



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

Faculté de génie
Département de génie civil

SYNTHÈSE DE BIOCATALYSEURS VERSATILES POUR L'ÉLIMINATION DE
POLLUANTS ÉMERGENTS DES EAUX USÉES.

Mémoire de maîtrise
Spécialité : génie civil

Imad Eddine TOUAHAR

Jury : Pr. Hubert CABANA (directeur)
Pr. Roland LEDUC
Pr. Mourad Ben AMOR (rapporteur)
Pr. Viviane YARGEAU

Je dédie ce travail à mes parents, sans lesquels il n'aurait jamais pu être réalisé pour des raisons évidentes, mais aussi parce qu'ils m'ont encouragé, m'ont accompagné tout le long malgré la distance en rendant mes brunchs du samedi des plus agréables. A mon père qui m'aura poussé à finaliser ma rédaction et dont le harcèlement aura porté ses fruits. A ma mère, qui m'aura toujours proposé son aide dans tous mes travaux depuis le plus jeune âge et qui bien que j'ai toujours décliné continue de me la proposer tout de même. A ma tante et sa petite famille qui sont de véritables rayons de soleil que j'ai rarement entrevus durant mon séjour sherbrookois. Je tiens aussi à dédier ce travail à mes amis Sherbrookois ou assimilés Sherbrookois, Damien, Djazia, Jamie, Elodie, Emilio, Raphaël, Sylvain et Wanis, qui ont rendu l'expérience et la vie à Sherbrooke des plus agréables. Et enfin mes amis Algérois, Azzedine, Bachir, Chakib, Fethi, Mehdi et Zahra tout simplement pour leur précieuse amitié.

RÉSUMÉ

L'émergence de nouveaux contaminants dans les eaux usées requiert le développement de nouvelles techniques. En effet, les traitements classiques des stations d'épuration des eaux usées laissent entrer dans les matrices environnementales de nombreux contaminants organiques de faibles concentrations tels que les produits pharmaceutiques.

Nous avons donc étudié l'élimination d'une variété de pharmaceutiques, représentatifs de leur classe, ou bien présentant une forte occurrence, ou encore des composés récalcitrants, parmi ces pharmaceutiques on retrouve des anti-inflammatoires non stéroïdiens (acétaminophène, naproxène, acide méfénamique, kétoprofène, indométacine, diclofénac), un stimulant (caféine) deux antibiotiques (ciprofloxacine et triméthoprime), un anticonvulsif et régulateur de l'humeur (carbamazépine), un anxiolytique (diazépam) et deux fibrates (fénofibrate et bézafibrate).

Parmi les techniques novatrices permettant de réaliser ce type d'élimination on retrouve certaines enzymes oxydatives qui sont capables de transformer de nombreux contaminants organiques que l'on retrouve dans les eaux usées. L'utilisation de trois enzymes de ce type, la laccase, la versatile peroxydase et la glucose oxydase, dans différentes combinaisons, a permis d'obtenir une élimination satisfaisante de la plupart des pharmaceutiques auxquels nous nous sommes intéressés, avec une efficacité optimale pour la combinaison des trois enzymes. Partant de ce constat, une combinaison plus stable de ces trois enzymes a été produite par une technique de co-aggrégation permettant de les insolubiliser tout en les regroupant par réticulation. Ceci facilite la réutilisation de ces biocatalyseurs, et augmente leur stabilité, ce qu'une caractérisation du biocatalyseur a permis de vérifier. Le biocatalyseur a alors pu être testé pour le traitement d'un cocktail des produits pharmaceutiques précédemment énoncés et a permis de réaliser une élimination de plus de 60 % de la plupart des composés dans des conditions qui ont été optimisées. Testé dans des eaux résiduaires urbaines prélevées à l'affluent de la station d'épuration de Magog (Québec), le biocatalyseur a permis une élimination de l'ordre de 25 % pour des concentrations très faibles (ppb) en acétaminophène.

Mots-clés : Laccase, versatile peroxydase, glucose oxydase, combi-CLEA, eaux usées, polluants émergents, produits pharmaceutiques, enzyme oxydative.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Hubert Cabana pour la confiance qu'il m'a accordée dans la réalisation de ce projet et ses conseils avisés dans la façon de mener ce travail. Je tiens aussi à remercier les Professeurs Roland Leduc, Mourad Ben Amor et Viviane Yargeau d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de me faire bénéficier de leurs expertises en sciences environnementales. Je remercie aussi le FQRNT dont le financement attribué à ce projet a permis de le mener à terme. Je tiens à adresser mes sincères remerciements à mes collègues dont l'assistance aura été hautement profitable, en l'occurrence, le Laboratoire de génie de l'environnement et plus spécifiquement, Lounès, Olivier, Thanina, Alex, Sidy, Serge, Sandrine, Eliane, Sebastian, Carolina, et Emeline, pour ne citer qu'eux.

TABLE DES MATIÈRES

1	Introduction.....	1
1.1	Produits pharmaceutiques parmi les contaminants d'intérêt émergents.....	2
1.1.1	Problématique des produits pharmaceutiques	2
1.1.2	Quelques classes de produits pharmaceutiques	3
A.	Anti-inflammatoires non stéroïdiens	4
B.	Antibiotiques	5
C.	Régulateurs de l'humeur et antiépileptiques	6
D.	Stimulants	7
E.	Hypolipémiants ou substances médicamenteuses hypolipémiantes.....	8
1.1.3	Effet cocktail	9
1.2	Objectifs.....	10
1.2.1	Objectif général	10
1.2.2	Objectifs spécifiques	11
1.3	Contributions originales.....	11
1.3.1	Innovations scientifiques	11
1.3.2	Valorisation des travaux	12
A.	Article	12
B.	Présentations orales	12
C.	Présentations par affiches	12
1.4	Structure du mémoire.....	12
2	Le traitement des eaux usées par voie enzymatique	15
2.1	Les enzymes ligninolytiques.....	15
2.1.1	Laccase	17

2.1.2	Peroxydases	18
A.	Lignine peroxydase	19
B.	Manganèse peroxydase	21
C.	Versatile peroxydase	21
2.1.3	Glucose oxydase.....	22
2.2	L'immobilisation enzymatique et la synthèse de biocatalyseurs	22
2.2.1	Immobilisation enzymatique	23
2.2.2	Encapsulation enzymatique.....	24
2.2.3	Agrégats d'enzymes réticulées.....	25
2.2.4	Combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées	25
2.3	L'élimination de contaminants émergents dans l'eau par les enzymes ligninolytiques	
	27	
2.3.1	Traitements par enzymes libres.....	28
2.3.2	Traitements par enzymes immobilisées	31
2.3.3	Traitements par enzymes insolubilisées.....	32
3	Caractérisation d'une combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées de laccase, de versatile peroxydase, et de glucose oxydase et son utilisation pour l'élimination de produits pharmaceutiques	35
3.1	Avant-propos	35
3.2	Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals	37
3.2.1	Abstract	37
3.2.2	Introduction	38
3.2.3	Material and Methods.....	42
A.	Enzymes and reagents	42
B.	Activity assays.....	42
C.	Preparation of Combi-CLEAs and activity yields	43

D.	Determination of kinetic parameters	43
E.	Determination of pH and temperature optima.....	44
F.	Stability of Combi-CLEAs against thermal denaturation	44
G.	Enzymatic treatment of pharmaceuticals in wastewaters	44
H.	Extraction of pharmaceuticals	45
3.2.4	Results and discussion.....	46
A.	Characterization of combi-CLEA.....	46
B.	Elimination of PhACs.....	50
3.2.5	Conclusions	60
3.2.6	Acknowledgements	61
4	Conclusion	63
	ANNEXE A – Removal of PhACs using LME - a literature review	67
	ANNEXE B – UPLC-MS/MS analysis of pharmaceutically active compounds	73
	Liste des références.....	75

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Structure de la molécule de lignine ([Arsenault, 2012])	15
Figure 2.2 Monomères primaires de la lignine ainsi que les sous-unités de la lignine correspondantes ([Wong, 2009])	16
Figure 2.3 Cycle catalytique de la laccase ([Wesenberg, 2003])	18
Figure 2.4 Cycle catalytique des peroxydases ([Wesenberg, 2003])	19
Figure 2.5 Cycle catalytique de LiP en présence de verartryl alcool ([Wong, 2009])	20
Figure 2.6 Représentation schématique de l'encapsulation et de deux techniques d'immobilisation enzymatique adaptée de [Jia <i>et al.</i> , 2014].....	24
Figure 2.7 Représentation de la formation d'un combi-CLEA de Lac, VP et GOD (adaptée de [Touahar <i>et al.</i> , 2014])	27
Figure 3.1 Effect of pH on catalytic activities a) laccase activity of the (●) combi-CLEA and (○) free Lac b) Mn-oxidizing activity of the (●) combi-CLEA and (○) free VP.....	48
Figure 3.2 Effect of temperature on catalytic activities, a) laccase activity of the (●) combi-CLEA and (○) free Lac b) Mn-oxidizing activity of the (●) combi-CLEA and (○) free VP.	49
Figure 3.3 Residual activity of Lac, combi-CLEA-Lac, VP and combi-CLEA-VP after 24h exposition to denaturing conditions pH 3 and 40 °C.....	50
Figure 3.4 Removal of PhACs using free Lac, VP and GOD (alone or in combination) in the presence/absence of glucose (0.7 mM), peroxide (0.1 mM) and manganese sulfate (7 mM) for a contact time of 14 h at room temperature and pH 5.....	52
Figure 3.5 Removal of PhACs using different amounts of combi-CLEA in presence of glucose (0.7 mM) and manganese sulfate (7 mM) after a contact time of 5 h at room temperature and pH 5.	55
Figure 3.6 Removal of PhACs using combi-CLEA in the presence/absence of glucose (0.7 mM), peroxide (0.1 mM) and manganese sulfate (7 mM) after a contact time of 5 h at room temperature and pH 5.	56
Figure 3.7 Effect of contact time on combi-CLEA efficiency in three different situations involving a) PhACs solution and glucose, b) PhACs solution, manganese sulfate and peroxide, c) PhACs solution, manganese sulfate and glucose, at room temperature and pH 5.	58

Figure 3.8 Removal of acetaminophen in real wastewater of Magog WWTP using combi
CLEA in presence and absence of both manganese and glucose.60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Apparent Michaelis-Menten parameters for free Lac, VP and combi-CLEA for the oxidation of their respective substrates at 20°C at pH 3 and 5 for Lac and Mn-oxidizing activities, respectively	47
Tableau 4.1 A comparison between the elimination of studied PhACs in litterature and the present study.....	67
Tableau 0.1 Analytical parameters used for the quantification of pharmaceutically active compounds.....	73

LISTE DES ACRONYMES

Acronyme	Définition
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
CE	Contaminant émergent
CLEA	<i>Cross-linked enzyme aggregate</i> , agrégat d'enzyme réticulée
Combi-CLEA	<i>Combined Cross-linked enzyme aggregate</i> , combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées
EDAC	<i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide hydrochloride
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide (oxidized)</i> , flavine adénine dinucléotide (oxydée)
FADH ₂	<i>Flavin adenine dinucleotide (reduced)</i> , flavine adénine dinucléotide (réduite)
GOD	<i>Glucose oxidase</i> , glucose oxydase
HOBt	Hydroxybenzotriazole
Lac	Laccase
LiP	<i>Lignin peroxidase</i> , lignine peroxydase
LME	<i>Lignin modifying enzyme</i> , enzyme ligninolytique
MnP	Manganese peroxidase, manganèse peroxydase
PhAC	<i>Pharmaceutically active compound</i> , produit à activité pharmaceutique
TrOC	<i>Trace Organic compound</i> , composé organique à l'état de trace
VA	Veratryl alcool

VAD	Vertaldéhyde
VP	<i>Versatile peroxidase</i> , versatile peroxydase
WRF	<i>White-rot fungi</i> , champignons responsables de la pourriture blanche sur le bois

1 Introduction

Le souci premier de la protection environnementale est la sauvegarde de la santé, humaine dans un premier temps, puis celle des écosystèmes en second lieu, mais cette dernière est intimement liée à la première. Or, excepté l'air, il n'existe aucune denrée dont l'impact sur la santé soit aussi global que l'eau. En tenant compte de ce constat, de nouveaux défis s'imposent à la filière du traitement des eaux et de la décontamination environnementale.

Actuellement, les méthodes de détection et d'analyse des contaminants dans les matrices environnementales se perfectionnent, et les études de toxicité et d'écotoxicité s'intéressent à des substances de plus en plus nombreuses et variées [Peysson et Vulliet, 2013; Celiz et al., 2009; Pomati et al., 2006]. Cela dit, de nouveaux contaminants, dits contaminants émergents (CE) ou contaminants d'intérêt émergent, ou encore composés organiques à l'état de trace (*trace organic compounds*; TrOC), sont décelés dans les eaux résiduaires et les cours d'eau qui les reçoivent [Verlicchi, et al., 2012] et leurs impacts sur l'environnement sont soit peu connus voire méconnus, ou bien montrent des signes inquiétants tels que la baisse de fécondité, stérilité et féminisation de poissons et autres espèces [Celiz et al., 2009; Ji et al., 2013]. Parmi ces divers composés, certains possèdent des propriétés communes, en l'occurrence, de faibles teneurs qui les rendent difficiles à traiter, une certaine persistance dans les matrices environnementales ainsi que des risques qui leur sont associés malgré leurs faibles teneurs [Celiz et al., 2009].

Un autre aspect à considérer est ce que l'on appelle l'effet cocktail et qui consiste en l'effet cumulé de ces substances en présence les unes des autres. Ces composés ne se comportent pas nécessairement, dans un mélange, de la même façon que s'ils étaient étudiés séparément, par le fait des différentes interactions pouvant avoir lieu entre ces substances dans des matrices environnementales [Pomati et al., 2008]. Face à cette nouvelle problématique de nouvelles techniques de traitement des eaux usées sont requises, car les techniques classiques ont montré de nombreuses limitations et semblent incapables d'y remédier efficacement [Verlicchi et al., 2012]. C'est ainsi que de plus en plus d'études s'intéressent à l'utilisation d'enzymes oxydatives telles que celles produites par les champignons responsables de la pourriture blanche sur le bois (*white-rot fungi*, WRF). Ces

enzymes ligninolytiques (*lignin modifying enzymes*, LME) par leur large spectre d'action et leurs hautes performances catalytiques, suscitent de l'intérêt pour le traitement de TrOC [Ammann *et al.*, 2013; Ba *et al.*, 2014; Cabana *et al.*, 2007a]. Parmi ces contaminants, il est important de s'intéresser à une catégorie omniprésente et diversifiée que l'on rencontre dans les matrices environnementales mais aussi dans divers lieux prodiguant des soins, en l'occurrence, les produits pharmaceutiques [Benotti *et al.*, 2009].

1.1 Produits pharmaceutiques parmi les contaminants d'intérêt émergents

1.1.1 Problématique des produits pharmaceutiques

Alors que la population canadienne, et les populations occidentales en général, connaissent une augmentation de la moyenne d'âge et un net vieillissement, la consommation de produits pharmaceutiques s'accroît donc par la même occasion [Anderson et Hussey, 2000]. En outre, la consommation de produits pharmaceutiques de manière générale représente un important volume, puisqu'en 2005 le marché mondial représentait plus de 600 milliards de dollars US [Chenxi *et al.*, 2008]. Cependant, une bonne partie de ces produits pharmaceutiques se retrouve dans les eaux usées, principalement par les rejets humains que sont les selles et les urines [Ratola *et al.*, 2012], mais aussi à travers les sécrétions animales qui contiennent souvent des antibiotiques [Kemper, 2008]. En effet, le métabolisme ne transforme pas l'intégralité du principe actif d'un médicament, ainsi, une bonne partie du médicament, ainsi que ses produits de métabolisation, se retrouve dans les eaux usées, à de très faibles teneurs, mais pour lesquelles ces substances restent actives et peuvent être métabolisées ou générer de nouveaux produits de transformation [Quintana *et al.*, 2005]. D'autres sources de contamination peuvent être citées, en l'occurrence les activités industrielles liées à leur production ainsi que les établissements hospitaliers. Ces produits se retrouvent donc dans les eaux usées à des concentrations variant de centaines de pg/L à des centaines de µg/L [Ratola *et al.*, 2012]. Ces eaux résiduaires sont ensuite acheminées vers les stations d'épuration (STEP), or, ces dernières sont généralement conçues pour dégrader de la matière organique présente à des teneurs plus élevées et de manière non spécifique. Par conséquent, elles sont moins efficaces pour l'élimination de ce

type de contaminants. Ces substances sont donc rejetées sans être suffisamment traitées à la sortie des STEPs dans les milieux récepteurs qui sont le plus souvent des cours d'eau naturels [Verlicchi *et al.*, 2012]. De plus, ces substances peuvent être métabolisées par l'humain ou l'animal qui les rejette, mais aussi par les microorganismes utilisés dans les traitements biologiques [Quintana *et al.*, 2005]. Une fois que ces substances entrent dans les matrices environnementales leur parcours devient difficile à prédire, en effet, elles peuvent passer dans différentes phases dépendamment de leurs propriétés physico-chimiques, elles peuvent aussi être métabolisées en d'autres substances pouvant être plus dangereuses pour l'environnement [Quintana *et al.*, 2005], comme elles peuvent s'accumuler dans les différentes chaînes trophiques et éventuellement remonter jusqu'au dernier maillon de la chaîne, l'homme [Focazio *et al.*, 2008]. La présence de produits pharmaceutiques parmi d'autres polluants émergents dans les eaux usées et les cours d'eau *in fine*, constitue donc un risque potentiel pour la santé humaine.

Les risques liés à ces différentes substances peuvent être associés à leur fonction première, c'est pourquoi il est intéressant d'étudier différentes classes thérapeutiques [Kümmerer, 2009c].

1.1.2 Quelques classes de produits pharmaceutiques

L'intérêt porté à certaines classes de produits pharmaceutiques est motivé par leur occurrence dans les matrices environnementales, essentiellement aquatiques ainsi que leur persistance et leurs effets connus sur les espèces qui y évoluent [Tran *et al.*, 2010]. La sélection des substances utilisées dans la présente étude s'est aussi basée sur leur réactivité envers les mécanismes d'oxydation enzymatique, ceci est détaillé dans la section 2.3.1 relative au traitement par enzymes libres. Dans les prochaines sections, ces substances sont mentionnées et une brève description de leurs classes thérapeutiques est introduite. Les teneurs dans des milieux aquatiques, de ces substances, ou d'autres produits appartenant à la même classe, sont citées ainsi que des valeurs de taux d'élimination dans des STEP, de même que certains effets néfastes pouvant leur être attribués pour des concentrations similaires à celles observées dans les matrices environnementales.

A. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Parmi les substances les plus communes et les plus utilisées, étant généralement en vente libre, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), possèdent généralement des propriétés analgésiques et antipyrétiques, leur mode d'action est souvent associé à l'inhibition d'enzymes cyclo-oxygénases qui interviennent dans la production des prostaglandines et thromboxanes qui sont des molécules à action hormonale [Sanjuan-Reyes *et al.*, 2013].

L'étude présente s'intéresse à l'acétaminophène (paracétamol), l'ibuprofène, le naproxène, le diclofénac, l'indométacine, le kétoprofène et l'acide méfénamique. On les retrouve dans des teneurs variables de l'ordre du ng/L, comme pour l'ibuprofène et le naproxène près des zones les plus peuplées le long de la rivière Yamaska au Québec [Yargeau *et al.*, 2007], allant jusqu'au µg/L pour ces deux substances en Nouvelle-Ecosse [Crouse *et al.*, 2012]. Ces teneurs s'expliquent par de faibles taux d'élimination dans les STEP. En prenant en compte la proportion transférée dans les boues (par adsorption, absorption ou biosorption), 35 à 44 % des concentrations de AINS à l'entrée de trois STEP en Catalogne utilisant des procédés conventionnels, ont pu être retrouvées à la sortie, donnant des teneurs pouvant atteindre 1 µg/L [Jelic *et al.*, 2011].

Il est aussi possible de retrouver les AINS sous leur forme métabolisée, parfois dans des concentrations plus élevées que la molécule mère. En l'occurrence, dans le cas de la STEP de Källby en Suède, le métabolite du naproxène le o-desmethylnaproxen, et les deux métabolites de l'ibuprofène le 2-hydroxyibuprofen et le carboxyibuprofen ont été décelés à l'entrée de la STEP dans des teneurs nettement plus élevées que les composés parents dont ils sont issus [Larsson *et al.*, 2014].

Ces substances peuvent présenter différents effets sur les espèces aquatiques, c'est d'ailleurs ce que montrent différents essais sur des poissons zèbre (*Danio rerio*), cette espèce présente une nature identique du domaine fonctionnel des protéines où se fixent les médicaments que chez les humains [David et Pancharatna, 2009a, David et Pancharatna, 2009b].

L'acide méfénamique et l'ibuprofène, à titre d'exemples, peuvent provoquer des perturbations du système endocrinien par l'augmentation de production d'hormone féminine chez les femelles et la diminution d'hormones masculines chez les mâles à partir

de concentrations de 10 µg/L [Ji *et al.*, 2013]. Aussi, des essais ont permis de montrer que l'ibuprofène peut réduire la fécondité de certains poissons pour des concentrations supérieures ou égales à 1 µg/L [Ji *et al.*, 2013]. D'autres travaux ont mis en évidence son embryotoxique à travers des troubles de la croissance des embryons ainsi que des anomalies et une augmentation de la mortalité pour des concentrations proches de 10 µg/L [David et Pancharatna, 2009a]. Enfin, ces substances peuvent aussi perturber la capacité d'adaptation à des changements tels que le passage en eau de mer [Gravel *et al.*, 2009] ainsi que la réaction et la perception de stress environnementaux tels que les chocs thermiques [Gravel et Vijayan, 2007].

B. Antibiotiques

Depuis la découverte accidentelle de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming [Ligon, 2004], les antibiotiques ont été largement utilisés pour la santé humaine mais aussi dans le domaine vétérinaire [Martinez, 2009]. Ce sont des « agents chimiothérapeutiques qui inhibent ou stoppent la croissance de microorganismes tels que les bactéries, les espèces fongiques et les protozoaires » [Kümmerer, 2009a] bien que certains soient naturellement sécrétés, ils peuvent perturber fortement les écosystèmes dans lesquels ils pénètrent [Kümmerer, 2009b]. En effet, ces substances sont capables d'inhiber la croissance et la prolifération de nombreuses espèces microbiennes et de bouleverser l'équilibre fragile des écosystèmes. En outre, ces substances peuvent aussi participer au développement de résistances bactériennes, qui permettent à ces microbes de survivre à l'élimination par ce type de produits, réduisant ainsi l'efficacité de ces médicaments [Kümmerer, 2009b; Baquero *et al.*, 2008; Martinez, 2009]. Outre la pénicilline, de nombreux composés appartiennent à cette classe, citons à titre d'exemple l'amoxiciline, les tétracyclines, les antibiotiques sulfamidés, le triméthoprime et la ciprofloxacine. Les essais décrits dans la suite du mémoire ont utilisé les deux dernières substances.

Ces substances se retrouvent très souvent à la sortie des effluents de stations d'épuration et dans les cours d'eau qui les reçoivent, principalement sous leur forme non-métabolisée et donc active [Kümmerer, 2009a]. On les retrouve dans les effluents hospitaliers à des concentrations atteignant des centaines de µg/L, dans les eaux résiduaires urbaines leurs

teneurs sont habituellement de l'ordre de quelques $\mu\text{g/L}$ tandis que leurs concentrations oscillent entre ces deux gammes dans les eaux de surface, les eaux souterraines et portuaires [Kümmerer, 2009a]. Par exemple au Québec, de la sulfaméthoxazole a été détectée à une concentration maximale de 578 ng/L dans la rivière Yamaska [Yargeau *et al.*, 2007].

