



HAL
open science

Conception de systèmes catalytiques hétérogènes chimioenzymatiques pour l'époxydation

Noémie Balistreri

► **To cite this version:**

Noémie Balistreri. Conception de systèmes catalytiques hétérogènes chimioenzymatiques pour l'époxydation. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066290 . tel-01452822

HAL Id: tel-01452822

<https://theses.hal.science/tel-01452822v1>

Submitted on 2 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 397

Laboratoire de réactivité de surface

**Conception de systèmes catalytiques hétérogènes
chimioenzymatiques pour l'époxydation**

Par Noémie Balistreri le 13 Octobre 2016

Thèse de doctorat Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Claude Jolivalt et Franck Launay

Devant un jury composé de :

Migonney Véronique, Professeur, Université Paris 13	Rapporteur
Marc Lemaire, Professeur, Université Lyon 1	Rapporteur
Serge Thorimbert, Professeur, Université Paris 6	Président du jury
Sabine Valange, Maître de Conférences HDR, Université de Poitiers	Examinatrice
Claude Jolivalt, Professeur, Université Paris 6	Directrice de thèse
Franck Launay, Professeur, Université Paris 6	Co-Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Je dédicace ce travail à Jérôme Polesel, sans qui je ne me serais jamais lancée dans cette aventure.

Il a su croire en moi, chose qui me manque souvent, m'a initiée au travail de recherche et m'a poussée à me lancer. Un conseil de sa part : « *Lorsque tu choisis une thèse Noémie, tu choisis avant tout un sujet. Peu importe si ta formation n'est pas totalement en adéquation. Les choses s'apprennent et tu as trois ans pour cela. Alors il faut que ton sujet t'attire vraiment, te questionne et non pas uniquement dans l'optique finale d'un diplôme, puisque trois ans c'est long et le moment de la rédaction difficile. Alors autant faire quelque chose de stimulant non ?* ». Et c'est ce que j'ai fait Jérôme: j'ai postulé à l'unique sujet qui me « *stimulait* » et c'est celui qui sera présenté dans ce manuscrit.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury Véronique Migonney et Marc Lemaire en leur qualité de rapporteur d'avoir accepté d'examiner mon travail. Merci également à Sabine Valange de venir en tant qu'examinatrice et Serge Thorimbert, examinateur, de me permettre de vous présenter mes travaux. Un infini merci (**des milliers de remerciements devrais-je dire**) à ma Directrice de thèse Claude Jolival et mon Co-Directeur Franck Launay, qui m'ont donné ma chance en me confiant ce travail. Merci pour tout l'enseignement qu'ils m'ont apporté et leur soutien infaillible, que ce soit professionnellement ou personnellement. Je pense avoir eu les meilleurs directeurs du monde et j'ai eu une chance inouïe de travailler avec de telles personnes. Claude, merci pour votre profonde gentillesse, vos rires que l'on entend à l'autre bout du couloir, votre attention et votre patience (oh qu'il en a fallu), votre compréhension à toute épreuve, votre soutien et d'avoir toujours su trouver les mots réconfortants (même au pire moment de ma vie de doctorante, hormis la rédaction, à savoir : lorsque la colonne HPLC était bouchée !). Franck, merci pour nos discussions interminables, qu'elles aient été professionnelles ou tout simplement sur la vie (désolée de ne pas avoir su faire d'une simple question autre chose qu'une discussion d'une heure), d'avoir toujours cru en moi, d'avoir toujours été patient en prenant le temps de me faire des cours particuliers de chimie, merci pour nos plaisanteries qui remontaient le moral lorsqu'il était au plus bas. Enfin **merci à vous d'avoir répondu présents** à chaque moment de ce travail. Ma proposition « d'adoption de thésarde » pour les années à venir est encore valable (enfin sans la partie rédaction, j'entends bien). Je remercie également Julien Reboul avec qui j'ai pu travailler et énormément échanger. Ton soutien a été très important pour moi, notamment lorsque tu apaisais mes craintes, et nos discussions toujours très enrichissantes pour moi. Ne perds pas ton humour qui est top. Je tiens à dire merci à Dorian Gaboriau, d'avoir amorcé ce travail. Un immense remerciement également à mes petits stagiaires, ma petite Thao Duong Nguen, Florian Blain, Clément Corfdir, ainsi que mon dernier « Nono's crew » en date Maëwen Mintec, Alexandre Millanvois et Alice Apter. Alexandre, Maëwen, n'ayez crainte l'histoire de la colonne est à présent terminée !

J'adresse également mes remerciements à Hélène Pernot, Directrice du LRS, pour sa gentillesse, son écoute constante et de m'avoir permis d'acheter un billet d'avion pour aller à la conférence FCcat le lendemain de mon mariage (même si comme une bécasse au lieu de partir de Lyon, l'intérêt même de prendre l'avion, j'ai pris un billet au départ de Paris pour aller... à Frejus. Le retour en voiture de Grenoble et l'avion le lendemain de Paris auront eu raison d'une chose : le stress de mon oral, puisque trop fatiguée pour y penser). J'adresse mes sincères remerciements à Annie Mettendorff et Vincent Losinho, sans qui le LRS s'écroulerait ! Votre gentillesse, votre réactivité et votre aide sans faille est un réel bonheur. Annie nos discussions mariage étaient tout simplement un plaisir, de même pour Anne-Félicie Lamie-Humblot (les discussions sur la plage étaient encore meilleures). Merci à Cyril Thomas et Catherine Louis pour m'avoir écoutée me plaindre lors de mes moments « craquage de la mi-août » pendant la rédaction. Je remercie également le gentil Thomas Onfroy, qui bien qu'en détachement, a été présent durant toute ma première année et a su m'aider régulièrement. Merci à tous les membres du LRS quels qu'ils soient pour leur aide lorsque j'en avais besoin, leur accueil et le temps qu'ils m'ont consacré. Tous ont été tellement agréables et gentils (même toi Vincent Humblot, très taquin, mais toujours de très bons conseils et tellement cool) : Guillaume Laugel, Frédéric Averseng, Juliette Blanchard, Anne Davidson, Cyril Domingos, Jean-François Lambert, Claire-Marie Pradier, Pascal Massiani, Sonia M'Barek, Sabine Meme, Alberto

Mezzetti, Thomas Georgelin, Céline Sayag, Guylène Constantin, Jacques Vedrine, Michel Che, Sandra Casale, Jean-Marc Krafft, Stanislaw Dzwigaj, Yannick Millot, les Laurent² (Anscieau et Delannoy), les Christophe² (Calers, Méthivier). Je tiens également à remercier personnellement Xavier Carrier pour m'avoir permise d'effectuer des analyses XANES sur mes échantillons et d'avoir pris le temps de discuter de mes résultats. Mention spéciale à l'équipe de l'Ekiden, Vincent, Xavier, Cédric, Laurent², Anne-Felicie et Jelle. En ce qui concerne les étudiants j'aimerais souligner que le LRS n'aurait jamais été pareil sans vous. Une belle équipe, de belles personnes, tout cela me manque déjà. J'ai pu rencontrer des gens formidables, mon co-bureau Diaa Obaid qui est la joie de vivre incarnée, ainsi que le club des « petites » dont je fais partie : Marie Steffenhagen, Jane Abi Aad et Sarah Petit. Merci également à Maroua Ben Haddada, Alice Gimat, Mariame Akouche, Marc Robin, Zhao Wang, Achraf Blout (qui m'a été d'un soutien sans faille lors du congrès CaBiomass, même lorsqu'il a fallu passer une demi-heure à me trouver des collants), Maya Daou, Olfa Ben Moussa. Puis une tendre pensée aux doctorants partis en cours de route et qui m'ont accueillie si gentiment à mes débuts, Camella, Catharina, les Jumelles. Enfin une seconde mention spéciale aux membres du groupe très fermé de consommateurs de Savane, dont je faisais partie contre mon gré : Kim Larmier, Cédric Bara, Claire Vallotteau, Laetitia Valentin vous êtes mes chouchous et lorsque les trois premiers nous ont quittés vers d'autres missions post-doctorales, je dois bien dire que nos cœurs se sont brisés avec Laetitia. Ah Laetitia...ma kepine ! La reine des molécules ! Sans toi ma thèse n'aurait jamais été la même, une réelle et belle amitié en te découvrant. Je ne saurais t'exprimer autant de remerciements qu'il n'en faudrait et tu le sais bien. Notre passion commune des Minions a eu son rôle à jouer dans notre complicité (Vive Bob). Vous l'aurez compris le LRS m'a énormément apporté, autant d'un point de vue professionnel que personnel ! Des gens en or et de belles rencontres. Ce n'est pas sans émotion que j'écris ces mots à cette heure tardive à laquelle je me trouve et je dois bien l'avouer... si thèse il y avait à refaire auprès de vous je la referais sans hésiter (même avec le manuscrit, c'est pour dire).

Puis comme l'a si bien dit Jelle Dionot, qui au court de cette aventure est devenu mon mari, « au-delà des portes du LRS » je tiens à remercier le Directeur de l'école doctorale Christian Bonhomme pour sa gentillesse, sa présence, les restos après les auditions des bourses doctorales, de même que mes collègues doctorants représentants de l'ED, avec qui j'ai passé de superbes moments. Un grand merci à Catherine Boudeau la secrétaire de l'école doctorale, Arnaud Boissière de la DGRTT de Jussieu lors de mes missions valorisation, ainsi que Fabienne Lauvray et Héloïse Boulet.

Puis en s'avancant hors des portes de Jussieu je remercie vivement Stéphane Ledoux pour son soutien et son aide, notamment en ce qui concerne la chimie organique. Ce n'était pas une mince affaire je te l'accorde et bien qu'« illettrée en la matière », comme tu le dirais si bien, tu as toujours su m'apporter une épaule pour me plaindre, parler science ou même me traîner jusqu'à la bibliothèque pour regarder ensemble « un mécanisme » (grrrr, frisson). Et que seraient des remerciements sans citer les amis d'avant thèse. Du plus profond de mon petit corps je tiens à hurler ce MERCI à vous tous mes amis, qui me soutenez depuis maintenant quinze ans et ont toujours cru en moi. Merci de n'avoir jamais douté (même si je me serais bien passée des « ça va Nono on te connaît, tu chouines et après t'as 18 », croyez-moi, dure épreuve que de leur faire comprendre que ce travail n'a absolument rien à voir avec le partiel de mécanique des milieux continus). Quoiqu'il en soit une vague de remerciements pour avoir toujours répondu présents, merci les filles pour votre aide avec l'organisation du mariage au moment où je commençais à rédiger, cela m'aura appris une chose : après la thèse je peux toujours me reconvertir en décoratrice de mariage. Merci Claire et Vincent pour les moments « pause » qui font du bien, de même à Michel Tac. Une fois encore une mention spéciale à Elsa Neves et Mathilda

Mugnier de m'avoir accompagnée dans cette aventure qu'est : LES CHERCHEURS FONT LEUR CINEMA. Ce festival de vulgarisation scientifique a été le bonus de ces trois ans, en me faisant découvrir une autre parcelle de la science. Il faut bien le dire, sans vous les prix du public Ile-de-France et lors de la finale Nationale n'auraient jamais été gagnés. Les studios du Montparnasse en force les filles (mention spéciale à Madame PoilPoil qui a su charmer le jury) !

J'adresse enfin mes plus vifs remerciements à ma famille. Sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci papa pour ton soutien et ton réconfort, merci maman pour tes petits textos du matin et surtout d'être là. Je suis fière que tu puisses voir l'aboutissement de tout cela « mamounette ». Votre soutien a été essentiel dans cette aventure. Merci d'être vous et d'être mes parents, qui ne m'ont jamais lâchée, même quand j'étais pénible pendant la rédaction. Ma sœur chérie merci d'être toujours là, tu le sais ma little Hilly. Tu ne m'as jamais laissée baisser les bras et a toujours cru en moi, bien souvent plus que moi-même. Tu as assuré pendant un moment très difficile pour nous deux l'année dernière, ta venue sur Paris a été une joie immense et merci pour ces mange-mange à Jussieu entre midi et deux ! Je souhaiterais également remercier mes beaux parents qui m'ont toujours écoutée, poussée et qui m'ont ravitaillée dans les moments difficiles avec un petit Pommery et des gambas sauce hollandaise, un osso bucco ou un magique rougail saucisse ! Huum ! Enfin, je finirais en remerciant de tout mon cœur amoureux mon mari Jelle Dionot pour son soutien constant durant cette épreuve qu'a été la rédaction, mais également tout le long de ce parcours, pendant mes moments de doute (et Dieu sait qu'il y en a eu). Merci pour tes mots doux, mignons, les bons petits plats qui m'attendaient le soir pendant ces deux derniers mois et les verres de Pulco que tu m'apportais pendant que mon nez était pointé sur mon ordinateur. Tu ne m'as jamais lâchée et je ne peux que t'en remercier.

Donc **MERCI**¹⁰⁰⁰⁰⁰⁰ à toutes ces personnes pour m'avoir accompagnée durant ce voyage d'apprentissage et de découverte (dans les plus beaux jours ^^) !

Table des matières

Remerciements	v
Table des matières	ix
Liste des abréviations	xiii
Introduction générale	1
Références:.....	6
Chapitre I. Etude bibliographique - Définition d'une stratégie	9
1. Production de l'oxydant H ₂ O ₂	9
1.1. Procédé actuel de production industrielle de H ₂ O ₂	9
1.2. Procédés de production directe de H ₂ O ₂	10
1.3. Procédés de production <i>in-situ</i> de H ₂ O ₂ pour l'oxydation.....	15
2. Immobilisation d'enzymes.....	26
2.1. Les différentes méthodes d'immobilisation.....	26
2.2. Les différents supports utilisés pour l'immobilisation d'enzymes.....	43
3. Catalyse inorganique d'oxydation avec H ₂ O ₂	51
3.1. Quels catalyseurs d'oxydation avec H ₂ O ₂	51
3.2. Inconvénients liés à l'utilisation de H ₂ O ₂ comme oxydant.....	76
3.3. Preuve de concept : intérêt de l'ajout progressif de H ₂ O ₂ avec un catalyseur de type MCF-Ti.....	79
4. Associer un catalyseur titané avec la glucose oxydase en tandem : Stratégie de recherche.....	81
4.1. Nécessité d'un milieu hydro-organique.....	82
4.2. Quels supports pour l'insertion de Ti et la GOx ?.....	82
4.3. Incorporation de l'espèce catalytique Ti.....	82
4.4. Quel mode d'immobilisation pour l'enzyme ?.....	83
Références :.....	84
Chapitre II. Etude exploratoire en vue d'un catalyseur tandem	93
Introduction.....	93
1. Matériels & Méthodes.....	93
1.1. Synthèse des supports mésoporeux.....	93
1.2. Titanation du support MCF2.....	94
1.3. Silylation du support MCF2.....	94
1.4. Amination des surfaces.....	95
1.5. Caractérisations des supports mésoporeux.....	96
1.6. Immobilisation de la GOx.....	98
1.7. Mesure d'activité de la GOx.....	98

1.8.	Essais d'époxydation avec H ₂ O ₂ dans un milieu MeOH/aqueux	100
2.	Résultats & Discussions	102
2.1.	Caractérisation des supports mésoporeux.....	102
2.2.	Immobilisation de la GOx sur un matériau silicique.....	123
2.3.	Essais préliminaires d'époxydation du cyclooctène avec H ₂ O ₂ et MCF2-Ti : évaluation de l'intérêt de la silylation en milieux hydro-organiques à forte teneur en eau	133
3.	Conclusions.....	138
	Références :.....	141
Chapitre III. Couplage de la zéolithe TS-1 et de matériaux apparentés avec la GOx		143
	Introduction.....	143
1.	Matériels & Méthodes	144
1.1.	Synthèse de la zéolithe TS-1	144
1.2.	Modification de la zéolithe TS-1 par désilication	144
1.3.	Dépôt d'une couche de zéolithe TS-1 sur MCF-Ti	144
1.4.	Caractérisation des matériaux TS-1, TS-1-d et TS-1@MCF-Ti	145
1.5.	Tests d'oxydation.....	145
2.	Résultats et discussion	149
2.1.	Caractérisations des matériaux TS-1, TS-1-d et TS-1@MCF-Ti.....	149
2.2.	TS-1 : Epoxydation du cyclohexène par H ₂ O ₂	162
2.3.	Oxydations chimio-enzymatiques: couplage de la zéolithe TS-1 avec la GOx immobilisée sur MCF-NH ₂	166
2.4.	Oxydations chimio-enzymatiques : Vers un système catalytique plus intégré impliquant un support mésoporeux	178
3.	Conclusion	184
	Références :.....	187
Chapitre IV. Utilisation d'une porphyrine couplée à la production biocatalysée de H₂O₂		189
	Introduction.....	189
1.	Matériels & Méthodes	191
1.1.	Greffage covalent de la porphyrine sur MCF-NH ₂	191
1.2.	Caractérisation du greffage covalent de Mn-TCPP sur MCF-NH ₂	192
1.3.	Tests d'époxydation d'alcènes	192
2.	Résultats et discussion	195
2.1.	Caractérisation du matériau MCF-NH ₂ -Mn-TCPP.....	195
2.2.	Résultats des tests d'oxydation d'alcènes.....	197
3.	Conclusion	204
	Références :.....	206
Chapitre V. Vers une immobilisation alternative par reconstitution de la GOx		207

Introduction.....	207
1. Matériels & Méthodes	207
1.1. Préparation de l'apo-GOx.....	208
1.2. Greffage du FAD sur le support MCF-NH ₂ et caractérisation	208
1.3. Reconstitution de la GOx en solution et sur le support	210
2. Résultats et discussion	211
2.1. Préparation de l'apo-GOx par précipitation.....	211
2.2. Caractérisation du greffage du FAD sur les supports	212
2.3. Reconstitution de la GOx.....	217
3. Conclusion	220
Références :.....	222
Conclusion générale et perspectives.....	223
Annexes.....	227
Annexe 1. Courbes de Michaelis-Menten de la GOx en solution et immobilisée sur MCF-NH ₂ .	229
Annexe 2. Bilan matière pour le test d'époxydation du but-3-ène-2-ol dans MeOH/tampon acétate (v/v) (50 : 50) à 35°C avec un mélange mécanique TS-1 et MCF-NH ₂ -GOx.....	231
Annexe 3. Bilans matière des tests d'époxydation du cyclohexène dans MeOH/tampon acétate (v/v) (50 : 50) à 35°C avec un mélange mécanique TS-1 et MCF-NH ₂ -GOx.....	233
Annexe 4. Mesure du potentiel zeta (PZC) du matériau SBA-15-NH ₂	237

Liste des abréviations

- ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acide)
- A.C : Agent de couplage
- APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane
- ATG : Analyse thermogravimétrique
- BdB: Broekhoff-de-Boer
- BET : Brunauer-Emmet-Teller
- BJH : Barrett, Joyner et Halenda
- CPG : Chromatographie en phase gaz
- CTMS : Chlorotriméthylsilane
- DRX : Diffraction des rayons X
- EDC : N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- FAD : Flavine adenine dinucleotide
- GA : Glutaraldéhyde
- GOx : Glucose oxydase
- HMDS : Hexaméthylsilazane
- HPLC : Chromatographie en phase liquide
- HRP : *horseradish peroxidase* ou peroxydase de Raifort
- K_M : Constante de Michaelis-Menten
- MCF : Mesocellular foam
- MCM : Mobil Composition of Matter
- MET : Microscopie électronique à transmission
- Mn-TCPP : Mn-5, 10, 15, 20-(tetrakis-4-carboxyphényl) porphyrine
- NHS : N-hydroxysuccinimide
- P123 : Pluronic 123 (poly(éthylène glycol)-poly(propylène glycol)-poly(éthylène glycol))
- PZC : Point of Zero Charge
- SBA-15 : Santa Barbara Amorphous No.15
- SDS : Dodécylsulfate de sodium
- TBHP : *tert*-butylhydroperoxyde
- TS-1 : Titanosilicalite-1
- XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure

XPS : X-ray photoelectron spectrometry

UV-RD : spectroscopie UV-vis en réflexion diffuse

Introduction générale

Depuis une vingtaine d'années, l'industrie chimique vise à développer une chimie plus respectueuse de l'environnement dans le but de réduire fortement la pollution générée par ce secteur d'activité. A cela s'ajoute la nécessaire transition des ressources, pour le moment essentiellement d'origine fossile mais en cours d'épuisement, vers d'autres renouvelables, telle que la biomasse à condition que celle-ci soit utilisée de manière responsable. Au début des années 90, l'Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis (EPA) a introduit pour la première fois le terme « chimie verte » [1]. Ce concept s'appuie sur 12 principes [2] dont la mise en œuvre repose sur la révision des procédés déjà mis au point et, surtout, le développement de procédés catalytiques nouveaux. Les catalyseurs peuvent intervenir pour remédier à la production de polluants en les dégradant, pour réduire les consommations énergétiques, en particulier, lors des étapes de séparation impliquées dans des procédés de synthèse multi-étapes, ou pour favoriser l'utilisation de nouveaux réactifs et/ou solvants largement disponibles mais intrinsèquement peu actifs. Ainsi, les chercheurs académiques et industriels, convergent-ils de plus en plus vers la mise au point de procédés à forte économie d'atomes [3] et minimisant le coût de recyclage ou d'élimination des déchets [1] [4].

Dans ce contexte, les procédés d'oxydation et, notamment les réactions d'époxydation, font partie des procédés qui sont amenés à être revus, en particulier du point de vue de l'économie des atomes [5]. Ces réactions (Figure 1) impliquent le plus souvent des peracides seuls [6-8], (acides métachloroperbenzoïque (mCPBA) et peracétique) ou bien des hydroperoxydes (*tert*-butylhydroperoxyde (TBHP) par exemple) activés par des catalyseurs avec, dans ce dernier cas, des possibilités de synthèse asymétrique (procédé Sharpless)¹ [9].

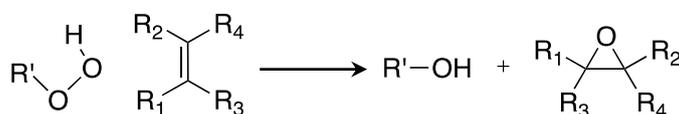


Figure 1. Principe de l'époxydation d'alcènes

La faible économie d'atomes est liée au fait que les réactifs cités permettent le transfert d'un atome d'oxygène à l'alcène et conduisent à autant de moles de co-produit de haute masse molaire (acide carboxylique ou alcool) que de moles d'époxyde [6], générant ainsi beaucoup de déchets à éliminer à moins d'être recyclés. Cet enjeu est d'importance en raison du rôle clé joué par les époxydes dans la production de nombreux composés chimiques [6, 10] pour les industries des polymères, papetière, pharmaceutique, cosmétique [11]. A titre d'exemple, l'oxyde de propylène figure parmi les composés organiques les plus produits dans le monde avec 8 millions de tonnes/an en 2009 [10, 12].

Aujourd'hui, la moitié de l'oxyde de propylène est obtenue en solution via la chlorhydrine correspondante (procédé CHPO) (Figure 2A). Le propylène réagit avec Cl₂ en large excès d'eau et en présence de NaOH conduisant à 2 t de NaCl, polluant d'importants volumes d'eau (de l'ordre de 40 t par tonne de PO produit). Le co-produit majoritairement généré lors de ce procédé est le 1,2-dichloropropane (jusqu'à 10% en rendement, qui est soit vendu comme solvant ou incinéré avec les autres sous-produits chlorés organiques pour produire du HCl à partir des effluents gazeux), par tonne

¹ Cette réaction stéréo-sélective utilise l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (TBHP) associé au *tétra*-isopropylate de titane (Ti(OiPr)₄) comme catalyseur et au tartrate de diéthyle (DET) comme ligand chiral.

d'oxyde de propylène obtenue [6]. Une autre partie de l'oxyde de propylène provient du procédé PO/SM (Figure 2B) [6] employé par Lyondell, Repsol ou Ellba (Shell/BASF), utilisant l'hydroperoxyde d'éthylbenzène comme oxydant. Dans ce cas, la parade à la production de déchets consiste à déshydrater le 1-phényléthanol obtenu pour former du styrène (2,25 t pour une tonne de PO produite), un composé alors valorisable par polymérisation. L'inconvénient de ce type d'approche est plutôt d'ordre économique, la viabilité du procédé d'époxydation étant conditionnée au prix compétitif ou non du styrène ainsi produit. Dans la même idée, différents procédés catalytiques homogènes impliquant des hydroperoxydes d'alkyle, dont TBHP, et des formes solubles du molybdène ont été industrialisés avec l'idée de recycler le *tert*-butanol via la formation d'éther de *tert*-butyle et de méthyle (TBME). Malheureusement, ce composé qui était utilisé comme additif dans les carburants ne l'est plus aux Etats-Unis en raison de la mise en évidence de ses effets toxiques.

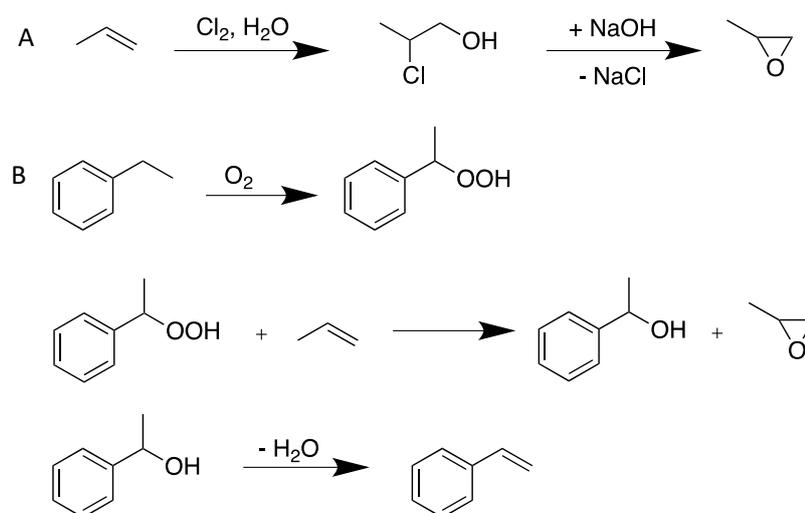


Figure 2. Production de PO par les procédés CHPO (A) et PO/SM (B) [6]

Les premiers catalyseurs hétérogènes, en fait des titanosilicates (Ti(IV)/SiO_2 [13]), utilisés pour l'époxydation en continu du propène par l'hydroperoxyde d'éthylbenzène en phase liquide, ont été mis au point par Shell dans les années 70 (Figure 3) et constituait la base du procédé commercial pour l'époxydation du propène avec de l'hydroperoxyde d'éthylbenzène. La catalyse hétérogène a pour objectif de faciliter la récupération puis la ré-utilisation des espèces catalytiquement actives. De plus, dans le cas présent, la dispersion des ions Ti(IV) au sein de la matrice silicique limite la propension du titane à former des espèces polynucléaires ainsi que le lessivage des espèces actives.

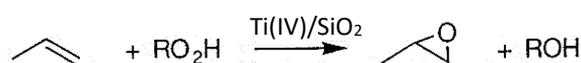


Figure 3. Procédé de production de PO développé par Shell

Au milieu des années 80, la découverte de la zéolithe TS-1 par les chercheurs d'Enichem [6] a ouvert la voie à une variété de réactions d'oxydation en phase liquide, notamment l'époxydation. La réactivité de cette zéolithe avec l'oxydant H_2O_2 (30% mass.), considéré comme vert par sa co-production d'eau, fait de ce matériau un catalyseur très attractif.

Avec 50% d'oxygène actif et l'eau comme sous-produit, l'oxydant idéal est le dioxygène. Seulement, pour transférer un de ses atomes d'oxygène au substrat, O_2 doit être convenablement activé sous peine de conduire à des réactions particulièrement lentes. Une élévation de la température

ou l'emploi de catalyseurs peuvent aider, mais il faut alors veiller à éviter des réactions incontrôlées de sur-oxydation [14] (voire la combustion du substrat) ou la désactivation de l'espèce active [15]. A ce jour, seul l'oxyde d'éthylène est obtenu industriellement par réaction de l'éthylène avec O_2 à haute température et en présence de catalyseurs hétérogènes à base d'argent [16]. Dans les mêmes conditions, le propylène et les alcènes supérieurs ont plutôt tendance à entrer en combustion. Le monde du vivant est riche d'exemples de biocatalyseurs de type monooxygénase aptes à activer O_2 , mais les systèmes bio-inspirés fonctionnant dans des conditions douces proposés par les chimistes à l'heure actuelle restent loin d'être compétitifs avec les procédés cités plus haut.

Aussi, une alternative intéressante, consiste à utiliser une forme pré-réduite de O_2 , à savoir le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , dont le produit de réduction est également l'eau et le taux d'oxygène actif est de 47%. De nombreux travaux décrivent son utilisation pour l'oxydation de substrats variés, tels que les alcools en composés carbonylés, les aldéhydes en acides carboxyliques, les oléfines en époxydes ou les composés sulfurés en sulfoxydes ou sulfones [17]. Le peroxyde d'hydrogène est une espèce métastable qui, si elle n'est pas activée correctement, tend à donner de l'eau et du dioxygène par dismutation. Tout l'enjeu de l'utilisation de H_2O_2 repose donc sur une activation adaptée, d'une part au transfert de l'oxygène actif vers le substrat plutôt que vers une autre molécule de H_2O_2 et, d'autre part, à la genèse d'espèces actives sélectives excluant en particulier la formation de radicaux hydroxyle, $HO\cdot$. L'activation de H_2O_2 peut se faire par interaction i) avec un acide carboxylique et formation d'acide percarboxylique [10] via une catalyse homogène basique mais avec les mêmes inconvénients liés à la co-génération d'acide ; ou le plus souvent ii) avec un catalyseur métallique et formation d'une espèce hydroperoxo ou oxo, ces deux entités (métalliques ou percarboxyliques) étant plus aptes que H_2O_2 à transférer sélectivement un atome d'oxygène au substrat. La seconde approche mise en œuvre initialement par Sheldon [18] avec des métaux de transition d^0 a été étendue depuis à bien d'autres métaux utilisés dans des conditions de catalyse soit homogène, soit hétérogène voire les deux [13, 19-21]. La littérature référence une variété d'alcènes ainsi époxydés tels que les molécules linéaires (propylène [22, 23], 1-octène [24, 25], 1-hexène [26]), les molécules à double liaison endocyclique (cyclooctène [25, 27, 28], cyclohexène [25-34], terpènes [24, 35-37]), exocyclique (styrène [27, 28, 38-41]) ou activée (géraniol [27, 42, 43], alcool allylique [32, 44-46]). Permettant à la fois une séparation plus simple des produits et la ré-utilisation des phases actives, l'immobilisation de ces dernières sur support solide est privilégiée, mais de tels matériaux doivent faire l'objet d'une attention particulière eut égard aux possibilités de lessivage liées à l'importante nucléophilie de H_2O_2 et à l'emploi de solvants polaires. Dans ce contexte, les catalyseurs à base de titane, notamment la zéolithe TS-1 et des matériaux apparentés, semblent avoir démontré une certaine supériorité qui se traduit actuellement par leur utilisation à grande échelle pour l'oxydation de petites molécules, en particulier par la société ENI VERSALIS [47]. L'époxydation généralisée des alcènes, quelle que soit leur dimension, par des systèmes H_2O_2 /catalyseur à base de Ti semble être une excellente alternative aux peracides ou hydroperoxydes d'alkyle employés actuellement. Cependant le choix du support idéal pour les espèces actives reste un défi important, même s'il a fait l'objet de très nombreuses études en marge de l'élaboration de nouveaux matériaux mésoporeux [48, 49].

Le peroxyde d'hydrogène, commercialisé sous forme de solution aqueuse relativement diluée en raison de sa dangerosité lorsqu'il est trop concentré, est un composé jugé sensible lors de son transport et son stockage [11]. Aussi, une tendance actuelle chez les producteurs et utilisateurs de H_2O_2 consiste à mettre en place sur le même site des unités mixtes de production et utilisation, parmi lesquels le procédé HP-PO permettant la production d'oxyde de propylène [50]. De là, à produire le

peroxyde d'hydrogène *in-situ*, il ne reste qu'un pas à franchir. Certains, parmi lesquels Haruta et *al.* [51], ont déjà proposé de générer H_2O_2 à partir de H_2 et O_2 et d'utiliser l'oxydant ainsi formé pour époxyder du propylène en présence d'un catalyseur bi-fonctionnel doté à la fois de nanoparticules d'or et d'espèces isolées du titane(IV). Cependant l'efficacité d'un tel système reste faible. Le procédé « alkylanthraquinone » mis en œuvre pour produire la majorité du H_2O_2 dans le monde (3 millions de tonnes en 2012 [11]) ne satisfait pas pleinement aux critères d'éco-compatibilité. C'est en effet un procédé sur la « sellette » du fait de l'importante quantité de déchets organiques co-produits, lesquels sont souvent passés sous silence quand H_2O_2 est mis en avant comme oxydant « vert ». Plusieurs alternatives pour la production de H_2O_2 sont en cours d'étude, impliquant le dioxygène, de nouveaux catalyseurs et le dihydrogène, ou bien des réducteurs moins dangereux à manipuler [52].

La stratégie développée dans ces travaux de thèse propose de produire H_2O_2 de manière bio-catalysée grâce à l'intervention d'une enzyme, la glucose oxydase (GOx) et de coupler cette dernière à un catalyseur d'époxydation à base de titane (IV). La production progressive du peroxyde d'hydrogène dans le milieu devrait permettre de réduire sa concentration et donc d'atténuer la part de H_2O_2 perdue sinon par dismutation. L'objectif ultime consiste à immobiliser sur un même support silicique le catalyseur inorganique et le bio-catalyseur afin de stabiliser ce dernier et faciliter la réutilisation de l'ensemble, la plus ou moins grande proximité des deux espèces actives pouvant être mise à profit pour des questions d'efficacité. Cependant, contrairement aux réactions d'oxydation avec Ti(IV), qui s'effectuent généralement à des températures supérieures à 50°C et en milieu organique, la GOx travaille dans des conditions douces (milieux aqueux, faibles températures, valeurs de pH proches de la neutralité). Ainsi, un enjeu important de ce travail sera de déterminer dans quelles conditions de compromis il pourra être raisonnable de faire travailler le système catalytique hétérogène chimio-enzymatique résultant, pour réaliser l'époxydation des alcènes par O_2 avec la médiation de H_2O_2 .

Le premier chapitre de ce manuscrit présente une étude bibliographique, permettant d'orienter notre étude. Celle-ci expose les possibilités de bio-production de H_2O_2 par la glucose oxydase et renseigne sur les particularités de cette enzyme. Puis, les différentes voies de son immobilisation sur des supports variés seront également discutées. Dans un second temps, la catalyse inorganique avec H_2O_2 sera abordée et plus particulièrement en utilisant Ti comme espèce active, notamment en catalyse hétérogène. Les inconvénients liés à l'utilisation de H_2O_2 seront évoqués, justifiant l'utilisation de la GOx. La stratégie de recherche mise en place à partir de ces informations sera ainsi exposée, notamment en ce qui concerne le milieu réactionnel, le choix du support, la méthode d'immobilisation de l'enzyme et d'incorporation de l'espèce active Ti.

Le chapitre II aborde dans un premier temps la synthèse de différents supports siliciques mésoporeux, candidats pour l'introduction couplée de Ti et de la GOx. La caractérisation de l'espèce Ti sera ensuite présentée, de même que les modifications de surface permettant à la fois d'améliorer les performances catalytiques (silylation) et le greffage de l'enzyme (fonctionnalisation à l'aide de groupements $-NH_2$). L'immobilisation de l'enzyme sera largement étudiée afin d'établir les conditions adéquates de greffage covalent et d'utilisation de la GOx, dans un environnement compatible avec la réaction d'oxydation avec Ti. Des premiers tests d'oxydation seront effectués afin d'évaluer le catalyseur synthétisé, ainsi que la faisabilité de la réaction en milieux hydro-organiques.

L'utilisation d'un catalyseur plus hydrophobe (la zéolithe TS-1) sera envisagée Chapitre III, pour contrer les effets néfastes de l'eau sur l'activité catalytique. Plusieurs modifications du catalyseur seront considérées afin de créer de la mésoporosité, permettant la localisation de l'enzyme dans le

matériau. L'évaluation des performances catalytiques de ces matériaux dans différents milieux renseignera sur leur activité. Puis, un système chimioenzymatique constitué d'un mélange mécanique de TS-1 et GOx immobilisée sera étudié, en faisant varier les conditions d'oxydation (milieu réactionnel, température, concentration de glucose) selon la nature du substrat (hydro-soluble/organo-soluble). Différents catalyseurs titanés synthétisés seront donc évalués pour différents substrats et le catalyseur tandem sur un support commun sera testé.

Le Chapitre IV présentera quelques résultats préliminaires sur l'utilisation d'un catalyseur au manganèse, associé à H_2O_2 : la porphyrine Mn-TCPP. L'activité catalytique en homogène d'un mélange porphyrine/GOx sera d'abord évaluée. Il s'agira ensuite de rendre le système hétérogène en procédant par étape, à savoir en immobilisant l'une ou l'autre des espèces catalytiques pendant que la seconde sera en solution. L'effet du support sur la réaction couplée sera alors observé.

Enfin le Chapitre V présentera une méthode d'immobilisation de la GOx originale qui consiste dans un premier temps à séparer la partie protéique de la GOx de son cofacteur, la flavine adénine dinucléotide (FAD), de greffer ce dernier sur le support silicique via une liaison amide et de reconstituer la protéine autour du FAD. L'enjeu sera de réussir à greffer efficacement le FAD et de reconstituer l'enzyme sous sa forme active.

Références:

- [1] R.A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 1437-1451.
- [2] S.L.Y. Tang, R.L. Smith, M. Poliakoff, *Green Chem.* 7 (2005) 761-762.
- [3] B.M. Trost, *Science* 254 (1991) 1471-1477.
- [4] R.A. Sheldon, *C. R. Acad. Sci. Paris, Serie IIc* 3 (2000) 541-551.
- [5] H.J. Milner, A. Armstrong, in: P.I. Dalko (Ed.), *Comprehensive Enantioselective Organocatalysis: Catalysts, Reactions, and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013, pp. 523-545.
- [6] F. Cavani, J.H. Teles, *ChemSusChem* 2 (2009) 508-534.
- [7] B. Plesnicar, in: W.S. Trahanovsky (Ed.), *Oxidation in Organic Chemistry, Part C, Organic Chemistry*, Academic Press, New York, 1978, pp. 211-294.
- [8] D. Swern, in: J.W. Sons (Ed.), *Organic Reactions*, New York, 1953, pp. 378-433.
- [9] K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (12) (2002) 2024-2032.
- [10] G. Sienel, R. Rieth, K.T. Rowbottom, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000, pp. 629-644.
- [11] M. Kazmierczak, P. Vicot, 12/11/2014, Note relative au peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse (Direction des Risques Accidentels INERIS), En ligne, <http://www.ineris.fr/centredoc/141624--dra-82-2014-peroxyde-hydrogene-repro-1429781018.pdf>, Consulté le 28/06/2016.
- [12] R. Landau, G.A. Sullivan, D. Brown, *Chem. Tech.* 9 (1979) 602-607.
- [13] I.W.C.E. Atends, R.A. Sheldon, *Appl. Catal., A* 212 (2001) 175-187.
- [14] P. Fordham, M. Besson, P. Gallezot, *Catal. Lett.* 46 (1997) 195-199.
- [15] M. Besson, P. Gallezot, *Catal. Today* 81 (2003) 547-559.
- [16] Z. Nawaz, *Chem. Eng. Technol.* (2016).
- [17] R. Noyori, M. Aoki, K. Sato, *Chem. Commun.* (2003) 1977-1986.
- [18] R.A. Sheldon, *Bull. Soc. Chim. Belg.* 94 (1985) 651-670.
- [19] G. Grigoropoulou, J.H. Clark, J.A. Elings, *Green Chem.* 5 (2003) 1-7.
- [20] R.A. Sheldon, *Catal. Today* 57 (2000) 157-166.
- [21] C. Wang, H. Yamamoto, *Chem. Asian. J.* 10 (2015) 2056-2068.
- [22] A. Prieto, M. Palomino, U. Díaz, A. Corma, *Catal. Today* 227 (2014) 87-95.
- [23] X. Zuwei, Z. Ning, S. Yu, L. Kunlan, *Science (New York, N.Y.)* 292 (2001) 1139-1141.
- [24] J.C. Van der Waal, M.S. Rigutto¹, V.B. H., *Appl. Catal., A* 167 (1998) 331-342.
- [25] M. Cohen, R. Neumann, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 146 (1999) 291-298.
- [26] M.A.C. A. Corma, P. Esteve, A. Martínez, J. Pérez-Pariente, *J. Catal.* 145 (1994) 151-158.
- [27] T.A.G. Duarte, I.C.M.S. Santos, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, A.M.V. Cavaleiro, J.A.S. Cavaleiro, *Catal. Lett.* 144 (2013) 104-111.
- [28] B.F. Sels, D.E. De Vos, P.A. Jacobs, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 8350-8359.
- [29] N. O'Callaghan, J.A. Sullivan, *Appl. Catal., B* 146 (2014) 258-266.
- [30] A. Hagen, K. Schueler, F. Roessner, *Microporous Mesoporous Mater.* 51 (2002) 23-33.
- [31] S. Kwon, N.M. Schweitzer, S. Park, P.C. Stair, R.Q. Snurr, *J. Catal.* 326 (2015) 107-115.
- [32] M.G. Clerici, P. Ingallina, *J. Catal.* 140 (1993) 71-83.
- [33] D.A.R. Richard L. Brutchey, Lars K. Andersen, and, T.D. Tilley, *Langmuir* 21 (2005) 9576-9583.
- [34] V. Sazo, C.M. López, M. De Quesada, J.M. Vieira, *Catal. Today* 172 (2011) 8-12.
- [35] M. Bosing, A. Noh, I. Loose, B. Krebs, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 7252-7259.
- [36] F.C. Skrobot, A.A. Valente, G. Neves, I. Rosa, J. Rocha, J.A.S. Cavaleiro, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 201 (2003) 211-222.
- [37] R.R.L. Martins, M.G.P.M.S. Neves, A.J.D. Silvestre, M.M.Q. Simões, A.M.S. Silva, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, P. Tagliatesta, C. Crestini, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 172 (2001) 33-42.
- [38] A. Ramanathan, R. Maheswari, B. Subramaniam, *Top. Catal.* 58 (2015) 314-324.
- [39] E. Poli, R. De Sousa, F. Jérôme, Y. Pouilloux, J.-M. Clacens, *Catal. Sci. Technol.* 2 (2012) 910-914.
- [40] J. Wang, J. Lu, J. Yang, R. Chen, Y. Zhang, D. Yin, J. Wang, *Appl. Surf. Sci.* 283 (2013) 794-801.

- [41] J. Huang, C. Liu, D. Sun, Y. Hong, M. Du, T. Odoom-Wubah, W. Fang, Q. Li, *Chem. Eng. J.* 235 (2014) 215-223.
- [42] N. Marin-Astorga, J.J. Martinez, G. Borda, J. Cubillos, D.N. Suarez, H. Rojas, *Top. Catal.* 55 (2012) 620-624.
- [43] R. Kumar, G.C.G. Pais, B. Pandey, P. Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1995) 1315-1316.
- [44] P.N.R. Vennestrøm, C.H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt, J.M. Woodley, *ChemCatChem* 2 (2010) 249-258.
- [45] A. Wroblewska, A. Fajdek, J. Wajzberg, E. Milchert, *J. Hazard. Mater.* 170 (2009) 405-410.
- [46] A. Wróblewska, E. Makuch, E. Sokalska, M. Malko, *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* 113 (2014) 519-542.
- [47] E. Versalis, 18/02/2016, Proprietary Catalysts, En ligne, <https://www.versalis.eni.com/irj/portal/anonymous?standAlone=true&sapDocumentRenderingMode=EmulateIE8&windowId=WID1471871325606&NavMode=0>, Consulté le 20/05/2016.
- [48] Y. Wan, D. Zhao, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2821-2860.
- [49] Z. Alothman, *Materials* 5 (2012) 2874-2902.
- [50] chemicals-technology.com, 2016, BASF/Dow/Solvay HPPO Plant, En ligne, <http://www.chemicals-technology.com/projects/basf-hppo/>, Consulté le 22/06/2016.
- [51] T. Hayashi, K. Tanaka, M. Haruta, *J. Catal.* 178 (1998) 566-575.
- [52] C.a.E. News, 19/04/2016, Spark from pressure gauge caused University of Hawaii explosion, En ligne, fire department says, <http://cen.acs.org/articles/94/web/2016/04/Spark-pressure-gauge-caused-University.html>, Consulté le 22/08/2016.

Chapitre I. Etude bibliographique – Définition d’une stratégie

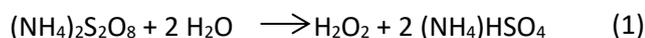
Dans le contexte de la chimie verte, l’industrie chimique est à la recherche de systèmes durables, en particulier dans le cas des réactions d’oxydation. Une stratégie à l’égard de processus écologiques innovants impliquerait la généralisation des transformations catalytiques en utilisant l’oxygène moléculaire de l’air comme oxydant [1]. Cependant O_2 présente une faible réactivité cinétique et les processus correspondants sont, à des taux élevés de conversion, souvent non-sélectifs [2]. Une solution pratique réside dans la formation *in-situ* de H_2O_2 à partir de O_2 , conduisant à H_2O comme sous-produit. Cet oxydant est connu pour être plus facilement activé que O_2 par des catalyseurs métalliques et bien que sa génération est possible via des systèmes catalytiques inorganiques, une façon efficace de produire H_2O_2 à partir de O_2 repose sur les enzymes oxydases et en particulier la glucose oxydase (GOx).

Dans un premier temps, le chapitre bibliographique vise à présenter la méthode actuelle de production industrielle de H_2O_2 et à examiner les alternatives telles que la production directe par O_2 et H_2 ou *in-situ*, grâce à la catalyse inorganique ou enzymatique. L’hétérogénéisation de ce dernier système constituera la seconde partie de ce chapitre, avec une analyse portant sur l’immobilisation d’enzymes. Puis, un accent sera mis sur la catalyse inorganique d’oxydation avec H_2O_2 , en donnant un rapide aperçu de systèmes homogènes, puis en se focalisant sur la catalyse hétérogène et plus particulièrement à base de titane. Enfin, la présentation des inconvénients liés à l’utilisation de H_2O_2 mèneront à la stratégie de recherche établie lors de cette étude.

1. Production de l’oxydant H_2O_2

1.1. Procédé actuel de production industrielle de H_2O_2

Historiquement, le peroxyde d’hydrogène était préparé par hydrolyse du peroxodisulfate $S_2O_8^{2-}$ (1):



Actuellement, le procédé de Riedl-Pfleiderer [3], élaboré en 1936, connu sous le nom de procédé (AO) d’auto-oxydation d’antraquinones, est le procédé le plus utilisé pour la production industrielle de H_2O_2 . Il est basé sur l’oxydation du 2-éthyl-9,10-dihydroxyanthracène en anthraquinone, couplée à la réduction du dioxygène en peroxyde d’hydrogène (Figure 4). Ces réactions s’effectuent en phase organique, dans un solvant ou un mélange de solvants non miscibles dans l’eau. La concentration en H_2O_2 peut atteindre 47% en masse. Le peroxyde d’hydrogène ainsi formé est ensuite extrait en phase aqueuse, puis la solution est concentrée par distillation pour atteindre en général 70% en masse. La régénération de la 2-éthylantraquinone se fait par hydrogénation via un catalyseur pour former l’hydroquinone correspondante. Le Nickel de Raney était initialement utilisé, mais actuellement ce sont des catalyseurs à base de palladium que l’on retrouve dans ces procédés.

La catalyse pour la régénération de la quinone constitue l’étape critique du procédé. Les fournisseurs de H_2O_2 (Azko Nobel et Eka Chemicals) développent de nouvelles technologies et ont mis au point des catalyseurs à base de monolithes, permettant d’accéder à de hautes sélectivités et productivités [4].

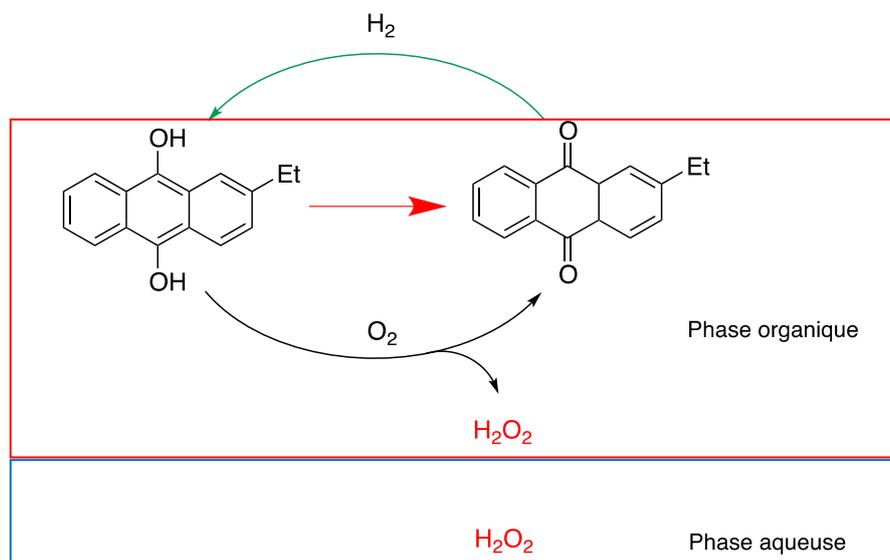


Figure 4. Réaction d'auto-oxydation d'anthraquinone pour la production de H_2O_2

Cette méthode de production de H_2O_2 (AO) est utilisée industriellement dans le procédé d’oxydation du propylène avec H_2O_2 aqueux (appelé HPPO), pour former l’oxyde de propylène (PO) mis au point par BASF/Dow et Degussa-Evonik/Headwaters [5]. Les unités de production sont composées de deux unités connectées : l’une pour la production de H_2O_2 et l’autre pour l’étape d’époxydation qui a lieu dans un réacteur à lit fixe contenant un catalyseur titané (la titanosilicalite : TS-1). Le rendement d’un tel procédé est estimé à 95%. La production de H_2O_2 est ainsi complètement intégrée à l’usine. Des variantes à ce procédé, qui remplacent la dihydroxyanthraquinone par l’isopropanol, ont également été mises au point, générant *in-situ* H_2O_2 par combinaison directe de H_2 et O_2 .

L’usine de BASF/Dow, ouverte en 2008 et située à Antwerp (Belgique), présente une capacité de production de 300 000 t de PO par an [1]. L’intégration des deux unités (H_2O_2 et PO), diminue les frais de production et supprime ceux de transport de H_2O_2 , tout en limitant l’impact environnemental du procédé (diminution de l’empreinte carbone, des infrastructures, énergies). Grâce à cette technologie, BASF/Dow a reçu en 2010 le *Presidential Green Chemistry Challenge Award* décerné par l’Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis [6].

Il est cependant à noter que le procédé Riedl-Pfleiderer présente certains inconvénients : outre la complexité de mise en œuvre de l’étape d’hydrogénation, il génère des goudrons non valorisables issus de la dégradation de l’anthraquinone en hydroanthrahydroquinones, oxanthrones et anthrones [7]. Ainsi, l’organo-catalyseur à base d’anthraquinone doit être renouvelé régulièrement et les « goudrons » détruits. Enfin, ce procédé est économiquement viable uniquement à grande échelle, ce qui nécessite un investissement important pour sa mise en place.

1.2. Procédés de production directe de H_2O_2

L’une des alternatives au procédé AO permettant d’évoluer vers une production de H_2O_2 plus verte, afin que son utilisation en tant qu’oxydant éco-compatible ait un réel sens, serait la synthèse

directe de H_2O_2 à partir de H_2 et O_2 . La photocatalyse [8] (qui ne sera pas développée ici) ou la catalyse métallique conventionnelle ont ainsi été étudiées dans ce but.

Dans un premier temps, les études se sont tournées vers les catalyseurs à base de palladium (ou même de platine), comme en témoigne un certain nombre de brevets déposés dès 1914 [9-21]. Dès lors, des travaux ont été menés aussi bien sur du Pd dispersé sous forme colloïdale par Dhammike et *al.* [22, 23] (PdCl_2 ou Pd/gel de silice comme source de Pd), que supporté par différentes matrices (Al_2O_3 , ZrO_2 , CeO_2 , ThO_2 , Y_2O_3 , Ga_2O_3 , TiO_2 , SiO_2 , MgO , C) [24-29] au sein desquelles le Pd est généralement introduit par des méthodes d’imprégnation. La synthèse directe de H_2O_2 à partir de H_2/O_2 est donc un système tri-phasique impliquant un catalyseur solide, un mélange gazeux et un solvant, constitué d’acide sulfurique et de NaBr par exemple. Plus loin, il sera montré que la présence d’acide et d’ion Br^- évite la décomposition de H_2O_2 . L’introduction de CO_2 dans le solvant permet d’améliorer la solubilité de H_2 et O_2 mais également de modifier le pH, influençant les propriétés acido-basiques du support et donc la réactivité de la surface.

Cependant, les inconvénients liés à ces méthodes de production sont la génération directe de H_2O ainsi que l’hydrogénation et la décomposition de H_2O_2 , catalysées par le Pd lui-même [24, 30] (Voir Figure 5. ci-dessous).

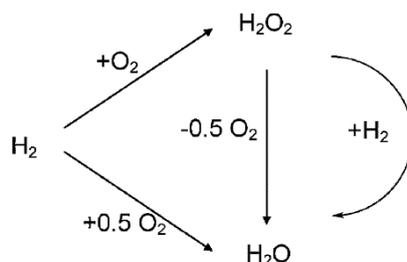


Figure 5. Réactions secondaires lors de la synthèse directe de H_2O_2 en présence de Pd

Ces réactions parasites sont les principales causes de pertes de sélectivité et de rendement en H_2O_2 . Afin de les réduire, Choudhary et *al.* [31] ont proposé d’incorporer des anions bromure dans le catalyseur Pd supporté sur Al_2O_3 (ici le palladium est sous forme métallique Pd^0), afin de modifier la structure électronique du Pd et donc son activité catalytique. D’autres ont suggéré que les anions halogénés venaient bloquer les sites catalytiques, empêchant ainsi le clivage homolytique de la liaison O-O de O_2 et H_2O_2 [29, 32]. Différentes espèces halogénées ont été testées [24, 33] (supports fluorés, chlorés) mais il semblerait que les ions bromure soient les plus prometteurs. Quelques années plus tard, Ntainjua et *al.* [25] ont étudié le rôle du support (ici Al_2O_3 , TiO_2 , MgO , C), afin de réduire ce genre de phénomènes. Ils ont ainsi observé que les supports dont les potentiels de charge nulle (PZC) sont les plus faibles (carbone et silice notamment) présentaient des taux de production de H_2O_2 les plus élevés, pour une activité de décomposition et d’hydrogénation les plus faibles. D’autre part, il a été montré que l’activité du catalyseur et sa sélectivité vis-à-vis de l’oxydation de H_2 en H_2O_2 [22-24, 33, 34] est meilleure en milieu acide, source supplémentaire de protons H^+ . De plus, les ions H^+ améliorent également l’adsorption des anions Br^- en diminuant le pH du milieu à une valeur inférieure au point isoélectrique du support et privilégiant l’adsorption des anions plutôt que leurs cations associés. Abate et *al.* [35] ont proposé les mécanismes possibles pour la formation de H_2O_2 présentés Figure 6.

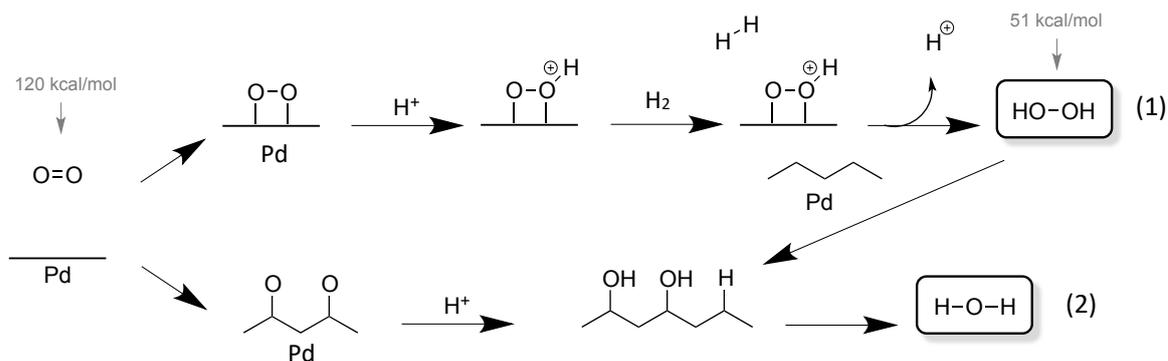


Figure 6. Chemins réactionnels possibles lors de la formation de H_2O_2 catalysée par Pd [35]

H_2O_2 est formé selon la voie 1 : O_2 est adsorbé sous forme moléculaire sur la surface de palladium. Il réagit ensuite avec H^+ (milieu acide) pour donner HOO^+ en surface. L'intermédiaire actif réagit avec H_2 pour former H_2O_2 régénérant ainsi H^+ pour un nouveau cycle. La voie 2 se produit sur les sites de Pd les plus énergétiques, tels que des défauts ou bords, se traduisant par la dissociation de O_2 chimisorbé, ainsi que de H_2O_2 ré-adsorbé après formation. Dans ce cas, l'ajout de Br^- permet de bloquer ces sites particuliers. Les travaux de Dissanayake et Lunsford [22] ont confirmé ce chemin en étudiant un mélange de deux isotopes d'oxygène ($^{16}\text{O}_2$ et $^{18}\text{O}_2$) afin de déterminer la possible dissociation et recombinaison d' O_2 lors de la réaction. Si dissociation il y a, l'espèce $\text{H}^{16}\text{O}^{18}\text{OH}$ devrait être majoritaire, or des analyses Raman ont montré que H_2O_2 est uniquement sous la forme $\text{H}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. Toutefois ce mécanisme semble valide uniquement pour les catalyseurs Pd sous forme dispersée, puisque Yates et *al.* [36] ont observé un comportement différent à environ -75°C pour une surface plane Pd (111). Dans ce cas, c'est la voie 2 qui est privilégiée et une adsorption dissociative de O_2 a lieu. Degushi et *al.* [28] ont ensuite présenté un mécanisme de réaction où l'espèce hydrido-hydroperoxyde ($\text{H}-\text{Pd}-\text{OOH}$) est l'intermédiaire clé pour la formation de H_2O_2 , la formation directe de H_2O et la décomposition de H_2O_2 .

Récemment, Abate et *al.* [27] ont proposé un modèle plus détaillé pour des catalyseurs Pd/N-CNT (nanotubes de carbone dopé N). Le modèle est basé sur deux hypothèses : (i) les sites actifs de Pd sont vus comme de petites « terrasses » couvertes de O_2 chimisorbé et possédant un nombre limité de sites de chimisorption de H_2 , et (ii) au cours de la réaction, le polyacétate de vinyle (PVA) utilisé pour la préparation du catalyseur (dispersion et stabilisation des nanoparticules) est dégradé, libérant ainsi des sites de Pd pour la chimisorption de H_2 . La quantité de H_2 chimisorbé disponible augmente, entraînant la formation parallèle de H_2O et l'hydrogénolyse de H_2O_2 . Pour des temps de contact plus longs, des agrégats de particules de Pd se forment, entraînant la diminution du nombre de sites disponibles et donc de la productivité.

Afin d'éviter le phénomène d'agglomération, Lee et *al.* [37] ont proposé d'encapsuler les nanoparticules de Pd dans des coquilles de SiO_2 . Ce type de catalyseurs a présenté des activités deux fois supérieures à celles des catalyseurs usuels Pd/ SiO_2 , obtenus par imprégnation. Cependant ceux-ci ont montré certaines limitations en termes d'accessibilité des gaz, amenant à la mise au point de structures creuses de Pd@vide@ ZrO_2 de type « *yolk-shell* » [38]. Ici le nano-cristal de Pd est encapsulé dans une coquille creuse d'oxyde, augmentant l'accessibilité du Pd aux réactants dans l'espace vide. De plus, des nano-cristaux de Pd encapsulés dans des coquilles d'oxydes plus acides tels que $\text{SiO}_2-\text{Al}_2\text{O}_3$ [34] ont également été développés et permettent de réduire l'ajout de protons, généralement utilisé pour améliorer la sélectivité.

La morphologie des cristaux de Pd (ou l'un de ces alliages) est un facteur clé de l'activité catalytique. Des calculs par DFT réalisés pour les faces Pd(111), Pd(100) et Pd(110) monocristallin ont démontré, qu'avec sa densité d'atomes la plus élevée, ainsi que l'énergie de liaison la plus faible, la face Pd(111) conduit à la sélectivité en H₂O₂ la plus élevée [39]. Ainsi, les interactions entre les espèces de surface contenant des liaisons O-O et la surface Pd(111) sont plus faibles et la barrière énergétique de dissociation de la liaison O-O, promouvant la formation d'eau, plus élevée.

L'un des désavantages de la synthèse directe de H₂O₂ est l'utilisation d'un mélange H₂/O₂ potentiellement explosif. Une solution possible est l'utilisation de membranes permettant de séparer H₂ et O₂ tout en servant de support au Pd. Des membranes tubulaires constituées d'alumine- α mésoporeuse, supportées sur de l'alumine- α microporeuse, avec ou sans revêtement de carbone, ont ainsi été étudiées [35]. Le palladium a été déposé par deux techniques d'imprégnation différentes conduisant soit à des particules soit à des cristallites, influençant alors l'activité catalytique. Le dépôt d'un film de Pd sur une membrane en alumine- α est une autre méthode possible conduisant à une importante augmentation de la sélectivité [30].

Plus récemment, les travaux portant sur la synthèse directe de H₂O₂ à partir de H₂ et O₂ utilisent largement les catalyseurs bimétalliques à base de Au-Pd [25, 40-44]. Le fait d'incorporer une petite quantité d'or semble modifier la structure électronique globale du catalyseur et donc améliorer son activité et sa sélectivité vis-à-vis de H₂O₂. L'avantage d'associer ces deux espèces est qu'il n'est plus nécessaire d'ajouter d'ions halogénures ou de travailler en milieu acide. Le coût de production en serait donc diminué, dans la mesure où il n'y a pas besoin de séparer ces espèces du produit final et les problèmes de corrosion associés à leur utilisation n'ont plus raison d'être, de même que ceux liés à l'environnement.

Comme dans le cas du palladium, plusieurs supports catalytiques ont ainsi été étudiés: TiO₂ [25, 40, 43], C [25, 40-42, 45], Al₂O₃ [25, 46], MgO [25] ou même CeO₂ [44]. De même que pour le Pd, il semblerait que le carbone (ou SiO₂) à faible point isoélectrique soit le support optimal [25]. La nature du support affecte à la fois la morphologie et la dispersion des nanoparticules de Au-Pd. Celles supportées sur TiO₂ ou Al₂O₃ par exemple, présentent une morphologie cœur-coquille (« *core-shell* ») avec un cœur riche en Au et un pourtour enrichi en Pd [40, 46], tandis que les catalyseurs supportés sur carbone présentent des nanoparticules formées d'un alliage homogène. Lorsque le catalyseur est préparé par imprégnation, il est possible de procéder à un prétraitement acide (HNO₃) du carbone, qui va activer le support et améliorer la nucléation des particules, favorisant la formation de particules de petites tailles (2-50 nm) [47]. Ceci améliore la dispersion de l'or dans les nanoparticules et la petite taille de ces dernières inhibe les sites favorables à la décomposition de H₂O₂. Des supports plus exotiques ont également été testés tels que des hétéropolyacides (Cs_{2,8}H_{0,2}PW₁₂O₄₀) [41], qui présentent même des propriétés catalytiques supérieures aux catalyseurs similaires à base de carbone, dont la productivité de H₂O₂ est de 198 mol.kg_{cat}⁻¹ h⁻¹ avec (2,5% Au/ 2,5% Pd/Cs_{2,8}H_{0,2}PW₁₂O₄₀) contre 160 mol.kg_{cat}⁻¹ h⁻¹ avec (2,5% Au/ 2,5% Pd/C (2% HNO₃)) en conditions standards². L'avantage de ces catalyseurs est leur utilisation à température ambiante, dans l'eau et avec un mélange 2% H₂/air.

En plus de l'effet du support, pour aller plus loin, il faut se pencher sur les méthodes de synthèse de ces catalyseurs bimétalliques, discutées rapidement un peu plus tôt. Les nanoparticules

² Conditions standards : 5% H₂/CO₂ (2,9 MPa) et 25% O₂/CO₂ (1,1 MPa), 8,5 g de solvant (5,6 g MeOH + 2,9 g H₂O) à 2°C

sont généralement intégrées sur leur support par des méthodes d'imprégnation qui vont avoir une influence sur la structure et donc l'activité du catalyseur. Cette façon de faire permet d'obtenir aussi bien des alliages, que des structures « cœur-coquille ». Pritchard *et al.* [40] ont mené une étude sur l'influence de la méthode de préparation de catalyseurs Au-Pd supportés sur TiO₂ et C. Ils ont mis en avant le fait que la taille et la distribution des particules varient significativement suivant la présence ou non d'eau dans le mélange d'imprégnation avant l'étape de séchage. Dans la méthode classique utilisée par les auteurs, 75% de l'eau présente dans le mélange d'imprégnation est d'abord retirée à 80°C pour obtenir une pâte épaisse qui est séchée et calcinée. Dans le cas de TiO₂, l'imprégnation du catalyseur en absence d'eau avant l'étape de séchage, conduit à une distribution bimodale des nanoparticules de Au et Pd (1-8 nm et 20-200 nm). Les plus grosses particules présentent une morphologie « cœur-coquille » avec un cœur enrichi en or et une coquille riche en Pd. Les plus petites particules quant à elles sont constituées d'un alliage Au-Pd avec une fraction importante de Pd. La présence de petites particules d'alliage rappelle les catalyseurs sur carbone et tend à diminuer les réactions d'hydrogénation et de décomposition de H₂O₂, et la productivité de H₂O₂ obtenue est de 64 mol.g_{cat}⁻¹.h⁻¹. Les catalyseurs préparés en présence d'eau avant le séchage du solide présentent quant à eux une distribution bimodale pour laquelle les particules plus grandes (20-80 nm) contiennent uniquement de l'or et les plus petites (1-10 nm) uniquement du palladium, tandis qu'aucune trace d'alliage n'est détectée. Cependant cette méthode permet d'obtenir une productivité de H₂O₂ de 89 mol.g_{cat}⁻¹.h⁻¹, malgré l'absence d'alliage ou de structure combinée. Cela est uniquement dû à une meilleure dispersion de Pd, comparé à un catalyseur Pd/TiO₂ obtenu par une méthode d'imprégnation classique sans ajout d'eau, qui présente une productivité de 30 mol H₂O₂.g_{cat}⁻¹.h⁻¹. Concernant les supports carbonés, la présence d'eau ou non n'a aucun effet sur l'activité du catalyseur du fait de l'adsorption très rapide de Au et Pd sur la surface active du carbone et sa facilité à former un alliage. Pour ces supports, il a été montré que les particules de petite taille augmentaient la réactivité du catalyseur vis-à-vis de la production de H₂O₂ (120 mol H₂O₂.g_{cat}⁻¹.h⁻¹). Cependant, la méthode de co-imprégnation utilisée pour obtenir ces très petites particules, mène à une faible densité de celles-ci. L'utilisation de nanoparticules colloïdales permettrait de s'affranchir de ce problème. Celles-ci sont alors immobilisées sur la matrice par une méthode de « sol-immobilisation » qui consiste à mettre en contact pendant 2 h une suspension colloïdale de Au-Pd (+PVA et NaBH₄) avec le solide, puis de filtrer et sécher celui-ci à 120°C pendant 16 h. Une autre méthode de synthèse évoquée est l'échange d'ions au niveau des supports hétéropolyacides de type (Pd_{0,10}Au_{0,0333}CS_{2,5}H_{0,2}PW₁₂O₄₀) en substituant une partie des Pd par Au [41].

Enfin, la mise en œuvre du catalyseur au sein de réacteurs a également son importance. Paunovi *et al.* [48] ont utilisé récemment un dispositif micro-fluidique permettant de travailler avec un mélange H₂/O₂ de manière plus sécurisée à des pressions importantes [49], favorisant la conversion de H₂O₂. Pour se faire, après dépôt d'une couche de silice sur la surface des micro-canaux, des nanoparticules bimétalliques Au-Pd ont été introduites via la méthode d'imprégnation.

Pour conclure, même si l'approche consistant à produire H₂O₂ *in-situ* pour l'époxydation est la plus intéressante d'un point de vue investissements ou sécurité, celle-ci s'avère compliquée avec les systèmes cités à l'instant. En effet, la production de H₂O₂ s'effectue classiquement à basse température (2°C), en présence d'une forte acidité de Brønsted (co-catalyseur si uniquement Pd est utilisé), de même que d'ions halogénure (empoisonnement sélectif). La réaction d'époxydation requiert des températures sub-ambiantes et la présence d'acides forts peut conduire à la formation de produits secondaires de l'époxyde, tout comme les ions bromure peuvent être oxydés en sous-produits bromés.

Dans le cas de l'époxydation du propylène une approche quasi *in-situ*, étudiée par Evonik/Headwaters, consiste à générer l'oxydant H_2O_2 dans le solvant utilisé lors de l'époxydation (MeOH), mais dans une unité de production séparée de cette dernière étape. Dans ce cas la sélectivité en H_2O_2 atteinte s'élève à 75%, ce qui est non négligeable mais toujours plus faible que le procédé conventionnel d'antraquinone [1]. Néanmoins, plusieurs problèmes persistent, tels que la réaction de H_2 avec O_2 en présence d'un solvant inflammable (MeOH), l'élimination de l'acide et des ions bromure (si uniquement Pd est utilisé) avant que la solution produite soit utilisée pour l'époxydation et le recyclage du solvant. En effet, après que la solution de H_2O_2 produite ait été utilisée pour l'époxydation, le méthanol doit être séparé et recyclé. La dismutation du peroxyde d'hydrogène est également un problème majeur nécessitant l'utilisation de quantités importantes d'oxydant dans le milieu réactionnel afin de pallier cette perte, ce qui favorise le lessivage de l'espèce catalytique. La production *in-situ* de cet oxydant, associée à un catalyseur d'époxydation efficace limitant la concentration instantanée en H_2O_2 , semble être le meilleur compromis.

1.3. Procédés de production *in-situ* de H_2O_2 pour l'oxydation

Plusieurs travaux ont montré que l'introduction progressive de H_2O_2 lors d'une réaction améliorerait son rendement, en diminuant les phénomènes de dismutation de H_2O_2 et le lessivage de l'espèce catalytique (voir 4.2. et 4.3. de ce même chapitre). La production *in-situ* de H_2O_2 couplée avec une réaction d'oxydation permettrait donc d'éviter ces inconvénients, mais également le problème de stockage de H_2O_2 et son acheminement à l'unité d'oxydation. L'oxydant serait donc utilisé directement, sans aucune étape de purification et/ou séparation. Cette stratégie de synthèse en « *one-pot* » a déjà été explorée depuis les années 90 [50], mettant en œuvre soit des catalyseurs inorganiques, soit un procédé enzymatique utilisant le glucose.

1.3.1. Par catalyse inorganique

Une des réactions d'oxydation pour laquelle la production de H_2O_2 en tandem est la plus étudiée est l'époxydation du propylène. Cet alcène est intéressant puisqu'il permet d'obtenir l'oxyde de propylène utilisé lors de la production du propylène glycol et de polyéthers de polyols lesquels interviennent dans la synthèse de polyuréthanes [51].

La plupart des études effectuées concernant la production tandem de H_2O_2 utilisent des catalyseurs composés de nanoparticules de Pd, Pt mais surtout de Au, dispersées sur un support titané [52-58]. En présence de O_2 et H_2 (réaction en phase liquide ou gazeux), les nanoparticules permettent la production de H_2O_2 , ensuite utilisé lors de l'étape d'époxydation de l'alcène qui se produit sur les sites de titane après la formation d'espèces hydroperoxo [59]. L'étape de formation du peroxyde d'hydrogène est l'étape limitante du point de vue cinétique dans cette succession de réactions. Il a d'autre part été mis en évidence que l'or interfère dans l'étape d'époxydation sur titane car, selon le modèle proposé par Nijhuis [60], l'or catalyse la rupture de la liaison O-O des Ti-OOH formés puis la formation, à partir de l'alcène, d'espèces propoxy bidentes [61]. Cette étape, cinétiquement très rapide, conduit soit à la formation d'époxyde, soit à la désactivation du catalyseur par formation de carboxylates dont la désorption du support est très lente (Figure 7).

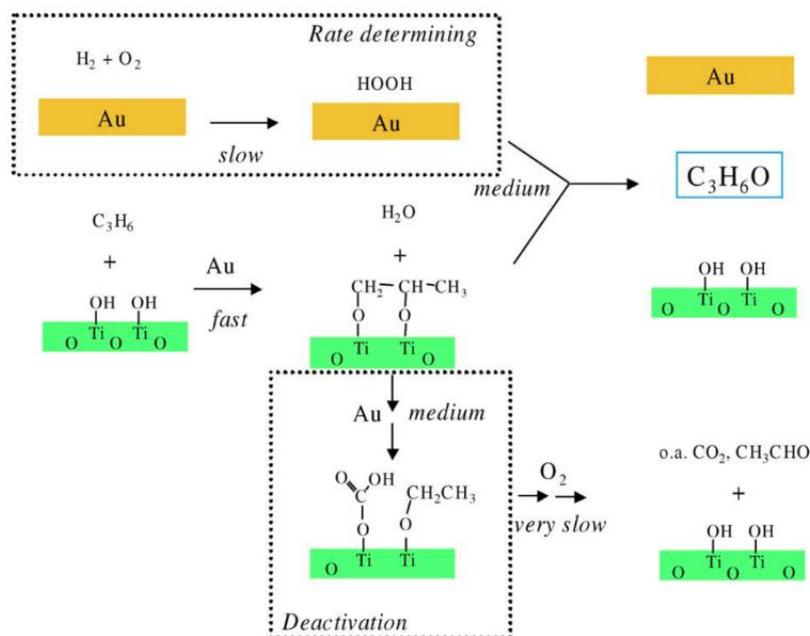


Figure 7: Mécanisme de réaction proposé par Nijhuis [60] pour l'oxydation du propylène avec un catalyseur à base de Ti associant Au pour la production *in-situ* de H₂O₂

De plus, Mul et *al.*[62] ont montré que les hydroxyles (Ti-OH et Si-OH) présents en surface des catalyseurs silicanotitanés étaient responsables de la ré-adsorption de l'oxyde de propylène, entraînant la formation d'espèces carbonatées et carboxylates citées précédemment, constituant un facteur supplémentaire de désactivation du catalyseur. A noter que ce phénomène de ré-adsorption de l'oxyde de l'alcène correspondant peut être observable sur tout support catalytique riche en hydroxyle de surface.

Comme présenté au point 1.2., la distribution des nanoparticules d'or au sein du matériau, tout comme leur taille, sont des paramètres également très importants. En effet, la taille des nanoparticules a une influence sur la sélectivité de l'oxyde, puisque au-dessous de 2 nm il est possible d'observer la production de propane [53] par réduction directe du propène avec H₂. Cependant Lee et *al.* observent une toute autre tendance puisqu'ils reportent une taille optimale de ~ 1 nm et observent une augmentation de la stabilité du catalyseur avec la diminution de la charge en Au [57]. Les particules de tailles supérieures à 2 nm, quant à elles, promeuvent la décomposition du H₂O₂ produit. La méthode d'introduction des nanoparticules d'or est très importante. Avec l'une des plus utilisées, la technique de dépôt-précipitation, Sinha et *al.* ont observé que les catalyseurs avec une faible charge en or (0,21% massique) contiennent des particules d'Or métalliques (~ 3 nm), tandis que ceux avec des charges plus importantes (0,42% massique) contiennent des particules plus grosses et des espèces d'or oxydés (Au-O) dont la présence a été vérifiée par EXAFS. Ces dernières particules conduisent à une plus faible sélectivité en oxyde de propylène [63]. Pour le palladium, la taille des particules peut être plus importante puisque Prieto et *al.* [64] ont supporté des nanoparticules de palladium d'environ 10-20 nm sur des nanocristaux de TS-1 (Pd@TS-1). En optimisant les conditions de CO₂ supercritique utilisés dans leurs travaux, ils arrivent à obtenir un rendement en oxyde de propylène de 10% pour une sélectivité de 70%. Ce type de système a d'ailleurs intéressé Lyondell, Dow, and BASF, mais dans ce cas la sélectivité en H₂O₂ est moins bonne que celle obtenue avec le système quasi *in-situ* de Evonik/Headwaters cité au point précédent [1].

Il a été observé que la présence de sites Ti isolés et/ou très dispersés permettait d’améliorer l’adsorption du propylène sur le support [59, 65], mais aussi de faciliter l’incorporation et la bonne dispersion des nanoparticules d’or de petites tailles [55]. Des travaux effectués sur des supports SBA-15 (Au/Ti-SBA-15 [66], Au/TiO₂@SBA-15 [67]) ont montré une augmentation de la dispersion et de la quantité d’espèces Ti insérées, en greffant le Ti plutôt qu’en l’insérant directement lors de la synthèse du support. Le rapport Ti/Si est un paramètre important à considérer afin de trouver le bon compromis entre une dispersion du titane sous forme isolée et la désactivation du catalyseur par les –Si-OH ré-adsorbant le PO. Les études de ce ratio sur deux types de matériaux (MCM-41 [68] et MCM-48 [54]) ont conduit à une valeur optimale de 0,02 pour une charge en or de 8% en masse et des conditions d’oxydation à 150°C et 100°C respectivement.

Il a été observé d’autre part que la structure de ce type de matériaux poreux permet une distribution homogène et uniforme de l’espèce Ti, ainsi qu’une diffusion plus importante des composés grâce à la taille adaptée de la porosité [56, 58]. Les catalyseurs Au/Ti-MCM-41 de structure hexagonale (la description des méthodes de synthèse et de caractérisation de ces matériaux sera discutée au paragraphe 3.1.2 de ce chapitre) ont montré de meilleures performances d’époxydation du propylène en phase gaz, comparés à Au/TiO₂-SiO₂ (obtenu par imprégnation de SiO₂ de Fuji Davison, ID gel, surface spécifique 310 m²/g) [69]. Les mêmes observations ont été faites par Uphade et *al.* [68] qui expliquent cela par une proportion importante des Ti hors du réseau silicique et une faible dispersion des particules d’or dans ces derniers matériaux. Ceci se traduit également par la nature plus hydrophobe des silices MCM-41 qui adsorbent préférentiellement les molécules d’oléfines moins polaires, permettant de réduire l’adsorption d’eau et probablement d’éviter l’accumulation des produits intermédiaires oxygénés. La structure cubique tridimensionnelle du système de pores des catalyseurs Au/Ti-MCM-48 améliore légèrement la conversion du propylène (+ 0,5%) et la sélectivité en oxyde de propylène (+ 4%) par rapport à Au/Ti-MCM-41 [54]. La balance hydrophile/hydrophobe du support est donc à considérer. En effet, la fonctionnalisation du catalyseur Au/TiO₂@SBA-15³ par des groupements hydrophobes [67] a permis d’améliorer la conversion du propylène de 0,2 à 2,3% après 1 h de réaction à 150°C.

Malgré les travaux visant à les optimiser, les taux de conversion du propylène obtenus grâce au couplage des phases actives Au(0) et Ti(IV) restent modestes. Ainsi, la conversion du propylène obtenue à 150°C par Uphade et *al.* [68] n’excède pas 5,1% avec Au/Ti-MCM-41 et 5,6% avec Au/Ti-MCM-48, pour une sélectivité en époxyde de 88% et 92%, respectivement [54]. Avec une sélectivité de 95%, Kalvachev et *al.* ont obtenu un rendement en époxyde de seulement 1,8% avec Au/Ti-MCM-41 à 100°C. Prieto et *al.* ont atteint quant à eux un rendement de 10% en époxyde et une sélectivité de 70% pour la même réaction, mais rappelons que cette dernière a été effectuée dans du CO₂ supercritique. En fait, l’inconvénient des catalyseurs bimétalliques étudiés réside dans le fait que l’or, en plus de son rôle dans la production de H₂O₂, intervient dans la désactivation des sites actifs pour l’époxydation (Ti) en catalysant la production d’espèces carbonate/carboxylate qui empoisonnent le Ti. L’utilisation d’un catalyseur enzymatique permettrait, grâce à sa spécificité et sa sélectivité unique, de s’affranchir de ce type de réaction secondaire.

³ Ti/Si = 0,05 ; diamètre moyen des nanoparticules de Au de 0,15 nm

1.3.2. Par biocatalyse : utilisation de la glucose oxydase (GOx)

a. Les enzymes : biocatalyseurs

Les enzymes sont des protéines dotées de propriétés catalytiques les faisant intervenir dans certaines réactions biochimiques, notamment dans les cellules. Ces biocatalyseurs agissent en abaissant l'énergie d'activation d'une réaction chimique, ce qui accroît la vitesse de réaction. Elles ont la particularité d'être spécifiques à une réaction donnée, qui s'explique par la présence d'une région tridimensionnelle appelée « site actif ». Celui-ci reconnaît et fixe un substrat donné (S), procurant ainsi aux enzymes la capacité de cibler les réactions. La première étape consiste à former un complexe enzyme-substrat (ES), puis le substrat est transformé en produits (P1) et (P2).

