

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY

Université Badji Mokhtar-Annaba



-
Année 2010

Faculté des Sciences
Département de Chimie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de **MAGISTER**

Option : Chimie organique et Bioorganique.

Immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* sur la résine Amberjet 4200Cl
Optimisation de l'énantioselectivité par la méthode des surfaces de réponse

Par :

M^{elle} Samah Bouchagra

Directeur de mémoire : M. Z. DJEGHABA Professeur Université Badji Mokhtar, Annaba

Devant un jury:

Président : M. Z. REGAINIA Professeur Université Badji Mokhtar, Annaba

Examineurs : M. A. LADJAMA Professeur Université Badji Mokhtar, Annaba

M. F. FERKOUS Professeur Université Badji Mokhtar, Annaba

M. L. KABOUB M.C Université Larbi Tébessi, Tébessa

Dédicace

A mes parents,

A mes sœurs,

A mes frères,

A tous ceux qui sont chers.

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique Appliquée, groupe « Bioconversion et de Synthèse Organique », sous la direction de Monsieur Z.Djeghaba Professeur au département de Chimie d'Annaba, que je tiens à le remercier sincèrement pour son encadrement.

Soyez assuré Monsieur de ma vive reconnaissance, car vous m'avez donné cette chance.

Mes remerciements vont conjointement à Madame F.Benamia docteur à l'université d'Annaba pour sa gentillesse et pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce travail. Son intérêt, sa disponibilité, son suivi quotidien de mes travaux et ses précieux conseils m'ont été D'un grand profit. Je la remercie infiniment.

Mes meilleurs remerciements s'adressent à monsieur Z. REGAINIA Professeur à l'université Badji Mokhtar, Annaba pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Ses cours excellents qu'il m'avait enseignés dont je les garde comme des bons souvenirs.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur A. LADJAMA qui me fait l'honneur d'examiner ce travail et de faire partie du jury de ce mémoire.

Je remercie tout particulièrement Monsieur L. KABOUB Maître de conférences à l'Université Larbi Tébessi, Tébessa, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

Un merci tout particulier à Monsieur le Professeur F, FERKOUS, pour son aide et ses conseils judicieux ainsi pour sa grande disponibilité et

ses qualités humaines. C'est un grand plaisir pour moi qu'il ait accepté d'examiner ce travail.

Je n'oublierai pas de remercier mes camarades de promotions Wahida, Dalal, Ismaïhen, Fawzia, et Yazid pour leur sympathie.

Je leur souhaite une bonne continuation.

Je suis également reconnaissant envers BENI car elle m'a toujours été une véritable sœur. Je la remercie pour le soutien et la sympathie qu'elle m'a manifestés.

Je dois un grand merci à mes chères khaoula, Asma, et Fatima, pour nos délires, nos fous rires, nos moments de bonheur et de déprime qu'on a partagé pendant ces années à Chaïba.

Je remercie également mes chers amis, que même si on se voit périodiquement, pour leur grand cœur et sympathie : halima, hanane, aziza, asma, síhem, somia, Nadia, Fatima.

Enfin, merci à tous les membres d'équipes du laboratoire « 32 » pour m'avoir donné l'impression que je faisais partie de l'équipe et surtout un énorme, merci à tous ceux qui ont permis à mon esprit de s'évader de temps en temps : Youcef. S, Sabrina. B, Reda. H, Hamida. B, A.Kader. A, Khair eddine. K, Aicha. F, Fahima. A.

La conclusion viendra pour mon grand père, parti beaucoup trop tôt et qui m'a légué tant de valeurs... Ce travail est pour toi. Tu resteras à jamais un modèle pour moi. Merci...

Résumé

Ce travail décrit l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) sur une résine anionique, l'Amberjet 4200Cl™, et particulièrement l'effet des conditions expérimentales d'immobilisation sur l'activité et l'énantiosélectivité de la CRL immobilisée. Nous avons mené notre étude sur une réaction modèle, l'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle. Les facteurs influençant potentiellement l'immobilisation (température, pH, volume et concentration du tampon, temps, vitesse d'agitation et rapport enzyme/support) et leur impact sur le fonctionnement de la CRL immobilisée, en particulier sur son énantiosélectivité, ont été étudiés par la méthode des plans d'expériences.

Le plan de criblage de Plackett et Burman utilisant un modèle de premier degré a permis de dégager 3 facteurs les plus influents parmi les 7 facteurs initiaux, et a montré qu'un modèle de second degré est nécessaire pour décrire le phénomène étudié. Pour ce faire, il a été fait appel au plan de Box-Behnken. Le modèle de second degré provenant de ce plan a permis la détermination des conditions expérimentales pour une énantiosélectivité optimale par la méthode de surface de réponse (RSM). La valeur de l'énantiosélectivité estimée par le modèle est en parfait accord avec celle trouvée expérimentalement.

Mots clés : Immobilisation ; CRL ; énantiosélectivité ; plan d'expériences ; Plackett et Burman ; Box-Behnken ; RSM.

Table de matières

Introduction générale	15
------------------------------------	----

Première partie

Chapitre 1 : les enzymes et leur immobilisation

1. Les enzymes	17
1.1. Introduction.....	17
1.2. Généralités.....	17
1.3. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique	18
1.4. Dédoublment cinétique enzymatique.....	19
1.4.1. Paramètre d'évaluation du dédoublment cinétique enzymatique.....	21
1.5. Les lipases.....	21
1.5.1. Réactions catalysées par les lipases.....	22
1.5.2. Sélectivité des lipases.....	23
1.5.2.1. Chimiosélectivité.....	23
1.5.2.2. Régiosélectivité.....	23
1.5.2.3. Enantiosélectivité.....	23
2. Immobilisation des enzymes	24
2.1. Généralités.....	24
2.2. Les techniques d'immobilisation.....	25
2.2.1. Immobilisation par liaison.....	25
2.2.2. Immobilisation par réticulation.....	26
2.2.3. Immobilisation par inclusion.....	27
2.3. Comparaison de différentes méthodes d'immobilisation	29
3. Application des lipases immobilisées	29
3.1. Accès au S-Naproxène par hydrolyse enzymatique.....	29
3.2. Synthèse s'acétate de vitamine E.....	30
3.3. Résolution du menthol racémique.....	31
3.4. Aminolyse énantiosélective du 2-Chloropropionate d'Éthyle.....	31
4. Conclusion	33

Chapitre 2 : Les plans d'expériences

1. Introduction	34
2. Présentation de la méthode des plans d'expériences	34
2.1. Méthode classique.....	34
2.2. Méthode de plan d'expérience.....	35
2.2.1. Choix d'une méthode d'expérimentation.....	35
2.2.1.1. Description de problème	35
2.2.1.2. Détermination d'objectif d'étude	36
2.2.1.3. Détermination des réponses	36
2.2.1.4. Détermination des facteurs et de domaine d'étude	36
2.2.1.5. La sélection des facteurs.....	37
2.2.1.6. L'importance des mesures aux points centraux.....	38
2.2.1.7. Choix de plan d'expérience.....	39
a - Les plans factoriels complets à deux niveaux.....	39
b - Les plans factoriels fractionnaires.....	40
c - les plans de la surface de réponse.....	41
2.2.3. Analyse de résultats.....	44
2.2.3.1. Calculs des effets.....	44
2.2.3.2. Analyse des résultats	46
a - Graphique de comparaison des réponses mesurées est réponse estimée.....	46
b - Résumé de la pertinence de modèle (qualité descriptif).....	46
2.2.3.3. La technique d'analyse de variance	47
a- Test de validation 1.....	47
b- Test de validation 2.....	48
2.2.2.4. Analyse graphique des résultats.....	50
2.2.2.5 Validation de l'hypothèse et recherche de solution au problème.....	50
2.2.3. Acquisition progressive de connaissance.....	51
3. Conclusion	52

Deuxième partie

Chapitre 1 : Résultat et discussion

1. Préparation du plan d'expérience	53
1.1. Description du phénomène d'immobilisation	53
1.2. Objectif de l'étude	54
1.3. Détermination des facteurs et domaine d'étude.....	54

1.4. Démarche expérimentale.....	55
2. Construction du plan de criblage et réalisation des essais.....	55
2.1. Matrice des expériences.....	55
3. Résultats du plan de criblage et interprétation.....	55
3.1. Résultats et collecte des données.....	55
3.2. Traitement et analyse statistique des données	56
4. Plan de Box-Behnken. Résultats et interprétations.....	61
4.1. Validation primaire du modèle	64
4.2. Optimisation de l'énantioselectivité.....	65
5. Comparaison entre l'énantioselectivité de la CRL libre et de celle immobilisée.....	70
Conclusion générale.....	71
Chapitre 2 : Méthode et matériel	
1. Techniques générales.....	73
1.1. RMN ¹ H.....	73
1.2. Infrarouge (IR).....	73
1.3. Les dosages colorimétriques	73
1.4. La chromatographie en phase gazeuse chirale.....	73
2. Produits chimiques.....	73
3. Méthodes	74
3.1. Préparation des solutions tampons.....	74
3.2. Dosage de protéine par la méthode de Bradford.....	75
3.3. Immobilisation de la lipase <i>Candida rugosa</i> sur résine.....	76
3.4. La réaction de transestérification	76
Bibliographie	84
Annexe	85

Liste des tableaux

Première partie

Chapitre 1

Tableau 1. Comparaison de différentes méthodes d'immobilisation.....	29
Tableau 2. Aminolyse énantioselective du 2-chloropropionate d'éthyle par Les amines RNH ₂ catalysée par la lipase <i>C.cylindracea</i>	32

Chapitre 2

Tableau 1. Nombre d'essai du plan de Plakett-Burman en fonction du nombre de facteurs.....	38
Tableau 2. Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs	43
Tableau 3. Matrice de réponse du plan factorielle 2 ²	44
Tableau 4. Récapitulatif du test de validation 1.....	48
Tableau 5. Récapitulatif de test de validation 2.....	49

Deuxième partie

Chapitre 1

Tableau 1. Facteurs et domaine d'étude du plan initial.....	54
Tableau 2. Matrice des expériences du plan de criblage.....	55
Tableau 3 : Réponses du plan de criblage.....	56
Tableau 4. Effets et coefficients estimés pour la réponse.....	57
Tableau 5. Analyse de variance pour V _R	59
Tableau 6. Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken.....	61
Tableau 7. Plan de Box-Behnken et les résultats expérimentaux obtenus.....	61
Tableau 8. Coefficients estimés pour E.....	62
Tableau 9. Analyse de variance pour E.....	62
Tableau 10. Coefficients estimés pour le modèle amélioré.....	63
Tableau 11. Analyse de variance pour E (modèle améliorée).....	63
Tableau 12. Comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées.....	64
Tableau 13. Taux de conversion de la réaction et celui de protéine fixée.....	69

Chapitre 2

Tableau 1. Les différentes caractéristiques de l'Amberjet 4200 CI™	74
Tableau 2. Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (S.A.B).....	75

Liste des figures

Première partie

Chapitre 1

Figure 1. Structure tertiaire d'une protéine.....	18
Figure 2. Immobilisation par liaison.....	25
Figure 3. Immobilisations par réticulation.....	27
Figure 4. Immobilisation par Microencapsulation.....	27
Figure 5. Emprisonnement dans une matrice.....	28

Chapitre 2

Figure 1. La courbe $y = f(x)$	34
Figure 2. Représentations du domaine d'étude pour un seul facteur.....	37
Figure 3. Répartition des points expérimentaux dans le domaine expérimentale.....	39
Figure 4. Plans composites pour deux facteurs	41
Figure 5. Plan de Box-Behnken pour trois facteurs	43
Figure 6. Illustrations de l'effet de facteur	45
Figure 7. Illustrations d'une interaction	45
Figure 8. Graphique de comparaison de réponse mesurée et estimée.....	46
Figure 9. Courbes d'iso- réponse et surface de réponses.....	50

Deuxième partie

Chapitre 1

Figure 1. Diagramme de Pareto des effets normalisés.....	58
Figure 2. Graphique des V_R estimées en fonction des V_R mesurées.....	58
Figure 3. Diagramme de E mesurée en fonction de E estimée.....	65
Figure 4. Diagramme de contours présentant les effets des différents facteurs sur l'énantiosélectivité.....	67
Figure 5. Optimisation par la fonction Désirabilité.....	67

Chapitre 2

Figure 1. La résine Amberjet 4200 Cl.....	74
Figure 2. Courbe des conditions d'analyse CPG.....	77

Liste des schémas

Première partie

Chapitre 1

Schéma 1. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique.....	19
Schéma 2. Diagramme d'énergie d'activation de réaction.....	20
Schéma 3. Les différentes techniques d'immobilisation.....	24
Schéma 4. Synthèse de S-Napoxène.....	30
Schéma 5. Synthèse s'acétate de vitamine E.....	30
Schéma 6. Résolution énantiosélective du (R, S) menthol.....	31
Schéma 7. Aminolyse énantiosélective du 2-Chloropropionate d'Éthyle.....	32

Chapitre 2

Schéma 8. Démarche de la méthodologie de plan d'expérience.....	52
--	----

Deuxième partie

Chapitre 1

Schéma 9. L'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle.....	53
--	----

Symboles et abréviations

R, S	Enantiomères <i>Rectus et Sinister</i>
ee	Excès énantiomérique
Rdt	Rendement
C	Conversion
E	Facteur de sélectivité
T°	Température
CALB	<i>Candida antractica</i> lipase B
CCL	<i>Candida cylindracea</i> lipase
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipase
LPP	Lipase pancréatique du porc
RML	<i>RhizopusMiehi</i> lipase
@	Encapsulation
SM	Somme des carrés
CM	Carrés moyens
F	Coefficient de Fisher
P	Coefficient de Probabilité
R ²	Coefficient de détermination

Introduction générale

Au cours de ces dernières années, la demande en produits d'intérêt thérapeutique, agroalimentaire ou cosmétique s'est fortement accrue, de même que les exigences en matière de procédés de synthèse respectueux de l'environnement. Dans ce contexte, l'utilisation des enzymes s'est fortement développée. Au niveau industriel, les avantages de leur utilisation malgré leur coût relativement élevé, sont des dépenses énergétiques faibles, des étapes de purification simplifiées, des conditions expérimentales douces, évitant la dégradation des substrats et des produits¹. Parmi ces enzymes, les lipases sont largement employées aussi bien en milieu aqueux pour l'hydrolyse d'esters, qu'en milieu organique dans des réactions d'alcoolyse et d'aminolyse par exemple. Ces réactions sont effectuées non seulement dans des conditions réactionnelles douces, mais permettent également de conduire le processus avec une grande sélectivité (chimio, régio, et énantiosélectivité)².

Ces biocatalyseurs peuvent présenter, cependant, quelques inconvénients, parmi lesquels leur manque de stabilité et leur réutilisation limitée. Une des méthodes permettant de pallier ces inconvénients est l'immobilisation de l'enzyme sur support solide. Que ce soit par liaison, par réticulation, ou par inclusion, l'immobilisation des lipases vise à leur conférer une bonne stabilité, permettant une réutilisation des enzymes après réaction, et le développement de procédés en continu. Un autre avantage potentiel de l'immobilisation pourrait concerner également l'activité et la sélectivité de la protéine. Les conditions réactionnelles de l'immobilisation et les différentes liaisons de la protéine avec le support peuvent, en effet, avoir un impact sur la conformation de la macromolécule et par conséquent sur le fonctionnement de l'enzyme et particulièrement sur son énantiosélectivité.³

C'est dans ce contexte général que s'inscrit notre travail. Il concerne l'étude de l'effet des conditions expérimentales d'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* sur une résine anionique, l'Amberjet 4200 CITM, sur l'activité et l'énantiosélectivité de la protéine. L'utilisation de cette résine comme support d'immobilisation n'a, à notre connaissance, jamais été décrite. Ce support présente de nombreux avantages, dont sa large disponibilité, son innocuité, pas de nécessité de traitement préalable et une haute affinité pour les protéines.

Cette étude a été menée sur une réaction modèle, l'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle. Les facteurs influençant potentiellement l'immobilisation

(température, pH, volume et concentration du tampon, temps, vitesse d'agitation et rapport enzyme/support) et leur impact sur le fonctionnement de la CRL immobilisée, en particulier sur son énantiosélectivité, ont été étudiés par la méthodologie des plans d'expériences.

Dans une première partie, nous consacrerons un premier chapitre à une étude bibliographique sur les enzymes et les différentes méthodes de leur immobilisation. Ensuite, nous présenterons la méthodologie des plans d'expériences dans un second chapitre.

La deuxième partie sera consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus ainsi qu'à la description des différentes méthodes et réactions menées au cours de ce travail.

La présentation générale de notre travail sera la suivante :

Première partie.

Chapitre 1. Les enzymes et leurs immobilisations

Chapitre 2. Les plans d'expériences

Deuxième partie.

Chapitre 1. Résultats et discussion

Conclusion générale

Chapitre 2. Matériels et méthode

1. Les enzymes

1.1. Introduction

Les enzymes sont des protéines qui allient la capacité de reconnaître très spécifiquement des molécules au pouvoir de catalyser efficacement leur transformation en composées utiles au métabolisme des organismes vivants. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes et celles-ci ne favorisent pas seulement une réaction chimique donnée, elles empêchent aussi la présence de réactions secondaires gênantes.

C'est l'efficacité de ces catalyseurs qui a attiré l'attention des chimistes qui ont alors adopté les enzymes pour effectuer leurs réactions.

C'est ainsi qu'au cours de ces dernières années, les enzymes se retrouvent dans de nombreux domaines : chimie fine, agro-alimentaire, secteur biomédical, etc.

1.2. Généralités

L'enzyme est un biocatalyseur présent dans les organismes vivants. Les enzymes sont de nature protéique, c'est-à-dire résultant de la condensation d'acides aminés de la série L avec formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle d'un acide aminé. La chaîne polypeptidique obtenue se replie sur elle-même grâce à différents types de liaisons, pour donner un édifice tridimensionnel bien défini (fig.1). La diffraction des rayons X sur des cristaux d'enzyme permet de décrire cette structure dans laquelle on distingue une cavité où s'effectue la réaction catalysée par l'enzyme. Cette cavité est appelée site actif, lieu de fixation du substrat.

Selon la réaction catalysée, les enzymes sont classées en six grandes catégories : oxydoréductase, transférase, lyase, isomérase, ligase, hydrolase (lipase, estérase, protéase, amidase, acylase, glycosidase).⁴

En ce qui nous concerne nous intéresserons principalement aux lipases car ce sont les enzymes les plus utilisés en synthèse organique. Ce sont des biocatalyseurs peu coûteux, disponibles, faciles à manipuler et à stocker, et leur utilisation ne nécessite pas de cofacteur.