Alors que certains antibiotiques, tels que le triméthoprim, se retrouvent dans les mêmes concentrations à l'entrée et à la sortie de STEP, d'autres, tels que la ciprofloxacine et la norfloxacine, peuvent être transférés dans les boues, quittant ainsi la matrice aqueuse et faisant croire à une bonne élimination, or, de 70 à 80 % des teneurs initiales de ces substances à l'entrée d'une STEP classique ont pu être retrouvées dans les boues digérées d'une STEP en Suède [Lindberg *et al.*, 2006].

C. Régulateurs de l'humeur et antiépileptiques

Pour ces substances, l'attention est portée en premier lieu sur la carbamazépine à cause de son caractère persistant et de son omniprésence dans l'environnement [Focazio *et al.*, 2008]. Ce composé, ainsi que son principal métabolite humain, la carbamazépine-10,11-époxyde [Mathieu *et al.*, 2011], ont été sélectionnés pour le travail présent. La carbamazépine est utilisée comme anticonvulsif, comme régulateur des troubles de l'humeur, et dans le traitement de certains troubles neurologiques [Oliva *et al.*, 2012].

En second lieu, le diazépam, qui est aussi digne d'intérêt, est « un anti-convulsant, anxiolytique, sédatif et relaxant musculaire avec des propriétés amnésiques et une longue durée d'action » [MeSH Browser, s.d.]. Cette dernière passe par une augmentation de l'activité de l'acide γ -aminobutyrique, un neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central [Li *et al.*, 2013].

On retrouve la carbamazépine à des concentrations assez élevées dans de nombreux effluents urbains et même dans des eaux de surface, atteignant jusqu'à 800 ng/L [Batt *et al.*, 2008]. Mais aussi dans des eaux souterraines [Focazio *et al.*, 2008], et même dans de l'eau potable à une teneur de 30 ng/L [Heberer, 2002]. Elle a pu être décelée à une concentration maximale de 106 ng/L dans la rivière Yamaska au Québec [Yargeau *et al.*, 2007].

De plus cette substance est particulièrement persistante à cause de sa structure dont le groupement azépine, qui agit comme un puissant accepteur d'électrons, lui confère une certaine stabilité [Yang *et al.*, 2013a] . Cette stabilité s'illustre par des taux d'élimination faibles au niveau des STEP conventionnelles qui rejettent jusqu'à 95 % de la teneur initiale de cette substance dans leurs effluents traités [Jelic *et al.*, 2011].

Aussi, quand la carbamazépine est traitée par le biais des méthodes classiques elle peut se trouver à des concentrations plus élevées dans l'effluent que dans l'affluent d'une station d'épuration, ceci pouvant être attribué à un relargage dans l'eau par les boues au niveau du bassin d'aération [Gao *et al.*, 2012], ou bien une transformation des produits issus de la voie métabolique humaine en carbamazépine, ou encore par un échantillonnage inadéquat qui ne prendrait pas en compte le temps de séjour réel des particules [Majewsky *et al.*, 2011a; Rodayan *et al.*, 2014].

Cependant, il faut déplorer la génération de sous-produits tout aussi indésirables dans l'environnement que la carbamazépine [Mathieu *et al.*, 2011] . En effet, il a été montré que 7 produits de transformation de la carbamazépine étaient produits lors de traitements d'eau à des fins de potabilisation par des méthodes conventionnelles. De plus, le mélange de produits formés était constitué de substances connues pour être plus toxiques que la carbamazépine [Kosjek *et al.*, 2009].

En plus de la contamination aqueuse générée, la persistance de la carbamazépine dans les eaux usées, peut être à l'origine d'une contamination notable des sols. En effet, l'utilisation d'eaux usées pour l'irrigation et d'autres fins agricoles, en même temps que la matière organique dissoute, permet à la carbamazépine de s'adsorber au sol et d'y demeurer de manière plus ou moins permanente. La présence de matière organique dissoute étant probablement liée à la facilité qu'a la carbamazépine de se fixer dans ces conditions particulières [Navon *et al.*, 2011].

D. Stimulants

Dans ce cas-ci, la caféine, stimulant psychotrope qui augmente l'attention et diminue la somnolence [Dash et Gummadi, 2006] a été particulièrement étudiée à cause de son omniprésence dans les milieux aquatiques [Focazio *et al.*, 2008]. Cette substance est

utilisée thérapeutiquement pour aider à l'assimilation de l'acétaminophène et de l'aspirine [Gokulakrishnan *et al.*, 2005]. Cet alcaloïde synthétisé par les plantes est aussi utilisé comme stimulant cardiaque, neurologique, respiratoire et diurétique. Cependant, sa consommation n'est pas thérapeutique mais plutôt alimentaire, étant donné qu'on la retrouve dans le café, le thé, le maté, la guarana, la noix de kola, et le cacao [Dash et Gummadi, 2006]. Aussi, elle peut être nocive par ses effets pharmacologiques, tels que la stimulation du système nerveux central, sa toxicité en cas de surdose et la mutagénicité qu'elle provoque chez les microorganismes [Tagliari *et al.*, 2003].

Lors d'analyses de produits pharmaceutiques dans des eaux potables non traitées aux États-Unis, 27 % des échantillons d'eau de surface et 16 % des eaux souterraines, contenaient du 1,7-diméthylxantine, un métabolite de la caféine, avec une concentration maximale de 300 ng/L, alors que la teneur maximale détectée pour la caféine était de 270 ng/L [Focazio *et al.*, 2008]. Au Québec, en plusieurs points de la rivière Yamaska, elle a pu être décelée à des concentrations comprises entre une dizaine et une trentaine de ng/L [Yargeau *et al.*, 2007].

E. Hypolipémiants ou substances médicamenteuses hypolipémiantes

Il s'agit de composés visant à diminuer la quantité de lipides dans le sang, dans cette catégorie on peut citer les fibrates dont font partie le bézafibrate, le fénofibrate, le gemfibrozil, et l'acide clofibrigue. L'action du bézafibrate par exemple, consiste à baisser la concentration des triglycérides et le cholestérol-LDL (cholestérol transporté par des lipoprotéines de basse densité, dit « mauvais cholestérol »), tout en augmentant la teneur plasmique du cholestérol-HDL (cholestérol transporté par des lipoprotéines de haute densité, dit « bon cholestérol ») [Rocco *et al.*, 2010].

Parmi les effets suspectés de ces substances, le bézafibrate serait capable de provoquer une altération de l'ADN de poissons zèbre à des teneurs inférieures à 50 ng/L [Rocco *et al.*, 2010].

Les teneurs de ces produits peuvent atteindre les $\mu\text{g/L}$ dans les effluents de STEP, et les eaux de surface, tandis que le bézafibrate et le gemfibrozil ont été détectées à des concentrations respectives de 190 et 340 ng/L dans des eaux souterraines [Heberer, 2002].

Les concentrations de gemfibrozil dans la rivière Yamaska, ont été décelées à des teneurs n'excédant pas ou peu les 10 ng/L [Yargeau *et al.*, 2007].

En termes de traitement, le bézafibrate et le fénofibrate, montrent clairement deux comportements (indésirables) différents alors qu'il s'agit de molécules aux structures relativement similaires (voir tableau 4.1 en annexe A). Pour des STEPs situées en Espagne, il a été montré que le fénofibrate était quasi-totalement transféré dans les boues de STEP; d'un autre côté, le bézafibrate est tout aussi peu éliminé mais il montre une très faible sorption dans les boues [Jelic *et al.*, 2011].

Ce sont donc ces deux molécules qui ont retenu notre attention dans cette classe thérapeutique. Le choix des molécules envers les mécanismes réactionnels est explicité dans la section 2.3.1 traitant des traitements par enzymes libres.

1.1.3 Effet cocktail

On a longtemps cru que la toxicité d'un composé était proportionnelle uniquement à sa concentration, ce qui signifie que s'il est en dessous d'un certain seuil critique, on peut le considérer comme non toxique. Cependant, une telle approche ne peut être adoptée quand il s'agit de sciences environnementales où les composés se retrouvent dans des mélanges très variés et où les interactions envisageables sont très nombreuses [Escher et Hermens, 2002].

L'effet cocktail doit donc être pris en considération, il s'agit en fait de l'effet cumulé de différents composés et qui se base sur le fait que la somme des effets n'est pas simplement une addition mais peut être amplifiée par les interactions entre les composés même dans de faibles concentrations, ceci en utilisant des techniques toxicogénomiques [Altenburger *et al.*, 2012], ainsi que les concepts de la toxicité couplée que sont l'addition des concentrations et l'action indépendante [Backhaus et Faust, 2012].

Par exemple, des travaux ont été menés afin d'étudier un mélange de produits pharmaceutiques incluant des AINS et des antibiotiques, à des teneurs environnementales et leur action sur un protozoaire, bioindicateur d'eau douce (*Tetrahymena*). Ces travaux ont

permis de montrer que l'interaction de type antagoniste prévalait à hauteur de 59 %, juste avant l'additivité qui contribuait à 37 % tandis que la synergie représentait 4 % de l'interaction, montrant que l'addition des concentrations ne suffit pas à décrire ces interactions [Láng et Kohidai, 2012].

En outre, des essais sur des cellules embryonnaires humaines, utilisant un mélange de produits pharmaceutiques à des concentrations similaires à celles retrouvées dans les matrices environnementales ont montré une baisse allant jusqu'à 30 % de la prolifération cellulaire [Pomati *et al.*, 2006].

Bien que l'étude de l'effet cocktail ne soit pas réalisée de manière exhaustive dans la suite de ce travail, il semblait important de souligner ce point étant donné que les essais réalisés dans le cadre du présent travail ont été effectués sur un mélange de contaminants au sein duquel cet effet peut s'exercer de manière notable.

La problématique des produits pharmaceutiques dans les effluents de STEP et les eaux de surface nécessite donc une solution innovante qui soit assez spécifique et contrôlée pour ne pas générer des produits indésirables mais aussi suffisamment efficace et versatile pour faire face à la diversité de ces molécules. Or, de nombreux travaux synthétisés dans le tableau 4.1 en annexe A montrent une certaine efficacité du traitement enzymatique pour éliminer quelques produits pharmaceutiques dans des conditions particulières. Cela dit, la plupart de ces études ont été réalisées en utilisant un seul composé et une seule enzyme à la fois. Ainsi, l'utilisation d'une combinaison enzymatique optimale pour le traitement de mélanges de produits pharmaceutiques tels que rencontrés dans les matrices environnementales et l'optimisation des conditions d'élimination constituent donc les principaux défis à relever dans le cadre de cette étude.

1.2 Objectifs

1.2.1 Objectif général

Afin de relever les défis énoncés ci-haut, ce projet vise à synthétiser de nouveaux biocatalyseurs, capables de fonctionner dans un vaste spectre opératoire pour éliminer

certains contaminants émergents, en l'occurrence, des produits pharmaceutiques de différentes classes.

1.2.2 Objectifs spécifiques

Afin d'atteindre l'objectif général énoncé plus haut, il est nécessaire de répondre aux objectifs spécifiques suivants :

- Combiner les trois enzymes oxydatives laccase, versatile peroxydase et glucose oxydase en un seul biocatalyseur capable de conserver de bonnes propriétés catalytiques en comparaison avec leurs homologues libres.
- Déterminer le comportement du biocatalyseur et des enzymes libres en fonction des différentes conditions opératoires en termes de pH et de température.
- Réaliser l'élimination de produits pharmaceutiques par les enzymes libres dans différentes conditions opératoires.
- Réaliser et optimiser l'élimination de produits pharmaceutiques par le biocatalyseur, en fonction de la durée de traitement, de la quantité de biocatalyseur et des conditions de traitement.
- Réaliser l'élimination de produits pharmaceutiques dans une eau usée réelle issue d'une station d'épuration des eaux usées.

1.3 Contributions originales

1.3.1 Innovations scientifiques

La réalisation du présent travail a permis d'aboutir aux innovations scientifiques suivantes :

- Combinaison de trois enzymes jamais réalisée auparavant, avec deux types de combinaisons, associative (VP-Lac) et en cascade (GOD-VP) et caractérisation de la combinaison.
- Élimination d'un cocktail de produits pharmaceutiques variés par les enzymes libres dans différentes conditions et associations.
- Étude de l'élimination d'un cocktail de produits pharmaceutiques par le biocatalyseur.

1.3.2 Valorisation des travaux

A. Article

Touahar, I. E., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J.P. et Cabana, H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, volume 481, numéro 1, p. 90-99.

B. Présentations orales

I.E.Touahar, L.Haroune, S.Ba, J-P.Bellenger, H.Cabana. Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates from Laccase, Versatile Peroxidase and Glucose Oxidase for the Elimination of Pharmaceuticals. 28th Eastern Canadian Symposium on Water Quality Research. Canadian Association on Water Quality. Kingston, ON, Canada. 26 octobre.

C. Présentations par affiches

I.E.Touahar, C.Cruz-Morato & H.Cabana (2012). Preparation and Characterization of Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates from Laccase, Versatile Peroxidase and Glucose Oxidase and their potential for wastewater treatment. 27e Congrès de l'Est du Canada de Recherche sur la Qualité de l'Eau. Association canadienne de la qualité de l'eau. Sherbrooke, Qc, Canada. 26 octobre.

I.E.Touahar & H.Cabana (2012). Preparation and Characterization of Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates from Laccase, Versatile Peroxidase and Glucose Oxidase. Meeting européen Oxizymes. Marseille, France. 16-19 septembre.

1.4 Structure du mémoire

Le mémoire s'articule comme suit.

Le premier chapitre, qui constitue l'introduction, présente le contexte général qui a motivé la réalisation de ce travail. Ce chapitre introduit la problématique associée à la contamination des eaux par les produits pharmaceutiques et la nécessité de développer de

nouvelles techniques afin de les traiter en soulignant les conséquences néfastes pouvant résulter de leur présence dans les milieux aquatiques. Aussi, les objectifs, les innovations, la valorisation des travaux et la structure du mémoire y sont présentés.

Le second chapitre s'attarde sur la littérature décrivant l'approche choisie pour traiter les contaminants présentés. Il s'agit en fait de descriptions des enzymes utilisées pour le traitement des contaminants et de la technique utilisée pour leur association, ainsi que les précédents travaux de traitement des eaux par ce type d'enzymes.

Ensuite, le troisième chapitre, rédigé sous forme d'article déjà publié dans la revue *Science of The Total Environment*, décrit les résultats obtenus en synthétisant un biocatalyseur à partir des trois enzymes, et l'utilisation de ce biocatalyseur pour l'élimination de produits pharmaceutiques divers.

Enfin, le dernier chapitre souligne les conclusions du travail réalisé, et évoque les limitations de ce dernier, pour aborder ensuite d'éventuelles perspectives à explorer.

La section en annexe représente le contenu des informations supplémentaires liées à l'article présenté dans le troisième chapitre.

2 Le traitement des eaux usées par voie enzymatique

2.1 Les enzymes ligninolytiques

Les enzymes ligninolytiques sont essentiellement, mais pas exclusivement, sécrétées par les WRF. Ces protéines permettent à ces basidiomycètes de décomposer cette macromolécule qu'est la lignine en unités plus simples afin de pouvoir les utiliser comme source de carbone organique.

La lignine, dont le nom provient du latin *lignum* signifiant bois, est la source de carbone organique la plus abondante après la cellulose [Wong, 2009]. Elle présente une structure fortement diversifiée, comme le montre la figure 2.1. Cette structure pouvant varier très largement en fonction de l'espèce l'ayant produite. Cela dit, on retrouve généralement trois unités primaires pouvant être identifiées grâce à la présence et la position de groupements méthoxy et qui sont l'alcool paracoumarylique (*p-coumaryl alcohol*), l'alcool coniférylique (*coniferyl alcohol*) et l'alcool sinapylique (*sinapyl alcohol*). La figure 2.2 présente ces trois monolignols à l'état libre et en tant qu'éléments de la lignine [Wong, 2009].

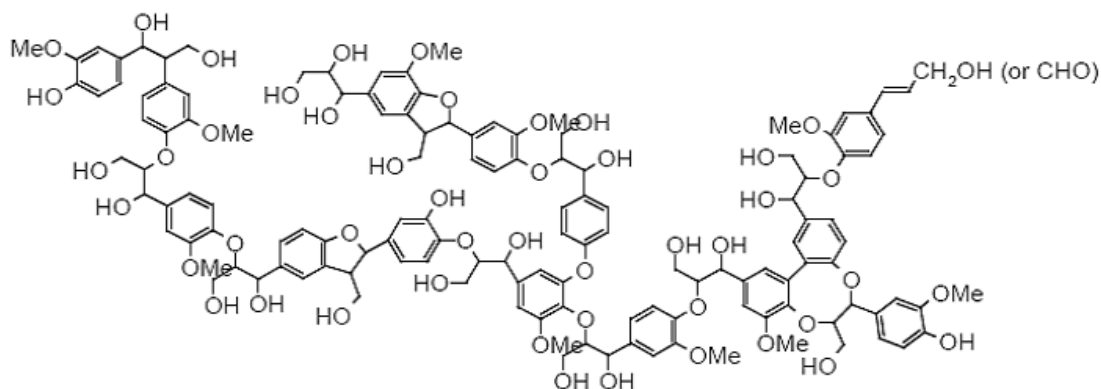


Figure 2.1 Structure de la molécule de lignine ([Arsenault, 2012])

Ces sous-unités confèrent à la lignine une forte stabilité et la rendent difficile à dégrader biologiquement vu la présence de nombreux groupements phénoliques et aromatiques. Sa transformation par des organismes vivants nécessite donc un complexe enzymatique diversifié et capable de transformer une grande variété de molécules aux potentiels rédox élevés [Wong, 2009]. A cet effet, les WRF sont généralement capables de sécréter dans le

milieu environnant quatre types d'enzymes extracellulaires constitutives, la lignine peroxydase (LiP, EC 1.11.1.14), qui en présence de peroxyde d'hydrogène, s'attaque essentiellement aux liens aromatiques. La manganèse peroxydase (MnP, EC 1.11.1.13) qui requière en plus du peroxyde d'hydrogène, la présence de manganèse pour transformer les constituants phénoliques de la lignine. La versatile peroxydase (VP, EC 1.11.1.16), constitue une espèce hybride entre la MnP et la LiP et présente des propriétés catalytiques relativement proches des deux enzymes précédentes. Et enfin la laccase (EC 1.10.3.2) qui se distingue des autres enzymes ligninolytiques par sa capacité à utiliser de l'oxygène comme accepteur d'électrons tout en générant de l'eau comme sous produit [Wong, 2009]. Ces dernières sont décrites de manière plus approfondie dans les sections suivantes. A celles-ci viennent s'ajouter d'autres enzymes facultatives intervenant dans le cycle de dégradation de la lignine, essentiellement pour la production de peroxyde d'hydrogène essentiel à l'action des enzymes précédemment évoquées, ces dernières étant la glyoxal oxidase (EC 1.2.3.5), l'aryl alcohol oxidase (EC 1.1.3.7), la glucose oxidase (GOD; EC 1.1.3.4), la cellobiose/quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.1), et la cellobiose dehydrogenase (EC 1.1.99.18) [Wong, 2009]. Parmi celles-ci, la GOD a retenu notre attention pour sa capacité à utiliser un substrat omniprésent dans l'environnement, le glucose.

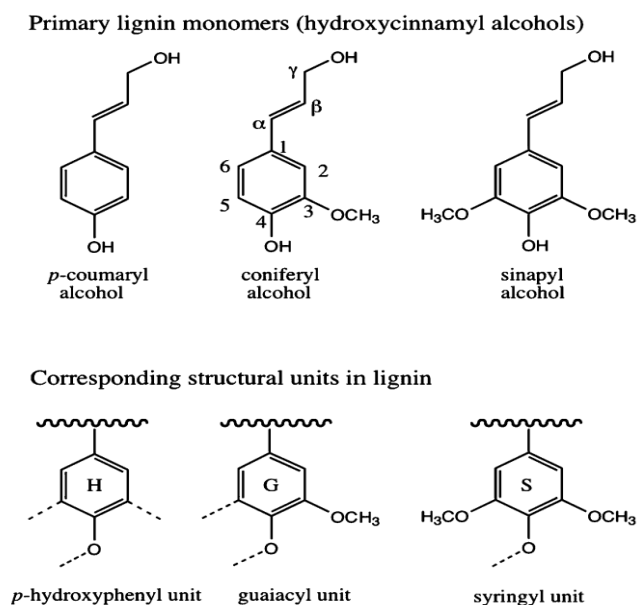


Figure 2.2 Monomères primaires de la lignine ainsi que les sous-unités de la lignine correspondantes ([Wong, 2009])

2.1.1 Laccase

Le nom de la laccase provient de l'arbre Vernis du Japon (*Japanese laquer tree*, *Rhus vernicifera*) dont la sève sert à produire de la laque. Cette enzyme semble être déjà décrite à la fin du XIX^e siècle figurant ainsi parmi les plus anciennes enzymes connues [Wong, 2009]. Elle reste cependant d'un intérêt crucial pour de nombreuses applications envisageables. En effet, cette enzyme dont le site actif est composé de plusieurs atomes de cuivres appartient à la famille des polyphénol oxidases, regroupant aussi la tyrosinase (EC 1.14.18.1) [Mukherjee *et al.*, 2013]. La laccase, de taille variant entre 50 et 110 kDa, possède un potentiel redox entre +420 et +800 mV, et montre une capacité à polymériser des substrats phénoliques, ou méthoxyphénoliques, voire des aromatiques donneurs d'hydrogène, qui sont insolubilisés après polymérisation [Wong, 2009]. Cette catalyse se fait par l'extraction d'un proton et d'un électron aux hydroxyles phénoliques qui sont alors oxydés en radicaux phénoxy libres, ou bien en s'attaquant aux groupes amino aromatiques qui sont transformés en radicaux correspondants [Potthast *et al.*, 1995; Lu et Huang, 2009]. La fonctionnalité du site actif de l'enzyme repose sur l'action de quatre sites contenant des atomes de cuivre, dont un site de type 1 (T1), un site de type 2 (T2) et deux sites de type 3 (T3). Au repos, les atomes de cuivre des trois sites sont à l'état d'oxydation +2. Les trois atomes de cuivre des sites de type T2 et T3 constituent un noyau trinuécléaire. C'est au niveau du site T1 que se fait l'oxydation du substrat réducteur, l'atome de cuivre passe à un état d'oxydation +1, puis transfère 4 électrons aux sites T2 et T3, l'enzyme passe à l'état réduit. Au niveau du noyau trinuécléaire T2/T3 où se fait la réduction moléculaire de l'oxygène en eau comme le montre la figure 2.3, c'est ainsi que l'enzyme retourne à son état initial [Wong, 2009].

