockage des polluants organiques et minéraux.<sup>123</sup> Les écorces de sapin de Douglas présentant de bonnes capacités à adsorber les cations métalliques, nous avons souhaité

engager une étude prospective des capacités du sapin de Douglas d'une part à tolérer le Cadmium au cours de sa croissance et, d'autre part, à s'adapter chimiquement à cette contamination. Cet élément est classé parmi les éléments métalliques de transition, il ne fait pas partie des oligoéléments. Très toxique à faible dose, il est pourtant absorbé par les plantes de manière opportuniste. Ses propriétés physiques et chimiques (taille, charge...) lui permettent d'emprunter les canaux responsables de l'absorption d'oligoéléments tels que le calcium. Par ailleurs, la majorité des plantes accumulatrices décrites a la particularité physiologique d'être de petite taille. C'est la raison pour laquelle, notre choix s'est orienté vers une espèce ligneuse : le sapin de Douglas. Si cet arbre est capable de tolérer la présence d'ETM dans le sol, son utilisation permettrait de décontaminer les sols en profondeur grâce à son système racinaire développé et d'accumuler de grandes quantités d'ETM - même à de faibles teneurs - du fait de sa production de biomasse importante. Enfin, une culture sous serre a été choisie afin de permettre une bonne modélisation du phénomène et notamment de fixer des teneurs initiales en Cadmium. Des effets toxiques du Cadmium sur la croissance et le développement des plantes étant couramment observés à partir de 0,1 mM, nous avons retenu cette valeur de concentration comme limite maximale pour nos cultures. Des sapins de Douglas juvéniles ont donc été cultivés sous serre (Figure 45) au contact de sols contenant de 0 à 0,1 mM de Cd soit 11 ppm maximum ; la valeur seuil pour considérer un sol pollué étant fixée à 0,02 mM (2 ppm environ). La phytodisponibilité du Cadmium sera préalablement étudiée. Dans un second temps, la distribution du Cd dans la plante tout comme les conséquences chimiques de la présence du Cadmium, sur les principaux constituants des parois cellulaires d'écorces et de bois seront évaluées.



**Figure 45 : Culture de sapins de Douglas mise en place sous serre.**

Nous démontrerons ainsi que les conséquences d'un stress métallique se traduisent par une modification chimique des composés pariétaux des écorces et du bois. Cette évolution sera mise en relation avec les propriétés biosorbantes de matériaux obtenus ; la phytoextraction est dans ce cas un moyen d'induire une modification de la composition chimique des écorces.

## 2.1 Caractérisation des substrats de culture.

L'ensemble des mesures a été effectué de façon indépendante sur chaque pot de culture (avec quatre répétitions pour la même condition de culture). Les substrats de cultures sont issus d'un même mélange initial composé de terreau et de sable (cf partie expérimentale).

### 2.1.1 Caractéristiques générales.

La teneur en matière organique des substrats de culture est de 19,4% de la masse sèche, le rapport C/N est de 35,6 ; ces valeurs classent ce substrat parmi les sols riches en matière organique et dont la minéralisation de cette dernière est lente (rapport C/N > 20).

La mesure de la capacité d'échange cationique (CEC) a été effectuée par une méthode colorimétrique. Les résultats obtenus sur le substrat témoin (mélange terreau/sable) donne une valeur de  $16 \pm 3$  méq.100 g<sup>-1</sup> de sol sec ce qui classe le substrat utilisé parmi les sols à CEC modérée ( $12 < \text{CEC} < 25$ ).<sup>177</sup>

La mesure du pH du sol (Figure 46) après culture n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les différents niveaux de contamination : le cadmium apporté sous forme de sel de chlorure n'a pas d'influence sur le pH pour la gamme de concentration choisie pour cette étude. Ainsi, la valeur de pH moyen est estimée à  $6,44 \pm 0,09$  ce qui classe ces sols parmi les sols équilibrés ( $6 < \text{pH} < 7$ ), permettant une bonne alimentation minérale des plantes.

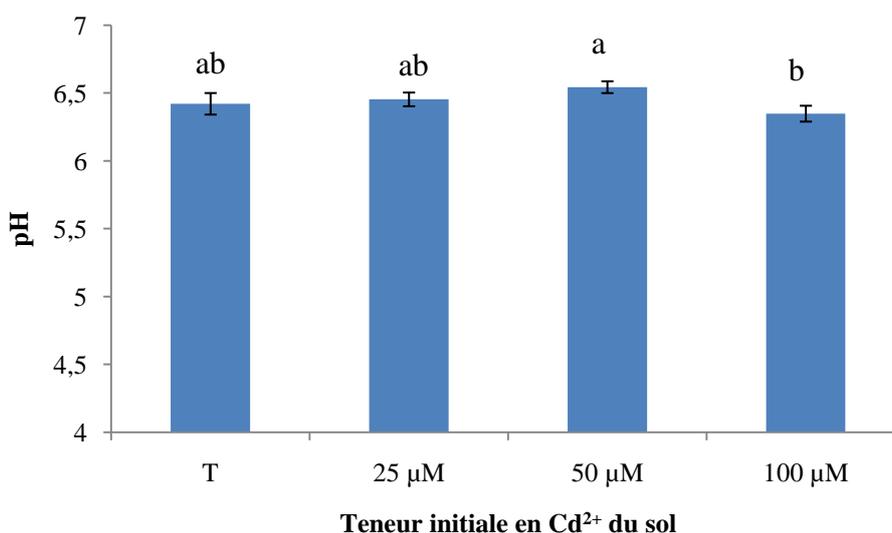


Figure 46 : pH des différents sols après 9 mois de culture des sapins de Douglas.

Les résultats sont une moyenne (n=4)  $\pm$  EC. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ( $p < 0,05$ )

## 2.1.2 Répartition du cadmium dans les sols.

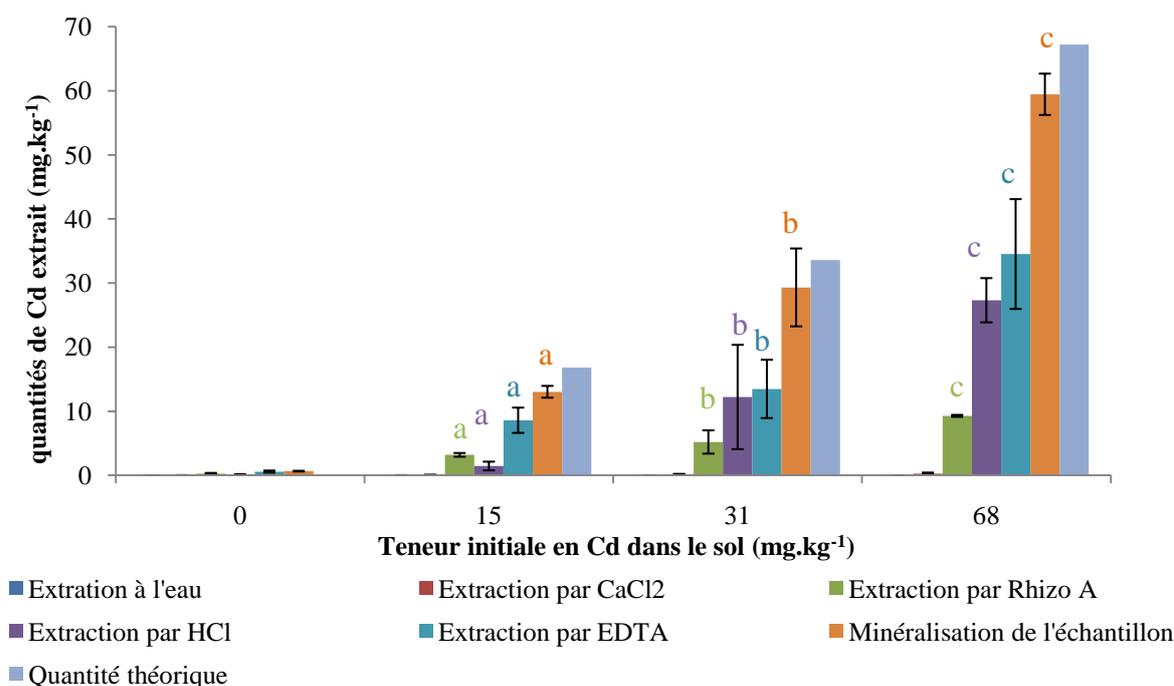
### 2.1.2.1 Schéma général de quantification.

Afin de quantifier le cadmium dans les différentes fractions des sols sur lesquels les cultures se sont déroulées, une série de 5 extractions sélectives du cadmium a été mise en place :

- ✓ Par l'eau ultra pure : permet d'extraire le cadmium encore mobile ;
- ✓ Par  $\text{CaCl}_2$ <sup>178</sup> : permet d'extraire le cadmium phytodisponible, qui est faiblement retenu aux particules de sol ;
- ✓ Par un mélange d'acide dit RHIZO A<sup>179</sup> : permet d'extraire le cadmium rendu disponible par la plante après libération d'exsudats racinaires comme des acides organiques ;
- ✓ Par l'EDTA<sup>180</sup> : permet d'extraire le cadmium complexé par la matière organique (en plus du cadmium extractible à l'eau et au  $\text{CaCl}_2$ ) ;
- ✓ Par  $\text{HCl}$ <sup>181</sup> : permet l'extraction du cadmium lié aux oxydes de fer et de manganèse (permet également l'extraction du cadmium extractible à l'eau et à  $\text{CaCl}_2$ ) ;
- ✓ Extraction du cadmium total : la minéralisation directe de l'échantillon en milieu acide à chaud permet de connaître la teneur globale en cadmium.

### 2.1.2.2 Teneurs en Cd dans les fractions extraites des sols de culture.

La Figure 47 montre la quantité de cadmium présent dans les différentes extractions réalisées à partir des quatre sols de culture contenant une quantité initiale théorique de 0 (témoin), 25, 50 et 100  $\mu\text{M}$ . Cette dernière représente l'objectif initial de concentration pour un volume de sol de 6 litres, or après mesure de la masse de sol (après la récolte des sapins de Douglas), les teneurs ne sont pas directement proportionnelles et correspondent en réalité à 0, 15, 31 et 68  $\text{mg.kg}^{-1}$ , c'est pourquoi dans la suite des résultats, ces valeurs sont utilisées. Pour chaque catégorie d'extraction, il apparaît très nettement une relation de proportionnalité avec les teneurs des sols étudiés.



**Figure 47 : Quantité de cadmium extrait lors des différentes extractions.**

Dosage sur sols après 9 mois de culture, les résultats sont une moyenne ( $n=4$ )  $\pm$  EC. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ( $p < 0,05$ ).

Les teneurs en Cd dosées après minéralisation des substrats de culture sont inférieures à celles théoriquement introduites à l'origine de la culture. Cela traduit indirectement le niveau de prélèvement du Cd par le sapin de Douglas au cours de sa croissance. Concernant la répartition du cadmium dans les différentes fractions extraites, celles extraites à l'eau et par  $\text{CaCl}_2$  sont très minoritaires (moins de 2% du Cd total). Globalement, 25% du cadmium est extractible par le Rhizo A, 50% extractible par l'EDTA et 40% extractible par HCl. Ces résultats traduisent le caractère sélectif de chaque extraction où un extrait peut contenir à la fois le cadmium retenu à un des constituants du sol mais aussi le cadmium libre.

### 2.1.2.3 *Phytodisponibilité du Cd au cours du temps.*

Si en début d'expérience, la totalité du Cd introduit est soluble et donc *a fortiori* phytodisponible, il en est autrement au cours du temps. Des études ont montré que la fraction phytodisponible diminuait au cours du temps, pour, en quelques mois devenir largement minoritaire<sup>182</sup> : il s'agit de « l'ageing affect ». C'est pourquoi, une étude de phytodisponibilité du Cd sur une période de 5 mois a été effectuée (Figure 48).

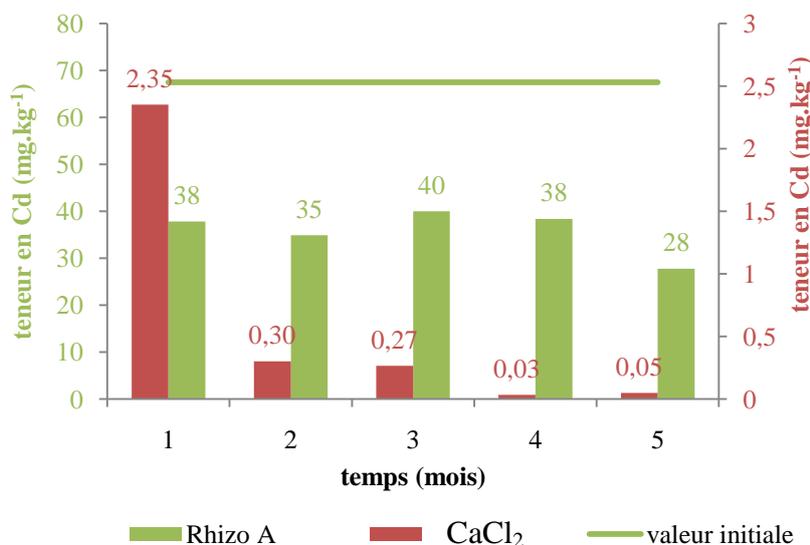


Figure 48 : Phytodisponibilité du Cd au cours du temps.

Résultats obtenus pour une contamination initiale de 68 mg.kg<sup>-1</sup> (100 µM) sans culture de sapin de Douglas.

La fraction extractible à l'eau est largement négligeable (<0,03 mg.kg<sup>-1</sup>) et ce quelle que soit la durée après la contamination artificielle (ici réalisée selon une teneur théorique initiale de 68 mg.kg<sup>-1</sup>) ; c'est pourquoi elle n'est pas représentée Figure 48. La quantité extractible par le mélange d'acides Rhizo A correspondant à la fraction phytodisponible dans le cas de libération d'exsudats racinaires (comme des acides organiques tels que l'acide citrique) reste constante sur la durée de l'expérimentation. Cependant, la fraction de Cd échangeable par CaCl<sub>2</sub>, bien que minoritaire (au plus 30 fois inférieure à la quantité introduite), diminue au cours du temps pour devenir à partir de 4 mois quasiment nulle.

## 2.2 Adaptation du sapin de Douglas au stress métallique.

Afin d'apprécier la quantité de cadmium absorbé et sa distribution, les plants de sapin de Douglas ont été découpés (Figure 49) en compartiments permettant de distinguer les parties souterraines des parties aériennes. Ces dernières sont divisées en 4 niveaux correspondant aux 4 années de croissance, l'exposition au sol contaminé en cadmium n'étant intervenue que pour la dernière année de croissance. De plus, pour chaque année, les écorces, le bois, les aiguilles, les rameaux et les bourgeons sont séparés (concernant la quatrième année, seules les aiguilles, les rameaux et les bourgeons sont différenciables).

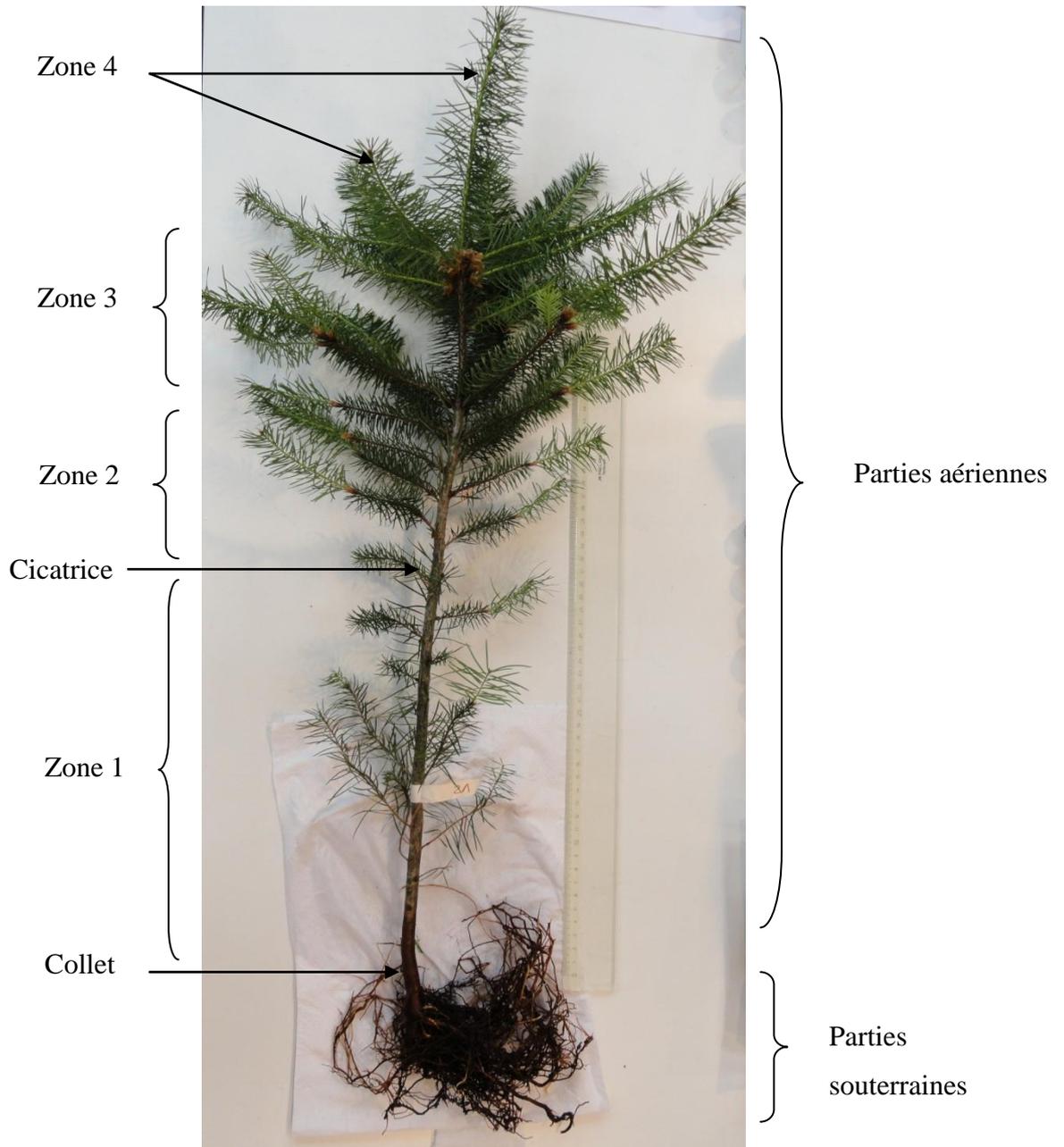


Figure 49 : Schéma de découpe d'un sapin de Douglas.

### 2.2.1 Effet du cadmium sur la croissance des plants de sapin de Douglas.

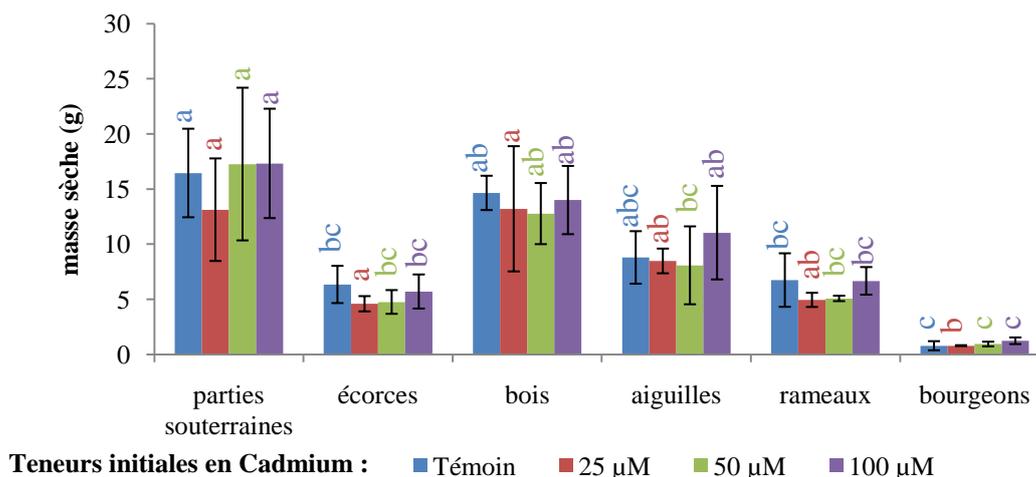
Le cadmium est connu pour induire un ralentissement de la croissance, en provoquant d'une part la diminution de la taille de la racine principale (ou pivot) et, d'autre part en limitant le développement des parties aériennes. C'est pourquoi les critères retenus pour cette étude sont la taille, le nombre de rameaux, le diamètre au collet et la masse sèche totale. Le Tableau 23 rassemble les caractéristiques morphologiques globales des sapins de Douglas utilisés pour cette étude. Dans les conditions expérimentales utilisées ici, les teneurs en Cd ne semblent pas altérer de manière significative la croissance et le développement des plants de sapin de Douglas.

**Tableau 23 : Données morphologiques des sapins de Douglas avant et après la période de culture.**

Les valeurs indiquées représentent la moyenne (n=4) ± EC. Le nombre de rameaux reste stable durant la période de culture. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative (p < 0,05).

[Cd <sup>2+</sup> ] (μM)	hauteur avant culture (cm)	hauteur après culture (cm)	Ø collet avant culture (cm)	Ø collet après culture (cm)	nombre rameaux
<b>Témoin (0)</b>	69 ± 8 a	84 ± 9 a	1,22 ± 0,11 a	1,26 ± 0,21 a	25 ± 7 a
<b>25</b>	73 ± 7 a	88 ± 7 a	1,22 ± 0,34 a	1,14 ± 0,26 a	26 ± 7 a
<b>50</b>	74 ± 2 a	87 ± 2 a	1,32 ± 0,35 a	1,36 ± 0,22 a	32 ± 1 a
<b>100</b>	68 ± 8 a	82 ± 7 a	1,13 ± 0,14 a	1,24 ± 0,16 a	27 ± 3 a

L'autre critère retenu est la mesure de la masse sèche pour chaque partie de la plante. Ces données sont présentées en Figure 50.



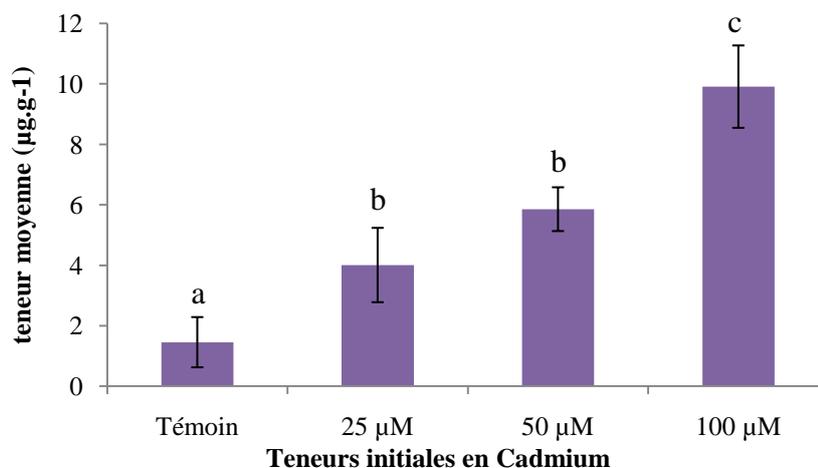
**Figure 50 : Masse sèche des différents compartiments des sapins de Douglas à la récolte.**

Les valeurs sont une moyenne (n=4) ± EC, la durée de culture est de 9 mois. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative (p < 0,05).

Les parties souterraines (racines et pivots) représentent 34% de la masse totale puis viennent le bois (26%), les aiguilles (18%), les écorces et les rameaux (10%); enfin les bourgeons ne contribuent qu'à hauteur de 2% de la masse totale. La masse est constante pour un compartiment donné quelle que soit la teneur en Cadmium dans le sol. Dans les conditions de culture mises en œuvre dans le cadre de cette étude, la teneur en Cadmium des sols n'induit aucune variation significative des masses sèches produites par chacun des compartiments.

### 2.2.2 Distribution du cadmium dans les arbres.

La Figure 51 présente les teneurs moyennes en Cadmium dosées à partir des plants cultivés dans les différentes conditions expérimentales. Une relation de proportionnalité peut s'établir entre les teneurs en Cadmium dans le sol et dans les plants. Les teneurs moyennes atteignent  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière sèche pour la condition la plus contaminée. La présence de Cadmium dans le lot témoin est vraisemblablement due à un effet de matrice ou à des interférences lors du dosage.



**Figure 51 : Teneurs moyennes en cadmium des arbres issus des différentes conditions de cultures.**

Les valeurs sont une moyenne ( $n=4$ )  $\pm$  EC, la durée de culture est de 9 mois. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ( $p < 0,05$ ).

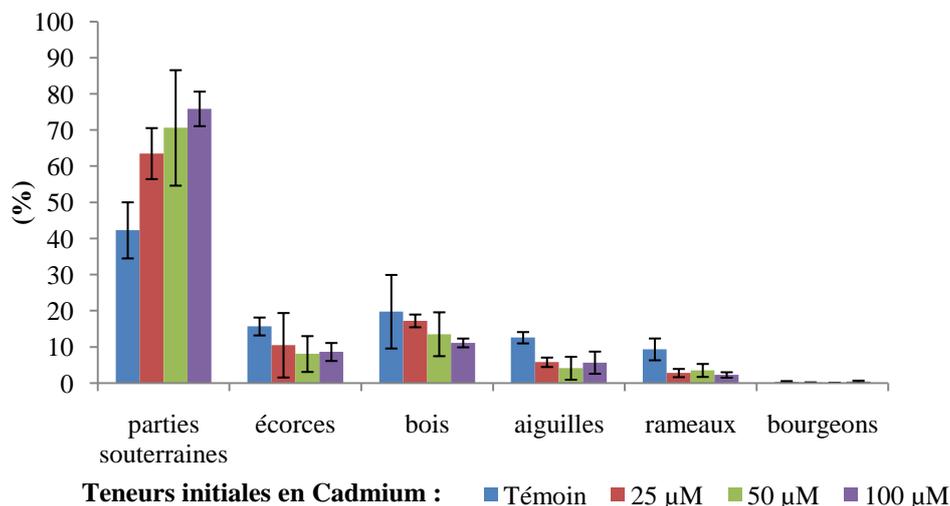
Le Tableau 24 indique que le pourcentage de Cadmium absorbé par la plante est de l'ordre de 2 à 3% et ce quelle que soit la teneur initiale dans le sol. De plus le facteur de bioconcentration diminue lorsque la teneur en Cadmium augmente. Il est faible, de l'ordre de 0,2.

**Tableau 24 : Pourcentage de Cadmium absorbé par les sapins de Douglas, facteur de bioconcentration du Cd.**

Lot	25 µM	50 µM	100 µM
<b>Teneur moyenne Cd <math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> de MS</b>	4,01	5,85	9,91
<b>% de Cd dans la plante</b>	1,88	2,99	2,56
<b>Facteur de bioconcentration</b>	0,27	0,19	0,15

### 2.2.2.1 Par compartiment.

Le Cd est principalement retrouvé dans le système racinaire (soit environ de 40 à 72% de la quantité totale de Cd dans la plante) (Figure 52). Les parties aériennes, essentiellement bois, écorces et aiguilles, contiennent environ 30 à 40%.



**Figure 52 : Répartition du cadmium dans les différentes parties des plants de sapins de Douglas exprimée en pourcentage de la quantité totale de cadmium dans l'ensemble des plants en fonction de la teneur en Cd du sol.** Les résultats sont une moyenne (n=4) ± EC. L'analyse statistique a été effectuée sur les teneurs (Figure 53).

La Figure 53 montre que l'augmentation de la concentration en Cadmium dans le sol induit une élévation des teneurs en Cadmium dans les parties aériennes et souterraines des plants de sapin de Douglas. Parmi les parties aériennes, si les écorces ne sont pas le principal compartiment de stockage du Cadmium en valeur absolue, elles sont néanmoins la zone où les plus fortes teneurs en Cd sont observables ; ces dernières atteignent  $6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière sèche dans le cas de culture à  $0,1 \text{ mM}$  de Cd.

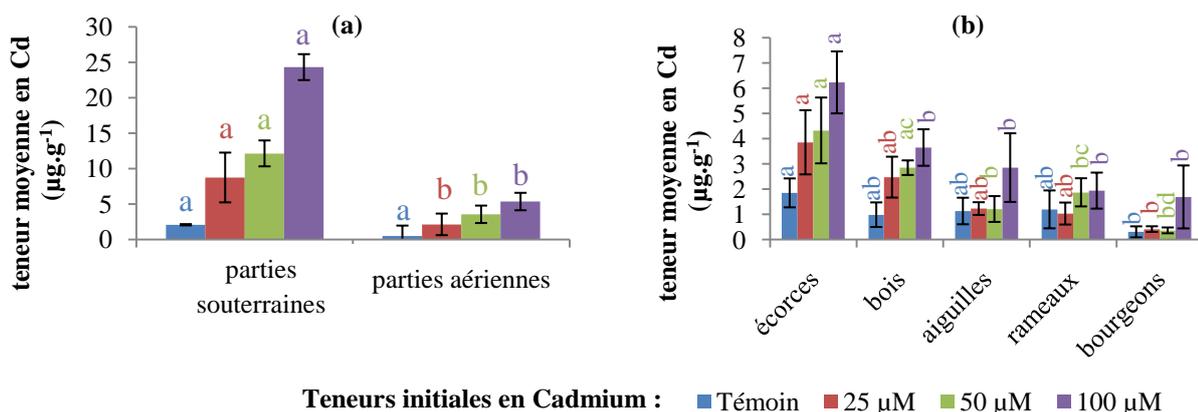


Figure 53 : (a) Teneurs moyennes en cadmium dans les parties souterraines et aériennes en fonction de la teneur en Cadmium du sol, (b) Teneurs en Cadmium dans les parties aériennes exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière sèche.

Les résultats sont une moyenne ( $n=4$ )  $\pm$  EC. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ( $p < 0,05$ ).

#### 2.2.2.2 Par année de croissance.

Précédemment, les résultats globaux par compartiment ont été présentés ; cependant, la Figure 54 rassemble les résultats des teneurs en cadmium par zone de chaque compartiment défini précédemment en Figure 49. Effectué sur chaque arbre de chaque lot, il est difficile de corréler teneur et année de croissance. C'est pourquoi, dans la suite des travaux, les différentes zones de chaque compartiment ont été rassemblées.

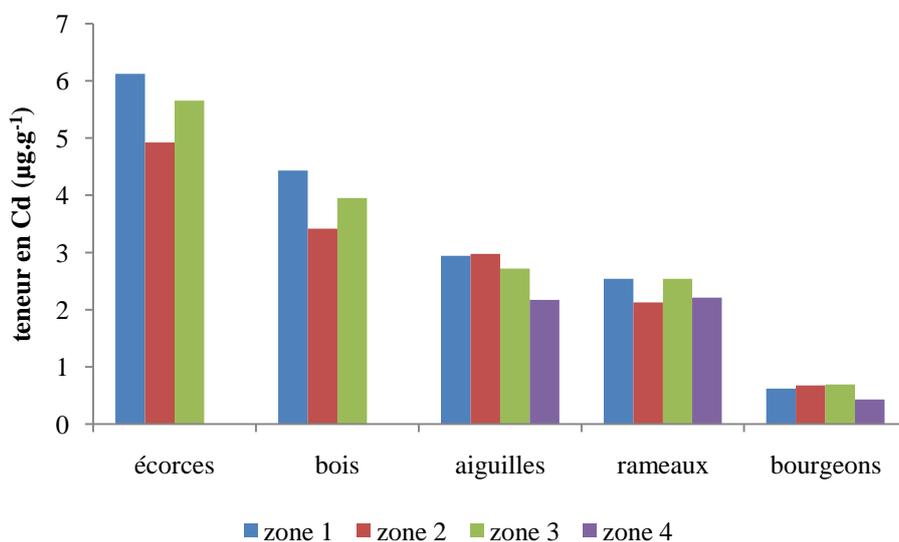


Figure 54 : Teneurs moyennes en cadmium dans les différents compartiments et par année de croissance sur un arbre cultivé sur un sol contaminé à 100  $\mu\text{M}$  de Cd.

