

N° d'ordre :

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE CHAHID HAMMA LAKHDAR
EL-OUED**

Faculté des Sciences



Mémoire de fin d'étude

Présentée pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

En : **CHIMIE**

Spécialité : **Chimie Organique Analytique**

Par : M^{elle} **ISMAILI YAMINA**

Thème

**Optimisation des conditions d'immobilisation de la lipase candida
rugosa (CRL) par la Méthode des Surfaces de Réponse (RSM)**

Soutenue publiquement le .../05/2016, devant le jury composé de :

M^r N. TAMMA	M.C. /B	Université d'EL-Oued	Président
M^{me} S. BOUCHAGRA	M.C. /B	Université d'EL-Oued	Directeur de mémoire
M^{me} R. MAZRI	M.C. /B	Université d'EL-Oued	Examinatrice
Mr. B. SOUYEI	M.C. /B	Université d'EL-Oued	Examinateur

Année Universitaire :2015 / 2016

Dédicace

A mes très chers parents.

A mes très chères sœurs.

A mon très chère Frère.

Aucun mot ne pourra exprimer mes sentiments envers vous.

A toute ma famille.

A tous mes chers ami(e)s : avec tous mes souhaits de réussir,

Pour tout votre soutien et votre amitié je vous dis MERCI.

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime

Je dédie ce travail...

ISMALI YAMINA

Remerciements

Dieu dit:

(وَإِذْ تَأْتِيَن رَّبُّكُمْ لَيْلِن شَكْرُتُمْ لِأَزِيدَنَّكُمْ وَلَيْلِن كَفَرْتُمْ إِنَّ مَكَابِي كَشِيدَت)

(Verset 07 Sourate Ibrahim)

Louange à Dieu qui m'a montré le chemin de la science et de la connaissance et a m'a aidé à accomplir cette tâche et m'a aidé à finir ce travail, comme l'indique l'impact : qui ne pas remercier personnes ne pas remercier Dieu .

Que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain, la réalisation de ce mémoire fut pour moi une expérience d'une immense valeur.

Scientifiquement, ces quatre mois ont représenté une opportunité précieuse d'apprendre un peu davantage sur les procédés enzymatiques et de découvrir, avec une grande fascination, la chimie théorique . Humainement, cette période a été marquée par d'énormes d'amitié, de résilience et d'humilité scientifique. Ainsi, je ne peux que remercier tous ceux qui étaient à mes côtés au cours de cette expérience.

Je remercie vivement Madame Bouchagra Samah , d'avoir accepté de me diriger tout au long de ce travail, qu'elle trouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je voudrais également remercier les membres du jury :

Président: **M^r N. TAMMA**

Directeur de mémoire: **M^{me} S. BOUCHAGRA**

Examinatrice: **M^{me} R. MAZRI**

Examineur: **Mr. B. SOUYEI**

R. ZOUARI AHMED

Je remercie du fond du cœur mes formidables collègues et amis qui ont toujours été là pour me soutenir et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables.

SOMMAIRE

<i>Liste des tableaux</i>	<i>I</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>II</i>
<i>Liste des schémas</i>	<i>IV</i>
<i>Symboles et abréviations</i>	<i>V</i>
<i>Introduction Générale</i>	<i>01</i>

Chapitre I : Les Enzymes Et Leurs Immobilisations

1.	Introduction.....	05
2.	Les enzymes.....	05
2.1.	Nomenclature et classification des enzymes.....	06
2.2.	Enzymes et catalyse.....	07
2.3.	Le cycle catalytique enzymatique.....	09
2.4.	Facteurs influençant l'activité enzymatique.....	10
3.	Triacylglycérols hydrolases (Les lipases).....	11
3.1.	Réactions catalysées par les lipases.....	12
3.2.	Le dédoublement enzymatique par les lipases.....	13
4.	Immobilisation des enzymes.....	14
4.1.	Les différentes méthodes d'immobilisation.....	14
4.1.1.	Immobilisation par adsorption.....	14
4.1.2.	Immobilisation par des liaisons covalentes ou ionique.....	15
4.1.3.	Immobilisation par réticulation.....	15
4.1.4.	Immobilisation par inclusion.....	15
4.1.5.	Immobilisation par encapsulation.....	16
5.	Application des lipases immobilisées.....	17
5.1.	Réaction d'hydrolyse enzymatique.....	17
5.2.	Résolution du menthol racémique.....	18
5.3.	Réaction de transestérification de 1-octanol avec le laurate de vinyle par la lipase BCL.....	18
5.4.	Réaction énantiosélective aminolyse d'ester éthylique de 2-chloropropionate.....	18
6.	Conclusion.....	19

Chapitre II : Les Plans D'expériences

1.	Introduction.....	21
2.	La méthode des plans d'expériences	21
2.1.	Choix de la méthode d'expérimentation.....	22
2.1.1.	Identifier le phénomène étudié (le problème)	22
2.1.2.	Objectifs d'un plan d'expériences	22
2.1.3.	Identifier les réponses	23
2.1.4.	Identifier les facteurs et du domaine d'étude	23
2.1.5.	Choix du plan d'expérience	24
2.1.5.1.	Les plans de criblage des facteurs	25
2.1.5.2.	Les plans d'optimisation des facteurs	28
2.2.	Analyse des résultats (effets, graphiques, variances).....	30
2.2.1.	Calcul des effets.....	31
2.2.2.	La comparaison graphique des résultats mesurées et estimées.....	31
2.2.3.	La technique d'analyse de variance.....	32
2.2.4.	Mesure de la qualité du modèle mathématique.....	34
2.2.5.	Analyse graphique des résultats.....	34
2.2.6.	Validation de l'hypothèse et recherche de solution au problème.....	35
2.3.	Acquisition progressive de la connaissance.....	36
3.	Conclusion.....	36

Chapitre III : Résultats et Discussion

1.	Préparation du plan d'expérience.....	39
1.1.	Objectifs.....	39
1.2.	Construction du plan Box-Behnken	40
1.3.	Détermination des facteurs et du domaine d'étude	40
1.4.	Réponse choisie.....	40
2.	Modélisation de la réponse.....	40

2.1.	Résultats statistiques et interprétations.....	41
3.	Amélioration du modèle.....	42
3.1.	Détection des essais aberrant.....	42
3.2.	Transformation de réponses.....	43
4.	Validation théorique du modèle.....	45
5.	Optimisation de la réponse.....	47
	<i>Conclusion générale</i>	52
	<i>Références Bibliographie</i>	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°	Titre	Page
<i>Chapitre III : Résultats et Discussion</i>		
<i>Tableau (III.1)</i>	Facteurs et domaine d'étude du plan du Box	40
<i>Tableau (III.2)</i>	Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unité non codée).	41
<i>Tableau (III.3)</i>	Analyse de variance pour C%	41
<i>Tableau (III.4)</i>	Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unité non codée).	43-44
<i>Tableau (III.5)</i>	Coefficients de régression estimés pour la conversion C(%).	44
<i>Tableau (III.6)</i>	Analyse de variance pour Log(C%).	45
<i>Tableau (III.7)</i>	Comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées	45-46

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
<i>Chapitre I : Les Enzymes Et Leurs Immobilisations</i>		
<i>Figure (I.1)</i>	Les différents niveaux de structure des enzymes.	06
<i>Figure (I.2)</i>	Le complexe enzyme-substrat.	08
<i>Figure (I.3)</i>	Modèle clé-serrure.	08
<i>Figure (I.4)</i>	Modèle ajustement induite.	09
<i>Figure (I.5)</i>	Représentation schématique de repliement structural de type α/β hydrolase.	11
<i>Figure (I.6)</i>	L'immobilisation par adsorption.	15
<i>Figure (I.7)</i>	Immobilisation par des liaisons covalente.	15
<i>Figure (I.8)</i>	Immobilisation par la réticulation.	16
<i>Figure (I.9)</i>	Immobilisation par l'inclusion	16
<i>Figure(I.10)</i>	Immobilisation par encapsulation.	17
<i>Chapitre II : Les Plans D'expériences</i>		
<i>Figure (II.1)</i>	Schéma de la démarche associée à un plan d'expériences.	21
<i>Figure (II.2)</i>	Domaine d'un facteur .	23
<i>Figure (II.3)</i>	Domaine d'étude pour deux facteurs.	24
<i>Figure (II.4)</i>	Plan factoriel complet à deux niveaux pour deux facteurs	26
<i>Figure (II.5)</i>	Plan factoriel complet à deux niveaux pour trois facteurs.	26
<i>Figure (II.6)</i>	Deux plans factoriels fractionnaires 2^{3-1} , configuration 1 en noir et 2 en gris.	27
<i>Figure (II.7)</i>	Transformation du plan 2^{3-1} en plan 2^2 (x_2 non influent).	27
<i>Figure (II.8)</i>	Plan composite pour deux facteurs	29
<i>Figure (II.9)</i>	Plan de Box-Behnken pour trois facteurs.	30
<i>Figure (II.10)</i>	Illustration de l'effet de facteur(A), illustration d'une interaction(B).	31
<i>Figure (II.11)</i>	exemple de graphe d'adéquation du modèle.	32
<i>Figure (II.12)</i>	surface de réponse.	35
<i>Figure (II.13)</i>	courbes iso-réponses.	35

Chapitre III : Résultats et Discussion

<i>Figure (III.1)</i>	Graphique des C% estimés en fonction des C% mesurées.	43
<i>Figure (III.2)</i>	Graphique des log C% estimés en fonction des log C% mesurées.	46
<i>Figure (III.3)</i>	Diagramme de contours présentant les effets des différents facteurs sur la réponse.	48
<i>Figure (III.4)</i>	Optimisation par la fonction Désirabilité.	49

LISTE DES SCHEMAS

Schéma N°	Titre	Page
<i>Chapitre I : Les Enzymes Et Leurs Immobilisations</i>		
<i>Schéma (I.1)</i>	Diagramme énergétique pour une réaction catalysée d'une façon générale.	06
<i>Schéma (I.2)</i>	Le cycle catalytique enzymatique	09
<i>Schéma (I.3)</i>	Influence de la température sur l'activité enzymatique	10
<i>Schéma (I.4)</i>	Etude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique de deux enzymes différentes	10
<i>Schéma (I.5)</i>	Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes.	14
<i>Schéma (I.6)</i>	Synthèse du (R)- et (S)-glycidol.	17
<i>Schéma (I.7)</i>	Résolution énantiosélective du (R, S) menthol.	18
<i>Schéma (I.8)</i>	Réaction de transestérification de 1-octanol avec le laurate de vinyle, catalysée par la lipase BCL immobilisée.	18
<i>Schéma (I.9)</i>	Aminolyse énantiosélective du 2-Chloropropionate d'Éthyle.	19
<i>Chapitre III : Résultats et Discussion</i>		
<i>Schéma (III.1)</i>	L'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle	39

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

C	Conversion
R, S	Enantiomères Rectus et Sinister
ee	Excès énantiomérique
E	Facteur de sélectivité
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
BCL	<i>Burkholderia cepacia</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

Les enzymes sont responsables des transformations biochimiques (catalyse) dans les molécules des vivants. De ce fait, cette méthode de catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles diverses et variées.

La synthèse enzymatique impliquant notamment des enzymes constitue une alternative intéressante qui permet d'une part, de travailler dans des conditions opératoires plus douces, et d'autre part de bénéficier d'une plus grande sélectivité ce qui limite la formation de produits secondaires et donc le nombre d'étapes nécessaires à la purification du produit. Ainsi, la mise en œuvre d'enzymes offre la possibilité d'améliorer le bilan environnemental du procédé. Les enzymes, utilisées comme catalyseur dans ces procédés, présentent un coût relativement élevé, ce qui implique souvent la nécessité de les utiliser sous forme immobilisée (qui confine une enzyme ou une fraction cellulaire dans une région de l'espace avec rétention de l'activité catalytique ou biologique) afin de permettre leur réutilisation et d'augmenter leur stabilité.

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'application de la méthode des plans d'expériences à l'étude des différentes conditions expérimentales d'immobilisation (le temps, rapport enzyme/support et concentration du tampon) qui affectent l'avancement de l'acylation enzymatique du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle.

La méthode des plans d'expériences, consiste en un ensemble homogène d'outils et de méthodes algébrique et statistiques visant à établir et à analyser les relations existants entre les grandeurs étudiées (réponses) et leurs sources de variation (facteurs). Les deux principales utilisations de la méthode des plans d'expérience sont La technique du screening qui permet de déterminer parmi les facteurs recensés par l'expérimentateur, ceux qui sont les plus influents sur la variation de la réponse. On procède ainsi implicitement à une simplification du problème et La méthodologie des surfaces de réponses qui consiste à calculer les variations des réponses en fonction des facteurs jugés précédemment influents.

Le présent mémoire est composé de trois chapitres distincts :

Après l'introduction générale, Le premier chapitre mise au point bibliographique sur les enzymes et leurs réactions et les techniques d'immobilisation et l'application des lipases immobilisées.

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons la méthodologie des plans d'expériences.

Le troisième chapitre sera consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

Après une conclusion générale, vient Les références bibliographiques qui sont réunies par chapitre à la fin de ce mémoire.

1. Introduction

Tous les processus de la vie, que ce soit végétales, animales ou microbiens, dépendent d'un réseau complexe de réactions chimiques catalysées par des enzymes pour la croissance et la maintenance cellulaires [1], Ce sont des catalyseurs biologiques très efficaces et polyvalents, en fonctionnant dans des conditions ambiantes (température et pH physiologique, pression atmosphérique)[2].

L'utilisation d'enzymes est généralement plus respectueux de l'environnement et économique due à faible coût de l'énergie, une efficacité élevée, de haute chimio-, regio- et stéréosélectivité et de voies de synthèse plus courtes. Toutefois, l'application industrielle d'enzymes dans de nombreux domaines est souvent entravée par leur faible stabilité opérationnelle et les difficultés dans la récupération et la réutilisation [3].

2. Les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules, majoritairement, de nature protéique [5], (c'est-à-dire résultant de la condensation d'acides α -aminés de la série L avec formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle d'un acide aminé et le groupe amine d'un autre acide aminé et ainsi de suite) [7] comme suivant :

Ces molécules présentes dans toutes les cellules des êtres vivants dont le rôle est de catalyser (accélérer) les réactions biochimiques. Ce sont des catalyseurs très efficaces et comme tout catalyseur les enzymes interviennent dans les réactions sans être consommées. Elles abaissent les énergies d'activation, et donc augmentent les cinétiques de réactions par un facteur (10^8 - 10^{12}) [4,5,6] (Schéma I. 1).

Les enzymes dotées de propriétés catalytiques leur permettant d'intervenir en faveur de certaines réactions biochimiques pour lesquelles elles sont spécifiques. La spécificité de l'enzyme est due à la présence d'une région tridimensionnelle appelée « site actif » qui reconnaît et fixe le substrat.

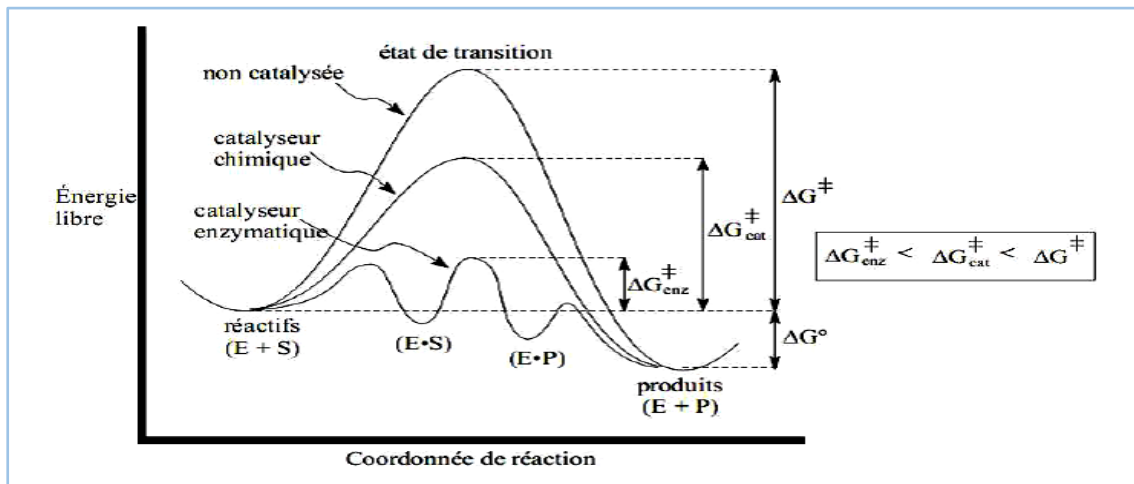


Schéma (I.1) : Diagramme énergétique pour une réaction catalysée d'une façon générale.

La spécificité de ces catalyseurs biologiques sous ses différentes formes (énantio , régio et stéréo-sélectivité) constitue un des avantages de leur utilisation dans des procédés biologiques comme alternative aux procédés chimiques[7,8].

La structure de l'enzyme est stabilisée par des liaisons hydrogène, des interactions de Van Der Waals et des liaisons covalentes sont les ponts disulfures. Donc les enzymes sont instables en solutions et peuvent perdre leur activité à des températures élevées [9].