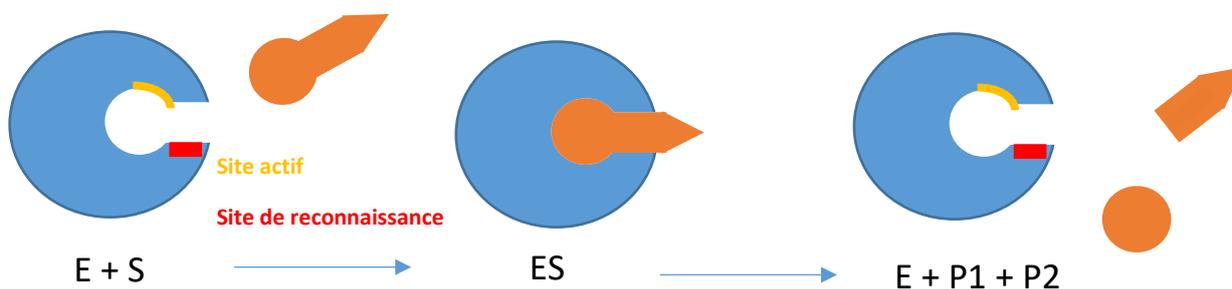


Figure 8: Mécanisme biocatalytique d'une enzyme (E) avec son substrat (S) pour former le complexe (ES) puis transformer (S) en produits (P1) et (P2)

Les enzymes sont classées en six catégories, associées à la réaction qu'elles catalysent :

Tableau 1: Les différentes catégories d'enzymes en fonction de la réaction biocatalysée

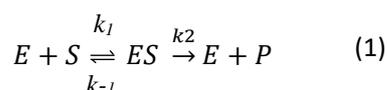
Classification internationale des enzymes

Classes	Type de réactions catalysées
1. Hydrolases	Hydrolyse
2. Oxydoréductases	Oxydoréduction
3. Transférases	Transfert d'un groupe fonctionnel
4. Isomérases	Réarrangement des groupements fonctionnels d'une molécule en l'un de ses isomères
5. Ligases	Formation de liaisons C-C, C-S, C-O ou C-N par condensation
6. Lyases	Rupture de liaisons chimiques par des moyens autres que l'hydrolyse ou l'oxydation pour former une liaison double ou un cycle

Elles sont ensuite sous-divisées selon la nature de leur substrat. La triple sélectivité (chimio, régio et stéréo) propre aux enzymes, constitue l'un des avantages de leur utilisation comme alternative aux procédés chimiques dans des procédés de biotransformation. Cette sélectivité est notamment d'importance dans le cas où il est nécessaire de contrôler la stéréosélectivité de la réaction, permettant

de limiter voire d’éviter les étapes de purification ultérieures souvent coûteuses et fastidieuses. Un autre avantage est lié au fait que ces protéines opèrent dans des conditions douces de pH, de température et de pression contrairement aux catalyseurs chimiques, présentant ainsi un meilleur bilan énergétique et environnemental. Voilà pourquoi, plusieurs sociétés chimiques telles que DSM, BASF, Lonza, Novartis et Roche ont opté pour l’utilisation d’enzymes dans leurs procédés, mettant en œuvre diverses réactions de type hydrolyse ou oxydoréduction dans le cadre d’applications industrielles [70] (lessive, biocarburant, brassage, agroalimentaire, industrie papetière, hygiène...).

Le mécanisme de catalyse enzymatique peut être décrit par l’équation (1) ci-dessous, où E, S, ES et P représentent l’enzyme, son substrat, le complexe enzyme-substrat et le produit respectivement.



D’où la vitesse,

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES]$$

Et la vitesse de production du complexe enzyme-substrat,

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES]$$

La vitesse de réaction catalysée par une enzyme dépend des concentrations d’enzyme et de substrat. Elle est généralement décrite de façon satisfaisante par le modèle de Michaelis-Menten (2) en faisant l’approximation de l’état quasi-stationnaire pour lequel [ES] est relativement constant si [S] >> [E]. Cela implique que la vitesse de formation de ES doit être égale à sa disparition et que, $\frac{d[ES]}{dt} = 0$, d’où :

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_2 \cdot [ES] + k_{-1} \cdot [ES]$$

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{K_M}$$

Où K_M est la constante de Michaelis-Menten et correspond à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale V_{max} . Elle reflète ainsi l’affinité du substrat avec l’enzyme. Plus K_M est faible, plus l’affinité entre l’enzyme et le substrat est grande. Sachant que $[E] = [E]_T - [ES]$ on peut écrire :

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

où $[E]_T$ est la concentration totale d’enzymes.

Soit

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Plus la concentration en enzyme augmente, plus la vitesse de réaction augmente. Pour une concentration en enzyme donnée, la vitesse de réaction augmente avec la concentration en substrat jusqu'à un point au-delà duquel, tout apport supplémentaire de substrat ne produira aucun changement significatif dans la vitesse de réaction. On dit que l'enzyme est saturée (Figure 9).

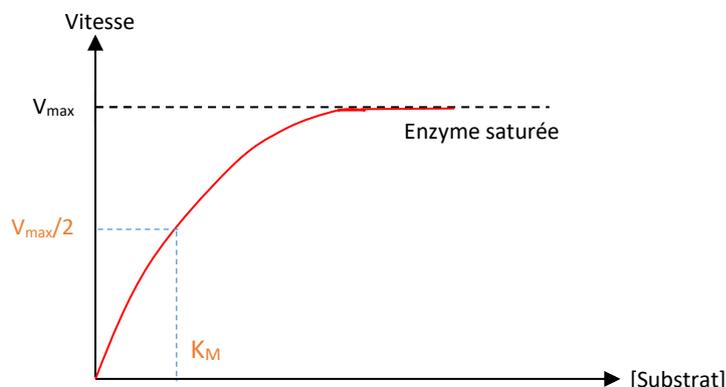


Figure 9: Evolution de la vitesse de production de l'enzyme (activité) avec la concentration en substrat

L'activité catalytique d'une enzyme, exprimée en unité (U), correspond au nombre de μ mole de substrat convertie ou de produit apparaissant par minute. L'activité spécifique d'une enzyme correspond au nombre d'unités pour un mg d'enzyme.

L'enzyme peut être inhibée par certaines molécules appelées inhibiteurs, pouvant se lier au site actif de l'enzyme. On parlera d'inhibition compétitive. D'autres types de mécanismes d'inhibition sont également rencontrés, notamment incompétitif lorsque l'inhibiteur se fixe au complexe ES et non à l'enzyme seule, puis non-compétitif quand l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme hors du site actif. Les inhibiteurs qui se fixent à d'autres parties de la protéine peuvent entraîner des effets de distorsion au niveau de sa forme [71].

Les paramètres physicochimiques influençant la vitesse de réaction enzymatique sont le pH, la température et la présence de solvants organiques. On observe généralement un optimum de l'activité en fonction de la température. Dans un premier temps, l'activité augmente avec la température, conséquence de la loi d'Arrhénius. Puis cet effet favorable de la température est suivi par celui défavorable lié à la dénaturation de l'enzyme par perte de sa structure tridimensionnelle, la rendant inactive. La modification de ce type de profil de l'activité est également observée avec la variation de pH. Ceci résulte de la combinaison plus ou moins favorable de l'état de protonation des acides aminés ayant des propriétés acido-basiques dans le site actif et de la déstabilisation de la structure de l'enzyme. Les milieux organiques peuvent également avoir cette conséquence. En effet, l'eau est très importante pour le fonctionnement des enzymes, puisqu'elle forme une sorte de coquille à la surface de la protéine liée par des liaisons H, appelée eau liée. Cette coquille d'hydratation ou du moins une partie de celle-ci est essentielle au fonctionnement enzymatique. Par conséquent, le remplacement des molécules d'eau par un solvant organique entraîne un changement drastique de la structure de la protéine, conduisant à sa dénaturation [72-75].

Toutes ces inhibitions ou déformations peuvent être réversibles ou non, entraînant la désactivation partielle ou définitive de l'enzyme. Ces biocatalyseurs sont donc à utiliser dans des conditions compatibles avec la préservation de leur activité enzymatique.

i. La glucose oxydase (GOx) : Description

La glucose oxydase (GOx), biocatalyse la réduction de O_2 en H_2O_2 , parallèlement à l’oxydation du D-glucose en D-gluconolactone, faisant d’elle un bon candidat pour la production *in-situ* de H_2O_2 (Figure 10). La D-gluconolactone s’hydrolyse spontanément pour former de l’acide gluconique qui peut être valorisé dans l’industrie agroalimentaire, car utilisé comme conservateur [76, 77].

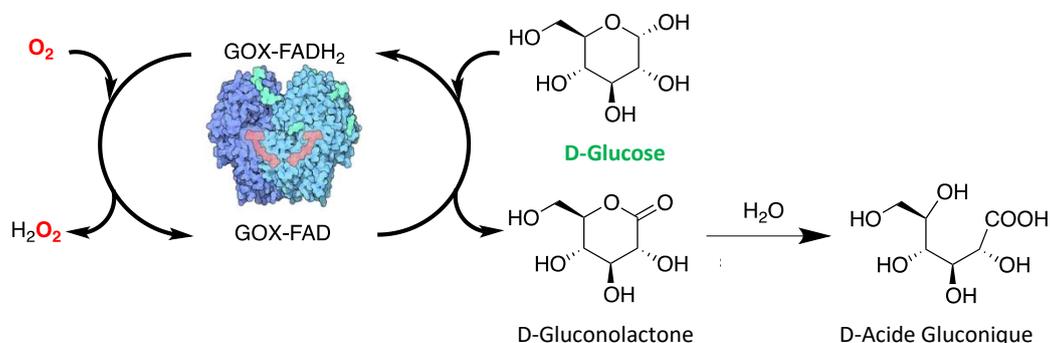


Figure 10: Mécanisme de production de H_2O_2 biocatalysée par la glucose oxydase d’*Aspergillus Niger*

Cette protéine découverte par Muller [78] est produite par plusieurs insectes et champignons, dont *Aspergillus Niger*. Sa fonction biologique principale est d’agir comme antibactérien et antifongique grâce à la production de peroxyde d’hydrogène. Cette glycoprotéine est constituée d’un dimère de deux polypeptides identiques d’environ 80 kDa, liés de manière covalente par un pont disulfure [79]. La GOx d’*Aspergillus Niger* contient 2 X 583 acides aminés dont 2,6% de lysine, 3,3% d’histidine et 3,8% d’arginine, acides aminés contenant des groupements amine (Figure 11).

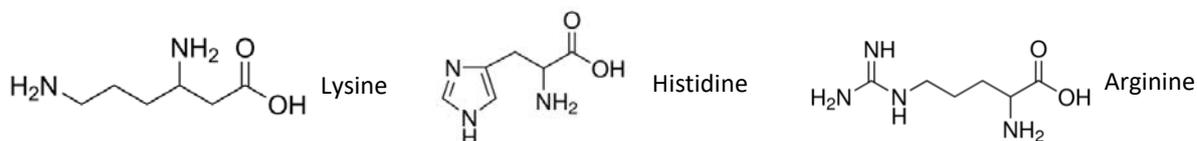


Figure 11: Lysine (à gauche), histidine (au milieu) et arginine (à droite)

A pH =7, la GOx possède ainsi 74 acides aminés, dont les groupements amine peuvent se protoner et donc chargés positivement, que sont l’arginine et la lysine et 132 acides aminés chargés négativement, les acides aspartique et glutamique (Figure 12) dont les groupements carboxyliques peuvent se déprotoner.



Figure 12: Acide aspartique (à gauche) et glutamique (à droite)

La Figure 13 ci-dessous montre la structure tertiaire, c’est-à-dire tridimensionnelle, d’un monomère constituant la GOx d’*Aspergillus Niger*. L’association des deux monomères constituera alors la structure quaternaire. Il est possible d’observer la présence de molécules telles que la flavine adénine dinucléotide (FAD) et des molécules glycosylées à hauteur de 16% [76], soit 190 unités de mannose et 16 résidus de N-acétylglucosamine [80].

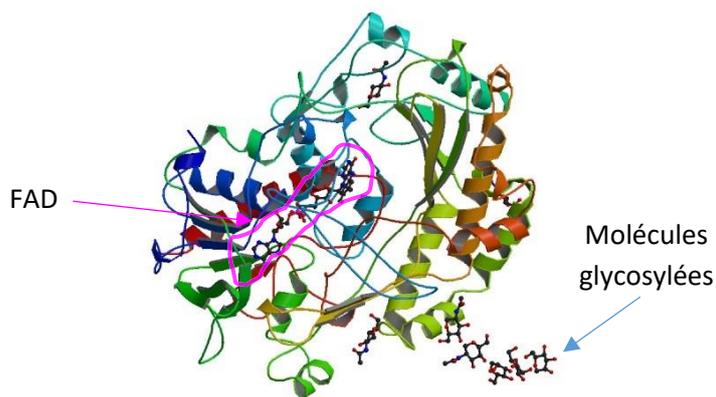


Figure 13: Polypeptide avec FAD d’une unité constituant la GOx (réf : PDB :1CF3 [81])

Chaque monomère contient une sous-unité de FAD (Figure 14) liée à la protéine de manière non covalente. L’échange d’électrons lors de la catalyse enzymatique se fait au niveau de ce cofacteur FAD [82].

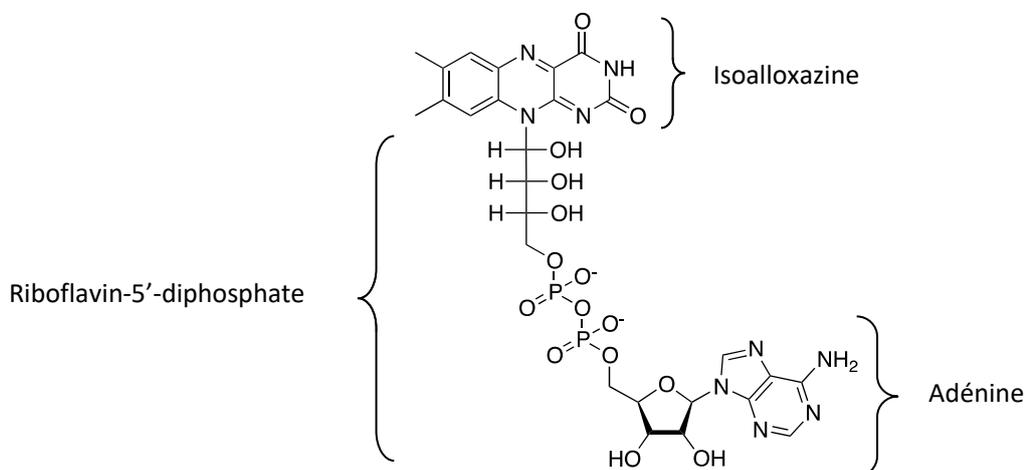


Figure 14: Flavine adénine dinucléotide (FAD)

Le mécanisme de production de H_2O_2 au niveau de l’isoalloxazine est présenté Figure 15 ci-dessous. Le D-glucose est oxydé par l’enzyme, concomitamment à la réduction simultanée du FAD en $FADH_2$.

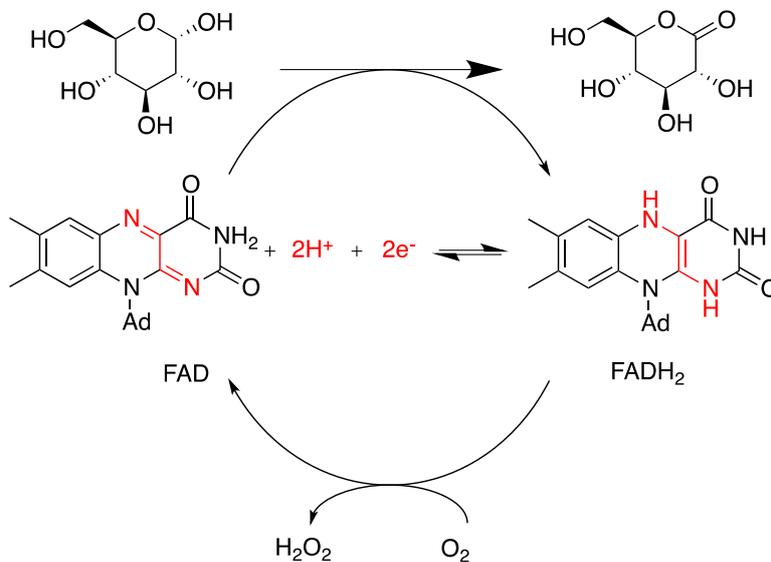


Figure 15: Réduction du FAD en $FADH_2$ puis production de H_2O_2 à partir de O_2

La réaction enzymatique peut donc être décomposée en deux étapes : (i) l’oxydation du glucose catalysée par la GOx avec réduction du FAD en FADH₂ [83] et (ii) la réduction de O₂ catalysée par la GOx avec ré-oxydation du FADH₂ en FAD, conduisant à la production de H₂O₂.

La GOx est très bien décrite dans la littérature [76, 84], donnant accès à nombre de ses caractéristiques telles que :

- Ses plages de stabilité en pH et en température : 4 - 7 et 20 - 50°C, respectivement.
- Sa constante de Michaelis-Menten K_m : 33 mM à pH = 5,6 et 25°C selon Swoboda et Massey [85], 198-248 mM à pH = 5 - 7 et 20 - 30°C selon Bao et *al.* [86] ou même 110 - 120 mM à pH = 5,6 et 0 - 38°C selon Gibson et *al.* [87].
- Ses principales valeurs de coefficients d’extinction molaire en spectroscopie UV-visible : 270000 M⁻¹ cm⁻¹ à 280 nm et 25180 - 28200 M⁻¹ cm⁻¹ à 450 nm.
- Son point isoélectrique pI = 4,2.
- Sa taille : 6,0 × 5,2 × 7,7 nm³ [88].

Bien que la GOx d’*Aspergillus Niger* soit stable sur une zone de pH comprise entre 4 et 8, son activité est optimale pour un pH compris entre 5 et 6 [80]. De plus, celle-ci est sensible à la présence de solvants organiques. En effet, Jan et *al.* [89] rapportent une perte d’activité de 20, 60 et 95% dans des mélanges 50/50 eau/dioxane, eau/acétone et eau/THF respectivement, après 6 h à 37°C. Cette caractéristique complique évidemment les applications possibles de la GOx en chimie fine. De plus, une quantité trop importante d’acide gluconique ou de H₂O₂ peut désactiver l’enzyme [86, 90-92]. Une étude cinétique menée par Bao et *al.* [91] l’explique par le fait que la forme réduite de la GOx ayant presque la même affinité pour le peroxyde d’hydrogène que pour l’oxygène, sont tous deux en compétition. L’ajout de catalase, qui a la propriété de catalyser la décomposition de H₂O₂ permet d’en diminuer l’excès. L’acide gluconique et le glucose ayant des structures similaires, substrat et produit sont également en compétition au niveau du site actif [93].

ii. Utilisation en biotransformation

La glucose oxydase est utilisée dans plusieurs domaines. Dans l’industrie agroalimentaire, elle permet de produire l’acide gluconique, lui-même utilisé comme additif. Elle est également employée pour éliminer l’oxygène dans les aliments et boissons, afin de prolonger leur durée de vie, le H₂O₂ produit par l’enzyme agissant comme un bon bactéricide. Ainsi, elle est aussi utilisée dans l’hygiène buccodentaire [94] grâce à ses propriétés bactéricides. Dans l’industrie textile, la GOx est utilisée après son immobilisation covalente sur des supports en alumine ou verre, permettant de produire respectivement 0,35 g/L et 0,24 g/L de peroxyde d’hydrogène en 7,5 h, pour le blanchiment de tissus en coton [95].

La GOx est surtout utilisée pour ses propriétés redox et donc dans les dispositifs électroniques tels que les biopiles, où l’énergie biochimique est convertie en énergie électrique au moyen d’un biocatalyseur. Une approche vers la conception d’une biopile implantable, sans membrane et biocompatible consiste à catalyser l’oxydation du glucose au niveau de l’anode en utilisant soit la GOx ou une glucose déshydrogénase, couplée à la réduction du dioxygène à la cathode par une enzyme réduisant le dioxygène telle que la laccase [96].

La GOx intervient également dans les biocapteurs de glucose [97, 98], principalement utilisés par les personnes diabétiques. L’enzyme est généralement immobilisée sur une électrode au niveau de laquelle les électrons issus de l’oxydation du glucose sont récupérés. Plusieurs exemples sont

présentés dans les parties qui suivent. Wilson et *al.* [99], quant à eux, proposent de se baser sur la mesure du changement de fluorescence du FAD, qui sous sa forme oxydée fluoresce à 520 nm.

Dans notre étude, l’intérêt de la GOx est basé sur sa capacité à produire H₂O₂. L’utilisation d’oxydases dans des procédés homogènes ou hétérogènes mettant en œuvre des catalyseurs en tandem a déjà suscité un certain intérêt, comme le montrent Vennestrøm et *al.* [100] dans leur revue. Ils ont ainsi proposé d’utiliser le système nommé Cetus, composé d’une pyranose oxydase, convertissant le glucose en glucosone, lui-même hydrogéné en fructose par un catalyseur Pd/C (Figure 16).

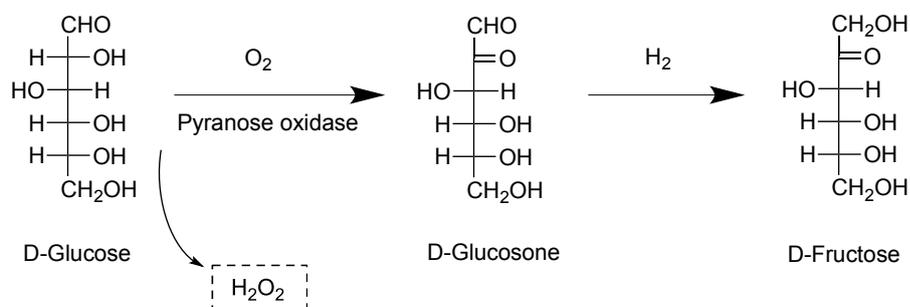


Figure 16: Système Cetus utilisant une pyranose oxydase pour la production de D-fructose à partir du D-glucose. H₂O₂ produit est éliminé à l’aide d’une catalase [100]

L’utilisation de deux enzymes immobilisées, la GOx et la chloroperoxydase (CPO) sur un support SBA-15⁴ a été étudiée pour l’oxydation de l’indole [101] (Figure 17).

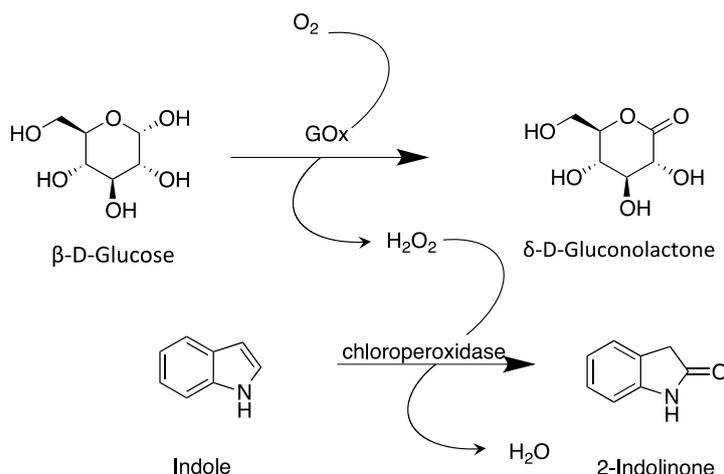


Figure 17: Réactions en tandem biocatalysées par la GOx et la CPO pour l’oxydation d’indole par O₂ [101]

Ici l’intérêt est la production progressive de H₂O₂ qui, pour des ajouts externes, désactive généralement la CPO. Cette même combinaison a également été utilisée par Van de Velde et *al.* [102] pour la formation de sulfoxyde. De même, Phuoc et *al.* [103] ont proposé un système bi-enzymatique constitué de la GOx et de la peroxydase de Raifort ou *Horseradish peroxidase* (HRP) encapsulées dans des nanopores de silice, permettant le couplage oxydant de la 4-aminoantipyridine avec le phénol (Figure 18).

⁴ SBA-15 (Santa Barbara Material No.15) est une silice de structure hexagonale présentée au point 3.1.2.

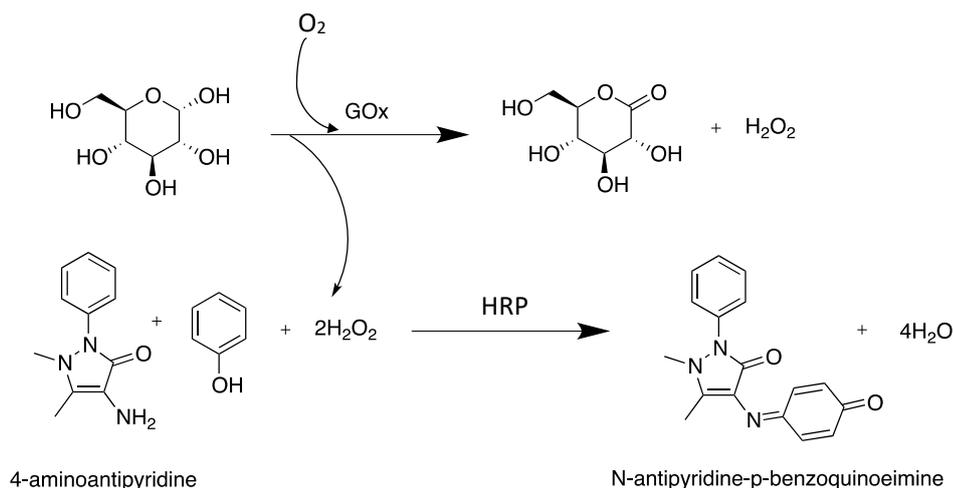


Figure 18: Association de la GOx et de la HRP pour le couplage oxydant de la 4-aminoantipyridine avec le phénol en présence de O₂ et de glucose

Laveille et *al.* [104] ont aussi encapsulé la GOx avec une hémoglobine Hb (ferroprotéine) en vue d'éliminer les hydrocarbures aromatiques polycycliques carcinogènes dans le cadre de la dépollution des eaux [104].

Au moins deux systèmes catalytiques chimioenzymatiques homogènes ou hétérogènes, combinant la production biocatalytique de H₂O₂ par la GOx avec l'oxydation d'alcènes en présence d'un catalyseur inorganique, ont déjà été décrits. Ainsi, Tong et *al.* [105] ont associé cette enzyme en solution, ou bien supportée sur un gel de silice, avec du bicarbonate de sodium et du sulfate de manganèse. De nombreux alcènes aussi bien hydrosolubles que liposolubles ont été testés avec le système catalytique soluble conduisant à de bons taux de conversion pour les premiers (> 99%) et de moins bons pour les seconds (20% pour le cyclooctène, 45% pour le styrène). Cependant, dans ce cas, l'hétérogénéisation d'une seule des composantes du tandem n'a pas permis de réaliser des études de recyclage. Vennestrøm et *al.* [106], quant à eux, se sont penchés sur l'oxydation de l'alcool allylique en présence d'une zéolithe, la TS-1, qu'ils ont associée à la GOx utilisée libre ou bien immobilisée sur ce support microporeux. La conversion de l'alcool allylique avec la GOx en solution est de 15% avec une sélectivité en glycidol de 24% et en glycérol de 76%. En revanche, aucun résultat chiffré n'est mentionné pour les essais réalisés avec la GOx immobilisée. Plus généralement, aucun test concernant des alcènes plutôt organosolubles n'a été effectué. Par ailleurs, l'activité de l'enzyme après immobilisation n'a pas été renseignée. Il est à noter qu'au vu de la structure de la zéolithe TS-1 la GOx ne pourra avoir été immobilisée que sur le pourtour des cristaux de zéolithe.

Au final, la GOx a déjà été exploitée dans quelques systèmes catalytiques tandem chimioenzymatiques ou purement enzymatiques, majoritairement homogènes, dans le but de produire H₂O₂ ou bien d'oxyder le glucose. La conception de tels procédés intégrant la production *in-situ* de H₂O₂ à partir de la GOx est une alternative intéressante aux systèmes catalytiques équivalents purement inorganiques. Cependant le principal écueil à l'utilisation des enzymes en général réside dans les conditions optimales de fonctionnement de ces dernières, pas toujours très compatibles avec les conditions de travail des catalyseurs inorganiques habituels (Figure 19). A part quelques cas particuliers, des compromis doivent être trouvés.

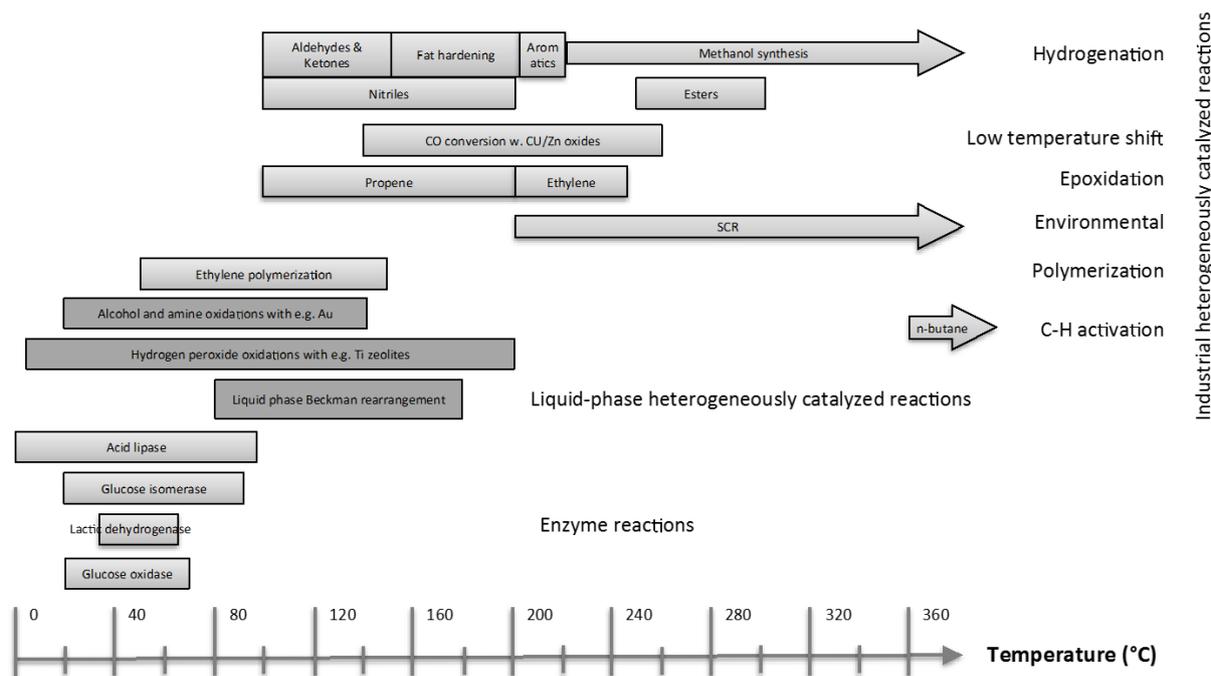


Figure 19 : Comparaison des températures de fonctionnement des réactions chimiques catalysées de façon classique dans l’industrie (en haut), par les enzymes (en-bas). Au milieu, figurent de nouvelles réactions, en cours de développement, catalysées par des espèces inorganiques œuvrant en phase liquide pour lesquelles davantage de convergences peuvent être trouvées au niveau des températures de fonctionnement [100]

La Figure 19 répertorie différents procédés chimocatalytiques et biocatalytiques selon une échelle correspondant à leur température d’utilisation. L’utilisation des biocatalyseurs peut difficilement être couplée aux réactions catalytiques hétérogènes utilisées industriellement, sauf peut être éventuellement pour les lipases pouvant fonctionner jusqu’à 90°C. Cependant, plusieurs réactions en phase liquide, telles que les oxydations avec Ti et Au, la formation du polyéthylène ou le réarrangement de Beckmann (conversion d’une oxime en lactame) peuvent être associées à l’utilisation d’enzymes, comme la glucose oxydase ou une isomérase, une déhydrogénase ou une lipase. L’enjeu de l’utilisation de biocatalyseurs est alors de trouver une manière de réduire le coût lié aux enzymes, d’augmenter leur stabilité dans les solvants organiques et dans des conditions de réaction sévères. L’immobilisation d’enzymes sur des supports solides appropriés fournit une solution possible à ces défis.

2. Immobilisation d’enzymes

Cette partie est centrée sur l’immobilisation d’enzymes et plus particulièrement de la glucose oxydase, en abordant les points essentiels, à savoir, la méthode d’immobilisation et le choix du support. Puis, seront également mentionnés l’effet de l’immobilisation sur les paramètres influençant le comportement de l’enzyme.

2.1. Les différentes méthodes d’immobilisation

L’immobilisation d’enzyme peut se faire selon trois approches : par encapsulation, adsorption et de manière covalente. Nous détaillerons rapidement chaque méthode, en nous focalisant principalement sur le cas de la GOx lorsque c’est possible, qui a été immobilisée pour la première fois en 1974 par Matthews [107].

2.1.1. Encapsulation de l'enzyme dans le support

Cette méthode d'immobilisation consiste à réaliser concomitamment la synthèse d'un support et le confinement de l'enzyme, en préservant l'accès à son substrat pour la réaction catalytique [108]. L'enzyme est donc introduite le plus souvent en début ou pendant la synthèse du support.

a. Synthèse sans surfactant

Les matrices polymériques peuvent être utilisées pour l'encapsulation d'enzymes. Parmi celles-ci, figure l'alginate, qui est un biopolymère dont les propriétés biocompatibles en font un bon candidat pour l'encapsulation de protéines alimentaires ou pour délivrer des protéines ou peptides à effets thérapeutiques. Ces dernières applications peuvent utiliser des microcapsules hybrides composées d'une coquille en silice et d'un cœur en alginate dans lequel les protéines sont encapsulées. Wu et al. [109] ont ainsi rapporté la formation de microcapsules d'alginate/protamine/silice (APSi) pour l'encapsulation de la laccase. Malgré le fait que la laccase encapsulée présente une activité spécifique moins importante que la laccase libre (5,72 mM.min⁻¹.g⁻¹ contre 11,68 mM.min⁻¹.g⁻¹, respectivement) pouvant être liée à une limitation diffusionnelle, l'enzyme conserve 80% de son activité après 7 cycles d'utilisation. De plus, la stabilité au stockage de la laccase encapsulée est plus élevée que l'enzyme libre puisqu'elle conserve 60% de son activité contre 10% après 10 jours à 4°C dans un tampon acétate à pH = 7. L'utilisation de ce polymère s'étend également à d'autres applications puisque, récemment, Marpani et al. [110] ont déposé une couche d'alginate et d'alcool déhydrogénase (ADH) sur une membrane de filtration. Par réticulation de dopamine et de catéchol, il est formé une structure polydopamine, utilisée comme liant entre la couche d'alginate et la membrane. Cela leur a permis d'encapsuler sept fois plus d'enzyme sur de l'alginate (de type ALG3000G39) que sans la présence de cette couche de polydopamine.

Par ailleurs, d'autres matrices sont également utilisées. Dans sa revue, Sheldon [111] décrit largement l'encapsulation d'enzymes dans des matrices siliciques sol-gel. Celles-ci sont préparées par polymérisation par hydrolyse de tétraéthoxysilane, la morphologie obtenue dépendant notamment de la méthode de séchage. Les xérogels sont obtenus par évaporation durant laquelle la tension capillaire provoque un rétrécissement des cages et nanopores. Ce phénomène peut être atténué par l'utilisation couplée d'alkylsiloxanes, RSi(OR)₃, tel que RSi(OMe)₃, avec Si(OR)₄, augmentant le caractère hydrophobe de la surface du sol-gel. Reetz et al. [112] ont amélioré cette méthode, pour immobiliser des lipases introduites en début de synthèse, en utilisant des alkylsiloxanes avec des groupements alkyle plus longs en association à des additifs tels qu'un éther couronne (18-crown-6), un surfactant (Tween 80), un sel (KCl) ou un dérivé de cyclodextrine (méthyl-β-cyclodextrine) afin de stabiliser l'enzyme. La quantité d'enzymes encapsulées et leur stabilité est alors plus importante, de même que leur recyclabilité. Par exemple la lipase CalB⁵ présente une activité de 1088 U/g_{gel} en utilisant le 18-crown-6 (0,5 mmol) contre 767 U/g_{gel} sans additif. De plus, l'activité de cette enzyme encapsulée est conservée après 5 cycles d'utilisation. D'autres méthodologies peuvent être utilisées. Récemment, Mansor et al. [113] ont immobilisé la laccase en procédant en une ou deux étapes, à savoir combinant une catalyse acide (solution de HCl) suivie d'une catalyse basique (solution de triéthylamine, TEA) (Figure 20). Ils observent qu'au niveau du gel silicique pour la première méthode, une partie du milieu de synthèse n'a pas réagi, tandis qu'en utilisant la seconde méthode le gel obtenu est issu de l'entière

⁵ CalB pour *Candida antarctica* Lipase B, enzyme permettant des réactions d'estérification

polymérisation du milieu. L'hydrolyse et la condensation catalysées par un acide conduisent généralement à une structure faiblement ramifiée et microporeuse. Pour cette raison, l'association à une catalyse basique dans un second temps permet de diminuer la microporosité et favoriser la formation de pores de plus grande taille dans le gel de silice [18]. La TEA agit comme agent de gélification et accélère la condensation. Lors de l'immobilisation, la laccase est ajoutée tout juste avant le TEA et la condensation rapide qui suit minimise le contact entre l'enzyme et le milieu environnant. La laccase est retenue dans la matrice silicique, qui protégera sa structure de toute altération. Contrairement à la synthèse en une étape, lors de la seconde, la laccase conserve une activité (valeur maximale de 434,71 U/g_{gel}).

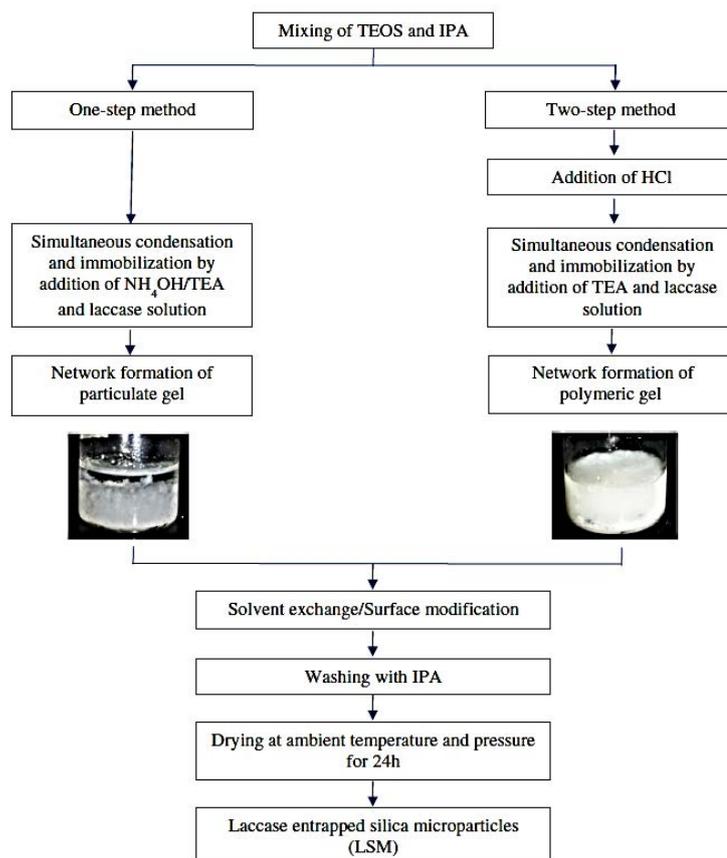


Figure 20: Encapsulation de la laccase en une seule étape (catalyse acide) ou deux (catalyse acide puis basique) [113]. IPA (isopropanol), TEA (triéthylamine)

b. Synthèses avec surfactant

Contrairement aux synthèses des matrices sol-gel ou hydrogel, celles des matériaux mésoporeux siliciques sont connues pour utiliser des tensio-actifs agissant comme agent structurant, qui doivent être retirés en fin de synthèse afin d'ouvrir la porosité [114].

Santalla et al. [115] ont encapsulé plusieurs enzymes (lipase, HRP et laccase) à l'intérieur d'un matériau silicique mésoporeux. Le pluronic F127 a été utilisé comme surfactant et le TMOS⁶ comme source de silice auxquels ont été ajoutées les enzymes à un pH de 3,5. Après 30 jours à 27°C, le surfactant a été retiré du solide par traitement de ce dernier à l'aide d'une solution aqueuse de HCl (pH = 3,5) pendant 24 h à 38°C à reflux. Les auteurs de ce travail ont ainsi observé que le caractère

⁶ TMOS pour tetramethyl orthosilicate

hydrophobe de la surface de la protéine était un élément clé influençant la synthèse et donc la structure du matériau. Ainsi la lipase a été incorporée efficacement dans un matériau mésoporeux ordonné de structure cubique, tandis que, pour la HRP, le matériau désordonné obtenu est de type mousse mésocellulaire et la laccase n'a pas été incorporée au réseau. *A priori*, les propriétés hydrophobes de la lipase lui permettent d'interagir avec l'agent tensio-actif pour former des micelles. L'enzyme joue donc le rôle de co-surfactant tandis que les deux autres enzymes qui sont fortement glycosylées (jusqu'à 20% de glycoside) présentent une surface polaire qui pourrait altérer la structuration des molécules de tensioactif. D'autre part, les synthèses ont été effectuées à un pH de 3,5, soit une valeur proche du pI de la laccase (4,2), et loin des pI de la lipase (6) et de la HRP (7,2). Pendant la synthèse, la lipase est donc chargée négativement mais la partie hydrophobe importante de l'enzyme l'emporte sur les forces électrostatiques, ce qui n'est pas le cas pour la HRP, menant à la structure finale désordonnée.

La glucose oxydase a été piégée par Blin et *al.* [116] dans un support silicique en utilisant un surfactant non-ionique fluoré (le Zonyl-FSN-100 commercialisé par Dupont®) comme agent structurant. La GOx est introduite dans une solution micellaire, puis après l'ajout de la source de silice (TMOS), la solution est placée dans un autoclave à 60°C pendant deux jours. L'agent structurant a ensuite été éliminé par extraction Soxhlet dans l'éthanol pendant 30 h. Après ces traitements l'encapsulation de la GOx a été mise en évidence. Il a été établi que l'arrangement de la structure du matériau final dépendait de la concentration de GOx introduite lors de la synthèse : pour une concentration inférieure à 3,2 mg/mL le matériau final présente une structure hexagonale ordonnée dans laquelle l'enzyme est insérée. Au-delà de cette concentration, l'addition de GOx perturbe l'interaction entre les micelles, entraînant l'apparition d'une structure de type « *wormhole* » ou « en trous de ver ». L'enzyme supplémentaire est alors exclue du matériau. Au vu des conditions de synthèse (60°C et 30 h de soxhlet dans l'éthanol) la question de la dénaturation de l'enzyme se pose. Aucune valeur d'activité n'a été donnée. En fait les auteurs s'appuient sur un changement colorimétrique lors de la mesure d'activité mais il apparaît que l'absorption relevée est faible.

Pour que l'enzyme encapsulée soit encore active après la synthèse du matériau, il est donc primordial de l'effectuer dans des conditions qui ne vont pas entraîner sa dénaturation. Voilà pourquoi les méthodes sol-gel sans surfactant présentées au point précédent sont préférables.

2.1.2. Adsorption

La méthode la plus simple d'immobilisation est l'adsorption physique de l'enzyme sur le support. L'interaction entre l'enzyme et la surface du support sera alors contrôlée par des interactions faibles de type forces de Van der Waals, liaisons hydrogènes, forces électrostatiques ou même par interactions hydrophobes, comme présentées Figure 21, ci-après.

L'adsorption de la GOx a par exemple été effectuée sur des supports tels que de l'agarose modifié avec des groupements monoaminéthyl-N-éthyl (MANAE-agarose) ou des billes de polyméthacrylate fonctionnalisées par de l'éthylène diamine (Sepabeads-EA®) [117]. Les supports siliciques sur lesquels nous nous sommes focalisés dans notre étude ont la particularité d'être hydrophiles. Les interactions les plus fortes sont celles mettant en jeu des forces électrostatiques entre le support et l'enzyme. Elles seront prépondérantes surtout lorsque le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique de la silice (~ 2 - 4 [118]).

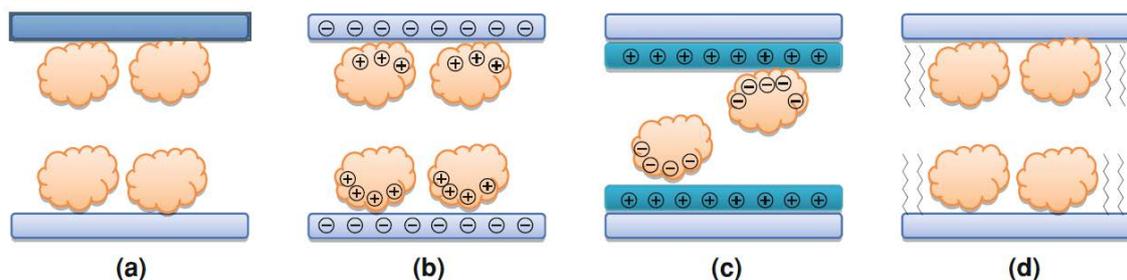


Figure 21: Différentes possibilités d'adsorption physique d'une enzyme sur un support : (a) Interactions par des forces de Van der Waals, des liaisons hydrogènes ou interactions hydrophobes, (b) Interactions électrostatiques avec une surface modifiée, (c) Interactions électrostatiques en ajustant le pH du milieu et (d) Interactions hydrophobes avec une surface modifiée [98]

De l'ordre de 9 U de GOx (pour 100 mg de solide) ont été adsorbés sur un support mésoporeux silicique (FDU-1⁷) dans du tampon acétate pH = 4,5 [119]. Cette faible quantité est liée au fait que le pH du milieu (4,5) est du même ordre de grandeur que le point isoélectrique (pI) de la GOx (4,2). Pour des valeurs de pH supérieures à 4,2, la GOx est chargée négativement. Le PZC de la silice étant compris entre 2 et 4, à un pH de 4,5 la surface sera également chargée négativement et les interactions électrostatiques entre la GOx et la surface ne seront pas favorisées. En ajustant le pH en fonction des points isoélectriques de chacun, il est possible d'optimiser ces interactions. Cependant, dans le cas de l'utilisation d'un xérogel silicique hybride à base de gélatine (Guar Gum), 20,73 U/mg_{sup} de GOx ont été immobilisés à pH = 5,6, démontré comme étant le pH optimum d'immobilisation dans cette étude [120]. Le PZC du matériau étant dans ce cas de 2,3, à pH = 5,6, la GOx et le support sont tous deux chargés négativement. L'immobilisation ici pourrait donc s'expliquer par des interactions de Van der Waals et liaisons hydrogènes.

Une modification de la surface du support peut permettre d'obtenir une charge opposée à celle de l'enzyme en ajustant le pH. Pour se faire, les surfaces sont fonctionnalisées en général par des groupements amine (notamment en utilisant l'APTES ou 3-aminopropyltriéthoxysilane [121]), des acides sulfoniques, carboxyliques ou phosphoniques [122]. Li et *al.* [123] ont en effet observé que l'adsorption à pH = 5 de la GOx sur une mousse mésocellulaire silicique fonctionnalisée avec des amines en surface (MCF-NH₂, pI = 6,2) était au moins deux fois plus importante que sur le matériau silicique non fonctionnalisé (MCF, pI = 4,3) : 487 mg/g_{sup} contre 216 mg/g_{sup}. Le support fonctionnalisé influe également sur la stabilité thermique de l'enzyme. Il a été observé qu'après une incubation à 60°C pendant 1 h à pH = 5, la GOx adsorbée sur MCF-NH₂ conserve 80% de son activité initiale, contre 60% pour la GOx sur MCF et 40% pour la GOx libre. Cette résistance accrue de la GOx adsorbée sur MCF et MCF-NH₂ a été expliquée par un effet de protection que le solide confèrerait à l'enzyme. La moindre stabilité de la GOx supportée sur MCF pourrait s'expliquer par un lessivage continu plus important de la GOx dans ce cas.

Le contrôle du pH permet d'optimiser la quantité d'enzyme adsorbée mais il faut ensuite utiliser le biocatalyseur ainsi immobilisé dans les mêmes conditions de pH afin d'éviter sa désorption. Une méthode permettant d'éviter cet inconvénient consiste à piéger l'enzyme adsorbée dans les pores du matériau. He et *al.* [124] ont ainsi procédé à la silylation de l'entrée des pores d'une silice SBA-15 à partir de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate, suivie de la polymérisation des groupements vinyle

⁷ Pour Fudan University, l'université dans laquelle ce matériau, présentant des cages cubiques ordonnées, a été élaboré

pendants, afin d’éviter le lessivage d’une lipase pancréatique porcine. Au mieux, les auteurs sont parvenus à retenir 20% d’enzymes en plus dans le matériau présentant des entrées de pores rétrécies. Après cinq cycles d’utilisation dans du tampon phosphate pH = 7,7, ce matériau retient 98% de son activité, contre 60% pour l’autre non modifié.

2.1.3. Immobilisation par voie covalente

L’immobilisation covalente génère un lien plus fort entre l’enzyme et le support que l’adsorption, limitant ainsi le phénomène de lessivage de l’enzyme et permettant de travailler dans une gamme de pH plus étendue. L’immobilisation covalente a lieu entre les groupements fonctionnels à la surface du matériau et ceux de l’enzyme. Ici, l’attention sera focalisée sur la fonctionnalisation de la silice, dans la mesure où ce type de support sera utilisé dans l’étude qui va suivre. La fonctionnalisation de la silice se fait généralement en utilisant des organosilanes [125], présentant des fonctions variées, dont la Figure 22 montre quelques exemples. Les fonctions intéressantes pour l’immobilisation d’enzymes sont notamment les amines (3-aminopropyltriéthoxysilane, APTES), les acides carboxyliques ou les oxiranes. Le 3-(mercaptopropyl)-triéthoxysilane peut également être utilisé pour greffer des thiols à la surface du support, qui formeront par la suite des ponts disulfures avec les cystéines de l’enzyme [126].

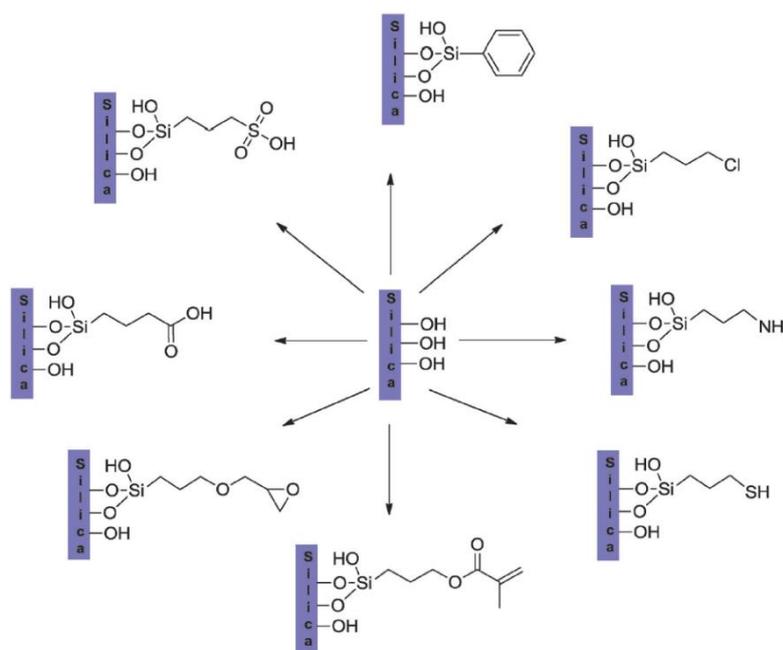


Figure 22: Différentes possibilités de fonctionnalisation post-synthèse de la surface de matériaux silicieux [127]

Les supports aux surfaces modifiées peuvent être obtenus par co-condensation des précurseurs de la fonction organique et de la silice. Si les vitesses d’hydrolyse des deux précurseurs sont convenablement ajustées, cette technique a le mérite de bien disperser les fonctions au niveau de la surface. En revanche, la présence du précurseur de la fonction en assez grande quantité dans le gel de synthèse peut aboutir à des matériaux aux pores moins ordonnés [128]. Par la suite, nous privilégierons donc la modification post-synthèse qui permet de greffer les groupements fonctionnels directement en surface du matériau, préalablement synthétisé.

La figure 23 ci-dessous présente plusieurs modalités de greffage, non exhaustives, illustrant la mise en place d’une interaction covalente entre les groupements fonctionnels greffés en surface du

support et la protéine. Les groupements de la protéine exploités ici sont uniquement des amines (contenues dans la lysine) ou les fonctions sulfhydryle de la cystéine alors qu’il est également possible de former des liaisons covalentes à partir des différents groupements carboxyliques des acides glutamique et aspartique présents à la surface des enzymes.

Des stratégies de deux types peuvent être mises en œuvre en fonction de l’intervention ou non d’agents de couplage. Ces derniers ont pour rôle d’activer les fonctions protagonistes de la future interaction covalente entre la surface du support et de l’enzyme et/ou de jouer le rôle d’agent de liaison (« *linker* »). Dans ce dernier cas, selon l’agent utilisé l’espace avec le support sera plus ou moins important, ce qui peut être intéressant pour certaines applications.

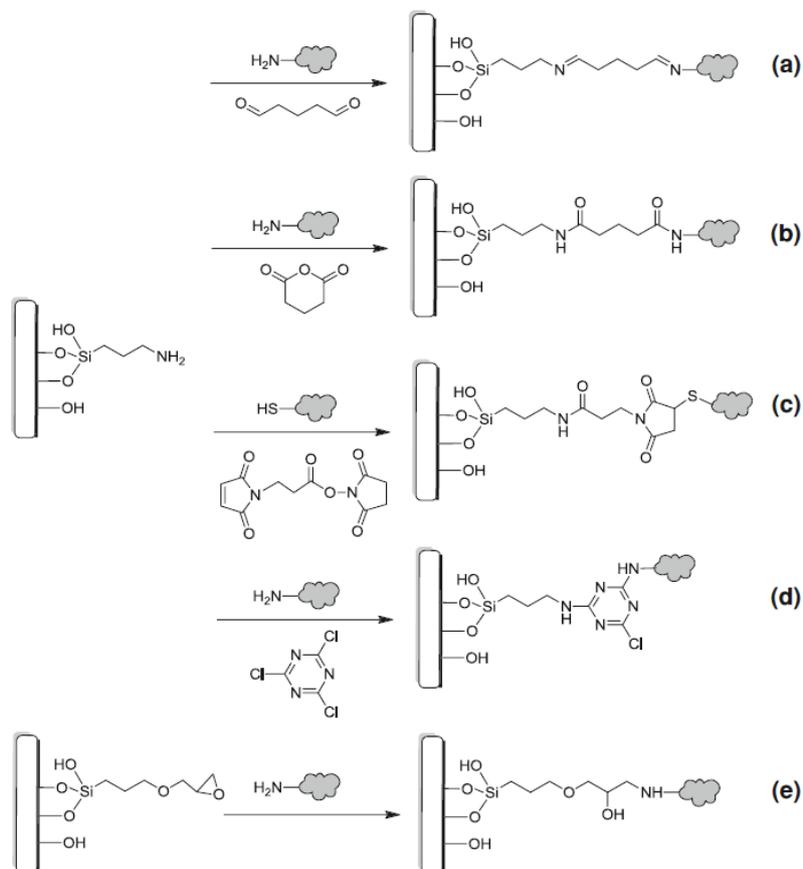


Figure 23: Différentes voies pour l’immobilisation covalente d’enzymes, via leurs groupements -NH₂ ou -SH de surface, sur un support fonctionnalisé [98]

- **Cas 1 : Greffage sans agent de couplage**

Comme montré Figure 23e. les groupements époxyde du 3-Glycidoxypropyl-triméthoxysilane (GTS) réagissent facilement avec les fonctions -NH₂ des enzymes en conditions douces [129, 130]. Jung et *al.* [130] se sont rendus compte que, selon l’enzyme utilisée, l’agent de fonctionnalisation de surface pouvait altérer l’activité enzymatique. En effet, en immobilisant deux enzymes différentes, la GOx et la chloroperoxydase (CPO), sur un matériau SBA-15 fonctionnalisé par le groupement époxy GTS, la CPO perdait son activité contrairement à la GOx. Ils expliquent cela par la réactivité trop importante des groupements époxy qui se liaient sur plusieurs sites de la CPO, dont la structure quaternaire serait plus sensible. Le greffage d’enzymes via des groupements époxyde [107, 131-133] utilisant un

copolymère macroporeux (Figure 24) commercialement disponible, par exemple l’Eupergit C® [134], a été reporté.

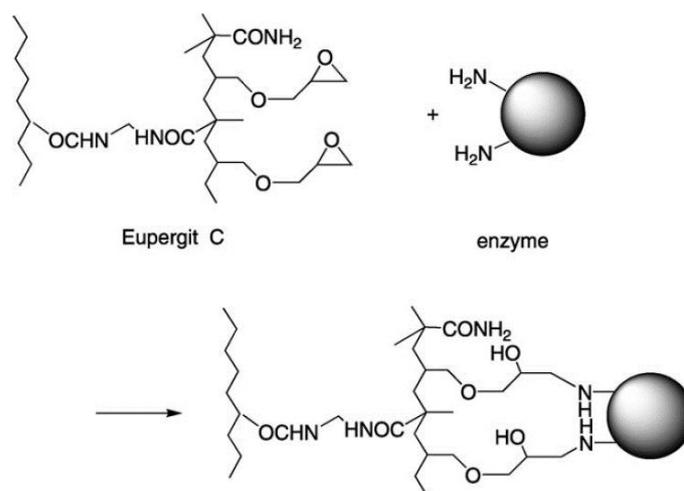


Figure 24: Immobilisation d'enzymes sur l'Eupergit C

Une autre méthode directe de greffage consiste à oxyder les carbohydrates sur la surface périphérique de la GOx en aldéhydes à l’aide d’oxydants doux tels que les ions periodate [135], permettant ainsi de conserver l'activité de la GOx [136]. Ces groupements aldéhyde de la GOx oxydée sont alors susceptibles de réagir avec les amines en surface du support pour former une liaison imine.

- **Cas 2 : Greffage avec agent de couplage**

a) Rôle de « linker »

Dans le cas où l’agent de couplage sert de *linker*, un certain nombre d’atomes de carbone sont ajoutés à la liaison support/protéine. Un des réactifs très utilisé pour le greffage d’enzymes avec les supports siliciques est le glutaraldéhyde (GA) qui, en tant que dialdéhyde, fait interagir les amines de surface de la protéine et celles ajoutées sur le support [117, 125, 130, 137, 138] (Figure 23 a). Comme montré respectivement Figure 23 b, c, d. l’anhydride glutarique (GAC), le succinimide-3-maléimidopropanoate (SMP) ou le chlorure cyanurique peuvent également être utilisés comme *linkers*.

Kao et *al.* ont montré que la nature du *linker* (GAC, SMP ou GA) utilisé pour immobiliser le cytochrome *c* (cyt *c*) sur un matériau silicique mésoporeux fonctionnalisé par des amines (IBN4-N) pouvait jouer sur l’orientation de l’enzyme et donc sur son activité [139]. Pour cela ils ont imaginé la structure de l’enzyme comme si celle-ci était contenue dans une boîte cubique présentant donc différentes « facettes » avec différentes charges nettes de surfaces (liées aux acides aminés présents en surface sur chaque facette fictive). La Figure 25 résume les différentes orientations de l’enzyme selon le *linker* utilisé. Par exemple, lorsque le cyt *c* est immobilisé sur IBN4-N-SMP, un seul groupe mercapto (issu d’une cystéine) est disponible en surface de la protéine pour former une liaison C-S avec le groupe SMP fonctionnalisés sur le support. Etant donné que cette cystéine se situe uniquement sur l’extrémité terminale d’une hélice, une seule possibilité d’accroche est envisagée et la protéine sera immobilisée de telle sorte que le site actif sera loin de la paroi de silice. Moins de gêne stérique permettra au substrat une totale accessibilité au site actif (Figure 25B). Dans le cas d’IBN4-N-GAC, l’interaction électrostatique sera le facteur dominant dans la détermination de l’orientation du cyt *c*. La facette du cyt *c* la plus chargée positivement sera celle attirée par les carboxylates chargés négativement dans

l'échantillon IBN4-N-GAC, ayant pour effet d'orienter le site actif à proximité de la surface de la silice et de bloquer partiellement son accessibilité (Figure 25A). Concernant l'immobilisation sur IBN4-N-GA, l'aldéhyde du glutaraldéhyde n'a pas d'interactions électrostatiques fortes avec les groupements amine, de sorte que le site de liaison sera aléatoire (Figure 25C).

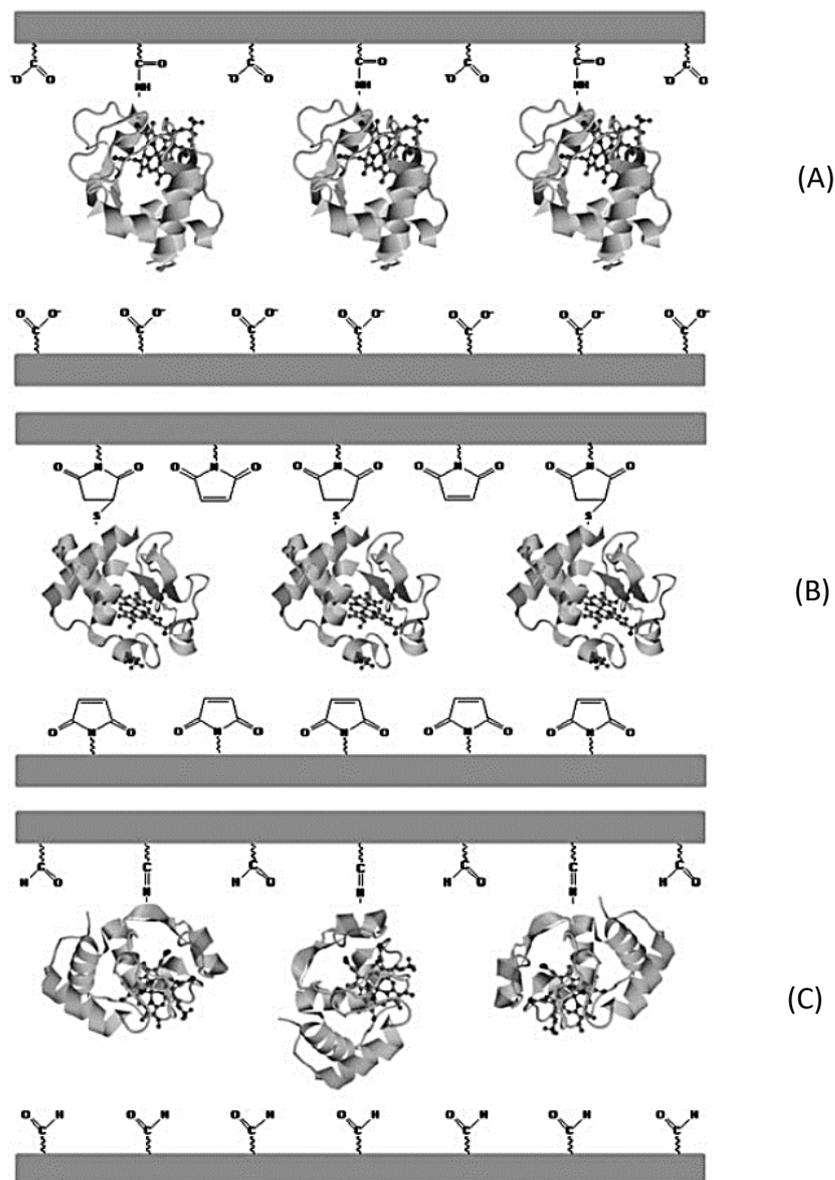


Figure 25: Orientation et liaison spécifique du cytochrome c sur (A) IBN4-N-GAC: le site actif (hème) se trouve à proximité de la paroi de silice (B) IBN4-N-SMP: le site actif est dirigé loin de la paroi de la silice et (C) IBN4-N-GA: l'orientation du site actif est aléatoire [139]

Des mesures par spectroscopie d'électron à résonance paramagnétique (EPR), permettant d'établir l'état de spin de l'hème, ont même permis de vérifier la covalence de la liaison entre l'enzyme et l'intérieur des pores du matériau mésoporeux.

Concernant la GOx, dans certains travaux, cette dernière a été immobilisée sur une mousse mésoporeuse à larges cellules (LMCFs), fonctionnalisée grâce à l'APTES et en utilisant le glutaraldéhyde (Figure 26) afin de transformer les $-NH_2$ en surface du support en aldéhydes. En considérant les travaux de Kao et *al.* présentés ci-dessus, ceux-ci réagiront ensuite avec les amines de l'enzyme, de manière aléatoire.

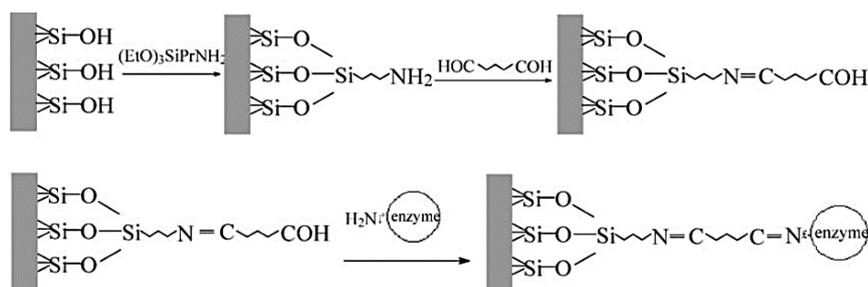


Figure 26: Mécanisme de greffage de la GOx sur LMCfs fonctionnalisée -NH₂ utilisant le GA [140]

Il existe donc une grande variété de *linkers*, qui diffèrent par leur nature et les liaisons mises en jeu. Selon l’enzyme utilisée, ceux-ci peuvent influencer sur son orientation en surface du matériau et donc sur son activité. De plus, en prenant l’exemple du glutaraldéhyde, en tant que composé bi-fonctionnel son utilisation peut poser un certain nombre de difficultés liées à des réactions secondaires. Il peut en effet interagir une seconde fois avec la surface ou contribuer à réticuler l’enzyme.

b) Rôle d’agent de couplage « activateur »

Une autre forme courante de bioconjugaison fait intervenir l’EDC (N-Ethyl-N’-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide sous forme de chlorhydrate) et le N-Hydroxysuccinimide (NHS) comme agents de couplage [134, 141-145] afin d’activer une fonction acide carboxylique et permettre le greffage covalent de l’enzyme par formation d’une liaison amide (Figure 27). Plus précisément, l’EDC active les fonctions carboxyliques de la GOx en formant un intermédiaire hautement réactif, puis le NHS permet de former un dérivé d’acide plus stable, mais suffisamment activé pour réagir avec les fonctions amines du support. Le greffage de fonctions carboxylique sur la surface du support, réagissant avec les fonctions amine de la GOx est également possible. Cette technique peut conduire, parallèlement à l’O-acylurée recherchée, à la formation d’une N-acylurée inactive vis-à-vis des fonctions -NH₂ de surface (cf. Figure 27).

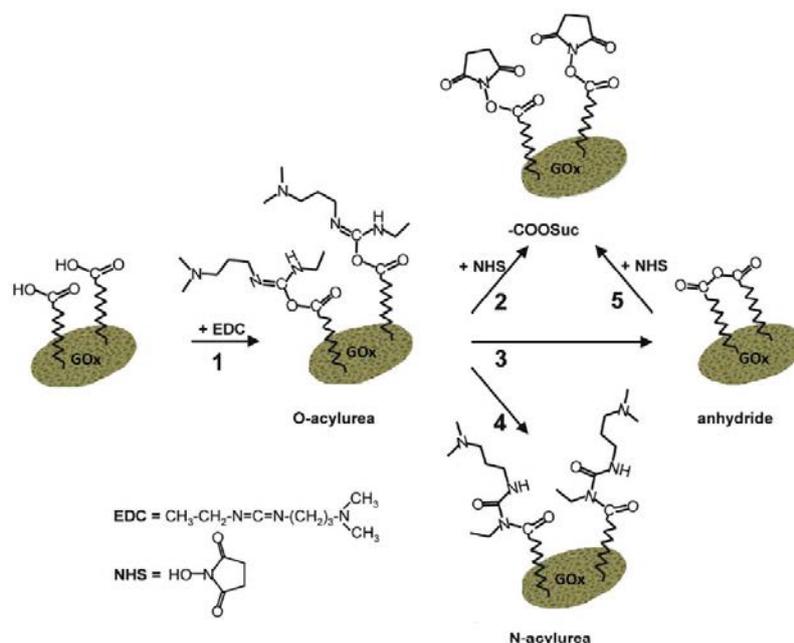


Figure 27: Différents groupements en surface de la GOx possiblement formés lors de l'activation de cette dernière par EDC/NHS [143]

Elle peut toutefois être optimisée [143], comme montré Figure 28, grâce au diagramme établi par Sam et *al.* Les limites des zones sont obtenues à partir de l’analyse infra-rouge de surface de silicium fonctionnalisé avec des groupements carboxyliques et activés avec EDC/NHS. Chacune des trois premières zones correspond à la présence de la signature d’un produit donné, comme indiqué sur la légende de droite.

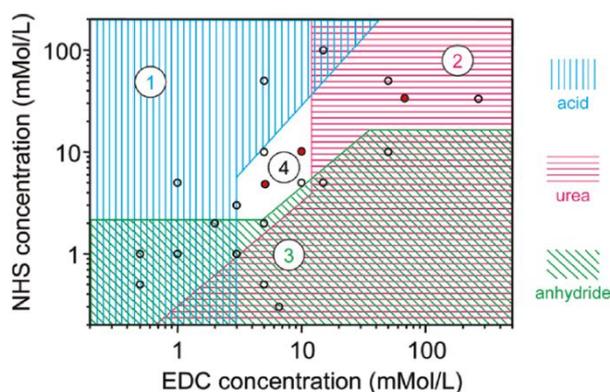


Figure 28: Diagramme présentant la composition de la surface d’une plaque de silicium recouverte d’une couche de silice poreuse, après une activation de 90 min dans des solutions EDC/NHS de diverses compositions [143]

Les conditions optimales correspondent à la zone 4 au centre du graphique, pour laquelle l’ester succinimidyl est formé.

La littérature rapporte de nombreux exemples d’amélioration des performances catalytiques d’une enzyme immobilisée par la voie covalente, notamment en termes de stabilité au stockage, à la température, aux solvants, à une gamme de pH importante et au lessivage de l’enzyme. L’immobilisation covalente par le GA de la trypsine sur un support silicique mésoporeux de type MCF amino-fonctionnalisé montre une activité relative, après 10 h de stockage à 60°C (pH = 7,8), de 0,5 contre moins de 0,2 lorsqu’elle est libre. [125]. Puisque l’activité d’une enzyme est liée à la stabilité de sa structure, l’immobilisation peut ainsi permettre de la rigidifier, notamment si elle se fait de manière covalente en plusieurs points d’un support [146], suffisamment rigide et avec un *linker* court. Cela pourrait expliquer la stabilité thermique accrue observée pour la GOx immobilisée sur des supports siliciques amino-fonctionnalisés ou polymériques comparée à la GOx libre [123, 145, 147, 148]. Une telle propriété a également été observée pour d’autres enzymes telles que la trypsine, la CPO, l’invertase, et la penicilline G acylase [130, 137] [125, 149]. Pour les enzymes dimériques telle que la GOx, l’immobilisation permettrait aussi d’éviter la dissociation du dimère, et donc la perte de l’activité de l’enzyme (Figure 29) [150].

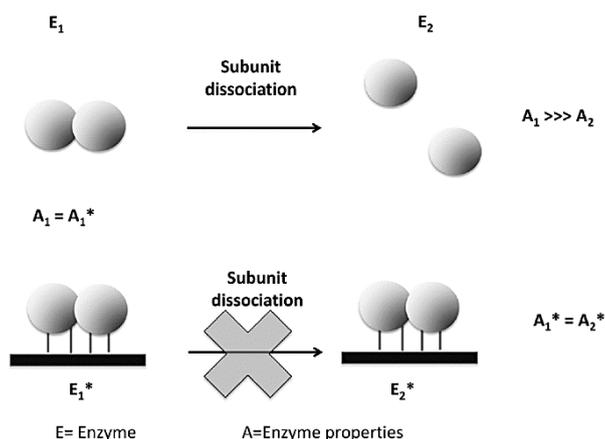


Figure 29: Prévention par l'immobilisation de la dissociation des unités d'une enzyme [151]. Les propriétés enzymatiques de départ (A_1) sont beaucoup plus élevées que celles après dissociation (A_2).

Dans certains cas on observe, après immobilisation, un élargissement de la gamme de pH dans laquelle l'enzyme est active ou une amélioration de l'activité en fonction du pH. Par exemple, sur une gamme de pH comprise entre 2 et 8, l'activité de la CPO immobilisée sur un matériau SBA-15 amino-fonctionnalisé grâce au GA, est plus élevée que celle de l'enzyme libre. Les conversions en indole catalysées par l'enzyme immobilisée sont de 80% (pH = 2) et 39% (pH = 8) contre 40% (pH = 2) et 20% (pH = 8) avec l'enzyme libre [130].

Les enzymes sont également particulièrement sensibles aux solvants organiques [73-75]. Aussi, leur insertion dans les pores d'un support peut être avantageuse, puisque le confinement résultant peut conférer à ces dernières un milieu protecteur face à leur environnement. Une étude de la GOx immobilisée de manière covalente sur différentes particules polymériques, a montré une stabilité élevée en présence de EtOH/tampon phosphate (pH = 7, 25 mM) (v/v) 50 : 50 et H_2O_2 [117]. Par exemple, après 20 h de stockage en présence de 20 mM de H_2O_2 , la GOx immobilisée de manière covalente montre une activité résiduelle de 100%, contre 80% pour celle immobilisée par interaction électrostatique et 50% pour l'enzyme libre. L'immobilisation peut également éviter que l'exposition de l'enzyme à des contraintes de cisaillement trop importantes, n'entraîne la dénaturation de la protéine.

Tout comme l'immobilisation influe sur l'accessibilité du site actif de l'enzyme, elle peut également influencer l'accessibilité des sites d'inhibition et donc diminuer ces effets (Figure 30 ci-après). Il a par exemple été montré que l'inhibition de β -galactosidase par le galactose pouvait être réduite en bloquant partiellement les sites d'inhibition ou en entraînant une légère distorsion de l'enzyme par immobilisation [152].

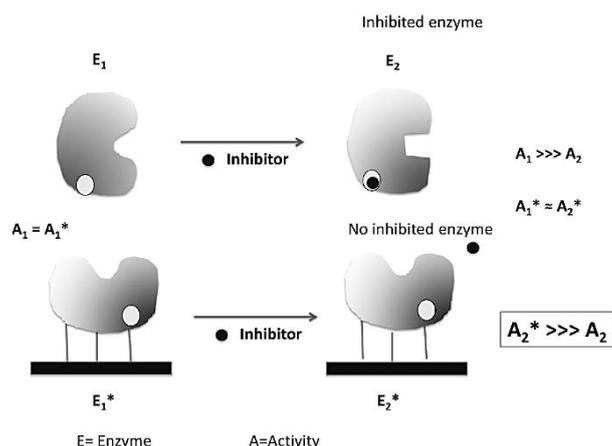


Figure 30: Parade contre l'inhibition d'enzymes grâce à l'immobilisation (* : après immobilisation) [151]

Enfin, l'immobilisation d'enzymes présente l'avantage de permettre une réutilisation simple de celles-ci et donc la mise au point de bioréacteurs efficaces [153]. Récemment, une étude sur le captage du CO_2 grâce à la bovine carbonic anhydrase (BCA) a montré qu'après son immobilisation covalente avec le GA sur une silice SBA-15 amino-fonctionnée, l'enzyme conservait 85% de son activité initiale après 10 cycles d'utilisation [154].

2.1.4. Immobilisation d'enzyme par réticulation : CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*)

Les CLEAs ont été développés progressivement grâce aux travaux de Sheldon [111]. Cette technique consiste à agréger les enzymes à l'aide d'un agent précipitant (sels, solvant, polymère), puis à stabiliser ces agrégats en ajoutant un agent réticulant bifonctionnel tel que le GA, comme montré Figure 31 (à gauche) [127]. Les premiers exemples de CLEAs contenaient de la pénicilline G amidase, utilisée industriellement dans la synthèse de la pénicilline et des antibiotiques céphalosporines. L'inconvénient de cette enzyme est sa faible stabilité thermique et dans les solvants organiques [155]. La formation de CLEAs à partir de la pénicilline G amidase a permis d'augmenter la productivité relative de la synthèse de l'ampicilline de 100 à 151 comparé à l'utilisation de son analogue libre. La réticulation d'enzymes permet de proposer des systèmes dépourvus de supports [156]. Le GA est généralement utilisé comme agent de réticulation puisqu'il est commercial et peu cher, mais d'autres agents de réticulation sont possibles. Mateo et *al.* [157] ont précipité plusieurs enzymes dont la pénicilline G acylase, ainsi qu'une hydroxynitrilelyase, une alcool déshydrogénase et deux nitrilases dans du diméthoxyéthane et ont comparé l'utilisation de GA et de polyaldéhyde dextrane comme agent de réticulation. Pour chacune des enzymes, l'activité récupérée après formation des CLEAs est meilleure lorsque le polyaldéhyde dextrane est utilisé. Les auteurs ont expliqué cela par le fait que cette macromolécule permet de conserver une quantité plus importante de sites actifs disponibles, puisque les dimensions importantes du polyaldéhyde l'empêchent de pénétrer dans les sites actifs des protéines et d'interagir avec des acides aminés à l'intérieur. De plus, dans le cas de deux nitrilase⁸ et de l'alcool déshydrogénase⁹, l'utilisation de cet agent permet d'obtenir des CLEAs actifs avec 50%, 60% et 10% d'activité respectivement, tandis que les agrégats réticulés avec le GA sont inactifs.

⁸ nitrilase *Ps. Fluorescens* et *BioCatalytics* 1004

⁹ alcool déshydrogénase *L. brevis*

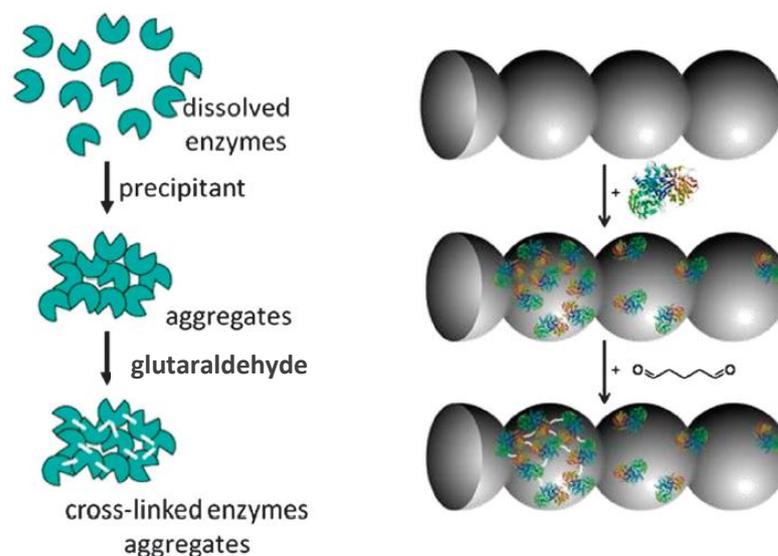


Figure 31: Formation de CLEAs en solution (à gauche) et dans les pores d'un support approprié (à droite) [127]

La formation des CLEAs fait intervenir principalement les amines des résidus de lysine sur la surface externe de l'enzyme et donc, pour chaque enzyme, la formation des agrégats sera différente. Les enzymes de point isoélectrique faible contiennent peu de résidus lysine par rapport aux résidus carboxyliques sur leur surface et, par conséquent, la réticulation peut être moins efficace. La coprécipitation de ce type d'enzymes avec un polymère contenant de nombreuses fonctions amine (exemple : poly-L-lysine ou polyéthylène imine) ou même une seconde protéine avec plusieurs résidus lysine telle que l'albumine de sérum bovin (BSA), permet de compenser ce manque [155].

