UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

2016-UYFM-LBMPT-0012

**Doctorat**

# T H ÈS E

*Pour obtenir le grade de docteur délivré par*

**L'Université Yahia Farès de Médéa**
**Spécialité : Génie des Procédés**

*Présentée et soutenue publiquement par*

**TANDJAOUI Nassima**

Le 18-05-2016

# Elimination des composés organiques volatils hydrophobes par couplage de l'absorption dans un solvant et la biocatalyse par des enzymes réticulées

***Directeur de thèse :*** **ABOUSEOUD Mahmoud**
**Co-directrice de thèse : COUVERT Annabelle**

**Jury**

| | | |
|---|---|---|
| M. KREA Mohamed | Professeur, Université Y.F Médéa | Président |
| M. ADOUR Lydia | Professeur, UMTO | Examinatrice |
| M. AZIZA Majda | Professeur, CDER | Examinatrice |
| M. AMRANE Abdeltif | Professeur, ENSCR | Invité |
| M. ABOUSEOUD Mahmoud | Professeur, Université Y.F Médéa | Directeur de Thèse |
| M. COUVERT Annabelle | Professeur, ENSCR | Co-directrice de Thèse |

Laboratoire de Biomatériaux
et Phénomènes de Transport

THÈSE

# *Remerciements*

Ce travail de thèse est le résultat de quatre ans de recherches dans le cadre d'un projet CMEP N° 12 MDU782, effectué en collaboration entre le laboratoire biomatériaux et phénomènes de transport (LBMPT) de l'université Yahia Farés de Médéa et le laboratoire chimie et ingénierie des procédés (CIP) de l'école nationale supérieure de chimie de Rennes ENSCR.

Je tiens tout d'abord à adresser mes vifs remerciements et ma sincère gratitude au professeur ***Mahmoud ABOUSEOUD*** chef de projet et directeur de thèse pour m'avoir offert l'occasion d'être un membre de ce projet, de m'avoir encadré durant ces quatre ans de thèse et pour m'avoir communiqué ses connaissances , pour sa disponibilité, son humanité et son soutien morale.

Je tiens aussi à exprimer mes profondes gratitudes au professeur ***Annabelle COUVERT***, chef de projet français pour m'avoir accueilli dans son équipe pendant trois ans de recherches. Pour sa contribution dans l'encadrement de ma thèse, pour sa disponibilité, sa gentillesse afin de mener à terme mon travail.

Je remercier particulièrement **Mr. *Abdeltif AMRANE,*** professeur à l'ENSCR et membre de l'équipe CIP, d'avoir contribué à diriger ce travail de recherche, qui m'a fait profiter de son expérience et de ses connaissances sur le sujet, et aussi pour sa disponibilité, sa sagesse et sa gentillesse.

Mes remerciements s'adressent également au **Mr. *Mohamed KREA***, professeur à l'université Yahia Farés de Médéa, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury. Je souhaiterais remercier **Mme. *Lydia ADOUR*** professeur à l'université de Tizi Ouzou et **Mme. *Majda AZIZA***, professeur au centre de développement des énergies renouvelables CDER, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner cette thèse.

Un grand merci pour Monsieur, *M. Nadjib BOUAZIZ* pour m'avoir intégré dans son équipe de recherches au laboratoire de LBMPT.

J’exprime ma sincère gratitude à tous les membres de l’équipe CIP qui étaient très sympathiques et accueillant. Je suis ravi d’avoir vécu cette expérience et c’est pour cette raison que je veux remercier sincèrement *Mr. Dominique walbert* , le directeur de laboratoire et *Mm. Marguerite Lemasle* , qui m’a aidé pour la maitrise des techniques analytiques et pour ses conseils précieux ainsi que à *Mm. Isabelle Soutrel*.

Mes remerciements vont aussi à *Mme Tassist Amina*, maitre de Conférences à l’université de Médéa pour ses encouragements et ses directives dans la partie enzymologie.

J’adresse mes remercîments à *Mr. Othmane Bakirturki* , ingénieur de laboratoire LBMPT, qui n’a pas cessé de m’aider pendant le déroulement des manipulations au LBMPT, pour sa disponibilité lors des problèmes techniques et son aide pour l’outil informatique.

Du fond de cœur, j’exprime mes remerciements à toutes mes amies que j’ai rencontré durant mes séjours en France, je précise : *Imane Bechohra , Imane Saidi, Sabra Hamidouche, Amel Ounnar , Fairouz, Aymen Asaadi, Arwa Aboudall , Lamia Khaniche, Thitom Dang, Cyrine Annabi , Melika Zeghdoudi et Houda Ayari.*

Un remerciement aussi à mes amis que j’ai rencontrés durant ces quatre ans :*Soumia Ferarsa, Mamadou Bachirou , Soumia Turkman, Mahdia Ali turki,*

Je voudrais remercier et dédier ce travail à mes très chers parents, pour leur soutien pendant les périodes difficile et leur sacrifices, à mes sœurs : *Nadia, Imane, Khalida et Amira* , ainsi qu’à mon Frère Nourddine et ma très chère cousine *Lamia* pour leur encouragement . Je le dédie aussi à nos petites princesses *Tasnime* et *Aya* et à mes nouveaux : *A.Alime* et *Monsif* .

Enfin, en quelques mots j’adresse un remerciement spécial à mon fiancé *Mr. Yacine.H*, pour son soutien moral, sa présence et sa compréhension.

## *Productions scientifiques*

**Publications dans des revues internationales avec comité de lecture**

Tandjaoui Nassima, Tassist Amina, Abouseoud Mahmoud, Couvert Annabelle, Amrane Abdeltif. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of Brassica rapa peroxidase. Biocatal. Agric. Biotechnol. 4, (2015) 208-213.

Nassima Tandjaoui , Mahmoud Abouseoud , Annabelle Couvert , Abdeltif Amrane , Amina Tassist. A new combined green method for 2-Chlorophenol removal using cross-linked Brassica rapa peroxidase in silicone oil. Chemosphere 148, (2016) 55-60.

Nassima Tandjaoui , Mahmoud Abouseoud , Annabelle Couvert , Abdeltif Amrane , Amina Tassist. A new application of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Brassica rapa* peroxidase - Phenol removal in silicone oil. Soumis au journal Process biochemistry.

**Communications orales internationales**

**Nassima Tandjaoui**, Abouseoud Mahmoud, Annabelle Couvert, Abdeltif Amrane. Treatment of Wastewater Containing 2-Chlorophenol Using Cross-linked Enzyme Aggregates of Brassica Rapa Peroxidase (BRP-CLEAs). 7 th International Conference on Environmental Science and Development-ICESD, 1-3 February, 2016, Rome, Italy. ***Prix de la meilleure présentation.***

**Publications dans acte de congrès avec comité de lecture**

Tandjaoui N , Abouseoud M, Tassist A, Couvert A, and Amrane A. Phenol Degradation By Crosslinked Enzymes Aggregates (CLEAS). 14th International Conference on Environmental Science and Technology Rhodes, Greece, 3-5 September 2015

# *Table des matières*

***Introduction générale et problématique*** ..... 1

***Chapitre I*** ..... 6

***Pollution atmosphérique par les COVs et méthodes de traitement*** ..... 6

**I.1. Composés organiques volatils (COVs)** ..... 7

**I.1.1.Définition et généralités** ..... 7

**I.1.2. Sources d'émission** ..... 8

**I.1.3.Impact sur l'homme et sur l'environnement** ..... 9

I.1.3.1. Impact sur l'environnement ..... 9

I.1.3.2. Impact sur l'homme ..... 10

**I.1.4. Législation concernant les émissions de COVs** ..... 12

**I.2. Différentes techniques de traitements de l'air chargé en COVs** ..... 13

**I.2.1.Techniques de récupération** ..... 13

I.2.1.1 Absorption ..... 14

I.2.1.2.Adsorption ..... 14

I.2.1.3.Condensation ..... 14

I.2.1.4.Séparation membranaire ..... 15

**I.2.2.Techniques de destruction** ..... 15

I.2.2.1. Oxydation ..... 15

I.2.2.1.1. L'oxydation thermique ..... 15

I.2.2.1.2.L'oxydation catalytique ..... 16

I.2.2.2. Traitement biologique ..... 16

I.2.2.2.1.Biofiltres ..... 16

I.2.2.2.2. Biolaveurs ..... 17

I.2.2.2.3.Traitement enzymatique ..... 17

**I.2.3.Couplage des procédés** ..... 20

I.2.3.1. Procédé couplant l'adsorption et l'ozonation ..... 20

I.2.3.2. Couplage de l'adsorption et la biodégradation ..... 20

I.2.3.3 Couplage de l'absorption à la biodégradation en TPPB (*two-phase partitioning bioreactor*) ..... 20

**I.3. Couplage de l'absorption à un traitement enzymatique en phase organique : une solution innovante alternative au TPPB ?** ..... 22

**I.3.1.Contexte** ..... 22

**I.3.2. Transfert gaz-liquide en système monophasique** ..... 23
I.3.2.1. Données d'équilibre ..... 23
**I.3.3.Choix du solvant d'absorption** ..... 25
I.3.3.1. Propriétés des huiles de silicone ..... 26
**Conclusion** ..... 27
**Référence bibliographiques** ..... 28
***Chapitre II*** ..... 33
***Enzymes, stabilité et techniques de stabilisation en milieu organique*** ..... 33
**II.1.Les enzymes** ..... 34
**II.1.1.Définition et généralités** ..... 34
**II.1.2. Classification et nomenclature** ..... 35
**II.1.3. La catalyse enzymatique** ..... 36
**II.1.4. Implémentation des enzymes dans l'industrie** ..... 38
**II.1.4.1. Exigences industrielles** ..... 39
**II.2. Notion d'activité et de stabilité enzymatique en milieu organique** ..... 41
**II.2.1. Génie de milieu (medium engineering)** ..... 41
**II.2.2. Génie de la biocatalyse** ..... 43
II.2.2.1. Mutagenèse dirigée ..... 43
II.2.2.2.Lyophilisation ..... 44
II.2.2.3. Immobilisation ..... 44
II.2.2.3.1. L'inclusion ..... 46
II.2.2.3.2. L'encapsulation ..... 46
II.2.2.3.3. La fixation sur un support ..... 46
II.2.2.3.4. La réticulation (Cross-linking) ..... 47
**II.3. Peroxydases** ..... 49
**II.3.1. Généralités** ..... 49
**II.3.2.Applications biotechnologiques envirennementales des peroxydases** ..... 52
II.3.2.1. Biorestauration des composés phénoliques ..... 52
II.3.2.2. Elimination des colorants synthétiques ..... 54
II.3.2.3. L'hydroxylation des composés aromatiques ..... 54
**Conclusion et objectif de thèse** ..... 55
**Référence bibliographiques** ..... 57
***Chapitre III*** ..... 62
***Matériel et Méthodes*** ..... 62
**III.1. Enzymes, substrats et réactifs** ..... 64
**III.1. 1. Peroxydase** ..... 64

**III.1.2. Composé organiques volatiles modèles (substrats)** ..... 64
III.1.2.1. Toluène ..... 65
III.1.2.2. Phénol ..... 66
III.1.2.3. 2-Chlorophénol ..... 66
**III.1.3. Réactifs et produits chimiques** ..... 67
**III.1.4. L'huile de silicone** ..... 67
**III.2. Préparation et caractérisation des agrégats des enzymes réticulés (CLEAs)** ..... 68
**III.2.1. Extraction de la peroxydase** ..... 68
**III.2.2. Dosage de l'activité enzymatique** ..... 68
**III.2.3. Dosage des protéines** ..... 70
III.2.3.1. Protocole de dosage des protéines ..... 71
**III.2.4. Réticulation** ..... 72
**III.2.5. Caractérisation des CLEAs** ..... 75
III.2.5.1. Effet du pH ..... 75
III.2.5.2. Effet de la température ..... 75
III.2.5.3. Effet des solvants organiques ..... 75
III.2.5.4. Microscopie électronique à Balayage (MEB) ..... 76
III.2.5.5. Stabilité en fonction du temps ..... 76
**III.3. Détermination des coefficients de partage** ..... 76
**III.4. Etude expérimentale de la dégradation des trois COVs par la peroxydase immobilisée de *Brassica rapa* (BRP-CLEAs) en système monophasique** ..... 79
**III.4.1. Dégradation du phénol et du 2-CP en phase aqueuse et organique** ..... 79
III.4.1.1. Recyclage des BRP-CLEAs ..... 81
III.4.1.2. Analyse du phénol et du 2-CP en phase aqueuse ..... 82
III.4.1.3. Méthode d'analyse du phénol dans le PDMS 47V20 ..... 82
III.4.1.4. Méthode d'analyse de 2-CP dans le PDMS 47V20 ..... 82
**III.4.2. Dégradation du toluène en phase aqueuse et organique** ..... 83
**Conclusion de chapitre** ..... 85
**Référence bibliographiques** ..... 86
***Chapitre IV*** ..... 88
***Caractérisation des agrégats de la Peroxydase de* Brassica rapa *réticulée (BRP-CLEAS)*** 88
**IV. 1. Optimisation de la préparation des BRP-CLEAs** ..... 90
**IV.1.1. Effet du solvant de précipitation** ..... 90
**IV.1.2. Effet de la concentration de peroxydase** ..... 91
**IV.1.3. Effet de la concentration de glutaraldéhyde** ..... 92
**IV.2. Caractérisation des BRP-CLEAs** ..... 94

**IV.2.1. Effet du pH sur les BRP-CLEAs et l'enzyme libre** ..... 94

**IV.2.2. Stabilité thermique des BRP-CLEAs et de l'enzyme libre** ..... 94

**IV.2.3. Stabilité dans le temps des BRP-CLEAs** ..... 96

**IV.2.4. Etude morphologique des BRP-CLEAs** ..... 96

**IV.2.5.Tolérance des BRP-CLEAs aux solvants organiques** ..... 98

**Conclusion** ..... 101

**Références bibliographiques** ..... 102

***Chapitre V*** ..... 104

***Traitement du phénol et du 2-chlorophénol par procédé combinant absorption et transformation enzymatique par BRP-CLEAs.*** ..... 104

**V.1. Détermination des coefficients de partage** ..... 106

**V.2. Dégradation du phénol par les BRP-CLEAs dans l'huile de silicone (PDMS 47V20) et dans la phase aqueuse** ..... 108

**V.2.1. Cinétique de dégradation** ..... 108

**V.2.2. Détermination des constantes cinétiques** ..... 111

**V.2.3. Effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène** ..... 112

**V.2.4. Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs** ..... 114

**V.2.5. Cinétique de dégradation du phénol dans le PDMS 47V20 dans les conditions optimales** ..... 116

**V.3.Etude de la dégradation du 2-Chlorophénol** ..... 117

**V.3.1. Cinétique de dégradation** ..... 118

**V.3.2. Détermination des paramètres cinétiques** ..... 121

**V.3.3. Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène** ..... 124

**V.3.4. Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs** ..... 125

**V.3.5. Cinétiques de dégradation dans les conditions optimales** ..... 127

**V.3.6. Recyclage des BRP-CLEAs pour la dégradation du 2-CP** ..... 128

**Conclusion** ..... 130

**Référence bibliographies** ..... 131

***Chapitre VI*** ..... 133

***Etude de la biodégradation du toluène par les BRP-CLEAs en phases aqueuse et organique*** ..... 133

**VI.1. Etude de la dégradation du toluène par les BRP-CLEAs en phase aqueuse** ..... 135

**VI.1.1. Cinétique de dégradation** ..... 135

**VI.1.2. Effet du pH** ..... 136

**VI.1.3.Effet de la concentration initiale de toluène** ..... 137

**VI.1.4. Effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène** ..... 138

**VI.1.5.Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs** ..... 139

**VI.2. Etude de la dégradation de toluène par les BRP-CLEAs dans l'huile de silicone (PDMS 47V20)** ..... 141

**VI.2.1. Effet du temps de contact** ..... 141

**VI.2.2. Détermination des constantes cinétiques $K_m$ et $V_{max}$** ..... 142

**VI.2.3. Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène** ..... 145

**VI.2.4. Effet de l'activité initiale des CLEAs** ..... 146

**VI.2.5.Régénération de PDMS 47V20** ..... 147

**Conclusion** ..... 148

**Références bibliographiques** ..... 150

***Conclusion générale et perspectives*** ..... 151

**Conclusion** ..... 152

**Perspectives** ..... 156

***Annexes*** ..... 157

**Annexe 1. Choix de la peroxydase de *Brassica rapa*** ..... 158

**Annexe 2. Calcul du coefficient d'extinction molaire pour convertir la densité optique de tetraguaiacol en concentration** ..... 159

**Annexe 3. Courbes d'étalonnage** ..... 160

**Annexe 4. Détermination des coefficients de partage** ..... 163

**Annexe 5. Spectre de masse GC/MS de la solution résiduelle après la bio-oxydation du toluène par les BRP-CLEAs en phase aqueuse** ..... 165

**Annexe 6. Aspect des BRP-CLEAs après leur lyophilisation** ..... 168

# *Liste des figures*

**Figure 1. 1.** Schéma de transformation de NO en $NO_2$ et formation de l'ozone $O_3$ (A) Système à l'état naturel en absence de COV (cycle de Chapman), (B) système en présence de COV (Atkinson, 2000) ..... 9
**Figure 1. 2.** Différentes voies d'exposition de l'homme aux COVs (Huang et al., 2014) ..... 11
**Figure 1. 3.** Méthodes conventionnelles de traitement des COVs ..... 13
**Figure 1. 4.** Schéma du procédé de couplage absorption- biodégradation en TPPB. . 21
**Figure 1. 5.** Schéma de procédé de couplage d l'absorption-biodégradation enzymatique en phase organique ..... 23
**Figure 1. 6.** Isotherme de partage d'un composé entre une phase gaz et une phase liquide (Darracq, 2011) ..... 24
**Figure 1. 7.** Formule générale des huiles de silicone ..... 26

**Figure 2. 1.** Le substrat particulier dans le site actif de l'enzyme ..... 34
**Figure 2. 2.** Mécanisme de catalyse, Ea et Ea′ sont les énergies de l'activation de la réaction non catalysée et catalysée, ΔG : la variation d'énergie libre de système (Illanes, 2008). ..... 36
**Figure 2. 3.** Représentation graphique de l'équation de Michaelis & Menten ..... 38
**Figure 2. 4**. Étapes de désactivation d'une enzyme en milieu organique : (1) déshydratation de protéine, (décollement de la couche d'eau des enzymes pas les solvants polaires) ; (2) (rattachement du solvant à la protéine déshydratée), (3) (transition conformationnelle dans la molécule de protéine pour donner une forme dénaturée (Iyer and Ananthanarayan, 2008). ..... 43
**Figure 2. 5.** Effet de la lyophilisation sur le site actif de l'enzyme ..... 44
**Figure 2. 6.** Les stratégies d'immobilisation des enzymes ..... 45
**Figure 2. 7.** Préparation des cristaux des enzymes réticulées (CLECs), et des agrégats d' enzymes réticulées (CLEAs) (Brady and Jordaan, 2009). ..... 48
**Figure 2. 8.** La précipitation et l'agrégation d'une enzyme pour former les CLEAs . 48
**Figure 2. 9.** Ferriprotoporphyrine IX ou hème b. (A, B, C, D) représentent les quatre noyaux pyrroles (Delannoy et al., 2004). ..... 50
**Figure 2. 10.** Structure tridimensionnelle moléculaire de l'hème principale de la peroxydase de raifort HRP (horseradish peroxidase en anglais) obtenue par cristallographie aux rayons X (Torres and Ayala, 2010). ..... 51
**Figure 2. 11.** Cycle catalytique de la peroxydase : AH le substrat, A• le radical libre (van de Velde et al., 2001) ..... 52
**Figure 2. 12**. Mécanisme de la transformation de toluène par la peroxydase(Kinne et al., 2010) ..... 55
**Figure 3. 1.** Les navets de Brassica Rapa ..... 64
**Figure 3. 2.** Réaction de condensation du guaiacol catalysée par la peroxydase (Singh et al., 2012) ..... 69

**Figure 3. 3.** Courbe d'étalonnage basée sur le BSA pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.....71
**Figure 3. 4.** Structure du glutaraldéhyde.....72
**Figure 3. 5.** Etapes de la préparation des CLEAs. .....74
**Figure 3. 6.** Carrousel pour mesurer les coefficients de partage.....76
**Figure 3. 7.** Exemple d'étalonnage du toluène dans la phase gaz.....77
**Figure 3. 8.** Vials utilisés pour l'étude de dégradation des COVs en système monophasique fermé.....80
**Figure 4. 1.** Effet du solvant de précipitation sur l'activité résiduelle et le taux d'agrégation (Conditions : Solvant : enzyme (v/v) 3:1, 2% de GA, 87.06 UI.mg$^{-1}$ de peroxydase, à 4°C, 3 h de réaction). .....90
**Figure 4. 2.** Effet de la concentration de peroxydase sur l'activité résiduelle et le taux d'agrégation. (Conditions : Acétone : enzyme (v/v) 3:1, 2% de GA, à 4°C, 3 h de réaction). .....91
**Figure 4. 3.** Effet de la concentration de glutaraldéhyde sur l'activité résiduelle et sur le taux d'agrégation (Conditions : Acétone : enzyme (v/v) 3:1, 74.88 UI.mg$^{-1}$ de peroxydase à 4°C, 3 h de réaction). .....93
**Figure 4. 4.** Effet de pH sur l'activité des BRP-CLEAS et de la peroxydase libre ....94
**Figure 4. 5.** Effet de la température sur l'activité des BRP-CLEAS et de la peroxydase libre .....95
**Figure 4. 6.** Stabilité de la peroxydase libre et des CLEAs en fonction du temps dans une solution tampon (pH=7, 50mM) à 4°C .....96
**Figure 4. 7.** Analyse morphologique des BRP-CLEAs par Microscopie électronique à balayage à différentes résolutions, (A) ×3500, (B) ×5000.....97
**Figure 4. 8.** Effet des solvants organiques sur l'activité des BRP-CLEAs. .....99
**Figure 4. 9.** Analyse des BRP-CLEAs par microscopie électronique à balayage à une résolution de ×1000, (A) CLEAs frais, (B) CLEAs lavées à l'acétone. .....100

**Figure 5. 1.** Concentration de toluène dans la phase gaz en fonction de sa concentration dans la phase liquide (PDMS 47V20 et 47V5).....106
**Figure 5. 2.** Cinétique de dégradation de phénol dans la phase aqueuse (Composition : 5mL de tampon phosphate (pH=7,10mM), 5µL de $H_2O_2$ (1M), 5mg CLEAs (0.82UI.mL$^{-1}$)), à 25°C.....109
**Figure 5. 3.** Cinétique de dégradation de phénol dans le PDMS 47V20. (Composition : 5mL de PDMS 47V20, 5µL de $H_2O_2$ (1M) ,5mg CLEAs (0.82UI.mL$^{-1}$)), à 25°C.....109
**Figure 5. 4.** Linéarisation de Lineweaver–Burk pour la détermination des constantes cinétiques, (A) en phase aqueuse, (B) en phase organique.....111
**Figure 5. 5.** Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène sur la dégradation de phénol, (A) dans la phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20.(Composition : 5mL de tampon phosphate (pH=7,10mM) ou de PDMS 47V20, 90mg.L$^{-1}$ de phénol dans la phase aqueuse et 60 mg.L$^{-1}$ dans le PDMS 47V20,5×4µL de $H_2O_2$ ,5mg des CLEAs (0.82UI.mL$^{-1}$)), à 25°C.....113

**Figure 5. 6.** Effet de l'activité des BRP-CLEAS sur la dégradation de phénol, (A) dans la phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20. (Composition : 5 mL de PDMS 47 V20 ou de tampon phosphaté (pH=7,10mM) 90mg.$L^{-1}$ de phénol dans la phase aqueuse et 60 mg.$L^{-1}$ dans la PDMS 47 V20, 5×4µL de $H_2O_2$ (2mM) dans la phase aqueuse et (3mM) dans la PDMS 47 V20), à25°C. ..... 115
**Figure 5. 7.** Cinétique de dégradation du phénol dans le PDMS 47V20 dans les conditions optimales ..... 117
**Figure 5. 8.** Cinétique de dégradation de 2-CP dans la phase aqueuse (Composition : 5 mL de tampon phosphate (pH=7,10 mM), 5 µL de $H_2O_2$ (1M), 5 mg CLEAs (0.76 UI.$mL^{-1}$), à 25°C. ..... 118
**Figure 5. 9.** Cinétique de dégradation de 2-CP dans le PDMS 47V20 (Composition : 5 mL de PDMS 47V20, 5×2 µL de $H_2O_2$ (2M) à t=0, t=10 min, 0.76 UI.$mL^{-1}$des CLEAs, à 25°C). ..... 118
**Figure 5 .10.** MEB des CLEAs avant et après leur utilisation pour dégrader le 2-CP dans le PDMS 47V20 ..... 120
**Figure 5. 11.** Mécanisme de polymérisation des phénols par la peroxydase (Regil and Sandoval, 2013) ..... 121
**Figure 5. 12.** Représentation graphique pour la détermination des constantes cinétiques du modèle d'Andrews pour le cas de la dégradation du 2-CP dans le PDMS 47V20 ..... 122
**Figure 5. 13.** Linéarisation de Lineweaver–Burk, pour la détermination des constantes cinétiques de la dégradation du 2-CP en phase aqueuse (A), et en phase huileuse (B). ..... 122
**Figure 5. 14.** Effet de la concentration initiale de $H_2O_2$ sur la vitesse initiale et sur le rendement de dégradation de 2-CP, (A) en phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20. (Composition : 5 mL de PDMS 47V20 ou de tampon phosphaté, 140 mg.$L^{-1}$ de 2-CP dans le tampon phosphaté et 80 mg.$L^{-1}$ dans le PDMS 47V20, 0.76 UI $mL^{-1}$ de BRP-CLEAs) à 25°C. ..... 124
**Figure 5. 15.** Effet de l'activité des CLEAs sur la vitesse initiale et le rendement de dégradation de 2-CP, (A) en phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20. (Composition : 5ml de PDMS 47 V20 ou de tampon phosphaté, (140mg.$L^{-1}$, 3mM) et (80 mg $L^{-1}$, 6 mM) de 2-CP et $H_2O_2$ dans le tampon phosphaté et le PDMS 47V20 respectivement) à 25°C. ..... 126
**Figure 5. 16.** Effet du temps de contact sur la concentration de 2-CP et le rendement de dégradation dans les conditions optimales (Composition : 5ml de PDMS 47V20, (80 mg $L^{-1}$, 6 mM) de 2-CP et $H_2O_2$ respectivement, 2.66 UI $mL^{-1}$ de BRP-CLEAs) à 25°C. ..... 128
**Figure 5. 17.** Essais en batch successifs pour l'élimination de 2-CP par les BRP-CLEAs dans les deux phases ..... 129
**Figure 5. 18.** Analyse de la surface des CLEAs par SEM après leur recyclage avec une résolution de (×1000) ..... 129
**Figure 6. 1.** Cinétique de dégradation du toluène par les BRP-CLEAs dans une phase aqueuse (Conditions : 10 mL de tampon phosphaté (10 mM, pH=7 ) , 25×5 µl $H_2O_2$ (50 mM) , 3.5 UI.$mL^{-1}$,25°C, 300 trm). ..... 135

**Figure 6. 2.** Effet du pH sur la dégradation de toluène par les BRP-CLEAs dans une phase aqueuse (Conditions : 10 mL de tampon phosphaté (10 mM, pH=7), 32 mg.$L^{-1}$ de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$ (50 mM), 3.5 UI.$ml^{-1}$, 25°C, 300 trm).....136
**Figure 6. 3.** Effet de la concentration initiale de toluène sur le rendement et la vitesse de dégradation en phase aqueuse (Conditions : 10 ml de tampon phosphaté (10 mM, pH=7), 25×5µL de $H_2O_2$ (50 mM), 3.5 UI.$ml^{-1}$ ,25°C , 300 trm).....138
**Figure 6. 4.** Effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène sur le rendement et la vitesse de dégradation du toluène en phase aqueuse (Conditions : 10 ml de tampon phosphaté (10mM, pH=7), 118 mg.$L^{-1}$ de toluène, .25×5µL de $H_2O_2$, 3.5 UI.$ml^{-1}$ ,25°C, 300 trm).....139
**Figure 6. 5.** Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs sur le rendement et la vitesse de dégradation du toluène en phase aqueuse (Conditions : 10 ml de tampon phosphaté (10mM, pH=7), 118 mg.$L^{-1}$ de toluène, .25×5µL de $H_2O_2$ (62mM), ,25°C, 300 trm). .....140
**Figure 6. 6.** Systèmes préparés pour la dégradation du toluène.....141
**Figure 6. 7.** Effet du temps de contact sur la dégradation du toluène dans l'huile de silicone (Condition : 10 ml de PDMS 47V20, 43 mg.$L^{-1}$ de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$ (50mM), 4UI.$ml^{-1}$ de BRP-CLEAs,25°C, 600 trm). .....142
**Figure 6. 8.** Effet de la concentration initiale de toluène sur le rendement et la vitesse de dégradation dans l'huile de silicone (Conditions : 10 ml de PDMS 47V20, 25×5µL de $H_2O_2$ (50mM), 4UI.$ml^{-1}$ de BRP-CLEAs, 25°C, 600 trm). .....143
**Figure 6. 9.** Lineweaver–Burk linéarisation pour la détermination des constantes cinétiques, (A) en phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20.....144
**Figure 6. 10.** Effet de la concentration initiale de Peroxyde d'hydrogène sur le rendement et la vitesse de dégradation dans l'huile de silicone (Conditions : 10 ml de PDMS 47V20, 260mg.$L^{-1}$de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$, 4UI.$ml^{-1}$ de BRP-CLEAs, 25°C, 600 trm). .....145
**Figure 6. 11.** Mise en évidence de l'activité catalytique des CLEAs après l'opération de dégradation du toluène (coloration rouge brique indiquant la formation de tetraguaiacol).....146
**Figure 6. 12.** Effet de la concentration des CLEAs sur le rendement et la vitesse de réaction de dégradation dans l'huile de silicone (Condition : 10 ml de PDMS 47V20, 260mg.$L^{-1}$de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$ (0.112M), 25°C, 600 trm).....147
**Figure 6. 13.** Aspect de l'huile de silicone 47V20 après son lavage .....148

# *Liste des tableaux*

**Tableau 1. 1.** Toxicité des composés organiques volatils.....11
**Tableau 1. 2.** Réactions d'oxydations de quelques COVs par les oxydoréductases...19
**Tableau 2. 1.** Classification des enzymes selon l'EC de IUBMB (IUBMB and Webb, 1992). .....35
**Tableau 3. 1.** Propriétés physico-chimiques des COVs sélectionnés pour l'étude (Agteren et al., 1998; Wan-Ying Shiu et al., 1994) .....65
**Tableau 3.2**. Propriétés physico-chimiques de l'huile de silicone.....67
**Tableau 3.3.** Composition de réactif de Bradford.....71
**Tableau 3.4.** Conditions d'analyse chromatographiques par CPG pour la détermination du coefficient de partage liquide /gaz du 2-CP et du toluène .....78
**Tableau 3. 5.** Conditions chromatographiques d'analyse de 2-CP dans l'huile de silicone 47V20 .....83
**Tableau 3. 6.** Conditions d'analyse chromatographiques par CPG FID du toluène dans l'huile de silicone 47V20.....84
**Tableau 4. 1.** Caractéristiques de la solution enzymatique initiale.....92
**Tableau 4. 2.** Caractéristiques des solvants utilisés dans le test de stabilité (Meurant, 1991; Sarker et al., 2005).....98
**Tableau 5. 1. V**aleurs des Coefficients de partage du toluène et du 2-CP dans l'eau et dans deux huiles de silicone (PDMS) .....107
**Tableau 5. 2.** Constantes cinétiques des BRP-CLEAs mesurées dans les deux phases. .....112
**Tableau 5. 3.** Constantes cinétiques des modèles de Michaelis-Menten et d'Andrews pour la dégradation du 2-CP par BRP-CLEAs en phase aqueuse et dans le PDMS 47V20 .....123
**Tableau.6. 1.** Constantes cinétiques des BRP-CLEAs mesurées dans les deux phases pour la bio-oxydation du toluène par les BRP-CLEAs.....144

# Nomenclature et abréviation

4-AAP : 4-aminoantipyrine

ADEME : Agence de l'environnement et de la maîtrise d'énergie

A.E : Activité enzymatique ($UI.ml^{-1}$ ou $UI.mg^{-1}$)

$AH^{\bullet}$ : Radicale libre

ATP : Adénosine triphosphate

ATSDR : Agency for toxic Substances and Disease Registry

BRP : Brasica rapa peroxidase

BRP-CLEAs : Agrégats de la peroxydase de Brasica rapa réticulée

BSA : sérum d'albumine bovine

BTEX : Benzène , Toluène , Ethylbenzène , xylene

C : Concentration ($mg.L^{-1}$)

CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'études de la Pollution Atmosphérique

CLEs : Enzymes réticulées dissoutes

CLEAs : Agrégats des enzymes réticulées (cross-linked enzyme aggregates )

CLECs : Cristaux des enzymes réticulées

Co I : La forme transitoire oxydée de la peroxydase

Co II : deuxième forme transitoire oxydée de la peroxydase

COVs : Composés organiques volatiles

2-CP : Le 2-Chlorophenol

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

CPO : Chloroperoxydase

DIF : Détecteur à ionisation de flamme

DO : densité optique

E : Enzyme

EC : Commission des Enzymes

ECE : Economic commission for Europe (United Nations)

EEA: European Environment Agency

ES : complexe, enzyme-Substrat.

ε : Coefficient d'extinction molaire ($ml^{-1}.\mu mol$)

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FCCC : Framework convention on Climate change (United Nations)

ΔG: le changement de l'énergie libre de système

GA : Glutaraldéhyde

H : Constante de Henry adimensionnelle.

H′ : Coefficient de Henry en ($atm.m^3.mol^{-1}$)

H″ : Constante de Henry (en atm ou Pa)

$H_2O_2$ : Peroxyde d'hydrogène

HRP : Horseradish peroxidase.

HV5 : Huile de silicone a une viscosité de 5 $mm^2/s$ à 25°C

HV20 : Huile de silicone a une viscosité de 20 $mm^2/s$ à 25°C

INERIS : Institut National de Recherche sur la Santé

IUBMB : Union Internationale de Biochimie et de biologie moléculaire

$KH_2PO_4$ : phosphate de potassium monobasique

$K_m$ : Constante de Michaelis-Menten ($mg.L^{-1}$)

$K_s$ : Constante de dissociation de complexe inactif enzyme-substrat ($min^{-1}$).

Log P : logarithme de coefficient de partage d'un solvant dans un mélange octanol/eau

MEB : Microscopie électronique à Balayage

n : nombre de mole (mole)

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NAPL : Non-Aqueous Phase Liquid

NO : oxyde d'azote

$NO_2$ : Dioxyde d'azote

P : Produit de la réaction.

$P_A^*$ : Pression partielle (en atm ou Pa)

PDMS : polydiméthylsiloxanes (Les huiles de silicones)

R : Constante universel des gaz parfaits (8.3145 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)

R : Rendement de la dégradation (%)

$R^2$ : Coefficient de corrélation

Rpm : Revolution per minute ( tours par minute ) $tr.min^{-1}$

S : Substrat

SOx : Oxydes de soufre

T : Température.

Δt : Durée de la réaction (min).

TPPB : two-phase partitioning bioreactor

USEPA : Agence Américaine de Protection de l'Environnement

V : Volume.

$V_0$: Vitesse initiale de la réaction enzymatique ($mg.L^{-1}.min^{-1}$)

$V_{max}$ : vitesse maximale de la réaction enzymatique ($mg.L^{-1}.min^{-1}$)

$x_A$ : Fraction molaire du composé A

**Indices et exposants**

eq : Equilibre

f : finale

g : en phase gaz

i : initiale

l ; en phase liquide

tot : totale

$^{*}$ : Saturation

**Résumé**

Ce travail a pour objectif l'étude de la faisabilité d'un nouveau procédé hybride pour le traitement des composés organiques volatils (COVs). Il s'agit de combinaison de l'absorption des COVs dans une phase organique en vue de réduire leur concentration et de leur biodégradation enzymatique au sein de cette même phase organique, par des peroxydases immobilisées.

La peroxydase extraite de navet de *Brassica rapa* a été immobilisée sous forme d'agrégats d'enzymes (cross-linked enzymes (CLEAs)). Les BRP-CLEAs produits retiennent 42% de l'activité de l'enzyme brute. Ils sont caractérisés par une stabilité opérationnelle pour de larges gammes de température et de pH, ainsi que par une très bonne stabilité permettant leur stockage jusqu'à 3 mois. Dans les milieux non-aqueux, ces derniers ont montré une bonne tolérance aux solvants organiques hydrophobes tels que les huiles de silicone.

L'étape de l'absorption des COVs a été effectuée dans l'huile de silicone PDMS 47V20. La capacité de l'absorption de ce solvant vis-à-vis de deux COVs (toluène, 2-chlorophénol) a été évaluée en estimant le coefficient de partage (PDMS /gaz) qui a été trouvé très inférieur à sa valeur dans l'eau.

Sur le plan pratique, les BRP-CLEAs ont montré une bonne capacité pour la biodégradation du phénol, du 2-CP et du toluène après leur absorption dans le PDMS 47V20. Les rendements trouvés ont été de :

- 71% pour le phénol à une concentration de 60 $mg.L^{-1}$ pour un temps de contact de 60 minutes ;
- 70% pour le 2-CP à une concentration initiale 80 $mg.L^{-1}$ et 100 minutes de temps de contact ;
- 51% pour le toluène à une concentration initiale de 260 $mg.L^{-1}$ et 4 heures de temps de contact.

**Mots clés :** Peroxydase, BRP-CLEAs, COVs , absorption, PDMS 47V20 , dégradation.

**Abstract**

This work aims to study the feasibility of a new combined process for the treatment of volatile organic compounds (VOCs). It is a combination of the absorption of VOCs in an organic phase in order to reduce their concentration followed by their enzymatic biodegradation within the same organic phase using immobilized peroxidases.

Peroxidase extracted from turnip *Brassica rapa* was immobilized as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). BRP-CLEAs produced retain 42% of the crude peroxidase activity. They are characterized by an operational stability against a broad range of temperature and pH as well as a very good storage stability up to 3 months. In the non-aqueous medium, they showed a good tolerance to hydrophobic organic solvents such as silicone oils.

The absorption step of VOCs was carried out in the silicone oil PDMS 47V20; the capacity of absorption of this solvent toward both VOCs (toluene, 2-Chlorophenol) was evaluated by estimating the partition coefficient (PDMAS/ gas), which was found much lower than its value in water.

On the practical level, BRP-CLEAs showed a good capacity for the biodegradation of phenol, 2-CP and toluene after their absorption in the PDMS 47V20. The yields achieved were:

- 71 % for phenol at a concentration of 60 $mg.L^{-1}$ for a contact time of 60 minutes;
- 70 % for the 2-CP at an initial concentration of 80 $mg.L^{-1}$ and for 100 minutes of contact time.
- 51 % for toluene at an initial concentration of 260 $mg.L^{-1}$ and a duration of 4 hours.

**Key words:** Peroxidase, BRP-CLEAs, VOCs, absorption, PDMS 47V20, degradation.

**الملخص**

يهدف هذا العمل إلى دراسة طريقة مشتركة جديدة لعلاج المركبات العضوية الطيارة, تتمثل في امتصاص المركبات العضوية الطيارة في مذيب عضوي من أجل الحد من تركيزها يليه التحلل الإنزيمي لهاته المركبات في نفس المذيب العضوي باستخدام انزيم البيروكسيداز المثبت.

تم تثبيت البيروكسيداز المستخرج من اللفت *براسيكا رابا* على شكل كتلات الانزيم (CLEAs). يتمتع BRP-CLEAs المنتج ب 42٪ من نشاط البيروكسيداز الخام .ويتميز بالاستقرار الوظيفي في مجال واسع من درجة الحرارة ودرجة الحموضة وكذلك بالاستقرار اثناء التخزين لمدة تصل إلى 3 أشهر .في الوسط غير المائي، أظهروا تأقلم جيد مع المذيبات العضوية مثل زيوت السيليكون.

تمت مرحلة امتصاص المركبات العضوية الطيارة في زيت السيليكون PDMS 47V20 .وقد تم تقييم قدرة امتصاص هذا المذيب اتجاه كل من المركبات العضوية الطيارة (التولوين، 2-الكلوروفينول) من خلال تقدير معامل التوزيع (غاز/ PDMS) ، الذي عثر عليه أقل بكثير من قيمته في الماء.

على المستوى العملي، أظهر BRP-CLEAs قدرة جيدة لتحليل كل من الفينول،2-الكلوروفينول والتولوين بعد امتصاصهم في PDMS 47V20 وكان المردود المحصل كالاتي:

- 71٪ من تحلل الفينول بتركيز اولي يقدر ب 60 مغ/ل في مدة تصل الى 60 دقيقة.
- 70 ٪ من تحلل 2-الكلوروفينول بتركيز اولي يقدر ب 80 مغ/ل في 100 دقيقة من وقت التفاعل.
- 51٪ للتولوين بتركيز أولي يقدر ب 260 مغ/ل وفي مدة 4 ساعات.

**الكلمات المفتاحية**: البيروكسيداز، BRP-CLEAs، المركبات العضوية الطيارة، الامتصاص، PDMS 47V20, التحلل

# *Introduction générale et problématique*

Le bouleversement du secteur industriel ces dernières années s'est concrétisé par l'apparition de plusieurs phénomènes présentant un danger planétaire au niveau environnemental. Ces phénomènes touchent l'eau, l'atmosphère et le sol. A titre d'exemple, l'appauvrissement de la couche d'ozone, l'effet de serre ou encore la pollution photochimique sont des faits observables ces dernières décennies. A l'origine de ces trois phénomènes, on trouve le dégagement de polluants, tels que les oxydes d'azote (NOx), les oxydes de soufre (SOx) et les Composés Organiques Volatils (COVs) dans l'atmosphère. Les COVs sont définis comme des molécules organiques qui se trouvent à l'état de gaz ou de vapeur dans les conditions normales de température et de pression issues principalement de la réaction de combustion des carburants ou de l'utilisation de solvants organiques. Les COVs sont répertoriés comme des substances à haut risque environnemental et sanitaire du fait de leur volatilité, de leur grande diversité dans l'air et de la complexité de leur structure moléculaire.

La gestion et le contrôle des émissions de composés organiques volatils font partie des préoccupations importantes à cause des règlements et des textes législatifs mondiaux établis par plusieurs organisations, qui sont devenus plus en plus stricts en matière de qualité de l'air. Afin de réduire ces émissions, plusieurs techniques ont été mises en place, par exemple en gérant la pollution à la source, en substituant à des COVs nocifs des composés alternatifs moins nocifs. Néanmoins, pour des raisons technico-économiques, cette approche n'est pas toujours envisageable. La deuxième solution consiste alors à traiter ces émissions. Une large gamme de procédés existe à ce jour pour y parvenir. A ce stade, le choix d'un procédé efficace selon la nature du COV à éliminer présente le facteur clé garantissant son élimination radicale.

Le développement de procédés basés sur la récupération des COVs dans une matière absorbante ou adsorbante suivi de leur dégradation par l'intégration d'une autre technique destructive semble être une solution rationnelle. Dans cette optique, la technique basée sur l'absorption des COVs dans un liquide absorbant (huile de silicone) suivie de leur biodégradation par voie biologique en utilisant des boues activées issue d'une station d'épuration, dans un réacteur biphasique (TPPB: two-phase partitioning bioreactor), a été mise à l'épreuve. Cette technique a pu montrer à l'échelle du laboratoire une efficacité remarquable dans l'élimination de certains COVs hydrophobes. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ce genre de procédé est la récupération du solvant organique, qui est une opération extrêmement difficile à cause

de la production de tensio-actifs lors de l'étape de biodégradation. De plus, la lenteur du procédé de biodégradation peut provoquer des pertes de la phase absorbante, ce qui peut affecter négativement le coût du procédé.

L'utilisation d'enzymes au lieu de microorganismes contenus dans des boues activées semble être une alternative intéressante, et répondant totalement aux exigences environnementales et de développement durable. Ce procédé met en jeux des enzymes sous une forme libre ou immobilisée, les enzymes étant des entités montrant une activité catalytique à l'égard des substances xénobiotiques. Les enzymes jouant le rôle de « biocatalyseurs » ont déjà montré leur efficacité dans l'élimination de molécules difficilement dégradables. Parmi les nombreuses enzymes disponibles, les peroxydases sont potentiellement utilisables pour éliminer une large variété de polluants en utilisant simplement le peroxyde d'hydrogène comme co-substrat.

La réaction enzymatique a lieu classiquement en phase aqueuse sous des conditions modérées de température et de pH. Cependant, depuis quelques années, grâce aux nouvelles techniques enzymatiques, les enzymes sont converties en biocatalyseurs industriels qui peuvent exercer une activité catalytique dans des milieux organiques, voire même hydrophobes. Sur le plan pratique, cette substitution de milieu est d'un grand intérêt biotechnologique vu que plusieurs processus enzymatiques qui sont presque impossibles à réaliser dans l'eau, deviennent faisables dans des solvants non-aqueux. D'un point de vue pratique, cette technologie ne peut être réalisée qu'après avoir « conditionné » l'enzyme sous une certaine forme (immobilisée) afin de réduire sa solubilité et augmenter sa stabilité. Une des solutions envisagées dans cette optique est la stabilisation par immobilisation sous forme d'agrégats d'enzymes réticulées (Cross-linked enzymes aggregates, CLEAs).

L'objectif de ce travail de thèse est donc de mettre en œuvre une absorption suivie d'une biodégradation enzymatique par des agrégats (CLEAs) de peroxydase pour traiter certains COVs. Les inconvénients liés à la séparation de la phase aqueuse de la phase absorbante vont être ainsi écartés en adoptant une technique d'immobilisation sous forme de CLEAs qui va donner aux biocatalyseurs une stabilité qui leur permet d'être actifs dans cette phase absorbante hydrophobe. L'absorption et la dégradation vont donc se produire au sein d'une seule phase, ce qui réduira le temps de traitement et les contraintes liées au transfert de matière comme celles rencontrées dans les TPPB. Dans ce contexte, le travail est organisé comme décrit ci-après.

Dans une première partie, nous exposons une synthèse bibliographique composée de deux chapitres. Dans le premier, nous détaillerons les phénomènes de pollution atmosphérique par les COVs. Les différentes sources d'émissions, leur impact sur l'homme et sur l'environnement, ainsi que les différentes techniques de traitement existantes seront présentés. Ce chapitre fait également le point sur le procédé alternatif de traitement des COVs par absorption dans l'huile de silicone, suivie de leur biodégradation par les boues activées en réacteur biphasiques (TPPB). Les avantages et les points faibles de ce système seront décrits. Enfin, la lumière sera faite sur le principe de la méthode alternative mettant en jeu l'absorption et la biodégradation enzymatique dans un système monophasique. Le solvant choisi est également décrit dans cette partie.

Le deuxième chapitre est concentré sur la biocatalyse en milieu organique. Il débute par des généralités sur les enzymes. Par la suite, nous reprenons en détail la catalyse en milieu organique, l'ensemble des approches qui permettent leur stabilisation dans ces milieux, ainsi que la technique d'immobilisation sous forme de CLEAs. A la fin, une partie sera consacrée à la présentation de la peroxydase, enzyme clé dans la dégradation de plusieurs composés organiques.

Le troisième chapitre décrit les outils et les moyens utilisés lors de la réalisation expérimentale de ce travail de thèse. Il décrit premièrement la méthode d'immobilisation de la peroxydase extraite de *Brassica rapa* sous forme de CLEAs, puis il intègre les protocoles expérimentaux et les techniques analytiques utilisées pour évaluer les performances de la nouvelle méthode de traitement.

Les résultats et la discussion sont découpés en trois chapitres comme suit :

Dans le quatrième chapitre sont présentés en détails les résultats de l'optimisation de la préparation des BRP-CLEAs ainsi que leur caractérisation physico-chimique.

Le cinquième chapitre est tout d'abord consacré à la quantification de l'absorption du toluène et du 2-Chlorophénol dans l'huile de silicone. Par la suite, une étude paramétrique détaillée sur la dégradation de phénol et du 2-Chlorophénol par les BRP-CLEAs dans l'huile de silicone est présentée.

Dans le dernier chapitre, l'étude est orientée vers la dégradation du toluène dans l'huile de silicone par le biocatalyseur, premièrement en phase aqueuse pour vérifier la faisabilité et deuxièmement, dans l'huile de silicone.

Enfin, une synthèse des résultats expérimentaux obtenus incluant des perspectives de l'étude seront présentées dans une conclusion globale.