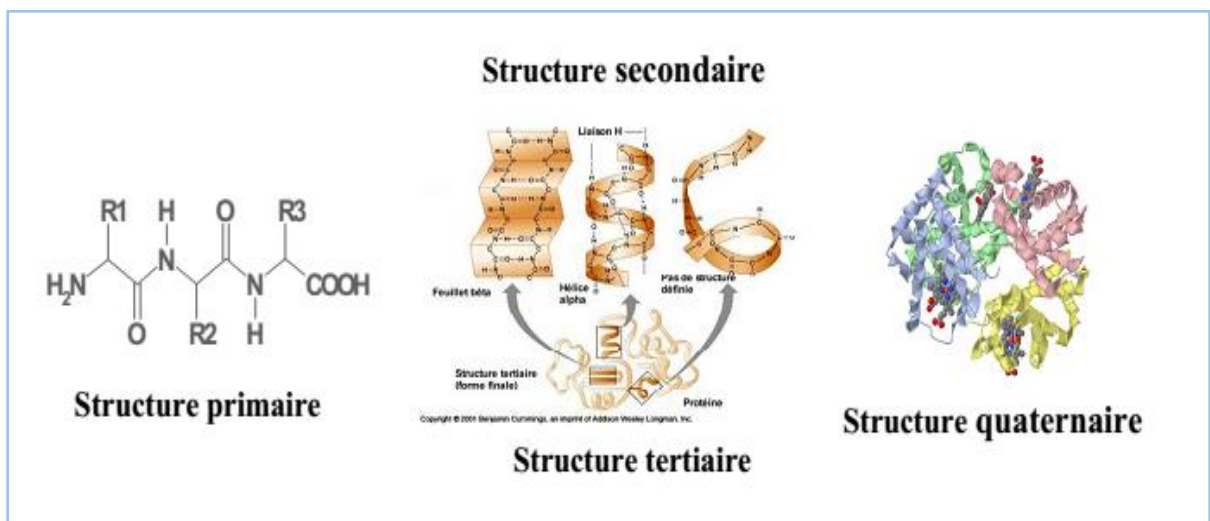


Figure (I.1) : Les différents niveaux de structure des enzymes.

2.1. Nomenclature et classification des enzymes

Le nom de la plupart des enzymes a été formé en ajoutant le suffixe « ase » au nom de leur substrat ou à un mot ou une phrase décrivant son activité. Actuellement environ 3000 enzymes sont reconnues par l'Union Internationale de Biochimie [9]. Cette organisation a

été réparti les enzymes en six classes, chacune divisée en sous classes, en fonction des réactions catalysées. A chaque enzyme est attribué un numéro de classification à quatre chiffres et un nom systématique qui identifie la réaction catalysée [10].

EC : Enzymes commission

A : Indique le type de réaction au quelle l'enzyme est rattachée (la classe) .

B : Indique le type de substrat pour lequel l'enzyme est activée.

C : Indique le type de l'accepteur.

D : Correspond au numéro individuel de chaque enzyme.

Les classes d'enzymes [9,10] sont :

- **Les oxydoréductases** (EC 1) catalysent les réactions d'oxydo-réduction. La plupart de ces enzymes sont connus sous le nom de déshydrogénases, mais certains d'entre eux sont appelés oxydases, peroxydases, oxygénases ou réductases.
- **Les transférases** (EC 2) catalysent les réactions de transfert de groupes moléculaires d'une molécule à une autre. Cette classe inclut les kinases.
- **Les hydrolases** (EC 3) catalysent les clivages hydrolytiques.
- **Les lyases** (EC 4) catalysent les réactions d'élimination d'un substrat, non hydrolytique et non oxydative, ou lyse, avec création d'une double liaison. Dans le sens inverse, les lyases catalysent l'addition d'un substrat à une double liaison d'un second substrat.
- **Les isomérases** (EC 5) catalysent les réactions d'isomérisation ou les réarrangements intramoléculaires.
- **Les ligases** (EC 6) catalysent les réactions de ligation au cours desquelles deux molécules sont unies. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie chimique, le plus souvent sous forme d'ATP.

2.2. Enzymes et catalyse

La liaison protéines-substrat est à la base de l'étude des interactions de l'enzyme avec son substrat, et par conséquent la formation du complexe « E-S : enzyme-substrat ». Ce modèle implique que l'enzyme ne se lie à un substrat qu'au niveau d'un seul site, dit site actif [10].

- ❖ **Le site actif** : est constitué d'un petit nombre d'acides aminés qui, le plus souvent, ne sont pas contigus dans l'enchaînement de la chaîne polypeptidique. L'agencement unique de ces acides aminés est la cause de la stéréospécificité de reconnaissance entre le site actif et le(s) substrat(s) [11].

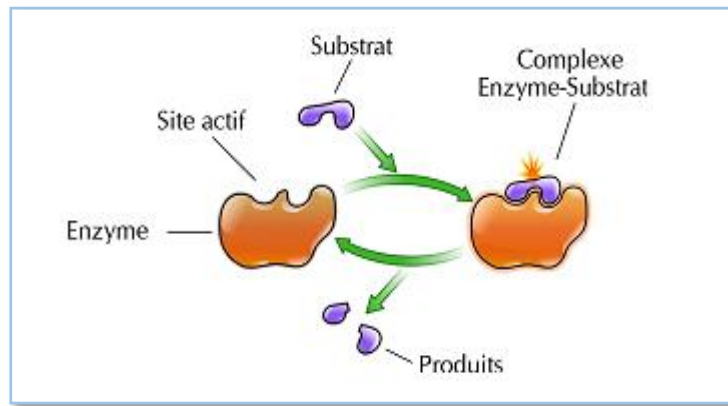


Figure (I.2) : Le complexe enzyme-substrat.

Le site actif est subdivisé en deux parties [12] :

- **Site de fixation** : dit aussi site de *reconnaissance*, reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme, et permet de mettre face à face, la partie de la molécule de substrat qui devra être transformée, avec les acides aminés du site catalytique.
- **Site catalytique** : cette partie correspond à un ensemble d'acides aminés qui interagissent directement avec le substrat pour faciliter sa transformation en produit. Il est composé d'acides aminés dont les chaînes latérales exposées dans le site actif sont chimiquement très réactives : elles comportent des électrons délocalisables qui vont attaquer des liaisons dans la molécule de substrat, pour la fragiliser. Une fois ces liaisons fragilisées, le substrat pourra ensuite facilement évoluer vers la formation de produit.

Le Reconnaissance enzymes-substrat peut être expliquée par les deux modèles suivants :

- ✚ **Modèle clé-serrure** : en 1890 Emil ; Fisher a proposé que la forme du substrat est complémentaire de la forme du site actif de l'enzyme.

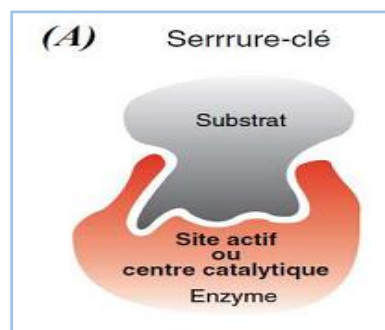


Figure (I.3) : Modèle clé-serrure

- ✚ **Modèle ajustement induite** : En 1985 ; Koshland a proposé que l'enzyme et le substrat adaptent mutuellement leurs formes respectives.

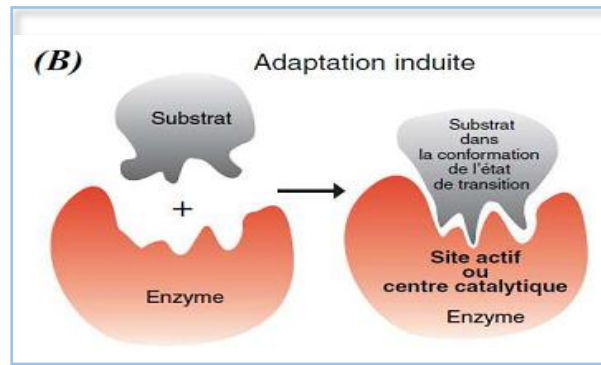


Figure (I.4) : Modèle ajustement induite.

2.3. Le cycle catalytique enzymatique [13]

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

- diffusion des réactifs dans le milieu.
- reconnaissance enzyme substrat : le substrat se positionne dans la cavité de l'enzyme.
- mécanisme catalytique : la réaction se produit.
- Expulsion des produits : l'enzyme libère le produit.

Ces différentes étapes sont résumées dans le schéma suivant :

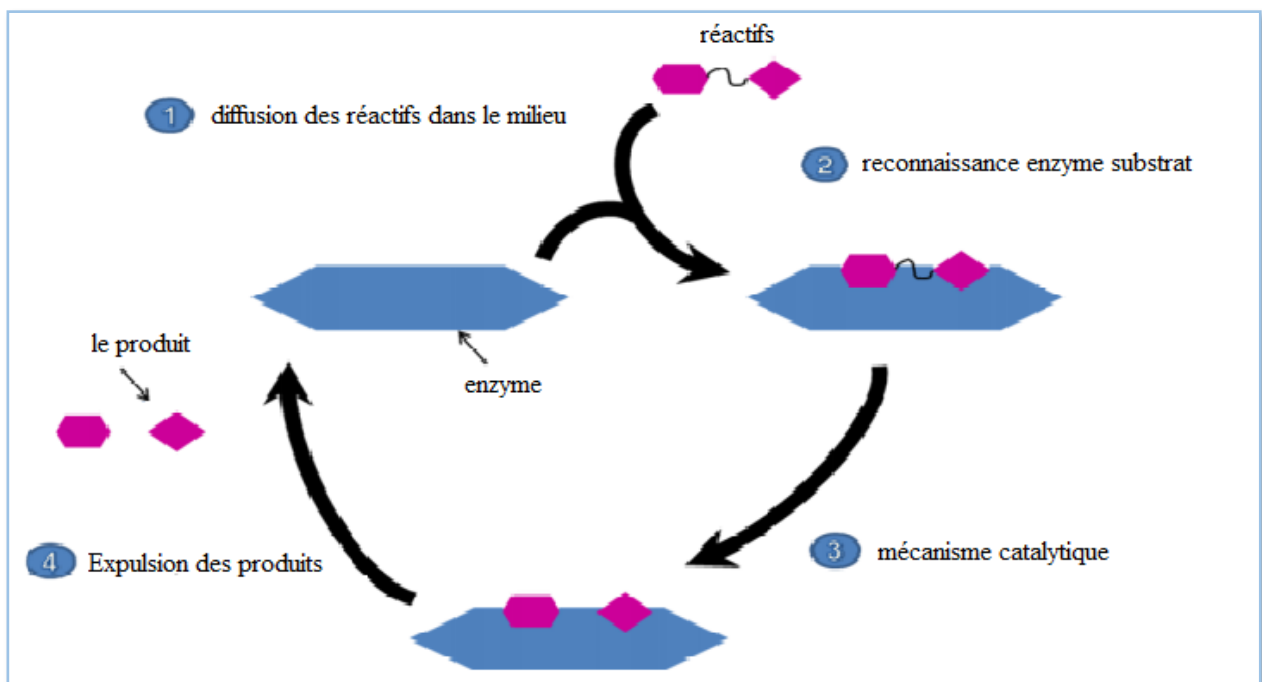


Schéma (I.2) : Le cycle catalytique enzymatique

2.4. Facteurs influençant l'activité enzymatique [14,15,16]

Il est connu que la température, le pH et la concentration du substrat sont les principaux facteurs qui influencent l'activité enzymatique en milieux aqueux et non aqueux.

2.4.1. Influence de la température

La température du milieu a un effet sur la vitesse de la réaction enzymatique (Schéma I.3) comprend deux parties : une ascendante puis une descendante de pente plus forte (baisse de l'activité plus rapide).

- En dessous de la température optimale, la chaleur du milieu apporte un supplément d'énergie qui facilite la réaction enzymatique : partie correspondant au phénomène d'activation.
- Au-dessus de la température optimale, la chaleur dénature les structures secondaires et tertiaires de l'enzyme et l'activité tend rapidement vers zéro : partie correspondant au phénomène de dénaturation.

Pour mesurer cet effet de la température sur l'activité de l'enzyme on compare l'activité de l'enzyme pour une température T avec l'activité pour une température $T + 10^{\circ}\text{C}$. Cette différence d'activité appelée Q_{10} est le paramètre permettant de mesurer l'activation de l'enzyme par la chaleur.

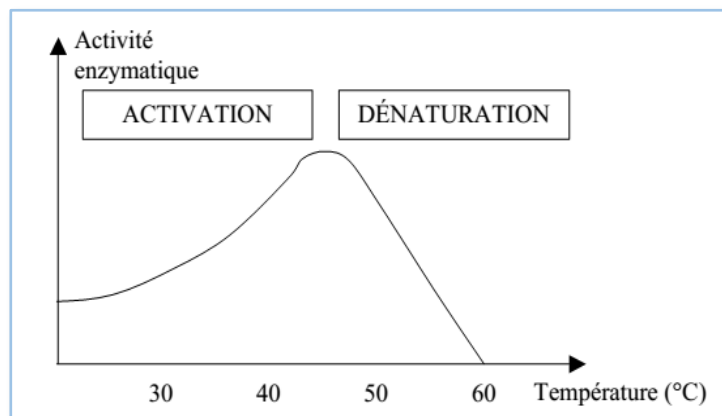


Schéma (I.3) : Influence de la température sur l'activité enzymatique

2.4.2. Influence du pH

Chaque enzyme est caractérisée par un pH optimum pour lequel son activité enzymatique est maximale (Schéma I.4). Ainsi, expérimentalement, l'activité d'une enzyme sera déterminée à un pH fixe proche de son pH optimum. L'utilisation d'une solution tampon permettra de maintenir le pH à une valeur stable et connue.

Les variations de pH influencent la charge des résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation et dans la catalyse du substrat (au niveau du site actif). Donc cela peut modifier les conditions de réalisation de la réaction enzymatique.

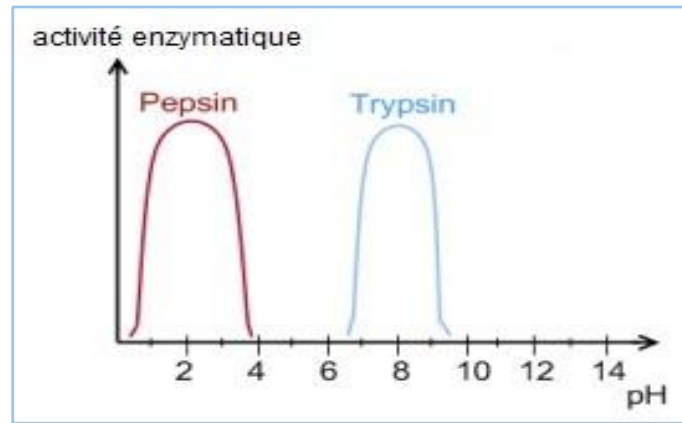


Schéma (I.4) : Etude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique de deux enzymes différentes.

3. Triacylglycérols hydrolases (Les lipases)

Parmi les six classes d'enzymes, le groupe des hydrolases (EC 3.) est de loin le plus utilisé en synthèse organique. Ce sont des enzymes simples, stables, sans cofacteur et le nombre d'hydrolases disponibles dans le commerce augmente sans cesse. Les hydrolases sont utilisées en chimie organique pour leur chimio-, régio- et stéréosélectivité mais surtout pour leur énantiosélectivité lors du dédoublement cinétique (ou résolution cinétique) [4,6]. Les lipases sont des α/β -hydrolases d'esters du glycérol (EC 3.1.1.3) (Figure 04). De même que les estérases, elles agissent sur les liaisons esters carboxyliques [17].

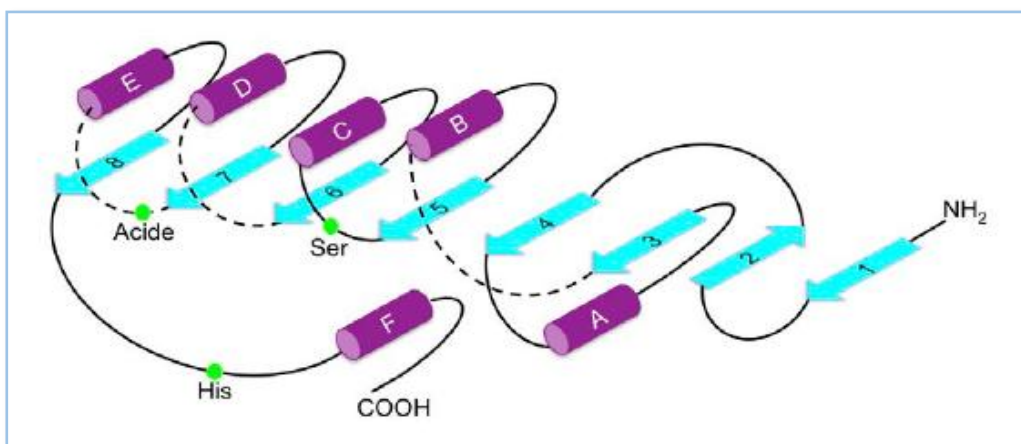


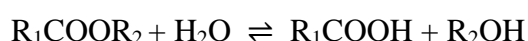
Figure (I.5) : Représentation schématique de repliement structural de type α/β hydrolase. (Les hélices α sont représentées par des cylindres, les brins β par des flèches et les acides aminés catalytiques sont identifiés par des points verts (Ser, Sérine ; Acide ; His, Histidine).

3.1. Réactions catalysées par les lipases

Le rôle physiologique des lipases c'est l'hydrolyse du triglycéride en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol (Figure I.5). L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques, insolubles dans l'eau, se produit à l'interface entre lipide et eau [5,18, 19]. Les lipases sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique selon l'environnement de l'enzyme [20].