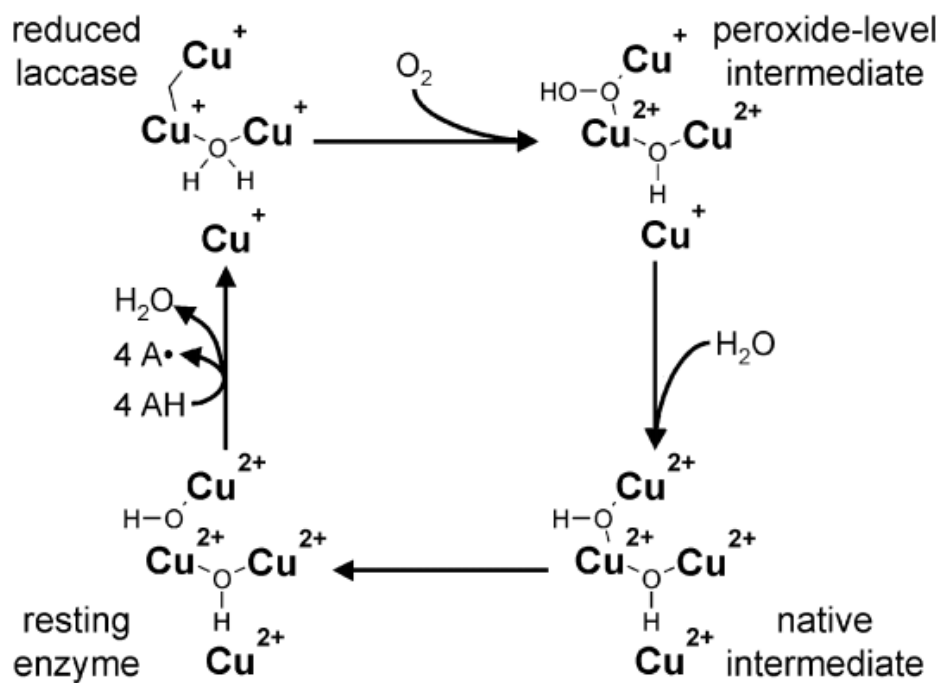


Figure 2.3 Cycle catalytique de la laccase ([Wesenberg, 2003])

Ceci a donné lieu à de nombreuses applications en éliminations de contaminants, tels que les perturbateurs endocriniens [Cabana *et al.*, 2007b], les chlorophénols [Ahn *et al.*, 2002], ou les produits pharmaceutiques [Lloret *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010].

Pour les composés de potentiel redox plus élevé tels que certains colorants synthétiques, il est possible de recourir à un médiateur qui est oxydé puis oxyde à son tour les substrats visés pour retourner à son état initial [Bourbonnais *et al.*, 1998; Cantarella *et al.*, 2003]. Parmi ces substances médiatrices les plus connues sont le 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) et l'hydroxybenzotriazole (HOBt) dont a permis d'augmenter le taux d'élimination d'un composé aussi récalcitrant que la carbamazépine de 22 % à 60 % [Hata *et al.*, 2010].

2.1.2 Peroxydases

Mise à part leur action ligninolytique, ces peroxydases possèdent plusieurs points communs. Il s'agit en l'occurrence d'enzymes à hème, qui possèdent donc un groupement

prosthétique de protoporphyrine entourant un atome de fer. Et comme leur nom l'indique, elles nécessitent la présence de peroxyde d'hydrogène comme accepteur final d'électrons. Elles oxydent le substrat par un transfert d'électrons se faisant en plusieurs étapes impliquant la formation de radicaux cationiques comme illustré sur la figure 2.4 [Wong, 2009].

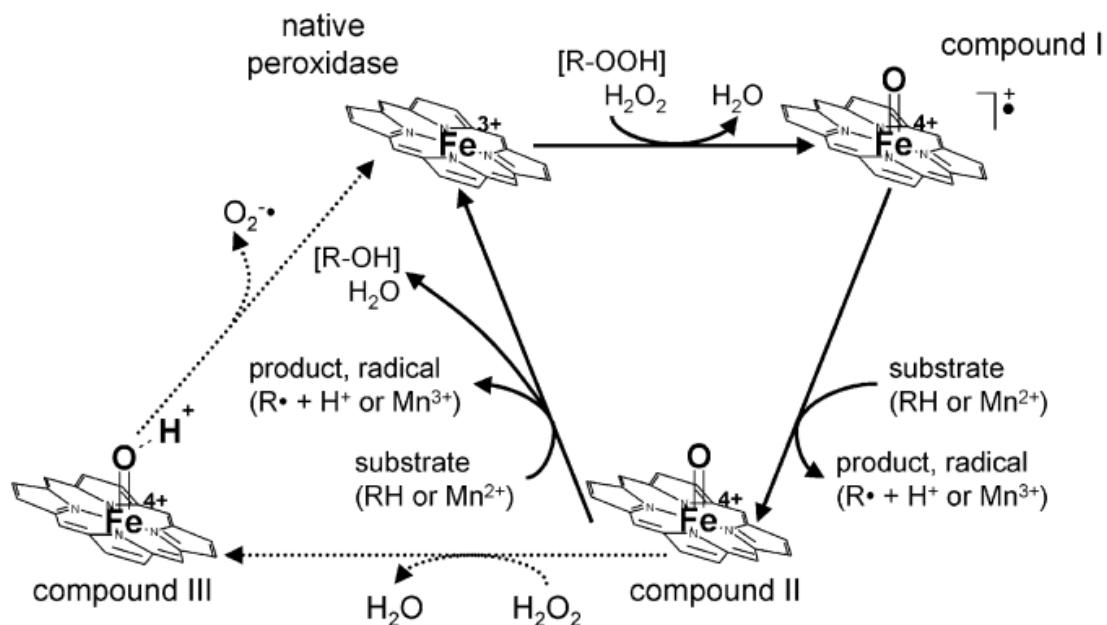


Figure 2.4 Cycle catalytique des peroxydases ([Wesenberg, 2003])

A. Lignine peroxydase

Découverte en 1983 [Karam et Nicell, 1997], d'une taille variant de 38 à 46 kDa, cette peroxydase joue un rôle important dans la dépolymérisation de la lignine. Elle agit, avec un potentiel redox allant jusqu'à 1400 mV, sur la transformation de certains composés organiques aromatiques, phénoliques ainsi que des composés non phénoliques de structures semblables aux sous-unités de la lignine, ou d'autres composés organiques, essentiellement par le clivage des liaisons C-C [Wong, 2009].

L'action catalytique de cette glycoprotéine N-glycosylée consiste en une oxydation à deux électrons de sa forme initiale [Fe(III), LiP] à une forme oxydée LiP-I qui génère un radical cationique [Fe(IV)=O•⁺, LiP-I], accompagnée d'un clivage du substrat peroxyde

d'hydrogène au niveau du lien O-O, tel qu'illustré sur la figure 2.5. La seconde étape consiste en une réduction de la LiP-I à la forme LiP-II avec [Fe(IV)=O, LiP-II], par un substrat réducteur tel que le veratryl alcool (VA) qui est transformé en radical cationique VA^{•+}, tandis qu'une seconde réduction permet à l'enzyme de repasser à son état initial [Fe(III), LiP]. La forme LiP-I peut, dans certains cas, retrouver directement son état initial par une réduction à 2 électrons [Wong, 2009].

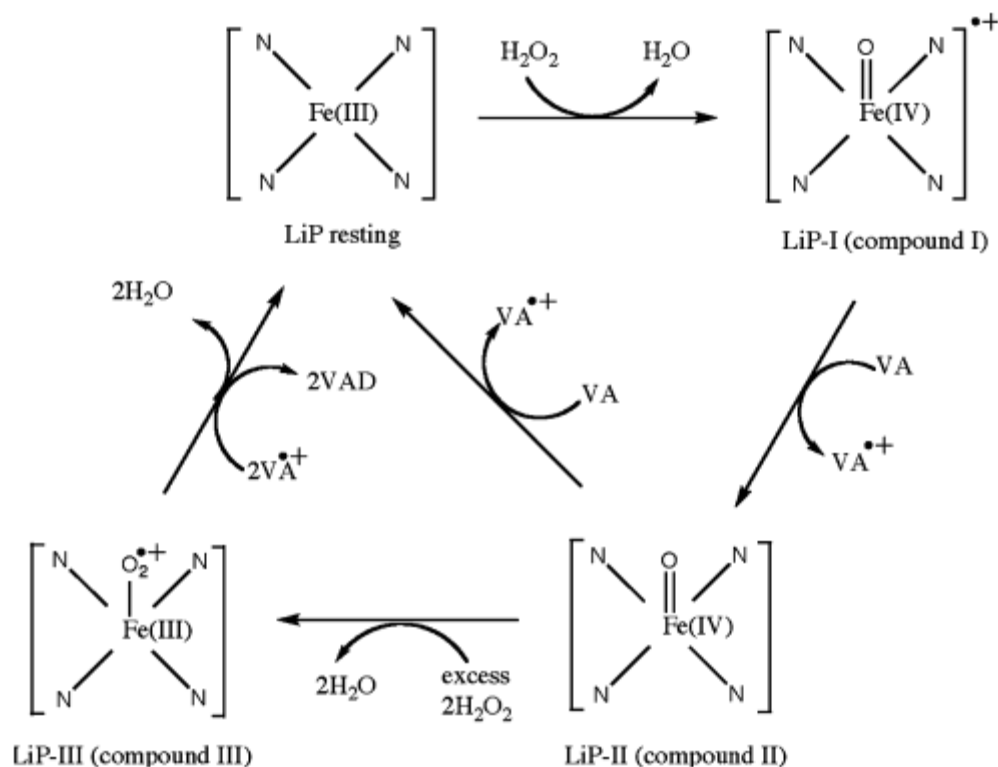


Figure 2.5 Cycle catalytique de LiP en présence de veratryl alcool ([Wong, 2009])

Il est intéressant de noter qu'en présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène, en absence de substrat et à pH 3, la LiP sous sa forme LiP-II réagit avec le H₂O₂ pour produire une forme inactive LiP-III où un complexe superoxo-ferrique est formé, cette inactivation est réversible par auto-oxidation ou par la réaction avec un radical VA^{•+} [Wong, 2009].

La LiP a été utilisée entre autres applications environnementales pour le traitement, peu fructueux, de carbamazépine, et la dégradation complète de diclofénac [Zhang et Geissen, 2010].

B. Manganèse peroxydase

La MnP est aussi une peroxydase à hème qui catalyse l'oxydation du Mn(II), en Mn(III) en présence de peroxyde d'hydrogène. Il est à noter que son excrétion par les WRF est aussi conditionnée par la présence de Mn(II) dans le milieu, cette excrétion peut aussi être stimulée par la présence de certains acides organiques, tels les acides α -carboxyliques comme le malonate [Wong, 2009].

La MnP est singulière par l'utilisation de Mn(II) comme substrat réducteur, cela dit, son cycle catalytique est très similaire à celui de la LiP, par l'oxydation de la MnP initiale en un composé MnP-I en présence de peroxyde d'hydrogène, ce composé MnP-I est alors réduit en MnP-II, ce qui peut aussi être réalisé par l'ajout d'autres donneurs d'électrons, enfin, le retour à la forme initiale nécessite la présence de Mn(II). C'est donc le Mn(III) généré qui réalise l'oxydation des substrats organiques présents. En outre le Mn(III) généré peut être stabilisé et acquérir un potentiel redox de 800 à 900 mV en se liant à des acides α -carboxyliques sécrétées par les WRF tels que l'oxalate ou le malonate. Il a aussi été montré que la MnP réagit avec le complexe Mn(II)-oxalate au lieu du Mn(II) lorsque ce complexe est présent dans le milieu [Wong, 2009].

De même que pour la LiP, il existe un composé inactif MnP-III, qui résulte d'une réaction du MnP-II avec le peroxyde d'hydrogène en présence d'un excès de ce dernier. Cela dit, la réactivation de l'enzyme nécessite la forme oxydée Mn(III) pour retourner à son état initial MnP.

La MnP a été utilisée entre autres pour le traitement de colorants [Arantes et Milagres, 2007], la déchloruration de pesticides chlorés [Hirai *et al.*, 2004], l'élimination de biocides tels que le triclosan [Inoue *et al.*, 2010], et d'antibiotiques comme les tétracyclines [Wen *et al.*, 2010].

C. Versatile peroxydase

La VP, confondue initialement avec de la MnP, est une enzyme de structure plus proche de celle de la LiP que de la MnP après étude. Tout en oxydant le Mn(II) en Mn(III) en présence de peroxyde d'hydrogène, elle montre aussi une activité catalytique similaire à celle de la LiP en oxydant des substrats qui sont typiques à cette dernière tels que le

veratryl alcool (VA). Cependant, cette enzyme n'a été retrouvée que pour certaines souches fongiques. Son cycle catalytique est assez similaire à celui des peroxydases en général et celui de la LiP en particulier [Wong, 2009].

Aussi, elle a déjà été utilisée pour le traitement de perturbateurs endocriniens [Taboada-Puig et al., 2011a] et d'AINS [Eibes *et al.*, 2011].

2.1.3 Glucose oxydase

Il s'agit d'une flavoprotéine de 130 à 175 kDa qui catalyse, en présence d'oxygène comme accepteur d'électrons la conversion du β -D-glucose en D-glucono- δ -lactone, lui-même hydrolysé non-enzymatiquement en acide D-gluconique, comme produit secondaire elle génère du peroxyde d'hydrogène [Bankar *et al.*, 2009].

Son cycle catalytique se fait par l'oxydation du β -D-glucose en D-glucono- δ -lactone, qui s'accompagne par la réduction de l'anneau de flavine adénine dinucléotide (FAD) de la GOD en FADH₂, l'oxygène oxyde alors la GOD qui retrouve son état initial et génère du peroxyde d'hydrogène [Bankar *et al.*, 2009].

Son utilisation en traitement des eaux a été rapportée pour l'élimination d'un colorant (vert de malachite), le peroxyde généré étant utilisé dans une réaction de Fenton [Karimi *et al.*, 2012], ou comme enzyme de support fournissant le peroxyde d'hydrogène pour un traitement par la VP [Taboada-Puig *et al.*, 2011a].

2.2 L'immobilisation enzymatique et la synthèse de biocatalyseurs

Bien que les enzymes représentent une solution de choix pour catalyser de nombreuses réactions, leur utilisation reste tout de même limitée du fait de leur faible stabilité thermique, mécanique et chimique; en effet elles sont très sensibles au milieu dans lequel elles sont placées [Aymard et Belarbi, 2000]. Ces protéines sont constituées de séquences d'acides aminés. Ces séquences, ainsi que les fonctions secondaires de ces acides aminés confèrent à l'enzyme sa structure spécifique qui est l'élément clé de son activité, or cette structure peut varier facilement si l'on change la température, le pH ou le microenvironnement de l'enzyme [Brown *et al.*, 2013]. Il est donc primordial de protéger

l'enzyme, autrement dit de limiter son exposition aux changements brusques et conditions adverses pouvant être rencontrées dans le milieu. Un autre aspect majeur limitant l'utilisation d'enzymes dans les procédés industriels en général, et en traitement des eaux plus particulièrement, est leur solubilité en milieu aqueux, ce qui les rend difficile à retenir dans un réacteur à moins d'utiliser des technologies de séparation qui sont particulièrement onéreuses [Mukherjee *et al.*, 2013].

Face à ce constat, plusieurs solutions ont été considérées parmi lesquelles l'immobilisation sur un support solide, l'encapsulation de l'enzyme et l'agrégation suivie d'une réticulation avec les deux objectifs de séparation et d'augmentation de l'activité enzymatique [Hanefeld, 2013].

2.2.1 Immobilisation enzymatique

Cette technique consiste à attacher l'enzyme à un support solide par un lien qui peut être physique (adsorption) ou chimique (liaison covalente). Elle permet ainsi à l'enzyme d'être protégée des conditions variables du milieu environnant et d'être séparée plus facilement [Hanefeld, 2013]. Dans le cas de l'adsorption, l'enzyme peut être fixée au support par des interactions intermoléculaires polaires, hydrophobes ou des liens ioniques [Jia *et al.*, 2014]. Ce type d'immobilisation présente l'inconvénient d'une faible sélectivité, soit la possibilité d'adsorber d'autres substances que l'enzyme. Il est aussi nécessaire que les substrats puissent entrer dans les pores dans lesquels l'enzyme est fixée et que les produits puissent en sortir. Ceci revient principalement à un problème d'encombrement stérique. Par ailleurs, l'enzyme peut se fixer aléatoirement sur le support et éventuellement son site actif peut devenir inaccessible [Jia *et al.*, 2014].

Pour ce qui est de l'attachement de l'enzyme de manière covalente, il s'agit de lier l'enzyme à un support à travers ses groupements fonctionnels libres. Ce sont, le plus souvent, des groupements amine de la lysine qui se trouvent sur la surface extérieure de la structure de la protéine. Ces derniers sont liés généralement à des groupements carboxyliques formant ainsi un lien amide, ou encore à des groupements aldéhyde ou epoxy [Jia *et al.*, 2014]. Une autre limitation de cette technique est liée au fait que l'adhésion de l'enzyme puisse provoquer des changements dans sa structure entraînant une baisse d'activité [Jia *et al.*, 2014].

En outre, certaines études vantent les mérites d'une adsorption suivie d'un lien covalent combinant ainsi deux approches d'immobilisation afin de bénéficier des avantages de chacune [Mateo *et al.*, 2000]. Cependant dans les deux cas de figures, il est nécessaire d'utiliser un support qui constitue une masse inactive catalytiquement et représente entre 90 et 99.9 % de la masse totale incluant l'enzyme et le support [Cao *et al.*, 2003].

L'encapsulation ainsi que les deux techniques d'immobilisation brièvement décrites sont schématiquement représentées dans la figure 2.6.

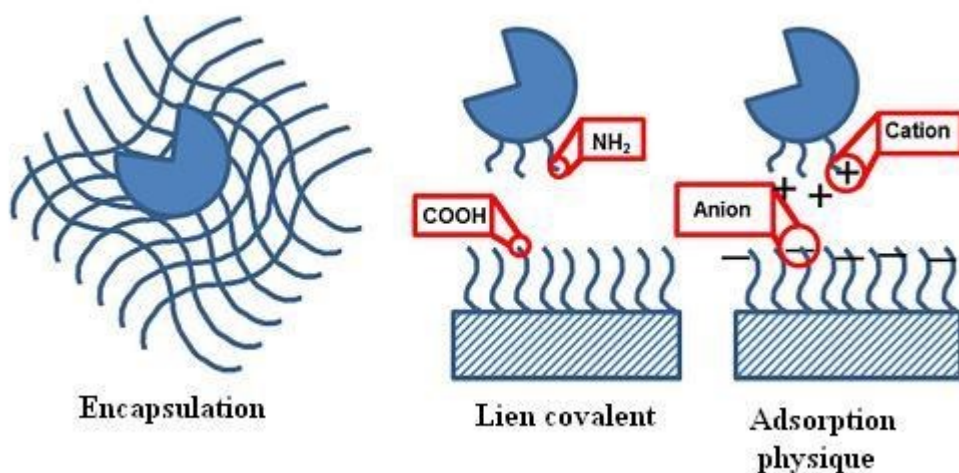


Figure 2.6 Représentation schématique de l'encapsulation et de deux techniques d'immobilisation enzymatique adaptée de [Jia *et al.*, 2014]

2.2.2 Encapsulation enzymatique

L'encapsulation consiste à confiner, ou séquestrer, des enzymes durant la réticulation ou la gélification d'un matériau. Durant le processus les solvants sont retirés à basse température ou par l'ajout de polymères ou de sels. L'encapsulation physique par gélification permet de ne pas lier l'enzyme et de la garder tout de même dans le gel qui la protège.

L'inconvénient majeur de cette technique étant lié aux contraintes diffusionnelles à l'intérieur du gel qui rendent la rencontre entre l'enzyme et son substrat plus difficiles [Jia *et al.*, 2014].

2.2.3 Agrégats d'enzymes réticulées

Partant de l'inconvénient de la forte proportion de masse inactive catalytiquement dans le cas des deux techniques précédemment décrites, une approche différente a été développée. Cette dernière consiste à faire précipiter les enzymes sous forme d'agrégats qui sont ensuite liées de manière covalente (réticulation) à l'aide d'un agent réticulant, les rendant insolubles de manière irréversible produisant ainsi un agrégat d'enzyme réticulée (*cross-linked enzyme aggregate*, CLEA) [Sheldon, 2007a]. L'avantage majeur lié à cette technique est la possibilité d'obtenir un biocatalyseur insoluble, stable et facile à récupérer avec une grande activité catalytique. En effet, il est possible de précipiter l'enzyme par l'utilisation d'un agent précipitant pouvant être un sel (sulfate d'ammonium par exemple), un solvant organique (acétone ou méthanol entre autres) ou un polymère non ionique (tel que le polyéthylène glycol) sans altérer la structure tridimensionnelle initiale de la protéine [Sheldon, 2007b]. On obtient alors une enzyme sous forme insolubilisée qui peut être maintenue facilement au sein d'un réacteur [Cabana *et al.*, 2009].

De plus, la précipitation est aussi une technique de purification de l'enzyme et permet donc d'éliminer certaines impuretés. Cependant, un changement dans les conditions opératoires telles qu'une simple dilution peut resolubiliser l'enzyme, il est donc essentiel de pallier à cette contrainte. C'est pourquoi, un agent réticulant, tel que le glutaraldéhyde, ou du chitosane, est utilisé pour lier les enzymes précipitées entre elles, et les rendre insolubles dans de nombreux solvants de manière quasi-irréversible [Schoevaart *et al.*, 2004; Arsenault *et al.*, 2011].

Le biocatalyseur ainsi obtenu conserve une quantité importante de l'activité initiale de l'enzyme tout en étant plus stable face aux conditions adverses et plus facile à récupérer et à réutiliser de par sa plus grande taille (de l'ordre du μm).

2.2.4 Combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées

En partant du principe utilisé pour former des agrégats d'enzymes réticulées, et des avantages qui lui sont associés, l'idée est venue de combiner plusieurs protéines par cette même technique et de former ainsi une combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées (*combined cross-linked enzyme aggregate*, combi-CLEA). Dans un premier temps des travaux ont été menés avec une enzyme et d'autres protéines utilisées pour en augmenter la

stabilité et la performance catalytique [Cabana *et al.*, 2007b] . Par la suite, le succès de la démarche précédente a permis d'envisager cette technique pour plusieurs enzymes. Certaines réactions nécessitent l'intervention successive d'une série d'enzymes. Ces réactions constituent donc ce qu'on appelle une cascade enzymatique, qui part d'un substrat initial, et donne le produit désiré en passant par différents produits intermédiaires nécessitant l'intervention d'autres enzymes pour la transformation de ces produits intermédiaires qui sont les substrats de certaines enzymes. La possibilité de combiner plusieurs enzymes en un seul biocatalyseur permet donc de regrouper en un seul élément les différents maillons de la chaîne catalytique évoquée, ce qui facilite les mécanismes de transfert et réduit les contraintes d'ordre diffusionnel et en fait un biocatalyseur facile à récupérer et réutilisable [Mateo *et al.*, 2006]. A titre d'exemple l'équipe de Taboada-Puig *et al.* (2011a) a combiné de la GOD, qui génère du peroxyde d'hydrogène à partir du glucose, et de la VP qui requiert un apport de peroxyde d'hydrogène pour transformer différents substrats phénoliques ou aromatiques [Taboada-Puig *et al.*, 2011a].

Une dernière utilisation de l'approche par combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées vise à produire des biocatalyseurs dits versatiles, pouvant réaliser une action catalytique similaire dans de plus larges conditions de pH, ou de température par exemple [Ba *et al.*, 2014]. La figure 2.7 présente la formation, par précipitation et réticulation, du combi-CLEA synthétisés dans le cadre de la présente étude. La figure explicite aussi schématiquement son mode d'action pour les deux LME qui le composent, ainsi que l'enzyme oxydative de support qui fournit le peroxyde d'hydrogène à partir du glucose.