Les CLEAs permettent d'associer différentes enzymes de manière simple, on parle de combi-CLEAs, et de récents développements associent les CLEAs aux méthodes d'encapsulation dans un support poreux silicique ou polymérique. La GOx a d'ailleurs été réticulée à l'aide de l'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDAC) en présence de chitosane avec deux autres enzymes simultanément, une laccase et une peroxydase, afin de former des CLEAs pour l'élimination de produits pharmaceutiques [158]. Sur les supports siliciques, la première étape de la formation des CLEAs est l'adsorption de l'enzyme sur le matériau. De cette manière Kim *et al.* [159] ont immobilisé l' α -chymotrypsine et la lipase sur une silice de type mésocellulaire à l'aide de GA. Ils ont remarqué que les enzymes formant des CLEAs présentaient une immobilisation en plus grande quantité, ainsi qu'une meilleure stabilité à l'agitation et à la digestion par la trypsine¹⁰, comparée à celles uniquement adsorbées sur le support ou libres. Jung *et al.* ont aussi beaucoup étudié les CLEAs de chloroperoxydase et GOx immobilisées dans des supports de types MCF [160-162] et SBA-15 [101, 130]. L'optimisation des paramètres influençant l'immobilisation des enzymes leur a permis d'établir qu'avec un début de réticulation 2 h après l'adsorption des enzymes sur le support et un rapport molaire GA/GOx > 400, la conversion de l'indole lors de son oxydation est de 92% et la sélectivité en 2-oxindole > 99%. Ces études ont rapporté l'amélioration de la stabilité des CLEAs insérés dans un matériau et l'efficacité supérieure des combi-CLEA comparée aux enzymes séparées dans un mélange. Une explication possible est que la proximité des enzymes à l'intérieur du combi-CLEA est plus favorable pour le transfert des substrats des unes aux autres [155]. Comme le résume Sheldon dans sa

¹⁰ La trypsine est une protéase impliquée dans l'hydrolyse de liaisons peptidiques

revue : « en considérant leur facilité de préparation et le bon maintien de l'activité enzymatique après réticulation, les CLEAs ont un réel potentiel au niveau industriel [111] ».

2.1.5. Immobilisation de la GOx via son cofacteur

Une méthode de greffage plus originale, parce que spécifique, consiste à immobiliser la GOx via son cofacteur FAD. Cette approche a été mise en œuvre avec plusieurs oxydases [163-165], notamment la glucose oxydase [163, 166-171] et appliquée au domaine des biocapteurs et biopiles puisqu'elle permet de maîtriser l'orientation du centre redox de l'enzyme par rapport à l'électrode, afin que le transfert d'électrons soit le plus direct et rapide possible [165, 166, 171].

Dans un premier temps, cette technique consiste à séparer la protéine de son cofacteur, le FAD lié de manière non covalente, pour donner l'apo-GOx. Le FAD est ensuite greffé à la surface du solide, puis mis en contact avec l'apo-GOx afin que la protéine se reconstitue autour du FAD. La séparation de la GOx se fait à basse température (< 0°C) et à pH très acide (autour de 1,5) afin d'« ouvrir » la protéine. Puis, la présence de sulfate d'ammonium saturé permet de la faire précipiter [172]. Cette étape doit cependant s'effectuer assez rapidement, afin de ne pas dénaturer la protéine. La GOx est ensuite reconstituée en présence du support fonctionnalisé par greffage covalent du FAD. Plusieurs méthodes de greffage du FAD ont été proposées. L'une d'elles consiste à modifier le cofacteur en fonctionnalisant un des atomes d'azote de l'adénine du FAD par un groupement aminoéthyle, afin de produire le N⁶-(2-aminoéthyl)-FAD [173]. Ce FAD ainsi modifié peut ensuite être lié à une surface fonctionnalisée à l'aide d'agents de couplage ou en l'associant à une molécule relais pour faciliter la communication électrique, dans le cas d'un usage pour les biopiles ou biocapteurs. Willner et *al.* [174] ont ainsi testé deux voies de reconstitution principales présentées ci-dessous. La première, Figure 32, consiste à fonctionnaliser le FAD-NH₂ par un groupement ferrocène pour former le FAD-Fc. La GOx est reconstituée en présence de FAD-Fc et d'apo-GOx. Ensuite, une monocouche de cystamine est déposée sur une électrode d'or afin de générer une charge positive en surface qui interagira de manière électrostatique avec la GOx reconstituée. Ici l'enzyme est dans un premier temps reconstituée, puis interagit avec la surface fonctionnalisée.

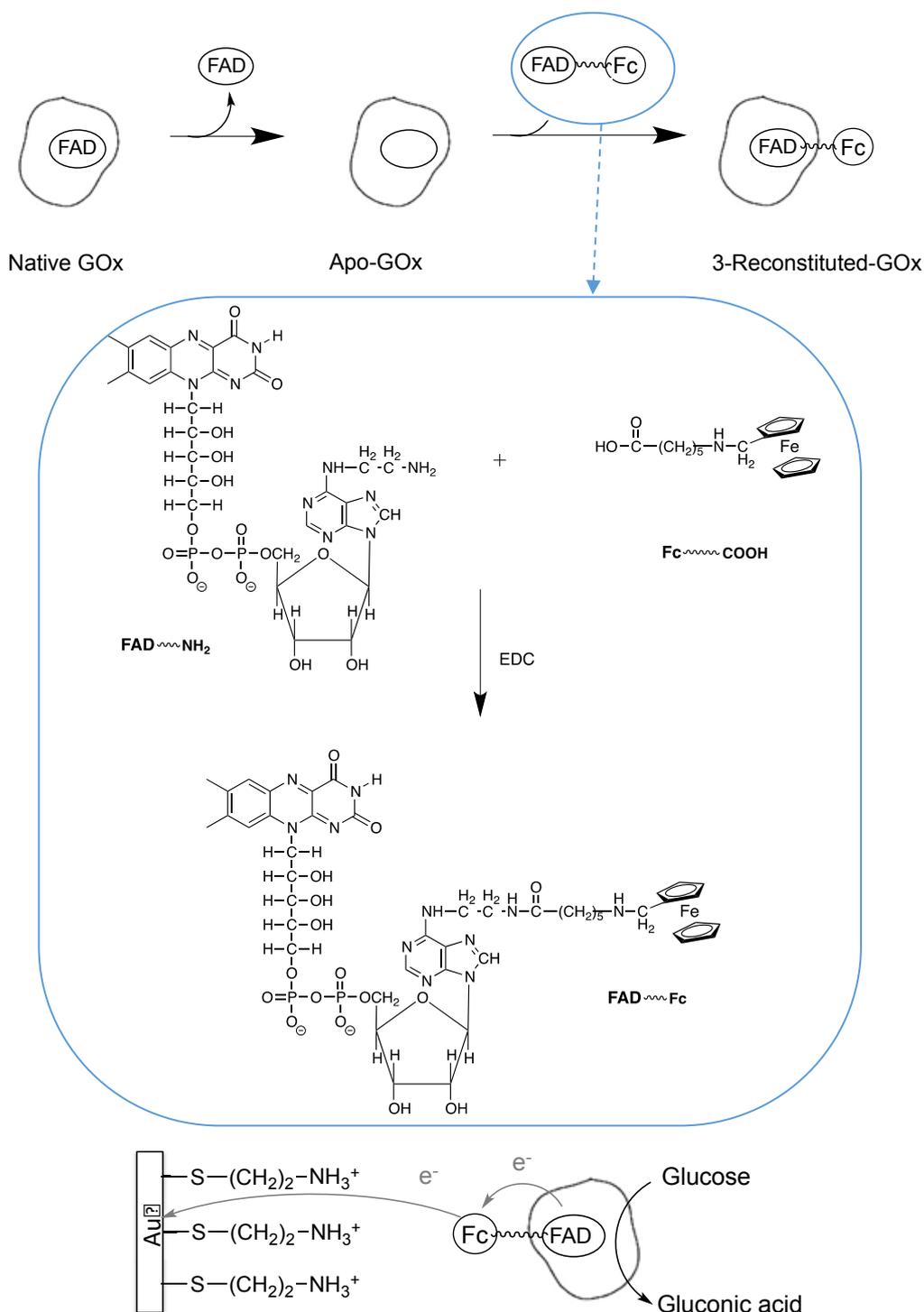


Figure 32: Contact électrique entre la GOx reconstituée avec un cofacteur FAD-Fc et l'électrode d'or présentant une monocouche de cystamine [166]

La comparaison des constantes cinétiques observées k_{obs} , correspondant au transfert intramoléculaire des électrons entre le FADH₂ réduit et le cation ferrocène le plus proche, a montré que $k_{obs} = 40 \text{ s}^{-1}$ pour la GOx reconstituée sur le FAD-Fc. Par opposition, une étude portant sur la GOx modifiée de manière aléatoire en surface avec le même groupement ferrocène a abouti à une constante maximale $k_{obs} = 0,90 \text{ s}^{-1}$ [175]. A partir de ces valeurs, les auteurs remontent, grâce à la théorie de transfert d'électron de Marcus [176], à une distance entre le FADH₂ et le plus proche accepteur

d’électron de 19 Å pour l’enzyme reconstituée, contre 21,5 Å pour celle dont le Fc a été greffé aléatoirement. Le chemin électronique est donc plus court.

La Figure 33 montre une autre reconstitution de GOx sur électrode d’or menant à une immobilisation covalente de la protéine.

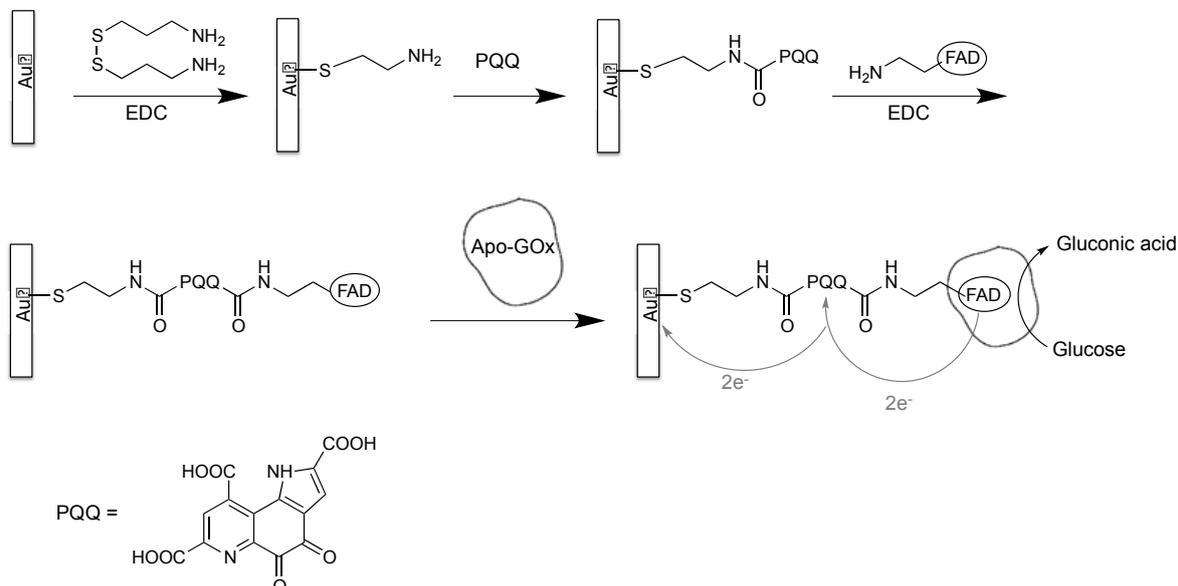


Figure 33: Reconstitution de la glucose oxydase sur une monocouche PQQ-FAD (quinone pyrroloquinoline –FAD) déposée sur une électrode d’or et oxydation directe du glucose par l’électrode modifiée [166].

La monocouche de cystamine sur l’électrode d’or est couplée de manière covalente à la quinone pyrroloquinoline (PQQ), qui à l’aide d’EDC est greffée au FAD modifié (FAD-NH₂). La GOx, comme précédemment, vient se reconstituer autour du FAD greffé.

Une autre manière d’immobiliser le FAD consiste à utiliser un acide boronique déposé sur la surface et à le lier aux hydroxyles du FAD, donc sans modification du cofacteur. Senel et *al.* [167, 177] ont ainsi procédé à un électrodépôt de polyacide boronique aniline (PABA) ou polyacide boronique triophène (PTBA) (Figure 34), pour un biocapteur de glucose.

La GOx reconstituée sur ce type d’électrode présente une constante apparente K_M de 2,98 mM contre 33 mM pour la GOx libre, ce qui reflète une meilleure affinité du glucose avec l’enzyme. Cela pourrait être expliqué par une orientation privilégiée du site actif de l’enzyme. Couplé à la présence de la couche de PTBA, le transfert électronique s’effectue plus facilement et rapidement entre l’enzyme et l’électrode. Les auteurs supposent donc que cet effet pourrait accélérer la régénération de la GOx et augmenter l’activité relative de l’enzyme.

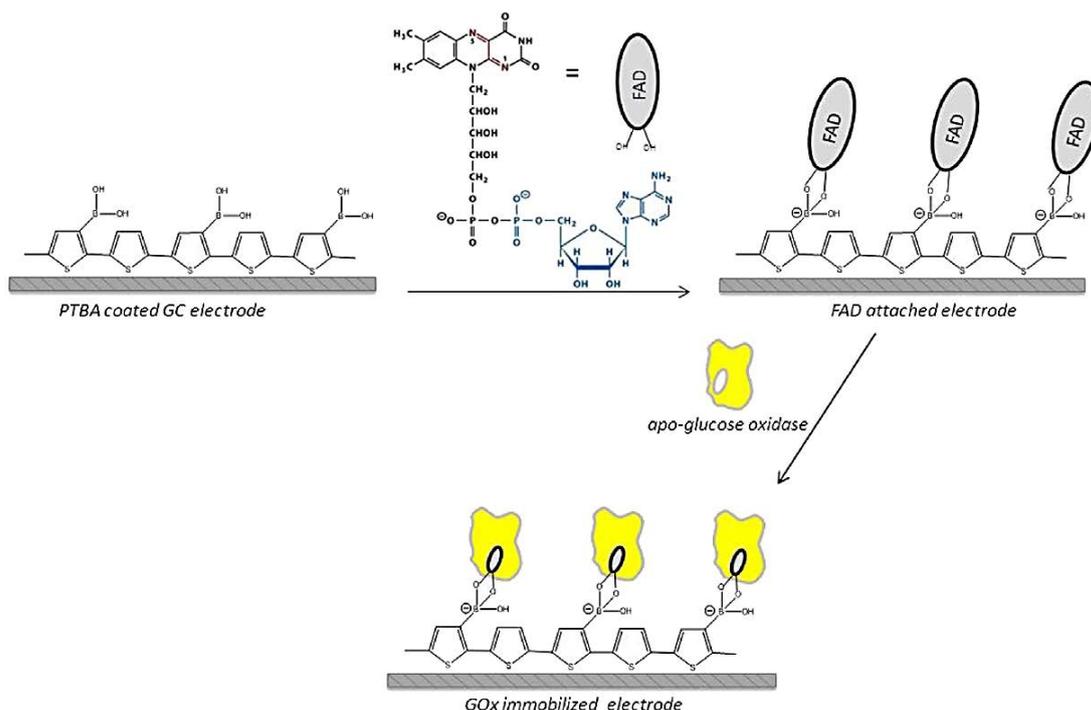


Figure 34: Préparation de la monocouche de FAD et reconstitution de la GOx sur l'électrode de carbone vitreux recouverte de la couche PTBA-FAD [167]

Pour conclure, il a été montré que l'immobilisation d'enzymes permet de faciliter leur récupération et leur réutilisation, d'améliorer leur stabilité (thermique, pH, solvant...) et donc de travailler dans des environnements plus rudes. Plusieurs techniques d'immobilisation, que sont l'encapsulation, l'adsorption, le lien covalent, la réticulation (CLEAs) ou même la reconstitution sont envisageables. La viabilité des biotransformations au niveau industriel est régie par les coûts liés à la contribution de l'enzyme. L'immobilisation permet alors de développer des technologies qui, en plus de fournir des biocatalyseurs stables et actifs, peuvent être facilement mis en œuvre puisqu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'enzymes très pures. Les enzymes étant toutes différentes avec leurs particularités bien précises, il est impossible de trouver une solution d'immobilisation unique. Celle-ci dépendra donc de l'enzyme utilisée et de l'application visée.

2.2. Les différents supports utilisés pour l'immobilisation d'enzymes

Si de nombreux types de supports ont été utilisés pour immobiliser les enzymes, ils doivent tous être thermiquement, mécaniquement et chimiquement stables et insolubles dans le milieu utilisé pour l'immobilisation et l'application désirée. Ils doivent également être adaptés à l'enzyme pour une immobilisation optimale, n'entraînant pas sa dénaturation ou désactivation.

Dans différentes revues, Sheldon [111, 155] présente différents supports possibles pour l'immobilisation d'enzymes, classés en trois principales catégories : les polymères (synthétiques, naturels), les matériaux inorganiques et les nanoparticules inorganiques hybrides. D'autres supports récemment utilisés et dont nous ne ferons pas état ici sont constitués de microcristaux inorganiques possédant un revêtement protéique (PCMCs [178]).

2.2.1 Les polymères (synthétiques, naturels)

Parmi les polymères organiques synthétiques, ce sont principalement les polymères de type résine acrylique, tels que les Amberlites® qui se sont imposés car plusieurs sont commercialement disponibles. Certaines enzymes comme la lipase B de *C. antarctica* sont vendues directement adsorbées sur une résine acrylique macroporeuse (Novozyme 435). L’Eupergit®C, qui est une résine N,N'-méthylène-bis(acrylamide) comportant des groupes époxydes, est également utilisée pour l’immobilisation d’enzymes [179-181] dont la glucose oxydase [134]. Cette résine a l’avantage d’être chimiquement et mécaniquement stable sur une gamme de pH comprise entre 0 et 14, sans gonfler ou se rétracter. Elle se présente sous forme de particules de 170 µm avec des pores de 25 nm. Le principe d’immobilisation entre une enzyme et la résine non modifiée est présentée Figure 35.

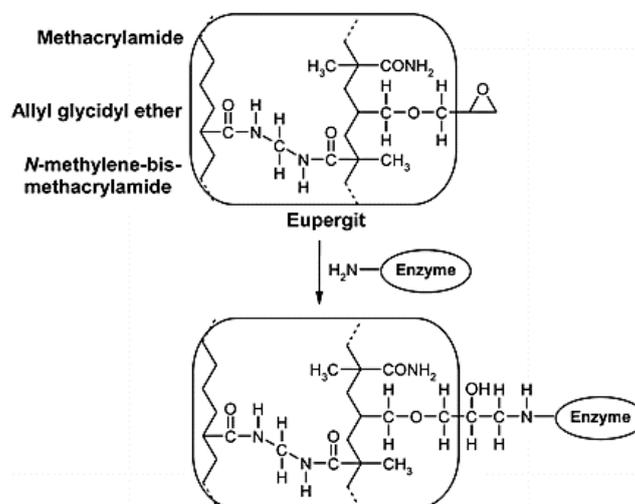


Figure 35: Immobilisation covalente directe d’une enzyme sur une résine Eupergit®C [182]

Un traitement avec de l’éthanolamine permet de passiver les fonctions époxyde n’ayant pas réagi. Il est également possible de fonctionnaliser ce genre de résine (qui aura préalablement réagi avec de petits composés diamminés, comme le 1,2-diaminoéthane) avec un bras espaceur tel que le glutaraldéhyde, qui réagira avec les amines de surface des enzymes. La même résine prétraitée au 1,2-diaminoéthane pourra réagir également avec une enzyme oxydée par le periodate comme montré Figure 36.

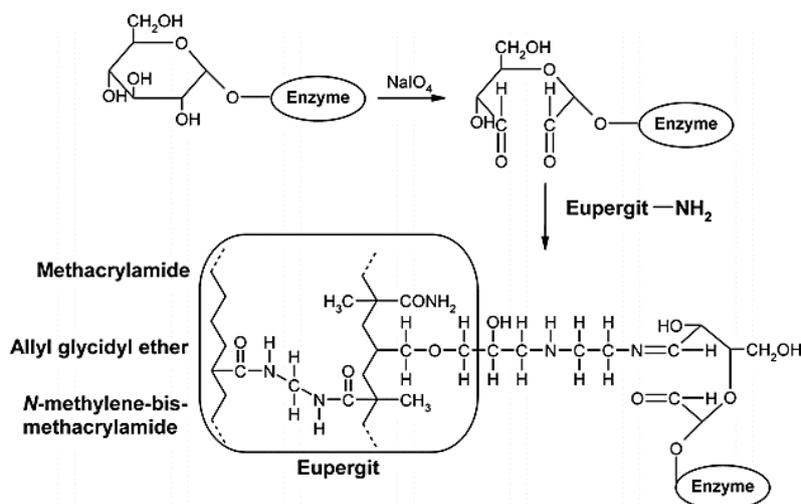


Figure 36: Immobilisation covalente d’une enzyme oxydée par le périodate sur une résine Eupergit®C aminée [182]

La pénicilline amidase immobilisée sur Eupergit[®]C est industriellement viable, puisqu’après plus de 800 cycles de réaction, celle-ci présente encore 60% de son activité initiale [183]. Des résines polyméthacrylate de type Sepabeads[®] revêtues par différentes fonctions (époxyde, amine) [184] [152, 185, 186] sont également disponibles sur le marché. Betancor et *al.* [117] ont utilisé des Sepabeads de type ECEP2 et EA (Resindion[®]) fonctionnalisées en surface par des groupements époxyde et amine respectivement, pour l’immobilisation de la GOx.

Des polysaccharides naturels tels que la cellulose, l’amidon, le collagène, la gélatine, le chitosane ou l’agarose [117, 147, 158, 187] sont également utilisés comme matrice d’immobilisation d’enzyme, dont la glucose oxydase. Ces matériaux issus de la biomasse sont très attractifs. L’alginate, polysaccharide issu d’algues brunes, est un polysel de calcium, sodium ou magnésium de l’acide alginique dont la formule est présentée Figure 37. Ce support très répandu a été par exemple utilisé par Palmieri et *al.* [188] pour immobiliser une phénol oxydase.

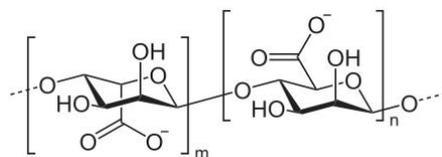


Figure 37: Alginate de sodium

Il est aussi possible d’associer deux biopolymères, comme l’ont fait Ehab et Mansoor [189] en mettant au point une microcapsule de type cœur-coquille dans laquelle l’enzyme β -galactosidase est immobilisée au niveau d’un cœur d’alginate lui-même recouvert d’une couche de chitosane réticulée avec du tripolyphosphate de sodium (Figure 38). Cette coquille permet le contrôle de la perméabilité des solutés. L’activité catalytique de l’enzyme ainsi encapsulée, mesurée à 4°C et 25°C dans du PBS¹¹ (pH = 7,4), est inférieure à l’enzyme libre. Les auteurs expliquent cela par la présence de la coquille solide intervenant au niveau de l’afflux du substrat et de l’écoulement du produit. Cependant, à 37°C, la tendance s’inverse. L’activité restante après 24 h est de 44% pour l’enzyme encapsulée contre 28% pour l’enzyme libre. Clairement, la présence de la coquille solide réduit la mobilité de l’enzyme, la protégeant ainsi des effets de l’environnement.

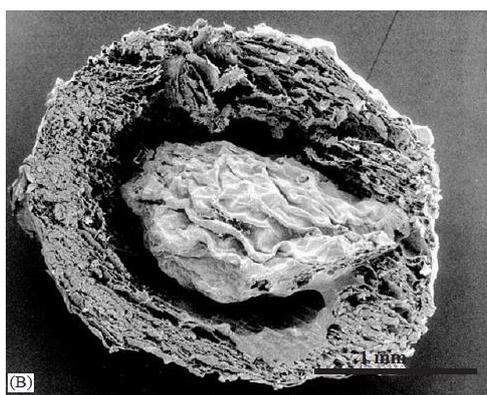


Figure 38: Microcapsule de β -galactosidase immobilisée dans une matrice d’alginate recouverte d’une coquille de chitosane [189]

Des supports biocomposites sont également utilisés, dont un exemple est présenté Figure 39. Celui-ci est formé de nanocristaux de cellulose (CNC) et de nanoparticules métalliques (AuNPs par exemple),

¹¹ PBS : phosphate buffered saline

elles-mêmes facilement fonctionnalisables, grâce à des molécules soufrées [190]. Ce type de biocomposite permet d’augmenter la surface spécifique disponible pour l’immobilisation.

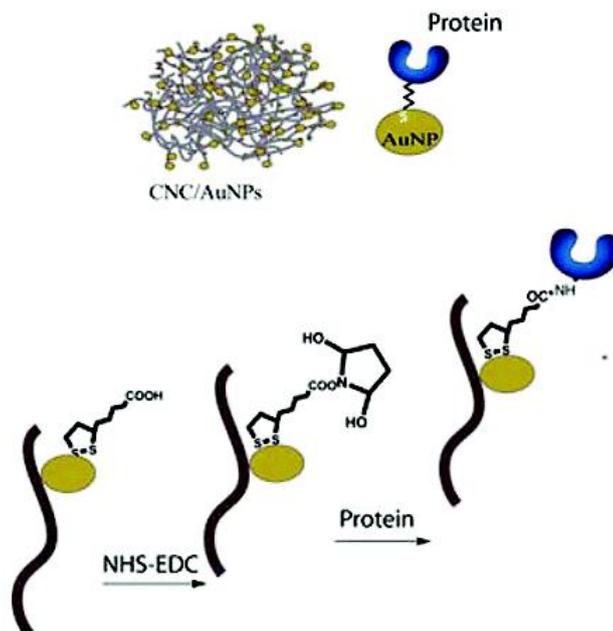


Figure 39: Biocomposite formé d’une matrice CNC/AuNPs pour l’immobilisation de cyclodextrine glycosyl transférase [190]

Finalement les polymères organiques synthétiques et bio-sourcés sont nombreux et très intéressants pour l’immobilisation d’enzymes, puisque simples d’utilisation. Cependant, rappelons que leur faible stabilité en milieu organique ou en température peut présenter un frein quant à leur utilisation industrielle pour des réactions s’effectuant dans des conditions rudes (voir Figure 19) [191].

2.2.2 Supports inorganiques

Les silices poreuses sont sans doute l’un des matériaux les plus fréquemment utilisés pour l’immobilisation d’enzymes, grâce à un coût faible et une grande facilité de fonctionnalisation. De plus, les différents matériaux développés dans ce domaine, notamment pour la catalyse, proposent un large panel de morphologies et de tailles de pores et ont l’avantage d’être inertes et stables à haute température et dans des milieux organiques variés. Cette partie ne traite que des supports qui peuvent être associés à des applications en catalyse hétérogène.

Des enzymes ont été immobilisées sur des zéolithes [192, 193], telle que la TS-1 sur laquelle Vennestrøm a notamment immobilisé la GOx [106]. Ce matériau cristallin titané présente une structure MFI¹² (Figure 40) qui lui confère un caractère hydrophobe marqué. La TS-1 est microporeuse avec une taille de pores de l’ordre de 0,5 nm de diamètre [194].

¹² MFI : Mordenite Framework Inverted

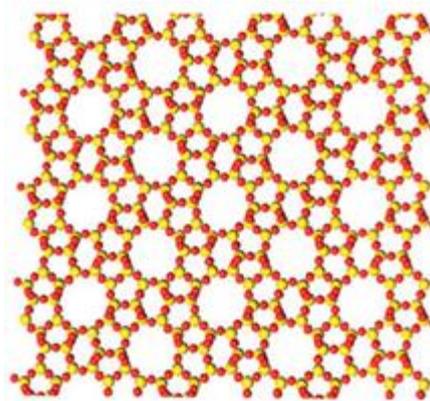


Figure 40: Structure MFI

Les zéolithes étant microcristallines, leurs pores ne dépassent pas 2 nm et ne sont pas accessibles à toutes les molécules et enzymes. La demande grandissante de supports accessibles à des molécules volumineuses a donné lieu à la mise au point de nouveaux matériaux hôtes tels que les FSM-*n* (Folded Sheet Materials). Ici, *n* correspond au nombre d’atomes de carbone contenus dans le surfactant utilisé en tant qu’agent porogène pendant la synthèse ($12 < n < 18$). Cette famille de matériaux mésoporeux mis au point par Kuroda et *al.* [195] en 1990 est synthétisée à partir d’une argile, la Kanémite (couche de silice lamellaire) et fait partie des premières présentant une distribution de taille de pores uniforme. L’échange ionique entre les cations hexadécyltriméthylammonium de l’argile et les molécules de tensioactif à longues chaînes lors de la synthèse a permis de réorganiser les couches silicique et ainsi de structurer les matériaux avec des pores de taille de plus en plus importante. Cette synthèse a ainsi ouvert la voie à la conception de nouveaux matériaux mésoporeux par l’équipe de Kresge [196] avec l’introduction de la famille des M41S, où l’on retrouve des matériaux plus connus comme MCM-41 (Mobil Composition of Matter No.41) ou MCM-48. Ces matériaux présentent des structures de pores hexagonale ou cubique, respectivement, grâce à l’utilisation lors de leur synthèse d’un surfactant cationique (le plus souvent du bromure de cetyltriméthylammonium ou CTAB) dans des gammes de concentrations différentes. Le principe de la synthèse de la silice MCM-41 est décrit Figure 41 ci-dessous. Les chaînes de surfactant s’organisent en micelles ou autres structures de type cristal liquide, puis le précurseur de silice est ajouté au système en milieu basique, s’hydrolyse et va donner lieu à des réactions de polymérisation autour des édifices organiques organisés, suivi d’un traitement hydrothermal. Finalement, une étape de calcination permettra la décomposition des molécules organiques de surfactant, libérant la porosité du matériau. Une silice aux mésopores structurés de façon hexagonale avec des pores de 2 à 6,5 nm de diamètre peut être obtenue par variation notamment de la longueur de chaîne des agents surfactants.

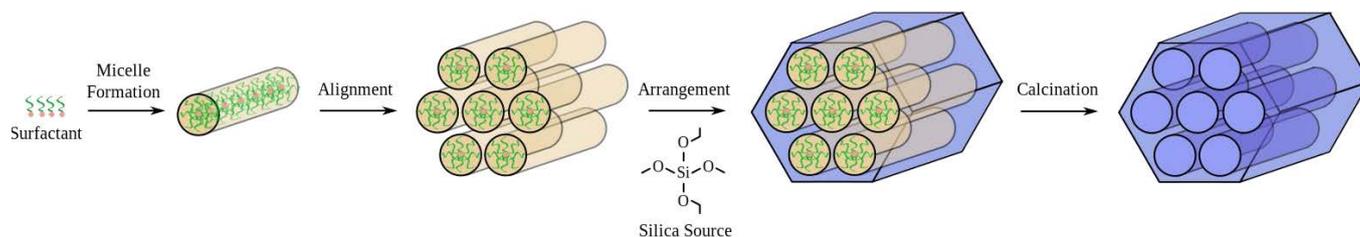


Figure 41 : Principe de la synthèse de de MCM-41 [197]

Les pores de ce type de matériaux sont alors accessibles à des protéines peu volumineuses, que l’on chercherait à y insérer.

En 1994, Huo et *al.* [198] mettent au point leur premier matériau mésoporeux, la silice SBA-1 (Santa Barbara Material No.1), présentant une structure tridimensionnelle cubique.

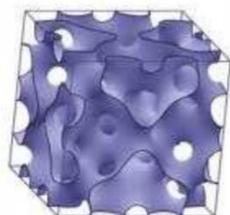


Figure 42 : Structure de la SBA-1 [199]

Le membre de la famille des silices SBA le plus utilisé à ce jour est la silice SBA-15 synthétisée en 1998 [200, 201]. Ce solide présente une structure hexagonale avec des mésopores plus grands que ceux de silice MCM-41 (compris entre 5 et 20 nm), interconnectés par des micropores. L’utilisation d’un copolymère triblock amphiphile, le Pluronic (ou P123) permet d’obtenir plusieurs formes de particules (sphère, bâtonnet, plaquettes...)(Figure 43), selon les conditions de synthèse.

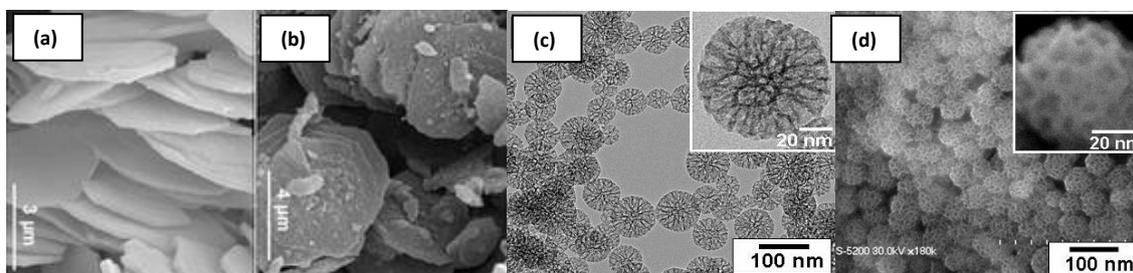


Figure 43 : Images MEB de plaquettes de SBA-15 (a)(b) [202] et image MET (c) et MEB (d) de particules de SBA-15 sphériques [203]

Jung et *al.* ont effectué plusieurs études ayant pour objectif de mélanger mécaniquement des silices SBA-15 sur lesquelles étaient immobilisées, par adsorption, soit de la GOx, soit de la CPO dans le but de réaliser l’oxydation d’indole [101, 130, 204]. Dans une de ces études [101], ils se sont intéressés plus particulièrement à l’immobilisation de la GOx et ont comparé plusieurs matériaux de type SBA-15 dont la température au moment de la synthèse hydrothermale est 100, 130 ou 150°C. Ces matériaux nommés respectivement SBA-15-100, SBA-15-130 et SBA-15-150 présentent des tailles de pores qui augmentent avec la température, soit 6,7 nm ($V_{\text{pore}}=1,12 \text{ cm}^3/\text{g}$), 8,2 nm ($V_{\text{pore}}= 1,14 \text{ cm}^3/\text{g}$) et 11,8 nm ($V_{\text{pore}}= 0,99 \text{ cm}^3/\text{g}$). Les activités retenues (par rapport à l’activité supposée introduite) pour ces trois matériaux sont respectivement 10, 13, et 26%. La quantité d’enzymes sur les matériaux semble donc augmenter selon l’ordre suivant : SBA-15-100 < SBA-15-150 < SBA-15-130. Cette tendance a été expliquée par une incorporation de la GOx facilitée dans des matériaux aux pores plus grands. Cependant, au vu de la taille de l’enzyme en question ($6,0 \times 5,2 \times 7,7 \text{ nm}^3$), les pores d’une silice SBA-15 sont tout juste assez grands.

Les mousses mesocellulaires ou MCFs qui sont des matériaux amorphes présentant de larges cellules sphériques (20-42 nm) interconnectées entre elles par des fenêtres communicantes (9-22nm), comme montré Figure 44, devraient permettre de résoudre ce problème. Celles-ci ont été synthétisées pour la première fois, en 1999, par l’équipe de Stucky [205].

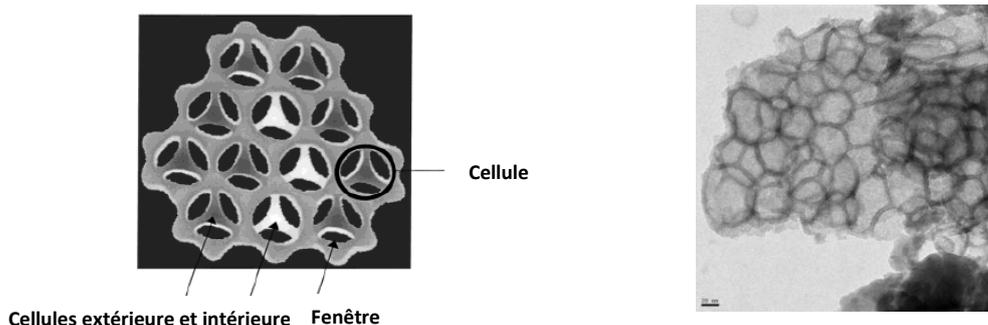


Figure 44 : Représentation schématique d'une silice MCF [205] (à gauche) et image MET d'une silice MCF (à droite) (échelle : 20 nm)

La synthèse de ce type de matériau utilise, comme dans le cas des silices SBA-15, du Pluronic 123 comme surfactant, mais l'ajout d'un agent destructurant particulièrement hydrophobe (le triméthylbenzène) va venir déstabiliser la structure des micelles, conduisant à la formation de cellules, couplée à une importante surface spécifique. Très rapidement, ces matériaux ont suscité un fort intérêt pour l'immobilisation d'enzymes et notamment la glucose oxydase [123, 145, 148, 161, 162, 206]. Contrairement aux silices MCM-41 ou SBA-15, la morphologie des MCFs, avec sa porosité importante composée de larges cellules et fenêtres, pourrait permettre d'améliorer la diffusion des substrats ou produits et d'introduire l'enzyme au sein du matériau.

Les études des mécanismes de structuration des matériaux mésoporeux conjuguées à l'utilisation d'autres surfactants ou d'autres conditions réactionnelles ont permis de développer de nombreuses autres familles de matériaux mésoporeux telles que les CMI (Chimie des Matériaux Inorganiques), FDU (Fudan University), KIT (Korean Institute of Technology), ou TUD (Technische Universiteit Delft) largement décrites dans une revue de Zhao et Wan [207].

2.2.3 Supports métalliques

L'utilisation de matériaux métalliques pour l'immobilisation d'enzymes est généralement liée aux applications concernant les dispositifs électroniques. Les applications premières de la GOx étant les biocapteurs et les biopiles, cette enzyme a donc beaucoup été immobilisée sur des matériaux conducteurs à base de carbone tels que des nanotubes de carbone [208-212] ou graphène [213, 214] et dernièrement sur des MCFs carbonées [206, 215-219]. Les nanomatériaux ont récemment suscité beaucoup d'intérêt en ce qui concerne l'immobilisation d'enzymes, puisqu'ils pourraient permettre d'augmenter leur charge en maximisant la surface fonctionnelle. Les nanoparticules, métalliques ou non, pourraient permettre de réduire les limites de diffusion et leur mobilité peut influencer sur l'activité inhérente des enzymes immobilisées en surface. La stabilité thermique et la résistance aux irradiations des nanoparticules, sont des caractéristiques favorisant leurs potentielles applications dans les photo-détecteurs, les cellules solaires, les biocapteurs, les nano-générateurs [220]. Dans leur revue de 2012, Ansari et Husain [221] référencient bon nombre de travaux d'immobilisation d'enzymes sur des nanoparticules de différents types comme les nanotiges, les nanotubes, les nanofils, les nanobagues, dotés de surfaces spécifiques importantes [222].

Par exemple, tout comme les particules de silice, les nanoparticules d'or (AuNPs), grâce à leur biocompatibilité sont très intéressantes pour la vectorisation où l'intégration de biocapteurs. Généralement, les AuNPs sont fonctionnalisées par des groupements thiols ou carboxyliques qui pourront ainsi interagir avec les amines des protéines. Elles sont la plupart du temps déposées sur des

électrodes ou piégées dans des matrices polymériques. Par exemple, les travaux de Zhang et *al.* [223] présentent une méthode d’élaboration d’un biocapteur de glucose à partir de GOx immobilisée de manière covalente sur une monocouche d’AuNPs déposées sur une électrode d’or. Il a alors été observé que les nanoparticules d’or à l’interface du biocapteur amélioraient efficacement le transfert d’électrons entre l’analyte et la surface de l’électrode. La concentration en surface de l’enzyme active dans le transfert électronique s’élève à $4,1 \times 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$, soit quatre fois celle de l’électrode obtenue par immobilisation directe de l’enzyme sans couche intermédiaire de nanoparticules d’or et 2,4 fois plus que sur la surface de l’électrode présentant une hypothétique monocouche saturée de GOx. Le biocapteur de glucose développé par Shan et *al.* [224] utilise un biocomposite. Il est basé sur l’immobilisation de la GOx sur un film mince de chitosane formant un nanocomposite avec du graphène et des nanoparticules (AuNPs), déposés sur une électrode d’or. La GOx est directement ajoutée au mélange graphène/AuNPs/chitosane sans agent de réticulation supplémentaire, le chitosane va jouer le rôle de liant d’encapsulation pour la GOx. La stabilité de ce biocapteur est meilleure que celle de son analogue GOx/chitosane, qui perd 4% de ses performances après une semaine [225] contre 4,6% après un mois pour graphène/AuNPs/chitosane/GOx. La combinaison AuNPs/chitosane/GOx, pour le développement des capteurs de glucose, a été largement étudiée [226-228] et même associée à des nanotubes de carbone [229, 230] dont les propriétés, tout comme le graphène, permettent d’accélérer le taux de transfert d’électrons.

Parmi les particules métalliques, il faut évoquer également celles aux propriétés magnétiques (MNPs) qui sont de plus en plus utilisés depuis une dizaine d’années, en particulier pour immobiliser des enzymes. En effet, en plus de conférer aux enzymes fixées une certaine résistance, ce type d’immobilisation facilite les processus de séparation par simple application d’un champ magnétique ou également par filtration ou centrifugation et donc facilite leur ré-utilisation [155, 231]. Ces MNPs sont, le plus souvent, constituées d’un cœur d’oxyde de fer (Fe_3O_4) recouvert d’une couche de silice essentiellement fonctionnalisée avec des groupements amine ou acide carboxylique, comme montré Figure 45 ci-dessous. La glucose oxydase a ainsi déjà été immobilisée sur ce type de particules [231-234].

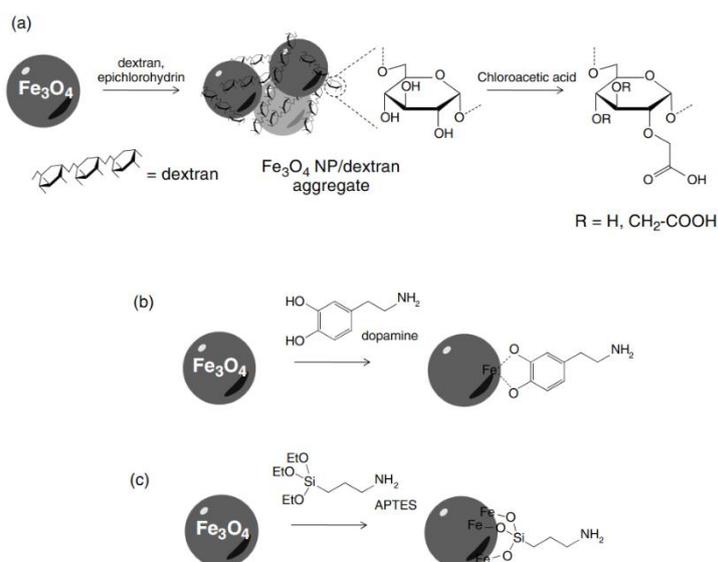


Figure 45: Voies de fonctionnalisation des MNPs : (a) utilisation de dextrane et d’un réactif de réticulation (épichlorhydrine) pour former des agrégats de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP/dextrane}$ avec ultérieurement un greffage de groupements acide carboxylique par traitement à l’acide chloroacétique; (b) utilisation de la dopamine pour former une monocouche de ligands chélateurs présentant des fonctions amine en surface; (c) utilisation de l’APTES pour greffer des groupements amine en surface [231].

Pour conclure, une grande variété de supports est disponible pour l'immobilisation d'enzymes, dont la GOx. Dans notre cas, les silices mésoporeuses pourraient présenter toutes les caractéristiques nécessaires au greffage de la GOx pour la production biocatalysée de H₂O₂, à savoir l'inertie du support, sa stabilité, les possibilités variées de fonctionnalisation de surface, des morphologies et taille de pores variés adaptables à la taille de l'enzyme et une récupération simple par centrifugation ou filtration. Elles pourraient permettre une immobilisation importante d'enzymes et diminuer les éventuels problèmes de diffusion lors de l'immobilisation de l'enzyme ou des réactifs et produits lors de la réaction visée.

3. Catalyse inorganique d'oxydation avec H₂O₂

L'utilisation de H₂O₂ en tant qu'oxydant éco-compatible a déjà été introduite rapidement au point 1. de ce chapitre. Ici, nous présenterons les différents types de catalyseurs inorganiques d'oxydation utilisés avec H₂O₂.

3.1. Quels catalyseurs d'oxydation avec H₂O₂

Cette partie est restreinte à la catalyse hétérogène d'oxydation des alcènes. Parmi les catalyseurs utilisés, il faut distinguer ceux complètement inorganiques, des autres dits catalyseurs « homogènes supportés ». Ces derniers - on pense en particulier aux polyoxométallates et aux porphyrines métallées supportés - résultent le plus souvent du greffage de « complexes » ayant déjà fait leurs preuves en catalyse homogène. De tels catalyseurs font l'objet d'une présentation à part.

3.1.1. Catalyseurs homogènes d'oxydation avec H₂O₂

Une première famille de complexes capables de catalyser des processus d'oxydation ménagée en solution comprend les peroxométallates, comportant un métal de transition sous forme ionique de configuration d⁰ tels que Mo(VI), W(VI) et Re(VII) [235]. Différentes revues ont été publiées sur le sujet dont celle de Sheldon [235] et Brégeault [236] qui rendent compte des propriétés de ces catalyseurs homogènes formés « *in-situ* » en partant le plus souvent de combinaisons d'ions tungstate ou molybdate avec un anion assembleur (par exemple, l'ion phosphate). D'après Noyori et *al.* [237], l'association H₂O₂/peroxométallate à base de tungstène catalyse l'oxydation de différents types de substrats tels que les alcools, les aldéhydes et les sulfures pour donner respectivement des cétones, des acides carboxyliques ou des sulfoxydes, de même que des alcènes qui sont convertis en époxydes (Figure 46) avec de bons rendements.

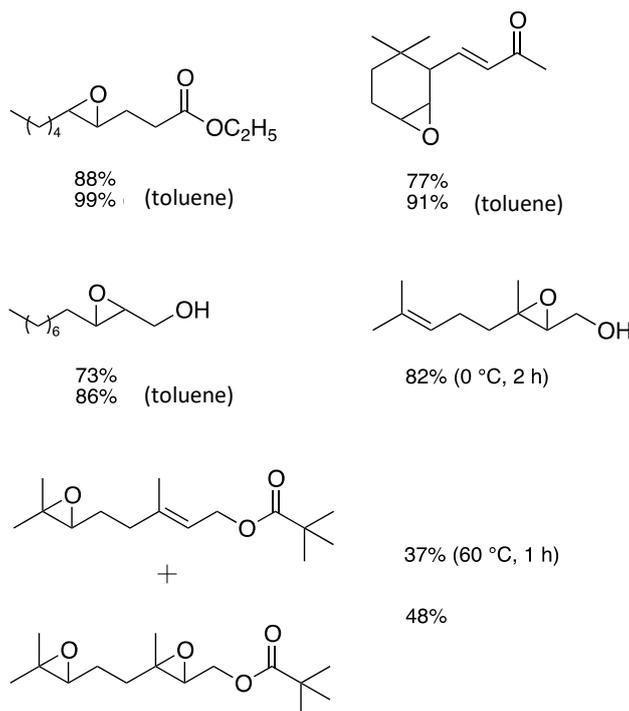


Figure 46: Rendements obtenus pour l'époxydation d'oléfines avec H_2O_2 et un peroxométallate à base de tungstène [237] pour la réaction généralisée présentée Figure 47

Le peroxyde d'hydrogène et ces catalyseurs étant plutôt hydrophiles, ils sont mis en œuvre en général dans des conditions biphasiques avec intervention d'agents de transfert de phase de type sels d'ammonium quaternaires. Le système illustré Figure 47 fonctionne aussi bien avec des alcènes simples que fonctionnalisés. L'époxydation de substrats tel que le styrène est plus délicate dans ces conditions car son époxyde est sensible aux milieux acides.

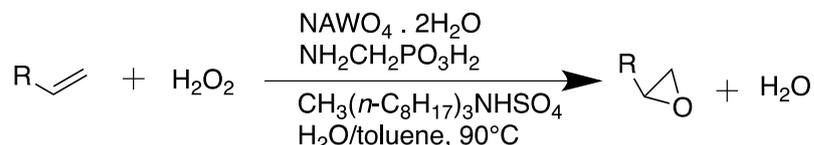


Figure 47: Epoxydation d'alcène par H_2O_2 en présence d'un catalyseur de type phosphotungstate en milieu biphasique avec un sel d'ammonium quaternaire comme agent de transfert de phase [237]

L'utilisation de ce genre de peroxométallates en catalyse hétérogène est possible. L'intérêt de la catalyse hétérogène réside principalement dans la facilité de récupération et de recyclage du catalyseur. Les alcènes sur lesquels notre revue se focalisera sont le cyclooctène, le cyclohexène et l'alcool allylique. Une approche consiste à exploiter le caractère ionique de ces catalyseurs en les ancrant sur des résines échangeuses d'ions adaptées. En associant le tungstate de sodium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à une résine Amberlite IRA-900[®] [238], Hoegaerts *et al.* indiquent qu'il est possible de convertir très sélectivement le *cis*-cyclooctène en son époxyde (> 90%) mais le taux de transformation de l'alcène reste très faible (2%).

Plutôt que de partir de simples sels comme les ions tungstate, molybdates, *etc.* et de les laisser évoluer en présence ou non d'ions inorganiques assembleurs, il est possible de démarrer à partir de polyoxométallates ou d'hétéropolyoxométallates pré-formés (POM). La littérature dans le domaine est relativement abondante. Les polyoxométallates sont parfois considérés comme étant finalement des ligands inorganiques capables de « complexer » une grande variété d'ions de métaux de transition. On

peut citer en particulier la série de complexes $\text{Na}_x\text{M}_2\text{Zn}_3\text{W}_{19}\text{O}_{68}$ avec $\text{M} = \text{Ru}, \text{Mn}, \text{Zn}, \text{Pd}, \text{Pt}, \text{Co}, \text{Fe}$ et Rh [239]. Parmi ceux-ci, il semblerait que les POMs à base de manganèse soient parmi les plus efficaces pour catalyser l'époxydation des alcènes aussi bien acycliques, cycliques que fonctionnalisés par des fonctions alcool. Cela a été démontré en milieu biphasique en présence de chlorure de méthyltricapryle ammonium. En revanche, il apparaîtrait, dans ce cas-là, que les POMs impliquant les autres métaux de transition ont tendance à se dégrader en présence de H_2O_2 aqueux, époxydant uniquement des alcools allyliques primaires. Dans leur revue, Zhou et *al.* [240] répertorient les principales stratégies de préparation de catalyseurs hétérogènes basées sur des POMs (Figure 48).

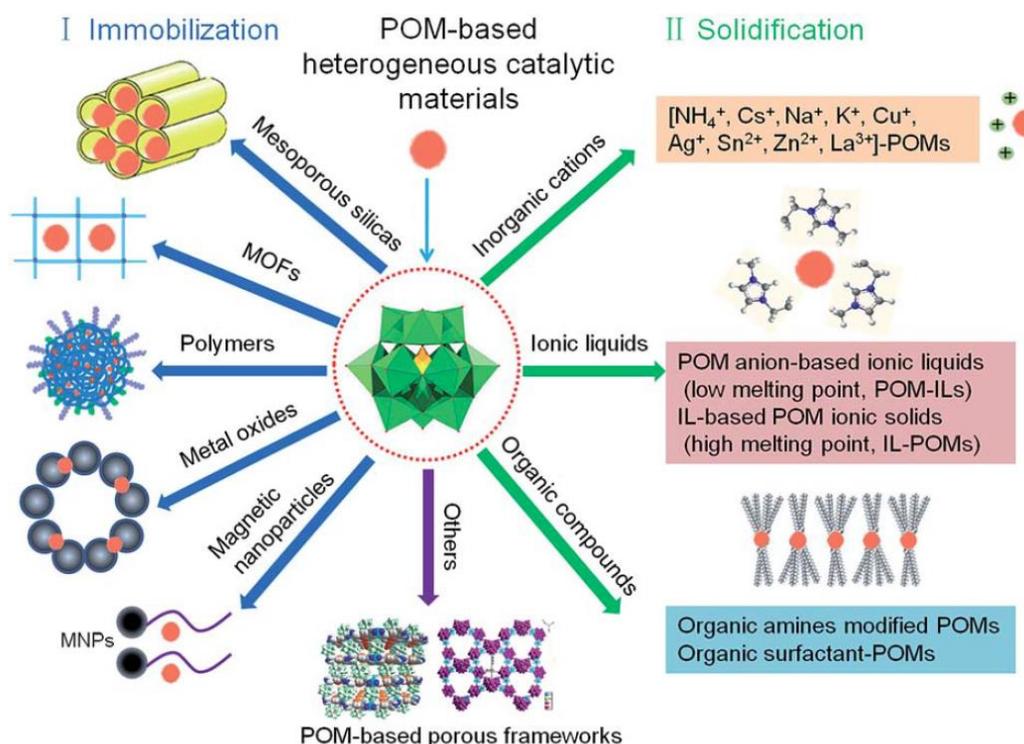


Figure 48: Principales stratégies pour la préparation de catalyseurs hétérogènes basés sur des POMs [240]

Comme montré sur la figure ci-dessus, il est possible d'immobiliser des POMs sur des polymères, comme par exemple des résines de type Amberlite IRA-900[®] afin d'obtenir un catalyseur hétérogène [241], comme pour l'oxydation de terpènes Figure 49.

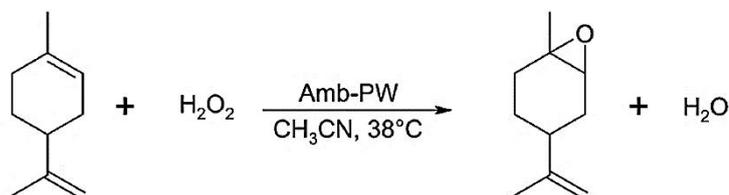


Figure 49: Epoxydation du limonène par H_2O_2 en présence d'un POM à base de tungstène immobilisé sur une résine Amberlite[®]

Ce catalyseur hétérogène a été obtenu par échange entre la résine et un anion $\{\text{PO}_4[\text{WO}(\text{O}_2)_2]_4\}^{3-}$ et conduit, dans le cas du limonène, à une conversion de 84% et une sélectivité en oxyde de limonène de 85% [242]. Une technique permettant de greffer des POMs sur un support consiste à utiliser de la silice, par exemple de type MCM-41 [238], et à fonctionnaliser la surface de cette dernière avec des groupements fonctionnels adaptés pour une interaction covalente ou échange d'ions comme montré Figure 50.

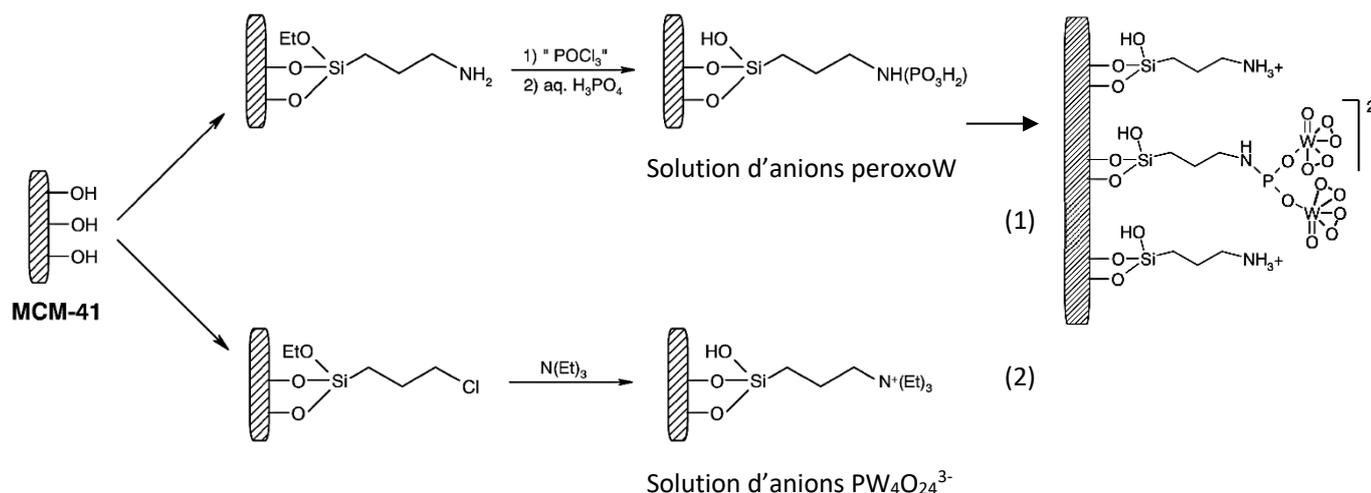


Figure 50: Fonctionnalisation, en deux étapes, d'un support silicique MCM-41 visant à l'introduction d'un groupement phosphoramidate (en haut) ou ammonium quaternaire (en bas)

Testés dans l'acétonitrile, les deux catalyseurs ainsi obtenus ont montré des performances différentes vis-à-vis de l'époxydation du *cis*-cyclooctène : une conversion de 70% (après 12 h de réaction) contre 20% (après 16 h de réaction) et une même sélectivité (> 95%) pour (1) et (2) respectivement. Le système (2) a également permis l'oxydation d'un alcool allylique, le géraniol, avec une conversion > 99% et une sélectivité en 2,3-époxyde de géraniol de 95%. Cette sélectivité importante pour les alcools allyliques est typique de la chimie du tungstène, où la fonction -OH est connue pour coordonner le métal de transition central permettant l'oxydation de la double liaison à proximité. Pour l'époxydation du cyclohexène dont l'époxyde est plus sensible aux conditions acides, il est possible d'observer la formation de diol (conversion de 30% et sélectivité en époxyde de 60%). L'addition d'une base de Lewis telle que la pyridine conduit à une réduction significative de la formation du diol avec 85% de sélectivité en époxyde. Parmi les exemples récents, on peut citer les travaux de Poli et *al.*, lesquels ont consisté à « emprisonner » un POM à base de tungstène dans une silice SBA-15 (Figure 51) [243] pour l'oxydation de styrène et d'oléate de méthyle. Dans un premier temps, les POMs ont été dissouts dans du dichlorométhane en présence du solide SBA-15. Ensuite, le dichlorométhane est évaporé permettant l'adsorption de POMs sur SBA-15. Ceux-ci sont alors déposés soit dans les pores, soit sur la surface externe de SBA-15. Le matériau obtenu a été dispersé dans du *n*-octyltriéthoxysilane contenu dans un mélange de toluène/pyridine (10: 1) afin de fermer les pores et emprisonner les POM à l'intérieur du matériau. Après 2 h de réaction à 50°C, la conversion du styrène est de 100% avec une sélectivité en époxyde de 99%. Du fait de la faible solubilité de l'oléate de méthyle, la conversion atteint 85% après 15 h de réaction avec une sélectivité de seulement 5% pour le premier test catalytique.

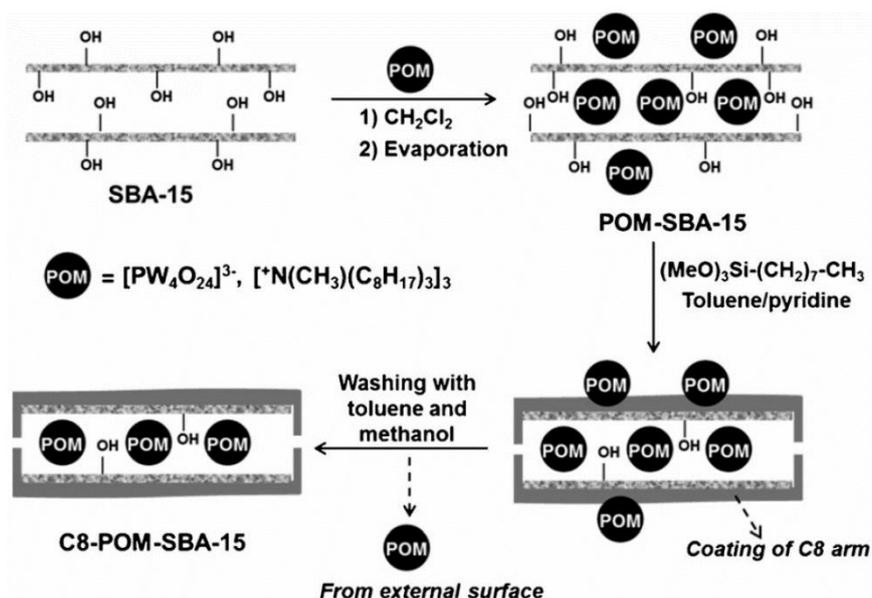


Figure 51: Illustration de la procédure d'encapsulation du POM dans le support SBA-15 décrite par Poli et al. [243]

Une autre stratégie consiste à former la matrice silicique directement autour des POMs. Sa synthèse consiste, grâce aux interactions électrostatiques, à remplacer les contre-ions d'un POM $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ par des cations ammonium quaternaire, tels que le di(11-hydroxyundécyl)diméthylammonium, pour obtenir des complexes supramoléculaires (SEP). La structure du SEP est similaire à celle d'une micelle inverse et une matrice de silice sera formée autour des SEP par condensation sol-gel à l'aide d'un précurseur TEOS. L'époxydation du cyclohexène avec ce type de structure, a conduit à une conversion de 85% après 2 h à 25°C, avec une sélectivité en époxydation de 100% [244]. Un autre exemple intéressant est l'époxydation du cyclohexène par H_2O_2 en présence de $[\pi\text{-C}_5\text{H}_5\text{NC}_{16}\text{H}_{33}]_3[\text{PO}_4(\text{WO}_3)_4]$ qui est en fait un sel résultant de l'association d'un ion hétéropolyoxotungstate et d'un ion ammonium quaternaire cétylpyridinium [245]. L'intérêt de ce catalyseur est sa facilité de récupération par précipitation. Le catalyseur est insoluble dans le milieu réactionnel, mais sous l'action de l'un des réactifs, ici H_2O_2 , il peut former des espèces actives solubles qui réagissent ensuite avec le substrat pour générer le produit souhaité. Lorsque H_2O_2 est entièrement consommé, le catalyseur reprend sa structure d'origine et précipite à partir du milieu réactionnel. En fait, les atomes d'oxygène intramoléculaires ne suffisent pas à compléter la coordination de l'atome de W, de sorte que ce dernier interagira avec les atomes d'oxygène d'une autre molécule (par formation d'une liaison W-O-W), aboutissant ainsi à des structures polymères complexes, à l'origine de son insolubilité dans les solvants organiques.

Il est à noter que les propriétés électroniques des POMs peuvent être impactées par de nombreux paramètres, tels que les solvants, les interactions POM-cations et les liaisons covalentes à un support [246] [247] [237].

Une autre famille de complexes beaucoup utilisés comme catalyseurs pour l'époxydation des oléfines par H_2O_2 est celle des métalloporphyrines [241, 248]. Celles utilisées en catalyse d'oxydation sont le plus souvent synthétiques mais leur exploitation s'inspire des bonnes performances des métalloporphyrines biologiques, en particulier de celles présentes dans le site actif des enzymes monooxygénases du type cytochrome P450 [249, 250]. Les porphyrines sont des ligands macrocycliques tétradentes pouvant être substitués de différentes manières pour faire évoluer leurs

propriétés électroniques ou leur encombrement stérique ; elles peuvent complexer différents métaux. Ceux les plus couramment utilisés avec H_2O_2 sont le fer et le manganèse au degré d'oxydation III. Dans ce qui suit, nous nous intéresserons plus particulièrement à la porphyrine de manganèse Mn^{III} -TCPP (Manganese tetrakis (4-carboxyphényl)porphyrine) montrée Figure 52, puisqu'elle sera utilisée dans la suite de l'étude.

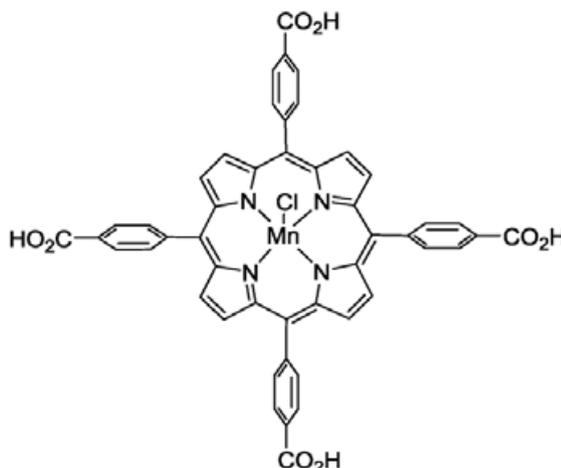


Figure 52 : Porphyrine synthétique Mn-TCPP

La porphyrine substituée par quatre groupements 4-carboxyphényle présente l'avantage d'être commercialement disponible mais à un coût élevé. Elle est assez facilement métallée par Mn en la mettant en contact $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Même si le métal n'est pas le même, le complexe Mn^{III} -TCPP ainsi formé est utilisé pour mimer l'activité catalytique des hémoprotéines (monooxygénase, peroxydase...) en sachant bien que ces dernières ne fonctionnent normalement qu'en présence de O_2 , de sources de H^+ et d'électrons. Srouf et *al.* [251] ont ainsi rapporté l'époxydation d'alcènes (styrène et ses formes substituées) par H_2O_2 avec ce type de molécule (Figure 53) dans un mélange tampon/méthanol ((v/v) 1 : 3) et à température ambiante. Une quantité de H_2O_2 , préalablement solubilisée dans 1 mL de MeOH et équimolaire à celle du styrène, a été ajoutée lentement. La conversion du styrène est alors de 88% et la sélectivité en époxyde de 99% à 25°C. Dans la perspective de la mise en œuvre d'une association chimioenzymatique de catalyseurs, ces conditions d'époxydation nous paraissent largement plus compatibles que les autres exposées auparavant.

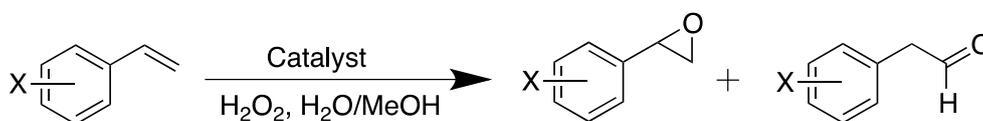


Figure 53: Epoxydation du styrène et de ses formes substituées dans un mélange tampon/MeOH avec Mn-TCPP et H_2O_2 comme oxydant [251]

La porphyrine TCPP est intéressante puisqu'elle affiche quatre fonctions acide carboxylique pouvant se comporter comme des sites de réticulation avec des amines, qu'elles soient localisées à la surface de supports ou qu'elles soient résiduelles à la surface d'enzymes oxydases, tandis que le centre métallique contenu dans l'anneau de la porphyrine agit comme site catalytique d'oxydation. Liée à une enzyme ou à un support, ce type de porphyrine métallée devrait être capable de catalyser l'oxydation de substrats dans des conditions de réaction compatibles avec celles de fonctionnement de la GOx

(dans l'eau, à pH modéré et dans des conditions de température propices). Par contraste avec les enzymes peroxydase ou monooxygénase, l'absence de l'environnement volumineux de la protéine autour de la porphyrine, induisant généralement la spécificité drastique chez l'enzyme, devrait permettre ici la transformation de substrats variés. Plusieurs travaux ont déjà porté sur l'immobilisation de porphyrines de manganèse pour l'époxydation d'alcènes avec H_2O_2 [252-254] ou même l'oxygène moléculaire [255]. Tout comme pour les enzymes, différentes approches ont été élaborées pour immobiliser ces molécules sur des supports : par interactions électrostatiques, par piégeage dans une matrice solide ou par greffage covalent. Rebelo et *al.* [253] ont utilisé cette dernière méthode pour lier de manière covalente la chloro-2-nitro-5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorophényl)-porphyrinatomanganèse(III) $[Mn(\beta NO_2 TDCPP)Cl]$ à un gel commercial silicique fonctionnalisé par des groupements aminopropyle. Dans ce cas, la porphyrine est ancrée via la position β du macrocycle (Figure 54).

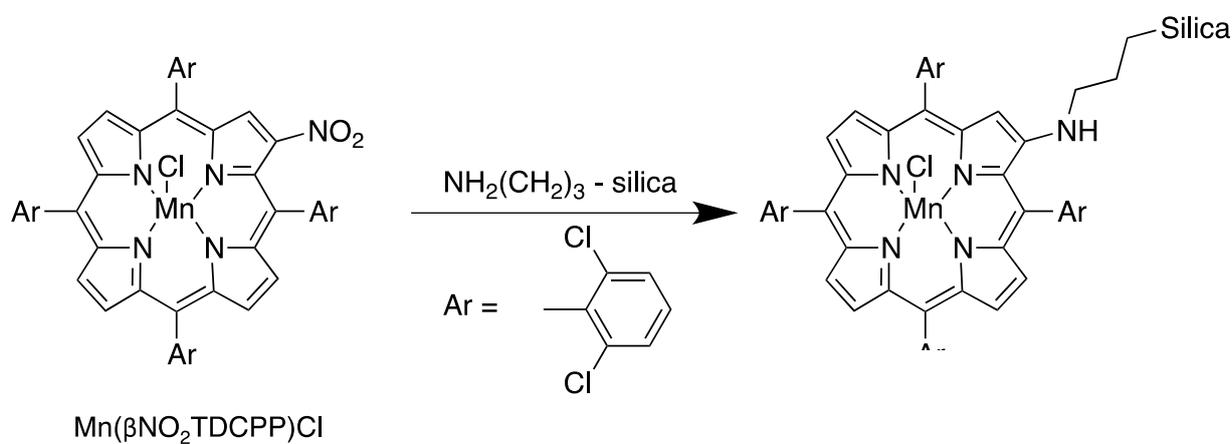


Figure 54: Immobilisation covalente de la porphyrine $Mn(\beta NO_2 TDCPP)Cl$ sur un support silicique amino-fonctionnalisé [253]

L'utilisation de ce catalyseur pour l'époxydation du cyclooctène a montré les meilleures performances pour un faible volume de solvant (0,5 mL d'acétonitrile) et une vitesse d'addition de H_2O_2 faible (0,04 mmol / h), avec 89% de conversion du substrat et 99% de sélectivité en époxyde de cyclooctène après 21 h à 20°C. Ces auteurs indiquent qu'un ajout trop rapide de l'oxydant désactive la porphyrine et qu'un volume de solvant trop important aurait tendance à rendre l'accès des réactifs au catalyseur difficile. Bien d'autres supports ont été utilisés. De Paula et *al.* [254] ont comparé une résine polymérique (Merrifield) à un gel silicique fonctionnalisé par des groupements bromopropyle. La liaison covalente de la porphyrine sur ces matériaux est schématisée Figure 55 ci-dessous.

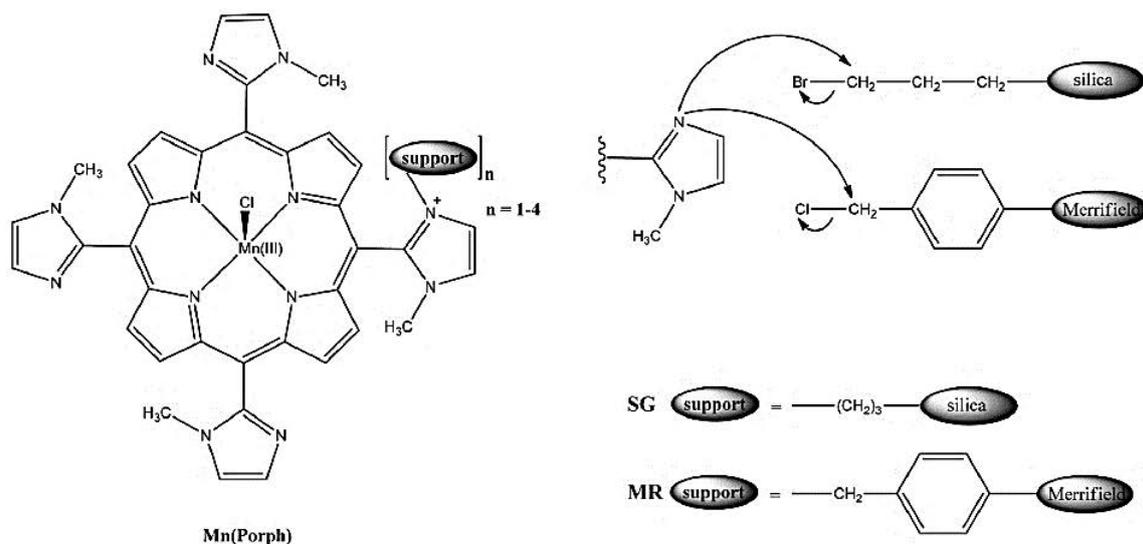


Figure 55: Immobilisation d'une porphyrine manganèse sur un gel silicique fonctionnalisé par des groupes bromopropyl et sur une résine Merrifield [254]

Dans les mêmes conditions (dans l'acétonitrile, pour un rapport molaire substrat/H₂O₂ de 2 avec des ajouts d'oxydant toutes les 30 min et à 25°C), l'oxydation du cyclooctène est plus efficace avec le catalyseur sur résine Merrifield ((Porph)-MR) plutôt que sur gel de silice (Mn (Porph)-SG). Lors du premier test catalytique, la conversion est de 96,7% avec la résine¹³ contre 79,4% avec la silice¹⁴. Seul l'époxyde de cyclooctène est détecté. Lors d'un second test, les conversions passent respectivement à 57% et 2,2%. La stabilisation du catalyseur (Porph)-MR, actif pendant 4 tests successifs, pourrait s'expliquer par une interaction favorable des orbitales moléculaires impliquées dans la liaison entre le métallocomplexe et le support. L'efficacité catalytique plus faible observée pour Mn (Porph)-SG comparé à Mn (Porph)-MR peut être attribuée aux différences structurales, dues à l'agent de liaison entre le support et la porphyrine. Ainsi, De Paula et *al.* font partie des auteurs qui ont montré que l'efficacité catalytique est influencée par les conditions de synthèse utilisées lors des réactions d'immobilisation.

L'immobilisation de catalyseurs d'oxydation fonctionnant avec H₂O₂ en solution (catalyse homogène) ouvre la voie à une nouvelle catalyse hétérogène, proposant des espèces catalytiques permettant de travailler dans des conditions variées (en solvant ou température). Pour les POMs, les milieux bi-phasiques chlorés généralement utilisés dans les conditions de Venturello¹⁵ peuvent être remplacés par des milieux acides comme l'ont montré Noyori. Pour les porphyrines, des milieux organiques, notamment l'acétonitrile sont très utilisés, de même que des milieux aqueux/organiques (tampon/méthanol) et à température ambiante.

¹³ Charge en porphyrine sur la résine obtenue par analyse élémentaire basée sur la teneur en azote : 0,75% en masse

¹⁴ Charge en porphyrine sur la silice obtenue par analyse élémentaire : 1,08% en masse

¹⁵ Les conditions de Venturello utilisent un milieu biphasique à base de solvants chlorés

3.1.2. Catalyseurs hétérogènes d’oxydation avec H_2O_2

Ici, nous nous intéressons à des catalyseurs hétérogènes constitués par la dispersion de phases actives inorganiques au sein de matrices inorganiques. Il n’est plus question de ligands ou de bras organiques. Pour les métaux en question, la matrice inorganique joue en quelque sorte le rôle de ligand « inorganique » empêchant du coup la formation d’agrégats ou de clusters d’oxydes de la phase active. L’isolement des sites actifs qui en résulte est à la base, en général, d’une réactivité accrue. Concernant les réactions d’époxydation avec H_2O_2 , les catalyseurs les plus efficaces font intervenir des métaux de transition de configuration d^0 comme le W (VI), V (V), Nb (V), Ta (V), et Ti (IV). Dans ce cas, le métal ne peut être oxydé davantage ; il agit au premier abord comme un acide de Lewis, comme présenté Figure 56 ci-dessous :

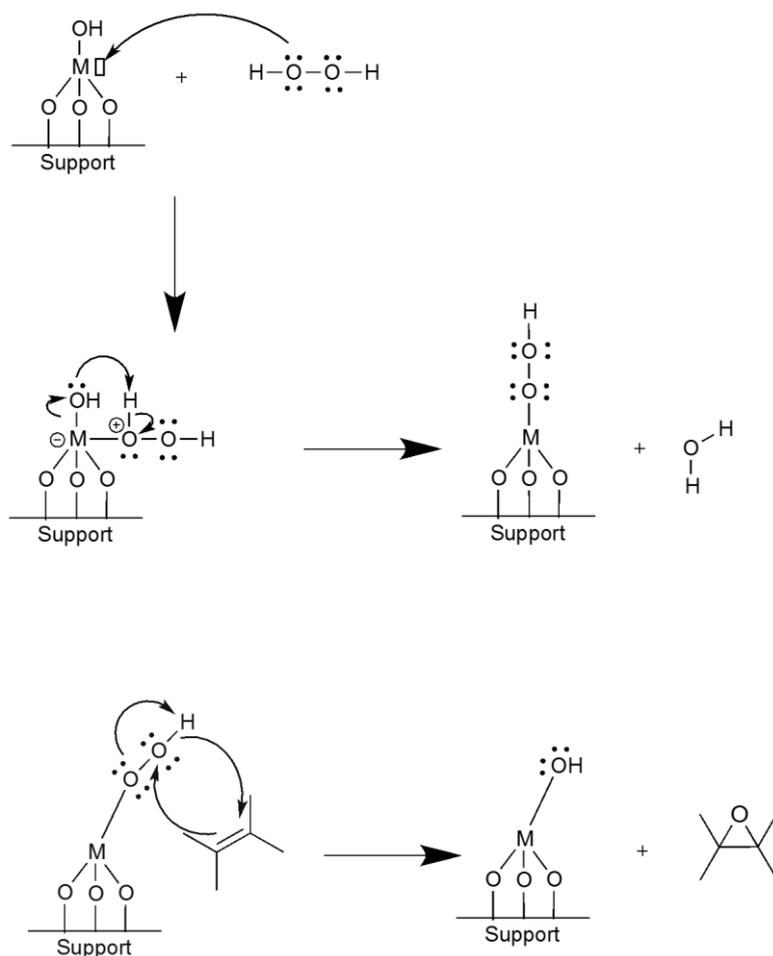


Figure 56: Mécanisme d’action de l’espèce métallique impliquée dans l’époxydation d’alcènes par H_2O_2

Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour insérer l’espèce métallique sur le support. Dans une revue publiée en 2001 [256], Sheldon en cite quatre, qui sont présentées Figure 57. L’ion métallique peut ainsi être incorporé au sein du réseau oxyde constituant le support soit lors de sa synthèse hydrothermale, soit par post-modification. Le greffage de l’espèce métallique s’effectue le plus souvent par imprégnation. Il est également possible de lier l’espèce active au support via un ligand espaceur, lui-même greffé en surface de la matrice (cf. exemples en 4.1.1.). Enfin une dernière méthode consiste à encapsuler le complexe métallique dans les cages d’une matrice solide telle qu’une zéolithe [257, 258], une argile telle que la montmorillonite [259] ou à l’intérieur de membranes polymériques, par exemple du type polydiméthylsiloxane [260].

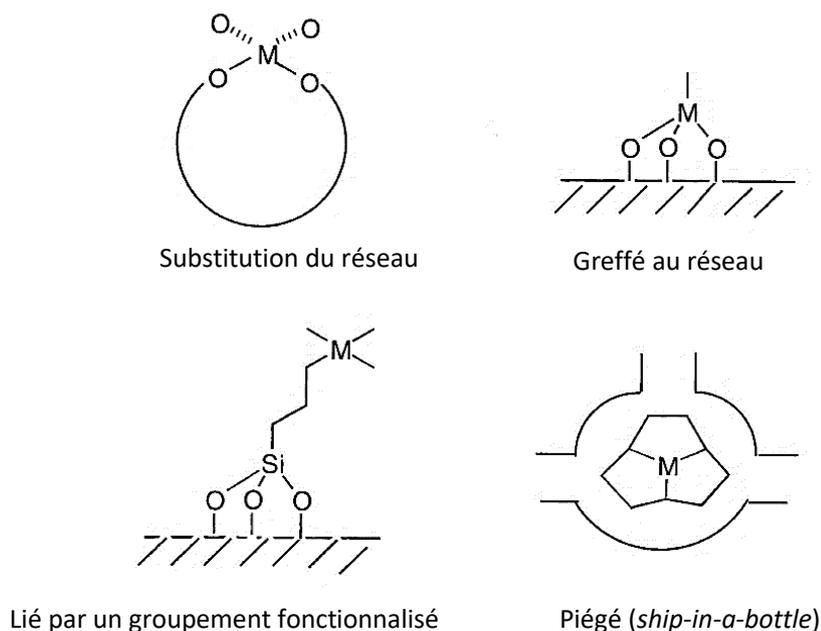


Figure 57 : Stratégies pour l’hétérogénéisation d’un centre métallique dans une matrice inorganique [256]

Différents métaux de transition pouvant être utilisés seront présentés dans ce qui suit, à savoir le tungstène, le vanadium et niobium, puis le titane qui sera largement développé.

a. Le tungstène (VI)

Comme énoncé précédemment en 4.1.1, le tungstène peut être utilisé pour l’époxydation d’alcènes par H_2O_2 , notamment en supportant les peroxométallates correspondants. Le matériau silicique SBA-15 a été utilisé par Tang et *al.* [261] pour le greffage d’un complexe oxodiperoxotungstène $[WO(O_2)_2L]$ (L = pyrazolylpyridine, éthylènediamine, imidazole, 4,4’-bipyridine modifié en vue de son greffage) comme présenté Figure 58 ci-dessous, pour l’époxydation du cyclooctène avec H_2O_2 . Plusieurs échantillons ont été synthétisés, se différenciant par le ligand L utilisé lors du greffage entre le solide et l’espèce active. Le catalyseur utilisant la pyrazolylpyridine est celui montrant les meilleures activités catalytiques : après six tests catalytiques à $55^\circ C$ dans CH_3CN , la teneur en W est constante (0,13 à 0,12 mmol/g), le catalyseur est relativement stable puisque la conversion en cyclooctène passe de 76 à 73% (sélectivité en époxyde de 100%), pour un rapport substrat/ H_2O_2 équimolaire et après 10 h de réaction. La température d’époxydation est un paramètre important puisqu’après 4 h de réaction, la conversion du cyclooctène avec ce même catalyseur atteint 11, 40 et 80% à 35, 55 et $70^\circ C$, respectivement.