# *Chapitre I*

# *Pollution atmosphérique par les COVs et méthodes de traitement*

## I.1. Composés organiques volatils (COVs)

Les COVs figurent parmi les principales espèces chimiques, avec les oxydes d'azote (NOx), les oxydes de soufre (SOx), le dioxyde de carbone ($CO_2$) et l'ozone ($O_3$), impliquées dans la pollution atmosphérique. Les COVs forment une famille de substances chimiques très riche du point de vue structure et propriétés. Pour guider une politique de prévention de leurs effets sanitaires, il est important de les considérer à la fois de façon globale, en raison de leur rôle dans la pollution chimique, tant dans l'environnement extérieur que dans l'environnement intérieur.

### I.1.1.Définition et généralités

Un composé organique volatil (COV) peut être défini comme n'importe quel composé organique, à l'exclusion du méthane, c'est-à-dire comme une substance contenant du carbone et de l'hydrogène, ce dernier étant parfois substitué par un atome de chlore (Cl), de fluor (F), de soufre (S) ou de phosphore (P). Ce composé se trouvant à l'état de gaz ou de vapeur dans des conditions normales de pression et de température est caractérisé par une pression de vapeur saturante supérieure ou égale à 10 Pa à 20°C et 101.3KPa (Le Cloirec, 1998; Koppmann, 2008).

L'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (US EPA) définit les COVs comme tous les composés chimiques organiques possédant une température d'ébullition inférieure ou égale à 250°C mesurée sous les conditions standards de pression (101.3KPa) ,capables de produire des oxydants photochimiques par réaction avec des oxydes d'azote sous l'effet du rayonnement solaire, à l'exception de ceux désignés par l'EPA comme ayant un effet négligeable (US EPA , 2012).

A l'inverse des polluants traditionnels de l'air (CO, $SO_x$, $NO_x$), les composés organiques volatils contiennent un mélange de plusieurs substances organiques. Du point de vue de leurs structures chimiques , les COV peuvent être regroupés en deux catégories (Manéro and Monneyron, 2012; Vigneron et al., 1994) :

- COV non-halogénés : alcènes (éthylène, propylène), aromatiques (benzène, toluène, xylène), alcools (méthanol, éthanol), aldéhydes (formaldehyde), cétones (acétone), esters.

- COV halogénés : hydrocarbures halogénés (dichlorométhane, trichloroéthylène), autres composés organiques halogénés (chlorure de vinyl, polychlorobiphényles).

### I.1.2. Sources d'émission

Les sources des émissions des COVs non méthaniques peuvent être divisées en quatre catégories principales (Theloke and Friedrich, 2007) :

- Transport (Automobiles, avions,…..)
- Processus de production industrielle
- Stockage et usage des solvants
- Processus de combustion.

L'émission de COVs par le parc automobile fait partie de l'ensemble des COVs émis par un pays. Ces émissions sont considérées comme le contribuant principal aux COVs ambiants dans les zones urbaines. En revanche, l'intensité d'émission est en corrélation avec la densité de la population et sa composition varie selon le type de véhicules utilisés, à diesel ou à essence (Liu et al., 2008; Theloke and Friedrich, 2007).

Les processus de production industrielle sont la deuxième source la plus fréquente des émissions des COV dans les grands pays industriels (Bari et al., 2015; EEA, 2013). Ces émissions proviennent essentiellement des industries pétrochimiques et des industries de production des COVs ; elles représentent 21% des émissions totales des COVs au Canada (Bari et al., 2015), 36 % des émissions totales en France (CITEPA, 2014) et 28 % en Chine (Wei et al., 2008). Une autre source potentielle de COVs non-méthaniques est due à l'utilisation domestique ou industrielle des solvants, des dégraissants et des conservateurs. L'intensité de cette dernière source peut atteindre des valeurs très importantes. En Allemagne, par exemple, ce type d'émissions a dépassé 20 % de la totalité des COVs émis durant l'année 2007 (Niedojadlo et al., 2007).

Une autre fraction naturelle des COVs présents dans l'atmosphère est due aux fumées de combustion de la biomasse, qui produit de grandes quantités d'hydrocarbures et d'oxydes d'azote lors de feux de forêts ou de savane (Huang et al., 2014; Theloke and Friedrich, 2007).

### I.1.3.Impact sur l'homme et sur l'environnement

La grande majorité des composés organiques volatils sont des composés odorants et nuisibles pour l'homme et pour l'environnement, même s'ils sont présents à de très faibles concentrations (ppm ou sub-ppm).

I.1.3.1. Impact sur l'environnement

- **Formation de l'ozone :** Dans les années 50, Haagen Smit (Haagen-Smit, 1952) a prouvé que l'oxydation des espèces organiques en présence de $NO_x$ et des rayons du soleil peut avoir comme conséquence la formation de l'ozone. L'ozone, composé très actif, toxique pour les êtres vivants et nuisible au système écologique, est devenu un problème majeur et un critère d'évaluation de la qualité de l'air dans les villes (Koppmann, 2008; Sillman, 1999).

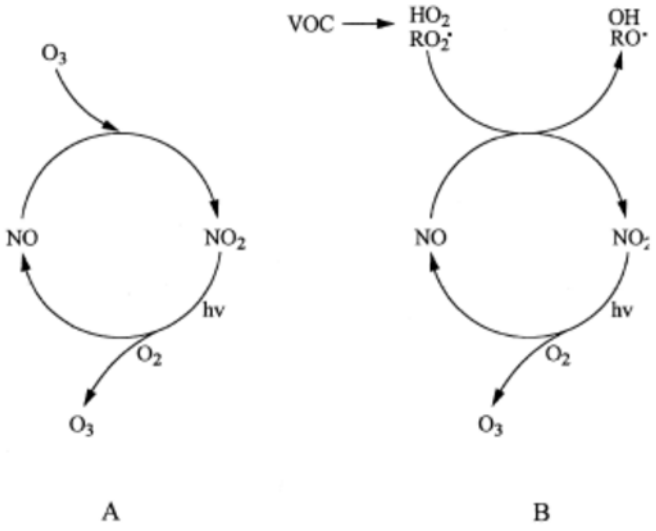



***Figure 1. 1.*** *Schéma de transformation de NO en $NO_2$ et formation de l'ozone $O_3$ (A) Système à l'état naturel en absence de COV (cycle de Chapman), (B) système en présence de COV (Atkinson, 2000)*

Comme décrit sur la Figure 1.1, les émissions d'oxydes d'azote (NO, $NO_2$) et de composés organiques volatils (COVs), contribuent à une série de transformations photochimiques compliquées, conduisant à la perturbation du cycle de Chapman. La réaction de dégradation des COVs donne lieu à la formation des intermédiaires $RO_2^{\bullet}$ et des radicaux de $HO_2^{\bullet}$. Ces radicaux réagissent sur le monoxyde d'azote (NO) pour donner lieu au dioxyde d'azote ($NO_2$) qui se photolyse pour former l'ozone ($O_3$) sous l'action des rayonnements solaires (hν). Ce processus de perturbation du cycle de Chapman, engendre ainsi une accumulation d'ozone au sein de la basse atmosphère,

également appelée troposphère (Atkinson, 2000 ; Le Cloirec, 1998 ; Sillman, 1999). Dans le domaine de la production agricole, par exemple, l'ozone engendre des dommages sur les végétaux en perturbant l'activité photosynthétique des plantes, diminuant ainsi leur croissance. Par conséquent, les rendements des cultures se trouvent amoindris (Dalstein et al., 2005).

- **COV et Effet de serre :**

  Les rayons du soleil réchauffent la surface de la Terre. Deux tiers de ces rayons sont absorbés par la planète. La réverbération permet d'évacuer le tiers restant vers l'espace. Toutefois, le tiers réverbéré se trouve en partie piégé par une couche de gaz située dans la troposphère qui renvoie la chaleur vers la Terre et contribue à la réchauffer davantage. Ce phénomène naturel est communément appelé « effet de serre ».

  Cet effet de serre résulte de l'absorption de chaleur par la vapeur d'eau et par les nuages. Certains COVs participent au réchauffement climatique de manière directe en absorbant le rayonnement infrarouge des sols. (Ex : trichloréthane, méthyl-chloroforme, tétrachlorure de carbone) ou d'une manière indirecte par la production de l'ozone qui est connu comme un gaz à effet de serre (le troisième gaz à effet de serre après $CO_2$ et $CH_4$) (CITEPA, 2015). Une molécule d'ozone est environ 2 000 fois plus absorbante vis-à-vis des infrarouges rayonnés par les sols qu'une molécule de dioxyde de carbone. Le doublement de la concentration d'ozone dans la troposphère pourrait accroître la température moyenne de l'atmosphère d'environ 1°C (Soltys, 1998).

### I.1.3.2. Impact sur l'homme

Principalement, l'exposition de l'homme aux COVs peut se faire sous trois formes (Figure 1.2) selon la source: l'absorption dermique, l'ingestion ou plus souvent l'inhalation. Plus Particulièrement, l'inhalation d'air chargé en COVs est considérée comme la voie la plus fréquente (Huang et al., 2014).

Le contact de l'homme avec les COVs a lieu suite à l'exposition directe ou indirecte, accidentelle ou systématique, aux rejets d'effluents industriels et urbains, fuites de réservoirs souterrains de stockage, les déversements durant le transport, l'utilisation de pesticides, d'insecticides et d'aérosols.

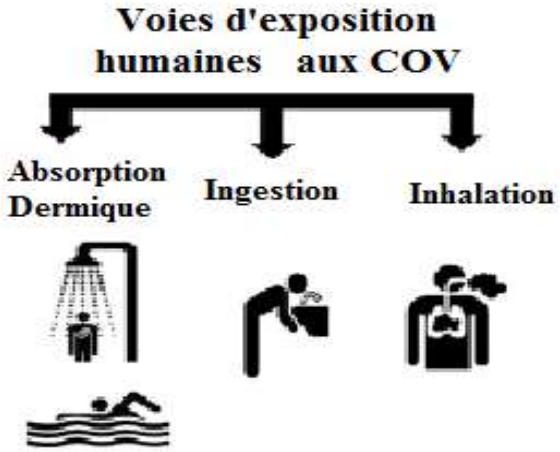



***Figure 1. 2.*** *Différentes voies d'exposition de l'homme aux COVs* (Huang et al., 2014)

L'effet de certains COVs sur la santé humaine a fait l'objet de nombreuses études. Différents troubles liés aux COVs ont été identifiés. Les fréquences et délais d'apparition de ces troubles varient en fonction de la durée d'exposition, du type de polluant, de la sensibilité du sujet et à de nombreux facteurs plus ou moins identifiés. On distingue deux types de toxicité (tableau 1.1) (ADEME, 2013 ; López et al., 2008):

***Tableau 1. 1.*** *Toxicité des composés organiques volatils*

| *Toxicité aigue* | |
|---|---|
| **Irritation des yeux** | hydrocarbures aromatiques non substitués comme les BTEX (Benzène, Toulène, Xylène) |
| **Irritations cutanées** | hydrocarbures halogénés ou aromatiques |
| **Irritation des voies respiratoires** | Acétaldéhyde, Hexane, |
| **Troubles cardiaques** | toluène, chloroforme, méthylchloroforme |
| **Troubles du système nerveux** | hydrocarbures aromatiques et halogénés, dichlorométhane, chloroforme, toluène, benzène, 1, 1, 1,-trichloroéthane |
| *Toxicité chronique* | |
| **Action cancérogène et mutagène** | Le benzène, fortement associé à des cas de leucémie, hydrocarbures insaturés (alcènes, oléfines...) qui peuvent être transformés en composés toxiques |

### I.1.4. Législation concernant les émissions de COVs

Les craintes des scientifiques concernant les risques dus aux émissions croissantes de COVs ont donné naissance à des textes législatifs établis par les grandes associations internationales et régionales. La législation sur l'environnement a vu le jour suite à la convention de Genève de 1979, qui reste à l'origine des actions internationales effectuées contre la pollution atmosphérique. Effectivement, un certain nombre de protocoles et directives ont été mis en place au niveau européen et international, afin de limiter les risques de pollution.

- **Protocole de Kyoto du 11 décembre 1997.** Cet accord international, bâti sur la Convention-Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques, met en place des objectifs légalement contraignants et des délais pour réduire les émissions de gaz à effet de serre des pays industrialisés**,** qui l'ont accepté en vue de réduire leurs émissions globales d'au moins 5% par rapport aux niveaux de 1990 dans la période d'engagements 2008 à 2012 (FCCC, 2014).

- **Protocole de Göteborg 1999.** Le protocole de Göteborg établit les émissions de COVs globales permises dans les pays de l'union européenne en 2010. Ce protocole visait la diminution des émissions de dioxyde de soufre ($SO_2$), d'oxydes d'azote ($NO_x$) et d'ammoniac ($NH_3$), responsables de l'acidification et de l'eutrophisation, et les émissions de composés organiques volatils (ECE , 2015).

- **Directive communautaire n° 1999/13/CE (directive des solvants).** Elle est relative à la réduction des émissions de COVs dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations (99/13/CE). Elle fixe des valeurs limites à l'émission pour les activités et les installations concernées (AIDA-INERIS, 2015).

- **Directive 2001/81/CE de Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2001.** Il fixe les plafonds d'émission nationaux pour certains polluants atmosphériques pour le $SO_2$, les NOx, les COV et le $NH_3$. Les États membres doivent respecter ces plafonds à partir de 2010 et doivent élaborer avant le 1$^{er}$

octobre 2002 des programmes de réduction progressive des émissions. Son application implique la mise en place d'une série de mesures par rapport aux sources fixes, pour lesquelles les responsabilités régionales et fédérales sont clairement définies (AIDA-INERIS, 2015).

## I.2. Différentes techniques de traitements de l'air chargé en COVs

Avant de mettre en œuvre une technique pour traiter les effluents gazeux chargés en COVs, le meilleur moyen est la prévention contre ces émissions (traitement à la source). La prévention peut être établie tout en agissant sur la source par la modification de l'équipement et les conditions opératoires du processus ou par la substitution de la matière première entrant dans le procédé ou bien par le choix de procédés de production plus « propres » (Khan and Ghoshal, 2000).

Lorsque ces émissions sont présentes, deux familles de techniques d'abattement sont disponibles, à savoir, les techniques de récupération et les techniques de destruction (Figure 1.3) (Le Cloirec, 1998; Ion et al., 2015).

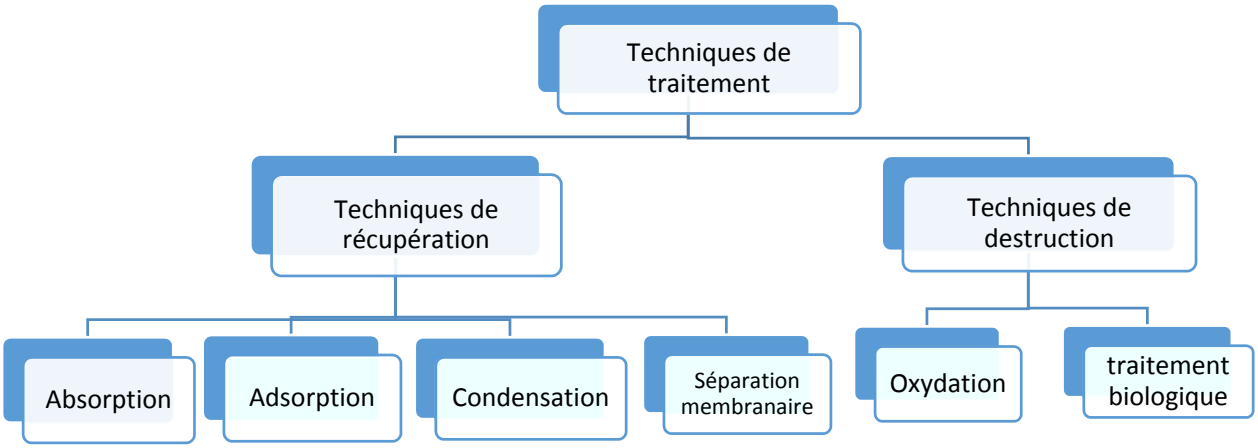



***Figure 1. 3.*** *Méthodes conventionnelles de traitement des COVs*

### I.2.1.Techniques de récupération

Ces techniques sont basées sur le transfert de COV de la phase gazeuse vers une phase liquide ou solide. Le produit récupéré est destiné à être recyclé ou revendu. Cette

technique met en œuvre quelques procédés classiques tels que l'absorption, l'adsorption, la condensation et la séparation membranaire.

### I.2.1.1 Absorption

L'absorption, souvent appelée lavage de gaz est utilisée pour éliminer un composé présent dans la phase gaz par contact entre l'air pollué et un solvant liquide. Les COVs solubles sont transférés vers la phase liquide et l'effluent gazeux est ainsi « lavé ». Ce procédé de traitement est mis en œuvre dans des contacteurs gaz-liquide dimensionnés de façon à optimiser la surface de contact entre l'air pollué et le solvant, et ainsi faciliter le transfert de matière. Les types de contacteurs souvent utilisés sont les colonnes à garnissage, contacteurs à film et les colonnes à plateaux (Khan and Ghoshal, 2000).
L'opération d'absorption peut être physique lorsque le transfert est basé sur la seule solubilité du COV dans le solvant liquide, ou bien chimique lorsque le COV réagit avec l'un des constituants contenus dans la phase liquide (Roustan, 2003).

### I.2.1.2.Adsorption

L'adsorption est un phénomène physique de fixation des molécules de COV sur la surface et sur les pores d'un adsorbant par des faibles forces d'attraction de Van der Waals. Ce phénomène est limité par la saturation et généralement connu comme phénomène exothermique et réversible répondant ainsi à un équilibre thermodynamique (Ion et al., 2015; Khan and Ghoshal, 2000).

Lorsqu'il s'agit de traitement d'air chargé en COVs, deux adsorbants sont couramment utilisés: le charbon actif, et les zéolithes. L'adsorption sur charbon actif représente 25 à 30 % des procédés mis en place pour l'élimination des COVs des émissions gazeuses. Le charbon actif est caractérisé par sa grande surface spécifique (800 à 2 000 $m^2/g$) et sa porosité (Le Cloirec, 1998). En revanche, l'application de cette technique présente quelques inconvénients tels que le contrôle de l'humidité ainsi que des difficultés de régénération du charbon actif et une faible efficacité pour des concentrations très faibles en COVs (Zhao et al., 1998).

### I.2.1.3.Condensation

Le traitement par condensation représente environ 5 % des procédés de traitement des COVs mis en place, en vue de leur réutilisation ou de leur destruction (Le Cloirec, 1998). Cette technique repose sur l'équilibre thermodynamique entre les deux phases

(liquide et gaz). Elle se produit par abaissement de la température jusqu'à ce que la pression partielle du COV dans l'air devienne supérieure à sa pression de saturation. La condensation est terminée au point triple du COV. Une fois la température a baissée au-dessous de la température du point triple, le COV se transforme directement en cristaux solides.

La condensation est plus efficace pour les COVs ayant des températures d'ébullition supérieures à 100°F (37.7°C) et à des concentrations relativement élevées, de l'ordre de 5000 ppm. Les COVs ayant de faibles températures d'ébullition nécessitent un refroidissement excessif ou une pressurisation, ce qui augmente le coût de l'opération (Khan and Ghoshal, 2000).

#### I.2.1.4.Séparation membranaire

Cette technique initialement utilisée dans les années 1960 pour le dessalement de l'eau de mer a vu accroitre ses applications dans divers secteurs industriels, notamment pour le traitement de l'air chargé en COVs. La séparation est basée sur le passage de l'air pollué à travers une membrane semi-perméable comme barrière sélective. Généralement, le débit traité par le procédé membranaire est très faible (inférieur à 100 $Nm^3/h$) (Le Cloirec, 1998; Khan and Ghoshal, 2000).

### I.2.2.Techniques de destruction

La destruction des COVs repose sur des procédés d'oxydation (catalytiques, thermique) ou biologiques, afin de détruire la molécule ou de la transformer en molécule peu nuisible.

#### I.2.2.1. Oxydation

L'oxydation figure parmi les techniques les plus utilisées pour le traitement des effluents gazeux chargés en COVs.

##### I.2.2.1.1. L'oxydation thermique

Aussi appelée « incinération des fumées», elle représente 60% des méthodes de traitement actuellement utilisées. Son principe est simple. Elle consiste à réaliser la combustion du COV pour le transformer en $CO_2$ et en eau. Le rendement de destruction des COVs est supérieur à 99% et la concentration tolérée en COVs varie entre 100 et 2000 ppm. Pour que l'oxydation soit complète, un apport d'énergie est nécessaire.

Cependant, lorsque le COV est halogéné, l'oxydation thermique devient très difficile et des conditions spécifiques sont nécessaires pour éviter la formation de polluants secondaires (Donley and Lewandowski, 2000).

I.2.2.1.2.L'oxydation catalytique

L'utilisation de cette technique permet de travailler à une température plus basse, variant entre 200 et 500°C. L'oxydation est garantie grâce à la présence d'un catalyseur qui réduit l'énergie d'activation nécessaire pour la réaction. Les catalyseurs les plus couramment utilisés sont des métaux précieux (platine, palladium) ou des oxydes métallique de cuivre, nickel (Liotta, 2010).

De grands systèmes catalytiques ont été installés mais ils ne sont pas aussi populaires que les systèmes d'oxydation thermique, principalement à cause des prix très élevés de remplacement des catalyseurs et aussi à cause des produits secondaires qui peuvent être produits (Khan and Ghoshal, 2000).

I.2.2.2. Traitement biologique

Les procédés de traitement biologiques sont maintenant appliqués avec succès pour le traitement du sol et des eaux souillées par les composés organiques synthétiques. Ces dernières années, ces procédés ont bouleversé le domaine du traitement de l'air et ont montré leur efficacité devant les autres techniques de traitement pour détruire les molécules volatiles les plus persistantes dans des conditions opératoires simples à mettre en œuvre et plus banales pour l'environnement. Dans ce type de destruction, le COV doit être transféré vers une phase liquide avant traitement (Groenestijn and Hesselink, 1993; Ikemoto et al., 2006).

Deux catégories de procédés biologiques peuvent être répertoriés : le traitement microbiologique (biofiltres, biolaveurs) et plus récemment le traitement enzymatique.

I.2.2.2.1.Biofiltres

La biofiltration est la méthode biotechnologique la plus ancienne reconnue pour le traitement de l'air pollué. Le principe de cette technique repose sur l'efficacité des microorganismes (généralement des bactéries) à convertir, en général en condition aérobie, les polluants organiques en eau et en dioxyde de carbone. Dans un biofiltre, l'air à traiter passe à travers un lit fixe sur lequel sont fixés (immobilisés) des microorganismes. Le procédé nécessite généralement une phase préalable

d'humidification afin de saturer l'air en eau (Burgess et al., 2001; Groenestijn and Hesselink, 1993).

I.2.2.2.2. Biolaveurs

Le biolavage consiste en une absorption des COVs en phase liquide dans des colonnes d'absorption gaz-liquide. L'opération est suivie par leur dégradation microbiologique dans des bioréacteurs en phase liquide aqueuse. Après traitement, l'effluent de la phase liquide est recyclé vers la colonne d'absorption. L'efficacité de la technique est limitée par les dimensions des contacteurs et par la solubilité limitée des COVs (généralement hydrophobes) dans l'eau (Burgess et al., 2001).

Pour les deux procédés ci-dessus, certains facteurs peuvent être limitants pour la biodégradation (Doble, 2006) :

- la température et le pH qui doivent être contrôlés et maintenus aux valeurs optimales de développement des microorganismes.
- la quantité d'oxygène et la concentration des nutriments dans le biofilm ou dans le bioréacteur.

Enfin, le mécanisme de transformation ou de minéralisation des COVs par les microorganismes peut prendre un temps relativement long. Les bactéries doivent s'acclimater à ce type de substrats, qui ne sont pas nécessairement présents dans leur environnement naturel. Le mécanisme de biodégradation est plutôt complexe et souvent la nature inhibitrice de la majorité des hydrocarbures volatils peut limiter le rendement de biodégradation (Huang et al., 2014)

I.2.2.2.3.Traitement enzymatique

Le procédé enzymatique figure actuellement parmi les procédés biotechnologiques les plus compétitifs par rapport aux autres procédés de traitement d'effluents industriels (Duran and Esposito, 2000). C'est un procédé simple mettant en jeu une seule réaction impliquant un ou plusieurs substrats catalysée par une substance de nature protéique, appelée enzyme, obtenue à partir d'une source microbienne, végétale ou animale.

Pour les effluents aqueux, l'efficacité technico-économique des enzymes a été relatée par plusieurs chercheurs (Karam and Nicell, 1997; Torres and Ayala, 2010; Xu, 2005).

Comparés aux techniques destructives, les procédés enzymatiques présentent plusieurs avantages (Hamid and Khalil-ur-Rehman, 2009) :

- les enzymes sont très sélectives vis-à-vis de leurs substrats et présentent un pouvoir catalytique important même lorsqu'elles sont présentes à de faibles doses.
- elles sont moins susceptibles d'être inhibées par les substances qui peuvent être toxiques pour les cultures microbiologiques.
- le coût global d'un bioprocédé enzymatique est nettement inférieur à celui des autres technologies, vu que la réaction enzymatique est menée au sein d'un milieu peu complexe et sous des conditions de température et de pH modérées.
- les enzymes fonctionnent dans une large gamme de concentration de substrats (polluants) et la durée de réaction est très courte.

L'efficacité d'oxydation ou de polymérisation de certains COVs, notamment les BTEX, par des enzymes appartenant à la famille des oxydoréductases et principalement les peroxydases a été démontrée par certains chercheurs (Tableau 1.2). En revanche, les conditions des réactions de transformation des COVs ainsi que la mise au point des installations à base de ces biocatalyseurs n'ont pas été suffisamment étudiées.

***Tableau 1. 2.*** *Réactions d'oxydations de quelques COVs par les oxydoréductases.*

| Substrat | Enzyme | Produits | Références |
|---|---|---|---|
| Toluène<br><br>o-Xylène | Coprinus peroxydase | Benzaldéhyde<br>Acide Benzoïque<br><br>o-Tolualdehyde<br>o-Acide toluique | (Russ et al., 2002) |
| Toluène<br>crésols<br>benzène<br>styrène<br>naphtalène | Toluène monooxygenase | p-Crésol<br>p-hydroxy<br>-aromatics | (Lippard, 2005) |
| Phénols | Peroxydase de radis noire (HRP) | Radicaux phénoliques<br>Benzoquinone | (Alemzadeh and Nejati, 2009; Bayramoğlu and Arıca, 2008; Bódalo et al., 2008) |
| Benzène | Agrocybe aegerita Peroxygenase (AaP) | Hydroquinone<br>*p*-benzoquinone, Catéchol<br>*o*-benzoquinone | (Karich et al., 2013) |
| Toluène | haloperoxydase de Agrocybe aegerita | Alcool benzoïque<br>Benzaldéhyde<br>Acide benzoïque. | (Ullrich and Hofrichter, 2005) |

### I.2.3.Couplage des procédés

Un procédé couplé consiste à mettre en œuvre deux procédés de traitement dans un même système afin de combiner les avantages des deux procédés et ainsi améliorer l'efficacité d'élimination des COVs. Dans ces systèmes, plusieurs combinaisons peuvent être appliquées. Ci-après sont détaillés les couplages les plus connus.

I.2.3.1. Procédé couplant l'adsorption et l'ozonation

Le procédé développé associe une phase d'adsorption, pendant laquelle s'effectue le piégeage des COV en continu dans la matrice solide poreuse minérale et une phase de régénération séquentielle du matériau, effectuée par une oxydation via un courant d'air ozoné. En outre, l'effet de concentration des polluants dans les pores du solide permet de favoriser les cinétiques de réaction dans le cas de composés difficilement oxydables. Les adsorbants les plus utilisés sont le charbon actif et le zéolite (Manéro and Monneyron, 2012).

I.2.3.2. Couplage de l'adsorption et la biodégradation

Plusieurs études ont montré l'efficacité de l'ajout de charbon actif sous forme d'une poudre dans un réacteur de type boues activées. Sa présence permet d'améliorer la décantabilité des boues, leur épaississement et déshydratation, mais aussi l'élimination des composés réfractaires ou inhibiteurs et de réduire l'impact de chocs toxiques. Cependant, ce couplage peut être coûteux, car le charbon actif est difficilement séparable des boues biologiques et il y a donc une perte continue en charbon. Le temps de séjour du charbon n'est, de plus, pas dissociable de celui des boues et ceci minimise le phénomène de biorégénération (Lesage, 2009) .

I.2.3.3 Couplage de l'absorption à la biodégradation en TPPB (*two-phase partitioning bioreactor*)

Afin de surmonter la contrainte diffusionnelle due à l'hydrophobicité de la majorité des COVs lors du traitement biologique (biofiltres, biolaveurs), une solution peut être envisagée, qui est l'addition d'une phase liquide absorbante immiscible avec l'eau (NAPL : Non-Aqueous Phase Liquid) pour la récupération des COV avant leur biodégradation en phase aqueuse (Darracq et al., 2012a; Kundu et al., 2003). Dans ce système, le traitement des COV hydrophobes peut être réalisé dans un biolaveur dans lequel le COV est d'abord absorbé dans un solvant organique immiscible à l'eau, dans

une colonne d'absorption par exemple ; puis cette phase est introduite dans un bioréacteur contenant les microorganismes en phase aqueuse. Le mélange formé entre la phase aqueuse et la NAPL constitue un bioréacteur biphasique, TPPB (two-phase partitioning bioreactor). Dans ce bioréacteur, le COV est transféré graduellement de la phase organique vers la phase aqueuse, où il subit une dégradation microbienne (Darracq et al., 2012b; Dumont et al., 2012). Le procédé de couplage de l'absorption et de la biodégradation en TPPB est représenté sur la figure 1.4 :

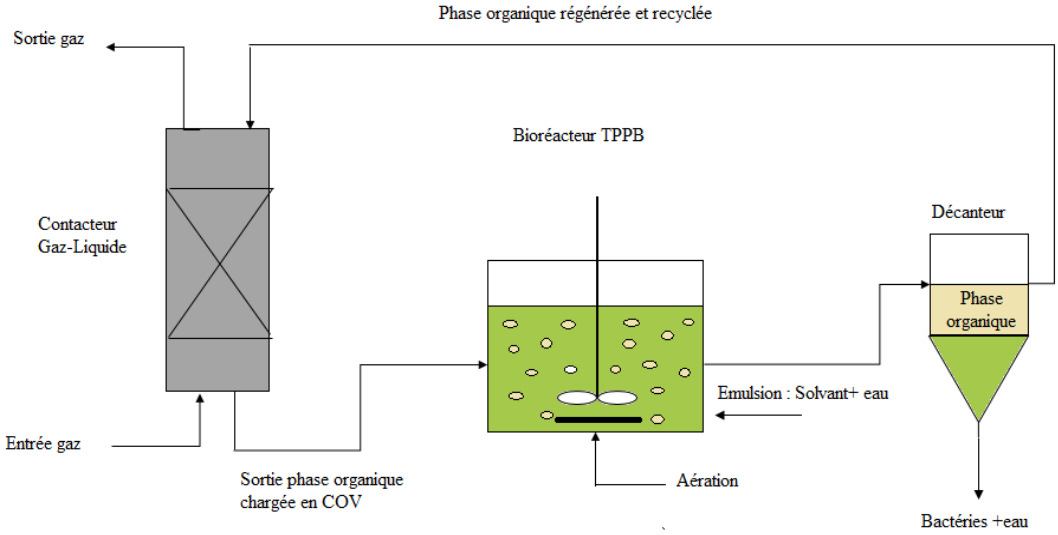



***Figure 1. 4.*** *Schéma du procédé de couplage absorption- biodégradation en TPPB.*

Le NAPL joue le rôle d'un réservoir à polluant, qui permet un ajout graduel de substrat. Après la biodégradation, le mélange sortant du réacteur est dirigé vers un décanteur pour séparer la phase organique et la recycler.

Dans les réacteurs biphasiques (TPPB), le facteur le plus critique à optimiser est l'aire interfaciale entre les deux phases liquides. L'activité microbiologique à l'interface ou dans la phase aqueuse dépend du transfert des molécules de COV entre la phase organique (NAPL) et la phase aqueuse, qui est principalement liée à l'aire interfaciale (Darracq et al., 2012a; Déziel et al., 1999).

Bien que l'efficacité de la dégradation des COVs dans les TPPB ait été démontrée dans plusieurs travaux, certaines modifications doivent être apportées afin de faire face à certaines contraintes (Déziel et al., 1999; Muñoz et al., 2007) :

1- l'amélioration de la biodisponibilité des COVs pour les espèces microbiologiques est un facteur limitant.
2- des pertes dans la phase organique sont constatées à cause de la durée totale de traitement qui est relativement longue et peut ainsi engendrer la biodégradation de cette dernière.
3- l'augmentation de la surface spécifique par l'ajout de tensioactifs peut être une solution à effet limité dû à leur toxicité.
4- la séparation des deux phases à la fin du traitement reste un obstacle surtout après l'addition d'un tensioactif où lorsque les bactéries ont produit des tensioactifs naturels (biosurfactants). Dans ce cas la décantation simple n'est pas une solution et d'autres méthodes de séparation doivent être mises en place, telle que l'ultracentrifugation où la filtration membranaire.

Le besoin d'écarter les problèmes liés au transfert de masse entre les deux phases dans un TPPB, ainsi que les difficultés rencontrées lors de la régénération de la phase organique nous ont amenés à proposer une solution alternative plus simple dans sa mise en œuvre mettant en jeu une seule phase organique et un seul biocatalyseur non vivant, une enzyme.

## I.3. Couplage de l'absorption à un traitement enzymatique en phase organique : une solution innovante alternative au TPPB ?

### I.3.1.Contexte

La phase organique est employée pour absorber le COV. Par la suite, la réaction enzymatique transformant le COV se déroule dans la même phase.

L'activité catalytique de l'enzyme étant altérée par sa présence dans un milieu non-aqueux, elle doit subir avant son utilisation certaines modifications lui permettant de supporter l'effet dénaturant du solvant organique jouant le rôle d'absorbant. Par ailleurs, cette modification structurale de l'enzyme permettra de l'obtenir sous forme régénérable insoluble dans le solvant organique. L'enzyme sera ainsi récupérée, sans difficulté, dans le décanteur. Le système de traitement est schématisé sur la figure 1.5 :

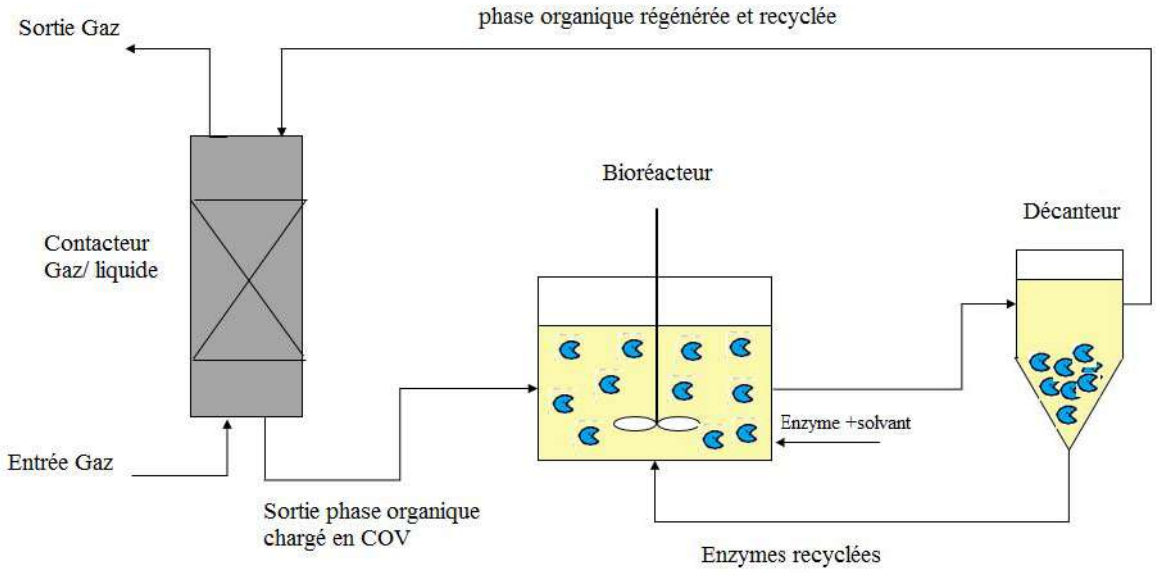



***Figure 1. 5.****Schéma de procédé de couplage d l'absorption-biodégradation enzymatique en phase organique*

### I.3.2. Transfert gaz-liquide en système monophasique

L'absorption est basée sur l'équilibre thermodynamique entre les deux phases (gaz-liquide). La détermination des données d'équilibre et la nature du solvant sont d'une importance majeure dans le développement du procédé.

#### I.3.2.1. Données d'équilibre

Les données physiques les plus intéressantes pour caractériser l'opération de l'absorption sont l'équilibre gaz-liquide. Ces données sont nécessaires pour définir la concentration maximale atteinte dans la phase absorbante. Souvent, la solubilité d'un gaz dans un liquide est représentée par la constante de Henry (Rousseau, 1987).

La théorie de Henry suppose qu'une relation linéaire est observée entre la pression partielle d'un composé dans la phase gaz et sa concentration dans la phase aqueuse pour les systèmes dilués (x<0.01) (Figure.1.6) (Lee, 2007; Rousseau, 1987)

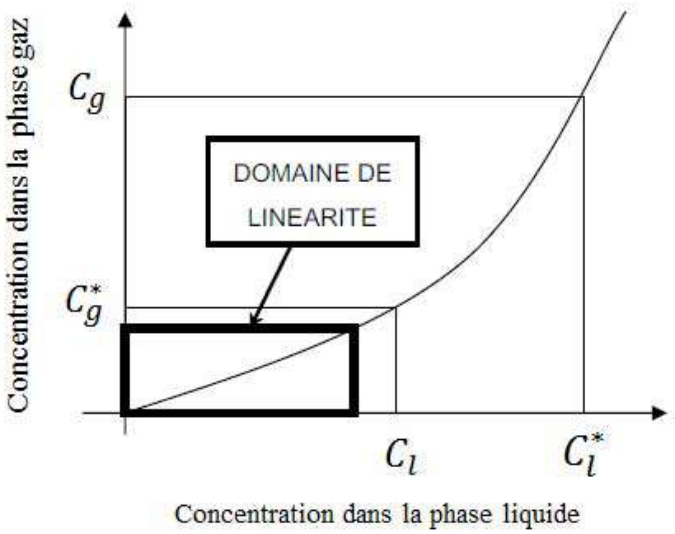



***Figure 1. 6.*** *Isotherme de partage d'un composé entre une phase gaz et une phase liquide (Darracq, 2011)*

La constante de Henry, notée H″, est définie par la relation suivante (Dutta, 2007):

$$P_A^* = H'' x_A \qquad \text{(Eq 1.1)}$$

Ou

H″ = la constante de Henry (en atm ou Pa)

$P_A^*$ =la pression partielle (en atm ou Pa) du composé A à une température donnée à l'équilibre

$x_A$ = la fraction molaire du composé A dans le liquide

Dans la littérature, plusieurs expressions ont été proposées pour l'estimation de cette constante. Elles ont été développées selon le système d'unités utilisé (Dutta, 2007; Lee, 2007; Reible, 1998).

Par exemple, à partir de la relation suivante :

$$P_A^* = H' C_A \qquad \text{(Eq 1.2)}$$

Où H′ est le coefficient de Henry en (atm.m$^3$.mol$^{-1}$) et $C_A$ est la concentration de composé A dans la phase liquide.

La loi de distribution entre deux phases, aussi appelée coefficient de partage, peut être appliquée pour calculer le coefficient de Henry,

$$C_{A,g} = H\, C_{A,L} \qquad \text{(Eq 1.3)}$$

Ou, $C_{A,L}$ est la concentration de composé A dans la phase liquide et $C_{A,g}$ est sa concentration dans la phase gaz. Dans ce cas, le coefficient est adimensionnel. Pour passer au coefficient dimensionnel H′ la loi des gaz parfait peut être utilisée :

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{RT} \qquad \text{(Eq 1.4)}$$

$$H = \frac{H'}{RT} \qquad \text{(Eq 1.5)}$$

Ou R est la constante universel des gaz et T est la température.

La constante de Henry n'a pas une valeur constante et dépend de la température. En effet, dans la littérature, sa valeur pour un composé est donnée pour plusieurs températures. Cette dépendance est parfois définie par une loi similaire à celle d'Arrhenius (Trambouze and Euzen, 2002).

$$ln(H) = A_{Arr}.e^{(-\frac{B_{Arr}}{RT})} \qquad \text{(Eq 1.6)}$$

Où

$A_{Arr}$, $B_{Arr}$ : Constantes expérimentales

R : Constante des gaz parfaits (8.3145 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)

T : Température absolue (K)

### I.3.3.Choix du solvant d'absorption

Le choix du liquide d'absorption (liquide de lavage) conditionnera la quantité de matière transférable de la phase gaz vers la phase liquide. Un bon absorbant des polluants hydrophobes doit fournir les propriétés suivantes (Déziel et al., 1999; Heymes et al., 2006; Muñoz et al., 2007) :

- Une grande capacité d'absorption
- Une faible viscosité et un grand coefficient de diffusion

- Une basse pression de vapeur pour éviter la formation d'une autre pollution atmosphérique
- Une biocompatibilité.

Une grande variété de solvants organiques ont été utilisés pour faciliter la biodégradation des polluants hydrophobes. Dans des études récentes, Muñoz et al., (2006) et Arriaga et al., (2006) ont choisi l'huile de silicone comme NAPL non-biodégradable et biocompatible parmi plusieurs solvant organiques. D'autre part Dumont et al., (2006) et (2010) ont prouvé la grande efficacité obtenue dans l'utilisation de l'huile de silicone pour l'absorption de COVs hydrophobes. Ces études ont mené au calcul des coefficients de partage huile/air, et huile/eau de quelques COVs. Plus récemment, l'introduction d'une huile de silicone dans un TPPB a été réalisé par Darracq et al., (2010, 2012b). Ces travaux ont confirmé l'efficacité de l'huile de silicone pour absorber les COVs, avant leur biodégradation dans un TPPB.

### I.3.3.1. Propriétés des huiles de silicone

Les huiles de silicones ou polydiméthylsiloxanes (PDMS) sont des huiles constituées de chaînes moléculaires linéaires, plus ou moins longues, dont les éléments sont formés d'atomes de Silicium et d'Oxygène alternés (liaison siloxane Si-O-Si). Les atomes de silicium sont saturés par des groupements méthyle $-CH_3$ (Figure 1.7) (Bluestar silicones, 2012).

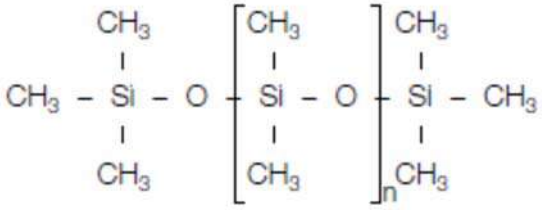


***Figure 1. 7.*** *Formule générale des huiles de silicone*

La structure de l'huile permet d'expliquer les propriétés physico-chimiques suivantes :

1- La liaison Si-O est entourée de groupes méthyles apolaires et hydrophobes, ce qui explique la compatibilité des PDMS avec les composés hydrophobes.

2- Une grande flexibilité de la chaîne polymère est due au grand angle de la liaison Si-O-Si. L'absence de substituant sur l'oxygène rend la chaine très flexible, entraînant un comportement de type élastique, une grande perméabilité aux gaz et un certain caractère amphiphile.
3- La viscosité des huiles de silicone est directement dépendante du degré de polymérisation de la chaîne.

## Conclusion

La problématique liée à la pollution de l'air par les COVs a été exposée dans ce premier chapitre. Les risques environnementaux, les règlementations internationales et les méthodes de traitement couramment utilisées ont été exposés.

L'une des solutions récentes destinées à l'élimination des COVs hydrophobes est le couplage de l'absorption à la biodégradation en réacteur biphasiques (TPPB). Cette technique a été décrite en détail, prenant en considération les avantages et les points faibles de ce système. La complexité et les difficultés des phénomènes liés au transfert de masse, à la dégradation biologique et à la séparation et régénération de la phase absorbante, mettent en évidence la nécessité de proposer une solution alternative plus efficace, moins encombrante et économiquement rentable.

L'idée à exploiter dans notre étude est de coupler l'absorption des COVs et leur biodégradation en utilisant des biocatalyseurs enzymatiques dans la même phase absorbante. La mise au point d'un tel procédé nécessite de concentrer l'étude sur deux points principaux :

- L'aspect de génie enzymatique permettant le conditionnement de l'enzyme sous une forme compatible avec le milieu non aqueux.
- Etudier la cinétique de dégradation sous différentes conditions physico-chimiques, dans le but de déterminer les valeurs optimales des paramètres donnant l'efficacité maximale pour la transformation des COVs.

Ces deux points seront discutés en détail dans le chapitre suivant.

**Référence bibliographiques**

ADEME ,Agence de l'environnement et de la maîtrise d'énergie (2013). Les Composés organiques volatils: Réduction des émissions de COV dans l'industrie (Dunod).

AIDA-INERIS (2015). Directive n° 1999/13/CE du 11/03/99 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations | AIDA.

Alemzadeh, I., and Nejati, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. J. Hazard. Mater. *166*, 1082–1086.

Arriaga, S., Muñoz, R., Hernández, S., Guieysse, B., and Revah, S. (2006). Gaseous Hexane Biodegradation by Fusarium solani in Two Liquid Phase Packed-Bed and Stirred-Tank Bioreactors. Environ. Sci. Technol. *40*, 2390–2395.

Atkinson, R. (2000). Atmospheric chemistry of VOCs and NOx. Atmos. Environ. *34*, 2063–2101.

Bari, M.A., Kindzierski, W.B., Wheeler, A.J., Héroux, M.-È., and Wallace, L.A. (2015). Source apportionment of indoor and outdoor volatile organic compounds at homes in Edmonton, Canada. Build. Environ. *90*, 114–124.

Bayramoğlu, G., and Arıca, M.Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. J. Hazard. Mater. *156*, 148–155.

Bluestar silicones (2012). Rhodorsil® Huiles 47 Information technique.

Bódalo, A., Bastida, J., Máximo, M.F., Montiel, M.C., Gómez, M., and Murcia, M.D. (2008). A comparative study of free and immobilized soybean and horseradish peroxidases for 4-chlorophenol removal: protective effects of immobilization. Bioprocess Biosyst. Eng. *31*, 587–593.

Burgess, J.E., Parsons, S.A., and Stuetz, R.M. (2001). Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: a review. Biotechnol. Adv. *19*, 35–63.

CITEPA, Centre Interprofessionnel Technique d'etudes de la Pollution Atmosphérique (2014). Composés organiques Volatils ,COV.

CITEPA, Centre Interprofessionnel Technique d'etudes de la Pollution Atmosphérique (2015). Pollution photochimique.

Le Cloirec, P. (1998). COV (Composes Organiques Volatils) (Ed. Techniques Ingénieur).

Dalstein, L., Vas, N., Tagliaferro, F., Ferrara, A.-M., and Spaziani, F. (2005). Effets de l'ozone sur la forêt et la végétation dans les Alpes franco-italiennes. For. Méditerranéenne XXVI 149–156.

Darracq, G. (2011). Couplage de l'absorption dans une phase organique et de la biodégradation dans un réacteur multiphasique Application au traitement de Composés Organiques Volatils hydrophobes. École nationale supérieure de chimie de Rennes.

Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Amrane, A., Thomas, D., Dumont, E., Andres, Y., and Le Cloirec, P. (2010). Silicone oil: An effective absorbent for the removal of hydrophobic volatile organic compounds. J. Chem. Technol. Biotechnol. *85*, 309–313.

Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Thomas, D., Amrane, A., Dumont, E., Andres, Y., and Le Cloirec, P. (2012a). Optimization of the volume fraction of the NAPL, silicone oil, and biodegradation kinetics of toluene and DMDS in a TPPB. Int. Biodeterior. Biodegrad. *71*, 9–14.

Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Amrane, A., and Cloirec, P.L. (2012b). Removal of Hydrophobic Volatile Organic Compounds in an Integrated Process Coupling Absorption and Biodegradation—Selection of an Organic Liquid Phase. Water. Air. Soil Pollut. *223*, 4969–4997.

Déziel, E., Comeau, Y., and Villemur, R. (1999). Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. Biodegradation *10*, 219–233.

Doble, M. (2006). Biological treatment of VOCs. Chem. Eng. J. *113*, 35–41.

Donley, E., and Lewandowski, D. (2000). Optimized design and operating parameters for minimizing emissions during voc thermal oxidation. Met. Finish. *98*, 446–458.

Dumont, E., Andrès, Y., and Le Cloirec, P. (2006). Mass transfer coefficients of styrene and oxygen into silicone oil emulsions in a bubble reactor. Chem. Eng. Sci. *61*, 5612–5619.