## **2.3 Caractérisation des composants pariétaux du bois et des écorces.**

Afin de disposer de suffisamment de matériel végétal, les composés pariétaux ont été caractérisés par lot et non par individu. De plus la répartition du cadmium étant indépendante de l'année de croissance, seule la zone 1 a été utilisée.

### **2.3.1 Protocole général d'extraction.**

Afin de caractériser les composants pariétaux des écorces et du bois, une série d'extractions successives a été mise en place ; le schéma général d'extraction est présenté dans la partie expérimentale. La première étape consiste à extraire les sucres circulants, les tanins, les éléments minéraux par une solution éthanolique à 80% (fraction S1). Puis l'extraction des pectines est effectuée en deux étapes : d'une part, les pectines HM (hautement méthylestérifiées) sont extraites à l'eau chaude (fraction S2), d'autre part les pectines FM (faiblement méthylestérifiées) sont extraites en présence d'oxalate d'ammonium (fraction S3), un chélateur de calcium qui permet de déstabiliser les structures en « boîte à œuf ». Puis, vient une étape de délignification par le chlorite de sodium : son utilisation permet d'oxyder les lignines et donc de les solubiliser. Ces dernières sont éliminées, leur masse (fraction S4) est obtenue par différence par rapport aux autres fractions. Les hémicelluloses sont extraites à partir des résidus délignifiés en deux étapes (fractions S5 et S6) par des solutions alcalines (KOH et NaOH respectivement). Le résidu cellulosique (fraction C7) est obtenu après avoir répété la dernière étape à chaud. Pour ces séries d'extraction, les poudres végétales correspondant à deux arbres de la même condition de culture ont été mélangées, ceci afin de réduire le nombre de fractions.

## 2.3.2 Analyses des constituants pariétaux des écorces.

### 2.3.2.1 Fractionnement.

La Figure 55 rend compte de la distribution des différentes fractions obtenues lors des extractions successives effectuées sur les écorces. De manière générale, les écorces sont majoritairement composées de sucres circulants, tannins... extractibles par l'éthanol à 80%. Les lignines (estimées par la fraction S4) constituent les polymères pariétaux majoritaires : elles représentent plus de 40 % de la masse totale de ces derniers, témoignant de la nature secondaire des parois. Les proportions de pectines (S2 + S3), d'hémicelluloses (S5 + S6) et de cellulose (C7) sont en général équilibrées, de l'ordre de 20% chacune.

Si le rapport composés pariétaux / composés extractibles reste constant quelle que soit la condition de culture, les proportions des différents polymères pariétaux varient en fonction du traitement en Cd des plants. L'augmentation de la teneur en Cd des sols semble induire une diminution de 10% des teneurs en lignines des écorces (fraction S4) au profit des pectines FM (fraction S3).

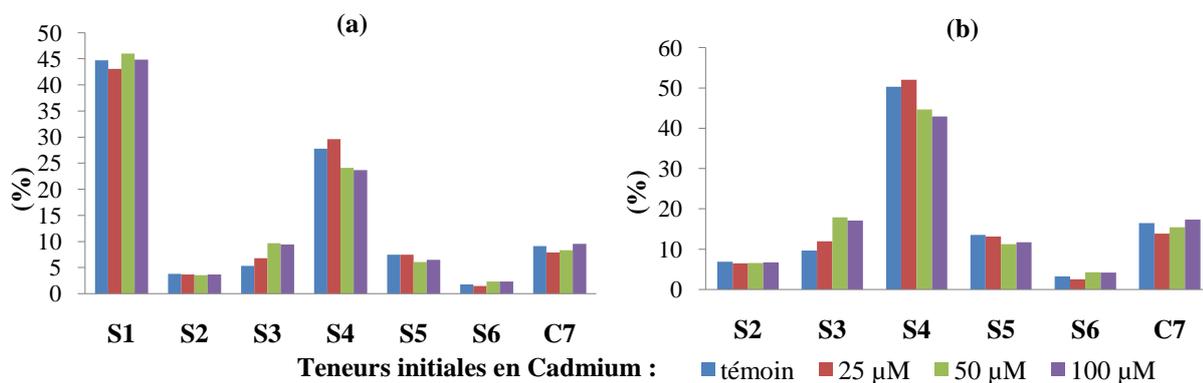


Figure 55 : Analyses des fractions extraites d'écorces d'arbres cultivés sur des sols contaminés par des concentrations croissantes en Cadmium.

- (a) Proportions des différentes fractions exprimées en pourcentage de la masse totale des fractions,  
(b) Proportions des différents constituants pariétaux des écorces exprimées en pourcentage de la masse totale des constituants pariétaux.

### 2.3.2.2 Composition monosaccharidique des constituants pariétaux extraits d'écorces.

Des analyses monosaccharidiques (Figure 56) des différentes fractions polysaccharidiques ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et dérivation par triméthylsililation.

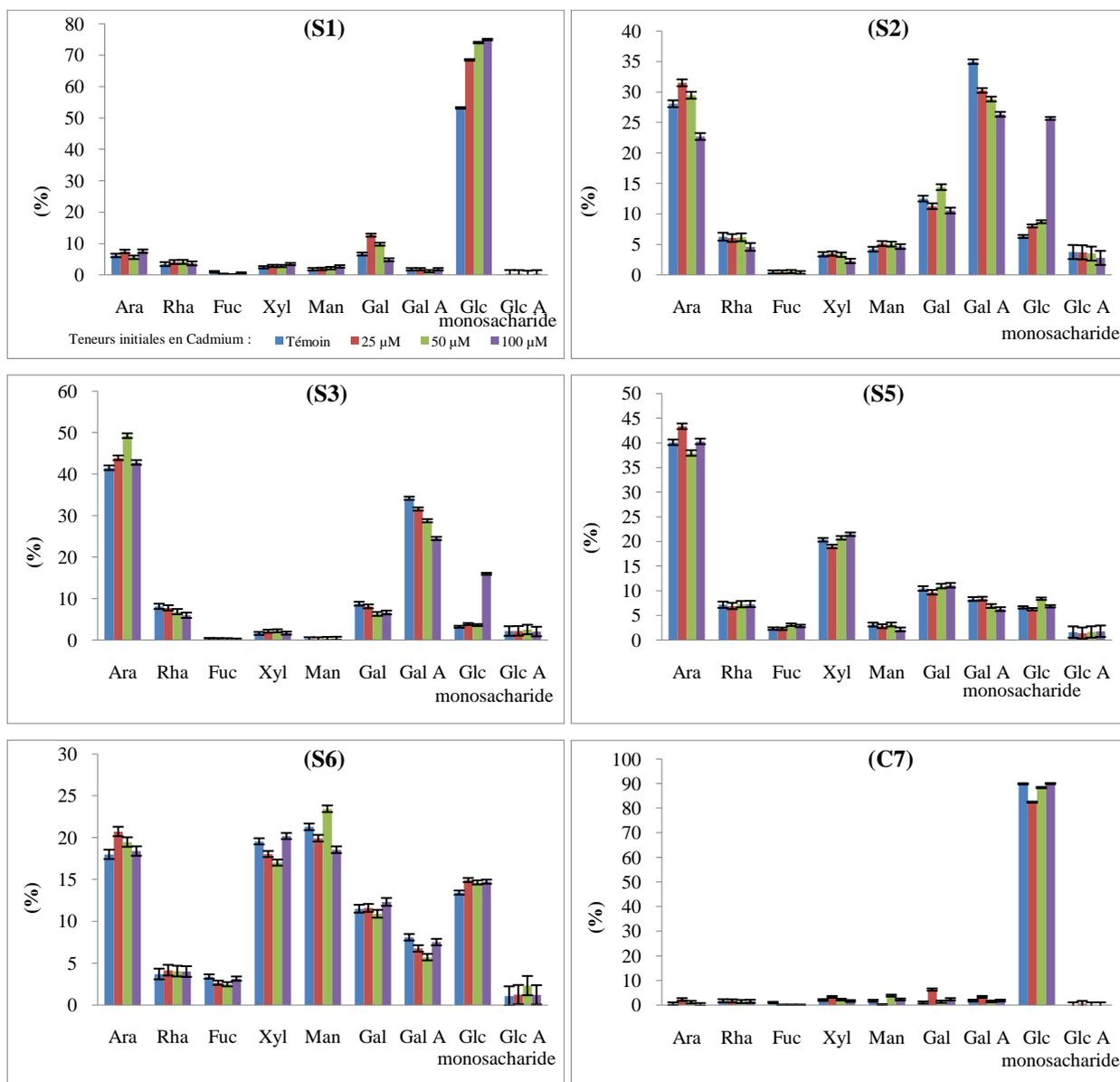


Figure 56 : Compositions monosaccharidiques des fractions polysaccharidiques extraites d'écorces d'arbres exposés à différentes concentrations de cadmium dans le sol.

Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction ; (S1) sucres circulants, (S2, S3) fractions pectiques, (S5 et S6) fractions hémicellulosiques, (C7) résidu cellulosique final ; les écarts types sont calculés à partir de trois injections différentes en CPG.

Les résultats obtenus témoignent dans l'ensemble d'une composition en monosaccharides représentative de la nature des glucides attendus dans chaque fraction. Ainsi, les fractions S1 contiennent majoritairement du glucose (conformément à la composition de la sève élaborée riche en saccharose, le fructose n'étant pas analysé par cette méthode de dérivation). Sa proportion augmente lorsque la teneur en cadmium augmente dans le sol, de 53% pour la condition témoin à 73% pour les arbres cultivés sur 100  $\mu\text{M}$  de cadmium.

Concernant l'analyse des fractions S2 et S3, leur nature pectique est confirmée par le taux élevé d'acide galacturonique (> 25%), traduisant la présence d'homogalacturonanes. Les taux de rhamnose de l'ordre de 5 à 10 % laissent supposer que ces fractions contiennent aussi des rhamnoglacturonanes pouvant être substitués par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes et/ou d'arabinogalactanes. Les autres monosaccharides identifiés (xylose, mannose, acide glucuronique) sont détectés à des taux faibles (moins de 5%). Par ailleurs, l'augmentation des teneurs en Cd dans les sols induit une diminution de la proportion d'acide galacturonique (de 35 à 24%) pour des teneurs en rhamnose constantes (de l'ordre de 7%). Le rapport Gal A/ Rha diminue en conséquence ce qui est caractéristique de structures pectiques plus ramifiées. La fraction S5 extraite à la potasse est riche en Ara et Xyl ; des traces de Glc A sont identifiées, ce qui suggère l'extraction sélective d'arabinoglucuronoxylanes. Des teneurs importantes en Man, Glc, Gal dans les fractions S6, extraites à la soude, semblent indiquer l'extraction de glucogalactomananes. De tels résultats sont en accord avec la littérature qui précise la présence de ces deux catégories d'hémicelluloses chez le sapin de Douglas<sup>183</sup>. Aucune évolution significative de la composition monosaccharidique des hémicelluloses ne peut toutefois être corrélée à l'évolution des teneurs en Cd des sols sur lesquels les plants de sapin de Douglas se sont développés.

Le résidu final C7 est très largement composé de glucose, monosaccharide caractéristique de glucanes pariétaux tels que la cellulose. L'absence d'autres polysaccharides dans la composition du résidu C7 confirme la bonne extraction des autres polysaccharides pariétaux et donc la bonne efficacité du protocole d'extraction mis en place.

### 2.3.2.3 Degré de méthylation des pectines extraites d'écorces de sapin de Douglas.

Une évaluation du degré de méthylestérification des fractions pectiques S2 et S3 a été effectuée (Tableau 25). Le DM est établi par le rapport entre la quantité de méthanol libéré au cours d'une saponification (dosage par spectrophotométrie UV-visible après dérivation avec le Purpald) et la quantité d'acide galacturonique précédemment évaluée par CPG. Les valeurs obtenues sont conformes à la stratégie d'extraction : dans la fraction pectique HM (S2), les DM sont globalement plus élevés et compris entre 64 et 81 %. Un fort DM est souvent corrélé avec une faible proportion de structure de type « boîte à œufs » au sein des pectines. Par conséquent, celles-ci sont plus facilement extraites par l'eau chaude. Dans le cas des fractions S3, les DM plus faibles, compris entre 52 et 69%, laissent supposer une plus grande richesse en motifs d'homogalacturonanes liés grâce au calcium dans les structures type « boîte à œufs » nécessitant l'emploi de chélateur de calcium pour être extrait. Par ailleurs, il est intéressant de constater que l'augmentation des teneurs en Cd dans les substrats induit une augmentation de DM des pectines HM (fraction S2) et une diminution de DM des pectines FM (fraction S3) traduisant dans ce dernier cas une augmentation de leur acidité.

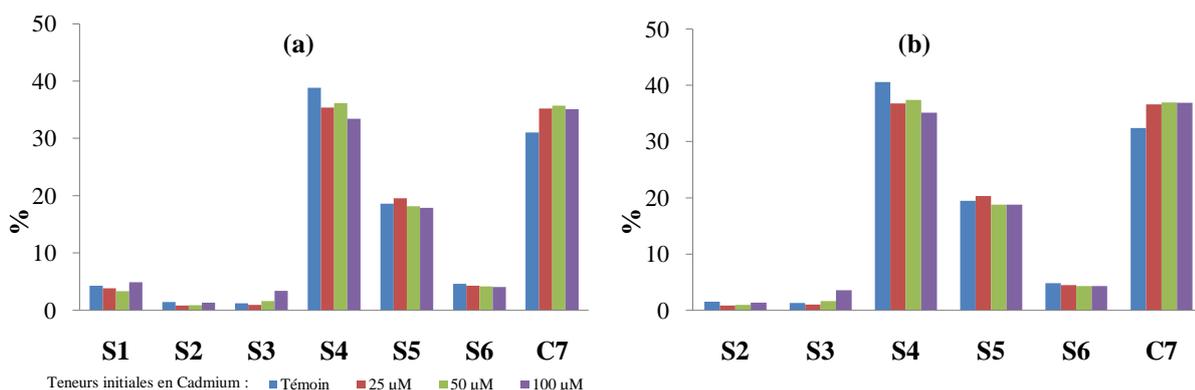
Tableau 25 : Degré de méthylestérification des pectines (fractions S2 et S3) d'écorces de sapin de Douglas en fonction de la concentration en cadmium du sol de culture.

Teneurs en Cadmium	DM (%)	
	S2	S3
Témoin (0 $\mu\text{M}$ )	64	69
25 $\mu\text{M}$	75	58
50 $\mu\text{M}$	64	52
100 $\mu\text{M}$	81	59

### 2.3.3 Analyses des constituants pariétaux du bois.

#### 2.3.3.1 Fractionnement.

Comme dans le cas des écorces, le protocole d'extraction a permis d'évaluer la répartition des différentes fractions. Si dans les écorces, la fraction S1 est la plus importante, elle représente moins de 5% de la masse de bois (Figure 57). En effet, ce tissu de soutien est spécialisé dans la conduction de la sève brute. Les pectines sont très peu présentes (de 1 à 3%). Le bois est ainsi majoritairement composé d'hémicelluloses, de cellulose et de lignines dans des proportions de 20, 35, et 35% respectivement, ce qui traduit la richesse des épaisissements secondaires de la paroi pour les vaisseaux de xylème.



**Figure 57 : Analyses des fractions extraites du bois d'arbres cultivés sur des sols contaminés par des concentrations croissantes en cadmium.**

- (a) Proportions des différentes fractions exprimées en pourcentage de la masse totale des fractions,
- (b) Proportions des différents constituants pariétaux des écorces exprimées en pourcentage de la masse totale des constituants pariétaux.

Une nouvelle fois, l'augmentation des teneurs en Cd dans les substrats de sol semble abaisser de façon significative la proportion de lignines au profit de celle de cellulose.

### 2.3.3.2 Composition monosaccharidique des composés pariétaux extraits du bois.

Comme pour les écorces, une analyse monosaccharidique a été effectuée sur chaque fraction. La Figure 58 rassemble l'ensemble des résultats obtenus.

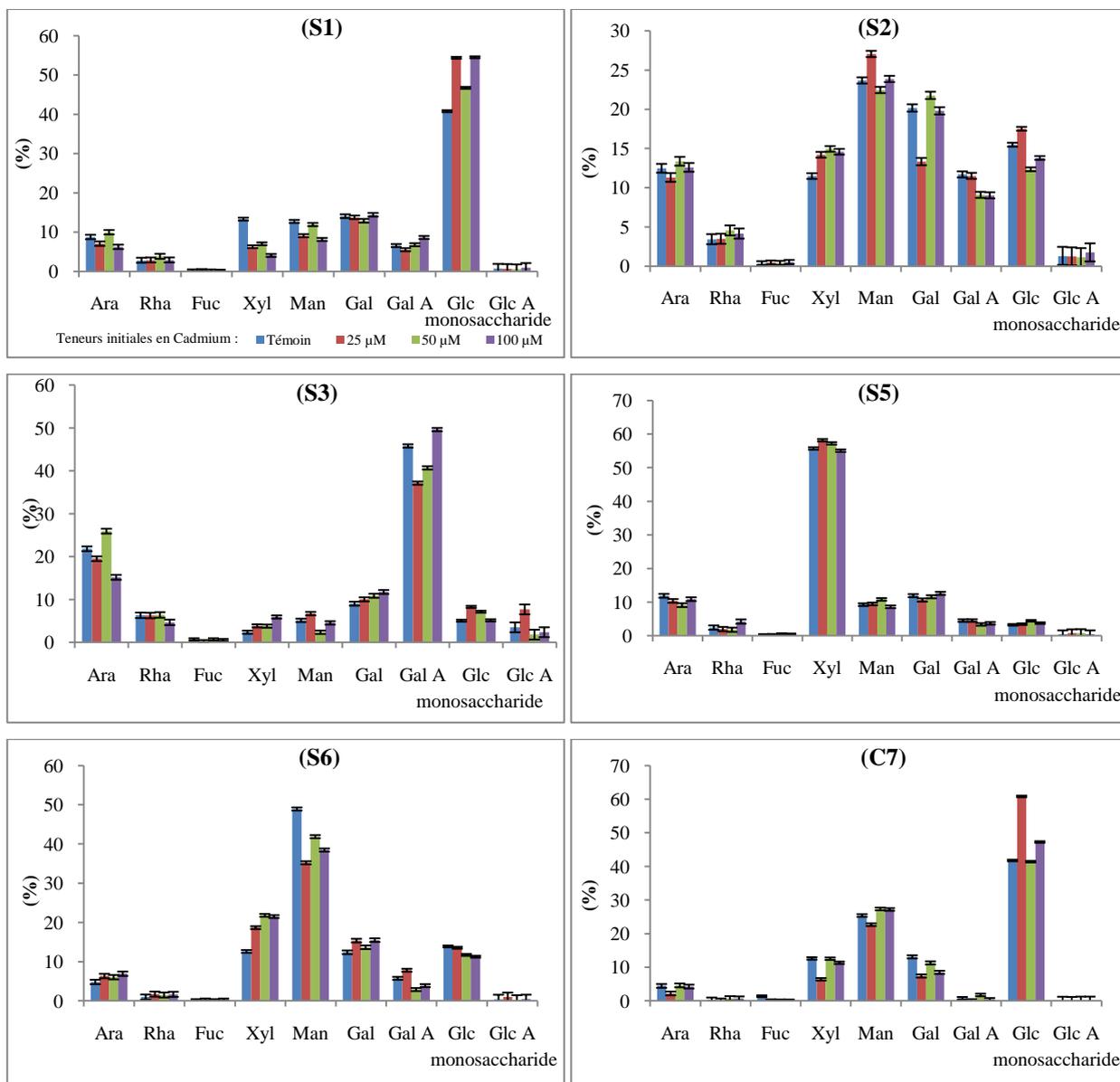


Figure 58 : Compositions monosaccharidiques des fractions polysaccharidiques extraites d'écorces d'arbres exposés à différentes concentrations de cadmium dans le sol.

Les données sont exprimées en pourcentage molaire des monosaccharides totaux dans chaque fraction ; (S1) sucres circulants, (S2, S3) fractions pectiques, (S5 et S6) fractions hémicellulosiques, (C7) résidu cellulosique final ; les écarts types sont calculés à partir de trois injections différentes en CPG.

Comme cela a déjà été observé dans le cas des écorces, l'augmentation de la teneur en Cd dans les substrats de sol induit une augmentation de la teneur en Glc circulant (fraction S1). Les pectines, avec moins de 5% de la masse totale du bois, sont nettement moins représentées que dans les écorces. La fraction S2, caractéristique des pectines HM, semble aussi plus hétérogène que dans le cas des écorces. L'augmentation des teneurs en Cd dans les substrats de sol semble induire, dans le cas des pectines FM (fraction S3), une augmentation des teneurs en Gal A – les teneurs en Rha restant stables. Ceci suggère une élévation du rapport Gal A / Rha caractéristique de composés pectiques moins ramifiés.

Les extraits obtenus par la potasse, riches en Ara et Xyl et présentant des traces de Glc A, sont caractéristiques d'arabinoglucuronoxylanes. La présence dans les extraits obtenus par la soude de Gal, Man et Glc confirme, dans ce cas, l'extraction de glucogalactomananes. De tels résultats sont comparables à ceux déjà obtenus sur les écorces.

Le résidu cellulosique C7 apparait enfin plus hétérogène sans doute contaminé par des hémicelluloses mal ou pas extraites dans les conditions standards (fractions S5 et S6).

### 3 Bilan.

Nous venons de développer deux voies de modification de biosorbants. D'une part d'un point de vue chimique, une stratégie d'oxydation a permis d'obtenir des matrices plus ou moins oxydées. Cependant, au cours du protocole, plus le nombre d'étapes augmente, plus le rendement massique diminue traduisant la dégradation des écorces. C'est pourquoi, nous proposons comme alternative le greffage de molécules échangeuses d'ions par amination réductrice sur les écorces précédemment oxydées par le *periodate* de sodium. Cette méthode offre l'opportunité d'augmenter le nombre de fonctions échangeuses d'ions et d'en moduler la nature. Ainsi des oligosaccharides de type galacturonanes et carraghénanes possédant respectivement des fonctions carboxylate et sulfate ont été greffées sur les écorces. Cependant, les degrés de substitution des fonctions aldéhydes restent faibles, inférieurs à 10%. D'autre part, la culture de plants de sapins de Douglas sur des sols contaminés en cadmium a été utilisée comme moyen d'induire une modification de la composition chimique des écorces par un stress métallique. L'adaptation à ce stress passe par une augmentation de la proportion de pectines au détriment de celle des lignines. De plus l'analyse monosaccharidique des fractions pectiques montre une diminution de la proportion d'acide galacturonique. Cependant ces deux tendances se compensent et conduisent à une quantité

totale d'acide galacturonique constante dans les composés pariétaux. Par ailleurs, le degré de méthylestérification des pectines augmente légèrement ; le nombre de fonctions acide carboxylique, disponible pour la biosorption, est donc diminué pour les écorces issues des plants soumis à un stress.

## **Chapitre 3 : Evaluation des capacités d'adsorption des matériaux biosorbants d'origine forestière.**



# 1 Evaluation des capacités d'adsorption des écorces oxydées.

## 1.1 Détermination des paramètres caractéristiques de l'adsorption des écorces oxydées par l'obtention d'isotherme de Langmuir.

### 1.1.1 Essai d'adsorption.

#### 1.1.1.1 *Effet du degré d'oxydation.*

La Figure 59 décrit les isothermes d'adsorption du plomb par des écorces mono, di et tricarboxyliques. Comparées aux écorces brutes, les capacités de rétention sont nettement augmentées, les valeurs de l'affinité restant similaires (Tableau 26). Bien que l'oxydation par l'hypobromite de sodium catalysée par le TEMPO ne conduise qu'à une unité glucidique monocarboxylée, il est intéressant de souligner que le matériau obtenu présente cependant des capacités de rétention comparables à celles des écorces tricarboxyliques. Une telle observation doit être rapprochée des conditions expérimentales utilisées pour modifier chimiquement les écorces. Ces dernières demeurent un matériau biologique sensible aux agents chimiques oxydants. Les résultats présentés sur la Figure 59 doivent nous inciter à rechercher le meilleur compromis expérimental qui conduit à une oxydation maximale et plurielle capable de préserver l'intégrité chimique des écorces et donc leurs propriétés naturelles.

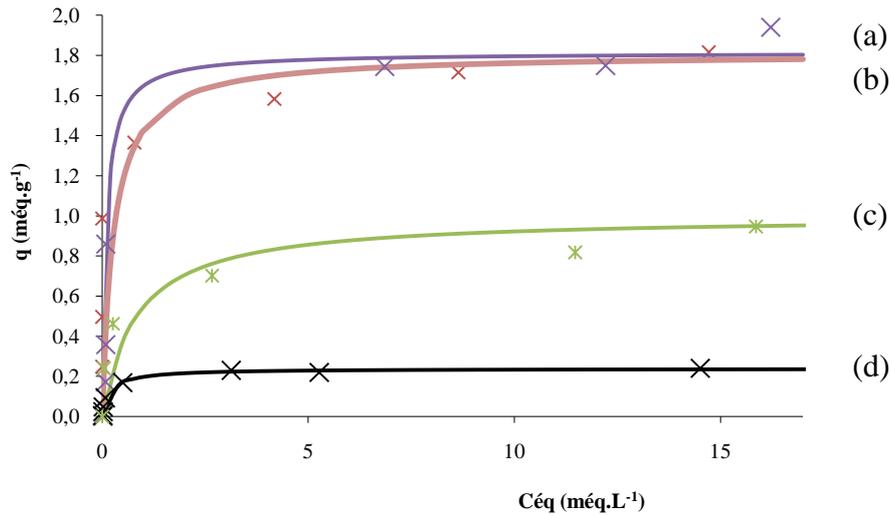


Figure 59 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces tricarboxyliques (5) (a), carboxyliques (7) (b), dicarboxyliques (6) (c), brutes (d).

#### 1.1.1.2 Effet de la stratégie d'oxydation.

Les commentaires précédents s'appliquent également à une même classe d'écorces oxydées, les écorces tricarboxyliques. Dans ce cas, la mise en œuvre d'un catalyseur comme le TEMPO lors de la synthèse du matériau contribue à améliorer les capacités de rétention (Tableau 26). De même, l'utilisation d'un oxydant plus fort comme l'hypobromite à la place de l'hypochlorite, induit une augmentation des capacités de rétention de 1,086 à 1,302  $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q}\cdot\text{g}^{-1}$ . De tels résultats nous ont incité à rechercher le meilleur compromis entre capacités des écorces modifiées et réactions chimiques mises en œuvre pour atteindre ce résultat.

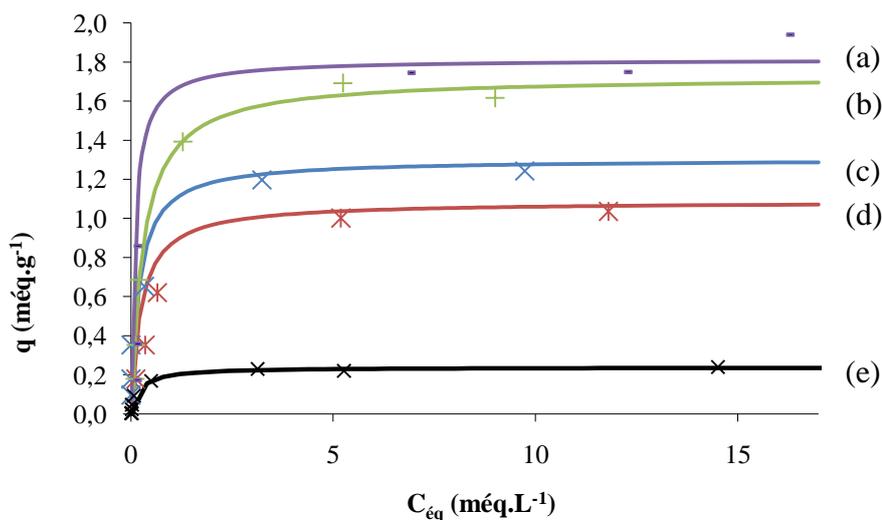


Figure 60 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces tricarboxyliques (4) (a), (5) (b), (2) (c), (3) (d) et les écorces brutes (e).

### 1.1.2 Récapitulatif.

Le Tableau 26 rassemble l'ensemble des paramètres cinétiques obtenus lors de l'adsorption du plomb sur les écorces oxydées. Les valeurs des capacités de rétention atteignent 1,816 méq.g<sup>-1</sup>. Concernant l'affinité, la nature des groupements échangeurs d'ions étant identique, les valeurs sont globalement similaires comprise en 2 et 5 méq.L<sup>-1</sup>. Une valeur plus élevée de 10,30 L.méq<sup>-1</sup> est toutefois obtenue dans le cas d'une oxydation effectuée en trois étapes. Il peut être supposé, dans ce cas, qu'une telle stratégie, en provoquant une modification chimique profonde des écorces, conduirait à l'élimination des autres sites échangeurs d'ions de l'écorce. Les valeurs de l'affinité enregistrées dans ce cas seraient alors celles de l'interaction entre le plomb et les fonctions carboxylate. Enfin, des coefficients de corrélation supérieurs à 0,9 soulignent, en les validant, la bonne répétabilité des résultats expérimentaux.

Tableau 26 : Paramètres cinétiques des isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces oxydées obtenus après linéarisation selon le modèle de Langmuir.

Ecorces / numéro de composé		q <sub>max</sub> (méq/g)	b (L/méq)	r <sup>2</sup>
<i>Brutes</i>		0,238	4,80	0,970
<b>Ecorces-carboxyliques</b>	<b>7</b>	<b>1.816</b>	3,70	0,863
<b>Ecorces-dicarboxyliques</b>	<b>6</b>	0,999	3,80	0,947
	<b>2</b>	1.302	2,98	0,999
	<b>3</b>	1.086	2,03	0,993
<b>Ecorces-tricarboxyliques</b>	<b>4</b>	<b>1,813</b>	10,30	0,993
	<b>5</b>	<b>1,725</b>	3,31	0,903

## 1.2 Mise en évidence des complexes « ion métallique-carboxylate ».

Suite à l'adsorption du plomb sur les écorces modifiées, la spectroscopie infrarouge peut être employée comme une méthode d'analyse quantitative : en effet, sur des matériaux de plus grandes capacités de rétention comme c'est le cas pour les écorces ayant subi une oxydation poussée (écorces tricarboxyliques (5)), il est possible de mettre en évidence la bande correspondant à l'élongation des liaisons C=O des carboxylates complexées par le plomb. De plus, cette observation est corrélée à la diminution de l'intensité de la bande correspondant à l'élongation des liaisons C=O « libres » à  $1750\text{ cm}^{-1}$  (Figure 61).

