

**RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

*Université Abderrahmane Mira-BEJAIA
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés*

MÉMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de
Master

En : Génie des Procédés
Option : Génie pharmaceutique

Thème

**Etude de l'activité de la pepsine immobilisée sur
du gel de silice**

Présenté par :

HAMOUDI Melia

&

IBELAIDENE Aziza

Soutenu le 07/07/2019

Devant le jury composé de :

Mr. KATI Djamel Edine

Mr. FATMI Sofiane

Mr. AKSAS Ali

Mme. AIT BRAHAM Sabrina

President

Examineur

Encadreur

Co-encadreur

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté afin d'aboutir ce travail.

Nous tenons à remercier particulièrement notre encadreur monsieur AKSAS Ali pour avoir bien voulu accepter l'encadrement de ce travail de recherche et pour ses conseils précieux et sa patience durant la réalisation de ce projet.

Nos remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux membres de jury honorables d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Nos sincères remerciements pour notre Co-encadreur Sabrina AIT BRAHAM pour son aide précieuse et ses conseils avisés.

Nous tenons par ailleurs à exprimer notre très hautes considérations et nos sincères Remerciements à tous les enquêtés qui ont collaboré et contribué à la Concrétisation de ce travail. A chaque un de nos familles, tous nos amis(es) et proches qui n'ont pas hésités à nous donner leurs aides et du courage dans les moments difficiles et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire d'étude.

Enfin, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à M AKSAS, et les ingénieurs du laboratoire pour leur aide, leur optimisme, leurs encouragements et leurs nombreux conseils

Dédicaces

Je dédier ce modeste travail à mes chers parents, honorable, aimable, vous représentez pour moi le symbole de la bonté, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et vos bénédictions ont été un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

*A mes très chers frères **Moussa, Hakím, Mounír, HABIB** Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

*A mon cher fiancé **Zahír** que je remercie beaucoup pour ses encouragements et je n'oublie pas ma future famille que dieu les protège.*

*A mes chères copines **Warda, Ibtissem** et aussi mon binôme **Aziza** veuillez-vous trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère, je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

A mes chers oncles, tantes, leur époux et épouses, à mes chers cousins et cousines.

A tous ceux l'oublie du nom n'est pas celui du cœur.

HAMOUDI Melia



Dedicates

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon très cher père (Allah Yarahmo) qui restera toujours présent dans nos cœurs et à ma mère Toujours chérit et comblé de son affection.

A mes chers frères : Dada et Hicham.

A ma belle-sœur : warda.

A mes chères sœurs : Lila, Nadia, Nassima, Kouka, et Lamia.

A ma chère copine : Didouche.

A mon oncle : Djahid.

A ma tante : Zakia.

A mon très cher binôme : Melia.

IBELAI DENE Aziza

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction : 01

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Immobilisation des enzymes : 03

I.1.1. Techniques d'immobilisation : 03

a. Immobilisation par adsorption : 04

b. Immobilisation par réticulation : 06

c. Immobilisation par inclusion : 06

I.1.2. Intérêt des enzymes immobilisées : 08

I.2. Procédé sol –gel : 08

I.2.1. Mécanismes réactionnels du sol-gel : 10

I.2.2. voies de synthèses : 13

I.2.3. Paramètres influençant la cinétique des réactions : 14

I.2.4. Etapes de formations de sol-gel : 15

I.2.5. Avantage et inconvénients de la méthode sol gel..... 18

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Produits et matériels utilisés : 19

II.2. Elaboration des échantillons : 22

II.2.1. Préparation de gel de silice : 22

II.2.2. Immobilisation de l'enzyme : 23

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. l'étude de l'activité de pepsine libre : 25

III.1.1. Influence du pH sur l'activité de la pepsine libre : 25

III.1.2. Influence de la température sur l'activité de la pepsine 28

III.2. l'étude de l'activité enzymatique de la pepsine immobilisée : 30

III.2.1. Influence de diamètre de la matrice de silice sur l'activité de la pepsine immobilisée..... 31

III.2.2. Influence de l'immobilisation sur l'activité de la pepsine..... 32

III.3. inactivation de la pepsine 34

Conclusion..... 38

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABREVIATION

A : absorbance

D : Diamètre

HCl : Acide chlorhydrique

M : Molaire (mol /L)

ml : millilitre

mg : milligramme

nm : nanomètre

pH : Potentiel hydrogène

TCA : Acide Trichloroacetique

TEOS : Tetraethylorthosilicate

T : température

t : temps

UV : Ultra-Violet

°C : Degré Celsius

μ : Micro

Liste des figures

<i>Figure d'immobilisation</i>	I.1	-	<i>Différentes techniques</i>	04
<i>Figure liaison</i>	I.2	-	<i>Immobilisation par</i>	04
<i>Figure I. 3 - Immobilisation par réticulation</i>				06
<i>Figure I.4 - Immobilisation par microencapsulation</i>				07
<i>Figure I.5 - Emprisonnement dans une matrice</i>				07
<i>Figure I.6 - Différents types de mise en forme de matériaux obtenus par voie sol-gel</i>				09
<i>Figure I. 7 - Représentation schématique de Sol gel</i>				10
<i>Figure I.8 - Illustration de la réaction de l'hydrolyse</i>				11
<i>Figure I.9 - Illustration de la réaction de condensation</i>				12
<i>Figure I. 10 - Caractéristique macroscopique de la transition sol-gel</i>				13
<i>Figure I.11 - Différents assemblages possibles des amas polymériques suivant le type de catalyse</i>				15
<i>Figure I.12 - Développement de matériau de propriétés distinctes par différentes méthodes de séchage</i>				17
<i>FigureII.1 – Centrifugeuse</i>				21
<i>Figure II.2- Bain marie</i>				22
<i>Figure Spectrophotomètre</i>	II.3		-	22
<i>Figure II.4 - Gel de silice élaboré par sol-gel</i>				23
<i>Figure III.1-Activité de la pepsine libre en fonction du temps à différents pH</i>				25
<i>Figure III.2- Activité de la pepsine libre en fonction du pH</i>				26
<i>Figure III.3- variation de l'activité enzymatique de la pepsine en fonction du temps de pH4</i>				27
<i>Figure III.4-L'activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH5</i>				27
<i>Figure III.5 - Activité de la pepsine libre en fonction du temps à différentes températures..</i>				28
<i>Figure III.6- Activité de la pepsine libre en fonction la température</i>				29
<i>Figure III.7- Activité de la pepsine libre en fonction du temps à T=40°C</i>				30
<i>Figure III.8- Activité de la pepsine immobilisée en fonction du temps à différents diamètres</i>				31
<i>Figure III.9-Activité de la pepsine immobilisée sous forme de monolithe en fonction du temps</i>				32
<i>Figure III.10- Activité de la pepsine libre et pepsine immobilisée à différents diamètres</i>				33
<i>Figure III.11- Effet de l'immobilisation dans un monolithe sur l'activité de la pepsine</i>				33
<i>Figure III.12- Activité de la pepsine immobilisée en fonction du diamètre du gel de silice</i> ...				34
<i>Figure III.13- Activité de la pepsine immobilisée en fonction du temps</i>				35
<i>Figure III.14- Effet de l'immobilisation sur l'activité de la pepsine</i>				36
<i>Figure III.15- Activité de la pepsine immobilisée à pH5 en fonction du temps</i>				36
<i>Figure III.16- Effet de l'immobilisation sur l'activité de la pepsine à pH = 5</i>				37

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I - Produits chimiques utilisés.....</i>	19
---	-----------

Les enzymes sont des catalyseurs de la cellule vivante. Elles jouent un rôle très important dans la vie des êtres humains car elles accélèrent de nombreuses réactions métaboliques des matières végétales et animales, et sont d'usage très important aussi dans les industries alimentaires, particulièrement industries des boissons [1]. Elles sont aussi présentes dans les matières premières dont elles influencent la saveur, la texture, la couleur, ainsi que les propriétés de conservation. D'autre part, les enzymes sont utilisées comme des auxiliaires techniques pour accroître la qualité des produits, telles que les propriétés nutritives ainsi que les propriétés physico-chimiques comme la viscosité. Les enzymes sont également utilisées pour l'analyse des aliments et des fluides biologiques, notamment sous la forme de capteur biologique (mesure de glucose). De plus en plus, les enzymes sont impliquées dans la synthèse de molécules bio-organiques et dans la digestion (ex : décomposition) de biopolymères tels que l'ADN et les protéines pour faciliter leur analyse structurale est l'application enzymatique : la digestion enzymatique des protéines pour leur caractérisation par cartographie peptidique.

Toutefois, l'utilisation de ces catalyseurs présente des limites. Outre le coût de l'enzyme et son instabilité à l'état libre, la catalyse enzymatique dépend des conditions réactionnelles difficilement maîtrisables à des échelles industrielles (pH, température, présence d'inhibiteurs, etc.). En réponse ces inconvénients, l'immobilisation de ces biocatalyseurs est une solution pouvant permettre une meilleure intégration des procédés biocatalytiques à l'échelle industrielle. La capacité de retenir ou de récupérer des enzymes permet de séparer le biocatalyseur du produit, permettant ainsi des procédés continus, et empêchant la transmission de protéines enzymatiques ou d'activité indésirée aux étapes ultérieures du procédé. L'immobilisation peut également améliorer la performance enzymatique dans des conditions optimales de réaction du processus industriel.

Ainsi, l'objectif de notre étude est de développer un nouveau support d'immobilisation (silice élaborée par sol-gel) d'une enzyme (la pepsine) qui vise l'amélioration de sa stabilité et pouvoir catalytique. A cet effet, plusieurs conditions d'immobilisations ont été testées (milieux catalytique et conditions réactionnelles).

Le présent manuscrit est constitué de trois chapitres. Dans le premier chapitre, une étude bibliographique détaillée sur l'immobilisation et la méthode sol-gel. Le second chapitre traite la partie expérimentale où sont exposés le matériel et les méthodes utilisés durant la phase pratique de notre étude. La discussion et l'interprétation des résultats

expérimentaux obtenus sont présentées dans le dernier chapitre. Et enfin, le manuscrit se termine par une conclusion résumant les principaux résultats obtenus et d'éventuelles perspectives.

I.1. Immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes a trouvé plusieurs applications industrielles, en chimie analytique [2], clinique [3], en environnement [4] et particulièrement en industries chimiques (digestion protéolytique). L'immobilisation des enzymes a été utilisée en électrochimie, dans le bioréacteur à deux phases liquides, en chromatographie d'affinité et dans des biocapteurs. La question qui se pose toujours lors de l'immobilisation des enzymes, est de savoir si l'enzyme conserve ses caractéristiques enzymatiques (activité et stabilité) après immobilisation. Plusieurs études [5] ont été réalisées dans ce domaine, celles-ci démontrent que généralement la stabilité de l'enzyme immobilisée augmente (stabilité thermique), alors que l'activité diminue. La stabilité thermique permet la flexibilité de manipulation dans le domaine de la digestion protéolytique. Par exemple, la diminution de l'activité dépend de la technique d'immobilisation utilisée, du changement de conformation de la protéine et /ou de l'interaction entre enzyme et le support.

Dans la littérature, on trouve plusieurs techniques démontrant comment une enzyme peut être immobilisée sur un support insoluble dans l'eau (adsorption, inclusion, réticulation). En générale, l'immobilisation aide les chercheurs à modifier une surface, à diminuer la perte d'enzyme en la fixant sur le support selon le besoin analytique, et ceci est un avantage dans le domaine industriel.

I.1.1. Techniques d'immobilisation

De nombreuses méthodes d'immobilisation sont connues, dont les principales sont [6] :

- Immobilisation par liaison
- Inclusion
- Réticulation

Voire figure I.1.

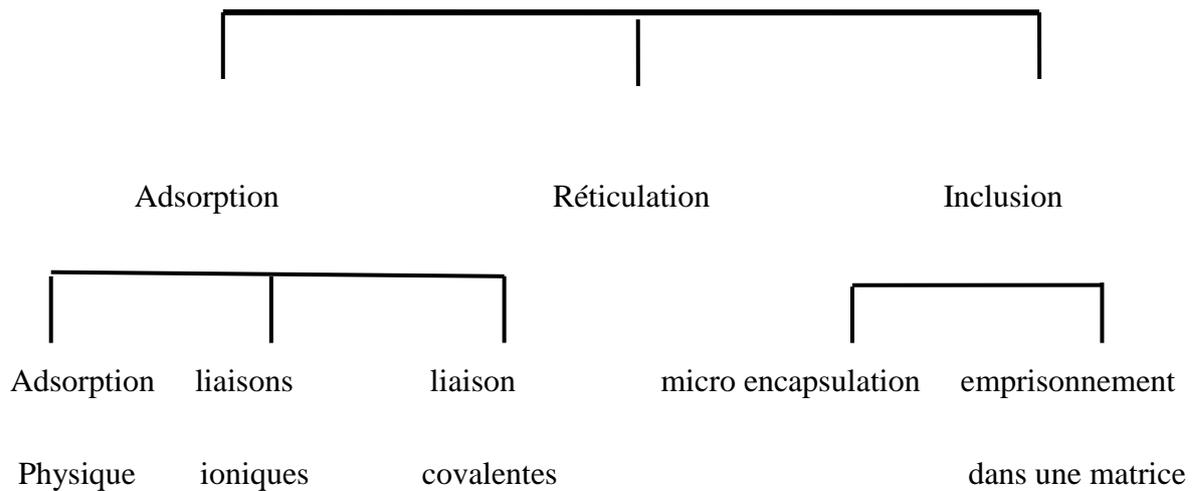


Figure I.1 - Techniques d'immobilisation [6]

a. Immobilisation par adsorption

C'est la plus ancienne méthode d'immobilisation. Elle consiste en la rétention d'enzyme sur une phase insoluble dans l'eau par une liaison chimique ou physique (figure I.2). Dans cette méthode, la quantité d'enzyme retenue et l'activité sont extrêmement variables et sont évidemment en fonction de la nature du support. Selon le mode de couplage, ce procédé peut être classifié de trois manières :

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

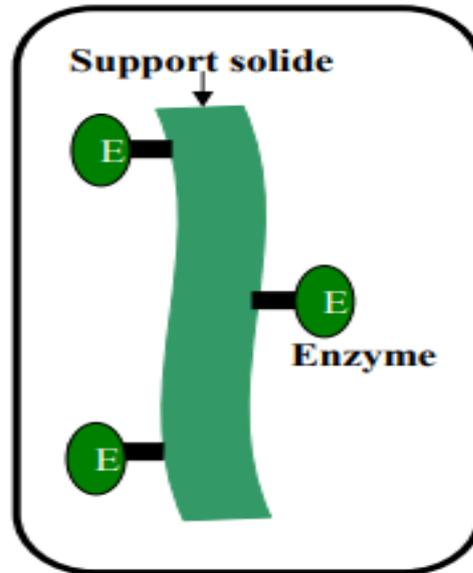


Figure I.2 - Immobilisation par liaison [7].

➤ **Adsorption physique**

L'adsorption physique demeure la méthode la plus simple et la plus rentable [8]. Dans ce procédé, l'enzyme est retenue à la surface d'un corps adsorbant minérale ou organique grâce à différents types de liaisons : interactions de Van der Waals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, transfert de charge, échange de ligands, chimio-sorption [9]. Différents supports tel que chitosane [10], kaolin [11], la celite [12], carbonate de calcium [13] ont été exploités pour l'immobilisation des enzymes; ils sont très variés tant de point de vue de leurs structures chimiques que du point de vue de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité, etc.). Cette technique est simple, réversible, mais la fixation n'est pas spécifique et les risques de désorption sont importants.

➤ **Immobilisation ionique**

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

Différents polysaccharides et polymères synthétiques ayant des centres d'échange d'ion sont habituellement utilisés comme supports [6].