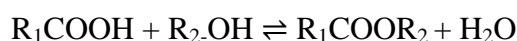
Les lipases interviennent dans les deux types de réactions [21,22] :

- **L'hydrolyse :**

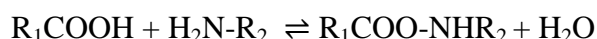


- **La synthèse:** Les lipases interviennent en chimie organique selon les types de réactions suivante :

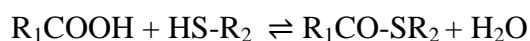
- Estérification



- Amidation :



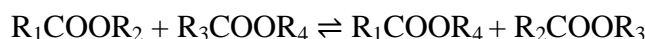
- Thioesterification :



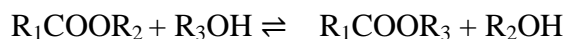
L'eau générée au cours de ses trois réactions enzymatique doit être éliminée afin de poursuivre la réaction [23].

- Transestérification :

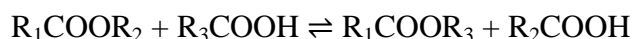
- Interestérification :



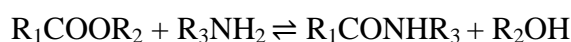
- Alcoolyse :



- Acidolyse :



- l'aminolyse :



3.2. Le dédoublement enzymatique par les lipases

En raison de l'environnement chiral spécifique du site actif des enzymes, les lipases sont capables de différencier deux énantiomères et de réagir préférentiellement, voire exclusivement, avec l'un d'eux par rapport à l'autre. Ce phénomène de différenciation varie beaucoup d'une enzyme à l'autre, d'un substrat à l'autre et suivant les conditions opératoires (solvant, température, pH,...).

L'énantiosélectivité des lipases a donc été largement utilisée pour séparer des énantiomères par dédoublement cinétique. L'enzyme va réagir avec un des énantiomères beaucoup plus rapidement qu'avec l'autre et va permettre la séparation aisée de l'énantiomère restant et du composé formé.

La sélectivité enzymatique peut être quantifiée par un paramètre appelé ratio énantiomérique noté E.

3.2.1. 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 Sih [24].

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

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

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

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

-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

$$E = \frac{k_R}{k_S} \dots\dots\dots (I.3)$$

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

$$E = \frac{\text{Ln} [(1-C)(1+ ee_p)]}{\text{Ln} [(1-C)(1- ee_p)]} \dots\dots (I.4) \quad \text{Ou} \quad E = \frac{\text{Ln} [(1-C)(1- ee_s)]}{\text{Ln} [(1-C)(1+ ee_s)]} \dots\dots (I.5)$$

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

4. Immobilisation des enzymes

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement [25]. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques [26]. Une alternative consiste à immobiliser l'enzyme sur une matrice appropriée. Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée, des changements dans l'activité enzymatique [27,28].

4.1. Les différentes méthodes d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme [29]. Le principe de ces méthodes est résumé dans schéma (I.5):

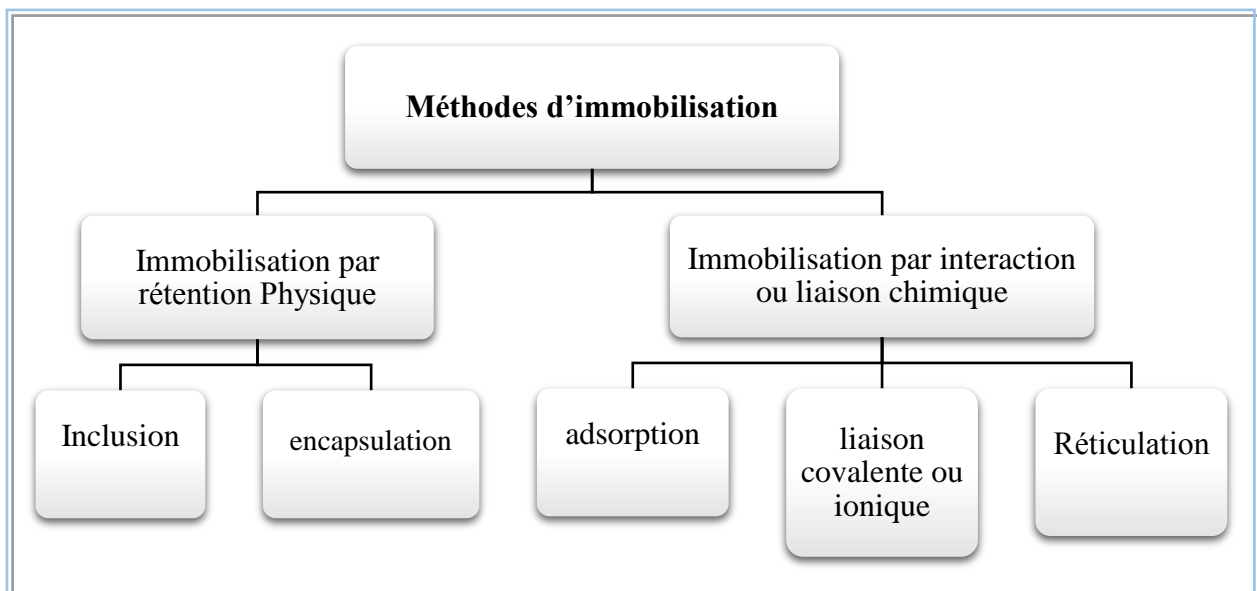


Schéma (I.5) : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes.

4.1.1. Immobilisation par adsorption

L'immobilisation par adsorption repose sur l'établissement d'interactions de type liaisons de faible niveau énergétique (Van der Waals, ionique, hydrogène, transfert de charges, échange de ligands,

hydrophobe, pont métallique...) entre les groupes fonctionnels situés à la surface de la molécule d'enzyme et ceux présents à la surface du support insoluble.

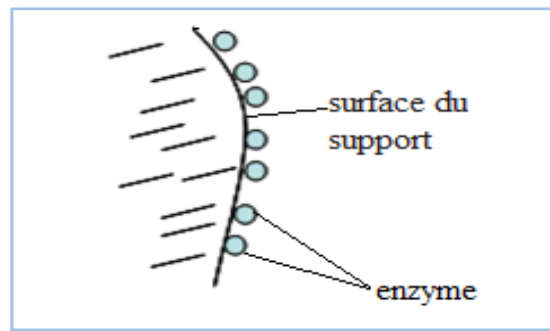


Figure (I.6) : L'immobilisation par adsorption [30].

4.1.2. Immobilisation par des liaisons covalente ou ionique

Cette immobilisation les liaisons de faible énergie impliquées dans l'adsorption sont remplacées par des liaisons covalentes ou ionique, et se réalise par La fixation de l'enzyme au support préalablement activé [26,29]. Le couplage covalent est basé sur la formation de liaisons fortes entre les molécules d'enzymes et la matrice. La condensation se fait entre les groupements fonctionnels réactifs (-NH₂, -OH, -SH, -COOH) des acides aminé de l'enzyme et les fonctions actives greffées sur le support, et les interactions ionique seront très dépendantes du pH du milieu en raison du caractère amphotère des résidus d'acide aminés [13].

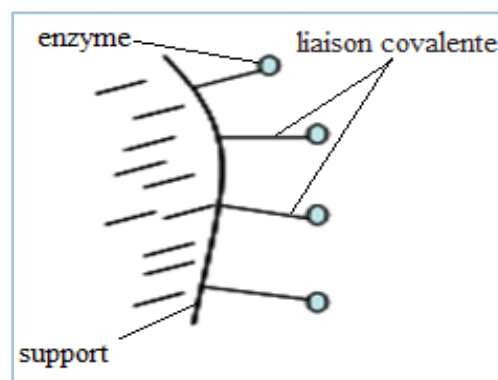


Figure (I.7) : Immobilisation par des liaisons covalente [30].

4.1.3. Immobilisation par réticulation

La réticulation consiste à établir des liens covalents entre molécules d'enzymes ou entre molécules d'enzymes et de protéines inertes par l'intermédiaire d'agents polyfonctionnels, afin d'obtenir des structures de très haute masse molaire [28,29].

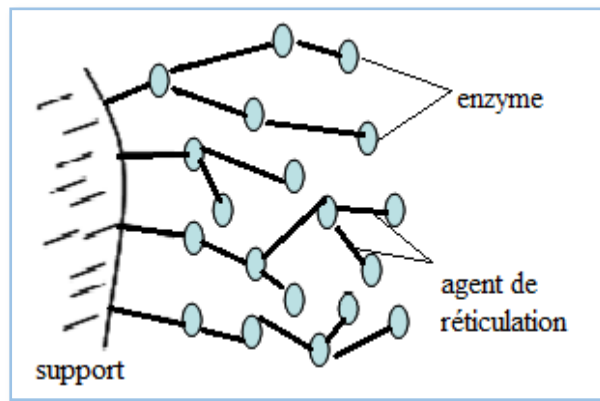


Figure (I.8) : Immobilisation par la réticulation [30].

4.1.4. Immobilisation par inclusion

Ce type d'immobilisation consiste à piéger l'enzyme dans une matrice par traitement chimique (polymérisation) via des agents de liaison ou par traitement physique comme la gélification par exemple. Cette méthode offre une grande flexibilité des propriétés géométriques des matrices à enzymes immobilisées, plusieurs formes sont souvent utilisées : les billes, les films et les fibres selon l'application souhaitée [26,29].

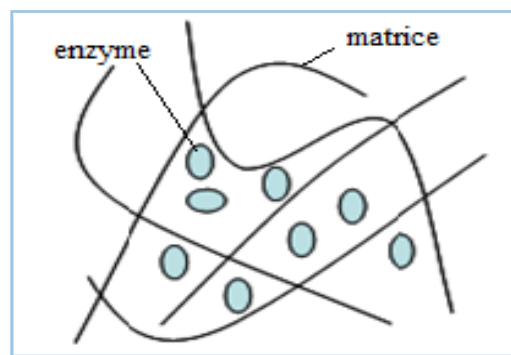


Figure (I.9) : Immobilisation par l'inclusion [30].

4.1.5. Immobilisation par encapsulation

L'enzyme en solution aqueuse est enfermée dans des microencapsules sphériques. Dont la paroi est une membrane semi-perméable qui peut être liquide ou solide. Cette membrane retient l'enzyme, mais laisse passer le substrat et le produit [29,31].

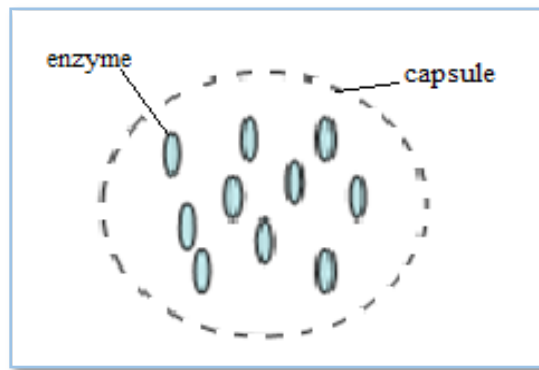


Figure (I.10) : Immobilisation par encapsulation [30].

5. Application des lipases immobilisées :

Les lipases immobilisées sont susceptibles d'application particulièrement nombreuses et diversifiées, nous donnons ci-dessous quelques exemples récents concernant les applications des lipases immobilisées en synthèse organique.

5.1. Réaction d'hydrolyse enzymatique [32]

Dans cet exemple la résolution de l'ester racémique butyrate de glycidyl (**R,S**) a été effectuée par hydrolyse enzymatique en utilisant différentes lipases (CALB,RML,25L) immobilisées. L'enzyme (25 L), qui est une lipase purifiée de la lipase pancréatiques du porc (LPP) a donné les meilleurs résultats.



Schéma (I.6) :: Synthèse du (R)- et (S)-glycidol.

5.2. Résolution du menthol racémique [33]

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

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.

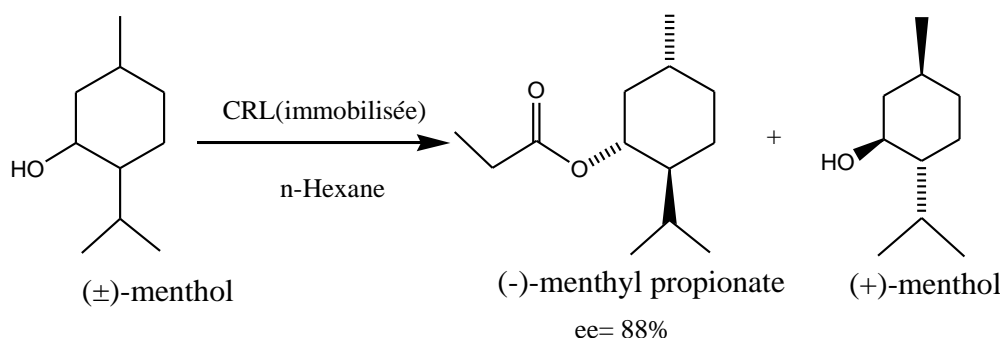


Schéma (I.7) : Résolution énantiosélective du (R, S) menthol.

5.3. Réaction de transestérification de 1-octanol avec le laurate de vinyle par la lipase BCL

La réaction suivante illustre la production d'un ester gras (octyl laurate), très utilisé en industries de cosmétiques, en utilisant la lipase BCL immobilisée par encapsulation dans des aérogels.

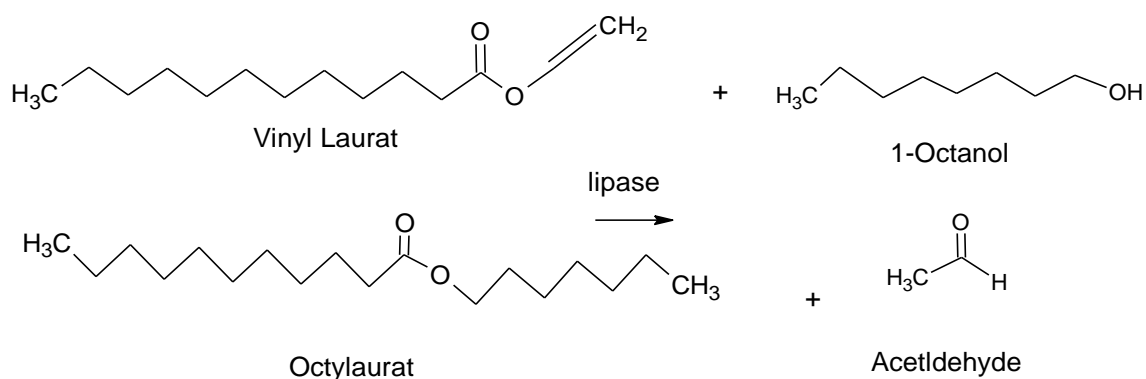


Schéma (I.8) : Réaction de transestérification de 1-octanol avec le laurate de vinyle, catalysée par la lipase BCL immobilisée.

5.4. Réaction énantiosélective aminolyse d'ester éthylique de 2-chloropropionate

L'aminolyse d'ester éthylique de 2-chloropropionate par la lipase CCL immobilisée par encapsulation dans le verre silice poreux a permis d'améliorer son activité et sa stabilité et a donné des produits avec de bon rendement et d'excellent excès énantiomérique [34]

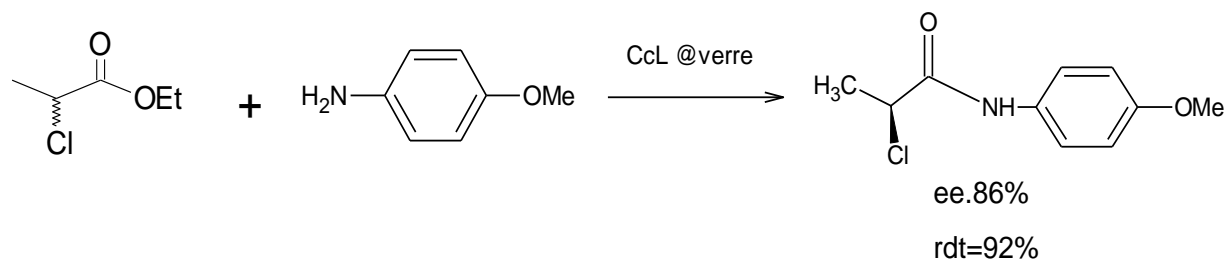


Schéma (I.9) : Aminolyse énantiosélective du 2-Chloropropionate d'Éthyle [35]

Conclusion

Grâce à leur grande spécificité d'action, les enzymes constituent un outil de fabrication et d'analyse irremplaçable dans de nombreux secteurs de la recherche, et de la production industrielle.

L'obtention de nouvelles sources d'enzymes plus stable par l'Amélioration des techniques d'immobilisations des biocatalyseurs, suscite un intérêt considérable en raison de nombreux avantages : amélioration des rendements, obtention des dérivés plus purs, diminution des besoins énergétiques etc...

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

La méthode des plans d'expériences est une méthodologie expérimentale qui consiste à minimiser le nombre d'expériences nécessaires pour étudier, simultanément, l'impact de plusieurs facteurs sur plusieurs grandeurs d'intérêt, appelées réponses [1] (Figure II.1).

Contrairement aux méthodologies classiques, à chaque expérience, les valeurs de tous les facteurs, correspondant aux bornes fixées au départ de l'étude, varient selon un plan raisonné. De ce fait, les plans d'expériences apportent de nombreux avantages tels que la diminution du nombre d'expériences ou essais, l'augmentation du nombre de facteurs étudiés, la détection d'interactions possibles entre facteurs, l'optimisation et la modélisation des résultats, et la détection d'optimaux dans la zone délimitée par les bornes de chaque facteur [2].