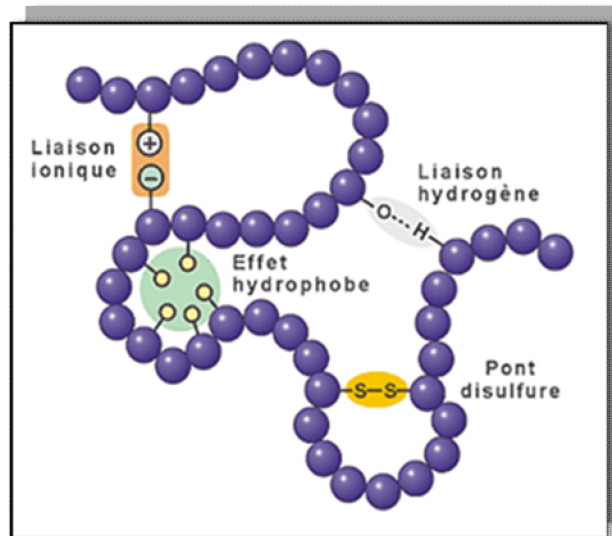


Figure 1 : Structure tertiaire d'une protéine.⁵

1.3. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique

Quelque soit le type de réaction catalysé, un cycle catalytique enzymatique se déroule généralement en quatre étapes⁶ :

a - diffusion des réactifs dans le milieu

b - reconnaissance enzyme substrat : elle est réalisée grâce à la complémentarité structurale entre le substrat et le site actif.

La formation du complexe enzyme-substrat (E-S) peut s'expliquer soit par le modèle de simple complémentarité stérique, soit par celui de l'ajustement induit.

La fixation E-S est réalisée par établissement de liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, et liaisons de Vander Wals. Cette approche du substrat vers l'enzyme, peut induire une modification de la géométrie du site actif pour une meilleure orientation du groupe réactionnel.

c - mécanisme catalytique

L'enzyme et son substrat sont associés par diverses forces d'interaction ils constituent alors un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instable qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction et d'aller vers la formation des produits.

C'est la reconnaissance enzyme substrat qui permet le rapprochement de certains groupes fonctionnels et facilite ainsi la rupture et la formation de certaines liaisons du substrat.

d - Expulsion des produits

Une fois l'étape catalytique proprement dite effectuée, le produit formé reste transitoirement fixé à l'enzyme par des interactions de faible énergie. Il est en suite libéré pour permettre à l'enzyme de retrouver sa conformation native plus stable.⁵ le schéma 1 suivant résume l'ensemble de ces étapes :

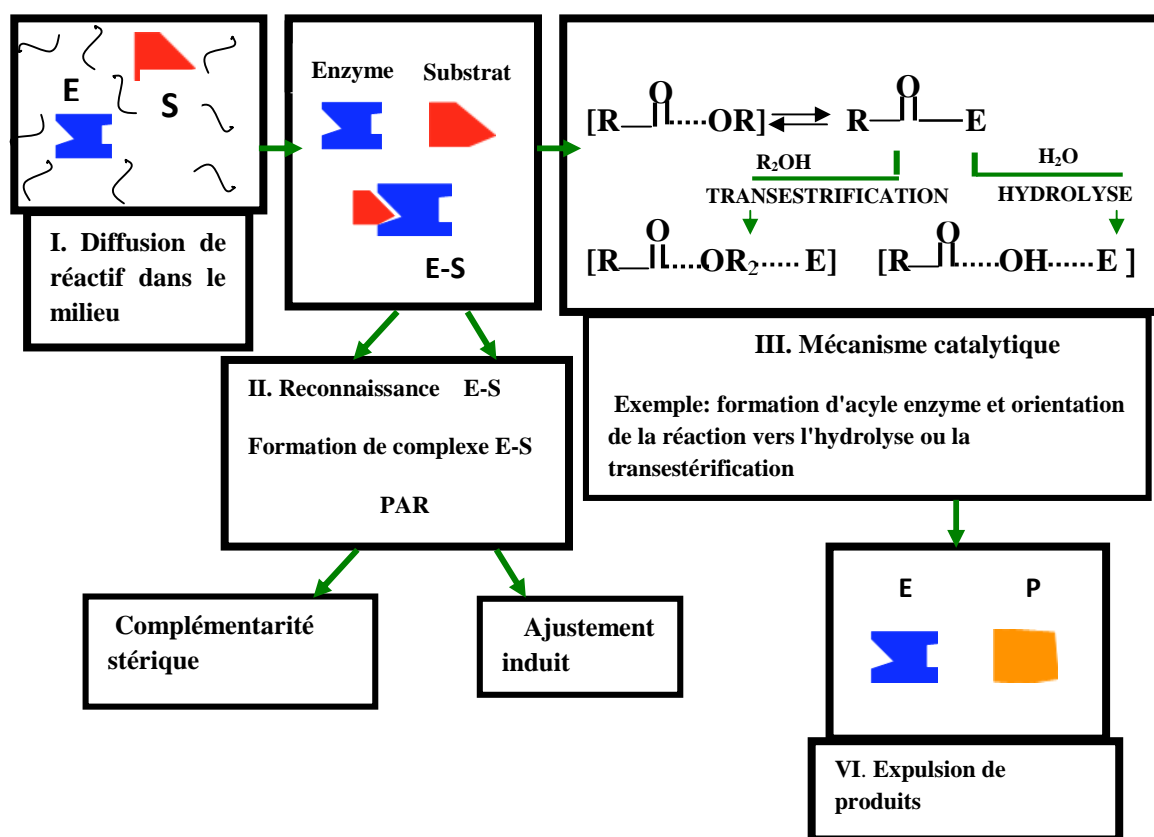


Schéma 1: Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique

1.4. Dédoublage cinétique enzymatique

Le développement de nouvelles stratégies permettant la préparation de composés énantiomériquement purs est un enjeu majeur en synthèse organique.

La résolution cinétique de mélanges racémiques reste encore aujourd'hui la voie la plus utilisée pour la synthèse de molécules chirales, en particulier à l'échelle industrielle.

Les résolutions cinétiques enzymatiques sont, notamment, très efficaces en terme de sélectivité.⁷ Cette méthode permet d'obtenir le composé désiré avec un rendement théorique maximum de 50%.

Aux cours de la réaction, les deux énantiomères réagissent avec une cinétique différente, ce qui permet l'énantiosélectivité de la réaction

Cette différence de cinétique est la conséquence directe des contraintes structurales imposées par le site actif de l'enzyme. Le gêne stérique dont sera "victime" le mauvais énantiomère va entraîner une hausse de l'énergie d'activation de la réaction par rapport au bon énantiomère.⁸ (Schéma 2)

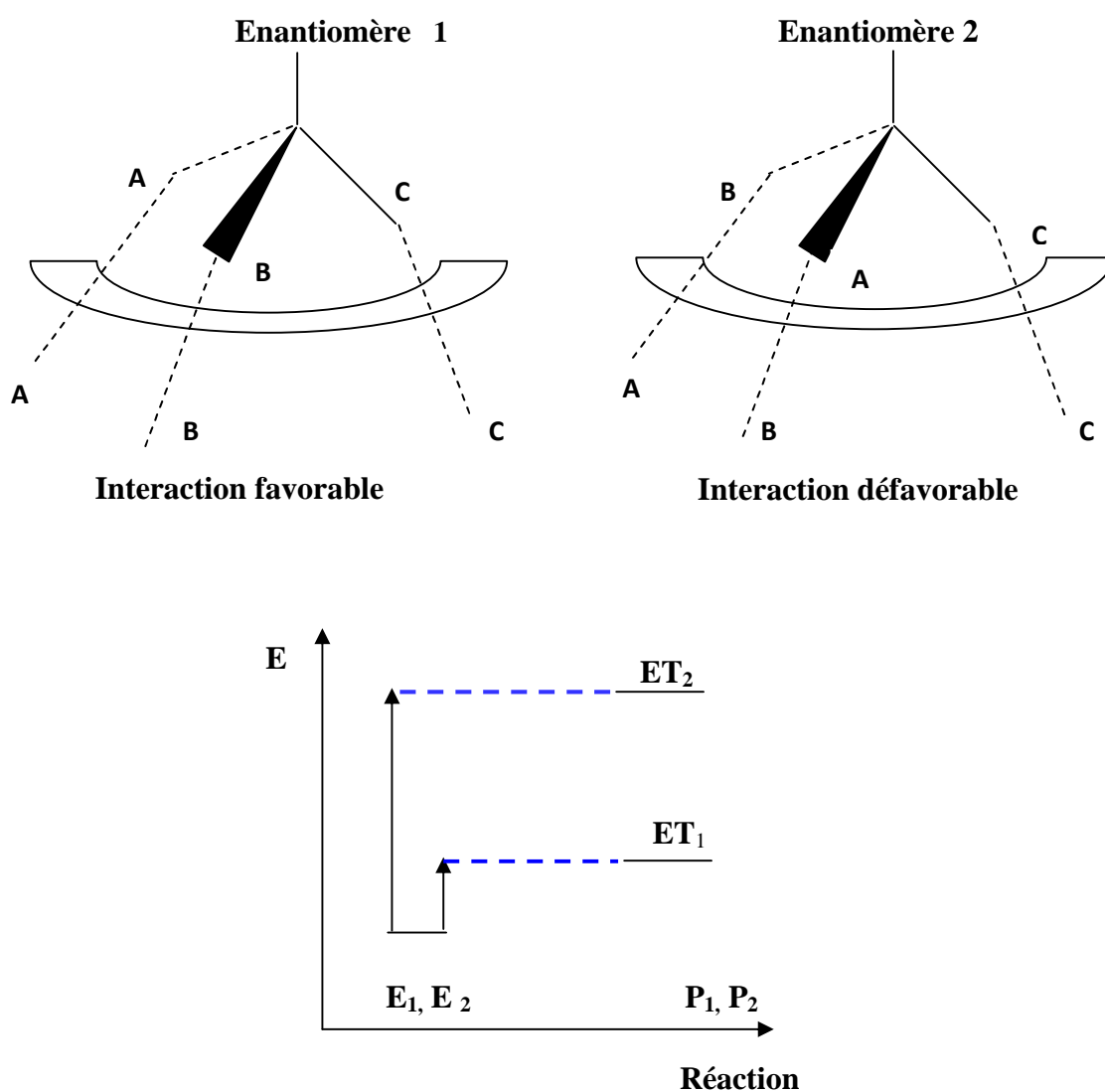


Schéma 2 : Diagramme d'énergie d'activation de réaction.⁸

E_1, E_2 : énantiomère 1 et 2

ET_1, ET_2 : état de transition relatif aux énantiomères 1 et 2

P_1, P_2 : produit correspond aux énantiomères 1 et 2

1.4.1. Paramètres d'évaluation du dédoublement cinétique enzymatique

L'évaluation de la réaction de dédoublement cinétique enzymatique est possible grâce à des équations mathématiques décrites par Sih⁹.

Soit (ee) l'excès énantiomérique de deux énantiomères R et S, on a

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \dots\dots\dots eq (1)$$

Soit (C) la conversion chimique de la réaction ($1 > C > 0$), on a :

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \dots\dots\dots eq(2)$$

-Le facteur de sélectivité (E): qui caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour un énantiomère donné, il est le rapport des vitesses de formation des deux énantiomères en compétition; soit

$$E = \frac{k_R}{k_S}$$

En tenant compte les équations (1) et (2), le facteur d'énantiosélectivité (E) peut alors s'exprimer comme suit :

$$E = \frac{\text{Ln} [(1-C)(1+ ee_p)]}{\text{Ln} [(1-C)(1- ee_p)]} \quad \text{ou} \quad E = \frac{\text{Ln} [(1-C)(1- ee_s)]}{\text{Ln} [(1-C)(1+ ee_s)]}$$

Ces équations sont valables uniquement dans le cas d'une réaction de dédoublement cinétique enzymatique irréversible.

1.5. Les lipases

Les lipases sont des hydrolases d'esters carboxyliques et appartiennent à la classe des triacylglycérols acyle-hydrolases (EC3.1.1.3). Ce sont des enzymes largement répandues dans la nature. Elles ont des origines diverses (bactérienne, fongique, végétale, pancréatique, hépatique) et présentent un panel de spécificités de substrat très large par rapport à d'autres classes¹¹. Par exemple, la lipase B de *Candida antarctica* est employée pour catalyser l'acylation d'une grande diversité de substrats tels que les alcools, les amines, les acides aminés, les sucres ou encore des flavonoïdes.¹⁰⁻¹³ Un autre avantage intéressant est que ces biocatalyseurs ne nécessitent pas la présence d'un coenzyme contrairement à beaucoup d'autres.¹⁴

1.5.1. Réactions catalysées par les lipases

En milieu aqueux, les lipases catalysent spécifiquement l'hydrolyse de liaison esters dans des systèmes biphasiques, à l'interface entre la phase aqueuse dans laquelle elles sont solubilisées et la phase apolaire constituée par l'ester d'acide gras non solubilisée. Cette réaction constitue la fonction première des lipases dont les substrats naturels sous forme d'émulsion sont les tri-acyles glycérols. Il en résulte la libération de mono-et di-acylglycérols, de glycérol et d'acide gras. Cette activité hydrolytique trouve des applications dans de nombreux secteurs industriels comme l'industrie laitière pour la production d'arôme ou dans le traitement des effluents. Dans les milieux pauvres en eau, les lipases catalysent la réaction inverse, c'est-à-dire la synthèse de liaison esters. En fonction de la quantité d'eau libre présente dans le milieu, c'est l'une ou l'autre de ces deux réactions qui se trouve favorisée. La synthèse d'une liaison ester, quelle soit catalysée par une lipase ou par un agent chimique, peut se faire selon trois schémas réactionnels :

- la réaction d'estérification directe entre un acide et un alcool,
- la réaction de transesterification qui regroupe :
 - La réaction d'alcoolyse (ester+ alcool = ester' = alcool'),
 - La réaction d'acidolyse (ester + acide = ester' + acide'),
- la réaction d'inter-estérification (ester + ester' = ester'' + ester '').

Dans ce dernier cas, les lipases catalysent la coupure puis la synthèse de liaison esters de façon séquentielle. Le terme estérification fait référence à la réaction entre un acide et un

alcool, toutefois les lipases présentent en réalité un spectre de substrats beaucoup plus large et sont capable de transférer un groupe acyle sur des atomes autres que l'oxygène, comme le soufre et l'azote, créant ainsi des liaisons thioesters et amides.^{15,16}

1.5.2. Sélectivité des lipases

Les lipases sont des catalyseurs très largement utilisés en synthèse organique principalement en raison de leur stabilité et leur activité en milieu organique. De plus elles présentent une grande chimiosélectivité, régiosélectivité, et stéréosélectivité.

1.5.2.1. Régiosélectivité

La régiosélectivité qualifie la préférence d'une enzyme à interagir avec l'un des groupes fonctionnels identiques d'une molécule substrat. Les molécules de type peptide constituent souvent une problématique de régiosélectivité enzymatique lors de leur acylation.

Une étude consacrée à l'acylation du peptide modifié L-Phe- α -L-Lys-O-t-Bu a mis en évidence que plusieurs lipases présentaient une régiosélectivité marquée en faveur de la fonction amine en position ϵ de la lysine plutôt que la fonction amine en position α du phényle alanine¹⁷. Des observations similaires ont été faites concernant l'acylation de la lysine biocatalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) en solvant organique¹⁸.

1.5.2.2. Chimio-sélectivité

La chimiosélectivité est la capacité d'une enzyme à interagir préférentiellement avec un groupe fonctionnel donné parmi des groupes fonctionnels distincts. Une étude consacrée à l'acylation enzymatique de la sérinamide, présentant une fonction amine primaire en position α et une fonction hydroxyle sur la chaîne latérale, a montré la propriété de chimio sélectivité de la lipase de *Candida antarctica* immobilisée (Chirazyme[®]) à catalyser essentiellement l'O-acylation en solvant organique.¹⁹

1.5.2.3. Enantiosélectivité

L'énantiosélectivité se définit comme la spécificité d'une enzyme pour un substrat en fonction de sa stéréochimie. Des études récentes illustrent parfaitement la capacité des lipases à catalyser la N-acylation énantioselective de molécules aminées à centre chiraux^{20, 21}. Ces propriétés d'énantioselectivité seraient dues à une conformation tridimensionnelle particulière des résidus aminés catalytiques de leur site actif.

2. Immobilisation des enzymes

2.1. Généralités

L'immobilisation est une technique qui confine une enzyme ou une fraction cellulaire dans une région de l'espace avec rétention de l'activité catalytique ou biologique pour une utilisation en continu et de façon répétée ; les différentes propriétés liées au support sont les suivantes :

- Une grande superficie
- Perméabilité
- Rigidité élevée
- Forme et dimension particulière appropriée
- Résistance à l'attaque microbienne
- Régénérabilité
- Une stabilité chimique, thermique, et mécanique

2.2. Techniques d'immobilisation

De nombreuses méthodes d'immobilisation sont connues, dont les principales sont²²:

- Immobilisation par liaison
- Inclusion
- Réticulation

Les différentes techniques d'immobilisation découlant des trois principales méthodes d'immobilisation sont résumées par le schéma 2 :

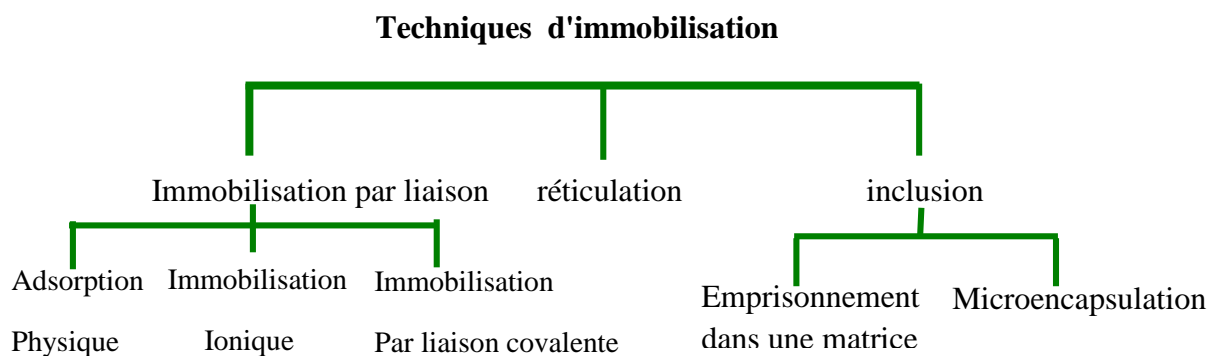


Schéma 3: les différentes techniques d'immobilisation²²

2.2.1. Immobilisation par liaison

C'est la plus ancienne méthode d'immobilisation. Elle consiste en la rétention d'enzyme sur une phase insoluble dans l'eau par une liaison chimique ou physique. Dans cette méthode la quantité d'enzyme retenue et l'activité sont extrêmement variables et sont évidemment fonction de la nature de support. Selon le mode de couplage, ce procédé peut être classifié de trois manières :

- Immobilisation par adsorption physique
- Immobilisation par liaison ionique
- Immobilisation par liaison covalent

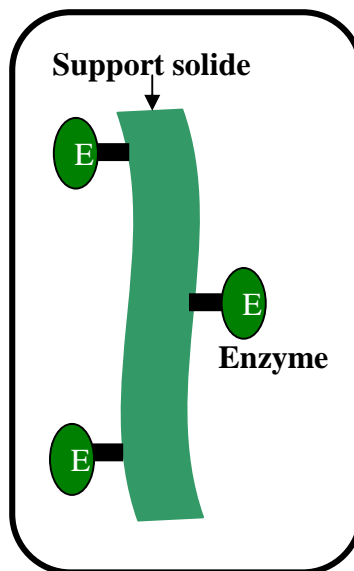


Figure 2 : Immobilisation par liaison²⁰

2.2.1.1. Adsorption physique

L'adsorption physique demeure la méthode la plus simple et la plus rentable²⁴. Dans ce procédé, l'enzyme est retenue à la surface d'un corps adsorbant minérale ou organique grâce à différents types de liaisons¹ : interactions de Vander Wals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, transfert de charge, échange de ligands, chimiosorption²⁵.