➤ Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzyme et support. Pour la réalisation de la liaison covalente il faut une activation préalable soit du support, soit de l'enzyme, car les groupes fonctionnels de l'enzyme ne sont généralement pas suffisamment réactifs mais c'est surtout l'activation du support qui a fait l'objet des nombreuses études, car l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme est délicate et peut conduire à la dénaturation de l'enzyme. Différents supports tels que la silice [14], Eppergit (résine absorbante) [15], carboxyméthylcellulose [16] ont été exploités pour cette technique.

b. Immobilisation par réticulation

En traitant une enzyme par un agent chimique hydrosoluble bi-fonctionnel et susceptible de réagir sur les groupements fonctionnels libres de celui-ci, on obtient un réseau enzymatique tridimensionnel insoluble (figure I.3). Le glutaraldéhyde est un agent de réticulation parmi les plus utilisés [17].

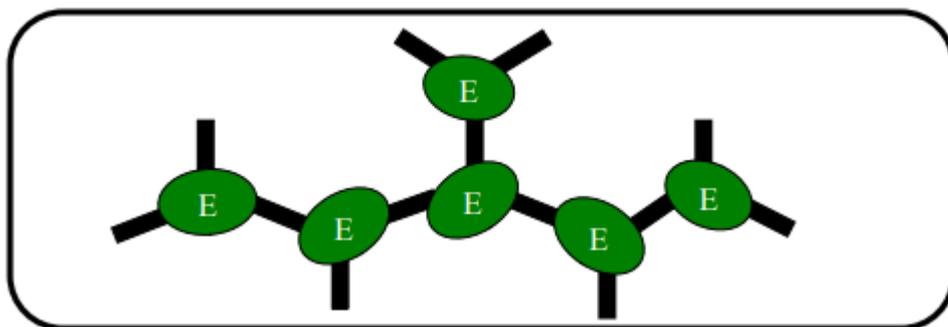


Figure I.3 - Immobilisation par réticulation [18]

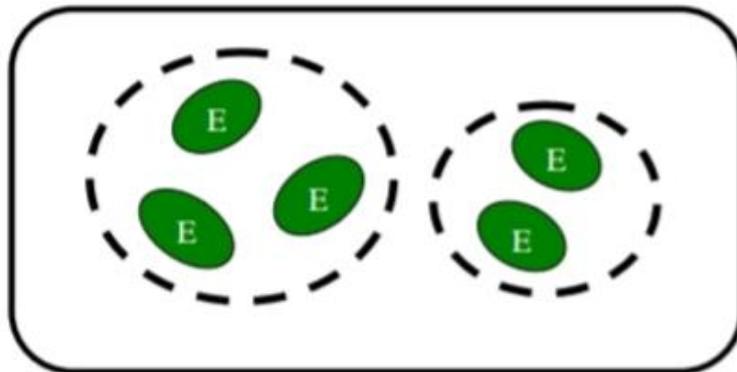
Cette méthode a l'avantage de fournir des dérivés insolubles constitués presque exclusivement d'enzyme. Malheureusement les produits sont gélatineux et difficile à filtrer et leurs propriétés mécaniques sont médiocres. En outre une très importante perte d'activité enzymatique accompagne la réticulation.

c. Immobilisation par inclusion

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

❖ Immobilisation par micro encapsulation

L'enzyme en solution aqueuse est enfermée dans des microcapsules sphériques, dont la paroi est une membrane semi -perméable qui peut être liquide ou solide (figure I.4). Cette membrane retient l'enzyme mais laisse passer substrat et le produit [19].



FigureI. 4 - Immobilisation par microencapsulation[18]

❖ Emprisonnement sur une matrice

L'enzyme est dissoute dans une solution aqueuse d'un monomère et d'un réticulant, la polymérisation est ensuite effectuée dans des conditions moins dénaturantes possibles, on obtient un réseau macromoléculaire tridimensionnel dans les mailles duquel l'enzyme se

trouve retenu de façon plus ou moins efficace. Cette technique est simple et très utilisée pour diverses enzymes, mais les risques de fuite ne sont pas négligeables, si les mailles du réseau sont larges. De plus on observe souvent une dénaturation importante de l'enzyme due à une réaction du polymère avec les groupes fonctionnels responsables de la protéine [19]

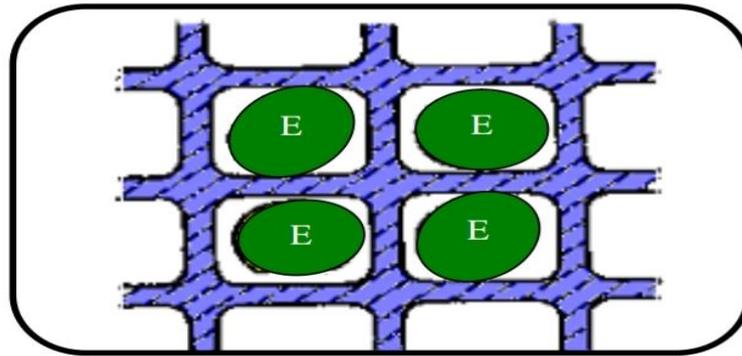


Figure I.5 - Emprisonnement dans une matrice [18]

I.1.2. Intérêt des enzymes immobilisées

L'industrie actuelle montre un grand intérêt pour l'utilisation des enzymes insolubles [20].

Les avantages des enzymes immobilisées sont variés. Les avantages majeurs sont :

- Les enzymes immobilisées peuvent être séparées facilement de substrat et de produit de la réaction se qui permet un meilleur contrôle de processus [21-26].
- Les enzymes immobilisées peuvent être réutilisées plusieurs fois, dans des réacteurs batch ou dans des processus continus, sans perte d'activité au cours d'une longue période [27,28, 29].
- L'immobilisation permet de compenser le cout élevé de l'enzyme, surtout dans le domaine analytique [30].
- L'immobilisation provoque généralement une amélioration de la stabilité thermique de l'enzyme et confère à l'enzyme une résistance élevée à la dénaturation [31,32].
- L'immobilisation peut allonger la demi-vie des enzymes.

- Les systèmes à enzymes immobilisées sont de bons modèles pour l'étude des cinétiques enzymatiques in vivo [28].

I.2. Procédé sol –gel

La première description de la synthèse sol-gel remonte à 1845 lors de la découverte de la conversion en verre solide de l'acide silicique exposé à l'air humide par le chimiste français J-J Ebelmen [33, 34]. Il fit réagir SiCl_4 avec l'éthanol pour former le tétra éthyle orthosilicate (TEOS), l'un des précurseurs couramment utilisé de nos jours lors de la synthèse de matériaux par voie sol-gel [35-44]. Cependant, il a fallu attendre près d'un siècle pour que le procédé soit repris et utilisé par l'industrie verrière.

Le premier brevet sol-gel a été déposé en 1939 par la société allemande Schott Glaswerke pour la réalisation de rétroviseur [35]. Beaucoup d'autres produits ont suivi comme des revêtements antireflets, des vitrages autonettoyants, des résistants à la rayure ou à la corrosion.

Ainsi, la méthode sol-gel a connu un essor considérable qui s'étend encore dans plusieurs catalyse, domaines technologiques, en particuliers l'optique, l'électronique, les biomatériaux [45-48]. On peut ainsi via le procédé sol-gel, aussi appelé chimie douce [49,50] d'élaborer une grande variété de matériaux sous différentes formes (monolithes de verres ou de céramiques, fibres, composites, gels poreux ou membranes, films ou couches minces, poudre.....) (Figure I.6).

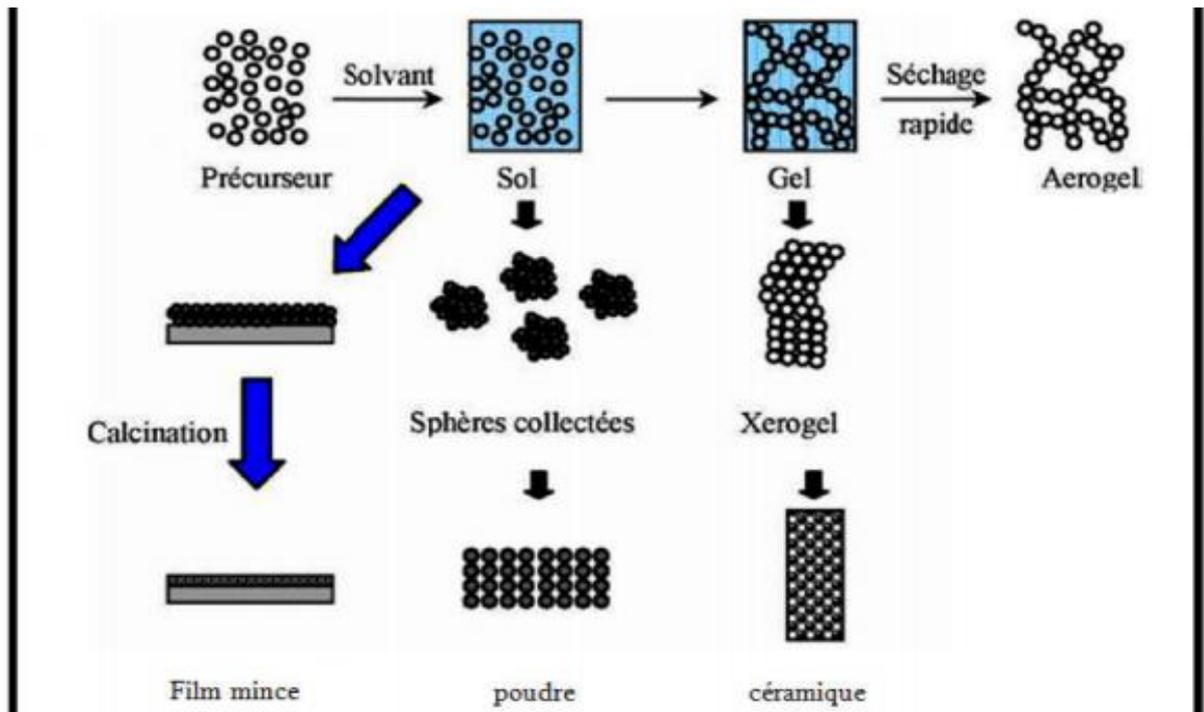


Figure I.6 – Etapes suivies durant le procédé sol-gel.

Une autre définition du procédé est de le décrire comme étant une voie colloïdale de synthèse de céramiques dans laquelle les étapes intermédiaires comportent un sol ou un gel [51].

Le sol

L'état "Sol" peut se définir comme une dispersion stable d'espèces au sein d'un solvant. Une dispersion de particules colloïdales ou d'entités moléculaires d'une taille qui doit être suffisamment petite pour que les forces responsables de la dispersion (mouvement brownien, interaction de Van der Waals) ne soient pas surpassées par la gravitation (restent supérieures aux forces de gravitation). L'agrégation ou la polymérisation de ces précurseurs conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel interconnecté et stable, appelé gel [52, 45,53].

Le gel

Le gel est défini comme étant une structure tridimensionnelle renfermant du solvant de sorte que, macroscopiquement, le milieu semble monophasé. Cet état résulte de l'agrégation des particules et ce phénomène est dû aux collisions de ces dernières à la suite de leur mouvement brownien. Les agrégats, alors formés, emprisonnent le solvant dans un réseau en trois dimensions et on parle alors de cage de solvant. Si le réseau solide est constitué de particules colloïdale, le gel est dit colloïdal le réseau est constitué de macromolécules, le gel est dit polymérique.

Le sol-gel

Une abréviation des deux termes "solution-gélification" où le sol (la dispersion d'un solide insoluble ou l'addition d'un précurseur qui réagit avec le solvant) est une suspension colloïdale d'oligomère et le gel est obtenue par l'évolution du sol par le biais de réactions chimiques (hydrolyse et condensation).

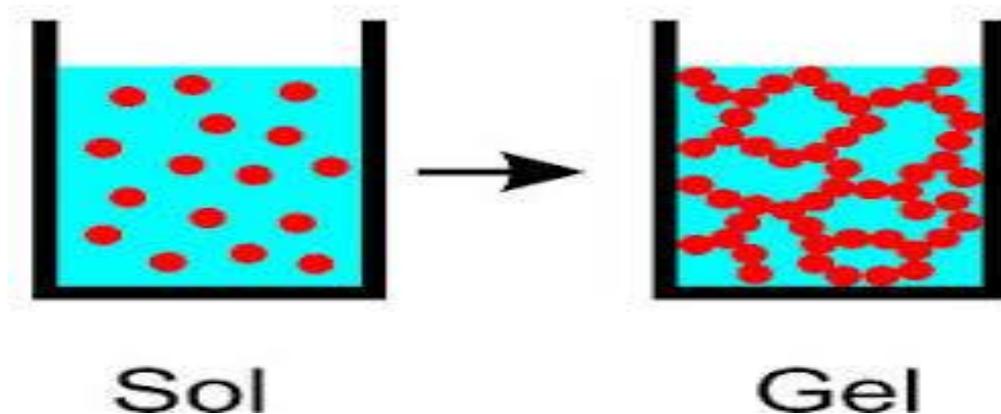


Figure I.7 - Représentation schématique de Sol-gel

I.2.1.Mécanismes réactionnels du sol-gel

La connaissance de différentes étapes de formation de l'oxyde permettra par la suite de comprendre le rôle de chaque constituant des solutions élaborées [54].

Le mécanisme chimique de transformations se décompose en deux étapes [45,55].

- L'hydrolyse qui correspond à la réaction d'activation ;

- La condensation qui est l'étape de croissance des chaînes

Afin d'obtenir une vitesse de réaction appropriée, on ajoute un catalyseur ou, au contraire, un inhibiteur de réaction.

➤ L'hydrolyse

Une réaction entre une molécule d'eau et un alcoxyde, permettant l'apparition d'une molécule d'alcool. Pour que les alcoxydes puissent se condenser à température ambiante, l'hydrolyse des groupements -OR doit débiter les processus réactionnel équilibré, en condition neutre. Cette étape est nécessaire pour donner naissance au groupement hydroxyles-OH :

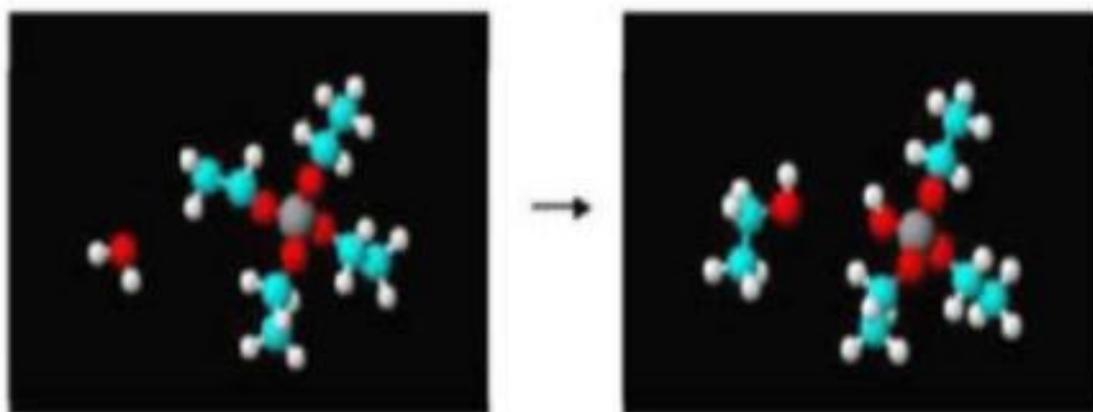
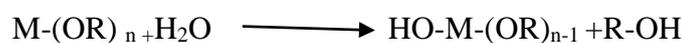


Figure I.8 – Processus d'hydrolyse

L'hydrolyse est une substitution nucléophile d'un ligand -OH à un ligand -OR. Elle s'accompagne d'une consommation d'eau et d'une libération d'alcool, au cours de cette étape, on crée la fonctionnalité du précurseur vis-à-vis de la polycondensation

➤ La condensation

Les groupements-OH générés au cours l'hydrolyse (partielle ou totale) sont de bons nucléophiles, ils vont se lier entres eux par une réaction de condensation, cette réaction se poursuit jusqu'à la disparition totale des groupements-OH où OR au profit des pontages métal-oxygène-métal et conduit à une structure continu hydroxyles terminaux.