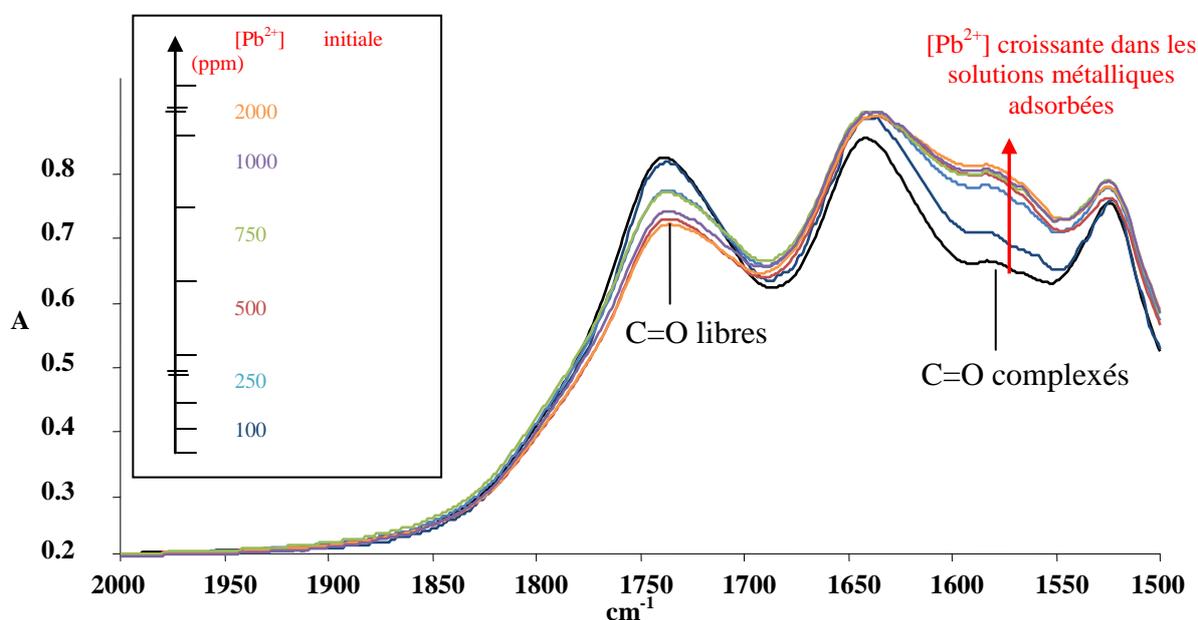


Figure 61 : Spectres IR d'écorces oxydées et ayant adsorbé des concentrations croissantes de plomb ; suivi de l'adsorption du plomb.

La Figure 62 montre une relation de proportionnalité aux faibles concentrations entre l'absorbance à  $1580\text{ cm}^{-1}$  et la quantité d'ions fixés par les écorces avant d'atteindre un plateau de saturation pour  $A = 0,17$ . Ce palier, à corrélérer à l'isotherme d'adsorption (Figure 63), traduit la saturation préférentielle des fonctions carboxylate : le plomb est toujours fixé mais sur des sites différents, vraisemblablement des fonctions phénoliques.

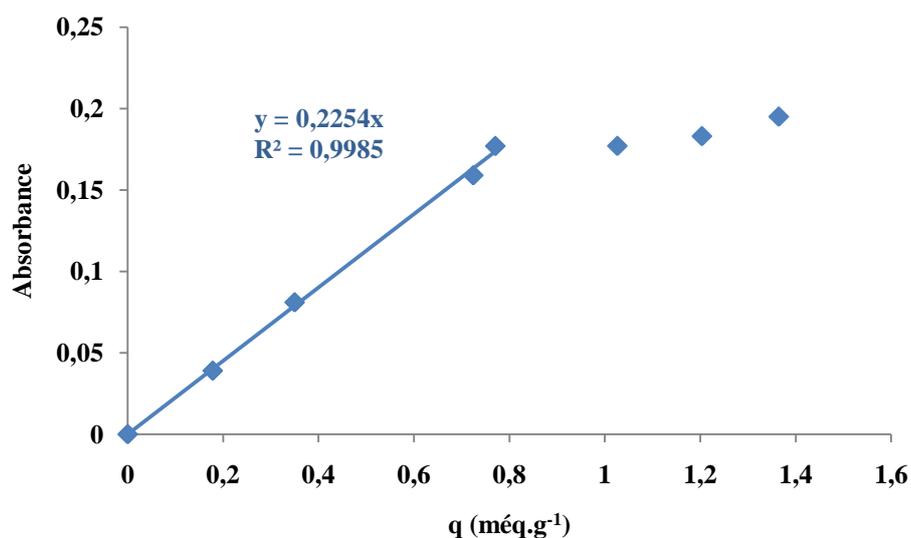


Figure 62 : Représentation graphique de l'absorbance à  $1580\text{ cm}^{-1}$  en fonction de la quantité de plomb fixé sur les écorces.

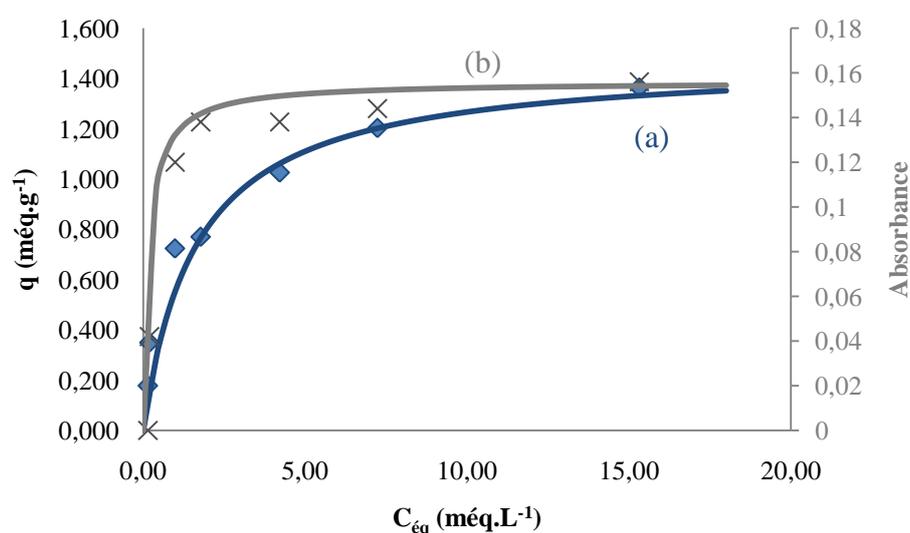


Figure 63 : (a) Isotherme d'adsorption du plomb par les écorces oxydées (5), (b) Absorbance des fonctions carboxylates complexés par le plomb.

La Figure 63 met en évidence une meilleure affinité du plomb vis-à-vis des fonctions carboxylate comparativement aux autres fonctions responsables de l'adsorption comme les fonctions phénol. Les sites carboxylate sont les sites d'adsorption prioritaires car très vite leur quantité atteint un maximum alors que l'adsorption est encore possible sur les écorces.

## **2 Evaluation des capacités d'adsorption des écorces greffées par l'obtention d'isotherme d'adsorption.**

### **2.1 Sur les écorces greffées par des molécules carboxylées.**

Lors de l'oxydation directe des polysaccharides structuraux des écorces, nous avons pu mettre en évidence le rôle des fonctions acide carboxylique sur les propriétés d'adsorption des cations métalliques. Nous nous proposons d'étudier les conséquences d'un éloignement des fonctions acide carboxylique greffées à la surface des écorces. En nous permettant de moduler la valeur des DP testés, le greffage d'oligogalacturonates apparaît comme un modèle de choix. L'insertion d'un bras espaceur est aussi une alternative dont nous avons souhaité étudier l'intérêt.

Les isothermes d'adsorption du plomb (Figure 64) effectuées sur les écorces greffées par les oligogalacturonates sont toutes de type Langmuir. L'élévation des valeurs enregistrées aux plateaux de saturation traduit une nette augmentation des capacités de rétention à la suite des différents greffages.

Si le greffage de l'acide galacturonique permet d'améliorer la capacité de rétention en plomb, à degré de substitution comparable, le greffage d'oligosaccharides de DP plus importants, en apportant un nombre de fonctions acide carboxylique supérieur, augmente les valeurs de capacités maximales de rétention des écorces greffées. Par ailleurs, pour un même oligosaccharide, l'insertion d'un bras espaceur semble influencer positivement sur la capacité de rétention des écorces greffées.

Enfin, quelle que soit la nature du greffage envisagé, avec ou sans bras espaceur, les valeurs d'affinité restent similaires (Tableau 27). Elles traduisent, à cation métallique constant, l'équilibre physicochimique qui s'établit avec l'unique fonction chimique échangeuse d'ion étudiée dans ce cas, la fonction acide carboxylique.

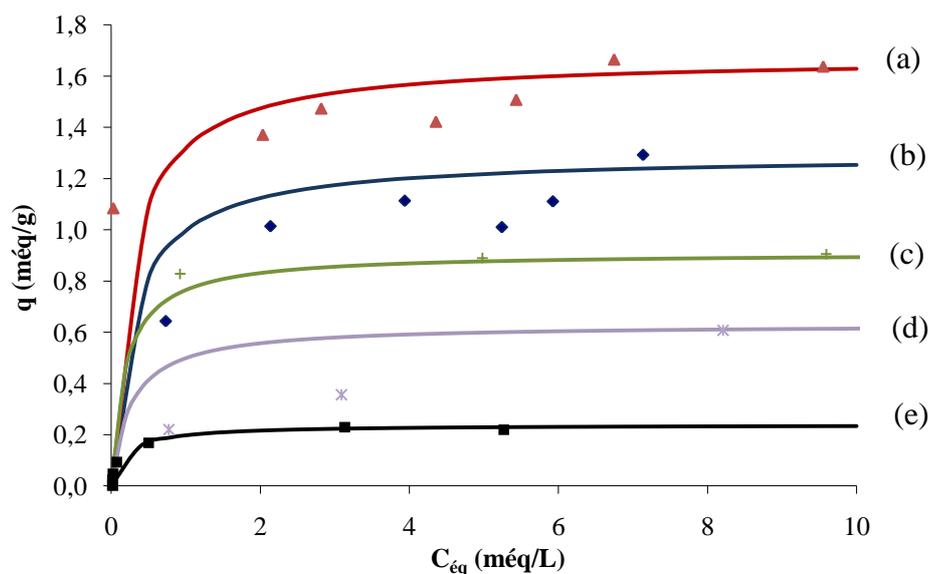


Figure 64 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces greffées (19) (a), (20) (b), (18) (c), (17) (d) et sur les écorces brutes (e).

## 2.2 Comparaison des capacités de rétention des écorces greffées par des carboxylates et par des sulfates.

Afin de mettre en évidence l'importance de la nature du groupement échangeur d'ions dans l'interaction entre le matériau biosorbant et le cation métallique présent en solution, nous avons souhaité comparer les capacités des fonctions carboxylate et sulfate à adsorber le plomb. Une expérience de greffage d'oligocarraghénanes de DP moyen égal à 4 muni d'un bras espaceur a été renouvelée dans des conditions équivalentes à celles mises en œuvre pour les oligogalacturonates.

A degré de substitution similaire, les isothermes d'adsorption obtenues à partir des écorces greffées oligocarraghénanes (Figure 65) conduisent à des valeurs de  $q_{\max}$  similaires à celles obtenues à partir des mêmes écorces greffées par les oligogalacturonates (Tableau 27).

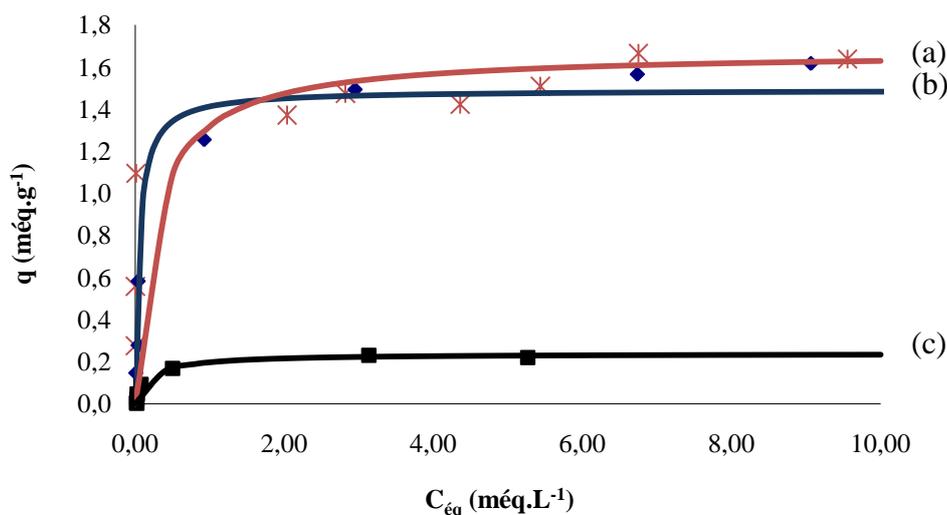


Figure 65 : Isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces greffées (19 d) (a), (21) (b) et les écorces brutes (c).

Dans l'un et l'autre des cas, les capacités des écorces brutes à adsorber le plomb sont très nettement augmentées, les capacités de rétention pouvant être augmentées jusqu'à un facteur 8. Dans le cas du plomb, la comparaison des valeurs d'affinité (b) montre des différences sensibles (de 4,8 L.méq<sup>-1</sup> pour les écorces brutes à 18,4 L.méq<sup>-1</sup> pour les écorces greffées par les oligocarraghénanes). Un tel comportement trouvera sa justification dans les lois qui régissent les équilibres entre ions présents en solution et les sites échangeurs d'ion à la surface desquels ils vont s'adsorber. Ce dernier aspect fera l'objet d'un point particulier de la discussion.

Tableau 27 : Paramètres cinétiques des isothermes d'adsorption du plomb sur les écorces greffées obtenus après linéarisation selon le modèle de Langmuir.

Ecorces		$q_{\max}$ (méq.g <sup>-1</sup> )	b (L.méq <sup>-1</sup> )	$r^2$	DS
<b>Brutes</b>		0,238	4,80	0,970	-
	(17)	0,632	3,78	0,984	4,93
<b>Greffées</b>	(18)	0,910	5,25	0,884	3,13
<b>galacturonates</b>	(19)	1,780	3,71	0,882	7,68
	(20)	1,292	3,37	0,942	1,89
<b>Greffées carraghénanes</b>	(21)	1,490	18,14	0,985	4,75

### 3 Evaluation des capacités d'adsorption du bois et des écorces d'arbres exposés à une contamination métallique.

Afin de disposer de suffisamment de matériel biologique, les essais de biosorption ont été effectués sur les écorces et le bois de la zone 1 des arbres.

#### 3.1 Variabilité des propriétés d'adsorption en fonction de l'arbre.

Dans un premier temps, des essais de biosorption ont été effectués sur chaque arbre afin de mettre en évidence une éventuelle différence entre les individus cultivés dans les mêmes conditions. La Figure 66 rend compte des résultats obtenus pour 3 arbres cultivés dans les mêmes conditions (50  $\mu\text{M}$  de cadmium) ; l'hyperbole décrite correspond à l'isotherme de Langmuir théorique calculée à partir des moyennes des paramètres obtenus lors des 3 adsorptions. Les points sont équitablement dispersés autour de la courbe théorique traduisant la validité du modèle de Langmuir. Par ailleurs, la linéarisation des isothermes obtenues conduit à une valeur de  $q_{\text{max}}$  équivalente égale à 1,130  $\text{még} \cdot \text{g}^{-1}$  (les droites coupent l'axe des abscisses en un même point), *exemple pris pour l'adsorption du Cd pour les écorces du lot à 50  $\mu\text{M}$ .*

De même, concernant les valeurs d'affinité, qui sont de l'ordre de 1  $\text{L} \cdot \text{még}^{-1}$  (les droites ont des coefficients directeurs quasi identiques). De plus, des coefficients de corrélation élevés (supérieurs 0,82) traduisent une nouvelle fois la validité du modèle de Langmuir.

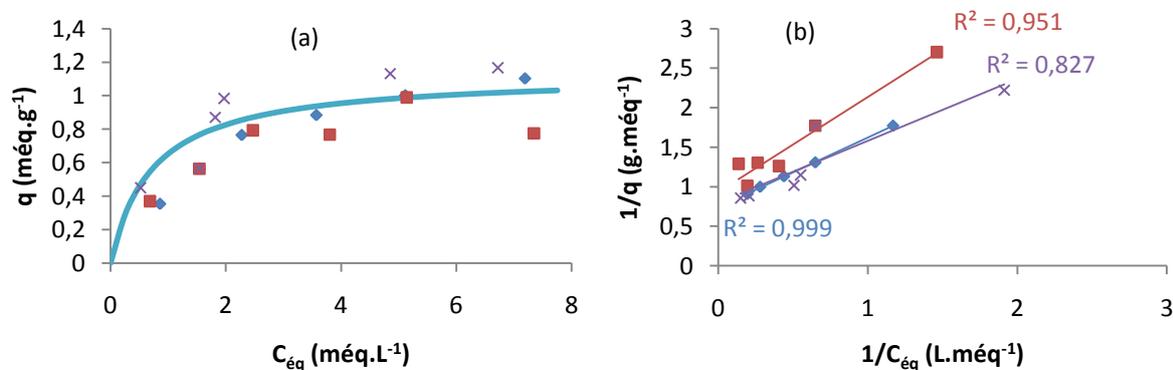


Figure 66 : Isotherme d'adsorption du cadmium sur les écorces des sapins de Douglas cultivés sur un substrat contaminé à 50  $\mu\text{M}$  (a), Linéarisation des isothermes précédentes selon le modèle de Langmuir (b).

D'un individu à l'autre, les paramètres cinétiques ne sont pas identiques ; ils peuvent toutefois être considérés comme similaires. Dans ce cas, les différences observées sont peu significatives. C'est pourquoi, dans la suite des travaux, nous présenterons uniquement les courbes théoriques calculées à partir des moyennes des paramètres cinétiques des 4 plants de la même condition.

### 3.2 Adsorption du plomb et du cadmium sur les écorces d'arbres exposés à une contamination métallique.

Les résultats des essais de biosorption du plomb et du cadmium sur les écorces récoltées à partir de sapins de Douglas exposés à la présence de Cd au cours de leur croissance sont illustrés par les isothermes d'adsorption (Figure 67). Ces dernières, d'allure hyperbolique, mettent en évidence un palier traduisant la saturation du biosorbant. Que ce soit dans le cas du plomb ou du Cd, les capacités de rétention maximale sont d'autant plus faibles que la teneur en cadmium dans le sol est élevée. Quel que soit l'élément trace métallique étudié, les capacités de rétention diminuent donc après croissance sur un sol contaminé.

La comparaison des Figure 67 a et b met en évidence que, dans ce cas, les capacités de rétention du plomb sont deux fois plus élevées que celles du cadmium.

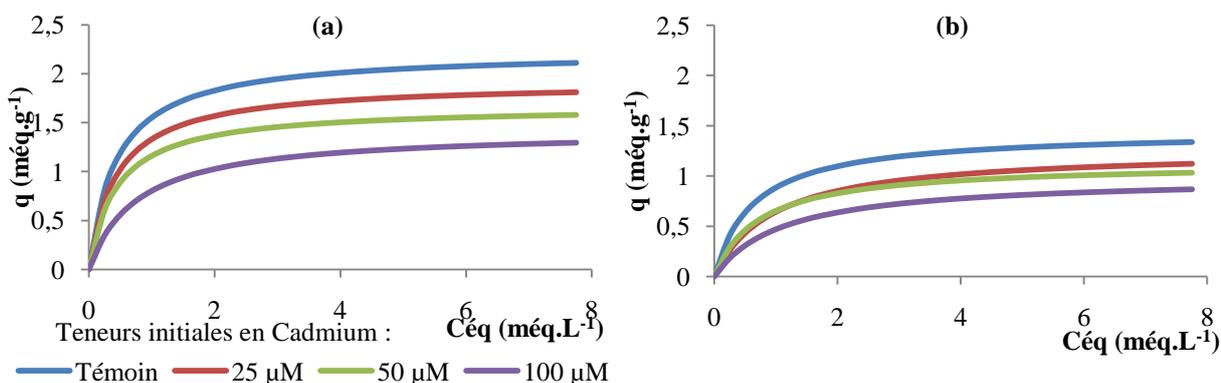


Figure 67 : Isothermes d'adsorption du plomb (a) et du cadmium (b) sur les écorces issues de sapins de Douglas cultivés sur des sols témoin et contaminés par des solutions croissantes de Cadmium.

Les isothermes décrites représentent les isothermes théoriques recalculées par le modèle de Langmuir.

### 3.3 Adsorption du plomb et du cadmium sur le bois.

Les résultats des essais de biosorption du plomb et du cadmium sur le bois sont illustrés par les isothermes d'adsorption (Figure 68). Aucune différence significative n'est constatée. La présence de Cd dans les substrats de sol ne semble pas modifier les capacités du bois à adsorber les cations métalliques. Comparées aux écorces, les capacités d'adsorption du plomb sont moins bonnes. Le Cd semble dans ce cas mieux adsorbé.

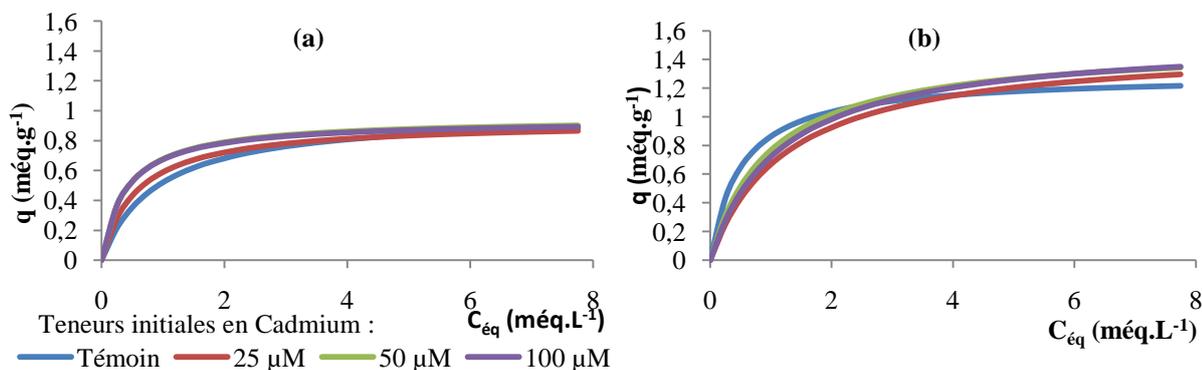


Figure 68 : Isothermes d'adsorption du plomb (a) et du cadmium (b) sur le bois issu de sapins de Douglas cultivés sur des sols témoin et contaminés par des solutions croissantes de Cadmium.

Les isothermes décrites représentent les isothermes théoriques recalculées par le modèle de Langmuir.

### 3.4 Synthèse.

Afin de comparer les valeurs des paramètres d'adsorption, nous les présentons sous forme de tableau récapitulatif (Tableau 28).

Les valeurs des capacités de rétention du plomb par les écorces diminuent de manière significative avec l'augmentation de la quantité en cadmium dans le sol. Les valeurs des écarts types (inférieurs  $0,2 \text{ még.g}^{-1}$ ) témoignent de la répétabilité de l'adsorption du plomb d'un individu à l'autre et valide la présentation des résultats par condition. Concernant l'adsorption du cadmium, la même tendance est observée, même si les incertitudes sont plus importantes. Par ailleurs, compte tenu de l'amplitude des incertitudes, les valeurs de l'affinité peuvent être considérées comme similaires.

L'augmentation des teneurs en Cd dans les substrats de sol ne semble avoir aucun effet sur la capacité du bois à adsorber le plomb. La capacité du bois à adsorber le Cd semble en revanche significativement améliorée. Cependant, aucun effet dose réponse n'est observé. Dans tous les cas, la valeur de l'affinité  $b$  ne semble pas affectée.

**Tableau 28 : Tableau récapitulatif des paramètres de l'adsorption du plomb et du cadmium sur le bois et les écorces des sapins de Douglas issus des cultures sous serre.**

Les résultats sont une moyenne (n=4) ± EC. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative (p < 0,05).

Condition de culture		Plomb		Cadmium		
<i>Ecorces</i>		$q_{\max}$ (méq.g <sup>-1</sup> )	b (L.méq <sup>-1</sup> )	$q_{\max}$ (méq.g <sup>-1</sup> )	b (L.méq <sup>-1</sup> )	
Teneurs initiales en Cd	Témoin	2,232 ± 0,107 a	2,29 ± 1,27 a	1,448 ± 0,181 a	1,57 ± 1,32 a	
	25 µM	2,135 ± 0,080 a	2,05 ± 0,74 a	1,260 ± 0,087 ab	1,04 ± 0,40 a	
	50 µM	1,864 ± 0,106 b	1,91 ± 0,28 a	1,129 ± 0,209 ab	1,37 ± 0,96 a	
	100 µM	1,424 ± 0,179 c	1,29 ± 0,62 a	0,990 ± 0,298 b	1,12 ± 0,99 a	
	<i>Bois</i>					
	Témoin	0,990 ± 0,298 a	1,11 ± 0,99 a	1,293 ± 0,025 a	2,00 ± 0,92 a	
	25 µM	0,929 ± 0,045 a	1,73 ± 0,53 a	1,504 ± 0,100 b	0,80 ± 0,19 b	
	50 µM	0,948 ± 0,113 a	2,49 ± 1,26 a	1,512 ± 0,104 b	1,03 ± 0,13 ab	
100 µM	0,938 ± 0,036 a	2,55 ± 0,76 a	1,548 ± 0,105 b	0,87 ± 0,41 b		

## 4 Bilan.

Les deux stratégies de modifications prospectées, par voies chimique ou biologique conduisent à des biomatrices dont les propriétés ont été modifiées. D'un point de vue chimique, les matériaux obtenus après oxydation ont des capacités d'échange d'ions augmentées d'un facteur 8 dans certains cas. Il apparait également que l'intensité de l'oxydation n'est pas le seul critère responsable de la biosorption, les écorces (7) dont seules les fonctions alcool primaires ont été oxydées en témoignent, de tels matériaux présentent les meilleures capacités de rétention. Par ailleurs, les biomatrices obtenues par greffage covalent d'oligosaccharides exposent non seulement une amélioration des capacités de rétention, mais également une valeur de l'affinité modulée en fonction de la nature des fonctions échangeuses d'ions présentes. D'un point de vue biologique, les écorces issues des lots d'arbres se développant sur sols contaminés présentent des capacités de rétention diminuées par rapport celles du lot témoin.

## **Troisième partie : Discussions.**



Les écorces présentent des propriétés biosorbantes intéressantes, cependant, comme nous l'évoquions précédemment, il s'agit d'une biomatrice hétérogène et dégradable. Au cours de ces travaux, nous nous sommes fixés deux objectifs. Le premier vise à stabiliser les écorces, le second à en améliorer les propriétés. C'est pourquoi une première partie de notre étude vise à éliminer les composés hydrosolubles, les oxyder ou les conserver en les réticulant directement sur la structure. Pour la seconde partie dédiée à optimiser les propriétés biosorbantes des écorces, deux stratégies ont été prospectées. D'une part le développement de plants de sapin de Douglas sur un substrat contaminé en cadmium est utilisé afin d'induire une modification par voie biologique de la composition chimique des écorces, d'autre part les propriétés sont directement modulées par réactions chimiques. L'oxydation vise à faire apparaître directement sur la structure des fonctions carboxylate, l'amination réductrice permet de greffer des molécules possédant des groupements échangeurs d'ions de nature variée.

## 1 Le sapin de Douglas absorbe le cadmium.

La littérature propose de nombreuses technologies - *essentiellement physico-chimiques* - de décontamination des sols pollués par les ETM. Sous l'impulsion de la demande sociétale tout comme des acteurs en charge de la réhabilitation des écosystèmes pollués, les écotechnologies connaissent actuellement un essor significatif, c'est notamment le cas pour la phytoextraction. Une telle approche procure en effet de nombreux avantages - *technologique et économique* - qui lui confèrent une place de choix parmi les différentes techniques envisageables.

### 1.1 Phytoextraction du cadmium par le sapin de Douglas.

Pour la plupart des végétaux, un stress métallique se traduit par une modification sensible du métabolisme et induit, généralement, des dysfonctionnements de ce dernier. Outre l'impact sur la croissance, la présence d'ETM pourra induire d'autres symptômes tels que le jaunissement des aiguilles ou des feuilles. Les plantes sont néanmoins capables d'absorber les ETM et de les tolérer à des teneurs faibles.<sup>184</sup> Quelques unes d'entre elles pourront être qualifiées d'hyperaccumulatrices et présentent dans ce cas la particularité de s'adapter à des

teneurs élevées en ETM. A l'heure actuelle, aucune espèce d'arbre n'est reconnue comme potentiellement hyperaccumulatrice.

Dans les conditions opératoires mises en œuvre, l'étude des capacités du sapin de Douglas à absorber et à accumuler le Cd, effectuée sous serre sur des substrats contaminés artificiellement en cadmium, n'a pas mis en évidence d'effets sur la croissance des plants. La durée de culture (9 mois) est vraisemblablement insuffisante - *aux teneurs en Cd utilisées* - pour induire des modifications morphologiques visibles. De telles modifications sont généralement obtenues *in vitro* ou en culture hydroponique pour des durées de culture plus courtes et des teneurs en ETM plus élevées.<sup>107</sup> De plus, la part du cadmium phytodisponible ne représente qu'une fraction minoritaire du cadmium total (moins de 0,5% du Cd total est directement disponible et moins de 20% est disponible en présence d'exsudats racinaires), ce qui équivaut à des teneurs réelles plus faibles. En fin d'expérience, et quelle que soit la teneur en Cd des sols, une fraction minoritaire du cadmium - *extractible par CaCl<sub>2</sub>* - reste phytodisponible pour les arbres en croissance. Si ce résultat semble suggérer que les teneurs en Cd dans le sol n'ont pas été toxiques au cours de l'expérimentation, il peut également suggérer que le système racinaire des plants de sapin de Douglas ne soit pas réparti de façon homogène à l'intérieur des pots de culture. Dans ce cas, une partie du Cd reste disponible sans toutefois être accessible aux racines. Par ailleurs, et quelle que soit la teneur en Cd dans le sol, près de 20% du cadmium initial demeure extractible par le mélange Rhizo A à l'issue de la période de culture, ce qui permet d'émettre l'hypothèse de l'absence d'exsudats chez le sapin de Douglas.

Le Cd est absorbé par le sapin de Douglas. Si, compte tenu des quantités de Cd absorbées (2,03 mg par arbre au maximum), ce dernier ne peut pas, à proprement parler, être considéré comme une espèce phytoaccumulatrice, nos résultats semblent indiquer qu'il serait en mesure de se développer sur des milieux faiblement contaminés. Les facteurs de bioconcentration sont de l'ordre de 0,2 et peuvent être considérés comme faibles. Les quantités de cadmium extraites de l'ordre de 2 mg par arbre n'affectent pas la croissance des plants de sapins de Douglas, ce qui démontre dans ce cas l'aptitude de ce dernier à s'adapter à de telles conditions environnementales. Concernant la distribution du cadmium dans l'arbre, les racines sont identifiées comme le compartiment le plus riche en Cd. La teneur en Cd dosée dans les racines est d'ailleurs proportionnelle aux teneurs des sols sur lesquels les plants de sapin de Douglas se sont développés. Cette dernière observation montre que le cadmium n'est que en partie transporté jusqu'aux parties aériennes soit 30 à 40% du Cd absorbé par la plante. Les différences de teneurs en Cd dosées dans ces dernières sont cependant significatives. Le

Cd est identifié à l'état de traces dans les bourgeons, par opposition aux écorces qui est le compartiment le plus riche en Cd. Un tel résultat confirme l'un des rôles biologiques des écorces en tant que zone de compartimentation des substances organiques et minérales - dont les ETM - nocives au métabolisme de la plante. Exprimés en teneurs, nos résultats désignent les écorces (jusqu'à  $6,23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pour le lot ayant poussé sur le sol le plus contaminé) comme tissus de stockage principal des ETM alors qu'en quantité absolue, il s'agit du bois (de 38 à 48% de la quantité totale contenue dans les parties aériennes, soit 0,3 à 0,4 mg). Ce résultat est expliqué par la large représentativité du bois dont la masse est plus de deux fois supérieure à celle des écorces. Il est aussi intéressant car c'est généralement le bois qui présente la meilleure valorisation dans le secteur énergétique ce qui permettrait indirectement d'envisager de concentrer le Cd dans les cendres issues de la combustion de bois obtenus après phytoextraction. Tout comme les bourgeons, les rameaux et les aiguilles présentent des teneurs faibles en Cd, le processus de transport vers les parties aériennes semble épargner ces zones. Les résultats obtenus à partir des aiguilles sont cependant à modérer car le dosage a été réalisé sur l'ensemble des aiguilles - *mortes et vivantes* - qui ont été récoltées simultanément. Il est donc possible que les teneurs en Cd dans ce compartiment soient sous estimées ne reflétant pas la variabilité en fonction de l'état physiologique des tissus.