Différents supports (chitosane²⁶, kaolin²⁷, la celite²⁸, carbonate de calcium²⁹) ont été exploités pour l'immobilisation des enzymes; ils sont très variés tant de point de vue de leur

structure chimique que du point de vue de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité, etc.).

Cette technique est simple, réversible, mais la fixation n'est pas spécifique et les risques de désorption sont importants.

2.2.1.2. Immobilisation ionique

Les enzymes portent, par leurs résidus d'acide aminé, des charges ioniques. Elles peuvent donc se prêter aux phénomènes d'échange d'ion. Ces interactions seront très dépendantes du pH du milieu en raison du caractère amphotère des résidus d'acide aminés. La différence principale entre l'immobilisation par adsorption et l'immobilisation ionique est que la force de liaison entre le support et l'enzyme est beaucoup plus forte pour cette dernière.

Différents polysaccharides et polymères synthétiques ayant des centres d'échange d'ion sont habituellement utilisés comme supports²².

2.2.1.3. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzyme et support. Pour la réalisation de la liaison covalente il faut une activation préalable soit du support, soit de l'enzyme, car les groupes fonctionnels de l'enzyme ne sont généralement pas suffisamment réactifs. Mais c'est surtout l'activation du support qui a fait l'objet des nombreuses études, car l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme est délicate et peut conduire à la dénaturation de l'enzyme.

Différents supports tels que la silice³⁰, Eppergit³¹ (résine adsorbante) carboxyméthylcellulose³² ont été exploités pour cette technique.

2.2.2. Réticulation

En traitant un enzyme par un agent chimique hydrosoluble bi fonctionnel et susceptible de réagir sur les groupements fonctionnels libres de celui-ci, on obtient un réseau enzymatique tridimensionnel insoluble (fig.3). Le glutaraldehyde est un agent de réticulation parmi les plus utilisés³³

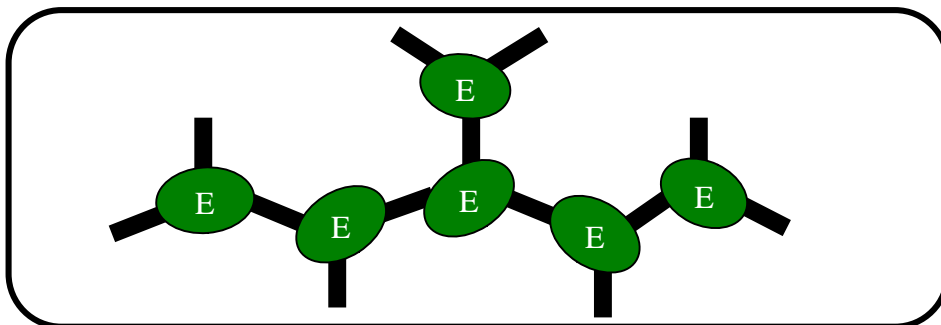


Figure 3: Immobilisation par réticulation²³

Cette méthode a l'avantage de fournir des dérivés insolubles constitués presque exclusivement d'enzyme. Malheureusement les produits sont gélatineux est difficile à filtrer et leur propriétés mécaniques sont médiocre. En outre une très importante perte d'activité enzymatique accompagne la réticulation.

2.3.3. Inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une micro capsule. Plusieurs polymères, entre autre l'alginate, le chitosan, le gel de polyacrylamide et le gel d'amidon sont utilisés.

2.3.3.1. Immobilisation par Microencapsulation

L'enzyme en solution aqueuse est enfermée dans des microcapsules sphériques, dont la paroi est une membrane semi-perméable qui peut être liquide ou solide (fig.4). Cette membrane retient l'enzyme mais laisse passer le substrat et le produit⁴.

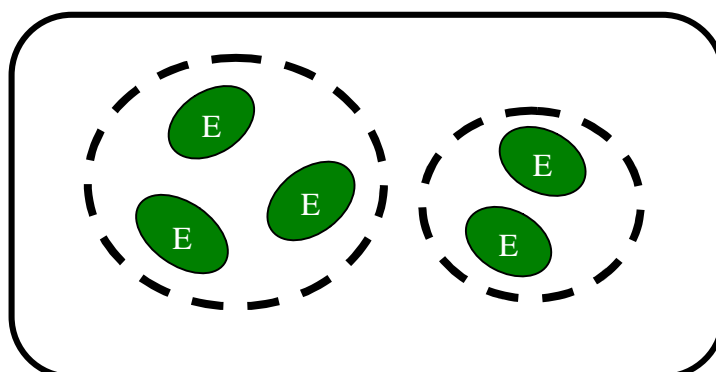


Figure 4 : Immobilisation par Microencapsulation²³

2.3.3.2. Emprisonnement sur une matrice

L'enzyme est dissoute dans une solution aqueuse d'un monomère et d'un réticulant .la polymérisation est ensuite effectuée à des conditions moins dénaturantes possibles, on obtient un réseau macromoléculaire tridimensionnel dans les mailles duquel l'enzyme se trouve retenu de façon plus ou moins efficace.

Cette technique est simple et très utilisée pour diverses enzymes, mais les risques de fuite ne sont pas négligeables, si les mailles du réseau sont larges. De plus on observe souvent une dénaturation importante de l'enzyme due à une réaction du polymère avec les groupes fonctionnels responsables de la protéine⁴.

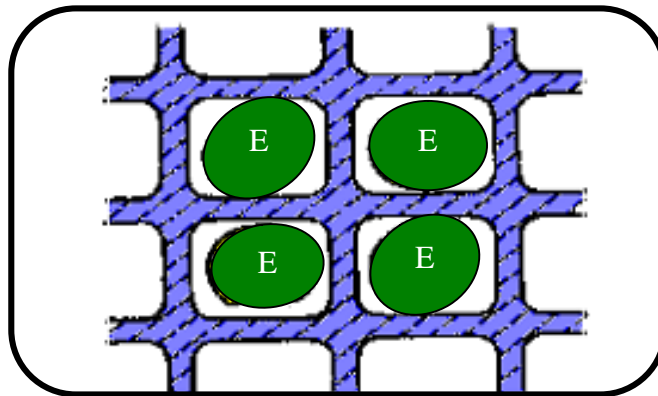


Figure 5 : Emprisonnement dans une matrice²³

2.3. Comparaison de différentes méthodes d'immobilisation

Le tableau 2 résume les différentes méthodes d'immobilisation avec leurs principales caractéristiques :

Tableau 1. Comparaison de différente méthode d'immobilisation³⁴

Caractéristiques	Réticulation	Adsorption	Ionique	Covalente	Inclusion
Préparation	Intermédiaire	Facile	Facile	Difficile	Difficile
La force de liaison	Forte	Faible	Moyenne	Forte	moyenne
Activité enzymatique	Faible	Moyenne	Elevé	Forte	Faible
Réutilisation	Impossible	Possible	Possible	Rare	Impossible
Coût	Moyennement coûteuse	Moins coûteuse	Moins coûteuse	Coûteuse	Moyennement coûteuse
Stabilité	Haute	Faible	moyennement	Haute	Haute

3. Application des lipases immobilisées

Les lipases immobilisées sont susceptibles d'application particulièrement nombreuses et diversifiées³⁵; des différents travaux indiquent leur application en milieu aqueux tels que l'hydrolyse des triglycérides^{36, 37} et la résolution des esters racémiques afin d'obtenir des composés optiquement actif³⁸.

Nous donnons ci-dessous quelques exemples récents concernant les applications des lipases immobilisées en synthèse organique. Nous verrons que celle-ci permet de résoudre de nombreux problèmes en particulier ceux liés à l'obtention de composés isomériquement purs.

3.1. Accès au S-Naproxène par hydrolyse enzymatique :

Le Naproxène appartient à la classe des médicaments à action anti-inflammatoire (non stéroïdien) et le **S**-Naproxène est 28 fois plus actif par rapport à son énantiomère **R**.

L'accès à l'énantiomère actif a été effectué par une hydrolyse enzymatique du mélange racémique des esters méthyliques du Naproxène³⁹. L'enzyme utilisée est la *Candida rugosa*

immobilisée sur une résine (Amberlite XAD 7). Une optimisation classique a été effectuée afin de définir les conditions de réaction permettant d'aboutir à une conversion et une énantiosélectivité optimales.

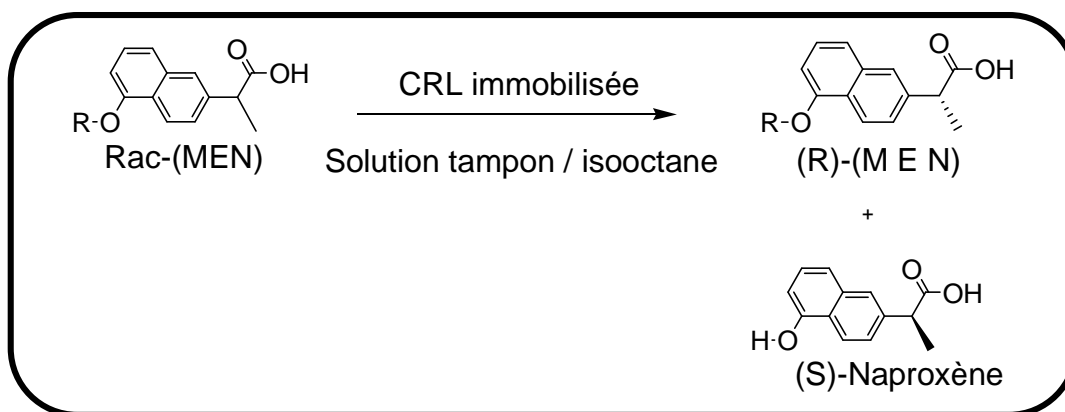


Schéma 4: Synthèse de S-Naproxène

La plus grande conversion $C = 49\%$ et l'énantiosélectivité élevée $E = 174$ ont été observées lorsque la température et le pH de la réaction d'hydrolyse sont les mêmes que ceux de l'immobilisation ($\text{pH} = 6$, $T = 45^\circ\text{C}$). Ces conditions permettent d'éviter une désorption trop élevée de l'enzyme de son support.

3.2. Synthèse d'acétate de vitamine E

La vitamine E est un antioxydant qui joue un rôle préventif dans le développement de diverses maladies (cancer, athérosclérose, diabète, rhumatisme) en empêchant les radicaux libres d'endommager les membranes cellulaires^{40, 41}.

Cet exemple présente une transestérification dans le but de produire l'acétate de vitamine E (-tocophérol) par une acylation en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle et en présence d'un solvant organique, le 2-méthyl-2-butanol (schéma 4)⁴²

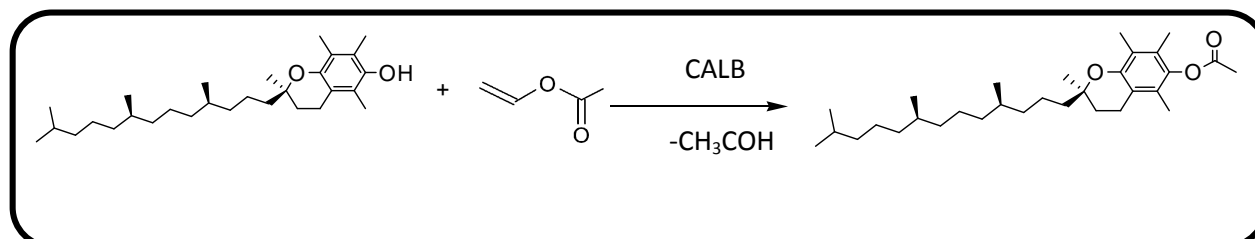


Schéma 4 : Synthèse d'acétate de vitamine E

La lipase *Candida antarica* B (CALB) employée dans cette étude est immobilisée sur trois supports différents:

- 1- résine échangeuse d'ion
- 2- polymère biodégradable
- 3-Polypropylène

Des trois supports utilisés, le polypropylène est celui qui a permis une plus grande activité enzymatique. Elle est expliquée par la grande porosité du polymère qui permet une plus grande diffusion et donc faciliter le contact entre le substrat et l'enzyme.

3.3. Résolution du menthol racémique

L'estérification de (\pm)-menthol avec l'anhydride propionique ont été effectuée en utilisant la lipase *Candida rugosa* (CRL) immobilisée sur des particules magnétiques⁴³.

L'effet des différents paramètres de la réaction d'estérification tels que, la température, le temps de réaction, et la concentration de substrat sur la conversion et l'énantiosélectivité a été étudiés. Les conditions permettant d'aboutir à une conversion et une énantiosélectivité optimale (C = 48.8%, ee = 88%) sont : T = 30°C, temps = 2.5 h, [menthol] = 0.2 mol/l.

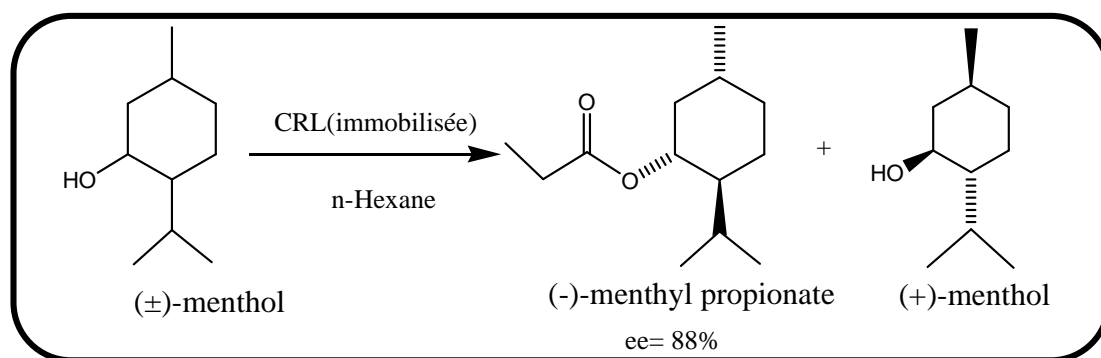
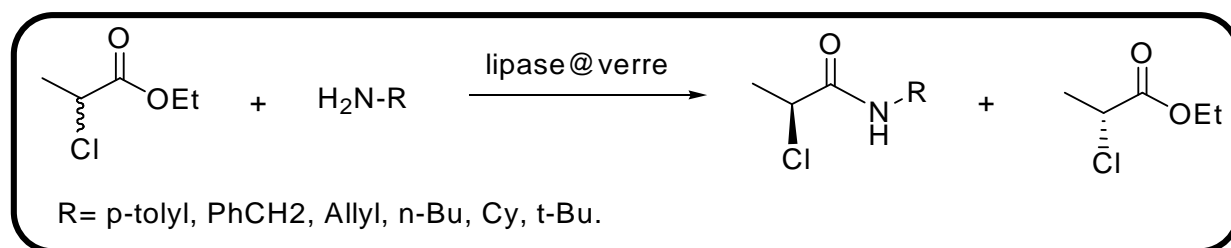


Schéma 6 : Résolution énantiosélective du (R, S) menthol

3.4. Aminolyse énantiosélective du 2-Chloropropionate d'Éthyle

L'aminolyse du 2-chloropropionate d'éthyle par la lipase CCL immobilisée par encapsulation dans le verre silice poreux a permis d'augmenter son activité et sa stabilité et a donné des produits avec de bon rendement et d'excellent excès énantiomérique⁴⁴.

**Schéma 7:** Aminolyse énantiosélective du 2-Chloropropionate d'Éthyle**Tableau 3.** Aminolyse énantiosélective du 2-Chloropropionate d'Éthyle par les amines RNH₂ catalysée par la lipase *C.cylindracea*

Entrés	R	Temp(C°)	Temps (h)	CCL@verre ^a		CCL ^b	
				Rendt (%)	ee(%)	Rendt (%)	ee(%)
1	p-tolyl	60	24	28	76	0.6	37
2		25	127	92	86	2.4	5
3	PhCH ₂	60	24	20	95	1.4	6
4		25	170	43	97	4.5	62
5	Allyl	25	4	25	3	2.1	0
6		5	12	23	3	1.5	0
7	n-Bu	25	6	40	88	1.5	39
8		5	12	38	95	1.3	96
9	Cy	25	3	58	84	2.0	62
10		5	3	22	77	1.5	37
11	t-Bu	25	4	51	13	1.7	0
12		5	12	50	10	1.5	0

^aL'enzyme encapsulée. ^bFraction soluble de l'enzyme.

4. Conclusion

Les lipases, de par leur capacité à hydrolyser et à estérifier, trouvent des applications dans différents secteurs. L'utilisation des enzymes continue toujours à présenter de nombreuses potentialités à exploiter. L'immobilisation est une des stratégies qui permet d'élargir le champ d'utilisation de ces enzymes, et les travaux récents montrent le grand intérêt que peuvent avoir les lipases immobilisées en chimie organique.

Au-delà de l'aspect application des enzymes immobilisées, les recherches concernant l'optimisation des conditions d'immobilisation en parvenir à de meilleur activité et/ou de sélectivité.

Parmi les méthodologies employées, celle des plans d'expérience est de plus en plus utilisée, le chapitre suivant sera consacré à la présentation de cette méthodologie.

1. Introduction

Dans toute recherche expérimentale, comme c'est le cas en chimie, le chercheur essaye toujours de trouver la meilleure stratégie pour conduire ses expériences.

Les plans d'expériences sont une méthodologie de choix pour répondre à cette préoccupation.

Ils sont, en effet, applicables à toutes les disciplines expérimentales où l'on recherche le lien existant entre un gradeur mesurée, y , et des variables, x_i , qui peuvent modifier sa valeur, c'est-à-dire l'étude et l'analyse de la relation $y = f(x_i)$.

Avec la méthodologie des plans d'expériences, on obtient les informations les plus fiables en un minimum d'essais. Les effets des différents facteurs intervenant dans le processus étudié, sont alors quantifiés et les conditions optimales définies. Avec le développement de l'outil informatique et l'apparition de logiciels performants, cette tâche est rendue encore plus facile.

2. Présentation de la méthode des plans d'expériences

Lors de l'étude d'un phénomène, c'est-à-dire celle de la relation $y = f(x_i)$, le chercheur effectue des plans des expériences. Celles-ci peuvent être conduites de manière classique ou de manière planifiée, comme c'est le cas des plans d'expérience.

Nous allons dans ce qui suit, présenter la méthode classique puis celle des plans d'expériences.

2.1. Méthode classique

Une méthode classique consiste à fixer le niveau de tous les facteurs sauf un, et l'on mesure la réponse y en fonction de différents valeurs du facteur non fixée.

A la fin de l'expérimentation sur cette première variable, on peut tracer la courbe : $y = f(x_i)$, (fig.1).

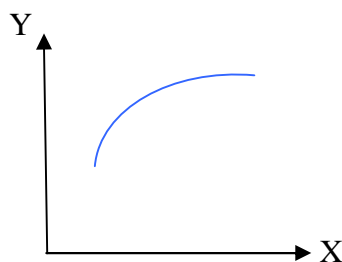


Figure 1: La courbe $y = f(x)$ ⁴⁵

Si l'on veut étudier toutes les variables il faut recommencer chacune des expériences⁴⁵. Cette méthode est coûteuse en nombre d'essai et inefficace : elle ne permet pas d'optimiser le processus ni de trouver d'éventuelles interactions entre les facteurs. Pour cette raison les expérimentateurs font appel à la méthode des plans d'expériences.