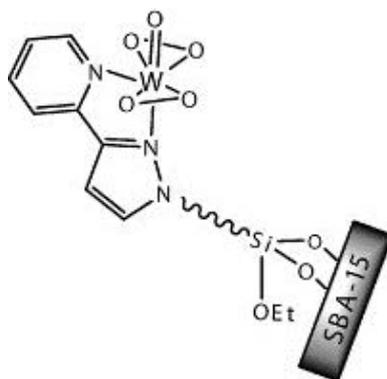


Figure 58: Greffage d'un complexe oxodiperoxotungstène sur un support SBA-15 [261]

Une étape de post-synthèse a également permis le greffage de tungstène et peroxotungstène sur ce même support SBA-15, doté de fonctions amines grâce à l'utilisation de l'APTES [262]. Les matériaux résultants (pourcentage massique de W, obtenu par analyse ICP, variant de 17,7 à 18,5%) se sont avérés remarquablement efficaces pour l'oxydation du cyclooctène (conversion et sélectivité > 98%). Après six cycles d'utilisation, l'activité catalytique ne diminue que faiblement ; la conversion passe de 98,9% à 93,3% et la sélectivité en oxyde de cyclooctène de 98,4% à 97,4%, après 5 h de réaction à 60°C dans CH₃CN, pour un rapport substrat/H₂O₂ équimolaire.

Des catalyseurs résultant de la combinaison d'oxydes de tungstène (3,8% en masse) et de zinc (0,8% en masse) supportés sur SnO₂ ($S_{\text{BET}} = 51 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) par imprégnation, développés par Kamata et *al.* conduisent également à de bons rendements en époxydes (> 80%) pour différentes catégories d'alcènes (allyliques, cycliques, ramifiés) [263]. Les époxydations du propylène et du cyclooctène ont abouti à de bonnes performances catalytiques dans le diméthyl carbonate (DMC) à 60°C, puisqu'après 5 tests catalytiques successifs, les rendements obtenus en époxyde évoluent comme suit : 84%, 85% 94% 91% et 81% puis > 99%, 99%, 98%, 95% et 99% respectivement.

Le tungstène peut également être incorporé par synthèse directe au sein de matériaux siliciques mésostructurés à deux (comme SBA-15) ou à trois dimensions (SBA-16, KIT-5 et KIT-6) [264]. Sur SBA-16, R. Maheswari et *al.* ont réussi à faire varier les pourcentages massiques de tungstène de 2,7 à 30,4%. Ici, il a été montré que les espèces isolées « WO₄ » et les oligomères sont responsables de l'époxydation du cyclohexène. Cette dernière est apparemment plus performante avec des matériaux à trois dimensions, avec 36 contre 22% en conversion et 56 contre 59% en sélectivité de l'époxyde, en utilisant SBA-16 (Si/W = 22) et SBA-15 (Si/W = 25) respectivement après 6 h à 50°C dans l'acétonitrile et pour un rapport substrat/H₂O₂ équimolaire. Le sous-produit majoritaire obtenu est le cyclohexène-1-ol. Malheureusement, un lessivage important de W est observé. Après 4 tests successifs, les auteurs observent un lessivage de 30 à 40% des espèces W sur SBA-16.

b. Le vanadium et niobium (V)

Un autre métal de transition pouvant être utilisé avec H_2O_2 est le vanadium. Cependant, dans la revue de Sheldon déjà citée [256], il est rapporté que les catalyseurs mis au point avec ce métal (immobilisé sur un xérogel, une silice mésoporeuse ou même encapsulé) sont instables. L’espèce métallique est lessivée en présence de liquide, ce qui conduit finalement à une catalyse plutôt homogène.

L’incorporation du vanadium dans le squelette d’une silice telle que MCM-41 ne semble pas aisée et semble dépendre de la source du métal utilisée [265]. Les sels dissous (comme le chlorure de vanadium) sont plus simples à intégrer dans la structure de la silice que les métaux déjà coordonnés à l’oxygène, comme les ions vanadyle (VO^{2+}) utilisés par Ziolek et *al.* Les catalyseurs ainsi préparés conduisent à d’assez faibles sélectivités en époxyde.

Récemment, Thornburg et *al.* [266] ont étudié le greffage de complexes à base de ligand calixarène avec des métaux de transition des colonnes 4 et 5 dont le vanadium, sur des particules de SiO_2 en vue de catalyser l’époxydation du cyclohexène et du styrène avec H_2O_2 . Un calixarène est un macrocycle obtenu par la condensation d’un phénol donné avec un aldéhyde. Il a la particularité de présenter une cavité hydrophobe dans laquelle peut être introduite de petites molécules. De plus, les atomes d’oxygène des groupements $-OH$ induisent une polarisation négative qui leur permet d’interagir avec des cations et de les retenir au centre du macrocycle, comme présenté Figure 59.

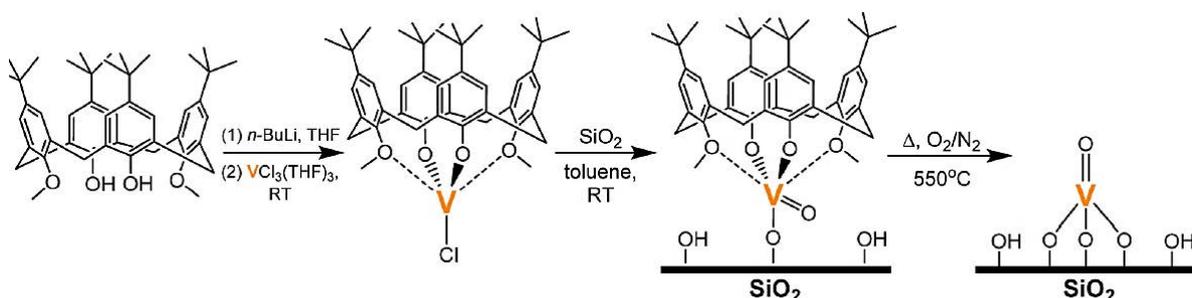


Figure 59: Greffage du vanadium sur SiO_2 par le biais d'un complexe avec un calixarène [266]

Ici, le calixarène joue le rôle de transporteur pour le greffage du vanadium. Il peut être conservé pendant la réaction catalytique ou éliminé par calcination avant. Ce ligand volumineux, fortement chélaté au métal, est à l’origine de sites actifs hautement isolés et accessibles comme l’ont montré Notestein et *al.* avec le même type de matériau mais avec Ti [267, 268]. Ces auteurs utilisent le seuil de la transition LMCT du calixarène- Ti^{IV} comme sonde de la structure du catalyseur, de la même façon que les seuils d’énergies sont utilisés pour caractériser les oxydes métalliques dispersés. L’étude des performances catalytiques est caractéristique de matériaux présentant des sites isolés comme la zéolithe TS-1. Il a été montré que l’encombrement stérique et les liaisons multidentées des calixarènes conduisent à une stabilité structurelle et un comportement, au cours de l’époxydation du cyclohexène, caractéristique d’espèces Ti isolées. Cependant, le greffage du vanadium par cette méthode n’a pas abouti à un catalyseur d’époxydation très efficace vis-à-vis du cyclohexène et du styrène. La sélectivité en faveur de l’époxyde est la plus faible comparée à d’autres métaux étudiés (Nb, Ti et Ta ou même Hf et Zr), conduisant à un rendement moins bon. Il semblerait qu’avec le vanadium, une voie de réaction radicalaire soit favorisée plutôt qu’une activation hétérolytique de H_2O_2 , comme présenté Figure 60.

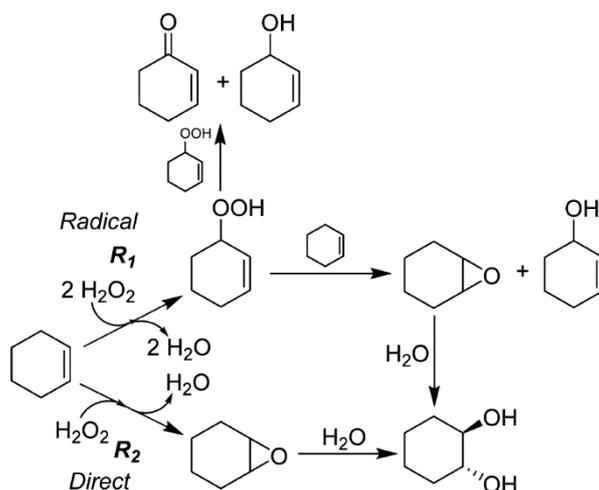


Figure 60: Chemins de réactions proposés pour l'oxydation du cyclohexène [266]

D'autres catalyseurs de degré d'oxydation V tels que le niobium [269, 270] et le tantale [271, 272], également capables d'assister l'époxydation des alcènes par H_2O_2 , ont été introduits de la même façon sur des supports siliciques. Les matériaux résultants catalysent efficacement l'époxydation du cyclohexène. C'est le cas notamment de Nb-SiO_2 qui permet d'obtenir une sélectivité en époxyde de l'ordre de 85%, à 90°C dans CH_3CN . Il est indiqué que la version calcinée de Nb-SiO_2 semble être stable vis-à-vis du lessivage et du recyclage, tandis que le solide Ta-SiO_2 est plus actif et sélectif avant d'être calciné.

Trejda et *al.* [273] ont quant à eux incorporé Nb par synthèse directe dans un matériau SBA-15 ($\text{Si/Nb} = 15$), en utilisant NbCl_5 et le TEOS comme précurseur de niobium et de silice, respectivement. Ils ont ensuite procédé à l'oxydation du cyclohexène avec H_2O_2 , à 45°C dans CH_3CN . Dans ces conditions, la meilleure conversion de l'alcène est de 72% après 40 h, mais la sélectivité en faveur de l'époxyde n'est que de 8% alors que celle en diol est de 59%. Il a été mis en évidence que la formation de l'époxyde ne dépend pas seulement de l'isolement du niobium, mais aussi de l'acidité de surface. En présence de centres acides, l'époxyde peut encore réagir avec une autre molécule de peroxyde d'hydrogène ou d'eau pour former un diol. Ainsi, les échantillons présentant des teneurs en niobium plus importantes ($\text{Si/Nb} = 5$ vs. 15) ont montré un caractère acide plus important (le nombre de sites acides passe de $436,7 \cdot 10^{17}$ molécules à $797,9 \cdot 10^{17}$ molécules) et les sélectivités en diol pour ceux-ci augmentent de 59 à 73% respectivement.

c. Le titane (IV)

Plusieurs métaux de transition de degré d'oxydation IV, tels que Ti(IV), Zr(IV), Hf(IV) et Sn(IV), ont été greffés sur des supports pour des applications en catalyse d'époxydation. Parmi eux, Hf(IV) et Sn(IV) montrent en général les plus faibles activités et sélectivités en époxyde pour les réactions menées avec H_2O_2 [266, 274]. La formation d'une espèce surfacique hydroperoxy est un préalable en vue de l'activation de H_2O_2 par ces catalyseurs. L'interaction de H_2O_2 avec ces métaux dépourvus d'électrons de valence s'apparentant à une réaction acide dur/base dure, on s'attend à ce qu'elle soit favorisée avec l'augmentation de la dureté de l'acide, laquelle est directement liée au niveau d'énergie de la LUMO du métal. Ainsi, plus basse est cette énergie, meilleur est le transfert de la densité d'électrons du fragment peroxyde au métal et donc l'activation de la liaison O-O requise par la formation de l'époxyde. Une étude théorique de ce type, présentée ci-dessous, effectuée par Borona et *al.* [274], illustre la meilleure activité catalytique de Ti dans le cas d'une série homologues de zéolithes

(Ti-Beta, Zr-Beta et Sn-Beta). Dans cette étude, les auteurs s’intéressent aux sites métalliques isolés connus pour agir comme un acide de Lewis et à l’adsorption d’une molécule sur le centre métallique entraînant une modification des niveaux électroniques à la fois du métal et de la molécule. Ainsi, l’activité d’un catalyseur pour une réaction donnée dépend non seulement des propriétés du site actif isolé, mais aussi des changements causés par son interaction avec les molécules de réactif.

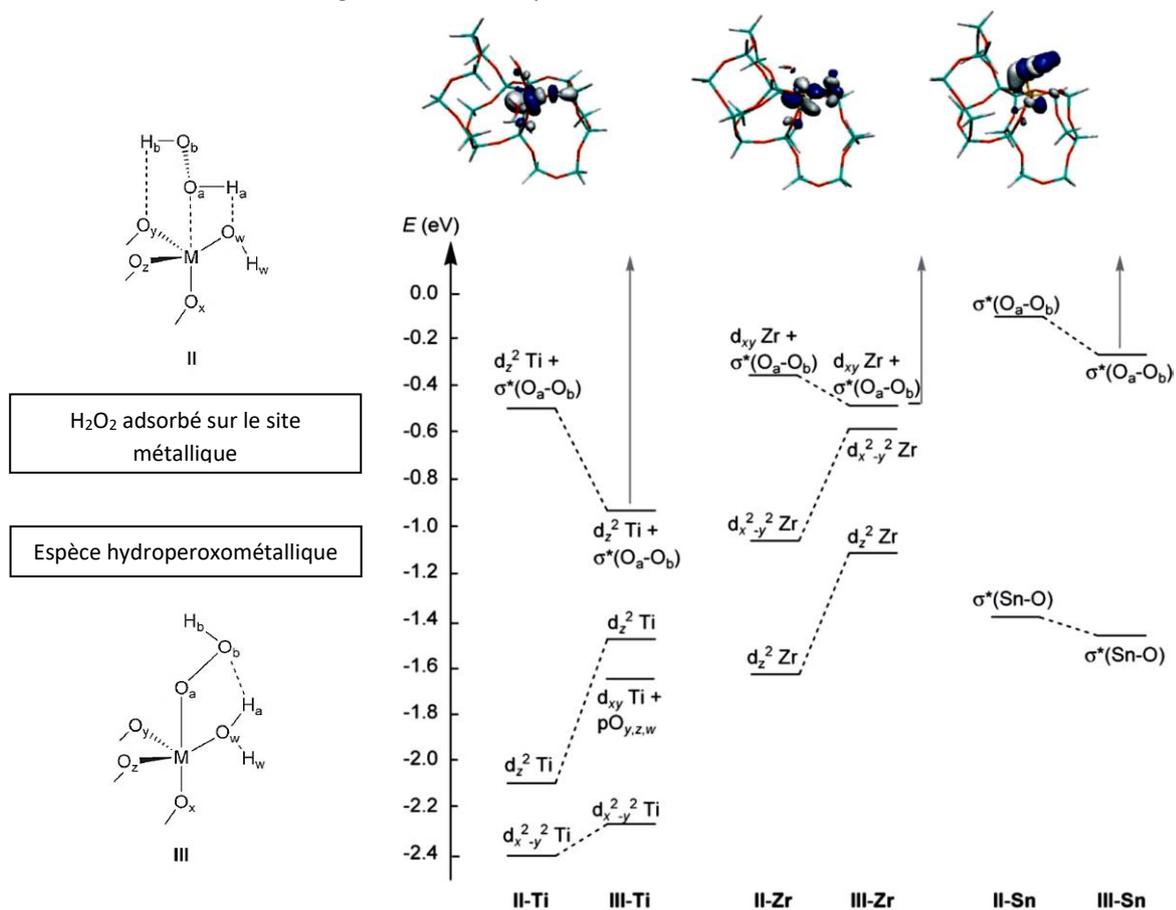


Figure 61: Niveaux d'énergie LUMO des espèces II (peroxyde d'hydrogène adsorbé) et III (espèce hydroperoxométallique) calculés pour les zéolithes Ti-, Zr- et Sn-Beta.

Voilà pourquoi, ici nous nous intéressons aux catalyseurs hétérogènes à base de titane lesquels sont largement reconnus pour leur activité en utilisant le peroxyde d’hydrogène pour l’époxydation.

c.1. Aperçu des différents catalyseurs titanés

L’utilisation de catalyseurs hétérogènes titanés pour l’époxydation en phase liquide a d’ailleurs commencé avec le développement, par Shell, d’un catalyseur constitué de 2% en masse de TiO_2 sur silice (présenté au point 1. de ce chapitre). L’activité catalytique de Ti(IV)/SiO_2 a alors été attribuée à la présence de ligands silanoxy dans la sphère de coordination de Ti. Ceux-ci, en lien avec leur caractère accepteur, vont d’une part exacerber l’acidité de Lewis du Ti(IV) et d’autre part empêcher son oligomérisation pour donner des espèces non réactives, comme cela est le cas en solution si les ligands utilisés ne sont pas adaptés. Cependant le plus gros inconvénient de ce genre de catalyseur réside dans leur sensibilité marquée pour la désactivation suite à la coordination, en particulier, de l’eau [275]. Rappelons d’ailleurs que dans le cas de la compagnie Shell, l’oxydant utilisé était de l’hydroperoxyde d’éthylbenzène. L’utilisation de H_2O_2 a été introduite plus tard avec la conception, par Enichem, de la zéolithe TS-1 [276, 277] laquelle présente d’intéressantes propriétés hydrophobes de par sa structure,

qui lui confèrent une activité importante pour l'époxydation d'alcènes. La TS-1 est une zéolithe à base de silicium, de titane et d'ions oxyde présentant une structure MFI tridimensionnelle identique à celle de la ZSM-5. L'espèce active Ti(IV) y est connue pour se substituer, de manière isomorphe, au silicium, et sous forme d'espèces isolées de coordination tétraédrique très actives, qui font la particularité de ce matériau. En effet, le titane en coordination octaédrique comme dans TiO₂ anatase est connu pour décomposer le peroxyde d'hydrogène et ne pas permettre un transfert efficace de l'oxygène nécessaire à l'époxydation [278]. La réactivité des centres catalytiques vis-à-vis de l'oxydation est généralement attribuée à la coordination tétraédrique de Ti(IV) au sein de la matrice : -Si-O-Ti-O-Si. En présence d'eau, l'hydrolyse de l'espèce précédente Si-O-Ti-O-Si entraîne la formation des espèces Ti-OH et Si-OH, tandis qu'avec H₂O₂ elle se solvolysé pour former l'espèce peroxyde active Ti-OOH et Si-OH, ainsi montré ci-dessous.

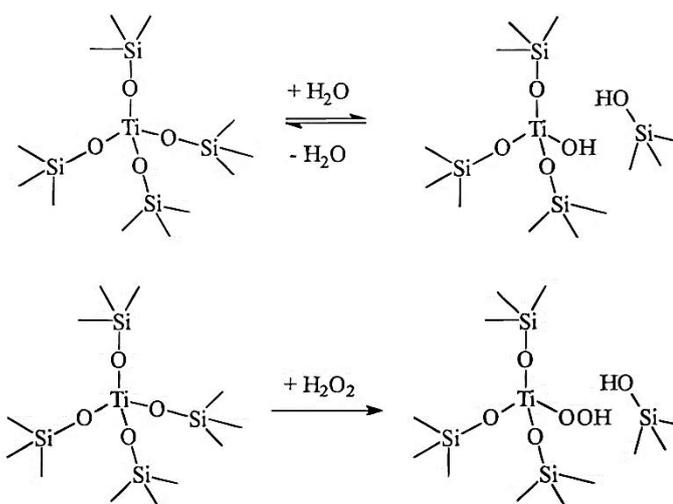
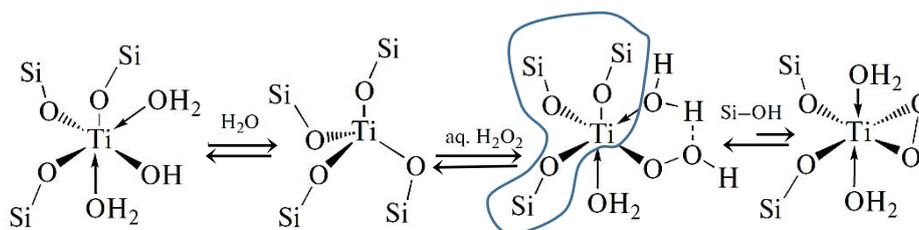


Figure 62: Activation du centre catalytique Ti(IV) par H₂O₂ pour former l'espèce peroxyde Ti-OOH [279]

Cependant, les choses sont un peu plus compliquées que cela. En effet, récemment des études XPS poussées ont montré la présence de deux types de sites Ti(IV) distincts dans la TS-1: les espèces tétraédriques Ti(IV) du réseau substituées à Si(IV) et les espèces tétraédriques Ti(IV) greffées à la surface des groupes hydroxyles [280]. Une étude portant sur l'époxydation du propylène en phase gaz utilisant des mesures de chromatographie couplées à de la spectroscopie Raman (GC-Raman) a montré que les espèces Ti hors réseau (non tétraédriques) étaient d'ailleurs responsables de la formation de l'oxyde de propylène du fait de leur importante acidité, supérieure à celle de TiO₂ anatase [281].

Comme énoncé précédemment, la particularité de la TS-1 est son fort caractère hydrophobe, permettant l'adsorption sélective de substrats organiques à l'intérieur des canaux du matériau. Des mesures d'adsorption de gaz (CO, CH₄ et (CH₃)₂O) utilisant le model MEA (Multiple Equilibrium Analysis), couplées à des mesures de titration calorimétrique et d'isotherme d'adsorption ont mis en avant, comme attendu, l'absence de sites acides très forts de type Brønsted sur TS-1 comparé à HZSM-5, ainsi qu'une moindre densité de fonctions permettant des liaisons hydrogène sur les surfaces interne et externe du matériau [279]. Cette absence d'acidité de surface (acide fort et liaison hydrogène) semble expliquer les propriétés hydrophobes de la TS-1. Une étude récente menée par Clerici [194] a montré que les propriétés catalytiques de la zéolithe TS-1 sont strictement dépendantes de sa structure MFI. Ainsi, il semblerait que la structure cristalline stabilise l'ancrage tripode de Ti vis-à-vis de l'hydrolyse d'une seconde liaison Ti-OSi qui transformerait les espèces actives Ti-OOH en espèces inactives Ti(η²O₂) [282].

Figure 63 : Equilibre entre les espèces Ti-OOH et Ti($\eta^2\text{O}_2$) [194].

Finalement, le caractère hydrophobe de la surface et la taille « moléculaire » des pores dus à la topologie MFI favorisent une physisorption importante des substrats apolaires tout en affaiblissant celle de l'eau, bien connue pour être un inhibiteur d'activité de Ti. En effet, ces deux paramètres couplés maximisent la probabilité de collision entre le substrat et l'espèce H_2O_2 activée [194]. Toutes ces propriétés font de la zéolithe TS-1 un excellent catalyseur pour l'époxydation d'oléfinnes de petites tailles [283], à savoir celles qui peuvent s'accommoder d'un diamètre de pores moyen $< 5,5 \text{ \AA}$ parmi lesquelles, le 1-hexène [284, 285], le cyclohexène [286], les alcools allyliques [287] ou même récemment le furfural [288].

Pour s'affranchir de ces limitations stériques, Corma et *al.* [289, 290] ont incorporé du titane dans la zéolithe Beta (Ti-Al-Beta), présentant des pores de structure tridimensionnelle légèrement plus gros ($7,6 \times 6,4 \text{ \AA}$). Cependant, la présence d'aluminium contenu initialement dans la zéolithe Beta introduit une acidité de Brønsted qui décroît la sélectivité en époxyde en entraînant l'ouverture du cycle oxirane par catalyse acide [289, 291]. Un catalyseur Ti-Beta dépourvu d'aluminium a alors été mis au point [292] pour l'époxydation du 1-octène, du norbornène (à 60°C dans MeOH avec substrat/ $\text{H}_2\text{O}_2 = 2$) ou même de substrats un peu plus gros comme le cyclooctène, les terpènes cycliques ou des alcools allyliques dont le nombre de carbone varie de 6 à 10 par exemple (à 70°C dans CH_3CN avec substrat/ $\text{H}_2\text{O}_2 = 2$). Ce solide Ti-Beta desaluminé présente encore une faible acidité de Brønsted et pour les substrats linéaires, l'activité de ce genre de catalyseur est légèrement inférieure à celle de TS-1. Cependant, il y a apparemment un potentiel catalytique pour les substrats plus encombrants avec une conversion pour le norbornène de 13,3% contre 10,1% (0% avec la TS-1) et des sélectivités respectives de 56 et 27%.

Il est intéressant de noter que la nature du solvant peut jouer sur l'activité catalytique. Par exemple, Corma et *al.* [290] ont montré que l'oxydation du 1-hexène par H_2O_2 en présence de Ti-Beta est plus sélective vis-à-vis de l'époxyde lorsqu'elle est effectuée en solution dans un solvant polaire et aprotique, comme l'acétonitrile. Ce dernier va, en effet, empoisonner les sites acides de Brønsted du fait de son caractère basique. Dans le cas de la TS-1, il semblerait qu'un solvant protique comme le méthanol, soit plus approprié pour cette même réaction comme l'ont démontré par le calcul les travaux de Ramachandran et *al.* [284]. Wróblewska et *al.* ont ainsi proposé que le méthanol pouvait intervenir et aider à la formation de l'espèce active formée par Ti et H_2O_2 [290, 293], comme montré Figure 64.

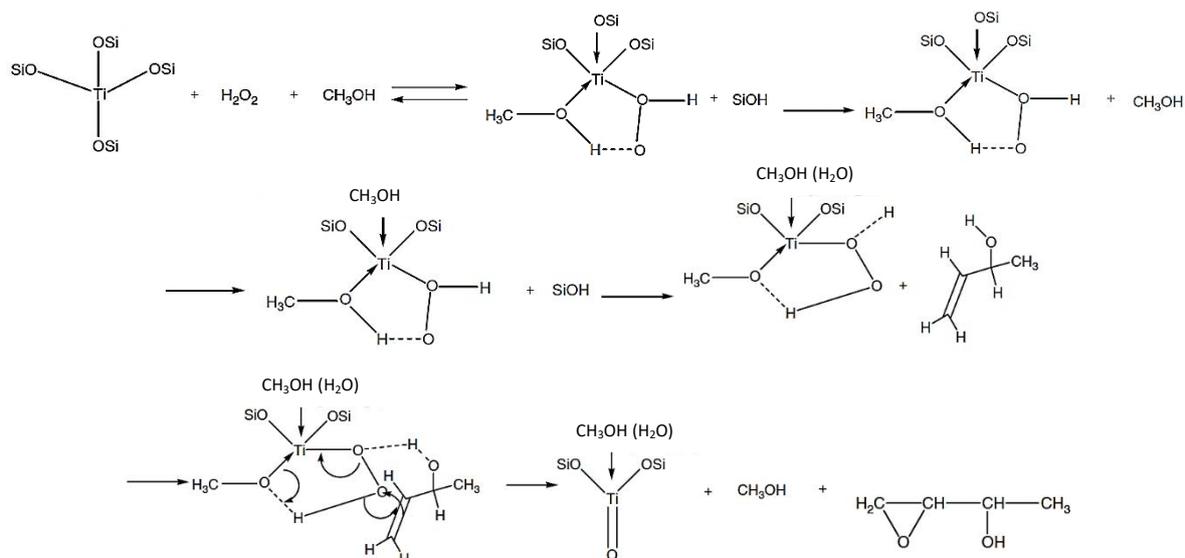


Figure 64: Implication du méthanol dans l’activation de Ti par H_2O_2 pour l’époxydation du but-3-ène-2-ol [293]

La différence de réactivité en fonction du solvant semble liée au comportement hydrophile et hydrophobe de la Ti-Beta et de la TS-1 respectivement. Il semble alors possible de prévoir quel genre de solvant (aprotique ou protique) est le plus judicieux d’utiliser selon l’affinité du solide avec l’eau.

De même, des matériaux mésoporeux silicieux pouvant accueillir de plus grosses molécules tels que ceux décrits au point 3.1.1 de ce chapitre, ont été utilisés comme supports pour insérer l’espèce catalytique à base de titane. Citons par exemple Ti-MCM-41 [294, 295] et Ti-MCM-48 [296, 297]. L’incorporation du titane dans ce genre de matériaux a été réalisée soit par synthèse directe, soit dans une étape de greffage (post-synthèse). Des précurseurs moléculaires tels que l’orthotitanate de tétrabutyle (TBOT) ou de tétrapropyle (TPOT) sont communément utilisés. En 2011, Wang et *al.* [298] ont préparé des matériaux Ti-MCM-41 et Ti-MCM-48 par synthèse directe et post-synthèse afin d’étudier l’influence des procédures de synthèse sur la dispersion du titane et sur l’activité catalytique. Les auteurs ont alors montré que Ti-MCM-41 conçu par post-synthèse affiche la plus forte activité pour l’époxydation du *cis*-cyclooctène, de l’ α -méthylstyrène et du 3-méthyl-2-buten-1-ol avec H_2O_2 aqueux dans l’acétonitrile. La caractérisation des différents catalyseurs a permis de démontrer par UV-DR que ce dernier est celui qui possède le plus de sites isolés du Ti en coordination tétraédrique ainsi que la structuration des pores la plus ordonnée. En effet, il apparaît plus difficile, lors de la synthèse directe, d’empêcher la formation de clusters Ti-O-Ti du fait des réactivités assez différentes des alcoxydes de Ti et Si d’une part, et d’autre part, du fait de l’utilisation de températures de calcination élevées pour éliminer complètement les molécules d’agent structurant.

Comme dans d’autres applications, les matériaux mésoporeux de type SBA-15 ont progressivement été testés comme supports en lieu et place de leurs analogues MCM-41. Ils sont non seulement capables d’accueillir des substrats volumineux mais sont réputés de bénéficier d’une stabilité hydrothermale plus importante en raison d’une épaisseur de parois accrue (3-6 nm) [299]. De la même façon que pour les matériaux précédents, il est possible d’introduire le titane de manière directe [300-305] ou par voie de post-synthèse à l’aide de précurseur solubilisés [297, 305-307] ou gazeux [308-311]. Cependant, la synthèse directe des silices de type SBA-15 a lieu en milieu fortement acide ($[\text{HCl}] = 1,6 \text{ M}$) rendant difficile l’incorporation du titane. Plusieurs méthodes ont donc été proposées afin d’améliorer l’incorporation du titane, comme par exemple, l’addition d’ions fluorure

dans le gel de synthèse [300], l'ajustement du pH en cours de synthèse vers des valeurs plus neutres [312] ou l'utilisation d'un traitement hydrothermal sous micro-ondes [302]. Notons que certains travaux, ceux notamment de Morey *et al.* [297] basés sur des analyses PAS (photoacoustique) - FTIR, mettent en garde contre le fait que la plupart des espèces du titane peuvent être encapsulées dans les murs des parois du matériau et être inaccessibles pour la catalyse lors d'une synthèse « *one-pot* » du catalyseur.

Rappelons également qu'au point 3.1.1 de ce chapitre, le développement continu de matériaux silicieux supports a conduit à l'apparition de mousses mésocellulaires : les MCFs. Nous avons ainsi pu voir que ces mousses présentent une structure tridimensionnelle amorphe à larges cellules sphériques (20-42 nm) interconnectées entre elles par des fenêtres communicantes (9-22nm). Cette texturation devrait non seulement permettre l'oxydation de substrats volumineux mais également pallier aux problèmes de diffusion des différents composés (substrat, produits ou oxydant). Jusqu'à présent, très peu de travaux ont porté sur l'époxydation d'alcènes avec H₂O₂ catalysée par des catalyseurs de type Ti-MCF. En 2005, Maksimchuk *et al.* ont préparé ce type de matériau en incorporant le titane par une voie de post-synthèse et l'ont utilisé pour catalyser l'oxydation de l' α -pinène par H₂O₂ [220]. Il est comparé, dans ces travaux, au solide à base de tungstène H₅PW₁₁TiO₄₀/silice. Dans l'acétonitrile à 50°C et, pour un rapport équimolaire substrat/H₂O₂, Ti-MCF est aussi efficace que H₅PW₁₁TiO₄₀/silice en termes de taux de conversion (de l'ordre de 60%). Plus récemment, O'Callaghan et Sullivan [305] ont comparé les catalyseurs Ti-SBA-15 et Ti-MCF dans le cadre de l'époxydation du cyclohexène avec H₂O₂ produit *in-situ* à partir de O₂ et H₂ grâce à une dispersion de nanoparticules de Au ou Au-Pd présentes au sein de ces matériaux. Les auteurs ont d'abord analysé la capacité de chacun des deux supports à accueillir Ti puis ont testé l'activité des catalyseurs résultants en présence de H₂O₂ 30% en masse à 60°C dans MeOH. *A priori*, il est apparu que l'incorporation de Ti est plus efficace dans MCF que SBA-15; l'activité de Ti-MCF est également la plus importante. La conversion en cyclohexène est de 94% avec un rendement en époxyde de 5%, tandis que la conversion et le rendement avec Ti-SBA-15 sont respectivement de 83 et 1%. Cependant, lors de la mise en œuvre du dispositif de production de H₂O₂ *in-situ* avec Au, les tendances s'inversent et les performances avec Ti-SBA-15 sont légèrement meilleures (7% de conversion pour 4% de rendement, contre 2% et 1% respectivement avec Ti-MCF). Les performances avec ces derniers catalyseurs sont cependant faibles et donc à perfectionner, mais les auteurs observent un lessivage minime de Ti, Au et Pd, que ce soit avec H₂O₂ ajouté ou produit *in-situ*, preuve de la bonne introduction de ces espèces au sein des matériaux.

En fait, dès 2003 Kaliaguine et son équipe ont soulevé deux inconvénients majeurs pour les matériaux MCFs ; à savoir le caractère hydrophile de leur surface (tout comme SBA-15) et la nature amorphe de la paroi de leurs pores, deux paramètres qui tendent à limiter leur utilisation dans les réactions d'oxydation impliquant H₂O₂. Ainsi, deux approches proposées par Kaliaguine pour pallier aux inconvénients de l'utilisation de matériaux amorphes à larges pores tel que MCF ou UL¹⁶ reviennent à introduire de la zéolithe TS-1. Aussi, ces auteurs ont-ils proposé de mettre au point une version de Ti-MCF silicieux recouverte d'une sorte de revêtement de TS-1 (TS-1 coated Ti-MCF ou TS1@MCF) [313, 314]. Pratiquement, il s'agit d'abord de synthétiser le matériau Ti-MCF puis d'imprégner ce dernier par un gel de synthèse de TS-1 (Si/Ti atomique = 65, en utilisant le TPOT et le TEOS comme source de titane et silice respectivement) et de laisser cette dernière se former dans des

¹⁶ Matériau à ultra-larges pores

conditions qui lui sont favorables et sans trop dégrader le support amorphe mésoporeux. La parade consiste à utiliser notamment un solvant visqueux comme le glycérol. Cette opération a été répétée (TS1-MCF1 et TS1-MCF2 respectivement dans le tableau qui suit). Globalement, ces traitements s’accompagnent d’une diminution des valeurs des différents paramètres texturaux (volume de pores, surface spécifique (-40% environ) et dimensions des cellules et des fenêtres). Le matériau deux fois enrobé a également subi un traitement de silylation. Les effets en termes d’activité catalytique n’ont pas été analysés par les auteurs dans le cadre d’une réaction d’époxydation mais lors de l’hydroxylation du 1-naphtol par H_2O_2 , une réaction très peu efficace en partant de Ti-MCF. L’effet de l’ajout du revêtement de TS-1 puis du traitement de silylation est clairement visible dans le Tableau 2. Les revêtements de type TS-1 ont permis de doubler, voire de tripler la conversion du 1-naphtol et même de l’augmenter d’un facteur huit après l’étape de silylation. En parallèle, l’utilisation du peroxyde d’hydrogène devient de plus en plus efficace sans pour autant que son taux de décomposition par dismutation ne varie fortement (toujours 9,7% pour le matériau le plus efficace). Pour la bonne compréhension de ces faits expérimentaux, il aurait été bien que les auteurs réalisent la silylation de Ti-MCF de départ pour permettre une meilleure analyse des apports respectifs de la TS-1 et des fonctions triméthylsilyles. Malgré tout, il apparaît que ce genre de matériau, présentant une structure de pores bimodale combinant à la fois les avantages des zéolithes et des tamis moléculaires mésoporeux, pourrait être également très intéressant dans le cadre de l’époxydation d’alcènes par H_2O_2 .

Tableau 2: Hydroxylation du 1-naphtol avec H_2O_2 en utilisant Ti-MCF et Ti-MCF recouverte de TS-1 (TS1@MCF) [313]

Echantillon	Matériau	Conversion 1-Naphtol (mmol)	Sélectivité H_2O_2 (mol%) ^a	TON (mol.mol-1 Ti/24 h) ^b	Décomposition H_2O_2 (mol%)
1	Ti-MCF	0,12	12,8	9,9	7,9
2	TS1-MCF1	0,205	24,8	16,7	5,9
3	TS1-MCF2	0,295	27,2	24	7,5
4	TS1-MCF2-sil ^c	0,947	48,8	76,2	9,7

Conditions de réaction : 0,1 g de catalyseur, 0,007 mol de 1-naphtol, 2,1 g de H_2O_2 aqueux (30% mass.), 10 g d’acétonitrile, 60°C pendant 24 h.

^a Sélectivité de H_2O_2 : H_2O_2 consommé lors de l’oxyfonctionnalisation par rapport au H_2O_2 total utilisé.

^b TON : moles de H_2O_2 converties par mole de Ti après 24 h de réaction

^c Echantillon TS1-MCF2 silylé

Cette approche a été mise en œuvre avec d’autres supports mésoporeux à base de titane dotés de larges pores. L’équipe de Kaliaguine a ainsi développé des matériaux micro/méso de type UL-TS-1 [313] en mettant en contact un matériau mésoporeux à ultra-larges pores avec de l’hydroxyde de tétrapropylammonium (TPAOH) de façon à promouvoir la cristallisation de clusters de zéolithe. L’étape de cristallisation s’effectue dans un autoclave à 120°C en présence d’une très faible quantité d’eau. Ici aucune source de Ti supplémentaire n’est ajoutée, celui-ci provient du matériau de base qui subit par la suite une cristallisation. Il est attendu que les nanocristaux ainsi formés se retrouvent « noyés » dans la matrice amorphe et que le matériau final (UL-zéolithe) présente des mésopores dont les parois ont des caractéristiques cristallines. Les paramètres texturaux du matériau résultant sont relativement proches de ceux TS1@MCF.

Les mesures de DRX et les essais catalytiques, ici encore pour l’hydroxylation du 1-naphtol avec H_2O_2 , tendent à indiquer qu’environ 70% de la surface des mésopores du matériau UL-TS-1 est cristalline. D’ailleurs en termes d’activité catalytique, les valeurs de conversions et de TON sont assez proches de

celles du Tableau 2 dans les mêmes conditions. Cependant H_2O_2 ne semble pas consommé de façon plus efficace ; son taux de décomposition par dismutation est même largement supérieur.

Parmi les différents titanosilicates présentés, la zéolithe TS-1 est incontestablement le matériau qui présente la meilleure activité catalytique dès lors que les substrats sont adaptés à sa porosité. Cette activité est liée à la nature des sites catalytiques et au caractère hydrophobe de sa surface qui permet de lutter contre la désactivation par coordination d’un nombre trop important de molécules d’eau. Cet aspect revêt toute son importance quand l’oxydant est le peroxyde d’hydrogène en solution aqueuse. Un autre moyen d’élargir finalement le champ d’application de cette zéolithe revient à la modifier par un post-traitement visant à créer une mésoporosité supplémentaire. Cette approche dite de hiérarchisation de la porosité, valable pour différents types de zéolithes [315-317], consiste à procéder à une désilication sélective par attaque ($NaOH$ ou NH_3) à des concentrations (0,1-0,8 M de $NaOH$), températures ($65^\circ C$) et durées (30 min-1 h 10) qui dépendent de la mésoporosité désirée. Elle a été appliquée en particulier à la zéolithe TS-1 [318-321]. La concentration de la base et le temps de traitement sont deux paramètres importants pour contrôler l’ouverture de la porosité. Un post-traitement par HCl peut d’ailleurs être utilisé pour neutraliser plus efficacement l’action de $NaOH$ stoppant ainsi la désilication. La Figure 65 ci-dessous montre le changement évident de morphologie du matériau obtenu par Silvestre-Albero et *al.*

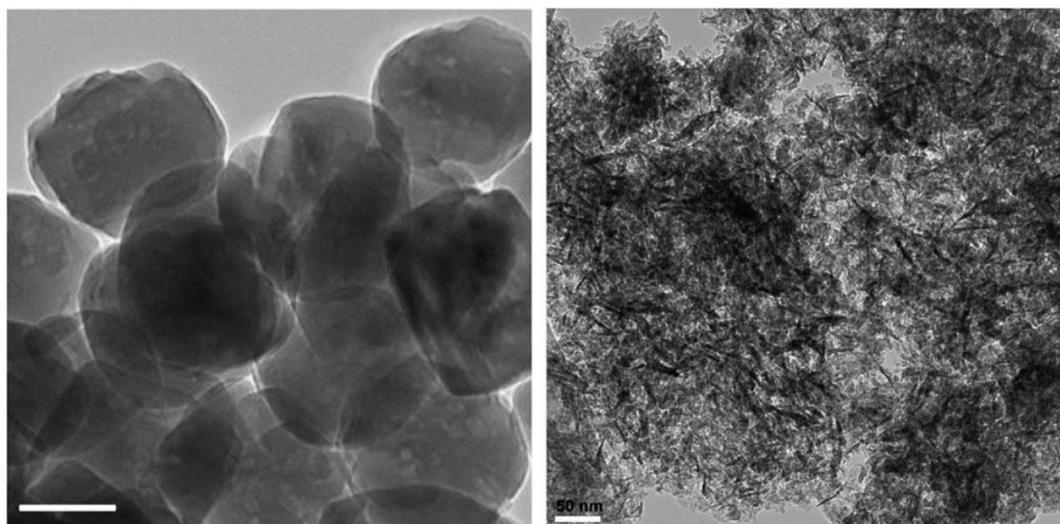


Figure 65: Images MET de la TS-1 originale (à gauche, barre d’échelle = 100 nm) et de la TS-1 désilicée par $NaOH$ (0,4 M) pendant 30 mins suivi par un post-traitement avec HCl [319]

Dans ce cas précis, un tel traitement se répercute logiquement par une augmentation de la proportion de Ti dans le matériau (au-dessus de 2,6 à 21,9 % de Ti), et une ouverture de la mésoporosité (qui passe de $0,39$ à $0,73\text{ cm}^3.g^{-1}$), tout en réduisant la surface spécifique du matériau (sur les images ci-dessus S_{BET} varie de $440\text{ m}^2.g^{-1}$ au départ à 185). Dans ces travaux, deux molécules modèles de tailles différentes ont été époxydées avec H_2O_2 : le cyclohexène et une forme substituée de ce dernier, le 1-*tert*-butyl-1-cyclohexène. Comme attendu, la zéolithe TS-1 favorise l’oxydation du cyclohexène et non celle du 1-*tert*-butyl-1-cyclohexène (taux de conversion égaux respectivement à 62 et 16%). En revanche, le catalyseur modifié Figure 65 conduit à une plus grande conversion de cette dernière molécule, jusqu’à 35%, tout en défavorisant celle du cyclohexène de 30%, sans doute suite à la dégradation concomitante des sites actifs de départ. La similarité des conversions s’explique par l’élargissement des pores, dans lesquels les deux substrats peuvent tous deux pénétrer.

La distribution en taille des mésopores ainsi créés n’est pas particulièrement contrôlée. Wilde et *al.* [318] ont proposé récemment de faire intervenir un agent structurant à longue chaîne du type de ceux utilisés pour les synthèses de matériaux aux mésopores structurés, comme l’ion CTMA⁺ (OH⁻ ou Br⁻). Pour se faire, ces auteurs ont proposé une approche en deux étapes faisant intervenir d’abord une désilication partielle de la TS-1 par voie alcaline à 65°C pendant 70 min (NaOH à 0,1 M ou NH₃ à 13 M en présence ou non de l’agent structurant de la zéolithe, TPAOH), suivie d’un traitement hydrothermal de recristallisation à 110°C pendant 24 h, en présence de CTMAOH ou CTMABr (Figure 66).

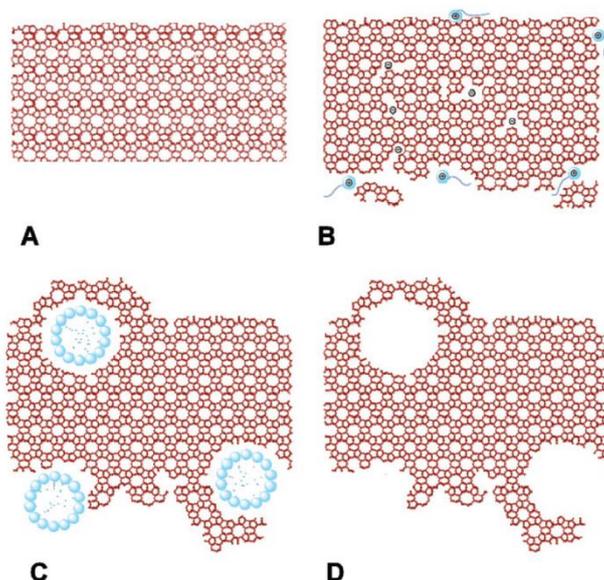


Figure 66: Processus de formation des mésopores de taille contrôlée dans la TS-1: (A) TS-1 microporeuse, (B) ouverture des liaisons Si-O-Si / Si-O-Ti et reconstruction en milieu alcalin, (C) réarrangement cristallin afin d’accommoder les micelles de tensioactifs et (D) retrait du surfactant [318]

Dans ce cas précis, le matériau résultant a été utilisé pour catalyser l’époxydation de biodiesels (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) par H₂O₂. Il a ainsi été montré que la TS-1 recristallisée en présence de CTMA⁺ présente une activité catalytique par site actif de Ti jusqu’à deux fois plus élevée comparée à la TS-1 non traitée. La sélectivité en époxyde atteint alors 82%. C’est un résultat particulièrement intéressant puisque les mêmes auteurs précisent que l’activité catalytique et la sélectivité en époxyde sont fortement réduites lorsque la TS-1 n’a subi qu’un traitement de désilication.

Wang et *al.* [320] ont également exploité ce type de traitement de dissolution-recristallisation. Les clichés obtenus par MET Figure 67 semblent indiquer que le contrôle de la taille des mésopores et dans une moindre mesure de leur organisation est plus abouti que dans le cas des travaux rapportés par Silvestre-Albero et *al.* Figure 65.

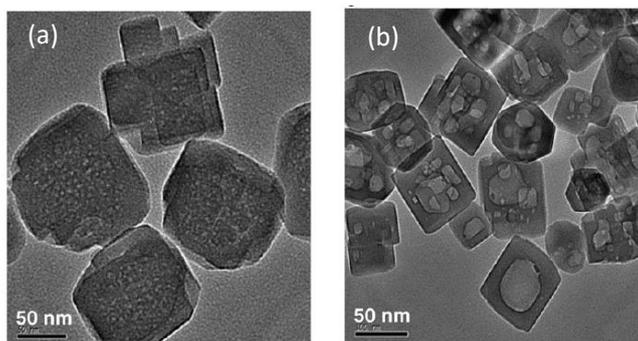


Figure 67: Images MET de TS-1 directement calciné (a) et après recristallisation à 180°C pendant 24 h (b) [320]

D’autres approches existent avec des degrés plus ou moins élevés de sophistication, comme par exemple celles faisant intervenir une fonctionnalisation de la surface des grains de TS-1 en cours de croissance, par des groupements amphiphiles issus de réactifs de silylation comme le N-phénylaminopropyltriméthoxysilane (PHAPTMS, [322]) ou le chlorure de diméthylodécyl[3-(triméthoxysilyl)propyl]ammonium (TPOAC, [323]). L’idée est ici de produire des nanocristaux avec des mésopores inter-granulaires.

Les voies dites de « *hard-templating* » ont également été regardées, par exemple, en remplissant les pores de carbones mésostructurés de type CMK-3 par le gel de synthèse de la zéolithe TS-1 puis en laissant ce dernier cristalliser avant d’éliminer le carbone par un traitement de calcination. Dans ce type d’approche, les mésopores correspondent au volume occupé au départ par le carbone (ici en bleu clair), comme montrée Figure 68:

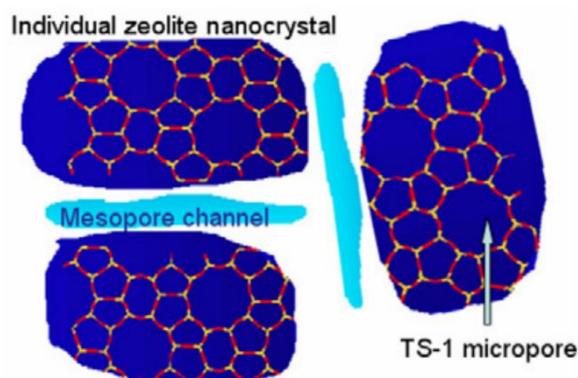


Figure 68 : Description de la structure de la zéolithe TS-1 mésoporeuse obtenue en utilisant du carbone CMK-3 comme « *template* » [324]

Dans des travaux qui se rapprochent, Yue et *al.* [325] ont également eu recours à un moment donné à un composite carbone-titanosilicate. Celui-ci a été obtenu cette fois-ci par immersion d’une mousse de polyuréthane dans un gel comprenant les sources de silicium, de titane ainsi que du copolymère P123. Le carbone a été formé ensuite par carbonisation du matériau hybride puis le composite carbone-titanosilicate ainsi formé a été transformé en zéolithe TS-1 par la méthode DGC (dry-gel conversion) moyennant l’utilisation d’un gel contenant des germes de zéolithes. Les auteurs ont fait varier le temps de cristallisation de 12 à 120 h et les meilleurs résultats pour l’époxydation du 1-hexène et du cyclohexène ont été obtenus avec celui dont le temps est le plus long. Ainsi, les performances catalytiques lors de l’oxydation du 1-hexène avec ce matériau (Si/Ti = 42,5), après 2 h à 60°C dans MeOH, aboutit à une conversion en 1-hexène proche de celle avec TS-1 (Si/Ti = 42,4) (21,3% contre

20,6% respectivement), de même que pour la sélectivité en époxyde (94% contre 93% respectivement). L’amélioration des performances catalytiques (notamment au niveau de la sélectivité) est plus visible pour l’époxydation du cyclohexène avec une conversion de 4,3% et une sélectivité de 37%, contre 2,1% et 18% respectivement avec TS-1.

c.2. Silylation des catalyseurs titanés

Bien que ces catalyseurs permettent d’accéder à une plus large variété de substrats, ceux-ci sont généralement hydrophiles et, utilisés avec H₂O₂ aqueux, cela tend à abaisser la sélectivité en époxyde. Corma et *al.* [326] ont proposé deux stratégies pour contrer cette hydrophilie de surface, consistant pour l’une à rendre la surface plus hydrophobe par silylation, et pour l’autre, à retirer l’eau du milieu réactionnel. La première stratégie a largement été utilisée avec différents précurseurs tels que l’hexaméthylsilazane (HMDS) [326-328] (Figure 69) ou le chlorotriméthylsilane (CTMS) [328-330], tous les deux conduisant au remplacement des atomes d’hydrogène des silanols par des groupements triméthylsilyle en surface du matériau. D’autres agents de silylation plus exotiques tels que MSTFA (N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) [331, 332] ont été testés. Certains font intervenir également le titane comme le *tétrakis*(diméthylamido)titane(IV) (Ti(NMe₂)₄) et le silylamide de titane (IV) (Ti(NMe₂)₃[N(SiHMe₂)₂]); ils jouent à la fois le rôle de source de Ti et d’agent de silylation.

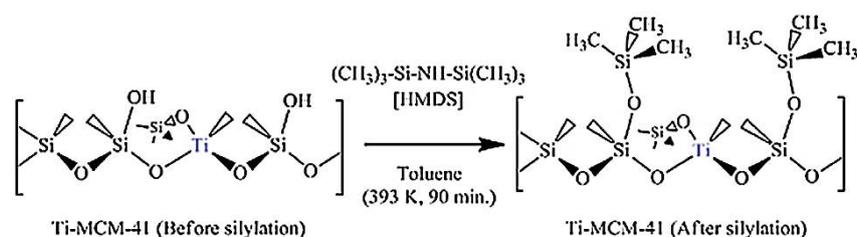


Figure 69: Traitement de silylation post-synthèse de Ti-MCM-41 par HMDS [333].

Silvestre-Alberó et *al.*, dans une étude récente utilisant un mélange TBHP/eau (3/2) pour l’oxydation de terpènes [333], sont parvenus à caractériser l’amélioration du caractère hydrophobe de Ti-MCM-41 en réunissant un panel de techniques telles que la calorimétrie, la RMN ²⁹Si et la spectroscopie XANES. Par exemple, après 8 h à 70°C, la conversion de l’ α -pinène avec ce type de catalyseur est de 85%, avec une sélectivité en époxyde de 78% contre 10% et 8%, respectivement avec Ti-MCM-41. Très clairement, l’absence d’eau dans l’environnement des sites Ti favorise la formation de l’époxyde et permet surtout d’éviter la réaction secondaire d’ouverture des cycles oxiranes qui produit les « glycols » correspondants. Ce type de produit, très polaire, qui a tendance à s’adsorber de manière irréversible sur les sites Ti peut être également responsable de la désactivation du catalyseur.

En général, l’eau dont il faut contrecarrer l’action est celle apportée par l’oxydant et celle produite conjointement avec l’époxyde. Dans une application visant l’époxydation du cyclohexène en l’absence de solvant et en présence de H₂O₂, Igarashi et *al.* ont préparé, par voie de synthèse directe, des matériaux de type Ti-MCM-41 incorporant des fonctions organiques de type méthyle (Me), phényle (Ph), vinyle (Vi) ou pentyle (Pe) apportées respectivement par le biais des organotriéthoxysilanes correspondants (rapport molaire d’espèces organiques/Ti compris entre 0 et 20) [334]. Il a alors pu être constaté que :

- la sélectivité en époxyde évolue ainsi : Ti-MCM-41-Me (70%) > Ti-MCM-41-Ph (26%) > Ti-MCM-41-Pe (15%) > Ti-MCM-41 (8%) > Ti-MCM-41-Vi (2%),

- le taux de silylation ne doit pas être trop important au risque d’atténuer la réactivité du catalyseur.

Des essais visant à rendre les surfaces des catalyseurs Ti-SBA-15 davantage hydrophobes ont été également reportés dans la littérature pour augmenter la sélectivité de la réaction d’époxydation. Citons, par exemple, les travaux de Brutchey *et al.* [335] dans lesquels des composés du type (N,N-diméthylamino)trialkylsilanes ($\text{Me}_2\text{N-SiMe}_2(\text{R})$) où $\text{R} = \text{Me}$, ^nBu , or ^nOc , avec une grande variété de possibilités pour les groupements alkyle, ont été greffés sur Ti-SBA-15. Dans CH_3CN à 65°C avec H_2O_2 comme oxydant, après 2 h de réaction, une augmentation significative de la sélectivité en oxyde de cyclohexène a été mise en avant avec l’ordre suivant: Ti-SBA15 (19%) < Ti-SBA-15-Bu (20%) < Ti-SBA-15-Me (30%) < Ti-SBA-15-Oc (58%), pour des rendements respectifs (basés sur H_2O_2) de 5,8, 15,3, 9,4 et 6,3%. Le triéthoxyfluorosilane (TEFS) a également été utilisé comme agent de silylation de Ti-SBA-15 (Figure 70), permettant d’atteindre une sélectivité de 97% lors de l’époxydation du cyclooctène avec H_2O_2 [336]. Entre les deux dernières exposées, il est cependant difficile de conclure quant à la procédure la plus efficace sachant que l’époxydation du cyclooctène conduit plus généralement à davantage d’époxyde que celle du cyclohexène.

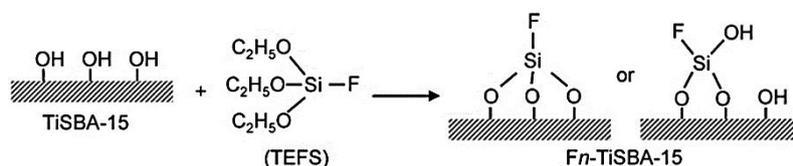


Figure 70: Schéma réactionnel de la modification de la surface de Ti SBA-15 par le triéthoxyfluorosilane [336].

L’insertion d’éléments hydrophobes dans le matériau par synthèse directe a été testée par Huang *et al.* [337] qui ont mis au point un matériau PMO (pour Periodic Mesoporous Organosilica) hybride silylé, en utilisant à la place du TEOS du 1,4-bis (triéthoxysilyl)benzène (BTEB) comme source de Si et du TBOT comme source de titane (Figure 71). Cette synthèse peut être suivie d’une étape de silylation avec CTMS. Les auteurs de ce travail espèrent que les groupements phényle insérés dans le réseau contribueront comme un facteur hydrophobe supplémentaire sur le matériau. Les matériaux ainsi obtenus sont nommés Ti-SBA-15-ben et Ti-SBA-15-ben-T après silylation.

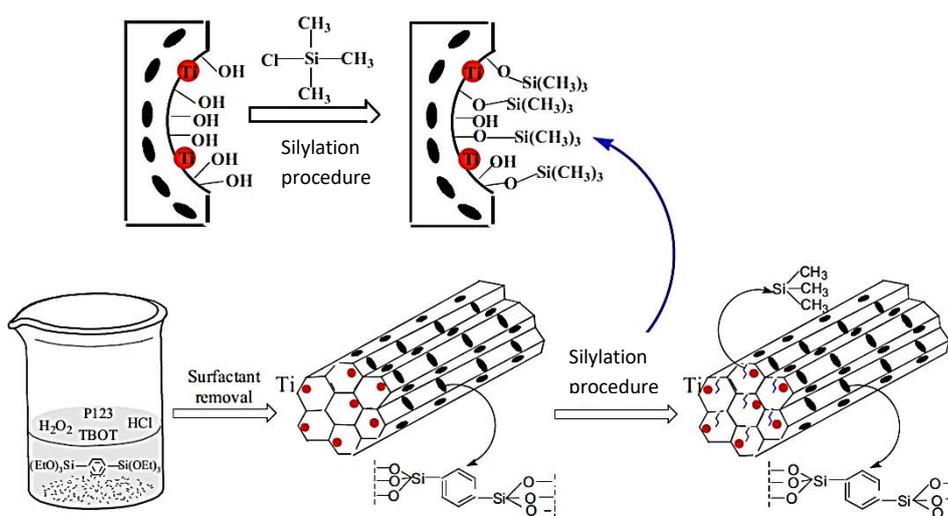


Figure 71: Préparation du matériau hybride Ti-SBA-15-ben (benzénique) silylé [337]

Ces matériaux ont été testés pour l’époxydation de cyclohexène et ont montré les performances récapitulées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3: Performances catalytiques des matériaux mis au point par Huang et al. [337] pour l'époxydation du cyclohexène par TBHP aqueux

Matériau	Ti (% mass.)	Conv. (% mol.)	TOF (h ⁻¹)	Sélectivité (%)						
										autres
SBA-15	0	4,5	0	0	43,3	0	19,1	27,7	0	9,9
Ti-SBA-15	2,3	12,9	3,6	8,3	50,7	1,6	21,9	5,8	0,03	11,4
Ti-SBA-15-T	1,3	26,3	12,9	33,2	32,9	0,7	14,8	4,2	0	14,2
Ti-SBA-15-ben	3	34,7	7,4	59,9	21,1	0,5	5,9	1,2	2,2	9,2
Ti-SBA-15-ben-T	0,9	38,7	27,5	71,5	15,5	0,4	3,9	0,8	1,1	6,8

Conditions de réaction : 0,24 g de catalyseur, 0,016 mol de cyclohexène, 0,016 mol de TBHP (70% aq.), 70°C pendant 5 h.
TOF : mole de substrat convertie pour une mole de centre actif par heure

Avec le matériau Ti-SBA-15-ben, la sélectivité en époxyde et la conversion du cyclohexène ont été améliorées jusqu'à 59,9% et 34,7% respectivement. La sélectivité est encore meilleure (71,5%) après silylation. Cela s'explique par la génération de centres actifs hydrophobes grâce aux groupements phényle, qui aident à incorporer plus de Ti en coordinence tétraédrique sur les surfaces intérieures de la silice mésoporeuse. Les meilleures performances de Ti-SBA-15-ben silylé indiquent que le caractère hydrophobe de la surface extérieure est également un facteur clé influençant la performance catalytique. Finalement, même si l'exemple ici utilise TBHP dans 70 % d'eau comme oxydant, il montre l'intérêt d'un couplage entre des fragments organiques incorporés à l'intérieur du réseau silicique et d'autres à l'extérieur (silylation post-synthèse) pour rendre ces matériaux mésoporeux suffisamment hydrophobes.

Pour conclure, les titanosilicates catalysent l'époxydation des alcènes par H₂O₂ aqueux avec plus ou moins de succès. La présence d'eau apportée par H₂O₂ (solvant) ou résultant de son utilisation (époxydation ou dismutation) a plutôt tendance à nuire à leur activité. Aussi, d'une façon générale, les solutions qui visent à rendre leurs surfaces plus hydrophobes ont un impact positif à condition toutefois de ne pas trop occulter le titane. Parmi ces différents matériaux, la zéolithe TS-1 ressort du lot car, par nature, sa surface est hydrophobe mais malheureusement ses pores sont peu adaptés à des substrats volumineux. Le dernier point traité ici indique que beaucoup d'efforts ont été déployés pour conjuguer TS-1 et mésoporosité dans le but d'étendre le champ d'action de cette zéolithe efficace. Enfin, il est évident que les conditions de réactions, telles que la température ou le solvant, sont également des paramètres importants à considérer. Cette étude a montré que les catalyseurs présentés (W, Nb et Ti, le vanadium étant inactif supporté) fonctionnaient tous dans des conditions proches, à savoir pour des températures comprises entre 50-70°C (on retrouve même 90°C avec Nb) et principalement dans l'acétonitrile (le DMC a été évoqué avec le tungstène, de même que le méthanol avec Ti).

3.2. Inconvénients liés à l'utilisation de H₂O₂ comme oxydant

Malgré les avantages énoncés précédemment, l'utilisation de H₂O₂ souffre de deux principaux inconvénients, à savoir sa dismutation et, en catalyse hétérogène, son rôle déclencheur du lessivage des espèces catalytiques supportées.

3.2.1. Le lessivage de l'espèce catalytique par H₂O₂

Le lessivage ou lixiviation de l'espèce active lors de l'utilisation de catalyseurs hétérogènes est notamment observable en phase liquide et pour les réactions d'oxydation. En effet, dans ce dernier cas, les oxydants utilisés (H₂O₂, ROOH ou RC(O)OH, etc), les produits obtenus (H₂O, ROH, RCO₂H, etc.) ou les solvants retenus sont des entités nucléophiles qui ont tendance à provoquer la solvolysse de la liaison métal-oxygène et donc le relargage de l'espèce active. Cela est particulièrement vrai pour les supports siliciques. Arends et Sheldon [256] proposent trois scénarios possibles sur le devenir de l'espèce active d'un catalyseur hétérogène en phase liquide :

- Le métal n'est pas lessivé et la catalyse observée est purement hétérogène,
- Le métal lessivé n'est pas une espèce active (mauvais ancrage et coordination) et la catalyse observée est principalement hétérogène,
- Le métal est lessivé et forme en solution un catalyseur homogène hautement actif. La catalyse est alors purement homogène.

Les catalyseurs d'époxydation à base de titane cités précédemment sont plus concernés par le premier et second scénario dans la mesure où le titane est connu pour ne pas être un catalyseur homogène très performant, sauf cas particulier (Sharpless). Ainsi la TS-1 ou le Ti(IV)/SiO₂ seraient plus concernés par le premier scénario, tandis que les catalyseurs tels que Ti-MCM-41 ou-48, Ti-SBA-15 ou Ti-MCF (titanés majoritairement par post-synthèse) tendraient vers le second. Le vanadium, également très actif pour l'époxydation d'alcènes, a tendance quant à lui à suivre le troisième scénario. En effet, à de nombreuses reprises, le lessivage du vanadium a été rapporté, que ce soit sur HMS (hexagonale mesoporous silica) [338], ZSM5 [339], aérogels ou xérogels [340], par exemple. Ces études ont permis de révéler que ce phénomène n'est pas lié à la taille des pores du support, dans la mesure où il a été observé à la fois sur des matériaux micro- et mésoporeux. Il semblerait que le lessivage se produise uniquement en condition d'époxydation, autrement dit en présence de substrats et dépend de leur nature.

Même si dans le cas des catalyseurs à base de titane le lessivage n'est pas immédiat, il peut être observé après plusieurs cycles d'utilisation. Le lessivage est bien moindre dans les solvants apolaires et en présence d'hydroperoxydes organiques. Le relargage de l'espèce active est surtout à redouter en milieu aqueux. Ainsi Chen et *al.* [341], dans leurs travaux portant sur l'époxydation du cyclohexène en présence de Ti-MCM-41 dans MeOH, ont observé un lessivage important dans le cas de H₂O₂ aqueux et indépendamment du mode d'introduction du titane (synthèse directe ou post-synthèse). Celui-ci s'est avéré en revanche négligeable avec TBHP. Les molécules polaires, en particulier H₂O₂, H₂O et CH₃OH, peuvent se coordonner au titane. La structure tétraédrique de Ti peut évoluer alors vers une structure octaédrique puis, dans le cas où l'interaction avec ces molécules est suffisamment forte, la

liaison Ti-O-Si peut même être rompue. Le lessivage de Ti semble dépendre également du support silicique utilisé. En effet, Wu et *al.* [306] ont mis en évidence la plus forte résistance de Ti-SBA-15 (obtenu par post-synthèse) face à ce phénomène comparé au catalyseur Ti-MCM-41 (obtenu par synthèse directe), comme le montre la Figure 72 ci-dessous, laquelle représente la quantité de Ti relarguée en solution en fonction du nombre de tests catalytiques réalisés avec le même catalyseur.

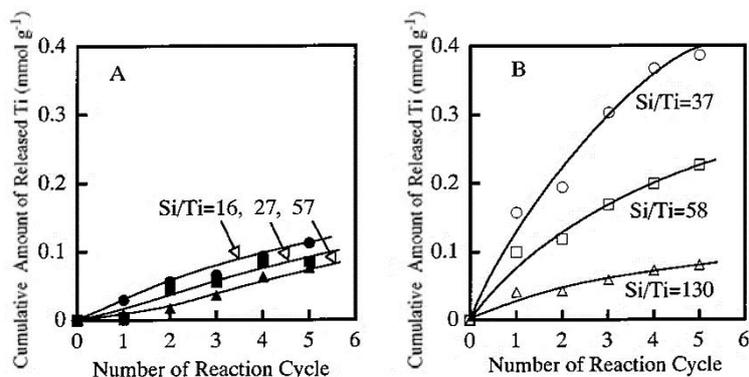


Figure 72: Quantité de Ti lessivé après l'époxydation répétée du cyclohexène avec H₂O₂ pour Ti-SBA-15 (A), Ti-MCM-41 (B). Le rapport Si/Ti représenté est celui du catalyseur de départ. Conditions d'époxydation: catalyseur = 0,05 g, cyclohexène = 30 mmol, H₂O₂ = 30 mmol; température = 60°C et temps = 2 h dans l'acétonitrile [306].

Deux raisons sont données pour expliquer le lessivage du titane avec ce type de catalyseurs. D'abord, ces matériaux mésoporeux présentent d'abondants groupements silanol en comparaison avec d'autres titanosilicates ce qui implique un environnement des espèces du titane très hydrophile conduisant à une forte propension de ces derniers à être attaqués par des molécules d'eau. S'ajoutent à cela des problèmes de stabilité des parois constituées majoritairement de silice amorphe qui, après hydrolyse des liaisons siloxanes, donnent lieu à l'effondrement de la structure des pores. Dans ce dernier cas, l'espèce Ti tend alors à se désolidariser du support et est extraite encore plus facilement de la matrice silicique par l'eau ou le peroxyde d'hydrogène. Selon les auteurs, le lessivage pour Ti-SBA-15 serait lié essentiellement à sa grande hydrophilie (première explication). Pour Ti-MCM-41, la seconde explication entre également en compte. En effet, il est apparu que la surface spécifique de Ti-MCM-41 diminue de quasiment un facteur 2 après 5 tests catalytiques.

Enfin, même s'il a été dit précédemment que la zéolithe TS-1 ne subit que très peu, voire pas de lessivage, ce phénomène a tout de même été observé [288, 342]. La façon dont la zéolithe est préparée peut jouer sur ce phénomène, en particulier la durée de son étape de cristallisation. Cela a été montré par Davies et *al.* [343] dans le cadre de l'oxydation de l'alcool crotyle ((2E)-But-2-en-1-ol) par H₂O₂. La durée de cristallisation de la TS-1 s'est révélée être un paramètre critique puisque la lixiviation du Ti a été observée pour la TS-1 cristallisée uniquement sur une durée de 2 jours, alors que celle cristallisée 10 jours n'a rien subi. Il est probable que le titane lessivé provienne de défauts dans la structure, comme par exemple des ions Ti⁴⁺ en coordinence imparfaitement tétraédrique, surtout pour une TS-1 préparée en utilisant une courte période de cristallisation. Ici, en particulier, il semblerait que le lessivage soit dû à la présence de triols, obtenus par hydrolyse de l'époxyde, qui en se liant au site catalytique vont permettre la rupture d'une liaison Ti-O-Si, comme proposé Figure 73 :

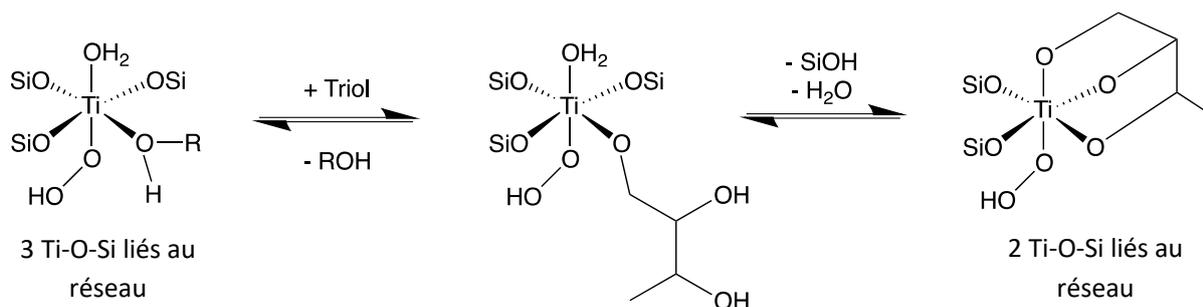


Figure 73: Mécanisme proposé par Davies *et al.* [343] pour la chélation du triol au Ti dans TS-1 conduisant à la solubilisation du métal.

Ainsi, il est possible de conclure que le lessivage dépend de plusieurs paramètres propres au système catalytique, tels que la morphologie, la nature du support et de ses défauts, tout comme les conditions de réaction (solvant, substrat, température etc.) qu’il s’agit de considérer. Dans le cas des supports mésoporeux le lessivage est surtout lié à la morphologie du matériau et pas vraiment à la méthode d’introduction du Ti. Pour la zéolithe TS-1, le critère important est le temps de cristallisation.

4.2.2. La dismutation de l’oxydant H_2O_2

Le peroxyde d’hydrogène est une espèce chimique métastable. Du point de vue thermodynamique, H_2O_2 tend à se décomposer en H_2O et O_2 selon un processus de dismutation. Cette réaction est généralement lente mais peut être catalysée par les métaux de transition, utilisés justement pour activer cet oxydant en vue de l’époxydation. Une telle décomposition entraîne une diminution néfaste du rendement attendu en époxyde. La compréhension des conditions dans laquelle elle est favorisée est donc essentielle pour optimiser les réactions d’oxydation faisant intervenir cet oxydant.

Cependant, malgré les nombreuses études publiées sur les mécanismes d’oxydation faisant intervenir des catalyseurs à base de titane couplés avec H_2O_2 , peu d’auteurs se sont vraiment attardés sur l’étude de la décomposition de l’oxydant [344-346]. Les quelques travaux rapportés ont permis de mettre en évidence les effets de l’acidité de la surface, du pH du milieu et du solvant. Yoon *et al.* [347], dans une étude assez récente, ont proposé un mécanisme de décomposition de H_2O_2 , appuyé par des analyses du catalyseur par spectroscopie UV-visible en mode réflexion diffuse couplées à de la modélisation par DFT (Density Functional Theory). Comme vu précédemment Figure 63, il est mentionné que l’interaction du site Ti avec H_2O_2 et donc en présence d’eau, mène à un mélange de différentes espèces en équilibre : les espèces Ti-OOH (II et III sur la Figure 71) et une espèce $Ti(\eta^2-O_2)$ (IV sur la Figure 74) inactive pour l’oxydation. Il semblerait que des conditions acides favorisent la formation de l’espèce IV et donc la stabilité de H_2O_2 .

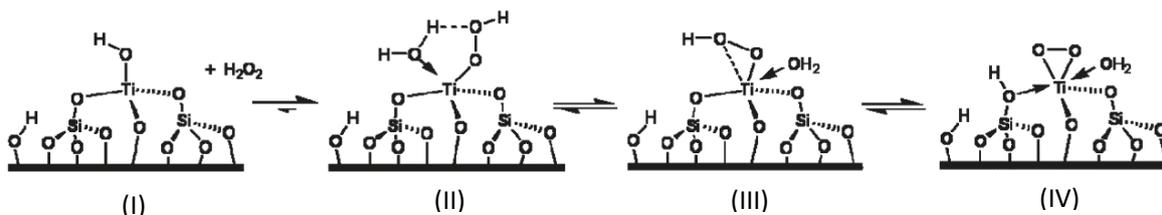


Figure 74: Espèces en équilibre lors de l’interaction du site catalytique actif Ti avec H_2O_2 , (II) : $Ti(\eta^1-OO)(OH)$, (III) : $Ti(\eta^2-OO)(OH)$ et (IV) : $Ti(\eta^2-O_2)$ [347].

Les espèces Ti-OOH sont celles impliquées dans la décomposition de H₂O₂ [344, 345] et le mécanisme peut être le suivant :

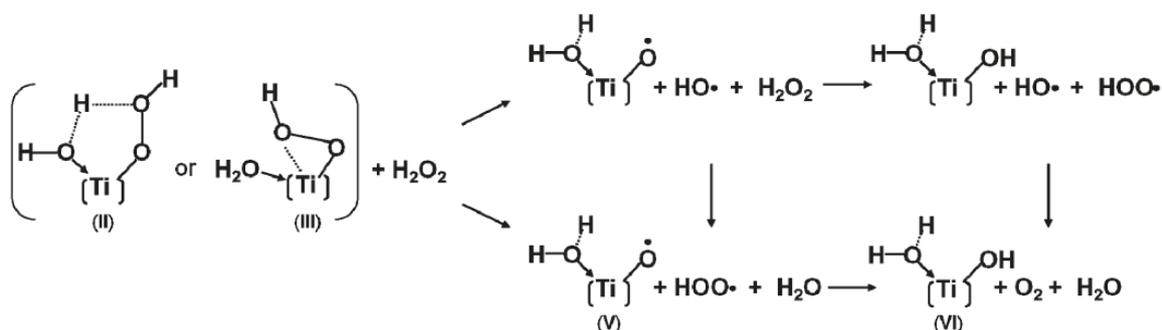


Figure 75: Mécanismes possibles de décomposition de H₂O₂ par l'intermédiaire de (II) : Ti(η¹-OO)(OH) ou (III) : Ti(η²-OO)(OH) [347].

Comme représenté ci-dessus, II ou III peuvent subir une homolyse de la liaison O-O de façon intramoléculaire en générant le radical hydroxyle (HO•, voie du haut) ou de manière intermoléculaire en oxydant H₂O₂ en radical hydroperoxy (HOO•, voie en bas). Ainsi, il semblerait que l'espèce de titane-hydroperoxy, formée initialement à partir d'une molécule de H₂O₂, soit capable d'oxyder une autre molécule de H₂O₂ via la formation de radicaux •OOH et Ti(O•)(OH₂).

Le choix du solvant et du catalyseur associé impacte également la décomposition de H₂O₂. Dans leur étude, Fan *et al.* [344] ont étudié l'influence du solvant sur les performances des matériaux TS-1, Ti-Beta et Ti-MWW (pour Mann-Whitney-Wilcoxon) pour l'époxydation du 1-hexène et du cyclohexène en phase liquide avec H₂O₂ à 60°C. Ils montrent que quels que soient les solvants utilisés (MeOH ou CH₃CN), le catalyseur Ti-Beta a décomposé beaucoup plus rapidement H₂O₂ que les matériaux TS-1 ou Ti-MWW. D'une manière générale, comparé au méthanol, CH₃CN semblerait promouvoir la décomposition de H₂O₂, bien que la différence ne soit pas flagrante avec la zéolithe TS-1.

Pour conclure sur cette partie, l'utilisation de H₂O₂ avec des catalyseurs à base de titane comporte également quelques inconvénients liés à la réactivité de cet oxydant, à la production d'eau qui l'accompagne et à sa décomposition par les métaux de transition. Adapter les conditions de réaction, notamment en choisissant le bon solvant pour le bon catalyseur, en modulant l'acidité du milieu et en évitant une concentration trop importante de H₂O₂ en l'introduisant lentement [348] peut permettre de réduire ces problèmes.

3.3. Preuve de concept : intérêt de l'ajout progressif de H₂O₂ avec un catalyseur de type MCF-Ti

La dismutation de H₂O₂ et le lessivage de Ti cités ci-dessus, peuvent être contrés en produisant progressivement le peroxyde d'hydrogène au sein du système. L'idée est alors d'utiliser la glucose oxydase, discutée précédemment, comme moyen de production de H₂O₂ *in-situ*. Mais avant d'entamer l'immobilisation de cette enzyme au sein du système catalytique, il s'agit d'asseoir dans nos conditions l'intérêt de l'ajout progressif de l'oxydant sur l'efficacité de la réaction d'époxydation (taux de conversion, rendement, sélectivité). Pour ce faire, nous avons effectué des tests d'époxydation du cyclooctène, en procédant à des ajouts manuels progressifs de H₂O₂ commercial à 30% en masse.

L'effet de la vitesse d'introduction de H₂O₂ a été étudiée en faisant varier la quantité par ajout, ainsi que leur fréquence, pour une quantité finale identique d'oxydant dans le milieu.

3.3.1. Protocole expérimental

Le choix du substrat s'est tourné vers le cyclooctène (*cis*-cyclooctène 95%, Aldrich) comme molécule modèle, puisque connue pour donner un époxyde de façon très sélective avec de faibles quantités de sous-produits. Ceci est dû à sa structure octogonale d'où une faible tension du cycle et à des liaisons C-H orthogonales pour lesquelles une fonctionnalisation en position allylique est plus difficile. Ici, un matériau mésoporeux titané a été utilisé (MCF2-Ti, Si/Ti = 21,2 et décrit dans le Chapitre II qui suit) comme catalyseur test. Rapidement, le protocole consiste à introduire dans un bicol, 150 µL de cyclooctène (1 mmol) ainsi que du décane (>99%, Sigma Aldrich) comme étalon interne, 20 mL d'acétonitrile (Sigma-Aldrich), puis de disperser 100 mg de MCF2-Ti. Le mélange réactionnel est maintenu sous ultra-sons pendant 2 min afin de s'assurer d'une bonne dispersion du catalyseur. 4,85 mmol de H₂O₂ (30% en masse, Aldrich) (0,5 mL) sont ajoutés avec différentes vitesses d'introduction: 0,5 mL/min (en une fois), 50 µL/15 min et 25 µL/ 15 min. La réaction s'effectue à 50°C à reflux, afin d'être dans des conditions compatibles à l'utilisation de ce type de catalyseur titané (cf. 4.1.2.). Le suivi de la réaction se fait par analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG). L'appareil Perichrom utilise un détecteur FID et une colonne capillaire de 30 m (diamètre interne de 0,25 mm) rempli d'une phase stationnaire OPTIMA 1 (100% diméthylsiloxane), d'une épaisseur de 0,25 µm. Le programme utilisé présente une rampe en température de 70°C à 200°C à raison de 5°C/min. La température de l'injecteur est de 200°C et celle du détecteur de 250°C. Avant de prélever la solution, l'agitation est stoppée de manière à ne prélever que la phase liquide.