Enfin, pour un même arbre, la répartition du Cd en fonction de l'âge des tissus considérés n'a pas permis de définir un gradient de concentration. Dans le cas du sapin de Douglas, le Cd serait donc distribué de façon homogène.

## 1.2 Adaptation du sapin de Douglas à la contamination par les ETM.

Dans les conditions expérimentales mises en œuvre, la contamination en cadmium n'induit aucune conséquence morphologique visible sur le sapin de Douglas, c'est la raison pour laquelle une analyse chimique des écorces et du bois, compartiments désignés comme principales zones de stockage du Cd, a été effectuée. L'objectif de cette analyse est, en caractérisant qualitativement et quantitativement les différentes familles de molécules pariétales, d'apprécier les conséquences chimiques de la contamination des sols par le Cd. Une série d'extractions séquentielles et sélectives a donc été effectuée sur chaque lot d'écorces et de bois prélevé sur des sapins de Douglas issus de culture provoquée sur des sols de teneurs croissantes en Cd.

Sur le plan des compositions monosaccharidiques, la fraction S1 isolée à partir des écorces est significativement affectée par la teneur en Cd dans le sol. Les teneurs en glucose (probablement sous la forme de Glc libre et de saccharose) augmentent fortement pour les trois lots contaminés. L'élévation de la teneur en Cd des sols semble induire une diminution significative de la proportion de lignine et une augmentation concomitante de la part des pectines FM. La présence de Cd induit en conséquence un épaissement de la paroi cellulaire qui pourrait lui conférer un rôle physique barrière au contact de laquelle les ETM pourraient s'adsorber. La paroi, bien que plus épaisse serait aussi moins rigide puisque moins lignifiée. Ce résultat quantitatif doit être associé à l'évolution qualitative de la composition des fractions pectiques faiblement (FM) et fortement (HM) méthylesterifiées. Dans chacun des cas, l'élévation des teneurs en Cd induit une diminution significative de la proportion en GalA pour des proportions stables en Rha. Le rapport GalA / Rha diminue donc en conséquence traduisant ainsi une augmentation de la ramification des structures pectiques. Enfin, l'estimation des degrés de méthylestérification (DM) des fractions pectiques extraites indique que l'élévation des teneurs en Cd provoque une diminution du DM des pectines FM dont l'interaction électrostatique avec les cations métalliques serait ainsi améliorée. A l'inverse, les pectines HM présentent un DM plus élevé. La contamination des sols en Cd induirait donc une augmentation de la proportion de pectines FM (S3), ces dernières étant structurellement plus ramifiées et chimiquement plus acides.

De plus, dans le cas des écorces issues des lots de sapin de Douglas cultivés aux plus fortes teneurs en Cd, les proportions élevées en Glc suggèrent la présence d'amidon - *plus abondant* - et non extrait sélectivement au cours du protocole utilisé. Un tel résultat est contraire aux données de la littérature<sup>117</sup> qui montrent dans ce cas, une diminution de la quantité de polymères non structuraux. Ce commentaire est toutefois purement spéculatif dans la mesure où la proportion d'amidon n'a pas été évaluée spécifiquement. Enfin, les fractions hémicellulosiques et cellulosiques ne semblent pas être affectées qualitativement et quantitativement par l'élévation des teneurs en Cd dans le sol. Un tel commentaire ne s'oppose cependant pas à l'idée d'un remodelage de ces structures polysaccharidiques dont la mise en œuvre par la plante, en réponse à la contamination par le Cd, ne seraient pas caractérisées par les analyses employées dans le cadre de cette étude.

Une caractérisation similaire a été réalisée pour le bois. Comme cela a été constaté dans le cas des écorces, l'élévation de la teneur en Cd des sols semble induire une diminution significative de la proportion de lignine du bois au profit d'une augmentation concomitante de

la part de la fraction cellulosique. La présence de Cd provoque une nouvelle fois un épaississement des parois cellulaires qui pourrait leur conférer un rôle physique de barrière au contact de laquelle les ETM pourraient s'adsorber. La paroi, bien que plus épaisse, serait aussi moins rigide puisque moins lignifiée. L'analyse de la composition monosaccharidique des différentes fractions polysaccharidiques ne révèle aucune différence significative. La composition monosaccharidique du résidu cellulosique apparaît très hétérogène ce qui traduit, dans ce cas, une extraction incomplète des hémicelluloses (arabinoglucuronoxylanes et glucogalactomananes) caractéristiques du sapin de Douglas. Une nouvelle fois, la forte proportion de Glc dans la fraction pectique S2 conforte l'hypothèse d'une contamination par de l'amidon.

## **2 Le bois et les écorces de sapin de Douglas adsorbent les cations métalliques.**

### **2.1 Modélisation du phénomène.**

Si la phytoextraction des ETM par le sapin de Douglas est un phénomène actif, la biosorption des cations métalliques présents en solution par les constituants chimiques des écorces et du bois, utilisés comme résine échangeuse d'ions, est un phénomène passif. La granulométrie des biosorbants utilisés pour cette étude à l'échelle du laboratoire est inférieure à 200  $\mu\text{m}$ . A masse de biosorbant équivalente, la diminution de la granulométrie augmente la surface d'échange favorisant ainsi les interactions ETM – sites d'adsorption. Toutefois, l'utilisation de cette granulométrie ne permet pas d'envisager le recours à un dispositif de type colonne de chromatographie en raison d'un colmatage. C'est la raison pour laquelle nous avons privilégié les expériences en batch. Les autres paramètres comme le pH, le temps de contact ont fait l'objet au laboratoire d'études antérieures qui nous ont conduits à retenir une valeur de pH 5 et un temps de contact de 2 h comme condition optimale. Le choix des ETM s'est orienté vers le plomb et le cadmium qui sont connus pour leur toxicité élevée y compris à faible dose ; celui du sapin de Douglas a été pour sa part influencé par sa très large distribution dans la forêt française. Le sapin de Douglas est l'espèce majoritaire de l'espace central, il est aussi au niveau national le deuxième résineux le plus utilisé pour le reboisement. La ressource naturelle en écorce est donc abondante et aisément mobilisable auprès des

sciéries. L'utilisation des écorces en tant que biofiltre permettrait d'ouvrir de nouvelles voies de valorisation technologique de bonne valeur ajoutée.

Enfin, le choix du modèle mathématique à utiliser pour décrire la biosorption s'appuie sur l'empirisme acquis par le laboratoire. En effet, le modèle de Langmuir repose sur des bases théoriques qui, dans le cas de l'écorce, ne sont pas respectées. L'hétérogénéité de l'écorce ne permet pas d'affirmer que l'ensemble des sites d'adsorption sont équivalents, l'énergie d'adsorption n'est donc pas équivalente. Toutefois, les nombreux résultats obtenus avec des coefficients de corrélation élevés témoignent de la bonne validité du modèle de Langmuir dans le cas de la biosorption des cations métalliques par les écorces.

### ***Cas des écorces***

L'utilisation des écorces forestières pour la biosorption est largement décrite dans la littérature ainsi que cela a été présenté et a fait l'objet de nombreuses publications. Les capacités de rétention des écorces sont toutefois difficilement comparables en raison d'une grande variabilité des conditions expérimentales utilisées. Dans le cas des écorces de sapin de Douglas, les capacités de rétention du plomb sont deux fois supérieures à celles du cadmium alors que l'affinité reste similaire. Le plomb est donc adsorbé sur des sites où le cadmium ne l'est pas traduisant ainsi une meilleure affinité vis-à-vis de certains constituants des écorces. L'étude de biosorption effectuée à différentes températures a permis de calculer l'énergie mise en jeu lors du processus de biosorption. Une valeur de  $\Delta G < 0$  confirme le caractère spontané de l'adsorption. Par ailleurs, dans le cas du Pb, une valeur d'énergie plus faible confirme que l'équilibre est plus déplacé vers les formes adsorbées que dans le cas du Cd. Cependant si l'adsorption est favorisée lorsque la température augmente, la capacité de rétention n'est que très légèrement modifiée ce qui est un résultat encourageant pour un transfert de technologie à grande échelle.

**Cas du bois**

Les capacités de biosorption du Cd et du Pb par le bois sont plus faibles que celles des écorces, les différences observées entre plomb et cadmium sont aussi moins marquées. Ces résultats sont à mettre en relation avec les compositions chimiques caractéristiques du bois dont nous avons démontré qu'il contenait des proportions plus faibles de pectines et lignines, deux constituants chimiques clés de la biosorption. Les valeurs d'affinité restent similaires à celles obtenues à partir des écorces car dans ce cas, la nature des interactions est inchangée, elles concernent les mêmes familles de constituants chimiques.

Un tel phénomène traduit la complexité du processus de biosorption qui est sensible à un certain nombre de paramètres dont le rayon ionique du cation. Le Tableau 29 recense quelques caractéristiques des cations métalliques étudiés.

**Tableau 29 : Quelques caractéristiques physiques et chimiques de cations métalliques.**

Caractéristiques	Cation métallique	
	Cd <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>
<b>Rayon ionique (nm)</b>	0,097	0,132
<b>Configuration électronique</b>	4d <sup>10</sup> 5s <sup>2</sup>	5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup>
<b>Energie d'hydratation (kJ.mol<sup>-1</sup>)</b>	-1807	-1481

L'ion Pb<sup>2+</sup> a un rayon ionique de 0,132 nm alors que celui de l'ion Cd<sup>2+</sup> est de 0,097 nm, ce dernier peut donc accéder plus facilement aux sites plus encombrés. La structure du bois est plus dense, probablement moins poreuse que celle des écorces. C'est pourquoi les capacités de rétention du cadmium sont supérieures à celles du plomb. Compte tenu de la variabilité des teneurs en monosaccharides des fractions polysaccharidiques, il est assez délicat d'avancer dans le cas du bois une relation capacité de rétention – composition monosaccharidique. Par ailleurs les différences de comportement entre les cations métalliques peuvent s'expliquer par d'autres paramètres. En effet, le corollaire du rayon ionique est la polarisabilité. Les deux cations ici présentés ont deux électrons de valence et n'ont pas d'électrons célibataires, c'est donc le plus gros qui est le plus polarisable. La classification établie par Pearson<sup>62</sup> classe le plomb parmi les acides de force moyenne et le cadmium parmi les acides durs. Ce dernier a donc une meilleure affinité vis-à-vis des fonctions hydroxyle et carboxylate que le plomb qui pour sa part a une meilleure affinité vis-à-vis des sites moyens comme les cycles aromatiques. Malheureusement, le concept de polarisabilité ne prend pas en

considération l'environnement aqueux des interactions entre les ligands et les cations métalliques. Cette observation est d'autant plus importante que les caractéristiques physico-chimiques des cations métalliques sont dépendantes de leur état d'hydratation en milieu aqueux. Cette enthalpie correspond à l'énergie nécessaire à la dissociation des molécules d'eau des cations et reflète la facilité avec laquelle un cation pourra interagir avec un ligand situé à la surface de la matrice. Concrètement, plus un cation est hydraté, plus son enthalpie d'hydratation est élevée (en valeur absolue) et par conséquent moins son interaction est possible avec le ligand. C'est pourquoi l'interaction avec les sites d'adsorption est plus favorable dans le cas du plomb que dans le cas du cadmium.

## **2.2 Inertion des écorces.**

L'utilisation des écorces en tant que biosorbant est une alternative originale aux procédés conventionnels de traitement des effluents contaminés en ETM. Cependant les écorces demeurent un matériau hétérogène susceptible de relarguer des composés phénoliques extractibles par l'eau comme certains tanins. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié puis mis en œuvre des approches de modifications chimiques des écorces visant à stabiliser la matrice filtrante tout en préservant ses propriétés échangeuses d'ions. La stabilisation des écorces a été étudiée selon trois méthodologies :

- ✓ l'activation par un acide minéral dont la mise en œuvre permet l'élimination des composés extractibles,
- ✓ la dégradation oxydative qui, dans les conditions de Fenton, permet l'élimination des composés aromatiques solubles ou non, dont les tanins et lignines parfois relargués en solution au cours des tests d'adsorption.
- ✓ la réticulation par le NoTox®, complexe chimique protégé par un brevet et considéré comme un substitut du formaldéhyde. Le NoTox® permettrait le couplage covalent entre des tanins rendant leur solubilisation impossible.

Quels que soient les procédés d'inertion mis en œuvre, les propriétés de biosorption des écorces sont globalement préservées. Les valeurs d'affinité des écorces vis-à-vis du plomb sont similaires. Les capacités de rétention des écorces vis-à-vis du Pb sont, pour leur part, préservées dans le cas de l'oxydation de Fenton, et peu altérées dans le cas de l'activation chimique et de la réticulation par le NoTox®. Les rendements massiques de

réactions sont quasi-quantitatifs. Ils sont compris entre 66% (cas de l'oxydation dans les conditions de Fenton) et 96% (cas de l'activation acide). Les pertes de rendement observées sont, dans les trois cas étudiés, imputables à l'élimination de sucres circulants, d'éléments minéraux et, vraisemblablement, de certains tanins avant leur couplage. L'oxydation de Fenton, avec un rendement massique réactionnel égal à 66%, se révèle plus agressive.

L'étude des écorces inertées par spectroscopie infrarouge, ne révèle aucune différence significative. En effet, la nature des fonctions chimiques présentes reste inchangée, seule leur proportion peut varier éventuellement ce qui globalement, n'affecte pas l'allure des spectres. L'hétérogénéité des matériaux permet difficilement d'attribuer un signal à une seule fonction chimique.

Enfin, l'oxydation de Fenton tout comme la réticulation par le NoTox® conduisent à l'obtention de matériaux parfaitement inertes. Les quantités de phénols relarguées dans chacun de ces deux cas sont très faibles, voire inférieures au seuil de détection. Si à première vue l'utilisation du NoTox® semble séduisante (en ayant un rendement massique plus élevé), ce dernier s'avère difficile à éliminer des écorces. C'est pourquoi l'utilisation du procédé d'oxydation dans les conditions de Fenton a retenu notre attention ; compatible avec des contraintes de chimie verte, il a par ailleurs fait l'objet d'un dépôt de brevet conjointement<sup>185</sup> entre l'entreprise Pe@rL et le laboratoire.

## **3 Les propriétés de biosorption du plomb par les écorces peuvent être optimisées.**

### **3.1 Approche chimique.**

#### **3.1.1 Optimisation par oxydation directe des écorces.**

Les écorces présentent naturellement des sites acide carboxylique (sur les pectines notamment) dont la contribution dans le phénomène de biosorption a été démontrée<sup>55</sup>. C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité mettre en œuvre des stratégies d'oxydation en une ou plusieurs étapes à partir des écorces brutes. A masses d'écorces équivalentes, les titrations acido-basiques tout comme les spectres IR obtenus à partir des écorces oxydées, confirment l'élévation de leur acidité qui est expliquée par l'apparition de fonctions carboxylate. Par

ailleurs, les valeurs de  $q_{\max}$  calculées à partir des isothermes de Langmuir réalisées sur les écorces oxydées en présence de Cd ou de Pb, sont améliorées de façon sensible, confirmant le rôle favorable des fonctions acide carboxylique dans le phénomène de biosorption. Les écorces ainsi modifiées peuvent être assimilées à de véritables résines échangeuses d'ions d'origine naturelle. La nature des sites échangeurs d'ions demeurant équivalente, les valeurs d'affinité  $b$  restent pour leurs parts stables. Nos analyses démontrent également que la fraction phénolique des écorces est plus ou moins affectée par la nature des procédés d'oxydation mis en œuvre. C'est particulièrement vrai dans le cas du chlorite de sodium utilisé notamment en industrie papetière pour blanchir la pâte à papier par oxydation de la fraction phénolique de la matière lignocellulosique.

La succession des étapes de modification peut conduire à l'augmentation progressive de la porosité des écorces dont l'une des traductions expérimentales est indirectement estimée par la diminution des rendements massiques. Les fonctions chimiques potentiellement oxydables deviennent alors plus accessibles et sont sans doute plus réactives à l'oxydation. Les rendements d'oxydation s'élèvent donc en conséquence. Parmi les stratégies utilisées, l'oxydation par NaOCl sans catalyseur se révèle être d'un intérêt limité alors que les réactions catalysées par le TEMPO induisent une élévation significative des propriétés biosorbantes des écorces. Enfin, nos résultats mettent clairement en évidence que la suroxydation des écorces, si elle conduit à la formation de trois fonctions acide carboxylique par unité glucidique, conduit aussi à des valeurs de rendement massique réactionnel très faibles. Pour des valeurs de  $q_{\max}$  similaires, les écorces mono-carboxylées obtenues en une étape à partir des écorces brutes sont produites avec des rendements quasi quantitatifs. Il convient donc d'inscrire les protocoles d'optimisation des propriétés biosorbantes des écorces dans un équilibre raisonné nombre d'étapes / altération de la structure physique et chimique de l'écorce / rendements massiques réactionnels / gain de capacité biosorbante. Une mise en évidence de la validité du protocole utilisé peut être transcrite au travers du gain de rétention. Ce dernier, calculé à partir du rapport ( $q_{\max}$ \*rendement massique /  $q_{\max}$  des écorces brutes) évalue l'efficacité du protocole. Il apparaît clairement (Tableau 30) que les écorces carboxyliques présentent un intérêt particulier. Il est dû, d'une part, à une bonne oxydation des fonctions alcool primaire et, d'autre part, à un rendement massique élevé.

Tableau 30 : Impact de la modification chimique sur les propriétés biosorbantes du plomb des écorces oxydées.

écorces		rendement massique (%)	q <sub>max</sub> (méq.g <sup>-1</sup> )	gain de rétention
<b>brutes</b>		100	0,238	1,0
<b>carboxyliques</b>	<b>7</b>	82	1,816	<b>6,3</b>
<b>dicarboxyliques</b>	<b>6</b>	35	0,999	1,5
	<b>2</b>	20	1,302	1,1
	<b>3</b>	32	1,086	1,5
<b>tricarboxyliques</b>	<b>4</b>	12	1,813	0,9
	<b>5</b>	7	1,725	0,5

La spectroscopie infrarouge s'est révélée être un outil précieux de caractérisation des matériaux oxydés obtenus dans le cadre de cette étude. L'intensité des oxydations peut y être appréciée sur les spectres au travers notamment de l'augmentation de l'intensité des bandes caractéristiques des fonctions C=O des acides carboxyliques ou des carboxylates. Dans le cas des écorces suroxydées, un lien de proportionnalité entre la capacité de rétention en plomb et l'évolution, sur le spectre IR, de la bande caractéristique de la forme complexée des C=O a même pu être caractérisée. Au fur et à mesure de l'adsorption du plomb sur les écorces suroxydées, une augmentation de l'intensité de la bande caractéristique de la forme complexée des carboxylates est constatée. Pour des concentrations en plomb supérieures, le phénomène se stabilise ensuite bien que l'adsorption du plomb soit toujours possible sur les écorces. De tels résultats suggèrent que les fonctions acide carboxylique, groupements échangeur d'ions majoritaires dans le cas des écorces sur-oxydées, ne sont pas les sites d'adsorption uniques du plomb à la surface des écorces. Leur nombre et leur accessibilité leur permettent toutefois d'être des acteurs précoces de l'adsorption du plomb.

### 3.1.2 Optimisation par greffages covalents d'oligosaccharides.

Les fonctions carboxylate, de même que les fonctions sulfate sont de bons candidats à l'adsorption des cations métalliques en solution. Les tests d'adsorption effectués sur les écorces issues des sapins de Douglas cultivés lors de l'expérience de phytoextraction ont révélé une relation entre proportion d'acide galacturonique et capacité de rétention. C'est pourquoi l'objectif du travail a été de fixer sur les écorces de telles fonctions et d'étudier les

variations de capacités et d'affinités induites. Pour ce faire, dans une première phase du travail, une série de modifications chimiques visant à greffer des hydrolysats d'homogalacturonanes a été mise en place. Les sites de greffage choisis sont des fonctions aldéhyde obtenues par oxydation *periodique* de la fraction polysaccharidique ; ces dernières permettent le greffage d'amines primaires via une réaction d'amination réductrice. Cette réaction est effectuée dans l'eau en présence d'un agent réducteur spécifique des imines, le cyanoborohydrure de sodium (Figure 69).

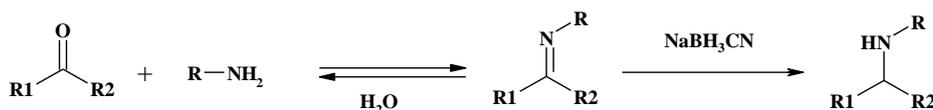


Figure 69 : Schéma réactionnel général de l'amination réductrice.

Le mécanisme de la réaction se déroule en deux étapes. Dans une première étape, l'attaque nucléophile de l'amine (ammoniaque, amine primaire voire secondaire) sur le dérivé carbonylé (aldéhyde ou cétone) conduit à une imine intermédiaire (ou ion iminium dans le cas d'amine secondaire ou en milieu acide). La seconde étape consiste en la réduction de l'imine en amine par action d'un agent réducteur comme  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , réducteur spécifique des imines. Le réducteur ne permettant pas la réduction des aldéhydes, son utilisation permet une réaction « one pot ». D'autres réducteurs supportés comme le formiate d'ammonium<sup>186</sup> (qui induit la formation d'hydrogène sur du Pd/ charbon) ou comme  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ <sup>187</sup> ont été développés, cependant leur utilisation au cours de cette étape reste impossible, les réactions ne peuvent soit pas être effectuées en milieu aqueux soit il est difficile de séparer le support solide des écorces.

Cette stratégie implique la fonctionnalisation des oligosaccharides devant être fixés sur les écorces afin de faire apparaître une fonction amine permettant le greffage. Dans un premier temps, des essais de glycosylation impliquant un amino-alcool dans les conditions de Fischer ont été effectués. La méthodologie développée reposait plus précisément sur la réaction de glycosylation entre des homogalacturonanes (DP moyen = 4) et le 3-aminopropan-1-ol en présence d'un acide fort. Le milieu réactionnel évoluait vers un état d'équilibre formant un mélange complexe de produits dont aucun n'a pu être identifié. Ainsi la méthode de Fischer s'est avérée inefficace. Dans ces conditions, des réactions concomitantes d'estérification mettant en jeu les fonctions acide carboxylique des oligosaccharides et

l' amino-alcool permettraient d'expliquer la multitude des produits formés. Au vue des résultats décevant, le travail s'est orienté vers une réaction d'amination réductrice entre l'ammoniaque ou le *ter*-butyl-3-aminopropylcarbamate et l'extrémité réductrice des oligosaccharides. Les caractérisations effectuées par spectrométrie de masse ESI et MALDI ont montré la disparition complète des homogalacturonanes traduisant ainsi la conversion totale en un produit unique aminé et protégé. Des analyses par spectroscopie de RMN effectuées sur un tétramère purifié sur résine échangeuse d'anions ont permis de confirmer la structure et donc de valider la stratégie. Cette méthodologie a été transposée avec succès à la modification d'oligosaccharides issus de *iota*-carraghénanes.

En fin de réaction, l'excès de réducteur est éliminé par chromatographie d'exclusion stérique ; toutefois, afin de faciliter cette étape de purification, les ions  $\text{BH}_3\text{CN}^-$  ont été supportés sur une résine ammonium échangeuse d'anions IRA 402 (Figure 70). L'élimination de l'excès de réducteur peut, dans ces conditions, être effectuée par simple filtration de la résine.

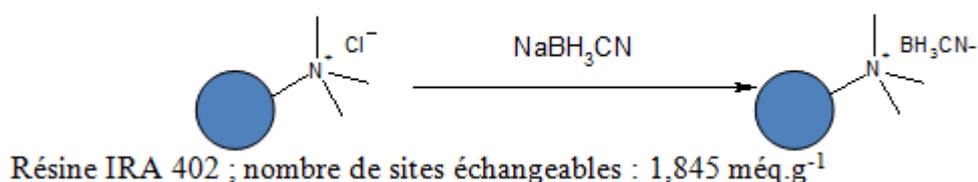


Figure 70 : Synthèse de la résine  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ .

Cependant il s'est avéré que les fonctions carboxylate présentes sur les acides uroniques se substituaient aux ions  $\text{BH}_3\text{CN}^-$  par échange d'ions les relargant dans le milieu réactionnel. La stratégie, finalement plus complexe, nécessite non seulement l'élimination des ions  $\text{BH}_3\text{CN}^-$  relargués dans le milieu mais également la désorption des oligosaccharides adsorbés sur la résine.

L'optimisation des conditions d'oxydation *periodique* de la fraction polysaccharidique des écorces repose sur l'utilisation de 2 équivalents de *periodate* par unité de glucose cellulosique ce qui permet, en théorie (résultat contrôlé par la réaction de Cannizzaro), d'oxyder 100% des unités glucose. Par ailleurs, la réaction d'amination réductrice conduit à des taux de substitution faibles de l'ordre de 10%. Ce résultat pourrait être expliqué par un greffage sans doute plus favorable des oligogalacturonates à la périphérie des grains

d'écorces. Une telle hypothèse, purement spéculative, est cependant renforcée par le fait que des degrés de substitution supérieurs soient obtenus - à quantité équivalente d'oligogalacturonates - dans le cas du greffage d'un mélange d'oligogalacturonates par rapport à un oligogalacturonate purifié de DP 4. Dans le cas du mélange, la présence d'oligomères de DP < 4 - y compris le GalA - doit permettre le greffage sur des sites moins accessibles. Les caractérisations effectuées par spectroscopie infrarouge mettent en évidence d'une part, l'augmentation de l'intensité des signaux correspondant à l'élongation des liaisons C=O à  $1740\text{ cm}^{-1}$  au cours de la réaction d'oxydation *periodique* et, d'autre part, la diminution concomitante des intensités des mêmes bandes au cours de l'étape d'amination réductrice traduisant ainsi le greffage covalent des oligosaccharides.

Les résultats démontrent que la stratégie de greffage covalent d'oligo- et/ou monosaccharides mono- ou poly-anioniques développée au cours de cette étude permet d'améliorer les capacités de rétention du plomb par les écorces. Par ailleurs, dans le cas du greffage d'un mélange d'oligogalacturonates, l'insertion d'un bras espaceur entre les sites de greffage à la surface de l'écorce et les sites échangeur d'ions améliore les propriétés d'adsorption. Le rôle anticipé du bras espaceur, choisit à 3 carbone pour être suffisamment long pour éloigner les sites acide carboxylique des grains d'écorce et suffisamment court pour ne pas favoriser un surenroulement de la chaîne, est de favoriser l'accessibilité des sites échangeurs d'ions. Dans cet environnement, les oligogalacturonates peuvent adopter plus facilement une conformation de type « boîte à œuf » plus favorable à l'adsorption des ETM. Le degré de polymérisation des oligosaccharides greffés est un autre aspect qui peut impacter les capacités des écorces modifiées. Dans ce cas, les capacités d'adsorption sont améliorées lorsque le DP des oligosaccharides augmente. Une telle observation est à associer aux prédictions de la théorie de Langmuir : un ion s'adsorbe sur un site échangeur d'ions - les capacités d'adsorption augmentent donc logiquement avec le nombre de sites échangeur d'ions.

Toutefois, dans le cas d'un matériau hétérogène comme l'écorce, si le nombre de sites d'adsorption évalué selon la méthode de Boehm suit la même tendance que les capacités de rétention, ces deux grandeurs ne sont néanmoins pas directement proportionnelles. En effet, certains sites déjà présents sur la structure avant les modifications chimiques ne sont pas accessibles par les ETM, c'est pourquoi la totalité des sites n'est pas occupée. Cette remarque renforce la nécessité de modifier chimiquement les écorces en greffant de manière covalente des oligosaccharides.

Dans le cas du greffage d'oligogalacturonates, si les valeurs des capacités d'adsorption sont accrues, les valeurs d'affinité restent stables, ce qui est en parfait accord avec la théorie HSAB. Le greffage d'une même famille de groupements échangeurs d'ions - *dans le cas des oligogalacturonates, les acides carboxyliques* - augmente la capacité d'échange d'ions en augmentant le nombre de sites échangeurs d'ions. Les sites greffés étant équivalents, ils présenteront pour un même métal, une même affinité quel que soit leur nombre. En revanche, le greffage d'oligo-*iotacarraghénanes*, en introduisant des fonctions sulfate à la surface des écorces, multiplie par 4 les valeurs d'affinité des écorces modifiées pour le plomb. Un tel résultat, tout en renforçant l'intérêt de notre approche, valide la théorie HSAB. En effet, le plomb qui est un métal de force moyenne, interagit de façon privilégiée avec des groupements échangeur d'ions de force moyenne tels que les groupements sulfate. Les groupements carboxylate, plus durs, présentent pour leur part, une affinité pour le plomb plus faible.

### 3.2 Approche biologique.

Le Cd est un ETM dont nous avons démontré qu'il était absorbé par les sapins de Douglas. Il y est d'ailleurs compartimenté dans les écorces où il induit une réponse chimique adaptative notamment au niveau des composés phénoliques et pectiques. Les teneurs en phénol diminuent au profit d'une élévation des teneurs en pectines. D'un point de vue qualitatif, les pectines apparaissent plus ramifiées. Elles sont aussi plus acides puisque leur degré de méthylestérification diminue. L'ensemble de ces évolutions seraient, en théorie, en mesure d'impacter positivement les capacités des écorces à adsorber les ETM en général, le Cd en particulier. De telles modifications chimiques sont de nature à favoriser la compartimentation du Cd dans les écorces par interaction électrostatique abaissant ainsi son caractère toxique pour le reste de la plante. Il est par ailleurs légitime de penser que de telles évolutions qualitatives et quantitatives puissent permettre à la plante de s'adapter à des conditions environnementales difficiles. Toutefois, des essais de biosorption réalisés à partir des écorces modifiées par voie biologique, mettent en évidence que les capacités d'adsorption des écorces sont abaissées lorsque les teneurs en Cd dans le sol augmentent.