2.2. Méthode de plan d'expérience

Les plans d'expériences constituent, essentiellement, une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates, de manière efficace et rapide. La méthodologie des plans d'expérience se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira nécessairement à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats.⁴⁶

La démarche de cette méthodologie peut se décomposer en trois étapes :

- 1) choix d'une méthode d'expérimentation
- 2) l'analyse des résultats
- 3) l'acquisition progressive des connaissances

2.2.1. Choix d'une méthode d'expérimentation

Le choix d'une méthode d'expérimentation est tributaire d'une bonne définition de la problématique à traiter.

Tous les facteurs pouvant avoir une influence sur la réponse doivent être pris en compte dans l'établissement du plan d'expériences.

Cette phase, essentielle, repose sur les points suivants :

2.2.1.1. Description de problème

D'une manière générale, la description d'un problème, quel qu'il soit, consiste à répondre à un certain nombre de questions que résument la méthode de SADO connue sous le nom de méthode de "QQCQQP"⁴⁷.

Ces questions sont les suivantes :

Q : En quoi consiste le problème ?

Q : Qui est gêné par le problème ? Qui est le demandeur de l'étude ?

C : Combien de cas ? Combien ça coûte ?

Q : Où cela se passe-t-il ?

Q : Quand cela arrive-t-il ?

P : Pourquoi est-ce un problème ?

2.2.1.2. Détermination de l'objectif d'étude

Les deux objectifs visés sont généralement :

- ❖ "Débroussailler" : de faire le tri parmi l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer la réponse
- ❖ l'ensemble des combinaisons des facteurs, y compris celle non essayées. Ceci est notamment nécessaire si l'on souhaite optimiser le système étudié.⁴⁶

2.2.1.3. Détermination des réponses

Une réponse doit être représentative, quantifiable, et la moins dispersée possible pour des facteurs maîtrisés et constants

Une réponse mal adaptée conduira à des conclusions sans intérêt.⁴⁷

2.2.1.4. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Les facteurs sont des grandeurs supposées influencer sur les variations des réponses qui peuvent être⁴⁸ :

- continue : comme la température, volume, etc.
- qualitatif : comme un état, une couleur, etc.

Les facteurs continus sont pleinement caractérisés par les valeurs suivantes :

- borne inférieur (b_{inf}) : limite basse (ou niveau bas) des valeurs que le facteur peut prendre
- borne supérieur (b_{sup}) : limite haute (ou niveau haut) des valeurs que le facteur peut prendre (fig.2).

Le domaine du facteur ne doit être trop petit ni trop large, pour que les conclusions aient une certaine généralité.

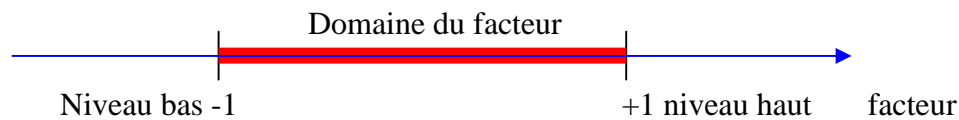


Figure 2 : Représentation du domaine d'étude pour un seul facteur⁴⁹

2.2.1.5. La sélection des facteurs

Parmi un ensemble de facteurs donné par l'expérimentateur, tous ne sont pas obligatoirement réellement influents sur les variations de la réponse. C'est la technique de screening qui permettra de déterminer ceux ayant une influence avérée, en utilisant des plans dits "plan de criblage" qui permettent de quantifier et de classer les effets de chacun des facteurs.

Parmi ces plans, citons le plan de PLACKETT-BURMAN qui est basé sur la matrice d'Hadamard qui présente les propriétés suivantes⁵⁰:

- 1) les éléments sont +1, ou -1 ;
- 2) les matrices sont carrées et possèdent un nombre de ligne (ou de colonne) égale à 2 ou un multiple de 4 ;
- 3) ces matrices sont orthogonales, c'est-à-dire que le produit scalaire de deux lignes (ou colonne) égale à zéro

Dans un plan Plackett- Burman chaque facteur n'a que deux niveaux plus le niveau au milieu de la plage de variation (les essais au centre du domaine)⁵¹. Le tableau 1 précise le nombre d'essais à réaliser en fonction du nombre de facteurs à étudier.

Tableau 1. Nombre d'essais du plan de Plakett-Burman en fonction du nombre de facteurs

Nombre de facteur	Nombre d'essai de plan	Nombre d'essai au centre	Nombre d'essai totale
2 à 3	4	3	7
4 à 7	8	3	11
8 à 11	12	3	15
12 à 15	16	3	19
16 à 19	20	3	23
20 à 23	24	3	27
24 à 27	28	3	31
28 à 31	32	3	35
32 à 35	36	3	39
36 à 39	40	3	43
40 à 43	43	3	47

Le modèle mathématique postulé pour ce plan du premier degré et sans interaction (purement additif):

$$y_k = b_0 + \sum_i b_i x_{ik} + \epsilon_k$$

y : la réponse

x_i : niveau attribué au facteur i

b_0 : valeur de réponse au centre du domaine

ϵ_k : résidu (écart)

2.2.1.6.. L'importance des mesures aux points centraux

Un point au centre permet de comparer la moyenne expérimentale des réponses à celle calculé par le modèle. Ceci permettra d'évaluer la validité du modèle qui découle de celui proposé par la théorie des plans factoriels (qui nous verrons par la suite). Si l'on effectue

plusieurs mesures aux points centraux on pourra également avoir une idée sur l'erreur expérimentale.⁴⁵

2.2.1.7. Choix du plan d'expérience

Le choix du plan sera guidé par l'analyse de tous les points précédents. On distingue plusieurs types de plans :

a- Les plans factoriels complets à deux niveaux

Pour ces plans le nombre de niveaux de chaque facteur est restreint à deux et le nombre des essais réalisés est égal à 2^n (n représente le nombre de facteurs). Toutes les combinaisons de niveau sont effectuées au cours de l'expérimentation, chaque combinaison représente les conditions dans lesquelles les réponses sont mesurées.

Les diagrammes ci-dessous montrent un plan à deux (fig. 3.A), et à trois facteurs (fig.3.B), ou les points représentent une combinaison unique de niveau de facteurs.

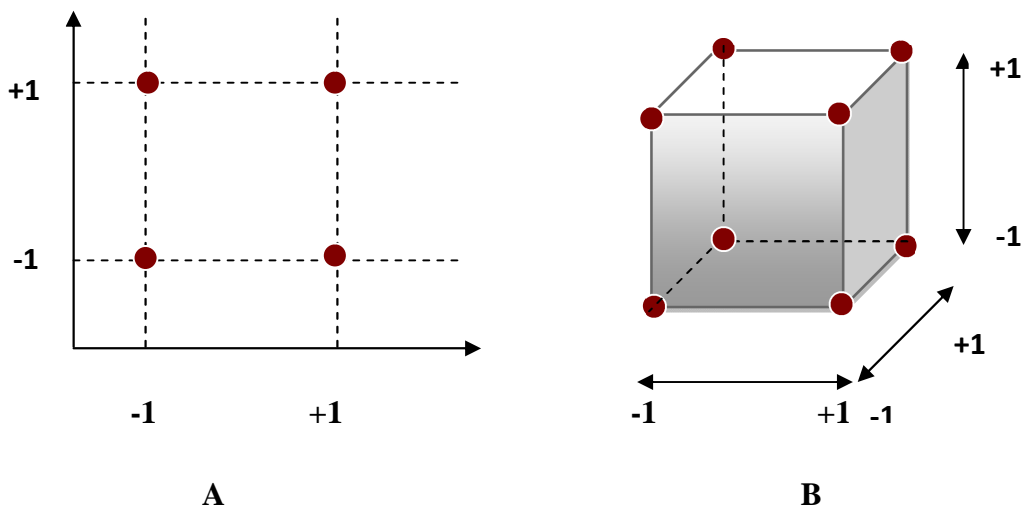


Figure 3: Répartition des points expérimentaux dans le domaine expérimentale

A : plan factorielle à deux facteurs

B : plan factorielle à trois facteurs

Le modèle mathématique postulé relatif à ce plan est le suivant :

$$y = b_0 + b_i x_{ik} + b_{ij} x_{ik} x_{jk} + \dots$$

y : réponse, x_i, x_j : niveau attribuer au facteur i, j

b_0 : valeur de réponse au centre du domaine d'étude

b_i : l'effet du facteur i

b_{ij} : l'interaction entre i et j

ϵ_k : résidu (écart)

Dans une expérience factorielle complète les réponses sont mesurées pour toutes les combinaisons de niveaux de facteur, ce qui peut se traduire par un nombre d'essais très élevé (exemple : 9 facteurs requiert 512 essais) ;

Pour minimiser le temps et le coût on peut exclure certaines combinaisons, et aboutir à des plans appelés factoriels fractionnaires.

b- Les plans factoriels fractionnaires

Les plans factoriels fractionnaires sont des plans factoriels permettant d'étudier tous les facteurs avec un nombre d'essais réduits par rapport aux plans factoriels complets dont le nombre d'essais augmente exponentiellement avec celui des facteurs.

Par exemple, 64 essais sont nécessaires pour étudier 6 facteurs, et pour 7 facteurs on passe à 128 essais. Les plans fractionnaires sont alors indispensables pour réduire le nombre d'essais. Ils sont basés sur la théorie des alias que nous allons présenter ci-dessous à partir d'un exemple simple de 3 facteurs.

Le modèle mathématique de la réponse d'un plan factoriel à 3 facteurs comporte 8 coefficients :

$$y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3$$

Si on effectue 4 essais, on obtient un système de quatre équations à 8 inconnues. On ne sait pas résoudre le système. Comme y n'a que 4 essais, on ne peut calculer que 4 inconnues. On adopte le modèle :

$$y = l_0 + l_1X_1 + l_2X_2 + l_3X_3$$

$$\text{Avec: } l_0 = a_0 + a_{123}, l_1 = a_1 + a_{23}, l_2 = a_2 + a_{13}, l_3 = a_3 + a_{12}$$

On dit que les coefficients sont alaisées dans les contrastes. Et les interprétations de ces plans sont basées essentiellement sur différentes hypothèses ⁴⁷

c - les plans de surface de réponse

Ces plans permettent d'établir des modèles mathématiques de second degré (modèle quadratique complet)

$$Y = b_0 + b_i x_{ik} + b_{ij} x_{ik} x_{jk} + b_{ik} x_{ik}^2 + k$$

Parmi les plans de seconds degrés les plus employés citons

- les plans composites centrés
- Les plans de Box-Behnken
- les plans hybrides

- Les plans composites centrés

Un plan composite centré est constitué de trois parties ⁵² (fig.9):

- i. Un plan factoriel dont les facteurs prennent deux niveaux
- ii. un point expérimental au moins situé au centre du domaine d'étude
- iii. Les points axiaux ; ces points sont situés sur les axes

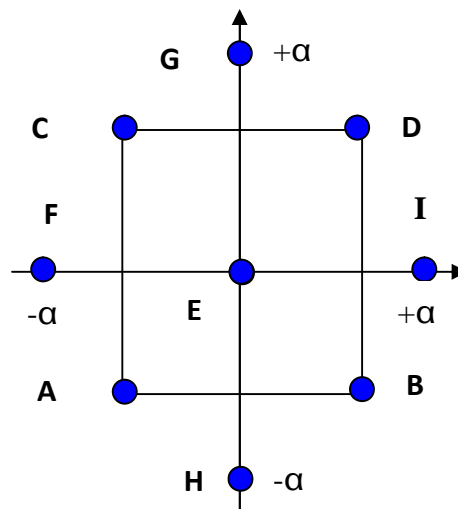


Figure 4 : Plan composite pour deux facteurs

- Le point E c'est le point central ; ce point peut avoir été répliqué une ou plusieurs fois

- les points : F, G, H, et I sont les points axiaux, ces quatre derniers points forment ce que l'on appelle, le plan étoile
- est déterminé en respectant le critère d'optimalité de presque orthogonalité par la formule suivante :

$$\alpha = \frac{(n_f (n - n_f))^{1/4}}{4}$$

Le nombre total de n essais à réaliser est la somme de :

- 1- les essais des plans factoriels, soient n_f
- 2- Les essais des plans étoile, soient n
- 3- Les essais au centre, soient n_0

Le nombre totale n essais d'un plan composite est donné par la relation suivante :

$$n_t = n_f + n + n_0$$

- Les plans de Box-Behnken

Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (fig.5). Ce plan comporte 12 essais auxquels on peut y ajouter un ou plusieurs points centraux. La matrice du tableau 2 présente ces 12 essais accompagnés d'un seul point central. Dans la pratique on réalise souvent 3 ou 4 point au centre.

Les plans de Box-Behnken répondent à un critère d'optimisation particulier : l'erreur de prévision des réponses est la même pour tous les points d'une sphère centrée à l'origine du domaine expérimental. C'est le critère d'isovariance par rotation.⁴⁹

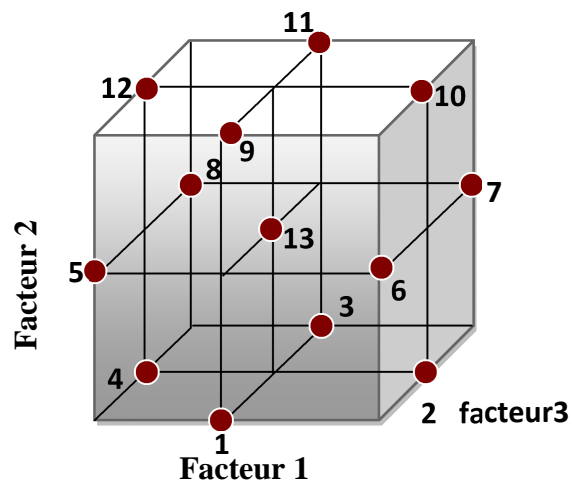


Figure 5 : Plan de Box-Behnken pour trois facteurs.⁴⁹

Tableau 2. Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.

N° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	0	-1	-1
2	+1	0	-1
3	0	+1	-1
4	-1	0	-1
5	-1	-1	0
6	+1	-1	0
7	+1	+1	0
8	-1	+1	0
9	0	-1	+1
10	+1	0	+1
11	0	+1	+1
12	-1	0	+1
13	0	0	0

- Les plans hybrides

Ce sont des structures très particulières qui ont pour intérêt principal leur faible nombre d'essais par rapport aux deux catégories précédentes. Mais ces plans sont peu robustes au non-respect du niveau de facteur.

2.2.3. Analyse de résultats

De nombreux logiciels commerciaux sont spécialement conçus pour les plans d'expérience (JMP⁵³, Minitab⁵⁴, Statisca⁵⁵, Statgraphics⁵⁶, Unscrambler⁵⁷, Pirouette⁵⁸, Modde⁵⁹). Ils permettent dans un premier temps, de définir la matrice d'expérience et dans un deuxième temps le traitement des données expérimentales obtenues.

2.2.3.1. Calcul des effets

Pour illustrer notre propos, nous donnons ci-dessous, un exemple d'un plan complet à deux facteurs x_1 , x_2 et une réponse y . La matrice d'expériences correspondante est la suivante :

Tableau 3 : matrice de réponse du plan factorielle 2^2

	Moyenne	Facteur	Facteur	Interaction	Réponse y
		x_1	x_2	$x_1 \cdot x_2$	
1	1	-1	-1	+1	y_1
2	1	+1	-1	-1	y_2
3	1	-1	+1	-1	y_3
4	1	+1	+1	+1	y_4

Les formules générales donnant les effets et les interactions d'un plan factoriel complet 2^2 sont les suivantes :

$$A_0 = 1/4 (y_1 + y_2 + y_3 + y_4)$$

$$A_1 = 1/4 (-y_1 + y_2 - y_3 + y_4)$$

$$A_2 = 1/4 (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4)$$

$$A_{1*2} = 1/4(y_1 - y_2 - y_3 + y_4)$$

De façon générale ;

$$A_0 = 1/N \sum y_i$$

$$A_{ij} = 1/N \sum x_{ij} y_{ij}$$

Le calcul des différents effets précédents permet de déterminer l'effet de chaque facteur (fig. 6,7)

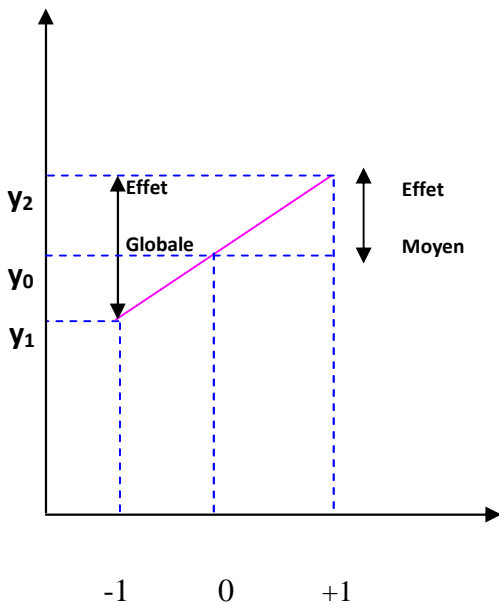


Figure 6: Illustration de l'effet de facteur 1⁵²

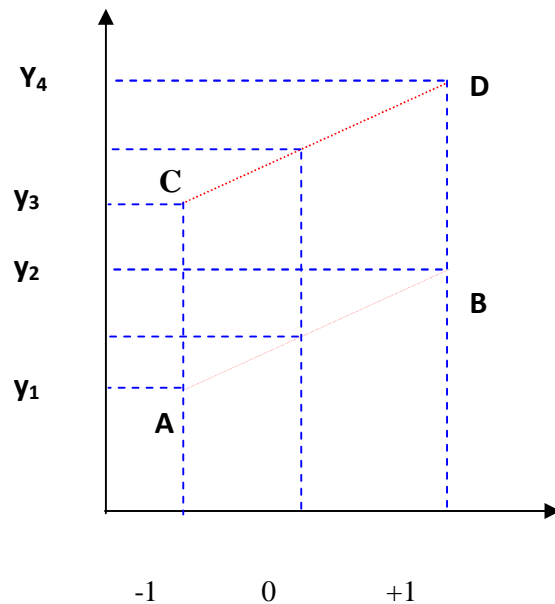


Figure 7: Illustration d'une interaction⁵²

- L'effet du facteur 1 est la variation de la réponse entre le centre du domaine d'étude et le niveau haut de facteur 1

- l'interaction apparaît comme la demi-différence entre l'effet du facteur 1 au niveau bas du facteur 2. Elle traduit une variation de l'effet d'un facteur en fonction du niveau d'un autre facteur

L'effet moyen du facteur est défini comme étant la moitié de l'effet globale ; on distingue :

- L'effet global $y_2 - y_1$

- L'effet moyen $(y_2 + y_1) / 2$

S'il n'y a pas d'interaction entre deux facteurs, les pentes des droites AB et CD sont identiques ($AB \parallel CD$)

S'il n'y pas d'interaction entre deux facteurs, les pentes des deux droites précédentes sont différentes.