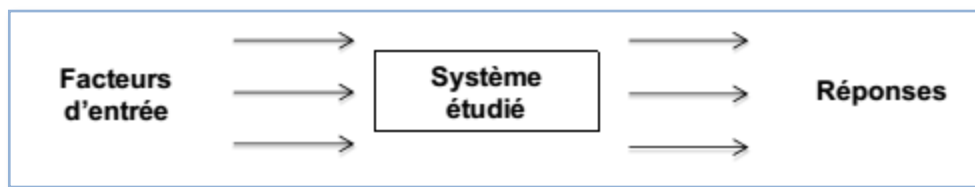


Figure (II.1) : Schéma de la démarche associée à un plan d'expériences.

2. La méthode des plans d'expériences

La méthode, ou technique des Plans d'Expériences (PE) est une démarche systématique, rigoureuse et ordonnée basée sur des considérations statistiques permettant d'étudier les relations entre les paramètres d'entrée et de sortie d'un système.

Elle est largement utilisée dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, la chimie,.... Concrètement, la méthode des PE peut être utilisée dès que l'on cherche à étudier une grandeur d'intérêt (grandeur mesurée ou calculée) y dépendant de variables d'entrée xi [3,4] :

$$y = f(xi)$$

Avec : $i=1,2,...,N$; N étant le nombre de paramètres d'entrée.

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences [4]. Les effets des différents facteurs intervenant dans le processus étudié, sont alors quantifiés et les conditions optimales définies. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'*espace expérimental* et celle de *modélisation mathématique* des grandeurs étudiées [5].

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

- ◆ le choix de la méthode d'expérimentation,
- ◆ l'analyse des résultats,
- ◆ l'acquisition progressive de la connaissance.

2.1. Choix de la méthode d'expérimentation

La méthode d'expérimentation choisie doit faciliter l'interprétation des résultats. Elle doit également minimiser le nombre des essais sans toutefois sacrifier la qualité. La théorie des plans d'expériences assure les conditions pour lesquelles on obtient la meilleure précision possible avec le minimum d'essais. On a donc le maximum d'efficacité avec le minimum d'expériences et par conséquent le coût minimum.

Cette phase, essentielle, repose sur les points suivants :

2.1.1. Identifier le phénomène étudié (le problème) :

C'est le poser clairement en précisant de quoi il s'agit et on quoi le sujet proposé est un problème pour cela il est recommandé de faire à la méthode du SADO connue sous le nom "méthode de QQCQP" [6,7] . par poser les questions 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 ?

2.1.2. Objectifs d'un plan d'expériences :

L'objectif de l'étude est la base du choix de la technique à utiliser pour construire le plan d'expériences optimal. Il faut donc initialement savoir si l'on souhaite :

- ✎ détecter et identifier les facteurs réellement influents parmi un ensemble de facteurs potentiellement influents.
- ✎ quantifier l'influence de différents facteurs en considérant les éventuelles interactions entre ces facteurs.

- ✎ délimiter un domaine d'intérêt.
- ✎ maximiser ou minimiser une performance ou déterminer le meilleur compromis entre différentes réponses.

2.1.3. Identifier les réponses :

Ce sont les grandeurs étudiées ou les sorties .Une réponse est une grandeur non maîtrisée, observable et quantifiable, qui sera mesurée à chaque expérience définie par le plan d'expériences. La réponse doit être la plus représentative possible, tout en étant la plus précise possible (écart type connu et acceptable).

Les réponses doivent préférentiellement être de nature quantitative afin de permettre l'utilisation de méthodes d'analyses statistiques telles que la régression multilinéaire et l'analyse de la Système Facteurs d'entrée étudié Réponses variance dont les hypothèses sont généralement admises lors de la mise en œuvre d'un plan d'expériences.

2.1.4. Identifier les facteurs et du domaine d'étude :

Les facteurs sont définis comme une variable ou un état qui agit sur le procédé étudié. Un facteur peut être de type qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable [6, 8,9].

Un facteur peut prendre n'importe quelle valeur entre une limite haute (+1) et une limite basse (-1), représentées sur un axe gradué et orienté. La graduation peut être en grandeurs normales spécifiques à chaque domaine d'expérience, ou en grandeurs codées qui confèrent aux plans d'expériences une présentation unifiée et générale. L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre un facteur entre ces deux bornes est le domaine de variation [9] (Figure II.2) .

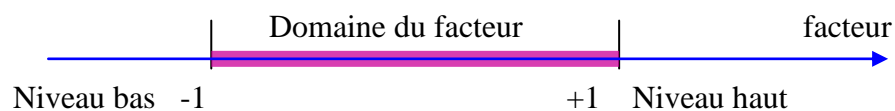


Figure (II.2) : Domaine d'un facteur [10].

Une expérience donnée constitue un point expérimental et par conséquent l'ensemble des points expérimentaux constitue le domaine expérimental (Domaine de l'étude). Le domaine expérimental défini est ainsi habituellement un carré pour deux facteurs (Figure II.3), un cube pour trois facteurs, etc.

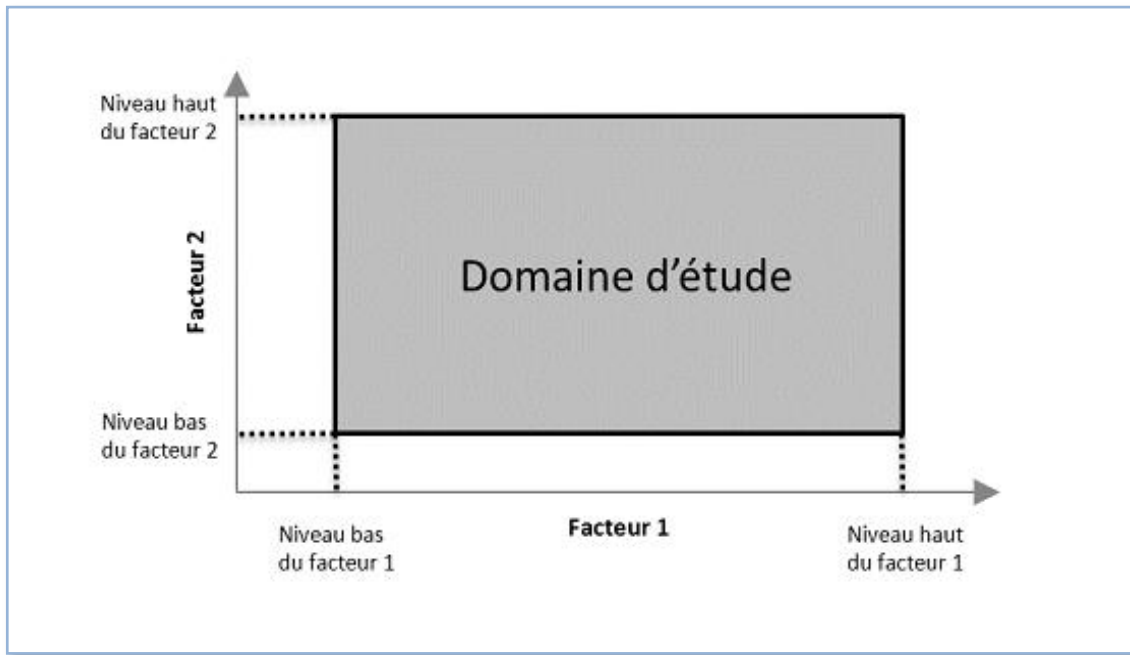


Figure (II.3) : Domaine d'étude pour deux facteurs [10].

2.1.5. Choix du plan d'expérience [10,11] :

Les différents PE peuvent être classés en deux catégories selon l'objectif que souhaite atteindre l'expérimentateur :

a- Les plans de criblage ou screening : ils permettent de déterminer quels sont les facteurs influents sur la réponse observée. Pour ce type de plan, un grand nombre de facteurs peut être étudié avec peu d'essais. Les modèles mathématiques des plans de criblage sont des polynômes d'ordre 1 pouvant prendre en compte les interactions de deux facteurs:

- Modèle sans interaction :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^N a_i x_i + e \dots\dots\dots(II.1)$$

- Modèle avec interactions :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^N a_i x_i + \sum_{i=1, j>i}^N a_{ij} x_i x_j + e \dots\dots\dots(II.2)$$

Avec : y : la réponse ; x_i : niveau de facteur i ; a_0 : valeur de réponse au centre du domaine ;

a_{ij} : l'interaction entre i et j ; e : résidu.

b- Les plans d'optimisation : ils sont utilisés pour réaliser un modèle mathématique prédictif du système. Le but est de pouvoir modéliser le comportement de la réponse étudiée avec la meilleure précision. Ils sont utilisés pour la phase d'optimisation. Pour les plans

d'optimisation, les modèles mathématiques sont généralement des polynômes du second degré prenant en compte les interactions de deux facteurs:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^N a_i x_i + \sum_{i=1, j>i}^N a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^N a_i x_i^2 + e \dots \dots \dots (II.3)$$

Avec : y : la réponse ; x_i : niveau de facteur i ; a_0 : valeur de réponse au centre du domaine ;
 a_{ij} : l'interaction entre i et j ; e : résidu.

2.1.5.1. Les plans de criblage des facteurs :

L'ensemble des facteurs donnés par l'expérimentateur, tous ne sont pas obligatoirement réellement influents sur les variations de la réponse. mais par le criblage des facteurs consiste distinguer, parmi un ensemble de facteurs potentiellement influents, sont effectivement dans le domaine d'étude fixé[12,13]..

Parmi les plans d'expériences largement utilisés pour le criblage des facteurs, on peut citer les plans de :

➡ Les plans factoriels :

Un plan factoriel complet consiste à étudier toutes les combinaisons possibles des facteurs pris en considération dans l'expérience (Tous les effets principaux et toutes les interactions peuvent être estimés à partir d'un plan factoriel complet).

A. Plans factoriel complets à 2 niveaux [14,15]:

Les plans factoriels à 2 niveaux sont les plus simples, ils permettent de bien comprendre le principe de la méthode, et ont de nombreuses applications. Le nombre d'expériences à réaliser se calcule par :

$$\text{le nombre d'expériences} = 2^k$$

Les plans factoriels à deux niveaux sont des plans factoriels dans lesquels chacun des k facteurs disponibles est étudié avec deux niveaux seulement.

Les premières étapes de l'expérimentation impliquent généralement l'analyse d'un grand nombre de facteurs potentiels pour découvrir les quelques facteurs «vitaux».

Les plans factoriels à deux niveaux sont utilisés durant ces étapes pour filtrer rapidement les effets inactifs de manière à pouvoir concentrer son attention sur les facteurs importants.

Par exemple Les figures (II.4) et (II.5) représentent un plan factoriel complet à deux niveaux pour respectivement deux et trois facteurs avec une expérience supplémentaire située au centre du domaine.

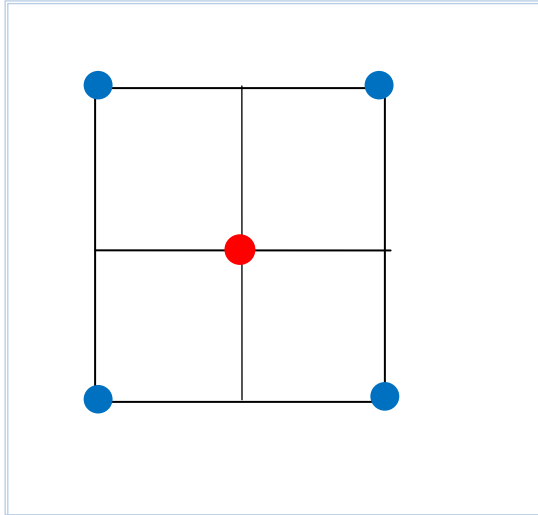


Figure (II.4) : Plan factoriel complet à deux niveaux pour deux facteurs .

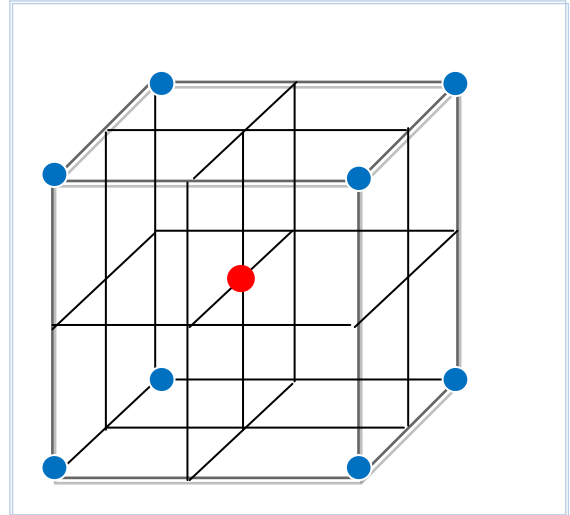


Figure (II.5) : Plan factoriel complet à deux niveaux pour trois facteurs.

L'inconvénient des plans factoriels complets est que le nombre d'expériences augmentée pour analyse un grand nombre des facteurs (64 expériences pour 6 facteurs, 128 pour 7 facteurs,...).

B. Les plans de Plackett - Burman [14,16]:

En 1946 que J.P. Burman et Robin .L. Plackett ont introduit une classe de plans factoriels est nommé d'après leurs noms, offrant une façon très efficace d'expérimenter avec un nombre appréciable de variables tout en conservant un nombre raisonnable d'essais.

Les plans de type Plackett-Burman Sont des matrices d'Hadamard consistent essentiellement en une fraction très spécifique d'un design factoriel complet et se les sont le plus souvent sans interaction avec propriétés suivantes:

- ✎ les éléments sont + 1 ou - 1 (le niveau bas (-1) et le niveau haut (+1)).
- ✎ ces matrices sont carrées et possèdent un nombre de lignes (ou de colonnes) égal à 2 ou à un multiple de 4 ;
- ✎ ces matrices sont orthogonales, c'est-à-dire que le produit scalaire de deux lignes (ou de deux colonnes) est égal à zéro.

C. Les plans factoriels fractionnaires :

Les plans factoriels fractionnaires permettent de réduire le nombre d'essais à réaliser par rapport à un plan complet. Mais ceci implique que certains effets des facteurs seront alors confondus entre eux. On parle alors de termes « aliasés » ou tout simplement d' « alias ».

la fraction est une proportion simple de l'ensemble complet des combinaisons possibles de traitements (Norme ISO 3534 -3) [13,17].

Dans les plans factoriels fractionnaires, seule une fraction des combinaisons possibles des niveaux des facteurs est prise en compte, d'où l'appellation de plan « fractionnaire ». De plus, une ou plusieurs expériences supplémentaires sont réalisées au centre du domaine. Ils nécessitent 2^k fois moins d'expériences que le plan factoriel complet. Ils sont notés pour un cas général :

$$\text{Le nombre d'expériences} = 2^{k-p}$$

Le p signifie que le nombre d'expériences a été divisé par 2^k par rapport à un plan complet.

2^{k-p} présente le nombre total d'expériences réalisées auquel s'ajoutent les points expérimentaux au centre du domaine [18].

L'exemple des figures (II.6) et (II.7) le cas d'un système avec trois facteurs x_1, x_2 et x_3 . Pour un plan 2^{3-1} , il existe deux configurations de points qui peuvent être réalisés. (Points noirs et gris).

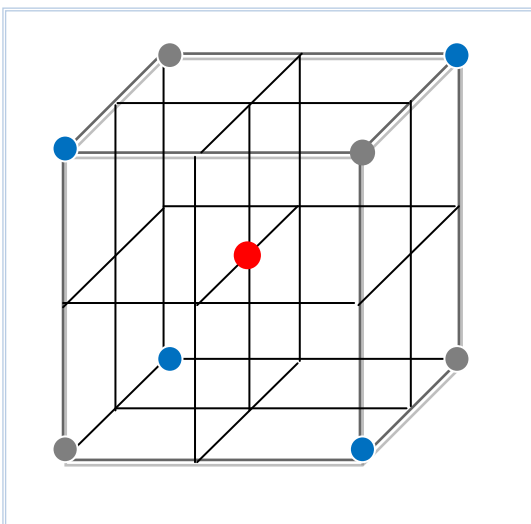


Figure (II.6) : Deux plans factoriels fractionnaires 2^{3-1} , configuration 1 en noir et 2 en gris.

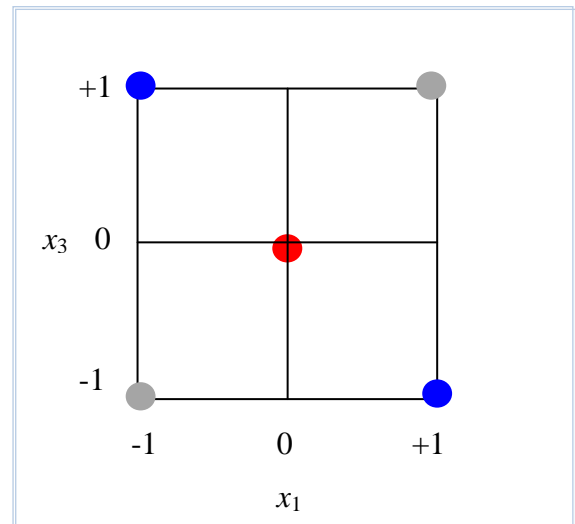


Figure (II.7) : Transformation du plan 2^{3-1} en plan 2^2 (x_2 non influent).