En réponse à une pollution par le Cd, et ainsi qu'en attestent nos résultats, si les pectines sont quantitativement plus abondantes dans les écorces, elles sont aussi qualitativement moins riches en GalA. Globalement, et à masse équivalente, la quantité de GalA est similaire. Les

pectines sont aussi plus ramifiées. Les GalA dont elles sont formées sont alors probablement moins accessibles. Couplé à une diminution de la proportion de lignines, ce phénomène permet d'expliquer la diminution des capacités de rétention du plomb et du cadmium observées dans le cas des écorces issues d'arbres cultivés sur des sols contaminés en Cd. Ce résultat met en lumière le rôle des pectines, en particulier celui de l'acide galacturonique, dans le processus de biosorption. Les capacités de biosorption des écorces sont donc à associer à leur richesse en GalA et lignines. Dans le cas de l'adsorption du cadmium, la diminution des capacités de rétention des écorces - *moins marquée dans le cas du plomb* - suggère un rôle favorable des lignines. Enfin, il est intéressant de constater que les écorces issues d'arbres juvéniles présentent pour le Pb et le Cd, des valeurs de  $q_{\max}$  jusqu'à dix fois supérieures à celles obtenues dans les mêmes conditions expérimentales à partir des écorces de scieries. Les valeurs d'affinité restent, pour leurs parts, similaires. Bien que l'évolution des compositions chimiques des parois cellulaires en fonction de la localisation et de l'âge des tissus qui sont caractérisés soit un phénomène bien connu des physiologistes, le résultat observé ne peut être expliqué, à masse équivalente d'écorces, qu'au regard d'une quantité de sites échangeurs d'ions (pectines et lignines) globalement supérieurs tout comme une structure / texture plus poreuse des tissus des écorces juvéniles ( Figure 71). Dans le cas des écorces juvéniles, la fraction extractible correspond à 45% de la masse alors qu'elle n'est que de 26%<sup>11</sup> dans le cas d'écorces de scierie : au cours de l'adsorption, les sucres circulants et les phénols relargués rendent plus accessibles les sites échangeurs d'ions. De plus, la part des glucanes est plus faible dans le cas d'écorces juvéniles, polymères dont les propriétés adsorbantes, bien que connues, sont plus faibles que celles des polymères phénoliques ou des pectines. Les sites échangeurs d'ions seraient alors plus nombreux en proportion, ils seraient aussi plus accessibles et donc disponibles pour des interactions avec les cations métalliques.

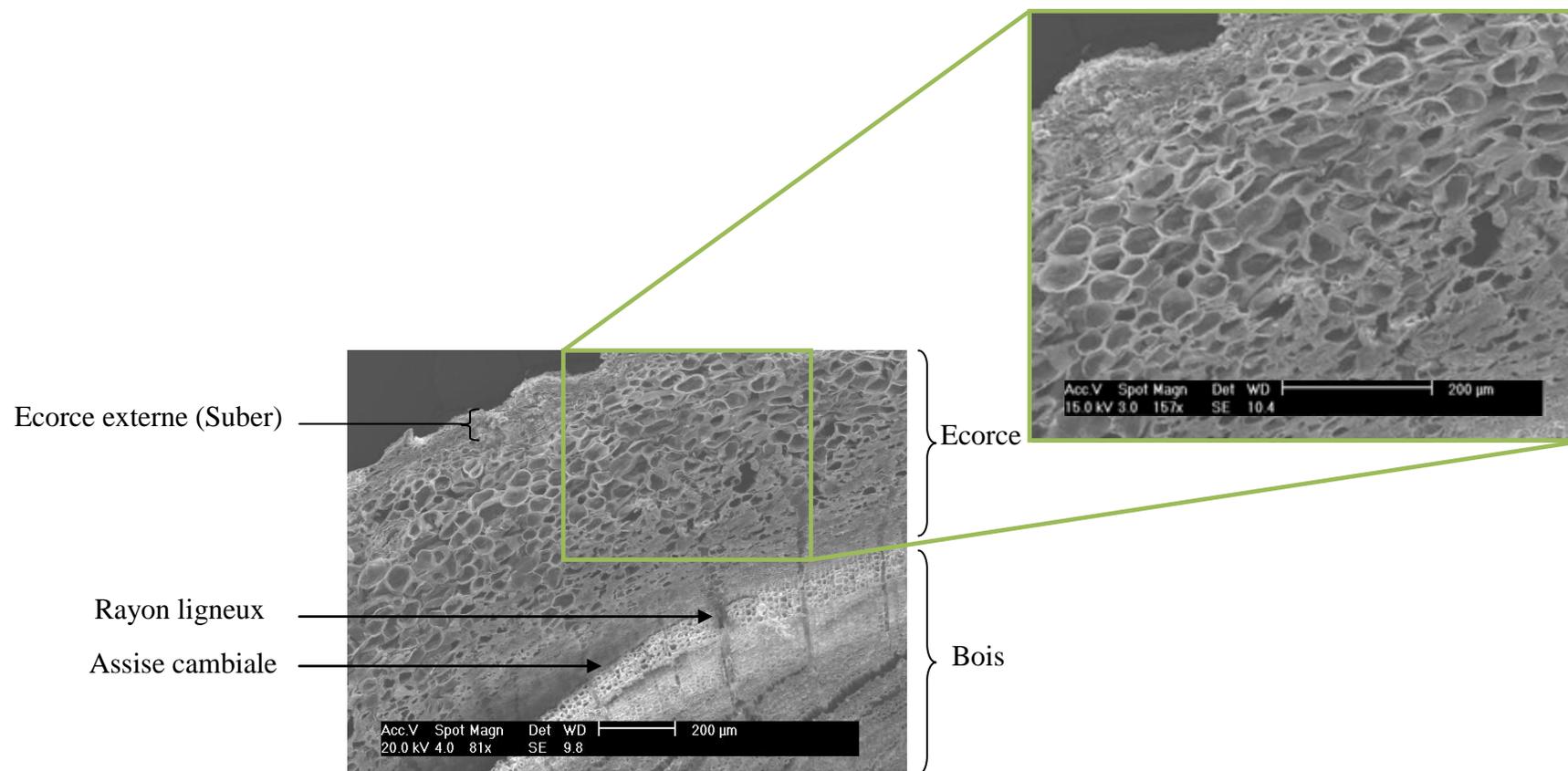


Figure 71 : Observation d'une coupe transversale d'écorces issues des sapins de Douglas cultivés sur sol témoin obtenue par microscopie électronique à balayage.



**Conclusion et perspectives.**



Abordée à la fois sous l'angle chimique et biologique, cette étude confirme les propriétés remarquables de l'écorce de sapin de Douglas à adsorber les cations métalliques en solution tout comme à stocker les ETM présents dans le sol après absorption par la plante.

Principal coproduit de la filière bois, l'écorce est un matériau hétérogène, de grande complexité chimique, qu'il convient de stabiliser en limitant le relargage de composés extractibles - *principalement phénoliques* - en perspective de leur utilisation en temps que biomatrice filtrante. Un tel résultat a été obtenu par réticulation induite par le NoTox® ou dégradation oxydative selon le protocole de Fenton. Ces stratégies, si elles conduisent à l'inertion de matériaux naturels, n'en améliorent pas pour autant les capacités biosorbantes. L'augmentation de la densité de charge anionique des écorces et, plus particulièrement, du nombre de fonctions acide carboxylique induit pour sa part une amélioration sensible des capacités biosorbantes des écorces. Nos travaux ont démontré qu'il est possible de générer de telles fonctions directement sur la structure par oxydation des polysaccharides constitutifs des écorces dont, notamment la cellulose. Si, dans ce cas, l'affinité pour les cations métalliques reste stable, les capacités maximales de rétention sont quand à elles augmentées jusqu'à un facteur 8 comme c'est le cas pour l'oxydation directe des fonctions alcool primaire par l'hypobromite de sodium catalysée par le TEMPO - *l'intégrité du matériau naturel étant préservée*. Une autre approche consiste à greffer de façon covalente sur l'écorce préalablement oxydée par le *periodate* de sodium, des molécules organiques polycarboxylées - *dans notre cas les dérivés d'oligogalacturonates* - après amination réductrice. Dans ce cas, les capacités adsorbantes en cations métalliques sont améliorées d'un facteur 8. Une telle stratégie offre par ailleurs à l'expérimentateur la possibilité d'orienter la sélectivité des écorces modifiées vis-à-vis des cations métalliques en diversifiant la nature chimique des groupements échangeurs d'ions greffés. C'est ce que nous avons démontré en greffant des dérivés sulfatés d'oligocarraghénanes qui permettent de multiplier par 4 l'affinité des écorces vis-à-vis du plomb. Un tel résultat est un argument supplémentaire qui vient confirmer la bonne cohérence de la théorie HSAB proposée par Pearson pour expliquer le phénomène de biosorption. La modification chimique par voie biologique est une alternative à l'approche d'oxydation ou de greffage chimique. Des expériences de phytoextraction conduites sous serre ont révélé une bonne capacité du sapin de Douglas à tolérer le Cd. Les écorces apparaissent comme le compartiment présentant la plus forte teneur en Cd. Dans ce cas, nous avons démontré une modification sensible de la composition des parois des cellules d'écorces dont la proportion de lignine est abaissée de 10% en masse au profit de l'apparition

concomitante de pectines faiblement méthylestérifiées. Toutefois, si l'importance de la fraction pectique demeure quantitativement stable, globalement, les pectines apparaissent moins acides (la proportion d'acide galacturonique diminue) et davantage ramifiées. Contrairement aux résultats obtenus dans le cadre du greffage chimique d'oligogalacturonates, les capacités de biosorption en plomb et cadmium des écorces modifiées par voie biologique sont abaissées. D'autres paramètres sont donc à prendre en compte comme la teneur en lignine et l'accessibilité des sites.

Sur le plan des perspectives, ce travail pourra être complété dans deux directions, l'optimisation des modifications chimiques et la caractérisation fine des modifications induites par voie chimique et biologique sur les écorces. Le greffage par amination réductrice, séduisant sur le plan fondamental, reste néanmoins difficilement industrialisable du fait de l'utilisation de cyanoborohydrure de sodium. Nos protocoles doivent donc s'orienter en conséquence vers la mise en œuvre de procédés faisant appel à des méthodes plus douces telles que l'oxydation par l'ozone ou les phthalocyanines. Développé à l'origine avec comme contaminant modèle les cations métalliques, le procédé sera étendu à l'élimination de micropolluants organiques tels que les pesticides et/ou les insecticides. Sur le plan de la caractérisation des écorces modifiées, si la titration acido-basique et la spectroscopie infrarouge apportent des informations précieuses quant à l'efficacité des stratégies de modification chimique mises en œuvre, une caractérisation plus fine par spectroscopie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance) permettrait de préciser si les modifications chimiques affectent de manière homogène les grains d'écorce. De façon corollaire, la microscopie électronique à balayage à détection EDS (Energy Dispersive Spectrometry) permettrait d'étudier la distribution du cadmium au sein des écorces. Par ailleurs, et s'agissant des modifications induites par voie biologique, il conviendra de caractériser globalement l'évolution des compositions chimiques des racines en réponse à un stress métallique. En contact permanent avec le substrat de sol contaminé, l'adaptation des racines, tant sur le plan morphologique que biochimique mérite d'être prospectée et ses conséquences sur les propriétés biosorbantes évaluées. Enfin, une étude chimique spécifique des polymères néosynthétisés au cours de la période de culture en condition contaminée (zone 4) serait complémentaire et pourrait apporter des réponses chimiques davantage marquées. C'est aussi le cas d'une étude en microscopie électronique après immunomarquage des pectines, des hémicelluloses et/ou des phénols dont la mise en œuvre permettrait d'étudier l'évolution éventuelle de leur distribution au sein de la paroi cellulaire en fonction de l'année de croissance.

Pour conclure, les deux approches proposées au cours de ces travaux apportent, d'une part, leur contribution au niveau de l'élimination sélective de cations métalliques en solution par les écorces forestières dont les propriétés biosorbantes peuvent être modulées par modifications chimiques et, d'autre part, contribuent à la caractérisation de l'impact d'une contamination par les ETM sur l'évolution de la composition chimique des polymères pariétaux des sapins de Douglas.



**Quatrième partie : partie expérimentale.**



# 1 Matériel biologique et réactifs.

## 1.1 Matériel biologique.

### 1.1.1 Origine et prétraitement des écorces de scierie.

Les écorces de sapin de Douglas en vue des traitements chimiques sont issues d'un lot unique. Elles proviennent d'arbres adultes prélevés sur des parcelles forestières et ont été obtenues auprès de la scierie ARBOS (Egletons, 19). Elles sont séchées à l'étuve ventilée 40 °C puis broyées à l'aide d'un broyeur centrifuge afin d'obtenir une poudre qui est ensuite tamisée pour obtenir des grains de granulométrie inférieure à 200 µm. Les écorces ainsi traitées sont alors conservées en étuve ventilée à 40 °C puis pesées.

### 1.1.2 Origine et culture des jeunes plants de sapin de Douglas.

Les plants de sapin de Douglas âgés de trois ans sont de variété « américaine 403 ». Ils ont été fournis par un pépiniériste spécialisé en reboisement, la SARL Vallade Delage (Bussière Gallant, 87).

## 1.2 Réactifs et solvants utilisés.

Les produits chimiques utilisés pour ces expériences sont listés dans le Tableau 31. Ils sont utilisés directement à l'exception du chloroforme qui est au préalable distillé en présence d'un desséchant  $\text{CaH}_2$ .

Tableau 31 : Réactifs et solvants utilisés.

Réactifs	pureté	fournisseurs
Acétate d'éthyle	99%	Prolabo
Acétylène	alphagaz	Air liquide
1,3-diaminopropane	98%	Alfa Aesar
Acide acétique	99,6%	Carlo Erba
Acide chlorhydrique	37% Normapur	VWR
Acide Chlorhydrique (normadose)	0,05 N	Alfa Aesar
Acide citrique	99%	Alfa Aesar
Acide formique	96%	Alfa Aesar
Acide galacturonique	97%	Fluka
L-Acide lactique	90%	Alfa Aesar
DL-Acide malique	98%	Alfa Aesar
Acide nitrique	68%	VWR
Acide nitrique (minéralisation)	68% Normapur	VWR
Acide sulfurique	95%	VWR
Acide trifluoroactique	99%	Sigma
Alcool oxydase	32 unités/mg	Sigma
Ammoniaque	7 N	Sigma
Argon	alphagaz	Air liquide
Boc <sub>2</sub> O	97%	Alfa Aesar
Borohydrure de sodium	98%	Sigma
Bromure de potassium	99%	Sigma
Bromure de sodium	99%	Alfa Aesar
BSTFA, TMSCI 1%	1%	Alltech
Butan-1-ol	99,5%	ACROS
Carbonate de sodium (normadose)	0,1 N	Alfa Aesar
Chlorite de sodium	80%	ACROS
Chloroforme	99%	Carlo Erba
Chlorure de cadmium	ACS	Acros
Chlorure de calcium dihydraté	99%	Acros
Chlorure de cobaltihexamine		Sigma
Chlorure de sodium	99,5%	Prolabo
Cyanoborohydrure de sodium	95%	Sigma
Diazote	Alphagaz	Air Liquide
Dihydrogénophosphate de K	99%	Acros
Eau ultra pure	18,2 MΩ.cm	Milli-Q plus
EDTA K <sub>2</sub> , dihydraté	99%	Alfa Aesar
Étalon cadmium (1000 ppm)	99,999%	VWR
Étalon plomb (1000 ppm)	99,999%	VWR

Ethanol	96%	Elvetec Services
Ether		VWR
Ethylèneglycol	99%	Sigma
Heptane	Extra dry	Acros
Hydrogénocarbonate d'ammonium		Alfa Aesar
Hydrogénocarbonate de sodium		Sigma
Hydrogénophosphate de K	98%	Acros
Hydroxyde de potassium	85%	Acros
Hydroxyde de sodium	98,5%	ACROS
Hydroxyde de sodium (normadose)	0,1 N	Alfa Aesar
Hypochlorite de sodium	13%	ACROS
Iota-carraghénanes		Fluka
Métaperiodate de sodium	98%	Alfa Aesar
Methanol		ACROS
Méthanol anhydre	Synthesis grade	Fischer
Méthanol / HCl	3 N	Supelco
Nitrate de cadmium	98,5%	Alfa Aesar
Nitrate de plomb	99%	Sigma
Nitrite de sodium		Sigma
NoTox®		Scientific device laboratory
Oxalate d'ammonium	98%	Prolabo
Pectine d'agrumes	60%	ACROS
Pectinex®	3800 unités/mL	Novozyme
Peroxyde d'hydrogène	30%	VWR
Propan-2-ol	99,5%	Prolabo
Purpald	99%	Sigma
Pyridine	Extra dry	Acros
Réactif de Folin-Ciocalteu	2 N	Sigma
Sulfate de fer heptahydraté	98%	Prolabo
TEMPO	98%	Alfa Aesar

## 2 **Modification chimique des écorces.**

### 2.1 **Traitements chimiques des écorces.**

Plusieurs traitements chimiques ont été appliqués aux écorces afin de vérifier leur impact sur les capacités d'échanges d'ion et sur les quantités de phénols relargués lors des adsorptions des cations métalliques.

#### 2.1.1 **Traitement des écorces par l'acide sulfurique : obtention des écorces- $H^+$ .**

5 g d'écorces brutes de sapin de Douglas de granulométrie inférieure à 200  $\mu m$  sont mis en suspension dans 50 mL d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 0,1 M. Le mélange est maintenu à 50 °C sous agitation magnétique pendant 2 h. La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté (porosité 3) puis les écorces sont rincées par de l'eau ultra pure jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne la valeur du pH de l'eau. Enfin, les écorces traitées sont lyophilisées puis pesées et conservées à l'étuve ventilée à 40 °C.

#### 2.1.2 **Oxydation dans les conditions de Fenton : obtention des écorces-Fenton.**

L'oxydation selon le principe de Fenton se déroule en 3 étapes :

- le relargage des tanins, sucres circulants ...
- l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène
- la désorption du fer éventuellement adsorbé lors de l'étape précédente

5 g d'écorces brutes de sapin de Douglas de granulométrie inférieure à 200  $\mu m$  sont mis en suspension dans 500 mL d'eau. Le mélange est maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 2 h. La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté (porosité 3) puis les écorces sont rincées par de l'eau ultra pure. Ces dernières sont directement mises en suspension dans une solution aqueuse du mélange peroxyde d'hydrogène à 50 mM et sulfate de fer (II) à 0,5 mM ; le pH est ajusté à 3 par ajout d'acide sulfurique 10 mM. La suspension est

ensuite maintenue à température ambiante sous agitation magnétique pendant 1 h 45. Les écorces sont récupérées par filtration sur verre fritté (porosité 3), rincées par 1 L d'eau ultra pure puis mises en suspension dans 250 mL d'une solution d'acide sulfurique à 0,1 M. Le mélange est maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 1 h. La suspension est alors filtrée sur verre fritté (porosité 3) puis les écorces sont rincées par de l'eau ultra pure jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne la valeur du pH de l'eau. Enfin, les écorces oxydées sont lyophilisées puis pesées et conservées à l'étuve ventilée à 40 °C.

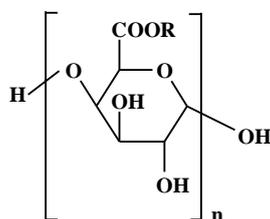
### **2.1.3 Stabilisation par le NoTox<sup>®</sup> : obtention des écorces-NoTox.**

A une solution hydro-alcoolique composée de 56,5 mL d'éthanol à 96% et 50 mL d'eau sont ajoutés 12,5 g d'écorces brutes. Afin d'être homogénéisé, le mélange est placé à température ambiante sous agitation magnétique pendant 5 min. Cinquante millilitres de NoTox<sup>®</sup> sont alors ajoutés, puis la suspension est placée à l'obscurité à 60 °C sous agitation magnétique pendant 24 h. Les écorces sont récupérées par filtration sur verre fritté (porosité 3), rincées par 2 L d'eau ultra pure puis mises en suspension dans 500 mL d'une solution d'acide sulfurique à 0,1 M. Le mélange est maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 1 h. La suspension est alors filtrée sur verre fritté (porosité 3) puis les écorces sont rincées par de l'eau ultra pure jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne la valeur du pH de l'eau. Enfin, les écorces stabilisées sont lyophilisées puis pesées et conservées à l'étuve ventilée à 40 °C.

## 2.2 Greffage chimique de molécules anioniques sur les écorces.

### 2.2.1 Préparations d'oligosaccharides modifiés.

#### 2.2.1.1 *Obtention d'oligogalacturonates par hydrolyse des pectines.*

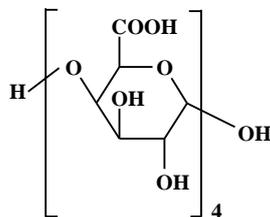


R = H ou R = CH<sub>3</sub>, DME ≈ 60%

(8)

Les oligosaccharides sont obtenus par hydrolyse enzymatique de pectines d'albêdo d'agrumes commerciales (l'albêdo étant la partie blanchâtre du fruit). A une solution aqueuse de 100 mL de pectines à 10 g.L<sup>-1</sup> sont ajoutés 25 µL d'endopolygalacturonase (Pectinex®). Le mélange est placé sous agitation magnétique à 55 °C pendant 35 min. Après élimination des oligomères de plus grands degrés de polymérisation par précipitation par 3 volumes d'éthanol, l'acide galacturonique est éliminé par chromatographie d'exclusion stérique (biogel P2, Ø : 2,1 cm, hauteur : 43 cm, éluant : eau, débit : 15 mL.h<sup>-1</sup>). Les fractions contenant les oligosaccharides d'intérêt sont rassemblées, lyophilisées puis pesées. Ces dernières ont un Rf compris entre 0 et celui de Gal A dans l'éluant Butan-1-ol/acide acétique/eau, 2/1/2, v/v/v.

2.2.1.2 *Saponification et purification du tétramère d'acide galacturonique.*



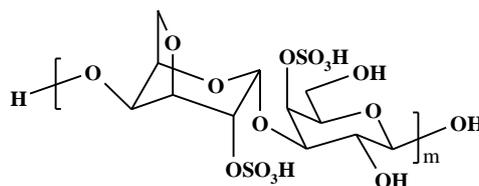
(9)

Afin de purifier le tétramère (9) par chromatographie d'échange d'ion, les fonctions acide carboxylique masquées par la méthylestérification naturelle des pectines sont saponifiées comme suit : une solution aqueuse de 250 mL d'oligogalacturonates à 1 g.L<sup>-1</sup> est placée à 4 °C sous agitation ; durant la réaction, le pH est ajusté à 10 par ajouts successifs de soude à 0,1 M. Lorsque le pH ne varie plus, la saponification est alors terminée. Le milieu réactionnel est alors neutralisé par passage sur résine échangeuse d'ion (Amberlite IR 120 H<sup>+</sup>). Après concentration des oligosaccharides sous pression réduite, un volume de 5 mL est déposé sur colonne d'exclusion stérique DEAE Sephadex A-25 (Ø 2 cm, 38 cm) précédemment équilibrée par une solution d'hydrogénocarbonate d'ammonium à 10 mM. Les oligogalacturonates sont élués par une solution de 1 L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> dont la concentration comprise entre 0,01 et 0,4 M est une fonction linéaire du temps. Les différentes fractions obtenues sont concentrées, lyophilisées et pesées avant d'être analysées par spectrométrie de masse ESI. Cette dernière met en évidence la présence du pic caractéristique du tétramère modifié à [M-H]<sup>-</sup> à m/z = 721,2 ainsi que de son adduit sodium majoritaire à m/z = 743,3.

R<sub>f</sub> = 0.17 (butan-1-ol / acide acétique / eau, 2 / 1 / 2, v / v / v).

RMN <sup>1</sup>H : (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) et RMN <sup>13</sup>C : (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) cf Tableau 20.

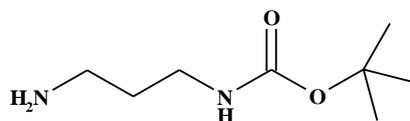
### 2.2.1.3 *Obtention d'oligocarraghénanes par hydrolyse acide des iota-carraghénanes.*



(10)

Les oligosaccharides sont obtenus par hydrolyse acide de iota-carraghénanes commerciaux. 2 g de carraghénanes sont dissous à 60 °C dans 200 mL d'eau déminéralisée ; la solution est acidifiée à pH 4 par HNO<sub>3</sub> 10 mM puis placée à l'étuve à 80 °C pendant 20 h. La solution est alors neutralisée par la soude à 10 mM, les oligomères de plus grands DP sont précipités par ajout de 600 mL d'éthanol à 96% et éliminés par centrifugation. Le surnageant est concentré sous pression réduite puis déposé sur colonne Biogel P2 (conditions identiques aux oligogalacturonates) afin d'éliminer les sels. Les fractions contenant les oligosaccharides d'intérêt (1 < m < 6) sont rassemblées, lyophilisées et analysées par spectrométrie de masse.

### 2.2.1.4 *Synthèse du ter-butyl-3-aminopropylcarbamate.*



(11)

22 mL d'une solution chloroformée de Boc<sub>2</sub>O (0.5 M) sont ajoutés goutte à goutte à 220 mL d'une solution chloroformée contenant 5 mL de 1,3-diaminopropane. L'ajout est effectué à 0 °C pendant 2 heures sous agitation magnétique. Le mélange est ensuite maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 18 h. Le 1,3-diaminopropane diprotégé est éliminé par filtration puisqu'il précipite au cours de la réaction. Une huile jaunâtre est obtenue après évaporation du chloroforme sous pression réduite. Elle est reprise par 400 mL d'acétate d'éthyle, lavée par une solution saline de NaCl demi-saturée (3 x 150 mL), séchée (MgSO<sub>4</sub>) puis concentrée sous pression réduite. Le ter-butyl-3-aminopropylcarbamate (solide blanc à 4 °C) est obtenu pur avec un rendement de 92%.

R<sub>f</sub> = 0,3 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 7/3, v/v),

RMN <sup>1</sup>H : (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : δ 1.39 (s, 9H), 1.57 (quint, 2H, J=6.7 Hz), 2.74 (t, 2H, J=6.7 Hz), 2.87 (s, 2H), 3.16 (q, 2H, J=6.4 Hz), 5.1 (s, 1H).

RMN <sup>13</sup>C : (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : δ 28.4 (3C), 33.5, 38.4, 39.7; 79.0, 156.2.

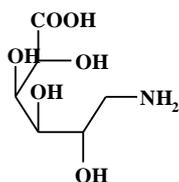
## 2.2.2 Synthèses des amines greffées.

### 2.2.2.1 Par réaction avec l'ammoniaque.

#### 2.2.2.1.1 Méthode générale.

100 mg d'oligosaccharides (ou d'acide galacturonique) sont dissous dans 1 mL d'eau ultra pure puis ajoutés à 3 mL d'une solution méthanolique d'ammoniaque 7 N contenant 16 équivalents de cyanoborohydrure de sodium. Le mélange est porté à 70 °C pendant une heure sous agitation magnétique. Après évaporation de l'ammoniaque en excès, l'huile est reprise dans 5 mL d'eau pour être déposée sur colonne d'exclusion stérique (biogel P2, Ø : 2,1 cm, hauteur : 43 cm, éluant : eau, débit : 15 mL.h<sup>-1</sup>) afin d'éliminer le réducteur en excès. Les fractions contenant les amines d'intérêt sont rassemblées, lyophilisées puis pesées pour obtenir le rendement de la réaction.

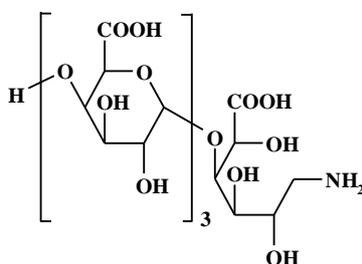
#### 2.2.2.1.2 Application à la synthèse de l'acide 6-amino-2,3,4,5-tetrahydroxyhexanoïque.



(12 a)

100 mg d'acide galacturonique (0,51 mmol) sont mis en présence de 3 mL d'ammoniaque méthanolique (20,6 mmol) contenant 513 mg de cyanoborohydrure de sodium (8,27 mmol).

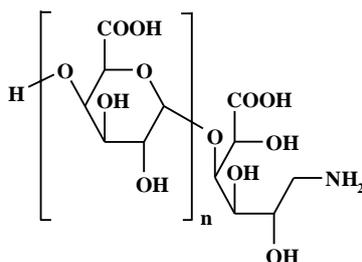
#### 2.2.2.1.3 Application à la synthèse du tétramère aminé.



(15)

100 mg de composé (9) (0,14 mmol) sont mis en présence de 3 mL d'ammoniaque méthanolique (20,6 mmol) contenant 136 mg de cyanoborohydrure de sodium (2,19 mmol).

#### 2.2.2.1.4 Application à la synthèse du mélange d'oligogalacturonates aminés.



(12 b)

100 mg d'oligogalacturonates (8) (0,14 mmol) sont mis en présence de 3 mL d'ammoniaque méthanolique (20,6 mmol) contenant 136 mg de cyanoborohydrure de sodium (2,19 mmol).

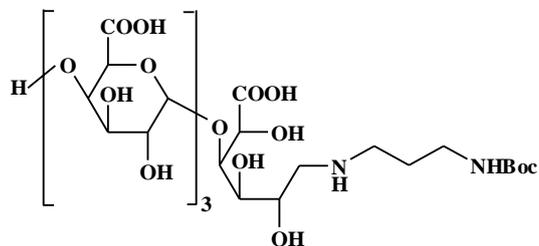
#### 2.2.2.2 Par réaction avec le *ter*-butyl-3-aminopropylcarbamate.

##### 2.2.2.2.1 Méthode générale.

Les oligogalacturonates (100 mg) sont dissous dans 1 mL d'eau et ajoutés à 3 mL d'une solution méthanolique contenant 10 équivalents (658 mg) de *ter*-butyl-3-aminopropylcarbamate et 16 équivalents (136 mg) de NaBH<sub>3</sub>CN. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique à 80 °C pendant 1 h. Le mélange est évaporé à sec puis le solide est repris par 10 mL d'eau. L'amine en excès est éliminée par 8 lavages par le chloroforme (8 x 20 mL), le réducteur et l'amine en excès sont pour leur part éliminés sur colonne d'exclusion stérique (biogel P2, éluant : eau, débit : 15 mL.h<sup>-1</sup>). Les fractions pures sont rassemblées, lyophilisées puis pesées.

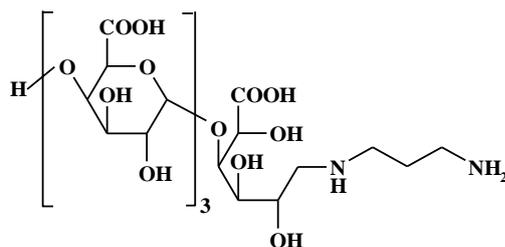
La déprotection est effectuée par le TFA à température ambiante : cet acide permet la régénération de l'amine primaire sans affecter la structure de la chaîne glucidique. Ainsi, 500 mg d'oligogalacturonates (dont la fonction amine est protégée) sont dissous dans 10 mL de TFA ; le mélange est placé sous agitation magnétique pendant 20 min. L'acide en excès est éliminé par évaporation sous pression réduite. Une purification par recristallisation est effectuée afin d'éliminer les dernières traces d'acide : le solide est dissous dans un minimum de méthanol sous action des ultra-sons puis recristallisé lors de l'ajout de quelques gouttes d'éther.

2.2.2.2.2 *Application à la synthèse du tétramère aminé muni d'un bras espaceur.*



(14 c)

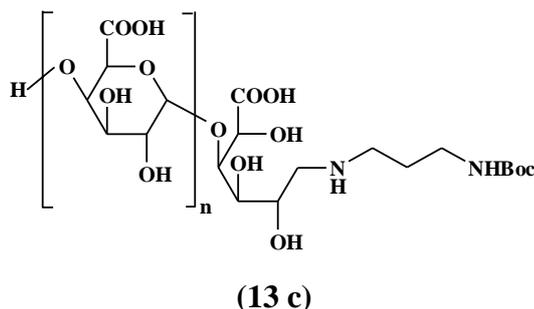
100 mg de tétramère (9) (0,14 mmol) sont ajoutés à 658 mg de ter-butyl-3-aminopropylcarbamate (3,78 mmol) et 136 mg de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (2,19 mmol). Le rendement de l'amination réductrice est quantitatif.