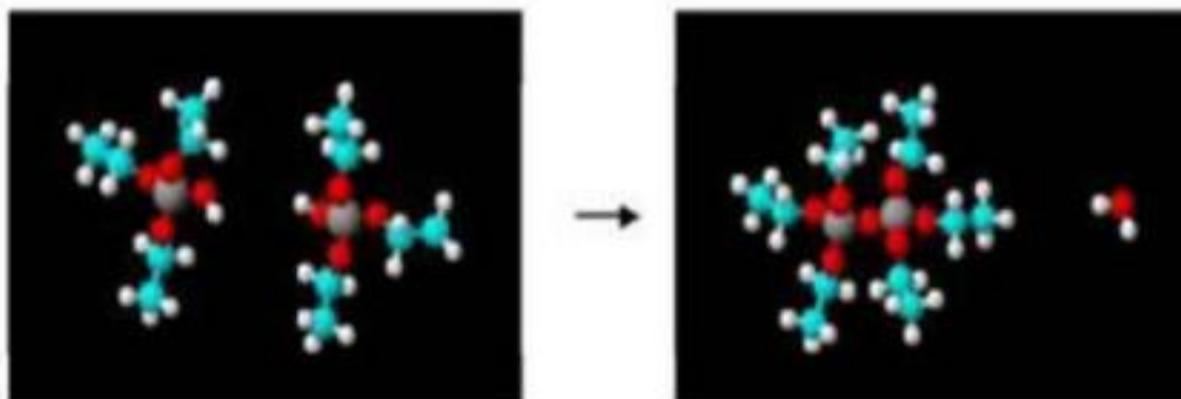


Figure I.9 – Processus de condensation

Ces mécanismes dépendent naturellement de la concentration en catalyseur et des contraintes stériques inhérentes à la nature de l'alcoxyde. Lorsque ces deux réactions sont achevées, on obtient un gel. La transformation de la solution en un amas polymérique solide est alors généralement appelée la transition sol-gel.

➤ La transition sol-gel

Le schéma généralement adopté pour la gélification est celui de chaînes polymériques en croissance qui s'agglomèrent par condensation et forment des amas. Au cours de l'avancement des réactions d'hydrolyse et de condensation, des amas polymériques, dont la taille croît avec le temps, sont créés. Lorsque l'un de ces amas atteint la dimension du contenant réactionnel, la viscosité devient infinie : c'est le point de transition sol-gel.

D'un point de vue macroscopique, la transition peut être suivie par l'augmentation de la viscosité de la solution. L'amas solide formé à partir de la solution de base peut alors être vu comme une imbrication des chaînes polymériques formant une structure solide désordonnée. Cette structure contient encore des masses liquides emprisonnées. Leur élimination se fait par évaporation. Comme toute réaction chimique, la transition sol-gel est sensible à son environnement, tel que la température ou l'humidité, ce qui peut modifier la cinétique des réactions mises en jeu.

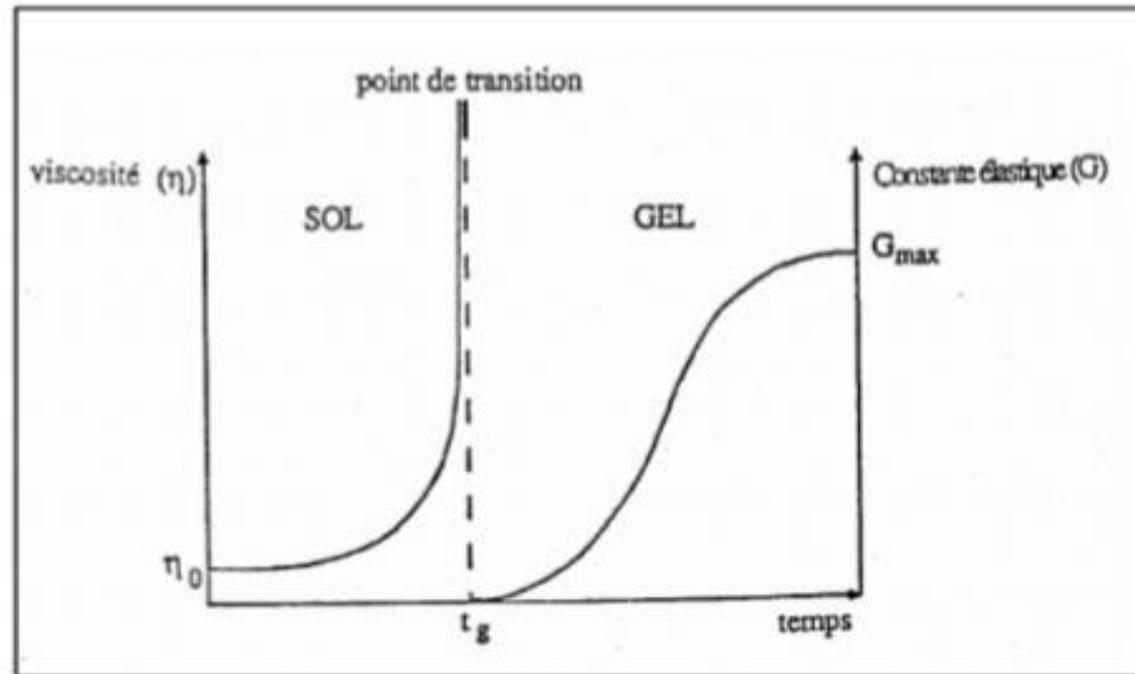


Figure I.10 - Caractéristique macroscopique de la transition sol-gel [56].

La diversité de la méthode sol-gel se situe dans le nombre de paramètres qui peuvent être modifiés dans chaque étape du processus, afin d'obtenir un matériau spécifique avec des meilleures caractéristiques catalytiques.

I.2.2. Les voies de synthèses

Dans une préparation sol-gel, selon la nature des précurseurs moléculaires utilisée, on distingue deux voies de synthèse [57, 58] : inorganique et organométallique.

➤ Voie inorganique ou colloïdale :

Le précurseur utilisé est un sel métallique tels que les nitrates, les sulfates, les chlorures, ou encore les acétates ; dissout dans une solution aqueuse. Les précurseurs inorganiques requièrent une élimination supplémentaire des anions inorganiques après réaction sol-gel.

➤ Voie métallo-organique ou polymérique :

Elle permet à partir d'al oxydes métalliquement solution organique, d'obtenir des gels. Cette voie est relativement coûteuse mais, permet un contrôle assez facile de la granulométrie.

Dans les deux cas la réaction est initiée par hydrolyse, elle donne lieu à la formation des groupes M-OH, puis intervient la condensation permettant la formation de liaisons M-O-M

Les précurseurs les plus souvent utilisés dans le procédé sol-gel sont des alcoxydes métalliques de formule générale $M(OR)_n$ ou M : désigne un métal de valence n et R une chaîne alkyle de type $(-C_n H_{2n+1})$ [59].

Les précurseurs peuvent être d'une très grande pureté et présenter une solubilité élevée dans une grande variété de solvant organique.

I.2.3. Paramètres influençant la cinétique des réactions

Ces cinétiques de réaction dépendent de plusieurs paramètres dont il faudra tenir compte lors de la mise en œuvre du procédé :

➤ La température :

La température est le premier paramètre à considérer qui intervient dans toute réaction chimique. Le fait d'augmenter la température accélère les réactions d'hydrolyse et condensation, mais affecte très peu la structure des matériaux formés.

➤ La concentration et le type d'alcoxyde :

Ce choix se fait en fonction de la réactivité de l'alcoxyde ou (précurseur) et du type d'échantillon que l'on veut élaborer. La concentration dans le sol, quant à elle est surtout importante lors de la condensation : plus elle est faible, plus les molécules aptes à se lier sont éloignées les unes des autres, ce qui retarde la réaction.

➤ Influence du pH : (Choix du catalyseur)

Le pH joue le rôle important dans l'évolution des réactions : Les ions H_3O^+ et OH^- n'ont pas la même influence sur les deux types de réaction : Le cation H_3O^+ attiré par l'oxygène,

facilite la substitution des groupes OR et donc l'hydrolyse, tandis que l'anion OH^- attiré par le métal M électronégatif, privilégie la formation de liaison par condensation [60].

En résumé, on peut dire qu'un milieu acide favorise l'hydrolyse, alors qu'un milieu basique accélère la condensation et mène à des d'amas caractérisés par une forme sphérique. La catalyse agit donc directement sur la forme du matériau élaboré .ce facteur interviendra également de façon importante sur la porosité du matériau final, ce qui conditionnera partiellement les propriétés physique [61].

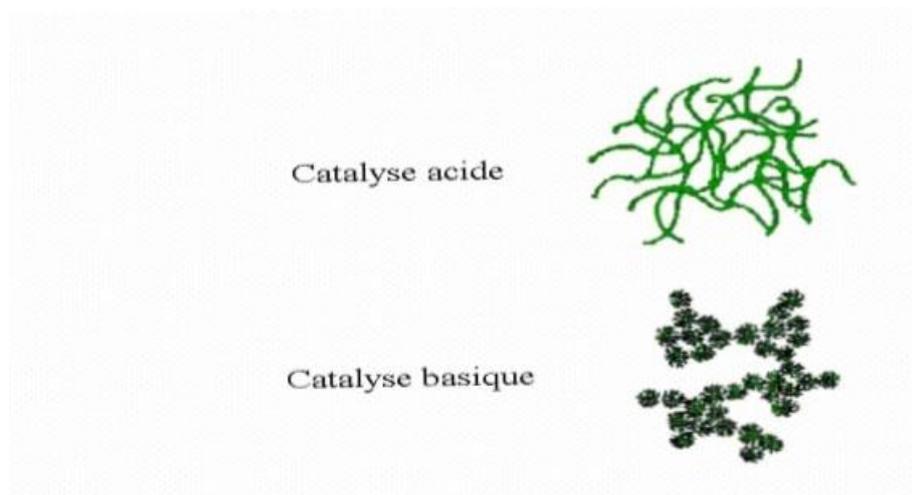


Figure I.11 - Différents assemblages possibles des amas polymériques suivant le type de catalyse [60]

➤ **Le solvant :**

Les alcoxydes ne sont pas miscibles dans l'eau. Il est donc nécessaire de mélanger les précurseurs, l'eau et le catalyseur dans un solvant commun .Le choix du solvant est également dicté par des impératifs de procédé (facilité de séchage, intégrité du matériau final), de toxicité éventuelle ou de contraintes environnementales (émission de composés organiques volatils).

I.2.4. Etapes de formations de sol-gel :

- **Gélification et structure de gel :**

La gélification est déterminée comme étant l'instant pour lequel le réseau solide constitué est suffisamment rigide pour résister à la gravitation alors que le film contient encore une fraction importante de solvants [45].

Les réactions conduisent à la gélification et à la formation d'un gel constitué de chaînes M-O-M (ou M-OH-M) et dont la viscosité augmente au cours du temps. Ce gel contient encore des solvants et précurseurs qui n'ont pas réagi. La phase solide est typiquement un sol polymérique condensé où les particules se sont enchevêtrées pour former un réseau tridimensionnel.

Avant que l'état de gel ne soit atteint, le système est dans l'état liquide : il est constitué d'un mélange d'oligomères colloïdaux et de petites macromolécules ainsi que, selon le degré d'avancement de la réaction de polymérisation, de différents monomères partiellement hydrolysés. Le solvant, avec des liaisons chimiques assurant la cohésion mécanique du matériau en lui donnant un caractère rigide, non déformable (un gel peut présenter un caractère élastique, mais pas de viscosité macroscopique). Le gel correspond à la formation d'un réseau tridimensionnel de liaisons de Van der Waals. Le temps nécessaire au « sol » pour se transformer en « gel » est appelé temps de gel (ou point de gel).

- **Vieillessement**

Le vieillissement représente la durée entre la formation du gel et l'élimination du solvant. Tant que le liquide est intérieur des pores, un gel n'est pas statique et peut subir beaucoup de transformations [45, 62]. Pour les gels dérivants des alcoolates, la condensation entre les groupements fonctionnels continue à se produire après "le point gel".

Le processus de vieillissement dépend de la température, du temps et du pH du liquide dans les pores. C.J.Brinker et al. [63] ont montré que ces paramètres peuvent changer la structure poreuse des gels secs de silicates et d'aluminosilicates.

- **Séchage**

Une fois gélifié, le matériau subit le séchage dû aux forces capillaires dans les pores et ce séchage entraîne un rétrécissement de volume. Le procédé de séchage permettant l'obtention du matériau sol-gel nécessite que l'alcool ou l'eau puisse s'échapper en même temps que le gel se solidifie. Le procédé d'évaporation se produit grâce aux trous et aux canaux existants dans le matériau sol-gel poreux. Il existe plusieurs types de séchage permettant d'obtenir des types de matériaux différents :

Xérogel : séchage classique (évaporation normale) entraînant une réduction de volume allant de 5 à 10%. L'évaporation du solvant permet la formation d'un Xérogel auquel on peut faire subir un traitement thermique à température modérée afin de densifier le matériau. Les températures de densification dépendent fortement du type de matériau et des propriétés recherchées. Le séchage du gel constitue une étape délicate. Il est important que le solvant s'évapore très lentement afin d'éviter la fragmentation du xérogel. La réalisation d'un matériau solide est donc difficile en raison des tensions internes apparaissant lors du séchage et pouvant entraîner la fissuration du matériau.

Après évaporation du solvant dans des conditions normales de température et de pression, il y a effondrement de la structure et on obtient xérogel (figure I.12). La distribution homogène des éléments au niveau du sol est conservée lors de la transition sol-gel. La calcination du gel permet ainsi d'obtenir une poudre de l'oxyde désiré

Aérogel : séchage en conditions critiques (dans un autoclave sous pression élevée) n'entraînant pas ou peu de rétrécissement de volume. L'évacuation du solvant dans des conditions supercritiques conduit à la formation d'un aérogel n'ayant subi aucune densification. On obtient ainsi un matériau très poreux avec des propriétés d'isolation exceptionnelles. Le passage d'un sol au gel, dont la viscosité peut être contrôlée, permet également la réalisation de fibres et de films divers supports par trempage ou vaporisation [60].

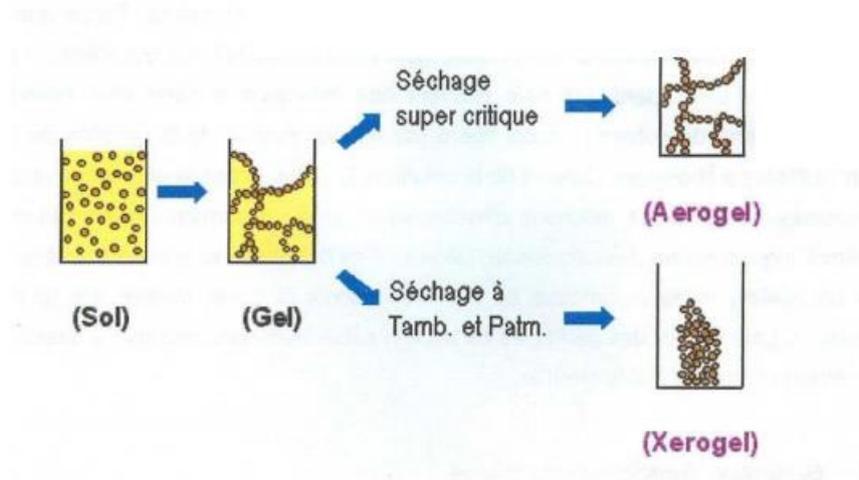


Figure I.12 - Développement de matériau de propriétés distinctes par différentes méthodes de séchage.

I.2.5. Avantage et inconvénients de la méthode sol-gel

Les avantages de ces méthodes sont multiples faisant d'elles des méthodes très convoitées, on cite :

- Grande pureté du produit final ;
- Basse température du procédé ;
- Composition du matériau final contrôlable à l'échelle moléculaire ce qui n'est pas le cas avec des méthodes conventionnelles ;
- Faible investissement en capital ;
- Facilité de production de systèmes dotés de composés multiples ;
- Grande maîtrise du dopage ;
- Faible épaisseur du revêtement.

Malgré ces avantages, la technique sol-gel présente les inconvénients suivants:

- Prix élevé de précurseur organométallique ;
- Réactivité des précurseurs vis-à-vis de l'humidité ;
- Temps de procédé souvent long ;
- Retrait / fissuration lors du séchage ;

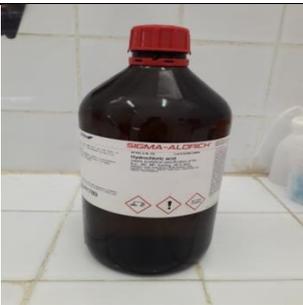
- Apparition de craquelures et de fissures ;
- Toxicité de certains précurseurs.