3.3.2. Tests préliminaires d'époxydation: preuve de concept

Les résultats obtenus après 3 h de réaction sont présentés Figure 76 ci-dessous. Il est clairement possible de s'apercevoir que la vitesse d'introduction de H₂O₂ influe sur les performances du catalyseur. En effet, l'essai comprenant les ajouts de 25 µL/15 min de H₂O₂ dans le milieu réactionnel est celui présentant les valeurs les plus élevées de taux de conversion (61%), rendement (52%) et sélectivité (85%). Plus l'introduction de H₂O₂ est progressive, plus la réaction d'époxydation est favorisée de par la diminution du phénomène de dismutation et du lessivage potentiel de l'espèce catalytiquement active, comme déjà observé. Guidotti et *al.* obtiennent un rendement de 44% et une sélectivité > 98% en oxyde de cyclohexène en utilisant un catalyseur Ti-MCM-41 pour l'oxydation du cyclohexène dans CH₃CN à 85°C en ajoutant 2,5 mmol de H₂O₂ en 3 h à raison de 10 µL.min⁻¹ [348]. En revanche, le même essai réalisé en introduisant l'oxydant en une seule fois a conduit à un rendement en époxyde proche de zéro et de nombreux produits secondaires ont été détectés (cyclohexène-1-ol et cyclohexène-1-one). Dans notre cas, après 3 h (Figure 73), l'introduction plus lente de H₂O₂ permet de doubler le taux de conversion et le rendement, ainsi que d'améliorer la sélectivité d'environ 20%. A noter ici, que la stabilité de l'oxyde de cyclooctène dans ces conditions a été vérifiée en l'absence de catalyseur. L'ouverture de cycle, si elle a lieu, serait donc catalysée par Ti lui-même. Après 24 h, dans les meilleures conditions présentées (25µL/15min), la conversion atteint 75%, le rendement en époxyde 69% et la sélectivité 93%.

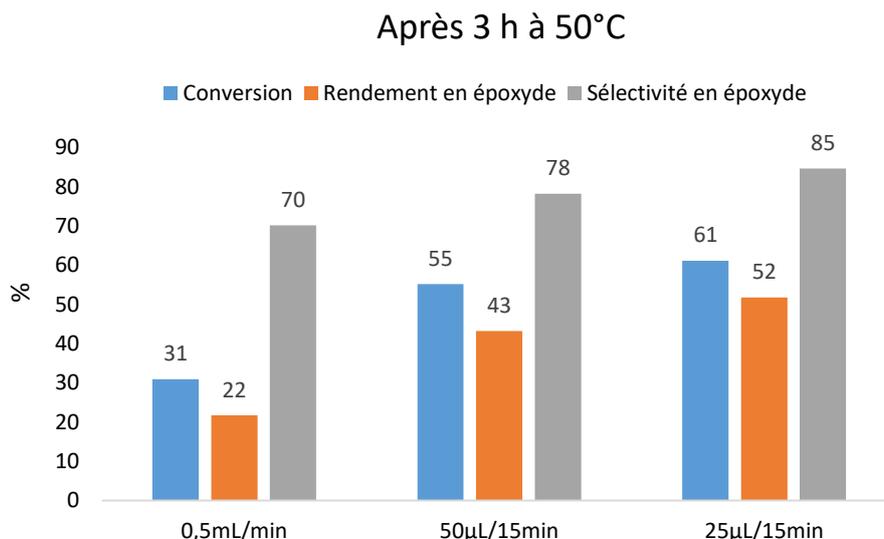


Figure 76. Preuve de concept: Efficacité de MCF-Ti pour différentes vitesses d'introduction de 4,85 mmol de H_2O_2 (30% en masse) pour l'époxydation de 500 mM de cyclooctène à 50°C, H_2O_2 /Cyclooctène (5 : 1 mol.), Ti/substrat (1 : 130 mol.)

L'utilisation de la glucose oxydase pour la production *in-situ* de H_2O_2 prend alors tout son sens et ces tests justifient l'étude effectuée et présentée dans ce travail. Cependant, l'utilisation de deux systèmes catalytiques distincts, évoluant dans des conditions opposées, présente plusieurs problématiques qu'il s'agit d'identifier et résoudre. Celles-ci sont présentées dans la partie qui suit.

4. Associer un catalyseur titané avec la glucose oxydase en tandem : Stratégie de recherche

Comme il a été possible de le voir à l'instant, l'introduction progressive de H_2O_2 permet d'améliorer la réaction d'époxydation et de diminuer la décomposition du peroxyde d'hydrogène. L'idée est ainsi d'immobiliser la glucose oxydase sur le catalyseur d'oxydation titané afin de produire H_2O_2 *in-situ*, qui ensuite sera directement utilisé pour l'époxydation d'alcènes. Ce catalyseur hétérogène sera ainsi réutilisable et les deux catalyseurs agiront de concert en « *one-pot* ». Le catalyseur hybride désiré est présenté Figure 77 ci-dessous.

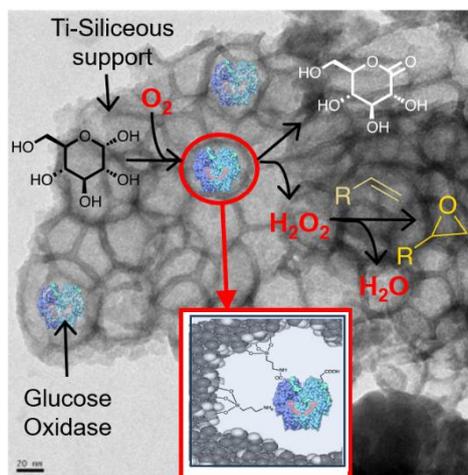


Figure 77: Catalyseur tandem associant la glucose oxydase et le titane pour l'époxydation d'alcènes

4.1. Nécessité d’un milieu hydro-organique

La glucose oxydase nécessite des conditions de réaction douces, notamment en température, en pH et d’opérer en milieux aqueux. La difficulté ici sera donc de faire cohabiter deux systèmes catalytiques, fonctionnant dans des conditions opposées, puisque les catalyseurs à base de titane agissent en milieux organiques (CH₃CN, MeOH, DMC...) et pour des températures comprises entre 50 et 80°C. L’utilisation d’un milieu hydro-organique s’avère donc nécessaire. Dans son livre *Metal-Catalyzed Reactions in Water* [349], Sheldon fait état de plusieurs procédés permettant des réactions d’oxydation dans l’eau et mentionne deux stratégies possibles, consistant à utiliser un agent de transfert de phase afin de transférer le catalyseur et l’oxydant dans la phase organique ou à utiliser des surfactants ou ligands hydrosolubles afin de promouvoir l’oxydation d’oléfines en phase aqueuse. Cependant, on s’attend à ce que ce type de composés dénature la GOx. L’utilisation de solvants miscibles à l’eau, tels que l’acétonitrile ou le méthanol, est ainsi indispensable afin de pouvoir utiliser la GOx et d’espérer solubiliser en partie des alcènes organosolubles tels que le cyclooctène ou le cyclohexène. En effet, comme il a été possible de le voir dans ce chapitre, ces substrats sont souvent utilisés en époxydation. Bien que ceux-ci soient plus difficiles à solubiliser dans des milieux contenant de l’eau, leur oxydation, même partielle, à l’aide d’un système chimioenzymatique pourrait être intéressante, puisque porteuse de défis. Afin de se placer dans des conditions plus favorables, l’utilisation de substrats hydrosolubles appropriés tels que des alcènes portant une fonction alcool est également à envisager.

4.2. Quels supports pour l’insertion de Ti et la GOx ?

L’étude bibliographique a montré que la GOx pouvait être immobilisée au sein de matériaux mésoporeux. Cela permet de lui conférer une certaine protection face à des conditions d’utilisation plus rudes, comme la présence de solvant organique ou les températures plus élevées. Les supports étudiés pour son greffage sont semblables à ceux utilisés également en époxydation avec Ti et H₂O₂. Le support qui semble être le plus intéressant au vue des dimensions de l’enzyme est une mousse mésocellulaire silicique (MCF). Cette dernière renferme des cellules volumineuses pour loger l’enzyme et des fenêtres interconnectées permettant la bonne diffusion des composés au sein du système. Deux types de supports mésoporeux seront étudiés : le matériau SBA-15, dont la dimension des pores ne permet qu’un greffage de la GOx en surface et les matériaux de type MCF (MCF1 et MCF2 dans le chapitre II qui suit), dont la morphologie et la taille de cellule pourraient aboutir à une réelle incorporation de l’enzyme dans la porosité. La comparaison du greffage de la GOx sur ces deux matériaux permettrait de valider ou non la faisabilité d’un greffage interne et sa plus-value en terme de quantité de GOx immobilisée et de sa performance.

4.3. Incorporation de l’espèce catalytique Ti

L’insertion de l’espèce active Ti sur les supports siliciques mésoporeux sera effectuée par greffage. La littérature a montré qu’en prenant des précautions ce type de synthèse permet l’obtention d’espèce Ti sous forme majoritairement tétraédrique et bien dispersées, menant donc à des espèces actives. L’insertion de Ti durant la synthèse du matériau semble beaucoup plus difficile à maîtriser et conduit à des espèces moins isolées et dont la configuration tétraédrique n’est pas favorisée, conduisant ainsi à des catalyseurs moins actifs.

4.4. Quel mode d'immobilisation pour l'enzyme ?

La méthode d'immobilisation semblant la plus appropriée, compte tenu des conditions d'utilisation du catalyseur est celle par liens covalents. L'adsorption peut être très efficace dans le cas où les conditions de réaction s'effectuent au pH favorisant l'interaction entre l'enzyme et le solide et donc plutôt en milieu aqueux. Dans la mesure où l'utilisation de solvants organiques est envisagée, il nous a paru plus judicieux de mettre en œuvre un greffage covalent pouvant, peut-être, stabiliser la GOx. Les trois supports choisis seront dans un premier temps fonctionnalisés par des groupements –NH₂ grâce à l'APTES et leurs taux de greffage comparés. On s'attend à ce que le support présentant le plus de –NH₂ en surface puisse permettre d'immobiliser plus d'enzymes. Le choix du support sera ainsi effectué.

Le protocole d'immobilisation choisi repose sur l'utilisation des agents de couplage EDC/NHS, largement renseignée dans la littérature [143]. Le comportement de l'enzyme immobilisée sera ainsi comparé à celui de son homologue en solution dans différentes conditions : milieux hydro-organiques et en température. Il s'agira d'effectuer une sorte de cartographie de la stabilité enzymatique afin d'opter pour des conditions réactionnelles compatibles avec l'époxydation et *vice-versa*.

Le défi de ces travaux consiste donc à trouver les conditions adéquates à la production *in-situ* biocatalysée de H₂O₂ couplée à la réaction d'époxydation avec Ti, afin de développer un système chimioenzymatique performant.

Références :

- [1] F. Cavani, J.H. Teles, *ChemSusChem* 2 (2009) 508-534.
- [2] D. Munz, T. Strassner, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 5043-5052.
- [3] H. Riedl, G. Pfeleiderer, Production of hydrogen peroxide, US Patent 2158525, 1936.
- [4] R. Edvinsson Albers, M. Nyström, M. Siverström, A. Sellin, A.C. Dellve, U. Andersson, W. Herrmann, T. Berglin, *Catal. Today* 69 (2001) 247–252.
- [5] J.H. Teles, A. Rehfinger, A. Berg, P. Rudolf, N. Rieber, P. Bassler, WO Patent ed., BASF, 2002.
- [6] M. Dow Chemical, MI, L. BASF, 2016, Dow and BASF receive Presidential Green Chemistry Challenge Award for HPPO Technology, En ligne, <http://www.dow.com/en-US/news/press-releases/Dow%20and%20BASF%20receive%20Presidential%20Green%20Chemistry%20Challenge%20Award%20for%20HPPO%20Technology#q=HPPO&t=All>, Consulté le 31/05/2016.
- [7] G. Goor, W. Kunkel, O. Weiberg, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, 1989.
- [8] D. Tsukamoto, A. Shiro, Y. Shiraishi, Y. Sugano, S. Ichikawa, S. Tanaka, T. Hirai, *ACS Catal.* 2 (2012) 599-603.
- [9] H. Henkel, W. Weber, Manufacture of hydrogen peroxid, US Patents, 1108752, 1914.
- [10] Y. Izumi, H. Miyazaki, S. Kawahara, Process for preparing hydrogen peroxide, US Patents, 4009252, 1977.
- [11] Y. Izumi, H. Miyazaki, S. Kawahara, Process for producing hydrogen peroxide, US Patents, 4279883, 1981.
- [12] H. Sun, J.J. Leonard, H. Shalit, Hydrogen peroxide production, US Patents, 4393038, 1983.
- [13] L.W. Gosser, J.A.T. Schwartz, Catalytic process for making hydrogen peroxide from hydrogen and oxygen employing a bromide promoter, Google Patents, 1988.
- [14] L.W. Gosser, Hydrogen peroxide method using optimized H+ and BR- concentrations, US Patents, 4889705, 1989.
- [15] C. Pralus, J.P. Schirmann, Production of hydrogen peroxide, US Patents, 4996039, 1991.
- [16] T. Kanada, K. Nagai, T. Nawata, Process for making hydrogen peroxide, US Patents, 5104635, 1992.
- [17] J. Van Weynbergh, J.P. Schoebrechts, C. Jean-Claude, Direct synthesis of hydrogen peroxide by heterogeneous catalysis, catalyst for the said synthesis and method of preparation of the said catalyst, US Patents, 5447706, 1995.
- [18] S.E. Park, J.W. Yoo, W.J. Lee, J.S. Chang, Y.K. Park, C.W. Lee, Direct manufacturing method of hydrogen peroxide, US Patents, 5972305, 1999.
- [19] V. Arca, R. Buzzoni, R. D'aloisio, A.G. De, P. Furlan, L. Meda, G. Paparatto, New catalyst, process for the production of hydrogen peroxide and its use in oxidation processes, EP Patents, 0978316A1, 2000.
- [20] B. Zhou, L.K. Lee, Catalyst and process for direct catalytic production of hydrogen peroxide, (H₂O₂), US Patents, 6168775, 2001.
- [21] M. Nyström, J. Wanngård, W. Herrmann, Process for producing hydrogen peroxide, US Patents, 6210651, 2001.
- [22] D. Dissanayake, *J. Catal.* 214 (2003) 113-120.
- [23] D.P. Dissanayake, J.H. Lunsford, *J. Catal.* 206 (2002) 173-176.
- [24] A.G. Gaikwad, S.D. Sansare, V.R. Choudhary, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 181 (2001) 143-149.
- [25] E.N. Ntainjua, J.K. Edwards, A.F. Carley, J.A. Lopez-Sanchez, J.A. Moulijn, A.A. Herzing, C.J. Kiely, G.J. Hutchings, *Green Chem.* 10 (2008) 1162-1169.
- [26] I. Huerta, P. Biasi, J. García-Serna, M.J. Cocero, J.-P. Mikkola, T. Salmi, *Catal. Today* 248 (2015) 91-100.
- [27] S. Abate, R. Arrigo, S. Perathoner, G. Centi, *Top. Catal.* 57 (2014) 1208-1217.
- [28] T. Deguchi, M. Iwamoto, *J. Catal.* 280 (2011) 239-246.
- [29] V.R. Choudhary, C. Samanta, P. Jana, *Appl.Catal., A* 317 (2007) 234-243.
- [30] V.R. Choudhary, A.G. Gaikwad, S.D. Sansare, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 1776-1779.
- [31] V.R. Choudhary, C. Samanta, A.G. Gaikwad, *Chem. Commun.* (2004) 2054-2055.
- [32] V.R. Choudhary, C. Samanta, *J. Catal.* 238 (2006) 28-38.
- [33] L. Fu, K.T. Chuang, R. Fiedorow, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 72 (1992) 33-41.
- [34] M.-g. Seo, S. Kim, D.-W. Lee, H.E. Jeong, K.-Y. Lee, *Appl.Catal., A* 511 (2016) 87-94.
- [35] S. Abate, G. Centi, S. Melada, S. Perathoner, F. Pinna, G. Strukul, *Catal. Today* 104 (2005) 323-328.
- [36] X. Guo, A. Hoffman, J.T. Yates, *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 5787-5792.
- [37] H. Lee, S. Kim, D.-W. Lee, K.-Y. Lee, *Catal. Commun.* 12 (2011) 968-971.

- [38] M.-g. Seo, S. Kim, H.E. Jeong, D.-W. Lee, K.-Y. Lee, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 413 (2016) 1-6.
- [39] P. Tian, L. Ouyang, X. Xu, J. Xu, Y.-F. Han, *Chinese Journal of Catalysis* 34 (2013) 1002-1012.
- [40] J.C. Pritchard, Q. He, E.N. Ntainjua, M. Piccinini, J.K. Edwards, A.A. Herzing, A.F. Carley, J.A. Moulijn, C.J. Kiely, G.J. Hutchings, *Green Chem.* 12 (2010) 915-921.
- [41] E.N. Ntainjua, M. Piccinini, S.J. Freakley, J.C. Pritchard, J.K. Edwards, A.F. Carley, G.J. Hutchings, *Green Chem.* 14 (2012) 170-181.
- [42] T. García, S. Agouram, A. Dejoz, J.F. Sánchez-Royo, L. Torrente-Murciano, B. Solsona, *Catal. Today* 248 (2015) 48-57.
- [43] S.J. Freakley, M. Piccinini, J.K. Edwards, E.N. Ntainjua, J.A. Moulijn, G.J. Hutchings, *ACS Catal.* 3 (2013) 487-501.
- [44] E.N. Ntainjua, M. Piccinini, J.C. Pritchard, J.K. Edwards, A.F. Carley, C.J. Kiely, G.J. Hutchings, *Catal. Today* 178 (2011) 47-50.
- [45] M. Piccinini, J.K. Edwards, J.A. Moulijn, G.J. Hutchings, *Catal. Sci. Technol.* 2 (2012) 1908-1913.
- [46] B.E. Solsona, J.K. Edwards, P. Landon, A.F. Carley, A. Herzing, C.J. Kiely, G.J. Hutchings, *Chem. Mater.* 18 (2006) 2689-2695.
- [47] J.K. Edwards, B. Solsona, E.N. Ntainjua, A.F. Carley, A.A. Herzing, C.J. Kiely, G.J. Hutchings, *Science* 323 (2009) 1037-1041.
- [48] V. Paunovic, V. Ordonsky, M. Fernanda Neira D'Angelo, J.C. Schouten, T.A. Nijhuis, *J. Catal.* 309 (2014) 325-332.
- [49] S. Chattopadhyay, G. Veser, *AIChE J.* 52 (2006) 2217-2229.
- [50] F. Zhang, X. Carrier, J.-M. Krafft, Y. Yoshimura, J. Blanchard, *New J. Chem.* 34 (2010) 508.
- [51] Dow Answer Center, 30/10/2014, Dow Polyurethanes - Polyol Role in Foam Formulation, En ligne, http://dowac.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/5658/kw/polyol%20polyether, Consulté le 24/08/2016.
- [52] P. Landon, P.J. Collier, A.J. Papworth, C.J. Kiely, G.J. Hutchings, *Chem. Commun.* (2002) 2058-2059.
- [53] T. Hayashi, K. Tanaka, M. Haruta, *J. Catal.* 178 (1998) 566-575.
- [54] B.S. Uphade, T. Akita, T. Nakamura, M. Haruta, *J. Catal.* 209 (2002) 331-340.
- [55] J. Chen, S.J.A. Halin, E.A. Pidko, M.W.G.M. Verhoeven, D.M.P. Ferrandez, E.J.M. Hensen, J.C. Schouten, T.A. Nijhuis, *ChemCatChem* 5 (2013) 467-478.
- [56] L. Xu, Y. Ren, H. Wu, Y. Liu, Z. Wang, Y. Zhang, J. Xu, H. Peng, P. Wu, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 10852-10858.
- [57] W.-S. Lee, M. Cem Akatay, E.A. Stach, F.H. Ribeiro, W. Nicholas Delgass, *J. Catal.* 287 (2012) 178-189.
- [58] H. Yang, D. Tang, X. Lu, Y. Yuan, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 8186-8193.
- [59] J.J. Bravo-Suárez, K.K. Bando, J. Lu, M. Haruta, T. Fujitani, T. Oyama, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 1115-1123.
- [60] T. Nijhuis, B. Weckhuysen, *Catal. Today* 117 (2006) 84-89.
- [61] T.A. Nijhuis, T. Visser, B.M. Weckhuysen, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 1115-1118.
- [62] G. Mul, A. Zwiijnenburg, B. van der Linden, M. Makkee, J.A. Moulijn, *J. Catal.* 201 (2001) 128-137.
- [63] A.K. Sinha, S. Seelan, T. Akita, S. Tsubota, M. Haruta, *Catal. Lett.* 85 223-228.
- [64] A. Prieto, M. Palomino, U. Díaz, A. Corma, *Catal. Today* 227 (2014) 87-95.
- [65] T.A. Nijhuis, T.Q. Gardner, B.M. Weckhuysen, *J. Catal.* 236 (2005) 153-163.
- [66] E. Sacaliuc, A.M. Beale, B.M. Weckhuysen, T.A. Nijhuis, *J. Catal.* 248 (2007) 235-248.
- [67] C.-H. Liu, Y. Guan, E.J.M. Hensen, J.-F. Lee, C.-M. Yang, *J. Catal.* 282 (2011) 94-102.
- [68] B.S. Uphade, Y. Yamada, T. Akita, T. Nakamura, M. Haruta, *Appl. Catal., A* 215 (2001) 137-148.
- [69] Y.A. Kalvachev, T. Hayashi, S. Tsubota, M. Haruta, *J. Catal.* 186 (1999) 228-233.
- [70] A. Schmid, F. Hollmann, J.B. Park, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 359-366.
- [71] H. Bisswanger, *Enzyme kinetics: principles and methods*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [72] M. VV., *Stability and stabilization of biocatalysts Progress in biotechnology*, Elsevier Science B.V, Amsterdam, The Netherlands, 1998, pp. 355-363.
- [73] P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process Biochem.* 43 (2008) 1019-1032.
- [74] K. Ryu, J.S. Dordick, *Biochemistry* 31 (1992) 2588-2598.
- [75] J.E. Mogensen, P. Sehgal, D.E. Otzen, *Biochemistry* 44 (2005) 1719-1730.
- [76] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 489-501.
- [77] M. Yabushita, H. Kobayashi, A. Fukuoka, *Appl. Catal., B* 145 (2014) 1-9.
- [78] D. Muller, *Biochem. Z* 199 (1928) 136-170.
- [79] D. Rando, G.-W. Kohring, F. Giffhorn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997) 34-40.
- [80] H.M. Kalisz, H.J. Hecht, D. Schomburg, R.D. Schmid, *Biochim. Biophys. Acta* 1080 (1991) 138-142.

- [81] G. Wohlfahrt, S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H.M. Kalisz, H.J. Hecht, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 55 (1999) 969-977.
- [82] R. Wilson, A.P.F. Turner, *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 165-185.
- [83] S. Witt, G.G. Wohlfahrt, D.D. Schomburg, H.J. Hecht, H.M. Kalisz, *Biochem. J* 347 (2000) 553-559.
- [84] C.M. Wong, K.H. Wong, X.D. Chen, *Appl Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 927-938.
- [85] B.E.P. Swoboda, V. Massey, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 2209-2215.
- [86] J. Bao, K. Furumoto, K. Fukunaga, K. Nakao, *Biochem. Eng. J* 8 (2001) 91-102.
- [87] Q.H. Gibson, B.E.P. Swoboda, V. Massey, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 3927-3934.
- [88] H.J. Hecht, H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* 229 (1993) 153-172.
- [89] U. Jan, Q. Husain, M. Saleemuddin, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34 (2001) 13-17.
- [90] K. Nakao, A. Kiefner, K. Furumoto, T. Harada, *Chem. Eng. Sci.* 52 (1997) 4127-4133.
- [91] J. Bao, K. Fujumoto, M. Yoshimoto, K. Fukunaga, K. Nakao, *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 69-72.
- [92] J. Mirón, M.P. González, J.A. Vázquez, L. Pastrana, M.A. Murado, *Enzyme Microb. Technol.* 34 (2004) 513-522.
- [93] T. Nakamura, Y. Ogura, *The Journal of Biochemistry* 52 (1962) 214-220.
- [94] H. Etemadzadeh, J. Ainamo, H. Murtomaa, *J. Clin. Periodontol.* 12 (1985) 607-616.
- [95] T. Tzanov, S.A. Costa, G.M. Gübitz, A. Cavaco-Paulo, *J. Biotechnol.* 93 (2002) 87-94.
- [96] T. Chen, S.C. Barton, G. Binyamin, Z. Gao, Y. Zhang, H.-H. Kim, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 8630-8631.
- [97] G. Zhou, K.K. Fung, L.W. Wong, Y. Chen, R. Renneberg, S. Yang, *Talanta* 84 (2011) 659-665.
- [98] Z. Zhou, M. Hartmann, *Top. Catal.* 55 (2012) 1081-1100.
- [99] R. Wilson, A.P.F. Turner, *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 165-185.
- [100] P.N.R. Vennestrøm, C.H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt, J.M. Woodley, *ChemCatChem* 2 (2010) 249-258.
- [101] D. Jung, C. Streb, M. Hartmann, *Microporous Mesoporous Mater.* 113 (2008) 523-529.
- [102] F. van de Velde, N.D. Lourenço, M. Bakker, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 286-291.
- [103] L.T. Phuoc, P. Laveille, F. Chamouleau, G. Renard, J. Drone, B. Coq, F. Fajula, A. Galarneau, *Dalton T.* 39 (2010) 8511-8520.
- [104] P. Laveille, L.T. Phuoc, J. Drone, F. Fajula, G. Renard, A. Galarneau, *Catal. Today* 157 (2010) 94-100.
- [105] K.-H. Tong, K.-Y. Wong, T.H. Chan, *Tetrahedron* 61 (2005) 6009-6014.
- [106] P.N.R. Vennestrøm, E. Taarning, C.H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt, J.M. Woodley, *ChemCatChem* 2 (2010) 943-945.
- [107] J. Matthews, *Method of immobilizing enzymes*, Gulf Research & Development Company, US Patent, 3844892, 1974.
- [108] P. Reis, T. Witula, K. Holmberg, *Microporous Mesoporous Mater.* 110 (2008) 355-362.
- [109] F. Wu, W. Wang, L. Liu, X.-J. Ju, R. Xie, Z. Liu, L.-Y. Chu, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 796-803.
- [110] F. Marpani, J. Luo, R.V. Mateiu, A.S. Meyer, M. Pinelo, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 17682-17691.
- [111] R.A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1289-1307.
- [112] M.T. Reetz, P. Tielmann, W. Wiesenhöfer, W. Könen, A. Zonta, *Adv. Synth. Catal.* 345 (2003) 717-728.
- [113] A.F. Mansor, N.A. Mohidem, W.N.I. Wan Mohd Zawawi, N.S. Othman, S. Endud, H. Mat, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 75 (2015) 323-335.
- [114] Z. Alothman, *Materials* 5 (2012) 2874-2902.
- [115] E. Santalla, E. Serra, A. Mayoral, J. Losada, R.M. Blanco, I. Díaz, *Solid State Sciences* 13 (2011) 691-697.
- [116] J.L. Blin, C. Gérardin, C. Carteret, L. Rodehüser, C. Selve, M.J. Stébé, *Chem. Mater.* 17 (2005) 1479-1486.
- [117] L. Betancor, F. Lopez-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *J. Biotechnol.* 121 (2006) 284-289.
- [118] S. De Monredon-Senani, *Interaction Organosilanes/Silice de précipitation: Du milieu hydroalcoolique au milieu aqueux*, Physique et Chimie des Matériaux, Paris VI.
- [119] L.C.C. da Silva, C.M.C. Infante, A.W.O. Lima, I.C. Cosentino, M.C.A. Fantini, F.R.P. Rocha, J.C. Masini, J.R. Matos, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 70 (2011) 149-153.
- [120] V. Singh, D. Singh, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 3854-3860.
- [121] P. Shah, N. Sridevi, A. Prabhune, V. Ramaswamy, *Microporous Mesoporous Mater.* 116 (2008) 157-165.
- [122] C. Lei, T.A. Soares, Y. Shin, J. Liu, E.J. Ackerman, *Nanotechnology* 19 (2008) 125102-125111.
- [123] J. Li, G. Yin, Y. Ding, X. Liao, X. Chen, Z. Huang, Y. Yao, X. Pu, *J. Biosci. Bioeng.* 116 (2013) 555-561.
- [124] J. He, Z. Song, H. Ma, L. Yang, C. Guo, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 4307-4315.
- [125] A.B. Jarzębski, K. Szymańska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń, *Catal. Today* 124 (2007) 2-10.

- [126] G.A. Petkova, K. Záruba, V. Král, *Biochim. Biophys. Acta* 1824 (2012) 792-801.
- [127] M. Hartmann, X. Kostrov, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6277-6289.
- [128] A. Mehdi, C. Reye, R. Corriu, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 563-574.
- [129] H. Sun, X. Ying Bao, X.S. Zhao, *Langmuir* 25 (2009) 1807-1812.
- [130] D. Jung, C. Streb, M. Hartmann, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 762-778.
- [131] F.J. Xu, Q.J. Cai, Y.L. Li, E.T. Kang, K.G. Neoh, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1012-1020.
- [132] C.A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 52 (1998) 257-263.
- [133] F. Céspedes, E. Martínez-Fábregas, S. Alegret, *Electroanalysis* 6 (1994) 759-763.
- [134] L. Pramparo, F. Stuber, J. Font, A. Fortuny, A. Fabregat, C. Bengoa, *J. Hazard. Mater.* 177 (2010) 990-1000.
- [135] O.R. Zaborisky, J. Ogletree, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61 (1974) 210-216.
- [136] S. Nakamura, S. Hayashi, K. Koga, *Biochim. Biophys. Acta* 445 (1976) 294-308.
- [137] J. Zhao, Y. Wang, G. Luo, S. Zhu, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7211-7217.
- [138] A. Rekuć, J. Bryjak, K. Szymańska, A.B. Jarzębski, *Process Biochem.* 44 (2009) 191-198.
- [139] K.-C. Kao, C.-H. Lee, T.-S. Lin, C.-Y. Mou, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 4653-4662.
- [140] X. Zhang, R.F. Guan, D.Q. Wu, K.Y. Chan, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 877-882.
- [141] M. Delvaux, S. Demoustier-Champagne, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 943-951.
- [142] P. Tengvall, E. Jansson, A. Askendal, P. Thomsen, C. Gretzer, *Colloids Surf., B* 28 (2003) 261-272.
- [143] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.N. Chazalviel, A.C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, S. Djebbar, *Langmuir* 26 (2010) 809-814.
- [144] K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Macromol. Biosci.* 8 (2008) 32-37.
- [145] N. Balistreri, D. Gaboriau, C. Jolival, F. Launay, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 127 (2016) 26-33.
- [146] C. Mateo, J.M. Palomo, M. Fuentes, L. Betancor, V. Grazu, F. López-Gallego, B.C.C. Pessela, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 274-280.
- [147] L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G.D.-O.C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 877-882.
- [148] X. Zhang, R.-F. Guan, D.-Q. Wu, K.-Y. Chan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 33 (2005) 43-50.
- [149] K. Szymańska, J. Bryjak, A.B. Jarzębski, *Top. Catal.* 52 (2009) 1030-1036.
- [150] R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009) 405-418.
- [151] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290-6307.
- [152] B.C.C. Pessela, C. Mateo, M. Fuentes, A. Vian, J.L. García, A.V. Carrascosa, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 199-205.
- [153] E. Katchalski-Katzir, *Trends Biotechnol.* 11 (1993) 471-478.
- [154] M. Vinoba, M. Bhagiyalakshmi, S.K. Jeong, Y.I. Yoon, S.C. Nam, *Colloid. Surface. B* 90 (2012) 91-96.
- [155] R.A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223-6235.
- [156] D. Häring, P. Schreier, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 35-38.
- [157] C. Mateo, J.M. Palomo, L.M. van Langen, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.* 86 (2004) 273-276.
- [158] I.E. Touahar, L. Haroune, S. Ba, J.-P. Bellenger, H. Cabana, *Sci. Total Environ.* 481 (2014) 90-99.
- [159] M.I. Kim, J. Kim, J. Lee, H. Jia, H.B. Na, J.K. Youn, J.H. Kwak, A. Dohnalkova, J.W. Grate, P. Wang, T. Hyeon, H.G. Park, H.N. Chang, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 210-218.
- [160] D. Jung, M. Paradiso, M. Hartmann, *J. Mater. Sci.* 44 (2009) 6747-6753.
- [161] D. Jung, M. Paradiso, D. Wallacher, A. Brandt, M. Hartmann, *ChemSusChem* 2 (2009) 161-164.
- [162] D. Jung, M. Hartmann, *Catal. Today* 157 (2010) 378-383.
- [163] M. Dervisevic, E. Cevik, M. Senel, *Enzyme Microb. Technol.* 68 (2015) 69-76.
- [164] G.A. Posthuma-Trumpie, W.A. van den Berg, D.F. van de Wiel, W.M. Schaaper, J. Korf, W.J. van Berkel, *Biochim. Biophys. Acta* 1774 (2007) 803-812.
- [165] J.C. Vidal, J. Espuelas, J.R. Castillo, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 88-98.
- [166] E. Katza, A. Riklina, V. Heleg-Shabtaia, I. Willnera, A.F. Bućkmannb, *Anal. Chim. Acta* 385 (1999) 45-58.
- [167] M. Şenel, M. Dervisevic, E. Çevik, *Curr. Appl. Phys.* 13 (2013) 1199-1204.
- [168] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, A.F. Bućkmann, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 10321-10322.
- [169] I. Willner, R. Baron, B. Willner, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1841-1852.
- [170] A. Riklin, E. Katz, I. Wiliner, A. Stocker, A.F. Buckmann, *Nature* 376 (1995) 672-675.
- [171] E. Katz, V. Heleg-Shabtai, B. Willner, I. Willner, A.F. Bückmann, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42 (1997) 95-104.

- [172] D.L. Morris, R.T. Buckler, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1983, pp. 413-425.
- [173] A.F. Bückmann, V. Wray, A. Stocker, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1997, pp. 360-374.
- [174] I. Willner, E. Katz, B. Willner, R. Blonder, V. Heleg-Shabtai, A.F. Bückmann, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 337-356.
- [175] A. Badia, R. Carlini, A. Fernandez, F. Battaglini, S.R. Mikkelsen, A.M. English, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 7053-7060.
- [176] R.A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1985) 265-322.
- [177] M. Şenel, C. Nergiz, M. Dervisevic, E. Çevik, *Electroanalysis* 25 (2013) 1194-1200.
- [178] M. Kreiner, M.-C. Parker, *Biotechnol. Lett.* 27 (2005) 1571-1577.
- [179] E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10 (2000) 157-176.
- [180] M. Tu, X. Zhang, A. Kurabi, N. Gilkes, W. Mabee, J. Saddler, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 151-156.
- [181] Z.D. Knežević-Jugović, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, M.G. Antov, in: D.S. Minteer (Ed.), *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2011, pp. 99-111.
- [182] Z.D. Knežević-Jugovic, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, M.G. Antov, *Enzyme Stabilization and Immobilization*, 2010, pp. 99-111.
- [183] A.I. Kallenberg, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* 347 (2005) 905-926.
- [184] C. Mateo, O. Abian, G. Fernández-Lorente, J. Pedroche, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisan, *Biotechnol. Progr.* 18 (2002) 629-634.
- [185] M. Žuža, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, *Chemical Papers* 63 (2009) 117-124.
- [186] J.M. Palomo, G. Muñoz, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19-20 (2002) 279-286.
- [187] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, *3 Biotech* 3 (2012) 1-9.
- [188] G. Palmieri, P. Giardina, B. Desiderio, L. Marzullo, M. Giamberini, G. Sannia, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 151-158.
- [189] E. Taqieddin, M. Amiji, *Biomaterials* 25 (2004) 1937-1945.
- [190] K.A. Mahmoud, K.B. Male, S. Hrapovic, J.H.T. Luong, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1 (2009) 1383-1386.
- [191] L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- [192] A.P.V. Gonçalves, J.M. Lopes, F. Lemos, F. Ramôa Ribeiro, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, M.R. Aires-Barros, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 1 (1996) 53-60.
- [193] M.K. Shelyakina, O.O. Soldatkin, V.M. Arkhypova, B.O. Kasap, B. Akata, S.V. Dzyadevych, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 1-9.
- [194] M.G. Clerici, *Kinet. Catal.* 56 (2015) 450-455.
- [195] T. Yanagisawa, Z. Shimizu, K. Kuroda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63 (1990) 1535-1537.
- [196] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, *Nature* 359 (1992) 710-712.
- [197] M. Reichinger, *Poröse Silicate mit hierarchischer Porenstruktur: Synthese von mikro-/mesoporösen MCM-41 und MC M-48 Materialien aus zeolithischen Baueinheiten des MFI-Gerüststrukturtyps*, Chemie, Ruhr-Universität Bochum, 2007.
- [198] Q. Huo, D.I. Margolese, U. Ciesla, D.G. Demuth, P. Feng, T.E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B.F. Chmelka, *Chem. Mater.* 6 (1994) 1176-1191.
- [199] T.U.o. Manchester, 2016, Centre for Nanoporous Materials, En ligne. <http://www.cnm.manchester.ac.uk/>, Consulté le 15/06/2016.
- [200] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024-6036.
- [201] D. Zhao, J. Feng, G. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *Science* 279 (1998) 548-552.
- [202] Sujandi, S.-E. Park, D.-S. Han, S.-C. Han, M.-J. Jin, T. Ohsuna, *Chem. Commun.* (2006) 4131-4133.
- [203] A.B.D. Nandiyanto, S.-G. Kim, F. Iskandar, K. Okuyama, *Microporous Mesoporous Mater.* 120 (2009) 447-453.
- [204] M.I. Kim, J. Kim, J. Lee, S. Shin, H.B. Na, T. Hyeon, H.G. Park, H.N. Chang, *Microporous Mesoporous Mater.* 111 (2008) 18-23.
- [205] P. Schmidt-Winkel, W. Lukens, D. Zhao, P. Yang, B. Chmelka, G. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 254-255.
- [206] F. Zhou, X. Pu, D. Luo, G. Yin, K. Zhuang, X. Liao, Z. Huang, X. Chen, Y. Yao, *J. Biosci. Bioeng.* 120 (2015) 9-16.
- [207] Y. Wan, D. Zhao, *107 Chem. Rev.* 107 (2007) 2821-2860.
- [208] M. Amatongchai, W. Sroysee, S. Chairam, D. Nacapricha, *Talanta* (2015) article in press.
- [209] J. Chen, R. Zhu, J. Huang, M. Zhang, H. Liu, M. Sun, L. Wang, Y. Song, *Analyst* 140 (2015) 5578-5584.
- [210] Y. Liu, T.D. Dolidze, S. Singhal, D.E. Khoshtariya, J. Wei, , *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 14900-14910.

- [211] G.-E. Anthony, L. Chenghong, H.B. Ray, *Nanotechnology* 13 (2002) 559-564.
- [212] C. Cai, J. Chen, *Anal. Biochem.* 332 (2004) 75-83.
- [213] C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska, L. Niu, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2378-2382.
- [214] Z. Wang, X. Zhou, J. Zhang, F. Boey, H. Zhang, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 14071-14075.
- [215] Y. Wang, H. Li, J. Kong, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 193 (2014) 708-714.
- [216] S. Wu, Y. Liu, J. Wu, H. Ju, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 397-401.
- [217] S. Wu, H.X. Ju, Y. Liu, *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 585-592.
- [218] D. Lee, J. Lee, J. Kim, J. Kim, H.B. Na, B. Kim, C.H. Shin, J.H. Kwak, A. Dohnalkova, J.W. Grate, T. Hyeon, H.S. Kim, *Adv. Mater.* 17 (2005) 2828-2833.
- [219] J. Lee, D. Lee, E. Oh, J. Kim, Y.-P. Kim, S. Jin, H.-S. Kim, Y. Hwang, J.H. Kwak, J.-G. Park, C.-H. Shin, J. Kim, T. Hyeon, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 7427-7432.
- [220] N. Maksimchuk, M. Melgunov, J. Mrowiecbialon, A. Jarzebski, O. Kholdeeva, *J. Catal.* 235 (2005) 175-183.
- [221] S.A. Ansari, Q. Husain, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 512-523.
- [222] M. Ali, M. Winterer, *Chem. Mater.* 22 (2010) 85-91.
- [223] S. Zhang, N. Wang, H. Yu, Y. Niu, C. Sun, *Bioelectrochemistry* 67 (2005) 15-22.
- [224] C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1070-1074.
- [225] C. Zhao, Y. Meng, C. Shao, L. Wan, K. Jiao, *Electroanalysis* 20 (2008) 520-526.
- [226] X.-L. Luo, J.-J. Xu, Y. Du, H.-Y. Chen, *Anal. Biochem.* 334 (2004) 284-289.
- [227] B.-Y. Wu, S.-H. Hou, F. Yin, J. Li, Z.-X. Zhao, J.-D. Huang, Q. Chen, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 838-844.
- [228] Y. Du, X.-L. Luo, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Bioelectrochemistry* 70 (2007) 342-347.
- [229] D. Ragupathy, A.I. Gopalan, K.-P. Lee, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 397-401.
- [230] Y. Wang, W. Wei, X. Liu, X. Zeng, *Materials Science and Engineering: C* 29 (2009) 50-54.
- [231] H.H.P. Yiu, M.A. Keane, *J. Chem. Technol. Biot.* 87 (2012) 583-594.
- [232] B. Kalska-Szostko, M. Rogowska, A. Dubis, K. Szymański, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 2783-2787.
- [233] K. Ashtari, K. Khajeh, J. Fasihi, P. Ashtari, A. Ramazani, H. Vali, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 1063-1069.
- [234] T. Matsunaga, S. Kamiya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987) 328-332.
- [235] R.A. Sheldon, *Catal. Today* 57 (2000) 157-166.
- [236] J.M. Brégeault, *Dalton Trans.* (2003) 3289-3302.
- [237] R. Noyori, M. Aoki, K. Sato, *Chem. Commun.* (2003) 1977-1986.
- [238] D. Hoegaerts, B.F. Sels, D.E. De Vos, F. Verpoort, P.A. Jacobs, *Catal. Today* 60 (2000) 209-218.
- [239] R. Neumann, A.M. Khenkin, D. Juwiler, H. Miller, M. Gara, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 117 (1997) 169-183.
- [240] Y. Zhou, G. Chen, Z. Long, J. Wang, *RSC Adv.* 4 (2014) 42092-42113.
- [241] G. Grigoropoulou, J.H. Clark, J.A. Elings, *Green Chem.* 5 (2003) 1-7.
- [242] A.L. Villa de P, B.F. Sels, D.E. De Vos, P.A. Jacobs, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 7267-7270.
- [243] E. Poli, R. De Sousa, F. Jérôme, Y. Pouilloux, J.-M. Clacens, *Catal. Sci. Technol.* 2 (2012) 910-914.
- [244] W. Qi, Y. Wang, W. Li, L. Wu, *Chemistry* 16 (2010) 1068-1078.
- [245] X. Zuwei, Z. Ning, S. Yu, L. Kunlan, *Science (New York, N.Y.)* 292 (2001) 1139-1141.
- [246] S.S. Wang, G.Y. Yang, *Chem. Rev.* 115 (2015) 4893-4962.
- [247] C. Venturello, R. D'Aloisio, J.C.J. Bart, M. Ricci, *J. Mol. Catal.* 32 (1985) 107-110.
- [248] B. Meunier, in: G. Strukul (Ed.), *Catalytic Oxidations with Hydrogen Peroxide as Oxidant*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1992, pp. 153-175.
- [249] W. Drenth, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 114 (1995) 77-77.
- [250] E. Brulé, Y.R. De Miguel, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 8555-8558.
- [251] H. Srour, P. Le Maux, G. Simonneaux, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 5850-5856.
- [252] A. Stamatis, D. Giasafaki, K.C. Christoforidis, Y. Deligiannakis, M. Louloudi, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 319 (2010) 58-65.
- [253] S.L.H. Rebelo, A.R. Gonçalves, M.M. Pereira, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 256 (2006) 321-323.
- [254] R. De Paula, I.C.M.S. Santos, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 404-405 (2015) 156-166.
- [255] A. Farokhi, H. Hosseini-Monfared, *New J. Chem.* 40 (2016) 5032-5043.
- [256] I.W.C.E. Atends, R.A. Sheldon, *Appl. Catal.*, A 212 (2001) 175-187.
- [257] M. Silva, C. Freire, B. de Castro, J.L. Figueiredo, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 258 (2006) 327-333.
- [258] T. Joseph, D.P. Sawant, C.S. Gopinath, S.B. Halligudi, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 184 (2002) 289-299.

- [259] A. Bezaatpour, M. Behzad, V. Jahed, M. Amiri, Y. Mansoori, Z. Rajabalizadeh, S. Sarvi, *Reac. Kinet., Mech. Cat.* 107 (2012) 367-381.
- [260] I.F.J. Vankelecom, K.A.L. Vercruyse, P.E. Neys, D.W.A. Tas, K.B.M. Janssen, P.P. Knops-Gerrits, P.A. Jacobs, *Top. Catal.* 5 (1998) 125-132.
- [261] J. Tang, L. Wang, G. Liu, Y. Liu, Y. Hou, W. Zhang, M. Jia, W.R. Thiel, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 313 (2009) 31-37.
- [262] A. Zhang, Y. Zhang, P. Wang, J. Li, Y. Lv, S. Gao, *Res. Chem. Intermed.* 37 (2011) 975-984.
- [263] K. Kamata, K. Yonehara, Y. Sumida, K. Hirata, S. Nojima, N. Mizuno, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50 (2011) 12062-12066.
- [264] R. Maheswari, M.P. Pachamuthu, A. Ramanathan, B. Subramaniam, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 18833-18839.
- [265] M. Ziolek, I. Nowak, B. Kilos, I. Sobczak, P. Decyk, M. Trejda, J.C. Volta, *J. Phys. Chem. Solids* 65 (2004) 571-581.
- [266] N.E. Thornburg, A.B. Thompson, J.M. Notestein, *ACS Catal.* 5 (2015) 5077-5088.
- [267] J.M. Notestein, E. Iglesia, A. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 16478-16486.
- [268] J.M. Notestein, L.R. Andrini, V.I. Kalchenko, F.G. Requejo, A. Katz, E. Iglesia, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1122-1131.
- [269] C. Tiozzo, C. Bisio, F. Carniato, L. Marchese, A. Gallo, N. Ravasio, R. Psaro, M. Guidotti, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115 (2013) 86-93.
- [270] C. Tiozzo, C. Bisio, F. Carniato, A. Gallo, S.L. Scott, R. Psaro, M. Guidotti, *PCCP* 15 (2013) 13354-13362.
- [271] N. Morlanés, J.M. Notestein, *J. Catal.* 275 (2010) 191-201.
- [272] N. Morlanes, J.M. Notestein, *Appl. Catal., A* 387 (2010) 45-54.
- [273] M. Trejda, A. Tuel, J. Kujawa, B. Kilos, M. Ziolek, *Microporous Mesoporous Mater.* 110 (2008) 271-278.
- [274] M. Boronat, A. Corma, M. Renz, P.M. Viruela, *Chemistry* 12 (2006) 7067-7077.
- [275] R.A. Sheldon, J.A. Van Doorn, C.W.A. Schram, A.J. De Jong, *J. Catal.* 31 (1973) 438-443.
- [276] M. Taramasso, G. Perego, B. Notari, Preparation of porous crystalline synthetic material comprised of silicon and titanium oxides, Snamprogetti S.p.A, US patente, 423/326, 1983.
- [277] B. Notari, *Catal. Today* 18 (1993) 163-172.
- [278] D.R.C. Huybrechts, P.L. Buskens, P.A. Jacobs, *J. Mol. Catal.* 71 (1992) 129-147.
- [279] R.S. Drago, S.C. Dias, J.M. McGilvray, A.L.M.L. Mateus, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 1508-1514.
- [280] F. Langerame, A.M. Salvi, M. Silletti, G. Moretti, *Surf. Interface Anal.* 40 (2008) 695-699.
- [281] G. Xiong, Y. Cao, Z. Guo, Q. Jia, F. Tian, L. Liu, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 18 (2016) 190-196.
- [282] J. To, A.A. Sokol, S.A. French, C.R.A. Catlow, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 7173-7185.
- [283] M.G. Clerici, P. Ingallina, *J. Catal.* 140 (1993) 71-83.
- [284] C. Ramachandran, H. Du, Y. Kim, M. Kung, R. Snurr, L. Broadbelt, *J. Catal.* 253 (2008) 148-158.
- [285] H. Li, B. Xu, B. Deng, X. Yan, Y. Zheng, *Catal. Commun.* 46 (2014) 224-227.
- [286] S. Kwon, N.M. Schweitzer, S. Park, P.C. Stair, R.Q. Snurr, *J. Catal.* 326 (2015) 107-115.
- [287] R. Kumar, G.C.G. Pais, B. Pandey, P. Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1995) 1315-1316.
- [288] N. Alonso-Fagúndez, I. Agirrezabal-Telleria, P.L. Arias, J.L.G. Fierro, R. Mariscal, M. L'opez Granados, *RSC Adv.* 4 (2014) 54960-54972.
- [289] M.A.C. A. Corma, P. Esteve, A. Martinez, J. Perezpariente, *J. Catal.* 145 (1994) 151-158.
- [290] A. Corma, P. Esteve, A. Martínez, *J. Catal.* 161 (1996) 11-19.
- [291] M.A. Cambor, A. Corma, A. Martinez, J. Perez-Pariente, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1992) 589-590.
- [292] J.C. Van der Waal, M.S. Rigutto, V.B. H., *Appl. Catal., A* 167 (1998) 331-342.
- [293] A. Wróblewska, J. Wajzberg, A. Fajdek, E. Milchert, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 1344-1349.
- [294] T. Blasco, A. Corma, M.T. Navarro, J.P. Pariente, *J. Catal.* 156 (1995) 65-74.
- [295] P.T. Tanev, M. Chibwe, T.J. Tinnavaia, *Nature* 368 (1994) 321-323.
- [296] K.A. Koyano, T. Tatsumi, *Chem. Commun.* (1996) 145-146.
- [297] M.S. Morey, S. O'Brien, S. Schwarz, G.D. Stucky, *Chem. Mater.* 12 (2000) 898-911.
- [298] Y. Wang, G. Wang, M. Yang, L. Tan, W. Dong, R. Luck, *J. Colloid. Interface Sci.* 353 (2011) 519-523.
- [299] T. Linsen, K. Cassiers, P. Cool, E.F. Vansant, *Adv. Colloid Interface Sci.* 103 (2003) 121-147.
- [300] W.-H. Zhang, J. Lu, B. Han, M. Li, J. Xiu, P. Ying, C. Li, *Chem. Mater.* 14 (2002) 3413-3421.
- [301] J.A. Melero, J.M. Arsuaga, P.d. Frutos, J. Iglesias, J. Sainz, S. Blázquez, *Microporous Mesoporous Mater.* 86 (2005) 364-373.
- [302] B.L. Newalkar, J. Olanrewaju, S. Komarneni, *Chem. Mater.* 13 (2001) 552-557.
- [303] F. Bérubé, F. Kleitz, S. Kaliaguine, *J. Mater. Sci.* 44 (2009) 6727-6735.

- [304] F. Bérubé, F. Kleitz, S. Kaliaguine, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 14403-14411.
- [305] N. O'Callaghan, J.A. Sullivan, *Appl. Catal., B* 146 (2014) 258-266.
- [306] T.T. Peng Wu, Takayuki Komatsu, Tatsuaki Yashima, *Chem. Mater.* 14 (2002) 1657-1664.
- [307] J. Feng, G. An, B. Chen, Y. Li, K. Ding, Y. Xie, Z. Liu, *Clean – Soil, Air, Water* 37 (2009) 527-533.
- [308] F. Chiker, F. Launay, J.P. Nogier, J.L. Bonardet, *Green Chem.* 5 (2003) 318-322.
- [309] F. Chiker, J.P. Nogier, F. Launay, J.L. Bonardet, *Appl. Catal., A* 259 (2004) 153-162.
- [310] F. Chiker, J.P. Nogier, F. Launay, J.L. Bonardet, *Appl. Catal., A* 243 (2003) 309-321.
- [311] W. Zhan, J. Yao, Z. Xiao, Y. Guo, Y. Wang, Y. Guo, G. Lu, *Microporous Mesoporous Mater.* 183 (2014) 150-155.
- [312] S. Wu, Y. Han, Y.-C. Zou, J.-W. Song, L. Zhao, Y. Di, S.-Z. Liu, F.-S. Xiao, *Chem. Mater.* 16 (2004) 486-492.
- [313] A. Ungureanu, D. Trong On, E. Dumitriu, S. Kaliaguine, *Appl. Catal., A* 254 (2003) 203-223.
- [314] D. Trong-On, A. Ungureanu, S. Kaliaguine, *PCCP* 5 (2003) 3534.
- [315] J.C. Groen, L.A.A. Peffer, J.A. Moulijn, J. Pérez-Ramírez, *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 4983-4994.
- [316] J.C. Groen, L.A.A. Peffer, J.A. Moulijn, J. Pérez-Ramírez, *Colloid. Surface. A* 241 (2004) 53-58.
- [317] J.C. Groen, J.A. Moulijn, J. Pérez-Ramírez, *Microporous Mesoporous Mater.* 87 (2005) 153-161.
- [318] N. Wilde, M. Pelz, S.G. Gebhardt, R. Gläser, *Green Chem.* 17 (2015) 3378-3389.
- [319] A. Silvestre-Albero, A. Grau-Atienza, E. Serrano, J. García-Martínez, J. Silvestre-Albero, *Catal. Commun.* 44 (2014) 35-39.
- [320] Y. Wang, M. Lin, A. Tuel, *Microporous Mesoporous Mater.* 102 (2007) 80-85.
- [321] S.-T. Tsai, P.-Y. Chao, T.-C. Tsai, I. Wang, X. Liu, X.-W. Guo, *Catal. Today* 148 (2009) 174-178.
- [322] D. Serrano, R. Sanz, P. Pizarro, I. Moreno, *Chem. Commun.* (2009) 1407-1409.
- [323] Y. Cheneviere, F. Chieux, V. Caps, A. Tuel, *J. Catal.* 269 (2010) 161-168.
- [324] Y. Fang, H. Hu, *Catal. Commun.* 8 (2007) 817-820.
- [325] M.B. Yue, M.N. Sun, F. Xie, D.D. Ren, *Microporous Mesoporous Mater.* 183 (2014) 177-184.
- [326] A. Corma, M. Domine, J.A. Gaona, J.L. Jordá, N.M. T., F. Rey, J. Pérez-Pariente, J. Tsuji, B. McCulloch, L.T. Nemeth, *Chem. Comm.* (1998) 2211-2212.
- [327] M.L. Pena, V. Dellarocca, F. Rey, A. Corma, S. Coluccia, L. Marchese, *Microporous Mesoporous Mater.* 44-45 (2001) 345-356.
- [328] N. Igarashi, K. Hashimoto, T. Tatsumi, *Microporous Mesoporous Mater.* 104 (2007) 269-280.
- [329] R.R. Sever, R. Alcalá, J.A. Dumesic, T.W. Root, *Microporous Mesoporous Mater.* 66 (2003) 53-67.
- [330] K. Lin, L. Wang, F. Meng, Z. Sun, Q. Yang, Y. Cui, D. Jiang, F.-S. Xiao, *J. Catal.* 235 (2005) 423-427.
- [331] C. Qi, T. Akita, M. Okumura, K. Kuraoka, M. Haruta, *Appl. Catal., A* 253 (2003) 75-89.
- [332] J. Bu, H.-K. Rhee, *Catal. Lett.* 65 (2000) 141-145.
- [333] J. Silvestre-Alberó, M.E. Domine, J.L. Jordá, M.T. Navarro, F. Rey, F. Rodríguez-Reinoso, A. Corma, *Appl. Catal., A* 507 (2015) 14-25.
- [334] N. Igarashi, S. Kidani, R. Ahemaito, K. Hashimoto, T. Tatsumi, *Microporous Mesoporous Mater.* 81 (2005) 97-105.
- [335] D.A.R. Richard L. Brutchey, Lars K. Andersen, and, T.D. Tilley, *Langmuir* 21 (2005) 9576-9583.
- [336] T. Kamegawa, N. Suzuki, K. Tsuji, J. Sonoda, Y. Kuwahara, K. Mori, H. Yamashita, *Catal. Today* 175 (2011) 393-397.
- [337] Y. Huang, P. Yuan, Z. Wu, X. Yuan, *J. Porous Mater.* 23 (2016) 895-903.
- [338] J. Sudhakar Reddy, P. Liu, A. Sayari, *Appl. Catal., A* 148 (1996) 7-21.
- [339] B.I. Whittington, J.R. Anderson, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 1032-1041.
- [340] D.C.M. Dutoit, M. Schneider, P. Fabrizioli, A. Baiker, *Chem. Mater.* 8 (1996) 734-743.
- [341] L.Y. Chen, G.K. Chuah, S. Jaenicke, *Catal. Lett.* 107 (1998) 107-114.
- [342] L.Y. Chen, G.K. Chuah, S. Jaenicke, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 132 (1998) 281-292.
- [343] L. Davies, P. McMorn, D. Bethell, P.C. Bulman Page, F. King, F.E. Hancock, G.J. Hutchings, *PCCP* 3 (2001) 632-639.
- [344] W. Fan, P. Wu, T. Tatsumi, *J. Catal.* 256 (2008) 62-73.
- [345] N.N. Trukhan, V.N. Romannikov, A.N. Shmakov, M.P. Vanina, E.A. Paukshtis, V.I. Bukhtiyarov, V.V. Kriventsov, I.Y. Danilov, O.A. Kholdeeva, *Microporous Mesoporous Mater.* 59 (2003) 73-84.
- [346] K.L. Antcliff, D.M. Murphy, E. Griffiths, E. Giamello, *PCCP* 5 (2003) 4306-4316.
- [347] C.W. Yoon, K.F. Hirsekorn, M.L. Neidig, X. Yang, T.D. Tilley, *ACS Catal.* 1 (2011) 1665-1678.
- [348] M. Guidotti, C. Pirovano, N. Ravasio, B. Lazaro, J.M. Fraile, J.A. Mayoral, B. Coq, A. Galarneau, *Green Chem.* 11 (2009) 1421-1427.
- [349] R.A. Sheldon, *Metal-Catalyzed Reactions in Water* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.

Chapitre II. Etude exploratoire en vue d'un catalyseur tandem

Introduction

L'objectif de cette étude est d'utiliser un support mésoporeux pour l'immobilisation de la GOx, qui permette l'incorporation de l'enzyme à l'intérieur du support et non pas uniquement en surface. Cela permettrait de greffer une quantité importante d'enzyme et de lui conférer une tolérance élevée face aux conditions d'époxydation, en la protégeant au sein du matériau. Enfin, l'insertion de la GOx à l'intérieur du support catalytique permettrait un meilleur couplage des deux réactions (production de l'oxydant et époxydation de l'alcène). En effet, la proximité des sites catalytiques pourrait alors réduire le phénomène de dismutation de H_2O_2 ainsi que la limitation diffusionnelle des composés. Le chapitre qui suit présente une étude de différents supports mésoporeux et de l'immobilisation de la GOx sur ces supports. Enfin, les premiers tests d'oxydation dans des milieux proches de ceux nécessaires au couplage de la production biocatalysée de H_2O_2 et de l'époxydation d'alcènes, seront également présentés.

1. Matériels & Méthodes

1.1. Synthèse des supports mésoporeux

Différents matériaux siliciques ont été utilisés durant ce travail. Ils diffèrent par leur structure (ordonnée ou non), la taille de leurs pores et la présence ou non d'un réseau de pores interconnectés. Ces paramètres présentent différents avantages et inconvénients en fonction des conditions catalytiques utilisées et seront discutés lors de l'analyse des résultats (cf. 2.).

1.1.1. SBA-15

La silice SBA-15 a été synthétisée selon la méthode décrite par Zhao et *al.* [1]. Celle-ci consiste à ajouter 4 g de copolymère triblocs $EO_{20}PO_{70}EO_{20}$ (Pluronic P123, Aldrich) dans 150 mL d'acide chlorhydrique aqueux (HCl, 37%, VWR) à 1,6 M et à laisser le mélange résultant sous agitation pendant 2 h, à 40°C. Puis, 9 mL (40 mmol) de tétraéthoxysilane (TEOS, 99%, Aldrich) sont ajoutés lentement sous agitation. Le gel résultant est maintenu à 40°C pendant 24 h, puis subit un traitement hydrothermal à 100°C pendant 24 h dans une bouteille de PFE®. Le matériau obtenu est filtré, lavé soigneusement à l'eau distillée et séché à 100°C pendant 24 h. Enfin, l'agent tensioactif est éliminé par calcination à 550°C sous air pendant 6 h, en utilisant au préalable une rampe de température de 24°C/h.

1.1.2. MCF (mesocellular foam)

Deux types de matériaux MCF (nommés MCF1 et MCF2) ont été préparés grâce à un procédé hydrothermal développé par Schmidt-Winkel et *al.* [2]. Le protocole est très proche de celui de la synthèse de la silice SBA-15 (1.1.1.) mais se différencie par l'ajout d'un agent déstructurant, le 1, 3, 5-triméthylbenzène (TMB, 97%, Acros). La synthèse consiste donc à dissoudre 4 g de copolymère triblocs EO₂₀PO₇₀EO₂₀ (Pluronic P123, Aldrich) dans 150 mL d'acide chlorhydrique aqueux (HCl, 37%, VWR) à 1,6 M et à laisser le mélange résultant sous agitation pendant 2 h à 40°C. 9,2 mL (67 mmol) de TMB sont ensuite ajoutés lentement et l'émulsion obtenue reste 2 h sous agitation vigoureuse (1000 rpm) à 40°C également. Puis 9 mL (40 mmol) de tétraéthoxysilane (TEOS, 99%, Aldrich) sont introduits lentement sous agitation. Le gel résultant est maintenu dans un bain d'eau à 40°C pendant 24 h. Dans le cas de MCF2, 48 mg de fluorure d'ammonium (NH₄F, 98%, Fluka) sont également ajoutés comme agent de gonflement pour ouvrir davantage les fenêtres au sein du matériau. Ensuite, le mélange est traité par voie hydrothermale pendant 24 h à 100°C dans une bouteille en PFE®. Le matériau résultant est filtré, lavé soigneusement à l'eau distillée et séché à 60°C pendant 24 h. Enfin, l'agent tensioactif est éliminé par calcination à 550°C sous air pendant 6 h, en utilisant au préalable une rampe de température de 24°C/h.

1.2. Titanation du support MCF2

Pour l'incorporation de l'espèce catalytique au sein du matériau MCF2, nous nous sommes basés sur les travaux de O'Callaghan et *al.* [3] qui effectuent une incorporation post-synthèse du titane sur le support silicique en présence d'un précurseur de Ti en phase liquide. Le rapport Ti/Si visé est de 0,053. Au préalable, le support silicique a subi un traitement thermique de 7 h à 350°C afin de supprimer toutes traces d'eau en surface. 1 g de MCF2 est ajouté à 40 mL de cyclohexane (99%, Sigma Aldrich) dans un ballon (séché préalablement) équipé d'un septum et d'un réfrigérant. Le mélange est placé 5 min sous ultra-sons afin d'obtenir une bonne dispersion puis mis sous flux d'azote. Parallèlement, 0,3 mL (1,1 mmol) d'orthotitanate de tétrapropyle (TPOT, 97%, Aldrich) est introduit dans 10 mL de cyclohexane, puis le mélange agité manuellement. La solution est insérée goutte à goutte dans la dispersion de solide, puis le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à température ambiante, puis 24 h à 80°C. Le solide est ensuite filtré et lavé avec 15 mL de cyclohexane et 15 mL d'acétone (VWR), puis séché à 60°C une nuit. Il est ensuite calciné à 550°C sous air pendant 6 h, en utilisant au préalable une rampe de température de 24°C/h. Le matériau ainsi obtenu est nommé par la suite MCF2-Ti.

1.3. Silylation du support MCF2

Au préalable, le support silicique a subi un traitement thermique d'une durée de 7 h à 350°C afin de supprimer toute trace d'eau en surface. Dans une première série d'expériences, l'agent de silylation utilisé est le chlorotriméthylsilane (CTMS, ≥97% Aldrich). Deux échantillons différents ont été produits en faisant varier le volume de CTMS. La quantité ajoutée a été calculée en se basant sur le recouvrement désiré des groupements hydroxyle en surface, après l'étape de titanation (sachant que 1,8 mmol – OH/g ont été titanés et qu'une silice contient environ 4 mmol – OH/g [4-7], il reste donc 2,2 mmol de – OH/g disponibles) et en triplant cette quantité:

- pour recouvrir 1/10^e des – OH restants en surface, 30 µL de CTMS (0,24 mmol) sont introduits au mélange contenant 355 mg de matériau (11 µL calculés théoriquement pour 1 g)
- pour 1/5^e des – OH restants en surface, 60 µL (0,47 mmol) de CTMS sont ajoutés à 355 mg de solide (22 µL calculés théoriquement pour 1 g)

Ces échantillons seront nommés respectivement MCF2-Tis1 et MCF2-Tis2. Noter qu'ici les quantités sont triplées comparées à la théorie, afin de s'affranchir de la possible hydrolyse de ce composé dans les conditions de synthèse.

Le solide MCF2-Ti (0,4 g) est dispersé dans 10 mL de toluène (VWR) dans un ballon (séché préalablement) équipé d'un septum et d'un réfrigérant. Le mélange est placé 5 min sous ultra-sons afin d'obtenir une bonne dispersion et mis sous flux d'azote. 30 µL/60 µL de CTMS sont introduits goutte à goutte dans la dispersion, qui est ensuite agitée pendant 1 h à température ambiante, puis 24 h à 115°C (reflux du toluène). Le milieu réactionnel est ensuite filtré et le solide lavé avec 20 mL de toluène et 20 mL de dichlorométhane (99,8% anhydre, Sigma Aldrich), puis séché à 60°C une nuit.

Dans une deuxième série d'expériences, l'agent de silylation utilisé est l'hexaméthylsilazane (HMDS, 99% Sigma). Le protocole suivi pour recouvrir 1/10^e des – OH restants en surface est le même que précédemment aux différences près que 25 µL de HMDS (0,12 mmol, correspondant à la quantité de CTMS/2 car le composé est bifonctionnel) sont ajoutés à 355 mg de solide et que le mélange est chauffé, directement à 120°C pendant 3 h, puis filtré et lavé avec 20 mL de toluène, puis d'acétone.

1.4. Amination des surfaces

La surface des trois supports SBA-15, MCF1 et MCF2 a été fonctionnalisée avec des groupements aminopropyle en s'inspirant de travaux de la littérature [7] (pour SBA-15) et [8] (pour MCFs). Ces derniers réagiront avec les groupes carboxyliques de l'enzyme, afin de former une liaison amide lors de son immobilisation sur les supports.

Le matériau silicique (1 g) est activé à 350°C pendant 3 h sous air puis est transféré dans un ballon (préalablement séché) équipé d'un septum. Du toluène sec (VWR, 50 mL) est introduit rapidement et la suspension obtenue est placée sous flux d'azote, puis 5 min sous ultra-sons. Le ballon est ensuite équipé d'un réfrigérant et de nouveau exposé à un flux d'azote. On ajoute 1 mL (4 mmol) de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, 99% Aldrich) au mélange goutte à goutte. La suspension est agitée 1 h à température ambiante, puis 24 h à reflux. Le mélange réactionnel est ensuite filtré et le solide lavé avec 30 mL de toluène, 30 mL d'acétonitrile (Sigma Aldrich) et enfin 30 mL d'éthanol (VWR). Le solide résultant est ensuite séché à 60°C sous air, puis l'excès d'APTES est extrait au soxhlet avec du dichlorométhane (99,8% anhydre, Sigma Aldrich) pendant 24 h. Le matériau est finalement séché à 60°C. Le même protocole a été appliqué pour introduire des fonctions amine sur le matériau MCF2-Ti.

1.5. Caractérisations des supports mésoporeux

Les matériaux siliciques SBA-15, MCF1, MCF2, ainsi que ceux silylés et aminés sont caractérisés par différentes techniques.

Les clichés de microscopie électronique en transmission ont été obtenus sur un instrument JEOL JEM 2010, 200kV monocristal LaB6 équipé d'une caméra CCD Orius de la société Gatan. Des analyses de microscopie électronique à transmission couplées EDX ont été effectuées grâce à un détecteur PGT (Bruker) qui a permis l'obtention des analyses de spectroscopie en dispersion en énergie (EDS ou EDX) sur l'élément Ti.

Les mesures de sorption de N₂ donnant accès aux paramètres structuraux (surface spécifique, taille de pores, de fenêtres etc.) ont été effectuées à l'aide d'un instrument ASAP 2020 à -196 °C. L'analyse des matériaux SBA-15 et MCF1 ou 2 a été précédée d'un dégazage à 120 °C pendant une nuit. Les matériaux silylés et aminés ont été traités à 40°C pendant 30 min et à 60°C pendant 30 min avec une baisse de pression de 0,0067 bar/s, plutôt qu'un dégazage à 120°C afin de ne pas détériorer les fonctions greffées en surface. Les mesures pour MCF-NH₂ ont été effectuées sur un instrument Belsorp Max.

La surface spécifique BET, S_{BET} , a été obtenue à partir des données d'adsorption dans la plage de pression relative P/P^0 = de 0,05 à 0,25. La constante BET, C_{BET} , obtenue lors des mesures, caractérise un état de surface, par exemple la balance hydrophile/hydrophobe de cette dernière. Il est obtenu par application de la théorie BET aux mesures d'adsorption de N₂, en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\frac{1}{v[(p^0/p) - 1]} = \frac{C_{BET} - 1}{v_m C_{BET}} \left(\frac{p}{p^0} \right) + \frac{1}{v_m C_{BET}}$$

Où p est la pression du gaz, p^0 la pression de vapeur saturante, v le volume de gaz adsorbé (cm³), v_m le volume de la monocouche et C_{BET} la constante BET telle que:

$$C_{BET} = \exp\left(\frac{\Delta H_1 - \Delta H_L}{RT}\right)$$

où ΔH_1 est la chaleur d'adsorption correspondant à la formation de la monocouche et ΔH_L la chaleur d'adsorption associée aux couches supérieures. D'après Mirabaud et *al.* [9], plus ces coefficients sont faibles et plus le matériau a tendance à être hydrophobe.

Le volume de pores total a été estimé à partir de la quantité de N₂ adsorbé à $P/P^0 = 0,99$. Le diamètre moyen des pores de SBA-15 a été déterminé selon le modèle BJH [10]. Les pores des solide MCF (cellules), présentent une forme de type « embout de bouteille » (*ink-bottle-type*) reliés entre eux par des fenêtres étroites. Les diamètres des cellules et fenêtres ont été estimés en utilisant la méthode de Broekhoff-de-Boer modifiée (BdB)-FHH [11, 12] où FHH se réfère à la forme des isothermes de Frenkel-Halsey-Hill. Les tailles de cellules ont été obtenues à partir des branches d'adsorption des isothermes, tandis que les branches de désorption ont donné les tailles de fenêtres.

Les mesures de diffraction de rayon X (DRX) renseignant sur la structure des matériaux (cristallin ou amorphe) ont été effectuées avec un instrument Bruker D8 Advanced muni d'une source de cuivre d'émission $K\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$).

Les compositions massiques (% mass., mg/kg) des échantillons analysés tels quels sous forme de poudre ont été estimées par spectroscopie de fluorescence X à l'aide d'un spectromètre SPECTRO

XEPOS doté d'une anti-cathode au palladium portée à 50 kV et 1 mA. L'analyse de chaque échantillon a été répétée deux fois.

Les spectres UV-vis en réflexion diffuse ont été enregistrés sur une gamme de 200-800 nm avec un spectromètre Cary 5000 Varian équipé d'un double faisceau avec du PTFE (polytétrafluoroéthylène) comme référence.

Des analyses par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) ont été réalisées sous ultra haut vide ($\leq 10^{-10}$ Torr) grâce à un spectromètre Omicron Argus équipé d'une source monochromatique $AlK\alpha$ ($h\nu = 1486,6$ eV) à une puissance de 300 W. Les mesures sont réalisées à un seuil de 100 eV pour le spectre général et à un seuil de 20 eV pour les régions C1s, O1s et Ti2p. Ces spectres sont enregistrés avec une résolution de 0,1 eV. Le caractère isolant de SiO_2 nécessite une compensation de charge. Le détecteur est placé à un angle de 45° par rapport à la surface et les énergies de liaisons sont calibrées par rapport à l'énergie de liaison du carbone aliphatique à 284,5 eV [13]. Les intensités des pics élémentaires sont corrigées par les facteurs de Scofield [14]. L'aire des pics est déterminée après soustraction d'une ligne de base linéaire. Les spectres sont traités en utilisant le logiciel Casa XPS v.2.3.15 et en appliquant des lois gaussiennes/lorentziennes de 70/30.

Des mesures de spectroscopie d'absorption de rayons X (XANES) au seuil K du Ti ont également été effectuées au Synchrotron Soleil sur la ligne de lumière Samba. Les échantillons ont été analysés dans des conditions ambiantes et préparés sous forme de pastille (10 mm de diamètre) en diluant 21 mg de MCF2-Ti dans 237 mg de cellulose et 6,3 mg d'anatase dans 83,7 mg de cellulose afin d'obtenir un saut de seuil $\Delta\mu(E)$ proche de 1.

Les différents matériaux silylés et aminés ont été étudiés par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) à l'aide d'un appareil Bruker Vector 22. Les poudres silylées ont subi un traitement thermique à $120^\circ C$ pendant 24 h juste avant la mesure, tandis que les matériaux aminés ont été traités à $50^\circ C$ sous vide poussé (1 mTorr) pour éliminer toute trace d'eau. L'analyse a été effectuée sur la gamme $400-4000\text{ cm}^{-1}$. Les pastilles des supports silylés ont été diluées avec du KBr et celles des matériaux aminés étaient autosupportées.

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées avec un appareil SDT Q600 de TA Instruments, sous flux d'air (100 mL/min) et avec une rampe en température de $10^\circ C/min$. Les analyses effectuées sur les solides silylés ou fonctionnalisés par des groupes aminopropyle ont permis d'évaluer la quantité de groupements fonctionnels ajoutés et le caractère hydrophobe des solides a été déduit des pertes en H_2O des matériaux, laissés volontairement se saturer en eau au contact d'une atmosphère humide pendant 7 jours, générée à l'intérieur d'un récipient fermé.

L'analyse RMN a été effectuée sur un spectromètre BRUKER AVANCEIII 500 opérant à 11,4 T, en utilisant une sonde 7 mm et une vitesse de rotation à l'angle magique (MAS) de 6 kHz. La fréquence de Larmor du silicium est de 99,4 MHz et les déplacements chimiques ont été référencés par rapport au tétraméthylsilane. Les paramètres de l'analyse $\{^1H^{29}Si\}$ CPMAS sont : une impulsion 90° de 3,6 μs pour l'excitation du proton, un temps de contact de 3 ms, un temps de répétition de 5 secondes et un nombre d'accumulation de 2048.

Enfin, des mesures de mobilités électrophorétiques à l'aide d'un Malvern Zetasizer ont permis de mesurer le potentiel zeta de suspensions de MCF2 et MCF2-NH₂ à différents pH et de déterminer le PZC (point de charge nulle) des particules. Cette méthode a permis d'établir que la charge de surface

de MCF2-NH₂ est de signe opposé à celle de la GOx lors des étapes de lavage qui suivent le greffage covalent.

1.6. Immobilisation de la GOx

L'immobilisation par formation d'une liaison covalente de l'enzyme a été effectuée en utilisant des agents de couplage (A.C.) : le N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC, Sigma) et le N-hydroxysuccinimide (NHS, Aldrich) avec un ratio molaire 1:1 et une concentration de 5 mM. Dans un premier temps, l'enzyme (glucose oxydase d'*Aspergillus niger*, type X-S, 120 unités/mg de solide, Aldrich) est dissoute dans 2 mL de tampon phosphate (obtenu à partir de KH₂PO₄, 99,5%, Riedel-de-Haën et K₂HPO₄ anhydre, Merck) pH = 6 (10 mM), en présence de différents ratios molaires de A.C./GOx : de 0 (pour les expériences d'adsorption) à 1600. Pour chacun des tests, les ratios ainsi que les concentrations associées sont indiqués dans le texte, puisque la quantité de GOx dépendra des conditions A.C./GOx ou GOx/solide choisies. En parallèle, environ 20 mg de solide fonctionnalisé sont dispersés dans 2 mL de tampon phosphate (également obtenu à partir de KH₂PO₄, 99,5%, Riedel-de-Haën et K₂HPO₄ anhydre, Merck) pH = 8 (100 mM) dans un bain à ultra-sons, pour améliorer leur dispersion. Après 30 min d'activation de l'enzyme, la solution de GOx et le support sont mélangés. La valeur de pH final est alors de 7, 6. La solution finale est agitée une nuit à 200 rpm, à température ambiante puis le solide est récupéré par centrifugation (10 min à 2500 rpm) et lavé au moins 2 fois dans 10 mL de tampon phosphate pH = 8 (100 mM). Pour les essais d'immobilisation par adsorption (sans A.C), les lavages sont effectués au pH correspondant à celui utilisé pour l'adsorption. Le solide est lavé jusqu'à ce qu'on ne détecte plus d'activité enzymatique dans le surnageant (Activité < 0,05 U/mL). La GOx immobilisée en présence d'agents de couplage est stockée dans du tampon acétate (acétate de sodium anhydre 99%, Alfa Aesar et acide acétique) pH = 6 (100 mM).

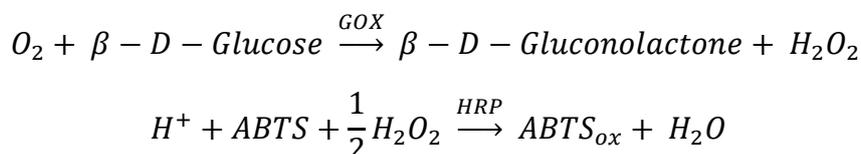
L'immobilisation de l'enzyme sur MCF2-Ti-NH₂ a été effectuée de la même manière avec 100 mg de solide, 4 mg de GOx initialement (GOx/solide = 4,8 U/mg) et une concentration en agent de couplage (EDC/NHS 1 : 1 mol.) d'environ 5 mM (A.C./GOx = 435 mol.).

A noter que dans notre étude, les composés EDC, NHS et GOx ont été pesés avec une incertitude-type de 0,0006 mg (balance XP26 Detla Range Mettler Toledo).

1.7. Mesure d'activité de la GOx

1.7.1. Mesure d'activité de la GOx libre

La GOx catalyse l'oxydation du glucose en gluconolactone et la réduction concomitante de O₂ en H₂O₂. Le principe de la mesure d'activité de la GOx repose sur le dosage de H₂O₂ ainsi produit. Ce dernier est réduit en présence d'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS, 98%, Sigma) et de peroxydase de Raifort ou *horseradish peroxydase* (HRP type VI, 253 unités/mg de solide, Sigma) qui catalyse la réaction, produisant ainsi la forme oxydée, ABTS_{ox}. Les équations ci-dessous résument ce mécanisme :



Comme l'ABTS_{ox} absorbe à 420 nm, des mesures spectroscopiques UV-visible sont effectuées avec un appareil UVIKON 930 de chez Kontron. Les concentrations du mélange réactionnel ($V_{\text{Final}} = 1$ mL) dans la cuve spectrophotométrique sont les suivantes: 500 mM de glucose (D-(+)-glucose 99,5%, Sigma), 8,6 mM d'ABTS et 0,01 mg/mL de HRP (3 U/mL) dans du tampon acétate de sodium aéré 100 mM, pH = 6. Les essais d'activité ont été effectués à 30°C. 10 µL de solution de GOx à tester ont été ajoutés au mélange réactionnel. Ces conditions sont favorables jusqu'à une activité mesurée de 2 U/mL, valeur pour laquelle la vitesse d'oxydation de l'ABTS observée est linéaire et proportionnelle à la concentration de GOx. Au-delà, la relation n'est plus linéaire. Une unité (U) est définie comme 1 µmole de peroxyde d'hydrogène produite par minute.

L'activité de la solution de GOx est déduite de la pente de $\frac{\Delta D_o}{dt}$ *test* mesurée à 420 nm, à partir de l'équation suivante:

$$\text{Activité} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\frac{\Delta D_o}{dt} \text{ test} \cdot V}{\epsilon_{ABTS_{ox}} \cdot 2} \cdot 100$$

où V est le volume final en mL de la solution testée et ϵ est le coefficient d'extinction molaire de l'ABTS_{ox} à 420 nm, qui est égal à 36 000 M⁻¹.cm⁻¹. Les résultats sont présentés comme l'activité moyenne sur au moins trois mesures et l'incertitude relative des résultats de l'activité peut être estimée à 5%, sur la base de l'écart-type de ces mesures successives sur chaque échantillon.

1.7.2. Mesure d'activité de la GOx immobilisée

Le même protocole est utilisé pour mesurer l'activité de la GOx après immobilisation sur le support, à l'exception près que la solution d'enzyme libre est remplacée par 20 µL d'une suspension silicique à 0,8 mg/mL. La suspension résultante ($V_{\text{Final}} = 2$ mL) est agitée continuellement avec un agitateur magnétique pendant toute la durée de la mesure d'absorbance. L'activité de l'enzyme immobilisée est ensuite exprimée en U/mg de solide. L'incertitude relative des résultats de l'activité peut être estimée à 5%, sur la base de l'écart type de trois mesures indépendantes de chaque échantillon.