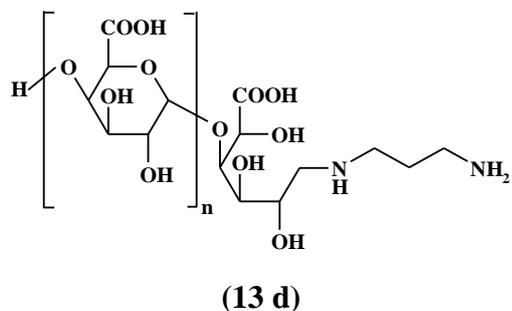
(14 d)

100 mg de composé (14 c) (0,11 mmol) sont mis à réagir dans 2 mL d'une solution aqueuse de TFA à 3%. Le rendement de la déprotection est quantitatif.

2.2.2.2.3 *Application à la synthèse du mélange d'oligogalacturonates aminés munis d'un bras espaceur.*

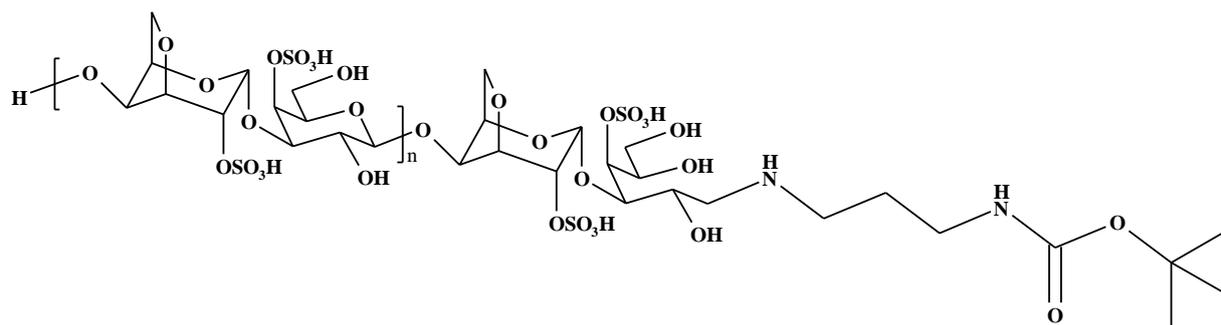


100 mg d'oligogalacturonates (8) (0,14 mmol) sont ajoutés à 658 mg de ter-butyl-3-aminopropylcarbamate (3,78 mmol) et 136 mg de NaBH<sub>3</sub>CN (2,19 mmol). Le rendement de l'amination réductrice est quantitatif.



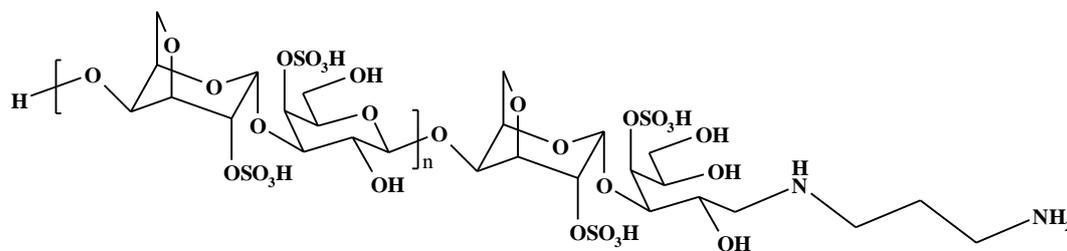
500 mg de composé (13 c) (0,56 mmol) sont mis à réagir dans 10 mL d'une solution aqueuse de TFA à 3%. Le rendement de la déprotection est quantitatif.

2.2.2.2.4 *Application à la synthèse du mélange d'oligocarraghénanes aminés munis d'un bras espaceur.*



(16 c)

130 mg d'oligocarraghénanes (10) (0,14 mmol) sont ajoutés à 658 mg de ter-butyl-3-aminopropylcarbamate (3,78 mmol) et 136 mg de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (2,19 mmol). Le rendement de l'amination réductrice est quantitatif.



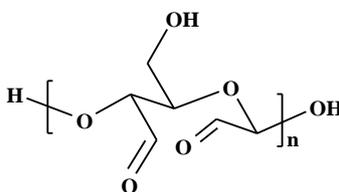
(16 d)

500 mg de composé (16 c) (0,45 mmol) sont mis à réagir dans 10 mL d'une solution aqueuse de TFA à 3%. Le rendement de la déprotection est quantitatif ; cependant, une légère hydrolyse de la chaîne glucidique est observée.

### 2.2.3 Synthèse des écorces greffées.

Afin de greffer les oligosaccharides précédemment synthétisés, les écorces brutes subissent au préalable une fonctionnalisation. Elle repose sur l'oxydation *periodique* de la fraction cellulosique des écorces faisant ainsi apparaître des fonctions aldéhydes.

#### 2.2.3.1 Obtention des écorces dialdéhydes : oxydation *periodique*.



(1)

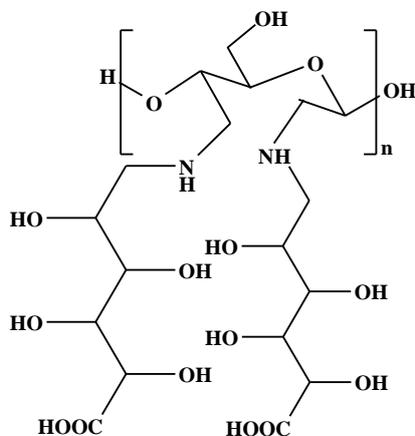
Six grammes d'écorces brutes sont suspendus dans 500 ml d'une solution aqueuse de *periodate* de sodium 0,0257 M. La réaction se déroule à l'obscurité afin de limiter la décomposition photochimique du *periodate* et en présence de propan-1-ol dans un rapport solution de *periodate* de sodium / propan-1-ol (9/1, v/v) afin de piéger les radicaux libres formés. Le mélange est placé sous agitation à température ambiante pendant 7 jours. A la fin de cette période, la réaction est arrêtée par ajout de 50 ml d'éthylène glycol. Les écorces oxydées sont ensuite lavées par 2 litres d'eau ultra-pure jusqu'au retour du pH de l'eau. Elles sont enfin séchées en étuve ventilée à 40 °C puis pesées pour obtenir la masse d'écorces-dialdéhydes.

#### 2.2.3.2 Greffage par amination réductrice : méthode générale.

4,5 g d'écorces-dialdéhydes sont placés au contact de 2079 ml d'une solution à 0,0257 M de molécules à greffer et de NaBH<sub>3</sub>CN. Les fonctions amine sont toujours apportées en excès par rapport aux fonctions aldéhyde afin de favoriser la réaction d'amination réductrice. C'est la raison pour laquelle un rapport molaire NH<sub>2</sub> / CHO égal à 2 pour des molécules monoamines est utilisé pour nos expériences. Le pH initial des solutions est ajusté<sup>188</sup> à pH 6,5 par de l'hydrogénocarbonate de soude afin d'assurer la sélectivité de l'ion cyanohydroborate vis à vis des fonctions imine. La réaction se déroule durant 5 jours à température ambiante et sous agitation. Les écorces ainsi dérivées sont rincées abondamment par l'eau ultra-pure jusqu'à retour au pH de l'eau. Les écorces sont enfin séchées en étuve ventilée à 40 °C puis pesées pour obtenir la masse d'écorces-molécules greffées.

Pour les différentes synthèses, les volumes et les masses sont ajustés en fonction des quantités à synthétiser, cependant les rapports ne changent pas.

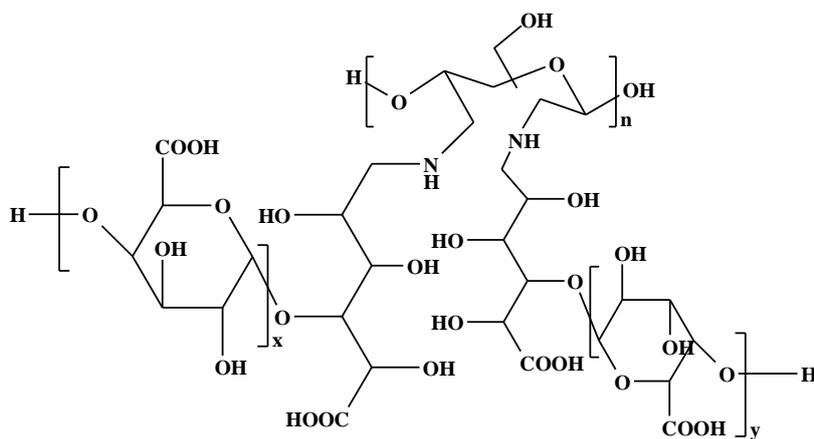
2.2.3.3 *Application à la synthèse d'écorces acide galacturonique.*



(17)

1,37 g d'écorces dialdéhydes (1) sont directement mis en contact avec la solution d'acide galacturonique aminé (12 a) afin d'obtenir les écorces-acide galacturonique.

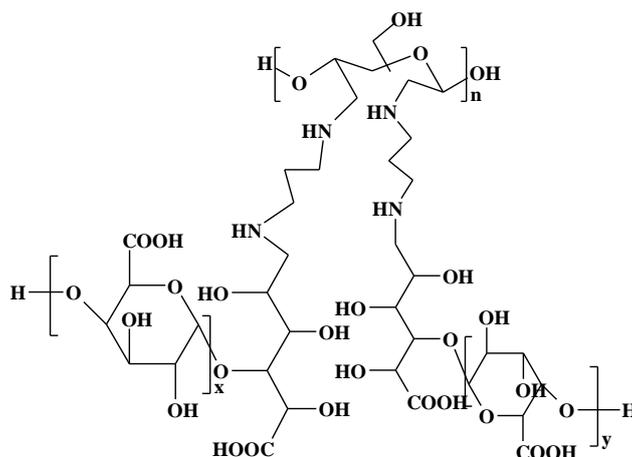
2.2.3.4 *Application à la synthèse d'écorces oligogalacturonates.*



(18)

0,5 g d'écorces dialdéhydes (1) sont directement mis en contact avec la solution d'oligogalacturonates aminés (12 b) afin d'obtenir les écorces-oligogalacturonates (18).

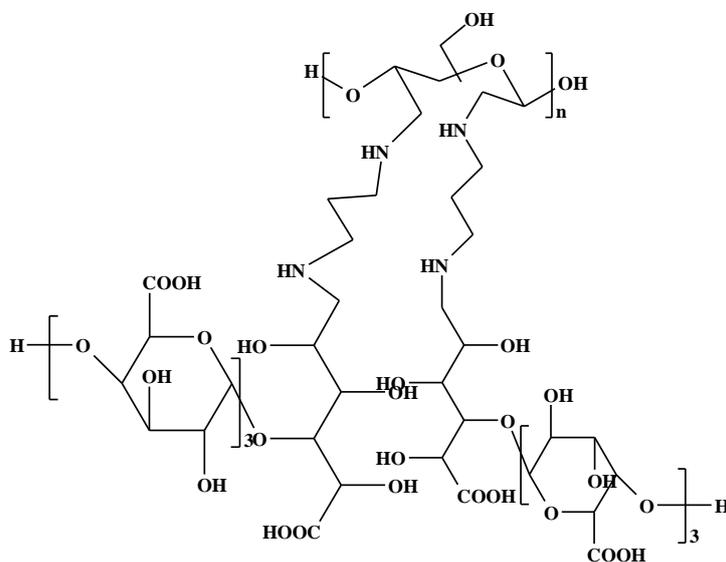
2.2.3.5 *Application à la synthèse d'écorces oligogalacturonates munis d'un bras espaceur.*



(19)

0,5 g d'écorces dialdéhydes (1) sont directement mis en contact avec la solution d'oligogalacturonates (13 d) afin d'obtenir les écorces-oligogalacturonates munis d'un bras espaceur (19).

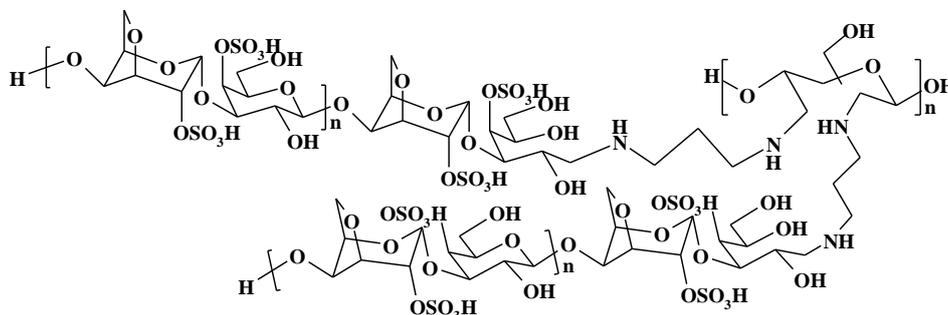
2.2.3.6 *Application à la synthèse d'écorces oligogalacturonates DP4 munis d'un bras espaceur.*



(20)

0,5 g d'écorces dialdéhydes (1) sont directement mis en contact avec la solution d'oligogalacturonates (14 d) afin d'obtenir les écorces-oligogalacturonates munis d'un bras espaceur DP4 (20).

2.2.3.7 *Application à la synthèse d'écorces oligocarraghénanes munis d'un bras espaceur.*

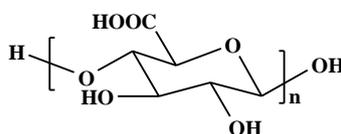


(21)

0,5 g d'écorces dialdéhydes (1) sont directement mis en contact avec la solution d'oligocarraghénanes munis d'un bras espaceur (16 d) afin d'obtenir les écorces-oligocarraghénanes munis d'un bras espaceur (21).

2.2.4 *Synthèse des écorces oxydées.*

2.2.4.1 *Oxydation directe des écorces brutes – Formation des écorces carboxyliques.*

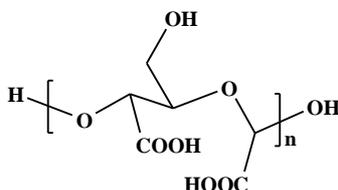


(7)

La méthode décrite dans la littérature<sup>189,190</sup> permettant d'oxyder la cellulose a été adaptée pour les écorces. Trois grammes d'écorces brutes sont suspendus dans 300 ml d'une solution aqueuse contenant 37 mg de TEMPO (0,24 mmol), 375 mg de bromure de sodium (3,63 mmol) et 5,64 mL d'hypochlorite de sodium (7,26 mmol). Le pH est ajusté et maintenu à 10 par ajout de soude à 0,1 M, lorsque le pH se stabilise, la solution est neutralisée par ajout d'acide chlorhydrique 0,1 M. Le mélange est alors maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 85 heures. Les écorces sont ensuite rincées par 1 L d'eau ultra pure puis séchées à l'étuve ventilée 40 °C avant d'être pesées afin d'obtenir le rendement massique de la réaction.

### 2.2.4.2 Oxydation des écorces dialdéhydes.

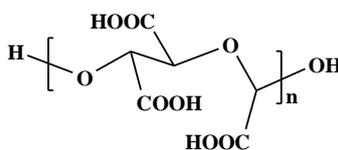
#### 2.2.4.2.1 Oxydation directe des écorces dialdéhydes - Formation des écorces dicarboxyliques.



(6)

1,5 g d'écorces dialdéhydes (1) sont mis en suspension sous agitation et à température ambiante, pendant 1 heure dans 600 ml d'une solution aqueuse de chlorite de sodium 0,2 M acidifiée à pH 3 par l'acide acétique concentré. Le chlorite de sodium est utilisé en excès dans un rapport stœchiométrique de 3,5. Ce rapport indique que la quantité molaire d'ions chlorite est 3,5 fois supérieure à celle théoriquement nécessaire à l'oxydation d'une mole de fonctions aldéhyde en fonctions carboxyle.<sup>191</sup> Les écorces oxydées sont ensuite lavées par l'eau ultra-pure jusqu'au retour d'une valeur de pH proche de celle de l'eau. Elles sont enfin séchées en étuve ventilée à 40 °C puis pesées pour obtenir la masse d'écorces-carboxyliques.

#### 2.2.4.2.2 Formation des écorces tricarboxyliques.



(2-5)

✓ A partir des écorces dicarboxyliques.

#### Obtention des écorces (5)

3 g d'écorces dicarboxyliques (6) sont suspendus dans 300 ml d'une solution aqueuse contenant 37 mg de TEMPO (0,24 mmol), 375 mg de bromure de sodium (3,63 mmol) et (5,64 mL d'hypochlorite de sodium (7,26 mmol). Le pH est ajusté et maintenu à 10 par ajout de soude à 0.1 M, lorsque le pH se stabilise, la solution est neutralisée par ajout d'acide chlorhydrique 0,1 M. Le mélange est alors maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 85 heures. Les écorces sont ensuite rincées par 1 L d'eau ultra pure puis séchées à l'étuve ventilée 40 °C avant d'être pesées afin d'obtenir le rendement massique de la réaction.

✓ *A partir des écorces dialdéhydes.*

*Obtention des écorces (3) par NaOCl.*

4 g d'écorces dialdéhydes (1) sont suspendus dans 400 mL d'une solution contenant 31 mL d'hypochlorite de sodium (40 mmol). Le mélange est alors maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 85 heures. Les écorces sont ensuite rincées par 1,5 L d'eau ultra pure puis séchées à l'étuve ventilée 40 °C avant d'être pesées afin d'obtenir le rendement massique de la réaction.

*Obtention des écorces (2) par NaOCl / NaBr.*

4 g d'écorces dialdéhydes (1) sont suspendus dans 400 mL d'une solution contenant 31 mL d'hypochlorite de sodium (40 mmol) et 2,07 g de bromure de sodium (20,1 mmol). Le mélange est alors maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 85 heures. Les écorces sont ensuite rincées par 1,5 L d'eau ultra pure puis séchées à l'étuve ventilée 40 °C avant d'être pesées afin d'obtenir le rendement massique de la réaction.

*Obtention des écorces (4) ar NaOCl / NaBr / TEMPO.*

4 g d'écorces dialdéhydes (1) sont suspendus dans 400 mL d'une solution contenant 31 mL d'hypochlorite de sodium (40 mmol), 2,07 g de bromure de sodium (20,1 mmol) et 49 mg de TEMPO (0,31 mmol). Le pH est ajusté et maintenu à 10 par ajout de soude à 0,1 M, lorsque le pH se stabilise, la solution est neutralisée par ajout d'acide chlorhydrique 0,1 M. Le mélange est alors maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 85 heures. Les écorces sont ensuite rincées par 1,5 litres d'eau ultra pure puis séchées à l'étuve ventilée 40 °C avant d'être pesées afin d'obtenir le rendement massique de la réaction.

## 3 Protocoles et dispositifs expérimentaux.

### 3.1 Etude de l'adsorption des cations métalliques par les écorces.

#### 3.1.1 Dispositif expérimental.

Le dispositif expérimental employé dans ces travaux repose sur la technique du bain agité dans lequel 100 mg (ou 10 mg) d'écorces brutes ou traitées (ou d'écorces modifiées) sont placés dans 50 ml (ou 5 mL) d'une solution de cations métalliques de concentration connue pendant un temps déterminé, à la température de  $(22 \pm 2)$  °C. Le pH des solutions est ajusté à 5 par ajout d'acide nitrique 0,1 M. Les écorces sont séparées des solutions par filtration sur verre fritté (porosité 3), les concentrations en cations métalliques des filtrats sont déterminées par dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique et les résidus sont séchés à l'étuve ventilée. Les écorces chargées en métaux sont pour leur part séchées à l'étuve ventilée à 40 °C.

#### 3.1.2 Adsorption des ions $Pb^{2+}$ et $Cd^{2+}$ .

Les expériences de biosorption sont effectuées avec un rapport masse de biosorbant / volume de solution constant et égal à 10.

##### 3.1.2.1 *Adsorption sur les écorces brutes issues de scierie.*

Cent milligrammes d'écorces brutes sont suspendus au contact de 50 mL d'une solution de nitrate de plomb ou de cadmium de concentration initiale comprise entre 0 et 19,3  $m\acute{e}q.L^{-1}$  soit entre 0 et 2000 ppm pour le plomb et 0 et 1032 ppm pour le cadmium. Les suspensions sont maintenues sous agitation magnétique à température ambiante (ou à 7, 27 et 47 °C pour l'étude thermodynamique sur les écorces brutes durant 2 h. Les solutions sont ensuite séparées des écorces par filtration sur verre fritté (porosité n°3) et dosées par absorption atomique en flamme. Les écorces adsorbées sont pour leur part séchées à l'étuve ventilée 40 °C.

### 3.1.2.2 *Adsorption sur les écorces modifiées ou les écorces et bois issus de la culture sous serre.*

Compte tenu des masses de biosorbants disponibles, les quantités utilisées sur les écorces brutes de scieries ont été divisées par 10 afin de maintenir constant le rapport masse/volume. Les mêmes expériences que précédemment sont menées en mettant en suspension 10 mg de bois ou d'écorces brutes dans 5 mL de solution métallique.

## 3.2 **Etude de la phytoextraction du cadmium par le sapin de Douglas.**

### 3.2.1 **Mise en place et conduite de la culture.**

Les sapins de Douglas âgés de trois ans ont été repiqués au mois de novembre dans des pots contenant 6 L d'un mélange terreau horticole / sable, 75 / 25, v /v. Ils sont placés dans une serre où la température est maintenue hors-gel, sans éclairage artificiel et arrosés par de l'eau déminéralisée ; à l'issue d'une période d'adaptation de 2,5 mois, 4 lots homogènes sont effectués reposant sur les critères suivant : taille, diamètre du pivot, nombre de branches. Un lot constitue le témoin, les trois autres subissent un apport de solution aqueuse de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) conduisant à des concentrations en Cd de 25, 50 et 100  $\mu\text{M}$ . Les plants sont par la suite arrosés par de l'eau déminéralisée afin de maintenir le substrat de culture humide. La récolte est effectuée à l'automne suivant après 9 mois de culture.

### 3.2.2 **Caractérisation des sols.**

Afin de caractériser les substrats de sols utilisés pour les cultures des plants de sapin de Douglas, une série de 5 extractions a été réalisée :

- ✓ Par l'eau ultra pure.
- ✓ Par  $\text{CaCl}_2$ <sup>178</sup> à  $10^{-3}$  M.
- ✓ Par un mélange d'acide dit RHIZO A.<sup>179</sup>
- ✓ Par l'EDTA.<sup>180</sup>
- ✓ Par  $\text{HCl}$ <sup>181</sup> à 0,5 M.
- ✓ Par minéralisation micro-onde.

Chaque sol est préalablement séché à l'étuve ventilée (40 °C) jusqu'à obtenir une masse constante puis broyé et tamisé à une granulométrie inférieure à 2 mm.

#### 3.2.2.1 *Extraction par l'eau ultra pure.*

Dix grammes de sol sont introduits dans 25 mL d'eau ultra pure, la suspension est placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 5 h. Après filtration sur verre fritté (porosité 3), les filtrats sont centrifugés à 12500 rpm afin d'éliminer les dernières particules en suspension. La concentration en cadmium des surnageants est ensuite déterminée par SAA (mode four).

#### 3.2.2.2 *Extraction par CaCl<sub>2</sub>.*

Dix grammes de sol sont introduits dans 25 mL d'une solution aqueuse de CaCl<sub>2</sub> à 10 mM, la suspension est placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 3 h. Après filtration sur verre fritté (porosité 3), les filtrats sont centrifugés à 12500 rpm afin d'éliminer les dernières particules en suspension.

#### 3.2.2.3 *Extraction par le mélange RHIZO A.*

2 g de sol sont introduits dans 20 mL de solution de RHIZO A, la suspension est placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 16 h. Après filtration sur verre fritté (porosité 3), les filtrats sont centrifugés à 12500 rpm afin d'éliminer les dernières particules en suspension. Le RHIZO A est un mélange d'acide à 0,1 M composé d'acide acétique, acide lactique, acide citrique, d'acide malique, d'acide formique dans un ratio 4/2/1/1/1, c/c/c/c/c (soit 44,44 mM d'acide acétique, 22,22 mM d'acide lactique et 11,11 mM d'acides citrique, malique et formique).

#### 3.2.2.4 *Extraction par l'EDTA.*

2 g de sol sont introduits dans 20 mL de solution d'EDTA à 50 mM neutralisée par l'ajout d'ammoniaque, la suspension est placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1 h. Après filtration sur verre fritté (porosité 3), les filtrats sont centrifugés à 12500 rpm afin d'éliminer les dernières particules en suspension.

#### 3.2.2.5 *Extraction des cations fixés aux oxydes.*

2 g de sol sont introduits dans 200 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,5 M. La suspension est placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 h. Après filtration sur verre fritté (porosité 3), les filtrats sont centrifugés à 12500 rpm afin d'éliminer les dernières particules en suspension.

### 3.2.2.6 *Extraction préalable au dosage du cadmium total.*

0,5 g de sol est minéralisé suivant la méthode décrite au paragraphe (Dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique. Page 166).

### 3.2.3 **Récolte des sapins de Douglas.**

Lors des différentes récoltes de sapins de Douglas, chaque arbre est séparé de son substrat de culture puis les racines sont grossièrement rincées par de l'eau distillée afin d'éliminer les plus grosses particules de substrat. Puis, les arbres ont été découpés en séparant les différents organes et en tenant compte de l'âge de chaque partie. Ainsi, chaque arbre est fractionné en 20 échantillons différents (Figure 49). Après avoir séparé les pousses de la quatrième année (constituées de bourgeons, aiguilles et rameaux), trois autres zones de découpe correspondent aux trois premières années de croissance de l'arbre ; chaque zone est divisée en 5 compartiments : le bois (uniquement celui du tronc), les aiguilles, les rameaux, l'écorce et les bourgeons. Le pivot et les racines sont récoltés séparément ; ils sont mis en contact pendant 2 heures dans une solution d'EDTA 0,02 M <sup>192</sup> afin d'éliminer les cations adsorbés à la surface. Les 20 compartiments obtenus sont pesés (masse fraîche) et séchés à l'étuve ventilée 40 °C puis pesés afin d'obtenir leur masse sèche.

#### 3.2.3.1 *Extraction puis dosage du cadmium dans les échantillons végétaux.*

Pour chaque échantillon végétal, un broyage de la totalité du lot (broyeur centrifuge) puis un tamisage ( $\emptyset < 200 \mu\text{m}$ ) sont effectués afin d'obtenir un mélange homogène. Par la suite, 0,5 g de poudre végétale est minéralisé suivant la méthode décrite au paragraphe (Dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique. Page 166).

#### 3.2.3.2 *Extraction séquentielle des constituants pariétaux du bois et des écorces.*

Le procédé d'analyse chimique des constituants pariétaux des écorces et du bois des sapins de Douglas utilisés lors de notre étude repose sur l'extraction sélective et séquentielle des molécules caractéristiques qui les composent (Figure 72).

### 3.2.3.2.1 Principe général.

Afin de favoriser l'extractibilité des différents constituants, une granulométrie inférieure à 0,2 mm est utilisée pour la mise en place du fractionnement ; sur chaque échantillon de poudre végétale, 0,5 g est mis en jeu lors de la première étape. Les volumes des solutions lors des différentes étapes sont systématiquement de 200 mL.

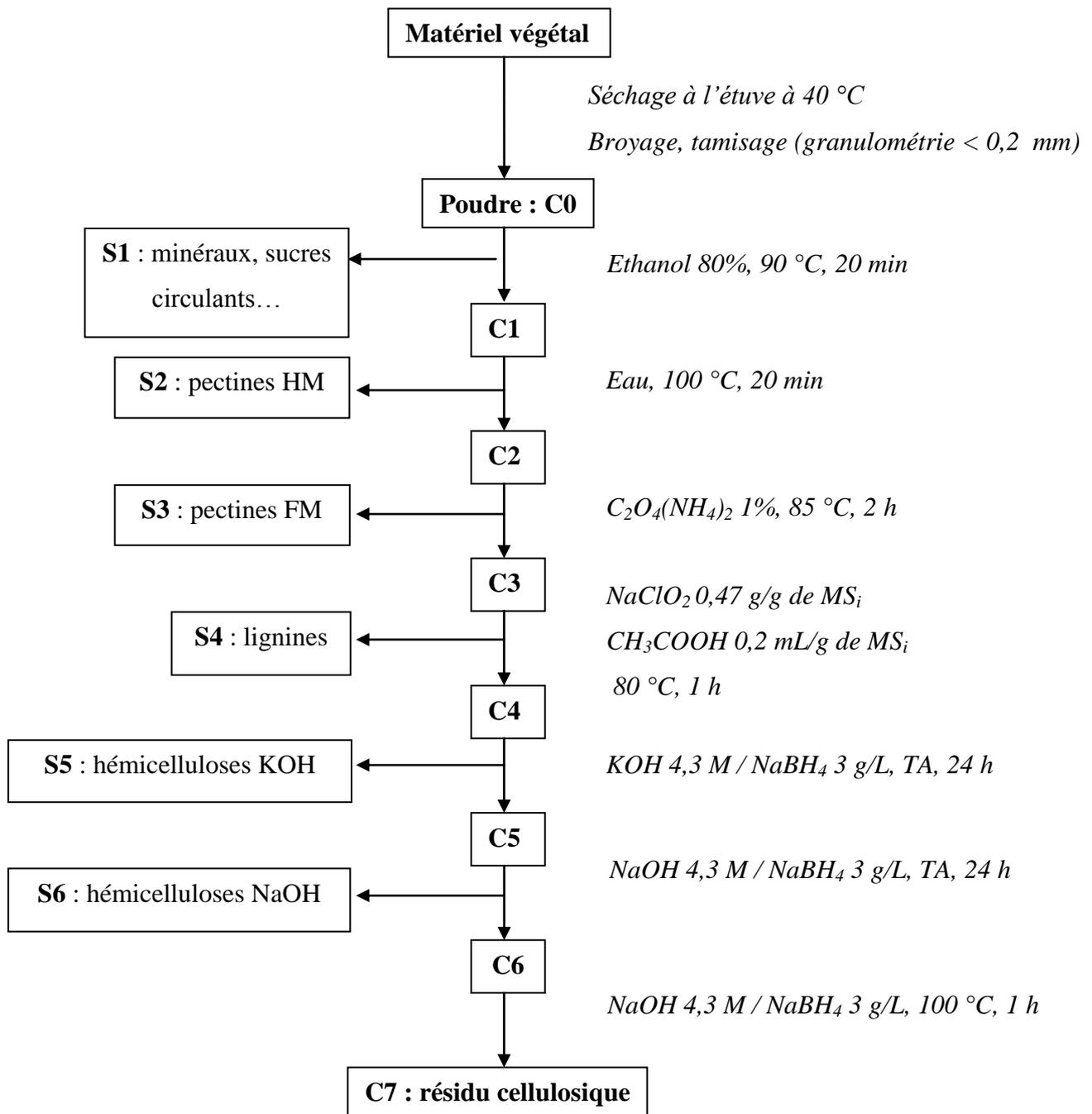


Figure 72 : Schéma de l'extraction séquentielle des constituants pariétaux des poudres végétales.

#### 3.2.3.2.2 *Extraction par l'éthanol à 80%.*

Le fractionnement débute par l'isolement des matières extractibles de la poudre (C0) par l'éthanol à 80%. Une quantité de 0,5 g de poudre (C0) est maintenue en suspension à 90 °C pendant 20 min. Le résidu C1 est récupéré par filtration sur verre fritté (porosité 3) puis rincé par 600 mL d'éthanol à 80%. Le filtrat (S0) est concentré sous pression réduite jusqu'à un volume de 50 mL puis séché par lyophilisation afin d'obtenir la masse de composés extractibles comme les composés minéraux, les sucres circulants, les tanins ...