Afin d'élaborer les échantillons de la silice ainsi que ceux de la pepsine immobilisée dans la silice, les produits chimiques et le matériel de préparation utilisée sont décrits dans cette partie du manuscrit.

II.1. Produits et matériel utilisés

Les produits chimiques utilisés soit pour la préparation du gel de silice, soit pour le substrat de l'enzyme sont répertoriés dans le tableau II.1.

Tableau I - Produits chimiques utilisés

<i>Produit</i>	<i>Image/Photo du produit</i>
<p>Agent de condensation : Hydrochlorique acide (HCL) (SIGMA-ALDRICH) à 37%, d=1,2g /ml, incolore.</p>	
<p>Solvant : Ethanol absolu (C₂H₆) (SIGMA-ALDRICH) à 99,8%, incolore et d'odeur caractéristique.</p>	
<p>Précurseur : Tétra-éthyle- ortho-silicate (TEOS) (SIGMA-ALDRICH) à 99% et d :0,933% , incolore, d'odeur caractéristique et de formule chimique Si(OCH₂CH₃)₄</p>	
<p>Agent d'hydrolyse : Eau distillée, incolore et inodore.</p>	

<i>Produit</i>	<i>Image/Photo du produit</i>
Substrat : Hémoglobine bovine (SIGMA-ALDRICH) Solubilité :H ₂ O ,Soluble :20mg /mL.	
Citrate tri sodium	
Enzyme : Pepsine	
Acide citrique	

Pour la préparation des échantillons de cette étude, le matériel utilisé est :

- pH-mètre (BANTE instruments) : Pour les mesures de pH des solutions;
- Thermomètre ;
- Micropipette de 1000 μ L ;
- Centrifugation de marque Sigma 1-14 ;
- Bain marie de marque memmert ;
- Spectrophotomètre de marque SECOMAM.

Pour la préparation finale et la caractérisation de la solution enzymatique, le gel de silice et l'enzyme de la pepsine introduite dans le gel de silice, différents techniques et appareillages ont été utilisés, on cite :

Centrifugation : Pour séparer la solution enzymatique, la centrifugation a été réalisée par une centrifugeuse de paillasse de marque *Sigma 1-14* (figure II.1).



Figure II.1 - Centrifugeuse

Bain marie : l'incubation a été faite dans un bain marie de marque *memmert* (figure II.2).



Figure II.2 - Bain marie

Spectrophotomètre : Pour calculer l'activité enzymatique de la pepsine avant et après introduction dans la silice, la mesure de l'absorption optique a été obtenue, à 280 nm comme onde d'excitation, par un spectrophotomètre de marque *SECOMAM* (figure II.3).

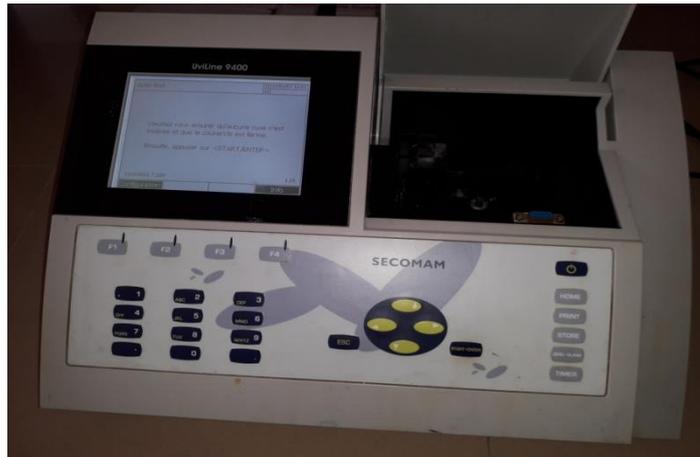


Figure II.3 - Spectrophotomètre

II.2. Elaboration des échantillons

II.2.1. Préparation de gel de silice

La préparation de gel de silice a été réalisée comme suit :

- Prélever le volume nécessaire de TEOS ;
- Mélanger le TEOS avec de l'éthanol à la température ambiante avec un rapport volumique de (1 : 3) ;
- Ajouter de l'eau distillée pour amorcer le processus d'hydrolyse de la solution ;
- Raccourcir la condensation et accélère la gélification par l'ajout de quelques gouttes de HCl ;
- Verser la solution obtenue dans des boîtes adéquates loin des impuretés et des poussières ;

Selon la température ambiante et après quelques temps, de la silice est obtenue (figure II.4).



Figure II.4 - Gel de silice élaboré par sol-gel

II.2.2. Immobilisation de l'enzyme

L'étude de l'activité enzymatique de la pepsine libre et immobilisée a été faite à partir de la quantification de la tyrosine soluble libérée durant la dénaturation de l'hémoglobine.

a/Préparation du substrat :

- Dissoudre 500 mg de l'hémoglobine bovine dans 100 ml de l'eau distillé ;
- Ajouter l'HCl (0,3M) à la solution de l'hémoglobine avec un rapport volumique de (1:4) ;
- Centrifuger le mélange à 1000*g pendant 10 min.

b/Préparation de la solution pepsine :

Cette solution a été préparée à partir de l'ajout de 0,5mg de l'enzyme (la pepsine) à une solution tampon citrate à différents pH.

c/Préparation de l'acide TriChlorohydrique (TCA) :

La solution TCA a été préparée par la dissolution de 5 mg de TCA dans 100 ml de l'eau distillé.

Pour l'étude de l'activité de la pepsine libre, les échantillons ont été préparés avec un mélange d'un volume de substrat et un volume de la solution enzymatique, et pour ceux de la pepsine immobilisée, les échantillons ont été préparés avec l'ajout d'un volume de substrat à l'enzyme immobilisée dans le gel de silice à différents diamètres. Pour les deux expériences l'incubation a été faite pendant une heure.

L'étude de l'influence de pH a été réalisée avec des échantillons préparés à différents pH (0,5-7) et à une température d'incubation de 40 °C.

L'étude d'influence de température a été faite à partir d'incubation des échantillons à différentes température et à pH optimal obtenu dans la première étude.

Et enfin, l'hydrolyse a été arrêtée à partir de l'ajout de 0,5 ml du TCA à 5 %.

Pour le test d'inactivation. Les échantillons ont été préparés aux conditions optimales (pH, température et diamètre) avec des mêmes rapports de volume que les premières expériences et pendant 24 heures d'incubation.

L'estimation de l'activité de la pepsine, dans le surnageant, après la centrifugation à 1000*g pendant 10 min a été mesurée selon l'équation suivante (Anson 1938, Han et al. 2015) :

$$\% \text{ de l'activité enzymatique} = \frac{(A \text{ échantillon} - A \text{ témoin}) * 100}{A \text{ échantillon}}$$

Logiciels utilisés

Les résultats obtenus ont été traités par Microsoft Excel pour la présentation des graphes et les résultats de l'activité enzymatique.

Dans ce chapitre sont présentés les résultats obtenus durant le travail sur l'étude de l'activité enzymatique de la pepsine libre et la pepsine immobilisée sur le gel de silice élaborée par sol-gel.

III.1. Etude de l'activité enzymatique de pepsine libre

III.1.1. Influence du pH sur l'activité de la pepsine libre

Les résultats obtenus lors de l'étude d'évolution de l'activité de la pepsine libre à différents pH en fonction du temps sont représentés en annexes. Ces derniers nous ont permis de réaliser les courbes représentés dans la figure III.1.

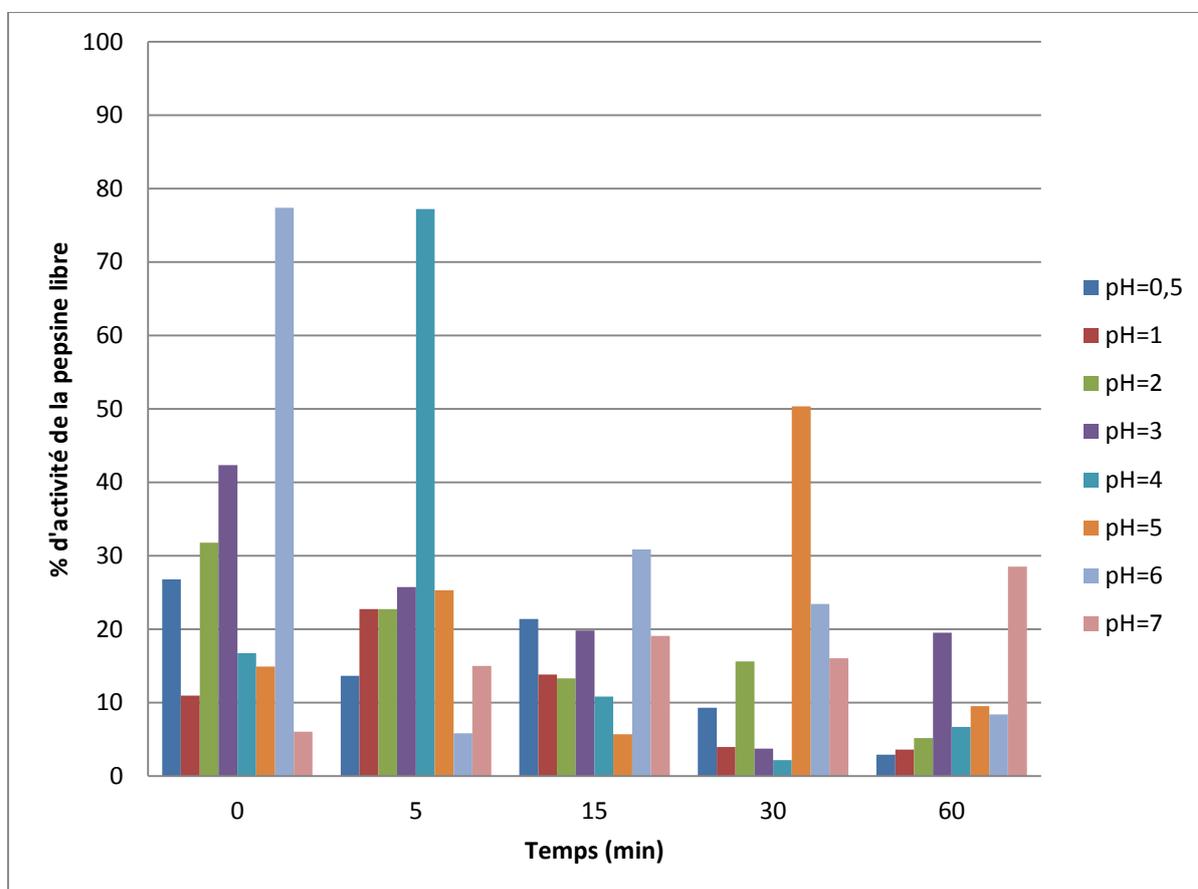


Figure III.1 - Activité de la pepsine libre en fonction du temps à différents pH

D'après les résultats, l'activité maximale est obtenue avec pH = 4. A pH = 5, on observe que l'activité diminue pour atteindre 50,32 % à 30 minutes puis elle diminue tandis qu'à pH = 1, la pepsine n'est active qu'à 25 %.

Cette étude montre que la pepsine est active dans tous le domaine de pH étudié.

L'évolution de l'activité enzymatique (c'est-à-dire rapportée à l'activité maximale) en fonction du pH est montrée sur la figure III.2.

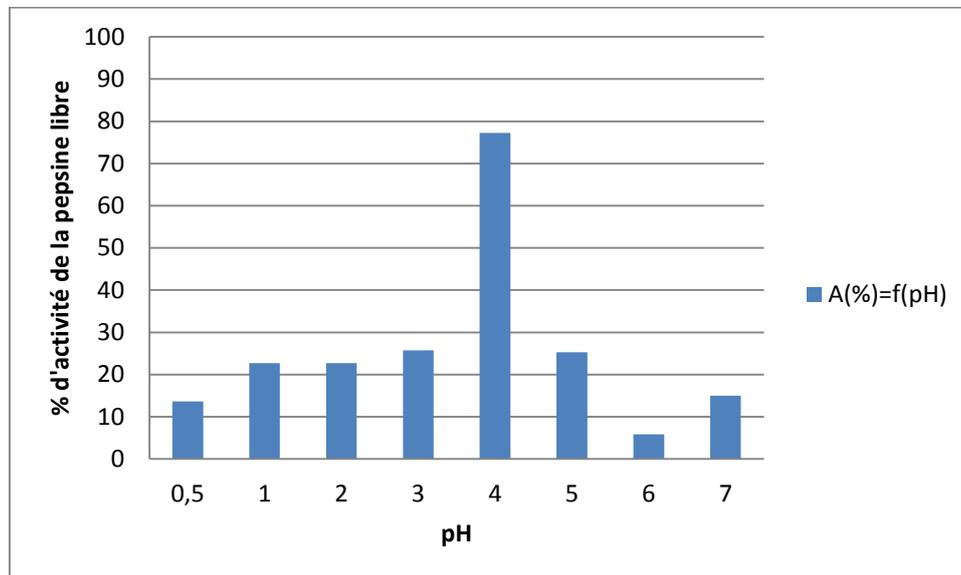


Figure III.2 - Activité de la pepsine libre en fonction du pH

D'après cette courbe, la meilleure activité enzymatique est de 80% qui est obtenue à pH=4

L'effet du pH est du à trois action indépendantes :

Un effet de dégradation irréversible (dénaturation) de l'enzyme aux pH extrêmes, causé par des modifications de la structure spatiale de l'enzyme.

Un effet sur l'état d'ionisation du substrat.

Enfin, un effet sur l'état d'ionisation de l'enzyme : la variation d'activité en fonction du pH est liée à la variation de l'état d'ionisation d'un nombre restreint de groupes dissociable de la protéine enzymatique [64].

L'évolution de l'activité enzymatique de la pepsine en fonction de pH révèle deux courbes en cloche faisant apparaitre une zone pH optimal (pH = 4) et le pH = 5 qui est aussi important.

Les figures III.3 et III.4 montrent l'évolution de l'activité de la pepsine libre en fonction du temps au pH optimal (4 et 5).

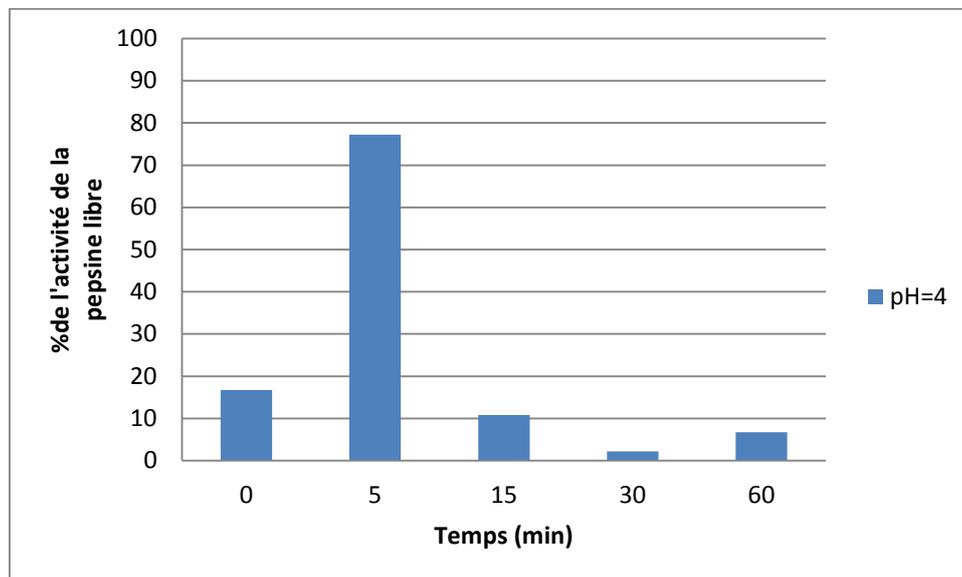


Figure III.3 - Variation de l'activité enzymatique de la pepsine en fonction du temps de pH = 4

On observe l'augmentation d'activité enzymatique de 0 min jusqu'à 5 min puis l'activité enzymatique reste plus ou moins stable à 30 min. Au-delà de cette zone, elle remonte progressivement.