1.7.3. Etude de la stabilité en température de la GOx libre ou immobilisée

L'effet instantané de la température sur l'activité enzymatique est étudié en introduisant directement la GOx libre (2 U/mL initialement) ou immobilisée (2,19 U/mg_{solide} de MCF2-NH₂-GOx initialement) dans la cuve du spectromètre contenant les substrats (500 mM de glucose, 8,6 mM d'ABTS) et la HRP (0,01 mg/mL à 3 U/mL), dans du tampon acétate de sodium aéré, pH = 6 (100 mM), préalablement chauffé à la température désirée (de 30 à 80°C).

Pour la stabilité de l'enzyme à plus long terme, 200 µL de GOx libre (2 U/mL initialement) ou 500 µL d'enzyme immobilisée (2,19 U/mg_{solide} initialement) dispersées dans du tampon acétate (100 mM, pH = 6), sont conservées à 50°C pendant 1 < t < 44 h sous légère agitation. L'activité résiduelle est mesurée selon la méthode détaillée ci-dessus en 1.7.1 et 1.7.2.

1.7.4. Stabilité de la GOx libre et immobilisée dans les solvants

Environ 200 μL de GOx libre à 2 U/mL et 500 μL de GOx immobilisée sur MCF2-NH₂ à 2,85 U/mg (toutes deux initialement solubilisée ou dispersée dans 100 mM de tampon acétate, pH = 6) ont été stockées pendant 4 h dans un mélange de 2 mL de CH₃CN (Sigma-Aldrich) ou MeOH (Sigma-Aldrich) et de tampon acétate (100 mM, pH = 6), pour différents rapports volumiques de CH₃CN (MeOH)/tampon. La stabilité au stockage est testée pour trois températures : à température ambiante, 35°C et 50°C. L'activité de la GOx a été mesurée selon la méthode habituelle, détaillée ci-dessus en 1.7.1. (à 30°C, dans un mélange composé de 500 mM de glucose, 8,6 mM d'ABTS et 0,01 mg/mL de HRP (3 U/mL) dans du tampon acétate de sodium 100 mM aérée pH = 6).

Les protocoles liés aux essais étudiant l'influence du pH sur l'adsorption de la GOx sur MCF2-NH₂, la stabilité (dans du tampon acétate, pH = 6, 100 mM) de la GOx libre et immobilisée en fonction de la température, de même que leur stabilité au stockage, à la fois dans des solvants organiques et en température, sont présentés dans la section *Supplementary Informations* de la publication à la fin de ce manuscrit.

1.8. Essais d'époxydation avec H₂O₂ dans un milieu MeOH/aqueux

Les essais d'époxydation du *cis*-cyclooctène (95%, Aldrich) par H₂O₂ (30% en masse, Sigma) à 50°C sont effectués dans un ballon bicol de 25 mL sous reflux. Typiquement, 1,1 mmol (150 μL) de cyclooctène sont ajoutées dans un volume total de 20 mL de milieu hydro-organique (MeOH/tampon acétate pH = 6 à 100 mM) en faisant varier le rapport solvant/tampon pour une gamme allant de 100% v/v à 75% v/v MeOH. Le catalyseur MCF2-Ti ou MCF2-Ti silylé (100 mg) est ajouté au milieu réactionnel. Le mélange est placé 2 min sous ultra-sons afin de s'assurer de la bonne dispersion du catalyseur, puis chauffé à 50°C. Ensuite, 5 mmol de H₂O₂ (500 μL) sont ajoutées progressivement en trois fois à raison d'un ajout par heure (150 μL + 150 μL + 200 μL), sous agitation magnétique.

Un suivi cinétique est effectué par chromatographie en phase gazeuse (He comme gaz vecteur) après 3, 6 et 20 h de réaction. La 2-hexanone (98%, Fluka) est utilisée comme étalon interne (170 μL). A noter que les quantités de substrat et étalon introduites dans le ballon sont pesées avec une incertitude-type de 0,06 mg (balance AB204-s de Mettler Toledo). L'étalonnage des différents composés a été effectué à l'aide de composés commerciaux (oxyde de cyclooctène, 99% Aldrich). Les coefficients de réponse des différents produits sont présentés dans le tableau 4 ci-après, selon l'équation ci-dessous.

$$m_i = \frac{m_{\text{réf}}}{C_{\text{Ri}}} \cdot \frac{A_i}{A_{\text{réf}}}$$

Où m_i et A_i sont la masse (g) et l'aire du pic du composé détecté, $m_{\text{réf}}$ et $A_{\text{réf}}$ la masse (g) et l'aire de l'étalon interne et C_{Ri} le coefficient de réponse du composé i .

L'appareil CPG Perichrom est muni d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire de 30 m (diamètre interne de 0,25 mm) rempli d'une phase stationnaire OPTIMA 1 (100% diméthylsiloxane), d'une épaisseur de 0,25 μm . Le programme utilisé présente une rampe en température de 70°C à 200°C à raison de 5°C/min. La température de l'injecteur est de 200°C et celle du détecteur de 250°C. Avant de prélever la solution, l'agitation est stoppée de manière à ne prélever que la phase liquide.

Tableau 4: Coefficients de réponse des produits analysés, obtenus après étalonnage

	100% MeOH	60% MeOH
Cyclooctène	0,81	0,87
Epoxyde de cyclooctène	1,04	0,96

Dans cette étude, les performances catalytiques sont décrites par les valeurs analytiques :

- De la conversion (%) = $\frac{n_{\text{substrat consommé}} (\text{mol})}{n_{\text{substrat de départ}} (\text{mol})} \times 100$
- De la sélectivité (%) = $\frac{n_{\text{produit}} (\text{mol})}{n_{\text{substrat consommé}} (\text{mol})} \times 100$
- Du rendement (%) = $\frac{n_{\text{produit}} (\text{mol})}{n_{\text{substrat départ}} (\text{mol})} \times 100$

2. Résultats & Discussions

2.1. Caractérisation des supports mésoporeux

2.1.1. Matériaux siliciques SBA-15, MCF1 et MCF2

Les différents supports siliciques ont été caractérisés par microscopie électronique à transmission (MET), par mesures de sorption de N₂ et par diffraction des rayons X (DRX). Ces différentes techniques ont permis de comparer leurs paramètres texturaux et structuraux, afin de déterminer le matériau le plus adéquat pour l'immobilisation de l'enzyme.

La figure ci-dessous montre des images MET des solides MCF2 (Figure 78A) et SBA-15 (Figure 78B).

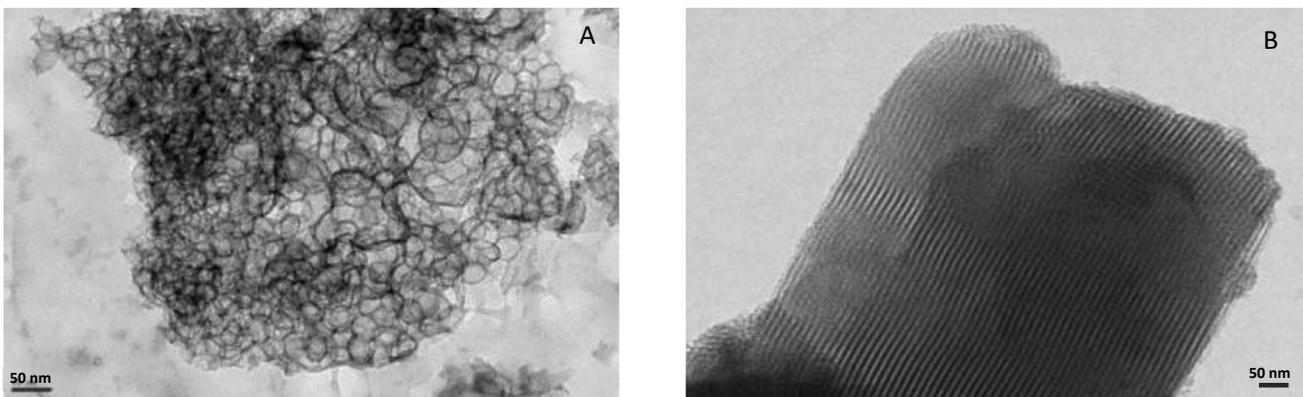


Figure 78. Images MET des silices MCF2 (A) et SBA-15 (B) à la même échelle (barre d'échelle : 50nm)

La différence de morphologie est flagrante. Le matériau MCF2 dévoile une structure désordonnée constituée de cellules de tailles variées (20-40 nm), tandis que la silice SBA-15 montre une organisation régulière, laissant deviner une structure hexagonale caractéristique. Les fenêtres interconnectées au sein de la silice MCF2 ont été décrites dans la littérature [2, 11] mais sont difficilement visibles sur les clichés de microscopie. Ces images permettent déjà de rendre compte de la différence de taille de pores dans ces deux types matériaux et de constater une morphologie sphérique pour le solide MCF et cylindrique dans le cas de la silice SBA-15.

Les isothermes d'adsorption/désorption des trois matériaux (MCF1, MCF2 et SBA-15) sont présentées Figure 79 ci-dessous.

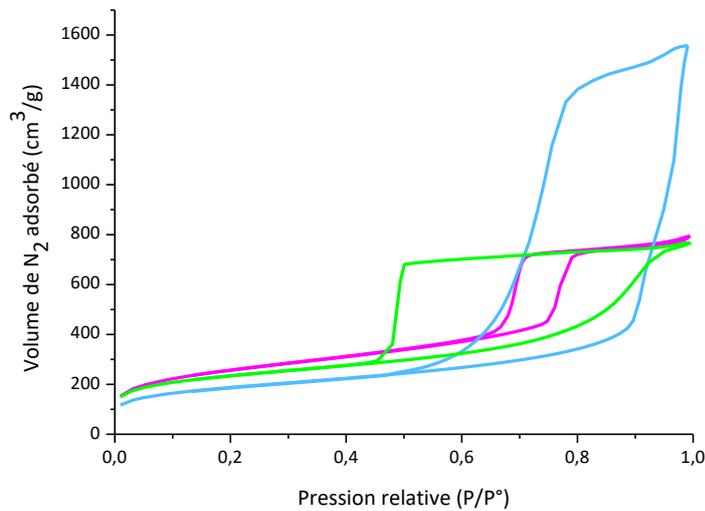


Figure 79. Isothermes d'adsorption/désorption d'azote de MCF1, MCF2 et SBA-15

Les isothermes sont des courbes de type IV et les boucles d'hystérésis formées sont de type H1 pour SBA-15 et MCF2 et H2 pour MCF1, typiques des matériaux mésoporeux [15]. Dans l'hystérésis H1, les branches d'adsorption et de désorption sont parallèles, tandis que l'hystérésis H2 constitue une boucle asymétrique avec une isotherme de désorption de pente plus abrupte que celle d'adsorption. Cette dernière est généralement considérée comme la signature d'un processus de percolation lors de la « vidange » du matériau poreux désordonné. Généralement l'hystérésis H1 est associée à un système de pores cylindriques non-interconnectés, tandis que l'hystérésis H2 est caractéristique de systèmes hautement connectés et désordonnés, souvent de type *ink-neck-bottle*. Cependant les récents travaux de Grosman et Ortega [16] ont montré que la classification IUPAC devait être reconsidérée et que la différence entre les boucles d'hystérésis de type H1 et H2 pourrait simplement être que les boucles H1 sont caractéristiques d'une étroite et H2 d'une large distribution de taille de pores, quelle que soit la forme des pores et sans présager de leur interconnexion.

Les hystérésis des MCFs sont plus grandes que celle de la silice SBA-15, ce qui indique une répartition de taille de pores beaucoup plus étendue. Les valeurs de surfaces spécifiques et de diamètres de pores de la SBA-15 et MCFs, présentées dans le tableau ci-dessous, sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour des matériaux réalisés selon les mêmes protocoles [1, 12], à l'exception de la MCF1, dont les cellules sont plus petites de 10 nm et les fenêtres 2 fois plus étroites. Le matériau MCF2 présente des tailles de pores et fenêtres plus importantes que MCF1: 35,4 et 11,7 nm, contre 22,1 et 5,3 nm, respectivement. L'addition de NH_4F lors de l'étape de synthèse hydrothermale de MCF2 a donc entraîné une augmentation de la taille des fenêtres et des cellules par rapport à celles de la MCF1.

Les paramètres texturaux des silices SBA-15 et MCF2 (Tableau 5) sont en accord avec les images MET de la Figure 78. Le matériau MCF2 montre des pores globalement sphériques désordonnés (Fig. 78A), tandis que les pores de la silice SBA-15 présentent une forme plus linéaire (Figure 78B). La silice SBA-15 montre des pores plus petits (5,3 nm) que MCF2, laquelle peut être décrite comme un réseau de cellules d'environ 35 nm de diamètre reliées entre elles par des fenêtres de 12 nm. A noter que dans MCF2, la distribution de tailles des fenêtres est plus large que celle des cellules.

Tableau 5: Paramètres structuraux des matériaux SBA-15 et MCFs

Support silicique	TMB/P123 (g/g)	NH ₄ F (mg)/P123 (g)	S _{BET} ^a (m ² /g)	∅ ^b _p ou ∅ ^c _c (nm)	∅ ^c _f (nm)	V _{pore} (cm ³ /g)
SBA-15 (ici)	0	0	904	5,3	-	1,19
SBA-15 [1]	0	0	850	5,8	-	1,17
MCF1 (ici)	1,0	0	810	22,1	5,3	1,17
MCF1 [12]	1,0	0	800	33,0	10,7	2,0
MCF2 (ici)	1,0	24 mg /2 g	639 ± 27	35,4 ± 0,6	11,7 ± 1,6	2,4 ± 0,3
MCF2 [12]	1,0	24 mg /2 g	625	32,2	16,5	2,2

^a Calculées selon Brunauer-Emmett-Teller (BET).

^b ∅_p est le diamètre de pore moyen de la silice SBA-15, calculé selon le modèle Barrett Joyner et Halenda (BJH).

^c ∅_c et ∅_w correspondent aux diamètres des cellules et des fenêtres des solides MCFs, calculés selon le modèle Broekhoff-de-Boer BdB-FHH modifié.

Les larges cellules des matériaux MCF font d'eux des candidats prometteurs pour l'introduction de la glucose oxydase (6,0 × 5,2 × 7,7 nm³) [17]. De plus, les fenêtres connectées de MCF2 sont suffisamment larges (11,7 nm) pour permettre la diffusion de l'enzyme à l'intérieur du matériau, tandis que l'immobilisation de la GOx sur SBA-15 ne pourra avoir lieu que sur la surface externe de la silice, du fait d'une porosité de taille insuffisante pour accueillir la protéine.

Une analyse structurale par DRX aux petits angles (2θ < 5°) a également été effectuée. Les résultats sont représentés ci-dessous Figure 80.

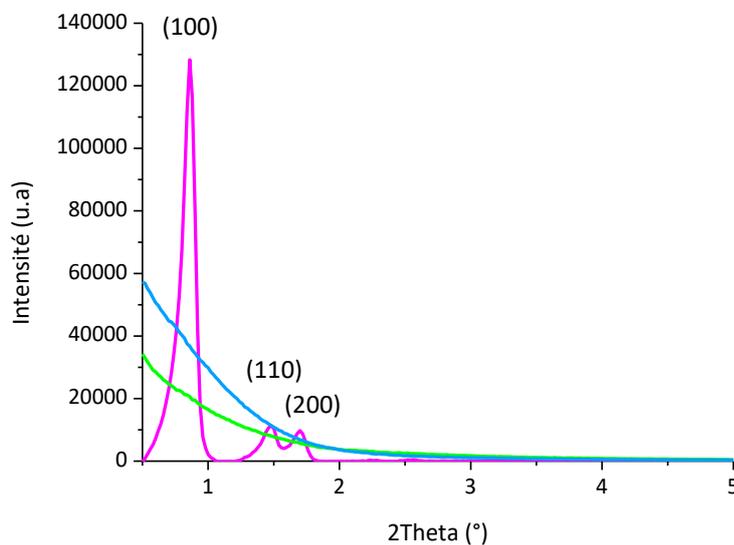


Figure 80: Diffractogrammes de rayons X de SBA-15, MCF1 et MCF2

Le diffractogramme de la silice SBA-15 présente trois pics associés aux plans réticulaires (100), (110) et (200), caractéristiques d'une organisation de symétrie hexagonale, comme en témoigne la littérature [1]. Pour les matériaux MCF1 et MCF2, aucun pic n'est observé au-dessus de 2θ = 0,5°. Ceci témoigne de l'absence de structuration périodique de leur porosité et donc de leur structure amorphe.

Finalement, suite à ces analyses, la silice MCF2 semble être le support le plus adéquat pour l'immobilisation enzymatique. Certains travaux utilisent des zéolithes [18, 19] comme supports. Vennestrøm a notamment immobilisé la GOx sur TS-1 [20] pour l'oxydation de l'alcool allylique. Dans ce cas, la GOx est greffée uniquement en surface si l'on s'en réfère à la taille de l'enzyme et à celle des pores de ce matériau (0,6 nm de diamètre). La taille de pores plus importante des supports mésoporeux devrait donc permettre d'introduire l'enzyme à l'intérieur du matériau, avec l'objectif de lui conférer une protection supplémentaire face aux conditions drastiques d'époxydation (température, solvant organique). L'insertion de l'enzyme devrait faciliter également la proximité entre celle-ci et le site catalytique métallique, évitant ainsi les problèmes de limitation diffusionnelle. De plus, la surface spécifique plus importante de ce type de matériaux devrait permettre de greffer une quantité plus importante d'enzymes.

2.1.2. Support MCF2 titané : MCF2-Ti

L'incorporation de l'espèce catalytique inorganique a été vérifiée et analysée par plusieurs techniques, le but étant de veiller à ce que le titane soit majoritairement sous forme Ti^{IV} , mais surtout de s'assurer de sa bonne dispersion au sein du matériau. En effet, pour la catalyse avec H_2O_2 , le titane doit se trouver sous sa forme isolée, comme nous avons pu le discuter Chapitre I.4.

Les caractéristiques du matériau ont été obtenus grâce à des mesures de sorption d'azote, de fluorescence X, des images de microscopie électronique à transmission couplées à une analyse chimique EDX, des analyses de diffraction des rayons X (DRX), d'UV-visible à réflexion diffuse (UV-RD), de spectroscopie de photoélectrons X (XPS) et enfin des mesures de spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES).

Le matériau MCF2-Ti a d'abord été analysé par des mesures de sorption d'azote, afin de vérifier la conservation des paramètres texturaux après l'étape de titanation post-synthèse. Il est en effet possible que l'étape de titanation réduise la taille des pores. La Figure 81 montre la superposition des courbes pour le support silicique avant et après titanation et le tableau 6 résume l'évolution des paramètres texturaux.

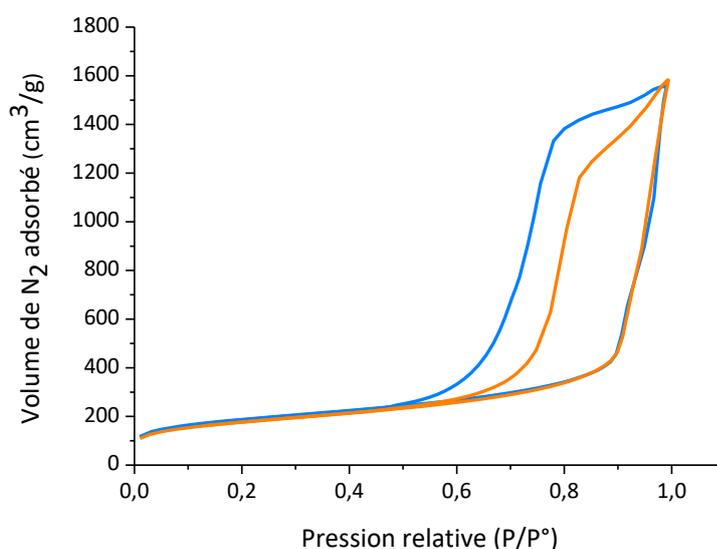


Figure 81: Isothermes d'adsorption/désorption de MCF2-Ti et MCF2

Les isothermes conservent leurs caractéristiques d'avant greffage. Les paramètres texturaux tels que le volume de pores, la taille des cellules et fenêtres n'ont pas été impactés par l'étape post-synthèse, mais l'hystérésis moins large témoigne d'une distribution de taille de pores plus étroite.

Tableau 6: Paramètres structuraux des matériaux MCF2-Ti et MCF2

Support	S_{BET} (m^2/g)	$\varnothing_{cellule}$ (nm)	$\varnothing_{fen\hat{e}tre}$ (nm)	V_{pore} (cm^3/g)
MCF2	639 ± 27	35,4 ± 0,6	11,7 ± 1,6	2,4 ± 0,3
MCF2-Ti	619 ± 81	37,1 ± 0,3	11,6 ± 1,4	2 ± 0,3

Ainsi, l'étape de titanation ne semble pas avoir de réelle influence sur la morphologie du matériau.

Ensuite, le taux d'incorporation du titane dans la silice a été déterminé par fluorescence X. Les raies Ti-K α 1 et Ti-K β 1 du spectre ci-dessous témoignent bien de la présence du titane dans le matériau.

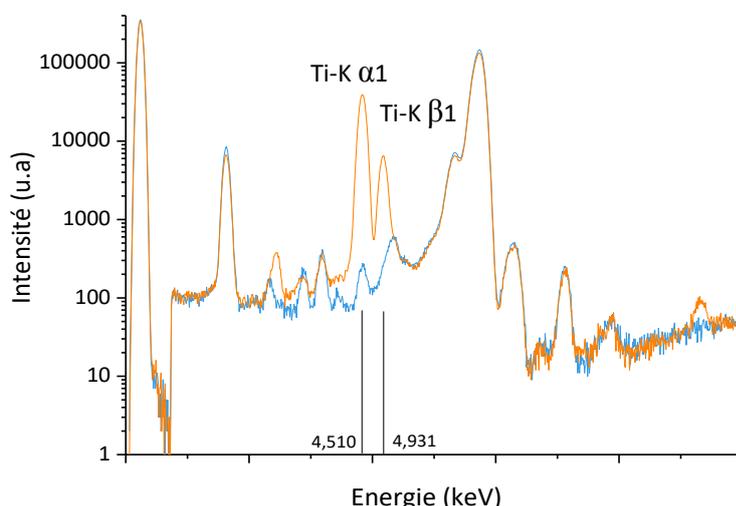


Figure 82: Spectre de fluorescence X du matériau silicique MCF2 avant et après l'introduction du titane MCF2-Ti

Parallèlement, des images MET couplées avec une analyse chimique EDX ont été enregistrées afin de vérifier la dispersion du titane et de le quantifier.

Tableau 7 : Rapport Ti/Si (molaire) dans MCF2-Ti obtenu par mesures EDX, fluorescence X et XPS

Ti (% massique)	Si (% massique)	Ti/Si théorique	Ti/Si MET-EDX (10 mesures)	Ti/Si FluoX	Ti/Si XPS
3,66 ± 0,03	45,18 ± 0,20	0,053	0,044 ± 0,015	0,0420 ± 0,0003	0,06

L'analyse quantitative des données de fluorescence X présentées dans le Tableau 7 montre que 3,66 % en masse de Ti a été introduit dans le matériau, soit une incorporation de Ti à hauteur de 80% de la quantité de départ. La concordance entre la mesure globale obtenue par fluorescence X et les mesures ponctuelles obtenues par EDX témoigne d'une bonne dispersion de l'espèce. La Figure 83 ci-dessous montre l'une des images MET obtenues. Nous pouvons voir que les murs des cellules contrastent

davantage après titanation (Figure 83A) que ceux du matériau de départ (Figure 83B). Ceci peut s'expliquer par la seconde calcination subie par le matériau [3].

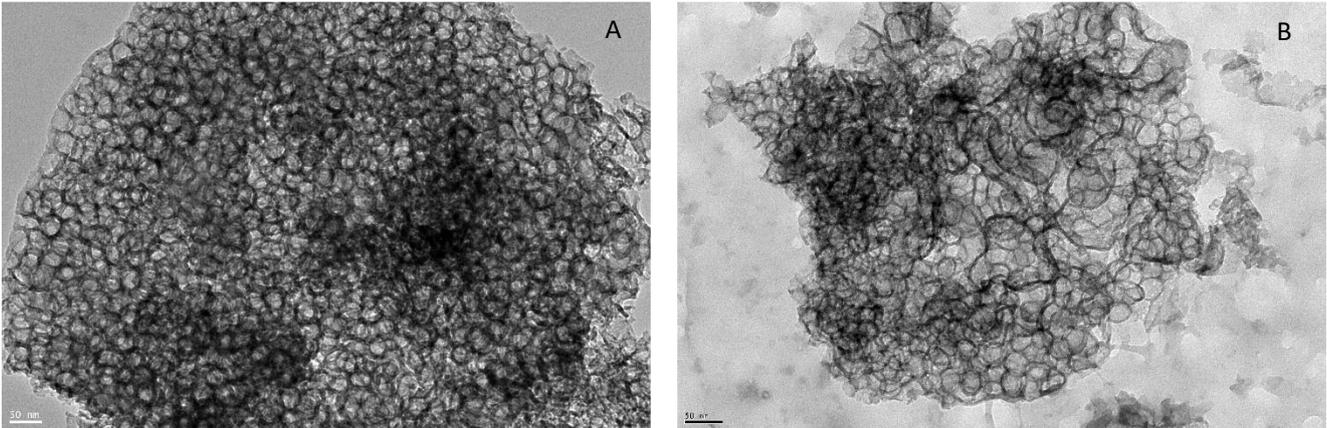


Figure 83: Images des matériaux MCF2-Ti (A) et MCF2 (B) par microscopie électronique à transmission

Les analyses XPS, renseignant sur la structure électronique du titane, permettent d'obtenir des informations sur la composition de surface et complètent les observations quantitatives obtenues par fluorescence X et EDX. Le rapport Ti/Si donné par l'analyse XPS, Tableau 7, est supérieur d'environ 20 % à ceux obtenus par fluorescence X ou EDX, ce qui suggère que la densité de Ti en surface est supérieure à celle en profondeur. Chandra et *al.* [21] ont observé la même tendance pour une incorporation de Ti par synthèse directe.

La spéciation du titane dans le réseau silicique a été étudiée par XPS, DRX, UV-RD, et XANES. Les mesures XPS sont présentées Figure 84 et 85.

Les spectres caractéristiques de Ti 2p et O 1s sont présentés Figure 84. Le tableau en haut de la figure montre que le rapport O/Si issu de ces mesures est de 1,9, donc proche de 2 comme on pourrait s'y attendre pour SiO₂, témoignant de la fiabilité des mesures.

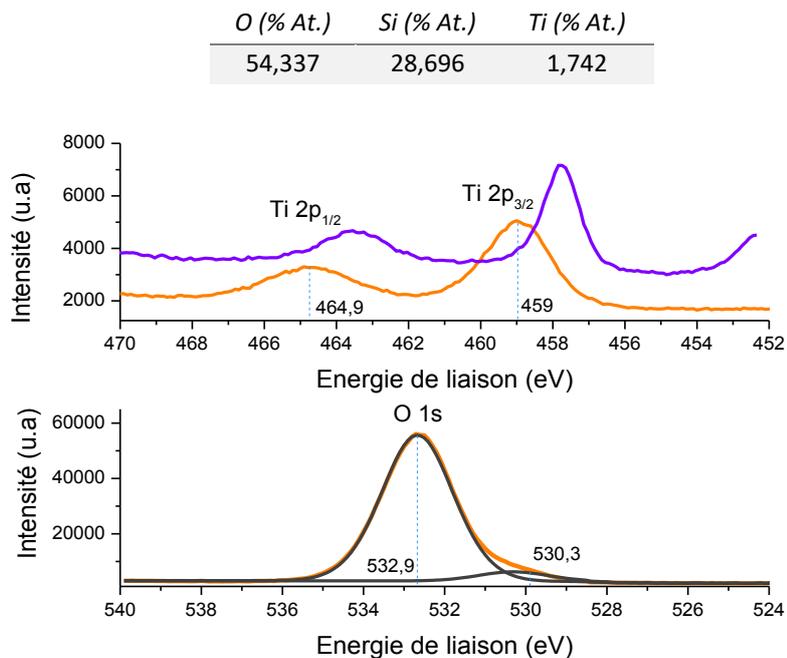


Figure 84: Pourcentages atomiques des éléments O, Si et Ti et comparaison des analyses XPS de MCF2-Ti pour les orbitales Ti2p (en haut) et O 1s (en bas), du TiO₂ anatase pour les orbitales Ti2p (en haut))

Pour l'anatase (spectre violet, fournisseur Merck), on retrouve les pics Ti 2p_{3/2} et Ti 2p_{1/2} à des énergies de 457,8 eV et 463,5 eV respectivement. Ces valeurs sont en accord avec la littérature, qui donne une valeur identique pour Ti 2p_{1/2}, et une valeur d'énergie de liaison pour Ti 2p_{3/2} de 457,2 eV [22]. De même, des valeurs d'énergie de liaison de Ti 2p_{3/2} de l'anatase légèrement différentes ont également été rapportées par d'autres auteurs comme Davis *et al.* [23] à 459 eV (465 eV pour Ti2p_{1/2}), Gao *et al.* [24] à 458,5 eV (Ti2p_{1/2} non renseignée) ou à 458,4 eV (Ti2p_{1/2} non renseignée) pour Blasco *et al.* [25]. Les valeurs trouvées dans ce travail pour l'anatase restent donc comparables à celles de la littérature. Pour le matériau MCF2-Ti (Figure 84, spectre orange), un décalage des pics vers les plus hautes énergies par comparaison au spectre de l'anatase est clairement observé pour chacun des pics de Ti 2p. Ce décalage peut s'expliquer par la présence de liaisons Si-O-Ti dans le matériau, qui a pour effet d'augmenter le caractère électropositif de Ti et donc d'augmenter l'énergie à fournir lors de la photoémission. Ce phénomène s'explique par le caractère plus électronégatif de l'atome de Si, comparé au Ti. La position des pics de Ti2p est donc un indice de l'incorporation du Ti dans le réseau du matériau. Grohmann *et al.* [26] observent également ce phénomène de décalage des énergies de liaison de Ti pour différentes silicalites titanées.

Concernant le spectre O 1s, d'après la littérature l'anatase pure ne présente qu'un seul pic O1s autour de 530 eV [22, 27, 28] caractéristique des liaisons Ti-O-Ti. On retrouve une contribution après décomposition du spectre O1s de MCF2-Ti (Figure 84 en bas) autour de cette valeur caractéristique de liaisons Ti-O-Ti dans ce matériau. Le pic majoritaire centré à 532,9 eV est caractéristique d'un matériau silicique et des liaisons Si-O-Ti [24]. L'introduction de SiO₂ a tendance à déplacer les pics vers les plus hautes énergies de liaison (jusqu'à plus de 2 eV au-dessus de la valeur à 530 eV caractéristique de l'anatase) [28, 29]. Tout comme l'observent Davis *et al.* [13], c'est également le cas pour les spectres de l'élément Si2p (Figure 85), pour lesquels ici le pic du silicium passe de 103,4 eV pour MCF-Ti à 103,6 eV pour le matériau MCF purement silicique. Cependant ce décalage de 0,2 eV n'est pas significatif, puisque comparable à la résolution de la mesure.

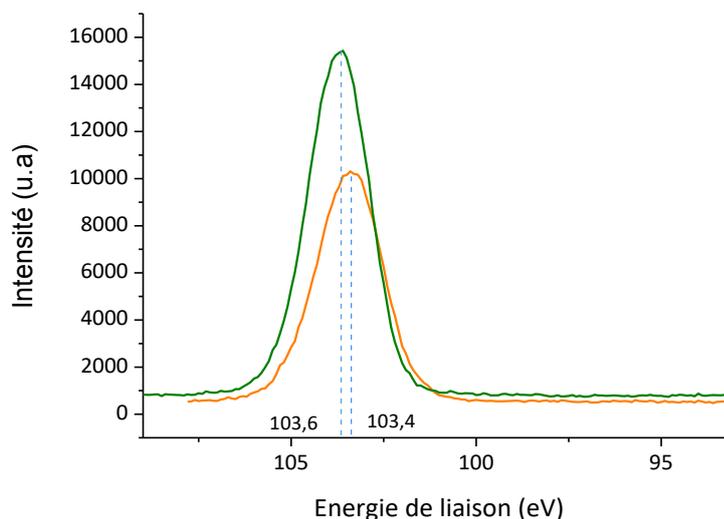


Figure 85: Comparaison des analyses XPS de MCF-Ti et MCF pour l'orbitale Si 2p

Finalement, les analyses XPS permettent d'observer l'incorporation effective du Ti dans le matériau silicique grâce à la présence de pics caractéristiques des liaisons Ti-O-Ti et Ti-O-Si. Cependant, il est difficile de conclure sur la coordinence du Ti au sein du réseau avec ces mesures. La différence avec le spectre de l'anatase donne cependant une indication quant au fait que le titane dans

l'échantillon n'est *a priori* pas sous forme entièrement octaédrique, comme c'est le cas sur le spectre XPS de TiO₂.

L'analyse DRX aux grands angles ($2\theta = 10^\circ$ à 80°), présentée Figure 86, démontre l'absence de clusters de TiO₂ (anatase) de taille importante dans le matériau, comme en témoigne le diffractogramme du matériau MCF2-Ti que nous avons synthétisé (spectre orange, figure du haut) en comparaison avec les données de la littérature (en bas) [30].

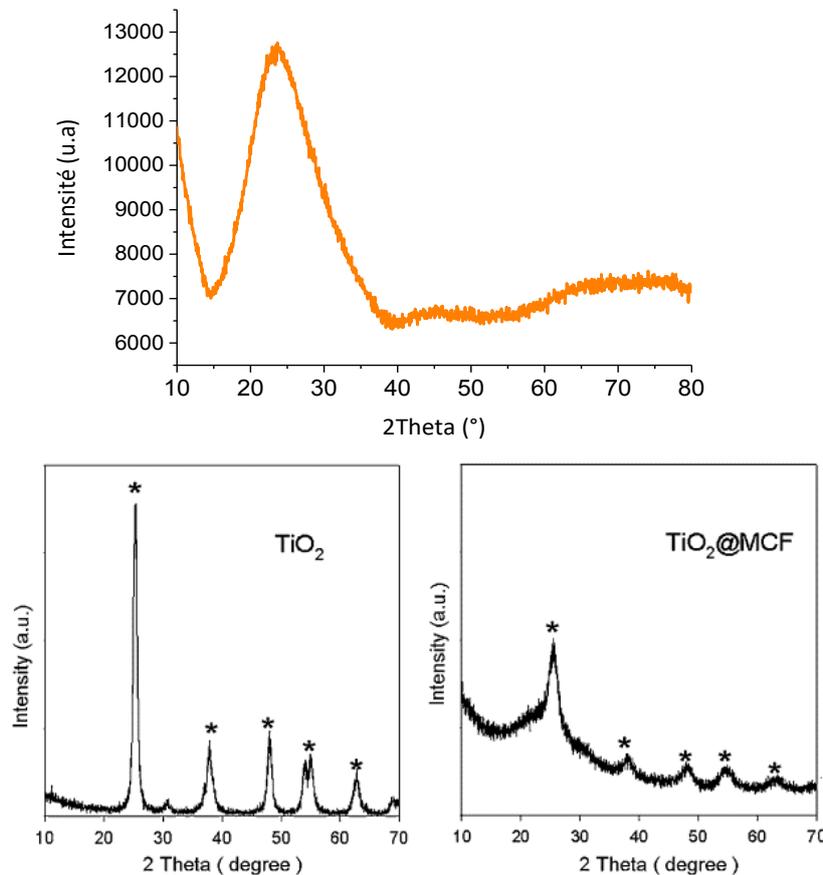


Figure 86: Comparaison du diffractogramme de **MCF2-Ti** avec ceux de l'**anatase** [30]. Les pics caractéristiques de l'anatase sont indiqués par la marque (*) pour l'anatase « *bulk* » (TiO₂) et incorporée à l'état de nanoparticules dans un matériau silicique mésoporeux MCF (TiO₂@MCF).

Le diffractogramme correspondant au matériau silicique titané MCF2-Ti présente un pic unique et relativement large, centré à $2\theta = 25^\circ$ caractéristique d'une silice amorphe. A l'inverse, dans le cas où des nanoparticules de TiO₂ anatase sont présentes, Zhang *et al.* [30] (en bas à droite sur la Figure 86) ont montré que les 5 pics de diffraction attendus sont bien observés mais avec une forme plus élargie que ceux de TiO₂ anatase *bulk* du fait de la faible étendue de ces domaines (cf. formule de Scherrer). Aucun de ces pics n'est visible dans notre cas ce qui implique que MCF2-Ti ne renferme pas de nanoparticules de TiO₂ ou bien que ces dernières sont en très faibles quantités ou de dimensions plus petites que 4 nm.

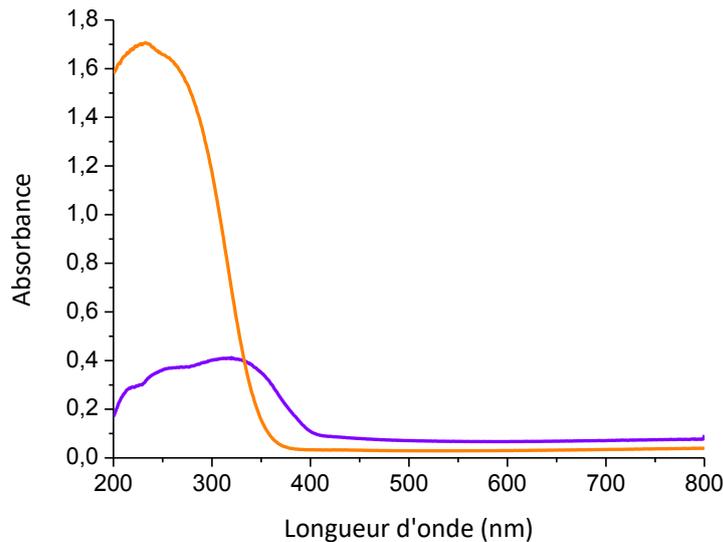


Figure 87: Analyses UV-DR de **MCF2-Ti** et d'un mélange mécanique **MCF2+TiO₂** avec le rapport Ti/Si: 0,04.

Les mesures en UV-RD et XANES viennent compléter les analyses précédentes. En effet, la spectroscopie UV-visible à réflexion diffuse est une technique utile pour caractériser la géométrie et l'environnement des liaisons des ions titane (IV). Le spectre d'un mélange mécanique de MCF2 et TiO₂ (MCF2+TiO₂ spectre violet) présente un seuil d'absorption à 400 nm et une large bande centrée autour de 300 nm (Figure 87). Le titane sous forme octaédrique, caractéristique de l'anatase, présente normalement un seuil d'absorption autour de 380 nm [13] et une bande d'absorption centrée autour de 300 nm [31]. Ici, une large bande se décompose en trois épaulements centrés à 331 nm, 257 nm et 218 nm. Les bandes centrées autour de 240-250 nm peuvent correspondre à des dimères ou de petits oligomères d'espèces titanées (Ti sous forme octaédrique) [28, 32], celles centrées autour de 260-290 nm sont caractéristiques de clusters d'oxyde [32] et celles autour de 330 nm sont caractéristiques de la présence d'anatase [28]. Le spectre de MCF2 + TiO₂ correspond bien à celui d'un matériau renfermant du Ti sous forme octaédrique. Par contre le spectre de MCF2-Ti (Figure 87, en orange) est très différent : le seuil d'adsorption est décalé vers les faibles longueurs d'onde et la bande d'absorption plus étroite et plus intense à teneur en Ti identique est centrée autour de 230 nm. La littérature a montré qu'un matériau contenant des atomes de titane isolés présente une bande d'absorption caractéristique d'un transfert de charge (LMCT) entre les ions oxyde et l'orbitale *d* vide de Ti⁴⁺, centrée sur une gamme de longueur d'ondes comprises entre 208 et 230 nm [27, 33, 34], ce qui laisse présumer d'une coordination de Ti dans le matériau MCF2-Ti majoritairement tétraédrique. Cependant, un petit épaulement est observable à 261 nm témoignant d'une faible présence de titane sous forme octaédrique au sein du matériau silicique [35]. L'élargissement de la bande d'absorption et le décalage vers des longueurs d'onde supérieures à 230 nm, témoigne d'une augmentation du nombre de coordination du titane. A noter que les différentes possibilités de ligands (-OH, -OSi, -OTi ou H₂O) peuvent impacter l'absorption de Ti dans ce type de matériau. La littérature n'est pas unanime quant à la forme du spectre de Ti(IV), puisque cela dépend également de la quantité de Ti dans le matériau [32] et de son traitement avant analyse (hydraté ou non), qui semble avoir une influence sur l'environnement de Ti [27].

En conclusion, la nette différence entre les spectres de TiO_2 et de MCF2-Ti laisse à penser que le Ti introduit dans MCF2 est majoritairement sous forme tétraédrique, même si une faible quantité sous forme octaédrique peut être présente.

Enfin, le matériau MCF2-Ti a également été analysé par spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX) en se concentrant sur la partie du seuil d'absorption (XANES), afin d'avoir des informations supplémentaires sur l'environnement local du Ti (Figure 88). La position et l'intensité du pré-seuil (vers 4970 eV) reflètent la coordinence du Ti. L'anatase présente trois pics de faibles intensités au niveau du pré-seuil, attribués aux transitions du niveau $1s$ de cœur du Ti vers les niveaux t_{2g} , e_g et a_{1g} caractéristiques d'une coordinence octaédrique [36, 37]. MCF2-Ti quant à lui, présente un pic majoritaire plus intense autour de 4970 eV. Or, nous distinguons tout de même deux épaulements juste avant et après ce pic à des positions identiques à celles trouvées pour l'anatase. Cette similitude montre que la coordinence n'est pas totalement tétraédrique dans notre cas. La position du pic le plus intense du pré-seuil (4970 eV) indique, selon Farges et *al.* [37], une coordinence entre 4 et 5, qui s'explique certainement par une extension de la coordinence du titane à l'état hydraté. D'après Bordiga et *al.* [38], la faible intensité du pré-seuil peut être associée à un mélange de Ti tétraédrique et octaédrique (normalement une coordination purement tétraédrique est caractérisée par un pic dont l'intensité représente 74% du seuil d'absorption). Cependant, cette même diminution de l'intensité du pré-seuil a également été observée pour des silices titanées microporeuses et mésoporeuses, tels que Ti-Beta [25], TS-1 [39] et Ti-MCM-41 [40]. Ce phénomène est probablement dû à une coordinence plus élevée causée par des molécules d'eau dans la sphère de coordinence ou plutôt les groupements -OH coordonnés au Ti, comme nous venons de le dire juste avant. Rappelons ici que les mesures ont été effectuées en conditions ambiantes, sans recuit préliminaire pour retirer l'eau en surface.

Finalement, les résultats XANES confirment les observations obtenues par les méthodes précédentes, à savoir que MCF2-Ti ne contient pas uniquement du Ti tétraédrique, mais contient une fraction minoritaire de Ti sous forme de clusters d'oxyde, ce qui n'est pas forcément gênant pour l'application recherchée pour ce catalyseur.

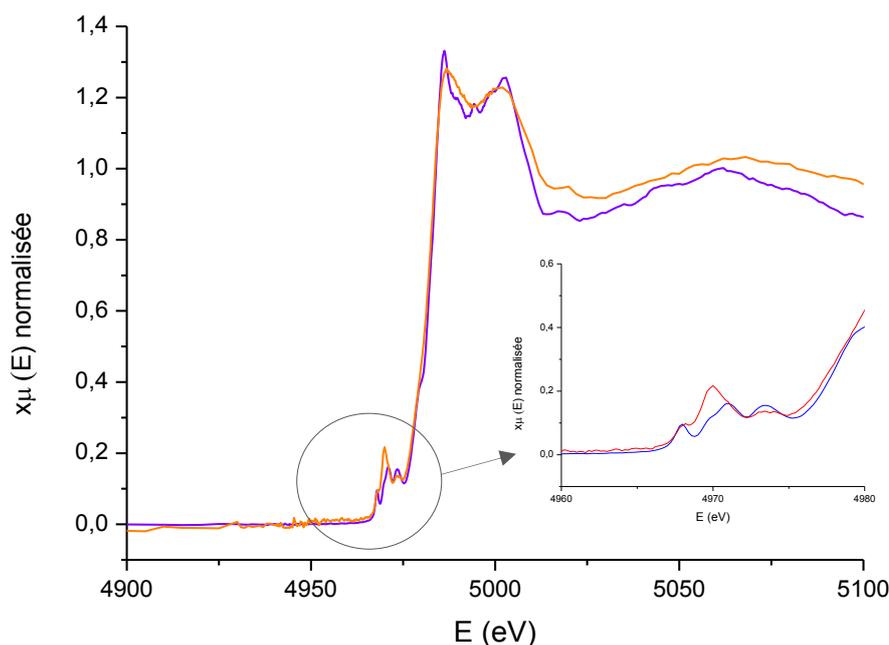


Figure 88: Résultats XANES au seuil K du Ti pour l'anatase et MCF2-Ti

Les travaux de Kholdeeva et *al.* [32] ont en effet montré l'intérêt de dimères ou petits clusters de Ti comparés au titane uniquement isolé, pour l'oxydation, par H_2O_2 , de phénols substitués par des groupements alkyle (Figure 89). Il semblerait que la présence d'au moins deux groupements Ti-OOH voisins améliore particulièrement l'interaction de l'espèce catalytique avec le substrat, mais également la réutilisation du catalyseur.

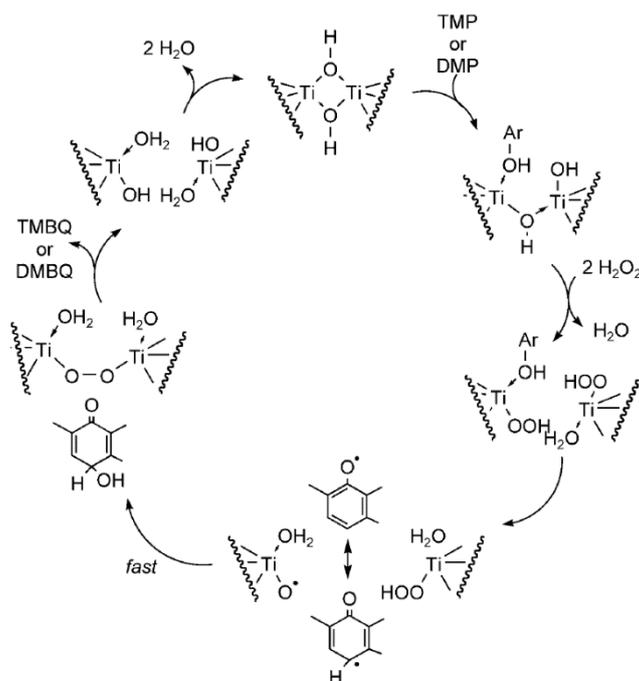


Figure 89: Mécanisme d'oxydation d'alkylphénols (TMP: 2,3,6-triméthylphénol et DMP: 2,6-diméthylphénol) en benzoquinones (TMBQ: 2,3,5-triméthyl-1,4-benzoquinone et DMBQ: 2,6-diméthyl-1,4-benzoquinone, respectivement) par H_2O_2 en présence de Ti dimériques, proposé par Kholdeeva et *al.*[32]

2.1.3. Support MCF2-Ti silylé : MCF2-Tisx

Certaines problématiques de notre étude développées 3.3 et 3.4 ont mené à augmenter le caractère hydrophobe de la surface du matériau MCF2-Ti, afin d'améliorer ses propriétés catalytiques. En effet, l'étude bibliographique a montré que les bonnes performances catalytiques de la zéolithe TS-1 avec H₂O₂ étaient notamment liées à son caractère hydrophobe. Le catalyseur MCF2-Ti a donc été silylé comme montré Figure 90.

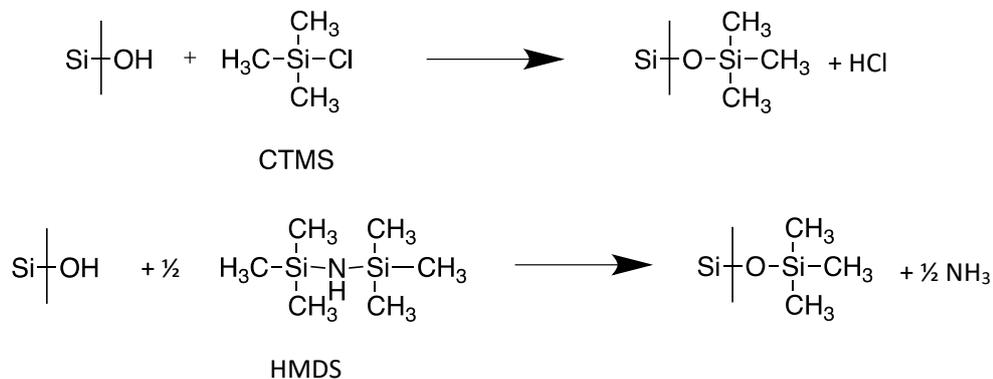


Figure 90 : Stratégies de silylation du support MCF2-Ti avec CTMS et HMDS

L'étape de silylation a été contrôlée par quatre techniques de caractérisation : la thermogravimétrie (ATG), la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF), la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire solide (RMN-MAS) et enfin la sorption de N₂, permettant d'avoir accès au coefficient C_{BET} que l'on peut lier au caractère hydrophobe du matériau à condition d'être comparé au sein d'une série homologue. A noter que la thermogravimétrie a permis d'évaluer la quantité de groupements fonctionnels ajoutés ainsi que l'évolution du caractère hydrophobe une fois les solides saturés par H₂O. Comme énoncé en 1.3., 60 µL de CTMS ont été ajoutés lors de la silylation de 355 mg de matériau MCF2-Tis2, contre 30 µL pour MCF2-Tis1 et 25 µL de HMDS ont été utilisés pour la fonctionnalisation de l'échantillon MCF2-Tis3.

Tableau 8: Paramètres de synthèse des différents matériaux silylés

Matériau	Silylation
MCF2-Ti-s1	0,24 mmol CTMS, 355 mg solide (0,67 mmol/g), 1 h à l'ambiante puis 24 h à 115°C
MCF2-Ti-s2	0,47 mmol CTMS, 355 mg solide (1,32 mmol/g), 1 h à l'ambiante puis 24 h à 115°C
MCF2-Ti-s3	0,12 mmol HMDS (0,67 mmol/g), 355 mg solide, 24 h à 120°C

Les courbes Figure 91 montrent les analyses thermogravimétriques des échantillons silylés, ainsi que de l'échantillon père MCF2-Ti. Les résultats sont normalisés à partir de 100°C, température à laquelle nous considérons que les molécules d'eau en surface ont été éliminées. Les variations de masse des matériaux silylés ne présentent pas d'évènements thermiques bien marqués caractéristiques du départ de groupements organiques en surface, comme observé par Sarawade et al. [41] (pour une quantité de HMDS identique à la nôtre). Ceci peut s'expliquer par une différence de mesure au niveau de la rampe de température lors de l'analyse TG. Néanmoins, pour les trois matériaux silylés, une variation de masse supérieure à celle du matériau correspondant non silylé, MCF2-Ti (courbe orange), est observée puisque chacune des courbes se trouvent sous celle

correspondant à MCF2-Ti. La perte de masse la plus importante est celle du matériau MCF2-Tis1, fonctionnalisée avec le moins de CTMS (0,67 mmol/g), suivi du matériau MCF2-Tis3 fonctionnalisé avec 0,34 mmol/g de HMDS. Il est possible de décomposer ces pertes en trois zones de décroissance monotone selon la température, comme indiqué par les tangentes vertes en pointillés sur la courbe correspondant à MCF-Tis1, délimitées par des verticales grises. La perte de masse est plus rapide dans la zone comprise entre 300 et 650°C, comme le montre la pente plus élevée.

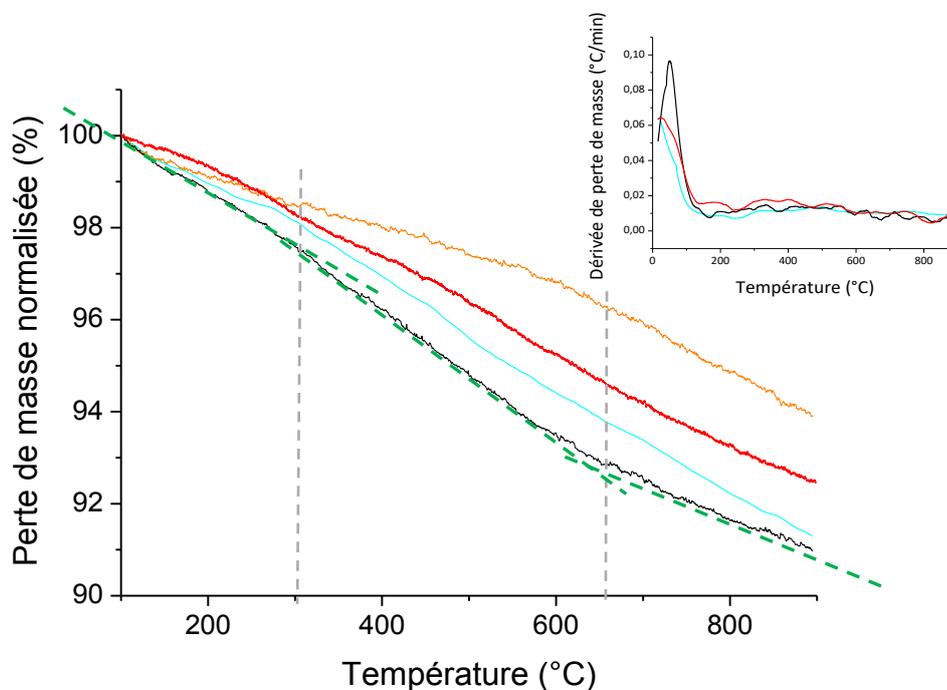


Figure 91: Analyses thermogravimétriques des matériaux silylés: MCF2-Tis1, MCF2-Tis2, MCF2-Tis3 et non silylé: MCF2-Ti

Les analyses montrent que doubler la quantité d'agent de silylation n'a pas permis ici d'augmenter la quantité greffée, au contraire : elle est deux fois moins importante. En retirant la contribution du support brut MCF2-Ti, les pertes de masse de MCF2-Tis1, MCF2-Tis2, MCF2-Tis3 sont respectivement de 2,9, 1,4 et 2,6%. Les quantités de groupements silylés sont donc respectivement pour ces trois matériaux de 0,32, 0,15 et 0,29 mmol/g. En termes de pourcentage de greffage par rapport à la quantité initiale introduite, MCF2-Tis1, MCF2-Tis2 et MCF2-Tis3 (voir récapitulatif des conditions de synthèse Tableau 8) présentent respectivement des taux de 48%, 11% et 43%. A noter qu'un second test

de greffage pour chaque échantillon aurait été intéressant.

Des analyses IR-TF sont présentées Figure 92. Les échantillons ont été soumis à un prétraitement à 120°C pendant une nuit. Pourtant, la présence d'eau résiduelle est toujours observée, comme en témoigne la bande à 3300 cm^{-1} caractéristique du mode d'élongation des liaisons O-H des molécules d'eau adsorbées sur la silice [41-43]. La bande située à 2964 cm^{-1} , visible sur les deux matériaux silylés, est caractéristique de l'élongation des liaisons C-H des groupements $-\text{CH}_3$ et les bandes à 850 cm^{-1} et 759 cm^{-1} correspondent aux liaisons Si-C [41, 43]. L'autre bande caractéristique de cette dernière liaison attendue vers 1260 cm^{-1} n'est pas observée à cause de la saturation de la bande associée à la liaison Si-O-Si de la silice, vers 1100 cm^{-1} . La seconde bande caractéristique de la silice est visible autour de 460 cm^{-1} [44]. Enfin, la bande à 1400 cm^{-1} est quant à elle caractéristique du

groupement $-CH_3$ (vibration de déformation dans le plan) de la chaîne hydrocarbonée liée au Si [42, 44, 45]. Les masses des pastilles n'ayant pas été pesée de manière précise avant et après séchage, aucune quantification ne peut être extrapolée de ces analyses. Ici les spectres avaient surtout un rôle qualitatif, afin de témoigner de la présence de $-CH_3$.

La comparaison des spectres IR du matériau titané de départ et après silylation a donc permis de confirmer la fonctionnalisation du matériau MCF2-Tis1 et 2. Cependant les pics caractéristiques du groupement greffé sont de faible intensité. L'utilisation de pastilles autosupportées et une mesure *in-situ* sous vide auraient pu permettre de les accentuer ; cependant la quantité de matériau disponible ne l'a pas permis.

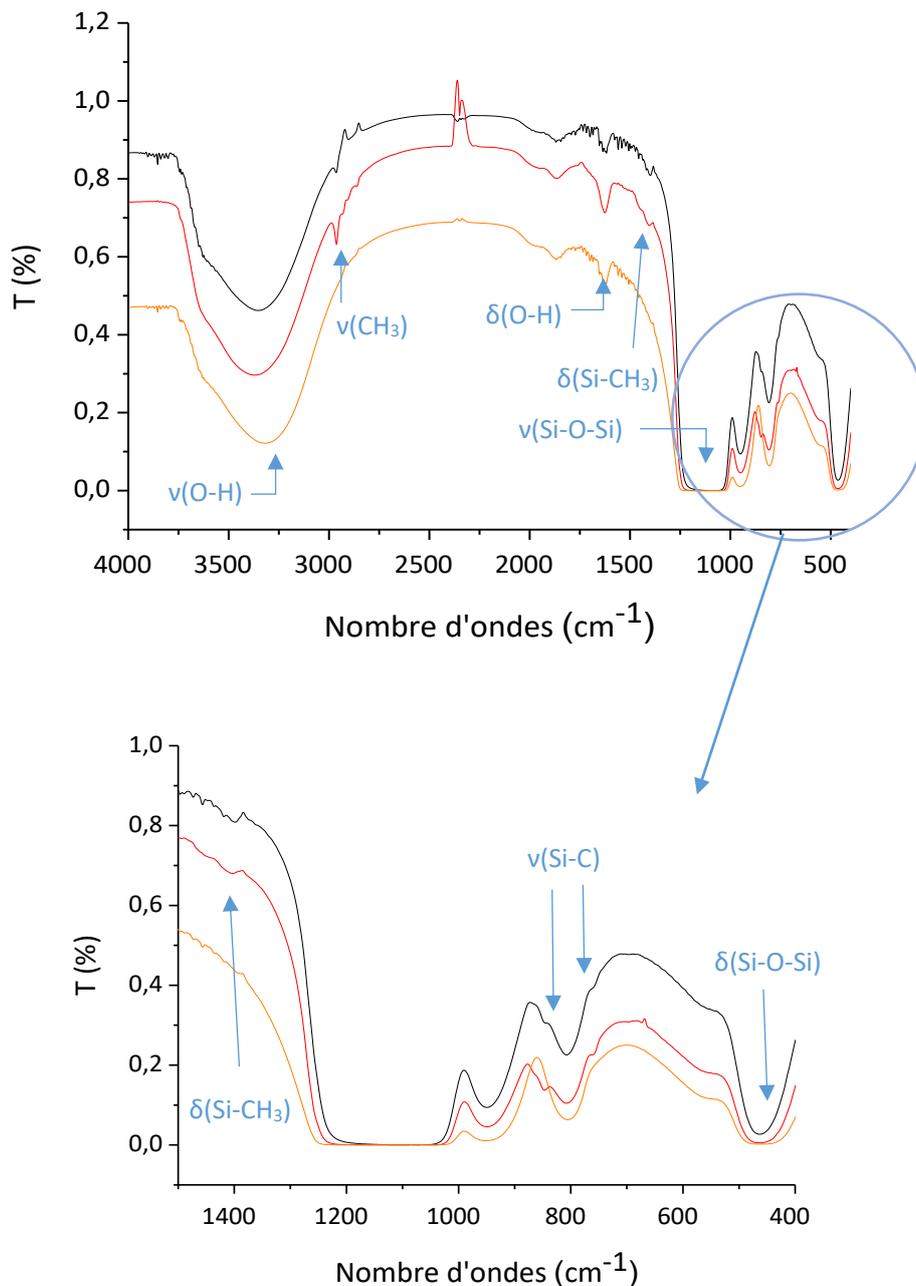


Figure 92: Analyses IR-TF des matériaux silylés MCF2-Tis1 et MCF2-Tis2 ainsi que du matériau non silylé MCF2-Ti

L'analyse RMN-MAS du silicium permet également d'appuyer ces observations. La Figure 93 ci-dessous présente le spectre RMN-MAS du ^{29}Si pour l'échantillon MCF2-Tis2.

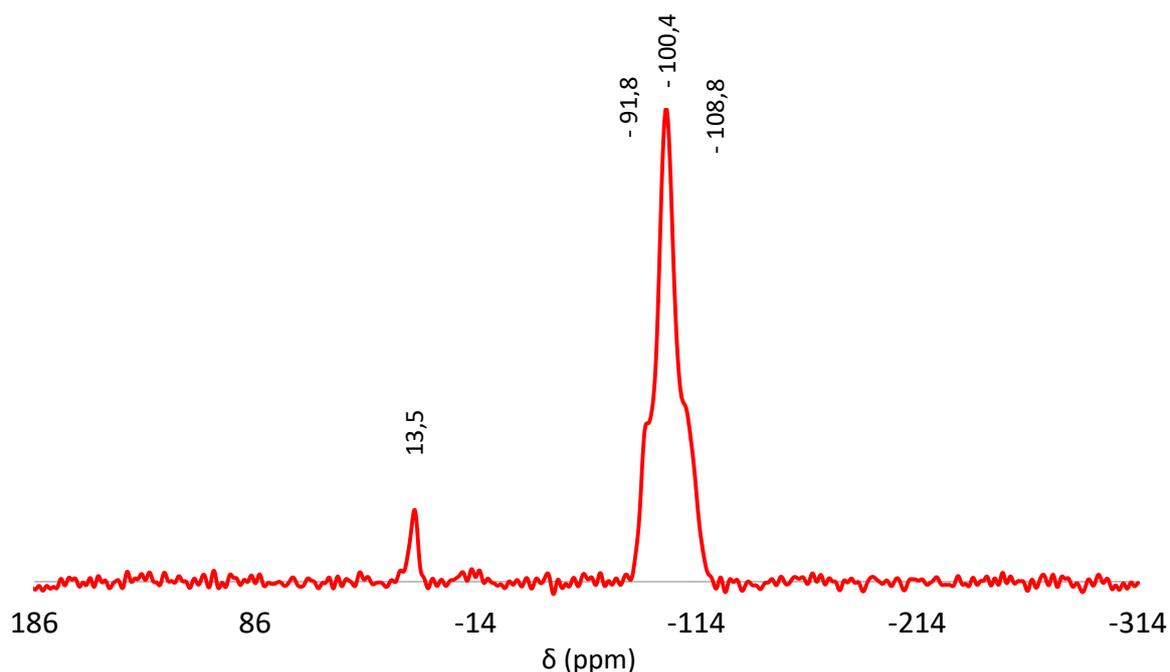


Figure 93: RMN-MAS du ^{29}Si pour l'échantillon à l'état solide **MCF2-Tis2**

Il est possible de distinguer deux pics : un singulet à environ + 13,5 ppm et un triplet situé à plus faible déplacement chimique centré sur - 100,4 ppm. Le triplet est caractéristique des atomes de Si composant les matériaux silicieux mésoporeux [46, 47]. Le pic à - 108,8 ppm correspond à $\text{Si}(\text{OSi})_4$ (et correspond aux espèces Q^4), le pic à - 100,4 ppm correspond à $\text{HO-Si}(\text{OSi})_3$ ou Q^3 et celui à - 91,8 ppm est caractéristique de la présence des espèces Q^2 ou $(\text{HO})_2\text{Si}(\text{OSi})_2$. La littérature montre que le singulet est caractéristique des atomes de Si des groupements $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ et caractéristique de la liaison $-(\text{SiO})-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ [42, 47-50] témoignant ainsi de la présence des groupements $-\text{CH}_3$ après le traitement de silylation.

Puis, des analyses de sorption d'azote ont permis de connaître l'évolution des paramètres texturaux après silylation et notamment la taille des cellules et des fenêtres, afin d'évaluer la faisabilité de l'insertion de la GOx à l'intérieur des cellules du matériau silylé. La figure 94 présente la superposition des hystérésis d'adsorption-désorption des matériaux MCF2, MCF2-Ti et MCF2-Tis2. Le tableau 9 quant à lui résume les paramètres texturaux de ces matériaux.

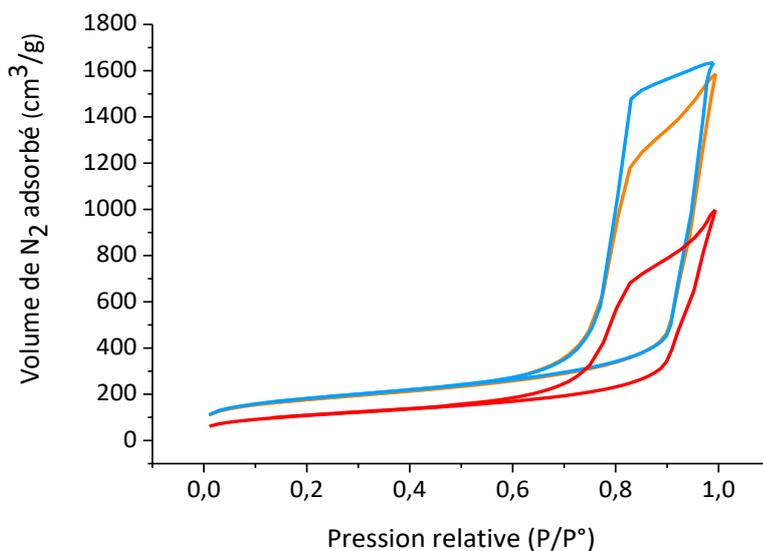


Figure 94 : Isothermes d'adsorption/désorption d'azote de **MCF2-Tis2**, **MCF2-Ti** et **MCF2**

Au vu de la Figure 94 et du Tableau 9, on constate que la surface spécifique et la porosité diminuent globalement d'un facteur 2, entre le matériau silylé et le matériau titané de départ. Le diamètre des cellules diminue également, mais de manière moins prononcée (environ $8 \pm 0,3$ nm), tandis que la taille des fenêtres reste constante. Rappelons que les dimensions de la GOx sont $6,0 \times 5,2 \times 7,7$ nm³. Son immobilisation à l'intérieur des pores du matériau silylé semble donc possible, mais cependant plus difficile, d'autant plus qu'à ce stade d'élaboration du matériau, une étape de fonctionnalisation de la surface par des groupements aminopropyle reste à effectuer.

Tableau 9: Paramètres structuraux des matériaux MCF2, MCF2-Ti et MCF2-Tis2

Support	S_{BET} (m ² /g)	$\varnothing_{cellule}$ (nm)	$\varnothing_{fen\hat{e}tre}$ (nm)	V_{pore} (cm ³ /g)
MCF2	640 ± 27	$35,4 \pm 0,6$	$11,7 \pm 1,6$	$2,4 \pm 0,3$
MCF2-Ti	619 ± 81	$37,1 \pm 0,3$	$11,6 \pm 1,4$	$2,0 \pm 0,3$
MCF2-Tis2	377	29,1	11,7	1,3

Les coefficients C_{BET} des matériaux sont présentés dans le Tableau 10. Ce coefficient est caractéristique de la force d'interaction entre N₂ et le matériau. En fait, la constante C_{BET} évalue l'énergie d'adsorption ($\Delta H_1 - \Delta H_L \cong RT \ln C_{BET}$) et la polarité de surface [51]. Bien que l'interprétation de cette constante présente des limites, principalement dues à la nature approximative du modèle BET, il est généralement admis que cette approche qualitative est tout à fait valide et utilisable pour caractériser des silices fonctionnalisées au sein d'une série de matériaux homologues [9]. Plus la valeur de C_{BET} est élevée et plus le matériau hydrophile. Ce coefficient diminue avec les étapes de titanation et silylation, témoignant de l'augmentation du caractère hydrophobe du support.

Tableau 10 : Evolution du coefficient C_{BET} représentatif du caractère hydrophobe des matériaux MCF2, MCF2-Ti et MCF2-Tis2

Matériau	Coefficient C_{BET}
MCF2	429
MCF2-Ti	324
MCF2-Tis2	100

La modification du caractère hydrophobe du matériau, après silylation a également été évaluée par analyses TG après avoir placé l'échantillon de départ MCF2-Ti et MCF2-Tis2 dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau (Figure 95).

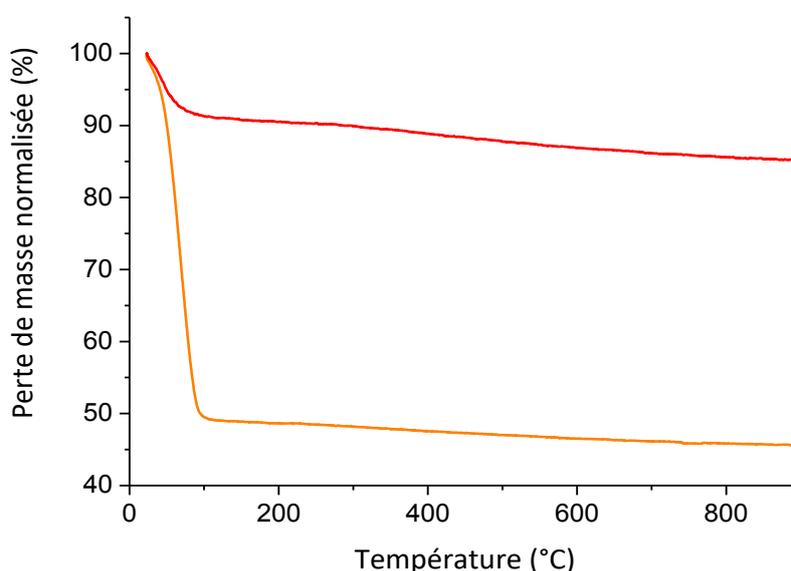


Figure 95: Comparaison de la perte de masse en eau entre MCF2-Ti et MCF2-Ti-s2. Mesures effectuées de 24 à 900°C, sous 100 mL/min d'air avec une rampe en température de 10°C/min

On observe une variation de masse caractéristique de la perte d'eau entre 24 et 100°C. Celle-ci est beaucoup plus importante pour MCF2-Ti (51%) que pour son analogue silylé (9%). Ce dernier matériau adsorbe donc 5 fois moins d'eau que le matériau titané de départ, preuve du greffage des groupements hydrophobes -Si (CH₃)₃ en surface. Le Tableau 11, ci-dessous, rapporte les quantités de H₂O à la surface de chacun des matériaux.

Tableau 11 : Comparaison des quantités d'eau adsorbée sur MCF2-Ti et MCF2-Tis2 après une semaine sous atmosphère humide

Catalyseur	$\mu\text{mol de H}_2\text{O/m}^2$
MCF-Ti	42,2
MCF2-Tis2	7,4

Finalement, des matériaux plus hydrophobes ont été obtenus en utilisant deux agents de silylation différents (CTMS et HMDS). Le greffage a été confirmé par plusieurs techniques permettant

de témoigner directement de la présence des groupements caractéristiques $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, ou indirectement, par le biais d'un caractère hydrophobe plus marqué. Les mesures d'ATG montrent que le taux de silylation du matériau est plus important pour des quantités d'agent de silylation de départ (CTMS) plus faibles.

2.1.4. Amination des supports

2.1.4.1. Sur supports siliciques

Certaines parties de ce chapitre, dont ce paragraphe, sont issues de travaux valorisés par une publication en 2016 [52]. L'autre partie des travaux publiés est présentée au paragraphe 2.2 et concerne l'immobilisation de la GOx. La partie Materials & Methods a été présentée dans ce manuscrit en français et n'est donc pas reprise. L'intégralité de la publication est disponible à la fin de ce manuscrit. Les parties en français ont été ajoutées après publication afin de compléter l'étude.

Post-synthesis modification of SBA-15 or MCF silica was then performed using the reaction of APTES with their silanol groups thus allowing the preparation of SBA-15-NH₂, MCF1-NH₂ and MCF2-NH₂ [53]. The presence of the aminopropyl functions on the surface of the supports will allow the subsequent covalent grafting of GOx through the formation of an amide bond between the amine functions and the external carboxylic groups of the enzyme. Figure 96, FTIR spectra of SBA-15-NH₂, MCF1-NH₂ and MCF2-NH₂ samples showed N-H stretching and N-H deformation bands at 3,400 cm⁻¹ and 1,600 cm⁻¹, respectively.

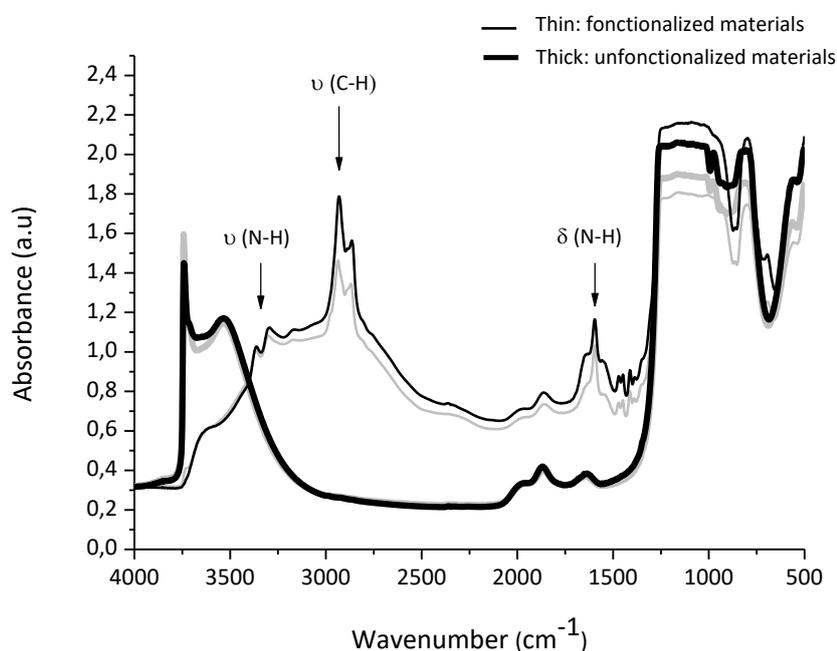


Figure 96: FTIR spectra: SBA-15 (grey) and MCF2 (black). Thin line: After functionalization with $-\text{NH}_2$. Samples are prepared with a 1:4.25 APTES:TEOS molar ratio (self-supporting pellet analysis c.a. 10 mg, 1 cm diameter, after a treatment at 50°C under vacuum at 1 mTorr)

These results thus, indicate the presence of amine groups on SBA-15 and MCF materials whose surface densities (Tableau 12) were calculated from TG analysis (Figure 97).

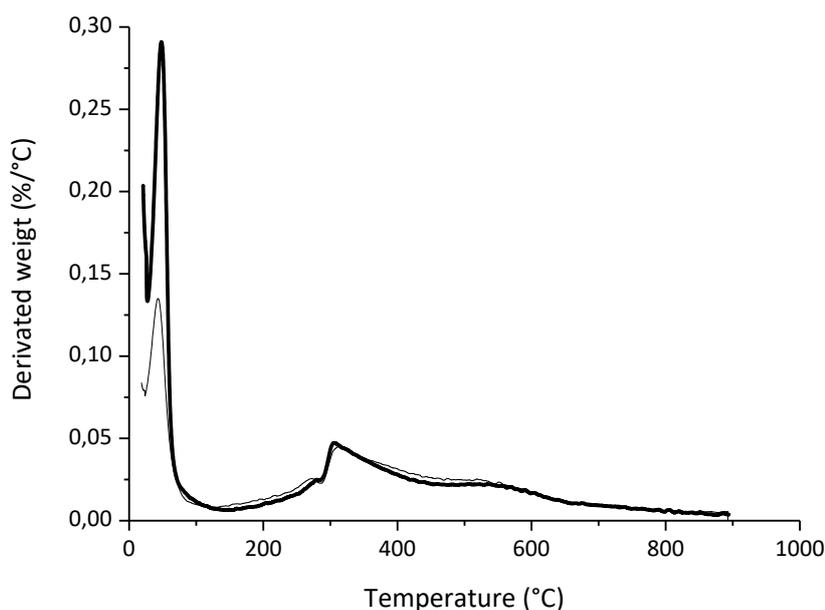


Figure 97: TG analysis of SBA-15-NH₂ (thin) and MCF2-NH₂ (thick) prepared with a 1:4.25 APTES:TEOS molar ratio (analysis carried out from 24 to 900°C, under 100 mL/min of air with a ramp rate of 10°C/min).

The amount of grafted APTES increased from 1.65 mmol to 2.06 mmol for SBA-15 and MCF2 respectively, leading to a much higher density of the amino groups for MCF2, as a consequence of the lower surface area of the latter support. With an amine surface density of 1.9 ± 0.6 molecules per nm² and supposing that each aminopropyl chain is grafted via at least two Si-O-Si bonds, half of the available silanol groups on the MCF2 surface would have reacted.

Tableau 12: Quantification of the -NH₂ groups on the surface of SBA-15-NH₂, MCF1-NH₂ and MCF2-NH₂.

Support	Weight loss ^a (%)	-NH ₂ loaded (mmol/g)	S _{BET} (m ² /g)	-NH ₂ density (/nm ²)
SBA-15-NH ₂	17.3	1.65	904	1.1 ± 0.2
MCF1-NH ₂	19.5	1.86	810	1.4 ± 0.4
MCF2-NH ₂	21.3	2.06	639	1.9 ± 0.6

^a Calculated from TGA measurements between 100°C and 900°C. These values were corrected by the weight loss of the non-grafted material (4%).

Des mesures XPS sur ces trois supports ont permis de mettre en évidence la fonctionnalisation du matériau de façon simple (Tableau 13). En effet, la présence de carbone et de l'azote ne peut résulter que du greffage de l'APTES, puisque le matériau MCF ou SBA-15 de départ n'en contenait pas. La comparaison des rapports N/Si et C/Si sur ces trois matériaux permet d'établir que le taux de fonctionnalisation croit dans l'ordre : SBA-15 < MCF1 < MCF2, en accord avec les résultats du Tableau 12 obtenus par analyses TG. Toutefois, il est à noter que le rapport N/Si est deux fois plus élevé pour MCF2 que pour SBA-15, alors que l'augmentation de masse déduite par l'ATG n'atteignait pas cette proportion.

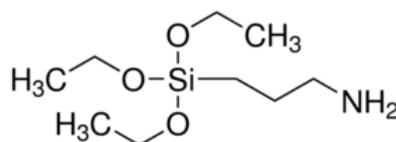


Figure 98: APTES

Pour les trois matériaux SBA-15, MCF1 et MCF2, les valeurs des rapports C/N sont proches de 5, ce qui indique que les groupements aminopropyle sont en moyenne greffés à la silice par deux ponts Si-O-Si. La comparaison des rapports N/Si entre les trois solides est *a priori* le meilleur outil pour vérifier l'efficacité du greffage.

Tableau 13 : Rapports atomiques N / Si, C / Si et C / N obtenus à partir des spectres XPS de SBA-15, MCF1 et MCF2

Support	N/Si	C/Si	C/N
SBA-15-NH ₂	0,13	0,61	4,5
MCF1-NH ₂	0,14	0,73	5,1
MCF2-NH ₂	0,27	0,89	5,7

L'évolution des paramètres texturaux de MCF2 après amination est présentée dans la partie qui suit.

2.1.4.2. Sur MCF2-Ti

Le matériau MCF2-Ti-NH₂ résultant de la fonctionnalisation de MCF2-Ti par des groupements aminopropyle a été caractérisé à l'aide de mesures de sorption d'azote, de thermogravimétrie et de fluorescence X.

La superposition des isothermes de sorption d'azote de MCF2-NH₂, MCF2-Ti et MCF2-Ti-NH₂ est présentée Figure 99 et les paramètres texturaux sont réunis dans le Tableau 14.