Dumont, E., Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Amrane, A., Thomas, D., Andrès, Y., and Le Cloirec, P. (2010). Determination of partition coefficients of three volatile organic compounds (dimethylsulphide, dimethyldisulphide and toluene) in water/silicone oil mixtures. Chem. Eng. J. *162*, 927–934.

Dumont, E., Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Amrane, A., Thomas, D., Andrès, Y., and Le Cloirec, P. (2012). Hydrophobic VOC absorption in two-phase partitioning bioreactors; influence of silicone oil volume fraction on absorber diameter. Chem. Eng. Sci. *71*, 146–152.

Duran, N., and Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Appl. Catal. B Environ. *28*, 83–99.

Dutta, B.K. (2007). Proncipales of mass transfer and separation processes (PHI Learning Pvt. Ltd.).

ECE , Economic commission for Europe (United Ntions) (2015). Protocol to Abate Acidification, Eutrophication and Ground-level Ozone - Air Pollution - Environmental Policy.

EEA,European Environment Agency (2013). EMEP/EEA air pollutant emission inventory guidebook.

FCCC, Framework convention on Climate change (United Nations) (2014). Le Protocole de Kyoto-Résumé.

van Groenestijn, J.W., and Hesselink, P.G.M. (1993). Biotechniques for air pollution control. Biodegradation *4*, 283–301.

Haagen-Smit, A.J. (1952). Chemistry and Physiology of Los Angeles Smog. Ind. Eng. Chem. *44*, 1342–1346.

Hamid, M., and Khalil-ur-Rehman (2009). Potential applications of peroxidases. Food Chem. *115*, 1177–1186.

Heymes, F., Manno-Demoustier, P., Charbit, F., Fanlo, J.L., and Moulin, P. (2006). A new efficient absorption liquid to treat exhaust air loaded with toluene. Chem. Eng. J. *115*, 225–231.

Huang, B., Lei, C., Wei, C., and Zeng, G. (2014). Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in environment — sources, potential human health impacts, and current remediation technologies. Environ. Int. *71*, 118–138.

Ikemoto, S., Jennings, A., and Skubal, K. (2006). Modeling hydrophobic VOC biofilter treatment in the presence of nutrient stimulation and hydrophilic VOC inhibition. Environ. Model. Softw. *21*, 1387–1401.

Ion, V.A., Pârvulescu, O.C., and Dobre, T. (2015). Volatile organic compounds adsorption onto neat and hybrid bacterial cellulose. Appl. Surf. Sci. *335*, 137–146.

Karam, J., and Nicell, J.A. (1997). Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. J Chem T Ech Biotechnol *69*, 141–153.

Karich, A., Kluge, M., Ullrich, R., and Hofrichter, M. (2013). Benzene oxygenation and oxidation by the peroxygenase of Agrocybe aegerita. AMB Express *3*, 1–8.

Khan, F.I., and Ghoshal, A.K. (2000). Removal of Volatile Organic Compounds from polluted air. J. Loss Prev. Process Ind. *13*, 527–545.

Koppmann, R. (2008). Volatile Organic Compounds in the Atmosphere (John Wiley & Sons).

Kundu, A., Dumont, E., Duquenne, A.-M., and Delmas, H. (2003). Mass Transfer Characteristics in Gas-liquid-liquid System. Can. J. Chem. Eng. *81*, 640–646.

Lee, F.F. (2007). Comprehensive Analysis, Henry's Law Constant Determination, and Photocatalytic Degradation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) And/or Other Persistent Organic Pollutants (POPs). (ProQuest).

Lesage, G. (2009). Etude de l'élimination de substances aromatiques dangereuses dans un procédé couplant adsorption et biodégradation. phdthesis. INSA de Toulouse.

Liotta, L.F. (2010). Catalytic oxidation of volatile organic compounds on supported noble metals. Appl. Catal. B Environ. *100*, 403–412.

Lippard, S.J. (2005). Hydroxylation of C-H bonds at carboxylate-bridged diiron centres. Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci. *363*, 861–877; discussion 1035–1040.

Liu, Y., Shao, M., Fu, L., Lu, S., Zeng, L., and Tang, D. (2008). Source profiles of volatile organic compounds (VOCs) measured in China: Part I. Atmos. Environ. *42*, 6247–6260.

López, E., Schuhmacher, M., and Domingo, J.L. (2008). Human health risks of petroleum-contaminated groundwater. Environ. Sci. Pollut. Res. *15*, 278–288.

Manéro, M.-H., and Monneyron, P. (2012). Traitement sélectif de l'air industriel pollué en COV par un procédé hybride adsorption-ozonation (Ed. Techniques Ingénieur).

Muñoz, R., Arriaga, S., Hernández, S., Guieysse, B., and Revah, S. (2006). Enhanced hexane biodegradation in a two phase partitioning bioreactor: Overcoming pollutant transport limitations. Process Biochem. *41*, 1614–1619.

Muñoz, R., Villaverde, S., Guieysse, B., and Revah, S. (2007). Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds. Biotechnol. Adv. *25*, 410–422.

Niedojadlo, A., Becker, K.H., Kurtenbach, R., and Wiesen, P. (2007). The contribution of traffic and solvent use to the total NMVOC emission in a German city derived from measurements and CMB modelling. Atmos. Environ. *41*, 7108–7126.

Reible, D.D. (1998). Fundamentals of Environmental Engineering (CRC Press).

Rousseau, R.W. (1987). Handbook of Separation Process Technology (John Wiley & Sons).

Roustan, M. (2003). Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux (Paris.: Lavoisier, Tech & Doc).

Russ, R., Zelinski, T., and Anke, T. (2002). Benzylic biooxidation of various toluenes to aldehydes by peroxidase. Tetrahedron Lett. *43*, 791–793.

Sillman, S. (1999). The relation between ozone, NOx and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. Atmos. Environ. *33*, 1821–1845.

Soltys, N. (1998). Procédés de traitement des COV ou composés organiques volatils. Tech. L'Ingénieur J *3*, 928.

Theloke, J., and Friedrich, R. (2007). Compilation of a database on the composition of anthropogenic VOC emissions for atmospheric modeling in Europe. Atmos. Environ. *41*, 4148–4160.

Torres, E., and Ayala, M. (2010). Biocatalysis Based on Heme Peroxidases (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Trambouze, P., and Euzen, J.-P. (2002). Réacteurs chimiques (Paris.: OPHRYS).

Ullrich, R., and Hofrichter, M. (2005). The haloperoxidase of the agaric fungus Agrocybe aegerita hydroxylates toluene and naphthalene. FEBS Lett. *579*, 6247–6250.

US EPA ,United States Environmental Protection Agency (2012). An Introduction to Indoor Air Quality: Volatile organic compounds (VOCs).

Vigneron, S., Hermia, J., and Chaouki, J. (1994). Characterization and Control of Odours and VOC in the Process Industries (Elsevier).

Wei, W., Wang, S., Chatani, S., Klimont, Z., Cofala, J., and Hao, J. (2008). Emission and speciation of non-methane volatile organic compounds from anthropogenic sources in China. Atmos. Environ. *42*, 4976–4988.

Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. Ind. Biotechnol. *1*, 38–50.

Zhao, X.S., Ma, Q., and Lu, G.Q. (Max) (1998). VOC Removal: Comparison of MCM-41 with Hydrophobic Zeolites and Activated Carbon. Energy Fuels *12*, 1051–1054.

# *Chapitre II*

# *Enzymes, stabilité et techniques de stabilisation en milieu organique*

# II.1.Les enzymes

## II.1.1.Définition et généralités

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui augmentent la vitesse des réactions chimiques ayant lieu dans les cellules vivantes sans qu'elles subissent un changement (Borel and Randoux, 1997). Les réactifs impliqués dans les réactions enzymatiques sont appelés substrats. Les enzymes sont caractérisées par leur spécificité, elles réagissent sur un substrat spécifique pour donner un produit spécifique également (Palmer and Bonner, 2007). Cette propriété est liée à la présence, dans leur structure, d'un site actif en forme de cavité au sein de laquelle se déroule la réaction enzymatique proprement dite (Figure 2.1). De manière générale, le site actif est d'une taille restreinte par rapport à la taille globale de l'enzyme. Il constitue donc le site de reconnaissance spécifique de l'enzyme (Cingöz, 2009; Palmer and Bonner, 2007).

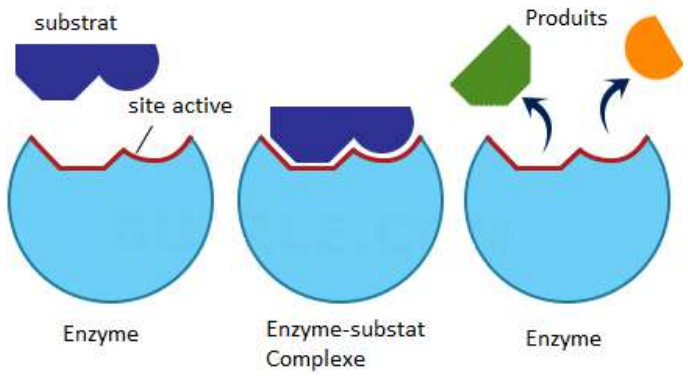



***Figure 2. 1.*** *Le substrat particulier dans le site actif de l'enzyme*

Toutes les enzymes sont de nature protéique. Cependant, certaines nécessitent pour leur fonctionnement une partie non-protéique liée à l'enzyme en mode covalent ou non-covalent appelée le cofacteur. Le cofacteur peut être une molécule d'une nature organique appelée coenzyme tels que le NAD, FAD, ATP ou bien des ions métalliques ($Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Fe^{2+}$…) (Drauz, 2012; Palmer and Bonner, 2007).

Le fait que toutes les enzymes soient des protéines leur confère les propriétés physicochimiques de ces macromolécules (solubilité, propriétés osmotiques et de diffusion, échanges ioniques, dénaturation thermique et labilité avec des réactifs chimiques énergetiques).

### II.1.2. Classification et nomenclature

Au début de l'enzymologie, il n'existait pas de règles systématiques pour nommer les enzymes ; elles étaient identifiées par des noms arbitraires qui rappelaient l'origine tissulaire ; par exemple la pepsine désigne l'enzyme gastrique de la digestion, il arrive parfois qu'une enzyme soit désignée par deux noms différents ou inversement (Frénot and Vierling, 2002).

Les enzymes sont communément nommées en ajoutant le suffixe –ase au nom du substrat de l'enzyme ou à une expression qui décrit l'action catalytique de l'enzyme (Drauz, 2012; Voet and Voet, 2005). Devant l'augmentation du nombre d'enzymes découvertes, La Commission des Enzymes (EC) de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) a établi une classification et une nomenclature des enzymes fondée sur le type de réaction qu'elles catalysent. Le tableau (Tableau 2.1) résume les six classes principales (IUBMB and Webb, 1992).

***Tableau 2. 1.*** *Classification des enzymes selon l'EC de IUBMB (IUBMB and Webb, 1992).*

| Classification | Le numéro E.C | Type de réaction catalysée |
|---|---|---|
| Oxydoréductases | 1 | Réduction de la liaison C=O et C=Coxydation de C-H, C=C,C-N et C-Ooxydation /réduction de cofacteur |
| Transférases | 2 | Transfert des groupements fonctionnels tels que : amino, acyl, phosphoryl, methyl. |
| Hydrolases | 3 | Hydrolyse |
| Lyases | 4 | Elimination de groupements et formation de doubles liaisons |
| Isomérases | 5 | Isomérisation |
| Ligases ou synthétases | 6 | Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP |

A l'intérieur de chaque classe, il y a des sous-classes et des sous-sous-classes. Chaque enzyme est désignée par un code constitué de quatre chiffres séparés par des points appelés « EC number ». Le premier chiffre indique la classe principale de l'enzyme, le deuxième précise sa sous-classe, le troisième chiffre désigne sa sous-sous-classe et le quatrième est le numéro de série de l'enzyme désigné arbitrairement à l'intérieur de sa sous-sous-classe (Voet and Voet, 2005). Prenons l'exemple de la Peroxydases (E.C. 1.11.1.7) :

EC **1** : Oxydoréductase

EC 1.**11** : une oxydoréductase qui agit sur les peroxydes comme accepteurs d'électrons.

EC 1.11.**1** : implique qu'elle utilise le $H_2O_2$ comme peroxyde.

EC 1.11.1.**7** : le dernier chiffre est le numéro individuel de l'enzyme.

### II.1.3. La catalyse enzymatique

Beaucoup de réactions chimiques peuvent avoir lieu spontanément, d'autres nécessitent d'être catalysées pour se produire à une vitesse significative. Les biocatalyseurs, comme n'importe quels catalyseurs, fonctionnent par la réduction de l'énergie d'activation nécessaire pour transformer chimiquement une molécule en une autre, et par l'augmentation du nombre de molécules susceptibles de réagir. Thermodynamiquement, l'importance de cette barrière d'énergie peut être exprimée en termes de changement d'énergie libre du système, comme représenté sur la figure 2.2 (Illanes, 2008; Jarrar, 2011).

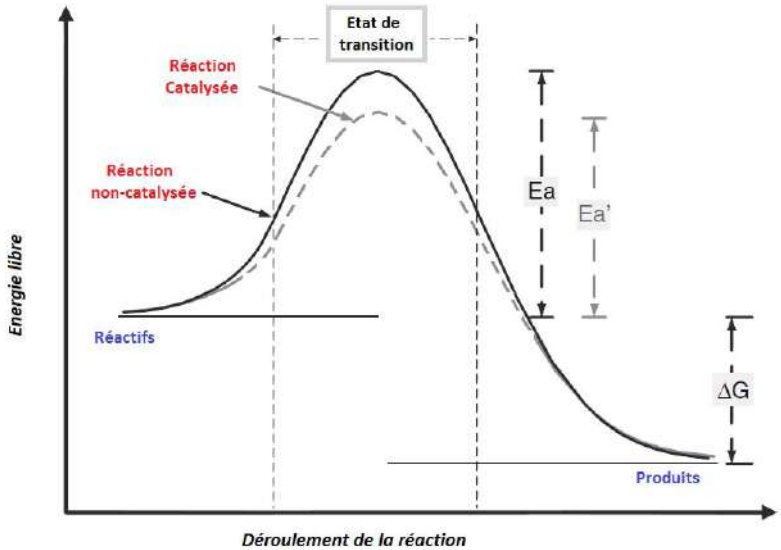



***Figure 2. 2.*** *Mécanisme de catalyse, Ea et Ea' sont les énergies de l'activation de la réaction non catalysée et catalysée, ΔG : la variation d'énergie libre de système (Illanes, 2008).*

Les enzymes réduisent le niveau de cette barrière d'énergie par leur interaction avec le substrat pour former un complexe intermédiaire (ES) non stable et actif qui délivre le produit et libère le catalyseur. Le catalyseur n'est pas consommé ou altéré durant la réaction ; théoriquement, il peut donc être réutilisé pour convertir d'autres substrats (Illanes, 2008).

Une réaction enzymatique est habituellement étudiée comme un processus en deux étapes (Eq 2.1): la formation d'un complexe enzyme/substrat (ES) à partir d'un substrat (S) et d'une enzyme (E), suivie d'une dissociation irréversible de ce complexe (ES) pour libérer l'enzyme (E) et le produit de réaction (P) (Marangoni, 2003).

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_2} E + P \qquad \text{(Eq 2.1)}$$

Selon le modèle d'équilibre de Michaelis & Menten, l'étape de fixation du substrat sur l'enzyme est supposée relativement rapide par rapport au taux de dissociation du complexe (ES). Par conséquent, la réaction est obligatoirement supposée à l'équilibre. En revanche, une simple analyse cinétique par Michaelis & Menten a démontré que la vitesse de la réaction est décrite par l'équation (2.2) (Illanes, 2008; Marangoni, 2003) :

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad \text{(Eq 2.2)}$$

où

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \qquad \text{(Eq 2.3)}$$

$V_{max}$ est définie comme la vitesse maximale de la réaction lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat (Eq 2.4).

$$V_{max} = k_2 [E]_0 \qquad \text{(Eq 2.4)}$$

et $K_m$ est la concentration de substrat lorsque la moitié des molécules d'enzymes sont complexées au substrat (l'enzyme est à demi-saturation) (Figure 2.3).

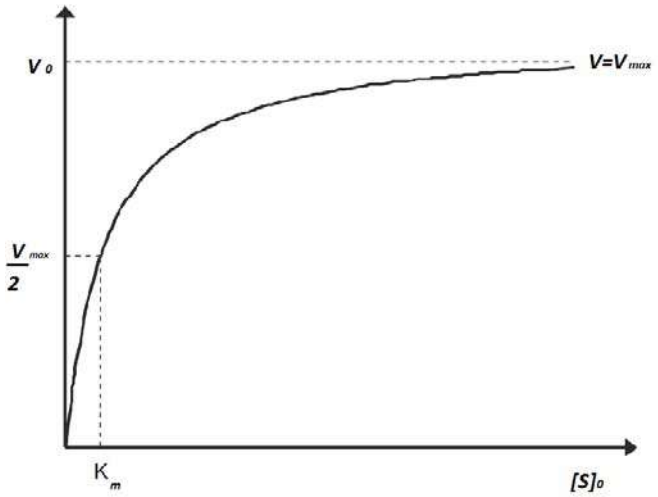



***Figure 2. 3.*** *Représentation graphique de l'équation de Michaelis & Menten*

### II.1.4. Implémentation des enzymes dans l'industrie

Les activités industrielles enzymatiques sont en forte croissance ces dernières années en raison de nouvelles technologies de production, de propriétés enzymatiques modifiées et de nouveaux domaines d'application. En 1998, la demande globale des enzymes dans l'industrie était de 1.6 billion de dollars avec un taux de croissance annuel de 5 à 10% (Iyer and Ananthanarayan, 2008). Le marché industriel des enzymes a atteint 5.1 billion de dollars en 2009 et elles sont impliquées dans la fabrication de plus de 500 produits commerciaux (Illanes et al., 2012). Les utilisations enzymatiques industrielles sont très variables, mais les plus fréquentes sont dans les domaines de l'industrie pharmaceutique, alimentaire, textile, et récemment le domaine de fabrication des détergents (Iyer and Ananthanarayan, 2008; Kirk et al., 2002).

Pendant les deux dernières décennies, des recherches considérables ont conduit à évaluer les nouvelles possibilités d'utiliser les enzymes dans les procédés de traitement des effluents (Duran and Esposito, 2000; Karam and Nicell, 1997). Un grand nombre d'enzymes extraites de différentes plantes et microorganismes sont aujourd'hui connues pour jouer un rôle très important dans le traitement des effluents. Les enzymes peuvent agir sur des polluants récalcitrants spécifiques pour les éliminer par précipitation ou transformation en un autre produit. Elles peuvent également modifier les caractéristiques d'un effluent pour le rendre plus favorable au traitement (Karam and Nicell, 1997). Les raisons principales de cet intérêt sont:

1. le taux d'introduction des xénobiotiques et des polluants organiques récalcitrants dans l'environnement est en croissance, et il devient de plus en plus difficile d'atteindre un degré d'élimination acceptable de ces polluants en utilisant les procédés chimiques et biologiques conventionnels. Par conséquent, il existe un besoin de développer des méthodes alternatives de traitement qui sont plus efficaces, moins coûteuses et plus simples à mettre en œuvre ;
2. les enzymes peuvent être utilisées pour cibler des polluants spécifiques ;
3. les récentes avancées en biotechnologie ont permis la production d'enzymes beaucoup moins chères en utilisant de nouveaux procédés de purification et d'isolement.

Cependant, dans l'industrie et dans le secteur du traitement des effluents, ces biocatalyseurs devront être raisonnablement stables dans des conditions qui peuvent être très différentes de leur environnement physiologique naturel. Par ailleurs, ces enzymes doivent conserver leur activité et sélectivité quand elles réagissent avec des substrats peu « classiques » (Hernandez and Fernandez-Lafuente, 2011; Iyer and Ananthanarayan, 2008).

### II.1.4.1. Exigences industrielles

Les applications techniques des enzymes dans l'industrie sont faisables à condition que les enzymes soient stabilisées vis-à-vis des agents physico-chimiques suivants (Iyer and Ananthanarayan, 2008):

- **Stabilité thermique**

Les avantages liés à une mise en œuvre à haute température sont :

– Augmentation du rendement de production
– Diminution des limites de diffusion par la réduction de la viscosité de milieu
– Limitation des risques de contamination.

- **Stabilité à la pression (Pressure stability)**

L'effet de la pression sur la structure protéique des enzymes dépend du mécanisme réactionnel et de l'équilibre global des forces responsables du maintien de la structure des protéines. La pression est un dénaturant potentiel souvent responsable d'une perturbation des protéines. L'effet global peut être décrit en termes d'effet de la pression

sur les interactions moléculaires individuelles à l'intérieur des protéines, y compris les interactions électrostatiques et celles de Van der Waals.

- **Stabilité à forte concentration en sels**

Les enzymes halophiles possèdent des fonctions enzymatiques identiques à leurs équivalents non-halophiles. Cependant, elles nécessitent une forte concentration en sels pour leur activité et stabilité et un excès en résidus acides des acides aminés par rapport aux résidus alcalins. Il est bien évident qu'une forte charge négative rend les protéines halophiles plus flexibles à une forte concentration en sel (la condition pour laquelle les protéines non-halophiles tendent à s'agréger et deviennent rigides).

- **Stabilité dans les milieux non-aqueux**

Les raisons essentielles liées à l'usage des enzymes dans des milieux non-aqueux sont les suivantes (Gupta, 1992; Klibanov, 2001) :

– un substrat apolaire et qui présente une meilleure solubilité dans un solvant organique
– une diminution du risque de contamination microbiologique
– une limitation des réactions secondaires (hydrolyse) par le déplacement de l'équilibre thermodynamique du système vers le sens désiré
– une amélioration de la thermostabilité
– une régénération de l'enzyme sans nécessiter d'immobilisation dans un support
– un milieu convenable pour travailler avec des produits sensibles à l'humidité tels que les anhydrides acides.

## II.2. Notion d'activité et de stabilité enzymatique en milieu organique

L'idée que les enzymes ne puissent être actives qu'en milieux aqueux a été rejetée depuis longtemps grâce aux nombreuses études qui ont démontré l'activité enzymatique dans des milieux non aqueux (Krishna, 2002). L'usage des enzymes dans des solvants organiques a ouvert beaucoup d'opportunités pour leur usage en synthèse organique, notamment pour la production biotechnologique de produits chimiques en mettant en œuvre des réactions qui ne sont pas réalisables en milieu aqueux (Gupta and Roy, 2004; Krishna, 2002).

En milieu organique, il a été démontré que certaines enzymes deviennent plus stables sous l'effet d'interactions spécifiques créées entre les acides aminés et les molécules de solvant. Par ailleurs, les limites de transfert de masse des substrats hydrophobes sont réduites dans les solvants apolaires, les rendant ainsi plus accessibles aux sites actifs des enzymes, ce qui est le cas de la réaction d'oxydation enzymatique de substrats hydrophobes dans des solvants organiques (Torres et al., 2003).

Comparée à l'activité en milieu aqueux, l'activité catalytique enzymatique dans les milieux organiques est, généralement, plus ou moins faible. Cette chute d'activité dans les solvants organiques est expliquée par l'absence de liaisons hydrogènes, qui forment les résidus des acides aminés, avec la couche d'eau qui entoure la surface de l'enzyme dans la phase aqueuse. Cette couche d'hydratation, ou au moins une partie de celle-ci, représente une partie intégrale de la structure des protéines, primordiale pour le fonctionnement de ces dernières (Klibanov, 2001; Plou et al., 1998).

Des études récentes ont montré que pour assurer une stabilité et une activité enzymatique dans un solvant organique, deux approches essentielles doivent être suivies : le génie de milieu (medium engineering) et le génie de la biocatalyse (Klibanov, 1989; Krishna, 2002).

### II.2.1. Génie de milieu (medium engineering)

Dans tous les systèmes organiques contenant des biocatalyseurs, la nature de solvant choisi est un facteur important pour garantir la stabilité et l'activité de ces derniers.

Généralement, les solvants utilisés pour la catalyse enzymatique sont catégorisés comme suit (Koskinen and Klibanov, 1996; Krishna, 2002) :

- solvants miscibles à l'eau (système monophasique : organique-aqueux)
- solvants immiscibles à l'eau (système biphasique : organique-aqueux)
- micelle inverse (système biphasique en présence de tensioactif)
- système organique monophasique
- anhydre
- fluides supercritiques
- liquides ioniques.

Il est bien évident qu'au moins une couche unitaire d'eau est nécessaire pour qu'une molécule d'enzyme garde sa flexibilité et son activité. Par conséquent, les enzymes dans les systèmes non aqueux peuvent être en activité si la couche essentielle de l'eau qui les entoure n'est pas « décollée » par le solvant. De ce fait, la grandeur de choix considérée pour prévoir l'activité enzymatique en milieu organique est l'indice d'octanol, c'est-à-dire le logarithme du coefficient de partage d'un solvant dans un mélange octanol/eau (Log P) (Gupta and Roy, 2004).

Log P reflète l'hydrophobicité du solvant. Généralement, les enzymes montrent une activité élevée et une meilleure stabilité dans les solvants hydrophobes (apolaires) caractérisés par des valeurs de Log P supérieures à 4 (Choi and Yoo, 2012; Gupta, 1992; Koskinen and Klibanov, 1996). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les solvants hydrophiles ou polaires (Log P < 4) possèdent la capacité, à travers des interactions du type ponts d'hydrogène, d'ôter la couche d'eau qui entoure les enzymes, ce qui conduit à une déshydratation des enzymes et une réduction de leur flexibilité, provoquant leur dénaturation (figure 2.4) (Iyer and Ananthanarayan, 2008; Koskinen and Klibanov, 1996).

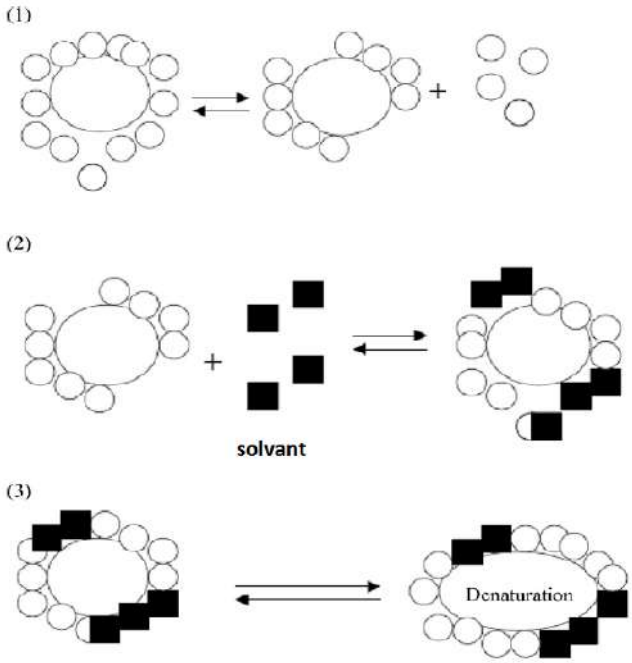



***Figure 2. 4.*** *Étapes de désactivation d'une enzyme en milieu organique : (1) déshydratation de protéine, (décollement de la couche d'eau des enzymes pas les solvants polaires) ; (2) (rattachement du solvant à la protéine déshydratée), (3) (transition conformationnelle dans la molécule de protéine pour donner une forme dénaturée (Iyer and Ananthanarayan, 2008).*

### II.2.2. Génie de la biocatalyse

L'immobilisation, la lyophilisation et la mutagenèse dirigée, sont bien connues depuis longtemps pour améliorer l'efficacité des biocatalyseurs en milieu aqueux ou organique.

#### II.2.2.1. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est une technique de biologie moléculaire moderne qui permet la création d'une mutation à un endroit précis au sein du gène cible après criblage ou choix de la propriété désirée (Amouroux et al., 2013; Illanes et al., 2012). Cependant, cette technique est souvent difficile à mettre en œuvre, car il peut y avoir ambiguïté dans l'identification du gène responsable des propriétés catalytiques désirées. Le plus souvent, l'efficacité catalytique de l'enzyme mutée est faible devant celle de l'enzyme native (Iyer and Ananthanarayan, 2008; Krishna, 2002).

### II.2.2.2.Lyophilisation

La manière la plus logique pour introduire une enzyme dans un solvant organique est de l'introduire sous la forme d'une poudre (Koskinen and Klibanov, 1996). Dans ce cas, la lyophilisation est la solution la plus envisageable. Une lyophilisation typique peut être réalisée comme suit : la solution enzymatique est placée dans des vials puis refroidie jusqu'à congélation totale. A ce point, la pression dans le lyophilisateur est réduite jusqu'à atteindre la pression de point triple de l'eau. Durant cette phase, l'eau dans la masse congelée est éliminée par sublimation à température constante (Zhai et al., 2003).

En revanche, dans ce processus de déshydratation, une dénaturation de la structure de la protéine peut se produire, notamment la structure secondaire de la protéine, le nombre et la forme des sites actifs (Figure 2.5) (Koskinen and Klibanov, 1996; Mattos and Ringe, 2001).

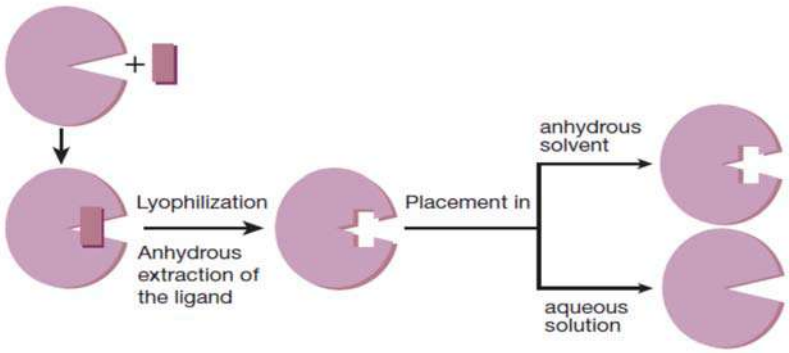



***Figure 2. 5.*** *Effet de la lyophilisation sur le site actif de l'enzyme*

*La collision d'un élément analogue au format de site actif dans l'eau (première rangée), un changement qui se produit sur le site, laissant une empreinte. Ce changement persiste après la lyophilisation, suivi par son extraction avec le solvant approprié (deuxième rangée). Cependant, l'enzyme garde en mémoire l'empreinte laissée sur le site actif même si l'enzyme est suspendue dans un solvant anhydre à cause de la rigidité structurale des enzymes dans de tels milieux (Klibanov, 2001).*

### II.2.2.3. Immobilisation

La dispersion des molécules de l'enzyme par immobilisation garantit généralement une meilleure accessibilité et une meilleure stabilisation de l'enzyme contre la dénaturation par les solvants organiques (Sheldon, 2007a). L'immobilisation présente plusieurs avantages (Miletić et al., 2012; Sheldon, 2007a) :

- meilleure stabilité thermique et chimique
- séparation facile du mélange réactionnel, par une simple filtration ou une centrifugation
- réutilisation de l'enzyme, ce qui permet de réduire le coût de production dans les processus industriels
- réduction de l'effet inhibiteur dû au substrat grâce au gradient établit entre la solution et le microenvironnement de l'enzyme immobilisée.

D'une façon générale, une enzyme immobilisée doit détenir deux fonctions essentielles, à savoir : les fonctions non-catalytiques (FNC) (le support) qui sont conçus pour faciliter la séparation du biocatalyseur et sa réutilisation, ainsi que les fonctions catalytiques (FC), assurant la conversion du substrat dans le temps et dans l'espace désirés (Cao, 2005).

La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend de la nature intrinsèque de l'enzyme, des conditions d'immobilisation, de la nature du matériau utilisé comme support et des conditions de la réaction, en tenant compte de l'application prévue et de l'utilisation du biocatalyseur (Jarrar, 2011).

Quatre méthodes traditionnelles d'immobilisation des enzymes peuvent être principalement distinguées, notamment le confinement ou l'inclusion (entrapement) , l'encapsulation , la fixation sur un support et la réticulation (cross-linking) (Figure 2.6) (Bickerstaff, 1997; Brady and Jordaan, 2009; Sheldon, 2007a).

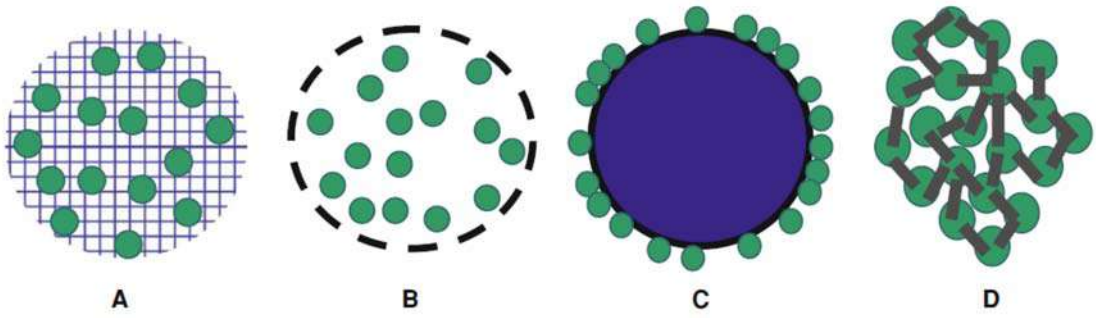



***Figure 2. 6.*** *Les stratégies d'immobilisation des enzymes*

*(A) Inclusion, (B) encapsulation, (C) fixation sur un support, (D) réticulation (cross-linking) .*
*Les enzymes sont représentées par des cercles (Brady and Jordaan, 2009).*

#### II.2.2.3.1. L'inclusion

Dans le cas de l'inclusion, les molécules de l'enzyme sont libres mais leur mouvement est limité grâce au réseau de gel qui les entoure (Figure 2.6.A). La porosité du gel est contrôlée pour s'assurer que la structure est suffisamment dense, afin d'éviter une fuite de l'enzyme tout en garantissant la libre circulation des substrats et des produits de la réaction. Inévitablement, le support agira en tant que barrière au transfert de matière, ce qui aura un impact direct sur la cinétique globale et sur le rendement de la réaction. La méthode la plus commune pour l'inclusion est l'utilisation de polymères organiques naturels (alginate, k-Carragenan) et de gel de silice (Bickerstaff, 1997; Brady and Jordaan, 2009).

#### II.2.2.3.2. L'encapsulation

L'encapsulation consiste à envelopper l'enzyme à l'aide de différentes formes des membranes semi-perméables (Figure 2.6.B). Elle permet aussi, la protection de l'enzyme de l'environnement externe. Son utilisation est limitée aux enzymes avec substrats de petite taille moléculaire à cause des limites de diffusion (Bickerstaff, 1997; Brady and Jordaan, 2009; Hanefeld et al., 2009).

#### II.2.2.3.3. La fixation sur un support

La liaison de l'enzyme avec le support peut être de nature physique (adsorption), ionique ou encore covalente (Figure 2.6.C). Dans le cas de l'adsorption, les enzymes sont fixées sur la surface d'un support insoluble et inerte par des liaisons de Van der Waals. Cette immobilisation semble assurer une certaine mobilité à l'enzyme, ce qui permet de conserver les propriétés catalytiques des enzymes immobilisées. Cependant, elle présente un inconvénient majeur du fait que les interactions qui lient l'enzyme au support sont faibles. L'enzyme peut ainsi se libérer au cours du temps surtout dans des conditions industrielles (concentrations élevées, forte agitation). En revanche, les fixations de type ioniques et covalentes sont généralement plus fortes. Les supports peuvent être des résines synthétiques, des biopolymères ou des polymères inorganiques tel que la silice et la zéolite (Cingöz, 2009; Sheldon, 2007a).

II.2.2.3.4. La réticulation (Cross-linking)

L'immobilisation sans support (Figure 2.6.D) est possible en utilisant un agent réticulant bifonctionnel pour lier les molécules d'enzymes sans recours à un support. Dans ce contexte, plusieurs techniques ont été développées: les enzymes réticulées dissoutes (CLEs), les cristaux d'enzymes réticulées (CLECs) et plus récemment les agrégats d'enzymes réticulées (CLEAs) (Miletić et al., 2012).

Au début des années 60, les avancées en chimie des protéines ont montré que la réticulation d'enzymes solubles, par l'intermédiaire de la réaction des groupements extérieurs $NH_2$ avec un produit chimique bifonctionnel tel que la glutaraldéhyde, conduit à la formation d'enzymes réticulées insolubles (CLEs) avec une conservation de l'activité catalytique. Cependant, l'usage de cette technique est restée limitée, vu qu'elle présente plusieurs inconvénients tels qu'une faible rétention d'activité catalytique, une mauvaise reproductibilité, une faible stabilité mécanique et des difficultés à gérer les CLEs gélatineux (Sheldon and van Pelt, 2013).

Par conséquent, dans les années 1990, des biologistes ont pu réaliser la préparation de cristaux d'enzymes réticulées (CLECs) (cross-linked enzyme crystals) alternatifs aux (CLEs). La méthodologie est principalement basée sur la cristallisation de l'enzyme dans une solution aqueuse à son pH optimal, suivie de la réticulation chimique par un agent réticulant. Les CLECs obtenus présentent une bonne stabilité opérationnelle et une taille de particules contrôlable avec une grande productivité ainsi qu'une séparation facile. Cependant, pour cette technique de réticulation, une grande pureté est exigée ce qui accroît le coût de préparation (Govardhan, 1999; Roessl et al., 2010).

La synthèse d'agrégats d'enzymes réticulées (CLEAs) est une technique alternative plus simple et moins chère qui a remplacé les CLECs. Elle a été développée initialement par le professeur Sheldon et ses collègues (Cao et al., 2000; Sheldon et al., 2005). En premier lieu, elle a été testée sur la pénicilline G acylase, puis généralisée pour un nombre impressionnant d'enzymes (Roessl et al., 2010). La formation des CLEAs rassemble, en une seule étape, deux processus : la purification et l'immobilisation. Le principal avantage de cette technique, comparée à celle utilisée pour la préparation des CLECs, est la possibilité d'agréger l'enzyme brute après son extraction, sans recours à la purification (Figure 2.7) (Sheldon, 2011).

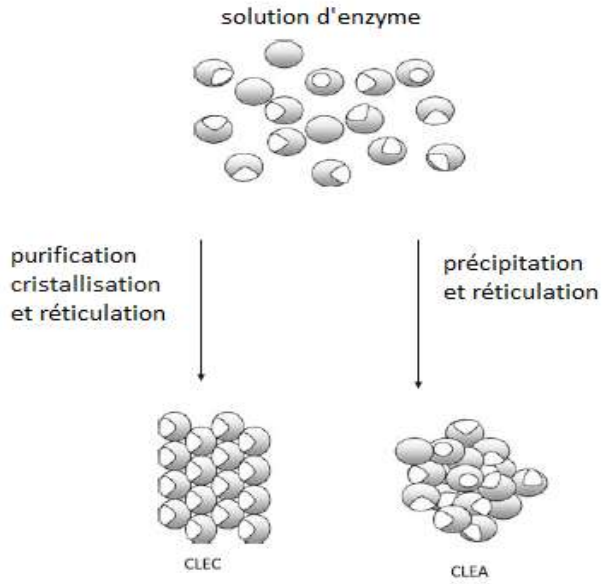



***Figure 2. 7.*** *Préparation des cristaux des enzymes réticulées (CLECs), et des agrégats d' enzymes réticulées (CLEAs) (Brady and Jordaan, 2009).*

En général, la méthode de préparation des CLEAs implique la précipitation de la solution aqueuse de l'enzyme accompagnée de l'ajout de solvants organiques miscibles à l'eau, de sels minéraux ou encore de polymères non-ioniques pour former des micro-agrégats qui sont liés entre eux par des liaisons non-covalentes, sans perturbation de leur structure tertiaire. La réticulation chimique débute en ajoutant un agent réticulant pour former des particules d'une taille variable entre 1 et 100 µm. L'agent réticulant le plus utilisé est la glutaraldéhyde vu sa disponibilité, sa faible toxicité et son coût modéré. La figure 2.8 illustre le mécanisme de réticulation lors de la formation des CLEAs (Roessl et al., 2010; Sheldon, 2011; Talekar et al., 2013).

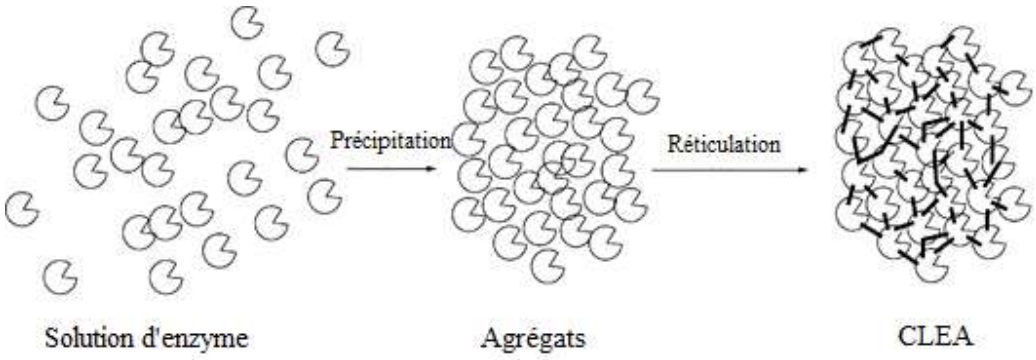



***Figure 2. 8.*** *La précipitation et l'agrégation d'une enzyme pour former les CLEAs (Hanefeld et al., 2009).*

Cette technique simple dans sa mise en œuvre, permet la réduction du coût de l'opération d'immobilisation sur support, tout en conservant un taux considérable de l'activité initiale de l'enzyme. Elle offre aussi certains avantages, tels que la stabilité thermique, chimique et mécanique suite à la formation d'une structure rigide des agrégats de l'enzyme. Les contraintes diffusionnelles rencontrées dans le cas de l'immobilisation sur support peuvent être réduites, vu que le substrat est en contact direct avec l'enzyme (Sheldon, 2007b; Sheldon and van Pelt, 2013). Un autre avantage de la technologie des CLEAs est qu'elle présente un excellent moyen pour préserver la structure quaternaire des enzymes.

La technique de préparation des CLEAs a été efficacement testée sur une large gamme d'enzymes telles que les hydrolases (lipases, estérases, amidases, protéases, nitrilases , glycosidases), les lyases (nitrile ,hydratases, oxynitrilases , aldolases) et les oxydoréductases (galactose oxydase, glucose oxydase, laccase) (Sheldon, 2011; Vinoth Kumar et al., 2012).

Les oxydoréductases figurent parmi les enzymes les plus utilisées dans le domaine du traitement des effluents. Comme leur nom l'indique, elles catalysent des réactions mettant en jeu des transferts d'électrons. Plusieurs oxydoréductases ont été citées dans la littérature pour réaliser la transformation ou la dégradation d'un certain nombre de composés, parmi elles les peroxydases.

## II.3. Peroxydases

### II.3.1. Généralités

Les Peroxydases (EC 1.11.1.X) sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation de plusieurs substrats organiques ou inorganiques par la réduction des peroxydes (ROOH) tels que le peroxyde d'hydrogène. Elles sont caractérisées par un poids moléculaire variable entre 35000 et 150000 Da (Banci, 1997; Battistuzzi et al., 2010; Mathé et al., 2010).

Selon leur site actif, on distingue les peroxydases héminiques, qui sont des peroxydases qui contiennent un groupement hème, les vanadiums peroxydases qui contiennent un groupement de vanadate au lieu du groupement hème, et les peroxydases non-

métalliques. Les plus connues sont les peroxydases héminiques dont le site actif, hème, est constitué d'une métalloporphyrine dont l'ion métallique est le fer ferrique ($Fe^{3+}$)(ferriprotoporphyrin IX) , associé à quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole par quatre liaisons de coordination qui portent un élément fer (Figure 2.9) (Delannoy et al., 2004).

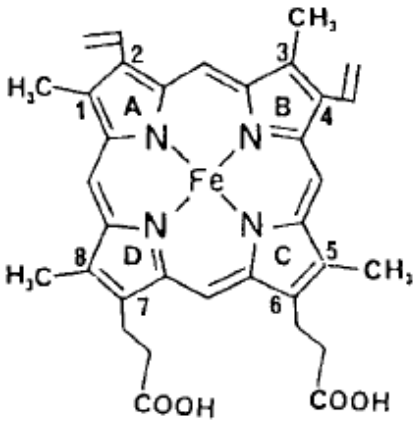



***Figure 2. 9.*** *Ferriprotoporphyrine IX ou hème b. (A, B, C, D) représentent les quatre noyaux pyrroles (Delannoy et al., 2004).*

Les peroxydases héminiques à leur tour se subdivisent en peroxydases du règne animal et non-animal (plantes, des champignons et des bactéries). Cette dernière famille a été organisée en trois classes essentielles en se basant sur la comparaison des séquences des acides aminés supportés par la structure tridimensionnelle des enzymes de chaque classe (Battistuzzi et al., 2010; Delannoy et al., 2004; Passardi et al., 2007; Veitch, 2004) :

- Classe I : Elle renferme les peroxydases d'origine intracellulaire procaryotique dont le cytochrome c peroxydase (CcP), les ascorbate peroxydases (AsP) et les catalase-peroxydases (CaP) bactériennes.
- Classe II : Elle consiste en peroxydases extracellulaires fongiques. Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont présentées chez un grand nombre de champignons. On distingue la lignine peroxydase (LiP) et le manganèse peroxydase (MnP).
- Classe III : Elle est constituée de peroxydases sécrétées par les plantes. Elle représente la classe des peroxydases les plus étudiées dont la HRP (horseradish peroxidase en anglais) ou peroxydase de Radis noir (Figure 2.10).

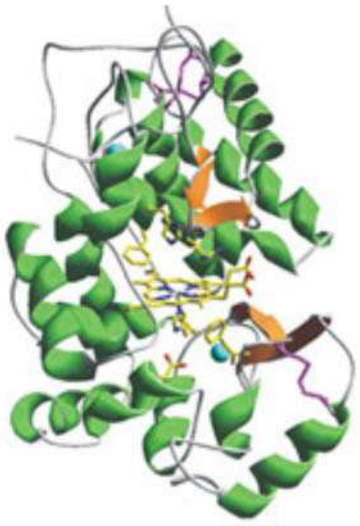


***Figure 2. 10.*** *Structure tridimensionnelle moléculaire de l'hème principale de la peroxydase de raifort HRP (horseradish peroxidase en anglais) obtenue par cristallographie aux rayons X (Torres and Ayala, 2010).*

En raison de leur activité vis-à-vis d'un large groupe de substrats, il est difficile, voire impossible, de dégager une réaction typique des peroxydases végétales (classe III). Néanmoins, elles partagent toutes un schéma réactionnel similaire selon l'équation suivante (Eq 2.5) (Bansal and Kanwar, 2013; Veitch, 2004) :

$$H_2O_2 + 2AH \xrightarrow{Peroxydase} 2H_2O + 2A^{\bullet} \qquad \text{(Eq 2.5)}$$

Les peroxydases oxydent leurs substrats de la même manière selon le cycle catalytique typique qui implique plusieurs réactions enchaînés (figure 2.11). La catalyse déclenchée par le $H_2O_2$ permet la formation d'une forme transitoire oxydée appelé composé I (Co I) avec la réduction de peroxyde d'hydrogène en eau. En régissant avec un substrat donneur de proton (AH), le composé I (Co I) donne lieu à un autre composé intermédiaire et instable nommé composé II (Co II) et libère le radical libre ($A^{\bullet}$). La réaction entre le compose II et une nouvelle molécule de substrat permet le retour de l'enzyme à l'état natif. Les radicaux libres libérés au cours du cycle catalytique peuvent former des polymères en réagissant entre eux (Banci, 1997; Rodríguez-López et al., 2001; van de Velde et al., 2001).

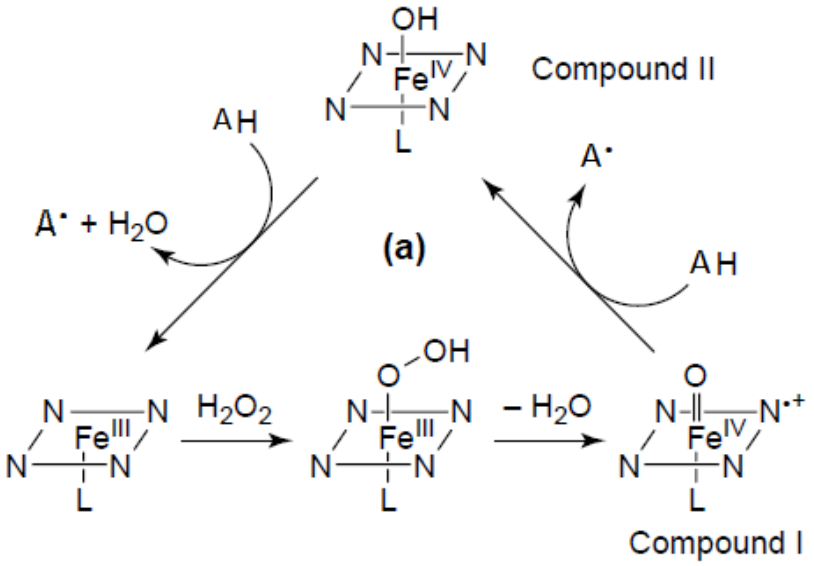



***Figure 2. 11.*** *Cycle catalytique de la peroxydase : AH le substrat, A˙ le radical libre (van de Velde et al., 2001)*

### II.3.2.Applications biotechnologiques environnementales des peroxydases

Les peroxidases ont le potentiel d'être employées à grande échelle dans les procédés industriels vu que ce sont des enzymes capables de donner lieu à plusieurs réactions d'oxydation, allant des réactions de couplage des radicaux, de l'insertion des molécules d'oxygène dans les substrats jusqu'à quelques types d'halogénation. Elles peuvent également oxyder sans sélectivité une variété importante de molécules riches en électrons. En outre, grâce à leur nature oxydante, elles peuvent remplacer les techniques d'oxydation courantes (Casella et al., 2010; Regalado et al., 2004).