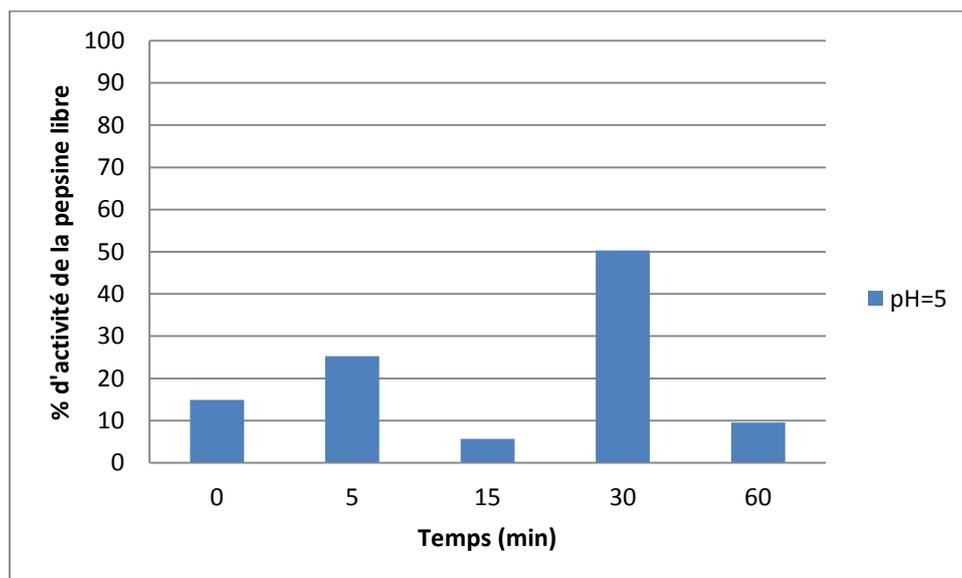


Figure III.4 - Activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH = 5

On remarque que l'activité commence avec un taux faible pendant les 15 premières minutes puis augmente jusqu'à environ 50 % à 30 min puis elle diminue jusqu'à la fin du temps de l'expérience.

III.1.2. Influences de la température sur l'activité de la pepsine

Dans cette partie, l'étude est portée dans un milieu de pH optimal obtenu lors des expériences de l'effet de pH, soit à un pH = 4.

Les résultats obtenus pour l'étude de l'évolution de l'activité de la pepsine libre en fonction du temps à différentes températures sont représentés dans la figure III.5 suivante :

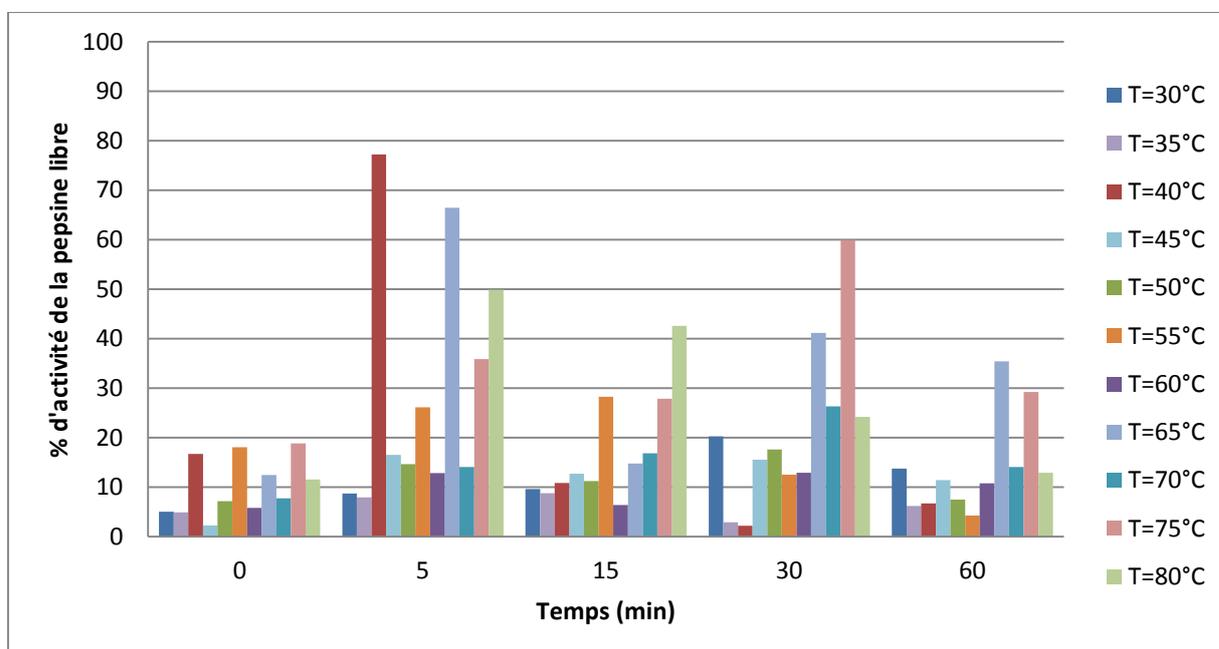


Figure III.5 - Activité de la pepsine libre en fonction du temps à différentes températures

On remarque que la température la plus élevée à laquelle l'enzyme présente une activité maximale après 5 min est T = 40 °C. A noter que l'activité de la pepsine libre a été déterminée dans du tampon acétate 0,5 M.

A 65°C, la pepsine présente une activité aussi importante qui atteint 66,47 % après les 5 premières minutes d'incubation.

Après 30min d'incubation, la pepsine présente une activité importante qui est de 59,90% à la température de 75°C.

Les principaux avantages d'une température optimale élevée lors de la mise en œuvre des enzymes à l'échelle industrielle sont [65,66] :

- Vitesse de réaction plus importante, donc diminution du temps nécessaire pour obtenir un taux de conversion déterminé et augmentation de la productivité de l'installation.
- Diminution de la viscosité du milieu ce qui permet de minimiser l'énergie dépensée pour agiter le milieu.
- Solubilité élevée du substrat et des produits de réaction.
- Réduction des proliférations microbiennes.

La figure III.6 représente l'évolution de l'activité de la pepsine libre en fonction de la température.

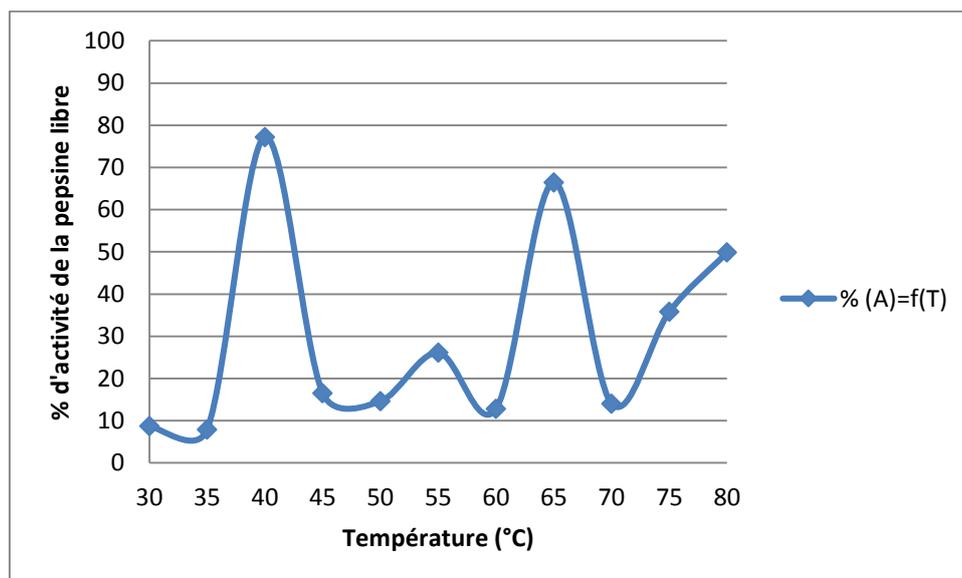


Figure III.6 – Activité de la pepsine libre en fonction de la température

Les résultats montrent l'évolution de l'activité enzymatique de la pepsine libre en fonction de la température d'incubation.

On observe que la température influence considérablement sur l'activité enzymatique de la pepsine.

En variant la température d'incubation de 30 °C jusqu'à 80 °C, l'activité enzymatique de la pepsine libre révèle une courbe en cloche qui présente une réponse maximale à 40 °C et une activité remarquable à 65 °C.

L'évolution observée de l'activité enzymatique en fonction de la température résulte de deux de deux phénomènes :

- L'activation thermique de la réaction hydrolyse.
- La dénaturation thermique de l'enzyme.

De plus, la température optimale observée dépend du temps de réaction qui ici relativement court : 5min.

La figure III.7 représente l'évolution de l'activité de la pepsine à la température optimale constatée (40 °C) en fonction du temps.

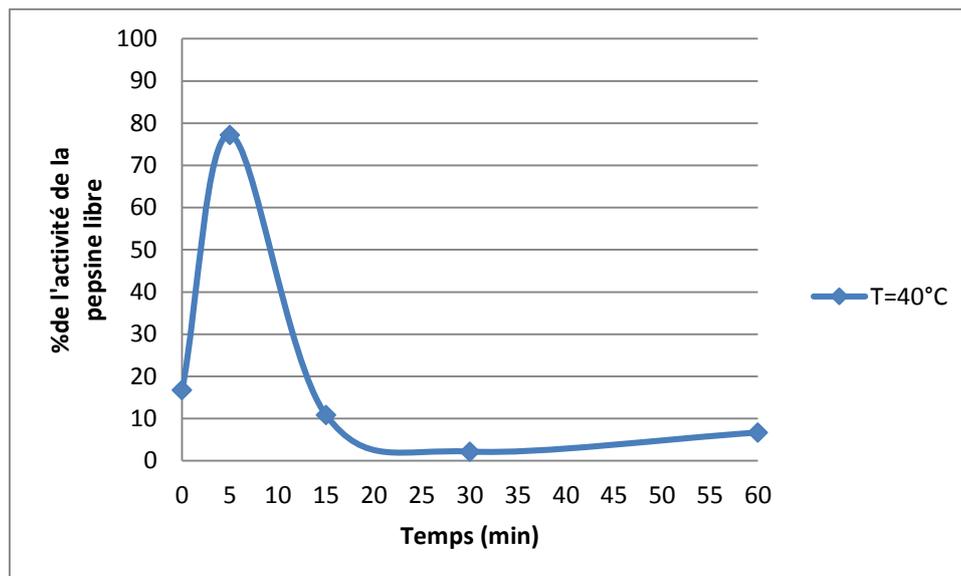


Figure III.7 - Activité de la pepsine libre en fonction du temps à $T = 40\text{ °C}$

L'expérience montre que le meilleur résultat obtenu est avec la pepsine libre incubée dans le tampon acétate à pH = 4 est pour une période d'incubation de 5 min à 40 °C, alors que les résultats demeurent inférieures à 10 % après 15 minutes d'incubation.

III.2. Etude de l'activité enzymatique de pepsine immobilisée

L'expérience précédente a montré que les résultats de l'activité enzymatique de la pepsine libre sont obtenus avec un $\text{pH} = 4$ et aussi $\text{pH} = 5$ à une température d'incubation à 40°C , pour cela l'étude de l'activité de la pepsine immobilisée dans le gel de silice a été réalisée dans ces conditions.

III.2.1. Influences du diamètre de la matrice de silice sur l'activité de la pepsine immobilisée

La figure III.8 montre une variation de l'activité enzymatique de la pepsine immobilisée à $\text{pH}=4$ et $T= 40^\circ\text{C}$ dans différents diamètres du support de silice (lavée au préalable avec le pH de la réaction) en fonction du temps.

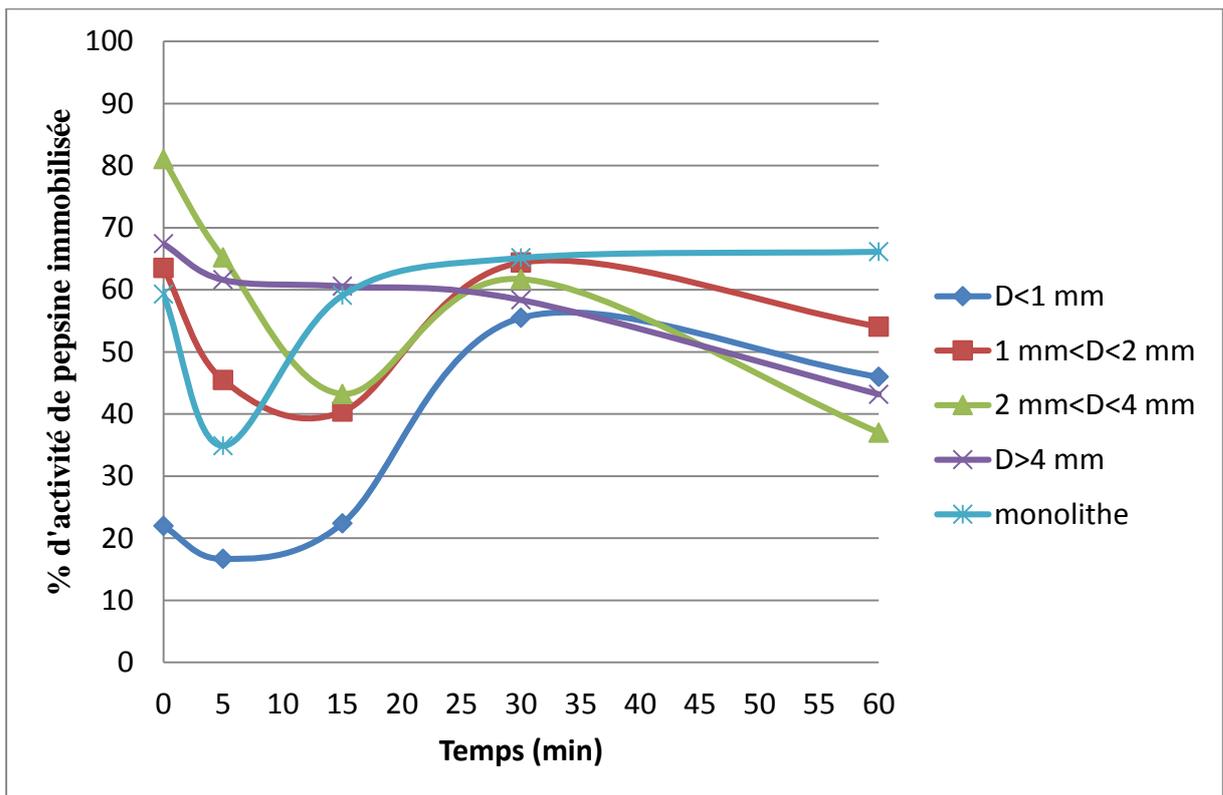


Figure III.8 - Activité de la pepsine immobilisée en fonction du temps à différents diamètres

Quel que soit le diamètre de la matrice de silice, l'activité diminue durant les premiers temps d'incubation pour reprendre après presque 15 minutes de l'incubation. La meilleure activité est enregistrée pour le monolithe de silice.

La figure III.9 représente l'évolution de l'activité de la pepsine immobilisée dans un monolithe de silice en fonction du temps.