2.2.3.2. Analyse des résultats de calcul

De nombreuses rubriques existent dans les logiciels traitant des plans d'expériences (sommaire d'ajustement, analyse de variance, etc.) qui donnent les informations nécessaires à une bonne appréciation des résultats (modèles obtenus)

a- Graphique de comparaison des réponses mesurées et réponses estimées

Plus les points du graphique sont proche de la première bissectrice, plus le modèle rend assez bien compte des réponses, et vice-versa (fig.8)

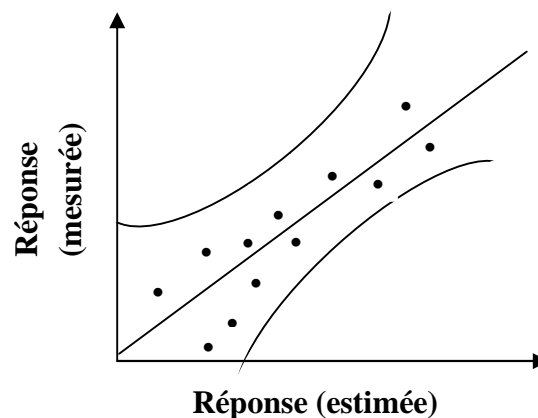


Figure 8 : Graphique de comparaison de réponse mesurée et estimée

b. Résumée de la pertinence du modèle (qualité descriptif)

La pertinence de modèle est généralement vérifiée par le coefficient de détermination. Il est défini comme le rapport de la variance expliquée par le modèle à la variance totale qu'il faut expliquer. Ce coefficient varie entre 0 et 1, plus il est proche de 1 plus les réponses calculées seront fortement corrélées avec les réponses expérimentales.⁵²

Où ;

$$R^2 = \frac{\sum (y_i'' - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} = \frac{SCM}{SCT}$$

y : la matrice de réponse mesurée

y'' : la matrice de réponse calculée par le modèle

\bar{y} : la matrice de la moyenne de réponse

SCM : la somme des carrés moyen

SCT : la somme des carrés totale

2.2.3.3. La technique d'analyse de variance

L'analyse de variance (ANOVA) permet de comparer les variances des valeurs calculées par le modèle et les résidus. Cette analyse constitue un test statistique (test de Fisher-Snedecor) et elle fournit les réponses aux questions suivantes⁴⁶ :

- Est-ce que le modèle nous apporte quelque chose ? la régression est elle significative ? explique-t-elle en grande partie les variations observées de y_i ?

C'est le test de signification globale de la régression que nous appellerons le **test de validation 1**.

- Est que le modèle représente bien le phénomène ? si oui, le modèle introduit un biais acceptable. Si non, il convient d'en chercher un autre. la première validation concerne donc l'analyse de des résidus du modèle. nous appellerons cette étape, le **test de validation 2**.

a- Test de validation 1

Le test de Fisher-Snedecor(F_1) va nous dire si le modèle nous apporte quelque chose, si l'équation établit bien une relation entre la variation des facteurs et de la réponse, ou si c'est dû à un changement aléatoire de la réponse dans le domaine expérimentale.

$$\text{Soit ; } F_1 = \frac{\text{SCM} / (p-1)}{\text{SCRES} / (N-1)}$$

$$\text{SCT} = \text{SCM} + \text{SCRES} \text{ et } \text{SCRES} = \sum_i^2$$

SCRES : la somme des carrés des résidus

Pour qu'il existe le moins de résidu possible, il faut que le rapport F_1 le plus grand possible.

Dans ce cas on pourra dire que le modèle apporte de l'information.

En d'autre terme, F1 nous renseigne sur la probabilité **Prob_{F1}** de rejeter l'hypothèse nulle. Donc dans ce cas, nous voulons obtenir la plus petite valeur possible de cette probabilité. On dira qu'au dessous de 5%, nous n'avons pas de raison de rejeter le modèle.

Le tableau.4 résume les différents calculs et notation de ce test

Tableau 4. Récapitulatif du test de validation 1

Source	Somme de carrés	ddl	Test F	Probabilité
Modèle	SCM	P-1	$\frac{SCM}{p-1}$	
Ecarts	SCRES	N-P	$\frac{SCRES}{N-P}$	
Total	SCT	N-1		

Toutes ces informations sont données par les logiciels cités dans un tableau d'analyse de régression

b -Test de validation 2

Bien que les écarts entre les valeurs observées et les valeurs calculées par le modèle aient été minimisés par le choix de la méthode des moindres carrés, il faut s'assurer que localement, les résidus ne soit pas anormalement importants. Tout d'abord on calcule à partir de l'équation du modèle les différents y_i on obtient alors la valeur de résidus :

$$e_i = Y_i - \hat{Y}_i$$

On calcule ensuite la somme des carrés des résidus notés SCRES

$$SCRES = SCE_1 + SCE_2$$

SCE₁ : l'erreur due au manque d'ajustement du modèle appelé aussi le biais ou encore le **Lack of Fit**

SCE₂ : l'erreur pure ou naturelle appelé **Pure Error**.

Pour estimer si ce que l'on obtient est acceptable, on procède à un test de **Fischer-snedecor** loi de **F**. la loi de **F** dépend du nombre de degré de liberté de chacune des deux populations donc :

$$F_2 = \frac{SCE_1/ddl_{SCE1}}{SCE_2/ddl_{SCE2}}$$

ddl : le degré de liberté représente le nombre de coefficients indépendants que la régression permettra d'estimer. ⁶⁰

On a donc : $ddl_{SCRES} = ddl_{SCE} + ddl_{SCE2} = N - P$

N : représente le nombre d'essai ; **P** : représente le nombre de coefficient

Le test F (F_2) va être calculé en posant une hypothèse nulle (H_0 : hypothèse nulle que le rapport soit égale à 1. c'est à dire si les résidus liée au modèle sont du même ordre de grandeur que l'erreur naturelle, on teste si le modèle est juste et fidèle). on obtiendra la probabilité ($probF_2$) de trouver un rapport égale à 1. On dira qu'au dessus de 5 , Nous n'avons pas de raison de rejeter le modèle.

Ce test n'est faisable qu'en présence de répétition ce qui permet de connaître SCE_2

Le tableau.5 résume les différents calculs et notation de ce test

Tableau 5. Récapitulatif du test de validation 2

Source	Somme de carrées	ddl	Test F	Probabilité
Lack of fit	SCE_1	ddl_{SCE1}		
Pure error	SCE_2	ddl_{SCE2}	$\frac{SCE_1/ddl_{SCE1}}{SCE_2/ddl_{SCE2}}$	$ProbF_2$
Résidus	$SCRES$	ddl_{SCRES}		

Meilleur ajustement du modèle si :

- R^2 proche à 1
- $\text{Prob}F_1 < 5$ F_2 le plus petit possible
- $\text{Prob}F_2 > 5$ F_1 le plus grand possible

2.2.2.4. Analyse graphique des résultats

Un des grands avantages des plans d'expériences est la présentation des résultats sous forme graphique qui constitue une projection de la surface de réponse dans le plan horizontale (fig.9)

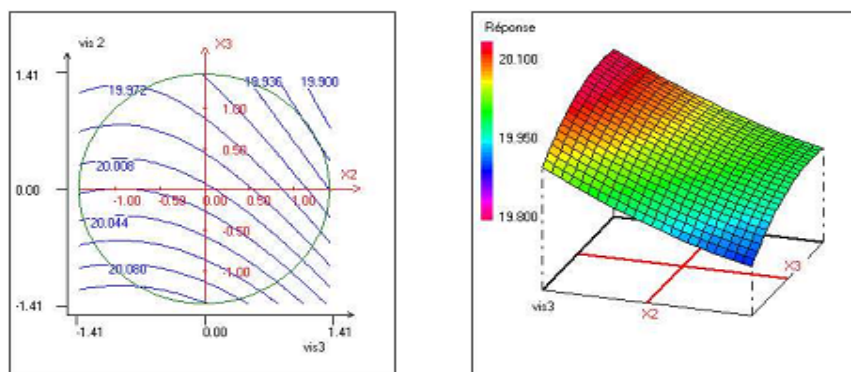


Figure 9: Courbe d'iso- réponse et surface de réponses⁴⁶

Les graphiques sont avant tout un outil d'aide à l'interprétation des résultats mais, ils permettent également de manière plus communicative lors d'une réunion de tirer plus rapidement des conclusions et ainsi d'orienter la poursuite d'une étude.

2.2.2.5 Validation de l'hypothèse et recherche de solution au problème

L'analyse de résultats d'essais permet d'identifier une combinaison optimale des facteurs qui n'a pas forcément fait l'objet d'un essai dans le plan. Il faudra alors tester la combinaison optimale, qui n'a pas été faite dans le plan d'expérience, ce qui arrive fréquemment. Avec cet essai final, on rejettera ou pas le modèle proposé.

De plus, quand on arrive à l'étape de l'analyse finale, il faut vérifier le résultat obtenu par l'analyse est plausible ou non.

Dans l'essai de validation, soit l'essai confirme les informations

- Si oui, le plan d'expériences aura joué son rôle et permis de mettre en évidence les facteurs influents et/ou d'optimiser et la réponse, c'est-à-dire trouver les valeurs des facteurs qui donnent la réponse optimale
- Si non, il faudra alors examiner les conditions dans lesquelles a été oublié ou s'il ne se cache pas un effet d'interaction entre deux facteurs ou encore d'autres choses

2.2.3. Acquisition progressive des connaissances

A ce stade, l'expérimentateur désire de l'information supplémentaire et en fonction de l'analyse du premier résultat obtenu ; il choisira sa stratégie

- Plan complémentaire : pour désaliaser les effets principaux et les interactions qui pouvaient présenter des ambiguïtés
- Essai complémentaire
- Niveaux de facteur : lorsque les facteurs préfixées deviennent actifs
- Nouveau domaine : le choix d'un nouveau domaine d'étude peut provenir de plus raison le domaine initial était trop grand ou il était trop petit, le domaine initial ne contient pas des résultats intéressants,

La démarche de la méthodologie de plan d'expérience est résumée dans le schéma général suivant⁴⁵.

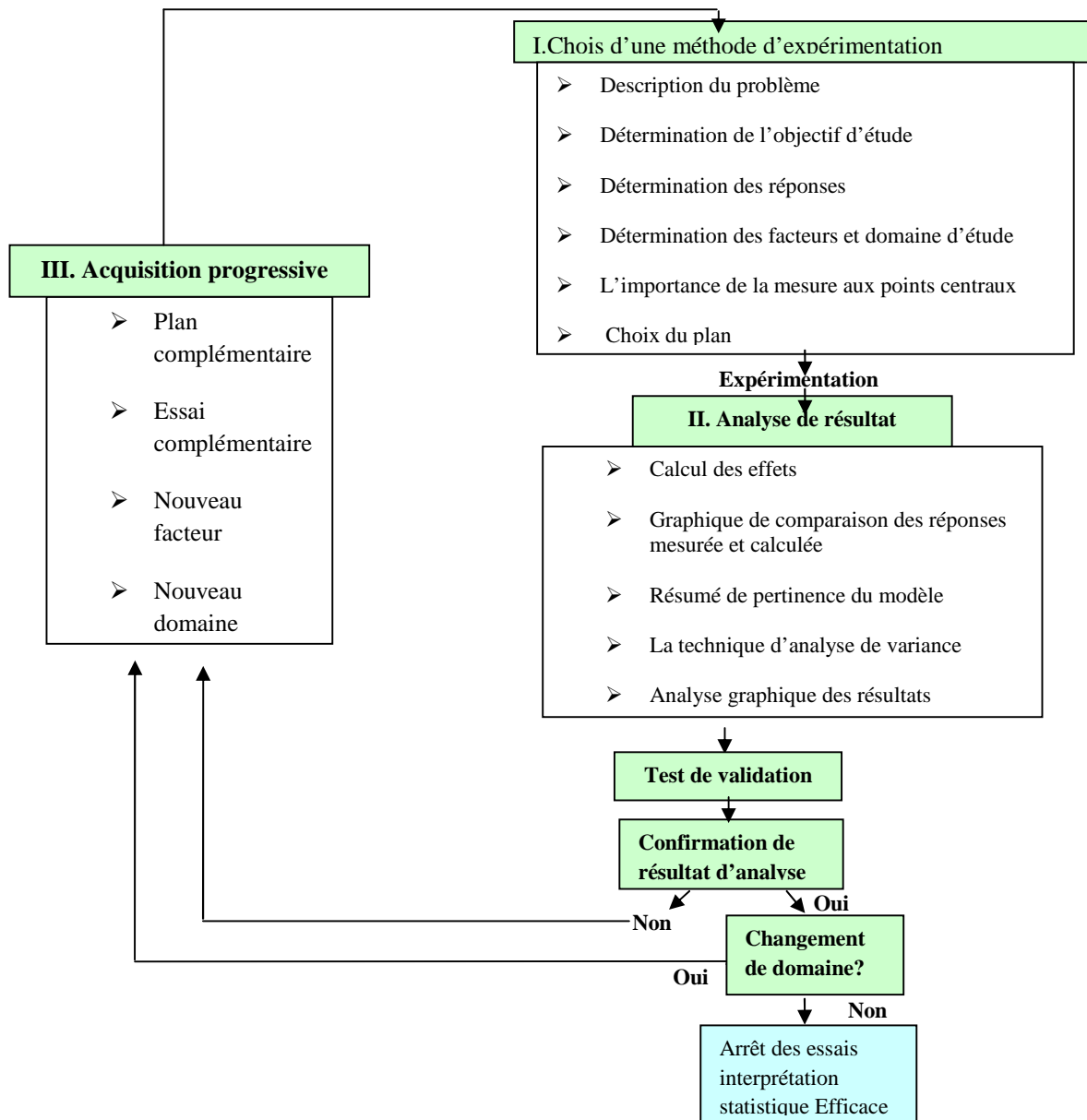


Schéma 1: la démarche de la méthodologie de plan d'expérience⁴⁵

3. Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre les éléments bibliographiques essentiels relatifs à la compréhension de la méthodologie des plans d'expériences, dont on a résumé schématiquement les grandes étapes. Nous allons présenter dans ce qui suit, l'application de cette méthodologie dans l'étude de l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* dans le but de connaître l'influence des différents paramètres réactionnels sur le fonctionnement de l'enzyme.

La lipase de *Candida rugosa* (CRL) est une enzyme très étudiée et largement employée dans de nombreuses réactions d'hydrolyse et de synthèse⁶¹⁻⁶⁷. En raison de sa large panoplie de substrats, mais également pour ses propriétés stéréo- et régiosélectives, elle est utilisée dans l'industrie en particulier dans la préparation de composés pharmaceutiques³⁹.

Le travail que nous avons réalisé concerne l'étude de l'immobilisation ionique de la lipase de *Candida rugosa* sur une résine anionique, l'Amberjet 4200 ClTM, dont l'utilisation en tant que support d'immobilisation, n'a, à notre connaissance, jamais été décrite.

Notre travail concerne l'étude de l'influence des conditions d'immobilisation sur l'activité et l'énantiosélectivité de la lipase de *Candida rugosa* par la méthode des plans d'expériences. Pour ce faire, nous avons choisi l'acylation énantiosélective du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle. Cette réaction modèle est souvent utilisée pour évaluer l'activité et l'énantiosélectivité des lipases⁶⁸ :

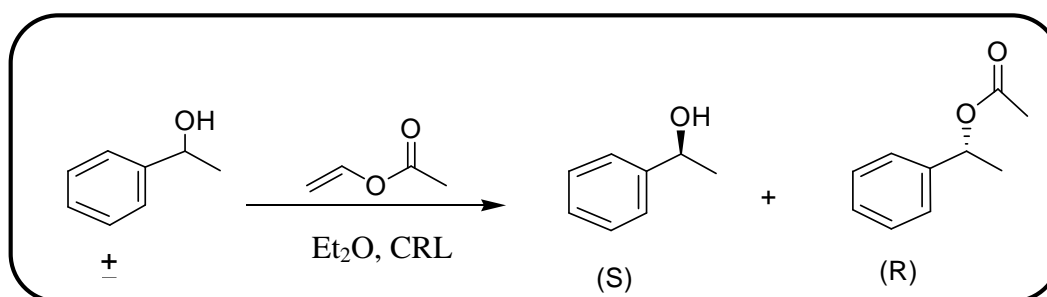


Schéma 1 : L'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle

Avant d'entamer notre étude, nous avons réalisé une réaction en présence du support seul. Aucune réaction n'a été observée. Le support seul ne catalyse pas la réaction.

1. Préparation du plan d'expérience

1.1. Description du phénomène d'immobilisation

Parmi les différentes possibilités d'immobilisation, nous avons choisi d'immobiliser notre enzyme sur une résine anionique. Cette technique basée sur un échange ionique, est décrite dans de nombreux travaux et utilise différents supports, comme la cellulose, la duolite, le dorex, Indion 850, etc.⁶⁹⁻⁷²

D'une manière générale, le mécanisme d'immobilisation d'une protéine sur une résine anionique s'effectue par un échange d'anion entre la résine et les charges négatives portées par les résidus des acides aminés.

Dans notre étude nous avons utilisé un support original, l'Amberjet 4200 CI™ qui est une résine anionique fortement basique possédant une forte capacité d'échange.

Le choix de cette technique d'immobilisation est basé sur les propriétés et avantages suivants :

- travail dans des conditions relativement douces
- pas de risque de modifier la conformation protéique
- simplicité de mise en œuvre
- bonne capacité de réutilisation
- faible degré de désorption

1.2. Objectif de l'étude

L'objectif de notre travail est l'étude de l'influence des conditions réactionnelles d'immobilisation sur le fonctionnement de l'enzyme et principalement la détermination des conditions optimales permettant de maximiser l'énantiosélectivité qui est, par conséquent, la réponse du plan d'expériences.

1.3. Détermination des facteurs et domaine d'étude

Dans notre travail nous avons décidé de prendre en compte 7 facteurs potentiellement influents sur le cours de la réaction. Ces facteurs ainsi que le domaine de variation, sont précisés dans le tableau 1 :

Tableau 1. Facteurs et domaine d'étude du plan initial.

Facteur	Unité	Niveau -1	Niveau +1	Symbole
Température	°C	25	45	T
Temps	heures	5	15	t
pH	/	5.5	8.5	pH
Vitesse d'agitation	tpm	100	300	Vag
Volume de solution de tampon	ml	20	30	Vtp
Concentration du tampon	mmol/l	20	60	[tp]
Rapport en quantité de protéine E/S (mg de E / g de S)	mg/g	80	160	E/S

1.4. Démarche expérimentale

Nous avons décidé de faire appel dans un premier temps à un plan de criblage. C'est un plan de premier degré permettant de trier les facteurs en faisant ressortir les plus influents. Il est également utile pour évaluer la pertinence d'un modèle de premier degré.

Nous avons choisi le plan de Plackett et Burman car c'est généralement le plus employé dans les études similaires à la notre en raison de son économie en terme du nombre d'essais.

2. Construction du plan de criblage et réalisation des essais

2.1. Matrice des expériences

Le plan de Plackett et Burman pour 7 facteurs, comprend 11 essais, dont 3 au centre du domaine. Il a été réalisé à l'aide du logiciel Minitab, version 14 (tableau 2).

Tableau 2. Matrice des expériences du plan de criblage.