Le point blanc représente une expérience au centre du domaine pour les deux configurations du plan.

- _ On remarque que si l'un des facteurs n'a aucune influence sur la réponse, le plan se transforme en un plan factoriel complet 2^2 , quel que soit le facteur non influent.

Si par exemple le facteur x_2 n'a pas d'influence, on obtient en projetant des points expérimentaux sur le plan (x_1, x_3) un plan factoriel complet à deux facteurs x_1 et x_3 quel que soit la configuration choisie [10].

2.1.5.1. Les plans d'optimisation des facteurs :

➡ les plans de surface de réponse :

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) constitue le second volet de la méthode des plans d'expériences. Cette technique vise à déterminer d'une façon quantitative les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative.

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponse permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ils sont utilisés pour les variables continues.

La méthode des surfaces de réponse doit être vue comme un ensemble d'outils permettant la compréhension et l'exploitation d'objets simplificateurs de la fonction réponse étudiée, plus largement et plus aisément exploitables [14,19].

A. -Plans composites centrés [15] :

Ils sont développés, en particulier, dans la méthodologie de surface de réponse, et ils permettent l'étude d'un modèle quadratique, dans la plupart des cas des phénomènes non linéaires. Tous les facteurs pour lesquels on souhaite tester l'influence quadratique auront 5 niveaux. Les plans composites centraux sont constitués de trois parties, ce qui permet une démarche séquentielle :

- Le plan factoriel : c'est un plan factoriel complet ou fractionnaire à deux niveaux par facteurs. Les points expérimentaux sont aux sommets du domaine d'étude.
- Le plan en étoile : les points du plan en étoile sont sur les axes et ils sont, en général, tous situés à la même distance du centre du domaine d'étude (les points F, G, H, et I de Figure II.8).
- Les points au centre du domaine d'étude. On prévoit toujours des points expérimentaux situés au centre du domaine d'étude usuellement noté par 0 répété plusieurs (n_0) fois pour estimer la variance de répétabilité (Le point E de Figure II.8).

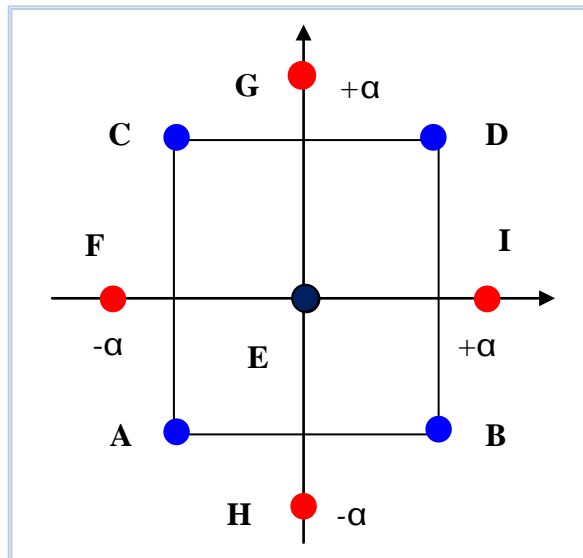


Figure (II.8) : Plan composite pour deux facteurs.

Les unités expérimentales 1 à 8 constituent les points cubiques du plan, équivalent à un plan factoriel 2^3 . Les niveaux des variables de prédiction sont donnés comme des valeurs codées. Les unités expérimentales 9 et 10 sont les points centraux et les unités expérimentales 11 à 16 sont les points en étoile [10].

-Le nombre total n d'essais à réaliser est la somme des essais du plan factoriel (n_f), des essais du plan en étoile (n_α) et des essais au centre (n_0). Le nombre n des essais d'un plan composite est donné par la relation :

$$n_t = n_f + n_\alpha + n_0 \dots \dots \dots (II.4)$$

Pour respecter le critère de presque orthogonalité, la valeur de α doit vérifier par l'équation [18] :

$$\alpha = \frac{(n_f (\sqrt{n} - \sqrt{n_f})^4)^{\frac{1}{4}}}{4} \dots \dots \dots (II.5)$$

B. -Les plans de Box-Behnken :

Box et Behnken ont proposé en 1960 ces plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : -1 , 0 et $+1$. Ces plans sont faciles à mettre en œuvre et possèdent la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des k premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués.

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube. Pour quatre facteurs ce plan est construit sur un hypercube à quatre dimensions. On place les points expérimentaux non pas aux sommets du cube ou de l'hypercube, mais au milieu des arêtes ou au centre des faces (carrés) ou au centre des cubes. Cette disposition a pour conséquence de répartir tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère ou sur une hypersphère suivant le nombre de dimensions. On ajoute des points au centre du domaine d'étude [19,20].

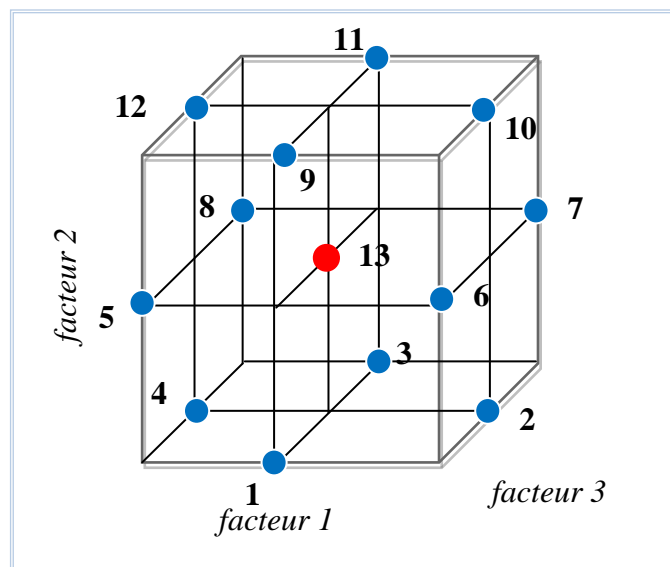


Figure (II.9) : Plan de Box-Behnken pour trois facteurs.

2.2. Analyse des résultats (effets, graphiques, variances):

Le calcul des moyennes et des effets permettent de déterminer les coefficients du modèle matriciel. La représentation graphique et son analyse donnent une interprétation du poids des effets sur la réponse. L'analyse de la variance permet de vérifier si les effets définis comme influents pour l'étude associée sont réellement associés au facteur étudié ou s'ils ne sont pas les résultats de la variabilité naturelle du phénomène étudié. Elle permet donc, une validation statistique des effets.

les logiciels de construction des plans d'expériences (JMP, Minitab, Stata, SAS...) facilitent les calculs et les interprétations sont devenues très simples. Ces outils favorisent également les représentations graphiques qui illustrent de manière spectaculaire les résultats et améliorent la compréhension des phénomènes.

2.2.1. Calcul des effets [21,22]:

Isoler l'effet de chaque facteur ne rend pas toujours compte de l'ensemble du phénomène. Il arrive que l'un des facteurs renforce l'effet de l'autre. Cela traduit une interaction entre les deux facteurs. Le phénomène étudié est dit sous l'effet de diverses actions: l'action globale, l'action de chaque facteur et l'action de chaque interaction.

Il est usuel de représenter l'effet d'un facteur par un segment de droite dont le coefficient directeur vaut cet effet. Il s'agit simplement de la transcription graphique des relations générales de calcul de ces grandeurs.

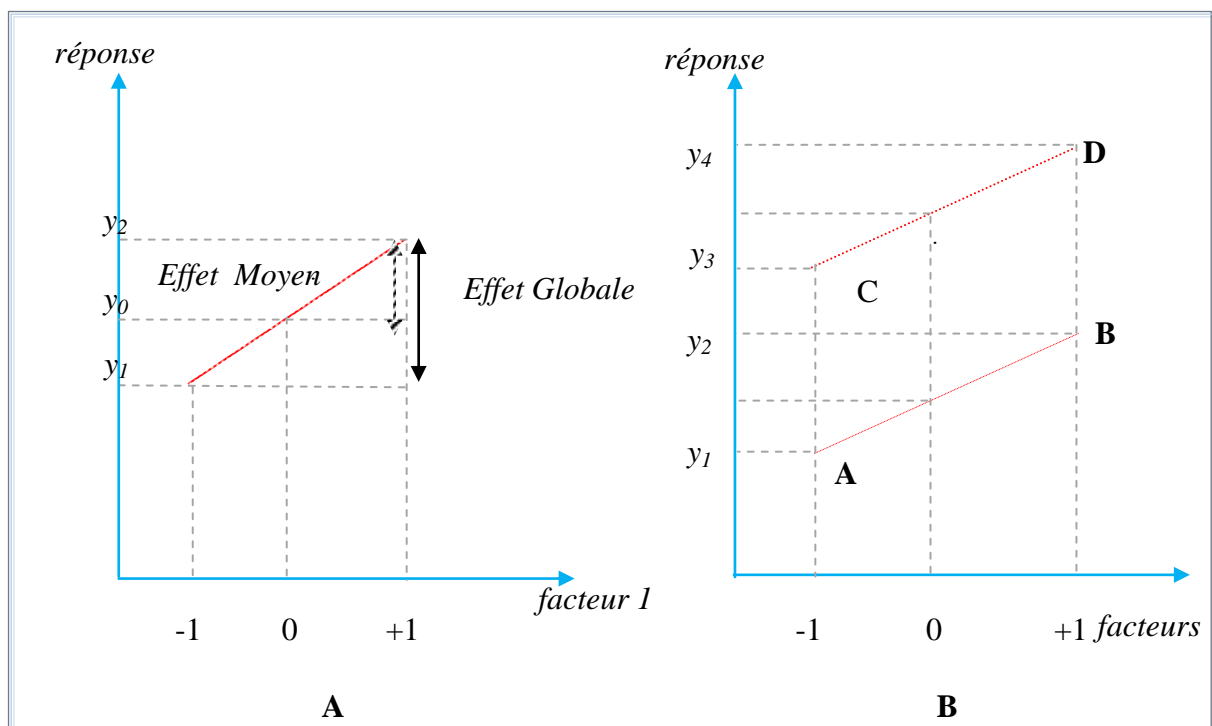


Figure (II.10) : Illustration de l'effet de facteur(A), illustration d'une interaction(B).

2.2.2. La comparaison graphique des résultats mesurés et estimés

Les résultats obtenus peuvent alors être représentés graphiquement afin de comparer dans un premier temps les réponses mesurées et les réponses estimées par le modèle. Pour cela, il est nécessaire de tracer le graphe d'adéquation du modèle. Les réponses estimées (calculées par le modèle) sont placées en abscisse et les réponses mesurées (expérimentales) en ordonnée.

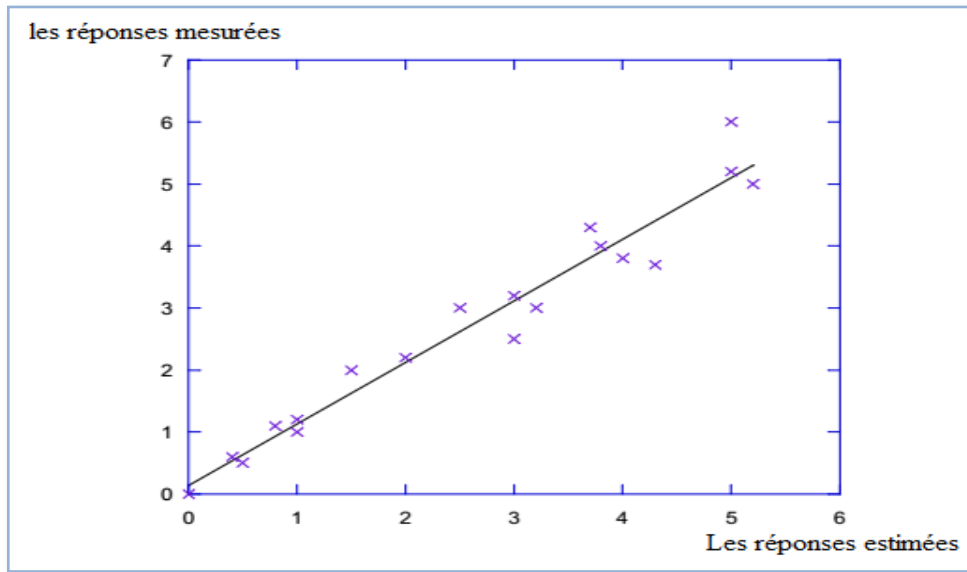


Figure (II.11) : exemple de graphe d'adéquation du modèle.

La figure 11 donne un exemple de graphe d'adéquation, le nuage de points représente les valeurs d'une réponse Y pour chaque ligne du plan d'expériences.

Si le nuage de points est aligné sur la droite d'équation $y = x$, la qualité descriptive du modèle sera excellente.

2.2.3. La technique d'analyse de variance [5, 23,24] :

L'analyse de la variance est appelée « Analysis of Variance », est couramment abrégée en ANOVA. Cette analyse consiste à rechercher les sources de variation des réponses.

On suppose que les réponses ont été calculées avec le modèle postulé : $Y_i = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) + e$, en utilisant la méthode des moindres carrés c'est-à-dire comparer la somme des carrés des écarts due uniquement à la régression , avec la somme des carrés des résidus.

Dans ce cas, les réponses calculées s'écrivent et les écarts e prennent des valeurs particulières r_i qui s'appellent les résidus.

L'analyse de la variance consiste à trois types de variations:

- ☞ La variation due à la liaison linéaire :

$$SCM = \sum_{i=1}^N (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \dots\dots\dots (II.6)$$

Y : la matrice des réponses observées lors de la réalisation des expériences.

\hat{Y} : la matrice des réponses estimée.

SCM : la somme des carrés moyen.

☞ La variation résiduelle :

$$SCE = \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \dots\dots\dots (II.7)$$

SCE : la somme des carrés des résidus.

☞ La variation totale :

$$SCT = SCE + SCM \dots\dots\dots (II.8)$$

$$SCT = \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2 \dots\dots\dots (II.9)$$

SCT: somme totale des carrés des écarts.

- **Le test de variation [25]:**

Le test de Fisher-Snedecor permet de comparer deux variances, par l'utilisation de la loi statistique de Fisher (loi F) . Celle-ci travaille sur le quotient de variance et prend en compte le nombre de degrés de liberté de chacune d'elles. Les variances concernées doivent être celles de variables aléatoires suivant une distribution normale et à variance constante.

Pour effectuer ce test on calcule le ratio suivant pour le terme du modèle considéré (facteur ou interaction) :

$$F_1 = \frac{SCM/(p-1)}{SCE/(N-p)} \dots\dots\dots (II.10)$$

La probabilité F_1 que ces variances soient issues d'une même distribution peut être retrouvée à l'aide d'une table de Fisher :

- **Le calcul des résidus [26] :**

La somme des carrés des résidus peut être partagée en deux composantes :

- *Le manque d'ajustement (lack of fit en anglais):* traduit le fait que le modèle choisi par l'expérimentateur avant les expériences est probablement un peu différent du modèle réel qui régit le phénomène étudié et on le note par la lettre Δ .
- *Les erreurs expérimentales (pure error en anglais) :* est la prise en compte de la nature aléatoire de la réponse. En effet, dans le cas général, si l'on mesure plusieurs fois une

réponse en un même point expérimental, on n'obtiendra pas exactement le même résultat et on les note par la lettre ϵ .

On a donc :

$$\sum e^2 = \sum(\Delta + \epsilon)^2 \dots\dots\dots(II.11)$$

2.2.4. Mesure de la qualité du modèle mathématique [10,26]:

Le coefficient de détermination R^2 , qui est le coefficient de corrélation, estime la manière dont le modèle mathématique approxime les résultats expérimentaux.

$$R^2 = \frac{SCM}{SCT} = 1 - \frac{SCE}{SCT} \dots\dots\dots(II.12)$$

Ce coefficient traduit la contribution du modèle dans la restitution de la variation de la réponse observée. Par définition, le coefficient de détermination appartient à l'intervalle [0, 1] , Lorsqu'il est proche de 0, le pouvoir prédictif du modèle est faible et lorsqu'il est proche de 1, le pouvoir prédictif du modèle est fort.

Si le nombre d'expériences est égal au nombre d'inconnues du système, le coefficient R^2 sera toujours égal à 1. C'est pour éviter cela que le coefficient de détermination $R^2_{ajusté}$ a été introduit. Ce coefficient est défini comme la différence à 1 du rapport entre le carré moyen des écarts des résidus et le carré moyen des écarts expérimentaux :

$$R^2_{ajusté} = 1 - \frac{SCE/(N-p)}{SCT/(N-1)} \dots\dots\dots(II.13)$$

2.2.5. Analyse graphique des résultats

Un des principaux avantages des plans d'expériences est la présentation des résultats sous forme graphique. De nombreux graphiques sont disponibles pour interpréter l'équation du modèle empirique. Dans le cas des plans à surfaces de réponses, cette restitution s'effectue essentiellement sous deux formes différentes : les surfaces de réponses et les courbes iso-réponses.