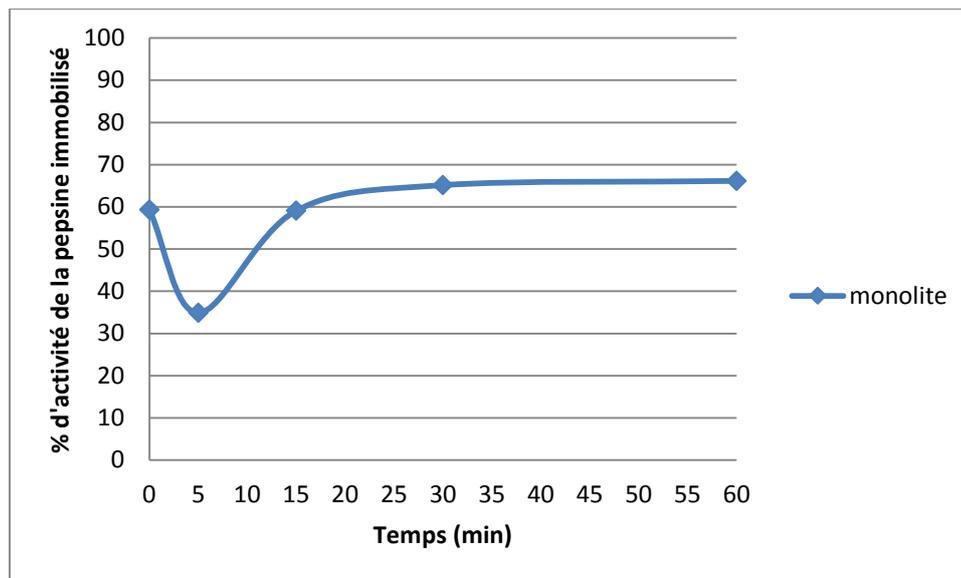


Figure III.9 - *Activité de la pepsine immobilisée sous forme de monolithe en fonction du temps*

On remarque que l'activité de la pepsine immobilisée diminue dans les 5 premières minutes qui sont peut-être dû au temps nécessaire pour que l'enzyme sera en contact avec le substrat puis elle augmente durant le reste du temps d'incubation pour attendre un taux de 66 %.

III.2.2. Influence de l'immobilisation sur l'activité de la pepsine

Pour étudier l'influence du support d'immobilisation sur l'activité enzymatique de la pepsine, des expériences ont été menées dans les conditions optimales déjà établies dans les expériences précédentes. Les courbes obtenus pour cette étude de l'activité de la pepsine immobilisée et libre sont regroupées dans la figure III.10.

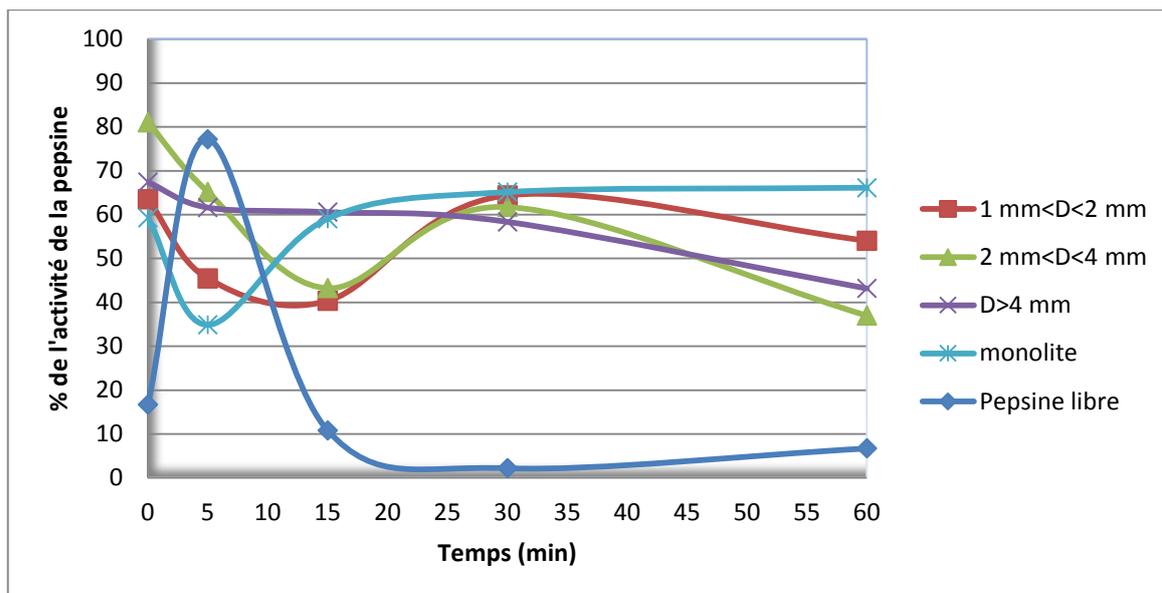


Figure III.10 - Activité de la pepsine libre et pepsine immobilisée à différents diamètres

Il est remarquable que l'activité enzymatique de la pepsine libre évolue inversement par rapport à celle de la pepsine immobilisée. Durant les premières instantes de l'expérience, on remarque que l'activité de la pepsine libre augmente contrairement à celle de la pepsine immobilisée pour les différents diamètres du gel de la silice mais les résultats montrent que l'enzyme immobilisée adopte une stabilité très intéressante avec une activité remarquable supérieure à 50 % pour les quatre échantillons.

La figure III.11 représente l'évolution de l'activité de la pepsine libre et immobilisée dans un bloc de monolithe de silice en fonction du temps à pH = 4 et T = 40 °C.

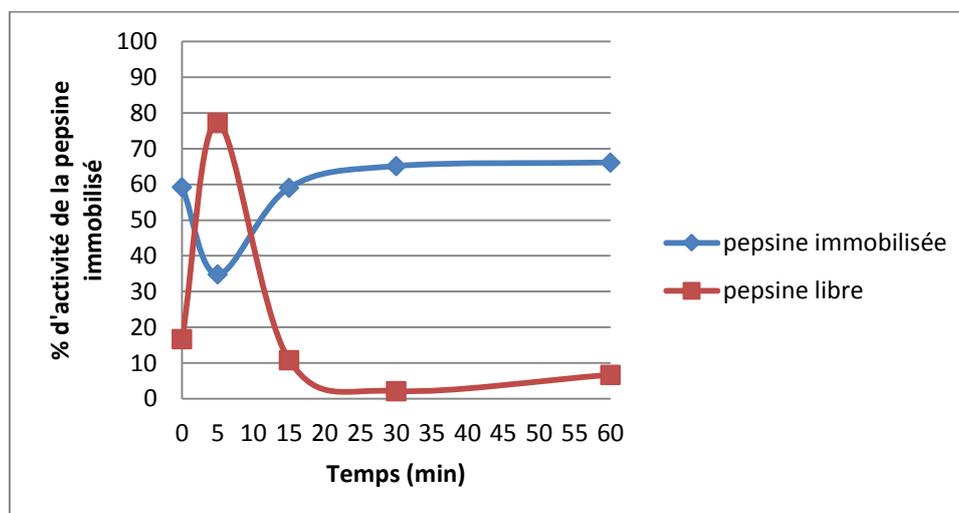


Figure III.11 - Effet de l'immobilisation dans un monolithe sur l'activité de la pepsine

L'étude montre que l'activité de la pepsine libre augmente les 5 premières minutes contrairement pour celle de la pepsine immobilisée qui apparaitre plus élevée après 10 minute d'incubation. Donc l'immobilisation dans un monolithe de silice conserve une activité enzymatique dans le temps.

La figure III.12 représente la variation du taux de l'activité de la pepsine immobilisée en fonction des diamètres de la silice à $t = 0$ min et $t = 60$ min.

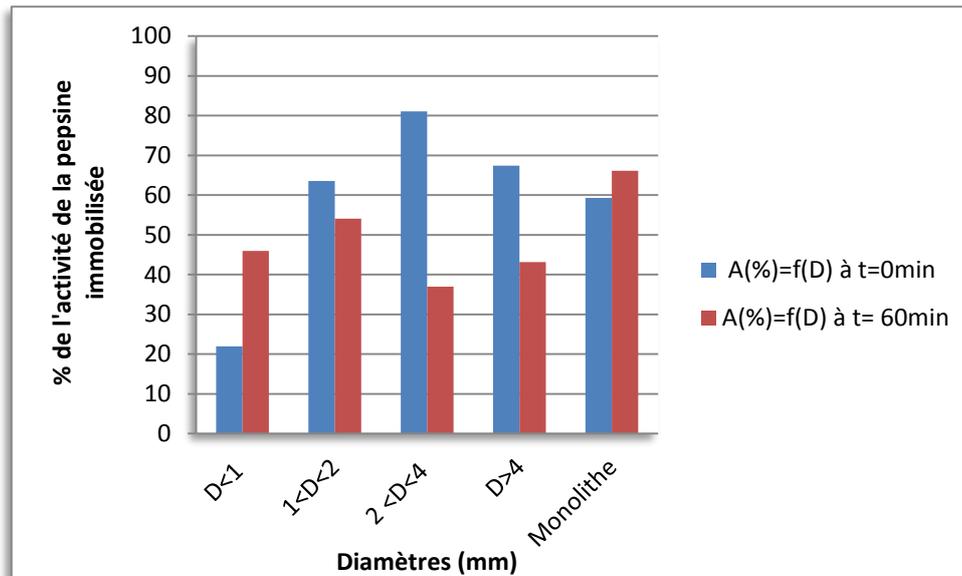


Figure III.12 - Activité de la pepsine immobilisée en fonction du diamètre du gel de silice

Cette expérience montre que l'activité de la pepsine immobilisée est remarquable (plus de 50 %) pour les diamètres supérieurs à 1mm avant l'incubation et elle est intéressante dans le monolithe après 60 minutes d'incubation.

III.3. Inactivation de la pepsine

L'inactivation sert à étudier la résistance et la durée de vie de la pepsine en fonction du temps.

La figure III.13 représente l'évolution de l'activité enzymatique de la pepsine immobilisée dans le gel de silice en fonction du temps pour le monolithe à $\text{pH} = 4$ et $T = 40$ °C.

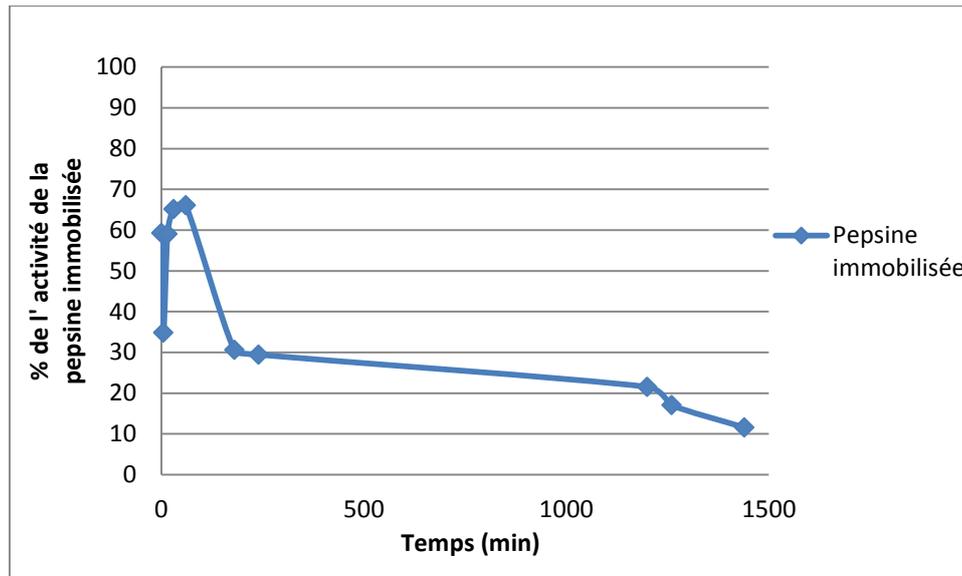


Figure III.13 - Activité de la pepsine immobilisée en fonction du temps

D'après la figure, l'activité de la pepsine immobilisée commence à diminuer à partir d'une heure pour devenir plus ou moins constante aux environs de 3h jusqu'à 21h et en suit diminue encore à partir de 21h pour qu'elle devienne inactive.

Cette inactivation est peut-être dû à la présence d'agents d'inactivation (radicaux libre, agents d'oxydation,...). Comme elle peut être aussi inactivée si l'un des groupements du site actif est déstabilisé.

La figure III.14 représente l'effet de l'immobilisation sur l'activité de la pepsine en fonction du temps.

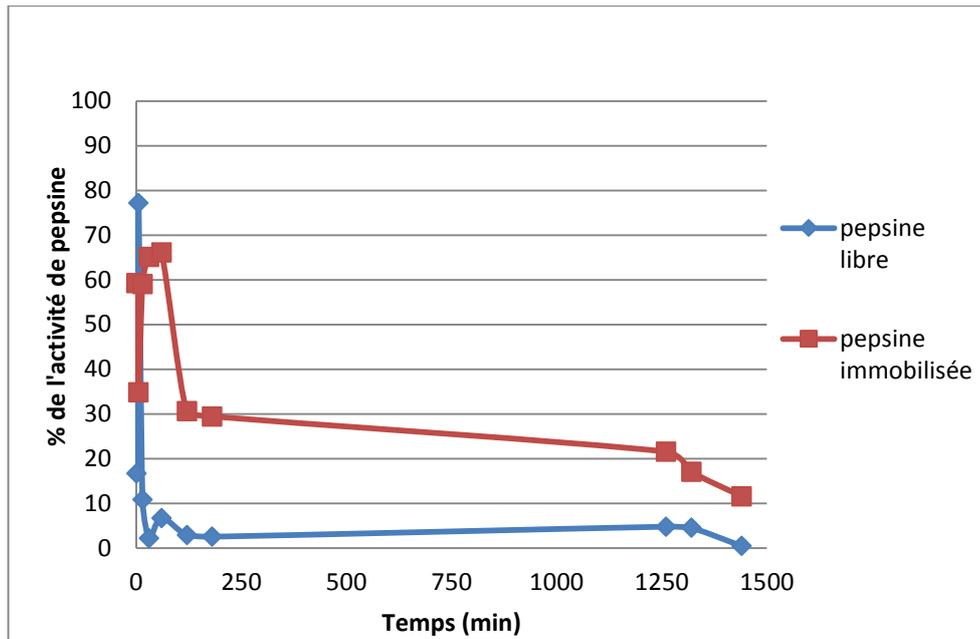


Figure III.14 - Effet de l'immobilisation sur l'activité de la pepsine

On remarque que l'activité de la pepsine immobilisée est plus élevée que celle de la pepsine libre. On peut conclure que la pepsine immobilisée est plus résistante que la pepsine libre.

Une autre expérience a été menée pour un pH = 5 et T = 40 °C. La figure III.15 représente l'évolution de l'activité de la pepsine immobilisée dans un monolithe de silice en fonction du temps.

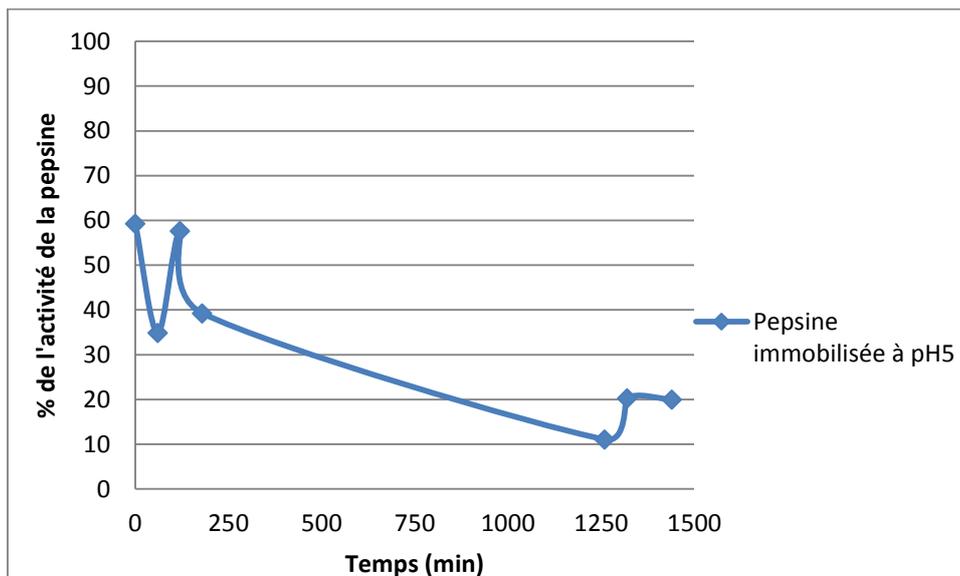


Figure III.15 - Activité de la pepsine immobilisée dans un monolithe de silice à pH = 5 en fonction du temps

Cette figure montre que l'activité de la pepsine immobilisée décroît à partir de 2h jusqu'à 21h puis augmente légèrement pour se stabiliser entre 22 h et 24 h aux environs de 20 %.