#### 3.2.3.2.3 *Extraction des pectines.*

Les pectines sont extraites en deux étapes. D'une part, les pectines HM (hautement méthylestérifiées) (fraction S2) sont extraites à l'eau à 100 °C pendant 20 min. Après filtration sur verre fritté (porosité 3) et rinçage par 600 mL d'eau, cette étape conduit au résidu C2. D'autre part, ce dernier subit à son tour une extraction des pectines FM (faiblement méthylestérifiées) (fraction S3) par une solution d'oxalate d'ammonium à 1 % à 85 °C pendant 2 h. Après filtration sur verre fritté (porosité 3) et rinçage par 600 mL d'eau, cette étape conduit au résidu C3. Les filtrats sont pour leur part dialysés (seuil de coupure 6-8000 Da, membrane SpectraPor) contre de l'eau déminéralisée et pendant 48 h afin d'éliminer les sels résiduels puis concentrés sous pression réduite jusqu'à un volume de 50 mL. La masse sèche des fractions S2 et S3 est obtenue après lyophilisation de ces dernières.

#### 3.2.3.2.4 *Élimination des lignines.*

Le résidu C3 est délignifié par une solution de chlorite de sodium ( $0,047 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  de  $\text{MS}_i$ ) en milieu acide (0,2 mL d'acide acétique glacial par gramme de  $\text{MS}_i$ ), le mélange est porté à 80 °C pendant 1 h. Le résidu C4 est obtenu après élimination de la fraction S4 par filtration sur verre fritté (porosité 3) et rinçage par 600 mL d'eau.

#### 3.2.3.2.5 *Extraction des hémicelluloses.*

Après élimination des lignines, les hémicelluloses sont extraites du résidu C4 en deux étapes. D'une part, une extraction de 24 h à température ambiante par la potasse 4,3 M en présence de borohydrure de sodium ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ ) conduit après filtration sur verre fritté (porosité 3) et rinçage par 600 mL d'eau au résidu C5. Celui-ci subit la deuxième étape d'extraction par la soude 4,3 M en présence de borohydrure de sodium ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ ) pendant 24 h à température ambiante. Le résidu C6 est obtenu par filtration de la suspension sur verre fritté (porosité 3) puis rinçage par 600 mL d'eau.

Les filtrats sont neutralisés par l'ajout d'acide acétique puis dialysé contre de l'eau déminéralisée (seuil de coupure 6-8000 Da) pendant 48 h afin d'éliminer les sels résiduels. La masse sèche des fractions S5 et S6 est obtenue après lyophilisation de ces dernières.

#### 3.2.3.2.6 *Obtention du résidu cellulosique.*

Afin d'éliminer les dernières impuretés, la dernière étape d'extraction des hémicelluloses est effectuée une nouvelle fois à reflux pendant 1 h. Le résidu cellulosique est obtenu après filtration sur verre fritté (porosité 3) et rinçage par 600 mL d'eau puis lyophilisation.

## 4 Caractérisations et méthodes analytiques.

### 4.1 Méthodes quantitatives.

Afin d'obtenir une meilleure précision lors des différents dosages, les solutions de soude et de carbonate de sodium sont de qualité normadose et sont dosées par une solution d'acide chlorhydrique 0,05 M de qualité normadose.

#### 4.1.1 Dosage direct des fonctions aldéhyde des écorces par la réaction de Cannizzaro.

Cent milligrammes d'écorces fonctionnalisées sont mis en suspension dans 20 ml d'une solution de soude 0,1 M sous agitation à 70 °C pendant 15 minutes. Après 2 minutes de refroidissement dans l'eau froide, l'excès de soude est dosé par l'acide chlorhydrique 0,05 M, ce qui permet de déduire la quantité de soude consommée au cours de la réaction de Cannizzaro. Afin de mesurer l'acidité pouvant être naturellement générée par les écorces lors de la réaction de Cannizzaro, une expérience témoin est réalisée avec les écorces non oxydées. La quantité des fonctions aldéhyde [CHO] formées sur les écorces après oxydation *periodique* peut alors être déterminée par la relation suivante :

$$n_{\text{CHO}} = 2(V_0 - V_1)0.05/0.1$$

$$n_{\text{CHO}} = (V_0 - V_1)$$

avec :

$V_1$  = volume (ml) d'acide chlorhydrique versé pour neutraliser l'excès de soude (sur les écorces dialdéhydes);

$V_0$  = volume (ml) d'acide chlorhydrique versé pour neutraliser l'excès de soude (sur les écorces brutes);

$n_{\text{CHO}}$  = nombre de moles de fonctions aldéhyde formées par gramme d'écorce-dialdéhyde

#### 4.1.2 Caractérisation chimique des écorces par mesure de l'acidité selon la méthode de Boehm.

La mesure de l'acidité est effectuée selon la méthode de Boehm ; 50 mg d'écorces brutes ou modifiées sont mis en contact pendant 72 heures sous agitation avec 10 mL d'une solution à 0,1 N de l'une des trois bases suivantes :  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et  $\text{NaOH}$ . La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté (porosité 3) puis l'excès de solution basique est dosé en retour par une solution d' $\text{HCl}$  0,05 N. Il est à noter que la neutralisation des fonctions acides est effectuée pour les trois bases différentes sous atmosphère inerte (Azote) afin d'éviter une acidification des solutions par le  $\text{CO}_2$  de l'air.

De plus la mesure de l'acidité permet (par l'hydrogénocarbonate de sodium) d'estimer le degré de substitution (DS) des écorces greffées. Le DS est donné par la formule suivante :

$$\text{DS} = \frac{n_{\text{H}^+}(\text{écorces aminées}) - n_{\text{H}^+}(\text{écorces-NaBH}_3\text{CN})}{n_{\text{CHO}}} \times 100$$

Avec :

- $n_{\text{H}^+}$  (écorces aminées) : nombre de moles de protons dosés sur les écorces aminées.
- $n_{\text{H}^+}$  (écorces- $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) : nombre de moles de protons dosés sur les écorces ayant subi des conditions d'amination réductrice (sans amine).
- $n_{\text{CHO}}$  : nombre de moles d'aldéhyde présentes sur les écorces dialdéhydes
- DP : degré de polymérisation de l'oligosaccharide greffé.

#### 4.1.3 Dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique.

Les gammes d'étalonnage sont préparées à partir de solutions commerciales standardisées à 1000 ppm, les dilutions sont effectuées par des solutions d'acides nitrique et chlorhydrique de qualité Normapure permettant d'atteindre un pH proche de celui des échantillons à doser.

##### 4.1.3.1 *Lors d'adsorption : dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme.*

La quantité de cations métalliques adsorbés par les écorces ou par le bois est calculée par différence entre la quantité d'ions présents dans la solution mère et la quantité d'ions restant libres en solution à l'équilibre.

Les concentrations de cations métalliques ( $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ ) en solution sont estimées par dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme (Analyst 400, Perkin Elmer). La flamme est formée à partir d'un mélange oxy-acétylénique et atteint une température de 2100 °C.

L'appareil mesure une absorbance qui permet de doser le nombre de particules dans la flamme et par conséquent la concentration de l'élément suivant une formule proche de la loi de Beer-Lambert :

$$A = k.l.C$$

Avec : A : Absorbance ;

k : Coefficient d'absorption de l'élément à doser ;

l : Parcours optique dans le brûleur ;

C : Concentration de la solution en  $\text{mol.L}^{-1}$ .

Le dosage est réalisé à la longueur d'onde correspondant à la raie de résonance (la plus intense du spectre), et par conséquent implique d'utiliser une gamme d'étalonnage avec des concentrations en cations métalliques les plus faibles : le Tableau 32 recense les paramètres du dosage.

Tableau 32 : Paramètres utilisés pour le dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique à flamme.

Cation métallique	Gamme de concentration de l'ion (mg.L <sup>-1</sup> )	Longueur d'onde (nm)
Pb <sup>2+</sup>	0-15	283,60
Cd <sup>2+</sup>	0-3	228,80

La spectrométrie d'absorption atomique permet de doser les éléments métalliques en solution, c'est pourquoi, les différents compartiments des sapins de Douglas et les extractions effectuées sur le sol par des composés organiques doivent subir une minéralisation.

#### 4.1.3.2 Minéralisation des échantillons.

Les différents compartiments (0,5 g de solide ou 5 mL de solution) sont minéralisés selon le même protocole opératoire : chaque échantillon est mis à réagir avec 5 mL d'acide nitrique et 2 mL d'acide chlorhydrique dans un réacteur, puis placé au minéralisateur micro-ondes (Multiwave 3000, Perkin Elmer) pour subir un programme en quatre phases (Figure 73) :

- phase 1 : 200 W pendant 1 minute ;
- phase 2 : de 200 à 500 W en 15 minutes puis palier de 5 minutes ;
- phase 3 : de 500 W à 850 W en 10 minutes puis palier de 15 minutes ;
- phase 4 : 0 W pendant 15 minutes.

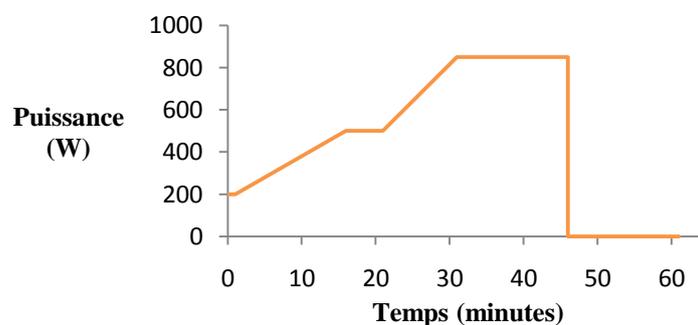


Figure 73 : Puissance appliquée aux échantillons en fonction du temps (minéralisation micro-onde).

Au cours de la minéralisation, la pression et la température maximales sont respectivement de 60 bars et de 260 °C. En fin de réaction, les minéralisats sont repris dans des fioles de 25 mL avec de l'eau ultra pure, puis la quantité de cadmium présent en solution est dosée par spectrophotomètre d'absorption atomique à four compte tenu des faibles concentrations.

#### 4.1.3.3 Dosage au spectromètre d'absorption atomique à four.

Les concentrations en  $\text{Cd}^{2+}$  en solution sont estimées par dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique à four (HGA 900, Perkin Elmer) équipé d'un passeur automatique (AS 800, Perkin Elmer). Le principe du dosage est le même que celui décrit pour le dosage à flamme, cependant les paramètres Tableau 33 sont différents.

Tableau 33 : Paramètres utilisés pour le dosage des cations métalliques par spectrométrie d'absorption atomique à four.

Cation métallique	Gamme de concentration de l'ion ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Longueur d'onde (nm)
$\text{Cd}^{2+}$	0-20	228,8

#### 4.1.4 Dosage des hydroxyles phénoliques totaux relargués au cours de l'adsorption par spectrophotométrie.

La teneur en groupements hydroxyles phénoliques totaux relargués au cours de l'adsorption est déterminée par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu proposée par Pereira<sup>193</sup> et modifiée par Piló-Veloso *et al.*<sup>194</sup> Cette méthode repose sur une réaction d'oxydo-réduction indépendante du degré de polymérisation des composés phénoliques. Ainsi elle implique tous les composés phénoliques sans différenciation entre l'acide gallique, les monomères, les dimères et les composés phénoliques les plus grands. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un réactif formé de phosphomolybdate et de phosphotungstate. Ces derniers sont réduits par réaction avec les composés phénoliques sous l'effet de la chaleur en milieu alcalin pour former un produit coloré bleu. La concentration de ce dérivé coloré est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 760 nm. Des solutions d'acide gallique de concentrations croissantes sont utilisées comme étalon.

Les hydroxyles totaux sont dosés dans les filtrats : 0,5 ml de filtrat ou de filtrat dilué est mélangé à 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois par de l'eau ultra-pure. Le mélange est aussitôt additionné de 2 ml d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 75

$\text{g.L}^{-1}$  puis placé au bain marie à 50 °C pendant 5 minutes avant d'être placé dans un bain d'eau froide. Les mesures d'absorbance sont effectuées au spectromètre UV visible (Shimadzu, PharmaSpec UV-1700) à 760 nm. Les concentrations en hydroxyles phénoliques totaux sont estimées par référence à une droite étalon d'acide gallique de concentrations comprises entre 20 et 100  $\text{g.L}^{-1}$ . Les résultats sont exprimés en équivalents massiques d'acide gallique.

#### 4.1.5 Analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

Le principe de cette méthode repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation des monosaccharides libérés.

##### 4.1.5.1 Préparation des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés.

Les monosaccharides neutres et les acides uroniques sont identifiés et analysés sous forme de méthylglycosides *O*-triméthylsilylés.<sup>195,196</sup> L'analyse est effectuée sur 200 à 500  $\mu\text{g}$  de polysaccharides, auxquels est ajouté un témoin interne, le méso-inositol (MI), à raison de 50% de la quantité de polysaccharide. Cette méthode a été adaptée à l'analyse de poudres d'origine végétale<sup>197</sup>, et peut être également utilisée pour l'étude de la composition monosaccharidique des résidus d'extraction.

##### 4.1.5.1.1 Méthanolyse.

Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides (Figure 74) par ajout de 1 mL de méthanol chlorhydrique 1 M à l'échantillon polysaccharidique anhydre. Après 24 h à 80 °C dans un tube scellé, la méthanolyse est stoppée par évaporation de l'hydrolysate sous un flux d'azote. Pour les fractions ( $S_i$ ) ou résidus ( $R_i$ ) d'extraction, la phase méthanolique est délipidée par trois lavages successifs à l'heptane (3 x 1 mL). Elle est à nouveau évaporée sous flux d'azote.

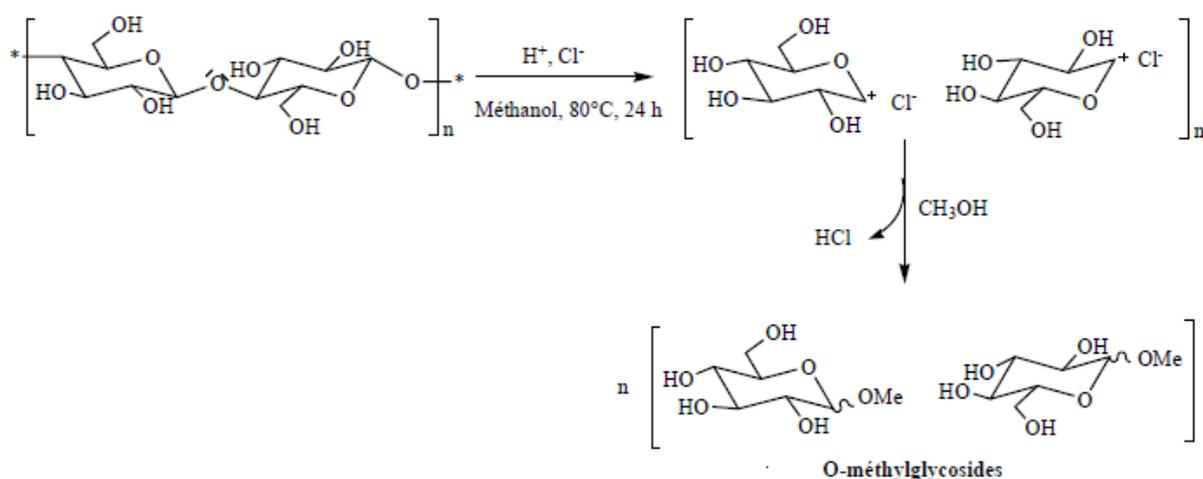


Figure 74 : Préparation de méthylglycosides selon la méthode proposée par Kamerling *et al.*<sup>195</sup>.

#### 4.1.5.1.2 Triméthysilylation.

Les méthylglycosides sont ensuite triméthylsilylés (Figure 75) par 100  $\mu L$  de BSTFA (N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide) à 1% de TMCS (triméthylchlorosilane) dans la pyridine (100  $\mu L$ ), à l'obscurité pendant 2 h, à  $27^\circ C$ . Ces échantillons sont maintenus à  $-22^\circ C$  pendant 24 h puis directement injectés en CPG.

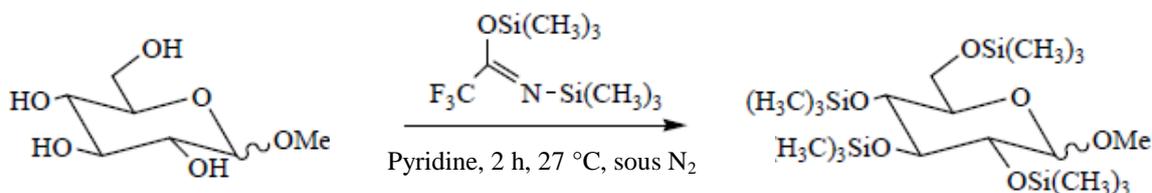


Figure 75 : Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides, d'après Kamerling *et al.*<sup>195</sup>

#### 4.1.5.2 Analyse des dérivés TMS en CPG.

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont identifiés par CPG, par comparaison avec des échantillons authentiques à l'aide d'un chromatographe Perichrom PR 2100 équipé d'une colonne capillaire (0,32 mm x 60 m) OPTIMA®-1-Accent 0,25  $\mu M$  (Macherey-Nagel) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ; le gaz vecteur est l'azote sous pression de 75 kPa. La température de l'injecteur est fixée à  $260^\circ C$ . L'élévation de la température du four est programmée de  $130$  à  $210^\circ C$  à raison de  $2^\circ C \cdot min^{-1}$ , avec un pallier de 5 min à  $190^\circ C$ , puis de  $210$  à  $260^\circ C$  à raison de  $5^\circ C \cdot min^{-1}$ . Le chromatographe est piloté par le logiciel Winilab III (Perichrom). Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics chromatographiques par les facteurs de correction.

#### 4.1.6 Evaluation du degré de méthylestérification des pectines S2 et S3.

Un dosage biochimique du méthanol est effectué après saponification sur les fractions pectiques extraites S2 et S3 des écorces des sapins de Douglas afin de déterminer le degré de méthylestérification des pectines. La teneur en méthanol est déterminée par spectrométrie UV-visible : le couplage du Purpald et du méthanal produit par oxydation enzymatique du méthanol conduit à la formation d'un composé violet dosé à 550 nm (Figure 76).

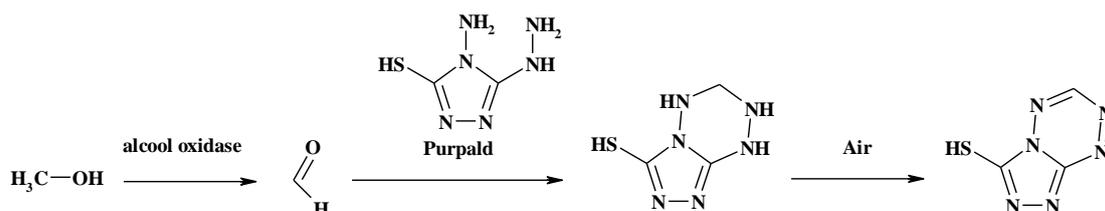


Figure 76 : Schéma réactionnel du dosage du méthanal.

La concentration en méthanol est estimée par référence à une droite étalon de méthanol (entre 0 et 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité molaire de méthanol par rapport à la quantité molaire d'acide galacturonique de l'extrait obtenu par CPG.

10 mg de Si sont introduits dans 1 mL de soude à 0,1 M afin de saponifier les fonctions ester. La suspension (après lyophilisation, une partie des pectines n'est plus soluble) est maintenue à 4 °C pendant 15 h. Après neutralisation de la soude en excès par ajout d'acide chlorhydrique, les particules en suspension sont éliminées par centrifugation (12000 g, 5 min, 4 °C). 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon (ou d'échantillon dilué) ou de gamme étalon sont additionnés de 90  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 200 mM, pH 7, puis de 10  $\mu\text{L}$  de solution enzymatique d'alcool oxydase fraîchement préparée dans le même tampon phosphate. Les échantillons sont agités puis incubés 10 min à 30 °C. Puis 200  $\mu\text{L}$  de Purpald à 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  fraîchement préparé dans de la soude à 0,5 M sont ajoutés. Les échantillons sont homogénéisés puis incubés 40 min à 30 °C. Enfin une étape de dilution des échantillons et de la gamme est effectuée en ajoutant 600  $\mu\text{L}$  d'eau. Après homogénéisation l'absorbance est lue au spectromètre UV-visible (Shimadzu, PharmaSpec UV-1700).

#### 4.1.7 Evaluation de la capacité d'échange cationique.

La CEC est évaluée selon une méthode colorimétrique<sup>198</sup> qui repose sur l'échange des cations présents dans le sol par la cobaltihexamine, cette dernière est dosée par spectrométrie UV-visible. Ainsi, 2 g de sol sec sont mis en suspension dans 40 mL d'une solution de  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}, \text{Cl}^-$  à 0,05 M et maintenus sous agitation magnétique pendant 1h. Après filtration sur verre fritté (porosité 3) puis centrifugation (12000 g, 15 min, T.A.), l'absorbance des surnageants est déterminée par UV-visible à 472 nm ; une gamme étalon de chlorure de cobaltihexamine (gamme 0, 0,05 M) permet le calcul de la concentration résiduelle en  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ . Cette dernière conduit à la valeur de la CEC.

### 4.2 Caractérisations.

#### 4.2.1 Analyse spectrale des écorces par spectrométrie infrarouge.

Les spectres IR des écorces brutes, traitées, modifiées et adsorbées sont réalisés sur des pastilles de 180 mg KBr contenant 2 % en masse d'écorces, à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer (spectrum 1000) à transformée de Fourier sur une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Analyse par spectrométrie de masse.

Les spectres de masse des oligosaccharides issus de l'hydrolyse acide, de l'hydrolyse enzymatique ou des modifications par amination réductrice ont été effectués au Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université de Nantes (UR 1268 INRA, Plate-forme : biopolymères, Interactions, Biologie Structurale). Les analyses de masse MALDI sont effectuées par un appareil M@LDI LR (Micromass / Waters) à polarité positive dont le laser émet dans l'ultra violet à 337 nm, la matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), la gamme de m/z est illimitée. Les analyses de masse ESI sont pour leur part effectuées par un appareil LCQ Advantage (Thermo Finnigan) à polarité positive ou négative dans une gamme de m/z de 0 à 2000.

#### 4.2.3 Analyse par spectroscopie de RMN.

Les analyses RMN ont été réalisées au service commun de RMN de l'Université de Limoges sur un appareil Bruker DPX-400 à une fréquence de 400,13 MHz pour le proton et 100,62 MHz pour le carbone 13. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm par rapport au triméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz.

### **4.3 Analyse statistique.**

Le traitement statistique des différentes données a été effectué à partir du logiciel libre PAST (PAleontological STatistics, <http://folk.uio.no/ohammer/past>) développé au départ pour la paléontologie mais utilisé depuis dans de nombreuses disciplines.

Les résultats ont été traités par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey (pour la comparaison de paires de moyennes) avec un seuil de confiance de 95 % ( $p < 0,05$ ).



## **Références bibliographiques**



- <sup>1</sup> **L. J. Kucera, L. Bergamin**, Structure fonction et propriétés physiques de l'écorce, *Dans : Guide des Ecorces*, Ed. Delchaux et Niestlé, Paris, 1993, pp. 15-32.
- <sup>2</sup> <http://www.sirtin.fr>
- <sup>3</sup> **D. Tolivia, J. Tolivia**, Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues, *Journal of microscopy*, 1987, 148, 113-117.
- <sup>4</sup> **D. M. Gibeaut N. C. Carpita**, Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *The FASEB Journal*, 1994, 8, 904-915.
- <sup>5</sup> **D. M. Gibeaut**, Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, 38, 69-80.
- <sup>6</sup> **R. A. Burton, D. M. Gibeaut, G. B. Fincher**, Functional analysis of polysaccharide synthases responsible for cell wall synthesis in higher plants, *Progress in Biotechnology*, 2001, 18, 77-84.
- <sup>7</sup> **O. Lerouxel, D. M. Cavalier, A. H. Liepman, K. Keegstra**, Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9, 621-630.
- <sup>8</sup> **P. Albersheim**, Concerning the structure and biosynthesis of the primary cell walls of plants. *Int. Rev. Chem. Biochem. Carbohydr.*, 1978, 16, 127-150.
- <sup>9</sup> **C. R. Somerville**, Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev Biol.*, 2006, 22, 53-78.
- <sup>10</sup> **M. Mc Cann, K. R. Roberts**, The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form, 1991, 126.
- <sup>11</sup> **J. Robinson, J.D. Keating, S.D. Mansfield, J.N. Saddler**, The fermentability of concentrated softwood-derived hemicelluloses fractions with and without supplemental cellulose hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33, 757-765.
- <sup>12</sup> **R. Alén**, Structure and chemical composition of wood, *Papermaking Science and Technology*, 2000, 3, 11-57.
- <sup>13</sup> **J. E. Winandy, J. J. Morrell**, Relationship between incipient decay, trength, and chemical composition of Douglas fir heartwood. *Wood and Fiber Science*. 1993, 25 (3), 278-288.
- <sup>14</sup> **C. Moine, P. Krausz, V. Chaleix, O. Sainte-Catherine, M. Kraemer, V. Gloaguen**, Structural Characterization and cytotoxic properties of a 4-O-Methylglucuronoxylan from *Castanea Sativa*. *Journal of Natural Products*, 2007, 70, 60-66.

- <sup>15</sup> **C. Moine**, Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois-Obtention de matériaux plastiques par modification des xylandes. *Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges*, 2005, 240 p.
- <sup>16</sup> **M. C. Jarvis**, Structure and properties of pectin gels in plant cell walls, *Plant. Cell. Environ.*, 1984, 7, 153-164.
- <sup>17</sup> **D. A. Powell, E. R. Moris, M. J. Gidley, D. A. Rees**, Conformations and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels, 1982 *Journal of Molecular Biology*, 155, 517-531.
- <sup>18</sup> **T. H. Schultz**, Determination of the degree of esterification of pectin, determination of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titration. *In Methods in carbohydrate chemistry*. NY:Academic Press, 1965.
- <sup>19</sup> **G. E. Anthon, D. M. Barrett**, Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food chemistry*. 2008, 110, 239-247.
- <sup>20</sup> **A. Fellah, P. Anjukandi, M. R. Waterland, M. A. K. Williams**, Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimization and comparison with theoretical calculation. *Carbohydrate polymers*, 2009, 78, 847-853.
- <sup>21</sup> **S. Pérez, M. A. Rodríguez-Carvajal, T. Doco**, A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II.A structure in quest of a function. *Biochimie*, 2003, 85, 109-121.
- <sup>22</sup> **C. Satge**, Etude de nouvelles stratégies de valorisation de mono et polysaccharides. *Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges*, 2002, 183 p.
- <sup>23</sup> **M. Metche, M. Girardin**, Les tanins végétaux. Les polymères végétaux. *Editions Monties, Bordas*, 1980, 252-287.
- <sup>24</sup> **Y. Kai**, Chemistry of extractives, *Wood and cellulosic chemistry*, 1991, 215-255.
- <sup>25</sup> **H. A. Stafford, H. H. Lester**, Procyanidins (condensed tannins) in green cell suspension cultures of Douglas fir compared with those in strawberry and avocado leaves by means of C18-reversed-phase chromatography, *Plant Physiology*, 1980, 66 (6), 1085-1090.
- <sup>26</sup> **G. D. Mc Ginnis, S. Parikh**, The chemical constituents of loblolly pine bark, *Wood Science*, 1975, 7 (4), 295-297.
- <sup>27</sup> **Y. P. Chang, R. L. Mitchell**, Chemical composition of common North American pulpwood barks, *Tappi*, 1955, 38 (5), 315-320.
- <sup>28</sup> **H. E. Young**, Preliminary estimates of bark percentages and chemical elements in complete trees of eight species in Main, *Forest Products Journal*, 1971, 21 (5), 56-59.

- <sup>29</sup> **D. Aderhold, C. J. Williams, G. G. J. Edyvean**, The removal of heavy-metal ions by seaweeds and their derivatives. *Bioresource Technology*, 1996, 58 (1), 1-6.
- <sup>30</sup> **N. Kongsricharoern, C. Polprasert**, Chromium removal by a bipolar electro-chemical precipitation process, *Water Science and Technology*, 1996, 34 (9), 109-116.
- <sup>31</sup> **S. S. Madaeni, Y. Mansourpanah**, COD removal from concentrated wastewater using membranes. *Filtration and Separation*, 2003, 40 (6), 40-46.
- <sup>32</sup> **G. Crini**, Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science*, 2005, 30(1), 38–70.
- <sup>33</sup> **E. Pehlivan, T. Altun, S. Parlayıcı**, Utilization of barley straws as biosorbents for Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> ions, *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164, 982-986.
- <sup>34</sup> **S. T. Akara, A. Gorgulu, B. Anilan, Z. Kaynak, T. Akara**, Investigation of the biosorption characteristics of lead(II) ions onto *Symphoricarpus albus*: batch and dynamic flow studies, *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 165, 126-133.
- <sup>35</sup> **K. K. Krishnani, X. Meng, C. Christodoulatos, V. M. Boddu**, Biosorption mechanism of nine different heavy metals onto biomatrix from rice husk, *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153, 1222-1234.
- <sup>36</sup> **E. Pehlivan, T. Altun, S. Cetin, M. I. Bhangar**, Lead sorption by waste biomass of hazelnut and almond shell, *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167, 1203-1208
- <sup>37</sup> **J. C. P. Vaghetti, E. C. Lima, B. Royer, B. M. da Cunha, N. F. Cardoso, J. L. Brasil, S. L. P. Dias**, Pecan nutshell as biosorbent to remove Cu(II), Mn(II) and Pb(II) from aqueous solutions, *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 162, 270-280.
- <sup>38</sup> **A. Sari, M. Tuzen**, Kinetic and equilibrium studies of biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution by macrofungus (*Amanita rubescens*) biomass, *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164, 1004-1011.
- <sup>39</sup> **K. Jayaram, I. Y. L. N. Murthy, H. Lalhrulaitluanga, M. N. V. Prasad**, Biosorption of lead from aqueous solution by seed powder of *Strychnos potatorum* L., *Colloids Surfaces*. 2009, B 71, 248-254.
- <sup>40</sup> **V. C. Taty-Costodes, H. Fauduet, C. Porte, A. Delacroix**, Removal of Cd(II) and Pb(II) ions, from aqueous solutions, by adsorption onto sawdust of *Pinus sylvestris*, *Journal of Hazardous Materials*, 2003, 105, 121-142.
- <sup>41</sup> **V. S. Munagapati, V. Yarramuthi, S. K. Nadavala, S. R. Alla, K. Abburi**, Biosorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) by *Acacia leucocephala* bark powder: Kinetics, equilibrium and thermodynamics. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 157, 357-365.