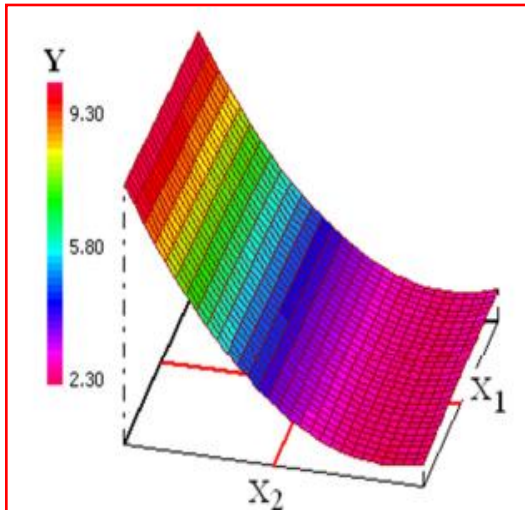


Figure (II.12) : surface de réponse.

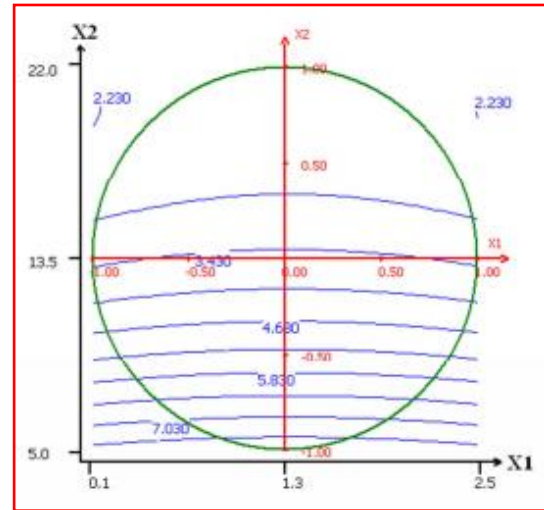


Figure (II.13) : courbes iso-réponses.

2.2.6. Validation de l'hypothèse et recherche de solution au problème

L'analyse de résultats d'essais procède l'identification des combinaisons optimales des facteurs qui n'a pas certainement fait l'objet d'un essai dans le plan. Ils nécessiteront alors de tester la combinaison optimale, quand on arrive à l'étape de l'analyse finale, il faut vérifier le résultat obtenu par l'analyse est plausible ou non. on acceptera ou pas le modèle proposé, c'est avec un examen approfondi des résultats :

- Quels sont les facteurs influents ?
- Quelles sont les interactions significatives ?
- Existe-t-il des ambiguïtés dans les contrastes calculés ?
- Le modèle mathématique associé aux plans peut-il orienter les futurs travaux ?
- Le domaine contient-il les solutions du problème posé ?
- Une analyse des résidus a-t-elle été pratiquée pour s'assurer que toute l'information restante a été extraite ?

Une extension du domaine d'étude est à envisager si les premiers résultats montrent que la solution espérée n'est pas dans le domaine défini au départ.

Les résultats acquis orienteront les futurs essais vers le nouveau domaine qui devrait contenir la solution espérée.

2.3. Acquisition progressive de la connaissance :

L'expérimentateur qui entreprend une étude ne connaît pas les résultats, il est donc sage d'avancer progressivement pour pouvoir réorienter les essais en fonction des premiers résultats. Une première ébauche permettra de mieux orienter les essais vers les seuls aspects intéressants de l'étude et d'abandonner les voies sans issues.

En fonction des conclusions du premier plan, l'expérimentateur pourra se poser les questions suivantes :

- Faut-il envisager un changement de domaine ?
- Faut-il envisager un plan complémentaire (ou des essais complémentaires) ?
- Faut-il envisager un autre modèle mathématique ?

Une première série d'expériences conduit à des conclusions provisoires ; en fonction de ces conclusions provisoires, on lance une nouvelle série d'essais. L'ensemble des deux séries d'expériences est utilisé pour obtenir un contour précis des résultats d'étude. L'expérimentateur accumule ainsi les seuls résultats dont il a besoin et s'arrête dès qu'il a obtenu ce qu'il cherche.

3. Conclusion

La méthode du plan d'expérience (MPE) est donc un ensemble des techniques complémentaires aidant son utilisateur dans la détermination des expériences à réaliser ainsi que dans la compréhension et l'exploitation des résultats obtenus. Ces outils s'appuient essentiellement sur des bases statistiques et algébriques. Cette particularité induit la possibilité quasi-permanente de connaître les erreurs concédées sur les données expérimentales et sur celles qui en sont déduites.

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons présenter l'application de la méthode du MPE dans l'étude de l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* dans le but de déterminer les valeurs du facteur permettant de donner un taux de conversion optimal.

L'enzyme utilisée dans notre travail est la lipase de *Candida rugosa*, elle appartient à la famille des hydrolases qui réagissent spécifiquement sur la liaison ester du groupe carboxyester. Cette enzyme présente une bonne activité catalytique. De plus, sa structure tridimensionnelle adopte une conformation particulière qui la rend active en s'adsorbant aux interfaces huile/eau.

Cette enzyme est largement employée comme catalyseur dans diverses réactions (hydrolyse, estérification, transestérification, interestérification) en milieux aqueux ou organiques [1,2].

Notre travail concerne l'application de la méthodologie des plans d'expériences pour étudier l'influence des conditions d'immobilisation sur le taux de conversion.

Pour ce faire, nous avons choisi l'acylation énantiosélective du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle. Cette réaction modèle est catalysée par la lipase de *Candida rugosa* immobilisée sur une résine anionique l'Amberjet 4200 Cl.

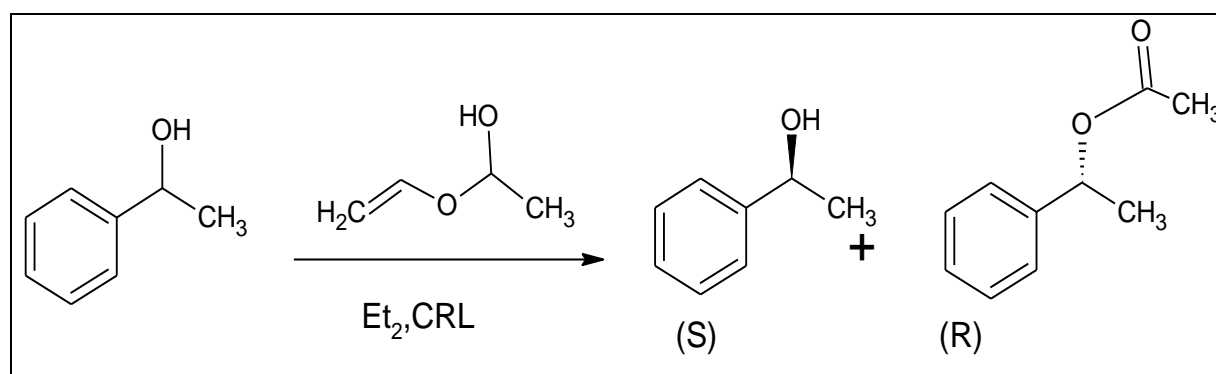


Schéma (III.1): L'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle.

1. Préparation du plan d'expérience

1.1. Objectifs :

L'objectif de notre travail est l'application d'un modèle statistique appelé le modèle de Box-Behnken sur des principaux facteurs afin de :

- Modéliser la réponse choisie

- Déterminer les valeurs optimales des différents facteurs en appliquant la méthodologie de surface des réponses (RSM).

1.2. Construction du plan Box-Behnken :

La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) permet d'établir un modèle de régression polynomiale d'ordre 2 de type :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^N a_i x_i + \sum_{i=1, j>i}^N a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^N a_i x_i^2 + e \dots\dots\dots(III.1)$$

Dans ce travail nous avons choisi le plan de Box-Behnken. Ce choix est notamment motivé par le faible coût demandé: 15 expériences doivent être calculées.

1.3. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Dans notre travail nous avons décidé de prendre en compte 3 facteurs potentiellement influents sur le cours de la réaction [3,4]. Ces facteurs ainsi que le domaine de variation, sont précisés dans le tableau suivant :

Tableau (III.1) : Facteurs et domaine d'étude du plan du Box

Facteur	Unité	Niveau-1	Niveau+1	Symbole
Rapport en quantité de protéine E/S (mg de E / g de S)	mg/g	80	160	E/S
Temps	heures	5	15	t
Concentration du tampon	mmol/l	20	60	[tp]

1.4. Réponse choisie

La réponse choisie est le taux d'avancement de la réaction modèle, c'est la conversion (C%).

2. Modélisation de la réponse

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, composé de quinze essais dont trois au centre du domaine (essais 13, 14 et 15) et des réponses expérimentales (C%). Il a été réalisé à l'aide du logiciel Minitab (Tableau III.2). Les données de la réponse choisie de ce travail ont été tirées du travail de Bouchagra [3].

Tableau (III.2) : Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unité non codée).

Essaie	E/S	temps	C	C%
1	80	5	40	8,70
2	160	5	40	3,02
3	80	15	40	19,86
4	160	15	40	13,88
5	80	10	20	18,87
6	160	10	20	13,78
7	80	10	60	23,93
8	160	10	60	19,25
9	120	5	20	16,63
10	120	15	20	26,47
11	120	5	60	13,97
13	120	10	40	25,83
14	120	10	40	28,03
15	120	10	40	23,64

Les données de ce tableau subiront un traitement statistique avec logiciel Minitab, pour estimer les coefficients du modèle mathématique.

2.1. Résultats statistiques et interprétation

Le traitement statistique de la réponse selon le plan de Box-Behnken donne les résultats représentés dans le tableau de l'analyse de variance (ANOVA).

Tableau (III.3) : Analyse de variance pour C%

Source	DL	SC	MS	F	P
Régression	6	539,706	89,951	4,3	0.031
Linéaire	3	173,89	395,504	26.39	0,017
Carré	3	365,816	121,939	5,82	0.021
Erreur résiduelle	8	167,484	20,935		
Inadéquation de l'ajustement	6	157,848	26,308	5,46	0,163
Erreur pure	2	9,636	4,818		

Nous avons utilisé comme indicateur statistique les valeurs de P pour évaluer quels sont les termes du modèle qui sont importants. D'après l'ANOVA (tableau III. 3), la valeur $P=0,031$ indique que le modèle est significatif au niveau de confiance choisi ($P < 0.05$). D'autre part, l'ensemble des effets linéaires avec la valeur de $P=0,017$ indique qu'il existe un effet linéaire significatif pour les facteurs principaux. Il est suivi des effets carré qui lui aussi significatif $P=0,021$, contrairement aux interactions entre facteurs, qui sont exclues automatiquement par le logiciel.

En conclusion, nous avons trouvé un modèle acceptable ($R^2=76,3\%$) ce qui permet d'avoir une idée sur l'influence des différents facteurs. Cependant, les valeurs résiduelles importantes et le manque d'ajustement observé oblige une amélioration du modèle.

3. Amélioration du modèle

Dans notre étude, nous avons amélioré notre modèle en basant sur les deux approches statistiques suivantes :

3.1. Détection des essais aberrants

Les essais aberrants sont des essais entachés d'une erreur très importante et qui sont donc non représentatifs du phénomène étudié.

L'examen du diagramme des réponses estimées en fonction des réponses mesurées (fig.2) montre que malgré un acceptable coefficient de détermination, nous remarquons qu'il y a un point s'écartent de la première bissectrice. Le balayage de ce point à l'aide d'une fonction du logiciel Minitab, permet de déterminer le numéro de l'essai ; C'est l'essai numéro 12.

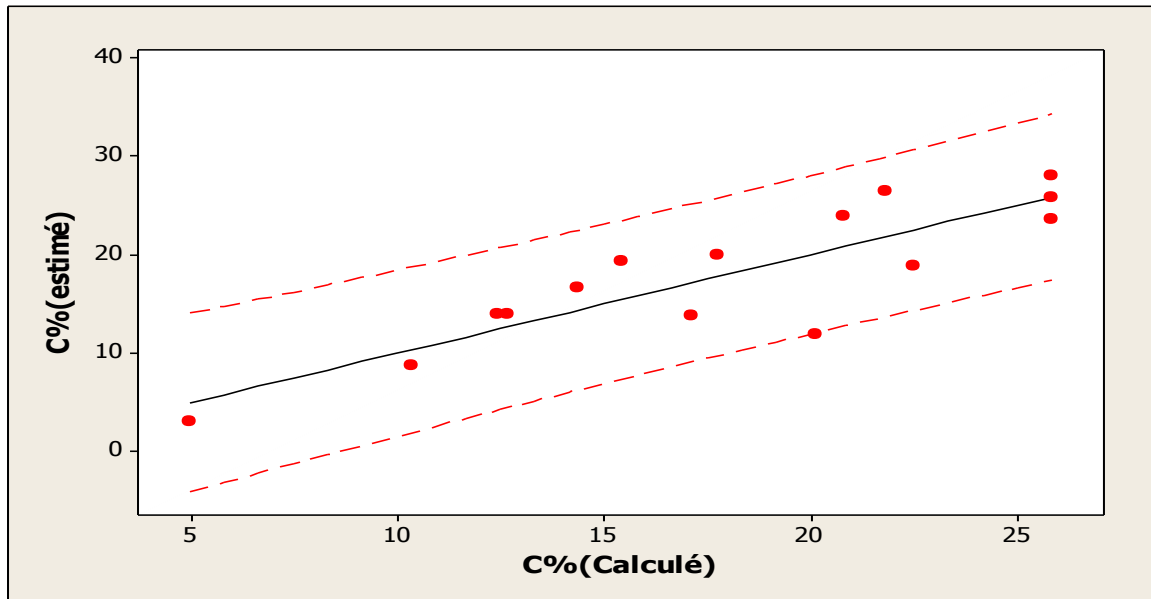


Figure (III.1) : Graphique des C% estimés en fonction des C% mesurées.

3.2. Transformation de réponses

Par conséquent, dans le but d'améliorer la qualité de modélisation (résidus plus faibles), nous l'avons recalculé le modèle en considérant une autre réponse, c'est-à-dire : au lieu de modéliser les Y_i comme une fonction des facteurs, on modélise les $f(Y_i)$ comme une fonction des facteurs, avec f une fonction inversible. On garde la transformation qui minimise la somme des carrés des résidus [5].

Lorsque l'on utilise le modèle (prédiction), on applique la transformation inverse f^{-1} pour revenir dans l'unité initiale.

La transformation de la réponse choisie dans notre cas est $\text{Log}(C\%)$, la matrice cette nouvelle réponse est représentée dans le tableau suivant :

Tableau (III.4) : Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales (unité non codée).

Essaie	E/S	emps	C	LogC%
1	80	5	40	0,93
2	160	5	40	0,48
3	80	15	40	1,29
4	160	15	40	1,14
5	80	10	20	1,27

6	160	10	20	1,13
7	80	10	60	1,37
8	160	10	60	1,28
9	120	5	20	1,22
10	120	15	20	1,42
11	120	5	60	1,14
13	120	10	40	1,41
14	120	10	40	1,44
15	120	10	40	1,37

Par conséquent, dans le but d'améliorer le modèle obtenu, nous l'avons recalculé en exclusion la valeur de point aberrant. Les données du nouveau modèle obtenu sont résumées dans le (tableaux III.5).

Tableau (III.5) : Coefficients de régression estimés pour la conversion C(%).

Source	Probabilité
E/S	0,008
temps	0,000
C	0,000
E/S*E/S	0,001
temps*temps	0,013
C*C	0,013
E/S*temps	0,074
temps*C	0,047

R-Sq = 97,14% R-Sq (adj) = 92,58%

L'équation de régression polynômiale optimale pour le nouveau modèle s'écrit en unité non codée comme suit :

$$\text{Log C\%} = -0,584 + 0,03773 \text{ E/S} + 0,0704 \text{ Temps} - 0,0391 \text{ C} - 0,000184 \text{ E/S*E/S} \\ - 0,00599 \text{ Temps*Temps} + 0,000377 \text{ C*C} + 0,000386 \text{ E/S*Temps} + 0,00127 \text{ Temps*C.}$$

Tableau (III.6) : Analyse de variance pour Log(C%).

Source	DI	SC	CM	F	P
Modèle	8	0,80204	0,100256	2127	0.002
Linéaire	3	0,39582	0,13194	27,99	0.001
Carré	3	0,44748	0,14916	31,64	0.001
Interaction	2	0,05644	0,02822	5,99	0,047
Erreur résiduelle	2	0,02357	0,004714		
Inadéquation de l'ajustement	3	0,02110	0,007035	5,70	0,153
Erreur pure	2	0.00246	0.00123		
Totale	13	0,8256			
R² = 97,14%,					
R²aj. = 92,58%.					

L'analyse de la variance (ANOVA) du nouveau modèle obtenu (tableau III.6), montre que tous les termes sont significatifs. On conclut donc que le modèle amélioré est meilleur du point de vue statistique.

4. Validation théorique du modèle

La validation du modèle est une des étapes fondamentales des plans d'expériences. Elle consiste à comparer le résultat théorique d'une expérience calculée par le modèle, avec le résultat réel d'un essai.

Tableau (III.7) : Comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées

Essais	LogC%	LogC%
	mesuré	estimé
1	0,93	0,89
2	0,48	0,53
3	1,29	1,23
4	1,14	1,17

5	1,27	1,29
6	1,13	1,08
7	1,37	1,44
8	1,28	1,23
9	1,22	1,22
10	1,42	1,44
11	1,14	1,11
12	1,07	1,85
13	1,41	1,40
14	1,44	1,40
15	1,37	1,40

Le diagramme des réponses mesurées, en fonction des réponses estimées, montre une forte corrélation entre celles-ci (figure III.2).