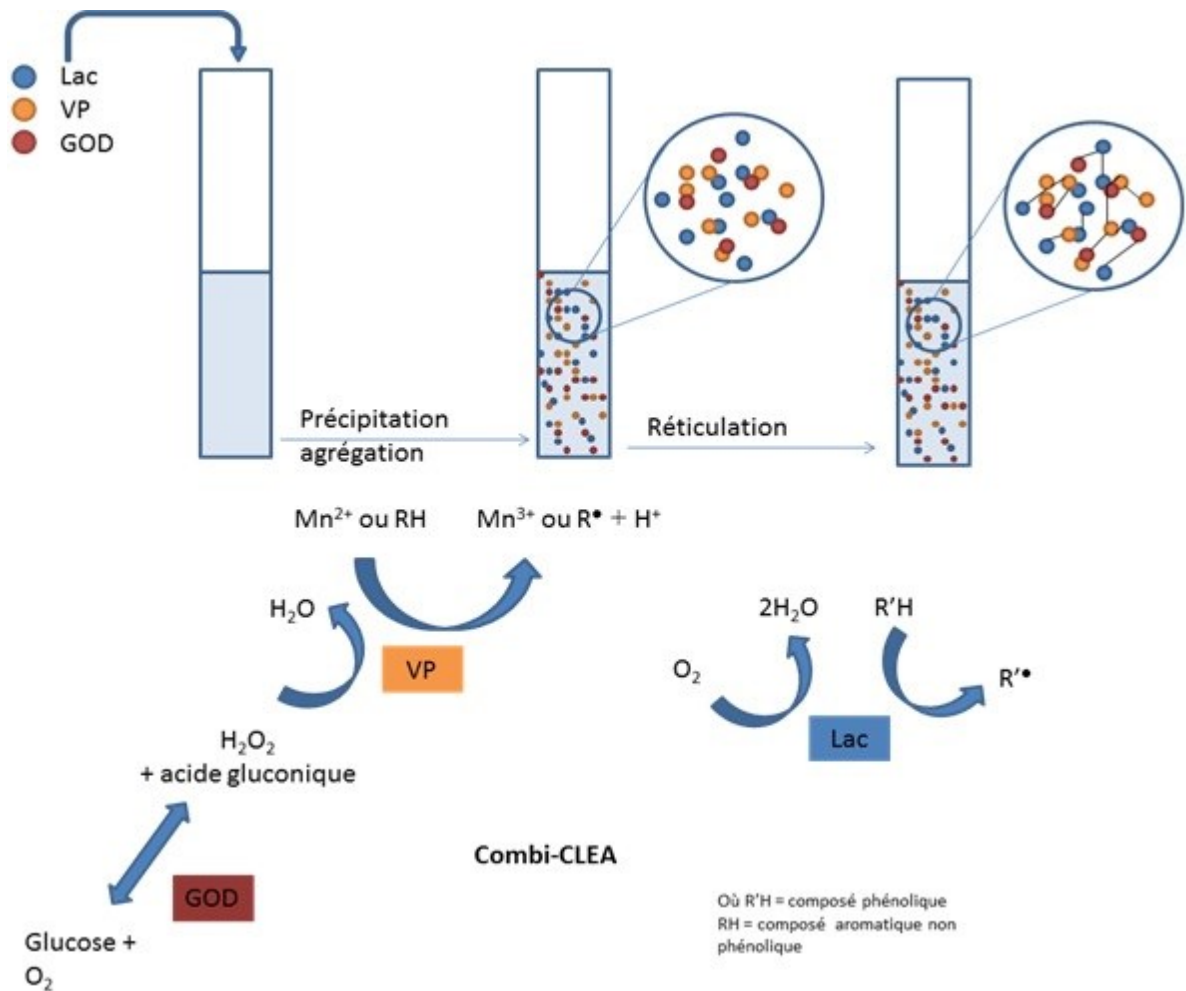


Figure 2.7 Représentation de la formation d'un combi-CLEA de Lac, VP et GOD (adaptée de [Touahar *et al.*, 2014])

2.3 L'élimination de contaminants émergents dans l'eau par les enzymes ligninolytiques

Vu la similitude entre les groupements fonctionnels de certains composés pharmaceutiques et des constituants de la lignine, plusieurs études ont été menées afin de déterminer la capacité des enzymes ligninolytiques à transformer ces contaminants émergents en substances moins actives. Parmi les travaux réalisés certains se sont intéressés à la transformation de ces composés par des enzymes solubles introduites dans un milieu contaminé. Dans d'autres travaux, l'approche par enzyme fixée a été privilégiée, tandis que dans différentes études, ce sont des enzymes insolubilisées qui ont été utilisées. Dans les

parties suivantes, certains travaux récents sont présentés. En annexe A, dans le tableau 4.1, une revue de littérature exhaustive a été réalisée pour l'élimination, par des LME, des contaminants ciblés dans le cadre de cette étude. En outre, de nombreux travaux utilisant directement les champignons lignivores sécrétant ces enzymes ont été réalisés, et ont permis de montrer entre autre une diminution de la toxicité d'eaux usées municipales et hospitalières contenant des produits pharmaceutiques [Cruz-Morató *et al.*, 2013; Cruz-Morató *et al.*, 2014]. Cela dit ces travaux se situent en dehors du cadre de cette étude qui s'intéresse à l'utilisation d'enzymes spécifiques. Ces dernières ont aussi montré une efficacité réelle pour la réduction de la toxicité d'effluents réels tels que ceux émanants de l'industrie papetière [Dhiman *et al.*, 2014].

2.3.1 Traitements par enzymes libres

L'utilisation d'enzymes ligninolytiques pour le traitement de produits pharmaceutiques dans l'eau a récemment suscité un certain intérêt, et montré une certaine efficacité pour l'élimination de plusieurs composés. En effet, plusieurs études ont été réalisées en utilisant de la laccase de *Trametes versicolor*, avec un intérêt particulier pour son utilisation pour l'élimination d'AINS, notamment le naproxène et le diclofénac [Lloret *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010], le diclofénac présentant un certain caractère de persistance par des traitements classiques tels que les boues activées [Majewsky *et al.*, 2011b]. Lors d'expériences en batch, une élimination complète de ce composé par la laccase a pu être obtenue au bout de 3 h à 30 °C, [Tran *et al.*, 2010] et après 8 h de traitement à température ambiante [Lloret *et al.*, 2010] pour des teneurs de 10 µg/L et 5 mg/L, respectivement. Un résultat similaire a été observé pour le naproxène à faible concentration [Tran *et al.*, 2010], tandis qu'à plus haute concentration une élimination de 60 % seulement a pu être obtenue même après 8 h de traitement en présence du médiateur HOBt [Lloret *et al.*, 2010]. Tandis que l'ajout de ce médiateur a permis dans le cadre d'une autre étude d'éliminer un composé aussi récalcitrant que la carbamazépine à hauteur de 60 % après 48 h [Hata *et al.*, 2010], cela dit la laccase seule était incapable de dégrader cette substance [Hata *et al.*, 2010; Marco-Urrea *et al.*, 2009].

Dans le cadre des essais évoqués précédemment pour le diclofénac, les traitements ont été réalisés sur des mélanges de produits pharmaceutiques, en l'occurrence un mélange de

diclofénac et de naproxène, en présence d'hormones (estrone, 17β -estradiol, 17α -éthynylestradiol), dans le premier cas [Lloret *et al.*, 2010]. Dans le second cas, un cocktail comprenant des AINS, des hypolipémiants et un antipyrétique [Tran *et al.*, 2010] a été utilisé pour comparer la capacité d'élimination d'un champignon lignivore (*T. versicolor*), de son extrait enzymatique, et de laccase commerciale, en présence et en absence de médiateurs. D'autres études dont les résultats sont présentés en annexe A, tendent aussi à comparer l'efficacité d'un champignon, de son enzyme et même de boues activées pour le traitement de produits pharmaceutiques avec pour résultats une meilleure élimination en utilisant les champignons [Marco-Urrea *et al.*, Yang *et al.*, 2013b].

Cependant, la présence de mélanges de produits pharmaceutiques pourrait être un facteur déterminant, c'est aussi ce que relève des travaux s'intéressant à la dégradation de deux AINS (diclofénac et acide méfénamique), d'un biocide (triclosane) et d'un agent plastifiant (bisphénol A) par de la laccase de *T. versicolor* [Margot *et al.*, 2013]. Ces travaux montrent, entre autres, que la présence d'autres composés peut grandement influencer l'élimination d'un produit pharmaceutique par la laccase. Une cinétique d'élimination plus rapide a pu être constatée lors de l'élimination du diclofénac en présence des autres composés cités précédemment par rapport à son traitement seul. De plus, le degré d'élimination de ce composé est passé de 25 % seul, à 60 % en présence de bisphénol A et 95% en présence d'acide méfénamique [Margot *et al.*, 2013]. Il est suggéré dans cet article que la laccase génère des radicaux libres pouvant réagir préférentiellement avec d'autres substances tels que le diclofénac et soit, retourner à leur état initial, jouant ainsi le rôle de médiateur, ou encore se lier au diclofénac pour former de plus grandes molécules plus aptes à précipiter [Margot *et al.*, 2013]. Cette hypothèse semble confirmée par les observations des auteurs qui notent une plus grande précipitation dans le cas du mélange et une coloration différente qui sous-entendrait la présence de produits de transformation différents [Margot *et al.*, 2013].

Cette hypothèse se voit supportée par une autre étude qui s'intéresse aux voies de transformation de l'acétaminophène par la laccase, dans un premier volet [Lu *et al.*, 2009] et aux réactions ayant lieu en présence de matière organique naturelle, dans un second volet [Lu et Huang, 2009]. En effet, cette étude montre que l'acétaminophène peut être oligomérisé par la laccase sous forme de dimères lorsqu'il se trouve seul [Lu *et al.*, 2009],

mais qu'en présence de substances organiques naturelles, modélisées par le gaïacol, cette polymérisation n'est pas observée, tandis que les radicaux formés semblent se lier à la matière organique naturelle dissoute [Lu et Huang, 2009]. Ces résultats revêtent une importance particulière lorsqu'il s'agit de traitement des eaux usées, puisqu'on y retrouve généralement des teneurs élevées de matière organique dissoute, une compréhension plus profonde de ces mécanismes serait donc souhaitable. C'est pourquoi dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de l'acétaminophène, comme seul composé phénolique avec l'objectif de l'utiliser pour réagir avec d'autres substances non-phénoliques.

Aussi, dans une revue critique de la littérature, c'est essentiellement à certains groupes fonctionnels qu'est attribuée la capacité des composés à être transformés par les différentes enzymes ligninolytiques; en effet, cette étude souligne que les composés les mieux éliminés sont ceux qui comportent des groupements à fort donneurs d'électrons tels que les groupements hydroxyle (-OH) ou amine (-NH₂), tandis que les groupements à fort accepteurs d'électrons tels que le groupement amide que l'on retrouve dans la carbamazépine réduisent sa capacité à être oxydée directement, cela dit l'effet combiné des deux types de groupements est à étudier au cas par cas en tenant compte de la contribution structurale de chacun et à l'interprétation biochimique [Yang *et al.*, 2013a].

Nous avons donc utilisé dans le cadre de notre étude expérimentale des composés comportant ces différents types de groupements tel qu'illustré par leurs structures présentées dans le tableau 4.1 en annexe A.

En outre, bien que la plupart des études utilisent de la laccase de *T. versicolor*, cette enzyme secrétée par d'autres souches peut s'avérer tout aussi efficace, malgré les différences structurelles qui peuvent en découler, à titre d'exemple de la laccase de l'ascomycète *Paraconiothyrium variable* a été utilisée pour traiter plusieurs benzodiazépines, avec une efficacité atteignant 61 % dans le cas du diazépam traité en présence de HOBt [Ostadhadi-Dehkordi *et al.*, 2012].

Les autres enzymes ligninolytiques sont aussi utilisées, dans une moindre mesure, Hata et al. [2010] par exemple ont comparé l'action de laccase de *T. versicolor* et de MnP de *Phanerochaete chrysosporium* pour l'élimination de la carbamazépine, bien que l'élimination fut faible dans les deux cas au bout de 24 h, l'élimination est quasi nulle par la

laccase seule, tandis que la MnP élimine tout de même une quantité bien plus appréciable de carbamazépine (14 %), cela dit le système laccase-HOBt reste plus efficace sur cette période en transformant 22 % de la quantité initiale de carbamazépine.

De la LiP de *P. chrysosporium* a aussi été utilisée pour traiter de la carbamazépine ainsi que du diclofénac, le traitement du premier composé n'ayant pas été notable (moins de 10 %), tandis qu'une élimination complète du diclofénac a pu être réalisée [Zhang et Geissen, 2010].

Enfin, le traitement par la VP de *Bjerkandera adusta* de plusieurs produits pharmaceutiques tels que le diclofénac, le naproxène et la carbamazépine a montré des résultats similaires aux autres enzymes ligninolytiques avec des difficultés à éliminer la carbamazépine et une plus grande efficacité pour le naproxène et le diclofénac [Eibes *et al.*, 2011].

2.3.2 Traitements par enzymes immobilisées

Afin de pallier aux différentes contraintes liées aux enzymes libres, différentes techniques d'immobilisation ont été appliquées afin de traiter des eaux contenant des produits pharmaceutiques. Ces techniques se sont essentiellement servies de laccase en utilisant des techniques telles que l'immobilisation sur membranes de polypropylène, préalablement activées par du glutaraldéhyde, pour le traitement de l'acétaminophène avec une efficacité de 100 % au bout de 250 min de traitement [Georgieva *et al.*, 2010].

De même que pour les enzymes libres, l'un des produits pharmaceutiques dont l'élimination a été la plus étudiée est le diclofénac. Sa dégradation a été testée par le biais de laccase de *T. versicolor* fixée sur la paroi de microtubes en polytétrafluoroéthylène sous forme d'enzymes réticulées par l'action de glutaraldéhyde et de paraformaldéhyde [Lloret *et al.*, 2013], ou encore de la laccase de *Pleurotus florida* liée à des nanofibres de poly(lactic-co-glycolic acid) [Sathishkumar *et al.*, 2012] et enfin de laccase de *Corioloopsis gallica* immobilisée puis réticulée sur des sphères de silice mésoporeuses [Nair *et al.*, 2013].

Dans le cas de l'enzyme fixée sur la paroi d'un nanotube, du diclofénac a été testé ainsi que du naproxène. Dans les deux cas, la présence de médiateurs semblait indispensable, avec des éliminations allant respectivement de 25 à 90 % et de 0 à 71 %, ceci semble propre à la configuration spéciale adoptée pour ce réacteur [Lloret *et al.*, 2013].

Pour ce qui est de la laccase de *P. florida* fixée à des nanofibres de poly(lactic-co-glycolic acid), cette dernière a été utilisée spécifiquement pour le traitement du diclofénac avec une grande efficacité. En effet, 100 % d'élimination pendant 3 cycles de 5 h 30 min de traitement a pu être obtenue, tandis que l'ajout de syringaldéhyde a fait passer cette valeur à 6 cycles, montrant ainsi la possibilité de réutiliser ce biocatalyseur à plusieurs reprises [Sathishkumar *et al.*, 2012].

Aussi, la laccase de *C. gallica*, immobilisée puis réticulée sur des sphères de silice mésoporeuses, a servi à traiter du diclofénac seul ou en présence de bisphénol A et de 17 α -éthinyloestradiol. Ceci a donné lieu à des éliminations de 70 % pour le diclofénac seul, et 90 % dans le cas du mélange après plus de 80 h de traitement soit 64 volumes de réacteurs [Nair *et al.*, 2013].

2.3.3 Traitements par enzymes insolubilisées

Comme souligné dans la section 2.2 traitant de l'immobilisation enzymatique, l'inconvénient majeur des techniques d'immobilisation et d'encapsulation est leur faible volume actif, la plus grande proportion étant celle du support qui ne participe pas à la réaction enzymatique. D'où l'intérêt des traitements par agrégats d'enzymes réticulées.

A notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à l'utilisation d'agrégats d'enzymes réticulées pour l'élimination de produits pharmaceutiques ou de soin personnel dans l'eau. Seuls deux travaux ont pu être retrouvés dans la littérature, ces derniers ont été réalisés afin de tester la capacité d'agrégats d'enzymes réticulées pour le traitement de produits pharmaceutiques.

Dans les deux cas il s'agit de combinaisons enzymatiques, en l'occurrence, la première étude, combine de la VP et de la GOD en utilisant différents agents précipitants (polyéthylène glycol, acétone, méthanol, 2-propanol, n-propanol et 2-butanol) et le glutaraldéhyde comme agent réticulant. Cette combinaison enzymatique insolubilisée a été utilisée pour le traitement de nonylphénol, de triclosan, et de deux hormones (17 β -estradiol, 17 α -éthinyloestradiol) et a résulté en une élimination de plus de 90 % pour tous les composés à l'exception du triclosan. Le fait d'avoir combiné les deux enzymes donne de meilleurs résultats même dans le cas de la GOD et VP soluble, la GOD agissant dans les deux cas comme fournisseur de peroxyde d'hydrogène, elle reste cependant plus proche de

la VP puisque les deux enzymes sont réticulées en un même biocatalyseur au sein duquel se font les réactions enzymatiques [Taboada-Puig et al., 2011a].

La deuxième étude traitant de l'élimination de produits pharmaceutiques par un agrégat d'enzymes réticulées fait appel à une combinaison de laccase et de tyrosinase, une enzyme capable d'oxyder des substrats similaires à ceux de la laccase, autrement dit les composés phénoliques, mais plus active à pH alcalin contrairement à la laccase qui agit de manière optimale en milieu acide.

Cette étude s'intéresse à la transformation de l'acétaminophène et aux produits de dégradation générés lors de la transformation de ce dernier par le biocatalyseur synthétisé. De même que pour la laccase libre, des oligomères d'acétaminophène sont générés sous forme de dimères mais aussi des trimères et des tétramères [Ba et al., 2014].

Enfin, le tableau 4.1 en annexe A présente une revue de littérature quant à l'élimination de pharmaceutiques sélectionnés par des enzymes oxydatives ligninolytiques.

3 Caractérisation d'une combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées de laccase, de versatile peroxydase, et de glucose oxydase et son utilisation pour l'élimination de produits pharmaceutiques

3.1 Avant-propos

Auteurs et affiliation :

Imad E. Touahar, Lounès Haroune, Sidy Ba, Jean-Philippe Bellenger, Hubert Cabana

Imad E. Touahar : étudiant à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie civil

Lounès Haroune : étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de sciences, Département de chimie

Sidy Ba: étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique

Jean-Philippe Bellenger : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de sciences, Département de chimie

Hubert Cabana : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie civil

Date d'acceptation : 31 janvier 2014

État de l'acceptation : version finale publiée le 15 mai 2014

Revue : Science of The Total Environment

Référence : [Touahar *et al.*, 2014] <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.132>

Titre français : Caractérisation d'une combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées de laccase, de versatile peroxydase, et de glucose oxydase et son utilisation pour l'élimination de produits pharmaceutiques

Contribution au document :

Cet article contribue au mémoire en montrant la réalisation expérimentale effectuée. Il décrit la méthodologie expérimentale employée pour la synthèse du biocatalyseur ainsi que son application pour le traitement de produits pharmaceutiques dans l'eau. Les résultats obtenus en appliquant cette méthodologie y sont aussi exposés, analysés, comparés à la littérature, et discutés.

L'auteur a contribué à la réalisation de cet article par la réalisation des essais en laboratoire, incluant la préparation des enzymes, et la production du biocatalyseur, leur caractérisation, ainsi que les essais d'éliminations des produits pharmaceutiques. De plus, l'analyse des résultats issus des expériences, la compilation des données et leur mise en forme ont aussi été réalisées par l'auteur. Enfin, la rédaction de cet article, incluant la comparaison à la littérature et sa mise en forme, ont essentiellement été réalisés par l'auteur de ce mémoire.

Résumé français :

Dans le but de transformer une vaste gamme de produits pharmaceutiques (PhACs), les trois enzymes oxydatives laccase (lac) de *T. versicolor*, versatile peroxydase (VP) de *B. adusta* et glucose oxydase (GOD) d'*Aspergillus niger*, ont été réticulées de manière concomitante après avoir été précipitées produisant ainsi une combinaison d'agrégats d'enzymes réticulées (combi-CLEA), à la fois versatile et impliquant une réaction enzymatique en cascade. À partir des activités initiales, environ 30% de l'activité de la laccase a été récupérée dans le combi-CLEA, tout en maintenant 40 % de chacune des activités initiale de GOD et de VP. Le combi-CLEA a montré de bonnes performances dans des conditions proches de celles des eaux usées réelles (pH neutre et température modérée) ainsi qu'une bonne capacité à résister à des conditions dénaturantes telles qu'une haute température (60 °C) et un bas pH (3). Des expériences ont été réalisées en batch afin de déterminer la capacité des enzymes libres à dégrader un cocktail de PhACs, principalement

dans des eaux usées synthétiques contenant les PhACs suivants: acétaminophène, naproxène, acide méfénamique, indométacine, diclofénac, kétoprofène, caféine, diazépam, ciprofloxacine, triméthoprime, fénofibrate et bézafibrate, carbamazépine et son sous-produit 10-11 époxy-carbamazépine. Une élimination notable (80 %) a pu être obtenue pour les 5 premiers composés cités. Aussi, la capacité de traitement du combi-CLEA a été testée en présence et en absence de peroxyde d'hydrogène, de glucose, et de sulfate de manganèse. Globalement, la VP a montré une capacité de traitement sur un plus large spectre que la laccase. Cela dit ces capacités épuratoires ont été atteintes sous des conditions plus spécifiques, tandis que le combi-CLEA semblait détenir les avantages tant de la laccase que de la VP. Finalement, l'élimination de produits pharmaceutiques présents dans l'effluent d'une station d'épuration a été étudiée de manière marginale. Excepté l'acétaminophène, pour la plupart des produits pharmaceutiques ciblés, les concentrations retrouvées dans cet effluent étaient inférieures à la limite de détection (20 ng/L). Son élimination par combi-CLEA a pu atteindre 25%.

3.2 Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals

3.2.1 Abstract

In order to transform a wide range of pharmaceutically active compounds (PhACs), the three oxidative enzymes laccase (Lac) from *T. versicolor*, versatile peroxidase (VP) from *Bjerkandera adusta* and glucose oxidase (GOD) from *Aspergillus niger* were concomitantly cross-linked after aggregation making a combined cross-linked enzyme aggregate (combi-CLEA) that was versatile and involved in an enzymatic cascade reaction. From the initial enzymes about 30% of initial laccase activity was recovered along with 40% for each of VP and GOD. The combi-CLEA showed good results in conditions close to those of real wastewater (neutral pH and medium temperature) as well as a good ability

to resist to denaturing conditions such as high temperature (60 °C) and low pH (3). Batch experiments were realized to test the free enzyme's ability to degrade, a PhACs cocktail, mainly in a synthetic wastewater containing acetaminophen, naproxen, mefenamic acid, indometacin, diclofenac, ketoprofen, caffeine, diazepam, ciprofloxacin, trimethoprim, fenofibrate and bezafibrate, carbamazepine and its by-product 10-11 epoxy-carbamazepine. High removal was achieved (more than 80%) for the five first compounds. Then, the elimination ability of the combi-CLEA with or without hydrogen peroxide, glucose or manganese sulfate was determined. Globally, our results demonstrated that VP has a wider removal spectrum than Lac. These removal features are enhanced under more specific conditions, whereas the combi-CLEA combined advantages of both VP and laccase. Finally, the elimination of PhACs in a municipal wastewater treatment plant effluent using the combi-CLEA was marginally investigated. Concentrations of most of the selected PhACs were below the limit of quantification (lower than 20 ng/L) except for acetaminophen. Its combi-CLEA-mediated removal reached up to 25%.

Keywords:

Laccase; Versatile peroxidase; Glucose oxidase; Combi-CLEA; Pharmaceutically active compounds; Wastewaters.