- <sup>42</sup> **R. Vimala, N. Das**, Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 168, 376-382.
- <sup>43</sup> **A. Saeed, M. W. Akhter, M. Iqbal**, Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using papaya wood as a new biosorbant, *Separation and Purification Technology*, 2005, 45, 25-31.
- <sup>44</sup> **E. Kurek, J. Czaban, J. Bollag**, Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents, *Applied Environmental Microbiology*, 1982, 43, 1011-1015.
- <sup>45</sup> **I. Y. E. Sherif, A. Ashmawy, S. Badr**, Biosorption of cadmium and nickel by Nile water algae, *Journal of Applied Science Research*, 2008, 4, 391-396.
- <sup>46</sup> **E. W. Shin, K.G. Karthikeyan, M. A. Tshabalala**, Adsorption mechanism of cadmium on juniper bark and wood. *Bioresource Technology*, 2007, 98, 588-594.
- <sup>47</sup> **S. Kocaoba**, Comparison of Amberlite IR 120 and dolomite's performances for removal of heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 147, 488-496.
- <sup>48</sup> **Z. Wu, Z. Gu, X. Wang, L. Evans, H. Guo**, Effects of organic acids on adsorption of lead onto montmorillonite, goethite and humic acid. *Environmental Pollution*, 2003, 121, 469-475
- <sup>49</sup> **A. Nawirska**, Binding of heavy metals to pomace fibers. *Food Chemistry*, 2005, 90, 395-400.
- <sup>50</sup> **J. L. Casterline, K. Yuoh**, Binding of zinc to apple fiber, wheat bran and fiber components. *Journal of Food Science*, 1993, 58, 365-368.
- <sup>51</sup> **C. H. Hwu, S. K. Tseng, C. Y. Yuan, Z. Kulik, G. Lettinga**, Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water research*, 1997, 32, 1571-1579.
- <sup>52</sup> **N. Ratola, C. Botelho, A. Alves**, Influence of metals on lindane adsorption onto pine bark. *Water, Air, and Soil Pollution*, 3, 2003, 181-188.
- <sup>53</sup> **A. O. Majolagbe, A. A. Paramole, H. O. Majolagbe, O. Oyewole, M. O. Sowemimo**, Concentration of heavy metals in tree barks as indicator of atmospheric pollution in Oyo Town, Southwest, Nigeria. *Archives of Applied Science Research*, 2010, 2(2), 170-178.
- <sup>54</sup> **Ministère de l'Écologie et du Développement Durable**, 2003. Principaux rejets industriels en France. Bilan de l'année, 2001.
- <sup>55</sup> **M. Khotimchenko, V. Kovalev, Y. Khotimchenko**, Equilibrium studies of sorption of lead(II) ions by different pectin compounds. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 149, 693-699.
- <sup>56</sup> **M. T. Kartel, L. A. Kupchik, B. K. Veisov**, Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions, *Chemosphere*, 1999, 38, 2591-2596.

- <sup>57</sup> **G. Tondi, C.W. Oo, A. Pizzi, A. Trosa, M. F. Thevenon**, Metal adsorption of tannin based rigid foams. *Industrial Crops and Products*. 2009, 29, 336–340.
- <sup>58</sup> **X. Guo, S. Zhang, X. Shan**, Adsorption of metal ions on lignin, *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 151, 134–142.
- <sup>59</sup> **G. Hu, S. Huang, H. Chen, F. Wang**, Binding of four heavy metals to hemicelluloses from rice bran. *Food Research International*, 2010, 43, 203-206.
- <sup>60</sup> **M. A. Al-Ghouti, J. Li, Y. Salamh, N. Al-Laqtah, G. Walker, M. N. M. Ahmad**, Adsorption mechanisms of removing heavy metals and dyes from aqueous solution using date pits solid adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176, 510-520.
- <sup>61</sup> **F. Martin-Dupont**, Valorisation chimique d'un produit de la filière bois, *Thèse de Doctorat Université de Technologie de Compiègne*, 2003, 156 p.
- <sup>62</sup> **R. G. Pearson**, Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases, *Journal of Chemical Education*, 1987, 64, 561-564.
- <sup>63</sup> **P. King, K. Anuradha, S. Beena Lahari, Y. Prasanna Kumar, V. S. R. K. Prasad**, Biosorption of zinc from aqueous solution using *Azadirachta indica* bark: Equilibrium and kinetic studies. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152, 324-329.
- <sup>64</sup> **J. M. Randall, R. L. Bermann, V. Garrett, A. C. Jr. Waiss**, Use of bark to remove heavy metal ions from waste solutions, *Forest Products Journal*, 1974, 24 (9), 81-84.
- <sup>65</sup> **N. Ratola, C. Bothelo, A. Alves**, Influence of metals on lindane adsorption onto pine bark, *Water, Air, and Soil Pollution*, 2003, 3, 181-188.
- <sup>66</sup> **F. Pagnanelli, S. Mainelli, S. De Angelis, L. Toro**, Biosorption of protons and heavy metals onto olive pomace: Modelling of competition effects, *Water Research*, 2005, 39, 1639-1651.
- <sup>67</sup> **P. Lodeiro, J.L. Barriada, R. Herrero, M.E. Sastre de Vicente**, The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: kinetic and equilibrium studies, *Environmental Pollution*, 2006, 142, 264-273.
- <sup>68</sup> **S. Brunauer, L. S. Deming, N. S. Deming, E. Teller**, *Journal of American Chemical Society*, 1940, 62, 1723.
- <sup>69</sup> **H. Freundlich**, Ueber die Adsorption in Loesungen. *Z. Phys. Chem.* 1907, 57, 385-470.
- <sup>70</sup> **I. Ghodbane, L. Nouri, O. Hamdaoui, M. Chiha**, Kinetic and equilibrium study for the sorption of cadmium (II) ions from aqueous phase by eucalyptus bark. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152, 148-158.

- <sup>71</sup> **A. Gundogdu, D. Ozdes, C. Duran, V. Numan Bulut, M. Soylak, H. Basri Senturk**, Biosorption of Pb(II) ions from aqueous solution by pine bark (*Pinus brutia* Ten.), *Chemical Engineering Journal*, 2009, 153, 62-69.
- <sup>72</sup> **L. Jossens, J. M. Prausnitz, W. Fritz, U. Schlunder, A. L. Myers**, Thermodynamics of multisolute adsorption from dilute aqueous solutions. *Chemical Engineering Science*, 1978, 33, 1097-1106.
- <sup>73</sup> **R. Sips**, On the structure of a catalyst surface. *Journal of Chemicals Physics*, 1948, 16 (5), 490-495.
- <sup>74</sup> **S. Brunauer, P. H. Emmet, E. Teller**, Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of American Chemical Society*, 1938, 60, 309-319.
- <sup>75</sup> **M. M. Dubinin, L. V. Radushkevich**, Equation of the characteristic curve of activated charcoal. *Chem. Zentr.* 1947, 1, 875.
- <sup>76</sup> **M. Venkata Subbaiah, Y. Vijaya, N. Siva Kumar, A. Subba Reddy, A. Krishnaiah**, Biosorption of nickel from aqueous solutions by *Acacia leucocephala* bark: Kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 74, 260-265.
- <sup>77</sup> **V. Sarin, T. S. Singh, K.K. Pant**, Thermodynamic and breakthrough column studies for theselective sorption of chromium from industrial effluent on activated eucalyptus bark, *Bioresource Technology*, 2006, 97, 1986-1993.
- <sup>78</sup> <http://taste.versailles.inra.fr>
- <sup>79</sup> **M. Puschenreiter W. W. Wenzel**, Rhizosphere processes involved in phytoremediation of contaminated soils. 2005, in *H.-K. Galazka, editor*. Current developments in remediation of contaminated lands, Pulawy, Poland.
- <sup>80</sup> **M. W. H. Evangelou, M. Ebel, A. Schaeffer**, Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 2007, 68, 989-1003.
- <sup>81</sup> **H. Y. Peng, X. E. Yang, L. Y. Jiang, Z. L. He**, Copper phytoavailability and uptake by *Elsholtzia splendens* from contaminated soil as affected by soil amendments. *Journal of Environmental Science and Health, A*, 2005, 40, 839-856.
- <sup>82</sup> **K. V. Karimanal, M.J. Hall**, Effect of temperature and flow on the volatilization of elemental lead and cadmium, *Hazardous waste and hazardous materials*, 1996, 13 (1) 63-71.
- <sup>83</sup> **C. W. N. Anderson, R. R. Brooks, A. Chiarucci, C. J. La Coste, M. Leblanc, B. H. Robinson, R. Simcock, R. B. Stewart**, Phytomining for nickel, thallium and gold, *Journal of Geochemical Exploration*, 1999, 67, 407-415.

- <sup>84</sup> **M. Mench, J. Vangronsveld, N. Lepp, P. Bleeker, A. Ruttens W. Geebelen**, Phytostabilisation of metal - contaminated sites. 2005, in *T. N. Springer, editor* 109-190. Phytoremediation of metal - contaminated soils. Echevarria G., Morel J. L., Goncharova N. (Eds), Trest, Czech Republic.
- <sup>85</sup> **M. H. Wong**, Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils, *Chemosphere*, 2003, 50, 775-780.
- <sup>86</sup> **G. M. Pierzynski**, Strategies for remediating trace - element contaminated sites. 1997, in *I. K. A. Iskandar, D.C., editor*, 67-84. Remediation of soils contaminated with metals. Science Reviews.
- <sup>87</sup> **C. D. Tsadilas**, Soil pH effect on the distribution of heavy metals among soil fractions. 2001, in *I. K. Iskandar, editor*, 107-120 Environmental restoration of metals - contaminated soils. Lewis publishers.
- <sup>88</sup> **H. Dahmani-muller, F. Van Oort, B. Gelie, M. Balabane**, Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, 1999, 109, 1-8.
- <sup>89</sup> **D. E. Salt, R. C. Prince, I. J. Pickering, I. Raskin**, Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard, *Plant Physiology*, 1995, 109, 1427-1433.
- <sup>90</sup> **A. J. M. Baker, R. R. Brooks**, Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1989, 1, 81-126.
- <sup>91</sup> **R. M. Welch, W. A. Norvell**, Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. 1999, In: *McLaughlin MJ, Singh BR, eds.* 125-150, Cadmium in soils and plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- <sup>92</sup> **M. L. Guerinot**, The ZIP family of metal transporters, 2000, *Biochimica Biophysica Acta*. 1465, 190-198.
- <sup>93</sup> **S. Thomine, R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford, J. I. Schroeder**, Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97, 4991-4996.
- <sup>94</sup> **M. Greger**, Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. 2004, In: *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems (2<sup>nd</sup> ED)*, 1-27, Prasad M. N. V., Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg.
- <sup>95</sup> **F. Van Assche, H. Clijsters**, Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, 1990, 13, 195-206.

- <sup>96</sup> **J. Vangronsveld, H. Clijsters**, Toxic effects of metals. 1994, In: *Plants and the Chemical elements*. Ed. M. Farago. 149-177, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- <sup>97</sup> **W. H. O. Ernst, J. A. C. Verkleij, H. Schat**, Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* 1992, 41, 229-248.
- <sup>98</sup> **K. Smeets, A. Cuypers, A. Lambrechts, B. Semane, P. Hoet, A. Van Laere, J. Vangronsveld**, Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43, 437-444.
- <sup>99</sup> **F. Van Breusegem, J. F. Dat**, Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant physiology*, 2006, 141, 384-390.
- <sup>100</sup> **S. Cheng**, Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science Pollution research*, 2003, 10, 256-264.
- <sup>101</sup> **S. R. Devi, M. N. V. Prasad**, Membrane lipid alteration in heavy metal exposed plant. In: *Heavy metal stress in plants: From molecule to ecosystems* (2<sup>nd</sup> Ed.) Prasad M. N. V., Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg, 2004, 127-145.
- <sup>102</sup> **H. S. Abreu, M. A. Maria, J. L. Reis**, Dual oxidation ways toward lignin evolution. *Florestae Ambiente*, 2001, 8, 207-210.
- <sup>103</sup> **L. Santina di Toppi, R. Gabrielli**, Response to Cadmium in higher plants. *Environmental Experimental Botany*, 1999, 41, 105-130.
- <sup>104</sup> **K. E. Hammond-Kosack, J. D. G. Jones**, Resistance gene dependant plant defense responses, *Plant cell*, 1996, 8, 1773-1791.
- <sup>105</sup> **E. Grill, E. L. Winnacker, M. H. Zenk**, Phytochelatins: the principal heavy- metal complexing peptides of higher plants, *Science*, 1985, 230, 674-676.
- <sup>106</sup> **N. Verbruggen, C. Hermas, H. S. Chat**, Mechanism to cope with arsenic and cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12, 364-372.
- <sup>107</sup> **C. Moussavou**, Etude des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsis thaliana* (écotype *Wassilewskija*) et chez le mélèze hybride (*Larix x eurolepis*) par des approches moléculaire et développementale. *Thèse de doctorat de l'Université de Limoges*, 2010, 221 p.
- <sup>108</sup> **D. Gonzalez-Mendoza, A. Q. Moreno, O. Zapata-Perez**, Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquatic Toxicology*, 2007, 83 (4), 306-314.
- <sup>109</sup> **D. L. Callahan, A. J. M. Baker S. D. Kolev, A. G. Weed**, Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *The Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2006, 40, 405-412.

- <sup>110</sup> **J. L. Hall**, Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 366, 1-11.
- <sup>111</sup> **L. Sanita di Toppi, R. Gabbrielli**, Response to cadmium in higher plants. *Environmental Experimental Botany*, 1999, 41, 105-130.
- <sup>112</sup> **S. Thomine**, Les outils de la génomique au secours de l'étude des transporteurs de métaux : exemple de la famille des gènes NRAMP chez *Arabidopsis*, *Ecole thématique Biologie végétale*, 2001, 7 p.
- <sup>113</sup> **R. L. Qiu, X. Zhao, Y. T. Tang, F. M. Yu, P. J. Hu**, Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyperaccumulator, *Arabis paniculata* F., *Chemosphere*, 2008, 74, 6-12.
- <sup>114</sup> **J. F. Gonçalves, F. G. Antes, J. Maldaner, L. B. Pereira, L. A. Tabaldi, R. Rauber, L. V. Rossato, D. A. Bisognin, V. L. Dressler, E. M. Flores, F. T. Nicoloso**, Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47 (9), 814-821.
- <sup>115</sup> **N. M. Dickinson**, Metal resistance in trees, in *Heavy Metals and Trees*, Glimmerveen, I., Ed., Institute of Chartered Foresters (ICF), Edinburgh, 1996, 85.
- <sup>116</sup> **A. P. Turner, N. M. Dickinson**, Survival of *Acer pseudoplatanus* L. (sycamore) seedlings on metalliferous soils, *New Phytologist*, 123, 509, 1993.
- <sup>117</sup> **C. Schadel, A. Blochl, A. Richter, G. Hoch**, Short-term dynamics of nonstructural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break. *Tree Physiology*, 2009, 29, 901-911.
- <sup>118</sup> **S. Renault, J. J. Zwiazek**, Cell wall composition and elasticity of dormant and growing white spruce (*Picea glauca*) seedlings, *Plant Physiology*, 1997, 101, 323-327.
- <sup>119</sup> **K. Stobrawa, G. Lorenc-Plucińska**, Changes in carbohydrate metabolism in fine roots of the native European black poplar (*Populus nigra* L.) in a heavy-metal-polluted environment. *Science of the Total Environment*, 2007, 373, 157-165.
- <sup>120</sup> **A. G. L. Assunção, H. Schat, M. G. M. Aarts**, *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study hyperaccumulation in plants, *New Phytologist*, 2003, 59, 351-360.
- <sup>121</sup> **M. Weber, E. Harada C. Vess, E. Roepenack-Lahaye, S. Clemens**, Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors, *The Plant Journal*, 2004, 13 (37), 269-281.

- <sup>122</sup> **S. H. Wei, Q. X. Zhou, X. Wang, K. S. Zhang, G. Guo**, A new Cd hyperaccumulator-*solanum nigrum* L., *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49, 2568-2573.
- <sup>123</sup> **R. Unterbrunner, M. Puschenreiter, P. Sommer, G. Wieshammer, P. Tlustos, M. Zupan, W.W. Wenzel**, Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe, *Environmental Pollution*, 2007, 148, 107-114
- <sup>124</sup> **M. Greger, T. Landberg**, Use of willows in phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation*, 1999, 1, 115-123.
- <sup>125</sup> **E. Klang-Westin, J. Eriksson**, Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant Soil*, 2003, 249, 127-137.
- <sup>126</sup> **W. Rosselli, C. Keller, K. Boschi**, Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil*, 2003, 256, 265-272.
- <sup>127</sup> **A. H. Hawari, C. N. Mulliga**, Biosorption of lead (II), cadmium (II), copper (II) and nickel(II) by anaerobic granular biomass. *Bioresource. Technology*, 2006, 97, 692-700.
- <sup>128</sup> **L. V. A. Gurgel, O. K. Junior, R. P. F. Gil, L. F. Gil**, Adsorption of Cu(II), Cd(II), and Pb(II) from aqueous single metal solutions by cellulose and mercerized cellulose chemically modified with succinic anhydride. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 3077-3083.
- <sup>129</sup> **M. Ozacar, C. Soykan, I. A. Sengil**, Studies on Synthesis, Characterization, and Metal Adsorption of Mimosa and Valonia Tannin Resins. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 102, 786-797.
- <sup>130</sup> **I. A. Sengil, M. Ozacar**, Competitive biosorption of  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  ions from aqueous solutions onto valonia tannin resin. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 166, 1488-1494.
- <sup>131</sup> **Y. N. Mata, M. L. Blázquez, A. Ballester, F. González, J. A. Munoz**, Sugar-beet pulp pectin gels as biosorbent for heavy metals: Preparation and determination of biosorption and desorption characteristics. *Chemical Engineering Journal*, 2009, 150, 289-301.
- <sup>132</sup> **M. N. M. Ibrahim1 W. S. W. Ngah1 M. S. Norliyan1 W. R. W. Daud**, Copper(II) Biosorption on Soda Lignin From Oil Palm Empty Fruit Bunches (EFB). *Clean*, 2009, 37 (1), 80-85.
- <sup>133</sup> **D. W. O'Connell, C. Birkinshaw, T. F. O'Dwyer**, Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (15), 6709-6724.
- <sup>134</sup> **G. Palma, J. Freer, J. Baeza**, Removal of metal ions by modified *Pinus radiata* bark and tannins from water solutions. *Water Research*, 2003, 37, 4974-4980.

- <sup>135</sup> **M. E. Argun, S. Dursun, M. Karatas**, Removal of Cd(II), Pb(II), Cu(II) and Ni(II) from water using modified pine bark. *Desalination*, 2009, 249, 519-527.
- <sup>136</sup> **V. Marchetti, A. Clément, P. Gérardin, B. Loubinoux**, Synthesis and use of esterified sawdusts bearing carboxyl group for removal of cadmium(II) from water, *Wood Science and Technology*, 2000, 34, 167-173.
- <sup>137</sup> **Z. Xuan, Y. Tang, X. Li, Y. Liu, F. Luo**, Study on the equilibrium, kinetics and isotherm of biosorption of lead ions onto pretreated chemically modified orange peel. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 31, 160-164.
- <sup>138</sup> **F. Martin-Dupont, V. Gloaguen, R. Granet, M. Guilloton, P. Krausz**, Chemical modifications of Douglas fir bark, a lignocellulosic by-product - enhancement of their lead(II) binding capacities. *Separation Science and Technology*, 2004, 39 (7), 1595-1610.
- <sup>139</sup> **E. W. Shin, R. M. Rowell**, Cadmium ion sorption onto lignocellulosic biosorbant modified by sulfonation: the origin of sorption capacity improvement. *Chemosphere*, 2005, 60, 1054-1061.
- <sup>140</sup> **G. Tana, H. Yuana, Y. Liub, D. Xiao**, Removal of lead from aqueous solution with native and chemically modified corncobs. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 174, 740-745.
- <sup>141</sup> **D. Harikishore Kumar Reddy, Y. Harinath, K. Seshaiha, A.V.R. Reddy**, Biosorption of Pb(II) from aqueous solutions using chemically modified *Moringa oleifera* tree leaves, *Chemical Engineering Journal*, 2010, 162, 626-634.
- <sup>142</sup> **A. Kapoor, T. Viraraghavan**, Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: effect of pretreatment, *Bioresource Technology*, 1998, 63, 109-113.
- <sup>143</sup> **G. Yan, T. Viraraghavan**, Effect of pretreatment on the bioadsorption of heavy metals on *Mucor rouxii*, *Water*, 2000, 26, 119-123.
- <sup>144</sup> **E. Neyens, J. Baeyens**, A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique, *Journal of Hazardous Materials*, 2003, B98, 33-50.
- <sup>145</sup> **A. Mustranta, L. Viikari**, Dewatering of activated sludge by an oxidative treatment, *Water Science and Technology*, 1993, 28 (1), 213-221.
- <sup>146</sup> **M. E. Argun, S. Dursun**, A new approach to modification of natural adsorbent for heavy metal adsorption. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 2516-2527.
- <sup>147</sup> **H. N. Bhatti, I. I. Bajwa, M. A. Hanif, I. H. Bukhari**, Removal of lead and cobalt using lignocellulosic fiber derived from *Citrus reticulata* waste biomass. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2002, 27 (1), 218-227.

- <sup>148</sup> **O. Joseph, M. Rouez, H. Metivier-Pignon, R. Bayard, E. Emmanuel, R. Gourdon,** Adsorption of heavy metals on to sugar cane bagasse: Improvement of adsorption capacities due to anaerobic degradation of the biosorbant. *Environmental Technology*, 2009, 30(13), 1371-1379.
- <sup>149</sup> **C. E. Gimba, M. Turoti, P. A Egwaikhide, E. E. Akporhonor,** Adsorption of indigo blue dye and some toxic metals by activated carbons from coconut shells. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 8 (11), 1194-1201.
- <sup>150</sup> **M. M. Rao, G.P.C. Rao, K. Seshaiyah, N.V. Choudary, M.C. Wang,** Activated carbon from *Ceiba pentandra* hulls, an agricultural waste, as an adsorbent in the removal of lead and zinc from aqueous solutions, *Waste Manage*, 2008, 28, 849-858.
- <sup>151</sup> **K. Srinivasan, N. Balasubramanian,** Removal of cadmium (II), mercury (II) and lead (II) by rice husk carbon. *Oriental Journal of Chemistry*, 2003, 19 (2), 287-292.
- <sup>152</sup> **D. Mohan, S. Chander,** Single component and multi-component adsorption of metal ions by activated carbons. *Colloids and Surfaces, A*, 2001, 177 (2-3), 183-196
- <sup>153</sup> **E. Pehlivan, T. Altun,** The study of various parameters affecting the ion exchange of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , and  $\text{Pb}^{2+}$  from aqueous solution on Dowex 50W synthetic resin. *Journal of Hazardous Materials*, 2006, B134, 149-156.
- <sup>154</sup> **E. M. Malla, M. B. Alvarez, D. A. Batistoni,** Evaluation of sorption and desorption characteristics of cadmium, lead and zinc on Amberlite IRC-718 iminodiacetate chelating ion exchanger. *Talanta*, 2002, 57, 277-287.
- <sup>155</sup> **N. Meunier, P. Drogui, C. Montané, R. Hausler, G. Mercier, J.F. Blais,** Comparison between electrocoagulation and chemical precipitation for metals removal from acidic soil leachate *Journal of Hazardous Materials*, 2006, 137, 581-590.
- <sup>156</sup> **A. Tor, T. Buyukerkek, Y. Cengeloglu, M. Ersoz,** Simultaneous recovery of Cr(III) and Cr(VI) from the aqueous phase with ion-exchange membranes. *Desalination*, 2005, 171, 233-241.
- <sup>157</sup> **D. L. Bishop, N. J. Chatterton, P. A. Harrison, R. D. Hatfield,** Changes in carbohydrate coordinated partitioning and cell wall remodeling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, 61 (1), 53-63.
- <sup>158</sup> **M. A. Pombo, M. C. Dotto, G. A. Martínez, P. M. Civello,** UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation, *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 51 (2), 141-148.

- <sup>159</sup> **H. Zhong, A. Läuchli**, Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44, 773-778.
- <sup>160</sup> **J. Mustard, S. Renault**, Effect of NaCl on water relations and cell wall elasticity and composition of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2004, 121, 265-271.
- <sup>161</sup> **H. L. Van, S. Kuraishi, N. Sakurai**, Aluminium induced rapid root inhibition and changes in cell wall components of squash seedlings. *Plant Physiology*, 1994, 106, 971-976.
- <sup>162</sup> **A. Tabuchi, H. Matsumoto**, Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminium-induced growth inhibition. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2001, 112, 353-358.
- <sup>163</sup> **A. K. M. Z. Hossain, H. Koyama, T. Hara**, Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminium stress. *Journal of plant physiology*, 2006, 163, 39-47.
- <sup>164</sup> **A. Muschitz**, Réponses physiologiques des végétaux supérieurs aux stress métalliques. Caractérisation du rôle des parois cellulaires dans les stratégies défensives des cellules de tomates (*Solanum lycopersicum L.*) face aux éléments traces métalliques, *Thèse de doctorat de l'Université d'Artois*, 2009, 189 p.
- <sup>165</sup> **M. Aoyama, K. Seki, S. Honma, A. Kasai**, Adsorption of heavy metal ions by hardwood barks, *Cellulose Chemistry and Technology*, 1993, 27, 39-46.
- <sup>166</sup> **A.M. Deshkar, S. S. Bokade, S.S. Dara**, Modified *Hardwickia binata* bark for adsorption of mercury (II) from water, *Water Research*, 1990, 24 (8), 1011-1016.
- <sup>167</sup> **S. Lantenois, B. Prelot, J. M. Douillard, K. Szczodrowski, M. C. Charbonnel**, Flow microcalorimetry: Experimental development and application to adsorption of heavy metal cations on silica. *Applied Surface Science*, 2007, 253, 5807-5813.
- <sup>168</sup> **F. Martin-Dupont, V. Gloaguen, R. Granet, M. Guilloton, H. Morvan, P. Krausz**, Heavy metal adsorption by crude coniferous barks: a modelling study. *Journal of environmental science and health, A*, 2002, 37 (6), 1063-1073.
- <sup>169</sup> **A. J. Varma, V. B. Chavan**, A study of crystallinity changes in oxidized celluloses. *Polymer Degradation and Stability*, 1995, 49, 245-250.
- <sup>170</sup> **K. Pommerening, H. Rein, D. Bertram, R. Muller**, Estimation of dialdehyde groups in 2,3-dialdehyde bead-cellulose. *Carbohydrate Research*, 1992, 233, 219-223.

- <sup>171</sup> **C. Klein-Koerkamp, R. Granet, R. Zerrouki, N. Villandier, F. Jérôme, J. Barrault, P. Krausz**, Efficient oxidative modification of polysaccharides in water using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activated by iron sulfophthalocyanine. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78, 938-944.
- <sup>172</sup> **H. P. Boehm**, Chemical identification of surface groups. *Advances in catalysis and related subjects*. 1966, 16, 179-274.
- <sup>173</sup> **C. Astier, V. Chaleix, C. Faugeron, D. Ropartz, V. Gloaguen, P. Krausz**, Grafting of aminated oligogalacturonans onto Douglas fir barks. A new route for the enhancement of their lead (II) binding capacities. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 182, 279-285.
- <sup>174</sup> **M. Hricovini, S. Bystricky, A. Malovikova**, Conformation of (1-4)-linked  $\alpha$ -D-galacturono-di- and -tri-saccharides in solution analysed by n.m.r. measurements and theoretical calculations. *Carbohydrate Research*, 1991, 220, 23-31.
- <sup>175</sup> **C. Dardonville, C. Fernandez-Fernandez, S. L. Gibbons, G. J. Ryan, N. Jagerovic, A. M. Gabilondo, J. J. Meana, L. F. Callado**, Synthesis and pharmacological studies of new hybrid derivatives of fentanyl active at the I-opioid receptor and I<sub>2</sub>-imidazoline binding sites. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 2006, 14, 6570-6580.
- <sup>176</sup> **A. Muschitz, C. Faugeron, H. Morvan**, Response of cultured tomato cells subjected to excess zinc: Role of cell wall in zinc compartmentation, *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31 (6), 1197-1204.
- <sup>177</sup> **A. Martin, M. C. Nolin**, Etude pédologique du comté de Chambly, 1991, 2, Description et classification des series de sols, 144 p.
- <sup>178</sup> **I. Novozamsky, Th. M. Lexmond, V. J. G. Houba**, A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1993, 51, 47-58.
- <sup>179</sup> **M. H. Feng, X. Q. Shan, S. Z. Zhang, B. Wen**, Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere*, 2005, 59, 939-949.
- <sup>180</sup> **J. I. Wear, C. E. Evans**, Relationship of zinc uptake by corn and sorghum to soil zinc measured by three extractants. *Soil Science Society of America Proceedings*, 1968, 32, 543-546.
- <sup>181</sup> **S. N. Luoma, G. W. Bryan**, A statistical assessment of the form of trace metals in oxidized estuarine sediments employing chemical extracts. *Science of the Total Environment*, 1981, 17, 165-196.

- <sup>182</sup> **U. Zapusek, D. Lestan**, Fractionation, mobility and bio-accessibility of Cu, Zn, Cd, Pb and Ni in aged artificial soil mixtures, *Geoderma*, 2009, 154, 164-169.
- <sup>183</sup> **J. E. Winandy, J. J. Morrell**, Relationship between incipient decay, strength, and chemical composition of Douglas fir heartwood. *Wood and Fiber Science*. 1993, 25 (3), 278-288.
- <sup>184</sup> **X. E. Yang, X. X. Long, H. B. Ye, Z. E. He, D. V. Calvert, P. J. Stoffella**, Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii Hance*), *Plant and soil*, 2004, 259, 181-189.
- <sup>185</sup> **J-L. Decossas, P. Krausz, V. Gloaguen, L. Jauberty, C. Astier, A. Berland, A. Royer, I. Niort, V. Granger**, Procédé de traitement par oxydation d'un substrat pour l'adsorption de radionucléides, 2010, Brevet FR0957024.
- <sup>186</sup> **E. Byun, B. Hong, K. A. De Castro, M. Lim, H. Rhee**, One-Pot Reductive Mono-N-alkylation of Aniline and Nitroarene Derivatives Using Aldehydes. *The Journal of organic chemistry*, 2007, 72 (25), 9815-9817.
- <sup>187</sup> **S. Sato, T. Sakamoto, E. Miyazawa, Y. Kikugawa**, One-pot reductive amination of aldehydes and ketones with  $\alpha$ -picoline-borane in methanol, in water, and in neat conditions, *Tetrahedron*, 2004, 60 (36), 7899-7906.
- <sup>188</sup> **R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. Dupont Durst**, The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent, *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93 (12), 2897-2904.
- <sup>189</sup> **T. Saito, Y. Okita, T.T. Nge, J. Sugiyama, A. Isogai**, TEMPO-mediated oxidation of native cellulose: Microscopic analysis of fibrous fractions in the oxidized products, *Carbohydrate polymers*, 2006, 65, 435-440.
- <sup>190</sup> **C. Fraschini, M. R. Vignon**, Selective oxidation of primary alcohol groups of  $\beta$ -cyclodextrin mediated by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical (TEMPO), *Carbohydrate Research*, 2000, 328, 585-589.
- <sup>191</sup> **E. Maekawa, T. Koshijima**, Properties of 2,3-dicarboxy cellulose combined with various metallic ions, *Journal of Applied Polymer Science*, 1984, 29, 2289-2297.
- <sup>192</sup> **X.E. Yang, X.X. Long, W.Z. Ni, C.X. Fu**, *Sedum alfredii* H.: A new Zn hyperaccumulating plant first found in China, *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47, 1634-1637.
- <sup>193</sup> **H. Pereira**, Dosage des tanins du liège de *Quercus suber* L., *Anais Inst. Sup. Agronomia*. XL, 1981, 9-15.

- <sup>194</sup> **D. Piló-Veloso, E. A. do Nascimento, S. A. L. de Moraes**, Isolation and structural analysis of lignins, *Química Nova*, 1993, 16(5), 435-448.
- <sup>195</sup> **J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, J. F. G. Vliegthart, J. R. Clamp**, Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides, *Biochemical Journal*, 1975, 151 (3), 491-495.
- <sup>196</sup> **J. Montreuil, S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Spik, G. Strecker**, Glycoproteins. In: Chaplin M.F., Kennedy J.F., *Carbohydrate analysis, a practical approach*. IRL Press, Oxford, Washington DC, 1986, 143-204.
- <sup>197</sup> **F. Marga, V. Freyssac, H. Morvan**, Rapid gas liquid chromatography microanalysis of carbohydrates in woody plant tissues, *J. Trace and Microprobe Techniques*, 1995, 13 (4), 473-478.
- <sup>198</sup> **D. Aran, A. Maul, J. F. Masfaraud**, A spectrophotometric measurement of soil cation exchange capacity based on cobaltihexamine chloride absorbance, *Geoscience*, 2008, 340, 865-871.