Parmi leurs applications biotechnologiques, leur usage extensif dans la dégradation de substances organiques toxiques qui se trouvent dans les effluents industriels (Colonna et al., 1999). Le mécanisme d'action des peroxydases sur ces polluants organiques peut être réalisé à travers des réactions de polymérisation ou dépolymérisation, clivage des cycles aromatiques, oxydation ou minéralisation (Xu, 2005).

#### II.3.2.1. Biorestauration des composés phénoliques

Les composés phénoliques, plus spécifiquement les dérivés chlorés, sont très toxiques même à de très faibles concentrations (1µg.$L^{-1}$) (Torres et al., 2003). Ces composés sont largement utilisés dans une grande variété d'industries: la synthèse de résines et plastiques, le raffinage du pétrole, les textiles (Bansal and Kanwar, 2013; Regalado et

al., 2004). A cause de leur toxicité élevée, la réglementation environnementale limitant leur tolérance dans l'environnement devient de plus en plus stricte (ATSDR , 2013; US EPA, 2013).

La méthode d'élimination des dérivés phénoliques par la peroxydase conduit à la formation de polymères qui sont produites par réaction d'accouplement entre les radicaux phenoxyl. Ces polymères peuvent facilement être précipités et séparés par filtration ou par centrifugation (Torres et al., 2003). La réaction de polymérisation peut être décrite comme suit (Bansal and Kanwar, 2013; Casella et al., 2010) :

$$Enzyme + H_2O_2 \rightarrow Composé\ I + H_2O \qquad \text{(Eq 2.6)}$$

$$Composé\ I + PhOH \rightarrow Composé\ II + PhO^{\bullet} \qquad \text{(Eq 2.7)}$$

$$Composé\ II + PhOH \rightarrow Enzyme + PhO^{\bullet} + H_2O \qquad \text{(Eq 2.8)}$$

$$PhO^{\bullet} + PhO^{\bullet} \rightarrow Polymère\ phénolique \qquad \text{(Eq 2.9)}$$

La majorité des rapports portant sur l'élimination des dérivés phénoliques par la peroxydase décrivent l'utilisation de la peroxydase de raifort HRP (*Horseradish*). Dans des études récentes, Alemzadeh et ses collègues ont démontré que plus de 60% de phénol peuvent être éliminés par la HRP immobilisée par l'alginate de sodium (Alemzadeh and Nejati, 2009). Dans une autre étude de Bayramoglu , la dégradation du phénol et du p-chlorophénol a été étudiée dans un réacteur contenant de la HRP immobilisée par des liaisons covalentes. Dans les conditions de l'étude, plus de 90% des deux composés ont été éliminés (Bayramoğlu and Arıca, 2008). De même, Masuda et al ont établi que la peroxydase de *Coprinus cinereus* en excès conduit à une polymérisation totale du phénol pour une gamme de pH de 5 à 9 et des températures comprises entre 0 à 60°C (Masuda et al., 2001). D'autres travaux de recherche se sont également axés sur l'élimination de plusieurs dérivés phénoliques par différentes types de peroxydases (Entezari and Pétrier, 2004; Feng et al., 2013; Niu et al., 2013). La peroxydase de navet *Brassica Rapa* a aussi montré un potentiel intéressant comme biocatalyseur pour cette réaction (Azizi et al., 2014).

### II.3.2.2. Elimination des colorants synthétiques

La plupart des colorants synthétiques produits sont utilisés dans les industries du textile, de papeterie, l'agroalimentaire et les peintures. Les rejets contenant les colorants peuvent provoquer des dégâts néfastes sur la faune et sur la flore (Bansal and Kanwar, 2013). La dégradation enzymatique des colorants a fait l'objet de plusieurs travaux. Bhunia et al. (2001) ont réussi à polymériser des colorants azoïques, le bleu de Ramazole et le rouge Cibacron à l'aide de la HRP. Des rendements de l'ordre de 95% ont été obtenus avec la peroxydase de navet blanc *Brassica rapa* sous formes libre et immobilisée pour la dégradation du Rouge Congo (Ahmedi et al., 2012, 2015).

### II.3.2.3. L'hydroxylation des composés aromatiques

L'introduction d'une molécule d'oxygène dans les substrats organiques est le processus le plus important qui peut être catalysé par les peroxydases. Ces enzymes permettent l'oxydation sélective des molécules organiques sous des conditions modérées et contrôlées. L'avantage de cette application réside dans l'utilisation d'oxydants moins chers et peu nuisibles pour l'environnement (ex : Peroxyde d'hydrogène, dioxygène) (Colonna et al. 1999).

L'oxydation des composés aromatiques commence par l'hydroxylation de la liaison aliphatique C-H. La molécule d'oxygène impliquée au cours de cette transformation provient du peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) (Ullrich and Hofrichter, 2007). Des études récentes ont montré que la chloroperoxydase (CPO) est capable de catalyser l'oxydation du toluène et du benzène en benzaldéhydes correspondants (Ullrich and Hofrichter, 2007; Zaks and Dodds, 1995). Le mécanisme de l'oxydation benzylique du toluène a été proposé par Kinne et ses collègues (Kinne et al., 2010). La transformation a été catalysée par la peroxydase extracellulaire d'*Agrocybe aegerita*. L'oxydation du toluène conduit à la formation de benzaldéhyde et d'alcool benzoïque qui s'oxydent à leur tour pour donner l'acide benzoïque comme produit final du cycle de transformation (Figure 2.12).

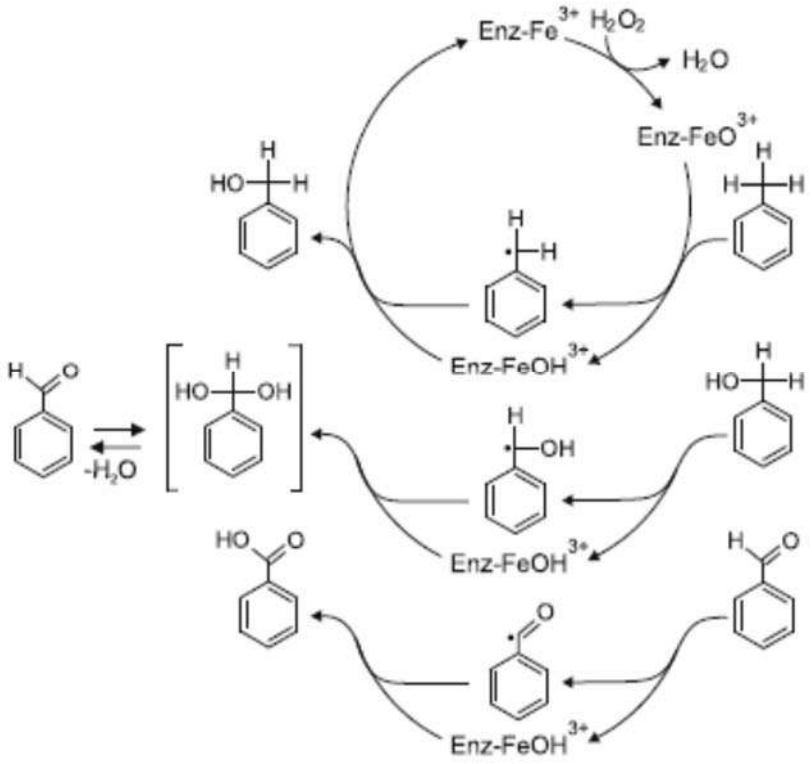



***Figure 2. 12.*** *Mécanisme de la transformation de toluène par la peroxydase(Kinne et al., 2010)*

## Conclusion et objectif de thèse

Des points essentiels ont été mis en évidence dans ce deuxième chapitre pour se rapprocher des enjeux de l'introduction des enzymes dans une phase organique. Les différentes méthodes et techniques de stabilisation ont été décrites en détails.

L'immobilisation des enzymes sous forme des CLEAs semble être une technique très prometteuse qui peut répondre aux exigences requises pour le traitement des COVs, décrites dans le premier chapitre. La simplicité de leur préparation, ainsi que leur stabilité technique décrites dans de nombreux travaux nous ont amenés à choisir cette technique pour entamer les essais de biodégradation de quelques COVs en milieu aqueux ou après leur absorption dans un solvant organique.

L'enzyme peroxydase a été également décrite en détails, vu son intérêt dans le traitement des effluents. La variété de réactions biotechnologiques pouvant être catalysées par cette enzyme et la diversité de ses substrats nous ont encouragés à la sélectionner parmi les oxydoréductases pour accomplir l'élimination des COVs.

L'objectif de la partie « expérimentale » est donc d'étudier la faisabilité de cette technique hybride innovatrice pour la dégradation de molécules modèles appartenant à

la famille des COVs, en un système hétérogène formé par la phase organique absorbante (l'huile de silicone) et la peroxydase immobilisée sous forme de CLEAs.

Le travail expérimental sera mené en plusieurs étapes :

- ✓ Préparation et caractérisation des CLEAs de peroxydase. Les paramètres optimaux pour l'obtention de CLEAs stables ayant une activité maximale seront déterminés. La stabilité des CLEAs sera également testée dans les solvants organiques, notamment dans l'huile de silicone.
- ✓ Préparation du milieu réactionnel : formé par le COV absorbé en phase organique. Les données d'équilibre des COVs choisis seront à déterminer dans le solvant étudié.
- ✓ Essais de biodégradation des COVs absorbés en système batch. Les effets de différents paramètres physico-chimiques seront étudiés et les cinétiques seront établies dans le but d'obtenir le rendement maximal d'élimination.

**Référence bibliographiques**

Ahmedi, A., Abouseoud, M., Couvert, A., and Amrane, A. (2012). Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (Brassica rapa) peroxidase. Z. Für Naturforschung C J. Biosci. *67*, 429–436.

Ahmedi, A., Abouseoud, M., Abdeltif, A., and Annabelle, C. (2015). Effect of Diffusion on Discoloration of Congo Red by Alginate Entrapped Turnip ( *Brassica rapa* ) Peroxidase. Enzyme Res. *2015*, 1–9.

Alemzadeh, I., and Nejati, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. J. Hazard. Mater. *166*, 1082–1086.

Amouroux, J., Blin, E., and Coquery, M. (2013). La chimie et la nature (EDP Sciences).

ATSDR ,Agency for toxic Substances and Disease Registry (2013). ATSDR – Priority List of Hazardous Substances.

Azizi, A., Abouseoud, M., and Ahmedi, A. (2014). Phenol removal by soluble and algi nate entrapped turnip peroxidase. J Biochem Tech *4*, 795–800.

Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. J. Biotechnol. *53*, 253–263.

Bansal, N., and Kanwar, S.S. (2013). Peroxidase(s) in Environment Protection. Sci. World J. *2013*, 1–9.

Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C.A., and Sola, M. (2010). Redox properties of heme peroxidases. Arch. Biochem. Biophys. *500*, 21–36.

Bayramoğlu, G., and Arıca, M.Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. J. Hazard. Mater. *156*, 148–155.

Bhunia, A., Durani, S., and Wangikar, P.P. (2001). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Biotechnol. Bioeng. *72*, 562–567.

Bickerstaff, G.F. (1997). Immobilization of Enzymes and Cells (Totowa, New Jersey: Humana Press).

Borel, J.-P., and Randoux, A. (1997). Biochimie dynamique (Paris: De Boeck Supérieur).

Brady, D., and Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. Biotechnol. Lett. *31*, 1639–1650.

Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? Curr. Opin. Chem. Biol. *9*, 217–226.

Cao, L., van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A. (2000). Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. Org. Lett. *2*, 1361–1364.

Casella, L., Monzani, E., and Nicolis, S. (2010). Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries. In Biocatalysis Based on Heme Peroxidases, E. Torres, and M. Ayala, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 111–153.

Choi, Y.S., and Yoo, Y.J. (2012). A hydrophilic and hydrophobic organic solvent mixture enhances enzyme stability in organic media. Biotechnol. Lett. *34*, 1131–1135.

Cingöz, A. (2009). Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse: synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., and Pasta, P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. Trends Biotechnol. *17*, 163–168.

Delannoy, É., Marmey, P., Penel, C., and Nicole, M. (2004). Les peroxydases végétales de classe III. Acta Bot. Gallica *151*, 353–380.

Drauz, K. (2012). Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook (John Wiley & Sons).

Duran, N., and Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Appl. Catal. B Environ. *28*, 83–99.

Entezari, M.H., and Pétrier, C. (2004). A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of phenol. Appl. Catal. B Environ. *53*, 257–263.

Feng, W., Taylor, K.E., Biswas, N., and Bewtra, J.K. (2013). Soybean peroxidase trapped in product precipitate during phenol polymerization retains activity and may be recycled: SBP, EC 1.11.1.7 trapped in precipitate during phenol polymerization retains activity. J. Chem. Technol. Biotechnol. *88*, 1429–1435.

Frénot, M., and Vierling, E. (2002). Biochimie des aliments: diététique du sujet bien portant (Wolters Kluwer France).

Govardhan, C. (1999). Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. Curr. Opin. Biotechnol. *10*, 331–335.

Gupta, M.N. (1992). Enzyme function in organic solvents. Eur J Biochem *203*, 25–32.

Gupta, M.N., and Roy, I. (2004). Enzymes in organic media: Forms, functions and applications. Eur. J. Biochem. *271*, 2575–2583.

Hanefeld, U., Gardossi, L., and Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. Chem Soc Rev *38*, 453–468.

Hernandez, K., and Fernandez-Lafuente, R. (2011). Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. Enzyme Microb. Technol. *48*, 107–122.

Illanes, A. (2008). Enzyme Biocatalysis ,Principles and Applications (Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V).

Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L., and Castro, G.R. (2012). Recent trends in biocatalysis engineering. Bioresour. Technol. *115*, 48–57.

IUBMB ,International Union of Biochemistry and Molecular Biology Nomenclature Committee, and Webb, E.C. (1992). Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes (Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press).

Iyer, P.V., and Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. Process Biochem. *43*, 1019–1032.

Jarrar, H. (2011). Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. Ecole nationale supèrieure de chimie de Montpellier.

Karam, J., and Nicell, J.A. (1997). Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. J Chem T Ech Biotechnol *69*, 141–153.

Kinne, M., Zeisig, C., Ullrich, R., Kayser, G., Hammel, K.E., and Hofrichter, M. (2010). Stepwise oxygenations of toluene and 4-nitrotoluene by a fungal peroxygenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. *397*, 18–21.

Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. Curr. Opin. Biotechnol. *13*, 345–351.

Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. Elsevier Sci. Publ. *14*, 141–144.

Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. Macmillan Mag. *409*, 241–246.

Koskinen, A.M.P., and Klibanov, A.M. (1996). Enzymatic Reactions in Organic Media (Dordrecht: Springer Science+Business Media Dordrecht).

Krishna, S.H. (2002). Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. Biotechnol. Adv. *20*, 239–267.

Marangoni, A.G. (2003). Enzyme kinetics: a modern approach (Hoboken, N.J: Wiley-Interscience).

Masuda, M., Sakurai, A., and Sakakibara, M. (2001). Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using Coprinus cinereus peroxidase. Enzyme Microb. Technol. *28*, 295–300.

Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., and Dunand, C. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. Arch. Biochem. Biophys. *500*, 58–65.

Mattos, C., and Ringe, D. (2001). Proteins in organic solvents. Curr. Opin. Struct. Biol. *11*, 761–764.

Miletić, N., Nastasović, A., and Loos, K. (2012). Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. Bioresour. Technol. *115*, 126–135.

Niu, J., Xu, J., Dai, Y., Xu, J., Guo, H., Sun, K., and Liu, R. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase by electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of pentachlorophenol in water. J. Hazard. Mater. *246-247*, 119–125.

Palmer, T., and Bonner, P.L. (2007). Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry (UK: Elsevier).

Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., et al. (2007). PeroxiBase: The peroxidase database. Phytochemistry *68*, 1605–1611.

Plou, F.J., Iborra, J.L., and Halling, P.J. (1998). Stability and Stabilization of Biocatalysts (Elsevier).

Regalado, C., García-Almendárez, B.E., and Duarte-Vázquez, M.A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. Phytochem. Rev. *3*, 243–256.

Rodríguez-López, J.N., Lowe, D.J., Hernández-Ruiz, J., Hiner, A.N.P., García-Cánovas, F., and Thorneley, R.N.F. (2001). Mechanism of Reaction of Hydrogen Peroxide with Horseradish Peroxidase: Identification of Intermediates in the Catalytic Cycle. J. Am. Chem. Soc. *123*, 11838–11847.

Roessl, U., Nahálka, J., and Nidetzky, B. (2010). Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. Biotechnol. Lett. *32*, 341–350.

Sheldon, R.A. (2007a). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. Adv. Synth. Catal. *349*, 1289–1307.

Sheldon, R.A. (2007b). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. Biochem. Soc. Trans. 35 6 2007.

Sheldon, R.A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Appl. Microbiol. Biotechnol. *92*, 467–477.

Sheldon, R.A., and van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chem Soc Rev *42*, 6223–6235.

Sheldon, R.A., Schoevaart, R., and Van Langen, L.M. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). Biocatal. Biotransformation *23*, 141–147.

Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R., and Kambale, S. (2013). Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). RSC Adv. *3*, 12485.

Torres, E., and Ayala, M. (2010). Biocatalysis Based on Heme Peroxidases (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Torres, E., Bustos-Jaimes, I., and Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. Appl. Catal. B Environ. *46*, 1–15.

Ullrich, R., and Hofrichter, M. (2007). Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. Cell. Mol. Life Sci. *64*, 271–293.

US EPA (2013). Phenol | Technology Transfer Network Air Toxics Web site | US EPA.

Veitch, N.C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phytochemistry *65*, 249–259.

Velde, F. van de, Rantwijk, F. van, and Sheldon, R.A. (2001). Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. Trends Biotechnol. *19*, 73–80.

Vinoth Kumar, V., Prem Kumar, M.P., Thiruvenkadaravi, K.V., Baskaralingam, P., Senthil Kumar, P., and Sivanesan, S. (2012). Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes. Bioresour. Technol. *119*, 28–34.

Voet, D., and Voet, J.G. (2005). Biochimie (De Boeck Supérieur).

Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. Ind. Biotechnol. *1*, 38–50.

Zaks, A., and Dodds, D.R. (1995). Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study. J. Am. Chem. Soc. *117*, 10419–10424.

Zhai, S., Taylor, R., Sanches, R., and Slater, N.K.H. (2003). Measurement oflyophilisation primary drying ratesby freeze-drying microscopy. Chem. Eng. Sci. *58*, 2313–2323.

# *Chapitre III*

# *Matériel et Méthodes*

Ce chapitre a comme objectif de décrire les différents produits, matériels, appareillages et moyens mis en place pour l'étude. Les différentes méthodes adoptées pour la réalisation de ce travail sont également décrites.

En premier lieu, les COVs modèles (phénol, 2-chlorophénol et toluène) choisis pour mener l'étude de leur dégradation par les BRP-CLEAs suite à leur absorption dans l'huile de silicone sont présentés.

En deuxième partie, le protocole suivi pour la préparation des agrégats de peroxydase réticulée (BRP-CLEAs), méthode sélectionnée pour immobiliser et stabiliser la peroxydase en milieu organique, est décrit. Les paramètres régissant le protocole de préparation seront optimisés sur la base de critères de choix. Une partie sera également consacrée à la caractérisation fonctionnelle et structurale des CLEAs du point de vue de leur stabilité thermique et chimique.

Enfin, la troisième partie concerne l'étude proprement dite, visant à mettre en œuvre les BRP-CLEAs pour la dégradation des COVs en phase organique. Une description des essais réalisés a été détaillée en adoptant une stratégie expérimentale monofactorielle ayant pour but l'obtention des valeurs optimales des paramètres de la réaction enzymatique.

## III.1. Enzymes, substrats et réactifs

### III.1. 1. Peroxydase

La peroxydase utilisée fait partie de la variété des peroxydases de classe III. Elle est extraite à partir d'une souche locale de navet blanc cultivé en Algérie, dont le nom scientifique est *Brassica Rapa.* Les fruits de *Brassica rapa* utilisés sont caractérisés par une longueur de 10 à 15 cm (Figure 3.1).

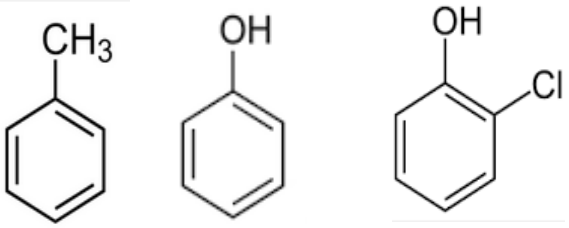


***Figure 3. 1.*** *Les navets de Brassica Rapa*

### III.1.2. Composé organiques volatiles modèles (substrats)

Trois COVs ont été choisis dans le cadre de cette étude : le phénol, le 2-chlorophénol et le toluène. Les propriétés physico-chimiques de ces trois composés sont reportées dans le tableau 3.1. Les critères de sélection de ces COVs sont discutés ci-après.

***Tableau 3. 1****. Propriétés physico-chimiques des COVs sélectionnés pour l'étude (Agteren et al., 1998; Wan-Ying Shiu et al., 1994)*

| | Toluène | Phénol | 2-chlorophénol |
|---|---|---|---|
| Formule brute | $C_7H_8$ | $C_6H_6O$ | $C_6H_5ClO$ |
| Masse molaire ($g.mol^{-1}$) | 92.14 | 94.11 | 128.56 |
| Masse volumique ($g.cm^{-3}$) | 0.867 | 1.07 | 1.24 |
| Température d'ébullition (°C) | 110.6 | 181.75 | 174.9 |
| Pression de vapeur saturante à 20°C (Pa) | $2.92.10^3$ | 47.04 | 200 |
| Solubilité dans l'eau à 25°C ($g.L^{-1}$) | 0.526 | 98 | 28.5 |
| Structure chimique |  | | |



III.1.2.1. Toluène

Le toluène est considéré comme un polluant prioritaire par l'agence américaine de protection de l'environnement et d'autres organismes (ATSDR , 2013; US EPA, 2013a).

Le toluène est un liquide incolore, très volatil, inflammable et explosif, c'est un constituant naturel du charbon et du pétrole. Il s'agit d'un composé aromatique monocyclique dont un hydrogène du cycle benzénique a été remplacé par un groupe méthyle (formule moléculaire : $C_6H_5CH_3$).

Le toluène est utilisé comme intermédiaire synthétique, additif dans les produits cosmétiques ou solvant dans les peintures, les adhésifs, les encres et les produits pharmaceutiques. Le toluène est également un substrat de synthèse de certains détergents et herbicides (Zeng et al., 2009).

Depuis de nombreuses années, il est utilisé comme produit de substitution du benzène, principalement à cause du pouvoir cancérogène de ce dernier. Le toluène pur n'est pas cancérogène et moins toxique que le benzène. Cependant, c'est un déprisant du système nerveux central et il est irritant pour la peau, les yeux et le système respiratoire (INRS, 2012; US EPA, 2013a).

Comme conséquence de son utilisation par divers secteurs industriels, il peut se retrouver dans l'environnement à des concentrations allant de 0.5 $\mu g.m^{-3}$ à quelques $mg.m^{-3}$ (US EPA, 2013a). De ce fait, sa concentration limite dans les rejets ne doit pas dépasser les 260 $\mu g.m^{-3}$ (INRS, 2012).

III.1.2.2. Phénol

Le phénol est caractérisé par une pression de vapeur saturante de 47.04 Pa à 20 °C, cette caractéristique lui valant d'être classé dans la famille des COVs (Ni et al., 2012; Wallace et al., 1996).

La toxicité du phénol est prise en compte par plusieurs institutions environnementales. L'US EPA a fixé une concentration limite de ce dernier dans l'air à 6 $\mu g.m^{-3}$ d'air. De nombreuses activités industrielles sont responsables des émissions de phénol: raffineries de pétrole, industrie de plastique, industrie pharmaceutique… (ATSDR , 2013; US EPA, 2013b).

III.1.2.3. 2-Chlorophénol

Le 2-chlorophenol (2-CP) fait partie de 19 chlorophénols existants. C'est un liquide aux conditions normales de température et de pression. Le 2-CP appartient à la famille des COVs chlorés et est le plus volatile dans la famille des dérivés phénoliques avec une pression de vapeur saturante de 200 Pa à 20°C.

Le 2-CP est principalement émis dans l'environnement par l'industrie papetière ou suite à l'incinération des déchets de bois vu qu'il est utilisé comme conservateur (Olaniran and Igbinosa, 2011).

Comme tous les composés récalcitrants, le 2-CP est classé parmi les polluants prioritaires par plusieurs organisations environnementales (ATSDR , 2013).

### III.1.3. Réactifs et produits chimiques

Les réactifs et produits utilisés sont tous de grade analytique, il s'agit de :

- Le toluène (98%), 2-Chlorophénol (99%), guaiacol ou 2-methoxyphénol (98%), peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$ à 30 et 50%), glutaraldéhyde (25 %, vol. dans l'eau), hexane (>99%), fournis par Sigma Aldrich (Allemagne).
- Le phénol (99%) et le phosphate de potassium monobasique ($KH_2PO_4$), fournis par Merck (Allemagne).
- Le bleu de Coomassie et le sérum d'albumine bovine (BSA) (poudre lyophilisée, ≥96%) ont été fournis par Sigma Aldrich.
- Les produits analytiques : le 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le ferricyanure de potassium sont fournis par Sigma Aldrich (Allemagne).
- Le benzaldéhyde (≥99.5%), l'alcool benzylique (99.8%) et l'acide benzoïque (>99%), fournis par Sigma Aldrich (Allemagne).

### III.1.4. L'huile de silicone

L'huile de silicone (polydiméthylsiloxanes ,PDMS ) est utilisée dans cette étude comme phase absorbante des COVs ; c'est également le milieu au sein duquel va se dérouler la réaction enzymatique. Les propriétés des deux huiles de silicone utilisées dans cette étude sont données dans le tableau 3.2 :

***Tableau 3.2**. Propriétés physico-chimiques de l'huile de silicone*

| Propriétés | PDMS 47V5 | PDMS 47V20 |
|---|---|---|
| Viscosité cinématique ($mm^2.s^{-1}$) à 25°C | 5 | 20 |
| Densité à 25°C | 0.910 | 0.950 |
| Masse molaire ($g.mol^{-1}$) | 900 à 1100 | 2800 à 3200 |
| Constante diélectrique à 25 °C | 2.59 | 2.68 |

L'huile de silicone est un solvant utilisé comme lubrifiant pour les machines industrielles, qui répond aux critères de choix des solvants utilisés pour l'absorption des gaz (voir chapitre I paragraphe I.3.3). Les huiles Rhodorsil 47 sont caractérisées par leur (Bluestar silicones, 2012; Darracq, 2011)**:**

- Inertie chimique
- Faible tension de vapeur et par conséquent une faible volatilité
- Bonne solubilité dans une large gamme de solvants tels que les hydrocarbures aliphatiques, aromatiques (BTX) et chlorés
- Non-inflammabilité
- Perméabilité aux gaz (dépend de la viscosité de l'huile, de la température, de la nature et de la pression du gaz).

## III.2. Préparation et caractérisation des agrégats des enzymes réticulés (CLEAs)

### III.2.1. Extraction de la peroxydase

Le jus frais de peroxydase est préparé selon les besoins. Une quantité de fruits présélectionnés de *Brassica rapa*, d'une longueur de 10 à 15 cm, préalablement lavés à l'eau et épluchés, sont broyés à l'aide d'une centrifugeuse à jus. L'extrait obtenu est filtré à travers une gaze propre pliée en double couche afin d'éliminer les résidus de pulpe. Le filtrat obtenu est conservé sous 4°C. Cette solution représente l'extrait brut de la peroxydase qui sera utilisé ultérieurement pour la préparation des CLEAs (Figure 3.5).

### III.2.2. Dosage de l'activité enzymatique

Les activités de l'extrait brut et celle des CLEAs préparées sont mesurées régulièrement après chaque opération d'extraction ou de préparation des CLEAs. La méthode de dosage est basée sur la réaction chromogénique de condensation du guaiacol, suite à son oxydation enzymatique par la peroxydase, en présence du peroxyde d'hydrogène pour former le tetraguaiacol (Figure 3.2) (Egley et al., 1983; Singh et al., 2012).

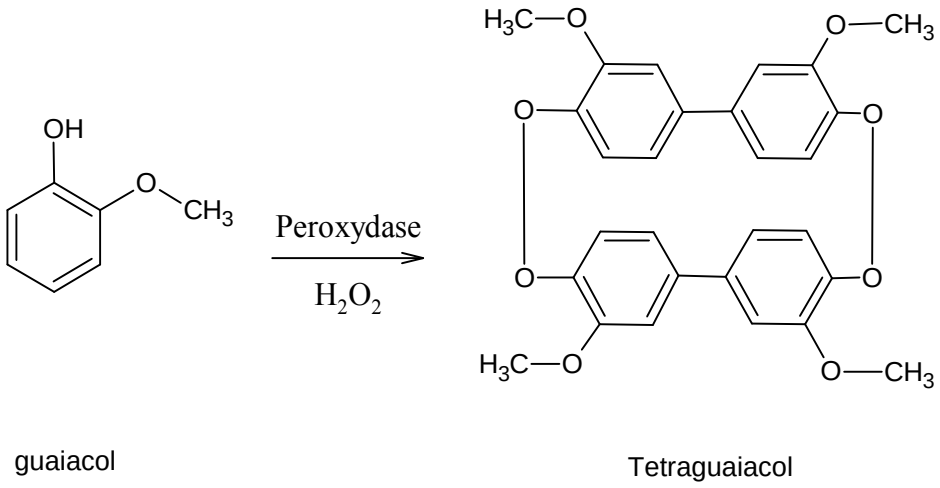



***Figure 3. 2.*** *Réaction de condensation du guaiacol catalysée par la peroxydase (Singh et al., 2012)*

La variation au cours du temps de la couleur, due à la formation du tetraguaiacol et mesurée par densité optique (D.O.), sera suivie par spectrophotométrie dans le domaine visible. L'activité enzymatique correspond à la vitesse initiale de la réaction mesurée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe obtenue.

Le mélange réactionnel est constitué de 3.9 ml de solution tampon (10 mM, pH= 7), 90 µL de l'extrait enzymatique ou 2 mg de CLEAs et 4.05 µL de guaiacol à 98%. La réaction est initiée par addition de 5 µL de $H_2O_2$ (0.8 M). Le changement de D.O. du mélange en fonction de temps est mesuré à la longueur d'onde d'absorption maximale caractéristique de tetraguaiacol (470 nm).

L'intensité de la couleur est convertie en concentration en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 4.279 µmol.ml$^{-1}$ déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage D.O. en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène (voir annexe 2). Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion de 1 µmol de peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C et pH =7. Elle est donnée en Unité Internationale (U.I.).

L'activité enzymatique (AE) sera donnée donc par l'équation (3.1) pour l'enzyme libre et l'équation (3.2) pour les CLEAs :

$$AE = \frac{UI}{ml\ d'enzyme} = \frac{\frac{dA}{dt} \times V_r}{\varepsilon \times V_E} \qquad \text{(Eq. 3.1)}$$

$$AE = \frac{UI}{mg\ des\ CLEAs} = \frac{\frac{dA}{dt} \times V_r}{\epsilon \times m_{CLEAs}} \qquad \text{(Eq. 3.2)}$$

Où :

dA/dt : la pente de la courbe de variation de la densité optique en fonction du temps.

$V_r$ : le volume de mélange réactionnel

ε : le coefficient d'extinction molaire.

$V_E$ : le volume d'extrait enzymatique utilisé lors du test de dosage de l'activité.

$m_{CLEAs}$ : la masse de CLEAs utilisée lors du test de dosage de l'activité.

### III.2.3. Dosage des protéines

La quantité totale de protéines dans les extraits enzymatiques est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). La liaison du bleu de Coomassie aux groupements cationiques et aux cycles aromatiques des protéines entrainent une augmentation de la longueur d'onde d'absorption de la couleur de 365 à 595 nm. L'intensité de la coloration obtenue mesurée en D.O. est proportionnelle à la quantité de protéines en solution.

Le réactif de Bradford utilisé est préparé selon la formulation décrite dans le tableau 3.3 :

***Tableau 3.3.*** *Composition de réactif de Bradford*

| *Elément* | Quantité |
|---|---|
| *Bleu de Coomassie* | 20 mg |
| *Ethanol absolu* | 25 mL |
| *Acide phosphorique 85%* | 50 mL |
| *Eau distillée* | Ajustement du volume à 500 mL |

III.2.3.1. Protocole de dosage des protéines

0.1 mL de l'échantillon enzymatique est ajouté à 0.25 mL de NaOH et 5 mL de réactif de Bradford. Après agitation et incubation 5 min à température ambiante, à l'abri de la lumière, le développement de la couleur est mesuré à 595 nm contre un blanc préparé de la même façon avec 0.1 mL de tampon de pH = 7.

La quantité de protéines est déterminée à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec le sérum d'albumine bovine BSA à des concentrations allant de 0 à 100 mg.$L^{-1}$ (Figure 3.3).

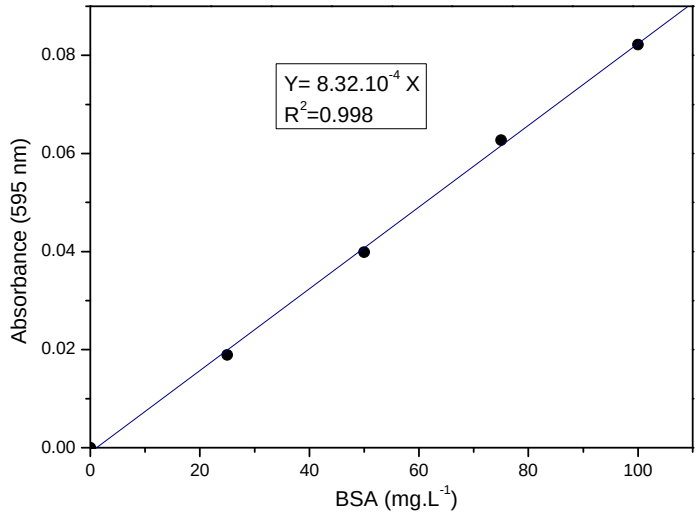



***Figure 3. 3.*** *Courbe d'étalonnage basée sur le BSA pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford*

### III.2.4. Réticulation

Les CLEAs de la peroxydase de *Brassica rapa* (BRP-CLEAs) sont préparées suivant un protocole standard décrit par Sheldon et ses collègues (Cao et al., 2000; Sheldon, 2011). Deux étapes sont essentielles : la précipitation de l'enzyme et la réticulation des agrégats formés.

Les conditions opératoires de la préparation telles que la nature du solvant précipitant, la concentration de la peroxydase et celle de l'agent de réticulation, le glutaraldéhyde, sont optimisées en se basant sur deux critères d'évaluation : l'activité résiduelle (Eq. 3.3) et le taux d'agrégation (Eq. 3.4).

$$\textit{Activité résiduelle (\%)} = \frac{\text{Activité totale des CLEAs } (U)}{\text{Activité totale de l'enzyme utilisée pour le préparation des CLEAs } (U)} \times 100$$

(Eq. 3.3)

$$\textit{Taux d'agrégation (\%)} = \left[1 - \frac{\text{activité totale de la solution résiduelle } (U)}{\text{activité totale de l'enzyme utilisée pour la préparation des CLEAs } (U)}\right] \times 100$$

(Eq. 3.4)

Le glutaraldéhyde est un réactif bifonctionnel (Figure 3.4) utilisé pour l'immobilisation covalente des protéines. Le glutaraldéhyde est choisi comme réticulant à cause de sa solubilité dans l'eau et dans les solvants polaires, sa capacité à former des liaisons stables avec les groupements d'amine primaire des molécules enzymatique ainsi que sa disponibilité et son coût peu élevé. A l'état pur, le glutaraldéhyde se présente sous forme d'un liquide huileux incolore ayant une odeur caractéristique. Il est soluble en toutes proportions dans l'eau et dans l'éthanol.

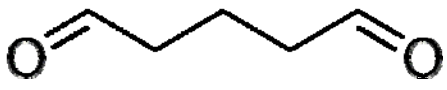


***Figure 3. 4.*** *Structure du glutaraldéhyde*

La méthode de préparation des BRP-CLEAs est présentée schématiquement sur la figure 3.5.

A l'aide d'une burette, trois volumes de solvant pré-refroidi (acétone, acétonitrile, éthanol, 2-propanol) sont ajoutés goutte à goutte à 12 ml de la solution enzymatique ayant une activité donnée, maintenue dans un Erlenmeyer sous agitation magnétique continue de 300 rpm, plongé dans un cristallisoir contenant de la glace pilée. Après addition de tout le volume de solvant, le mélange est mis au repos dans le réfrigérateur sous 4°C pendant 30 minutes.

Par la suite, les agrégats physiques des protéines formés sont réticulés en ajoutant un volume de glutaraldéhyde (25% vol.) de façon à obtenir des concentrations volumiques de l'ordre de 1, 1.5, 2, 2.5, et 3%. Le mélange est remis sous agitation pendant trois heures à une température ne dépassant pas 4°C. A la fin de la réaction, la solution est centrifugée à 4 000 rpm est les CLEAs obtenues sont lavées à l'eau distillée. L'activité des CLEAs ainsi que celles de la solution de lavage et du surnageant sont mesurées. Les CLEAs sont conservées dans le réfrigérateur (4°C), en solution tampon phosphate (50 mM, pH = 7).



1-Filtration de l'extrait brut



2-Précipitation des protéines



4- Centrifugation et lavage des CLEAs



3-Réticulation

***Figure 3. 5.*** *Etapes de la préparation des CLEAs.*

### III.2.5. Caractérisation des CLEAs

Les effets de quelques paramètres physico-chimiques et de la température sur l'activité des BRP-CLEAs sont étudiés afin de tester leur stabilité en vue de déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir l'efficacité maximale de l'acte catalytique. Les données relatives aux effets de pH et de température sont comparées à celles obtenues avec l'enzyme libre. L'effet de chaque paramètre est décrit par le terme de l'activité relative qui est définie comme l'activité des CLEAs montrée dans un point donné sur l'activité maximale trouvée dans la série.

III.2.5.1. Effet du pH

L'étude est réalisée avec des solutions tampon à 50 mM pour une gamme de pH allant de 2 à 9. Pour cela, une masse de 2 mg des CLEAs ou un volume 90 µL de l'extrait enzymatique brut sont introduits dans des vials contenant 4 mL d'une solution tampon à pH donné pendant 15 minutes. L'activité enzymatique de la préparation est calculée par la méthode au guaiacol décrite précédemment.

III.2.5.2. Effet de la température

L'activité catalytique des CLEAs et de l'enzyme brute a été évaluée après incubation des mélanges réactionnels constitués de 3.9 mL d'une solution tampon pH 7 à 10 mM et 2 mg de CLEAs ou 90 µL de l'extrait enzymatique brut à plusieurs températures, comprises entre 25 à 70°C pendant 15 minutes. Les solutions sont refroidies et l'activité catalytique résiduelle des préparations est évaluée après addition de 5 µL de $H_2O_2$ et 4.05 µL de guaiacol.

III.2.5.3. Effet des solvants organiques

La tolérance des CLEAs aux solvants organiques est évaluée. Six solvants ayant différentes polarités sont sélectionnés : l'hexane, l'huile de silicone (PDMS 47V5 et le PDMS 47V20), l'éthanol, l'acétone et le chloroforme. L'essai est effectué en incubant 20 mg de CLEAs dans chacun des solvants pendant 72 h. Après filtration et séchage par papier absorbant, l'activité résiduelle des CLEAs incubées dans chaque solvant est mesurée selon la méthode décrite en dessus.

III.2.5.4. Microscopie électronique à Balayage (MEB)

L'étude de la caractérisation structurale des BRP-CLEAs est réalisée par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). Cette technique permet l'observation des agrégats d'enzymes réticulées avec une très grande résolution.
Les CLEAs sont préalablement préparées par séchage à l'air libre et métallisation à l'or et au palladium. Les images sont prises à plusieurs amplifications à l'aide d'un microscope électronique marque JSM-630F (JEOL).

III.2.5.5. Stabilité en fonction du temps

Des échantillons de l'extrait enzymatique brut et des CLEAs sont préservés dans des solutions tamponnées (50 mM, pH7), dans des tubes fermés à l'abri de la lumière, sous 4°C, pendant 3 mois. Leur activité est mesurée régulièrement en fonction du temps.

## III.3. Détermination des coefficients de partage

Les coefficients de partage liquide/air du toluène et du 2-chlorophénol sont déterminés par une méthode statique à 25°C. Un volume précis de COV est introduit à l'aide d'une micro-seringue dans des vials de 22 mL hermétiquement fermés à l'aide de septums muni de capsules. Les vials contenant 5 mL d'eau ultra pure ou d'huile de silicone sont placés sur un agitateur rotatif à l'intérieur d'une étuve thermostatée pendant 72 heures (Figure 3.6).



***Figure 3. 6.*** *Carrousel pour mesurer les coefficients de partage*

Une fois l'équilibre entre les deux phases atteint, un prélèvement de 500 µL de la phase gazeuse est effectué, puis analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) muni d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF) selon les conditions décrites dans le tableau 3.4. La concentration des COVs dans la phase liquide à l'équilibre est alors déterminée à partir du bilan de matière décrit par l'équation (3.5) :

$$n_{total} = n_{gaz} + n_{liquide} \qquad \text{(Eq 3.5)}$$

où : $n_{total}$ : est le nombre total de moles de COV injecté dans le vial à t=0

$n_{gaz}$ : le nombre de moles de COV dans la phase gazeuse à l'équilibre

$n_{liquide}$ : le nombre de moles de COV dans la phase liquide à l'équilibre.

La concentration de COV en phase gazeuse est déterminée en utilisant des courbes d'étalonnage établies par injection d'un volume de COV (de 2 à 8 µL) à l'aide d'une micro-seringue de 10 µL dans des ballons calibrés de 2 L, hermétiquement fermés par des septums. Les ballons sont maintenus sous une agitation magnétique constante et uniforme. Une fois la phase gaz présente dans les ballons homogénéisée, 500 µL de gaz sont prélevés et analysés par la CPG-DIF (Figure 3.7).

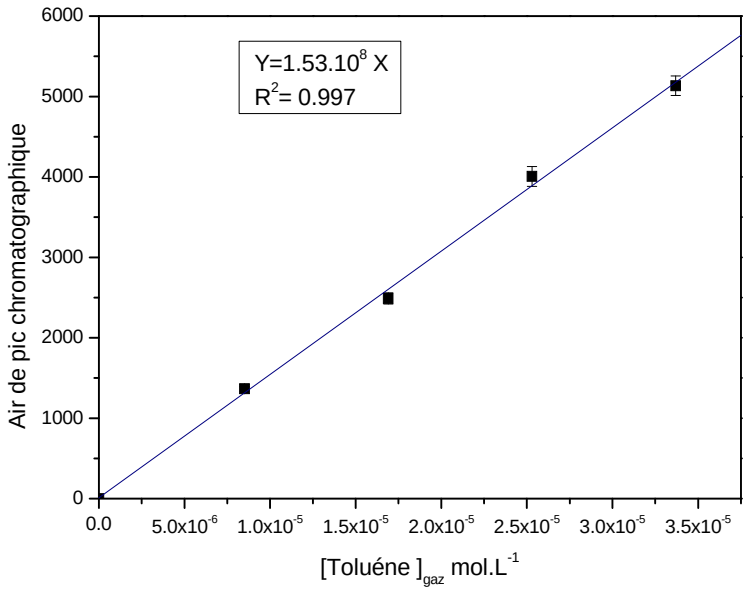



***Figure 3.7.*** *Exemple d'étalonnage du toluène dans la phase gaz*

Le rapport des concentrations de COV dans la phase gaz sur celle dans la phase liquide permet la détermination du coefficient de partage adimensionnel H (Eq. 3.6) :

$$H = \frac{C_{gaz}}{C_{liquide}} \left( \frac{g\ COV_{gaz} / L_{gaz}}{g\ COV_{liquide} / L_{liquide}} \right) \qquad \text{(Eq 3.6)}$$

Où : H : le coefficient de partage adimensionnel.

$C_{gaz}$ : la concentration en COV dans la phase gazeuse

$C_{liquide}$ : la concentration en COV dans la phase liquide.

Le coefficient dimensionnel H′ en $Pa.m^3.mol^{-1}$ se fait par multiplication de H par la température de travail en Kelvin (T) et par la constante des gaz parfaits R = 8.314 $Pa.m^3.mol^{-1}.K^{-1}$ (Eq 3.7).

$$H' = H.T.R \qquad \text{(Eq 3.7)}$$

***Tableau 3.4.*** *Conditions d'analyse chromatographiques par CPG pour la détermination du coefficient de partage liquide /gaz du 2-CP et du toluène*

| COV | Gaz vecteur ($N_2$) Débit ($mL.min^{-1}$) | Temperature (°C) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Four | Injecteur | Détecteur |
| 2-CP | 21 | 120 | 140 | 202 |
| toluène | 21 | 80 | 250 | 250 |

## III.4. Etude expérimentale de la dégradation des trois COVs par la peroxydase immobilisée de *Brassica rapa* (BRP-CLEAs) en système monophasique

L'étude expérimentale d'élimination des trois COVs (phénol, 2-CP et toluène) est menée en système discontinu (batch) dans des vials agités de 22 mL tout en suivant une optimisation mono-factorielle des conditions de la réaction. L'huile de silicone (PDMS 47V20) est choisie comme absorbant et milieu de dégradation enzymatique des COVs par BRP-CLEAs. Des essais similaires sont également menés dans les mêmes conditions en système aqueux pour comparer les performances des CLEAs dans leur milieu natif par rapport à l'huile de silicone.

### III.4.1. Dégradation du phénol et du 2-CP en phase aqueuse et organique

Les essais de dégradation du 2-CP et de phénol sont réalisés comme suit :

Des solutions mères (1000 $mg.L^{-1}$) des deux COVs sont préparées dans 50 mL de solvant (solution tampon pH= 7 à 10 mM ou PDMS 47V20) et conservées au frais sous 4°C dans des flacons bruns afin d'éviter tout changement de la concentration par évaporation ou sous l'effet de la lumière. Leur concentration est vérifiée périodiquement par la méthode de dosage appropriée.

Des volumes précis de la solution mère sont dilués à 5 mL dans des vials de 22 mL, avec un espace de tête. Des solutions de COVs à des concentrations variables sont ainsi obtenues. Après introduction d'une masse pré-pesée de BRP-CLEAs, les vials sont fermés à l'aide de septums munis d'une capsule (Figure 3.6)

La réaction enzymatique est déclenchée en injectant périodiquement à travers le septum 5 µL d'une solution de $H_2O_2$ fraichement préparée à une concentration donnée. Dans le but de favoriser le transfert de matière et maintenir une dispersion homogène des CLEAs, les vials sont maintenus à 25°C sous agitation magnétique constante, 300 rpm (milieu aqueux) ou 600 rpm (milieu organique), pendant toute la durée de la réaction.

Les cinétiques de dégradation des COVs sont suivies par échantillonnage effectué toutes les 20 minutes sur une durée totale de 140 minutes. Chaque vial prélevé est centrifugé à 4500 rpm, le surnageant est récupéré et conservé dans un vial de 2 mL, hermétiquement fermé, pour analyse par la méthode appropriée.



***Figure 3. 8.*** *Vials utilisés pour l'étude de dégradation des COVs en système monophasique fermé*

Les effets de la concentration du COV (phénol ou 2-CP), de la concentration de peroxyde d'hydrogène, ainsi que celle des CLEAs sur le rendement R (%) (Eq 3.8) et sur la vitesse de la réaction V ($mg.L^{-1}.min^{-1}$) (Eq 3.9) sont étudiés en variant un seul facteur à la fois. La valeur optimale de la variable donnant l'efficacité maximale sera ainsi fixée pour la suite de l'étude.

$$R\ (\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \qquad \text{(Eq 3.8)}$$

$$V = \frac{C_i - C_f}{\Delta t} \qquad \text{(Eq 3.9)}$$

Où :

$C_i$ : Concentration initiale de COV ($mg.L^{-1}$)

$C_f$ : Concentration finale de COV à la fin de la réaction ($mg.L^{-1}$)

$\Delta t$ : Durée de la réaction (min).