N° Essai	T (°C)	pH	t (h)	V _{ag} (tpm)	V _{tp} (ml)	[tp] (mmol/l)	E/S*
1	45	5.5	5	300	20	60	160
2	45	8.5	5	100	30	20	160
3	45	8.5	15	100	20	60	80
4	25	8.5	15	300	20	20	160
5	45	5.5	15	300	30	20	80
6	25	8.5	5	300	30	60	80
7	25	5.5	15	100	30	60	160
8	25	5.5	5	100	20	20	80
9	35	7	10	200	25	40	120
10	35	7	10	200	25	40	120
11	35	7	10	200	25	40	120

* en milligramme de protéine par gramme de résine

3. Résultats du plan de criblage et interprétation

3.1. Résultats et collecte des données

Les essais ont été réalisés conformément à la matrice des expériences (tableau 2).

Les réactions ont été suivies par CPG chirale. L'attribution des configurations absolues R et S de l'ester formé et de l'alcool résiduel, a été établie sur la base des résultats de la littérature⁶⁸.

Le calcul du facteur d'énantiosélectivité E est le rapport des vitesses V_R et V_S de formation des deux esters énantiomères R et S ($E = V_R/V_S$). Cependant, les faibles taux de conversion obtenus dans les conditions réactionnelles employées, donnent des valeurs de V_S négligeables par rapport à celles de V_R , et ne permettent pas de déterminer E.

Dans la mesure où le plan de criblage est une étape préliminaire de sélection des facteurs, et sachant que pour les substrats utilisés la CRL est pro-R⁶⁸, nous avons contourné ce problème en tenant compte uniquement de V_R , qui est promotionnelle à E (tableau 3)

Tableau 3 : Réponses du plan de criblage.

N° essai	V_R (mmol/min.g ⁻¹)	C (%)	Rendement d'immobilisation (%)	Quantité de protéine retenue (mg/g de support)
1	3.56	3.70	8.01	12.81
2	7.66	13.20	19.3	30.88
3	4.62	12.20	14.13	11.3
4	50.76	17.70	20.56	32.89
5	158.54	14.10	10.95	8.76
6	5.89	2.60	12.44	9.952
7	0.00	0.00	2.23	3.568
8	0.00	0.00	3.16	2.52
9	16.13	13.90	22.92	27.5
10	15.93	11.20	24.37	29.24
11	15.73	12.60	21.09	25.3

Le tableau 3 comprend également les valeurs des taux de conversion de la réaction ainsi que les rendements d'immobilisation et le taux de protéine retenu par la résine.

Le taux de protéine fixée sur la résine ainsi que le rendement d'immobilisation, ont été calculé selon la formule :

$$R = [(P_T - P_L) / P_T] * 100$$

Avec :

P_T : quantité totale de protéine utilisée.

P_L : quantité de protéine dans l'eau de lavage.

$P_T - P_L$: quantité de protéine retenue par la résine

Les quantités de protéine ont été déterminées par la méthode de Bradford⁷³.

3.2. Traitement et analyse statistique des données

Le traitement des données a été effectué par régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab. Les valeurs des effets et les coefficients de régression du modèle sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4. Effets et coefficients estimés pour la réponse

Terme	Effet	Coefficient	Probabilité ($P < = 0.05$)
T	29.43	14.72	0.033
pH	-23.29	-11.65	0.058
t	49.20	24.60	0.008
Vag	51.62	25.81	0.007
Vtp	28.29	14.14	0.036
[tp]	-50.72	-25.36	0.007
E/S	-26.77	-13.38	0.042

Ces résultats qu'on peut également représenter par le diagramme de Pareto (fig.1), montrent que parmi tous les facteurs étudiés, seul le pH n'a pas d'influence significative sur la réponse au niveau de confiance choisi ($\alpha = 0,05$).

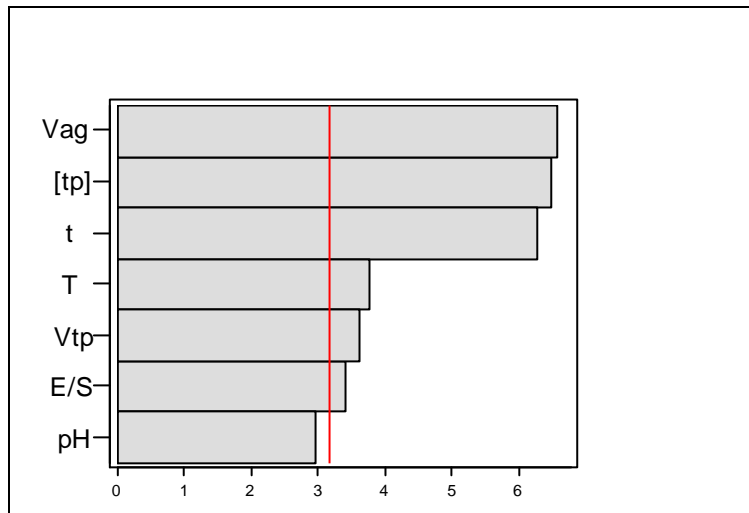


Figure 1 : Diagramme de Pareto des effets normalisés.

Par ailleurs, l'examen du diagramme des réponses estimées en fonction des réponses mesurées (fig.2) montre que malgré un bon coefficient de détermination ($R^2 = 0.983$), nous remarquons que trois points s'écartent de la première bissectrice. Le balayage de ces points à l'aide d'une fonction du logiciel Minitab, permet de déterminer le numéro de l'essai. En l'occurrence, les trois points concernés sont ceux au centre (essais 9, 10 et 11) qui ont été exclus du calcul du modèle. Cela signifie clairement que le modèle du 1^{er} degré ne peut pas rendre compte des résultats de mesure malgré le bon R^2 apparent.

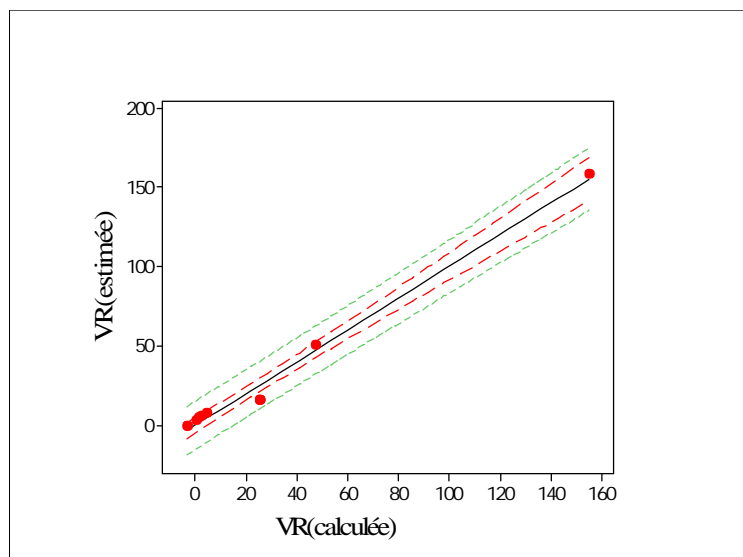


Figure 2 : Graphique des V_R estimées en fonction des V_R mesurées

Cela est également confirmé par la comparaison de la moyenne des valeurs des réponses obtenues au centre du domaine qui montre une différence nette entre la moyenne calculée et

celle estimée. ($\text{moy.}y_{(\text{expérimentale})} = 15.93$, $\text{moy.}y_{(\text{calculée})} = 25.34$). L'analyse de l'ANOVA (tableau 5) abonde dans le même sens (courbure avec $P = 0.00$ et valeurs résiduelles importantes).

Tableau 5. Analyse de variance pour V_R

Source	DL	SC	CM	F	P
Effets principaux	7	21167	3023.86	24.79	0.003
Erreur résiduelle	3	365.9	121.97		
Courbure	1	365.8	365.83	9E+03	0.000
Erreur pure	2	0.1	0.04		
Total	10	21532.9			

En conclusion, nous avons trouvé un bon modèle, ce qui permet d'avoir une idée préliminaire sur l'influence des différents facteurs. Cependant, les valeurs résiduelles importantes et le manque d'ajustement observé, montrent que le modèle linéaire ne peut pas décrire correctement le phénomène et que d'autres termes importants, comme des interactions ou des termes quadratiques ne doivent pas être exclus. Par conséquent, nous avons décidé de passer à un modèle du second degré du type :

$$y = b_0 + b_i X_{ik} + b_{ij} X_{ik} X_{jk} + b_{ik} X_{ik}^2 + \dots \text{ (eq.1)}$$

La question qui se pose alors, concerne le plan de second degré à utiliser et le choix des facteurs qu'il faut maintenir dans l'étude.

Parmi les nombreux plans d'expériences du second degré, nous avons choisi le plan de Box-Behnken qui ne nécessite pas un grand nombre d'essais. Il est facile à mettre en œuvre et déjà décrit dans des études similaires^{74, 75}.

Concernant le choix des facteurs, nous nous sommes basés sur les résultats du plan de criblage mais également sur des critères expérimentaux. Il ne faut pas perdre de vue que le critère expérimental, basé sur des considérations techniques et scientifiques, est toujours priorisé par rapport aux critères purement statistiques⁵².

Ainsi, parmi les 7 facteurs introduits au départ dans le plan de criblage, les valeurs de 4 d'entre eux ont été fixées et les autres conservés dans le plan de Box-Behnken.

- Le pH :

C'est le facteur le moins influent sur l'énantiosélectivité, il influe de façon négative.

A bas pH, on a de faibles taux de fixation de protéine et par conséquent de faibles taux de conversion (tableau 3). Cela peut être expliqué par la valeur du point isoélectrique de l'enzyme, $pI = 4.6-4.7$ ⁷⁶, qui est proche du niveau bas du facteur pH. A ces valeurs de pH, la protéine est faiblement ionisée et son adsorption par la résine est donc faible. Pour ces raisons, nous avons décidé de fixer le pH à 8 où la densité de la charge négative est prédominante. La liaison avec la résine anionique est par conséquent, plus forte.

- Le volume du tampon V_{tp} :

Ce facteur influe positivement sur la réponse. Ce résultat s'explique par une meilleure diffusion des réactifs dans le milieu. Nous avons donc décidé de le fixer à sa valeur haute, soit 30 ml.

- La température T :

L'influence de la température d'immobilisation est positive. Cependant, on ne peut aller au-delà de 40°C au risque de dénaturer la protéine et également la résine, instable à partir de 60°C⁷⁷

Par ailleurs, comme l'a montré Serpil *et al.*³⁹ lors de l'étude de l'immobilisation de la CRL sur une autre résine, l'AmberliteTM, les meilleures énantiosélectivités sont obtenues lorsque la température d'immobilisation et celle du dédoublement sont les mêmes car cela évite la désorption trop élevée de l'enzyme de son support.

En ce qui nous concerne, nous avons donc fixé la température d'immobilisation à 40°C, qui est la température de la réaction étudiée.

- La vitesse d'agitation V_{ag} :

Statistiquement, c'est le facteur le plus influent. Son influence est positive. Cependant, dans la mesure où le mode d'agitation employé (agitation magnétique) ne peut être régulé de manière précise, nous avons fixé ce facteur à sa valeur haute.

En conclusion, les 3 facteurs retenus pour le plan de Box-Behnken sont le temps (t), la concentration du tampon ([tp]) et le rapport enzyme-support (E/S) (tableau 6). Concernant ce dernier facteur, bien qu'il soit donné statistiquement comme peu influent, il a été quand même conservé dans l'étude. C'est en effet, un paramètre généralement décrit comme important par de nombreux auteurs^{75, 78}.

Tableau 6. Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken.

Facteurs		Niveau -1	Niveau +1
E/S	(X ₁)	80	160
Temps	(X ₂)	5	15
[Tampon]	(X ₃)	20	60

4. Plan de Box-Behnken. Résultats et interprétations

Le plan de Box-Behnken pour 3 facteurs, composé de 15 essais dont 3 au centre du domaine (essais 13, 14 et 15), ainsi que la réponse expérimentale, E, sont donnés dans le tableau 7.

Tableau 7. Plan de Box-Behnken et les résultats expérimentaux obtenus.

Essai	E/S	t	[tp]	E mesuré
1	80	5	40	5,55
2	160	5	40	4,20
3	80	15	40	4,25
4	160	15	40	3,84
5	80	10	20	4,98
6	160	10	20	4,73
7	80	10	60	3,93
8	160	10	60	4,17
9	120	5	20	3,83
10	120	15	20	3,80
11	120	5	60	4,27
12	120	15	60	3,43
13	120	10	40	1,52
14	120	10	40	1,75
15	120	10	40	1,53

Le traitement statistique des données du tableau 7 à l'aide du logiciel Minitab, permet d'estimer les coefficients du modèle (cf. eq.1) (tableau 8) :

Tableau 8. Coefficients estimés pour E

Terme	Coefficient	Probabilité
E/S (x_1)	-0.2848	0.000***
Temps (x_2)	-1.0172	0.000***
[tampon](x_3)	-0.2270	0.006***
E/S*E/S (x_1^2)	0.0011	0.010***
temps*temps(x_2^2)	0.0454	0.003***
[tampon]* [tampon] (x_3^2)	0.0027	0.003***
E/S*temps($x_1 \times x_2$)	0.001	0.354 ^{NS}
E/S*[tampon]($x_1 \times x_3$)	0.0002	0.571 ^{NS}
Temps*[tampon] ($x_2 \times x_3$)	-0.0020	0.362 ^{NS}

*** : corrélation très hautement significative au niveau de confiance de 99% ($P < 0.001$). NS : non significative. $R^2 = 96.1\%$, $R^2_{aj.} = 89.0\%$.

Nous remarquons à travers l'analyse du tableau 7 et celle de l'ANOVA (tableau 9), que les facteurs principaux et quadratiques ont des effets hautement significatifs, contrairement aux interactions entre facteurs. La non signification des interactions entre facteurs montre que l'effet d'un facteur ne dépend pas du niveau de l'autre.

Tableau 9. Analyse de variance pour E

Source	DL	SC	MS	F	P
Régression	9	19.9491	2.21656	13.54	0.005
Linéaire	3	1.5078	4.31889	26.39	0.002
Carré	3	18.0454	6.01514	36.75	0.001
Interaction	3	0.3958	0.13195	0.81	0.542
Erreur résiduelle	5	0.8183	0.166366		
Inadéquation de l'ajustement	3	0.7857	0.26191	16.07	0.059
Erreur pure	2	0.0326	0.01630		
Total	14	20.7674			

Par conséquent, dans le but d'améliorer le modèle obtenu, nous l'avons recalculé en éliminant les interactions entre facteurs. Les données du nouveau modèle obtenu sont résumées dans les tableaux 10 et 11.

Tableau 10. Coefficients estimés pour le modèle amélioré.

Terme	Coefficient	Probabilité
E/S	-0.2684	0.000
Temps	-0.9744	0.000
[tampon]	-0.2289	0.001
E/S*E/S	0.0011	0.000
Temps*Temps	0.0454	0.001
[tampon]*[tampon]	0.0027	0.001

$R^2 = 94.1\%$, $R^2_{aj.} = 89.8\%$.

Le nouveau modèle s'écrit donc comme suit :

$$y = 27.98 - 0.2684 x_1 - 0.9744 x_2 - 0.2289 x_3 + 0.0011 x_1^2 + 0.0454 x_2^2 + 0.0027 x_3^2$$

Contrairement au modèle avec interactions, le nouveau modèle calculé est meilleur du point de vue statistique (tableau 10).

Tableau 11. Analyse de variance pour E (modèle améliorée)

Source	DI	SC	CM	F	P
Régression	6	19.5532	19.5532	21.47	0.000
Linéaire	3	1.5078	19.0559	41.85	0.000
Carré	3	18.0454	18.0454	39.63	0.000
Erreur résiduelle	8	1.2142	1.2142		
Inadéquation de l'ajustement	6	1.1816	1.1816	12.08	0.078
Erreur pure	2	0.0326	0.0326		
Totale	14	20.7674			

La probabilité d'inadéquation de l'ajustement augmente de 0.059 à 0.078, ce qui signifie un meilleur ajustement du modèle. De la même manière, les termes quadratiques sont devenus très hautement significatifs.

4.1. Validation primaire du modèle

La validation primaire du modèle consiste à s'assurer que les réponses calculées et mesurées se corrélaient (tableau 12).

Tableau 12 : comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées

Essais	E_{mesuré}	E_{estimé}
1	5,55	5,03
2	4,20	4,62
3	4,25	4,36
4	3,84	3,95
5	4,98	4,85
6	4,73	4,44
7	3,93	4,46
8	4,17	4,05
9	3,83	4,35
10	3,80	3,69
11	4,27	3,97
12	3,43	3,31
13	1,52	1,60
14	1,75	1,60
15	1,53	1,60

Le diagramme des réponses mesurées, en fonction des réponses estimées, montre une forte corrélation entre celles-ci (figure 3). Le modèle rend, donc, bien compte du phénomène étudié.