3.2.2 Introduction

In the last decades, the aging populations of western countries have induced a significant increase in the consumption of pharmaceutically active compounds (PhACs). These PhACs represent a new challenge to environmental quality, as many of them are found in wastewater treatment plants (WWTPs) at concentrations ranging from ng/L to µg/L and are readily transferred to the environment [Celiz *et al.*, 2009; Khetan *et Collins*, 2007; Verlicchi, Al Aukidy *et al.*, 2012b]. The general conclusion is that since WWTPs fail to remove most PhACs from wastewaters, these molecules easily enter the environment through treated water discharges [Khetan *et Collins*, 2007; Verlicchi *et al.*, 2012]. Major efforts have been deployed to characterize the dynamics (e.g. transfer, interactions with natural matrices) and fate of PhACs in the environment and to evaluate their potential side

effects on the biosphere (ecotoxicology) and human health [Pomati *et al.*, 2008; Celiz *et al.*, 2009].

Enzymes have attracted interest as a way to deal with the PhACs removal issue. Oxidative enzymes, namely laccase (Lac, EC 1.10.3.2), manganese peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), lignin peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) and versatile peroxidase (VP, EC 1.11.1.16), secreted, among others, by wood degrading fungi, have shown great potential for the transformation of a wide range of PhACs and other organic contaminants, such as pesticides and chemicals with known or suspected endocrine disrupting properties [Davila-Vazquez *et al.*, 2005; Taboada-Puig *et al.*, 2011a]. Both Lac and VP belong to the lignin modifying enzymes (LME) family. Lac is a multi-copper containing enzyme that can oxidize phenolic substrates in the presence of dioxygen [Wong, 2009], and non-phenolic substrates in the presence of mediators such as 1-hydroxibenzotriazole (HOBt) [Srebotnik *et al.*, 2000]. In contrast, LiP, MnP and VP belong to the heme peroxidases family requiring the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂) for their oxidation of substrates [Wong, 2009]. In the presence of hydrogen peroxide, LiP oxidizes substrates containing methoxybenzene groups such as veratryl alcohol generating cation radicals involved in the carbon-carbon and ether bonds cleavage in lignin model compounds [Tien *et al.*, 1988]. In contact with hydrogen peroxide and Mn(II), MnP is able to oxidize a wide range of organic compounds [Glenn *et al.*, 1986]. The transformation process is based on the conversion of Mn(II) into Mn(III). The Mn(III) form complexes with α -hydroxy acids and oxidizes lignin-like substrates [Glenn *et al.*, 1986]. Finally, VP shows the potential to oxidize phenolic and non-phenolic substrates, exhibiting both LiP and MnP oxidative properties. These oxidative properties can be expressed either in the presence or in the absence of manganese but require the presence of hydrogen peroxide in both cases [Rodríguez *et al.*, 2004].

Lac has shown the ability to transform PhACs such as diclofenac [Sathishkumar *et al.*, 2012], tetracycline [Suda *et al.*, 2012] and mefenamic acid [Margot *et al.*, 2013]. Since the discovery of VP [Martinez *et al.*, 1996], interest towards enzymes as elimination enhancing agents has emerged recently, hence, to date, only few studies have considered VP as an eliminative agent for PhACs. Meanwhile, a recent study has shown that sulfamethoxazole and naproxen could be removed using VP [Eibes *et al.*, 2011]. Moreover, since VP shows

the oxidative activities of both LiP and MnP, it is hypothesized that VP might transform the same compounds as these enzymes. For instance, LiP was responsible for complete removal of diclofenac [Zhang et Geissen, 2010] and according to Wen *et al.* [2009, 2010], MnP and Lip were both able to efficiently remove tetracycline.

Complementarily to the presence of VP, glucose oxidase (GOD, EC 1.1.3.4) is required to provide hydrogen peroxide that allows the expression of both LiP and MnP activities. GOD is able to transform glucose into gluconic acid and hydrogen peroxide [Bankar *et al.*, 2009]. The transformation of phenolic or non-phenolic substrates by Lac and VP leads to the formation of oligomers or quinones [Wong, 2009]. The transformation products generated by the action of these enzymes are typically less toxic to organisms or show lower biological activity (e.g. endocrine disruptions) than the parent compounds [Arboleda *et al.*, 2013; Cabana *et al.*, 2007a].

Due to substrate limitations, changing operational conditions (e.g. presence / absence of manganese) and the synergistic action that results from the combination of different enzymes, it is preferable to use multiple enzymes to eliminate a wide range of PhACs in municipal wastewaters [Rodríguez *et al.*, 2004]. It is therefore necessary to develop biocatalysts that combine the enzymes involved in the transformation of contaminants with different chemical structures and under variable operating conditions [Ammann *et al.*, 2013; Taboada-Puig *et al.*, 2011a; Van Aken *et al.*, 2000]. These versatile biocatalysts can be constituted of oxidative (e.g. laccase, peroxidases) and supporting enzymes (e.g. glucose oxidase) that interact in a cascade of reactions [Sheldon, 2011; Sheldon, 2012; Van Aken *et al.*, 2000].

Even though free enzymes may be efficient biocatalysts for the removal of PhACs, their utilization involves some limitations. The solubility of the enzymes in the aqueous phase makes them difficult to maintain in a reactor. In addition, their lack of stability towards chemicals or thermal denaturation reduces their potential for the development of bioprocesses. The latter greatly affects the cost of such enzyme-based [Strong et Claus, 2011]. The use of insolubilized laccase facilitates the recovery of both enzyme and product and allows multiple reuse of the enzyme [Park *et al.*, 2012; Sangeetha *et al.*, 2008], continuous operation of enzymatic processes [Cabana *et al.*, 2009], rapid termination of

reactions and greater variety of bioreactor designs [Cabana *et al.*, 2009; Taboada-Puig *et al.*, 2011a].

Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) are a rapid, gentle and cost effective method for the production of carrier free insolubilized catalytically active enzymes [Sheldon, 2011; Cao *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2003]. The insolubilization of enzymes as CLEAs consists of a two step process: the precipitation of the active protein followed by its cross-linking. The resulting insolubilized biocatalysts have shown a high enzyme activity per unit volume [Tanaka *et al.*, 2003] with improved properties (eg. stability, kinetics, reusability, etc.) compared to their free counterparts [Ju *et al.*, 2013; Reshmi and Sugunan, 2013].

In addition to the production of CLEAs composed of single enzymes, a new technique has been recently developed, involving concomitant insolubilization and cross-linking of two or more enzymes/proteins producing a new type of biocatalysts called combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs) [Mateo *et al.*, 2006]. This innovative approach adds two important arguments for the use CLEA technology. Firstly, one-pot multistep catalytic cascade process is made easier thanks to combi-CLEAs. Individual CLEAs of these enzymes show improved conversion yields than their free counterparts, and the combi-CLEAs demonstrate even better catalytic properties [Mateo *et al.*, 2006]. Secondly, catalysis of multiple non-cascade reactions has also been reported recently. The aim of such combination is the production of multi-purpose biocatalyst [Dalal *et al.*, 2007]. Versatility against environmental conditions (pH, temperature, etc.) may also be improved using this approach; by combining enzymes with different properties and similar substrates. The present work is focused on versatility towards substrates, coupled with a cascade reaction process, thus combining the two approaches.

The main concern of this work was to overcome the limitations of free enzymes in PhACs treatment by making a stable and versatile biocatalyst able to concomitantly remove a wide range of structurally different PhACs in aqueous media and wastewater. Interest has been given to some representative PhACs including nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) such as acetaminophen, naproxen, mefenamic acid, ketoprofen, indometacin and diclofenac. Caffeine was studied as a stimulant drug. In addition to the anticonvulsant and mood-stabilizing drug carbamazepine and its by-product Carbamazepine 10,11-Epoxyde (carbamazepine-E), the benzodiazepine drug diazepam was tested. Same interest has been

given to both antibiotics ciprofloxacin and trimethoprim, and finally two fibrate drugs: fenofibrate and bezafibrate. The objectives of the present study were to, first, insolubilize Lac, VP and GOD as combi-CLEA to form a stable and versatile biocatalyst with expanded substrate spectrum using the biocompatible and biodegradable natural polymer, chitosan [Krajewska, 2004] with *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC) as the cross-linking agent. Secondly, the combi-CLEAs were characterized with respect to pH, temperature, kinetics, and stability against denaturation. Then, free enzymes were tested against solutions of PhACs in different conditions. Finally, the combi-CLEAs of these enzymes were applied to aqueous solutions and municipal wastewaters to eliminate several PhACs with different chemical structures and biological functions.

3.2.3 Material and Methods

A. Enzymes and reagents

Versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* (VP, EC 1.11.1.16; 4.3 U/mg) was purchased from JenaBios (Jena, Germany). Laccase from *T. versicolor* (Lac, EC 1.10.3.2; 22.4 U/mg), glucose oxidase from *Aspergillus niger* (GOD, EC 1.1.3.4; 181.3U/mg) and all other reagents were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). All chemicals were of analytical grade (or of the highest purity available). All solvents were HPLC grade.

B. Activity assays

Lac activity was measured by following the conversion of 0.5 mM 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) to its radical cation (ABTS^{•+}) at 420 nm ($\epsilon_{\max} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 0.1 M citric acid/ 0.1 M disodium hydrogen phosphate buffer at pH 3 [Bourbonnais et Paice, 1990]. Lignin peroxidase activity was determined through the oxidation of 2 mM veratryl alcohol at 310 nm ($\epsilon_{\max} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 0.1 M tartrate buffer at pH 3 in the presence of 0.4 mM H₂O₂ [Tien et Kirk, 1988]. Mn-oxidizing peroxidase (MnP) activity was calculated by measuring Mn³⁺-tartrate complexes at 238 nm ($\epsilon_{\max} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) generated by the reaction of 7 mM MnSO₄ in 0.1 M tartrate buffer at pH 5, in the presence of 0.05 mM H₂O₂ according to a modified method of Martinez et al. [1996].

GOD activity was qualitatively estimated through the increase of Mn-oxidizing activity of VP. Since VP exhibited low affinity towards veratryl alcohol, a substrate of lignin peroxidase [Taboada-Puig et al., 2011b], Mn-oxidizing activity was selected to estimate VP activity as free enzyme or combined in a combi-CLEA. One unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme that forms 1 μmol of product per min. Activity measurements were carried on a 96 wells plate using a double-beam UV-Vis spectrophotometer (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Results report the mean of triplicates.

Throughout the paper, combi-CLEA-Lac refers to the laccase activity of the combi-CLEA and combi-CLEA-VP to its VP content as Mn-oxidizing peroxidase activity.

C. Preparation of Combi-CLEAs and activity yields

Combi-CLEAs of Lac, VP and GOD were produced using a protocol adapted from Arsenault et al. [2011] by successive aggregation and cross-linking of the enzyme. First, the three stock solutions of free enzymes consisting of 40 U/mL of Lac, 4 U/mL of VP and 181.3 U/mL of GOD respectively were mixed, and then precipitated with ammonium sulfate to obtain a 500 g/L solution, precipitation lasted 30 min at room temperature. Cross-linking was then started by adding 1.5 g/L chitosan, 0.1 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) as cross-linking agent in a 0.2 M acetate buffer at pH 5, to make a 10 mL solution of 4 U/mL of Lac, 1 U/mL of VP and 18.13 U/mL of GOD. The solution was then stored for 48h at 4 °C. The solution was centrifuged at 10 000g for 5 min at 4 °C, and the supernatant was withdrawn. The aliquot was washed with Milli-Q water. After repeating this operation three times, the particles were re-suspended in a 10 mL solution of 0.2 M acetate buffer at pH 5.

Activity yields have been estimated by dividing the total amount of activity units of the generated combi-CLEA by the total amount of activity units of the free enzyme initially used.

D. Determination of kinetic parameters

For Lac activities, kinetic parameters were estimated at 20°C using ABTS as a substrate, its concentration varying from 0.05 to 2 mM in a 0.1 M citric acid/ 0.1 M disodium hydrogen

phosphate buffer at pH 3. Mn-oxidizing peroxidase activity was measured as the formation of Mn^{3+} -tartrate complexes in a 0.1 M tartrate buffer at pH 5. Considering Mn(II) as a substrate, its concentration was varied between 0.035 and 122.5 mM, in a 0.05 mM H_2O_2 solution. Experiments focusing on H_2O_2 as a substrate were carried out in a fixed concentration of 7 mM Mn(II) with H_2O_2 concentrations ranging between 0.01 and 1 mM. Kinetic constants were calculated by fitting a curve of the reaction rate *versus* the substrate concentrations using Matlab R2006a [MathWorks, Natick, MA].

E. Determination of pH and temperature optima

The effect of pH on Lac activity was determined in buffer solutions varying from pH 2 to 8. For pH varying from 2 to 5.5 citric acid (0.1 M)/ disodium hydrogen phosphate buffer (0.1 M) was used and for pH 6 to 8 phosphate buffer (0.1 M) was used. The Mn-oxidizing activity of VP was determined for pH 2 to 5.5 in 0.1 M tartrate buffers. The thermal effect was determined by varying temperature from 20 °C to 65 °C and monitoring the activity change of the biocatalysts at each temperature in pH 3 citric acid (0.1 M)/ disodium hydrogen phosphate (0.1 M) buffer solutions. The results for optimum temperature and pH were given in relative form with the highest value being 100% relative activity.

F. Stability of Combi-CLEAs against thermal denaturation

Stability of biocatalyst was determined by incubating 750 μL of free enzymes and combi-CLEA solutions at 40°C in 250 μL of a 0.1 M citric acid/ 0.1 M disodium hydrogen phosphate buffer at pH 3. Activities were estimated after 24 hours of incubation.

G. Enzymatic treatment of pharmaceuticals in wastewaters

Two different types of pharmaceuticals solutions were used to determine the potential of free enzymes and combi-CLEAs for the elimination of PhACs.

A sample of municipal wastewater (MWW, pH 7.3) was collected on September 2012 from the influent of WWTP in Magog [QC, Canada] and was analyzed for the presence of acetaminophen, caffeine, naproxen, carbamazepine, mefenamic acid, carbamazepine-E, ketoprofen, diazepam, trimethoprim, ciprofloxacin, indometacin, fenofibrate, bezafibrate

and diclofenac using UPLC-MS/MS analysis, as described in the Supplementary Data file. Milli-Q ultrapure water (mLQW) (18.2 M Ω ·cm at 25 °C, TOC < 10 ppb) from our laboratory was also used for optimization purpose before treatment of real wastewaters. mLQW was spiked with 1 mg/L of each of the aforementioned pharmaceuticals, providing a mixture of all these compounds.

Treatment of the PhACs in both mLQW and MWW was performed in batch mode at 20 °C in 125 mL Erlenmeyer flask with orbital shaking at 150 rpm for 5 hours unless specified otherwise, pH was adjusted to 5 using 1 N NaOH and the final volume of samples was 10 mL.

Biocatalysts (free enzymes or combi-CLEA) were added to each of the aforementioned solutions to obtain final Lac and Mn-oxidizing activities of 750 U/L and 250 U/L, respectively. For blanks and controls, the biocatalyst solutions were replaced by mLQW.

Results are expressed as the difference between the elimination observed in each sample and the decrease in concentration observed for the corresponding control. No more than 20% loss of the initial concentration was observed in the control experiments. Tests were done in duplicates.

H. Extraction of pharmaceuticals

The enzymatic reactions were stopped by successive acidification, using 1 N HCl, followed by addition of 4 g of MgSO₄ and 1 g of NaCl, and thorough mixing. Then, 10 mL of ethyl acetate were added and the mixture was vortexed for 2 min. After decantation and phase separation, the organic phase was filtered on a Na₂SO₄ bed that was washed with ethyl acetate in order to maximize the recovery of the organic phase. Organic phase was then gently transferred without any particle or drop of water to glass vial and subsequently evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen prior to re-suspension in 1 mL of a solution of water-methanol 50-50% (v/v) and 0.1% (v/v) formic acid. The mixture was then sonicated for 5 min and filtered through 0.2 μ m PTFE membrane filters before transfer into UPLC vial for quantitative analysis. Samples were stored at +4°C until analyze by UPLC/MS.

More details about the analyses of the selected PhACs are provided in the Supplementary Data (Annexe B) and the method used was described by Ba et al. [2014].

3.2.4 Results and discussion

A. Characterization of combi-CLEA

a. Combi-CLEA production

Co-aggregation and cross-linking of Lac, VP and GOD was well achieved. The activity yields obtained were 27.7% for Lac, 38.9% for VP and 36.4% for GOD. Specific activities of combi-CLEAs were 14.9 U/g as combi-CLEA-VP and 37.5 U/g as combi-CLEA-Lac. The apparent activities of these combi-CLEAs are in the same range as previous aggregations and cross-linkings using different enzymes and the same cross-linking agents (chitosan, EDAC) [Ba et al., 2012] or others such as glutaraldehyde [Vafiadi et al., 2007, D'Annibale et al., 1999]. Such low yields may be explained by the different nature of the three enzymes and their activities depending on the environmental conditions such as pH and temperature.

b. Kinetic parameters

As shown in Table 3.1, kinetic tests for ABTS oxidation by free Lac and the combi-CLEA resulted in relatively close K_m values (287 μM and 216 μM respectively) similarly to previously obtained results [Hassani et al., 2013]. Results show that the insolubilized enzyme exhibited a slightly higher affinity towards ABTS according to its lower K_m value. Chitosan may be responsible for this increase of affinity as it can induce hyperactivation of laccase according to previous results reported by Cabana et al. [2011]. Although higher turnover number was obtained for free Lac (8.68 $\mu\text{mol/s/mg}$), the combi-CLEA (3.38 $\mu\text{mol/s/mg}$) had similar laccase biocatalytic efficiency (0.02 L/s/mg and 0.03 L/s/mg, respectively).

Tableau 3.1 Apparent Michaelis-Menten parameters for free Lac, VP and combi-CLEA for the oxidation of their respective substrates at 20°C at pH 3 and 5 for Lac and Mn-oxidizing activities, respectively

Substrate	Free Lac			Free VP			Combi-CLEA		
	K_m (μM)	Kcat ($\mu\text{mol/s/mg}$)	Kcat/ K_m (L/s/mg)	K_m (μM)	Kcat ($\mu\text{mol/s/mg}$)	Kcat/ K_m (L/s/mg)	K_m (μM)	Kcat ($\mu\text{mol/s/mg}$)	Kcat/ K_m (L/s/mg)
ABTS	287 ± 39	8.68 ± 0.66	0.03	-	-	-	216 ± 24	3.38 ± 0.32	0.02
H₂O₂	-	-	-	5.22 ± 0.42	6.3 ± 0.06	1.21	30.6 ± 14.9	0.104 ± 0.017	0.003
Mn(II)	-	-	-	513 ± 88	5.28 ± 0.15	0.01	381 ± 149	0.018 ± 0.012	0.00005

When considering manganese as a substrate, higher affinity was observed for the combined biocatalyst; its K_m value (381 μM) was notably lower than its free counterpart (513 μM). Meanwhile, the free enzyme had better biocatalytic efficiency and turnover numbers (0.018 $\mu\text{mol/s/mg}$ and 0.00005 L/s/mg for combi-CLEA and 5.28 $\mu\text{mol/s/mg}$ and 0.01 L/s/mg for free VP). The same observations regarding the biocatalytic efficiency and turnover number may be drawn while using hydrogen peroxide as a substrate (0.104 $\mu\text{mol/s/mg}$ and 0.003 L/s/mg for combi-CLEA and 6.3 $\mu\text{mol/s/mg}$ and 1.21 L/s/mg for free VP); even K_m value is higher for the combi-CLEA (149 vs. 88 for free VP).

c. Influence of the pH

Figure 3.1a presents the activity profile of both free laccase and combi-CLEA-Lac as a function of pH. As shown in this figure, a similar trend was observed for both, free and combined, forms of enzyme. Laccase activity increased with pH to an optimum value and then decreased with further increase of the pH. The highest activity of soluble Lac was obtained at pH 4.5, whereas combined Lac in the combi-CLEA showed a shift in the pH optimum to a lower value, its activity optimum was found at pH 3 with a local optimum at pH 4.5 that exhibited 70% of the maximal activity. Other studies have also reported a shift in the pH optimum [Ba et al., 2012, Hassani et al., 2013] for Lac insolubilized using chitosan as the cross-linking agent but in these cases, the pH optimum was moved to a

higher value. In the present case, a co-insolubilization with two other enzymes may explain the difference between these two shifts, as the microenvironment of the enzyme changes more importantly in presence of other proteins that are co-aggregated and cross-linked.

On the other hand, Figure 3.1b shows that VP exhibited the same trend as that observed for CLEAs made of other enzymes [Talekar *et al.*, 2013b]. In fact, pH optimum of the free VP was estimated as pH 4.5, whereas the co-insolubilized form showed highest activity at pH 5.5. Such a shift is usually associated with the linking of the coupling agent to the superficial amino groups of the enzyme, leaving only acidic groups on the surface of the protein, thus elevating the optimum pH [Sangeetha and Abraham, 2008].

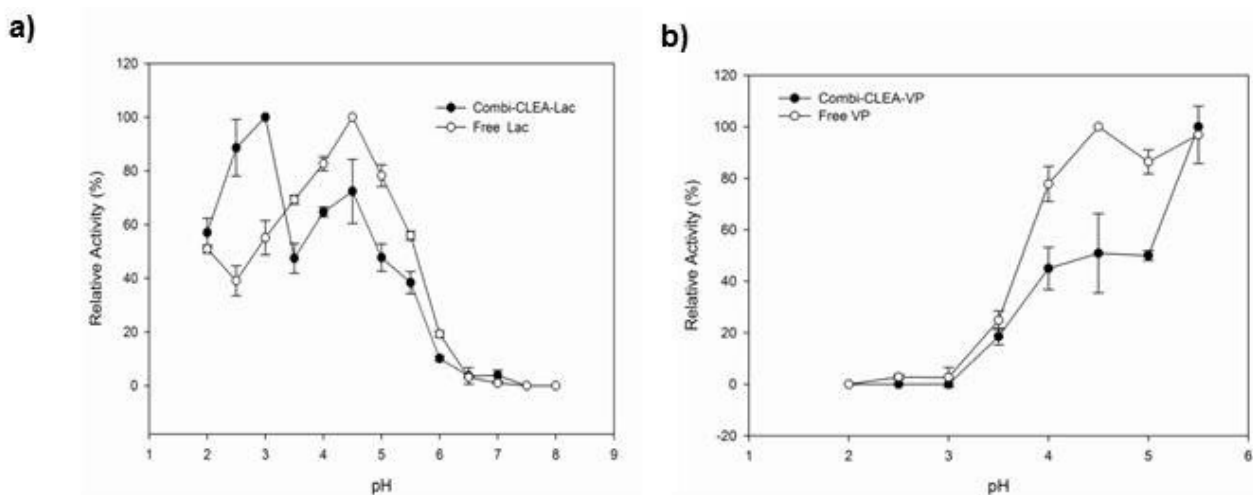


Figure 3.1 Effect of pH on catalytic activities a) laccase activity of the (●) combi-CLEA and (○) free Lac b) Mn-oxidizing activity of the (●) combi-CLEA and (○) free VP.

d. Influence of the temperature

Free Lac and combi-CLEA-Lac presented similar trends with regards to the effect of temperature for both biocatalysts. Activity tended to rise until it reaches its peak before decreasing. For the free Lac, the highest activity was obtained in the range of 30 to 40 °C, whereas for combi-CLEA-Lac it occurred between 30 and 35 °C (see Figure 3.2a). Optimum activity at a lower temperature than their free counter part for the combined form of Lac can be explained by the fact that the enzymes surrounding laccase particles, in addition to the chitosan, may induce an alteration of its initial tertiary structure by reducing

its conformational flexibility [Talekar *et al.*, 2013b], hence, in this form, the enzyme might take and keep the required conformation at a lower temperature.