Afin de quantifier la dégradation « abiotique » (non-enzymatique), des essais « témoins » sont menés en parallèle dans les mêmes conditions mais en absence de CLEAs.

Le bilan matière des COVs présents dans les vials est décrit comme suit :

$$\grave{A}\ t=0 \qquad n_{tot} = n_{liquide} + n_{gaz} \qquad \text{(Eq 3.10)}$$

$n_{tot}$ : nombre total de moles de COV présent dans le vial a t=0

$n_{liquide}$ : nombre de moles de COV dans la phase liquide après le partage

$n_{gaz}$ : nombre de moles de COV dans la phase gaz

A la fin de la réaction, les concentrations de phénol et de 2-CP en phase gazeuse sont négligeables devant les concentrations en phase liquide, vues la bonne capacité d'absorption de l'huile de silicone et les volatilités relativement faibles du 2-CP et du phénol. Le bilan matière s'écrira donc (Eq 3.11) :

$$n_{tot} = n_{résiduelle\ liquide} + n_{dégradé\ liquide} \qquad \text{(Eq 3.11)}$$

Où :

$n_{tot}$ : le nombre total de moles de COV mis dans le vial a t=0.

$n_{résiduelle\ liquide}$ : le nombre de moles de COV non-dégradé restant dans la phase liquide.

$n_{dégradé\ liquide}$ : le nombre de moles de COV dégradé.

III.4.1.1. Recyclage des BRP-CLEAs

La régénérabilité du biocatalyseur enzymatique figure parmi les critères importants permettant de valider le choix des procédés à enzymes immobilisées comme solution rentable et efficace à l'échelle industrielle (Cao, 2005).

L'efficacité catalytique des BRP-CLEAs pour le traitement des COVs est testée lors de batchs successifs sous des conditions identiques. Entre deux batch successifs, les particules d'enzyme sont récupérées par centrifugation, lavées à l'eau distillée ou à l'éthanol (en cas de PDMS47V 20), puis réintroduites lors du batch suivant.

L'efficacité des BRP-CLEAs est évaluée en termes de capacité de d'éliminations traduites selon l'équation (3.12) :

$$\textit{Capacité de régénération (\%)} = \frac{Conversion\ de\ COV\ en\ \ batch\ (N°\ x)}{conversion\ de\ COV\ en\ batch\ (N°\ 1)} \times 100 \qquad \text{(Eq 3.12)}$$

III.4.1.2. Analyse du phénol et du 2-CP en phase aqueuse

Dans la phase aqueuse, la concentration résiduelle des composés phénoliques est déterminée en utilisant une méthode colorimétrique dans laquelle les dérivés phénoliques réagissent avec le 4-aminoantyperrine (4-AAP) en présence de ferricyanure de potassium en milieu alcalin (Bayramoğlu and Arıca, 2008; Bódalo et al., 2008; Feng et al., 2013). La procédure d'analyse est la suivante :

- Un échantillon de 2.4 mL de surnageant (après une dilution appropriée) est ajouté à 0.3 mL ferricyanure de potassium (83.4 mM) et 0.3 mL de 4-Aap (20.8 mM).
- Le mélange est incubé à l'obscurité pour quelques minutes pour permettre le développement de la couleur.
- L'intensité de la couleur est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 510 nm.

Les concentrations de phénol et de 2-CP sont déduites grâce aux coefficients d'extinction obtenus à partir des courbes de calibration de ces deux derniers réalisées de la même manière (voir annexe .3).

III.4.1.3. Méthode d'analyse du phénol dans le PDMS 47V20

Dans l'huile de silicone, le phénol est dosé directement par un spectrophotomètre UV-Visible, à la longueur d'onde d'absorption maximale du phénol, 270 nm. Les échantillons dont la densité optique dépasse 1 sont diluées avec de l'isopropanol (voir annexe 3).

III.4.1.4. Méthode d'analyse de 2-CP dans le PDMS 47V20

La concentration résiduelle de 2-CP dans le PDMS 47V20 est analysée par chromatographie en phase gazeuse à détecteur d'ionisation de flamme (CPG-DIF). L'appareil de type Thermo Focus est muni d'une colonne $RTx^{-1}$ (15 m×0.32 mm) avec

une épaisseur de film de 0.25 µm. Un volume de 1 ml d'échantillon de 2-CP dans le PDMS 47V20 est dilué dans 1 ml de l'hexane pur (99%) (ratio volumique 1 :1), puis 2 µL de mélange sont injectés dans la colonne du CPG-DIF. Les concentrations de 2-CP sont déduites par la transformation de l'air de pic chromatographique en concentration grâce à la courbe d'étalonnage établie préalablement (voir annexe .3). Les conditions d'analyse chromatographique sont reportées dans le tableau 3.5.

***Tableau 3. 5.*** *Conditions chromatographiques d'analyse de 2-CP dans l'huile de silicone 47V20*

| COV | Gaz vecteur ($N_2$) Débit ($mL.min^{-1}$) | Température (°C) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Four | Injecteur | Détecteur |
| 2-CP | 21 | 140 | 220 | 202 |

### III.4.2. Dégradation du toluène en phase aqueuse et organique

Un volume de 10 mL d'huile de PDMS 47V20 est introduit, ainsi que la masse de CLEAs souhaitée, dans des vials de 22 mL avec un espace de phase gaz de 12 mL. Les vials sont fermés par des septums et sertis avec des capsules métalliques afin d'éviter toute fuite de gaz. Un volume de toluène est ensuite injecté à travers le septum dans la phase liquide et les vials sont placés sous agitation magnétique à l'intérieur d'une étuve réfrigérée à 25°C pour permettre l'établissement de l'équilibre entre les deux phases.

Une fois l'équilibre établi, la réaction est lancée par injection de 25 µL de $H_2O_2$ (4 M) à t=0 à travers le septum. Le même volume de $H_2O_2$ est injecté 4 fois durant la réaction tout en gardant les vials sous une agitation constante pendant toute la durée de réaction de 6 heures.

A la fin de la réaction, la concentration de toluène en phase gazeuse est analysée sur un prélèvement de 500 µL effectué à travers le septum. L'analyse se fait par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur d'ionisation de flamme selon les conditions décrites dans le tableau 3.6. Les prélèvements effectués sont tripliqués afin de s'assurer de la répétabilité de la mesure.

Des tests « témoins », en absence des CLEAs, sont menés dans les mêmes conditions pour quantifier le taux de dégradation abiotique du toluène.

En considérant que les vials sont hermétiquement fermé donc il n'y a pas des fuites. La quantité de toluène dans les vials est déterminée par le bilan de matière décrit par l'équation (3.13).

$$n_{tot} = n_{liquide} + n_{gaz} \qquad \text{(Eq 3.13)}$$

Où :

$n_{tot}$ : nombre de mole totale de toluène dans le vial à un instant t.

$n_{liquide}$ : nombre de moles de toluène dans la phase liquide.

$n_{gaz}$ : nombre de moles de toluène dans la phase gaz.

La quantité de toluène résiduelle dans la phase liquide est déduite à partir du coefficient de partage de ce dernier entre l'huile de silicone et l'air, puisqu'à tout instant le toluène est en équilibre entre ces deux phases.

$$C_{liquide} = \frac{C_{gaz}}{H} \quad \text{et} \quad n_{liquide} = \left(\frac{C_{gaz}}{H}\right) V_{liquide} \qquad \text{(Eq 3.14)}$$

***Tableau 3. 6.*** *Conditions d'analyse chromatographiques par CPG FID du toluène dans l'huile de silicone 47V20*

| COV | Gaz vecteur ($N_2$) Débit ($mL.min^{-1}$) | Température (°C) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Four | Injecteur | Détecteur |
| Toluène | 21 | 80 | 250 | 250 |

Afin d'optimiser la réaction, différentes durées de réaction, ainsi que différentes concentrations de toluène, de peroxyde d'hydrogène et de CLEAs, sont testées afin de déduire les valeurs qui permettent d'obtenir une efficacité maximale du procédé, évaluée à travers le calcul du rendement et de la vitesse de dégradation.

A titre comparatif, des essais sont aussi menés dans les mêmes conditions en milieu aqueux.

**Conclusion de chapitre**

En conclusion, les points essentiels pris en considération durant le déroulement des expériences sont les suivants :

- L'activité catalytique des BRP-CLEAs est vérifiée avant chaque utilisation par le teste décrit dans ce chapitre ainsi que la concentration des solutions stockés ($H_2O_2$, Phénol, 2-CP) par la méthode d'analyse appropriée.
- les essais réalisés sur les trois COVs sont similairement accompagnés par des témoins dans toutes les étapes de l'étude.
- Notant que le dosage de la phase gaz est une analyse sensible. Chaque vial était analysé trois fois, afin de s'assurer de la valeur trouvée.

**Référence bibliographiques**

Agteren, M.H., Keuning, S., and Janssen, D.B. (1998). Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds (Dordrecht: Springer Netherlands).

ATSDR ,Agency for toxic Substances and Disease Registry (2013). ATSDR – Priority List of Hazardous Substances.

Bayramoğlu, G., and Arıca, M.Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. J. Hazard. Mater. *156*, 148–155.

Bluestar silicones (2012). Rhodorsil® Huiles 47 Information technique.

Bódalo, A., Bastida, J., Máximo, M.F., Montiel, M.C., Gómez, M., and Murcia, M.D. (2008). A comparative study of free and immobilized soybean and horseradish peroxidases for 4-chlorophenol removal: protective effects of immobilization. Bioprocess Biosyst. Eng. *31*, 587–593.

Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? Curr. Opin. Chem. Biol. *9*, 217–226.

Cao, L., van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A. (2000). Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. Org. Lett. *2*, 1361–1364.

Darracq, G. (2011). Couplage de l'absorption dans une phase organique et de la biodégradation dans un réacteur multiphasique Application au traitement de Composés Organiques Volatils hydrophobes. École nationale supérieure de chimie de Rennes.

Egley, G.H., Jr, R.N.P., Vaughn, K.C., and Duke, S.O. (1983). Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in Sida spinosa L. Planta *157*, 224–232.

Feng, W., Taylor, K.E., Biswas, N., and Bewtra, J.K. (2013). Soybean peroxidase trapped in product precipitate during phenol polymerization retains activity and may be recycled: SBP, EC 1.11.1.7 trapped in precipitate during phenol polymerization retains activity. J. Chem. Technol. Biotechnol. *88*, 1429–1435.

INRS, Institut Nationale de Recherche et de Sécurité (2012). Fiche toxicologique de toluène.

M.Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. *72*, 248–254.

Ni, J.-Q., Robarge, W.P., Xiao, C., and Heber, A.J. (2012). Volatile organic compounds at swine facilities: A critical review. Chemosphere *89*, 769–788.

Olaniran, A.O., and Igbinosa, E.O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. Chemosphere *83*, 1297–1306.

Sheldon, R.A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Appl. Microbiol. Biotechnol. *92*, 467–477.

Singh, P., Prakash, R., and Shah, K. (2012). Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: Prospects for enzyme based applications. Talanta *97*, 204–210.

US EPA (2013a). Toluene | Technology Transfer Network Air Toxics Web site | US EPA.

US EPA (2013b). Phenol | Technology Transfer Network Air Toxics Web site | US EPA.

Wallace, J.C., Basu, I., and Hites, R.A. (1996). Sampling and Analysis Artifacts Caused by Elevated Indoor Air Polychlorinated Biphenyl Concentrations. Environ. Sci. Technol. *30*, 2730–2734.

Wan-Ying Shiu, Kuo-Ching Ma, Dana Varhanickova, and Donald Mackay (1994). Chlorophenols and Alkylphenols: A Review and Correlation of Environmentally Relevant Properties and Fate in an Evaluative Environment. Chemosphere *29*, 1155–1224.

Zeng, X., Wu, J., Zhang, D., Li, G., Zhang, S., Zhao, H., An, T., Wang, X., Fu, J., and Sheng, G. (2009). Degradation of toluene gas at the surface of ZnO/SnO2 photocatalysts in a baffled bed reactor. Res. Chem. Intermed. *35*, 827–838.

# *Chapitre IV*

# *Caractérisation des agrégats de la Peroxydase de* **Brassica rapa** *réticulée (BRP-CLEAS)*

Le premier objectif de cette partie est de caractériser et d'évaluer le biocatalyseur qui doit être mis en œuvre dans le procédé de traitement de COVs absorbés dans une phase organique.

Plusieurs études ont prouvé la capacité de la peroxydase issue de *Brassica rapa* à dégrader des composés récalcitrants, notamment le phénol et les colorants azoïques. Cependant, et pour ce qui concerne la préparation de CLEAs de cette peroxydase, à l'heure actuelle, aucune étude ne semble être répertoriée dans la littérature.

Cette méthode d'immobilisation doit garantir de bonnes performances au biocatalyseur afin d'avoir une activité significative dans le solvant d'absorption, qui n'est pas le milieu habituel et optimal pour la mise en œuvre de ces biocatalyseurs. En effet, les CLEAs sont censées être faciles à manipuler et à mettre en œuvre ; thermiquement et chimiquement stables et conservent leur activité lors d'un stockage sous des conditions normales.

# IV. 1. Optimisation de la préparation des BRP-CLEAs

La préparation des CLEAs a été réalisée en deux étapes essentielles, la précipitation et la réticulation à l'aide d'un agent réticulant. Cette technique d'immobilisation nécessite l'optimisation de quelques paramètres qui influent directement sur l'activité, la quantité et la forme des CLEAs obtenues.

## IV.1.1. Effet du solvant de précipitation

Le solvant de précipitation joue un rôle primordial dans le procédé de préparation des CLEAs. D'un côté, il doit garantir la précipitation de la quantité maximale des protéines suspendues dans la préparation enzymatique, et d'un autre, il préserve leur activité catalytique. Pour atteindre cet objectif, quatre solvants organiques ont été comparés, l'éthanol, l'acétone, l'acétonitrile et le 2-propanol. Les solvants ont été introduits dans la solution enzymatique dans les proportions suivantes (Solvant : enzyme (v/v) 3:1). Deux paramètres sont examinés pour évaluer leur effet : l'activité résiduelle et le taux d'agrégation, dont les résultats sont représentés sur la figure 4.1.

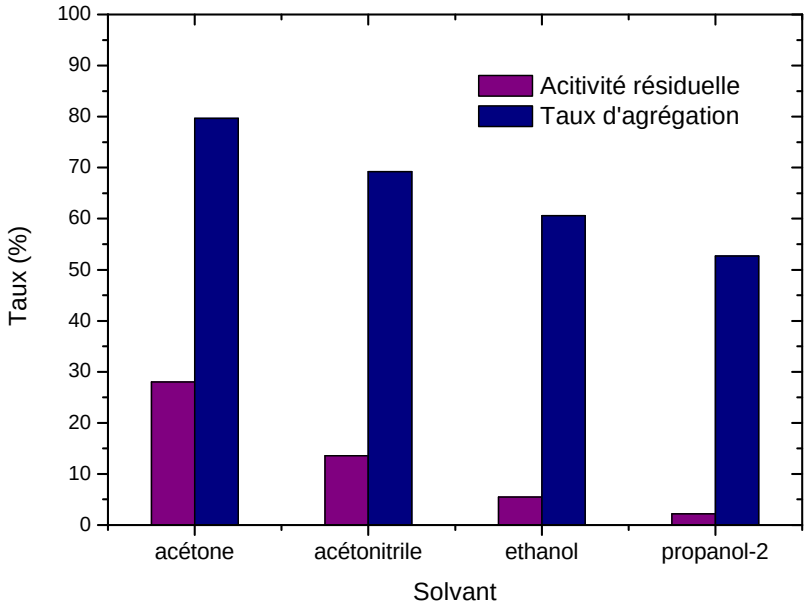



***Figure 4. 1.*** *Effet du solvant de précipitation sur l'activité résiduelle et le taux d'agrégation (Conditions : Solvant : enzyme (v/v) 3:1, 2% de GA, 87.06 UI.mg$^{-1}$ de peroxydase, à 4°C, 3 h de réaction).*

La figure démontre l'effet du solvant sur les deux facteurs. L'activité résiduelle des BRP-CLEAs est significativement inférieure à 10% quand l'éthanol et le 2-propanol sont utilisés comme précipitants. En effet, un taux important d'activité enzymatique a été perdu dans la solution résiduelle après la récupération des CLEAs par centrifugation et au cours du lavage. Ceci peut être expliqué par le fait que ces deux solvants provoquent une dénaturation partielle de la peroxydase à cause de liaisons du type ponts d'hydrogène avec les groupements des acides aminés sur les molécules d'enzymes. De meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acétonitrile (15% d'activité résiduelle et 69% de taux d'agrégation). Des valeurs maximales de 28% et 78% pour l'activité résiduelle et le taux d'agrégation ont respectivement été obtenues avec l'acétone, qui a donc été choisi comme solvant de précipitation pour la préparation des BRP-CLEAs.

### IV.1.2. Effet de la concentration de peroxydase

Pour évaluer l'effet de la concentration d'enzyme, la solution mère de peroxydase a été introduite à différentes dilutions dont l'activité totale et la concentration en protéines ont été mesurées (tableau 4.1). Le protocole de préparation a été réalisé en utilisant l'acétone comme précipitant et le glutaraldéhyde à une concentration de 2%.

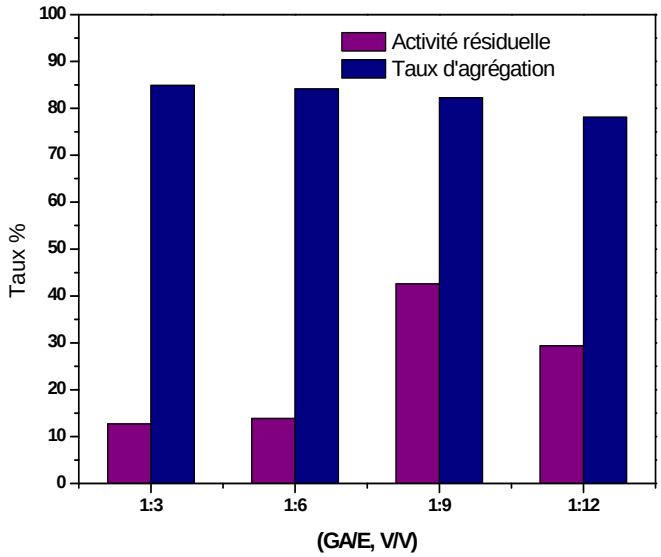



***Figure 4. 2.*** *Effet de la concentration de peroxydase sur l'activité résiduelle et le taux d'agrégation. (Conditions : Acétone : enzyme (v/v) 3:1, 2% de GA, à 4°C, 3 h de réaction).*

***Tableau.4. 1.*** *Caractéristiques de la solution enzymatique initiale*

| Concentration d'enzyme (GA/E, V/V) | Quantité totale de protéines (mg) | Activité initiale totale (UI) | Activité spécifique (UI/mg) |
|---|---|---|---|
| 1 :3 | 3.1 | 187.2 | 60.38 |
| 1 :6 | 5.3 | 374.4 | 70.64 |
| 1 :9 | 7.5 | 561.6 | 74.88 |
| 1 :12 | 8.6 | 748.8 | 87.06 |

A partir des résultats, on déduit que pour une concentration donnée de glutaraldéhyde et en utilisant l'acétone comme précipitant, l'activité résiduelle des BRP-CLEAs dépend fortement de la concentration enzymatique. Elle augmente avec la concentration et atteint son maximum (40%) pour une valeur d'activité totale initiale égale à 561 UI correspondant à 7.5 mg de protéines. Au-delà de cette valeur, l'activité des CLEAs rediminue suite à l'encombrement stérique et à une quantité insuffisante d'agent réticulant dans le milieu. L'efficacité du protocole est aussi démontrée par le fait que le taux d'agrégation n'est pas affecté de manière significative par l'augmentation de la concentration enzymatique. Une valeur de 561 UI a donc été considérée comme la valeur optimale et a été utilisée pour le reste de l'étude.

### IV.1.3. Effet de la concentration de glutaraldéhyde

La concentration de l'agent de réticulation influe directement l'activité, la stabilité et la taille des CLEAs résultantes. Le glutaraldéhyde est généralement le réticulant de choix du fait de sa disponibilité, de son faible coût et de sa faible toxicité. Le glutaraldéhyde est une petite molécule réactive qui peut pénétrer à l'intérieur de la structure de la protéine et réagir sur les fonctions amines primaires pour conduire à une liaison amine, qui est stabilisée par résonance avec la fonction éthylénique donnant ainsi une structure rigide (Matijošytė et al., 2010; Sheldon, 2011). L'influence de la concentration de ce dernier sur l'activité résiduelle des BRP-CLEAS et sur le taux d'agrégation est montrée sur la figure 4.3.

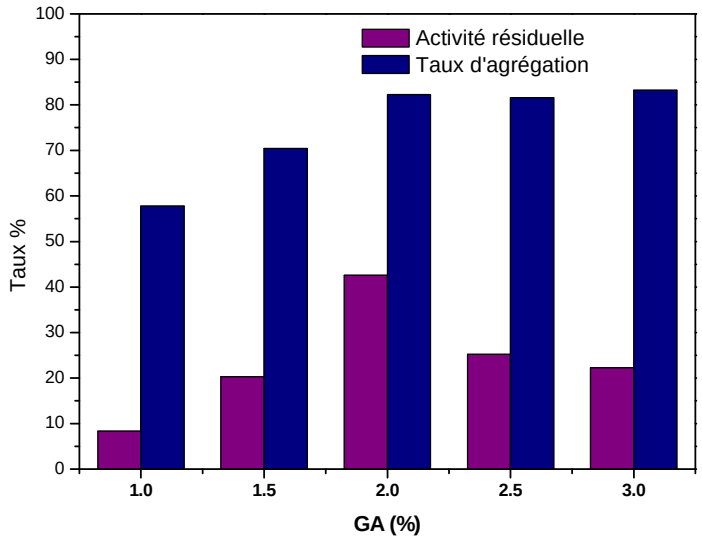



***Figure 4. 3.*** *Effet de la concentration de glutaraldéhyde sur l'activité résiduelle et sur le taux d'agrégation (Conditions : Acétone : enzyme (v/v) 3:1, 74.88 UI.mg$^{-1}$ de peroxydase à 4°C, 3 h de réaction).*

A des concentrations en glutaraldéhyde inférieures à 2%, une quantité considérable de l'enzyme n'est pas réticulée et est par conséquent perdue dans la solution résiduelle ou durant l'opération de lavage. L'augmentation de la concentration de glutaraldéhyde, à raison de 0.5%, a engendré la formation d'une quantité considérable des CLEAs. A 2% de glutaraldéhyde (V/V), plus de 42.5% d'activité de la peroxydase est retenue dans les CLEAs, et cette augmentation d'activité résiduelle est accompagnée d'une augmentation du taux d'agrégation, suite à la présence d'un nombre important de molécules d'agent réticulant. Au-delà de cette valeur (2%), l'activité récupérée diminue à cause de la perte de flexibilité de l'enzyme, qui est nécessaire à l'activité catalytique dans les CLEAs (Sheldon, 2011). En parallèle, on ne constate pas de changement significatif du taux d'agrégation au-delà de 2% de GA ; sa valeur reste de l'ordre de 81±1%.

En conclusion, la préparation optimale des BRP-CLEAs nécessite pour un volume de solution enzymatique, 3 volumes d'acétone comme agent précipitant, une activité initiale totale de 561 UI ou 75 UI.mg$^{-1}$ d'activité spécifique et 2% de glutaraldéhyde (à 25% dans l'eau). Les conditions opératoires sont décrites dans la partie Matériel et Méthodes.

## IV.2. Caractérisation des BRP-CLEAs

### IV.2.1. Effet du pH sur les BRP-CLEAs et l'enzyme libre

Les conversions peuvent être réalisées sous différentes conditions de pH, ce qui nécessite l'étude de la stabilité des préparations enzymatiques pour différents pH. La stabilité catalytique des CLEAs et celle de l'enzyme brute ont été testées en fonction du pH du milieu. Les résultats sont illustrés sur la Figure 4.4.

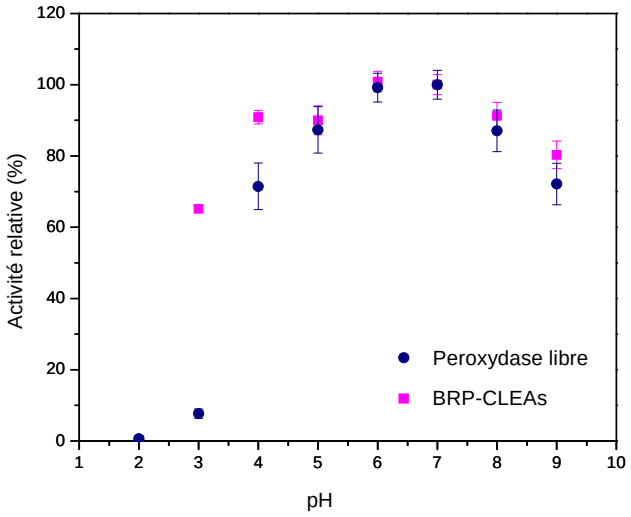



***Figure 4. 4.*** *Effet de pH sur l'activité des BRP-CLEAS et de la peroxydase libre*

Les résultats montrent que les BRP-CLEAs présentent une meilleure stabilité vis-à-vis de variations du pH par rapport à l'enzyme libre. L'activité relative des BRP-CLEAs est de l'ordre de 65% à pH 3 alors qu'elle ne dépasse pas 8 % pour l'enzyme libre. La gamme de pH optimal se trouve dans l'intervalle de pH 6 à 7 pour les deux formes de l'enzyme. Cette meilleure stabilité des CLEAs par rapport à l'enzyme libre est en accord avec des études précédentes sur la peroxydase de radis (Mohamed et al., 2013; Xu et al., 2013).

### IV.2.2. Stabilité thermique des BRP-CLEAs et de l'enzyme libre

La température peut avoir deux effets contradictoires en catalyse enzymatique. D'une part, elle peut augmenter la vitesse des réactions en augmentant le nombre de collisions entre le substrat et l'enzyme et d'autre part elle peut provoquer une désactivation

(dénaturation) réversible de l'enzyme. La thermostabilité des enzymes immobilisées est d'une grande importance pour le déroulement optimal de l'acte catalytique.

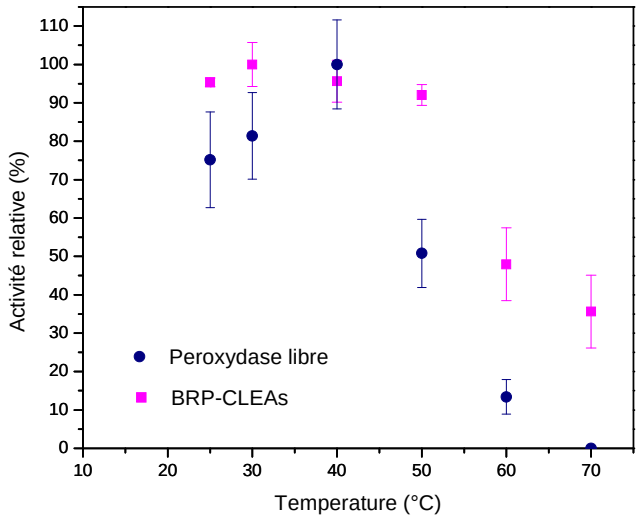



***Figure 4. 5.*** *Effet de la température sur l'activité des BRP-CLEAS et de la peroxydase libre*

Les deux courbes présentées sur la figure 4.5 montrant les résultats de l'étude de l'influence de la variation de température sur l'activité reflètent clairement la différence de comportement des deux formes enzymatiques. La thermostabilité des BRP-CLEAs a été bien conservée sur l'intervalle de 25 à 50°C et elle reste supérieure à 35% au-delà de 50°C. Par contre, l'enzyme libre montre une activité optimale à 40°C et une chute dramatique d'activité est constatée pour des températures plus élevées, qui peut être attribuée à l'inactivation (dénaturation) progressive de la protéine enzymatique. Cette dénaturation est d'autant plus prononcée que la température augmente. Ainsi, nous avons démontré que l'immobilisation de la peroxydase sous forme de CLEAs renforce la stabilité de sa structure tertiaire contre la dénaturation par la chaleur. Ce résultat a été confirmé par plusieurs auteurs sur une variété d'enzymes (Cao et al., 2000; Vaidya et al., 2012; Zheng et al., 2011). Par ailleurs, la conservation de l'activité optimale des BRP-CLEAs à des températures proches de l'ambiant, est une caractéristique importante en vue de leur utilisation dans le procédé de traitement couplé à l'absorption des COVs qui est favorisée à basse température vue la volatilité élevée de ces composés.

### IV.2.3. Stabilité dans le temps des BRP-CLEAs

Les BRP-CLEAs ont été conservées dans une solution tampon de pH= 7, à 4°C pendant 3 mois. Le suivi régulier de leur activité durant cette période est illustré sur la figure 4.6, en considérant une activité initiale de 100%.

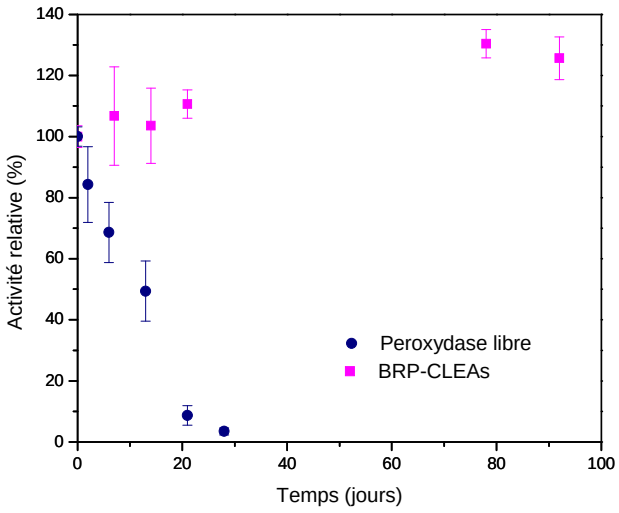



***Figure 4. 6.*** *Stabilité de la peroxydase libre et des CLEAs en fonction du temps dans une solution tampon (pH=7, 50mM) à 4°C*

L'activité de la peroxydase libre a chuté de plus de 90% après 20 jours de conservation. Des phénomènes tels que la dégradation biologique ou photochimique peuvent en être en cause. Contrairement, une stabilité de l'activité, voire même une augmentation de l'ordre de 25% après 90 jours de conservation, est observée dans le cas des BRP-CLEAs. Cette stabilité peut être expliquée par l'absence de changements structuraux des CLEAs, grâce à leur rigidité et à leur non-biodégradabilité (Gupta and Raghava, 2011). L'excès de glutaraldéhyde présent à la surface des CLEAs et qui est relargué dans le milieu tampon pendant le stockage peut également être impliqué dans la stabilité observée (Wilson et al., 2009).

### IV.2.4. Etude morphologique des BRP-CLEAs

Afin de caractériser la surface des CLEAs, une étude morphologique a été réalisée en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB). Cette microscopie repose sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection des signaux provenant

de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon (Watt, 1997). L'analyse a été faite sur des CLEAs fraîchement préparées et séchées à l'air libre.

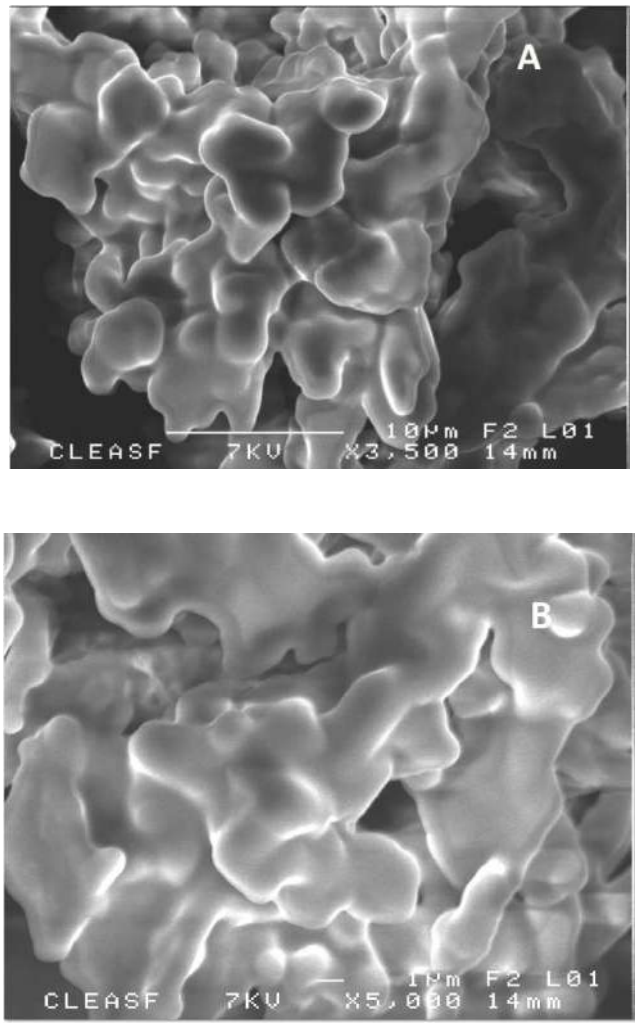



***Figure 4. 7.*** *Analyse morphologique des BRP-CLEAs par Microscopie électronique à balayage à différentes résolutions, (A) ×3500, (B) ×5000*

Le nombre de molécules d'enzyme réticulée et La façon dont elle s'agrègent influe directement leur activité (Sheldon et al., 2006). A partir des images de la microscopie électronique à balayage (MEB) représentées sur la figure 4.7. A et B, on constate que les BRP-CLEAs montrent une surface lisse caractérisée par une structure amorphe avec une surface spécifique importante et de nombreuses cavités. D'une part, cette structure devrait faciliter l'accès des molécules de substrat aux sites de l'enzyme, et d'autre part, elle devrait faciliter le transfert de matière vers et à partir de la surface des CLEAs.

### IV.2.5.Tolérance des BRP-CLEAs aux solvants organiques

En vue de la mise en œuvre des CLEAs dans différents procédés réactionnels pouvant avoir lieu dans des phases organiques ou aqueuses, il est impératif d'étudier l'effet de la nature du solvant sur l'activité des CLEAs. Six solvants classés selon leur polarité et leurs constantes diélectriques ont été sélectionnés.

***Tableau 4. 2.*** *Caractéristiques des solvants utilisés dans le test de stabilité (Meurant, 1991; Sarker et al., 2005)*

| Solvant | Constante diélectrique ε | Index de polarité |
|---|---|---|
| Eau | 80.2 | 9.0 |
| Ethanol | 24.6 | 5.2 |
| Acétone | 21 | 5.1 |
| Chloroforme | 4.8 | 4.1 |
| HV5 | 2.6 | - |
| HV20 | 2.8 | - |
| Hexane | 1.9 | 0.0 |

L'essai a été réalisé par incubation des BRP-CLEAs pendant 72 h dans un solvant donné. L'effet de chaque solvant sur l'activité des BRP-CLEAs est donné sur les histogrammes ci-dessous (figure 4.6) :

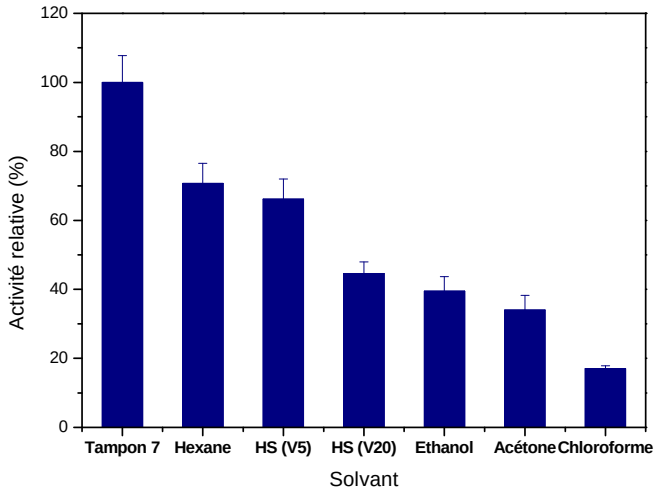



***Figure 4. 8.*** *Effet des solvants organiques sur l'activité des BRP-CLEAs.*

L'activité enzymatique dans les solvants organiques (comme déjà expliqué au chapitre II) est directement liée à la nature du solvant (log P), la taille et la morphologie de catalyseur et au microenvironnement de l'enzyme. Considérant l'activité des CLEAs dans la solution tampon de pH 7 en tant que valeur maximale (100%), il a été constaté que dans les solvants apolaires, comme l'hexane et les huiles de silicone 47V5 et 47V20, les BRP-CLEAs ont respectivement conservé 70.7, 66.0 et 44.6% de leur activité après 72 heures d'incubation. Ce phénomène peut être expliqué par la faible constante diélectrique des solvants et leur polarité qui est relativement basse. Les interactions avec les groupements polaires de l'enzyme et notamment avec les molécules d'eau résiduelle entourant l'enzyme sont peu probables et les molécules d'enzyme conservent ainsi partiellement leur activité.

Au contraire, dans les solvants avec une constante diélectrique importante, tels que l'éthanol et l'acétone on constate que les CLEAs perdent 61 et 67 % de leur activité catalytique. La chute d'activité est due à la compétition entre l'enzyme et le solvant pour réagir avec la couche d'eau essentielle qui se trouve à la surface de l'enzyme (Klibanov, 1989; Sangeetha and Abraham, 2008). Les solvants polaires ont tendance à décoller la couche d'eau entourant l'enzyme par l'établissement de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Ces résultats expliquent que les interactions entre le solvant et les molécules d'eau qui entourent l'enzyme sont plus importantes que les interactions entre le solvant et l'enzyme elle-même (Klibanov, 1989).

La réticulation renforce la rigidité des molécules d'enzyme et contribue de plus à la réduction du déploiement de la structure tridimensionnelle de la protéine sous l'effet des solvants organiques (Sangeetha and Abraham, 2008).

Par ailleurs et afin d'analyser l'effet des solvants polaires sur la morphologie des CLEAs, des analyses MEB ont été réalisées sur des CLEAs lavées à l'acétone et séchée à l'air libre. Les images obtenues sont montrées sur la figure 4.9.

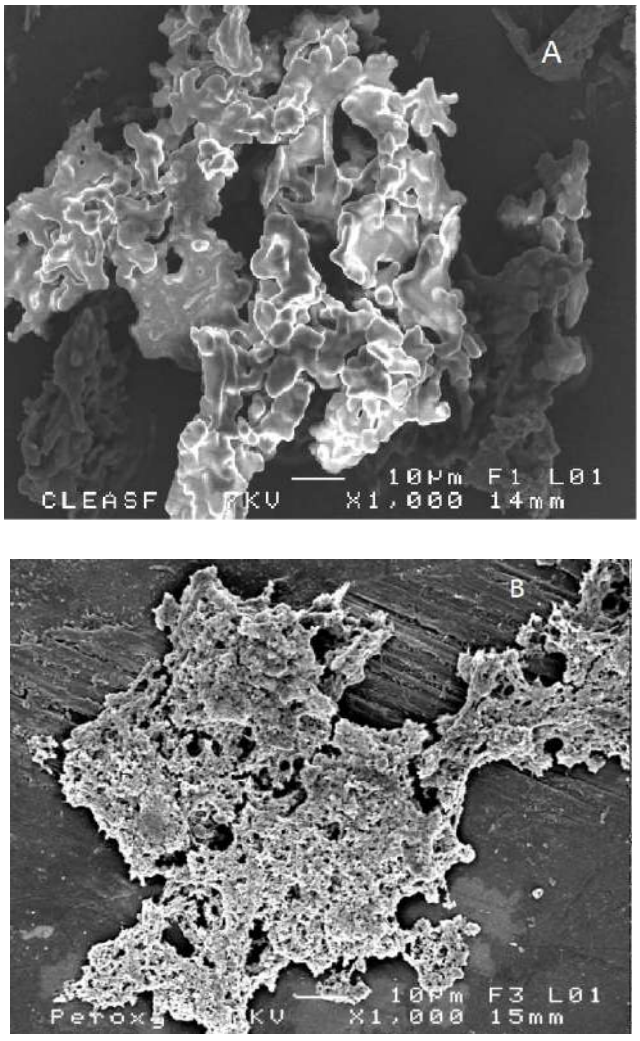



***Figure 4. 9.*** *Analyse des BRP-CLEAs par microscopie électronique à balayage à une résolution de ×1000, (A) CLEAs frais, (B) CLEAs lavées à l'acétone.*

La comparaison de l'état des CLEAs frais et après leur lavage à l'acétone comme modèle de solvant polaire est intéressante afin d'évaluer l'effet de déshydratation exercé par ce type des solvants sur les BRP-CLEAs. La figure A, révèle une surface pulpeuse, lisse et homogène comme expliqué précédemment (IV.2.4). En revanche, sur

la figure B, on constate un changement remarquable de la texture des CLEAs, la surface apparaissant endommagée, moins homogène, ayant une structure moins cohérente.

## Conclusion

De cette étude, on peut déduire que la technique d'immobilisation de la peroxydase sous forme de CLEAs est très attractive grâce à sa simplicité et sa facilité de réalisation. Les paramètres qui influent sa préparation sont la nature du solvant de précipitation, la concentration de l'enzyme et de l'agent réticulant, le glutaraldéhyde.

Le protocole de préparation a abouti au choix de l'acétone comme solvant de précipitation et une concentration optimale de la peroxydase de 74.88 $UI.mg^{-1}$. Pour l'agent de réticulation, le glutaraldéhyde a été utilisé à une concentration de 2%.

La réticulation est à l'origine de la protection de la peroxydase contre la désactivation par plusieurs paramètres physico-chimiques comme le pH et la température. En outre et comparée à l'enzyme libre, elle offre une très bonne stabilité à cette enzyme durant sa conservation.

Sur un plan pratique, les BRP-CLEAs préparées ont montré une bonne stabilité dans les solvants organiques apolaires tels que l'hexane et les huiles de silicone V5 et V20 après 72 heures d'incubation, ce qui prouve que cette technique de stabilisation de la peroxydase pour son usage en milieu organique constitue un bon choix afin de concrétiser les objectifs de ce travail, à savoir, l'élimination par des BRP-CLEAs de COVs absorbés dans l'huile de silicone.

**Références bibliographiques**

Cao, L., van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A. (2000). Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. Org. Lett. *2*, 1361–1364.

Gupta, M.N., and Raghava, S. (2011). Enzyme Stabilization via Cross-Linked Enzyme Aggregates. In Enzyme Stabilization and Immobilization, S.D. Minteer, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 133–145.

Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. Elsevier Sci. Publ. *14*, 141–144.

Matijošytė, I., Arends, I.W.C.E., de Vries, S., and Sheldon, R.A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. J. Mol. Catal. B Enzym. *62*, 142–148.

Meurant, G. (1991). Fundamentals and Techniques (Netherlands: Elsevier).

Mohamed, S.A., Darwish, A.A., and El-Shishtawy, R.M. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase on activated wool. Process Biochem. *48*, 649–655.

Sangeetha, K., and Abraham, T.E. (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of Subtilisin for controlled release applications. Int. J. Biol. Macromol. *43*, 314–319.

Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A.I. (2005). Natural Products Isolation (Totowa, New Jersey: Springer Science & Business Media).

Sheldon, R.A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Appl. Microbiol. Biotechnol. *92*, 467–477.

Sheldon, R.A., Schoevaart, R., and van Langen, L.M. (2006). Cross-linked enzyme aggregates. In Immobilization of Enzymes and Cells, (Springer), pp. 31–45.

Vaidya, B.K., Kuwar, S.S., Golegaonkar, S.B., and Nene, S.N. (2012). Preparation of cross-linked enzyme aggregates of l-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine. J. Mol. Catal. B Enzym. *74*, 184–191.

Watt, I.M. (1997). The Principles and Practice of Electron Microscopy (USA: Cambridge University Press).

Wilson, L., Illanes, A., Soler, L., and Henríquez, M.J. (2009). Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. Process Biochem. *44*, 322–326.

Xu, R., Chi, C., Li, F., and Zhang, B. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrous membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. Bioresour. Technol. *149*, 111–116.

Zheng, G.-W., Yu, H.-L., Li, C.-X., Pan, J., and Xu, J.-H. (2011). Immobilization of Bacillus subtilis esterase by simple cross-linking for enzymatic resolution of dl-menthyl acetate. J. Mol. Catal. B Enzym. *70*, 138–143.

# *Chapitre V*

# *Traitement du phénol et du 2-chlorophénol par procédé combinant absorption et transformation enzymatique par BRP-CLEAs.*

Les BRP-CLEAs ont montré une bonne stabilité dans l'huile de silicone (PDMS 47V20 et le 47V5). De ce fait, cette partie de l'étude sera consacrée à leur mise en œuvre dans un procédé de traitement des deux COVs.

Le choix de l'huile de silicone comme solvant d'absorption des COVs sera justifié par comparaison des valeurs expérimentales des coefficients de partage des COVs entre l'huile et la phase gazeuse.

Par la suite, l'influence des facteurs principaux régissant la réaction enzymatique sur la dégradation des deux COVs absorbés (phénol, 2-chlorophénol) par les BRP-CLEAS sera étudiée.

## V.1. Détermination des coefficients de partage

Le coefficient de partage d'un polluant entre le gaz et une phase liquide traduit la solubilité du polluant étudié dans la phase liquide sélectionnée. Plus il est faible, meilleure est l'affinité entre le polluant et la phase liquide.

Pour les deux COVs choisis, le toluène et le 2-chlorophénol (2-CP), les valeurs des coefficients de partage air/huile et air/eau ont été déterminés à 25°C. Le phénol a été exclu de cette étude à cause de difficultés rencontrées lors de son dosage dans la phase gaz. La courbe ci-dessous illustre un exemple de détermination du coefficient de partage du toluène dans les deux huiles 47V20 et 47V5.

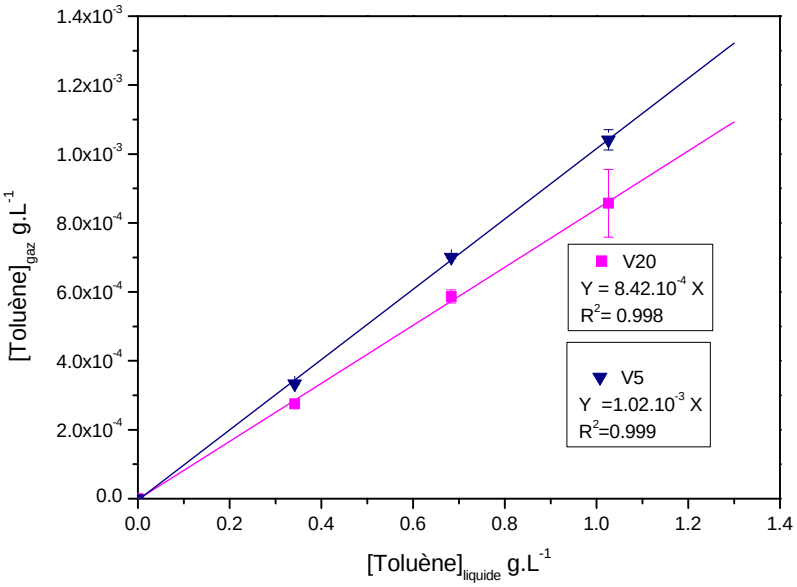



***Figure 5. 1****. Concentration de toluène dans la phase gaz en fonction de sa concentration dans la phase liquide (PDMS 47V20 et 47V5)*

Les courbes illustrées sur la figure 5.1. ont l'allure de droites, ce qui vérifie la théorie de partage d'un composé entre les deux phases pour de faibles concentrations. La pente des droites est une grandeur adimensionnelle qui représente le coefficient de partage adimensionnel H, à l'équilibre et pour une température donnée. Pour chacun des COVs, les coefficients de partage H dans chacune des phases absorbantes ont été calculés. Par la suite, les coefficients dimensionnels H′ ont été déduits en utilisant l'équation décrite dans le chapitre III (Eq. 3.7). Les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau 5.1.