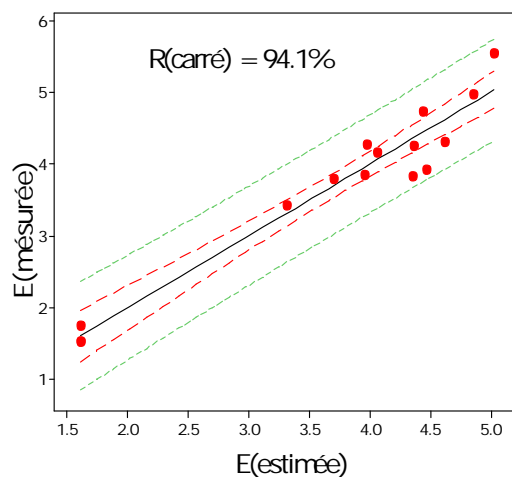
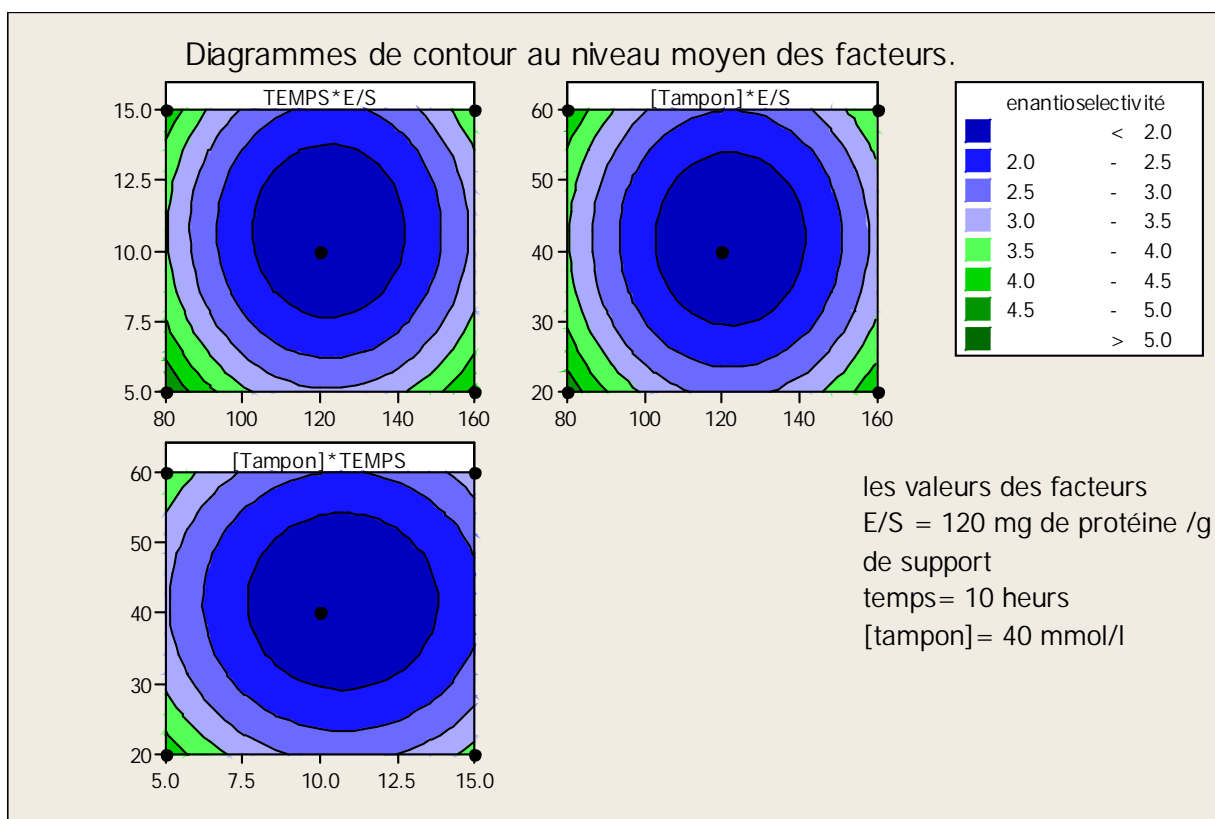
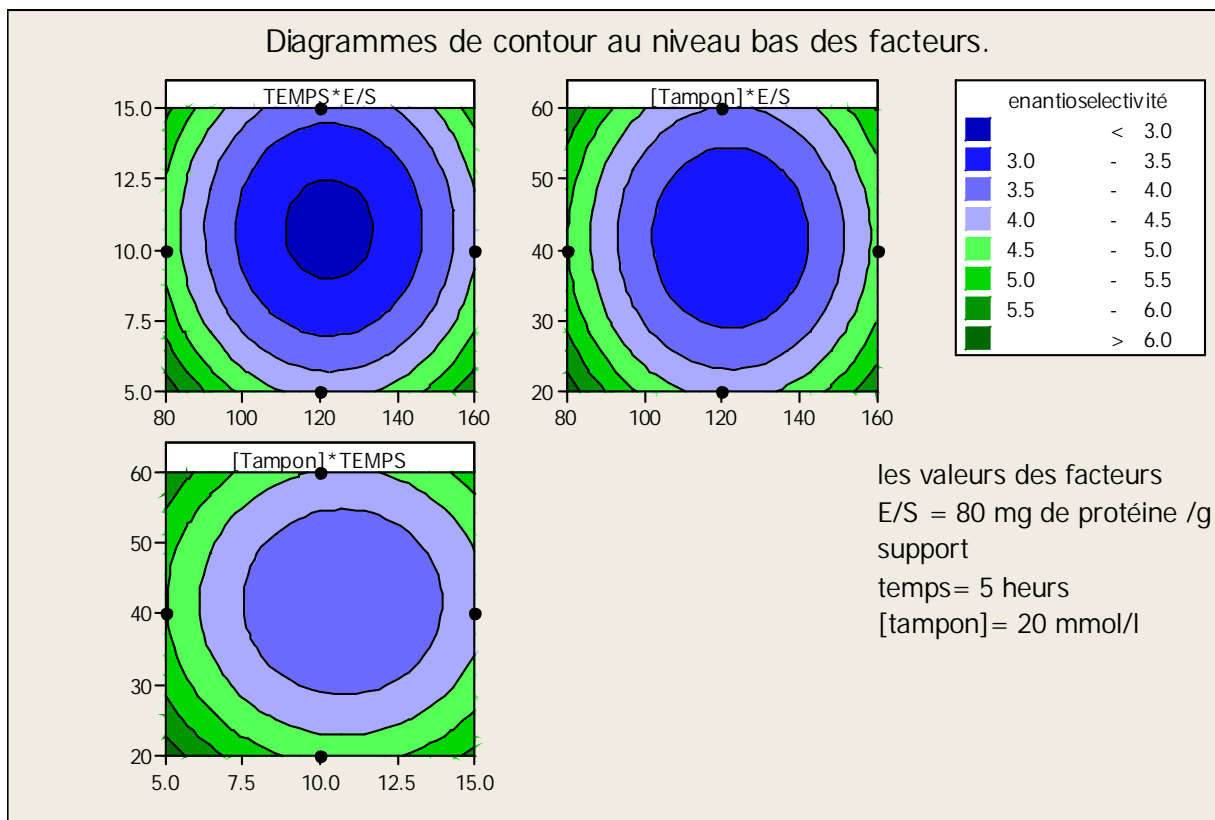


Figure 3 : Diagramme de E mesurée en fonction de E estimée.

4.2. Optimisation de l'énantiosélectivité

La recherche des conditions optimales, c'est-à-dire les valeurs des facteurs permettant d'aboutir à la meilleure énantiosélectivité, a été réalisée par l'analyse des diagrammes de contour (fig.4) qui sont les projections des courbes tridimensionnelles des surfaces de réponse. Ces dernières sont générées par le logiciel Minitab par la combinaison des 3 facteurs. A chaque fois un des facteurs est fixé aux 3 niveaux, haut, bas et moyen, et la réponse (axe z) est évaluée par rapport aux deux autres (axe x et axe y).

D'après les diagrammes de contour obtenus, il apparaît clairement que les plus fortes valeurs du coefficient d'énantiosélectivité E, sont atteintes ($E > 6$) lorsque les facteurs sont fixés à leur niveau bas.



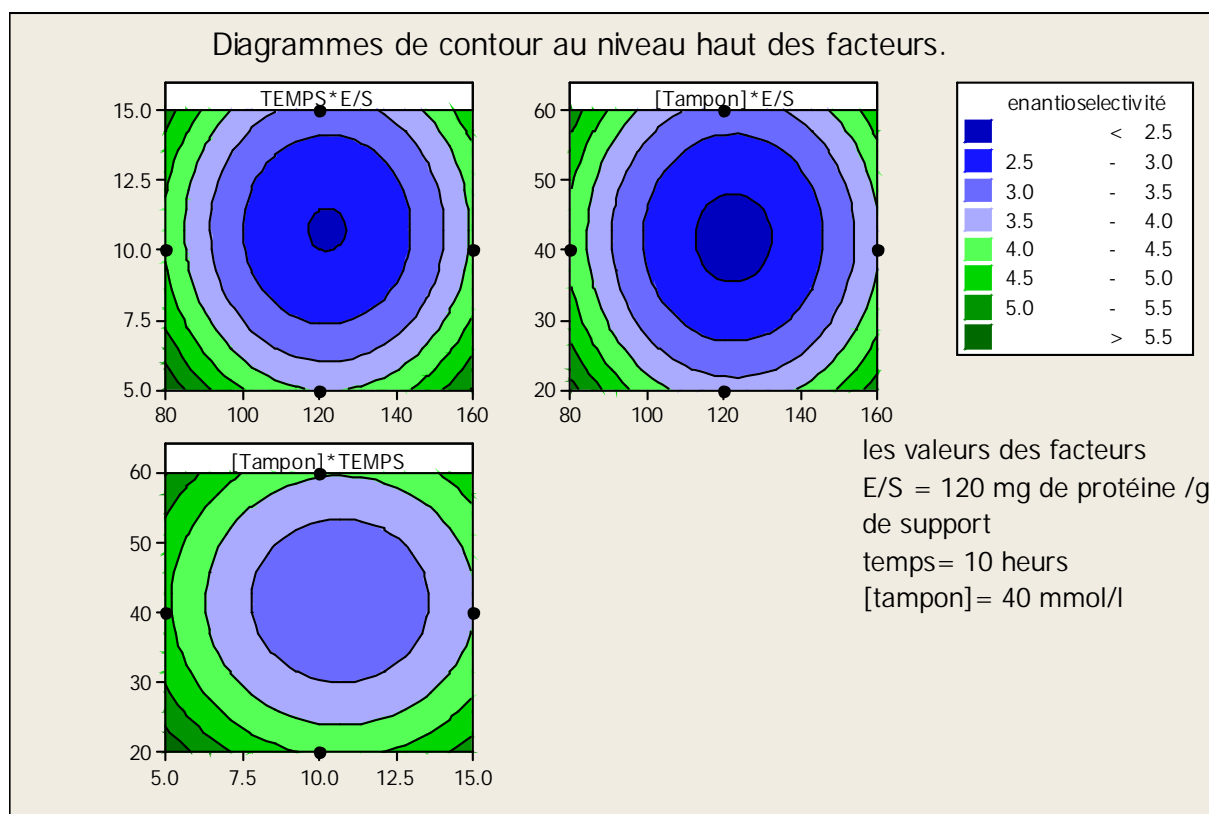


Figure 4 : Diagramme de contours présentant les effets des différents facteurs sur l'énantiosélectivité

La valeur précise de l'optimum théorique, correspondant à la valeur maximale de E, ainsi que les valeurs des facteurs permettant de l'atteindre ont été déterminées à l'aide de la fonction "désirabilité" du logiciel (fig.5).

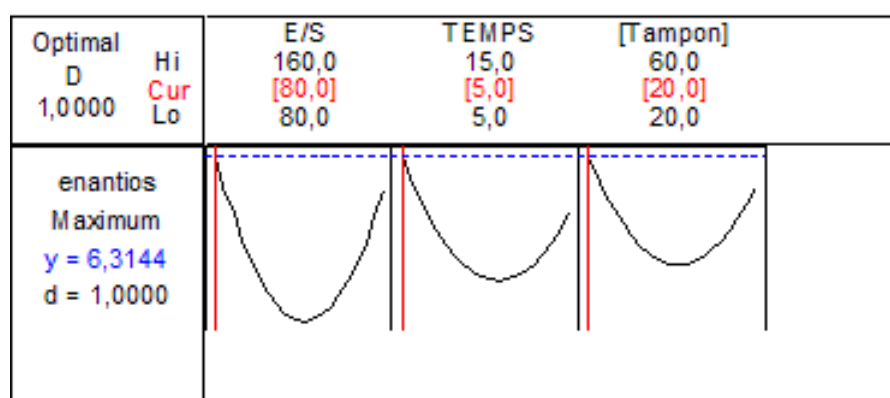


Figure 5 : Optimisation par la fonction Désirabilité.

Comme le montre la figure 5, la valeur du coefficient d'énantiosélectivité E maximale estimée par le modèle ($E = 6,3$), correspond aux valeurs des niveaux bas des facteurs, soit :

- E/S = 80mg de protéine par g de support

- Temps = 5 heures

- Concentration du tampon = 20 mmol/l

Ces conditions réactionnelles d'immobilisation ont été par la suite appliquées expérimentalement. La valeur du facteur d'énantiosélectivité trouvée ($E = 6,2$) est proche de la valeur théorique. Ce résultat valide donc le modèle obtenu.

Il est donc clair que les conditions expérimentales d'immobilisation ont une action réelle sur le fonctionnement de la protéine supportée et particulièrement sur son énantiosélectivité qui est la propriété la plus importante des enzymes. Cela est attribué à la qualité de la fixation de la protéine sur le support qui a des répercussions en particulier sur la conformation de l'enzyme³.

Dans le cas qui nous concerne, l'optimum a été atteint aux niveaux bas des 3 facteurs.

- Facteur E/S :

Une quantité élevée de protéine mise en contact avec le support a donc un effet négatif sur l'énantiosélectivité. Ce phénomène a déjà été observé par Ujang *et al.*⁷⁹ qui ont constaté une diminution très forte de l'énantiosélectivité lors de l'augmentation de la quantité d'enzyme retenue sur le support comme nous l'avons-nous même observé (tableau 13). Il semble qu'une trop forte concentration d'enzyme engendre des interactions protéine-protéine²⁵ responsables d'une déformation conformationnelle de l'enzyme.

Durée d'immobilisation :

Un contact trop long entre le support et les molécules de protéines conjugué à une quantité élevée d'enzymes, peut être la cause de la formation de multicouches protéiniques entraînant des déformations conformationnelles et des problèmes diffusionnels³. La limitation de la diffusion peut également affecter la sélectivité des enzymes immobilisées en changeant leur mode d'action, comme cela a été remarqué lors de l'immobilisation de *Aspergillus endopolygalaturonase* par adsorption sur une poudre poreuse de poly(éthylène téréphtalate)⁸⁰. Nous avons également noté qu'une durée de contact trop longue entraîne en général la désorption de la protéine et la dégradation des particules du support due à l'agitation mécanique employée. Ce phénomène a été également observé par Chag *et al.*⁸¹

- Concentration du tampon (force ionique) :

Une concentration du tampon trop élevée entraîne une concurrence entre les ions du support et celle du tampon (Na^+ , K^+ , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-) lors de l'immobilisation, qui est dans notre cas un échange ionique. Au final, on pourrait imaginer une sorte d'agrégat impliquant tous ces ions et la molécule de protéine dont la conformation s'en trouverait défavorablement modifiée.

Tableau 13. Taux de conversion de la réaction et celui de protéine fixée.

Essai	E/S	t (h)	[tp]	C%	τ (mg)
1	80	5	40	8,70	37.54
2	160	5	40	3,02	59.4
3	80	15	40	19,86	2.52
4	160	15	40	13,88	25.63
5	80	10	20	18,87	20.65
6	160	10	20	13,78	37.12
7	80	10	60	23,93	11.68
8	160	10	60	19,25	23.56
9	120	5	20	16,63	34.77
10	120	15	20	26,47	26.19
11	120	5	60	13,97	28.12
12	120	15	60	11,89	36.43
13	120	10	40	25.83	32.97
14	120	10	40	28,03	30.48
15	120	10	40	23,64	31.8

5. Comparaison entre l'énantioselectivité de la CRL libre et de celle immobilisée

Afin d'apprécier l'impact de l'immobilisation sur l'énantioselectivité de la protéine, nous avons effectué la réaction modèle avec la CRL libre dans les mêmes conditions réactionnelles. La quantité de CRL libre employée est équivalente, en terme de quantité de protéine, à celle de la CRL immobilisée dans les conditions optimales.

Le facteur d'énantioselectivité obtenu est $E = 3,6$. Cette valeur est inférieure de presque la moitié de celle obtenue avec la CRL immobilisée ($E = 6,2$).

En conclusion, l'immobilisation a donc amélioré de manière notable l'énantioselectivité de la CRL. Cette amélioration pourrait s'expliquer d'une manière générale, par l'adoption par la protéine d'une conformation plus favorable, comme cela a déjà été observé par d'autres auteurs⁸²⁻⁸⁴.

Des travaux similaires concernant l'amélioration de l'énantioselectivité de la CRL et utilisant la même réaction modèle, ont été effectués par immobilisation de l'enzyme sur Célite⁸⁵. Cependant, aucune amélioration n'a été observée par rapport à l'énantioselectivité de la CRL libre.

1. Techniques générales

1.1. Résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H)

Les spectres de RMN¹H ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de type *Brucker* (AM 200 à 200 MHz ou AC 250 à 250 MHz ou DPX 250 MHz), dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl₃) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm). Le déplacement chimique du solvant deutéré sert de référence interne ($\delta = 7,24$ ppm pour CDCl₃). Nous décrivons les spectres: s (singulet); d (doublet) ; t (triplets) ; q (quadruplet) ; quintuplet (qt) ; m (multiplet).

1.2. Infrarouges (IR)

Les spectres infrarouges (IR) sont élaborés sur un appareil d'absorption *infrarouge Shimadzu* IR 408 ou *Perkin- Elmer* 883. Les échantillons liquides sont déposés en film entre deux pastilles de NaCl. Les nombres d'onde sont exprimés en cm⁻¹.

1.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Nous avons employé cette technique d'analyse afin d'identifier les produits, vérifier leur pureté, suivre la cinétique des réactions, et calculer les paramètres d'énantioselectivité des composés chiraux. L'appareil utilisé est un SHIMADZU GC- 17. Colonne capillaire chirale Beta-dex 325 (30m x 0.25mm x 0.25 μ m) ; détecteur FID ; température maximale 300°C). Injecteur en mode Split.

1.4. Les dosages colorimétriques : ont été effectués à l'aide d'un spectromètre UV/VISIBLE JENWAY AY 6405

2. Produits chimiques

- La lipase de *Candida rugosa* (CRL type II; unité g⁻¹) provient de la société Sigma aldrich.
- Le bleu brillant de coomassie G250 et le sérum de l'albumine bovine proviennent de la société Fluka.
- Phényle éthanol un alcool secondaire à chiralité centrale provient de Sigma- Aldrich.
- Acétate de vinyle un agent acylant provient de Sigma- Aldrich. Il est utilisé dans l'acylation puisque il est peu coûteux, réagirait rapidement et de façon irréversible, l'énol

libéré au cours de la réaction tautomérise rapidement pour former une espèce non réactif (acétone).

- Nonane est un hydrocarbure linéaire de la famille des alcanes de formule brute C_9H_{20} provient de Sigma- Aldrich.
- La résine Amberjet 4200 Cl est un échangeur d'anion fortement basique se trouve sous forme des billes jaunes insoluble. Ses caractéristiques sont mentionnées au tableau 1

Tableau 1. Les différentes caractéristiques de l'Amberjet 4200 Cl

Résine	Structure matrice	Forme ionique	Température max (C°)	Capacité d'échange (eq/L)	Fonction
Amberjet 4200Cl	Styrène DVB	Cl	60	1.30	Base forte



Figure 1 : La résine Amberjet 4200 Cl

3. Méthodes

3.1. Préparation des solutions tampons

En générale, une solution tampon est une solution aqueuse dont le pH très peu sensible à l'ajout de petite quantité d'acide ou de base et à la dilution. Les solutions tampons phosphatées (pH=5.5, pH=7, pH=8.5) à concentration 20, 40, et 60 mmol/l sont préparées à partir d'un

mélange adéquat d'une quantité de di-hydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et d'une autre quantité de di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4).

3.2. Dosage de protéine par la méthode de Bradford

Cette méthode est basée sur l'analyse spectroscopique de la concentration des protéines en solution. Elle repose sur le changement d'absorbance d'une solution d'un complexant (bleu de Coomassie) lors de sa complexation avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des protéines. Le Coomassie se lie à la protéine par des interactions non covalentes (pont d'hydrogène, interaction hydrophobe, et interaction ionique) et sa longueur d'absorption maximale augmente de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

- Préparation de réactif de Bradford

La préparation de ce réactif est effectuée de la manière suivante :

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on mélange :

- l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) à 85% : 100ml
- l'eau distillée : quantité suffisante pour atteindre 1000 ml.
- une solution de référence

La méthode d'analyse utilisée nécessite l'emploi d'une solution de concentration en protéine connue (solution étalon). Celle-ci consiste en un sérum d'albumine bovine (SAB) à 0.1 mg/ml. Il servira comme solution d'étalonnage permettant de déterminer la concentration de la solution à doser.

- Préparation de dosage

Dans 6 tubes à hémolyse, on pépète des volumes différents 100 μL SAB de façon, le volume finale de chaque tube est amené à 100 μL avec de l'eau distillé.

Tableau 2. Gamme d'étalonnage de sérum albumine bovine (BSA)

Tube	1	2	3	4	5	6
SAB (μL)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé μL	100	80	60	40	20	0
Réactif (ml)	4	4	4	4	4	4

- Echantillon à doser

On procède comme pour la gamme de référence mais en remplaçant la (BSA) par l'échantillon.