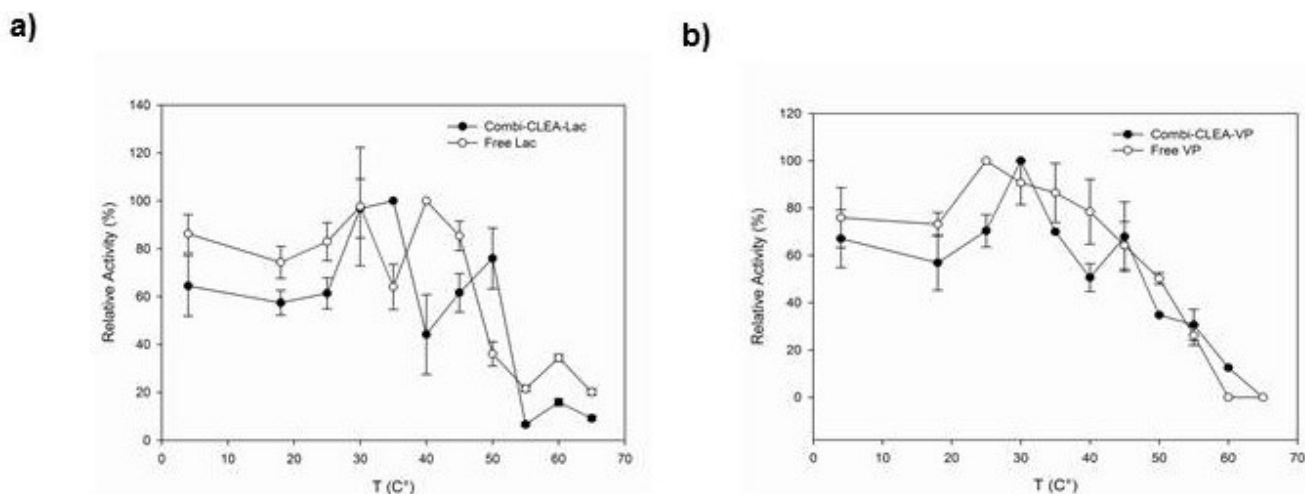


Figure 3.2 Effect of temperature on catalytic activities, a) laccase activity of the (●) combi-CLEA and (○) free Lac b) Mn-oxidizing activity of the (●) combi-CLEA and (○) free VP.

Considering Mn-oxidizing activity, the same general trend was observed as shown in Figure 3.2b. Activity increased with the increase in temperature to reach an optimum before decreasing drastically until no activity was detected. In the case of free VP, the optimum temperature was 25 °C, and that optimum was shifted to 30 °C for combi-CLEA-VP. This could be due to the covalent linking of enzymes that might reduce the specific flexibility of the enzyme [Talekar *et al.*, 2013b]. Moreover, activity of the combined VP remained relatively stable until 65 °C, while the free VP exhibited no residual activity beyond 60 °C, which shows that combi-CLEA-VP was more resistant to higher temperature than its free counterpart.

e. Stability against denaturing conditions

Insolubilization of the enzymes as combi-CLEA enhanced their stability against low pH (pH 3) and high temperature (40°C) as shown in Figure 3.3. In fact, exposing both free and co-insolubilized enzymes to the same denaturing conditions for 24h left only 10% of the

initial Lac activity of the free enzyme while the combi-CLEA retained more than 40% of its initial activity. A similar trend, though not as obvious, can be observed for VP, as its free form kept 25% of its original activity after a 24h exposition to the denaturing conditions, whereas the combi-CLEA-VP retained more than 35% of its initial activity. Such results confirm the utility of co-insolubilization as a way to protect the enzyme from harsh conditions [Cabana *et al.*, 2007a, Arsenault *et al.*, 2011, Talekar *et al.*, 2013a].

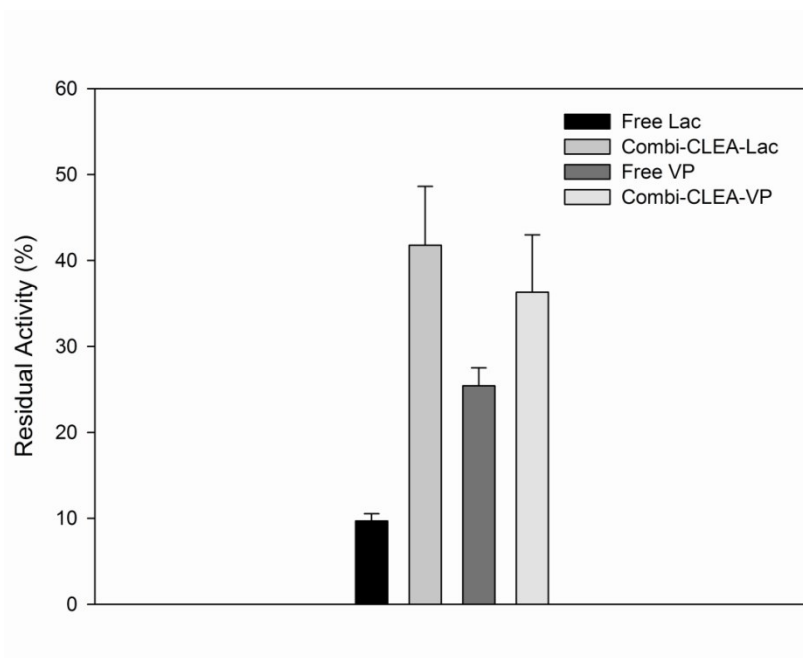


Figure 3.3 Residual activity of Lac, combi-CLEA-Lac, VP and combi-CLEA-VP after 24h exposition to denaturing conditions pH 3 and 40 °C.

B. Elimination of PhACs

a. Elimination of PhACs using free enzymes

Figure 3.4 shows the elimination efficiency of the free enzymes, alone or combined, for the removal of the selected PhACs in solution. Free Lac was capable of removing more than 95% of acetaminophen, mefenamic acid and diclofenac after 14h of contact time, whereas naproxen, ketoprofen, indometacin, fenofibrate and bezafibrate were incompletely transformed (20-40%). Additionally, caffeine, carbamazepine, diazepam, trimethoprim and ciprofloxacin were not significantly removed. These results are in accordance with those obtained in previous studies as shown in Table 4.1. For instance, both mefenamic acid and diclofenac have been removed efficiently by Margot *et al.* [2010] using *T. versicolor* laccase. Similar results were obtained using an immobilized form of this enzyme for the

removal of acetaminophen [Georgieva et al., 2010]. The removal of non-phenolic PhACs such as carbamazepine and diazepam using laccase has already been reported using well-documented mediators [Hata et al., 2010; Ostadhadi-Dehkordi et al., 2012]. Meanwhile, the absence of specific laccase mediators in this case may be compensated by the presence of phenolic PhACs in solution involved in cross-coupling reactions with non-phenolic PhACs. Indeed, previous studies have demonstrated that phenol containing chemicals, such as acetaminophen, form free radicals under laccase treatment. These radicals are then turned into oligomers through cross-coupling reactions [Lu et al., 2009; Ba et al., 2014]. These free radicals can interact with electron donor groups present on non-phenolic PhACs. The latter form of the compound might react with the other PhACs through cross-coupling reactions or as a common mediator of laccase, such as ABTS. This mediator is turned into a radical (ABTS•) and contributes to the oxidation of other compounds including PhACs [Lloret et al., 2013]. Radicals can interact with electron donating functional groups, especially the strong ones, such as amine. Consequently, PhACs containing electron donating groups that are not recognized as a substrate by the enzyme used, such as carbamazepine which contains an amide group [Yang et al., 2013a], can interact with the phenoxy radicals generated and undergoes oligomerization.

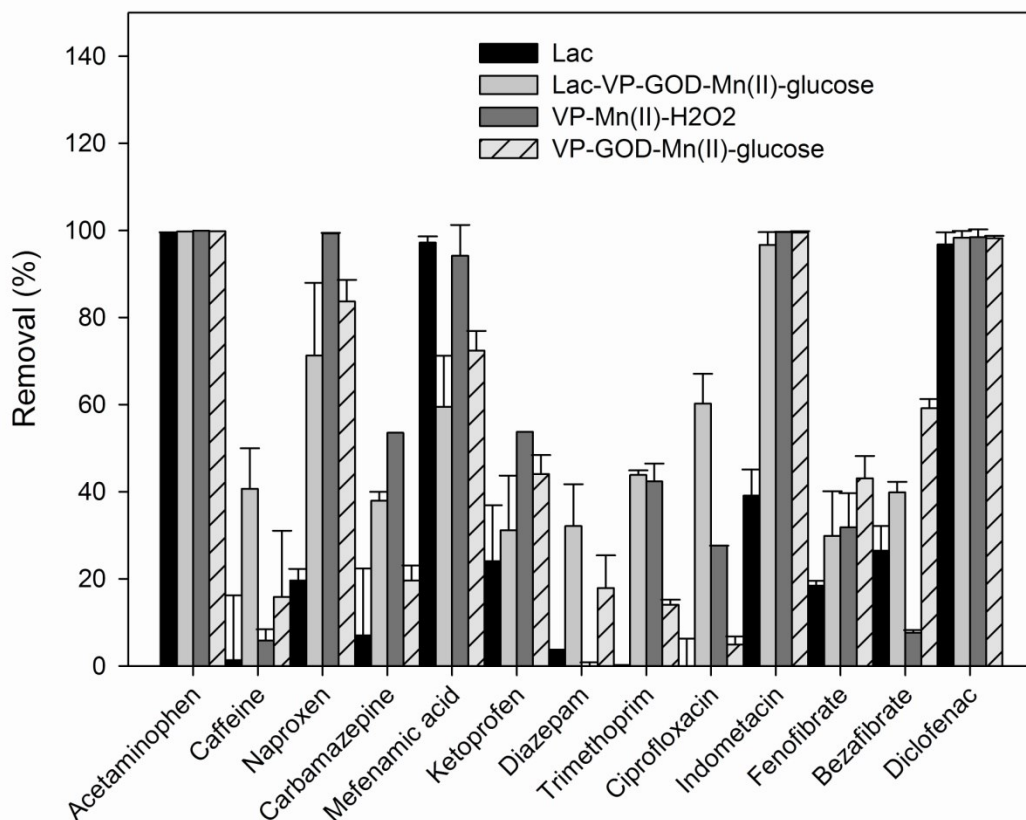


Figure 3.4 Removal of PhACs using free Lac, VP and GOD (alone or in combination) in the presence/absence of glucose (0.7 mM), peroxide (0.1 mM) and manganese sulfate (7 mM) for a contact time of 14 h at room temperature and pH 5.

Supporting observations have been made in a study involving laccase, acetaminophen and natural organic matter [Lu and Huang, 2009]. In that case, oligomerization of acetaminophen was not observed, whereas cross-coupling of acetaminophen and natural organic matter, and self-coupling of the latter moieties seemed to occur [Lu and Huang, 2009b].

For both VP-mediated treatments (VP with Mn(II) and H₂O₂, and VP-GOD with Mn(II) and glucose), complete or high removal of acetaminophen, naproxen, diclofenac, indometacin and mefenamic acid was achieved. However, caffeine, diazepam, ciprofloxacin and both fibrate drugs were poorly to not transformed by VP alone. Concerning carbamazepine, ketoprofen and trimethoprim, free VP was able to remove about half of their initial concentration (54, 54 and 42%, respectively). Similar extents of

elimination were obtained for fenofibrate (43%), ketoprofen (44%) and bezafibrate (59%) using the VP-GOD pair. This same pair was not able to decrease caffeine (16%), carbamazepine (20%), diazepam (18%), trimethoprim (14%) and ciprofloxacin (5%) concentrations efficiently.

As a general tendency, for the treatments involving free VP, H₂O₂ and Mn(II) and those containing free VP and GOD, Mn(II) and glucose, the same compounds transformed by laccase were also removed from the solution in addition to diazepam (18% for VP-GOD combination). The removal efficiencies of these compounds were different depending on the enzyme used. Lac was more efficient than VP for the removal of mefenamic acid and bezafibrate. Other studies carried using VP from *Bjerkandera adusta* for the elimination of PhACs have shown similar results for both diclofenac (100%) and naproxen (80%), whereas no elimination of carbamazepine was reported [Eibes et al., 2011]. In the present study, complete removal of diclofenac was realized for all treatments, while effective elimination of naproxen and more than 50% removal of carbamazepine were obtained using VP, manganese sulfate and hydrogen peroxide.

In addition, the combinations involving only VP as a LME were able to transform 42% of trimethoprim and 28% of ciprofloxacin.

Even though VP and VP-GOD combinations seem more efficient than Lac alone, the required presence of manganese sulfate and hydrogen peroxide can be considered a major limitation. For this reason, more interest was given to the association of the three enzymes in their free form (see Figure 3.4). The use of this combination gave the best elimination results, removing as much as the previous combinations and even more in some cases. For each compound, the results of this combination and the best ones obtained using other combinations were compared. For acetaminophen, indometacin and diclofenac near complete removal was achieved when the combination of the three enzymes was used. Identical results were obtained for the three other combinations, with the exception of indometacin removal using Lac (39%). Best results using Lac, VP or VP-GOD combination for the removal of caffeine, diazepam and ciprofloxacin were 16, 18 and 28 %, respectively whereas the three-enzymes consortium was able to achieve the double of the aforementioned removals, removing 41, 32 and 60 % of the initial concentration of caffeine, diazepam and ciprofloxacin respectively. Trimethoprim, carbamazepine,

fenofibrate and bezafibrate removals by this combination of enzymes were in the same range as the elimination realized using other combinations. Removals of ketoprofen, naproxen and mefenamic acid showed significant decreases, by more than 20 %, when the three enzymes combination was used. This might be due to the presence of gluconic acid generated by GOD that can react with the carboxylic group of these compounds [Ashry et al., 2007] rendering them inaccessible to the enzymes. This observation can also be made when comparing the elimination of these PhACs by VP alone and VP combined with GOD as the latter provides lower removal of these compounds. These results show the efficiency of these enzymes for the removal of PhACs on one hand, and the advantage of combining them on the other hand.

b. Impact of the operational conditions for the elimination of PhACs with combi-CLEA

i. *Impact of biocatalyst concentration*

Figure 3.5 shows the impact of the biocatalyst concentration on the elimination of the different chemicals. In fact, doubling the concentration once or twice does not seem to increase the elimination of PhACs significantly, except for naproxen (44% vs. 71%), bezafibrate (78% vs. 40%), diazepam (53% vs. 26%) and ketoprofen (67% vs. 36%). In these three cases only, increasing the amount of biocatalyst nearly doubled the removal, for both 55 and 109 mg/mL combi-CLEA. This increase in removal efficiency is not considered sufficient to justify the increase in the amount of biocatalyst required. These results might infer that all the available acetaminophen and easily transformed phenolic compounds, such as acetaminophen, have already been turned into less reactive products (e.g. oligomers) or have been involved into cross-coupling reactions with compounds containing strong electron donating groups. Consequently, higher elimination could hardly be achieved under these conditions. Moreover, the effect of increasing the initial activity of the catalyst can only be observed for compounds that were incompletely removed, such as diazepam or ketoprofen, as shown in Figure 3.5. For compounds such as acetaminophen, higher removal cannot be observed since the removal was already complete when using the initial amount of biocatalyst. However, an increase in the removal of acetaminophen when increasing the initial amount of Lac has been reported elsewhere [Lu et al., 2009].

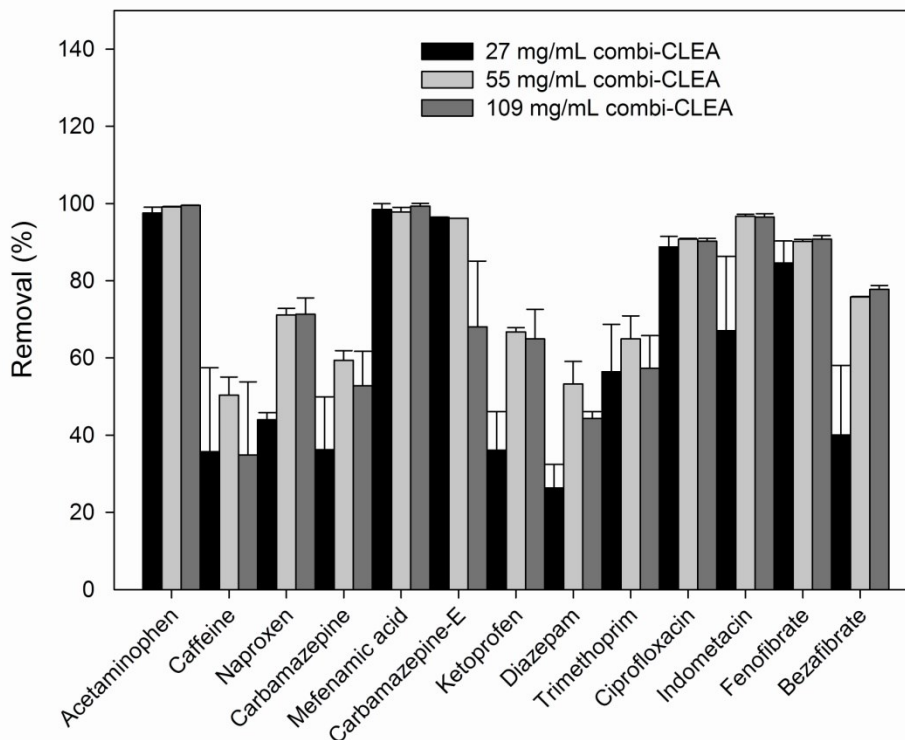


Figure 3.5 Removal of PhACs using different amounts of combi-CLEA in presence of glucose (0.7 mM) and manganese sulfate (7 mM) after a contact time of 5 h at room temperature and pH 5.

ii. Influence of the co-substrate used

Figure 3.6 shows the influence of co-substrates (H_2O_2 or glucose, and Mn(II)) on the removal of the selected PhACs by the combi-CLEA. Through these experiments, it is obvious that the best operational conditions involved the presence of both glucose and manganese sulfate in solution. Under these operational conditions, the removals were higher than those obtained with the other conditions tested for caffeine (46% compared to 25%, in best other situation), carbamazepine (54% vs. 30%), carbamazepine-E (62% vs. 36%), ketoprofen (45% vs. 29%), diazepam (45% vs. 27%), and trimethoprim (57% vs. 40%). In addition, when no VP substrate (Mn(II) or H_2O_2) was added to the combi-CLEA solution, the biocatalyst remained able to remove efficiently acetaminophen and mefenamic acid. In these cases, it is more likely Lac activity that was expressed, as suggested by

previous results obtained for free enzymes showing once again the efficiency of Lac for the removal of these two compounds [Geogieva *et al.*, 2010; Margot *et al.*, 2013]. Interestingly, although laccase alone was unable to transform ciprofloxacin, the combi-CLEA, even in the absence of manganese sulfate and H₂O₂ (whether pure or produced by GOD), was able to remove this antibiotic to a certain extent (39%). This result shows that the activity of VP and Lac is synergistic, and does not rely on neither Mn(II) nor H₂O₂. As illustrated in the case of non-phenolic compounds removed by free Lac, the actual removal of ciprofloxacin may result from the synergistic effect of other compounds mediating this transformation or cross-coupling with these non-phenolic molecules. The fact that this compound was removed in this case and not in the case of free Lac may result from the presence of other reaction products generated by the VP action of combi-CLEAs.

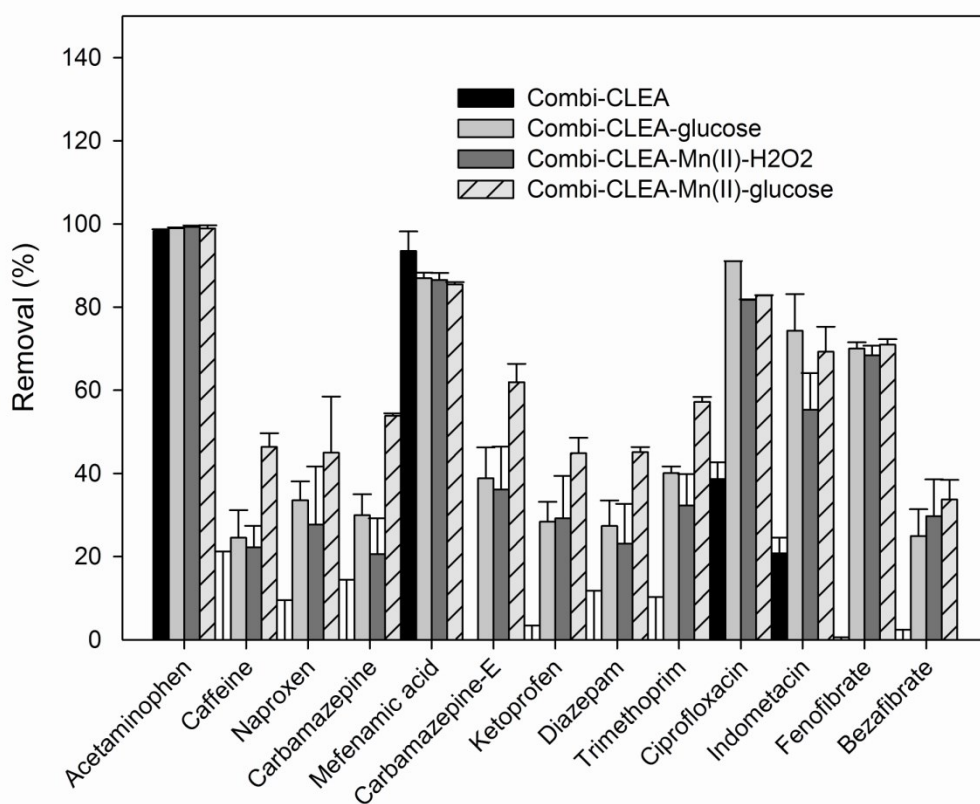


Figure 3.6 Removal of PhACs using combi-CLEA in the presence/absence of glucose (0.7 mM), peroxide (0.1 mM) and manganese sulfate (7 mM) after a contact time of 5 h at room temperature and pH 5.

Adding glucose to the solution, instead of hydrogen peroxide has a significant effect on the removal of PhACs. In fact, for most compounds a difference can be observed advantaging the use of glucose. This might be the result of its higher stability and the continuous production of hydrogen peroxide *in situ* thanks to GOD. This kind of continuous supply of hydrogen peroxide replaces the initial unstable amount of peroxide that is able to cause inhibition at high concentration [Garcia-Ruiz et al., 2012]. One last effect requiring mention is the ability of manganese sulfate to increase the efficiency of the process. The difference between the results obtained for the combi-CLEA in presence of glucose and manganese sulfate, and those obtained in presence of glucose alone; shows a higher efficiency that is due to the Mn-oxidizing activity of VP that requires manganese to exhibit its full potential as Mn-oxidizing activity. However, high removal of ciprofloxacin (91%), indometacin (74%) and fenofibrate (70%) was achieved, due to the ability of VP to transform compounds even in the absence of external mediators such as Mn(II) [Pozdnyakova et al., 2013], in that case, LiP activity may be responsible for such a removal. The greater removal achieved in presence of glucose may also be explained by the higher yield of activity obtained in presence of active GOD [Taboada-Puig et al., 2011a].

iii. Influence of the contact time between biocatalyst and PhACs under different conditions

Figure 3.7 presents the time courses of the removal of PhACs under different operational conditions. Through most of the tested conditions, we can see that after 2 hours of contact between the biocatalyst and the compounds, complete removal has not yet been achieved, except for acetaminophen (about 95% removal after 2h), which is consistent with previous results obtained by Georgieva et al. [2010]. Meanwhile, exposing the PhACs to the degrading potential of the combi-CLEA for 5 hours tends to yield results similar to the final elimination observed after 72h, and this for most of the compounds. For instance, when treated for 5h, 86% of mefenamic acid was transformed, while a 72h treatment resulted in 93% elimination. The same trend was observed for ciprofloxacin (about 80% vs. 90%), fenofibrate (about 70% vs. 85%), trimethoprim (about 50% to 70%), caffeine (about 40% to 60%), ketoprofen (about 40% vs. 60%) and indometacin (about 70% vs. 80%). Removals of

these last two compounds were in the same range as those obtained after a 3h exposure to Lac at 30 °C [Tran *et al.*, 2010]. Meanwhile, for bezafibrate (about 30% vs. 60%) longer exposure time should be considered. In addition, our biocatalysts retained about 20% of their initial activities after 72 h under these conditions (data not shown). Hence, the improved results obtained after 72 h are, most likely, the expression of the remaining activity of the combi-CLEA.