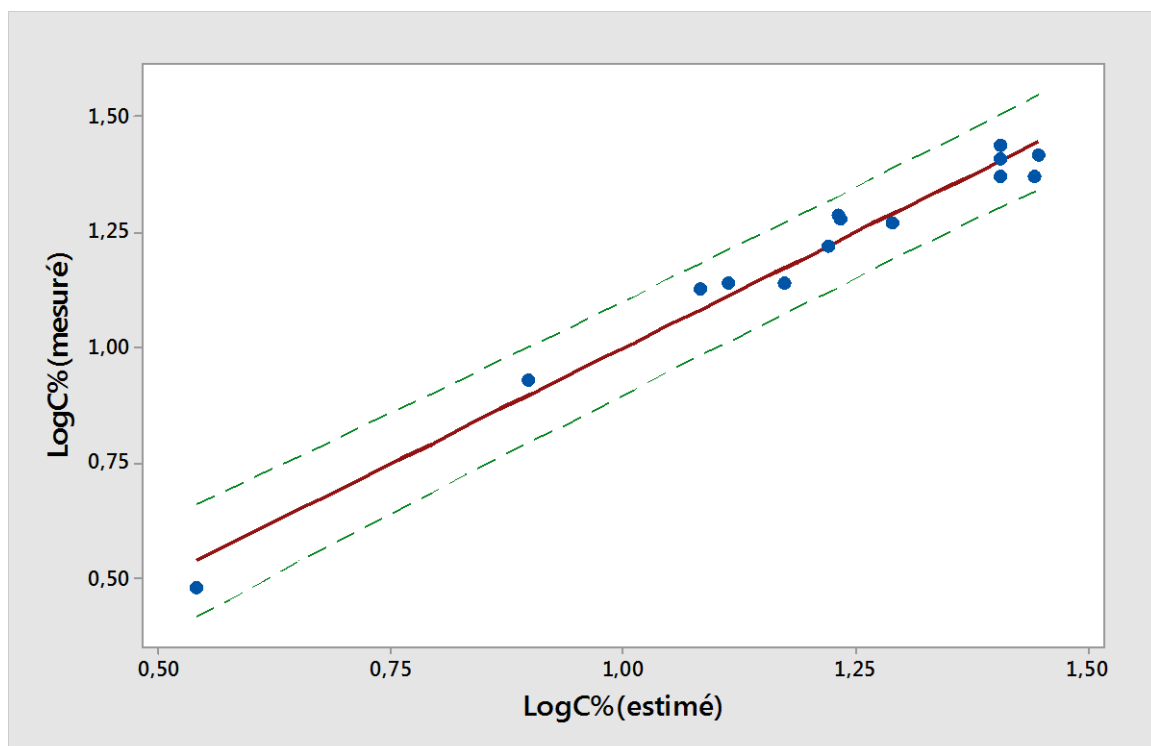
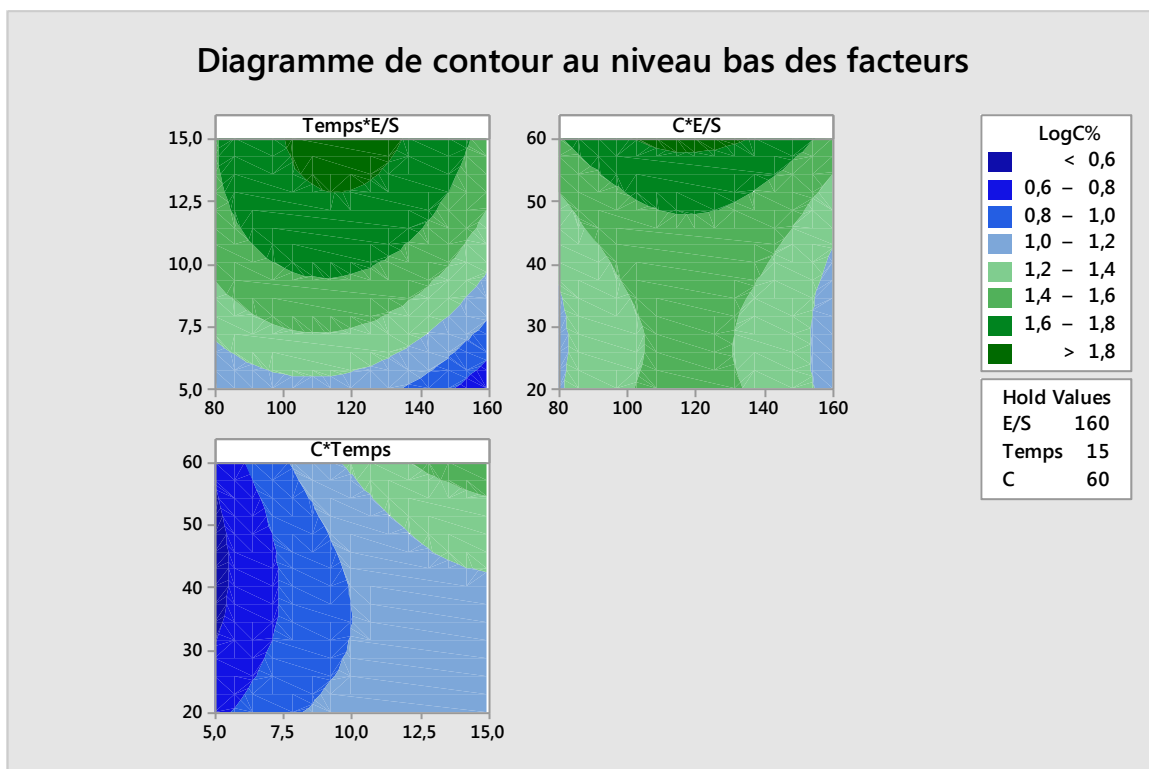


Figure (III.2) : Graphique des log C% estimés en fonction des log C% mesurées.

5. Optimisation de la réponse

L'étape finale consiste à trouver les valeurs des facteurs qui donnent la réponse optimale. A partir du modèle mathématique validé et à l'aide du logiciel, on réalise graphiquement les contours 2D. 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). Ces graphiques permettent de rechercher des solutions optimales plus désirables



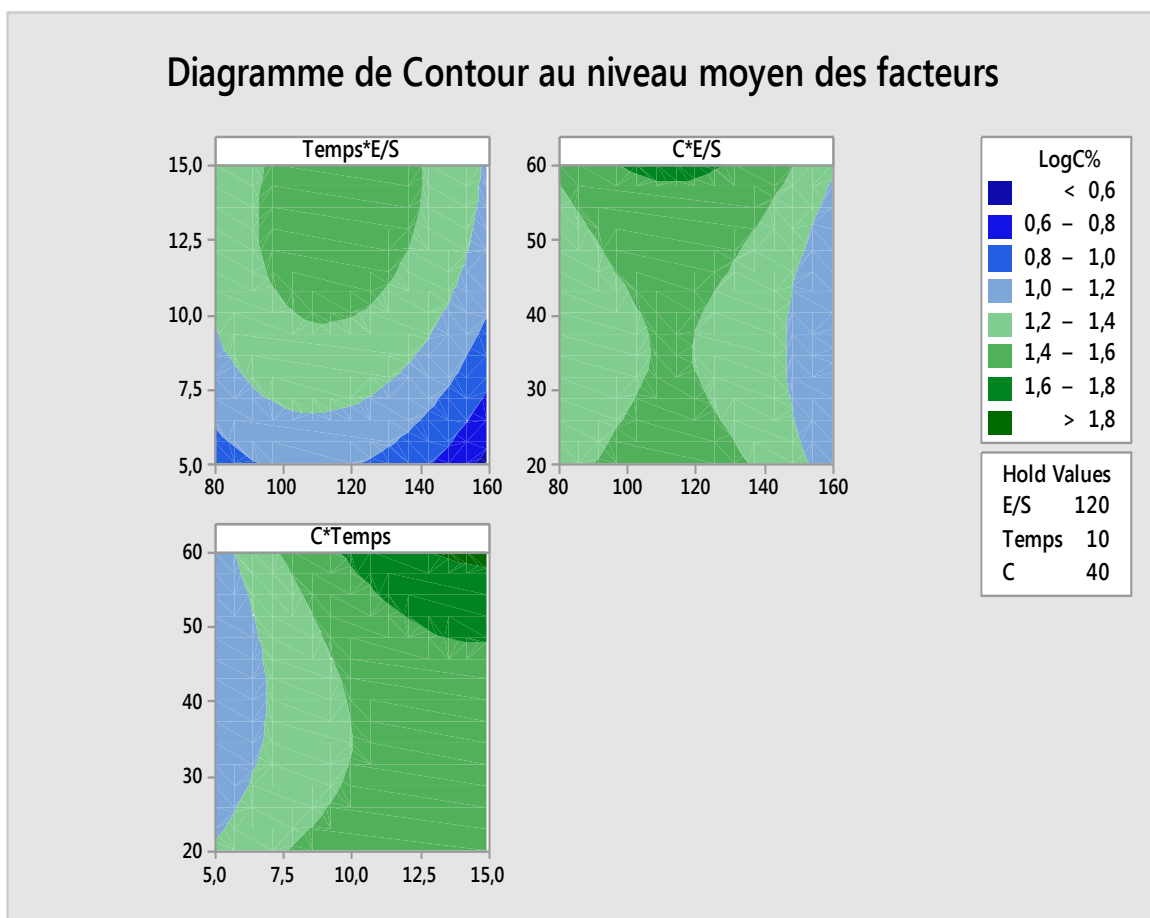
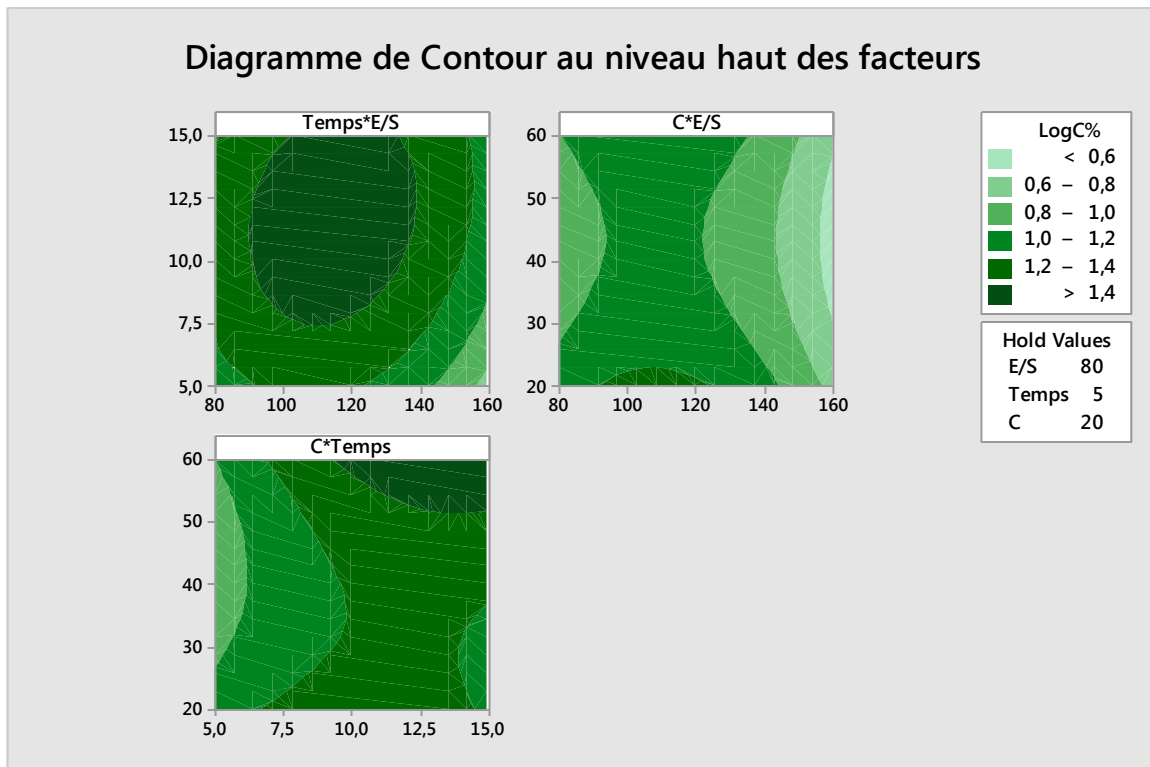


Figure (III.3) : Diagramme de contours présentant les effets des différents facteurs sur la réponse.

Les valeurs des facteurs permettant d'atteindre une réponse optimal ont été déterminées à partir du diagramme du contour et à l'aide de la fonction "désirabilité" du logiciel, les coordonnées du point optimal, soit :

- **E/S = 117,97 mg de protéine par g de support**

- **Temps = 15 heures**

- **Concentration du tampon = 60 mmol/l**

La valeur de la réponse en ce point est égale à $\text{Log}(C\%) = 1,85$, qui correspond à une valeur de taux de conversion égale à 70,79%, cette valeur n'a jamais été obtenue lors des 15 expériences réalisées. Ce résultat est a priori très intéressant.

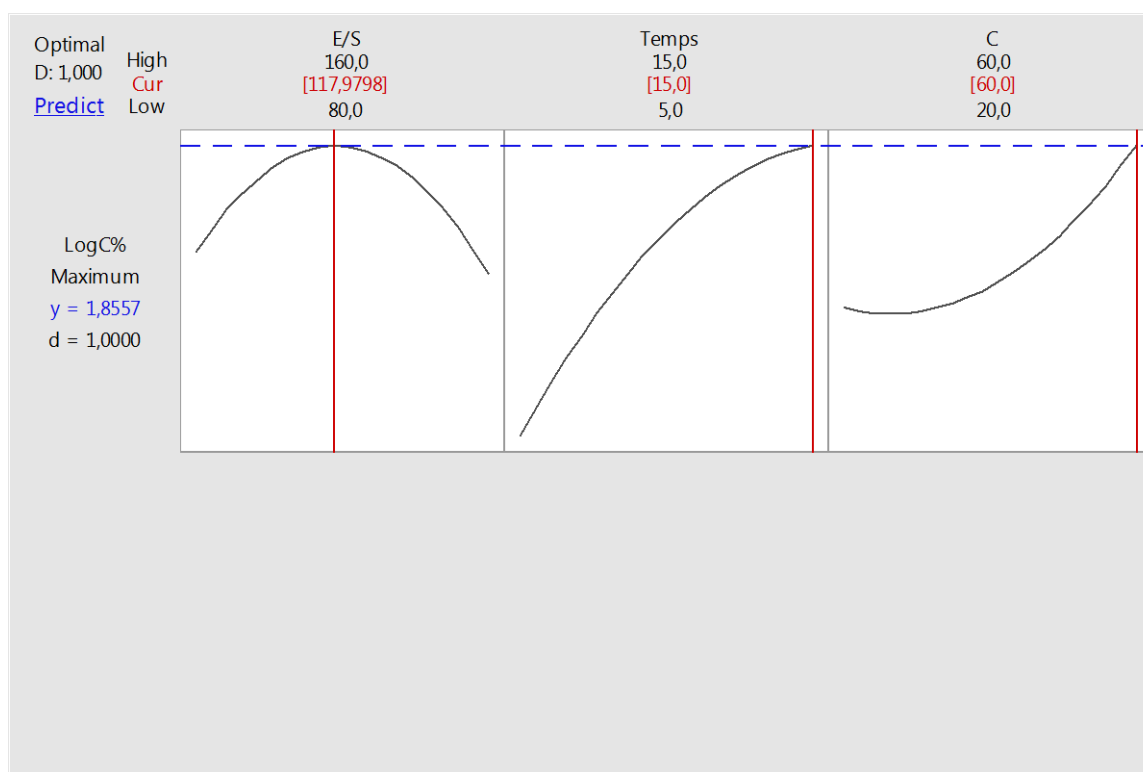


Figure (III.4) : Optimisation par la fonction Désirabilité .

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 activité 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'enzyme.

Dans le cas qui nous concerne, on peut expliquer les résultats optimaux des facteurs comme suit :

Le temps d'immobilisation à un effet positif, ce qui permet l'occupation de la majorité du site de support ; tout en sachant que chaque type de résine a un temps de saturation différent, selon la capacité d'échange

Le rapport enzyme support influe positivement sur le taux de conversion tant. Ce résultat est similaire à celles obtenus dans plusieurs travaux.

L'immobilisation de CRL sur Duolite (résine échangeuse d'ion) et l'immobilisation de lipase meichi sur une résine échangeuse d'ion Indion 850 [3] ,indique que l'augmentation de concentration de protéine augmente le taux de protéine ce qui influe positivement sur l'activité jusqu'à au point critique ou la grande quantité de protéine fixée peuvent modifier la conformation de l'enzyme.

- La concentration du tampon (ou force ionique) optimale est fixé au niveau haut qui explique que le domaine de ce facteur n'a pas atteindre certain valeurs ou un phénomène de concurrence entre les ions de support et celle du tampon lors de l'immobilisation peut apparaitre.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'influence des conditions expérimentales d'immobilisation, sur le taux de conversion de la réaction d'acylation enzymatique du 1-phényléthanol par l'acétate de vinyle en présence de Lipase de *Candida rugosa* (CRL) immobilisée sur une résine anionique, l'Amberjet 4200ClTM, par la méthode des plans d'expériences.

Les deux premiers chapitres de ce mémoire ont été consacrés à une étude bibliographique sur les enzymes et leurs réactions et les différentes techniques d'immobilisation et à la présentation de la méthodologie des plans d'expérience.

Nous avons ainsi développé une étude quantitative (RSM) fondée sur la construction et l'analyse des surfaces de réponses et La modélisation et l'optimisation par cette méthodologie ont été effectuées à l'aide du logiciel MINITAB version 14.