***Tableau.5. 1.*** **V**aleurs des Coefficients de partage du toluène et du 2-CP dans l'eau et dans deux huiles de silicone (PDMS)

| **Toluène** | | | |
|---|---|---|---|
| | Eau | PDMS 47V20 | PDMS 47V5 |
| H adimensionnel | 0.269 | $8.42.10^{-4}$ | $1.02.10^{-3}$ |
| H′ ($Pa.m^3.mol^{-1}$) | 666.46±10.65 | 2.08±0.04 | 2.52±0.03 |
| **2-Chlorophénol** | | | |
| | Eau | PDMS 47V20 | PDMS 47V5 |
| H adimensionnel | $2.5.10^{-4}$ | $5.51.10^{-5}$ | - |
| H′ ($Pa. m^3.mol^{-1}$) | 0.619±0.037 | 0.136±0.003 | - |

Les valeurs expérimentales du coefficient de partage eau/air H′ dans le cas du toluène et du 2-CP à 25°C sont respectivement de 666.46 ± 10.65 et 0.619 ± 0.037 $Pa.m^3.mol^{-1}$. Les grandeurs théoriques de cette constante pour le toluène décrites par plusieurs auteurs vérifient la précision des résultats obtenus par la méthode expérimentale précédemment décrite. A titre indicatif, Ashworth et al. ont estimé une valeur de 651 $Pa.m^3.mol^{-1}$(Ashworth et al., 1988) à 25°C , alors que Perlinger et al. ont obtenu une valeur de 660 $Pa.m^3.mol^{-1}$ pour la même température (Perlinger et al., 1993). Plus récemment, Darracq a obtenu une valeur moyenne de 615 $Pa.m^3.mol^{-1}$ à 25°C (Darracq, 2011).

En outre, le coefficient de partage obtenu pour le 2-CP dans l'eau (0.619 $Pa.m^3.mol^{-1}$) est très proche de la valeur obtenue par Olaniran et al. (0.68 $Pa.m^3.mol^{-1}$ à 25°C) (Olaniran and Igbinosa, 2011), et celle de Montgomery (0.644 $Pa.m^3.mol^{-1}$ à 20°C) (Montgomery, 2007).

En comparant les valeurs de H′ des deux composés ($H'_{toluène}$ /$H'_{2\text{-}CP}$), nous pouvons déduire que le toluène est une molécule à caractère plus hydrophobe que le 2-CP, elle est mieux absorbée dans le PDMS 47V20

L'analyse des valeurs des coefficients de partage du toluène dans les deux PDMS 47V20 et 47V5 révèle que ce dernier est préférentiellement soluble dans cette huile que dans l'eau. Les valeurs de H′ obtenues sont 2.08±0.04 et 2.52±0.031 $Pa.m^3.mol^{-1}$ respectivement pour les PDMS 47V20 et 47V5.

De même, en comparant à sa valeur dans l'eau, le coefficient de partage du 2-CP dans l'huile de silicone 47V20 est 5 fois plus faible (0.136 ±0.003 $Pa.m^3.mol^{-1}$), démontrant une affinité plus forte du 2-CP pour le PDMS.

A la lumière de ces résultats, on peut conclure que l'huile de silicone représente un bon réservoir pour le toluène et le 2-CP. Etant donné le léger avantage de l'huile 47V20, ce sera celle qui sera introduite comme absorbant avant le lancement de la réaction enzymatique, et ce, pour les 3 COVs faisant l'objet de ce travail de thèse.

## V.2. Dégradation du phénol par les BRP-CLEAs dans l'huile de silicone (PDMS 47V20) et dans la phase aqueuse

Dans un premier temps, l'élimination du phénol par les BRP-CLEAs a été étudiée. Le phénol a été choisi à cause de sa bonne dégradabilité par la peroxydase, c'est un substrat classique pour cette enzyme. Sa dégradation a été menée dans une phase aqueuse, puis dans l'huile de silicone dans l'objectif de vérifier l'activité des BRP-CLEAs dans une phase organique apolaire.

### V.2.1. Cinétique de dégradation

La cinétique de la réaction enzymatique est directement influencée par la concentration de substrat. Il s'agit d'analyser la vitesse de dégradation de ce substrat en fonction du temps. Les figures 5.2.A et 5.3.A présentent l'évolution de la concentration en phénol en fonction du temps dans les phases aqueuse et organique pour des quantités données de BRP-CLEAs et de peroxyde d'hydrogène. Les figures 5.2.B et 5.3.B présentent l'effet de la concentration initiale de phénol ($C_0$) sur le rendement (R%) et sur la vitesse initiale ($V_0$) de la réaction.

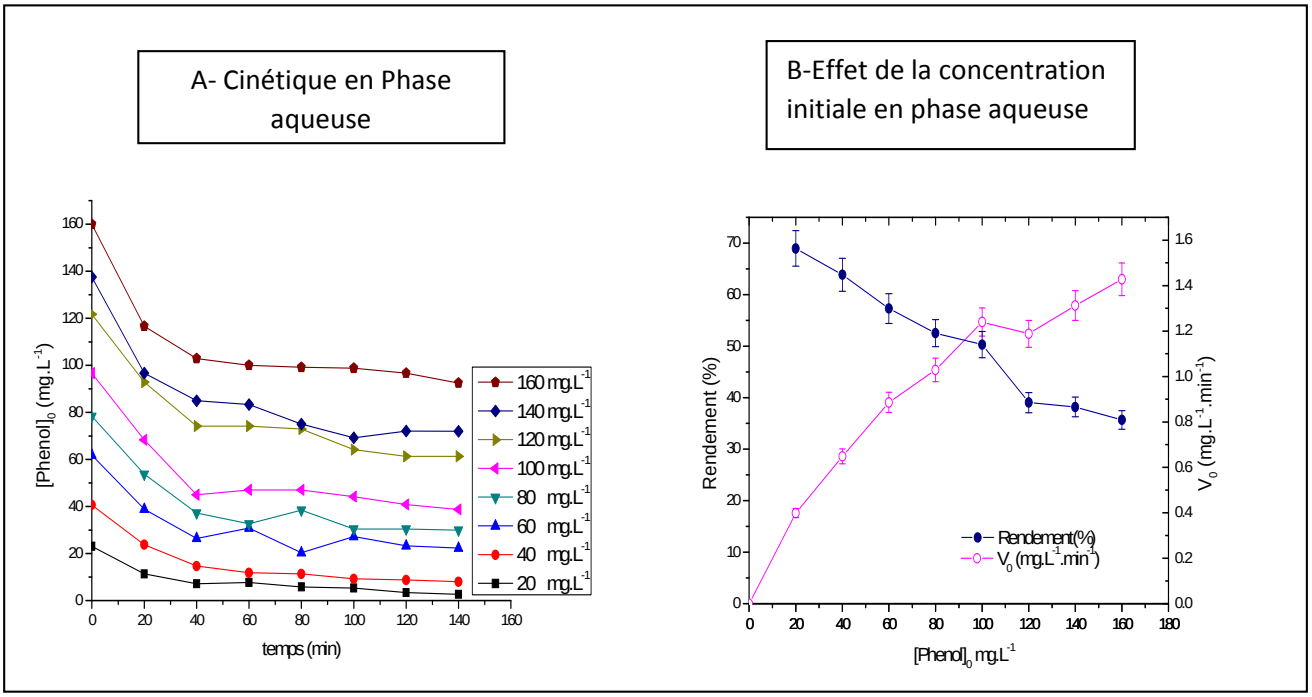



***Figure 5. 2.*** *Cinétique de dégradation de phénol dans la phase aqueuse (Composition : 5mL de tampon phosphate (pH=7,10mM), 5µL de $H_2O_2$ (1M), 5mg CLEAs (0.82UI.mL$^{-1}$)), à 25°C.*

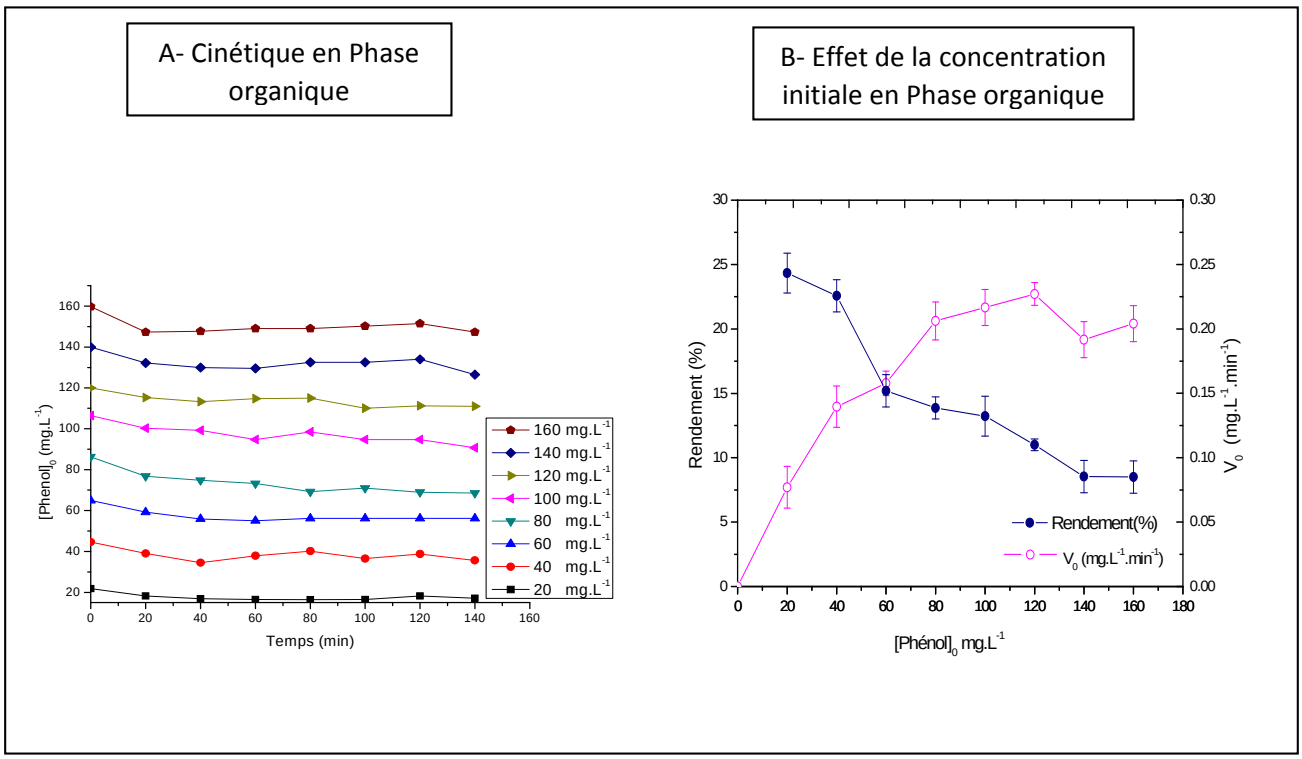



***Figure 5. 3.*** *Cinétique de dégradation de phénol dans le PDMS 47V20.*
*(Composition : 5mL de PDMS 47V20, 5µL de $H_2O_2$ (1M) ,5mg CLEAs (0.82UI.mL$^{-1}$)), à 25°C.*

Sur ces deux figures, on observe que la dégradation de phénol par les BRP-CLEAs dépend de la nature du milieu. Pour une concentration fixe en BRP-CLEAs et en peroxyde d'hydrogène, la réaction est plus rapide en phase aqueuse. En effet, à 40 minutes, la réaction tend vers un équilibre tandis que dans l'huile de silicone (PDMS 47 V20), le temps nécessaire pour établir l'équilibre est de 60 minutes.

Dans les deux cas, la vitesse initiale $V_0$ ainsi que le rendement de la réaction (R) dépendent fortement de la concentration initiale du substrat $C_0$. Les courbes montrent que la vitesse augmente rapidement et linéairement pour de faibles concentrations en phénol. Cependant, elle tend graduellement vers des valeurs limites à des concentrations plus élevées. Une légère chute a été constatée pour des concentrations en phénol supérieures à 120 $mg.L^{-1}$ dans l'huile de silicone. Dans cette région, tous les sites actifs des BRP-CLEAs sont remplis par les molécules de substrat et la réaction devient d'ordre zéro.

Les concentrations optimales en phénol ainsi déterminées sont respectivement de 90 $mg.L^{-1}$et 60 $mg.L^{-1}$ en phase aqueuse et dans le PDMS 47V20.

Bien que les valeurs des rendements de dégradation du phénol pour une concentration optimale en phase aqueuse (52%) et dans le PDMS 47V20 (15%) ne soient pas comparables, la faisabilité du procédé a été démontrée. Par ailleurs, certains phénomènes peuvent expliquer la limitation du rendement de dégradation en phase organique :

- ✓ l'accumulation de produit de dégradation sur la surface des CLEAs, qui limite l'accès du substrat aux sites actifs de l'enzyme et par conséquent la vitesse globale de réaction (Zhang et al., 2010).
- ✓ Les limitations du transfert de masse en phase organique, dues au caractère hydrophile de la molécule de phénol ou à la mauvaise dispersion des particules de CLEAs dans l'huile, ce qui affecte négativement l'activité de l'enzyme (Adlercreutz, 2008, 2013; Gupta et al., 2013; Hanefeld et al., 2009).

### V.2.2. Détermination des constantes cinétiques

Les valeurs des paramètres cinétiques du modèle enzymatique sont affectées par les conditions opératoires et notamment par la nature du milieu. En utilisant la méthode de linéarisation de double réciproque de Lineweaver–Burk (Eq 5.1), il sera possible de déterminer les valeurs des constantes cinétiques du modèle de Michaelis-Menten $K_m$ et $V_m$.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[Phenol]_0} \qquad \text{(Eq 5.1)}$$

Avec : $K_m$ et $V_{max}$ respectivement la constante de Michaelis-Menten et la vitesse maximale de la réaction.

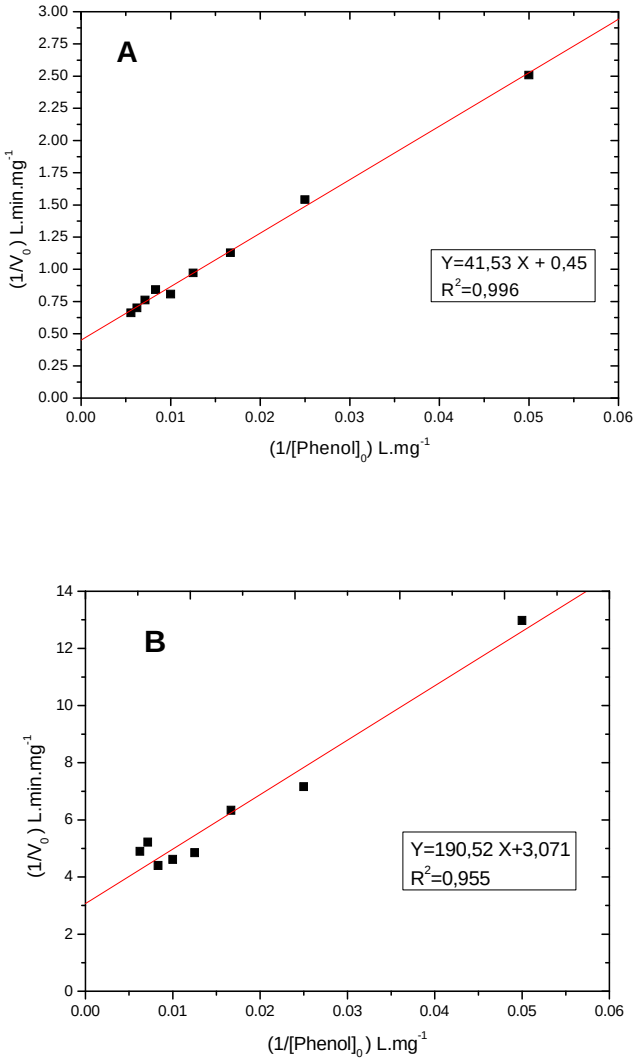



***Figure 5. 4.*** *Linéarisation de Lineweaver–Burk pour la détermination des constantes cinétiques, (A) en phase aqueuse, (B) en phase organique.*

Les courbes obtenues à partir des cinétiques établies en phases aqueuse et organique sont des droites caractérisées par des valeurs élevées des coefficients de corrélation, respectivement 0.998 et 0.955. Les valeurs de $K_m$ et $V_m$ obtenus pour les BRP-CLEAs dans les deux phases sont illustrées dans le tableau 5.1.

***Tableau 5. 2.*** *Constantes cinétiques des BRP-CLEAs mesurées dans les deux phases.*

| | $K_m$ ($mg.L^{-1}$) | $V_{max}$ ($mg.L^{-1}.min^{-1}$) |
|---|---|---|
| Tampon phosphaté | 92.28 | 2.22 |
| Huile de silicone (47V20) | 62.03 | 0.32 |

La constante de Michaelis-Menten ($K_m$), aussi appelée constante d'affinité, représente l'affinité de substrat pour son enzyme. Une enzyme avec une faible affinité pour son substrat a une grande valeur de $K_m$ (Cheng and Harper, 2012).

En phase aqueuse, la valeur de $K_m$ est supérieure à celle obtenue dans l'huile de silicone. De même, la valeur de $V_{max}$ est plus importante en phase aqueuse.

Un phénomène analogue a été signalé en ce qui concerne le changement de $K_m$ pour la réaction enzymatique avec la peroxydase de radis noir (HRP) dans des solvants organiques (Singh et al., 2012). Cette remarque permet de conclure que l'affinité du substrat pour son enzyme varie en fonction de la nature du milieu réactionnel. Dans le cas de la peroxydase de *Brassica rapa*, le phénol a montré plus d'affinité dans l'huile de silicone.

### V.2.3. Effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène

La figure 5.5 illustre l'effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène sur la dégradation du phénol après 40 et 60 minutes de réaction et pour des concentrations initiales en phénol de 90 $mg.L^{-1}$et 60 $mg.L^{-1}$ dans la phase aqueuse et le PDMS 47V20 respectivement.

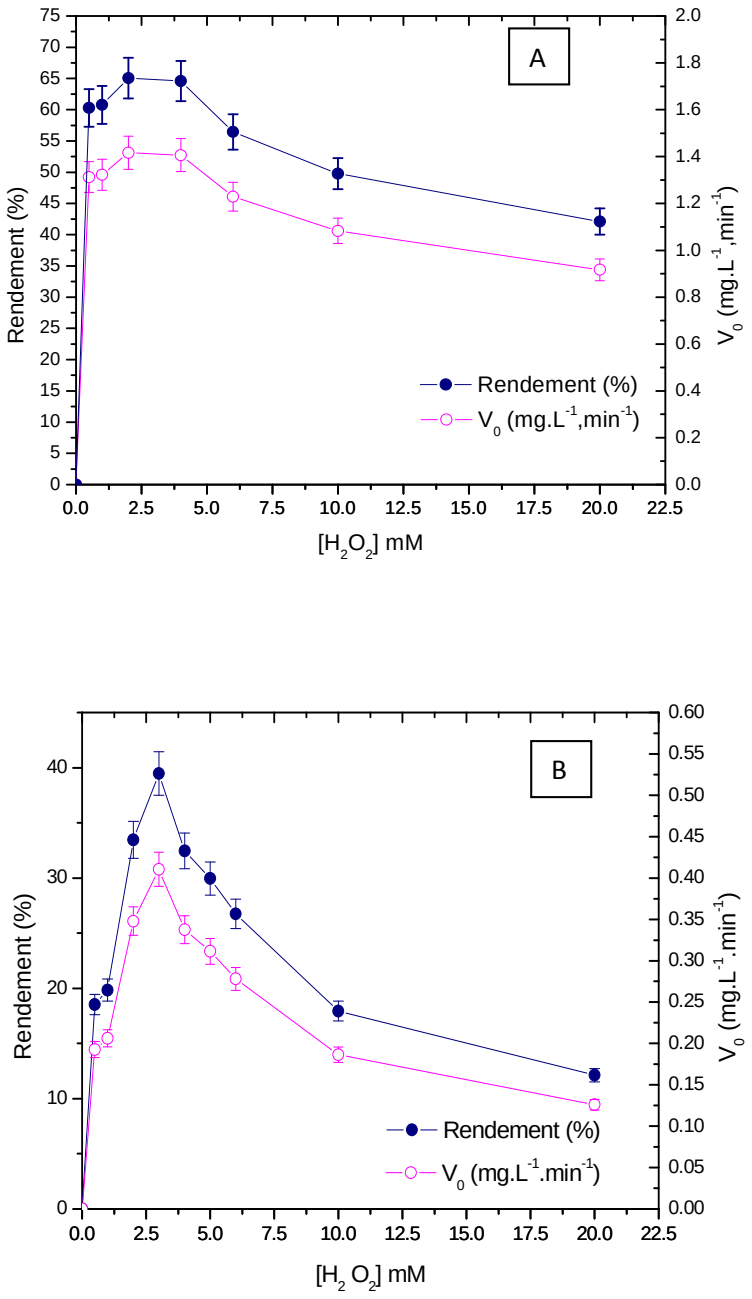



***Figure 5. 5.*** *Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène sur la dégradation de phénol, (A) dans la phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20.(Composition : 5mL de tampon phosphate (pH=7,10mM) ou de PDMS 47V20, 90mg.L$^{-1}$ de phénol dans la phase aqueuse et 60 mg.L$^{-1}$ dans le PDMS 47V20,5×4µL de $H_2O_2$ ,5mg des CLEAs (0.82UI.mL$^{-1}$)), à 25°C.*

Nous avons fait varier la concentration de peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel en injectant quatre fois un volume de 5 µL (soit un volume total de 20 µL) chaque 10 minutes dans la phase aqueuse et chaque 15 minute dans l'huile de silicone à partir de solutions de peroxyde fraichement préparées.

Pour la gamme de concentration de peroxyde d'hydrogène étudiée (0.5-20 mM), on note une augmentation de la vitesse et du rendement de dégradation jusqu'à une valeur optimale de l'ordre de 2 à 4 mM dans le cas du milieu aqueux (Figure 5.5.A). Cette dernière concentration correspond à un rendement maximal de 65.00 ± 3.25 % et une vitesse $V_0$ de 1.41 ± 0.07 $mg.L^{-1}.min^{-1}$. De même, dans l'huile de silicone, un rendement maximal de 40.00 ± 1.97% avec une vitesse plus faible de 0.41 ± 0.02 $mg.L^{-1}.min^{-1}$ ont été obtenus pour une concentration optimale de 3 mM en $H_2O_2$ (Figure 5.5.B).

A des concentrations plus élevées en peroxyde d'hydrogène, des diminutions importantes de la vitesse et du rendement ont été observées. Ces diminutions sont expliquées soit par l'effet de désactivation irréversible exercée par le peroxyde d'hydrogène sur le groupement d'hème de la peroxydase (Akhtar and Husain, 2006), ou par le fait que l'excès de peroxyde d'hydrogène produit plus de produits intermédiaires qui inhibent l'activité enzymatique (Alemzadeh and Nejati, 2009). Ces résultats concordent avec plusieurs études portant sur l'élimination de phénol par la peroxydase (Deva et al., 2014; Masuda et al., 2001).

Les résultats ci-dessus montrent que le ratio molaire optimal de peroxyde d'hydrogène sur phénol ([$H_2O_2$]/ [Phénol]) est de 2:1 en phase aqueuse tandis que dans la phase organique PDMS 47V20 il est de 4:1. Ceci permet de déduire que les BRP-CLEAs nécessitent une dose plus élevée de peroxyde d'hydrogène dans le milieu organique comparé à celle nécessaire dans la phase aqueuse.

### V.2.4. Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs

Le quatrième paramètre qui peut influencer la réaction de dégradation du phénol est l'activité des BRP-CLEAs dans le milieu réactionnel. Toutes les expériences réalisées précédemment ont été menées à une activité fixe de 5 mg (≈ 0.86 $UI.mL^{-1}$). Pour examiner l'impact de la concentration des BRP-CLEAs, le ratio molaire de phénol sur le peroxyde d'hydrogène est gardé constant à sa valeur optimale de 1:2 dans la phase aqueuse et 1:4 dans l'huile de silicone, en faisant varier la concentration de l'enzyme de 0.4 à 4.5 $UI.mL^{-1}$. Les résultats des essais sont illustrés sur la figure 5.6.

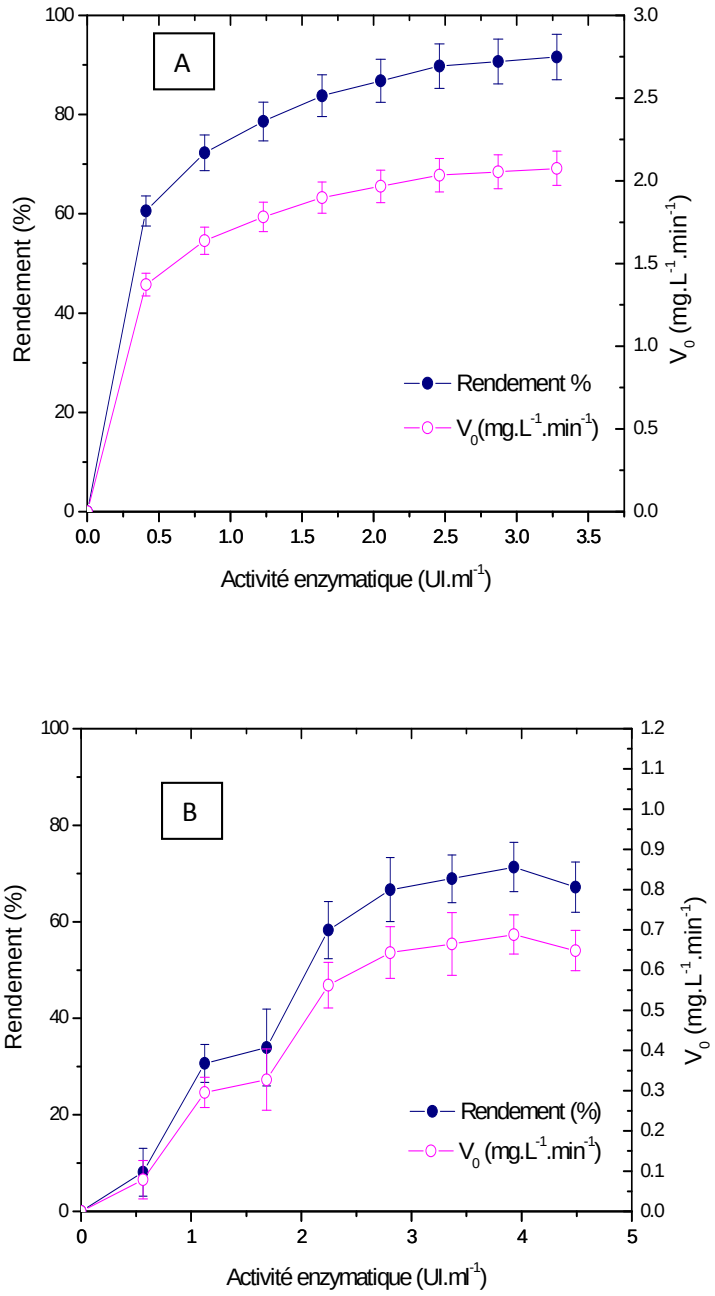



***Figure 5. 6.*** *Effet de l'activité des BRP-CLEAS sur la dégradation de phénol, (A) dans la phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20. (Composition : 5 mL de PDMS 47 V20 ou de tampon phosphaté (pH=7,10mM) 90mg.L$^{-1}$ de phénol dans la phase aqueuse et 60 mg.L$^{-1}$ dans la PDMS 47 V20, 5×4µL de $H_2O_2$ (2mM) dans la phase aqueuse et (3mM) dans la PDMS 47 V20), à25°C.*

Il est important de noter que l'augmentation de la quantité des CLEAs dans l'huile de silicone était accompagnée par la contrainte par leur dispersion. Afin d'éviter ce problème et pour assurer l'homogénéité du système, les mélanges ont été placés dans

un bain à ultrasons pendant 15 minutes à 25°C avant l'injection de peroxyde d'hydrogène.

Des tests témoins ont été menés dans le but d'évaluer les effets des ondes ultrasons sur l'activité enzymatique.

Une première lecture des courbes montre que la concentration de l'enzyme a eu un effet significatif sur la dégradation du phénol dans les deux solvants. La vitesse de réaction augmente rapidement dans l'intervalle de 0.4 à 2.0 $UI.mL^{-1}$dans la phase aqueuse et de 0.5 à 2.8 $UI.mL^{-1}$ dans l'huile de silicone. Ce résultat était prévisible étant donné que la disponibilité des sites actifs entraîne une attraction des molécules de substrats et par conséquent une augmentation du nombre des molécules converties par unité de temps.

Par ailleurs, une performance optimale des BRP-CLEAs a été obtenue à une concentration optimale de 2.5 $UI.mL^{-1}$ et 3.92 $UI.mL^{-1}$ respectivement dans la phase aqueuse et dans l'huile de silicone. Ces activités correspondent à des rendements de 89 ± 4% et 71± 5%.

### V.2.5. Cinétique de dégradation du phénol dans le PDMS 47V20 dans les conditions optimales

Cet essai a comme objectif l'établissement de la cinétique de dégradation du phénol au cours du temps dans le PDMS 47V20 dans les conditions optimales et d'analyser les effets sur la vitesse de réaction. La figure 5.7 est une représentation de la dégradation du phénol au cours du temps.

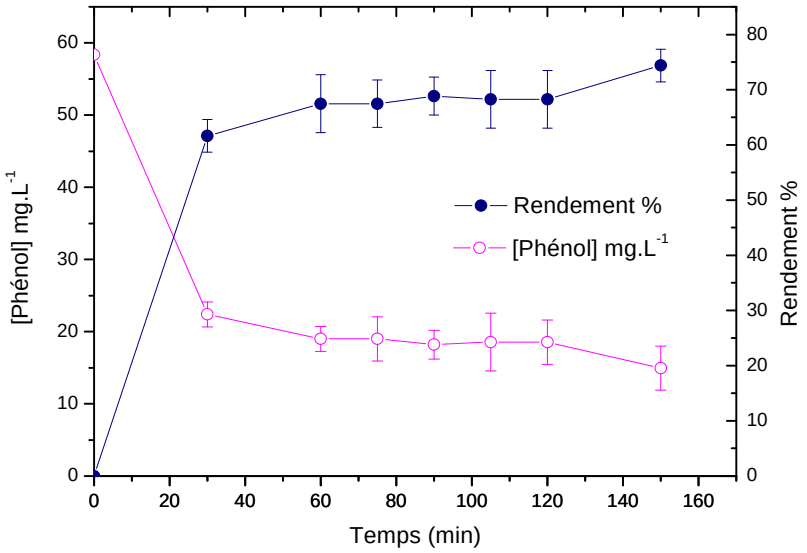



***Figure 5. 7.*** *Cinétique de dégradation du phénol dans le PDMS 47V20 dans les conditions optimales (5 mL de PDMS 47V20, 60 mg.L$^{-1}$ de phénol, 5×4µL de $H_2O_2$ (3mM) à 25°C)*

Après avoir examiné les effets de la concentration de phénol, du peroxyde d'hydrogène et de l'activité des CLEAs sur le processus, on constate une amélioration remarquable du temps optimal de la réaction. La réaction atteint son palier d'équilibre au bout de 30 minutes seulement, ce qui provoque une augmentation remarquable de la vitesse initiale $V_0$ de la réaction. Cette dernière a évolué de 0.68 à 1.2 mg.L$^{-1}$.min$^{-1}$. Ainsi, au bout de cette courte durée, plus de 65% du phénol est éliminé. En outre, une augmentation du temps de contact jusqu'au 150 minutes conduit à une élimination de 75% du phénol initial.

## V.3.Etude de la dégradation du 2-Chlorophénol

Une procédure expérimentale similaire à celle réalisée lors de la dégradation du phénol a été adoptée pour le 2-CP. Une fois l'équilibre établi en système fermé, une solution liquide saturée de 2-CP dans l'eau ou dans l'huile est obtenue. Le 2-CP est ainsi partagé entre la phase liquide (contenant les BRP-CLEAs) et gazeuse suivant la constante de Henry préalablement déterminée à température constante. La réaction de dégradation enzymatique sera par la suite déclenchée par ajout de peroxyde d'hydrogène.

### V.3.1. Cinétique de dégradation

La cinétique de dégradation du 2-CP a été suivie durant 140 minutes avec un échantillonnage toutes les 20 minutes. La concentration de 2-CP allant de 20 à 220 $mg.L^{-1}$. Les profils de dégradation obtenus sont montrés sur les figures 5.8 et 5.9.

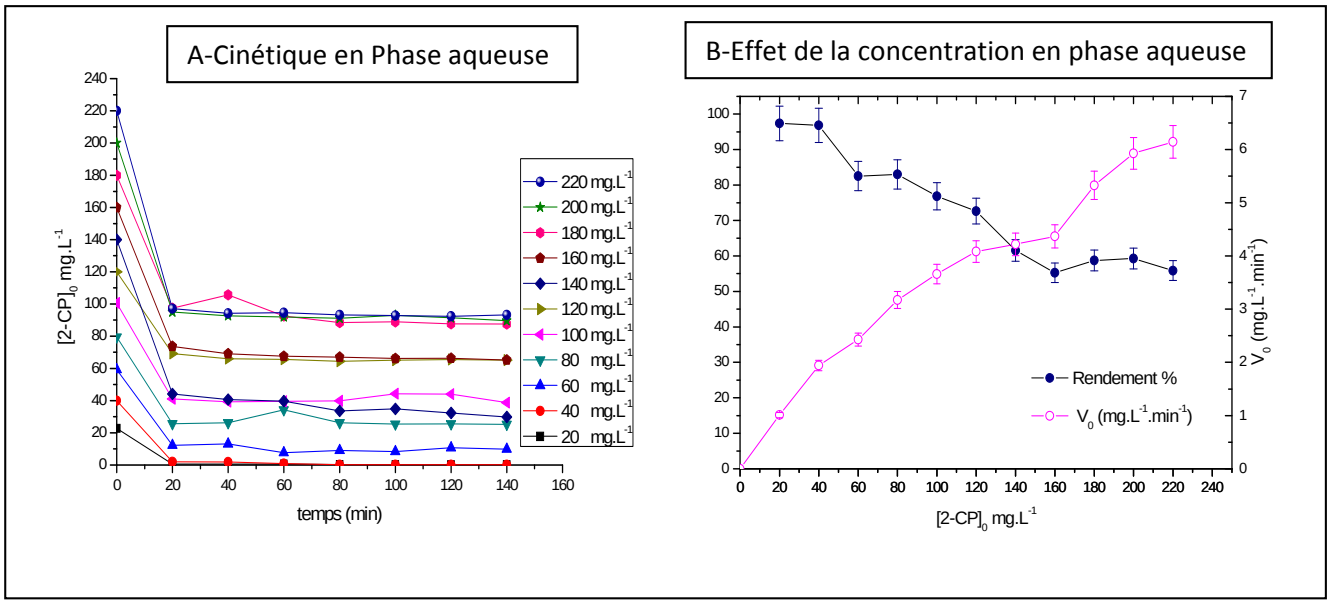



***Figure 5. 8.*** *Cinétique de dégradation de 2-CP dans la phase aqueuse (Composition : 5 mL de tampon phosphate (pH=7,10 mM), 5 µL de $H_2O_2$ (1M), 5 mg CLEAs (0.76 $UI.mL^{-1}$), à 25°C.*

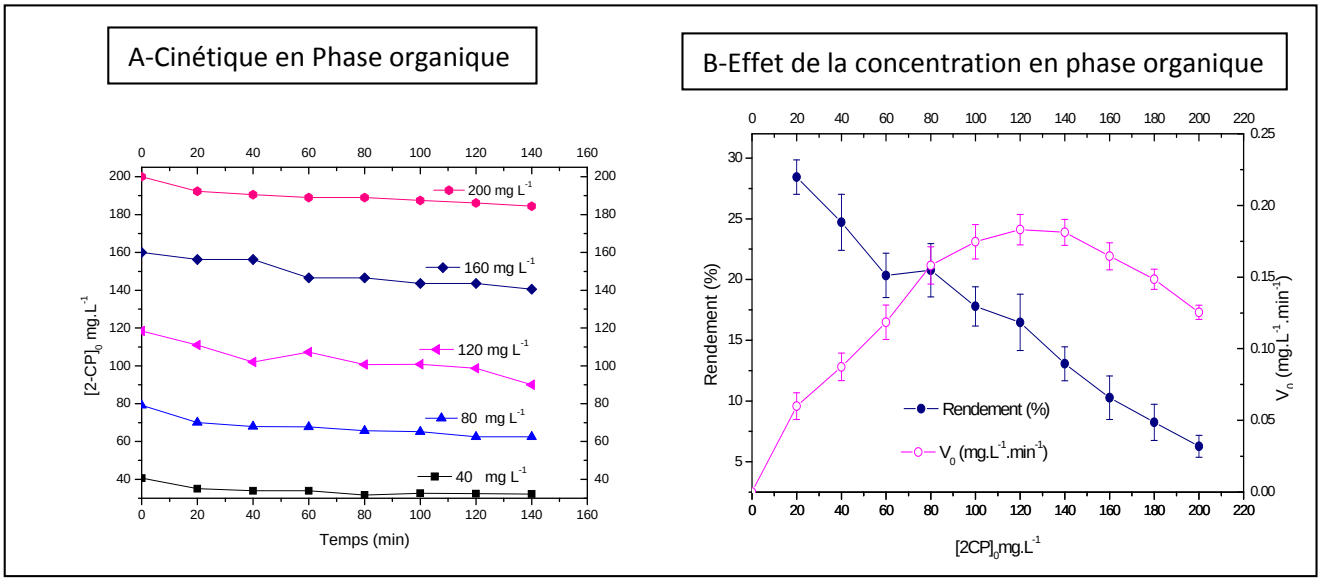



***Figure 5. 9.*** *Cinétique de dégradation de 2-CP dans le PDMS 47V20 (Composition : 5 mL de PDMS 47V20, 5×2 µL de $H_2O_2$ (2M) à t=0, t=10 min, 0.76 $UI.mL^{-1}$des CLEAs, à 25°C).*

Dans les deux cas, il peut être noté que, similairement au phénol, la dégradation démarre immédiatement après l'ajout du peroxyde d'hydrogène (Figure 5.8.A et 5.9.A). Dans le tampon phosphate, 20 minutes seulement sont suffisantes pour atteindre l'équilibre réactionnel et obtenir le rendement final. Au contraire, dans l'huile de silicone, il faut au minimum 100 minutes pour atteindre le rendement final.

En outre, les courbes qui représentent l'effet de la concentration initiale de 2-CP sur la vitesse initiale et sur le rendement de la réaction sont illustrées sur les figures 5.8.B et 5.9.B pour respectivement le tampon phosphate et l'huile de silicone.

En phase huileuse, la vitesse initiale augmente avec la concentration initiale dans la gamme (20 $mg.L^{-1}$ à 120 mg $L^{-1}$). Une valeur maximale de la vitesse (0.183 $mg.L^{-1}.min^{-1}$) est atteinte pour une concentration égale à 120 mg $L^{-1}$. Au-delà de cette concentration, un phénomène d'inhibition a été enregistré. Ce phénomène est reflété par la diminution de la vitesse. Cependant, en phase aqueuse, ce phénomène n'a pas eu lieu et le maximum obtenu est de l'ordre de 6.14 $mg.L^{-1}.min^{-1}$ à une concentration plus élevée (220 $mg.L^{-1}$). Les rendements de dégradation diminuent d'une manière avec l'augmentation des concentrations. Les rendements de dégradation en phase aqueuse sont plus importants. Ils varient de 97 % à 55 % pour la gamme de concentrations de 2-CP allant de 20 à 220 $mg.L^{-1}$ En phase organique, les rendements obtenus pour le même intervalle de concentrations sont plus faibles, de 28% à 6 %.

Dans la phase organique, le PDMS 47V20, il s'avère qu'à des concentrations élevées, le substrat peut altérer l'activité enzymatique. Cet effet inhibiteur est attribué à l'accumulation de produits de la réaction sur la surface de l'enzyme ce qui provoque quelques limites de diffusion du substrat aux sites actifs de l'enzyme (Gupta et al., 2013).

Cette hypothèse a été vérifiée par l'analyse structurale de la surface des CLEAs utilisés pour la dégradation de 2-CP à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 5.10).

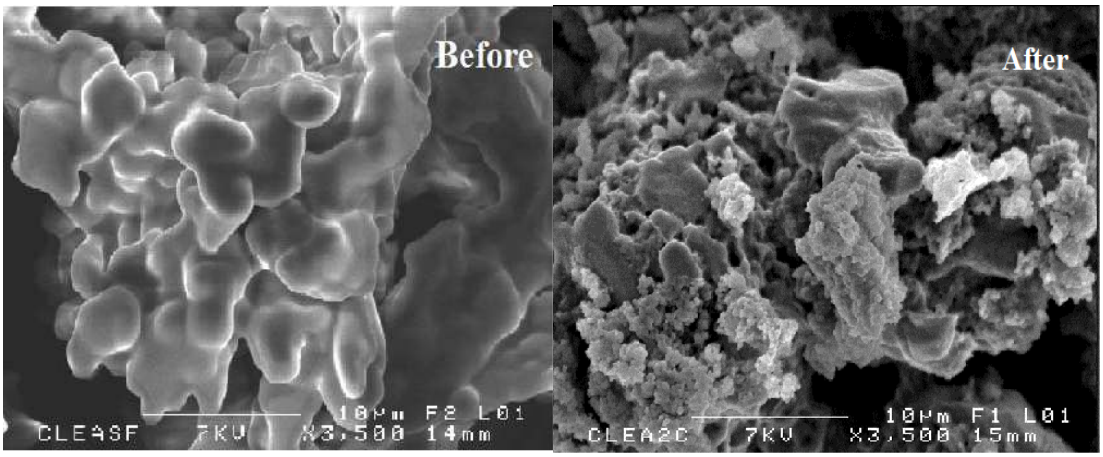



***Figure 5. 10.*** *MEB des CLEAs avant et après leur utilisation pour dégrader le 2-CP dans le PDMS 47V20.*

Les deux images révèlent qu'avant utilisation, les BRP-CLEAs apparaissent avec une surface propre, lisse avec une structure amorphe. Par contre, le changement le plus important ayant été observé après leur usage dans la dégradation de 2-CP était la présence de petites particules sur leur surface. La taille et la morphologie de ces particules diffèrent de celles des BRP-CLEAs.

À la lumière de cette remarque, il est possible de supposer que la nature du produit issu de la transformation catalytique du 2-CP par la peroxydase est un polymère insoluble dans les solvants apolaires (Dordick et al., 1987) (Figure 5.11), qui peut s'accumuler sur la surface des CLEAs, causant un abaissement de la diffusion du 2-CP vers l'intérieur des particules de CLEAs ou du produit de dégradation vers la solution. Par ailleurs, les contraintes de transfert de matière due à la dispersion limitée des CLEAs en phase huileuse en comparaison de celles observées en phase aqueuse, peuvent aussi affecter la cinétique de dégradation enzymatique du 2-CP par les BRP-CLEAs.

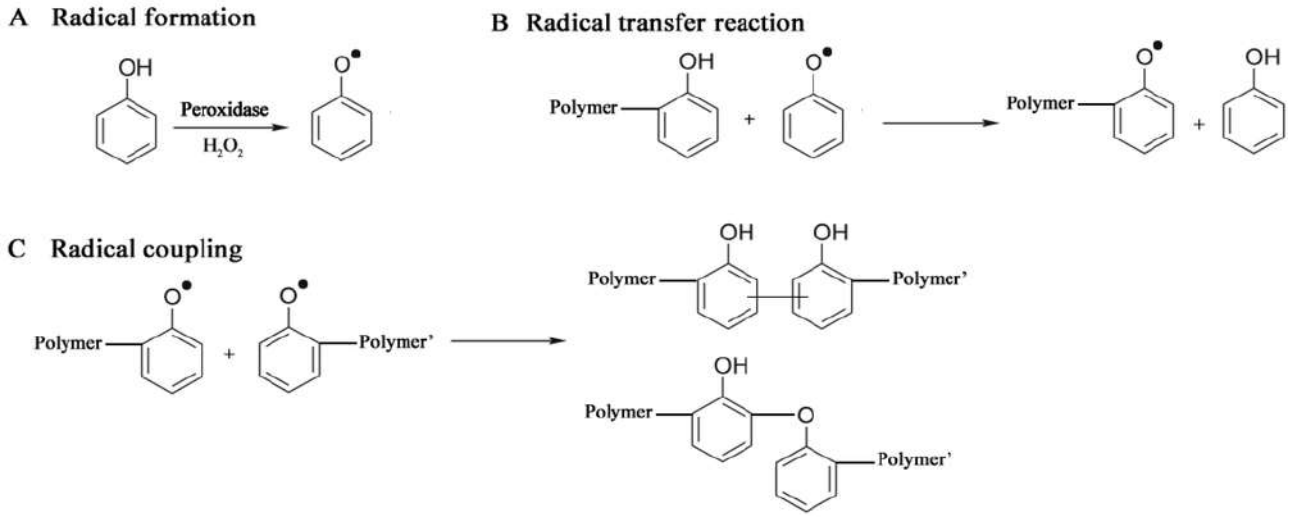



***Figure 5. 11.*** *Mécanisme de polymérisation des phénols par la peroxydase (Regil and Sandoval, 2013)*

### V.3.2. Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques ($V_{max}$ et $K_m$) de l'élimination de 2-CP par les BRP-CLEAs ont été déterminés suite à l'obtention des profils de l'évolution de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration de substrat dans les deux phases. Il a été montré que dans la phase aqueuse, la cinétique suit typiquement le modèle cinétique de Michaelis-Menten, tandis que dans l'huile de silicone elle suit le modèle d'Andrews tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat. Dans ce cas, l'équation de vitesse impliquée est la suivante (Eq 5.2) :

$$V_0 = \frac{V_{max}[2-CP]}{[2-CP]+K_m+(\frac{[2-CP]^n}{K_S})} \qquad \text{(Eq 5.2)}$$

Cette équation est caractérisée par un terme d'inhibition ($\frac{[2-CP]^n}{K_S}$) où $K_S$ est la constante de dissociation du complexe inactif enzyme-substrat. L'équation 5.2 peut être transformée sous la forme :

$$\frac{[2-CP]}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[2-CP]}{V_{max}} + \frac{[2-CP]^n}{K_S V_{max}} \qquad \text{(Eq 5.3)}$$

La représentation graphique de cette équation permet de déterminer les constantes cinétiques, $K_m$, $V_{max}$, $K_s$ (Figure 5.12).

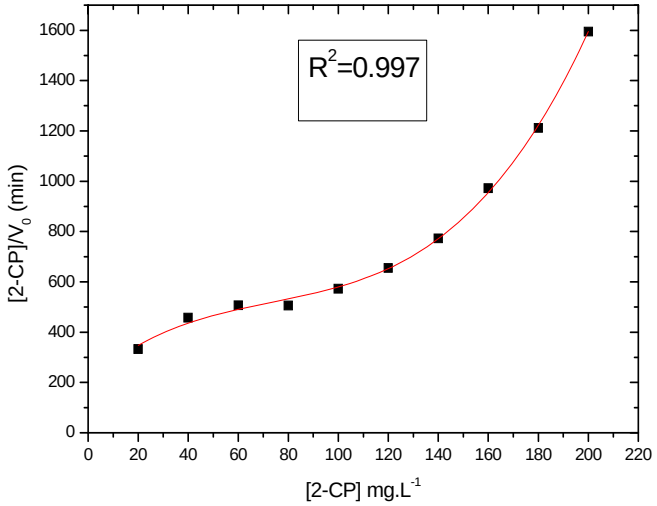



***Figure 5. 12.*** *Représentation graphique pour la détermination des constantes cinétiques du modèle d'Andrews pour le cas de la dégradation du 2-CP dans le PDMS 47V20*

En contrepartie, la linéarisation du modèle de Michaelis-Menten obtenu dans les deux phases par la relation de Lineweaver–Burk donne les courbes ci-dessous (figure 5.13) :

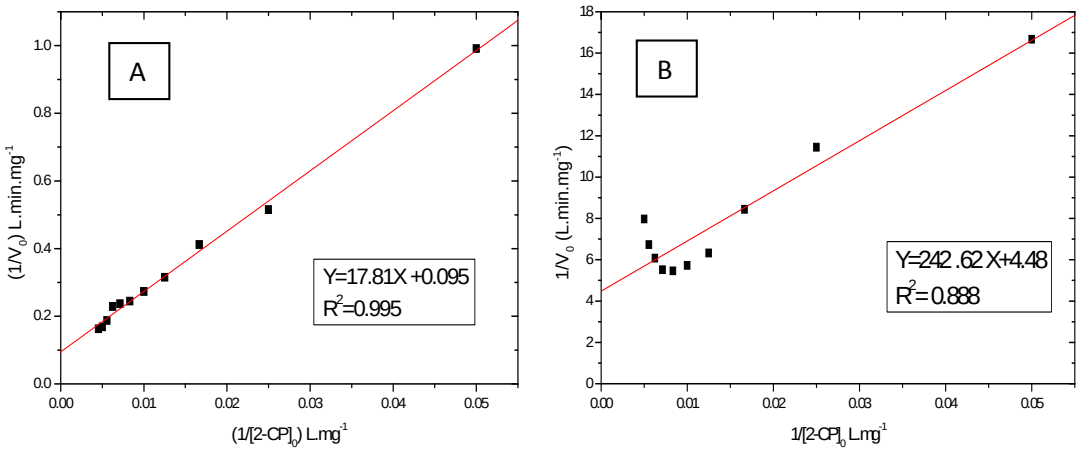



***Figure 5. 13.*** *Linéarisation de Lineweaver–Burk, pour la détermination des constantes cinétiques de la dégradation du 2-CP en phase aqueuse (A), et en phase huileuse (B).*

Les valeurs de $K_m$ et $V_{max}$ ainsi obtenues sont illustrées sur le tableau 5.2 :

***Tableau 5. 3.*** *Constantes cinétiques des modèles de Michaelis-Menten et d'Andrews pour la dégradation du 2-CP par BRP-CLEAs en phase aqueuse et dans le PDMS 47V20*

| | Modèle de Michaelis-Menten | Modèle d'Andrews |
|---|---|---|
| Tampon phosphaté | $K_m$=187.47 mg.L$^{-1}$<br>$V_{max}$= 10.52 mg.L$^{-1}$.min$^{-1}$<br>$R^2$ = 0.995 | |
| Huile de silicone (47V20) | $K_m$= 54.15 mg.L$^{-1}$<br>$V_{max}$= 0.223 mg.L$^{-1}$.min$^{-1}$<br>$R^2$= 0.888 | $K_m$= 23.71 mg.L$^{-1}$<br>$V_{max}$= 0.115 mg.L$^{-1}$.min$^{-1}$<br>$K_s$= 21276<br>n = 3<br>$R^2$ = 0.997 |

La représentation graphique de [2-CP] /$V_0$ en fonction de [2-CP] donne une allure hyperbolique avec un coefficient de corrélation $R^2$ de 0.995, la courbe devenant concave aux valeurs élevées de [2-CP], où [2-CP]/$K_s$ n'est plus négligeable (Figure 5.12). Comparée à la corrélation obtenue avec le modèle de Michaelis-Menten ($R^2$ = 0.888), il est évident que le modèle d'Andrews est plus adéquat pour estimer les valeurs des constantes cinétiques apparentes ($K_m$,$V_{max}$) des BRP-CLEAs dans l'huile de silicone.