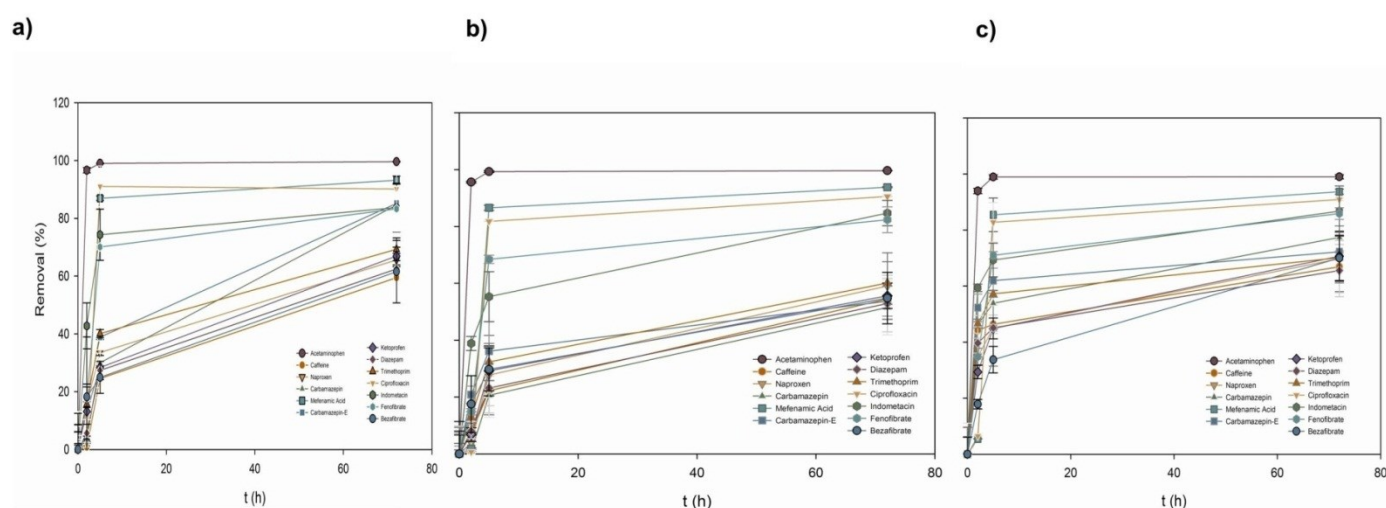


Figure 3.7 Effect of contact time on combi-CLEA efficiency in three different situations involving a) PhACs solution and glucose, b) PhACs solution, manganese sulfate and peroxide, c) PhACs solution, manganese sulfate and glucose, at room temperature and pH 5.

These elimination results also demonstrated the efficiency of the combination of the biocatalyst with glucose and sulfate manganese, since it showed the best elimination results, even during the shortest time course, underlying the higher removal speed of this combination. In the case of naproxen, for example, the presence of the two compounds (glucose and manganese) in addition to the combi-CLEA made possible a 35% removal, whereas both of the other combinations could not reach 15% elimination after 2h. All other compounds, except bezafibrate, follow the same scheme. Meanwhile, after 72h, the association of combi-CLEA with glucose and manganese was able to realize the best removal of bezafibrate. Diazepam is also a good example of such statement, as 40%

removal was obtained in the presence of glucose and manganese, no more than 10% elimination was reached under the other conditions tested. The same observation applies to carbamazepine (46% vs. less than 4%) and its by-product carbamazepine-E (52% vs. 20%).

c. Elimination of PhACs in municipal wastewaters

In order to test the behaviour of the combi-CLEA in real wastewater and determine its oxidative potential, preliminary experiments using Magog WWTP influent were carried out.

Acetaminophen was detected in this influent at a concentration of 5.4 µg/L. Caffeine, carbamazepine and naproxen were detected at concentrations lower than the limit of quantification (20 ng/L). Figure 3.8 shows that elimination occurred after exposing wastewater to the combi-CLEA, either alone or in presence of glucose and manganese sulfate. A greater elimination was observed in the absence of manganese and glucose. This might be the result of a partial inhibition of VP in the presence of Mn(II) [Ertan et al., 2012]. This compound might have reacted with a high-redox potential compound present in the wastewater causing an inhibition of VP as observed by Jarosz-Wilkolazka et al. [2008] using VP with Reactive Black 5 in presence of Mn(II). Results obtained in this case may differ from experiments realized using mLQW water because of the numerous other substances that can be found in the wastewater. The samples were filtered but this is not sufficient to eliminate the dissolved natural organic matter that may interact with the enzyme [Lu et Huang, 2009]. Moreover, the concentration of acetaminophen in this wastewater was lower than the one used in the previous experiments, hence, increasing the removal might require an increase of enzymatic activity, as demonstrated for the removal of some estrogenic compounds in municipal wastewater [Auriol et al., 2007].

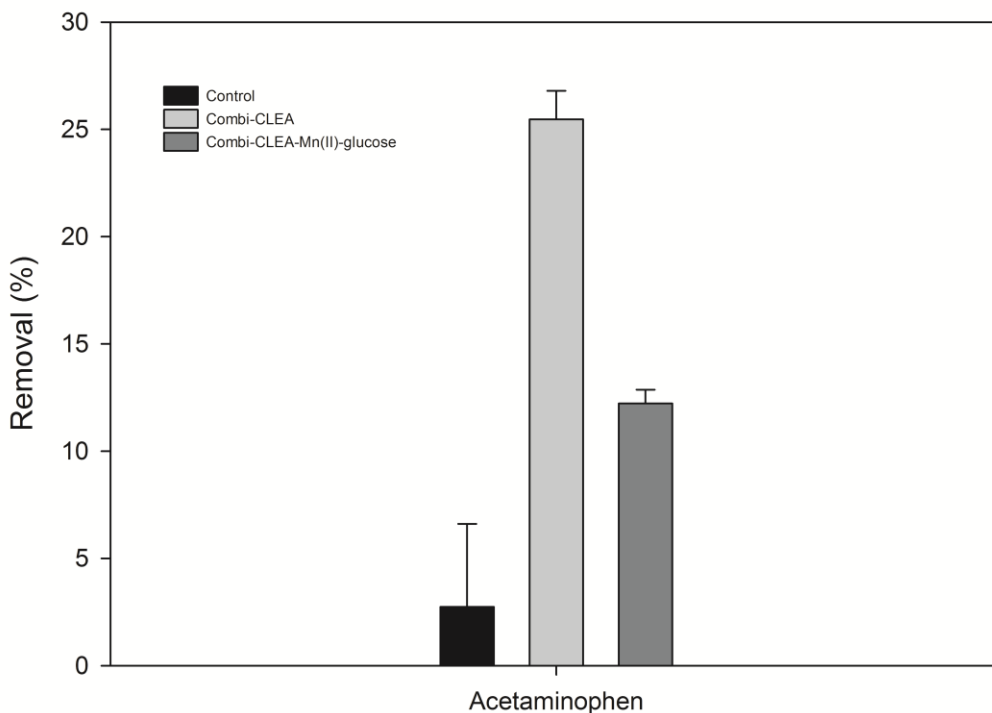


Figure 3.8 Removal of acetaminophen in real wastewater of Magog WWTP using combi CLEA in presence and absence of both manganese and glucose.

3.2.5 Conclusions

In this study, combi-CLEAs composed of laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase were successfully produced. This approach leads to the formation of insoluble and versatile biocatalysts with attractive properties for the development of enzyme-based bioprocesses. The biocatalyst exerted highest activities at pH closer to neutrality than their free counterparts. Furthermore, both their resistance to harsh conditions (high temperature and low pH) and activity at room temperature were improved after insolubilization. The combi-CLEA was used for the elimination of pharmaceuticals present in a mixed solution. The biocatalysts have shown the ability to transform efficiently the nonsteroidal anti-inflammatory drugs acetaminophen, naproxen, mefenamic acid, diclofenac and indometacin. This elimination was due to both VP and Lac oxidative properties as well as

the supporting effect of GOD as a hydrogen peroxide supplier. Then, these combi-CLEAs were used for the elimination of pharmaceuticals present in a filtered influent of a municipal wastewater treatment plant. Although concentrations of most of the tested PhACs were below the limit of detection, the combi-CLEAs allowed the elimination of acetaminophen under the tested conditions. Globally, combining these enzymes able to realize cascade conversions of different substrates allows the generation of biocatalysts with expanded substrate ranges as well as operating conditions.

3.2.6 Acknowledgements

This project was supported by a grant from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies. The authors would like to express their gratitude to Olivier Savary and Marieke Beaulieu for their assistance. The authors also wish to thank the staff of Magog (Qc, Canada) WWTP for raw influent samples.

4 Conclusion

Pour ce qui est de la biocatalyse, cette étude aura permis de réaliser la synthèse d'un biocatalyseur versatile appelé combi-CLEA pour l'élimination de produits pharmaceutiques dans les eaux usées. Aussi, une bonne partie des propriétés catalytiques de chacune des enzymes oxydatives ayant servi à sa synthèse (Lac, VP et GOD) a pu être conservée. En outre, dans des conditions proches de celles rencontrées dans les matrices environnementales, le combi-CLEA a montré de meilleures propriétés catalytiques que les enzymes libres.

Concernant la décontamination, ce biocatalyseur, ainsi que les enzymes qui le composent, ont été testés avec succès pour l'élimination de produits pharmaceutiques dans une eau synthétique. Le combi-CLEA, ayant dégradé globalement les mêmes molécules que la combinaison des trois enzymes libres dans une plus grande mesure, ce dernier a donc démontré l'action synergétique des trois enzymes qui est amplifiée par cette forme d'association. En effet, des molécules prises individuellement telles que la carbamazépine sont difficiles à dégrader par ces enzymes tel qu'illustré en annexe A. Or, la présence concomitante d'autres produits pharmaceutiques plus facilement dégradables par la laccase tels que l'acétaminophène ainsi que l'association des trois enzymes a permis de réaliser une élimination de plus de 50 % de la teneur initiale en carbamazépine en moins de 24 h contrairement aux travaux présentés en annexe A.

Dans le cas d'une eau réelle faiblement contaminée en produits pharmaceutiques, le combi-CLEA est resté actif en l'absence de co-substrats et a pu réduire de 25 % la faible teneur en acétaminophène (5.4 µg/L) en 5 h. Sa résistance aux conditions dénaturantes et sa versatilité en font donc un bon candidat pour le traitement d'eaux contaminées en produits pharmaceutiques.

A travers ce travail, il aura donc été possible de voir l'action d'un biocatalyseur novateur sur un mélange complexe de substances pharmaceutiquement actives. Il est intéressant de constater que malgré la diversité de ces composés, au bout d'un temps de traitement suffisamment long (72 h), la plupart ont été éliminés à plus de 60 % malgré le caractère récalcitrant de plusieurs d'entre eux, tels que la carbamazépine et son métabolite, ainsi que le trimétoprime. Des résultats analogues (mêmes composés transformés) ont été obtenus en

utilisant les enzymes libres dans différentes combinaisons; cela dit, la faible résistance des enzymes libres aux conditions dénaturantes du milieu les rend moins intéressantes pour une application réelle, d'autant plus que sous la forme libre leur action combinée se trouve limitée par les phénomènes de transfert. Le combi-CLEA représente donc une solution intéressante pour l'élimination de différentes substances pharmaceutiques, dans la mesure où il combine leurs actions, qu'il a su conservées, tout en montrant une meilleure résistance aux conditions dénaturantes des eaux usées réelles. A ceci vient s'ajouter le fait que cette forme de combinaison permet de limiter l'influence des phénomènes de transfert puisque les enzymes se trouvent en étroite proximité dans le même agrégat. En outre, sous cette forme, les enzymes étant insolubilisées elles se trouvent donc plus faciles à maintenir dans un réacteur.

Cela dit, avant de pouvoir songer à un passage au traitement à l'échelle industrielle, il serait intéressant d'étudier les sous-produits générés par cette méthode de traitement, et de vérifier par des tests d'écotoxicologie qu'il s'agit bien de substances sans caractère nocifs pour l'environnement. En outre, les combi-CLEAs eux-mêmes devraient être testés en termes de toxicité et d'écotoxicité. Ces biocatalyseurs ne sont pas supposés être toxiques, particulièrement en fin de vie, lorsqu'ils ne montrent plus d'activité biocatalytique, mais cette assertion mérite tout de même d'être vérifiée. En outre, lorsqu'ils perdent leur activité au-delà d'un certain point, il serait possible de réutiliser ces agrégats pour insolubiliser des enzymes à nouveau, et si cela s'avère impossible ou non viable économiquement, il faudrait alors les incorporer aux biosolides classiques d'une STEP. Les combi-CLEAs étant composés essentiellement de chitosane et de protéines que sont les enzymes, ils ne représentent donc pas, théoriquement, une source de contamination pour les boues, à moins qu'il y ait des phénomènes d'adsorption de contaminants à leur surface qu'il faudrait donc vérifier.

De plus, des tests sur une eau réelle fortement contaminée telle qu'un effluent hospitalier, ou une eau usée réelle dopée en produits pharmaceutiques, méritent d'être réalisés. Ces essais permettraient de déterminer l'efficacité de ces biocatalyseurs dans un contexte réel permettant d'exploiter pleinement leur potentiel.

Il serait tout aussi intéressant de réaliser des essais en écoulement continu afin de vérifier la longue durée de vie du biocatalyseur et son efficacité dans des conditions plus proches de

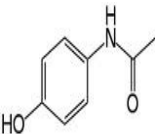
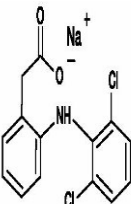
celles des STEP. Dans le même ordre d'idées, une utilisation à des températures plus basses, serait envisageable. En effet, des eaux usées froides sont souvent rencontrées à l'entrée des STEP canadiennes, particulièrement en hiver. Or, l'activité des enzymes sous forme de combi-CLEA reste assez élevée même aux basses températures tel que montré dans la caractérisation des biocatalyseurs face à la température. La biocatalyse devrait donc rester efficace dans de telles conditions.

Enfin, l'intérêt du biocatalyseur généré ne devrait pas être limité aux substances pharmaceutiques, vu le vaste spectre d'activité des enzymes qui le constituent. Il pourrait être appliqué à bon nombre de contaminants émergents qui suscitent de l'inquiétude par leur présence dans l'environnement. Cependant, le coût associé au traitement enzymatique à cause du coût initial de l'enzyme, reste assez élevé, il serait donc intéressant de développer des approches plus viables économiquement telles que la production d'enzymes et le développement de réacteurs adéquats.

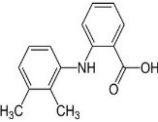
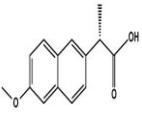
Globalement, une étude des coûts liés à ce procédé de traitement devrait être mise en parallèle avec les bénéfices environnementaux générés sur l'ensemble du cycle de vie du biocatalyseur par rapport à d'autres méthodes de traitement. La production *in situ* d'enzymes diminuerait les coûts économiques et environnementaux liés à ces biocatalyseurs. Une telle production réduirait fortement les coûts de transport, en générant l'ingrédient le plus important du biocatalyseur sur le site même de son utilisation. De même, l'utilisation de biosolides pour la croissance de champignons producteurs d'enzymes permettrait une décontamination supplémentaire, de la boue, tout en réduisant la quantité de réactifs nécessaires. Ceci s'inscrirait dans une approche globale d'analyse du cycle de vie et de son optimisation économique et écologique.

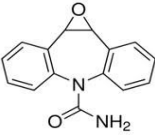
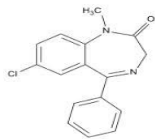
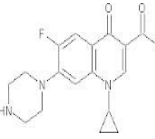
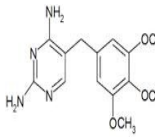
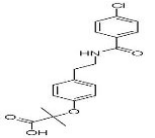
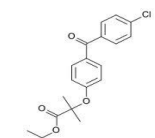
ANNEXE A – Removal of PhACs using LME - a literature review

Tableau 4.1 A comparison between the elimination of studied PhACs in litterature and the present study

Compound	Chemical Structure	Molecular weight	Biocatalyst	Treatment	LME-based elimination			Reference	Removal using biocatalyst in present work
					Initial concentration	Removal	Comments		
Acetaminophen			Immobilised Lac from <i>T. versicolor</i> on polypropylene beads	Non isothermal bioreactor $\Delta T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{av}=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5,5	7,56 mg/L	100%	Under isothermal conditions complete removal needed 250 min	Georgieva et al., 2010	98.9%
				Batch pH 7 1h	7,56 mg/L	About 75% (In $C_0/C=1.4$)	Study of pathways and metabolites as dimer, trimer...	Lu et al., 2009	
Diclofenac			Immobilized Lac from <i>T. versicolor</i>	Microreactor two stage, flow 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pH 7 temperature 30 for enzyme and pH 4 for substrate	4,25 mg/L	25 % (without mediator), 75% (1 stage, addition of ABTS) and 90% (2 stage, addition of ABTS)	The addition of ABTS as a mediator inactivated the enzymes used	Lloret et al., 2013	98.3% (using free enzyme)
				Batch pH 3-9, T 10,25,40 in presence of ABTS	20 mg/L	0 - 92 % (25 $^{\circ}$ C), 100 % (40 $^{\circ}$ C)	Statistical study and comparison of the effect of single compounds compared to mixture	Margot et al., 2013	

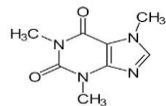
				of contaminants on the removal of targeted molecules	
Free Lac from <i>T. versicolor</i>	Batch test 25 °C, contact time = 22h	1.45 mg/L	0 % (without mediator), 5-27 % (with mediator)	Comparison with activated sludge and whole cell fungi	Yang et al., 2013b
Free LiP from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Batch 2h room temperature pH 4,5, with or without veratryl alcohol as a mediator	5 mg/L	100%		Zhang et Geissen, 2010
Free Lac from <i>T. versicolor</i>	Batch 30 °C 3h pH 4,5 without mediator, or with ABTS or HOBt	10 µg/L	100% with and without mediator	Comparison of whole fungi, crude Lac and commercial Lac Mixture of pharmaceuticals tested with natural and synthetic mediators	Tran et al., 2010
Free Lac from <i>T. versicolor</i>	Batch, room temperature 8h or 11h with HOBt pH 4-7	5 mg/L	100%		Lloret et al., 2010
Free VP from <i>Bjerkandera adusta</i>	Batch 22 °C malonate buffer, Mn 2+ 33µ M pH 4.5 addition of H2O2 1-10 µM/min	2.5 mg/L	100% after 0.42h		Eibes et al., 2011
Free Lac from <i>Coriolopsis gallica</i>	continuous stirred-tank membrane reactor room	2,96 mg/L	70% for more than 80 hours (64		Nair et al., 2013

			temperatu re 40 mL/h pH 5		reactor volume s)			
		Lac from <i>Pleurotus florida</i> as Lac- poly(lactic- co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber	Batch stirred for 5h 30 °C pH 4.3 to 6 cycles in presence of syringald ehyde (for 6 cycles)	50 mg/L	100%		Sathishk umar et <i>al.</i> , 2012	
Mefenami c acid		Free Lac from <i>T. versicolor</i>	Batch test pH 3-9, enzyme concentra tion: 73- 1380U/L, T 10,25,40	20 mg/l	0-100% at 25°C	Statistical study and compariso n of the effect of single compound s compared to mixture of contamina nts on the removal of targeted molecules	Margot et <i>al.</i> , 2013	85.5%
		Free Lac from <i>T. versicolor</i>	microreac tor two stage, flow 0.5 µL/min pH 7 temperatu re 30 for enzyme and pH 4 for substrate	4,25 mg/L	0 (no med) 50(1sta ge ABTS) 71 (2stage ABTS)	Almost no eliminatio n without mediator	Lloret et <i>al.</i> , 2013	
Naproxen		Free Lac from <i>T. versicolor</i>	Batch 30 °C 3h pH 4,5 without mediator, or with ABTS or HOBt	10 µg/L	100% with and without mediat or	Comparis on of whole fungi, crude Lac and commerci al Lac Mixture of pharmace uticals tested with natural and	Tran et <i>al.</i> , 2010	45%
		Free Lac from <i>T. versicolor</i>	Batch room temp pH 4-7 8h in presence of HOBt	5 mg/L	60%		Lloret et <i>al.</i> , 2010	

		Free MnP from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Batch 30 °C 24h pH 4.5	4,73 mg/L	14 after 24h and 60 after 48h	Hata et al., 2010
		Free VP from <i>Bjerkandera adusta</i>	Batch stirred 22 °C malonate buffer pH 4.5, Mn(II) 33 μM, addition of H ₂ O ₂ 1-10 μM/min during 7h	2.5 mg/L	0	Eibes et al., 2011
Carbamazepine -E		No LME-based treatment reported				61.9%
Diazepam		Lac from ascomycete <i>Paraconiothyrium variable</i>	Batch 35 °C 48h with or without HOBt	10 mg/L	18.6% and 61% with HOBt	Ostadhadi et al., 2012 45.1%
Ciprofloxacin		No LME-based treatment reported				82.8%
Trimethoprim		No LME-based treatment reported				57.2%
Bezafibrate		No LME-based treatment reported				33.7%
Fenofibrate		No LME-based				71%

treatment
reported

Caffeine



No LME-
based
treatment
reported

46.4%

ANNEXE B – UPLC-MS/MS analysis of pharmaceutically active compounds

Analyses of pharmaceuticals were performed on an Acquity UPLC XEVO TQ mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA). An Acquity UPLC HSS-T3 column (100 mm x 2.1 mm, 1.8 μ m) (Waters Corporation, Milford, MA) was used. The solvent flow rate was set to 0.40 mL/min and the column temperature was kept at 35 °C. The sample volume injected was 5 μ L. Mobile phase was 0.20% formic acid/water (A) and 0.20% formic acid/methanol-acetonitrile (72-25 v/v) (B) (LC/MS grade). The adopted elution gradient started with 5% of eluent B, increasing to 90% in 8 min and then back to initial conditions in 4 min. The mass spectrometry analysis was performed using a positive electrospray ionization (ESI+) source in Multi-Reaction-Monitoring mode. More details about the method and its development have already been described [Ba et al., 2014].

The optimized parameters were obtained by direct infusion of analytical standard solutions at 10 μ g/mL as follows: desolvation gas (nitrogen), 800 L/h; cone gas (nitrogen), 50 L/h; collision gas (nitrogen), 0.22 mL/min; capillary voltage 2.5 kV; source temperature, 150 °C and desolvation temperature 550 °C. Two daughter traces (transitions) were used. The most abundant transition was used for quantification, whereas the second most abundant was used for confirmation. The concentration of pharmaceutical was determined by comparing the peak areas obtained with those of standard solutions of known concentrations

Tableau 0.1 Analytical parameters used for the quantification of pharmaceutically active compounds.