La figure III.16 représente l'évolution de l'activité de la pepsine libre et immobilisée fonction du temps durant la période d'étude de l'inactivation.

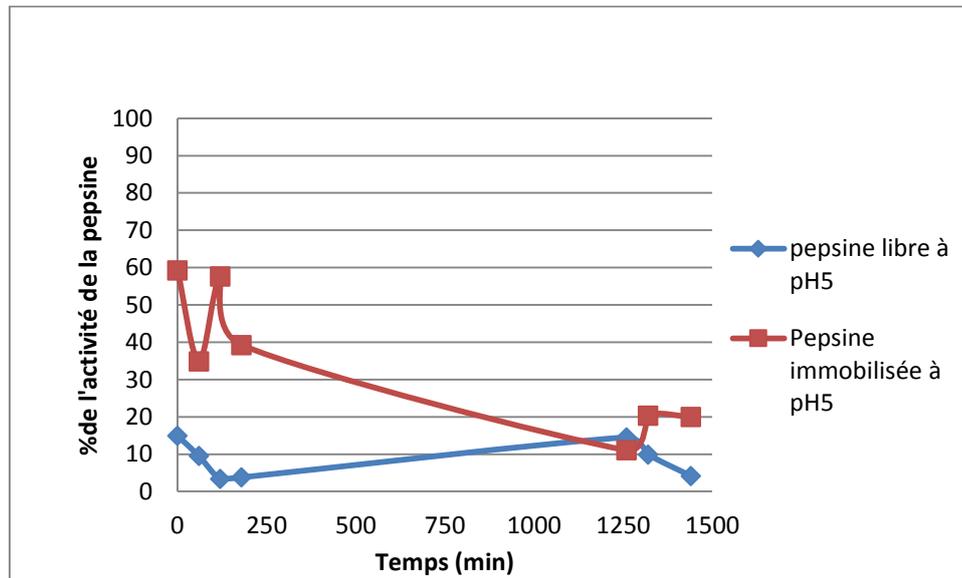


Figure III.16 - Effet de l'immobilisation sur l'activité de la pepsine à pH = 5

On remarque que l'activité de la pepsine immobilisée est plus élevée que celle de la pepsine libre. Ce qui signifie que cette dernière présente une stabilité importante par rapport à l'enzyme libre avec diminution régulière de son activité jusqu'à environ 10 % d'activité. La légère augmentation des résultats vers la fin de l'expérience est peut être due non pas à l'activité enzymatique mais à l'apparition de substances interférentes qui absorbent à la même longueur d'onde, un résultat a confirmé !

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la pepsine libre et la pepsine immobilisée, en utilisant une nouvelle matrice appelée la silice élaborée par la voie sol gel. La pepsine a été immobilisée par la technique d'inclusion. Tous les verres utilisés comme supports d'immobilisation ont été synthétisés au sein de notre laboratoire à base du TEOS comme précurseur, et la détermination de l'activité enzymatique a été effectuée suite à des mesures optiques à 280 nm.

Plusieurs paramètres ont été étudiés tels que l'influence du pH et de la température dans le milieu réactionnel. Les résultats de l'activité catalytique de l'enzyme immobilisée ont démontré clairement sa stabilité et sa résistance dans les différentes conditions de réaction contrairement à l'enzyme libre qui manifeste une instabilité et une courte durée l'activité même les conditions optimales.

L'immobilisation de la pepsine n'affecte pas les paramètres cinétiques de l'enzyme, son pH optimal ou sa température optimale, malgré la perte de son activité, mais aussi le temps de réaction et la stabilité structurelle de l'enzyme (le maintien du site actif).

On peut conclure que les matrices de silice synthétisées par sol –gel peuvent être parfaitement utilisées pour l'immobilisation de la pepsine par inclusion.

Les résultats de ce travail ouvrent une piste sur l'immobilisation des enzymes par sol-gel et représentent un début pour poursuivre les travaux dans cet axe. Et comme perspectives futures émergentes de cette étude :

- Etudier l'action de la pepsine immobilisée sur différentes substrats naturels tels que la caséine et l'ovalbumine afin de pouvoir l'exploiter dans le domaine industriel ;
- Procéder à des tests de toxicité de ces matrices en vue d'une utilisation in –vivo ;
- Mener une étude de l'immobilisation d'un autre type enzyme ou de molécules biologiques.

- , [1] FIE. Swaisgood (1982) in P.f. Fox (Editor), *Developments in Dairy Chemistry*, 1, Elsevier Applied Science, London.
- [2] E. Bonneil, M. Mercier, K.C. Waldron (2000) *Anal. Chim. Acta* 404: 29-45.
- [3] F.L. Jun, T.L. Yong, C.Y. Victor, *J. Pharmaceut* (2000) *Sci.* 89: 979-990.
- [4] A. Weiseman (1993) *Chem. Technol. Biotechnol.* 56: 3-10.
- [5] H.H. Weetall (1974) *Anal. Chem.* 46: 602A-615A.
- [6] B. Ozturk (2001) *Immobilization of lipase Candida rugosa on hydrophobic and hydrophilic supports*, Master of Science , İzmir Institute of Technology, Turkey: 35-39.
- [7] II.Gill, J.Das, R. N. Patel (2007) *Tetrahedron Asymmetry*, 18(11):1330-1337.
- [8] W.A. Alloue, M.Aguedo , J. Destain,H.Ghalfi. C, Blecker.J.P.Wathelet. P, Thonart (2008) *Biotechnol, Agon, Soc, Environ*, 12 (1): 57-68.
- [9] G. Durand.P, Monson (1974) *les enzymes immobilisées*, 05: 22-24.
- [10] M.L. Foresti. M.L. Ferreira (2007) *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (0 4):769-777.
- [11] M.B. Abdul Rahman, S.M. Tajudin, M.Z. Hussein, N. Z. Raja, A. R. Salleh, A. B.M. Basri (2005) *Applied Clay Science*, 29: 111– 116.
- [12]W. Kaewthong, S. Sirisaneeyakul, P.H. Prasertsan, A. Kittikun (2005) *Process Biochemistry.* 40:1525-1530.
- [13] Y. Gargouri, H. Ghamgui, N. Miled, M. Karra-chaâbouni (2007) *Biochemical*, 37: 34–41.
- [14]Y.X. Bai, Li. Y-F, Yong Yang, Liu-Xiang Yi (2006) *Journal of biotechnology*,125:574-582.
- [15]Z. Knezevic, N. Milosavic, Bezbradica, Dejan, Jakovljevic, Zivana, Prodanovic, Radivoje (2006) *Biochemical Engineering Journal*, 30: 269 – 278.
- [16] R. Dalla-Vecchia, D. Sebrão, M. Nascimento, V. Soldi (2005) *Process Biochem*, 40: 2677-2682.

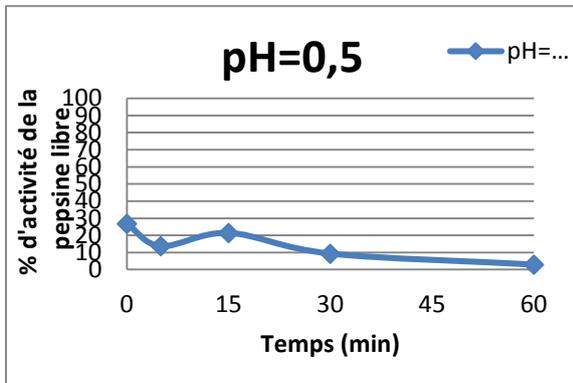
- [17] S-P. Colowick, N.O. Kaplan (1987) *Methods in enzymologie*, vol-44: immobilized enzymes and cells (parts), 584.p.bibl, Academic press.
- [18].Rensselaer Polytechnic Institute, Copyright ©1996-2010 (RPI), [en ligne], Adresse URL : <http://www.eng.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/immob.htm>
- [19] E. Brown J – F, Biellmann, *Techniques de l'Ingénieur. Traité Génie des procédés*. J 1240.
- [20]V. RAM ESH, C. SINGH (1981). Immobilisation of *Bacillus subtilis* a - amylase on zirconia – coated alkylamine glass with glutaraldehyde.*Enzyme Microb. Technol*, 3: 246 - 248.
- [21] K. BUSHHOLZ, M.NOLL – BORCHERS, D. SCHWENGERS (1998) Production of leucrose By dextransucrase.*Starch/Starke*, 50, N° 4: 164 - 172.
- [22] N. DAS, AM. KAYASTHA, O.P. MALHOTRA (1998) Immobilisation of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan*L.) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 27 : 25 - 29.
- [23] P.DUPUY, *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire*. Paris, Technique et Documentation - Lavoisier. (1982)165 - 171.
- [24] L.A. KIRK, H.W. DOELLE (1993) Rapid ethanol production from sucrose without by product formation. *Biotechnology letters*, 15. N° 9: 985 - 900.
- [25] L. RAY, SK. MAJUMDAR (1994) Enzymatic hydrolysis of starch to glucose, and immobilization of amyloglucosidase in calcium alginate gel *Research and industry*. 39:109 - 112.
- [26] H.H. WEETALL (1988) Enzymes immobilized on inorganic supports.In: *Analytical uses of immobilized biological compounds for detection, medical and industrial uses*, GG. GUIBAULT ' and M. MASCINI Ed, D. Reidel Publishing Company, 1 -16.
- [27] H. HATAYAMA, T. SWABE, Y. KUROKAWA (1996). Immobilization of urease on composite fibre by using a gel formation of cellulose acetate and titanium iso - propoxide. *Journal of sol - gel and Technology*, 7: 13 - 17.

- [28] W. KRASNOBAJE, R.VBONIGER (1974) Preparation and application of immobilized enzymes for starch degradation. Proc. IV Int. Congress Food Sei. and Technol.. IV: 45 - 49.
- [29] T. SAITO, Y. YOSHIDA, K. KAWASHIMA, H. LIN. KHINAGAKI, S. MAEDA, T. KOBAYASHI (1997) Influence of aldehyde groups on the thermostability of an immobilized enzyme on an inorganic support. Materials science and engineering C5:149 - 152.
- [30] N. DAS, A.M. KAYASTHA, O.P. MALHOTRA (1998) Immobilization of urease from pigeonpea (*cajanus cajan* L.) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads. Biotechnol. Appl. Biochem, 27: 25 - 29.
- [31] E. BONDG FREIRE, MF. MENDES, VF. SOARES (1984) Immobilization of glucoamylase on inexpensive supports: A comparative evaluation. Biotechnology and Bioengineering Symp, N° 14: 447 - 455.
- [32] H.H. WEETAL (1993) Preparation of immobilised proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. Applied Biochemistry and Biotechnology, 41, 157 - 8.
- [33] J. Ebelmen Ann (1846). Chim. Phys 3: 319.
- [34] J. Livage (2000) les procedes sol-gel ; revue verre, Vol 5, N°6.
- [35] E. M. Fixman, M. C. Abello, O. F. Gorriz, L. A. Arrua; Appl. Catal A: Gen (2007) 319, 11.
- [36] E. F. Aboefletoh, R. Pietschnig, Catal. Lett 127 (2009) 83.
- [37] R. S. da Cruz, J. M. S. de Silva, U. Arnold, U. Schuchardt, J. Mol. Catal. A: Chem. 171(1-2) (2001) 251.
- [38] P. Padmaja, K. G. K. Warriar, M. Padmanabhan, W. Wunderlich, F. J. Berry, M. Mortimer, N. J. Greamer (2006) Mat. Chem. Phys 95, 56.
- [39] S. Shylesh, P.P. Samuel, A.P. Singh, Appl. Catal A: Gen 318 (2007) 128.
- [40] D. Lahcene, Y.N. Tchenar, A. Choukchou-Braham, R. Bachir (2009) Phys. Chem. News 45, 121.

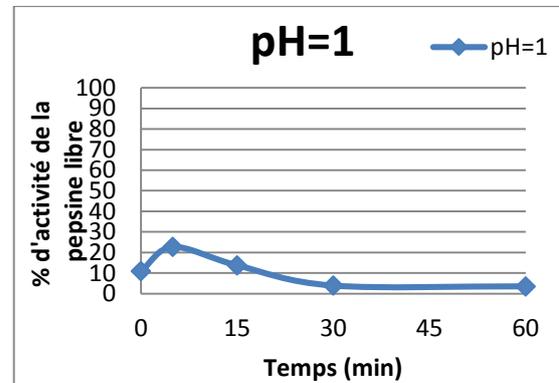
- [41] R. M. Mohamed, E. S. Baecissa, L. A. Mkhalid, M. A. Al-Rayyani; Appl. Nanosci. (2012).
- [42] M. B. Ahmad, Y. Gharayebi, M. S. Salit, M. Z. Hussein, S. Ebrahimasl, A. Dehzangi (2012) Int.J. Mol. Sci 13 , 4860.
- [43] Y. S. Mhaisagar, B. N. Joshi, A. M. Mhajan. Bull. Mater. Sci 35 (2) (2012) 151.
- [44] X. Wang, G. Wu, B. Zhou, J. Shen. Materials 6 (2013) 76.
- [45] J. Brinker, G. W. Scherer (1990) "Sol-gel science, the physics and chemistry of sol-gel processing". Academic Press.
- [46] L. C. Klein, "Sol-gel optics (1993) processing and applications". Kluwer Academic publishers, &.
- [47] S. Sakka, "Handbook of sol-gel science and technology (2004) Processing, characterization and applications". Kluwer Academic Publishers.
- [48] Y. N. Tchenar, D. Lahcene, A. Bellifa, R. Bachir, A. Choukchou-Braham. Algerian Journal of Advanced Materials 3 (2006) 143
- [49] J. Livage, "Chemica Scripta" 28 (1988) 9.
- [50] J. Livage, "De l'art du feu a la chimie douce". Academic des sciences. 2002.
- [51] A. C. Pierre, Introduction aux procedes Sol-Gel , Edition Septima, Paris. 1992.
- [52] A.C. Pierre (1992) Introduction aux procédés sol-gel, Collection FORCE RAM, Editions Septima, Paris.
- [53] H. Dislich, P. Hinz, J. Non-Cryst (1982) Solids 48:11-16.
- [54] D.C. Bradley (1958) Nature. 182 1211.
- [55] J. Livage, P. Barboux, M. Navabi, P. Judeinstein (1989) Solid State Ionics. 135, 131.
- [56] M. Bathat (1992) thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon. 1.
- [57] R. AZOUANI (2009) Elaboration de nouveaux nanomatériaux photocatalytiques actifs sous rayonnement visible, Thèse de Doctorat, Université Paris 13.

- [58] CNRST- IMIST ANGLE AV. ALLAL AL FASSI ET AV. DES FAR, HAY RYAD (2013) solgel: un procédé issu de la chimie douce, Institut Marocain de l'information Scientifique et Technique – IMIST, BP : 8027 – 10102 rabat – Maroc.
- [59] K. BENYOUCEF (2011) Préparation de catalyseurs nanostructurés à base d'oxydes de (Co, Mo, Ti et Si) par pulvérisation supercritique du sol. Application dans la transformation du cyclohexane, Thèse de Magister, Université M'Hamed BOUGARA-BOUMERDES.
- [60] E. J. A. Pope, J. D. Machenzie (1986) J. of Non-Crystalline Solids 87, 185.
- [61] K. Mouhli, K. Taraf, "élaboration des couches minces de ZnO et de ZnO:Al.
- [62] L. L. Hench, J. K. West (1990) Chem Rev. 90, 33.
- [63] C. J. Brinker, D. M. Smith, R. Deshpande, P. M. Davis, S. Hietala, G. C. Frye, C. S. Ashley, R. A. Assink (1992) Catal.Today. 14,155.
- [64] L.PENASSE (1974) Les enzymes: Cinétique et mécanisme d'action. Paris, Masson et Cie, 58 - 106.
- [65] G. COUTOUX (1991) Génie enzymatique. Paris, Masson et Doin : 116- 118 et 124-127.
- [66] A. ILLANES (1999) Stabilité of biocatalyses. FJB Electronique Journal of Biotechnologie. 2. N° 1 : 7 - 15.