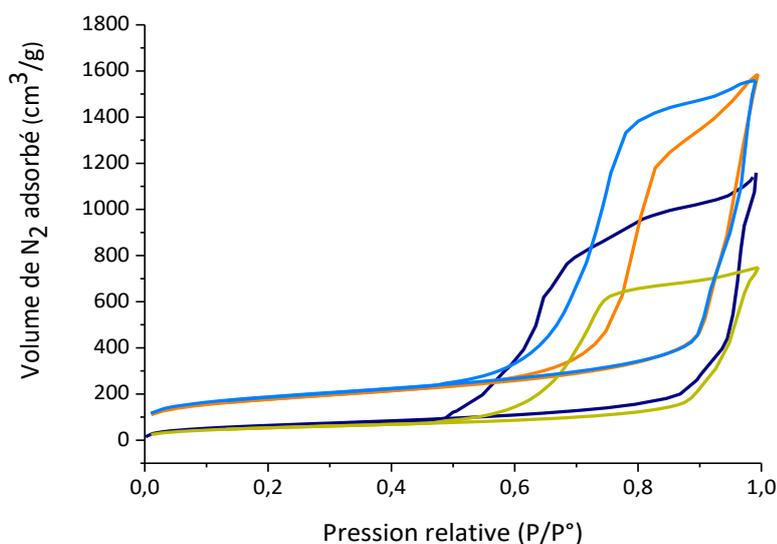
Figure 99: Isothermes d'adsorption/désorption d'azote de MCF2, MCF2-NH₂, MCF2-Ti et MCF2-Ti-NH₂

Tableau 14 : Paramètres texturaux des matériaux MCF2, MCF2-NH₂, MCF2-Ti et MCF2-Ti-NH₂

Support	S_{BET} (m ² /g)	$\varnothing_{cellule}$ (nm)	$\varnothing_{fen\hat{e}tre}$ (nm)	V_{pore} (cm ³ /g)
MCF2	640 ± 27	35,4 ± 0,6	11,7 ± 1,6	2,4 ± 0,3
MCF2-NH ₂	233	46,5 ¹⁷	6,5	0,6
MCF2-Ti	619 ± 81	37,1 ± 0,3	11,6 ± 1,4	2 ± 0,3
MCF2-Ti-NH ₂	197	37,5	8,6	1,0

Les isothermes de MCF-NH₂ et MCF-Ti-NH₂ restent caractéristiques de matériaux mésoporeux (isothermes de type IV et hystérésis de type H1). D'après les courbes et les valeurs du tableau, les paramètres les plus impactés par l'étape d'amination sont la surface spécifique, la taille des fenêtres et la porosité. La diminution de la surface spécifique pour MCF2-NH₂ et MCF2-Ti-NH₂ peut s'expliquer en partie par le blocage de l'entrée de certains pores [54, 55]. A noter que la surface spécifique n'est qu'indicative dans la mesure où les surfaces des matériaux sont fonctionnalisées par des groupements organiques qui peuvent affecter l'interaction de N₂ avec la silice. Malgré une diminution de la taille des fenêtres, celles-ci sont encore de l'ordre de grandeur de la taille de la GOx et les cellules suffisamment grandes pour son introduction dans ces matériaux.

Les mesures ATG, présentées Figure 100 ont montré que la quantité de -NH₂ greffée par nm² sur MCF2-Ti était similaire à celle greffée sur MCF2: 1,79 -NH₂/nm² et 1,9 -NH₂/nm² respectivement. La présence de Ti n'a donc aucune incidence sur le rendement de greffage des fonctions amine à la surface du matériau MCF.

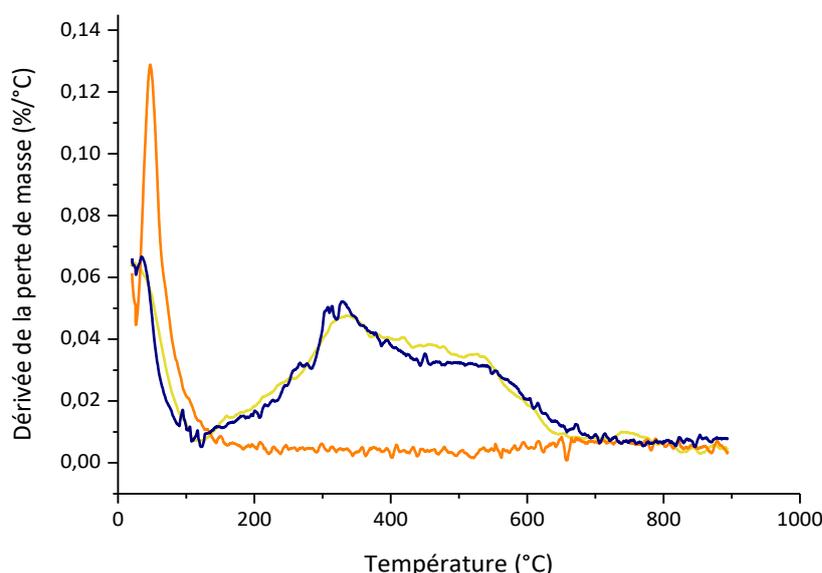


Figure 100: Dérivées de la perte de masse obtenues par ATG pour les matériaux MCF-Ti, MCF-NH₂ et MCF-Ti-NH₂, effectuées de 24 à 900°C, sous 100 mL/min d'air avec une rampe en température de 10°C/min

Outre l'eau jusqu'à 100°C, la perte de masse des deux matériaux MCF-NH₂ et MCF-Ti-NH₂ s'effectue entre 120 et 700°C. Les groupements en surface se dégradent de la même manière au vu des profils

¹⁷ L'agrandissement des cellules perceptible peut être lié à une moindre résistance de la silice MCF2, comparée à MCF2-Ti vis-à-vis de l'amine basique dans le toluène à reflux, entraînant une dégradation partielle de la porosité

de dérivés quasi identiques. Ainsi, on peut en conclure que les sites métalliques greffés n'exercent aucun rôle catalytique dans la dégradation des fonctions amine.

D'autre part, il a été vérifié par des mesures de fluorescence X que la quantité de Ti était constante sur MCF2-Ti avant et après amination. Le métal n'a donc pas été lessivé lors de l'étape de fonctionnalisation avec l'APTES dans le toluène.

2.2. Immobilisation de la GOx sur un matériau silicique

Avant d'immobiliser la GOx sur le support contenant le catalyseur inorganique, le greffage de l'enzyme sur un support silicique sans titane a été réalisé afin d'étudier le comportement de l'enzyme dans des conditions de température et de nature de solvant proches de celles qui seront utilisées lors de l'époxydation.

2.2.1. GOx immobilization

Two methods were used to immobilize glucose oxidase: physical adsorption and covalent grafting. They were then compared in terms of efficiency, i.e amount of bound active enzyme and stability.

2.2.1.1. Adsorption

Adsorption of GOx on functionalized MCF2-NH₂ was performed in 100 mM acetate buffer at pH = 6, at room temperature. As expected, the more GOx in the supernatant, the more active enzyme was adsorbed on the porous support [56, 57]. These experimental data could be accurately described according to a Langmuir model (Figure 101).

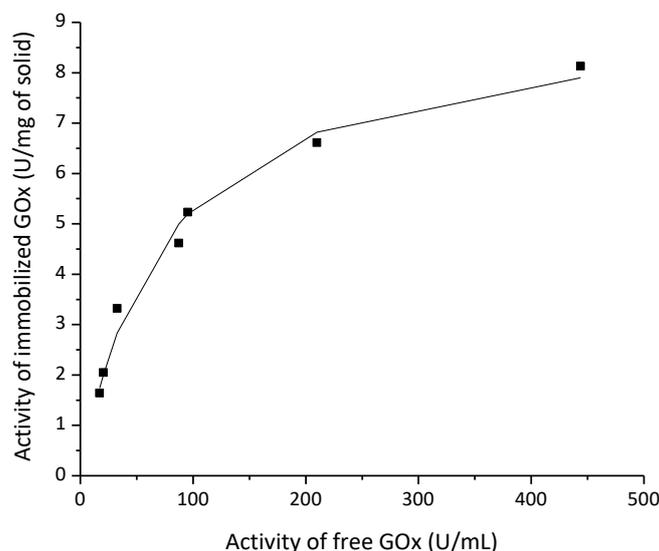


Figure 101: Adsorption isotherm of GOx on MCF2-NH₂. Experimental (square) and calculated (line) data. The fitted Langmuir parameters ($y = \frac{(a/b)*x}{1 + x/b}$) are $a = 9.2 \pm 0.4$ U/mg and $b = 73.8 \pm 9.7$ U/mL. 20 mg of solid was suspended in 25 mL 100 mM acetate buffer pH = 6 at room temperature

From fitting of the experimental data, it could be calculated that the maximum immobilized GOx activity was around 10.4 U/mg of solid. Alternatively, the amount of immobilized enzyme was determined by thermogravimetry (Figure 102).

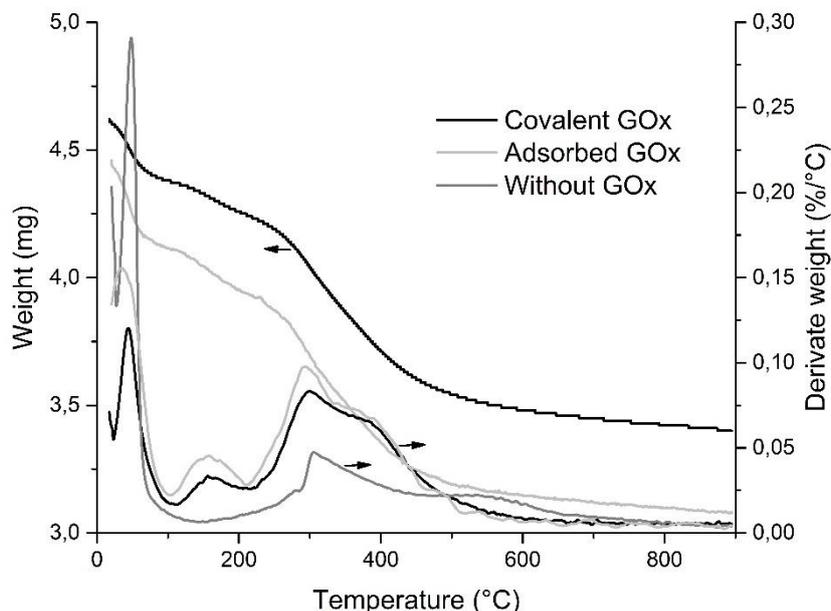


Figure 102: Thermogravimetric analysis of MCF2-NH₂ without GOx (dark grey), with adsorbed GOx (light grey) and with covalently immobilized GOx (black) from 24°C to 900°C, under 100 mL/min of air with a ramp rate of 10°C/min

Analysis of the silica materials functionalized with aminopropyl groups was first performed as a negative control. When increasing the temperature, two successive weight losses corresponding to two maximum values on the derivative weight profile at 50°C and around 320°C were observed. It can be assumed that they result from water loss and combustion of aminopropyl groups of silica surface, respectively. After enzyme adsorption, these two weight variations also took place at the same temperature whereas an additional weight loss event could be noticed around 150°C that could be assigned to the enzyme thermal degradation. This latter weight loss corresponds to 4.2% of the sample initial mass, meaning that 42 µg of GOx was adsorbed on 1 mg of the MCF2-NH₂ support. On the other hand, the supported GOx activity measured from the hydrogen peroxide quantification by spectrophotometry was estimated to 4.5 U per mg of MCF2-NH₂. These activity and amount measurements of adsorbed GOx allows to calculate that the specific activity of immobilized GOx is 107 U/mg. Knowing that the specific activity of free GOx is 120 U/mg, it can thus be deduced that GOx retained about 90 % of its specific activity after adsorption, and consequently, that immobilization induce a significant but limited denaturation of the enzyme. Denaturation was also rather slight in case of covalently immobilization of GOx: the activity of the supported enzyme was 5U/mg of MCF2-NH₂ whereas the amount of immobilized GOx deduced from TGA was 46 µg/mg. The specific activity of covalently immobilized GOx is thus 109 U/mg.

Additionally, it can be deduced from the maximum activity of supported GOx (9.2 U/mg) and the specific activity of the enzyme that the maximal enzyme coverage was 2.6×10^{17} molecules per gram of solid, i.e a surface coverage around $13 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (considering the GOx surface around 50 nm^2) for adsorbed GOx. The total surface of the support being $639 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, GOx thus covered only 2 % of the total available surface. It can also be noticed that the amino group density on the support surface ($2.06 \times 10^3 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ for MCF2-NH₂) is about four orders of magnitude higher than the immobilized protein density ($1.9 \times 10^{-1} \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ for an initial free GOx to MCF2-NH₂ of $2.8 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$), thus excluding an amino group shortage for covalent bonding. The same trend was observed by Zhang *et al.* [58] with

MCF1-NH₂ type silica: the GOx loading was almost five hundred times lower than the amino group density. One explanation could be related to the size of the enzyme whose diffusion inside the pores could be hindered.

In order to check the influence of pH on protein loading, adsorption experiments were performed with MCF2-NH₂ in a pH range from 4 to 8. Figure 103 shows that GOx adsorption increased when increasing pH from 4 to 5 and that a further increase in pH led to a decrease of the activity on the solid. A maximum was observed around pH = 5.

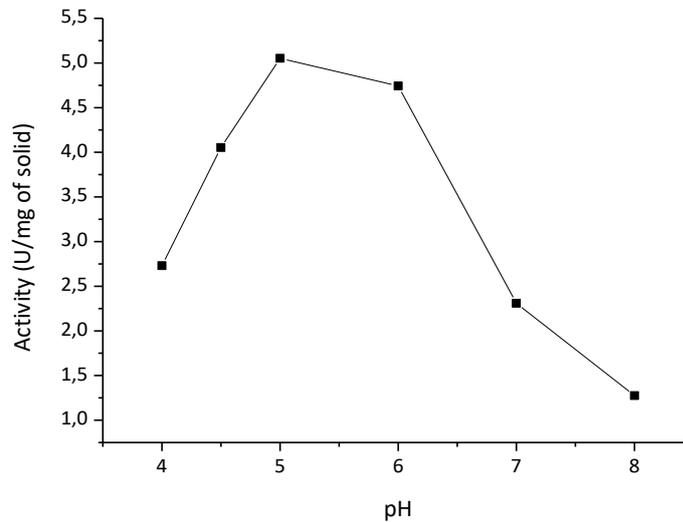


Figure 103 : Influence of pH on GOx adsorption on MCF2-NH₂. (20 mg of solid support was dispersed in 25 mL of GOx (62.5 U/mL) in 100 mM acetate buffer overnight at room temperature)

The overall profile of GOx adsorption as a function of pH can be explained by electrostatic interactions between the protein and the support. According to zeta potential measurements (Figure 104), the PZC of the functionalized solid was estimated around 8.5. Its overall surface charge is positive for pH lower than 8.5 while the enzyme is overall negatively charged at pH above its isoelectrical point, i.e 4.2 [59].

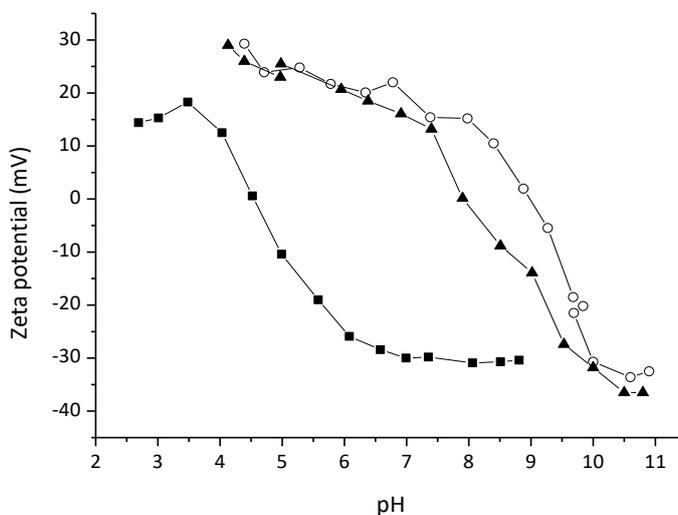


Figure 104: Zeta potential of MCF2 (square) for decreasing pH values and MCF2-NH₂ for increasing (circle) and decreasing (triangle) pH values

The number of negative charges on the enzyme surface even increases when increasing the pH to around 5, i.e until the carboxylic residues on the protein are all deprotonated, leading to a maximal adsorption with the positively charged support. Above this pH, deprotonation of remaining silanol groups (two populations with pKa values of 4.5 and 8.5 [60]) on the surface takes place, thus decreasing the electrostatic interaction strength between the support and the protein, and consequently the protein adsorption decreased. The amount of active GOx immobilized by adsorption thus strongly depends on the supernatant pH, which can lead to the protein leaching when pH is not carefully controlled. On the other hand, one can take advantage of the low adsorption of GOx at high pH to eliminate the enzyme that would not be covalently bonded on the support by washing as described below.

2.2.1.2. Covalent immobilization

GOx was covalently linked to the supports via amide bonds between the amino groups on the solid and the carboxylic acid residues of the protein. An EDC and NHS mixture was used as a coupling agent to activate the carboxylic groups on the enzyme surface. This procedure is widely used to link proteins covalently on siliceous substrates [61] or even for GOx immobilization, for example on modified metallic nanotubes [62]. Figure 105 shows the enzymatic activity of the grafted MCF2-NH₂ solid as a function of the initial ratio of GOx to solid in the presence or not of coupling agents and following two different washing procedures. When the solid was washed at pH = 6, almost no difference was observed between the amount of immobilized active GOx, in the presence or in the absence of coupling agents, except at high initial concentrations of GOx (Figure 105A). For an initial GOx/solid ratio above 30-40 U.mg⁻¹, the amount of immobilized active GOx in the absence of EDC/NHS reached a plateau around 8 U.mg⁻¹, whereas it remained lower than 6 U.mg⁻¹ in the presence of coupling agent. When GOx was only adsorbed, the activity measured on the support fell drastically below 1 U.mg⁻¹ after washing the solid at pH = 8 (Figure 105B).

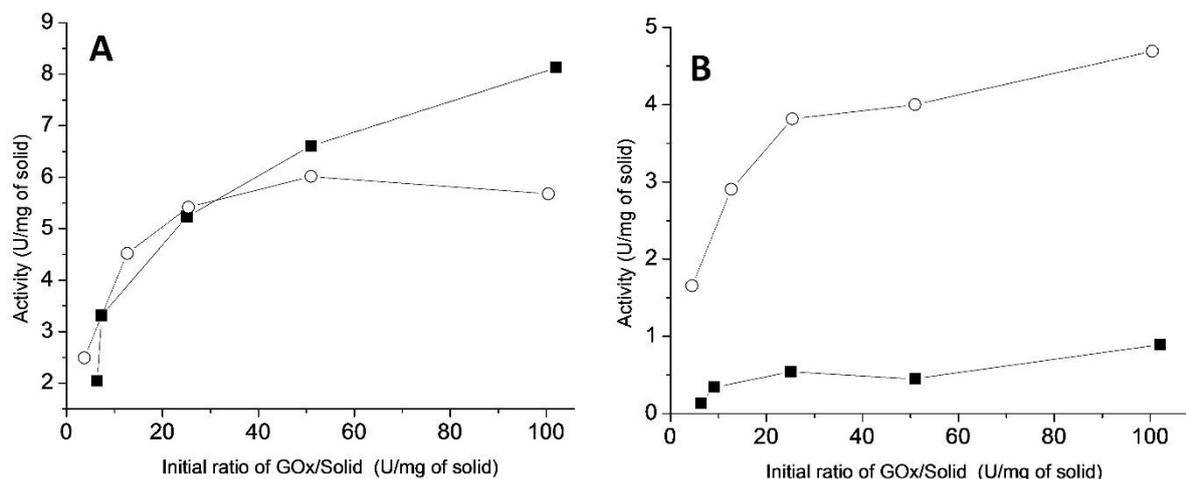


Figure 105: GOx activity on MCF2-NH₂ as a function of the GOx/solid initial ratio, for adsorption (square) and covalent (circle) experiments i.e without and with coupling agent, respectively. After (A): two washes at pH = 6, (B): two additional washes at pH = 8. For the immobilization step, 20 mg of solid was dispersed in 4 mL 10 mM phosphate buffer pH = 6 for adsorption and 4 mL phosphate buffer pH = 7.6 for the covalent grafting step. For the covalent grafting (circle), coupling agents/GOx molar ratio is 800

In the presence of coupling agents, the amount of immobilized active enzyme also decreased compared to that obtained when washing at pH = 6, as a result of the desorption of the non-covalently

bound proteins. However, it remained significantly higher than when GOx was immobilized only by adsorption (c.a. 1 U.mg⁻¹ activity). Out of the total 5 U.mg⁻¹ activity of immobilized protein, it can thus be concluded that around 4 U of GOx can be covalently bound to 1 mg of MCF2-NH₂ when using 100 U.mg⁻¹ of solid as an initial free protein concentration.

Immobilization experiments were carried out for SBA-15-NH₂, MCF1-NH₂ and MCF2-NH₂ in order to further assess the efficiency of protein loading depending on the mesoporous material pore size. Figure 106 clearly demonstrates the influence of the pore size on the protein loading. In the whole range of initial protein concentration studied (0 < initial GOx/solid ratio < 100), SBA-15-NH₂ is the less efficient support. The GOx loading on this support overall increases with initial GOx concentration, but reaches a maximum at 2 U.mg⁻¹.

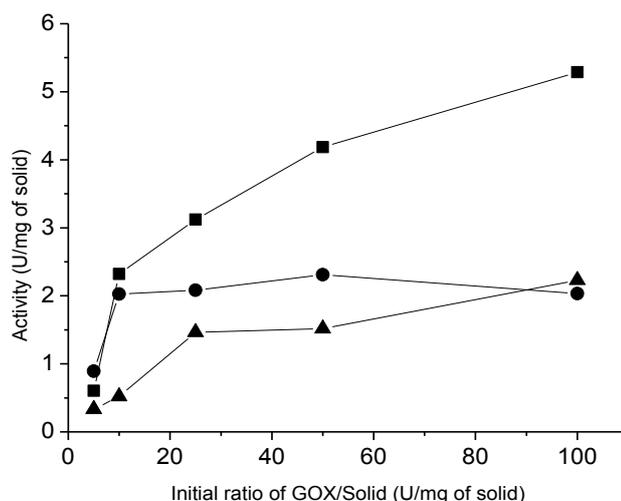


Figure 106: Activity of immobilized GOx as a function of initial GOx/solid molar ratio for three different supports: SBA-15-NH₂ (triangle), MCF1-NH₂ (circle) and MCF2-NH₂ (square). C.A./initial GOx concentrations ratio was 400. EDC and NHS concentrations were identical and ranged between 0.032 and 0.609 mM. 1 mg of solid was suspended in 1.6 mL of phosphate buffer pH = 7.6, for the grafting step. Materials washing after GOx immobilization was performed at pH 8

Comparison between the two mesocellular materials, MCF1-NH₂ and MCF2-NH₂, showed that protein loading was higher for MCF2-NH₂, except at the lowest enzyme concentration. The similar behavior of MCF1-NH₂ and MCF2-NH₂ for initial GOx/solid ratio < 10 could result from the preferential immobilization of the enzyme on the externally addressable surface of the materials in presence of a low GOx concentration. With higher protein concentrations in solution, the protein loading increased for both materials but the activity measured on the support was higher for MCF2-NH₂ than for MCF1-NH₂, 5U/mg and 2 U/mg, respectively. It can be hypothesized that at high initial concentrations of GOx, protein diffusion inside the larger interconnected cells and windows of MCF2-NH₂ is facilitated. Indeed, the pores and the windows sizes of MCF2-NH₂ are larger than the protein, thus allowing a higher protein loading. In contrast, mean pore diameters of both SBA-15-NH₂ and MCF1-NH₂ silica are smaller than the protein, so that GOx cannot be accommodated inside the pores, even as a monomer whose dimensions are 6.0×5.2×3.7 nm³. These results suggest that some GOx could be housed in cells within the MCF2-NH₂ support. Szymańska et al. [63] showed the same trend for invertase covalently immobilized using glutaraldehyde: the protein content was twice as large on MCF as on SBA-15.

The highest activity being measured on MCF2-NH₂, this support is thus likely to be the best candidate for GOx immobilization for hydrogen peroxide production. This catalytic activity of GOx was

assayed by using the rate of hydrogen peroxide production by GOx at saturating concentration of glucose, i.e. 0.5 mol.L⁻¹. The Michaelis Menten constant K_M of the GOx enzyme immobilized on MCF2-NH₂ was determined to further characterize its efficiency. The K_M values for immobilized and free GOx were 28.8 ± 2.8 mM and 29.7 ± 2.8 mM, respectively, in accordance with value reported in the literature for free GOx [59]. The affinity of immobilized GOx for glucose thus remains unchanged after immobilization. One hypothesis could be that the location of the enzyme inside the pores of the support preserves the availability of the enzyme for its substrate and that there is no substrate diffusion limitation.

Des mesures XPS ont été effectuées sur ces mêmes échantillons pour un ratio (GOx/solide) initial de 100. Le tableau ci-dessous montre les rapports atomiques O/Si, C/N, N/Si et C/Si des silices de départ, des silices-NH₂ et après immobilisation de la GOx obtenus.

Tableau 15 : Rapports atomiques O/Si, C/N, N/Si et C/Si des silices de départ, des silices-NH₂ et après immobilisation de la GOx. Les échantillons analysés sont les mêmes que ceux de la Figure 106 pour un rapport initial de GOx / solide = 100

Support	O/Si	C/N	N/Si	C/Si
SBA-15	2,05	/	/	0,08
SBA-15-NH ₂	2,01	4,50	0,13	0,61
SBA-15-NH ₂ -GOx	2,28	7,70	0,18	1,30
MCF1	2,03	/	/	0,11
MCF-1-NH ₂	1,91	5,10	0,14	0,73
MCF1-NH ₂ -GOx	2,31	6,27	0,38	2,38
MCF2	1,76	/	/	0,27
MCF2-NH ₂	1,84	5,70	0,27	0,89
MCF2-NH ₂ -GOx	1,94	6,13	0,17	1,04

Les rapports O/Si des matériaux siliciques et aminés sont proches de 2, comme attendu. Pour tous les matériaux¹⁸, on note une augmentation des rapports C/Si et de N/Si après immobilisation de la GOx comparé à MCF-NH₂, ce qui témoigne de la présence de l'enzyme. On observe également une augmentation du rapport C/N, également compatible avec la présence de GOx sur le solide puisque la GOx est constituée de 3,7 fois plus de carbone que d'azote.

Cependant, le solide SBA-15 est celui présentant le plus d'enzymes alors que les mesures d'activité montrent que la quantité de GOx active est la plus élevée sur MCF-NH₂. Ces données montrent qu'une approche quantitative utilisant des données d'XPS doit rester prudente.

La décomposition des pics de C1s (Figure 107) de MCF2, MCF2-NH₂ et des trois matériaux greffés permet de mettre en évidence une différence significative avant et après greffage de l'enzyme. Pour les solide MCF2 et MCF2-NH₂, les pics C1s se décomposent en trois contributions: les

¹⁸ Dans le cas de MCF-NH₂-GOx le rapport N/Si est le seul à diminuer après immobilisation de la GOx

groupements carboxyliques O-C=O (~ 288,1 eV), les liaisons simples C-N ou C-O (~285,8 eV) et le carbone sp³ (~ 284,5 eV). La présence d'un pic associé aux acides carboxyliques sur MCF2 et MCF2-NH₂ révèle une contamination sans doute due à des résidus de pluronic (le surfactant utilisé lors de la synthèse du matériau) oxydé durant l'étape de calcination et non totalement détruit. Il est également possible d'observer que celui-ci diminue entre MCF2 et MCF2-NH₂, puisque l'ajout d'APTES n'amène pas de groupes carboxyliques supplémentaires mais des C-O, qui viennent diminuer la proportion des O-C=O de départ.

Pour les solides sur lesquels la GOx a été immobilisée, on observe l'apparition d'un pic autour de 287,5 eV caractéristique de carbones impliqués dans une liaison carbonyle ou imine [60, 61], notamment les liaisons amide des protéines. Cette contribution au signal du C1s peut donc être un indice supplémentaire de la présence de la GOx sur le support solide. L'analyse de la proportion du signal « carbonyle » à 287,5 eV au pic total du C1s (Tableau 16) montre que les contributions des groupes carbonyles sont dans l'ordre croissant : MCF2-NH₂-GOx < MCF1-NH₂-GOx < SBA-15-NH₂-GOx avec des valeurs de : 6,2 < 7,15 < 9,09. Or les mesures d'activités sur ces solides montrent un ordre inverse d'activité : MCF2-NH₂-GOx > MCF1-NH₂-GOx > SBA-15-NH₂-GOx, laissant supposer qu'une partie de la GOx immobilisée est dénaturée, ce qui reste à confirmer puisque la confrontation des résultats d'ATG et les mesures d'activité sur la MCF2-NH₂-GOx conduit à un résultat inverse. Toutefois, si on admet que c'est le support MCF2-NH₂-GOx sur lequel a été immobilisée la plus petite quantité d'enzyme, comme c'est aussi le support sur lequel l'activité mesurée est la plus forte, on peut en conclure que le solide MCF2 est celui pour lequel l'enzyme paraît moins dénaturée après immobilisation, ce qui nous conforte dans le choix de ce support pour la suite de l'étude.

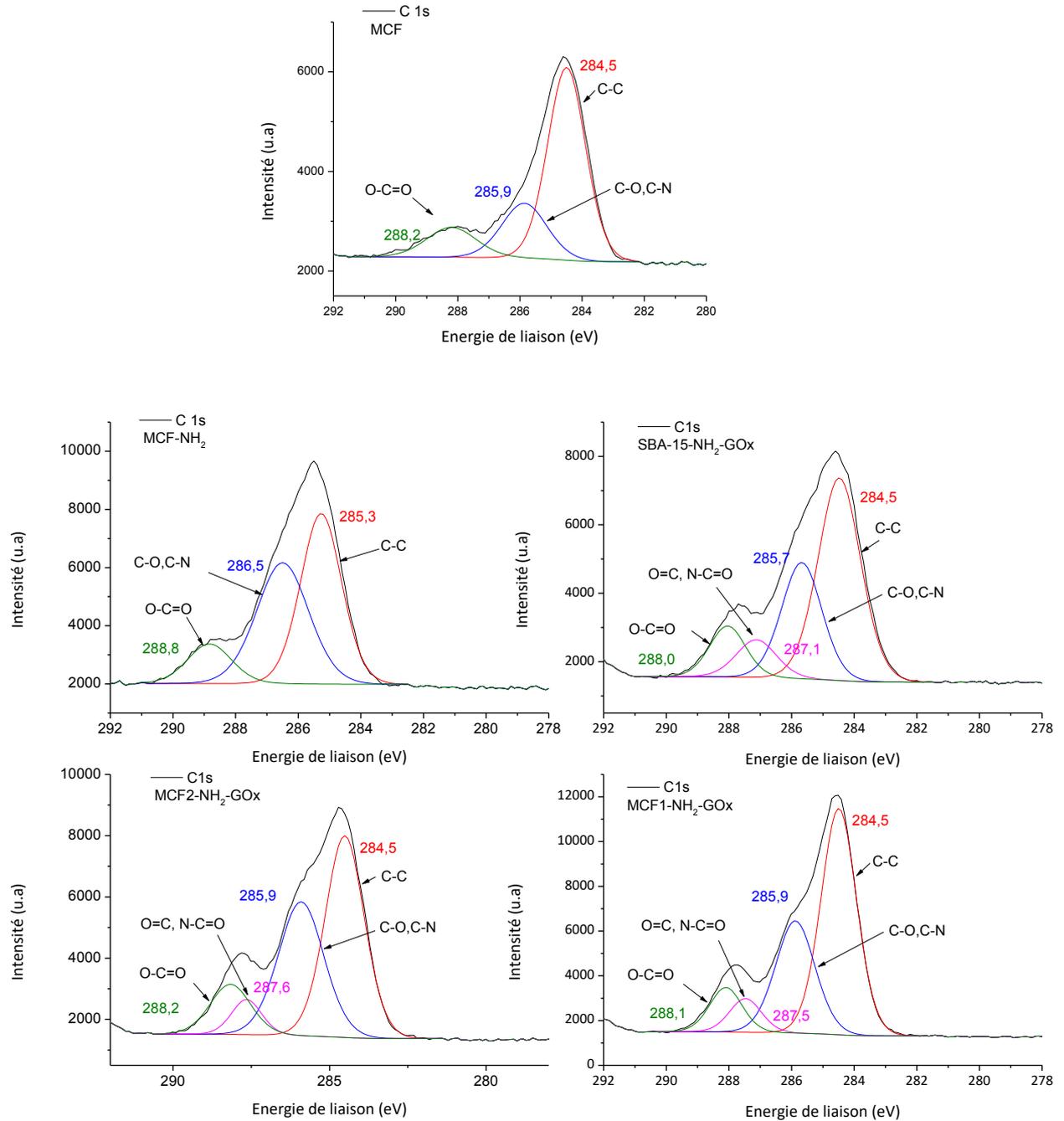


Figure 107: Spectres XPS du C1s des matériaux MCF, MCF2-NH₂, MCF2-NH₂-GOx, MCF1-NH₂-GOx et SBA-15-NH₂-GOx

Tableau 16: % atomiques associés aux aires des contributions O-C=O pour MCF et MCF2-NH₂ et des liaisons carbonyles ou imines pour MCF2-NH₂-GOx, SBA-15-NH₂-GOx et MCF1-NH₂-GOx, associées au pic C1s

Echantillon	Position du pic	%At
MCF2	289	14,02
MCF2-NH ₂	288,7	4,84
MCF2-NH ₂ -GOx	287,65	6,2
SBA15-NH ₂ -GOx	287,13	9,09
MCF1-NH ₂ -GOx	287,47	7,15

Concernant l'immobilisation de la GOx sur le solide MCF2-Ti-NH₂, les activités mesurées pour les différents matériaux élaborés au cours de cette étude sont de l'ordre de 1,5 U/mg, contre 2,5 U/mg en moyenne pour la MCF-NH₂-GOx. Cette plus faible activité, malgré le fait que la quantité d'enzyme initiale lors de l'étape de greffage soit largement en excès comparée à la quantité d'amines sur le solide, est liée aux conditions de greffage sur MCF2-NH₂ et MCF2-Ti-NH₂ légèrement différentes : (GOx/solide)_{initial} = 12 et 4,8 respectivement. Sachant que les rapports molaires A.C./GOx pour ces échantillons sont de l'ordre de 400, ces valeurs d'activités sont en accords avec celles de la Figure 106.

2.2.2. Stability studies of immobilized GOx on MCF2-NH₂

Ti-based catalytic epoxidation of alkenes currently takes place above room temperature and in organic solvents such as methanol or acetonitrile. For these reasons, stability studies of GOx had to be performed up to 50°C and in hydro-organic mixtures.

2.2.2.1. Enzyme thermal stability

The stability of both free and immobilized GOx to denaturation after a short incubation time at a given temperature was investigated. It can be seen from Figure 108A that the enzyme activity remained rather unchanged from 30 to 45°C and then dropped drastically for higher temperatures. The thermal stability of immobilized GOx was only slightly higher than that of the free enzyme. Thus, using short incubation time conditions at a given temperature, it can be concluded that the immobilization of GOx on MCF2-NH₂ does not allow protecting the enzyme from denaturation. However, thermal stability studies involving longer incubation times (Figure 108B) clearly emphasized the advantage of using immobilized GOx. Up to 80% of its initial activity was retained after 44 hours storage at 50°C, whereas the activity of the free enzyme drops quickly to hardly 10% of its initial value. A further 120 h storage period at 9°C showed that the observed partial denaturation at 50°C was not reversible but confirmed the fact that the immobilized enzyme is much more active than the free one.

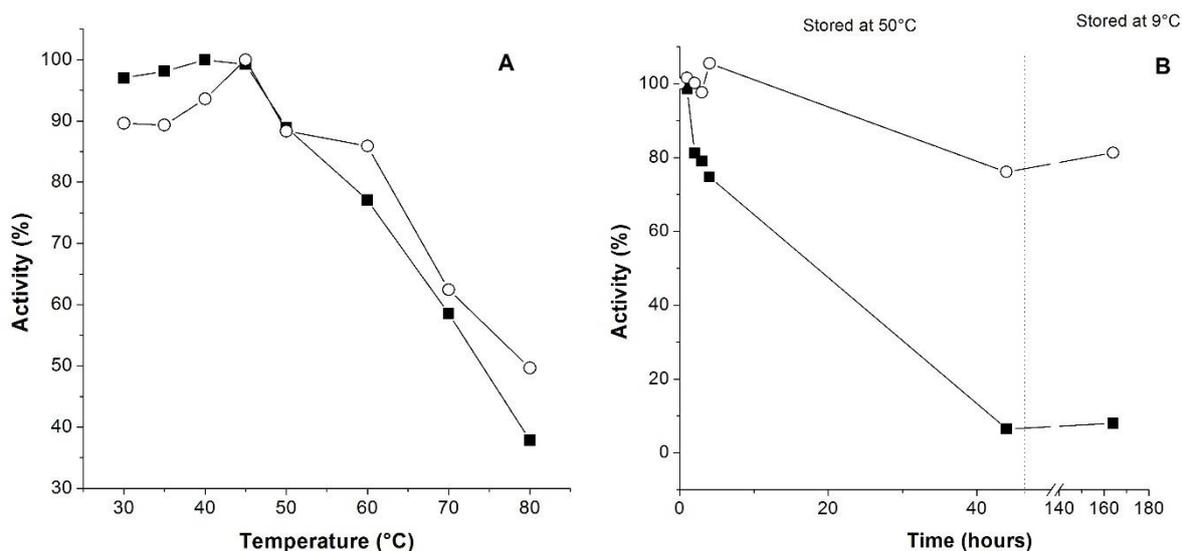


Figure 108: Thermal stability in aqueous media of free (black square) and immobilized GOx on MCF2-NH₂ (white circle). A: Activity after short incubation time B: Activity after storage at 50°C. Solid was suspended in 100 mM acetate buffer (pH 6)

2.2.2.2. Enzyme stability in hydro-organic mixtures

The storage stability of immobilized GOx in the presence of acetonitrile or methanol was studied for 4 h at room temperature (Figure 109A) and 50°C (Figure 109B).

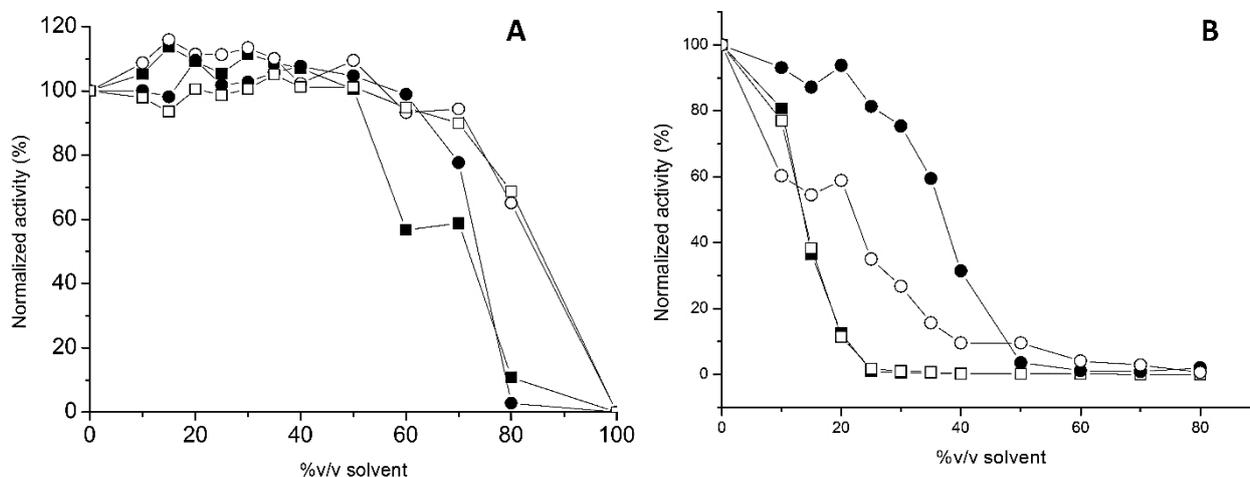


Figure 109: Stability of free (square) or immobilized GOx on MCF2-NH₂ (circle) stored for 4 hours at room temperature (A) or 50°C (B) in the presence of water/CH₃CN (white) and water/MeOH (black) mixtures. Initial C.A./GOx concentrations ratio was 350. Initial glucose and EDC (or NHS) concentrations were 0.5 g/L and 1 mM, respectively, for 20 mg of tested solid

Storage of GOx at room temperature in the presence of these solvents did not show any significant effect regarding activity up to 50% of organic solvent content as can be seen from Figure 109A. For higher percentages, the decrease of activity turned out to be more important in methanol than in acetonitrile: less than 10% of remaining activity compared to 75%, respectively. Moreover, it has to be noted that the activities of immobilized and free GOx in a given solvent (methanol or acetonitrile) were very similar.

On the other hand, storage of GOx at 50°C in the presence of methanol or acetonitrile (Figure 109B) did show important effects on the enzyme behavior. Indeed, for both acetonitrile and methanol, the free enzyme was completely denatured above 20 % of solvent whereas when immobilized, the GOx stability was significantly improved. The stabilization effect however depended on the solvent. In contrast to room temperature experiments, immobilized GOx showed higher activities when the solid was stored in MeOH compared to acetonitrile. Up to 50% v/v of organic solvent, activity of the immobilized protein stored in MeOH medium was up to 4-fold higher than in CH₃CN medium for a given solvent percentage.

Obviously, immobilization on MCF protects the enzyme against solvent induced denaturation, presumably as the result of the reduction of interferences of the organic solvent with hydrogen bonds of the 3D structure of the enzyme. Another explanation of the protein stabilization upon immobilization could be the induced rigidification of its structure, mainly if covalent multipoint attachment is achieved, as reported by Rodrigues *et al.* [64] in their review.

2.2.3. Conclusion

In this study, immobilization of glucose oxidase was compared on amino-functionalized siliceous mesoporous materials with large surface areas and either well-ordered pore channels (SBA-15) or disordered connected meso-cells (MCF). It was shown that MCF with both cells and windows diameters larger than the dimensions of the enzyme led to the immobilization of the highest quantity

of active GOx compared to materials with windows or pore dimensions not large enough to allow protein diffusion inside the material. Immobilization methods based on adsorption or covalent coupling (amide bond) were compared and experimental conditions were controlled to minimize adsorption, mostly by adjusting pH, so that electrostatic interactions between the amino-functionalized support and the protein should be unfavorable. In such conditions, at least 80 % of the immobilized GOx could be covalently grafted on the support, thus reducing the leaching of the protein. The immobilized GOx exhibited a catalytic efficiency similar to that of the free GOx, based on the determination of the Michaelis-Menten constant, K_M . The specific activity of both adsorbed and covalently immobilized GOx calculated from thermogravimetric analysis and activity measurement was only 10 % lower than the one of free GOx, showing that the immobilization process induced only slight denaturation of the enzyme. Despite of this rather low protein loading, the activity of the immobilized enzyme is relevant for biotechnological applications. As an example, a hydrogen peroxide production rate of 0.1 mmol/min can be obtained in acetate buffer with 20 mg of the optimized material (MCF2-NH₂). For the epoxidation application targeted, the stability of covalently immobilized GOx was investigated at 50°C in acetate buffer as well as at 25 or 50°C in acetate buffer/organic solvents mixtures. After 4 hours in acetate buffer at 50°C, immobilized GOx was found to be more stable than its free counterpart (only activity 20% loss compared to 90 %, respectively). The activity loss in such conditions was attributed to the irreversible denaturation of the protein. Both free and immobilized GOx showed a rather good stability after their room temperature incubation in buffer/methanol or acetonitrile mixtures with less than 50 v/v% of organic solvent. For higher solvent percentage values, immobilized GOx turned out to be more stable in the presence of acetonitrile than of methanol at room temperature whereas the opposite result was observed at 50°C. These results pave the way to further experiments coupling enzymatic production of hydrogen peroxide and its subsequent utilization in an environmental friendly oxidation such as epoxidation of bulky alkenes catalyzed by Ti(IV) .

2.3. Essais préliminaires d'époxydation du cyclooctène avec H₂O₂ et MCF2-Ti : évaluation de l'intérêt de la silylation en milieux hydro-organiques à forte teneur en eau

2.3.1. Tests d'époxydation dans différents milieux hydro-organiques MeOH/H₂O avec MCF2-Ti

Le *cis*-cyclooctène utilisé comme molécule modèle n'est pas extrêmement soluble dans H₂O. Les tests préfigurant les essais du tandem de catalyseurs ont donc dû être effectués dans un milieu hydro-organique compatible avec la préservation de l'activité de la GOx (voir 2.2 ci-dessus). Cette dernière affichant une meilleure stabilité dans des milieux MeOH/tampon acétate plutôt que CH₃CN/tampon acétate (cf. 2.2.2.2), l'étude du catalyseur MCF2-Ti a donc été réalisée dans des mélanges de tampon acétate et de méthanol.

Les résultats présentés Figure 110 concernent des tests d'époxydation du *cis*-cyclooctène réalisés à 50°C dans différents mélanges MeOH/tampon acétate (pH = 6, 100 mM) et en introduisant

progressivement l'oxydant (5 mmol de H₂O₂ ajoutées en trois fois à raison d'un ajout par heure, 150 µL puis 150 µL et enfin 200 µL, cf. 1.8.). Les valeurs de sélectivité et conversion ne sont présentées Figure 110 que pour l'essai effectué dans MeOH.

En effet, pour des proportions en tampon acétate comprises entre 0 et 25%, la conversion du cyclooctène semblait rester constante (entre 60 et 70%¹⁹), alors que le rendement et la sélectivité diminuent jusqu'à 3,4% et 5%²⁰ respectivement pour un milieu avec 25% de tampon acétate. En réalité, la disparition du cyclooctène constatée par CPG n'était pas liée à une conversion de l'alcène mais plutôt à sa démixtion du système. Cela a pu être confirmé, notamment grâce à un test témoin effectué sans catalyseur dans un mélange MeOH/tampon acétate (v/v) 75 : 25 qui a conduit à la disparition d'une quantité semblable de cyclooctène sans qu'une réaction n'ait lieu.

Dans le cadre d'une approche rigoureuse utilisant un étalon interne, dans les meilleures conditions (100% MeOH) la sélectivité en époxyde atteint 63%. Cependant aucun produit d'ouverture tel que le 1,2-cyclooctanediol n'est détectable par CPG, dont la colonne apolaire choisie rend difficile la détection de produits tels que le diol. De plus, l'époxyde de cyclooctène plus hydrophile pourrait avoir tendance à s'adsorber en surface du catalyseur, lui-même hydrophile, sous estimant la quantité en solution.

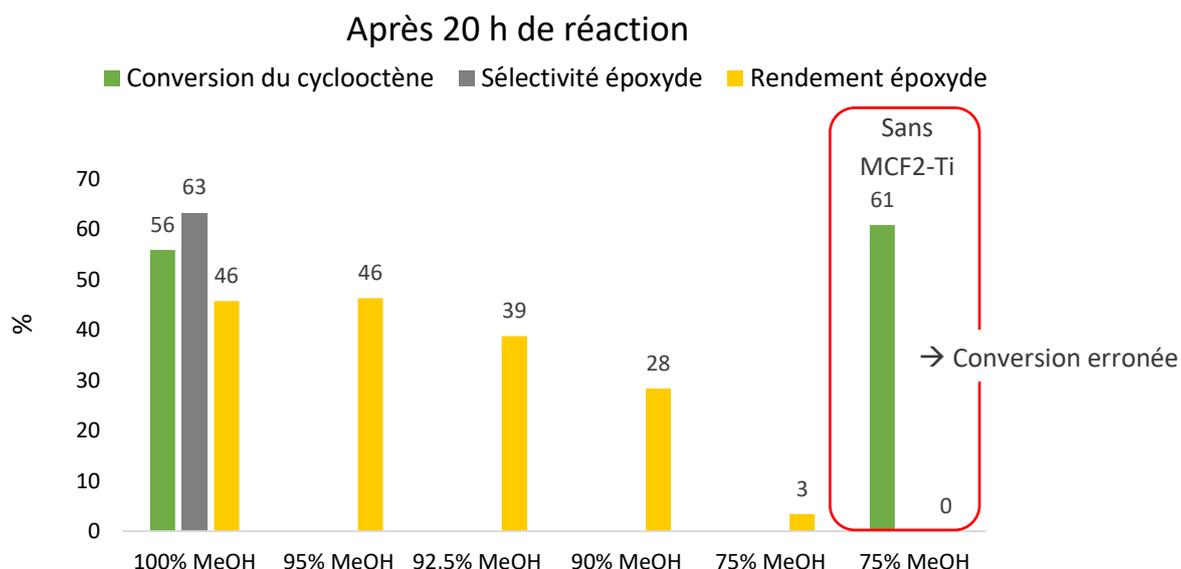


Figure 110: Résultats d'époxydation du cyclooctène (50 mM) en présence de MCF2-Ti (Si/Ti = 21,2) pour Ti/substrat (1 : 130 mol.) dans différents milieux MeOH/tampon acétate (v/v) (20 mL total) et H₂O₂/cyclooctène (5 : 1 mol.), après 20 h de réaction à 50°C

Dans ce qui suit, nous nous focaliserons donc sur les rendements en époxyde (évalués sur la base de la masse de substrat introduite en début de réaction) lesquels sont plus représentatifs de l'avancement de la réaction d'époxydation dans les milieux hydro-alcooliques que les valeurs de conversion. La figure 110 montre que, pour des mélanges comportant plus de 5% (en volume) de tampon acétate, le rendement en époxyde baisse lorsque la proportion de tampon augmente pour atteindre seulement 2 % dans le milieu MeOH/tampon acétate (v/v) 75 : 25. Si l'on s'en réfère à ces

¹⁹ Les barres correspondantes sur le diagramme ont été retirées par choix puisqu'elles correspondent à une conversion faussée.

²⁰ Idem, les barres correspondant à la sélectivité n'ont pas été montrées puisqu'incorrectes car elles s'appuient sur des valeurs de cyclooctène consommé érronées.

résultats, il n'est donc pas envisageable de travailler dans un milieu contenant plus de 25% d'eau si l'on souhaite conserver une bonne réactivité du catalyseur MCF2-Ti vis-à-vis de l'époxydation du cyclooctène.

En plus des problèmes liés à la faible solubilité du substrat, la présence d'eau dans le solvant tend à augmenter encore plus le caractère hydrophile de l'environnement de l'espèce active inorganique (Ti). Cela peut conduire à une diminution de son affinité vis-à-vis de H_2O_2 et donc à un rendement moindre en époxyde, comme cela a été montré dans la littérature pour des catalyseurs mésoporeux [40, 65, 66]. Rappelons pourtant qu'à 50°C et à partir de 50% de MeOH, l'enzyme n'est plus active.

En général, dans les articles mentionnés, l'eau dont il est question est celle qui accompagne l'oxydant introduit et celle formée (1 mol par mol d'époxyde). On comprendra aisément que l'ajout volontaire d'eau dans le milieu, comme nous le pratiquons, n'en sera que plus compliqué. Une solution pour travailler en présence de suffisamment d'eau pour préserver l'activité de l'enzyme tout en dotant le catalyseur inorganique d'un environnement hydrophobe, propice à ce type de catalyse, consiste à rendre la surface du catalyseur inorganique plus hydrophobe, en greffant des groupements $-Si(CH_3)_3$ à la surface du matériau MCF.

2.3.2. Tests d'époxydation en milieux hydro-organiques MeOH/H₂O avec les catalyseurs silylés

Dans la littérature, différents travaux ont rapporté que la silylation de la surface de matériaux titanés conduit à une amélioration de leurs performances catalytiques pour l'époxydation d'alcènes avec H_2O_2 aqueux et notamment la sélectivité en époxyde [42, 43, 67-69]. En effet, rendre la surface du catalyseur plus hydrophobe permet de tenir l'eau produite, lors de la transformation de H_2O_2 , éloignée des sites catalytiques. Ceci permet notamment de réduire la potentielle hydrolyse de l'époxyde, due à une ouverture de cycle catalysée par les sites Ti acides. Une diminution de la formation de diols lors de l'époxydation du cyclohexène a ainsi été mise en avant dans le cas de matériaux mésoporeux de type MCM-41-Ti [67, 68], MCM-48-Ti [42] ou SBA-15-Ti [69] silylés. Un caractère hydrophobe du support plus marqué permet aussi d'optimiser l'adsorption du substrat vs. celle des produits formés au niveau des sites catalytiques [70, 71], notamment en ce qui concerne l'oxydation d'oléfines, pour lesquelles l'époxyde présente une polarité plus importante que le substrat.

Rappelons que trois matériaux silylés (MCF2-Tis1, MCF2-Tis2, MCF2-Tis3) ont été synthétisés avec des quantités de groupements silylés estimées à 0,32, 0,15 et 0,29 mmol de $-Si(CH_3)_3/g$, ce qui correspond à 0,31, 0,15 et 0,28 $-Si(CH_3)_3$ par nm^2 (cf. 2.1.3). Le CTMS a été utilisé comme agent de silylation pour MCF2-Tis1 et MCF2-Tis2 ; le HMDS a été employé pour le troisième (MCF2-Tis3). Dans ce qui suit, nous proposons d'étudier le comportement des matériaux titanés silylés dans deux types de contexte. Dans le premier, la réaction d'époxydation est mise en œuvre dans le méthanol et les seuls apports d'eau sont liés à l'introduction de H_2O_2 aqueux ; dans le second, la même réaction a été réalisée dans MeOH/tampon acétate (v/v) 90 : 10.

La Figure 111 ci-dessous présente les résultats de l'oxydation du cyclooctène en présence de MCF2-Tis3 (silylé avec HMDS) et MCF2-Ti, après 20 h de réaction à 50°C dans du méthanol et en introduisant H_2O_2 en trois ajouts séparés d'une heure chacun.

Après 20 h de réaction

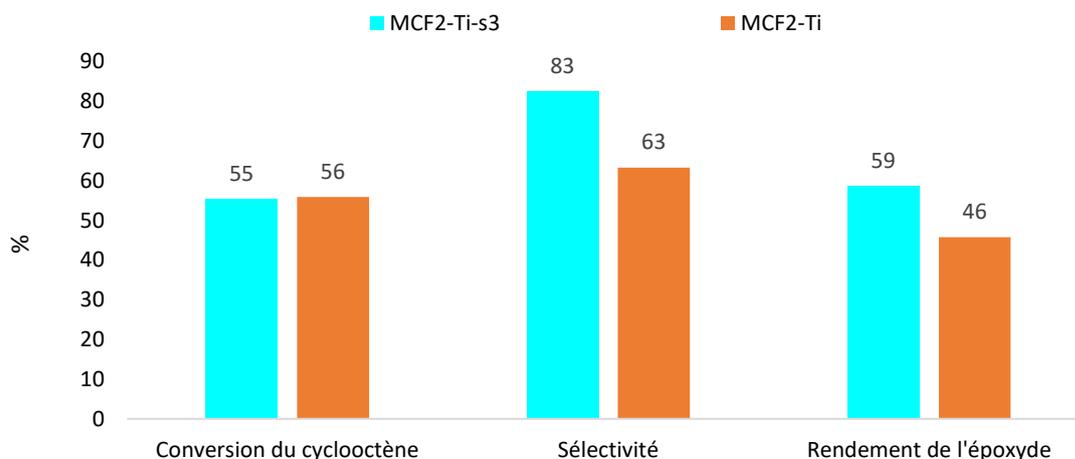


Figure 111: Résultats d'époxydation du cyclooctène 50 mM en présence de MCF2-Ti ou MCF2-Ti-s3 (Si/Ti = 21,2²¹) pour Ti/substrat (1 : 130 mol.) dans MeOH et H₂O₂/cyclooctène (5 : 1 mol.), après 20 h de réaction à 50°C

Alors que les conversions sont identiques pour les deux supports, la sélectivité et le rendement en époxyde sont de 83% et 59% respectivement, en utilisant le catalyseur silylé MCF2-Ti-s3. Cela correspond à une amélioration significative de 32% en sélectivité et 28% en rendement par comparaison au même matériau non silylé. Cette tendance suit donc celle observée dans la littérature. A noter que la valeur un peu plus élevée du rendement par rapport à celle de la conversion en utilisant le matériau silylé est due à l'erreur expérimentale.

L'évolution du rendement et de la sélectivité de l'époxyde au cours de la réaction, pour les deux types de supports, sont présentés Figure 112 ci-dessous.

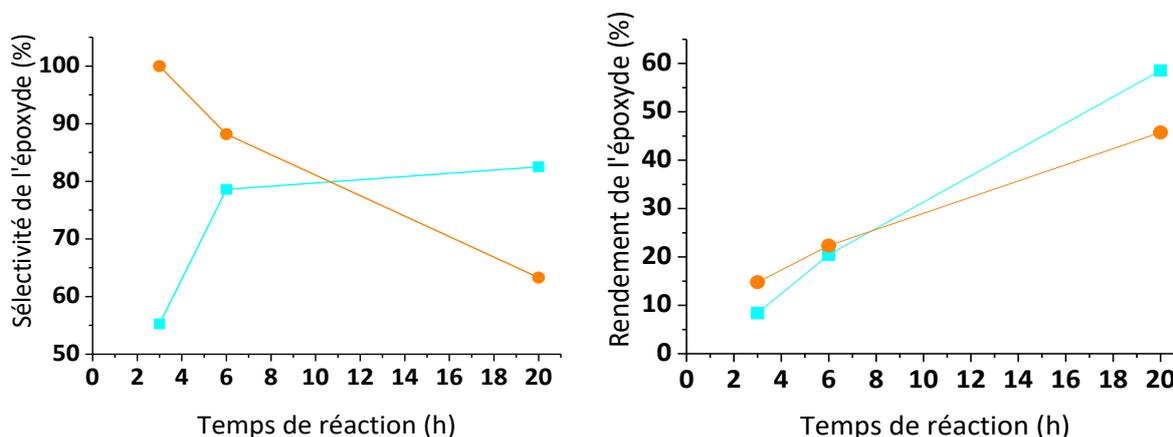


Figure 112: Evolution, sur 20 h de réaction à 50°C, de la sélectivité (à gauche) et du rendement (à droite) en oxyde de cyclooctène lors de l'époxydation du cyclooctène (50 mM) par H₂O₂ dans MeOH en présence de MCF2-Ti ou MCF2-Ti-s3 (Si/Ti = 21,2) pour Ti/substrat (1 : 130 mol.) et H₂O₂/cyclooctène (5 : 1 mol.)

Ces données montrent que l'utilisation d'un matériau silylé permet d'améliorer la sélectivité par rapport à MCF-Ti pour des temps longs (au-dessus de 6 h de réaction), pour lesquels les

²¹ Pour les tests utilisant des matériaux silylés, le rapport Si/Ti est celui correspondant au matériau de départ, les matériaux silylés n'ayant pas été analysés en fluorescence X.

rendements sont les plus élevés. Après 6 h de réaction, les rendements en époxyde obtenus avec les deux matériaux sont similaires, tandis que la sélectivité est supérieure d'environ 10% en utilisant le matériau brut. Cependant, passé ce temps de réaction, les tendances s'inversent. Concernant le matériau MCF-Ti-s3, au départ le substrat a plus d'affinité avec le matériau plus hydrophobe abaissant la concentration en solution, d'où une sous estimation de la sélectivité au temps courts. Au-delà de 20 h de réaction, la sélectivité en oxyde de cyclooctène est largement supérieure en utilisant le matériau silylé, pour un rendement plus élevé à presque 60%, contre 45% pour MCF2-Ti. Entre 3 et 20 h de réaction, on observe une diminution de presque 40% de la sélectivité de la réaction catalysée par MCF2-Ti, qui pourrait être liée à la formation de diol à partir de l'époxyde, elle-même favorisée par l'apparition d'eau issue de la transformation de H₂O₂. Cependant, la présence de diol issu de l'hydrolyse de l'époxyde, via les sites acides titanés, n'a pas pu être détectée par CPG dans nos conditions d'analyse.

Les matériaux MCF2-Ti-s1 (silylé avec CTMS, 0,32 mmol de-Si(CH₃)₃/g par ATG), MCF2-Ti-s3 (silylé avec HMDS, 0,29 mmol de-Si(CH₃)₃/g par ATG) ainsi que MCF2-Ti ont été testés pour catalyser l'époxydation du cyclooctène en milieu hydro-organique avec au maximum 10% de tampon. Les rendements sont présentés Figure 113.

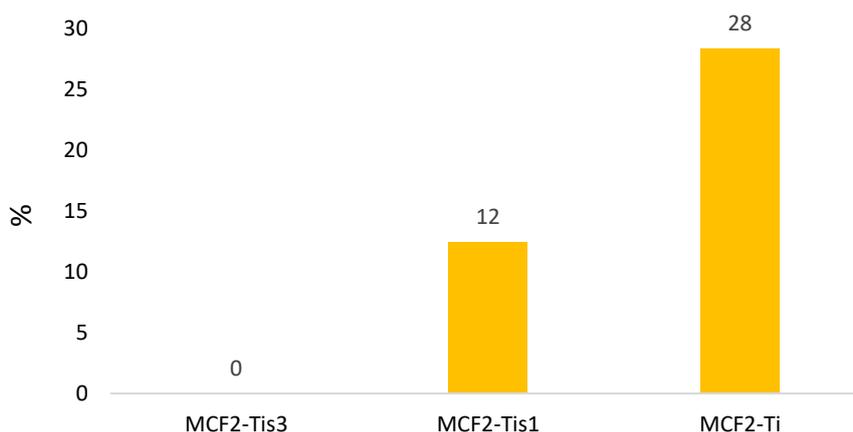


Figure 113: Résultats, après 20 h, pour l'époxydation du cyclooctène (50 mM) par H₂O₂ en présence de MCF2-Ti, MCF2-Ti-s3 ou MCF2-Tis1 (Si/Ti = 21,2) dans MeOH/tampon acétate (v/v) 90 : 10 à 50°C avec Ti/substrat (1 : 130 mol.) et H₂O₂/Cyclooctène (5 : 1 mol.)

Dans ces conditions, le catalyseur silylé avec HMDS n'a présenté aucune activité. La silylation du catalyseur MCF2-Ti avec CTMS n'améliore pas non plus les performances catalytiques, au contraire puisqu'avec MCF2-Tis1, le rendement diminue de 57% comparé à celui obtenu avec le catalyseur titané non silylé MCF2-Ti. Hagen et *al.* [72] ont fait la même observation après silylation d'un matériau Ti-MCM-41, ce dernier n'ayant pas permis d'améliorer l'époxydation du cyclohexène en utilisant H₂O₂ 30% comme oxydant. Selon Corma et *al.* [73], il est nécessaire de dépasser un certain seuil de silylation (au moins 40%) du matériau mésoporeux afin d'obtenir un catalyseur très actif et sélectif pour l'époxydation, ce qui n'est pas notre cas. Une silylation si importante pourrait rendre le greffage de l'enzyme compliqué, dans la mesure où, la disponibilité des sites silanol nécessaires à la fonctionnalisation par l'APTES serait largement diminuée. De plus, rappelons ici que la quantité d'eau présente dans le milieu est largement supérieure à celle des exemples pour lesquels des procédures de silylation ont été appliquées dans la littérature (eau apportée uniquement par H₂O₂), puisque à 50°C, il faut au moins 60% d'H₂O dans le milieu pour préserver 30% de l'activité de l'enzyme et 80%

d'H₂O pour conserver son activité de départ. Dans notre cas, la silylation du matériau n'est donc pas une solution pour améliorer l'activité catalytique dans des milieux hydro-organiques à forte teneur en eau puisque ce test préliminaire (Figure 113) a été effectué à 50°C dans uniquement 10% de tampon et que dans ces conditions l'enzyme n'est pas active. Pour finir, les essais du catalyseur en tandem MCF-Ti-NH₂-GOx seront discutés dans le chapitre qui suit au 2.4.2.

3. Conclusions

Finalement, l'étude effectuée sur l'immobilisation de la glucose oxydase a montré que c'est le matériau de type MCF2-NH₂, synthétisé à l'aide de 4 mmol d'APTES (pour 1 g de silice) qui permet d'immobiliser la plus grande quantité de GOx active comparé aux matériaux SBA-15-NH₂ et MCF1-NH₂ (Tableau 17).

Tableau 17: Récapitulatif des paramètres texturaux des silices SBA-15, MCF-1 et MCF2 et taux de fonctionnalisation par –NH₂ atteints

Support silicique	$\varnothing_{\text{pore}} \text{ ou } \varnothing_{\text{cellule}}$ (nm)	$\varnothing_{\text{fenêtre}}$ (nm)	-NH ₂ (mmol/g)	Densité de -NH ₂ (/nm ²)
SBA-15	5,3	-	1,65	1,05 ± 0,2
MCF1	22,1	5,3	1,86	1,4 ± 0,4
MCF2	34,4 ± 0,6	11,7 ± 1,6	2,06	1,9 ± 0,6

Les dimensions des cellules et fenêtres (Tableau 17) de MCF2 permettent la diffusion des composés de fonctionnalisation, de la protéine et des substrats à l'intérieur du matériau.

Les méthodes d'immobilisation soit par adsorption, soit par couplage covalent (par formation de liaisons amide entre le support fonctionnalisé et l'enzyme) ont été comparées et les conditions expérimentales contrôlées afin de minimiser l'adsorption, principalement par l'ajustement du pH, de sorte que les interactions électrostatiques entre le support -NH₂, et la protéine soient défavorables. Dans de telles conditions, au moins 80% de la GOx immobilisée est greffée de manière covalente sur le support, ce qui réduit le lessivage de la protéine. La GOx immobilisée a présenté une efficacité catalytique similaire à celle de la GOx libre, sur la base de la détermination de la constante de Michaelis-Menten K_M. Les activités spécifiques (U/mg_{GOx}) de la GOx adsorbée ou liée de manière covalente ont été déterminées par thermogravimétrie (obtention de la quantité de GOx immobilisée), couplée aux mesures d'activités (obtention des unités immobilisées). Celles-ci sont seulement 10% plus faibles que celle de la GOx libre (120 U/mg_{GOx}), montrant que le processus d'immobilisation induit seulement une légère dénaturation de l'enzyme. En accord avec les paramètres structuraux des trois silices et la quantité de -NH₂ greffée en surface, la quantité d'enzymes immobilisées (pour un rapport GOx initiale/solide de 100 U/mg_{solide}) est 2,5 fois plus importante sur MCF2-NH₂, avec 5 U/mg_{solide} que sur SBA-15-NH₂ et MCF1-NH₂ présentant une activité sur le solide similaire d'environ 2 U/mg_{solide}.

L'étude a montré que l'enzyme immobilisée de manière covalente est plus stable que l'enzyme libre en solution dans du tampon acétate après 4 h de stockage à 50°C : la perte d'activité est seulement de 20% pour l'enzyme immobilisée contre 90% pour la GOx en solution. Pour l'application en époxydation ciblée, la stabilité de la GOx immobilisée de manière covalente a été étudiée à 25°C ou 50°C dans différents mélanges hydro-organiques (tampon acétate/MeOH ou CH₃CN). La perte

d'activité dans de telles conditions a été attribuée à la dénaturation irréversible de la protéine. La GOx immobilisée montre une activité plus importante dans des mélanges eau/MeOH qu'avec CH₃CN. Cependant à 50°C, son activité devient nulle à partir de 50% de solvant organique.

Concernant le catalyseur inorganique (MCF2-Ti), les différentes caractérisations effectuées montrent que l'espèce active Ti a été introduite majoritairement sous forme tétraédrique et avec une bonne dispersion. Le catalyseur est actif pour l'oxydation du cyclooctène à 50°C dans le méthanol pur (56% de conversion et sélectivité en époxyde de 63%), mais la présence de Ti agit sur l'ouverture de l'époxyde par catalyse acide. L'utilisation d'un mélange hydro-organique, même pour une faible proportion de tampon, influe sur la solubilité du substrat. En outre, la présence d'eau augmente le caractère hydrophile du matériau MCF, ce qui conduit à diminuer l'activité catalytique de Ti. Le rendement d'époxydation passe de 46% dans MeOH à 3% dans MeOH/tampon acétate (v/v) 75 : 25, après 20 h de réaction à 50°C, et après ajout de H₂O₂ commercial. Or dans ces proportions de méthanol, la GOx n'est pas active à cette température, ce qui exclut tout essai de catalyse en tandem enzyme/Ti. L'étape de silylation du catalyseur n'a pas permis d'améliorer l'activité catalytique de Ti en milieu hydro-alcoolique. Les performances de MCF2-Ti sont améliorées uniquement dans le méthanol pur, c'est-à-dire en présence de quantités d'eau introduites avec H₂O₂ et produites en cours de réaction suite à la réduction de ce dernier (Tableau 18).

Tableau 18: Récapitulatif des tests d'époxydation du cyclooctène avec MCF2-Ti et ses dérivés silylés dans un milieu organique ou hydro-organique

<i>MeOH/tampon acétate (v/v)</i>		<i>MCF2-Ti</i>	<i>MCF-2-Ti-s3/1</i>
<i>(100 : 0)</i>	Conv. (%)	56	55
	Sél. (%)	63	83
	Rdt (%)	46	59
<i>(90 : 10)</i>	Rdt (%)	28	12

Augmenter le taux de silylation ne semble cependant pas envisageable si nous souhaitons introduire la GOx à l'intérieur du support. De plus, l'écrantage des sites Ti par les groupements -CH₃ n'est pas à exclure. Les conditions de température et de teneur en eau compatibles avec l'activité enzymatique ne coïncident pas avec celles de l'époxydation avec MCF2-Ti. En effet, les activités de la GOx immobilisée présentées Figure 114 montrent qu'à 50°C, l'activité chute à partir de 25% de MeOH.

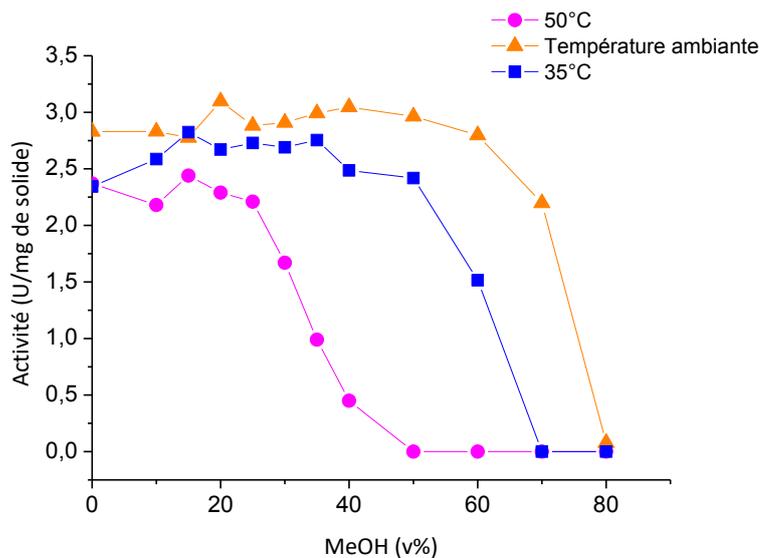


Figure 114: Activité de la GOx immobilisée sur MCF2-NH₂ (A.C./GOx = 350) en fonction de la proportion de MeOH dans le milieu (MeOH/tampon acétate pH=6, 100 mM) pour différentes températures : 50°C, température ambiante et 35°C.

A 35°C, il faut au moins 50% d'eau afin que l'activité de la GOx immobilisée ne s'effondre pas. Le caractère hydrophile du matériau MCF2 empêchant de travailler correctement dans ces conditions, l'utilisation d'un catalyseur plus hydrophobe a donc été envisagée. La partie suivante présente le travail effectué avec la zéolithe TS-1, connue pour fonctionner dans l'eau et avec H₂O₂.

Références :

- [1] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024-6036.
- [2] P. Schmidt-Winkel, W. Lukens, D. Zhao, P. Yang, B. Chmelka, G. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 254-255.
- [3] N. O'Callaghan, J.A. Sullivan, *Appl. Catal., B* 146 (2014) 258-266.
- [4] B.H. Wouters, T. Chen, M. Dewilde, P.J. Grobet, *Microporous Mesoporous Mater.* 44-45 (2001) 453-457.
- [5] S.A. Kozlova, S.D. Kirik, *Microporous Mesoporous Mater.* 133 (2010) 124-133.
- [6] V. Kocherbitov, V. Alfredsson, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 12906-12913.
- [7] L. Wang, R.T. Yang, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 21264-21272.
- [8] F. Bentaleb, O. Makrygenni, D. Brouri, C. Coelho Diogo, A. Mehdi, A. Proust, F. Launay, R. Villanneau, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 7607-7616.
- [9] A.s. Mirabaud, Development of a host-guest chemistry for the valorization of CO₂ through an eco-compatible catalysis, Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015.
- [10] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halend, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373-380.
- [11] W. Lukens, P. Schmidt-Winkel, D. Zhao, J. Feng, G. Stucky, *Langmuir* 15 (1999) 5403-5409.
- [12] P. Schmidt-Winkel, J.W.W. Lukens, P. Yang, D.I. Margolese, J.S. Lettow, J.Y. Ying, G.D. Stucky, *Chem. Mater.* 12 (2000) 686-696.
- [13] J.R. Davis, Z. Liu, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2311-2324.
- [14] J.H. Scofield, *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* 8 (1976) 129-137.
- [15] S.J. Gregg, K.S.W. Sing, Adsorption, surface area, and porosity, Academic Press, 1991.
- [16] A. Grosman, C. Ortega, *Langmuir* 24 (2008) 3977-3986.
- [17] H.J. Hecht, H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* 229 (1993) 153-172.
- [18] A.P.V. Gonçalves, J.M. Lopes, F. Lemos, F. Ramôa Ribeiro, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, M.R. Aires-Barros, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 1 (1996) 53-60.
- [19] M.K. Shelyakina, O.O. Soldatkin, V.M. Arkhypova, B.O. Kasap, B. Akata, S.V. Dzyadevych, *Nanoscale Research Letters* 9 (2014) 1-9.
- [20] P.N.R. Vennestrøm, E. Taarning, C.H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt, J.M. Woodley, *ChemCatChem* 2 (2010) 943-945.
- [21] D. Chandra, N. Kishor Mal, M. Mukherjee, A. Bhaumik, *J. Solid State Chem.* 179 (2006) 1802-1807.
- [22] M. Kang, W.-J. Hong, M.-S. Park, *Applied Catalysis B: Environmental* 53 (2004) 195-205.
- [23] R.J. Davis, Z. Liu, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2311-2324.
- [24] X. Gao, S.R. Bare, J.L.G. Fierro, M.A. Banares, I.E. Wachs, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 5653-5666.
- [25] T. Blasco, M.A. Camblor, A. Corma, J. Pérez-Pariante, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 11806-11813.
- [26] I. Grohmann, W. Pilz, C. Walther, H. Kosslick, V.A. Tuan, *Surf. Interface Anal.* 22 (1994) 403-406.
- [27] X. Gao, S.R. Bare, J.L.G. Fierro, M.A. Banares, I.E. Wachs, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 5653-5666.
- [28] K.-M. Choi, T. Yokoi, T. Tatsumi, K. Kuroda, *J. Mater. Chem. A* 1 (2013) 2485-2494.
- [29] B.J. Aronson, C.F. Blanford, A. Stein, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2842-2851.
- [30] G. Zhang, J. Yi, J. Shim, J. Lee, W. Choi, *Appl. Catal., B* 102 (2011) 132-139.
- [31] J. Sudhakar Reddy, R. Kumar, *J. Catal.* 130 (1991) 440-446.
- [32] O.A. Kholdeeva, I.D. Ivanchikova, M. Guidotti, C. Pirovano, N. Ravasio, M.V. Barmatova, Y.A. Chesalov, *Adv. Synth. Catal.* 351 (2009) 1877-1889.
- [33] L. Marchese, E. Gianotti, V. Dellarocca, T. Maschmeyer, F. Rey, S. Coluccia, J. M. Thomas, *PCCP* 1 (1999) 585-592.
- [34] F. Chiker, J.P. Nogier, F. Launay, J.L. Bonardet, *Appl. Catal., A* 259 (2004) 153-162.
- [35] T.T. Peng Wu, Takayuki Komatsu, Tatsuaki Yashima, *Chem. Mater.* 14 (2002) 1657-1664.
- [36] F. Zhang, X. Carrier, J.-M. Krafft, Y. Yoshimura, J. Blanchard, *New J. Chem.* 34 (2010) 508-516.
- [37] F. Farges, G.E. Brown Jr., J.J. Rehr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter* 56 (1997) 1809-1819.
- [38] S. Bordiga, S. Coluccia, C. Lamberti, L. Marchese, A. Zecchina, F. Boscherini, F. Buffa, F. Genoni, G. Leofanti, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 4125-4132.
- [39] A. Lopez, M.H. Tuilier, J.L. Guth, L. Delmontte, J.M. Popa, *J. Solid State Chem.* 102 (1993) 480-491.
- [40] T. Blasco, A. Corma, M.T. Navarro, J.P. Pariente, *J. Catal.* 156 (1995) 65-74.
- [41] P.B. Sarawade, J.-K. Kim, A. Hilonga, H.T. Kim, *Powder Technol.* 197 (2010) 288-294.
- [42] M.L. Pena, V. Dellarocca, F. Rey, A. Corma, S. Coluccia, L. Marchese, *Microporous Mesoporous Mater.* 44-45 (2001) 345-356.

- [43] M.V. Cagnoli, S.G. Casuscelli, A.M. Alvarez, J.F. Bengoa, N.G. Gallegos, M.E. Crivello, E.R. Herrero, S.G. Marchetti, *Catal. Today* 107-108 (2005) 397-403.
- [44] R. Al-Oweini, H. El-Rassy, *J. Mol. Struct.* 919 (2009) 140-145.
- [45] A. Grill, *Annual Review of Materials Research* 39 (2009) 49-69.
- [46] A. Corma, *Chem. Rev.* 97 (1997) 2373-2420.
- [47] X.S. Zhao, G.Q. Lu, *The Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 1556-1561.
- [48] X.S. Zhao, G.Q. Lu, A.K. Whittaker, G.J. Millar, H.Y. Zhu, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 6525-6531.
- [49] J. Silvestre-Alberó, M.E. Domine, J.L. Jordá, M.T. Navarro, F. Rey, F. Rodríguez-Reinoso, A. Corma, *Appl. Catal., A* 507 (2015) 14-25.
- [50] A. Ungureanu, D. Trong On, E. Dumitriu, S. Kaliaguine, *Appl. Catal., A* 254 (2003) 203-223.
- [51] R. Haul, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 86 (1982) 957-957.
- [52] N. Balistreri, D. Gaboriau, C. Jolival, F. Launay, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 127 (2016) 26-33.
- [53] K.C. Vrancken, K. Possemiers, P. Van Der Voort, E.F. Vansant, *Colloids and Surfaces* 98 (1995) 235-241.
- [54] D. Madden, T. Curtin, *Microporous Mesoporous Mater.* 228 (2016) 310-317.
- [55] K.-C. Kao, C.-H. Lee, T.-S. Lin, C.-Y. Mou, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 4653.
- [56] V. Gascón, C. Márquez-Álvarez, R.M. Blanco, *Appl. Catal., A* 482 (2014) 116-126.
- [57] E. Silva Mojica, M. Lohrasbi, S.S.C. Chuang, *Top. Catal.* 57 (2014) 1490-1497.
- [58] X. Zhang, R.-F. Guan, D.-Q. Wu, K.-Y. Chan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 33 (2005) 43-50.
- [59] C.M. Wong, K.H. Wong, X.D. Chen, *Appl Microbiol Biotechnol* 78 (2008) 927-938.
- [60] A. Rimola, D. Costa, M. Sodupe, J.F. Lambert, P. Ugliengo, *Chem. Rev.* 113 (2013) 4216-4313.
- [61] P. Tengvall, E. Jansson, A. Askendal, P. Thomsen, C. Gretzer, *Colloids Surf., B* 28 (2003) 261-272.
- [62] M. Delvaux, S. Demoustier-Champagne, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 943-951.
- [63] K. Szymańska, J. Bryjak, A.B. Jarzębski, *Top. Catal.* 52 (2009) 1030-1036.
- [64] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *Chem Soc Rev* 42 (2013) 6290-6307.
- [65] J.É. Gallot, S. Kaliaguine, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 76 (1998) 833-852.
- [66] A. Corma, M. Domine, J.A. Gaona, J.L. Jordá, N.M. T., F. Rey, J. Pérez-Pariante, J. Tsuji, B. McCulloch, L.T. Nemeth, *Chemical Communications (Cambridge)* (1998) 2211-2212.
- [67] M.C. Capel-Sanchez, J.M. Campos-Martin, J.L.G. Fierro, *Catal. Today* 158 (2010) 103-108.
- [68] R.R. Sever, R. Alcalá, J.A. Dumesic, T.W. Root, *Microporous Mesoporous Mater.* 66 (2003) 53-67.
- [69] D.A.R. Richard L. Brutchey, Lars K. Andersen, and, T.D. Tilley, *Langmuir* 21 (2005) 9576-9583.
- [70] T. Blasco, M.A. Camblor, A. Corma, P. Esteve, J.M. Guil, A. Martínez, J.A. Perdigón-Melón, S. Valencia, *The Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 75-88.
- [71] M. A. Camblor, A. Corma, P. Esteve, A. Martínez, S. Valencia, *Chem. Commun.* (1997) 795-796.
- [72] A. Hagen, K. Schueler, F. Roessner, *Microporous Mesoporous Mater.* 51 (2002) 23-33.
- [73] C. Avelino, D. Marcelo, G. José A., J. José L., N. Maria T., R. Fernando, P.-P. Joaquin, T. Junpei, M. Beth, N. Laszlo T., *Chem. Commun.* (1998).

Chapitre III. Couplage de la zéolithe TS-1 et de matériaux apparentés avec la GOx

Introduction

Le chapitre précédent a montré que la faible solubilité dans l'eau d'alcènes comme le cyclooctène, couplée au caractère hydrophile du matériau MCF, ne permettaient pas de travailler dans des conditions réactionnelles nécessitant de fortes teneurs en eau. Cependant, ces conditions sont nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme, puisqu'à 35°C, il faut au moins 50% d'eau afin que la GOx immobilisée ait une activité significative. Au-delà de cette température, les quantités d'eau nécessaires sont encore plus importantes pour que la GOx soit active et la solubilité de la plupart des alcènes, déjà faible, peut devenir quasi-nulle.