Pharmaceutically active compounds	Transition 1 Quantification			Transition 2 Qualification			Dwell time (S)
	Parent > Daughter (m/z)	Tension cone (V)	Voltage collision (V)	Parent > Daughter (m/z)	Tension cone (V)	Voltage collision (V)	
Acetaminophen	151.9 > 109.93	25	20	151.9 > 92.74	25	15	0.016
Caffeine	194.98 > 137.98	35	25	194.98 > 109.95	35	20	0.016
Naproxen	231.1 > 185.1	20	45	231.1 > 115	20	10	0.013
Carbamazepin	237.13 > 194.1	25	35	237.13 > 179.05	25	30	0.025
Mefenamic Acid	242.1 > 224.1	20	40	242.1 > 180.1	20	15	0.025
Ketoprofen	255.1 > 105	25	25	255.1 > 177.1	25	20	0.013
Diazepam	285 > 257.6	40	30	285.20 > 257.60	40	20	0.013
Trimethoprim	291.2 > 230.2	40	25	291.2 > 261.1	40	25	0.016
Ciprofloxacin	260.9 > 139.85	15	30	332.2 > 314.2	15	25	0.016
Indometacin	358.2 > 139	25	45	358.2 > 174.2	25	20	0.013
Fenofibrate	361.2 > 233.1	30	15	361.2 > 273.1	30	15	0.025
Bezafibrate	362.2 > 138.9	25	25	362.2 > 316.2	25	15	0.013
Diclofenac	294.50 > 178.00	20	30	294.50 > 250.50	20	10	0.013

Liste des références

- Ahn, M., Dec, J., Kim, J. et Bollag, J. (2002) Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *Journal of environmental quality*, volume 31, numéro 5, p. 1509-15.
- Altenburger, R., Scholz, S., Schmitt-Jansen, M., Busch, W. et Escher, B. I. (2012). Mixture toxicity revisited from a toxicogenomic perspective. *Environmental Science and Technology*, volume 46, numéro 5, p. 2508-2522.
- Ammann, E. M., Gasser, C. A., Hommes, G. et Corvini PF-X. (2013). Immobilization of defined laccase combinations for enhanced oxidation of phenolic contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 98, numéro 3, p. 1397-1496.
- Anderson, G. F. et Hussey, P. S. (2000). Population aging: a comparison among industrialized countries. *Health affairs*, volume 19, numéro 3, p. 191-203.
- Arantes, V. et Milagres, A. M. F. (2007). The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme and microbial technology*, volume 42, numéro 1, p. 17-22.
- Arboleda, C., Cabana, H., De Pril, E., Jones, J. P., Jiménez, G. A. et Mejía, A. I. (2013). Elimination of Bisphenol A and Triclosan using the enzymatic system of autochthonous Colombian forest fungi. *ISRN Biotechnol.*, volume 2013, p. 1-12.
- Arsenault, A., Cabana, H. et Jones, J. P. (2011). Laccase-based CLEAs: Chitosan as a novel cross-linking agent. *Enzyme Research*, volume 2011, numéro 1, p. 376015.
- Arsenault, A. (2012). *Production et caractérisation de biocatalyseurs insolubles de laccase par l'action du chitosane*. Essai de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, 94 p.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D. et Adams, C. D. (2007). Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water research*, volume 41, numéro 15, p. 3281-3288.
- Aymard, C. et Belarbi, A. (2000). Kinetics of thermal deactivation of enzymes: A simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. *Enzyme and microbial technology*, volume 27, numéro 8, p. 612-618.
- Ba, S., Haroune, L., Cruz-Morató, C., Jacquet, C., Touahar, I. E. et Bellenger, J. P. (2014). Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *The Science of the total environment*, volume 487, numéro 1, p. 748-755.
- Ba, S., Mialon, A., Jones, J. P. et Cabana, H. (2012). Laccase insolubilized as combination of crosslinked enzyme aggregates: characterization and potential application in wastewater. *Journal of Enzyme Research*, volume 3, p. 23-28.
- Backhaus, T. et Faust, M. (2012). Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environmental Science and Technology*, volume 46, numéro 5, p. 2564-2573.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S. et Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, volume 27, numéro 4, p. 489-501.

- Batt, A. L., Kostich, M. S. et Lazorchak, J. M. (2008). Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, volume 80, numéro 13, p. 5021-5030.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D. et Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science and Technology*, volume 43, numéro 3, p. 597-603.
- Bourbonnais, R., Leech, D. et Paice, M. G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, volume 1379, numéro 3, p. 381-390.
- Bourbonnais, R. et Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS letters*, volume 267, numéro 1, p. 99-102.
- Brown, I., Dafforn, T. R., Fryer, P. J. et Cox, P. W. (2013). Kinetic study of the thermal denaturation of a hyperthermostable extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, volume 1834, numéro 12, p. 2600-2605.
- Cabana, H., Ahamed, A. et Leduc, R. (2011). Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresource technology*, volume 102, numéro 2, p. 1656-1662.
- Cabana, H., Jones, J. P. et Agathos, S. N. (2007a). Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Engineering in Life Sciences*, volume 7, numéro 5, p. 429-456.
- Cabana, H., Jones, J. P. et Agathos, S. N. (2007b). Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology*, volume 132, numéro 1, p. 23-31.
- Cabana, H., Jones, J. P. et Agathos, S. N. (2009). Utilization of cross-linked laccase aggregates in a perfusion basket reactor for the continuous elimination of endocrine-disrupting chemicals. *Biotechnology and bioengineering*, volume 102, numéro 6, p. 1582-1592.
- Cantarella, G., Galli, C. et Gentili, P. (2003). Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 22, numéro 3-4, p. 135-144.
- Cao, L., van Langen, L. et Sheldon, R. A. (2003). Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? *Current opinion in biotechnology*, volume 14, numéro 4, p. 387-394.
- Cao, L., Van Rantwijk, F. et Sheldon, R. A. (2000). Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic letters*, volume 2, numéro 10, p. 1361-1364.
- Celiz, M. D., Tso, J. et Aga, D. S. (2009). Pharmaceutical metabolites in the environment: Analytical challenges and ecological risks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, volume 28, numéro 12, p. 2473-2484.
- Chenxi, W., Spongberg, A. L. et Witter, J. D. (2008). Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, volume 73, numéro 4, p. 511-518.
- Crouse, B. A., Ghoshdastidar, A. J. et Tong, A. Z. (2012). The presence of acidic and neutral drugs in treated sewage effluents and receiving waters in the Cornwallis and Annapolis River watersheds and

- the Mill Cove Sewage Treatment Plant in Nova Scotia, Canada. *Environmental research*, volume 112, p. 92-99.
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T. et Sarrà, M. (2013). Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water research*, volume 47, numéro 14, p. 5200-5210.
- Cruz-Morató, C., Lucas, D., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Gorga, M., Petrovic, M., Barceló, D., Vicent, T., Sarrà, M. et Marco-Urrea, E. (2014). Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. *The Science of the total environment*, volume 493, p. 365-376.
- Dalal, S., Kapoor, M. et Gupta, M. N. (2007). Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 44, numéro 3-4, p. 128-132.
- D'Annibale, A., Rita Stazi, S., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. et Giovannozzi Sermanni, G. (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*, volume 34, numéro 6-7, p. 697-706.
- Dash, S. S. et Gummadi, S. N. (2006). Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology Letters*, volume 28, numéro 24, p. 1993-2002.
- David, A. et Pancharatna, K. (2009a). Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, volume 27, numéro 3, p. 390-395.
- David, A. et Pancharatna, K. (2009b). Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of applied toxicology*, volume 29, numéro 7, p. 597-602.
- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M. A. et Vazquez-Duhalt, R. (2005). Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and microbial technology*, volume 36, numéro 2-3, p. 223-231.
- Dhiman, S. S., Garg, G., Sharma, J., Kalia, V. C., Kang, Y. C. et Lee, J.K. (2014). Reduction in acute ecotoxicity of paper mill effluent by sequential application of xylanase and laccase. *PloS one*, volume 9, numéro 7, p. e102581.
- Eibes, G., Debernardi, G., Feijoo, G., Moreira, M. T. et Lema, J. M. (2011). Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation*, volume 22, numéro 3, p. 539-550.
- El Ashry, E. S. H., Awad, L. F., Abdel Hamid, H. et Atta, A. I. (2007). MAOS of D-gluconic acid, D-glucono-1,4- and 1,5-lactones, esters, hydrazides, and benzimidazoles thereof. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, volume 26, numéro 5-6, p. 329-338.
- Ertan, H., Siddiqui, K. S., Muenchhoff, J., Charlton, T. et Cavicchioli, R. (2012). Kinetic and thermodynamic characterization of the functional properties of a hybrid versatile peroxidase using isothermal titration calorimetry: Insight into manganese peroxidase activation and lignin peroxidase inhibition. *Biochimie*, volume 94, numéro 5, p. 1221-1231.
- Escher, B. I. et Hermens, J. L. M. (2002). Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science and Technology*, volume 36, numéro 20, p. 4201-4217.

- Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Barber, L. B. et Thurman, M. E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--II) untreated drinking water sources. *The Science of the total environment*, volume 402, numéro 2-3, p. 201-216.
- Gao, P., Ding, Y., Li, H. et Xagorarakis, I. (2012). Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere*, volume 88, numéro 1, p. 17-24.
- Garcia-Ruiz, E., Gonzalez-Perez, D., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, A. T. et Alcalde, M. (2012). Directed evolution of a temperature-, peroxide- and alkaline pH-tolerant versatile peroxidase. *Biochemical Journal*, volume 441, numéro 1, p. 487-498.
- Georgieva, S., Godjevargova, T., Mita, D. G., Diano, N., Menale, C., Nicolucci, C., Carratelli, C. R., Mita, L. et Golovinsky, E. (2010). Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 66, numéro 1-2, p. 210-218.
- Glenn, J. K., Akileswaran, L. et Gold, M. H. (1986). Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, volume 251, numéro 2, p. 688-696.
- Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K. et Gummadi, S. N. (2005). Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and microbial technology*, volume 37, numéro 2, p. 225-232.
- Gravel, A. et Vijayan, M. M. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs disrupt the heat shock response in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, volume 81, numéro 2, p. 197-206.
- Gravel, A., Wilson, J. M., Pedro, D. F. N. et Vijayan, M. M. (2009). Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, volume 149, numéro 4, p. 481-490.
- Hanefeld, U. (2013). Immobilisation of hydroxynitrile lyases. *Chemical Society Reviews*, volume 42, numéro 15, p. 6308-6321.
- Hassani, T., Ba, S. et Cabana, H. (2013). Formation of enzyme polymer engineered structure for laccase and cross-linked laccase aggregates stabilization. *Bioresource technology*, volume 128, p. 640-645.
- Hata, T., Shintate, H., Kawai, S., Okamura, H. et Nishida, T. (2010). Elimination of carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Journal of hazardous materials*, volume 181, numéro 1-3, p. 1175-1178.
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, volume 131, numéro 1-2, p. 5-17.
- Hirai, H., Nakanishi, S. et Nishida, T. (2004). Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere*, volume 55, numéro 4, p. 641-5.
- Inoue, Y., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H. et Nishida, T. (2010). Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. *Journal of hazardous materials*, volume 180, numéro 1-3, p. 764-7.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Luterek, J. et Olszewska, A. (2008). Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* at different pH. *Biocatalysis and Biotransformation*, volume 26, numéro 4, p. 280-287.

- Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M. et Barcelo, D. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water research*, volume 45, numéro 3, p. 1165-1176.
- Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J. P. et Choi, K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal of hazardous materials*, volume 254-255, numéro 1, p. 242-251.
- Jia, F., Narasimhan, B. et Mallapragada, S. (2014). Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review. *Biotechnology and bioengineering*, volume 111, numéro 2, p. 209-222.
- Ju, H., Jang, E., Ryu, B. H. et Kim, T. D. (2013). Characterization and preparation of highly stable aggregates of a novel type of hydrolase (BL28) from *Bacillus licheniformis*. *Bioresource technology*, volume 128, p. 81-86.
- Karam, J. et Nicell, J. A. (1997). Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, volume 69, 141-153.
- Karimi, A., Aghbolaghy, M., Khataee, A. et Shoa Bargh, S. (2012). Use of enzymatic bio-fenton as a new approach in decolorization of malachite green. *The Scientific World Journal*, volume 2012,
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, volume 8, numéro 1, p. 1-13.
- Khetan, S. K. et Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. *Chemical reviews*, volume 107, numéro 6, p. 2319-2364.
- Kosjek, T., Andersen, H. R., Kompore, B., Ledin, A. et Heath, E. (2009). Fate of carbamazepine during water treatment. *Environmental science & technology*, volume 43, numéro 16, p. 6256-6261.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and microbial technology*, volume 35, numéro 2-3, p. 126-139.
- Kümmerer, K. (2009a). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, volume 75, numéro 4, p. 417-434.
- Kümmerer, K. (2009b). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, volume 75, numéro 4, p. 435-441.
- Kümmerer, K. (2009c). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of environmental management*, volume 90, numéro 8, p. 2354-2366.
- Láng, J. et Kohidai, L. (2012). Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere*, volume 89, numéro 5, p. 592-601.
- Larsson, E., Al-Hamimi, S. et Jönsson, J. A. (2014). Behaviour of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and eight of their metabolites during wastewater treatment studied by hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, volume 485-486, numéro 1, p. 300-308.

- Li, P., Eaton, M. M., Steinbach, J. H. et Akk, G. (2013). The Benzodiazepine Diazepam Potentiates Responses of $\alpha 1\beta 2\gamma$ 2L γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors Activated by either γ -Aminobutyric Acid or Allosteric Agonists. *Anesthesiology*, volume 118, numéro 6, p. 1417-1425.
- Ligon, B. L. (2004). Penicillin: its discovery and early development. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, volume 15, numéro 1, p. 52-57.
- Lindberg, R. H., Olofsson, U., Rendahl, P., Johansson, M. I., Tysklind, M. et Andersson, B. A. V. (2006). Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science and Technology*, volume 40, numéro 3, p. 1042-1048.
- Lloret, L., Eibes, G., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Feijoo, G. et Lema, J. M. (2010). Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, volume 51, numéro 3, p. 124-131.
- Lloret, L., Eibes, G., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M. et Miyazaki, M. (2013). Improving the catalytic performance of laccase using a novel continuous-flow microreactor. *Chemical Engineering Journal*, volume 223, p. 497-506.
- Lu, J. et Huang, Q. (2009). Removal of acetaminophen using enzyme-mediated oxidative coupling processes: II. Cross-coupling with natural organic matter. *Environmental Science and Technology*, volume 43, numéro 18, p. 7068-7073.
- Lu, J., Huang, Q. et Mao, L. (2009). Removal of acetaminophen using enzyme-mediated oxidative coupling processes: I. Reaction rates and pathways. *Environmental Science and Technology*, volume 43, numéro 18, p. 7062-7067.
- Majewsky, M., Gallé, T., Bayerle, M., Goel, R., Fischer, K. et Vanrolleghem, P. A. (2011a). Xenobiotic removal efficiencies in wastewater treatment plants: residence time distributions as a guiding principle for sampling strategies. *Water research*, volume 45, numéro 18, p. 6152-6162.
- Majewsky, M., Gallé, T., Yargeau, V. et Fischer, K. (2011b). Active heterotrophic biomass and sludge retention time (SRT) as determining factors for biodegradation kinetics of pharmaceuticals in activated sludge. *Bioresource technology*, volume 102, numéro 16, p. 7415-7421.
- Margot, J., Maillard, J., Rossi, L., Barry, D. A. et Holliger, C. (2013). Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase. *New Biotechnology*, volume 30, numéro 6, p. 803-813.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, volume 157, numéro 11, p. 2893-2902.
- Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. et Martínez, Á. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, volume 237, numéro 2, p. 424-432.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., Van Rantwijk, F., Stolz, A. et Sheldon, R. A. (2006). Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade: A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron Asymmetry*, volume 17, numéro 3, p. 320-323.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R. et Guisán, J. M. (2000). Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, volume 1, numéro 4, p. 739-745.

- Mathieu, O., Dereure, O. et Hillaire-Buys, D. (2011). Presence and ex vivo formation of acridone in blood of patients routinely treated with carbamazepine: Exploration of the 9-acridinecarboxaldehyde pathway. *Xenobiotica*, volume 41, numéro 2, p. 91-100.
- MeSH Browser (s.d.). Diazepam. Dans Diazepam, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68003975](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68003975) (page consultée le 8 juin 2014).
- Moreira, P. R., Almeida-Vara, E., Malcata, F. X. et Duarte, J. C. (2007). Lignin transformation by a versatile peroxidase from a novel *Bjerkandera sp.* strain. *International Biodeterioration and Biodegradation*, volume 59, numéro 3 SPEC. ISS., p. 234-238.
- Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Dey, A. et Mondal, B. (2013). Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, volume 12, numéro 1, p. 61-73.
- Navon, R., Hernandez-Ruiz, S., Chorover, J. et Chefetz, B. (2011). Interactions of carbamazepine in soil: effects of dissolved organic matter. *Journal of environmental quality*, volume 40, numéro 3, p. 942-8.
- Oliva, S. U., Scarano, W. R., Okada, F. K. et Miraglia, S. M. (2012). Harmful effects of carbamazepine on the postnatal development of the rat ventral prostate. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, volume 10, numéro 1, p. 22-22.
- Ostadhadi-Dehkordi, S., Tabatabaei-Sameni, M., Forootanfar, H., Kolahtouz, S., Ghazi-Khansari, M. et Faramarzi, M. A. (2012). Degradation of some benzodiazepines by a laccase-mediated system in aqueous solution. *Bioresource technology*, volume 125, p. 344-347.
- Park, J.M., Kim, M., Lee, H. J., Jang, A., Min, J. et Kim, Y.H. (2012). Enhancing the production of *rhodobacter sphaeroides*-derived physiologically active substances using carbonic anhydrase-immobilized electrospun nanofibers. *Biomacromolecules*, volume 13, numéro 11, p. 3780-3786.
- Peysson, W. et Vulliet, E. (2013). Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of chromatography.A*, volume 1290, p. 46-61.
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C. et Calamari, D. (2006). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environmental Science and Technology*, volume 40, numéro 7, p. 2442-2447.
- Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F. et Zuccato, E. (2008). Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Sciences*, volume 102, numéro 1, p. 129-137.
- Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C. L. et Gratzl, J. S. (1995). Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. *Journal of Organic Chemistry*, volume 60, numéro 14, p. 4320-4321.
- Pozdnyakova, N., Makarov, O., Chernyshova, M., Turkovskaya, O. et Jarosz-Wilkolazka, A. (2013). Versatile peroxidase of *Bjerkandera fumosa*: Substrate and inhibitor specificity. *Enzyme and microbial technology*, volume 52, numéro 1, p. 44-53.
- Quintana, J. B., Weiss, S. et Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water research*, volume 39, numéro 12, p. 2654-2664.

- Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A. et Katsoyiannis, A. (2012). Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *Journal of hazardous materials*, volume 239-240, p. 1-18.
- Reshmi, R. et Sugunan, S. (2013). Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 85-86, p. 111-118.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C. et Stingo, V. (2010). Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and environmental safety*, volume 73, numéro 7, p. 1530-1536.
- Rodayan, A., Majewsky, M. et Yargeau, V. (2014).). Impact of approach used to determine removal levels of drugs of abuse during wastewater treatment. *The Science of the total environment*, volume 487, p. 731-739.
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T. et Martínez, M. J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: The role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry*, volume 36, numéro 6, p. 909-916.
- Sangeetha, K. et Emilia Abraham, T. (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *International journal of biological macromolecules*, volume 43, numéro 3, p. 314-319.
- Sanjuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Islas-Flores, H. et Neri-Cruz, N. (2013). Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus Carpio*. *Water, air, and soil pollution*, volume 224, numéro 9.
- Sathishkumar, P., Chae, J. C., Unnithan, A. R., Palvannan, T., Kim, H. Y., Lee, K. J., Cho, M., Kamala-Kannan, S. et Oh, B. T. (2012). Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac. *Enzyme and microbial technology*, volume 51, numéro 2, p. 113-118.
- Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., Van Rantwijk, F., Van Der Wielen, L. A. M. et Sheldon, R. A. (2004). Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and bioengineering*, volume 87, numéro 6, p. 754-762.
- Sheldon, R. A. (2007a). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society transactions*, volume 35, numéro 6, p. 1583-1587.
- Sheldon, R. A. (2007b). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, volume 349, numéro 8-9, p. 1289-1307.
- Sheldon, R. A. (2011). Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *Organic Process Research and Development*, volume 15, numéro 1, p. 213-223.
- Sheldon, R. A. (2012). Fundamentals of green chemistry: Efficiency in reaction design. *Chemical Society Reviews*, volume 41, numéro 4, p. 1437-1451.
- Srebotnik, E. et Hammel, K. E. (2000). Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology*, volume 81, numéro 2-3, p. 179-188.
- Strong, P. J. et Claus, H. (2011). Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, volume 41, numéro 4, p. 373-434.

- Suda, T., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H. et Nishida, T. (2012). Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresource technology*, volume 103, numéro 1, p. 498-501.
- Taboada-Puig, R., Junghanns, C., Demarche, P., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M. et Agathos, S. N. (2011a). Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresource technology*, volume 102, numéro 11, p. 6593-6599.
- Taboada-Puig, R., Lú-Chau, T., Moreira, M. T., Feijoo, G., Martínez, M. J. et Lema, J. M. (2011b). A new strain of *Bjerkandera sp.* production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, volume 27, numéro 1, p. 115-122.
- Tagliari, C. V., Sanson, R. K., Zanette, A., Franco, T. T. et Soccol, C. R. (2003). Caffeine degradation by *Rhizopus delemar* in packed bed column bioreactor using coffee husk as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, volume 34, p. 102-104.
- Talekar, S., Desai, S., Pillai, M., Nagavekar, N., Ambarkar, S., Surnis, S., Ladole, M., Nadar, S. et Mulla, M. (2013a). Carrier free co-immobilization of glucoamylase and pullulanase as combi-cross linked enzyme aggregates (combi-CLEAs). *RSC Advances*, volume 3, numéro 7, p. 2265-2271.
- Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R. et Kambale, S. (2013b). Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*, volume 3, numéro 31, p. 12485-12511.
- Tien, M. et Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, volume 161, numéro C, p. 238-249.
- Touahar, I. E., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J.P. et Cabana, H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, volume 481, numéro 1, p. 90-99.
- Tran, N. H., Urase, T. et Kusakabe, O. (2010). Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase. *J. Water Environ. Technol.*, volume 8, numéro 2, p. 125-140.
- Vafiadi, C., Topakas, E. et Christakopoulos, P. (2008). Preparation of multipurpose cross-linked enzyme aggregates and their application to production of alkyl ferulates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 54, numéro 1-2, p. 35-41.
- Van Aken, B., Ledent, P., Naveau, H. et Agathos, S. N. (2000). Co-immobilization of manganese peroxidase from *Phlebia radiata* and glucose oxidase from *Aspergillus niger* on porous silica beads. *Biotechnology Letters*, volume 22, numéro 8, p. 641-646.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M. et Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment*, volume 429, p. 123-155.
- Wen, X., Jia, Y. et Li, J. (2009). Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* - A white rot fungus. *Chemosphere*, volume 75, numéro 8, p. 1003-1007.
- Wen, X., Jia, Y. et Li, J. (2010). Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of hazardous materials*, volume 177, numéro 1-3, p. 924-928.

- Wesenberg, D. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, volume 22, numéro 1-2, p. 161-187.
- Wong, D. W. S. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 157, numéro 2, p. 174-209.
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Price, W. E., Roddick, F., Moreira, M. T. et Magram, S. F. (2013a). Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. *Bioresource technology*, volume 141, p. 97-108.
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Roddick, F., Price, W. E., (2013b). Removal of trace organic contaminants by nitrifying activated sludge and whole-cell and crude enzyme extract of *Trametes versicolor*. *Water science and technology*, volume 67, numéro 6, p. 1216-1223.
- Yargeau, V., Lopata, A. et Metcalfe, C., (2007). Pharmaceuticals in the Yamaska River, Quebec, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada*, volume 42, numéro 4, p. 231-239.
- Zhang, Y. et Geißen, S. U. (2010). In vitro degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase. *Journal of hazardous materials*, volume 176, numéro 1-3, p. 1089-1092.