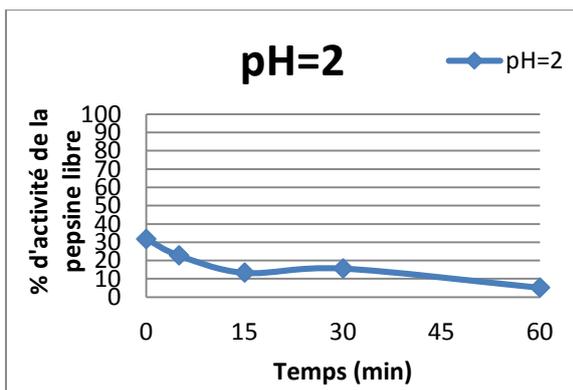
Annexe : 01



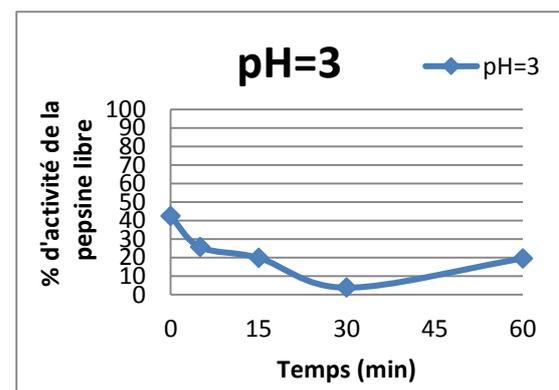
Activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH=0.5



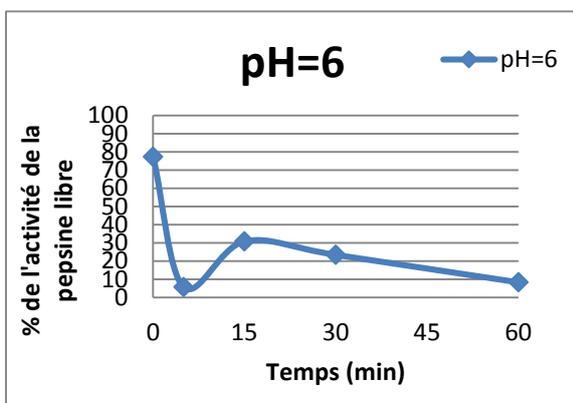
Activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH=1



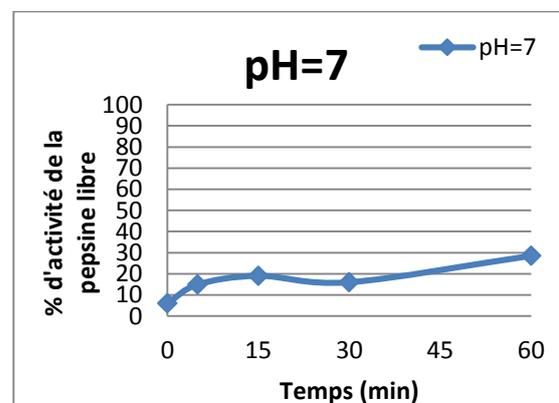
Activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH=3



Activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH=2

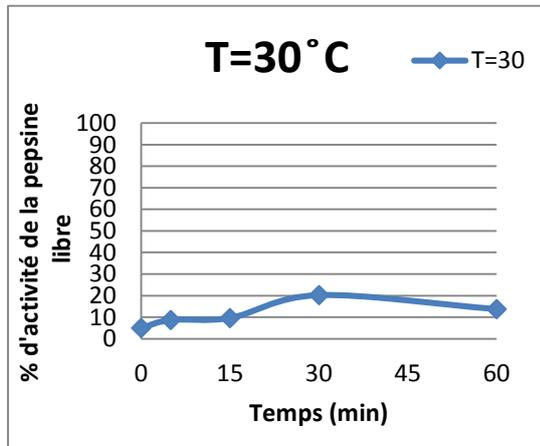


Activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH=6

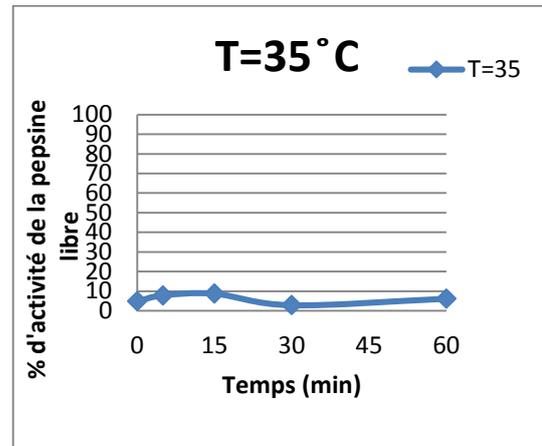


Activité de la pepsine libre en fonction du temps à pH=7

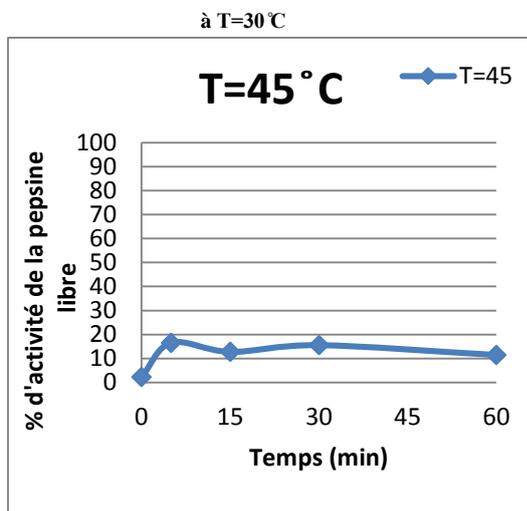
Annexe : 02



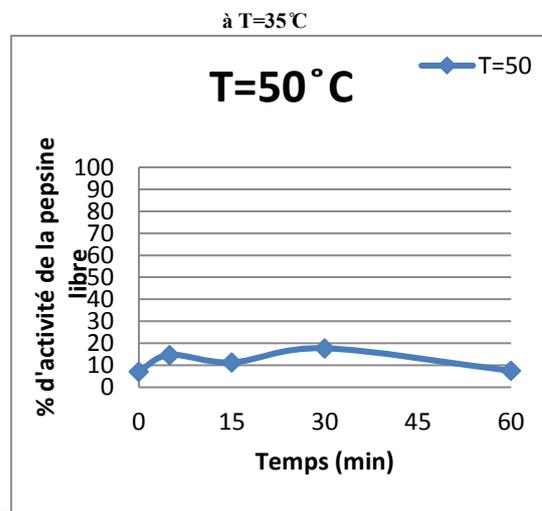
Activité de la pepsine libre en fonction du temps



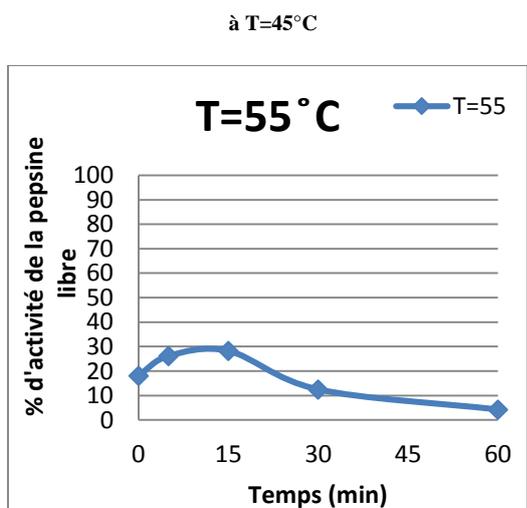
Activité de la pepsine libre en fonction du temps



Activité de la pepsine libre en fonction du temps

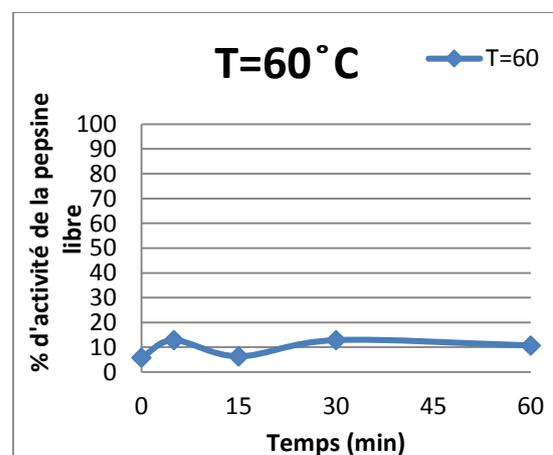


Activité de la pepsine libre en fonction du temps



Activité de la pepsine libre en fonction du temps

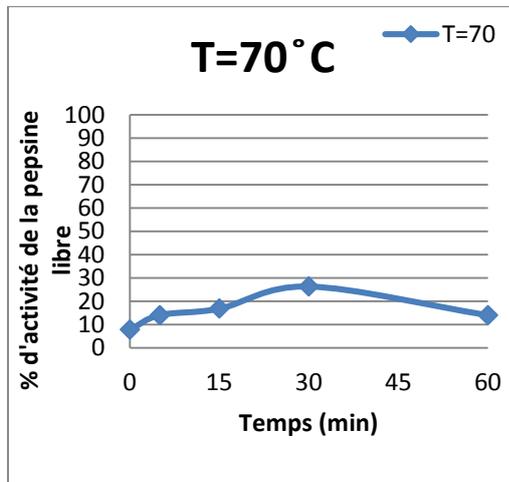
à T=55°C



Activité de la pepsine libre en fonction du temps

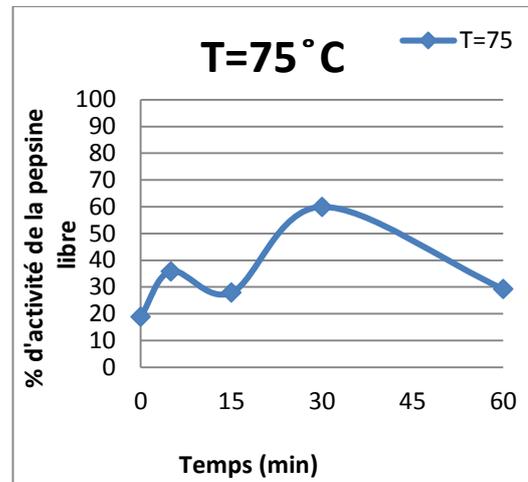
T=60°C

Annexe : 03



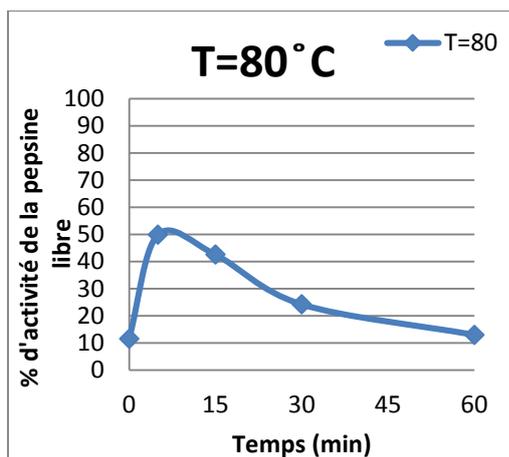
Activité de la pepsine libre en fonction du temps

à T=70°C



Activité de la pepsine libre en fonction du temps à

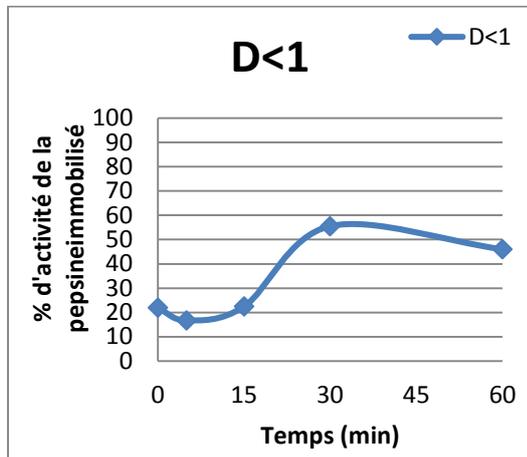
à T=75°C



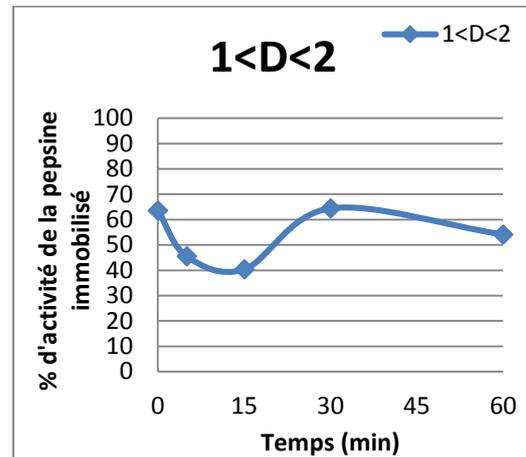
Activité de la pepsine libre en fonction du temps

à T=80°C

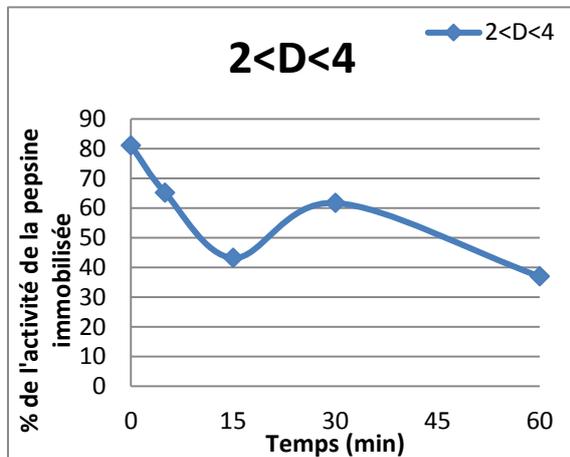
Annexe : 04



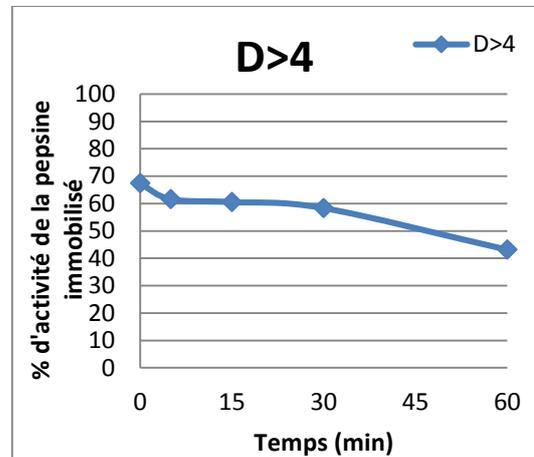
Activité de la pepsine immobilisée de $D < 1$ en
fonction du temps



Activité de la pepsine immobilisée de $1 < D < 2$ en
fonction du temps



Activité de la pepsine immobilisée de $2 < D < 4$ en
fonction du temps



Activité de la pepsine immobilisée de $D > 4$ en
fonction du temps

Résumé

Dans ce travail, la possibilité d'immobiliser la pepsine dans une matrice de silice élaborée par le procédé sol-gel est étudiée. L'étude a porté sur l'effet de la méthode l'inclusion, sur l'immobilisation de cette enzyme. L'activité catalytique des échantillons sur de substrat l'hémoglobine est également menée pour vérifier la présence de la matrice.

Les résultats de l'activité catalytique de l'enzyme immobilisée ont démontré sa stabilité et sa résistance dans les conditions réaction contrairement à l'enzyme libre.

L'activité dépassée 77% a été obtenu avec un pH acide (pH=4) alors qu'elle a diminuée de 60% pour la pepsine immobilisée par inclusion par rapport à la pepsine libre.

Abstract

In this work, the possibility of immobilizing pepsin in a silica matrix produced by the sol-gel process is studied. The study focused on the effect of the inclusion method on the immobilization of this enzyme. The catalytic activity of samples on substrate hemoglobin is also conducted to verify the presence of the matrix.

The results of the catalytic activity of the immobilized enzyme demonstrated its stability and resistance under the reaction conditions in contrast to the free enzyme.

The activity exceeded 77% was obtained with an acid pH (pH = 4) while it decreased by 60% for pepsin immobilized by inclusion compared to free pepsin.