Le $K_m$ reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Une faible valeur de $K_m$ reflète une bonne affinité pour le substrat. Par conséquent, quand le 2-CP est utilisé comme substrat, les BRP-CLEAs présentent plus d'affinité au 2-CP dans l'huile de silicone par rapport à celle observée en phase aqueuse. De même, en comparant les données obtenues avec le phénol comme substrat, l'efficacité catalytique ($V_{max}$) est plus importante dans le cas du 2-CP. Des résultats similaires ont été obtenus par Gonzalez et al. lors de la dégradation enzymatique du phénol et du chlorophénol par la peroxydase (González et al., 2008).

Ces résultats confirment que la valeur de $K_m$ est une fonction directe de la nature du substrat, et que pour un même substrat, elle dépend de la nature du milieu réactionnel (Bindhu and Abraham, 2003; Konash and Magner, 2006; Singh et al., 2012).

### V.3.3. Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est connu comme co-substrat pour toutes les peroxydases. Pour évaluer son effet sur le processus de dégradation du 2-CP, sa concentration a été variée de 0.5 à 20 mM par une addition graduelle de 20 µL de $H_2O_2$ sur la durée totale de la réaction (5×4 µL) à partir de plusieurs concentrations mères fraîchement préparés.

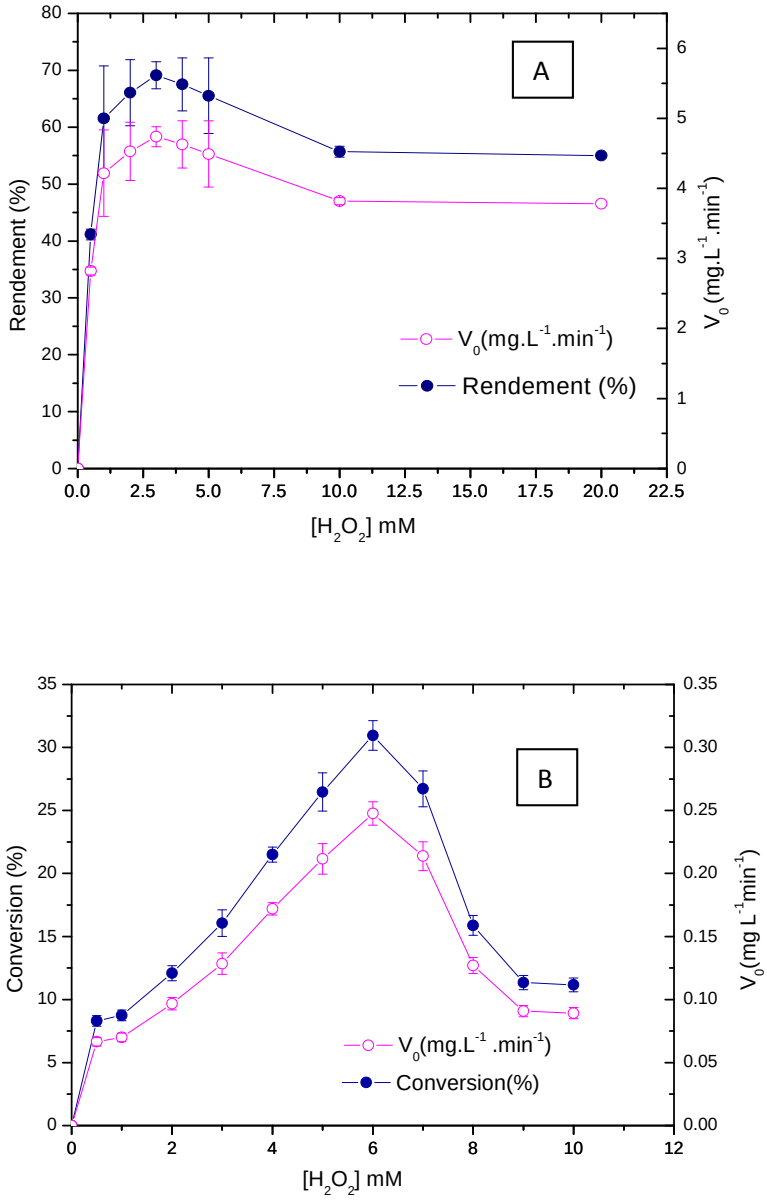



***Figure 5. 14.*** *Effet de la concentration initiale de $H_2O_2$ sur la vitesse initiale et sur le rendement de dégradation de 2-CP, (A) en phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20. (Composition : 5 mL de PDMS 47V20 ou de tampon phosphaté, 140 mg.L$^{-1}$ de 2-CP dans le tampon phosphaté et 80 mg.L$^{-1}$ dans le PDMS 47V20, 0.76 UI mL$^{-1}$ de BRP-CLEAs) à 25°C.*

Les figures 5.14.A et B illustrent l'effet de $H_2O_2$ sur la dégradation du 2-CP. Deux phases peuvent être observées. Une première phase d'augmentation pour des valeurs de concentrations en $H_2O_2$ de 0 à 3 mM en phase aqueuse et de 0 à 6 mM dans l'huile de silicone, suivie d'une phase de ralentissement, au cours de laquelle le rendement et la vitesse de la réaction diminuent progressivement pour des concentrations plus élevées en peroxyde d'hydrogène.

Ce phénomène est comparable à celui observé lors de la dégradation du phénol par BRP-CLEAs. Ceci est la conséquence de l'inactivation partielle de l'hème de peroxydase exercée par l'excès de peroxyde d'hydrogène (Bódalo et al., 2008; Deva et al., 2014).

Une vitesse de conversion et un rendement optimaux dans la phase aqueuse de 4.73 $mg.L^{-1}.min^{-1}$ et 69% ont été mesurés pour une concentration en $H_2O_2$ de 3 mM, alors que dans l'huile de silicone les valeurs optimales sont de 0.24 $mg.L^{-1}.min^{-1}$ et 30.95% obtenues pour une concentration en $H_2O_2$ de 6 mM.

### V.3.4. Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs

Généralement, l'augmentation de la quantité d'enzyme dans le milieu réactionnel a un effet significatif sur la vitesse de la réaction. L'influence de ce paramètre sur l'élimination du 2-CP a été étudiée par l'introduction de différentes quantités de BRP-CLEAs dans le mélange réactionnel. Les expériences sont menées dans les conditions optimales fixées précédemment. Les allures obtenues sont les suivantes (Figure 5.15) :

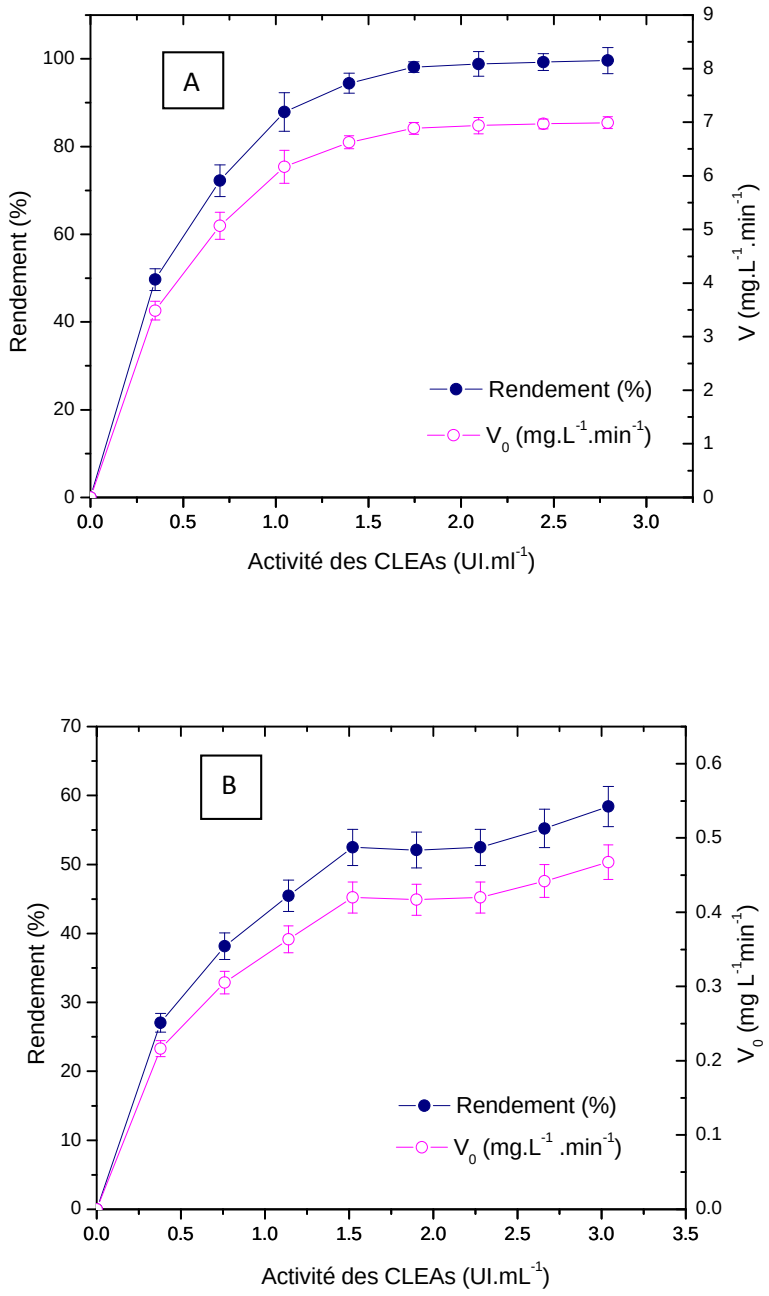



***Figure 5. 15.*** *Effet de l'activité des CLEAs sur la vitesse initiale et le rendement de dégradation de 2-CP, (A) en phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20. (Composition : 5ml de PDMS 47 V20 ou de tampon phosphaté, (140mg.L$^{-1}$, 3mM) et (80 mg L$^{-1}$, 6 mM) de 2-CP et $H_2O_2$ dans le tampon phosphaté et le PDMS 47V20 respectivement) à 25°C.*

Une première lecture des allures montre que l'activité des BRP-CLEAs possède un effet majeur sur le processus d'élimination du 2-CP dans la phase aqueuse, ainsi que dans le milieu organique apolaire représenté par le PDMS 47V20. En effet, quand la concentration en 2-CP est saturante, la vitesse initiale est directement proportionnelle à

l'activité des BRP-CLEAs pour des valeurs inférieures à 1.5 UI $mL^{-1}$. Dans ce cas, la vitesse de réaction peut être décrite par l'équation suivante :

$$V_0 = K.\ A_{CLEAs_0} \qquad \text{(Eq 5.4)}$$

Où K est la constante cinétique ($s^{-1}$).

$A_{CLEAs_0}$ est l'activité des CLEAs dans le milieu réactionnel (U.I.).

Pour une activité plus élevée des CLEAs, la vitesse maximale devient constante et elle ne dépend plus de l'activité enzymatique. A ce stade, la réaction atteint son équilibre et elle devient d'ordre zéro ($V_0 = K$). Dans cette gamme d'activité catalytique, des valeurs maximales de rendement et de vitesse de conversion sont atteintes : respectivement 60% et 0.46 $mg.L^{-1}.min^{-1}$ dans l'huile de silicone, et 99% et 6.93 $mg.L^{-1}.min^{-1}$dans le tampon phosphaté.

### V.3.5. Cinétiques de dégradation dans les conditions optimales

La comparaison des deux vitesses de dégradation obtenues dans les deux phases (aqueuse et organique) pourrait expliquer l'effet du phénomène de diffusion sur la vitesse de dégradation du 2-CP dans le PDMS 47V20. Toutefois, dans les conditions optimales précédemment fixées, il convient de suggérer une étude cinétique afin de ré-optimiser le temps effectif de la réaction et par conséquent améliorer la vitesse de conversion, comme cela est présenté sur la figure 5.16. Le profil de variation de la concentration du 2-CP en fonction du temps illustre que la vitesse initiale de la réaction $V_0$ peut être considérée durant les 30 minutes initiales seulement. Elle est de l'ordre de 1.58 $mg.L^{-1}.min^{-1}$. Une augmentation du temps de contact jusqu'à 135 minutes permet améliorer le rendement pour atteindre 70% de dégradation au lieu de 60 % (après 30 min).

A la lumière de cette remarque, il semble évident qu'en milieu organique, la disponibilité du substrat à la concentration favorable autour de l'enzyme permet de surmonter l'effet du transfert de masse sur la vitesse de transformation de ce substrat en produit.

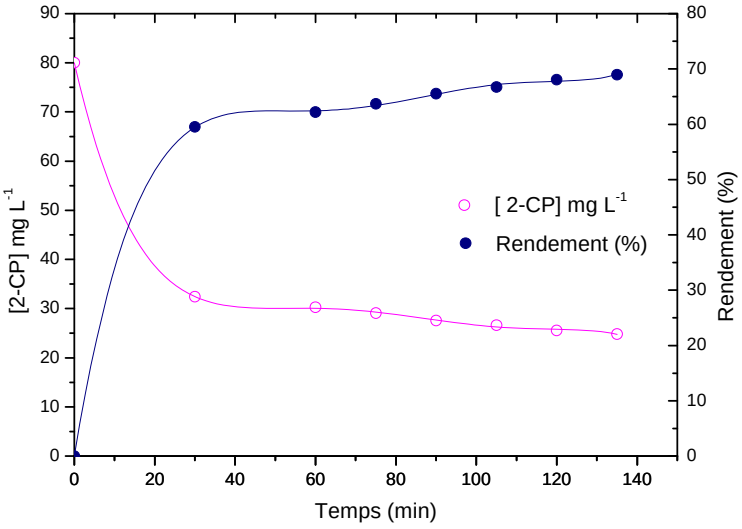



***Figure 5. 16.*** *Effet du temps de contact sur la concentration de 2-CP et le rendement de dégradation dans les conditions optimales (Composition : 5ml de PDMS 47V20, (80 mg $L^{-1}$, 6 mM) de 2-CP et $H_2O_2$ respectivement, 2.66 UI $mL^{-1}$ de BRP-CLEAs) à 25°C.*

### V.3.6. Recyclage des BRP-CLEAs pour la dégradation du 2-CP

La facilité de récupération et de recyclage du biocatalyseur compte parmi les avantages que présente l'immobilisation d'une enzyme pour une mise en œuvre efficace. Cette propriété a été vérifiée dans le cas des BRP-CLEAs lors du processus d'élimination du 2-CP dans les deux phases pour cinq cycles successifs. La capacité d'élimination a été calculée selon l'équation (Eq 3.12). Comme il est montré sur la figure 5.17, le 2-CP a été éliminé efficacement durant les trois premiers cycles avec une capacité d'élimination supérieure à 80% dans la phase aqueuse, et 55% dans l'huile de silicone. La perte d'activité enregistrée n'a pas dépassé 12% dans la phase aqueuse. Au-delà de trois réutilisations, une diminution significative du rendement d'élimination a été constatée. Ceci peut être attribué soit à l'accumulation de produits de polymérisation du 2-CP à la surface des BRP-CLEAs, (Figure 5.18), soit à une perte partielle de particules de CLEAs lors du lavage et de la centrifugation.

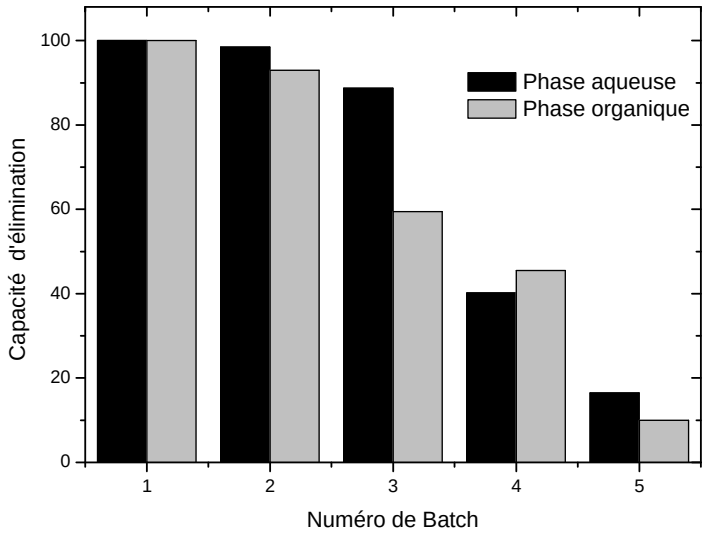



***Figure 5. 17.*** Essais en batch successifs pour l'élimination *de 2-CP par les BRP-CLEAs dans les deux phases*

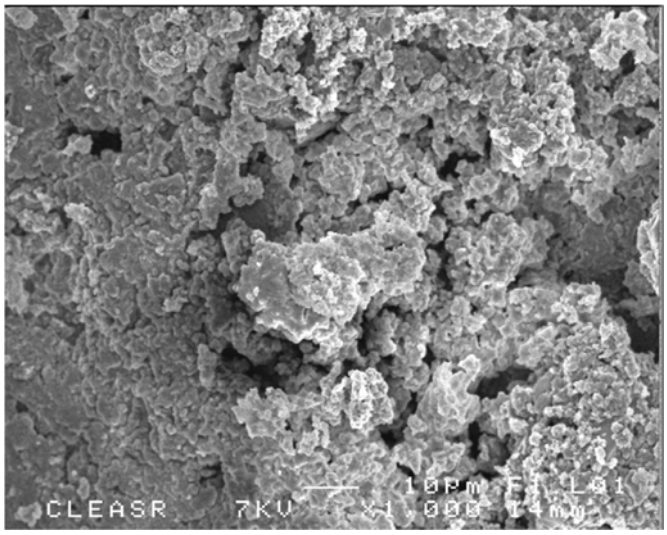



***Figure 5. 18.*** *Analyse de la surface des CLEAs par SEM après leur recyclage avec une résolution de (×1000)*

Il apparaît donc que le problème majeur de l'élimination des composés phénoliques par les CLEAs dans un milieu purement organique soit l'adhésion des produits insolubles présents dans cette phase à la surface du biocatalyseur provoquant son inhibition partielle. Toutefois, ce phénomène peut être minimisé, ou peut-être même évité, par le lavage des catalyseurs avec un solvant approprié (éthanol) avant sa réutilisation.

**Conclusion**

Sur le plan pratique, une évaluation de la capacité des BRP-CLEAs à éliminer le phénol et le 2-CP au sein de deux phases liquides différentes a permis de faire le point sur quelques facteurs à prendre en considération pour obtenir de bonnes performances.

- Le phénol et le 2-CP sont relativement solubles dans l'eau et dans l'huile de silicone, ce qui les rend plus disponibles dans la microcouche d'eau qui entoure les BRP-CLEAs.
- La dose de co-substrat, $H_2O_2$, nécessaire pour les BRP-CLEAs pour dégrader les deux molécules est plus importante en phase organique qu'en phase aqueuse.
- Les analyses ont démontré que la vitesse de la réaction dans le milieu organique dépend directement de la solubilité du substrat et de l'hydratation de l'enzyme (Lee and Kim, 1995).
- La valeur de $K_m$ diminue avec l'augmentation de l'hydrophobicité du milieu.
- Les contraintes diffusionnelles jouent un rôle important et affectent d'une manière significative l'efficacité du procédé.

**Référence bibliographies**

Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. Chem. Soc. Rev. *42*, 6406–6436.

Akhtar, S., and Husain, Q. (2006). Potential applications of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. Chemosphere *65*, 1228–1235.

Alemzadeh, I., and Nejati, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. J. Hazard. Mater. *166*, 1082–1086.

Ashworth, R.A., Howe, G.B., Mullins, M.E., and Rogers, T.N. (1988). Air-water partitioning coefficients of organics in dilute aqueous solutions. J. Hazard. Mater. *18*, 25–36.

Bindhu, L.V., and Abraham, T.E. (2003). Preparation and kinetic studies of surfactant–horseradish peroxidase ion paired complex in organic media. Biochem. Eng. J. *15*, 47–57.

Bódalo, A., Bastida, J., Máximo, M.F., Montiel, M.C., Gómez, M., and Murcia, M.D. (2008). A comparative study of free and immobilized soybean and horseradish peroxidases for 4-chlorophenol removal: protective effects of immobilization. Bioprocess Biosyst. Eng. *31*, 587–593.

Cheng, W., and Harper, W.F. (2012). Chemical kinetics and interactions involved in horseradish peroxidase-mediated oxidative polymerization of phenolic compounds. Enzyme Microb. Technol. *50*, 204–208.

Darracq, G. (2011). Couplage de l'absorption dans une phase organique et de la biodégradation dans un réacteur multiphasique Application au traitement de Composés Organiques Volatils hydrophobes. École nationale supérieure de chimie de Rennes.

Deva, A.N., Arun, C., Arthanareeswaran, G., and Sivashanmugam, P. (2014). Extraction of peroxidase from waste Brassica oleracea used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. J. Environ. Chem. Eng. *2*, 1148–1154.

Dordick, J.S., Marletta, M.A., and Klibanov, A.M. (1987). Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. Biotechnol. Bioeng. *30*, 31–36.

González, P.S., Agostini, E., and Milrad, S.R. (2008). Comparison of the removal of 2,4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. Chemosphere *70*, 982–989.

Gupta, M.N., Mukherjee, J., and Malhotra, D. (2013). Use of high activity enzyme preparations in neat organic solvents for organic synthesis. Univers. Org. Chem. *1*, 1.

Hanefeld, U., Gardossi, L., and Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. Chem Soc Rev *38*, 453–468.

Konash, A., and Magner, E. (2006). Characterization of an organic phase peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized in Eastman AQ. Biosens. Bioelectron. *22*, 116–123.

Lee, S.B., and Kim, K.-J. (1995). Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. J. Ferment. Bioeng. *79*, 473–478.

Masuda, M., Sakurai, A., and Sakakibara, M. (2001). Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using Coprinus cinereus peroxidase. Enzyme Microb. Technol. *28*, 295–300.

Montgomery, J.H. (2007). Groundwater Chemicals Desk Reference, Fourth Edition (CRC Press).

Olaniran, A.O., and Igbinosa, E.O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. Chemosphere *83*, 1297–1306.

Perlinger, J.A., Eisenreich, S.J., and Capel, P.D. (1993). Application of headspace analysis to the study of sorption of hydrophobic organic chemicals to .alpha.-alumina. Environ. Sci. Technol. *27*, 928–937.

Regil, R. de, and Sandoval, G. (2013). Biocatalysis for Biobased Chemicals. Biomolecules *3*, 812–847.

Singh, P., Prakash, R., and Shah, K. (2012). Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: Prospects for enzyme based applications. Talanta *97*, 204–210.

Zhang, F., Zheng, B., Zhang, J., Huang, X., Liu, H., Guo, S., and Zhang, J. (2010). Horseradish Peroxidase Immobilized on Graphene Oxide: Physical Properties and Applications in Phenolic Compound Removal. J. Phys. Chem. C *114*, 8469–8473.

# *Chapitre VI*

# *Etude de la biodégradation du toluène par les BRP-CLEAs en phases aqueuse et organique*

Après avoir étudié la faisabilité des enzymes immobilisées sur des molécules phénolique modèles, le travail a été poursuivi sur une molécule plus complexe figurant sur la liste des COVs à risque, le toluène. Sa biodégradation a souvent été étudiée par le passé mais la plupart du temps, par voie microbiologique. L'objectif pour ce composé est donc de vérifier sa biodégradabilité par la peroxydase extraite de *Brassica rapa* immobilisée sous forme des CLEAs dans le PDMS 47V20 tout en réalisant des expériences similaires à ce qui a été fait avec les deux molécules précédentes

# VI.1. Etude de la dégradation du toluène par les BRP-CLEAs en phase aqueuse

L'hydroxylation des composés aromatiques est l'une des réactions les plus difficiles à mettre en œuvre à cause de la stabilité de la molécule (Colonna et al., 1999). A l'heure actuelle, aucune étude dans la littérature ne rapporte la bio-oxydation de toluène par la peroxydase de radis noir (Horseradish) ou par une autre source de peroxydase extraite d'une source végétale. Tous les rapports disponibles décrivent seulement le potentiel de la peroxydase de classe II, peroxydase fongique (voir chapitre II), à oxyder le toluène en acide benzoïque tout en passant par les deux premiers stades d'oxydation que sont l'alcool benzoïque et le benzaldéhyde. Pour cette raison et comme initiative au traitement du toluène par absorption dans le PDMS 47V20, une étude préliminaire a été réalisée en phase aqueuse pour vérifier sa bio-oxydation par la peroxydase de *Brassica rapa*.

## VI.1.1. Cinétique de dégradation

Cette étude avait donc comme objectif principal de vérifier la faisabilité de la biodégradation du toluène par les BRP-CLEAs. Par la suite, il sera possible de déterminer le temps au bout duquel un maximum de dégradation serait atteint. Durant cette expérience, l'évolution de la concentration en toluène a été suivie pendant 8 heures. Ce suivi est représenté sur la figure 6.1.

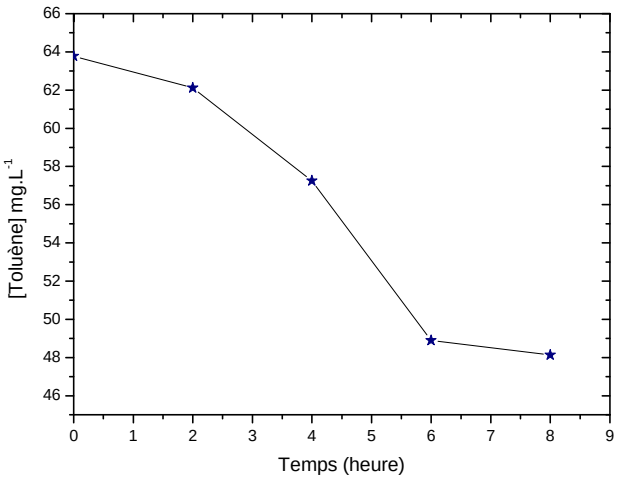



***Figure 6.1.*** *Cinétique de dégradation du toluène par les BRP-CLEAs dans une phase aqueuse (Conditions : 10 mL de tampon phosphaté (10 mM, pH=7 ) , 25×5 µl $H_2O_2$ (50 mM) , 3.5 UI.mL$^{-1}$,25°C, 300 trm).*

On constate que la peroxydase de *Brassica rapa* dégrade le toluène ; le profil de dégradation étant le même que celui observé avec le phénol ou le 2-CP. En revanche, le temps nécessaire pour obtenir des rendements satisfaisants est plus long et la dose de $H_2O_2$ consommée plus importante. Au bout de six heures, une dégradation de 22% a été observée. Nous pouvons donc conclure que les BRP-CLEAs peuvent catalyser un nouveau type de réactions, la bio-oxydation du toluène.

### VI.1.2. Effet du pH

Lors d'essais préliminaires de caractérisation, une bonne activité des BRP-CLEAs avait été observée sur une large gamme de pH (2 à 9). La figure 6.2. présente l'effet du pH sur l'efficacité des BRP-CLEAs pour l'oxydation du toluène.

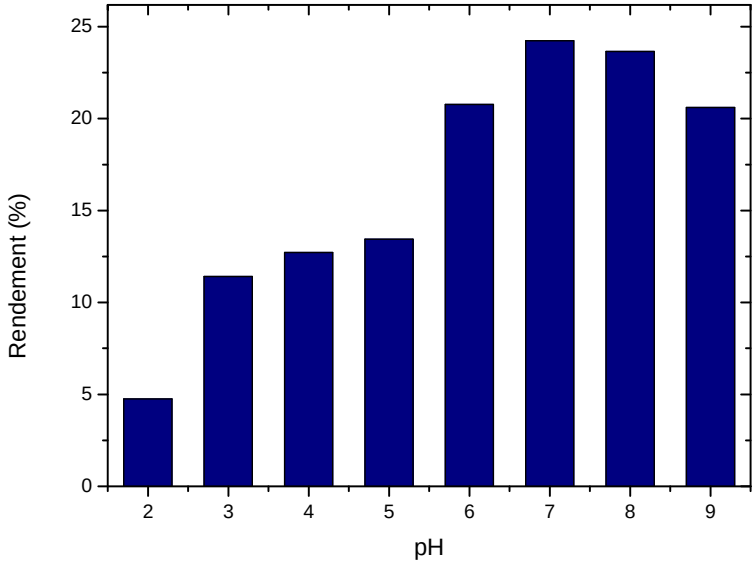



***Figure 6. 2.*** *Effet du pH sur la dégradation de toluène par les BRP-CLEAs dans une phase aqueuse (Conditions : 10 mL de tampon phosphaté (10 mM, pH=7), 32 mg.L$^{-1}$ de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$ (50 mM), 3.5 UI.ml$^{-1}$, 25°C, 300 trm).*

L'efficacité d'élimination du toluène est limitée en milieu acide. Lorsque le pH diminue vers des valeurs acides, la bio-oxydation du toluène ne dépasse pas les 15%, tandis que quand le pH tend vers la neutralité, le rendement est meilleur et tend vers une valeur maximale de 24% pour pH=7 à 8. On peut également constater que le pH optimal déduit pour l'activité enzymatique des BRP-CLEAs sur le toluène ne correspond pas

nécessairement au pH pour lequel la protéine enzymatique est la plus stable, ce qui porte à croire que l'état d'ionisation du substrat semble jouer un rôle sur sa réactivité (Niu et al., 2013).

Ce résultat est le point de démarrage de l'étude de dégradation du toluène absorbé dans l'huile de silicone, du moment que la valeur retenue ne constitue pas un obstacle dans l'huile de silicone, vu la neutralité de cette dernière.

### VI.1.3.Effet de la concentration initiale de toluène

Il a été décidé dans un premier temps de déterminer la concentration optimale de toluène permettant d'atteindre un rendement maximal d'élimination. Une série d'essais a donc été réalisée, en présence et en absence du biocatalyseur (BRP-CLEAs) ou en absence du co-substrat ($H_2O_2$) afin d'éliminer les erreurs et les interférences dues à la dégradation abiotique.

On observe sur la figure 6.3, que la vitesse initiale de la réaction augmente rapidement en fonction de la concentration en toluène, tandis que le rendement de la réaction ne présente pas vraiment d'évolution significative dans cette gamme de concentrations. Ce résultat pose donc une question fondamentale liée à la tolérance des BRP-CLEAs au toluène dans la phase aqueuse. Cette molécule, très volatile et hydrophobe, a plus tendance à être présente en phase gazeuse, ce qui rend le contact enzyme-substrat difficile en phase aqueuse. Ce qui peut aussi expliquer la valeur limitée du rendement. La concentration optimale adoptée pour la suite de l'étude sera donc 118 $mg.L^{-1}$ pour laquelle un rendement de 27% a été obtenu.

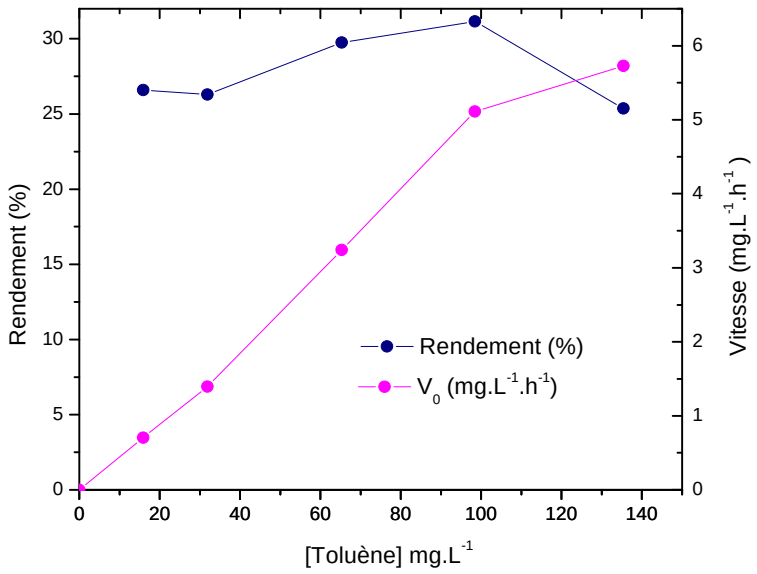



***Figure 6. 3.*** *Effet de la concentration initiale de toluène sur le rendement et la vitesse de dégradation en phase aqueuse (Conditions : 10 ml de tampon phosphaté (10 mM, pH=7), 25×5µL de $H_2O_2$ (50 mM), 3.5 UI.ml$^{-1}$ ,25°C , 300 trm).*

### VI.1.4. Effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène

Durant les essais de faisabilité, le peroxyde d'hydrogène était le facteur qui a présenté le plus d'impact sur le processus. A des concentrations très faibles, de l'ordre du millimolaire (inférieure à 10 mM), aucune dégradation n'a été observée. Par contre, à des doses plus élevées, les BRP-CLEAs sont devenues plus actives vis à vis du toluène. La courbe obtenue (figure 6.4) renforce l'hypothèse que le $H_2O_2$ est le paramètre le plus significatif.

La vitesse et le rendement montrent une évolution directe dans l'intervalle de concentration étudiée comprise entre 0.0125 et 0.075 M ; environ 34% du toluène a été éliminé.

Dans une étude récente, Ullrich et Hofrichter (Ullrich and Hofrichter, 2005) ont étudié l'hydroxylation du toluène par la peroxydase fongique de *Agrocybe aegerita.* Dans cette étude, l'ajout graduel d'une forte dose d'$H_2O_2$ était la clé du processus. A ce titre, deux points sont à surveiller lors de l'addition graduelle et continue de $H_2O_2$: premièrement, l'addition de $H_2O_2$ doit être arrêtée avant ou immédiatement à la fin de

la réaction. Deuxièmement, le taux d'addition de $H_2O_2$ est à ajuster selon la vitesse de la réaction (Velde et al., 2001).

Kinne et al (Kinne et al., 2010) ont montré dans leur étude d'oxydation du toluène par la même peroxydase fongique que la source d'oxygène incorporé dans le cycle d'oxydation du toluène en acide benzoïque est le $H_2O_2$. Dans ce cycle (voir Chapitre II, partie II.3.2.3), une molécule de $H_2O_2$ est introduite dans chaque étape d'oxydation.

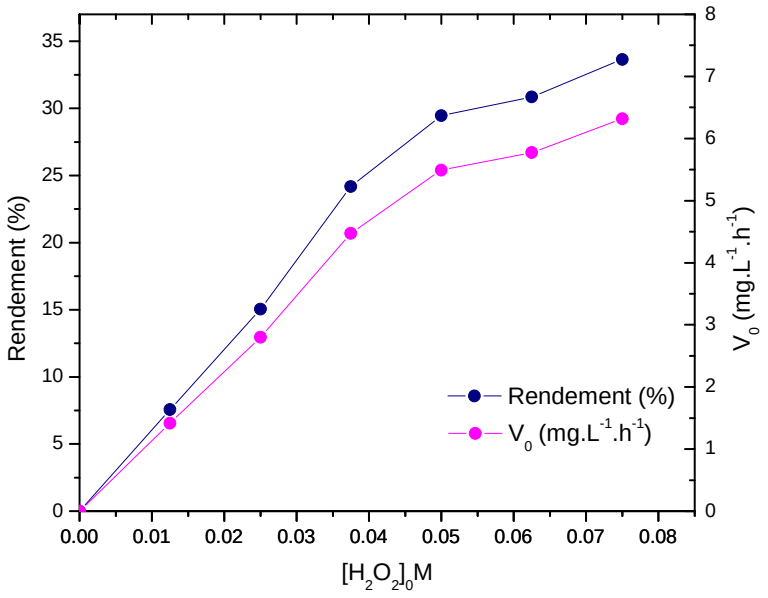



***Figure 6. 4.*** *Effet de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène sur le rendement et la vitesse de dégradation du toluène en phase aqueuse (Conditions : 10 ml de tampon phosphaté (10mM, pH=7), 118 mg.L$^{-1}$ de toluène, .25×5µL de $H_2O_2$, 3.5 UI.ml$^{-1}$ ,25°C, 300 trm).*

### VI.1.5.Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs

Une étude a également été menée sur l'activité des BRP-CLEAs après avoir fixé les concentrations en toluène et en $H_2O_2$. Pour ce faire, une gamme de 1.5 à 18 UI.mL$^{-1}$ a été choisie. Sur la figure 6.5, on observe quasiment le même effet qu'avec les deux autres molécules (phénol, 2-CP). Cependant, la conclusion qui peut être tirée est que l'activité des CLEAs dans ce cas n'a pas d'influence nette sur le processus. Le système atteint un équilibre pour une activité de 3.5 UI.mL$^{-1}$. La vitesse initiale tend vers une valeur maximale au voisinage de 9 mg.L$^{-1}$.h$^{-1}$, et le rendement maximal atteint est de l'ordre de 48%.

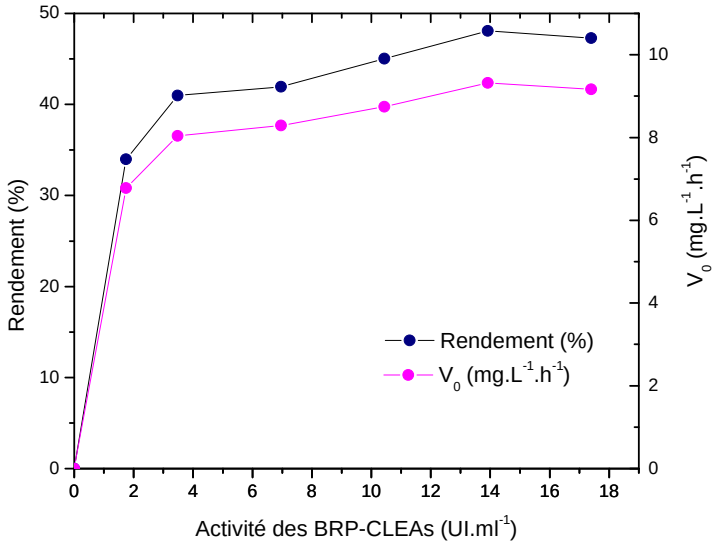



***Figure 6. 5.*** *Effet de l'activité initiale des BRP-CLEAs sur le rendement et la vitesse de dégradation du toluène en phase aqueuse (Conditions : 10 ml de tampon phosphaté (10mM, pH=7), 118 mg.L$^{-1}$ de toluène, .25×5µL de $H_2O_2$ (62mM), ,25°C, 300 trm).*

La première partie de l'étude a consisté à mettre au point et valider la faisabilité de l'oxydation de toluène par les BRP-CLEAs. Sur la base des résultats trouvés, nous pouvons confirmer que le toluène est une molécule difficilement biodégradable. Son oxydation par les BRP-CLEAs constitue un défi, surtout dans une phase dans laquelle il n'est pas miscible. De ce fait, et comme montré dans la partie V.1, le toluène étant bien piégé dans le PDMS 47V20, la suite de l'étude a consisté à vérifier son élimination en présence d'enzymes dans ce solvant.

## VI.2. Etude de la dégradation de toluène par les BRP-CLEAs dans l'huile de silicone (PDMS 47V20)

Les systèmes préparés pour cette étude sont présentés sur la figure 6.6. Les CLEAs sont introduites dans le PDMS 47V20 contenu dans des vials de 22 mL (A). Avant lancement de la réaction par injection de peroxyde d'hydrogène, les vials sont soumis à une sonication de 15 minutes afin de garantir la bonne dispersion des CLEAs (B). L'opération de sonication est ainsi vérifiée par un témoin qui rassure la non-dégradation du toluène sous l'effet des ondes d'ultrasons.

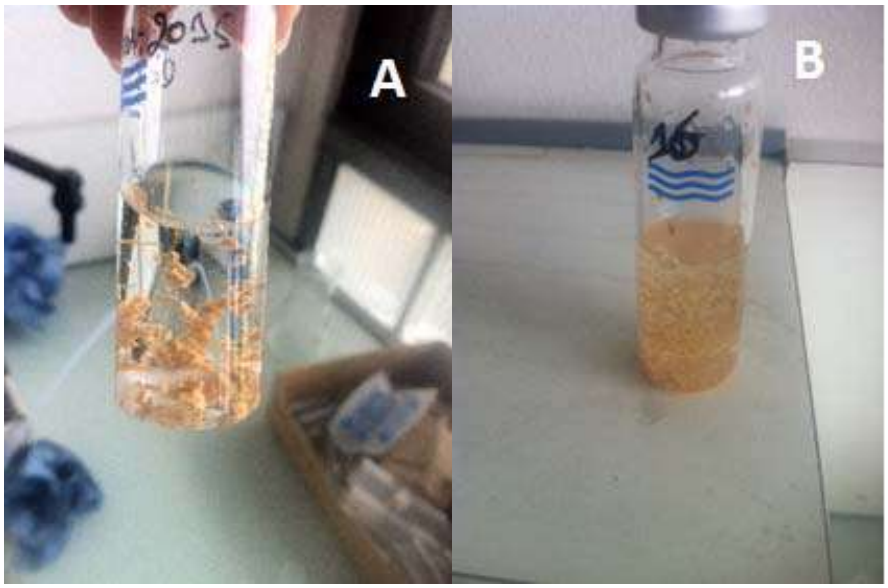



***Figure 6. 6.*** *Systèmes préparés pour la dégradation du toluène (A : avant sonication , B :Après sonication)*

### VI.2.1. Effet du temps de contact

Dans la phase aqueuse, 6 heures ont été nécessaires pour atteindre un optimum de rendement de réaction. Il convient de rappeller que ce temps n'est pas forcément le même dans l'huile de silicone (selon la conclusion qui a été faite après l'étude du phénol et du 2-CP). Dans cette phase, la concentration de toluène suit une cinétique d'ordre 1 ($A = A_0 e^{-Kt}$) ; on observe une diminution de la phase initiale en comparaison avec les

résultats trouvés pour le phénol et le 2-CP. Par conséquent, la vitesse initiale de la réaction ($V_0$) sera définie pour une durée de 4 heures (Figure 6.7).

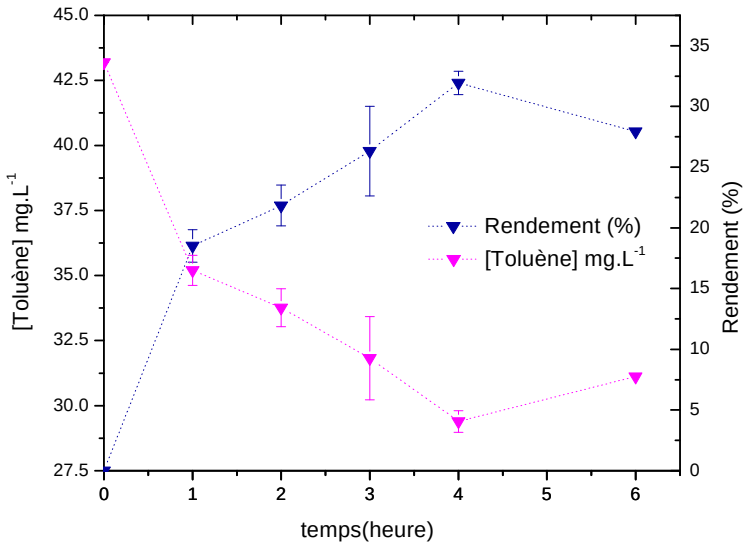



***Figure 6.7.*** *Effet du temps de contact sur la dégradation du toluène dans l'huile de silicone (Condition : 10 ml de PDMS 47V20, 43 mg.L$^{-1}$ de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$ (50mM), 4UI.ml$^{-1}$ de BRP-CLEAs,25°C, 600 trm).*

Cette diminution de la phase initiale dans le cas du toluène peut être attribuée à ce qu'on appelle « la sélectivité au substrat », qui est définie comme la capacité de l'enzyme à distinguer la nature du substrat selon la nature du milieu. Cela est généralement basé sur les interactions hydrophobes entre les résidus des acides aminés du site actif de l'enzyme et le substrat. En conséquence, un substrat hydrophobe est plus actif qu'un autre hydrophile dans un milieu organique (Klibanov, 1989, 2001). De plus, à l'inverse des molécules hydrophiles, les molécules hydrophobes qui sont plus solubles dans les phases organiques ne rencontrent pas les contraintes de diffusion externe. Par conséquent, elles seront plus disponibles pour l'enzyme (Gupta and Raghava, 2011).

### VI.2.2. Détermination des constantes cinétiques $K_m$ et $V_{max}$

Aucune donnée n'est disponible sur le comportement de la peroxydase dans un milieu organique, notamment avec des substrats hydrophobes comme le toluène. La variation de sa concentration révèle que les BRP-CLEAs dans l'huile de silicone ont une large tolérance vis-à-vis de ce dernier dans l'intervalle de concentration étudié

[0-500 mg.L$^{-1}$]. Sur la figure 6.8, on observe que la vitesse de la réaction augmente avec la concentration en toluène, tandis que le rendement est une fonction décroissante qui atteint sa valeur maximale de 32 % pour une concentration de 43 mg.L$^{-1}$. Dans le cas du toluène, les BRP-CLEAs ne semblent pas être inhibées à cause d'un excès de substrat, contrairement à ce qui avait été constaté avec le phénol et le 2-CP.

Dans une étude sur l'influence du partitionnement de l'eau ajoutée entre l'enzyme et le support d'immobilisation dans un milieu hydrophobe, Reslow et al. (Reslow et al., 1988) ont démontré que pour le solvant le plus hydrophobe utilisé, le toluène, utilisé pour une synthèse organique, nécessite une activité minimale en eau pour que la vitesse de la réaction atteigne son maximum. Cela est justifié par le fait que l'eau ajoutée va entourer le catalyseur, avec une diminution du taux de réaction pour une molécule hydrophobe comme le toluène. Une explication analogue pourrait donc être adoptée dans le cas de la bio-oxydation du toluène dans le PDMS 47V20.

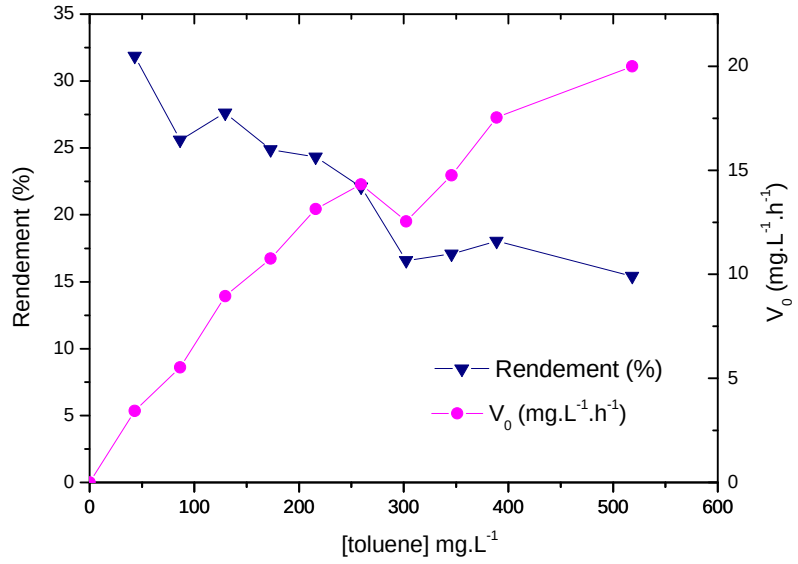



***Figure 6. 8.*** *Effet de la concentration initiale de toluène sur le rendement et la vitesse de dégradation dans l'huile de silicone (Conditions : 10 ml de PDMS 47V20, 25×5µL de $H_2O_2$ (50mM), 4UI.ml$^{-1}$ de BRP-CLEAs, 25°C, 600 trm).*

Le modèle de Michaelis-Menten est bien vérifié pour les deux phases de la réaction. Dans ce cas, les tracés de Lineweaver-Burk permettent l'estimation des valeurs de $K_m$ et de $V_{max}$. La courbe est donnée pour le PDMS 47V20 et comparée à celle obtenue en phase aqueuse (Figure 6.9). Les valeurs sont illustrées sur le tableau 6.1.