- Dosage

Dans chaque tube, on ajoute 4ml de réactif de Bradford, on mélange, après 5 minutes on mesure l'absorbance à 595 nm sur le spectrophotomètre

- Détermination de la concentration en protéines

Dans les conditions utilisées, la coloration apparue est proportionnelle à la quantité de protéine présente dans l'essai.

Pour déterminer la quantité des protéines présente dans les échantillons à doser, on effectue ce qui suit :

- On trace la courbe d'étalonnage absorbances en fonction de la quantité de SAB en μg .
- On détermine à partir de cette courbe d'étalonnage la quantité de protéine correspondante aux absorbance trouvées pour chaque échantillon de la solution enzymatique à doser (μg).

3.3. Immobilisation de la lipase *Candida rugosa* sur résine

On dissout 1g de lipase dans 20 ml de solution tampon phosphate. On laisse le mélange sous agitation pendant 30 minutes puis on le centrifuge, la solution obtenue est dosée. Les concentrations de la solution tampon utilisées ainsi que les différentes valeurs du pH sont donnés dans le tableau.2. La résine utilisée est lavée par la solution tampon puis sécher sous vide dans un dessiccateur.

On prend ensuite un volume V de la solution enzymatique qui contient la quantité de protéine (mg) puis on ajoute un autre volume de solution tampon pour atteindre la fourchette de 20 à 30 ml, et on additionne 1g de résine. Le mélange est agité à la température $t(\text{C}^\circ)$ pendant un temps de T (heures). La lipase immobilisée est enfin collectée par filtration sous vide et lavée avec 20 ml de solution tampon phosphaté. Le produit extrait, est séché sous vide, en présence de silica gel, jusqu'à stabilisation de sa masse.

3.4. La réaction de transestérification

Dans un flacon fermant hermétiquement une solution de (R,S)-1-phényléthanol (10mmol) et l'acétate de vinyle (20mmol) est agitée dans 7 ml d'éther diéthylique en présence de la CRL

immobilisée sur résine. Le mélange réactionnel est ensuite porté en agitation à 40 C°. La cinétique de la réaction est suivie par chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU GC-17A à Colonne capillaire chirale -Dex 325), par injection à intervalle régulier de prélèvements de 1µl du mélange réactionnel.

Les conditions d'analyse CPG représentées dans la figure X, ont été utilisées pour l'identification du produit (*R,S*)-Acétate de phényléthanol et la séparation de ces énantiomères S et R ainsi que ceux des deux énantiomères alcools.

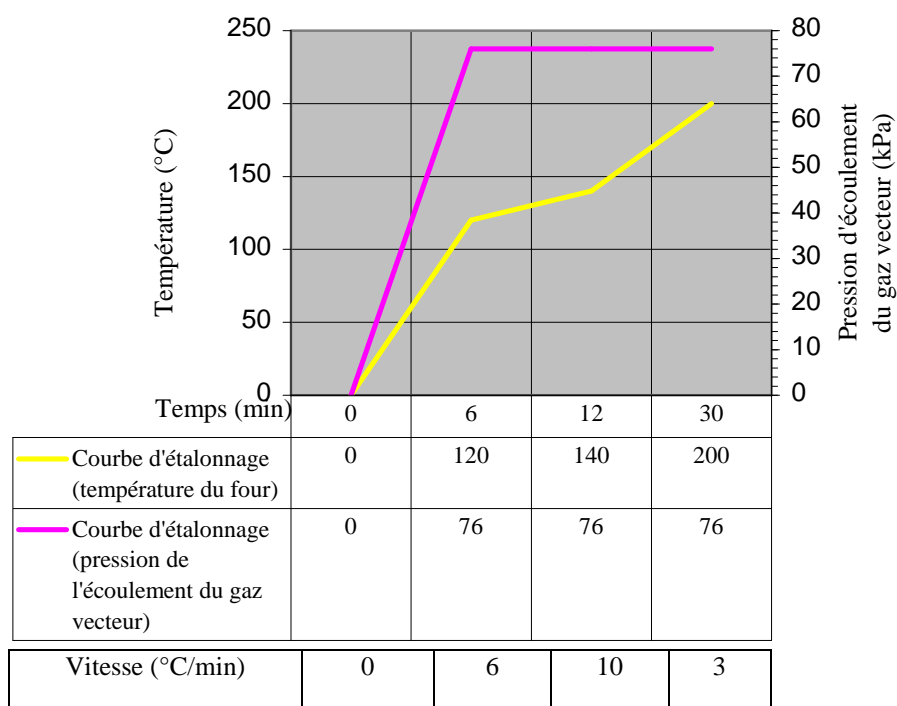


Figure 2 : Courbe des conditions d'analyse CPG

Les temps de rétention pour les deux énantiomères de l'ester racémique (*R,S*)-Acétate de phényléthanol et la séparation de ces énantiomères S et R ainsi que ceux des deux énantiomères alcools, ont été déduites par rapport à des références optiquement pures :

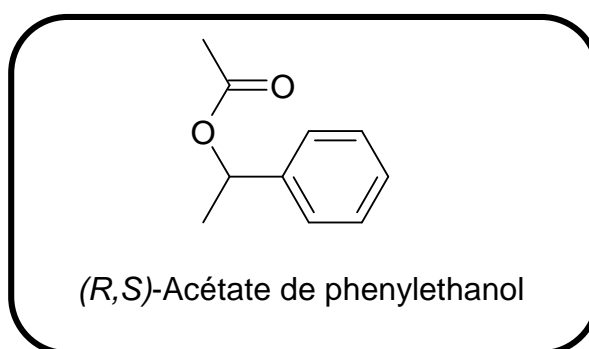
(*S*)-Acétate de phényléthanol, $t_R = 11,40$ min // (*R*)-Acétate de phényléthanol, $t_R = 11,64$ min

(*S*)-1-phényléthanol, $t_R = 10,31$ min // (*R*)-1-phényléthanol, $t_R = 10,15$ min

- **La chromatographie liquide sur colonne:** est effectué sur gel de silice Merck 230-400 Mesh (0.04-0.063mm). L'éluant utilisé est constitué d'un mélange de: éther de pétrole/acétate d'éthyle (80/20)

- **La chromatographie sur couche mince (CCM):** est réalisés sur des plaques de gel de silice (Merck 60 F254) en aluminium. La détection des tâches est assurée par rayonnement UV ($\lambda = 250$ nm).

- **Les caractéristiques spectroscopiques**



Les caractéristique du (R,S)-Acétate de phenylethanol synthétisé sont :

- **IR** (NaCl, en cm^{-1}): 3087–2872 (C-H bandes d'élongation), 761-700 (C-H aromatique mono substitué) 1742 (C=O), 1240 (C-O) cm^{-1} ;

- **RMN¹H** (CDCl_3 , 250 MHz): 1,54 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH-Ar}$), 2,08 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=O}$), 5,.89 (q, 1H, O- $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-Ar}$), 7,37 (m,5H, H-Ar).

Bibliographie

- 1: HUSSON. E, *Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique*, docteur de l'institut national polytechnique de lorraine Spécialité: Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, **2008**.
- 2: Pereira. E. B, Zanin. G. M, Castro. H.F, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 04, **2003**, 343-355.
- 3: Cao. L, *Carrier- bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- 4: E. Brown J – F, Biellmann, *Techniques de l'Ingénieur*. Traité Génie des procédés. J 1240.
- 5: Robert. A, *Copeland Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. **2000** by Wiley
- 6: Djeghaba. Z, *Document d'appui au cours sur la biocatalyse en chimie organique*, 16-18, **2008**, Université Badji Mokhtare Annaba.
- 7:Reymond.S, Janine.C, *dédoublément cinétique dynamique par la méthode chimioenzymatique*, 8^{ème} journées bibliographique EDCM, 08, **2008**, p 06.
- 8 : Antoniotti, S. *Cours de biocatalyse*, LCMBA UMR 6001 CNRS, France, **2007-2008**, p 51.
- 9: Chen, C. S, Fujimoto.Y, Sih,C.J, *AM. J.chem.SOC*, 104, **1982**, 7294-7299.
- 10: Furutani. T, Furui. M, Ooshima. H, Kato. J, *Enzyme and Microbial Technology*, 08, **1996**, 578-584.
- 11: Chamouleau.F, Coulon. D, Girardin. M, Ghoul. M, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), **2001**, 949-954.
- 12: Fernandez-Perez.M, Otero. C, *Enzyme and Microbial Technology*, 28(6), **2001**, 527-536.
- 13: Ardhaoui. M, Falcimaigne. A, Engasser. J-M, Moussou. P, Pauly. G, Ghoul. M, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29(1-6), **2004**, 63-67.
- 14: Macrae, A. R. H., R. C, *Present and future applications of lipases*, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*,03, **1985**,193 - 217.

- 15: Zaks. A, Klibanov, *Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), **1985**, 3192-3196.
- 16: Zaks, A, *New enzymatic properties in organic media, In enzymatic reactions in organic media*, **1996**, 70-93.
- 17: Gardossi. L, Bianchi. D, Klibanov. A. M, *Journal of American Chemical Society*, 113(16), **1991**, 6328-6329.
- 18: Soo. E. L, Salleh. A. B, Basri. M, Rahman. R. N. Z. A, Kamaruddin. K, *Process Biochemistry*, 39(11), **2004**, 1511-1518.
- 19: Zhang. X, Adachi. S, Watanabe. Y, Matsuno. R, *Food Research International*, 38(3), **2005**, 297-300.
- 20: Gill. I. I, Das. J, Patel, R. N, *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(11), **2007**, 1330-1337.
- 21: Gedey. S, Liljeblad. A, Lazar. L, Fulop. F, Kanerva. L. T, *Canadian Journal of Chemistry* 80(6), **2002**, 565-570.
- 22: Ozturk. B, *Immobilization of lipase Candida rugosa on hydrophobic and hydrophilic supports*, Master of Science , zmir Institute of Technology, Turkey, **2001**, 35-39.
- 23: Rensselaer Polytechnic Institute, Copyright ©1996-2010 (RPI), [en ligne], Adresse URL: <http://www.eng.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/immob.htm>
- 24: Alloue, W. A. M, Aguedo.M, Destain. J, Ghalfi. H, Blecker.C, Wathelet. J.P, Thonart.P, *Biotechnol, Agon, Soc, Environ*, 12 (1), **2008**, 57-68.
- 25: Durand.G, Monson. P, *les enzymes immobilisées*, 05, **1974**, 22-24.
- 26: Foresti. M.L, Ferreira.M.L, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (0 4), **2007**, 769-777.
- 27: Abdul Rahman. M. B, Tajudin.S. M.; Hussein, M. Z.; Raja N. Z, Raja A. R, Salleh, A. B, Basri. M, *Applied Clay Science*, 29, 2005, 111– 116.
- 28: Kaewthong. W, Sirisaneeyakul. S, Prasertsan. P, H-Kittikun, A. *Process Biochemistry*. 40, **2005**, 1525-1530.
- 29:Gargouri.Y, Ghamgui. H, Miled. N, Karra-chaâbouni. M, *Biochemical Engineering Journal*, 37, **2007**, 34–41.

- 30: Bai.Y-X, Li. Y-F, Yong Yang, Liu-Xiang Yi, *Journal of biotechnology*, 125, **2006**, 574-582.
- 31: Knezevic. Z, Milosavic, N, Bezbradica, Dejan, Jakovljevic, Zivana, Prodanovic, Radivoje, *Biochemical Engineering Journal*, 30, **2006**, 269 – 278.
- 32: Dalla-Vecchia. R, Sebrão. D, Nascimento. M, Soldi V, *Process Biochem*, 40, **2005**, 2677-2682.
- 33: Coloowick. S -P, Kaplan. N.O, *Methods in enzymologie*, vol-44: *immobilized enzymes and cells (parts)*, 584.p.bibl, Academic press, **1987**.
- 34: Ak amo lu. A, *Lipaz enziminin florisil ,zerine immobilizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, **1997**.
- 35: Torchilin. V.P, *Immobilized enzymes as drugs-advanced*, P41-86: bibl (213), Ring delivery reviews, **1987**.
- 36: Wu. H-S. Tsai. M-J, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, **2004**, 488–493.
- 37: Gupta. S, Yogesh, Javiya. S, Bhambi. M, Pundi.C.S, Singh. K, Bhattacharya. A, *International Journal of Biological Macromolecules*, 42, **2008**, 145–151.
- 38: Pregnolato. M, Terreni. M. E. de Fuentes. I, Alcantara Leon, A. R, Sabuquillo. P, Fernandez-Lafuente. R, Guisan, J. M, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, **2001**, 757–763.
- 39: Takaç. S, Bakkal. M, *Process biochemistry*, 42, **2007**, 1021- 2027.
- 40: Fang YZ, Yang. S, Wu GY. Free radicals, antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18, **2002**, 872–9.
- 41: Mantovani. G, Maccio. A, Madeddu. C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR,et al. *The impact of different antioxidant agents alone or in combination on reactive oxygen species, antioxidant enzymes and cytokines in a series of advanced cancer patients at different sites: correlation with disease progression*. *Free Radic Res*, 37, **2003**, 213–23.
- 42: Torres. P, Reyes-Duarte. D, Lopez-Cortes.N. Ferrer.M, Ballesteros. A, J. Plou, F, *Process Biochemistry*, 43, **2008**, 145–153.
- 43: Bai, S. Guo. Z, Liu. W, Sun. Y, *Food Chemistry*, 96, **2006**, 1–7.
- 44: Jovica, D. B, Ekaterina. N. K, Nenad. M. K, *Organic Letters*, 03, **2001**, 2025-2028.
- 45: Goupy, J, *la méthode du plan d'expérience, Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats*.

- 46: Sandrine. K, *Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt*, thèse de Doctorat, école doctorale science – technologie – santé, université de Limoges, **2004**.
- 47: Sad. G, Sado. M.C, *Les plans d'expériences de l'expérimentation à l'assurance qualité*, Collection AFNOR, **1991**.
- 48 : Vivier.S, *Stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis*, thèse de doctorat, école centrale de Lille, université des sciences et technologies, Lille, **2002**.
- 49 : Goupy. J, *Les plans d'expériences revues Modulad*, n°34, **2006**.
- 50: Goupy, J. Modélisation par les plans d'expériences, *Techniques de l'ingénieur, traité mesures et contrôle*. R 275, 1-23.
- 51: Chagnon. P, *Méthode statistique, les plans d'expériences*, *Contrôles Essais Mesures*, 02, Juillet **2005**, 97-100.
- 52: Goupy, J. *Pratiquer les plans d'expériences*, édition *DUNOD*, **2005**.
- 53: J. Sall, K.Fung, J.G.HRRIS, D.Ariely, P.Reich, **2010**, Statistical discovery, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.jmpdiscovery.com>
- 54: M. Tanguy, *Le logiciel d'analyse statistique des données Minitab*, mai **2008**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.minitab.fr>
- 55: Statistical Plots in Mathematica, **29-12-2008**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.intesoft.com/produits/tech/statistica>
- 56: Copyright©,2006-Web libre, [en ligne], Adresse URL: <http://www.sigmaplus.fr>
- 57 : Multivariate Data Analysis, Camo Software AS, **2010**, [en ligne], Adresse URL:<http://www.camo.no>
- 58: Last Updated: Wed, **25 November 2009**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.infometrix.com>

- 59: Windows Install Command Line (NO MST), **10/22/2008**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.umetrics.com>
- 60 : D. Benois, Y. Tourbier, S.Germain-Tourbier, *Plans d'expériences construction et analyse, technique documentation –Lavoisier*, Ed. Paris, **1994**.
- 61: Bornscheuer. UT, Kazlauskas. RJ, *Hydrolases in organic chemistry*, Weinheim : VCH-Wiley, **1999**.
- 62: Drauz. K, Waldmann. R, *Enzyme catalysis in organic synthesis. 2nd edition*. Willey-VCH, **2002**.
- 63: Faber. K, *Biotransformation in organic chemistry*, Springer, **2004**.
- 64: Faux. N, Razafimahefa. D, Picart-Goetgheluck. S, Brocard. J, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 1189-9758.
- 65: Schmid. R. D, Verger. R. *Lipases: Interfacial enzymes with attractive application*, *Angew Chem Int*, Ed **1998**, 37, 1608-33.
- 66: Hou, C.T, Industrial uses of lipase. In: Kuo, T.M; Gardner, H.W. (Eds.), *Lipid Biotechnologies*, **2002**, New York, pp.387-397.
- 67: Villeneuve. P, Muderhwa. J. M, Graille. J, Hass. M.J, *J. Mol. catal;B Enzym*, **2000**, 09, 113-148.
- 68: Chenevert. R, Pelchat. N, Morin. P, *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, **2009**, 1191-1196.
- 69: Karim. M.R, Hashinaga .C, *Process Biochem*, 38, **2002**, 809–814
- 70: Okos. M. R, Grulke. E.A, Syverson. A, *J Food Sci*, 43, 1978, 566–571.
- 71: Suekane. M, Z. Allg, *Mikrobiol*, 22, **1982**, 565–576.
- 72: N.N. gandi, V.Vyaylakshmi, S.B. Sawant, J.B. Joshi, *the Chemical Engineering Journal*, 61, **1996**, 149-156.
- 73: Bradford, M. M. *Analytical biochemistry*, **1976**, (1-2), 248-254.

- 74: X. Zhou, C.F. Chen, H.F. Hang, Y.P. Zhuang, S.L. Zhang, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 24, **2010**, 95-100.
- 75: S.F. Chang, S.W. Chang, Y-H, Yen, C-J. Shieh, *Applied Clay Science* 37, **2007**, 67-73.
- 76: P.J.O'Connell, J. Vatley, *Biotechnol. bioeng*, 74, 2001,264-269.
- 77: Tn. Sanjaya Sembiring, **25-02-2002**, *Ion Exchange Resin, Amberjet 4200 Cl*, [en ligne], Adresse URL: [http:// indonetwork.co.id/pt_arianto_darmawan/1105698/ion-exchange-resin-amberjet](http://indonetwork.co.id/pt_arianto_darmawan/1105698/ion-exchange-resin-amberjet).
- 78: Bruno. L. M, Saavedra Pinto. G. A, Ferreira de Castro. H, Luiz de Lima-Filho. J, Henrique de Magalhaes. M, *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, **2004**, 371-375.
- 79: Ujang. Z, Husain.W. H, Seng. M. C, Rashid. A.H.A, *Process Biochem*, 38, **2003**, 1483–1488
- 80: Rexova-Benkova L, Omelkova J,Veruovic B, Kubanek V, *Biotechnol Bioeng*, 34(1), **1989**, 79–85.
- 81: Chag, S-W; Shaw, j-F; Yang, K-H; Chang, S-F; Shieh, C-J, *Bioresource Technology*, 99, **2008**, 2800-2805.
- 82: Sanchez. E. M, Bello. J.F, Roig MG,Burguillo. F. J, Moreno. J. M, Sinisterra. J.V, *Enzym MicrobTechnol*, 18, **1996**, 468–476.
- 83: Basinska T, Slomkowski S, *Colloid Polym Sci*, 273, **1995**, 431–438
- 84: Zuzana. B, Marcela S, Antonin L, Daniel H, Jiri L, Jaroslava T, Jaroslav C, *Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 770, **2002**, 25–34.
- 85: Fishman. A, Cogan .U, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, **2003**, 193–202