Nous avons dans un premier temps mis en œuvre un plan permet d'établir un modèle d'ordre 2 de type Box-Behnken. Les trois facteurs choisies sont : le temps, le rapport : enzyme/support, et la concentration du tampon, qui sont des paramètres généralement décrit comme important par de nombreux auteurs, puis la conversion a été modélisée en fonction de ces trois facteurs.

Par conséquent, une amélioration du modèle obtenu a été réalisée en appliquant des approche statistiques connues, le nouveau modèle obtenue présente une amélioration statistique intéressante, D'après les analyses statistiques, le modèle obtenu est significatif, $P < 0,05$ et il présente une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées, $R^2=97,14\%$ et $R^2_{ajus}= 92,58\%$.

La recherche des conditions optimales, effectuée par l'analyse des diagrammes des surfaces de réponses et de contours, a permis de localiser la valeur optimale de la conversion, $C= 70,79\%$. Celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs :

- E/S = 117,97 mg de protéine par g de support

- Temps = 15 heures

- Concentration du tampon = 60 mmol/l

Conclusion générale

En conclusion, l'immobilisation des enzymes est un facteur important non seulement pour leur stabilité, mais également pour l'impact que peut avoir la nature du support sur une qualité primordiale des enzymes

En perspectives, nous envisageons de compléter ce travail en faisant l'appel à une validation expérimental des résultats théoriques obtenues.

CHAPITRE I

1. Roger A. S, Sander van P. «*Enzyme immobilisation in biocatalysis : why, what and how*». Journal The Royal Society of Chemistry. 2013, 42, 6223-6235.
2. Martin. H, Xenia .K . «*Immobilization of enzymes on porous silicas-benefits and challenges*». Journal The Royal Society of Chemistry, 2013, 42, 6277 -6289.
3. Zhou. Z ,Martin. H .«*Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications* ». journal The Royal Society of Chemistry. 2013, 42, 3894-3912.
4. Pierre, M .«*Applications Des Lipases En Synthèse Enantiosélective*» Thèse de Philosophiae Doctor (Ph.D.).Faculté des études supérieures de l'Université Laval (2010).
5. BATAICHE, I . «*Recherche de nouvelles potentialités de Yarrowia lipolytica, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques*».Thèse de Doctorat En Biotechnologies, Biologie et Environnement. Université Constantine 1 ,(2014).
6. LESZCZAK Jean Pierre. «*Synthèse d'esters de l'acide benzoïque par catalyse enzymatique en milieu hétérogène microaqueux*» . Thèse de Doctorat en Génie des Procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, (1998).
7. E. Brown J – F, Biellmann, *Techniques de l'Ingénieur. Traité Génie des procédés*. J 1240.
8. Robert J. Whitehurst, .Maarten van Oort: *Enzymes in Food Technology*. 2nd edition .willey Blackwell, (2010),388p.
9. BOUKERCHE, Toufik Taalibi. «*Synthèse de nouvelles molécules tensioactives non ioniques par voie enzymatique* » . Mémoire de magister en chimie (Option : chimie organique). Université d'Oran, Es-Sénia ,(2007).
10. KATI, Djamel .Edine. «*Cours de génie enzymatique : Sciences Alimentaires*». Université de Béjaia – FSNV, Master 1 Sciences alimentaires - Master 1 BAAN Assuré depuis le 2e semestre de l'année universitaire 2011/2012.
11. PUECH GUENOT, Sophie.« *Développement D'un Modèle Prédicatif De L'énantiosélectivité Des Lipases*». Microbiologie et Biocatalyse industrielle. INSA de Toulouse, France, (2007).
12. Robert A, Copeland.« *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* ». Wiley-VCH, Inc. second édition .New York.2000,412p.

13. BOUCHAGRA, Samah. « *Immobilisation de la lipase de Candida rugosa sur la résine Amberjet 4200Cl Optimisation de l'énantioselectivité par la méthode des surfaces de réponse* ». Mémoire de magister (Option : Chimie organique et Bioorganique). Université Badji Mokhtar-Annaba , (2010).
14. ELAGLI, Adil. « *Contribution à l'intensification de procédés appliqués à la protéolyse enzymatique Etude microcinétique en réacteur microfluidique et conception assistée par plasma froid d'un microréacteur à enzyme immobilisé* ». Thèse de Doctorat en ingénierie des fonctions biologiques .Université De Lille I, France, (2015).
15. CHAUVE, Marie. « *Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats celluloses* ». Thèse de Doctorat en Biotechnologie. Université de Grenoble, (2011).
16. MARANGONI, ALEJANDRO G. « *Enzyme Kinetics :A Modern Approach* ». Published by John Wiley & Sons, Inc , New Jersey ,(2003).
17. LE JOUBIOUX, Florian. « *Étude de l'acylation sélective de composés multifonctionnels par voie enzymatique : application à la synthèse de pseudo-céramides* ». Thèse de Doctorat en Biochimie. L'université de La Rochelle ,(2012).
18. Patrick Adlercreutz. « *Enzyme-catalysed Lipid Modification* ». Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 12:1,(1994), 231-254.
19. Piamtongkam ,Rungtiwa. « *Expression and evolution of lipases from Candida rugosa and Yarrowia lipolytica to modify their activities and specificities* ». Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biocatalyse Industrielles L'université de l'INSA de Toulouse , (2010).
20. Fickers, P, Destain ,J. Thonart ,P. « *Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications* ». Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12(2), (2008), 119-130.
21. KERVIEL, Vincent. « *Clonage et caractérisation de deux gènes codant des enzymes lipolytiques de la microalgue Isochrysis galbana* ». Thèse de Doctorat en Sciences du Vivant (Spécialité : Biologie des Organismes) .L'université du Maine-Laval, (2014).
22. CASAS GODOY, Leticia. « *Lipase-catalyzed purification and functionalization of Omega-3 polyunsaturated fatty acids and production of structured lipids* ». Thèse de Doctorat en l'ingénierie Microbienne et Enzymatique. L'université INSA de Toulouse, (2012).
23. Lancelot W.K., Luke M., John S.R. & Ignatious N. « *Characterisation of some underutilized vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents* ». Ind. Crops Prod., (2002), 16, 237-244.

24. Shelley D. Minter. «*Enzyme Stabilization and Immobilization, Methods and Protocols*». Humana Press, Springer Science.2011-229p.
25. Reymond.S, Janine.C, «*dédoublément cinétique dynamique par la méthode chimioenzymatique, 8^{ème} journées bibliographique*» EDCM, 08, **2008**, p 06.
26. Ulf Hanefeld,. Lucia Gardossi ,. Edmond Magner. «*Understanding enzyme immobilisation*». Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 453–468.
27. Alloue, W. A. M, Aguedo.M, Destain. J, Ghalfi. H, Blecker.C, Wathelet. J.P, Thonart.P. «*Les lipases immobilisées et leurs applications*». Biotechnol, Agon, Soc, Environ, 12 (1), 2008, 57-68.
28. Ghasemi Mahsa. «*Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma*». Thèse de Doctorat en Génie Des Procèdes et haute Technologie. Université Pierre Et Marie Curie (Paris VI), (2007).
29. HELLAL Djamila. «*Optimisation de la réactivité dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose*». Mémoire de magister (Option : Chimie Organique). Université Badji Mokhtar Annaba, (2011).
30. Vial, Stéphanie. «*Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques*». Thèse de Doctorat en Chimie, Sciences des Matériaux. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand, (2005).
31. HANEFELD, Ulf., GARDOSSI , Lucia., MAGNER, Edmond. «*Understanding enzyme immobilization* ». Chemical Society Reviews, (2009), 453–468.
32. Palomo, J. M.; Segura, R. L.; Mateo, C.; Terreni, M.; Guisana, J. M.; Fernandez Lafuente, R. Tetrahedron: Asymmetry. 2005, 16, 869–874.
33. Bai, S. Guo. Z, Liu. W, Sun. Y, Food Chemistry, 96, 2006, 1–7.
34. Marion B. Ansorge-Schumacher,. Oliver Thum .« *Immobilised lipases in the cosmetics industry*» .Chem. Soc. Rev., 2013, 42, 6475-6490.
35. Thierry Maugard,. Joana Tudella,. Marie Dominique Legoy .«*Study of Vitamin Ester Synthesis by Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic Media*». Biotechnol. Prog.(2000), 16, 358–362.

CHAPITRE II

1. GOUPY, Jacques .«*Les plans d'expériences*». revues Modulad, n°34, (2006).

2. LESZCZAK Jean Pierre. «*Synthèse d'esters de l'acide benzoïque par catalyse enzymatique en milieu hétérogène microaqueux*» . Thèse de Doctorat en Génie des Procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, (1998).
3. TINSSON, W. «*Plans d'expériences: constructions et analyses statistiques, Mathématiques et Applications*» . Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2010).
4. AZIZI, SAID. «*Influence de l'usure des outils de coupe sur les tolérances dimensionnelles*» .mémoire de magistère en mécanique, option: science des matériaux . université de Batna . 84p.
5. GOUPY Jacques .«*Introduction aux Plans d'expériences*» . Dunod. Paris. 303 p,(2001).
6. 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 en science technologie – santé, université de Limoges, (2004).
7. BOUCHAGRA ,Samah.« *Immobilisation de la lipase de Candida rugosa sur la résine Amberjet 4200Cl Optimisation de l'énantioselectivité par la méthode des surfaces de réponse*» . Mémoire de magister (Option : Chimie organique et Bioorganique). Université Badji Mokhtar-Annaba, (2010).
8. 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).
9. Kai-Tai Fang., Runze Li., Agus Sudjianto «*Design and Modeling for Computer Experiments, Computer Science and Data Analysis Series*», Chapman & Hall/CRC is an imprint of Taylor & Francis Group, (2006).
10. LAVIE, Thomas. «*Optimisation de la lubrification des paliers de tête de bielle : démarche méthodologique*». Thèse de Doctorat en Génie mécanique, productique et transports. Université De Poitiers UFR ,(2006).
11. GOUPY, J. «*Modélisation par les plans d'expériences*», Techniques de l'ingénieur, traité mesures et contrôle. R 275, 1-23.
12. CHLELA, Fadi. «*Développement d'une méthodologie de conception de bâtiments `a basse consommation d'énergie*». Thèse de Doctorat en Génie Civil. Université de La Rochelle, (2008).
13. GOUPY, Jacques. CREIGHTON, Lee .«*Introduction aux Plans d'expériences*». 3eme édition .Dunod. Paris. 336 pages. (2001).

14. George E. P. Box, Norman R. Draper , «*Response surfaces, mixtures, and ridge analyses*». -2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey,304p (2007) .
15. Ray-Bing Chen. ,Yu-Jen Tsai ,. Dennis K. J. Lin. «*Conditionally optimal small composite designs*». Statistics and Applications Volume 6, Nos.1 & 2, (2008) (New Series), p. 35-56.
16. Aliyu ,Salihu,. Muntari, Bala,. Shuaibu M, Bala. «*Application of Plackett-Burman Experimental Design for Lipase Production by Aspergillus niger Using Shea Butter Cake*» Hindawi Publishing Corporation ,ISRN Biotechnology ,Volume 2013, ID 718352,5 p
17. Norme : «*Statistique & Vocabulaire et symboles _ Partie 3:Plans d'expériences*» ; ISO/FDIS 3534-3:2012(E/F) .
18. PLARD, Jérôme . «*Apport de la chimiométrie et des plans d'expériences pour l'évaluation de la qualité de l'huile d'olive au cours de différents processus de vieillissement*» .Thèse de Doctorat en Chimie analytique et Chimiométrie .Université Aix Marseille,(2014).
19. M. Cavazzuti, «*Optimization Methods: From Theory to Design*» .Springer-Verlag Berlin Heidelberg ,(2013), DOI: 10.1007/978-3-642-31187-1_2.
20. HINKELMANN Klaus ,KEMPTHORNE, Oscar. «*Design and Analysis of Experiments, Advanced Experimental Design*», A John Wiley & Sons, Inc., United States of America.
21. S.N. Deming.,S.L. Morgan. «*Experimental Design: A Chemometric Approach* »(Second, revised and expanded edition) ELSEVIER Amsterdam - London - New York - Tokyo , 2nd rev,(1993).
22. B. J. WINER. «*Statistical Principles In Experimental Design*». McGRAW-HILL Book Company, New York San Francisco Toronto London,(1962) .
23. RABIER, François. «*Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire*». Thèse de Doctorat en Génie Mécanique. Ecole Doctorale Matériaux – Structure – Mécanique. (2007).
24. DAGNELIE, Pierre. «*De la régression simple et l'analyse de la variance aux modèles linéaires généralisés : synthèse et chronologie*». Faculté universitaire des Sciences agronomiques B-5030 Gembloux (Belgique) . Revue MODULAD, (2009).
25. GORE W.L. «*Statistical Methods for Chemical Experimentation*». Interscience Publishers, Inc.(1952). ISBN 52-11175.

26. DJENDOUBI MRAD, Nadia. «*Etude cinétique et optimisation multicritères du couplage déshydratation imprégnation par immersion : séchage convectif de la poire, la pomme et l'abricot* ». Thèse de Doctorat en Génie des Procédés Alimentaires. Agro Paris Tech. (2012).

CHAPITRE III

1. Piamtongkam ,Rungtiwa. « *Expression and evolution of lipases from Candida rugosa and Yarrowia lipolytica to modify their activities and specificities*».Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biocatalyse Industrielles L'université de l'INSA de Toulouse , 2010.
2. Ngakegni-Limbili, Adolphe Christian.« *Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des huiles essentielles et des lipides de réserve des fruits et graines saisonniers de la région Afrique Centrale* ». Thèse de Doctorat en Sciences des Agroressources. L'université INSA de Toulouse, 2012.
3. BOUCHAGRA, Samah.« *Immobilisation de la lipase de Candida rugosa sur la résine Amberjet 4200Cl Optimisation de l'énantioselectivité par la méthode des surfaces de réponse*» . Mémoire de magister (Option : Chimie organique et Bioorganique). Université Badji Mokhtar-Annaba , (2010).
4. Y. Collette .« *Planification d'expériences*» .06/02/2006)
5. (Bo. Chen, Elizabeth M. Miller, Lisa Miller, John J. MAIKNER , and Richard A.Gross, Langmuir, 2007,23, 1381-1387).

المخلص

أنزيم ليباز المبيضات (CRL) rugosa، هو أنزيم صناعي مهم يستخدم بنجاح في العديد من تفاعلات التحلل والأسترة يخصص هذا العمل لدراسة تأثير الشروط التجريبية للتثبيت على معدل التحويل لأنزيم مثبت بمبادل أنيوني (*résine* ، *anionique Amberjet* , 4200CLTM). لهذا الغرض هو أسيلة أنزيمية من راسيمي 1- فينيل إيثانول بأسيتات الفينيل، وذلك باستخدام طريقة تصميم التجارب.

ثلاث عوامل مهمة (النسبة أنزيم/ ركيزة، تركيز المبادل والوقت،) تم دراستها باستخدام منهجية استجابة السطح (RSM) للحصول على الشروط المثلى لأقصى قيمة لمعامل التحويل.

المعادلة من الدرجة الثانية الناتجة اظهرت تناسقا كبيرا بين القيم المحسوبة والتجريبية مما سمح لنا بتحديد الشروط المثلى لأقصى قيمة لمعامل التحويل

كلمات مفتاحية: ليباز المبيضات (CRL) rugosa، معدل التحويل، التثبيت، التحسين، منهجية استجابة السطح (RSM)

Résumé

Lipase de *Candida rugosa* (CRL) est une enzyme industrielle importante qui est utilisée avec succès dans une variété d'hydrolyse et des réactions d'estérification.

Ce travail est consacré à l'étude de l'effet des conditions expérimentales d'immobilisation d'une enzyme immobilisée à une résine anionique, l'Amberjet 4200ClTM sur le taux de conversion de la réaction d'acylation enzymatique du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle. En utilisant la méthode des plans d'expériences.

Trois facteurs importants (rapport enzyme/support, concentration du tampon et temps) ont été étudiés par la méthodologie des surfaces de réponses (RSM), afin de déterminer les conditions optimales pour une conversion maximale.

Model de second ordre estimée a donné des valeurs tout à fait cohérents avec ceux obtenus expérimentalement, après l'optimisation des résultats ont été identifiés des conditions expérimentales qui donnent une valeur optimale pour le taux de conversion.

Mots clés : Lipase *Candida rugosa* (CRL), Taux de Conversion, Immobilisation, Optimisation, Méthodologie des Surfaces de Réponse (RSM).

Abstract

Candida rugosa lipase (CRL) is an important industrial enzyme which is used successfully in a variety of hydrolysis and esterification reactions.

This work is devoted to the study of the effect of experimental immobilization conditions of an enzyme immobilized to an anionic resin, the Amberjet 4200 Cl M on the rate of conversion of the enzymatic acylation reaction of the racemic 1-phenylethanol by vinyl acetate using the method of design of experiments.

Three important factors (enzyme / substrate, buffer concentration and time) were investigated by the methodology of response surface (RSM) , to determine the optimum conditions for maximum conversion.

The model of second degree values obtained gave a completely consistent with those obtained experimentally, after optimization of the experimental results have been identified conditions that give optimum value for conversion coefficient.

Keywords: *Candida Rugosa* Lipase (CRL) , Conversion Rate , Immobilization, Optimization, Response Surface Methodology (RSM).