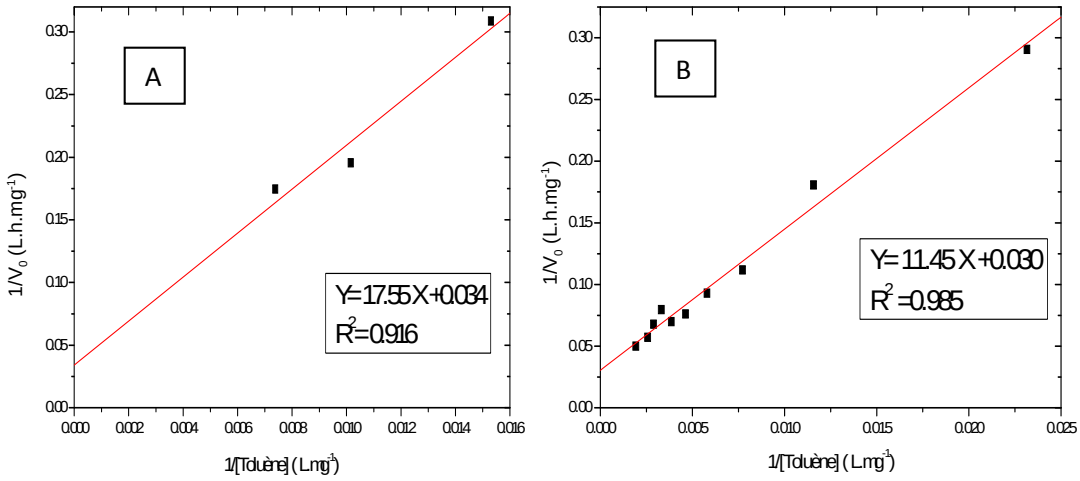



***Figure 6. 9.*** *Lineweaver–Burk linéarisation pour la détermination des constantes cinétiques, (A) en phase aqueuse, (B) dans le PDMS 47V20.*

***Tableau.6. 1.*** *Constantes cinétiques des BRP-CLEAs mesurées dans les deux phases pour la bio-oxydation du toluène par les BRP-CLEAs.*

| | $K_m$ (mg.L$^{-1}$) | $V_{max}$(mg.L$^{-1}$.h$^{-1}$) |
|---|---|---|
| Tampon phosphate | 516.17 | 29.41 |
| Huile de silicone (47V20) | 381.45 | 33.33 |

L'augmentation de la valeur de $K_m$ dans la phase aqueuse indique qu'une concentration plus élevée en toluène est demandée pour atteindre la vitesse maximale de la réaction. Une valeur importante de $K_m$ des BRP-CLEAs pour la bio-oxydation du toluène dans la phase aqueuse révèle une affinité limitée. Ceci peut s'expliquer par l'hydrophobicité de toluène qui peut altérer l'interaction enzyme-substrat.

La valeur de $V_{max}$ confirme que les BRP-CLEAs oxydent plus efficacement le toluène dans la phase organique.

### VI.2.3. Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène

Etant donné que l'ajout graduel du peroxyde d'hydrogène dans ce processus de bio-oxydation du toluène présente un effet majeur, nous avons fait varier sa concentration dans le mélange réactionnel par injection d'un volume de 25 µL en cinq fois durant la réaction. Les profils de rendement et de vitesse initiale ainsi obtenus sont présentés sur la Figure 6.10.

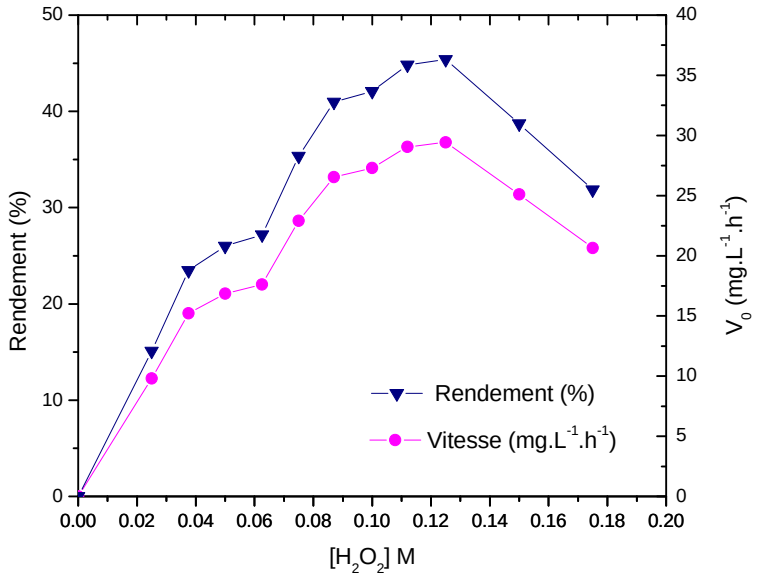



***Figure 6.10.*** *Effet de la concentration initiale de Peroxyde d'hydrogène sur le rendement et la vitesse de dégradation dans l'huile de silicone (Conditions : 10 ml de PDMS 47V20, 260mg.L$^{-1}$de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$, 4UI.ml$^{-1}$ de BRP-CLEAs, 25°C, 600 trm).*

Tenant compte des résultats trouvés en phase aqueuse, on admet alors que le peroxyde d'hydrogène est un paramètre clé. Une évolution remarquable du rendement et de la vitesse ont été enregistrés dans la gamme de concentration allant de 0 à 0.125 M. Des valeurs de 45% et 29 mg.L$^{-1}$.h$^{-1}$ ont été obtenues pour le rendement et la vitesse de dégradation pour une concentration en $H_2O_2$ de 0.10 M. Pour des concentrations plus élevées, on enregistre une chute de ces deux grandeurs.

Nous pouvons donc confirmer que dans l'huile de silicone ou dans un autre solvant organique hydrophobe, $H_2O_2$ peut être introduit de deux manières : graduellement par des injections séparées ou si l'installation le permet par sa génération à l'intérieur du système « in situ generation » (Velde et al., 2001). En effet, ces techniques sont

considérées comme pertinentes pour maintenir une concentration en $H_2O_2$ constante dans le microenvironnement du biocatalyseur en-dessous de la gamme inhibitrice afin de garantir une stabilité opérationnelle à l'enzyme.

Une vérification de l'activité catalytique des CLEAs a également été entreprise après l'ajout de peroxyde d'hydrogène. Pour ce faire, une quantité de CLEAs est récupérée après utilisation et son activité catalytique est vérifiée ; ou par l'introduction de quelques gouttes de guaiacol dans les vials et la formation de tetraguaiacol est suivie (Figure 6.11).



***Figure 6. 11.*** *Mise en évidence de l'activité catalytique des CLEAs après l'opération de dégradation du toluène (coloration rouge brique indiquant la formation de tetraguaiacol)*

### VI.2.4. Effet de l'activité initiale des CLEAs

Dans le but d'augmenter le rendement d'élimination du toluène, l'effet de la variation de l'activité des BRP-CLEAs sur le processus a été examiné. Dans une première étape, la concentration de toluène et de $H_2O_2$ ont été fixées à respectivement 260 $mg.L^{-1}$ et 0.112 mM.

A partir des résultats présentés sur la figure 6.12, il semble que l'activité des CLEAs introduites au début de l'étude était dans la gamme optimale. Pour une activité de 4 $UI.ml^{-1}$, un rendement de dégradation égal à 41% a été obtenu. Néanmoins, pour une activité 4 fois plus élevée (16 $UI.ml^{-1}$), un rendement maximal de 51% a pu être observé.

Ceci correspond à une vitesse de 33.24 $mg.L^{-1}.h^{-1}$.Cependant, une nouvelle augmentation de l'activité n'induit pas de changement significatif dans le processus.

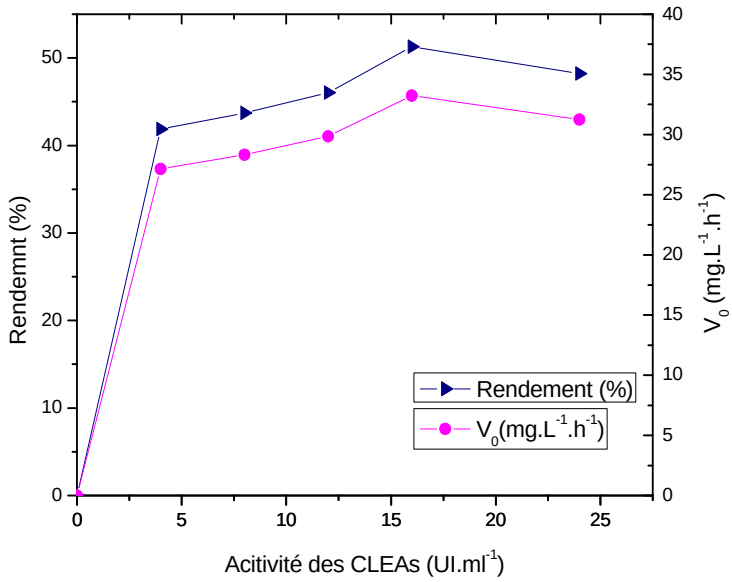



***Figure 6. 12.*** *Effet de la concentration des CLEAs sur le rendement et la vitesse de réaction de dégradation dans l'huile de silicone (Condition : 10 ml de PDMS 47V20, 260mg.L$^{-1}$de toluène, 25×5µL de $H_2O_2$ (0.112M), 25°C, 600 trm).*

### VI.2.5.Régénération de PDMS 47V20

Pour que l'élimination de toluène par ce procédé hybride d'absorption et de biodégradation soit rentable, l'huile doit être impérativement régénérée pour être réutilisée. Pour ce faire, l'huile de silicone (PDMS 47V20) issue du mélange réactionnel est récupérée par une simple centrifugation pour éliminer les BRP-CLEAs et subir par la suite un traitement spécifique. Le traitement est organisé en deux étapes principales :

- Tout d'abord, l'huile est lavée par l'eau ultra-pure dans une fraction volumique de (huile/eau, 1:2 , V/V) sous une agitation continue et à une température qui ne dépasse pas les 100°C. Cette étape d'extraction présente comme objectif l'élimination de tout composé non-volatil et soluble dans l'eau.
- Puis, l'huile est séparée de la phase aqueuse par décantation (Figure 6.13) et par la suite, chauffée à nouveau à 70 °C sous une agitation uniforme pour une durée de 72 heures. L'objectif de cette étape est de débarrasser l'huile de tout le

toluène qui reste absorbé, ou d'autres molécules hydrophobes caractérisées par une volatilité limitée.



***Figure 6. 13.*** *Aspect de l'huile de silicone 47V20 après son lavage*

Après ces deux étapes de traitement, un prélèvement de la phase gaz qui se trouve à l'interface de PDMS est analysé par chromatographie en phase gaz. Si aucun pic n'est apparu, cela montre que le PDMS a été bien lavé et il est à nouveau prêt à être réutilisé dans un cycle catalytique.

**Conclusion**

Le toluène est un composé hydrophobe absorbable essentiellement dans les phases organiques. La réduction de sa concentration dans l'air par couplage de l'absorption et de la bio-oxydation en utilisant la peroxydase de *Brassica Rapa* était l'objectif de cette partie d'étude.

Il a été démontré que dans certaines conditions, la peroxydase végétale de *Brassica rapa* est capable de catalyser ce type de réaction. Il a été observé que la dégradation est favorable à pH neutre et que dans le PDMS 47V20, la réaction est plus rapide. Elle dépend spécifiquement de la concentration de $H_2O_2$ qui est de l'ordre de 0.112 M dans cette phase. En outre, les BRP-CLEAs montrent plus d'affinité pour cette molécule hydrophobe dans le PDMS 47V20 que dans l'eau.

La biocatalyse dans les solvants organiques dépend essentiellement de la stabilité de l'enzyme dans le système hydrophobe (Vazquez-Duhalt, et al., 1992). Cette stabilité a ainsi été vérifiée en mesurant l'activité catalytique des BRP-CLEAs issues de l'opération.

**Références bibliographiques**

Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., and Pasta, P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. Trends Biotechnol. *17*, 163–168.

Gupta, M.N., and Raghava, S. (2011). Enzyme Stabilization via Cross-Linked Enzyme Aggregates. In Enzyme Stabilization and Immobilization, S.D. Minteer, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 133–145.

Kinne, M., Zeisig, C., Ullrich, R., Kayser, G., Hammel, K.E., and Hofrichter, M. (2010). Stepwise oxygenations of toluene and 4-nitrotoluene by a fungal peroxygenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. *397*, 18–21.

Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. Elsevier Sci. Publ. *14*, 141–144.

Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. Macmillan Mag. *409*, 241–246.

Niu, J., Xu, J., Dai, Y., Xu, J., Guo, H., Sun, K., and Liu, R. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase by electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of pentachlorophenol in water. J. Hazard. Mater. *246-247*, 119–125.

Rafael Vazquez-Duhalt, Phillip M. Fedorak, and Donald W. S. Westlake (1992). Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents.

Reslow, M., Adlercreutz, P., and Mattiasson, B. (1988). On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. Eur J Biochem *172*, 573–578.

Ullrich, R., and Hofrichter, M. (2005). The haloperoxidase of the agaric fungus Agrocybe aegerita hydroxylates toluene and naphthalene. FEBS Lett. *579*, 6247–6250.

Velde, F. van de, Rantwijk, F. van, and Sheldon, R.A. (2001). Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. Trends Biotechnol. *19*, 73–80.

# *Conclusion générale et perspectives*

## Conclusion

L'objectif principal de ce travail était de proposer une solution innovante pour l'élimination de composés organiques volatils. Ces dernières années, un procédé hybride couplant absorption et biodégradation dans un réacteur multiphasique biologique (TPPB) est à l'étude. Ce procédé consiste à absorber des COVs contenus dans un effluent gazeux pollué dans une phase organique appelée solvant dans un contacteur gaz-liquide. Puis, le solvant chargé est envoyé dans un TPPB, contenant des microorganismes en phase aqueuse, chargés de consommer les COVs sans s'attaquer au solvant, celui-ci visant à être recyclé en tête de procédé. A l'échelle du laboratoire, ce procédé a montré de bonnes performances. Néanmoins, lors du passage à l'échelle pilote, certaines limites et contraintes d'ordre pratique ont été soulevées, notamment la séparation de la phase organique et de la phase aqueuse contenant les boues activées, les microorganismes ayant produit des biotensioactifs stabilisant l'émulsion eau/huile.

La technologie proposée dans ce travail est basée sur l'utilisation d'enzymes immobilisées comme biocatalyseur de la réaction de transformation des COVs suite à leur absorption dans un solvant organique, l'huile de silicone. Cette approche permet d'éviter d'introduire une phase aqueuse dans le réacteur biologique et de réaliser la dégradation des COVs dans la même phase absorbante, en conditionnant l'enzyme par la méthode de réticulation afin qu'elle puisse garder son pouvoir catalytique au sein de la phase organique.

La peroxydase de *Brassica rapa* a été retenue comme biocatalyseur en raison de sa capacité à oxyder un grand nombre de composés organiques toxiques simplement en présence de peroxyde d'hydrogène dans le milieu.

Pour mettre en œuvre cette approche innovante, le travail était organisé en trois volets principaux :

- Premièrement, l'étude de l'immobilisation de la peroxydase sous une forme qui lui permet de montrer une activité catalytique et une stabilité dans les solvants organiques.
- Le deuxième volet concerne l'aspect thermodynamique qui tient compte de l'évaluation de l'efficacité de l'absorption des COVs sélectionnés dans le

solvant choisi pour l'étude. Cette approche était réalisée par la détermination des coefficients de partage (air/solvant).

- Le dernier volet relevant du génie de la réaction, a été consacré à l'optimisation des conditions opératoires qui permettent d'obtenir la meilleure efficacité de dégradation des COVs par l'enzyme immobilisée, efficacité ayant été mesurée à l'aide de deux paramètres : le rendement d'élimination du COV et la vitesse d'élimination du COV.

### *1- Immobilisation de la peroxydase de Brassica rapa sous forme d'agrégats de l'enzyme réticulée (BRP-CLEAs)*

La principale originalité de ce travail est l'introduction de la technologie des CLEAs comme méthode d'immobilisation pour la peroxydase de *Brassica rapa*. L'efficacité de cette immobilisation a été évaluée grâce à deux paramètres essentiels, notamment le taux d'agrégation et l'activité résiduelle. Il a été trouvé que le meilleur solvant pour la précipitation de la peroxydase est l'acétone pour une concentration optimale de la peroxydase de 74.88 $UI.mg^{-1}$. La réticulation a été effectuée par le glutaraldéhyde, qui a été utilisé à une concentration optimale de 2%. Comme efficacité catalytique, cette technique a conduit à la formation d'un biocatalyseur (BRP-CLEAs) caractérisé par une stabilité thermique et chimique qui ont été comparées à celles de l'enzyme libre. Les BRP-CLEAs ont montré une stabilité opérationnelle importante dans les solvants hydrophobes et plus spécifiquement dans les huiles de silicone.

Cette stabilité dans les huiles de silicones est le paramètre qui confirme la réussite de cette technique de stabilisation des enzymes dans les solvants organiques. Une technique simple, efficace et peu onéreuse.

### *2- Sélection de l'huile de silicone (PDMS) comme solvant d'absorption des COVs et détermination de capacité d'absorption*

Après avoir vérifié la tolérance des BRP-CLEAs aux huiles de silicone et compte tenu des caractéristiques de base de ce type d'huiles (la non-biodégradabilité, la basse pression de vapeur et la faible viscosité, la biocompatibilité vis-à-vis de la peroxydase,

l'affinité pour les COVs cibles, la faible toxicité, la stabilité thermique ….), l'huile de silicone a été choisie pour être la phase absorbante dans notre étude.

Le paramètre expérimental qui confirme ce choix est bien le coefficient de partage du COV entre l'huile et la phase gazeuse. Les valeurs obtenus pour le toluène sont 2.08 et 2.52 $Pa.m^3.mol^{-1}$ respectivement pour le PDMS 47V20 et le PDMS 47V5 (viscosités de 20 et 5 cp). En comparant ces valeurs à celles du toluène dans l'eau, 666.46 $Pa.m^3.mol^{-1}$, nous pouvons conclure que les deux types d'huiles de silicone choisies ont une grande capacité à réduire la concentration de toluène dans la phase gaz. Cependant, l'huile 47V20 a été retenue pour la suite de l'étude car elle présente une capacité d'absorption légèrement supérieure.

Le coefficient de partage du 2-CP dans cette dernière est de 0.136 $Pa.m^3.mol^{-1}$, alors que sa valeur dans l'eau est estimée à 0.619 $Pa.\ m^3.mol^{-1}$. Bien que l'écart entre les deux solvants soit plus faible que celui obtenu pour le toluène, il confirme que l'on peut utiliser cette huile pour ce composé également.

### *3- Elimination du phénol, 2-CP et du toluène par les BRP-CLEAs après leur absorption dans le PDMS 47V20*

*a- Le phénol*

Comme étape préliminaire essentielle de l'étude, le traitement a été testé sur le phénol, une molécule modèle et substrat classique des peroxydases. Le phénol a été absorbé dans le PDMS 47V20 et similairement, afin de comparer les performances cinétiques de BRP-CLEAs dans le PDMS, l'étude a été menée dans une phase aqueuse.

Les résultats ont prouvé la capacité catalytique des BRP-CLEAs à dégrader le phénol dans le PDMS 47V20 et en phase aqueuse. Le temps optimal de dégradation mesurée dans l'huile est plus important que celui obtenu en phase aqueuse, ainsi que la dose de peroxyde d'hydrogène nécessaire. Le rendement d'élimination obtenu dans les conditions optimales a été de 75% avec une vitesse de dégradation de 1.2 $mg.L^{-1}.min^{-1}$ pour une concentration en phénol de 60 $mg.L^{-1}$.

*b- Le 2-CP*

Le travail a été étendu à une autre molécule à caractère volatil, le 2-CP. Les conditions optimales ainsi fixées pour cette molécule ont été les suivantes : 80 $mg.L^{-1}$ de 2-CP, 6 mM de $H_2O_2$ et 2.66 UI $mL^{-1}$ d'activité des BRP-CLEAs. Dans ces conditions, les maximums pour le rendement et la vitesse initiale ont été respectivement de 70% et 1.58 $mg.L^{-1}.min^{-1}$. Cependant, dans l'huile de silicone, il a été montré qu'au-delà d'une certaine concentration des deux molécules traitées, la réaction enzymatique semble être inhibée, ce qui provoque une décroissance de la vitesse de la réaction. Ce phénomène, comme démontré par l'analyse microscopie électronique des CLEAs après la réaction, serait dû à l'accumulation de polymères insolubles issus de la réaction catalytique à la surface des BRP-CLEAs.

*c- Le toluène*

Pour cette dernière molécule, la plus volatile, une étude de faisabilité en phase aqueuse a été tout d'abord entreprise. Il a été démontré que la peroxydase végétale de *Brassica rapa* est capable d'oxyder le toluène, ce qui est un résultat original au vu de l'absence d'études à ce sujet. Après son absorption dans le PDMS 47V20, le toluène a montré plus de réactivité. A ce sujet, un temps optimal de réaction de 4 heures seulement a été suffisant pour atteindre l'équilibre. De plus, les BRP-CLEAs ont pu tolérer jusqu'à 500 $mg.L^{-1}$ de toluène sans que l'on observe de phénomène d'inhibition. Les concentrations optimales déduites de cette étude sont estimées à 0.112 M de $H_2O_2$ et 16 $UI.mL^{-1}$ de BRP-CLEAs. Le rendement et la vitesse de la réaction obtenus dans ces conditions sont alors respectivement égaux à 51% et 33.24 $mg.L^{-1}.h^{-1}$.

Les paramètres cinétiques ($K_m$ et $V_{max}$) déterminés pour les BRP-CLEAs dans les deux phases et pour les trois molécules ont confirmé que les BRP-CLEAs ont plus d'affinité vis-à-vis des COVs dans l'huile de silicone 47V20. Cependant, les vitesses maximales de la réaction sont plus faibles dans les cas du phénol et du 2-CP, par comparaison à celle obtenue pour le toluène.

## Perspectives

Les perspectives de ce travail consisteront principalement dans un premier temps à essayer d'améliorer la stabilité des CLEAs en milieu organique.
Pour les BRP-CLEAs, d'autres additifs protéiques peuvent être ajoutés à la peroxydase brute ou encore une autre enzyme afin d'obtenir des CLEAs hybrides avec des performances plus avancés. En outre, la préparation de lyophilisats de l'enzyme ou de CLEAs pourra aussi être une solution envisageable pour l'amélioration des performances techniques du biocatalyseur, notamment sa dispersibilité dans les solvants hydrophobes.

Sur le plan du traitement des COVs, toute l'étude réalisée a été menée à l'échelle de laboratoire dans des vials de 22 mL. A minima, une étude en réacteur semi-continu pourra être envisagée.

Bien que 50% de dégradation a été obtenue pour le toluène, la technique peut bénéficier d'une amélioration tout en adoptant une autre méthode d'optimisation telle que l'optimisation par la méthode de surface de réponse ou bien par l'établissement d'un système de recyclage de l'huile résiduelle chargé en toluène pour qu'elle soit retraitée.

Pour finir, l'étude pourra être développée sur un autre axe qui consiste à explorer les mécanismes d'oxydation du toluène par les BRP-CLEAs. Une étude complète doit être mise en place afin de rechercher et identifier les sous-produits de dégradation de ce dernier, ainsi que pour améliorer le rendement trouvé. Cela, peut être réalisé par l'introduction d'un autre type de substrat donneur d'oxygène à la place de $H_2O_2$ ou par sa génération à l'intérieur du système.

# *Annexes*

# Annexe 1. Choix de la peroxydase de *Brassica rapa*

La peroxydase a été extraite à partir de trois espèces végétales différentes : l'espèce algérienne, le navet blanc de *Brassica rapa*, et les espèces européennes, le navet rond et le radis noir (*Horseradish*). Les extraits ont été préparés par l'homogénéisation de 50 g de fruit épluché avec 25 mL de tampon phosphaté (50 mM, pH =7) . Les mélanges obtenus sont filtrés à travers des compresses propres pour enlever les résidus solides et testés en termes d'activité catalytique en utilisant le protocole décrit dans la section (III.2.2). Les résultats sont présentés sur la figure A-1..

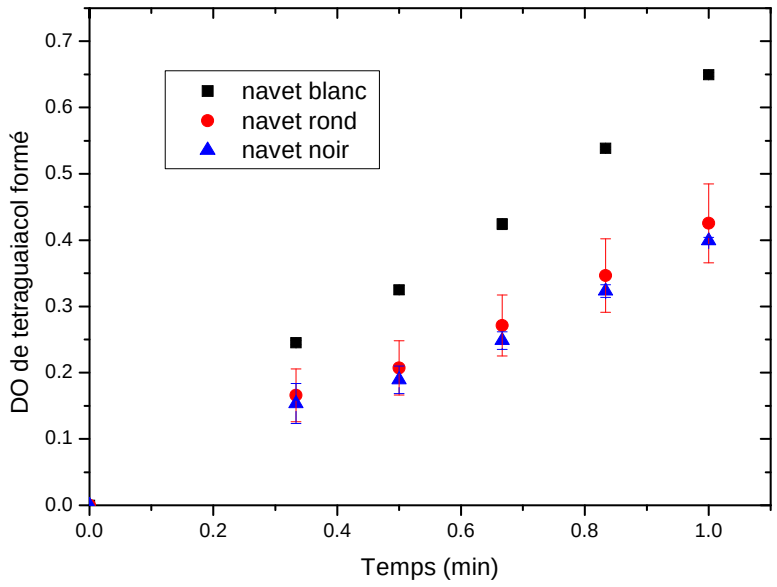



**Figure A-1.** Activité catalytiques des trois extraits enzymatiques

La première lecture de la figure révèle la richesse du navet algérien de Brassica rapa. L'extrait de ce dernier est caractérisé par une activité catalytique de 30UI .mL$^{-1}$, ce qui représente à peu près le double des activités des deux autres navets.

## Annexe 2. Calcul du coefficient d'extinction molaire pour convertir la densité optique de tetraguaiacol en concentration

Pour pouvoir transférer le développement de la densité optique de tetraguaiacol formé au cours de la transformation du guaiacol par la peroxydase en concentration, le coefficient d'extinction molaire (ε) est calculé en se basant sur la même réaction de détermination de l'activité enzymatique.

A l'aide d'une solution mère d' $H_2O_2$ de 30%, on prépare une série de dilutions de (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18).$10^{-5}$ M. Les mélanges réactionnels sont préparés comme décrit dans la section (III.2.2). Puis 5 µL de la solution de $H_2O_2$ est injectée dans le mélange pour déclencher la réaction.

La densité optique ainsi obtenue à 470 nm pour chacune des concentrations est mesurée et la courbe d'étalonnage est tracée (Figure A-2)

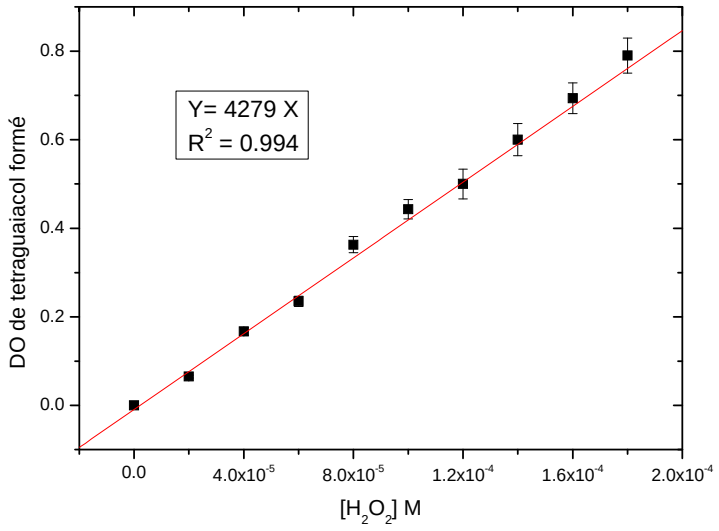



**Figure A-2.** Etalonnage de peroxyde d'hydrogène par le guaiacol

# Annexe 3. Courbes d'étalonnage

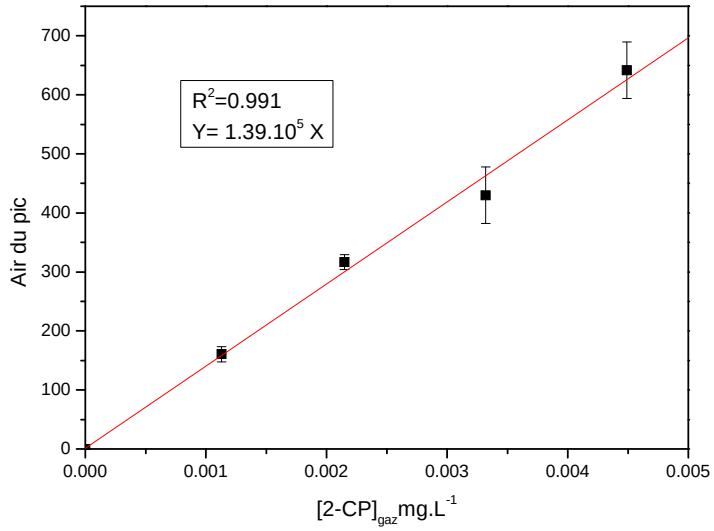



**Figure A-3. 1.** Etalonnage de 2-CP dans la phase gaz

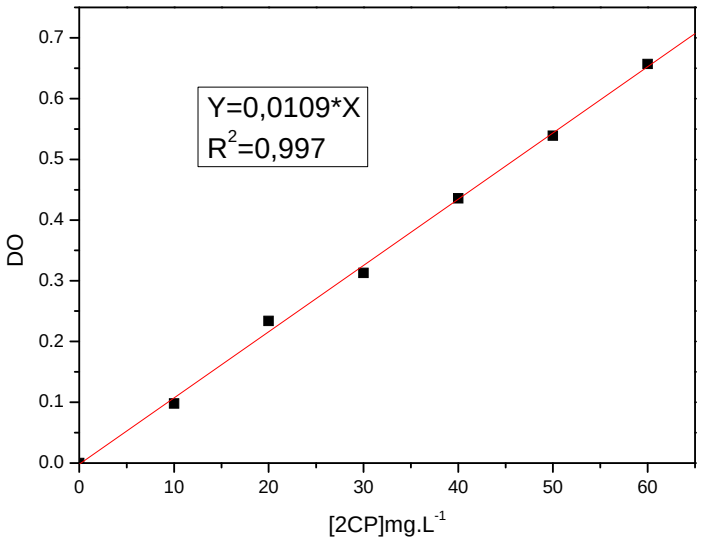



**Figure A-3. 2.** Etalonnage du 2-CP en phase aqueuse par la méthode du ferrycianure

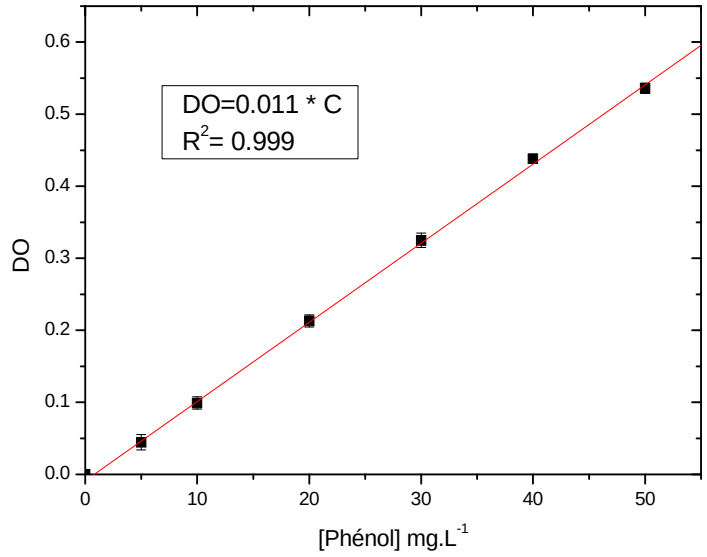



**Figure A-3. 3.** Courbe d'étalonnage du phénol en phase aqueuse par la méthode du ferrycianure

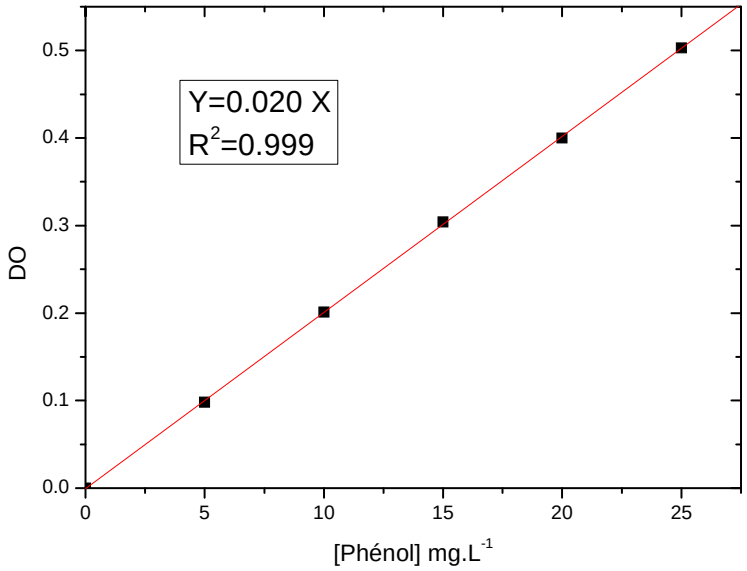



**Figure A-3. 4.** Courbe d'étalonnage du phénol dans le PDMS 47V20 par la méthode UV.

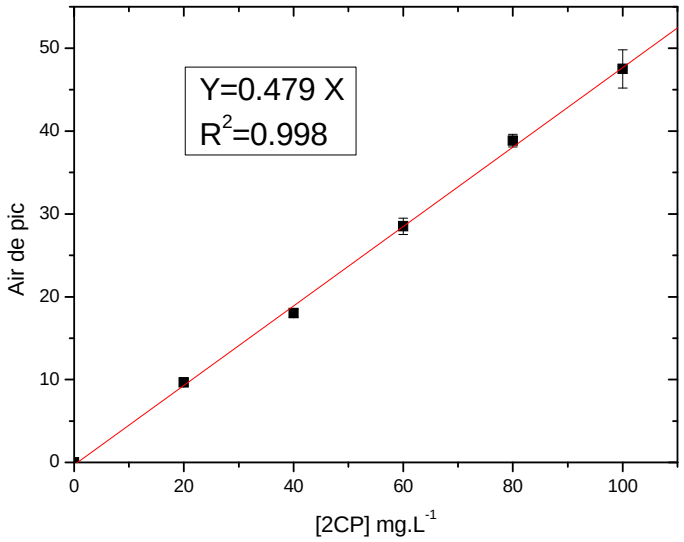



**Figure A-3. 5.** Etalonnage du 2-CP dans le PDMS 47V20 par la méthode de l'hexane

# Annexe 4. Détermination des coefficients de partage

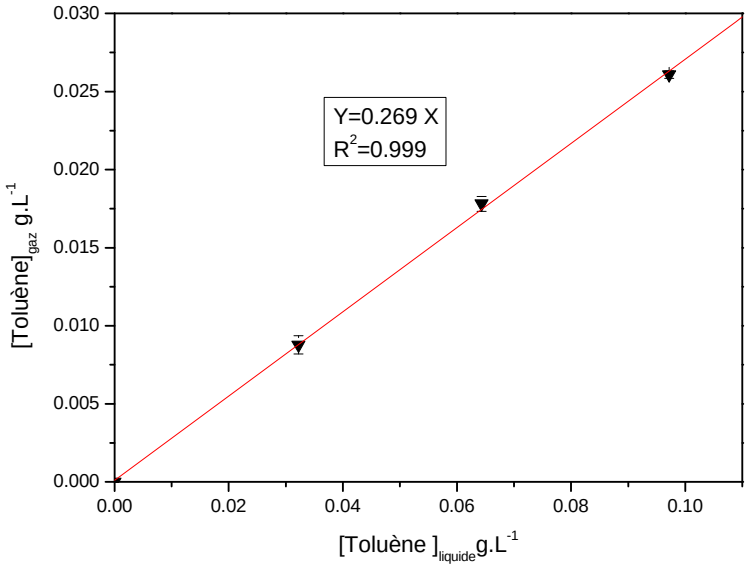



**Figure A-4. 1.** Coefficient de partage du toluène dans l'eau

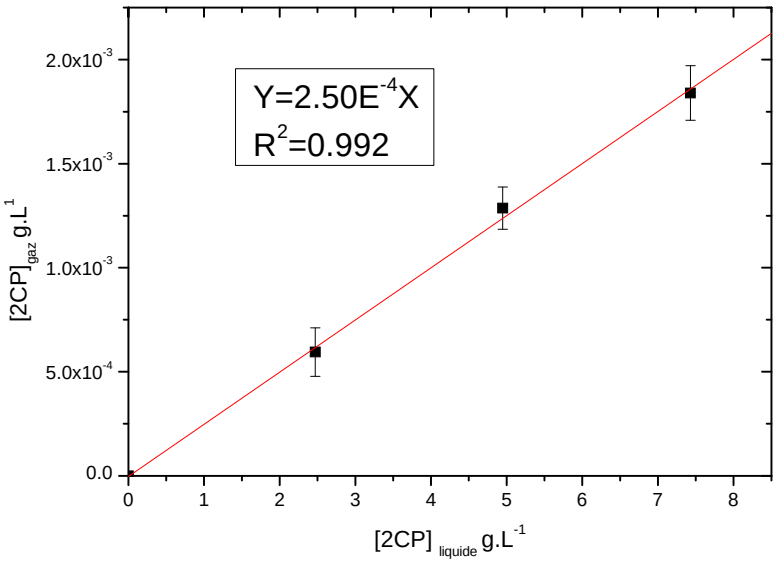



**Figure A-4. 2.** Coefficient de partage du 2-CP dans l'eau

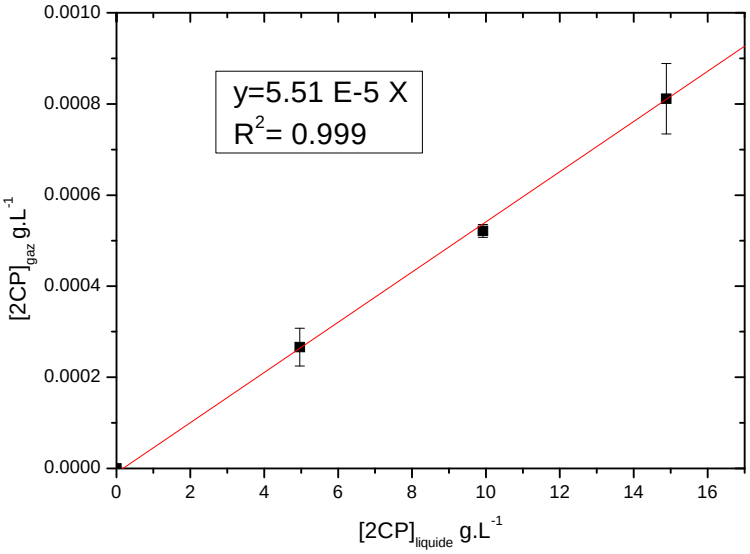



**Figure A-4. 3.** Coefficient de partage du 2-CP dans le PDMS 47V20

# Annexe 5. Spectre de masse GC/MS de la solution résiduelle après la bio-oxydation du toluène par les BRP-CLEAs en phase aqueuse

La recherche des sous-produits issus de la bio-oxydation de toluène a été effectuée dans la phase aqueuse seulement. L'analyse a été réalisée par une chromatographie en phase gaz couplée à un spectromètre de masse (GC/MS).

Conditions d'identification des composés susceptibles d'être formés :

- Un échantillon de 10 mL du mélange résiduel après le traitement enzymatique a été entraîné par purge à raison de 75 $mL.min^{-1}$ d'azote sur un tube adsorbant pendant 30 minutes
- Le tube est ensuite désorbé à 180 °C et le volume gazeux recueilli est directement envoyé sur la GC/MS
- Les composés désorbés sont séparés à travers une colonne polaire (CP-FFAP, 25 m de longueur, 0.15 mm de diamètre et 0.15 µm d'épaisseur de film avec une programmation de température : 40 °C pendant 5 min puis augmentation à 200°C à raison de 10°C /min suivi d'un palier à 200°C pendant 7 min.
- La détection est faite par un spectromètre de masse en mode Full Scan
- L'analyse a été vérifiée sur le toluène pur afin de s'assurer que les sous-produits recherchés n'existent pas dans le toluène pur.

Les spectres obtenus sont présentés sur les figures A-5.1 et A-5.2.

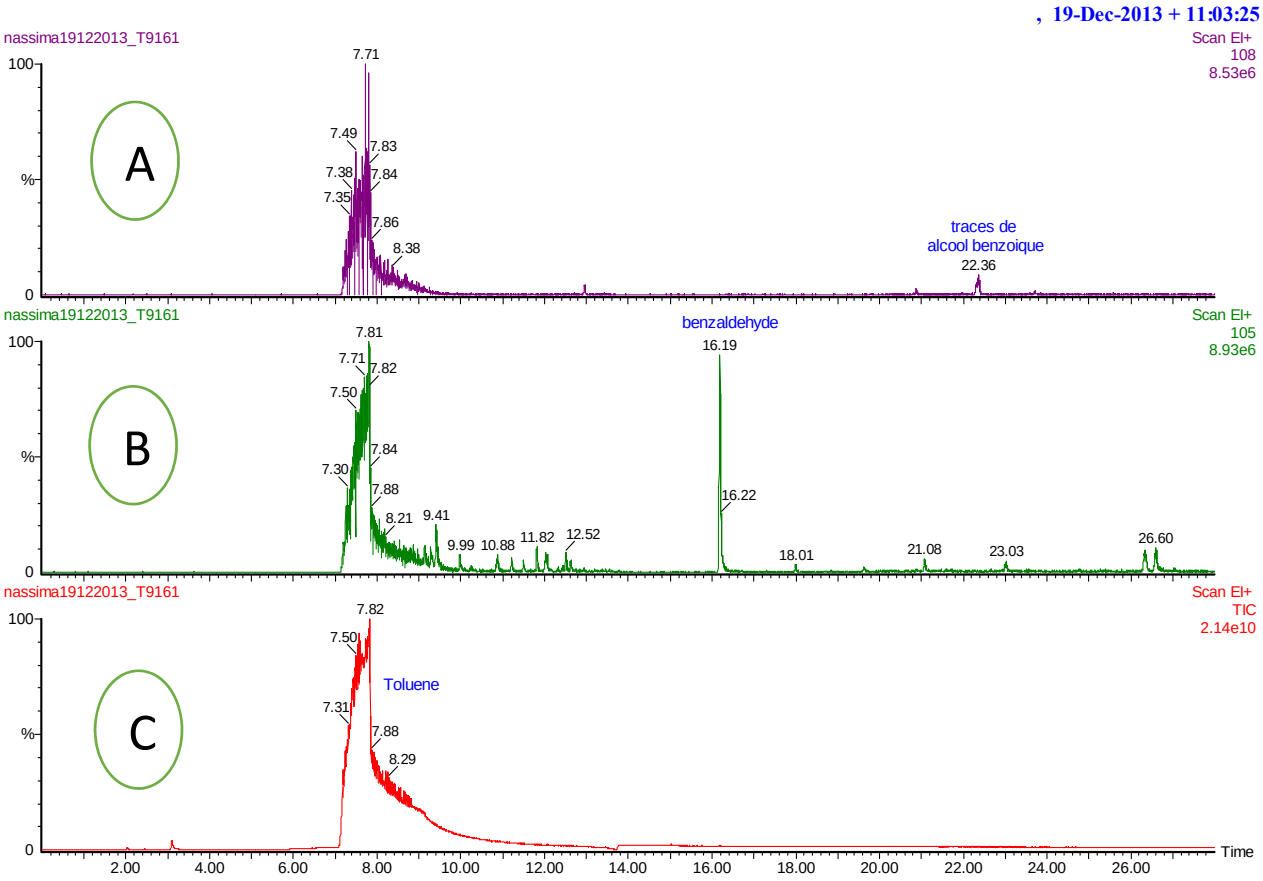



**Figure A-5. 1.** Spectre de masse de la phase aqueuse pour l'essai avec une concentration en toluène de 32 mg.L$^{-1}$ (A) et 118 mg.L$^{-1}$ (B)

Les spectres A, B, C représentent respectivement :

A- Echantillon à faible concentration en toluène.

B- Echantillon traité dans les conditions optimales.

C- Témoin de l'essai sans CLEAs contenant : solution tampon, toluène, $H_2O_2$

Les spectres obtenus révèlent la présence de benzaldéhyde et des traces d'alcool benzoïque.

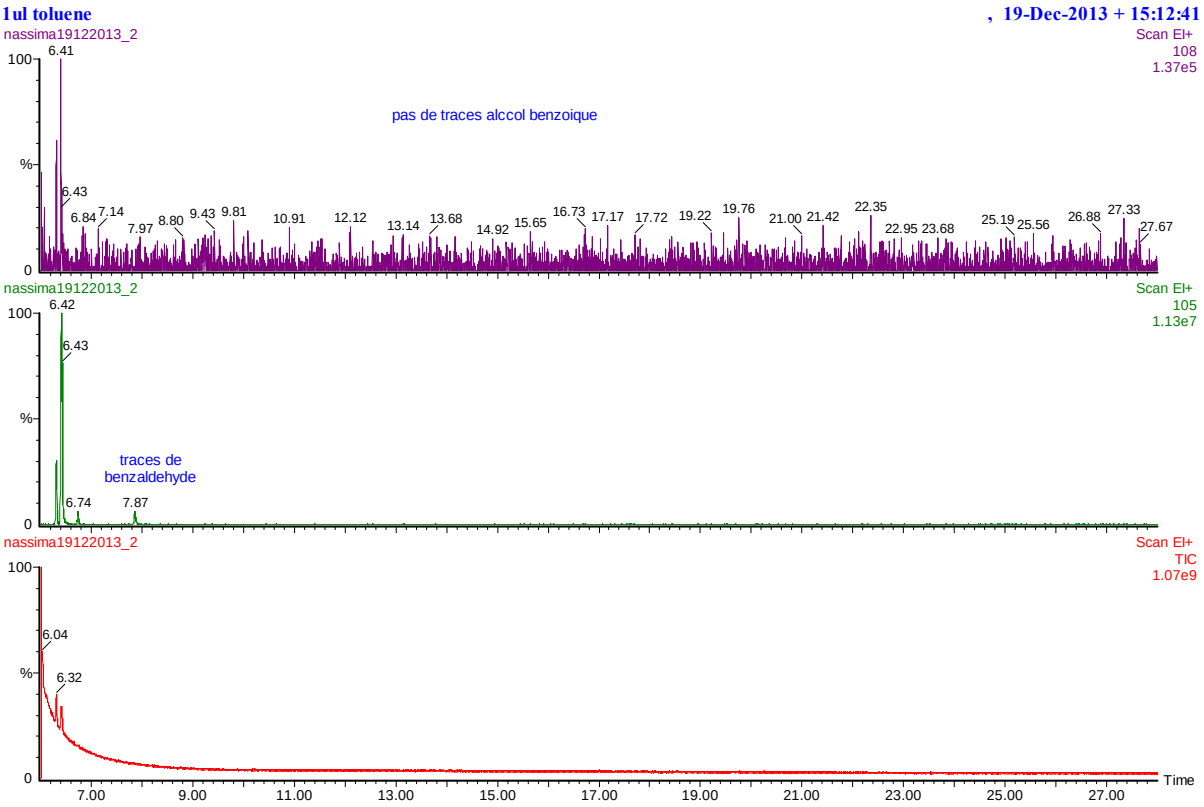



**Figure A-5. 2.** Spectre de masse de toluène pure

Le spectre a été construit à titre de comparaison, il révèle la présence de quelques traces de benzaldéhyde seulement dans le toluène pur.

# Annexe 6. Aspect des BRP-CLEAs après leur lyophilisation



**Figure A-6.1.** Aspects des CLEAs avant la lyophilisation



**Figure A-6.2.** Aspect des BRP-CLEAs après la lyophilisation