Dans ce contexte, la zéolithe TS-1, dont le caractère hydrophobe est particulièrement marqué (voir Chapitre I 4.1.2.c), nous semble intéressante. Notre hypothèse est que le couplage de cette zéolithe avec la GOx devrait favoriser la mise en œuvre d'une réaction d'époxydation catalytique utilisant du dioxygène et adaptée, dans un premier temps, à l'oxydation de petites molécules. Il reste que les propriétés structurales de la TS-1 ne permettent pas l'insertion de la GOx dans les pores du matériau. Pourtant, comme montré au chapitre précédent, la localisation de l'enzyme au sein d'une matrice poreuse adaptée est importante pour sa résistance aux milieux hydro-organiques, mais également pour favoriser les forts taux de greffage de la protéine sur le support. A défaut de pouvoir localiser les deux phases actives sur un même support poreux, l'approche développée dans ce chapitre a donc consisté à effectuer un mélange mécanique du catalyseur d'oxydation (TS-1) et du biocatalyseur « stabilisé » par immobilisation (MCF-NH₂-GOx). Ce mélange de catalyseurs présente encore les caractéristiques d'un catalyseur hétérogène en termes de facilité de récupération et de réutilisation. Nous avons fait l'hypothèse qu'avec une agitation suffisante de ce mélange mécanique, la réaction en tandem pourrait quand même pouvoir avoir lieu même si, effectivement, l'immobilisation des deux espèces actives sur le même support devrait être plus efficace. Deux types d'alcènes seront testés ; d'une part le cyclohexène qui devrait être plus soluble que le cyclooctène dans les milieux utilisés et d'autre part, des alcools allyliques hydrosolubles. Ces substrats seront également testés avec les catalyseurs MCF-Ti et MCF-Ti-NH₂-GOx (ici la MCF2 du chapitre précédent sera nommé simplement MCF). En effet, les alcools allyliques, contrairement aux cycloalcènes peuvent être en mesure d'entrer en compétition avec l'eau au niveau des sites actifs ce qui laisse espérer un certain taux de transformation. Finalement, pour pallier à la limitation de la taille du substrat, deux approches ont été proposées pour combiner mésoporosité et activité de Ti. La première a consisté à générer de la mésoporosité dans les cristaux de TS-1 via un processus de désilication, l'autre à recouvrir le matériau mésoporeux amorphe à base de Ti par un dépôt de TS-1.

1. Matériels & Méthodes

1.1. Synthèse de la zéolithe TS-1

La synthèse de la zéolithe TS-1 lors de cette étude s'est appuyée sur le protocole de Silvestre-Albero et *al.* [1]. Ici, la source de titane utilisée est l'orthotitanate de *tert*-butyle (TBOT, 97% Aldrich) et l'agent structurant est l'hydroxyde de tétrapropyle ammonium (TPAOH, 1 M dans H₂O Aldrich). La source de silicium est l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS, 99%, Aldrich). 22,5 mL de TPAOH ont été dilués à l'aide de 31,5 mL d'eau distillée puis, 0,9 mL de TBOT ont été ajoutés au mélange goutte à goutte sous agitation magnétique, suivi de 16,8 mL de TEOS introduits de la même manière. La solution ainsi obtenue (1 TBOT : 28,4 TEOS : 8,5 TPAOH : 1040 H₂O) est laissée sous agitation pendant 1,5h à température ambiante, puis pendant 3 jours à reflux à 70°C. Le mélange est ensuite introduit dans un autoclave à 150°C pendant 7 jours. Le gel obtenu est ensuite réparti dans 4 tubes, chacun centrifugé à 8500 tr/min pendant 10 min. Une fois les surnageants des tubes retirés, les tubes contenant le gel sont remplis d'eau distillée au 2/3, mélangés vivement grâce à un vortex et centrifugés à nouveau. Ces manipulations sont répétées 4 fois, puis le gel est séché à 60°C pendant une nuit. Enfin, le solide récupéré est calciné à 550°C sous air en utilisant une rampe en température de 24°C/h.

1.2. Modification de la zéolithe TS-1 par désilication

Le protocole de désilication de la zéolithe TS-1 suivi est également issu des travaux de Silvestre-Albero et *al.* [1]. Celui-ci consiste à traiter environ 1,5 g de TS-1 avec 45 mL de soude à 0,6 M à 65°C sous reflux pendant 30 min exactement. Après ce temps précis, le mélange est refroidi dans un cristalliseur rempli d'eau froide. Le solide est filtré et lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit égal à celui de l'eau distillée (papier pH). Le solide résultant est ensuite séché à l'étuve à 60°C, puis ajouté à 5 mL de HCl à 0,1 M. Le mélange est agité une nuit à 65°C, puis le solide est lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit égal à celui de l'eau distillée (papier pH). Enfin le solide obtenu est séché à 60°C. Celui-ci sera nommé dans la suite de l'étude TS-1-d.

1.3. Dépôt d'une couche de zéolithe TS-1 sur MCF-Ti

Le dépôt de cristaux de TS-1 sur le matériau MCF-Ti a été effectué en s'appuyant sur le protocole de l'équipe de Kaliaguine [2]. Dans un premier temps, un gel de TS-1 est formé, avec la même procédure que celle énoncée au-dessus au point 1.1 : 7,5 mL de TPAOH sont dilués avec 10,5 mL de H₂O puis 0,3 mL de TBOT et 5,6 mL de TEOS sont ajoutés. Le mélange résultant est laissé sous agitation pendant 1,5 h à température ambiante puis 24 h (au lieu de 3 jours pour la synthèse de TS-1 seule) à 70°C sous reflux. Cette solution est ensuite diluée par de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume de 200 mL, d'où sont prélevés 30 mL à ajouter à 0,5 g de MCF-Ti préalablement synthétisée. Cette dispersion est laissée 1 h à température ambiante sous agitation, puis filtrée et lavée trois fois à l'eau distillée. Le solide obtenu est séché à 80°C, puis introduit dans un autoclave avec 20 mL de glycérol. Ici le glycérol permet de protéger le solide qui se serait dégradé dans l'eau sous conditions hydrothermales. Le mélange est ainsi maintenu 24 h à 130°C, puis le solide est filtré, lavé, séché à 130°C et enfin calciné à 550°C avec une rampe de 24°C/h. Le matériau obtenu sera nommé par la suite

TS-1@MCF-Ti. Un second coating sur ce dernier matériau a été effectué de la même manière et le solide obtenu sera nommé TS-1@MCF-Ti².

1.4. Caractérisation des matériaux TS-1, TS-1-d et TS-1@MCF-Ti

Les matériaux TS-1, TS-1-d et TS-1@MCF-Ti ont été caractérisés par microscopie électronique à transmission (MET), spectroscopie de fluorescence X, mesure de sorption de N₂ (BET), diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie d'absorption de rayons X (XANES) et spectroscopie UV-visible en réflexion diffuse. Ces méthodes de caractérisation ont déjà été décrites dans le chapitre II et ont été effectuées dans les mêmes conditions, sauf exception citées ci-dessous.

Les paramètres texturaux des matériaux TS-1 et TS-1-d tels que la surface spécifique (S_{BET}) et le volume microporeux ont été estimés, pour l'un à partir de l'isotherme d'adsorption obtenue avec le modèle BET, et pour l'autre à partir de l'équation Horvath-Kawazoe. Le volume total des mésopores a été déterminé par soustraction du volume des micropores au volume total mesuré à $P/P^0 \sim 0,95$. Les paramètres texturaux des matériaux mésoporeux MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti² ont été déterminés comme décrit au point 1.5 du Chapitre II.

Les spectres d'absorption de rayons X (XANES) au seuil K du Ti ont été effectués au Synchrotron Soleil sur la ligne de lumière Samba. Les échantillons ont été analysés dans des conditions ambiantes et préparés sous forme de pastille (10 mm de diamètre). Deux matériaux ont été analysés, TS-1 et de l'anatase, utilisée comme référence. Les échantillons examinés ont été dilués avec de la cellulose (81,6 mg pour 21,3 mg de TS-1 et 83,7 mg pour 6,3 mg d'anatase) afin d'obtenir un saut de seuil $\Delta\mu(E)$ proche de 1.

Enfin, pour son observation au microscope électronique à transmission, l'échantillon TS-1@MCF-Ti a été immergé dans une résine placée à l'étuve à 70°C pendant 48 h. La résine a ensuite été coupée à l'aide d'un microtome de la société Leica (lame en diamant). Les coupes mesurent environ 50 nm et flottent à la surface de l'eau. Elles ont ensuite été récupérées par capillarité sur une grille MET en cuivre recouvert d'une membrane de carbone de 15 nm d'épaisseur, puis été analysées. Les clichés ont également été effectués avec un microscope JEOL JEM-100 CX II opérant à 100 kV.

1.5. Tests d'oxydation

A l'exception de TS-1-d, les catalyseurs à base de titane utilisés dans cette étude ont des teneurs en métal autour de 2 à 3% en masse. Ils ont été testés en présence des substrats suivants : cyclohexène (99%, Sigma-Aldrich), but-3-ène-2-ol (99%, Aldrich Chimie) et prop-2-ène-1-ol (> 99%, Aldrich). Le Tableau 19 regroupe les essais principaux effectués. Ces réactions ont été menées soit en introduisant manuellement du peroxyde d'hydrogène commercial à 30% en masse (Sigma) (1), soit en faisant intervenir la GOx (2) comme explicité ci-dessous. Certains essais faisant intervenir la GOx ont été effectués en faisant varier la quantité de glucose (300 mM, 200 mM et 150 mM). De plus, l'un des essais en milieu hydro-organique a été réalisé en présence d'un surfactant (SDS). Dans ce qui suit, les conditions expérimentales de chaque essai seront explicitement données dans les légendes des figures ou les parties correspondantes. Les quantités de substrat et étalon introduites en début de réaction dans le ballon sont pesées avec une incertitude-type de 0,06 mg (balance AB204-s de Mettler Toledo).

Tableau 19: Récapitulatif des tests d'époxydation effectués

Catalyseurs	% mass. Ti	Substrat	MeOH (%)				Température (°C)				H ₂ O ₂
			100	60	50	0	60	50	40	35	
TS1	2,5	cyclohexène	x					x			(1)
				x				x			(1)
		but-3-ène-2-ol			x					x	(2)
		prop-2-ène-1-ol			x					x	(2)
								x		(2)	
TS-1-d	10,5	cyclohexène	x					x			(1)
				x				x			(1)
MCF-Ti	3,5	prop-2-ène-1-ol				x			x		(1)
						x		x			(1)
		but-3-ène-2-ol				x			x		(1)
TS-1@MCF-Ti	2	but-3-ène-2-ol				x		x		(1)	
TS-1@MCF-Ti ²	1,5	prop-2-ène-1-ol				x		x		(1)	

(1): Ajouts manuels de H₂O₂ commercial 30% en masse.

Le milieu réactionnel est préparé en dispersant sous ultra-sons le catalyseur et le substrat de concentration C = 50 mM pour le cyclohexène, le prop-2-ène-1-ol et le but-3-ène-2-ol ainsi que 250 mM pour ce dernier. Les rapports molaires Ti/substrat utilisés pour ces composés sont : (1 : 4 mol.) avec TS-1, (2,6 : 1 mol.) avec TS-1-d, (1 : 3 mol.) avec MCF-Ti et (1 : 6 mol.) avec TS-1@MCF-Ti, de même que (1 : 12,6 mol.) pour un essai avec le but-3-ène-2-ol (C = 250 mM). Le solvant est soit du méthanol pur, soit du tampon acétate (pH = 6, 100 mM) ou bien un mélange des deux [60 : 40] ou [50 : 50]. La dispersion obtenue dans un ballon de 5 mL est maintenue sous agitation magnétique (1000 rpm) à une température T : 35°C, 40°C ou 50°C pendant 24 h. La quantité de H₂O₂ correspondant au ratio molaire H₂O₂/substrat = 5 ou 1 est introduite manuellement goutte à goutte en trois ou cinq fois, chacune des injections étant séparées d'une heure et une demi-heure respectivement. Les rapports Ti/H₂O₂ utilisés sont : (1 : 19) avec TS-1, (1 : 2 mol.) avec TS-1-d, (1 : 13) avec MCF-Ti et (1 : 31) avec TS-1@MCF-Ti, dans 2 mL au total.

(2): H₂O₂ produit *in-situ* par l'oxydation du glucose biocatalysée par MCF-NH₂-GOx

Les conditions de réaction pour ces essais sont identiques à celles décrites précédemment, à la différence que H₂O₂ n'a pas été ajouté manuellement au milieu réactionnel mais est produit cette fois-ci par 15 ou 5 unités d'enzymes apportées via MCF-NH₂-GOx. Pour cela, 6 mg de MCF-NH₂-GOx (avec un taux de greffage de la GOx plus ou moins important) sont filtrés, puis ajoutés au dernier moment au mélange réactionnel. Dans ce contexte, le solvant est constitué soit d'un mélange 50:50 de méthanol et de tampon acétate (pH = 6, 100 mM) à 35°C, soit de ce tampon seul à 40°C et contient du D-glucose (96%, Aldrich) à une concentration de 150 mM, 200 mM ou 300 mM. La solution aqueuse est préalablement oxygénée et un flux de O₂ en surface du milieu réactionnel peut également être ajouté.

Un essai de recyclage du mélange mécanique TS-1/MCF-NH₂-GOx a été réalisé comme indiqué ci-après dans le cas de l'oxydation du prop-2-ène-1-ol dans du tampon acétate. Dans un premier

temps, à la fin du premier test, le mélange des solides a été séparé du milieu réactionnel par centrifugation à 2500 rpm pendant 10 min. Ensuite, le surnageant a été retiré et 2 mL de tampon acétate (pH =6, 100 mM) ont été ajoutés aux solides et le tout agité vivement à l'aide d'un vortex. Le mélange résultant a été centrifugé une nouvelle fois. Le surnageant de lavage a été séparé de la même manière que précédemment et cette étape de lavage est répétée deux fois. Le mélange est ensuite filtré et les catalyseurs récupérés introduits dans un nouveau milieu réactionnel similaire au premier test catalytique.

Certains des tests effectués ont fait l'objet d'une étude cinétique. Le suivi a été effectué dans tous les cas par chromatographie, soit par CPG (cas du cyclohexène, du but-3-ène-2-ol), soit par HPLC (cas du prop-2-ène-1-ol). Pour la CPG, avant de prélever la solution, l'agitation a été stoppée de manière à ne prélever que la phase liquide. L'appareil CPG Perichrom est muni d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire de 30 m (diamètre interne de 0,32 mm) revêtue d'un film de phase stationnaire OPTIMA 5 (5 % phényl – 95 % méthylpolysiloxane) d'épaisseur 1 µm. Le programme utilisé présente une première rampe de température de 40 à 160°C à raison de 3°C/min, suivie d'une seconde rampe de 160 à 200°C avec une montée de 20°C/min. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. Un étalon interne a été ajouté au sein du milieu réactionnel dès t= 0. Les différents composés de départ et produits de la réaction ont fait l'objet d'un étalonnage à l'aide de composés chimiques authentiques commerciaux (cyclohexène, 2-cyclohexène-1-ol (95%, Aldrich), 2-cyclohexène-1-one (95%, Aldrich), *trans*-1,2-cyclohexanediol (98%, Aldrich) et but-3-ène-2-ol). L'étalon utilisé dans le MeOH est la 2-hexanone (98%, Fluka) ou le dioxane pour le but-3-ène-2-ol. Le Tableau 20 suivant récapitule les coefficients de réponse utilisés selon l'équation présentée 1.8 Chapitre II, ainsi que les coefficients de régression pour le substrat organosoluble et ses dérivés pour lesquels la présence d'eau influe sur leur solubilité.

Tableau 20: Coefficients de réponse C_{Ri} pour l'étalonnage interne du cyclohexène et du but-3-ène-2-ol ainsi que leurs différents dérivés avec indication des coefficients de régression R^2 de la droite d'étalonnage

Composé <i>i</i>	100% MeOH	R^2	50% MeOH	R^2	Etalon
Cyclohexène	1,00	0,95	1,90	0,93	2-hexanone
			0,50		dioxane
Oxyde de cyclohexène	0,97	0,99	0,81	0,99	2-hexanone
			0,48		dioxane
1,2-cyclohexanediol	0,80	0,99	0,58	0,68	2-hexanone
			0,40		dioxane
Cyclohexène-1-ol	0,95	0,96	1,49	0,96	2-hexanone
			0,47		dioxane
Cyclohexène-1-one	1,04	0,98	1,12	0,91	2-hexanone
			0,52		dioxane
2-méthoxycyclohexanol	0,80	-	0,58*	-	2-hexanone
			0,40		dioxane
but-3-ène-2-ol	/	/	1,34	/	2-hexanone
			1,5		dioxane
1,2-époxy-3-butanol	/	/	0,81*	/	2-hexanone

(*) Ne disposant pas de standards commerciaux pour le 1,2-époxy-3-butanol et le 2-méthoxycyclohexanol, leurs coefficients de réponse ont été pris égaux à ceux obtenus pour d'autres composés structurellement proches.

Pour les essais effectués dans 60% MeOH, les coefficients utilisés seront ceux dans 50% MeOH. La présence du 1,2-époxy-3-butanol et du 2-méthoxycyclohexanol dans les milieux réactionnels en fin de réaction a été établie par GC-MS (Instrument Trace GC équipé de la même colonne que précédemment (OPTIMA 5 et épaisseur de 1 μm) couplé avec un spectromètre de masse Thermoquest utilisé en mode impact électronique).

On remarque une nette différence entre les coefficients de réponse d'un même composé dans le méthanol pur ou en mélange 50 : 50 avec du tampon acétate, ce qui reflète la solubilisation partielle des composés dans le milieu réactionnel hydro-organique. Ainsi, l'écart entre les coefficients est pratiquement d'un facteur 2 pour le cyclohexène, mais de moins de 10 % pour le cyclohexène-1-one, composé soluble dans la gamme de concentration utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. En fait, dans le mélange 50 : 50, l'échantillon prélevé et injecté pour être analysé en CPG est une suspension qui comprend une partie du produit sous forme soluble et une partie insoluble, dispersée car l'échantillon a été vigoureusement agité avant le prélèvement. Les droites d'étalonnage obtenues ont un coefficient de régression plus faible que dans le méthanol pur, conséquence du prélèvement d'une solution inhomogène à des concentrations au-dessus de la solubilité du composé. Dans le cas du cyclohexène, la solubilité dans le mélange MeOH/Tampon acétate (v/v) 50 : 50 a été déterminée à 29 mM, résultat de plusieurs mesures de concentrations dans des solutions préparées avec des quantités croissantes du composé. Malgré cette difficulté d'analyse, il a été décidé de réaliser les tests d'époxydation avec une concentration initiale de cyclohexène de 50 mM, et ce afin d'être dans des conditions de sensibilité acceptables de la méthode de mesure.

Les analyses par HPLC ont été effectuées à l'aide d'une chaîne Shimadzu (LC-20AD + DGU-20A5) incluant un four CTO-10AS et deux détecteurs en série (d'une part, un spectrophotomètre à barrette de diodes (SPD-M20A) et d'autre part, un réfractomètre différentiel (RID-10A)), le tout piloté par le logiciel LabSolutions. Les séparations étudiées ont été réalisées avec une colonne de type Hi-Plex H (Agilent, 300 x 7,7 mm, 8 μm) thermostatée à 65°C en utilisant, comme phase mobile, soit de l'eau milliQ, soit une solution d'acide sulfurique 5 mM à un débit de 0,6 mL/min. La boucle d'injection a un volume égal à 20 μL . Avant l'injection en HPLC, les mélanges sont filtrés avec un filtre seringue de porosité de 0,45 μm . Notons que, dans les conditions (2), la formation du D-acide gluconique synonyme de bon fonctionnement de l'enzyme (1 mole d'acide produite pour 1 mole de H_2O_2) a pu être suivie par HPLC. Un étalonnage a été réalisé avec un échantillon authentique (49-53%, Aldrich). Les coefficients de réponse utilisés sont présentés ci-dessous et utilisés dans l'équation qui suit :

$$n_i = [i].V_T = A_i.C_{Ri}$$

Où n_i et $[i]$ sont la quantité de matière (mol) et la concentration du composé i (M), V_T le volume de l'échantillon, A_i l'aire (basée sur les mesures de réfractométrie) du pic correspondant au composé i et C_{Ri} le coefficient de réponse du composé i .

Tableau 21: Coefficients de réponse C_{Ri} pour l'étalonnage externe du glucose, du prop-2-ène-1-ol et leurs dérivés

	<i>tampon acétate :</i> <i>MeOH (50 : 50)</i>	<i>tampon acétate</i>
<i>Acide gluconique</i>	22 473 949	15 961235
<i>Glucose</i>	37 531 465	15 450 063
<i>Prop-2-ène-1-ol</i>	-	12 096 108
<i>Glycérol</i>	-	17 760 300

2. Résultats et discussion

Dans un premier temps, les performances catalytiques des matériaux TS-1 et TS-1-d ont été testées pour l'époxydation du cyclohexène dans le MeOH et 60% MeOH en ajoutant manuellement H₂O₂. Ensuite, l'oxydation chimioenzymatique de ce substrat a été effectuée à l'aide d'un mélange de TS-1 et MCF-NH₂-GOx dans un milieu hydro-organique. Ce même système a ensuite été utilisé pour l'oxydation d'alcools allyliques hydrosolubles. Suite à des essais d'oxydation de ces mêmes substrats avec MCF-Ti et des ajouts de H₂O₂, un premier catalyseur en tandem MCF-Ti-NH₂-GOx a également été testé. Enfin les performances catalytiques du catalyseur TS-1@MCF-Ti ont été vérifiées pour l'oxydation du prop-2-ène-1-ol en milieu aqueux par ajouts progressifs de H₂O₂.

2.1. Caractérisations des matériaux TS-1, TS-1-d et TS-1@MCF-Ti

Les caractérisations ci-après ont pour objectif de qualifier la dispersion du titane au sein des matériaux d'une part et de prouver la rémanence de la zéolithe dans le cas de TS1-d ou la présence de TS-1 dans le cas de TS-1@MCF-Ti². Ces informations devraient permettre une meilleure compréhension de l'activité catalytique de ces solides abordée aux paragraphes 2.2., 2.3., 2.4. et 2.5.

2.1.1. Caractérisations des matériaux TS-1 et TS-1-d

La synthèse de TS-1 et TS1-d s'est appuyée sur des travaux de Silvestre-Albero et *al.* [1] Les mesures de fluorescence X de ces deux catalyseurs ont permis de déterminer la proportion de l'espèce active Ti dans ces matériaux. Les résultats sont présentés dans le Tableau 22 ci-dessous et comparés à ceux de MCF-Ti précédemment synthétisée et ceux de la littérature (obtenus également par fluorescence X).

Tableau 22: Rapports molaires Si/Ti et % massiques en Ti obtenus par fluorescence X pour les échantillons de TS-1, TS-1-d et MCF-Ti

Matériaux	Ti (% massique)	Si (% massique)	Si/Ti (mole)
TS-1	2,48 ± 0,01	45,13 ± 0,01	31,2 ± 0,1
TS-1 litt. [1]	2,60		29,0
TS-1-d	24,40 ± 0,04	25,20	1,770 ± 0,003
TS-1-d litt. [1]	25,70		1,8
MCF-Ti	3,66 ± 0,03	45,18 ± 0,20	21,2 ± 0,2

Les pourcentages massiques de titane de la zéolithe TS-1 et de celle désilicatée concordent avec la littérature, de même que les rapports Si/Ti. La désilication rend le matériau beaucoup plus riche en titane. En dehors de TS-1-d, qui par définition contient beaucoup de titane, il est important de noter que les quantités de titane dans les matériaux MCF-Ti et TS-1 sont du même ordre de grandeur, ce qui devrait permettre une comparaison plus aisée des matériaux en termes de performance.

Les morphologies des solides TS-1 et TS-1-d synthétisés ont été obtenues par MET Figure 115 ci-dessous soulignant, comme attendu [1], de très grandes différences d'aspect. La zéolithe TS-1 parent (Figure 115A) présente des nanocristaux assez réguliers d'environ 150 nm de longueur et 100 nm de largeur en moyenne, où aucune mésoporosité n'est visible. Sur le cliché de microscopie à haute résolution Figure 115A, il est même possible d'observer les plans de diffraction. En revanche, le matériau TS-1-d Figure 115B présente une structure amorphe, plus proche de la silice MCF présentée dans le chapitre précédent. La cristallinité et la microporosité de la TS-1 de départ laissent place à une structure plus ouverte, semblable à celles observées dans la littérature après ce genre de traitement [1]. Nos résultats sont donc en adéquation avec ceux de Silvestre-Albero et *al.*

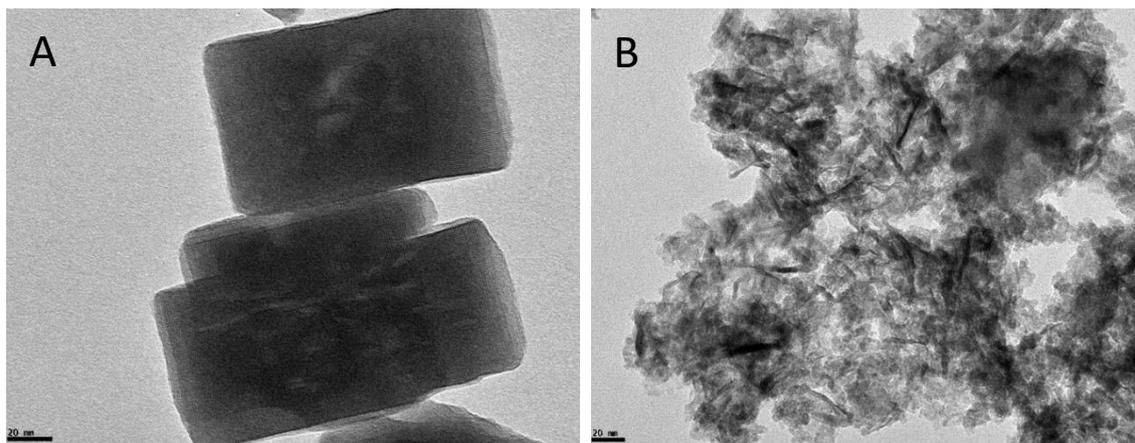


Figure 115: Images MET des matériaux TS-1 (A) et TS-1-d (B) désilicé par un traitement à base de NaOH à 0,6 M pendant 30 min. Barre d'échelle : 20 nm

La détérioration de la structure cristalline caractéristique de la TS-1 à la suite de la désilication a été confirmée par les mesures de DRX aux grands angles (5° - 70°) présentées sur la Figure 116.

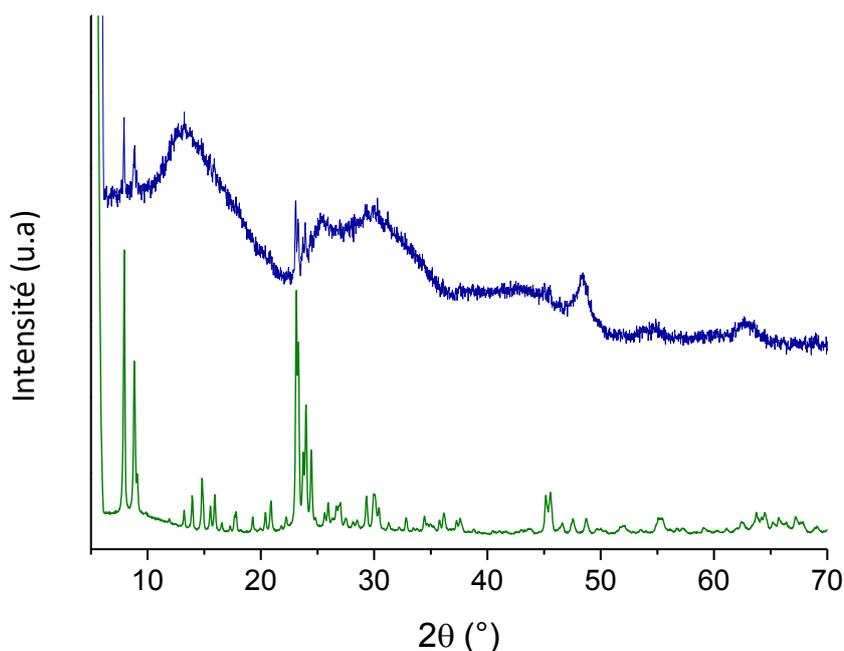


Figure 116: Diffractogrammes des rayons X des matériaux TS-1 et TS-1-d

Le diffractogramme de la zéolithe TS-1 est typique d'une structure MFI [1,6]. Les pics γ sont relativement étroits et intenses ce qui est signe d'une assez bonne cristallinité. La perte d'arrangement structural est clairement perceptible sur le diffractogramme du matériau TS-1-d, dont l'allure avec de larges bosses, se rapproche finalement de celle d'un matériau amorphe tel que MCF-Ti. Cependant quelques pics résiduels correspondant à la zéolithe TS-1 sont clairement visibles sur le diffractogramme du matériau TS-1-d, témoins de traces cristallines de la zéolithe de départ. En comparaison avec les travaux de Silvestre-Albero et *al.* [1], la structure cristalline semble avoir mieux persisté malgré l'utilisation de conditions comparables (même concentration de NaOH (0,6 M), même durée de traitement (30 min) et même température (65°C)). Cela peut être lié, dans notre cas, à un refroidissement plus rapide juste avant l'étape de filtration, qui a eu pour effet de stopper plus nettement l'attaque chimique. Au final, le diffractogramme met en avant la présence de deux types de phases distinctes, une cristalline et une seconde amorphe permettant d'espérer une certaine hiérarchisation de la porosité.

Les mesures de sorption de N_2 , montrées Figure 117 (ci-après), ont permis d'obtenir les paramètres texturaux de ces solides. Ces derniers sont reportés Tableau 23 (ci-après) et comparés aux travaux sur lesquels nous nous sommes basés pour leurs synthèses. Les isothermes d'adsorption et désorption de TS-1 sont de type I et présentent un saut pour des pressions $P/P^0 < 0,01$, caractéristique de solide microporeux, suivie d'une adsorption relativement faible à des pressions intermédiaires. La boucle d'hystérésis à des pressions plus élevées, autour de $P/P^0 > 0,9$, est généralement attribuée à la condensation du diazote au niveau de la porosité dite intergranulaire [3], confirmant ainsi la petite taille des cristallites de TS-1. Le traitement à la soude produit des changements au niveau de l'isotherme d'adsorption puisque la quantité d'azote adsorbée à des pressions relativement basses diminue fortement, confirmant la détérioration de la structure microporeuse, tandis que l'augmentation de l'adsorption aux pressions relatives intermédiaires peut s'expliquer par le développement d'une porosité secondaire, à savoir la mésoporosité. En effet, il est possible d'observer la présence de celle-ci par le début de l'hystérésis à $P/P^0 = 0,6$, tout comme pour le matériau MCF-Ti. L'apparition de mésoporosité est ainsi vérifiée par l'augmentation du volume mésoporeux de la TS-1-d présentée dans le Tableau 23.

Les paramètres texturaux obtenus pour la zéolithe de départ sont en assez bon accord avec la littérature, même si le modèle utilisé pour le volume microporeux est différent (ils utilisent l'équation de Dubinin–Radushkevich, tandis que dans notre cas c'est celle de Horvath-Kawazoe). Les deux zéolithes, TS-1 synthétisée et TS-1 de la littérature [1] sont caractérisées par des valeurs de volumes de micropores et de surfaces spécifiques très proches mais diffèrent par le volume des mésopores, un peu moins élevé dans notre cas. Lors du processus de désilication, le volume total des pores (micro + méso) est passé de 0,44 à 0,71 cm^3/g alors que celui-ci évoluait de 0,56 à 0,74 cm^3/g dans la publication prise en référence. On peut constater en particulier que le volume lié à la mésoporosité du matériau TS-1-d a été multiplié par 2 mais l'écart initial subsiste au profit de TS-1-d [1]. Le volume total des pores est quasiment le même dans les matériaux TS-1-d et TS-1-d [1] du fait de la faible variation du volume des micropores dans notre cas. La persistance de la microporosité pourrait s'expliquer par la présence de cristaux de TS-1 non attaqués visibles sur des images MET et également en DRX où les traces de structure cristalline dans notre cas sont encore présentes contrairement à [1]. Étonnamment, S_{BET} pour TS-1-d est même un peu plus importante que pour la zéolithe TS-1 d'origine et surtout largement plus élevée que celle de son analogue, TS-1-d[1]. La forme des pores n'est pas vraiment identifiée mais la courbe BJH en désorption permet d'estimer leur taille autour de 6 nm.

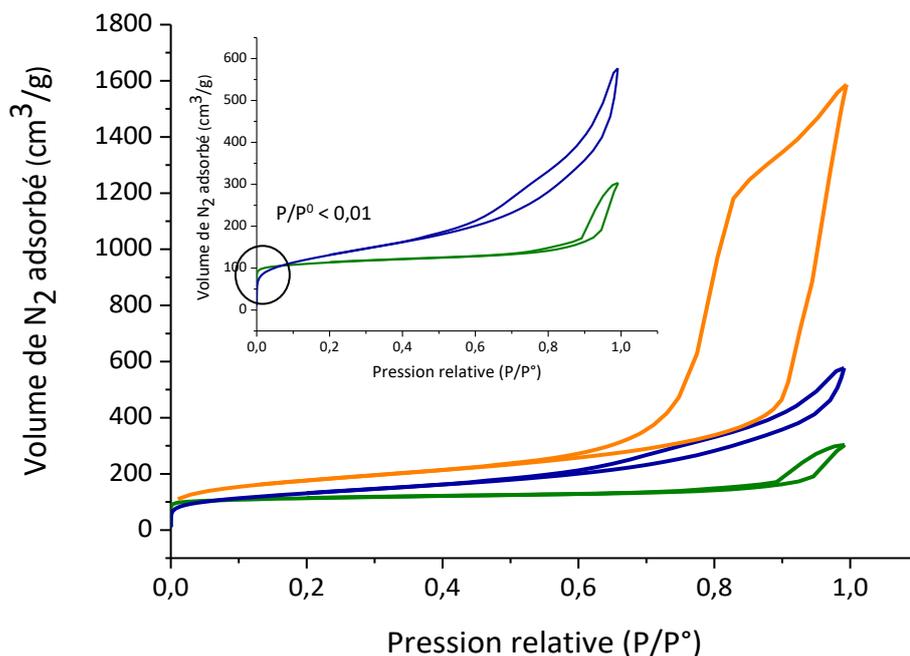


Figure 117: Isothermes d'adsorption/désorption de TS-1, TS-1-d et MCF-Ti

Tableau 23 : Paramètres texturaux de TS-1 et TS-1-d

Catalyseurs	S _{BET} (m ² /g)	V _{micro} (cm ³ /g)	V _{meso} (cm ³ /g)
TS-1	376	0,18	0,26
TS-1 [1]	440	0,17	0,39
TS-1-d	465	0,20	0,51
TS-1-d [1]	225	0,08	0,66

Des informations sur le mode de coordinence de Ti dans les matériaux TS-1 de départ et TS-1-d ont pu être obtenues grâce à des mesures d'absorption dans le domaine UV-visible en mode réflexion diffuse (Figure 118). La zéolithe de départ montre un maximum autour de 210 nm. Cette bande est caractéristique de la transition du transfert de charge de O (2p) vers Ti (3d) et témoigne de l'isolement du Ti de coordination tétraédrique [4-6]. Cependant, il semblerait que la largeur à mi-hauteur est supérieure à 45 nm, laissant présumer que certaines espèces Ti ne sont pas complètement coordonnées en Ti (IV) [5, 7]. La présence d'un petit épaulement entre 270 nm et 295 nm confirme cette conclusion [8, 9]. Le spectre de TS-1-d quant à lui montre un léger épaulement à 230 nm caractéristique des espèces de Ti tétraédriques résiduels. Indiscutablement, le traitement de désilication a eu pour effet d'élargir la bande d'absorption et de décaler le seuil d'absorbance vers les plus hautes longueurs d'onde. Ceci est caractéristique de la formation de plusieurs espèces titanées différentes, de coordination penta-, hexa- et/ou octaédrique, qui ont pu se former par interaction avec l'eau ambiante en milieu basique [1, 3, 4, 7]. La coordinence de la plupart des sites actifs, majoritairement de type tétraédrique au sein de la zéolithe TS-1 semble avoir été modifiée.

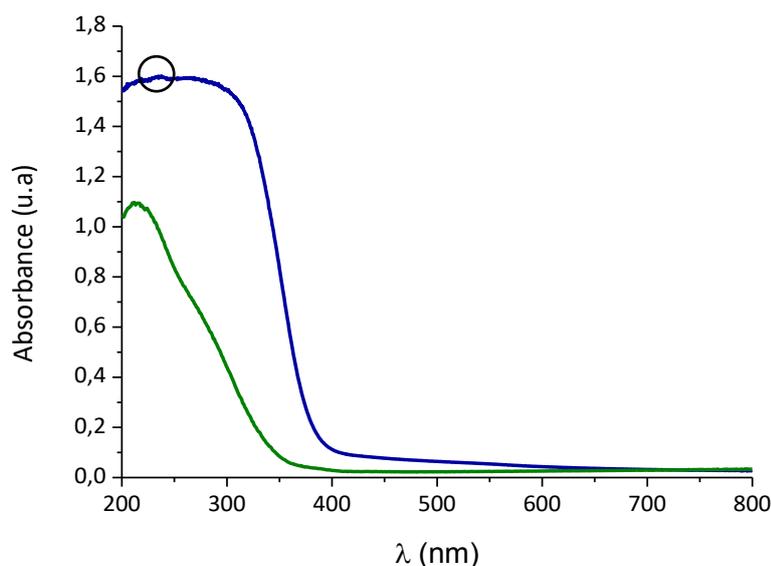


Figure 118: Spectres DRUV des matériaux **TS-1** et **Ts-1-d**

La coordinence de l'espèce active Ti dans la matrice silique a fait l'objet d'études complémentaires grâce à des mesures XANES présentées Figure 119. Ces mesures ont pu être réalisées pour la zéolithe de départ mais malheureusement pas pour TS-1-d (pastille brisée lors du créneau de temps de faisceau accordé).

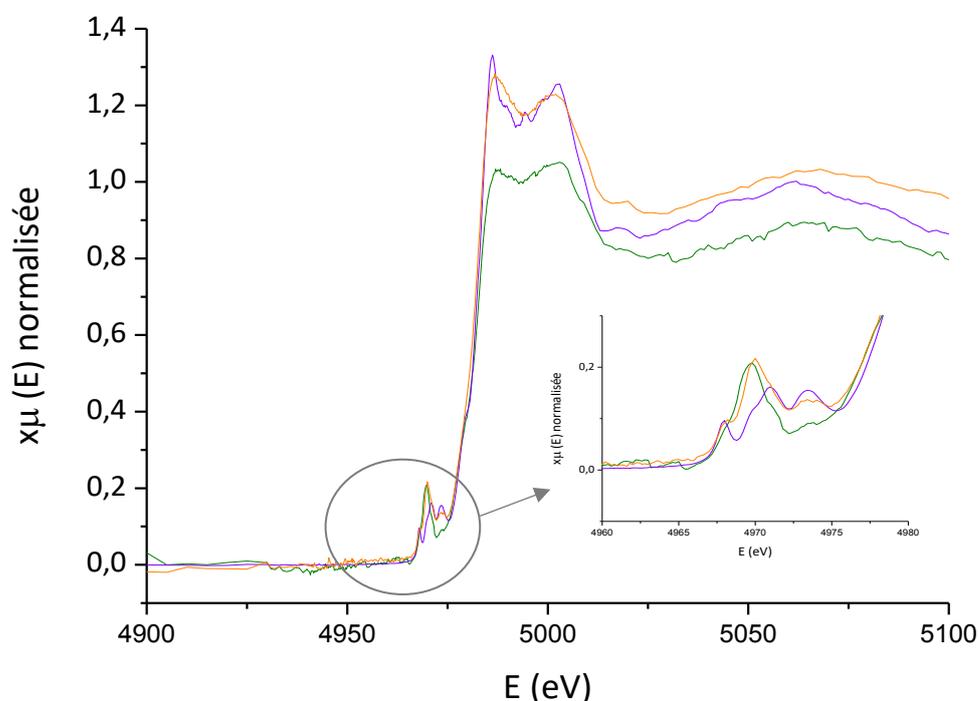


Figure 119 : Résultats XANES au seuil K du Ti pour la **TS-1**, l'**anatase** et **MCF-Ti**

Comme énoncé précédemment, l'anatase présente une résonance de trois pics de faible intensité au niveau du pré-seuil, assignée à la transition du niveau 1s de cœur du Ti, aux niveaux t_{2g}, e_g et a_{1g} caractéristiques d'une coordination octaédrique [10, 11]. Au contraire, le pré-seuil de la zéolithe TS-1

comprend un pic majoritaire qui se situe à 4969,8 eV, énergie caractéristique d'une coordination tétraédrique [12]. Cependant, le spectre de la zéolithe TS-1 apparaît moins prononcé que d'autres décrits dans la littérature probablement en raison d'une absorption trop importante due à la quantité élevée de cellulose, incorporée dans la pastille. Rappelons que, normalement sous vide, la zéolithe TS-1 présente un pic au niveau du pré-seuil dont l'intensité représente 74% du seuil [13]. Il est probable que ce résultat soit aussi dû au fait que les spectres ont été enregistrés en conditions ambiantes. De ce fait, le Ti adsorbe de l'humidité pour compléter sa sphère de coordination comme montré par Lopez et *al.* [14] ou dans la revue de Bordiga et *al.* [15] dont la Figure 120 est extraite. Dans cette revue les auteurs s'appuient sur des études récentes alliant plusieurs techniques telles que la diffraction combinée de neutron et IR [16, 17] et la RMN du proton [18] qui montrent que la zéolithe TS-1 est en réalité constituée de sites réguliers $[\text{Ti}(\text{OSi})_4]$ (sites fermés), mais également de sites défectueux $[\text{Ti}(\text{OSi})_3\text{OH}]$ (sites ouverts). Ces derniers sites ouverts peuvent ainsi être penta-coordinés par association à des groupements silanols d'un centre Si adjacent. En définitive, le spectre XANES de TS-1 reste bien typique d'une structure tétraédrique, même si malheureusement les intensités sont faibles du fait des conditions de mesures.

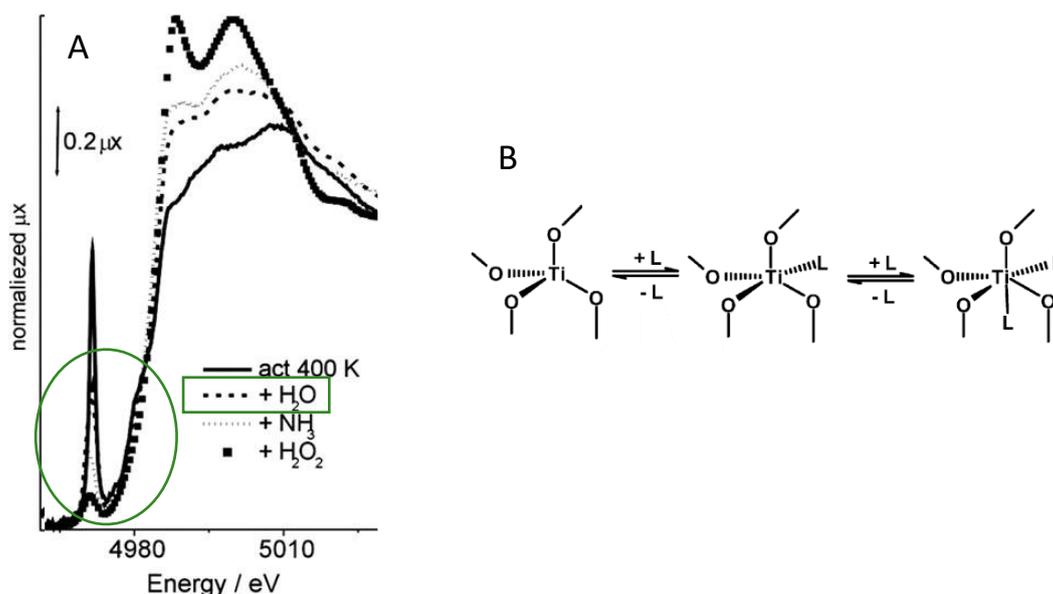


Figure 120: A : Spectre XANES d'une zéolithe TS-1 montrant l'effet de l'interaction de ligands dont l'eau sur la coordinence du Ti(IV) et B : Capacité de Ti (IV) dans TS-1 à modifier de manière réversible (ou presque réversible) son environnement local par interaction avec des ligands forts (L = H₂O ou NH₃) [15]

De plus les différentes espèces correspondant à des sites Ti ouverts indiquent bien que les espèces de Ti sont moins confinées que dans la TS-1 originale et donc que le milieu environnant Ti doit être plus hydrophile [3]. Enfin, il est intéressant de noter également que les similitudes entre les spectres de TS-1 et MCF-Ti appuient le fait que ce dernier catalyseur est constitué majoritairement d'espèces Ti tétraédriques.

Pour résumer, le matériau TS-1 synthétisé présente les caractéristiques attendues pour cette zéolithe, ce qui devrait lui conférer une activité catalytique importante lors des essais d'oxydation à venir. Concernant l'autre matériau, TS-1-d, les différentes caractérisations telles que les mesures de sorption, la DRX ou la MET ont montré une création évidente de mésoporosité mais également la création de sites Ti hors réseaux (DRUV et XANES). D'après la littérature, il semblerait qu'une étape de

recristallisation après l'attaque basique permette de conserver de manière plus importante la structure cristalline de TS-1, notamment l'espèce Ti(IV), tout en assurant une mésoporosité évidente [3, 7, 19]. Cela dit, la conservation d'une partie de la structure cristalline de départ, observée sur les images MET (Figure 121) et les analyses DRX, pourrait abriter les sites Ti(IV) nécessaires aux réactions d'oxydation, alors que le reste de la structure ouverte permettrait d'insérer la GOx et également une diffusion plus importante des réactifs que dans TS-1.

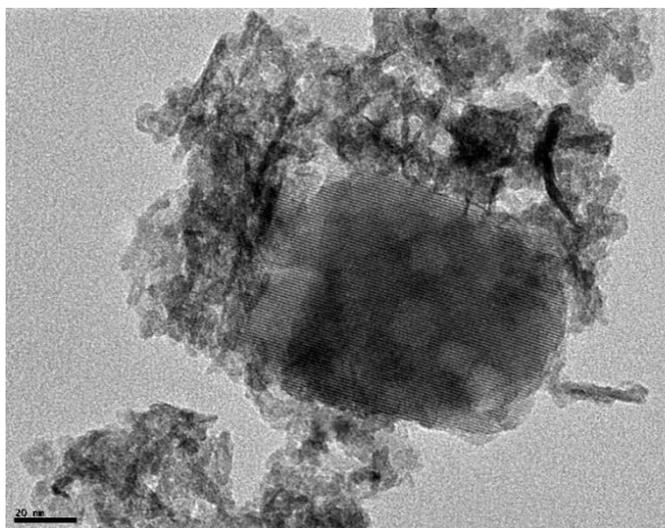


Figure 121 : Image MET témoignant de la conservation d'une partie de la structure cristalline après désilication

En effet, même si l'estimation de la taille de pore n'est que de 6 nm, la structure très ouverte visible sur les images de microscopie laisse penser que certaines zones du matériau pourraient être accessibles à la GOx.

2.1.2. Caractérisations du matériau TS-1@MCF-Ti

Le matériau MCF-Ti a subi un ou deux traitements post-synthèse successifs visant à déposer un revêtement de cristaux de TS-1 selon le protocole établi par l'équipe de Kaliaguine [2]. Comme décrit par ces auteurs, un premier *coating*, puis un second ont été effectués conduisant respectivement aux matériaux composites TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti². L'objet de cette partie est d'essayer de prouver que l'objectif visé a bien été atteint en croisant les informations obtenues via différentes techniques de caractérisation (MET, BET, DRX, DRUV et Fluorescence X). La difficulté ici réside dans le fait que les cristaux attendus sont supposés être de petite taille et produits en faible quantité, rendant délicate leur mise en évidence.

La Figure 122 ci-dessous montre un cliché MET du matériau MCF-Ti de référence. Les Figures 123 et 124 correspondent aux clichés des échantillons TS-1@MCF-Ti obtenus respectivement directement et après coupe au microtome. Conformément à ce qui a été rapporté dans la littérature pour ce type de matériau [2], aucun gros cristal de TS-1 n'est visible sur les clichés.

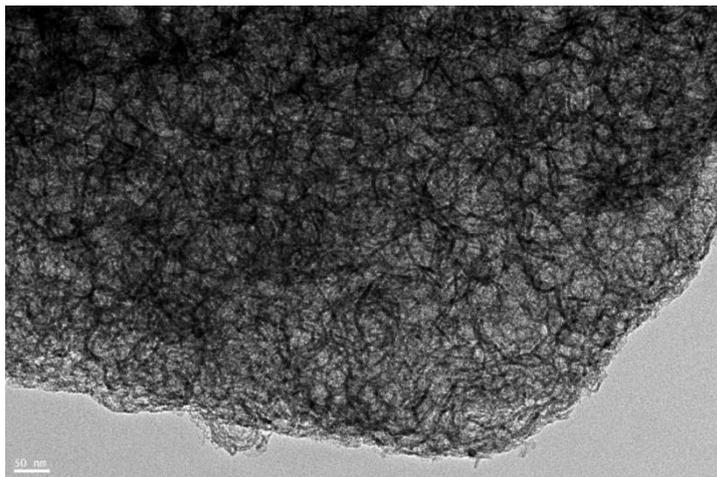


Figure 122: Cliché MET du matériau MCF-Ti de départ. Barre d'échelle : 50 nm

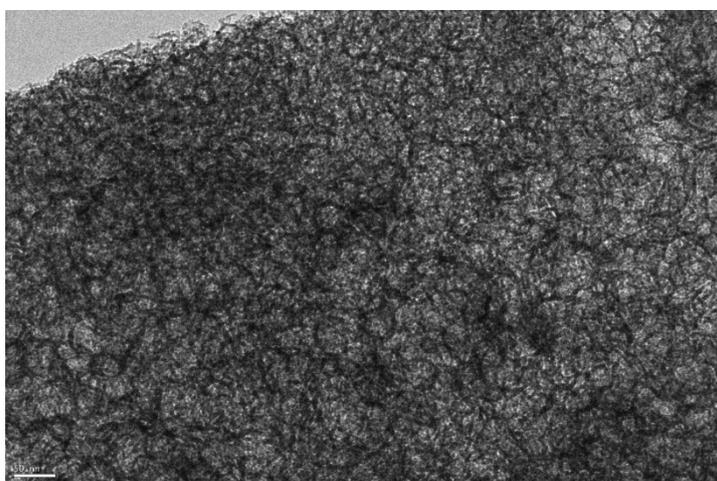


Figure 123: Cliché MET du matériau obtenu, TS-1@MCF-Ti. Barre d'échelle : 50 nm

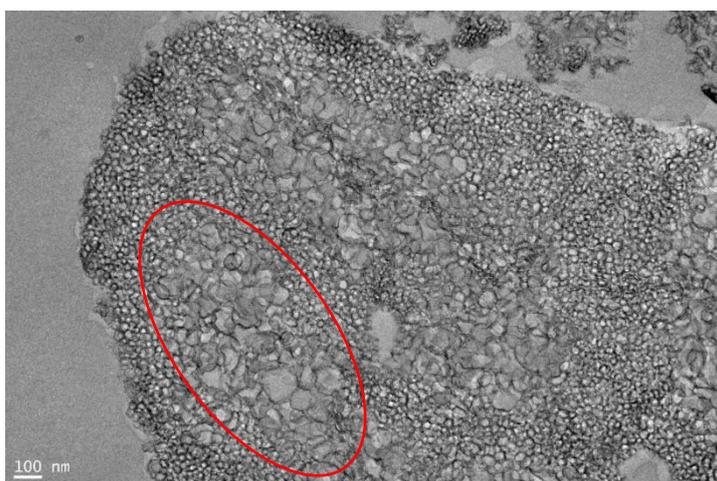


Figure 124: Coupe au microtome d'un échantillon du solide TS-1@MCF-Ti observé par MET. Barre d'échelle : 100 nm

Si la zéolithe est présente, cela doit donc être sous la forme de nano-cristaux. Il est possible de voir entre les Figures 122 et 123 que la matière semble être devenue plus dense. Ceci peut s'expliquer par une présence uniforme de zéolithe sur les parois initialement amorphes du matériau de départ. Cependant, il s'agit de rester prudent quant à l'interprétation de ces images qui ne sont pas réellement explicites tout comme d'ailleurs celles de l'étude à laquelle nous nous sommes référés. La Figure 124

semble montrer des zones au niveau desquelles les cellules se sont déformées et où la mésoporosité apparaît plus importante (un exemple cerclé en rouge). Ce phénomène pourrait être expliqué par le traitement subi par le solide MCF-Ti au contact avec le gel de TS-1 ainsi qu'à l'étape de calcination finale ou bien lors de la découpe au microtome. En effet, un cliché du matériau de départ aurait dû être pris dans les mêmes conditions afin de pouvoir correctement conclure sur l'apparition de cette mésoporosité. Par manque de temps, il n'a pas été possible de procéder à cette analyse.

Les paramètres texturaux du matériau TS-1@MCF-Ti ont été obtenus par des mesures de sorption de N₂ et comparés à ceux du matériau de départ. La Figure 125 et le Tableau 24 ci-dessous regroupent ces analyses.

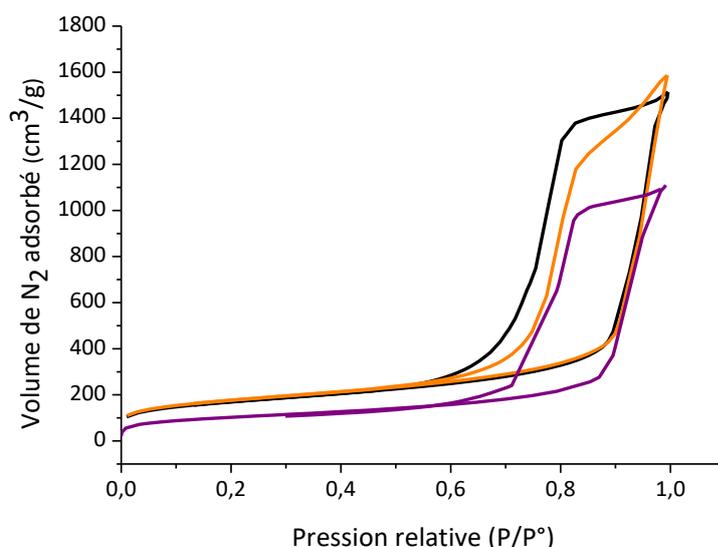


Figure 125: Isothermes d'adsorption/désorption de **MCF-Ti**, **TS-1@MCF-Ti** et **TS-1@MCF-Ti²**

Tout comme MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti² présentent des isothermes de type IV avec une hystérésis de type H1 caractéristiques d'un matériau mésoporeux où l'adsorption augmente aux alentours de $P/P^0 = 0,6$. Les trois isothermes sont relativement semblables. L'apparition d'une microporosité est visible uniquement sur les isothermes de TS1@MCF-Ti² (au niveau de $P/P^0 < 0,01$). Cela pourrait sembler normal aux vues des images MET puisque la zéolithe TS-1 aurait été introduite sous forme de nanocristaux à l'intérieur du matériau hôte. L'équation Horvath-Kawazoe appliquée aux valeurs obtenues pour TS-1@MCF-Ti² a permis de montrer des micropores de l'ordre de 0,69 nm.

Tableau 24 : Paramètres texturaux des matériaux MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti²

Catalyseur	S_{BET} (m ² /g)	$\phi_{cellule}$ (nm)	$\phi_{fen\hat{e}tre}$ (nm)	$V_{m\acute{e}so\text{porosité}}$ (cm ³ /g)
MCF-Ti	619	37,1	11,6	2,0
TS-1@MCF-Ti	598	37,3	11,1	2,1
TS-1@MCF-Ti²	356	24,7	9,6	1,2

Tout comme dans les travaux de l'équipe de Kaliaguine sur lesquels nous nous sommes appuyés, les paramètres texturaux diminuent au cours des étapes de dépôts [2]. La surface spécifique de leur matériaux MCF-Ti et après deux « *coatings* » passent de 675 à 420 m²/g et la taille des pores de 30,5 nm à 24,5 nm. Dans notre cas, les paramètres texturaux sont proches pour MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti, tandis qu'un changement plus significatif est également visible au niveau de TS-1@MCF-Ti², avec une diminution de tous les paramètres texturaux : la diminution de moitié de S_{BET} ainsi que les nouvelles dimensions des cellules (24,7 nm) et des fenêtres (9,6 nm) témoignent de la formation de nanocristaux de TS-1 dans le matériau. Les tailles des pores restent cependant du même ordre de grandeur que la GOx. Comme expliqué par De Moore et *al.* [20], la synthèse d'une zéolithe de type MFI commence par la formation d'unités primaires de 2,8 nm. La seconde étape est l'agrégation des unités primaires pour donner des particules de 10 à 15 nm. Cette étape est essentielle dans la formation de germes viables. Puis, l'agrégation de ces unités conduit à la croissance cristalline. Dans le cas présent, des nanocristaux primaires de quelques nanomètres seulement et donc difficilement détectables par les méthodes précédentes pourraient avoir été formés au niveau des parois des mésopores du matériau MCF-Ti. Ces derniers auraient subsisté du fait que, contrairement aux conditions classiques en solution, ceux-ci auraient vu leur diffusion limitée et donc également leur agrégation pour donner de plus gros cristaux.

Des mesures de DRX ont également été effectuées sur ces échantillons (Figure 126). L'idée est de confirmer l'absence de cristaux de grande taille et d'obtenir une information qualitative sur la taille des nanocristaux à condition que la « concentration » de ces derniers soit suffisante.

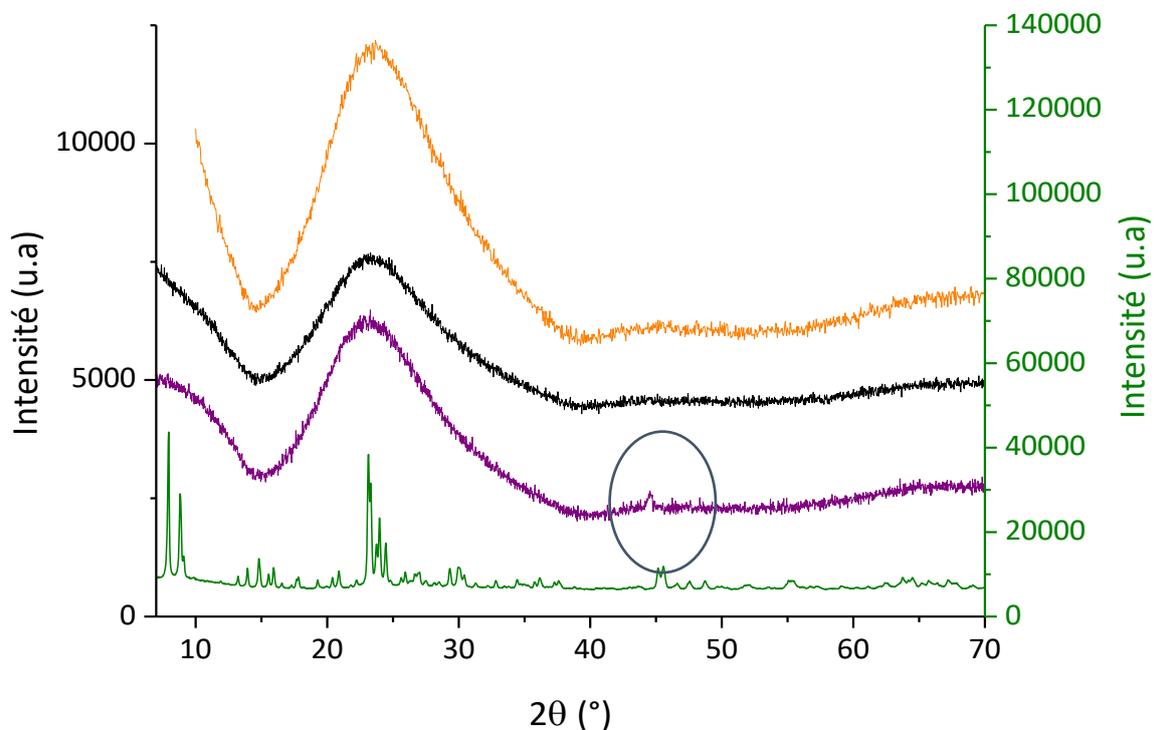


Figure 126 : Comparaison des diffractogrammes de MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti² et TS-1

Normalement, la formule de Scherrer permet d'estimer des tailles de domaines cristallins comprises entre 2 et 100 nm. Les mesures comparatives des trois matériaux TS-1@MCF-Ti², TS-1@MCF-Ti et MCF-Ti sont présentées sur la figure ci-dessous. En règle générale, les diffractogrammes présentent le même

profil, typique d'un matériau amorphe, cependant sur celui de TS-1@MCF-Ti² apparaît un pic de diffraction autour de $2\theta = 45^\circ$, qui pourrait être caractéristique d'une structure cristalline, bien que décalé comparé à celui de la zéolithe. Ce pic confirmerait la présence de nanocristaux, même si le reste des pics de diffraction caractéristiques de la TS-1 ne sont pas visibles. Nous suggérons ici, par croisement avec les données de la MET, que les nanocristaux de TS-1, formés, ont *a priori* une taille proche de 2 nm, les rendant difficilement détectables.

Des mesures par spectroscopie UV-visible en réflexion diffuse ont également été effectuées et sont disponibles Figure 127 ci-dessous. Il a pu être observé que les deux traitements visant à déposer des nanocristaux de TS-1 tendent à décaler le maximum d'absorbance du matériau MCF-Ti vers les plus faibles longueurs d'onde. Le maximum d'absorbance pour TS-1@MCF-Ti² se retrouve compris entre ceux enregistrés pour les solides MCF-Ti de départ et TS-1. De même, le seuil d'absorbance s'est décalé vers les plus faibles longueurs d'onde, appuyant l'idée d'une insertion de Ti dans des sites de coordination proches de celui de la zéolithe TS-1. Un pic autour de 210 nm caractéristique de la présence de Ti(IV) est attendu, comme pour la zéolithe TS-1. Les pointillés présentent le maximum de pic d'absorption pour chacun des trois matériaux. Pour le matériau TS-1@MCF-Ti² celui-ci est décalé à 226 nm, mais un faible épaulement à 210 nm est discernable contrairement à MCF-Ti. Le faible épaulement à 261 nm témoignant d'une faible présence de titane sous forme octaédrique dans MCF-Ti, n'est plus visible sur le matériau TS-1@MCF-Ti² [21]. Les étapes de cristallisation ont pu changer la structure du matériau. Finalement, l'introduction de nanocristaux de TS-1 est également validée par cette technique.

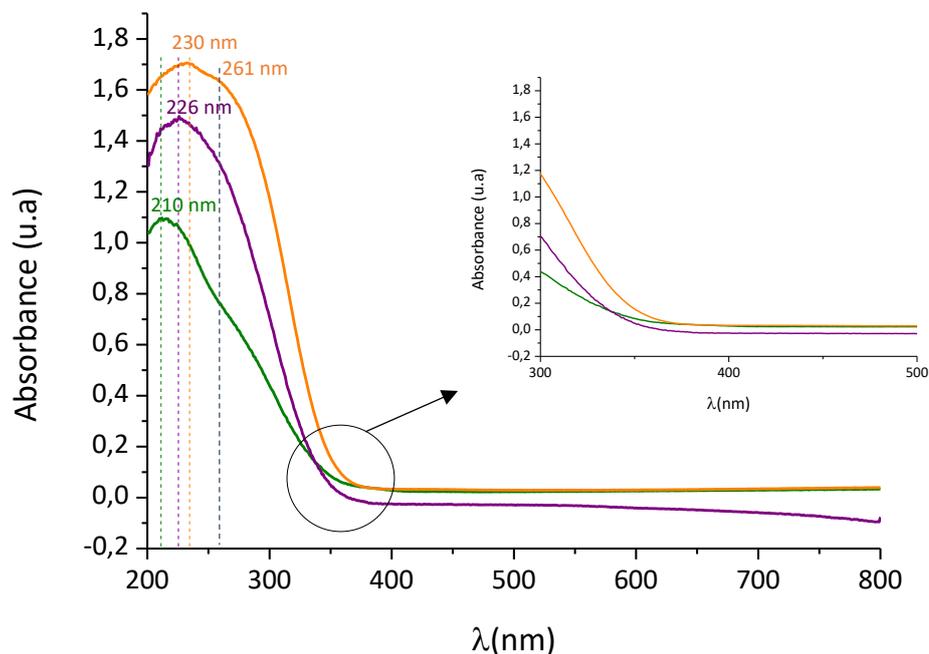


Figure 127: Spectres DRUV des matériaux **TS-1**, **TS-1@MCF-Ti²** et **MCF-Ti**

Enfin, l'évolution des quantités respectives de Si et Ti dans ces différents matériaux a été suivie par fluorescence X. Le tableau ci-dessous reporte les résultats obtenus pour les solides MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti².

Tableau 25 : Pourcentages massiques de Si et Ti obtenus par fluorescence X et rapports molaires Si/Ti pour les matériaux MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti²

Matériau	Ti (% mass.)	Si (% mass.)	Si/Ti (molaire)
MCF-Ti	3,5	44,4	21,2
TS-1@MCF-Ti	2,0	46,4	40,0
TS-1@MCF-Ti ²	1,5	46,5	53,0

D'après ces valeurs, il semblerait que le post-traitement de MCF-Ti ait pour conséquence un lessivage abondant du titane malgré un apport complémentaire de ce dernier dans le milieu réactionnel, tandis que la quantité de Si se rapproche petit à petit de celle attendue pour une silice pure (46,7%). Cela expliquerait également l'affaiblissement d'intensité observée sur les spectres UV-DR. Dans la publication sur laquelle nous nous sommes appuyés pour la synthèse de ces matériaux [2], les rapports atomiques obtenus par spectroscopie d'absorption atomique ne varient pas, contrairement à dans notre cas. Ici, le rapport Si/Ti a ainsi été multiplié par deux lors du premier *coating*. Les étapes de traitement hydrothermal et de calcination mises en œuvre dans le cadre du *coating* sont *a priori* responsables des pertes en titane. Ces dernières pourraient avoir été facilitées dans notre cas du fait que le titane a été inséré plutôt en surface du matériau lors de la préparation post-synthèse MCF-Ti à partir de MCF. Lors du second *coating*, la diminution de la quantité de Ti est moins importante comparé à celle entre le solide de départ et après le premier *coating*. Avec l'appui des données UV-Vis. (Figure 127), il est possible de supposer que les espèces Ti octaédriques qui étaient dans MCF-Ti ont été éliminées. Or le Ti octaédrique peut provoquer la dismutation de H₂O₂, ce qui dans le contexte de la réaction d'époxydation visée est un inconvénient. Les matériaux TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti² obtenus sont donc de meilleure qualité de ce point de vue après les opérations de revêtement, puisque les espèces Ti restantes sur le solide sont constituées de plus en plus majoritairement d'espèces tétraédriques.

Pour résumer, il apparaît que la composition du matériau MCF-Ti de départ ait été fortement modifiée par ces deux étapes de *coating* successives et que les différentes techniques de caractérisation utilisées afin de déceler la présence de cristaux de TS-1 introduits dans la MCF-Ti, aient été poussées à leurs limites du fait de la taille présumée des nano-cristaux attendus (< 4 nm). Des analyses d'absorption des rayons X auraient été utiles dans ce cas-là, mais n'ont pas pu être effectuées. Cependant, la diminution des coefficients BET pour les matériaux préparés nous apparaît comme être une preuve crédible de la formation de ces cristaux hydrophobes au sein du matériau de départ. Les essais d'oxydation devraient également apporter une preuve indirecte de ces modifications.

2.1.3. Comparaison du caractère hydrophobe/hydrophile des matériaux TS-1, TS-1-d, MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti

Les coefficients C_{BET} sont supposés caractériser un état de surface, par exemple la balance hydrophile/hydrophobe de cette dernière. Les équations s'appuyant sur la méthode BET et utilisées pour calculer ce coefficient sont présentées Chapitre II, point 1.5. Rappelons que plus ces coefficients sont faibles et plus le matériau devrait présenter des propriétés hydrophobes [22].

Cependant, la comparaison entre supports microporeux et mésoporeux, par exemple TS-1 et MCF-Ti, apparaît ne pas avoir de sens. Il est plutôt conseillé de comparer les valeurs de C_{BET} au sein de séries de matériaux homologues sous peine d'arriver à des conclusions faussées. Même si les coefficients C_{BET} informent qualitativement sur le caractère hydrophobe d'un matériau par rapport à un autre, ils sont issus d'un modèle et spécifiques de l'adsorption de N_2 . Nous avons donc pensé avoir recours à d'autres approches, en particulier la microcalorimétrie [23, 24] mais il apparaît que dans ce cas également les comparaisons doivent être faites pour des supports équivalents. La mesure d'angle de contact pourrait s'avérer efficace dans ce cas de figure, mais nécessite un dispositif bien particulier pour l'analyse de poudres [25]. Aussi, avons-nous décidé d'utiliser une méthode complémentaire de caractérisation de l'hydrophobicité du support en mesurant directement la capacité des matériaux préparés à retenir l'eau. Pour ce faire, les solides étudiés ont été placés dans une enceinte saturée en eau pendant 7 jours puis analysés par ATG afin d'évaluer leur perte en eau.

Les courbes d'ATG Figure 128, illustrent les différents comportements d'adsorption de l'eau selon le type de matériaux : MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti², TS-1-d ou TS-1.

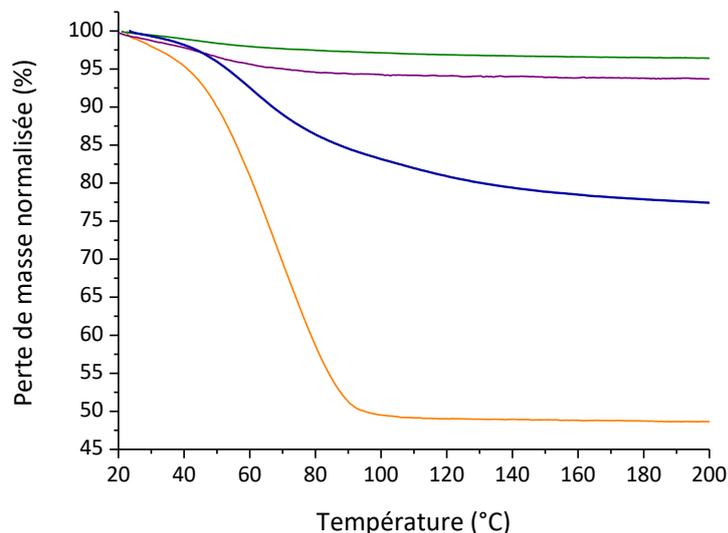


Figure 128: Comparaison de la perte de masse en eau pour MCF-Ti, TS-1, TS-1-d et TS-1@MCF-Ti². Mesures effectuées de 24 à 900°C, sous 100 mL/min d'air avec une rampe en température de 10°C/min

Les valeurs de quantités d'eau adsorbées sont rapportées dans le Tableau 26 avec les C_{BET} . Les valeurs de C_{BET} sont du même ordre de grandeur, à savoir environ compris entre 200 et 300, ce qui augure de surfaces de nature équivalente sur le plan de la balance hydrophile/hydrophobe. Ce n'était pas le cas de la zéolithe TS-1 de départ pour laquelle la valeur de C_{BET} était même négative. Pour être pertinente, la comparaison des coefficients BET doit se faire entre matériaux de morphologie proche, à savoir ici présentant une structure mésoporeuse. Le coefficient le plus élevé, correspondant donc au matériau le plus hydrophile est celui de MCF-Ti. Nous pouvons constater que ce coefficient diminue après les étapes de recouvrement de ce matériau par la zéolithe TS-1, s'expliquant par le fait que la zéolithe est plus hydrophobe que MCF-Ti. La diminution de ce coefficient est donc cohérente avec l'hypothèse de la présence de nanocristaux de TS-1 sur MCF-Ti. Le coefficient de la zéolithe TS-1 obtenu après un traitement de désilication est passé positif. La création de mésoporosité rend le matériau TS-1-d plus hydrophile que la zéolithe de départ, mais il est le plus hydrophobe des matériaux de la série, après TS-1 si on s'en réfère à sa valeur de C_{BET} .

Tableau 26: Evolution du coefficient C_{BET} et de la quantité de H_2O adsorbée pour une série homologue de matériaux MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti, TS-1@MCF-Ti², TS-1-d et TS-1

Catalyseur	Coefficient C_{BET}	$\mu\text{moles de H}_2\text{O/m}^2$
MCF-Ti	324	42,2
TS-1@MCF-Ti	283	n.d.
TS-1@MCF-Ti ²	238	5,9
TS-1-d	184	27,4
TS-1	/	5,3

D'après les mesures d'adsorption d'eau, il apparaît très clairement que les matériaux TS-1 et TS-1@MCF-Ti² ont un comportement similaire alors que le solide MCF-Ti adsorbe largement plus de molécules d'eau, ce qui témoigne du caractère hydrophile prononcé de sa surface. Cette dernière adsorbe environ huit fois plus de molécules d'eau que celle des deux autres matériaux. La modification du solide MCF-Ti par le double dépôt de nano-cristaux de TS-1 semble ainsi confirmée. Concernant TS-1-d, l'adsorption de H_2O est cinq fois plus importante après la création de mésoporosité dans cette zéolithe. Cependant, ce dernier solide reste plus hydrophobe que MCF-Ti (27 μmol de H_2O adsorbées contre 42 μmol), caractère que l'on cherche à conserver pour les essais d'époxydation.

Le caractère hydrophobe des matériaux évolue de la manière suivante MCF-Ti < TS-1@MCF-Ti < TS-1@MCF-Ti² < TS-1-d < TS-1 selon l'étude des C_{BET} , tandis que l'analyse de la quantité d'eau adsorbée en surface montre l'évolution suivante : MCF-Ti < TS-1-d < TS-1@MCF-Ti² ≤ TS-1. La méthode d'adsorption de H_2O nous paraissant plus représentative du comportement des matériaux étudiés en présence de milieux aqueux, on privilégie les résultats issus de cette technique pour conclure que le *coating* de MCF-Ti par la zéolithe apparaît comme la méthode la plus efficace pour obtenir un matériau mésoporeux hydrophobe.

2.2. TS-1 : Epoxydation du cyclohexène par H_2O_2

Les premiers essais d'époxydation ont pour objectif de tester la zéolithe TS-1 que nous avons synthétisée, afin de s'assurer de sa réactivité (paragraphes 2.2., 2.3. et 2.4.1.). La réaction catalysée est l'époxydation du cyclohexène. De nombreux exemples de travaux relatent l'époxydation de cette molécule par H_2O_2 en présence de la zéolithe TS-1. Dans la mesure où son diamètre hydrodynamique est de 0,2 nm^{22} [26], elle est en mesure d'atteindre les sites catalytiques à l'intérieur de la zéolithe dont les pores sont de l'ordre de 0,6 nm. Les tests ont d'abord été effectués dans un

²² Le rayon hydrodynamique maximum dans le cyclohexane (au lieu du MeOH) est de 0,164 nm et il a été arrondi à 0,2 nm.

milieu organique (MeOH pur) à 50°C, en ajoutant manuellement H₂O₂ commercial (30% mass.). Les mêmes essais ont été réalisés ensuite en présence de tampon acétate pH = 6, 100 mM.

Le cyclohexène a été préféré ici au cyclooctène pour des raisons de solubilité en milieu hydro-organique. L'alcène en C6 devrait en effet être plus soluble dans ce genre de milieu que le cyclooctène, ce qui pourrait être avantageux du point de vue de la réactivité mais également du suivi réactionnel. Dans ces conditions, nous avons espoir que, du fait du caractère hydrophobe de TS-1, l'alcène sera plus enclin à s'adsorber sur la surface de la zéolithe plutôt que de rester dans un milieu non favorable.

En dehors de l'époxyde attendu, d'autres composés sont envisagés, parmi lesquels des produits d'ouverture de cycle en lien avec le caractère légèrement acide de la zéolithe. En présence d'eau, dans un milieu hydro-organique, du 1,2-cyclohexanediol peut être formé. En présence de méthanol s'ajoutera le 2-méthoxycyclohexanol (Figure 129). Du point de vue des processus d'oxydation, il faut compter également sur l'obtention des composés allyliques tels que le cyclohexène-1-ol et le cyclohexène-1-one, lesquels sont plutôt issus de réactions parallèles impliquant une chimie radicalaire (autoxydation) [27, 28].

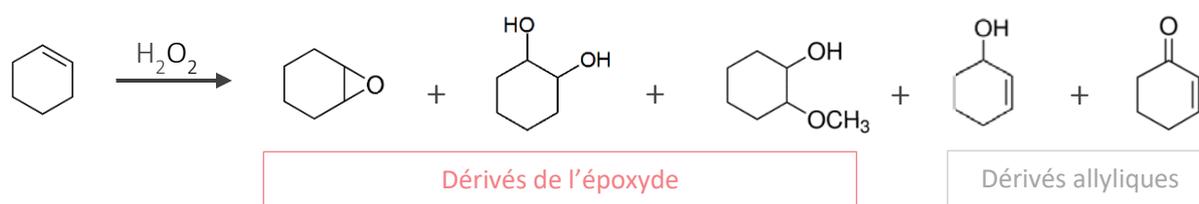


Figure 129: Produits susceptibles d'être obtenus lors de l'oxydation du cyclohexène par H₂O₂ dans un milieu MeOH/H₂O

2.2.1. Epoxydation dans le méthanol

L'activité catalytique de la zéolithe TS-1 a d'abord été testée à 50°C, dans du méthanol, bon solvant pour l'oxydation d'alcènes avec TS-1 selon Corma et *al.* [29] et en procédant à trois ajouts manuels de H₂O₂ (30% mass.) séparés d'une heure d'intervalle chacun. Le suivi temporel de la conversion du cyclohexène et de la sélectivité en époxyde dans ces conditions est présenté Figure 130.

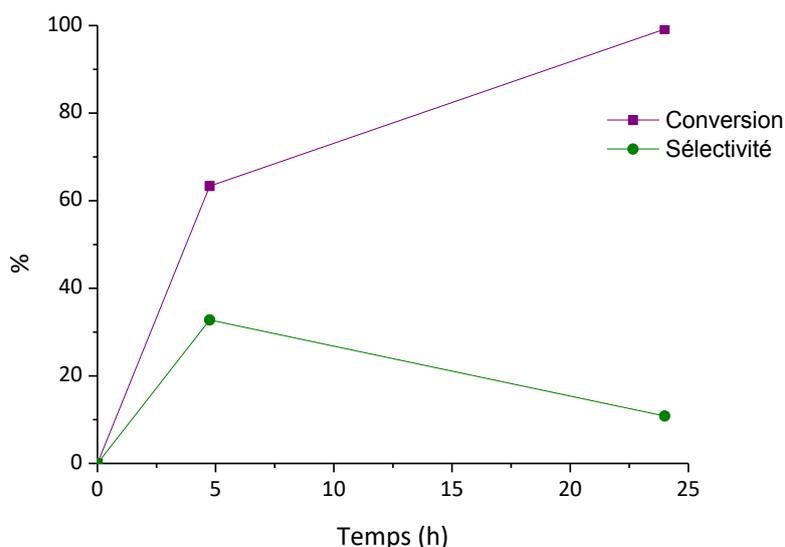


Figure 130: Epoxydation du cyclohexène en présence de TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) dans MeOH à 50°C. H₂O₂/substrat (5 : 1 mol.), Ti/substrat (1 : 4 mol.) et Ti/H₂O₂ (1 : 19 mol.) pour [cyclohexène] = 50 mM

Comme attendu la conversion du cyclohexène augmente avec le temps ; elle est totale après 24 h de réaction. La sélectivité en époxyde quant à elle est maximale après 5 h et diminue après 24 h. Elle passe de 33 à 11%. Cette tendance s'accompagne de l'apparition de produits d'ouverture : le 2-méthoxycyclohexanol d'une part et le 1,2-cyclohexanediol d'autre part. Le second résulte de l'ouverture de l'époxyde par H₂O pour donner le diol. En effet, de l'eau est présente parce qu'il s'agit d'une part du co-solvant de H₂O₂ et d'autre part parce qu'il en est produit suite à la réduction de H₂O₂. Un test témoin effectué dans les mêmes conditions (avec de l'époxyde au lieu de l'alcène) mais sans ajout d'oxydant, a montré que la solvolysé (apparition du 2-méthoxycyclohexanol) est bien le résultat de l'ouverture du cycle oxirane par le méthanol catalysée par la zéolithe TS-1.

La Figure 131 ci-dessous montre les rendements et sélectivités en époxyde et ses dérivés après 24 h de réaction.

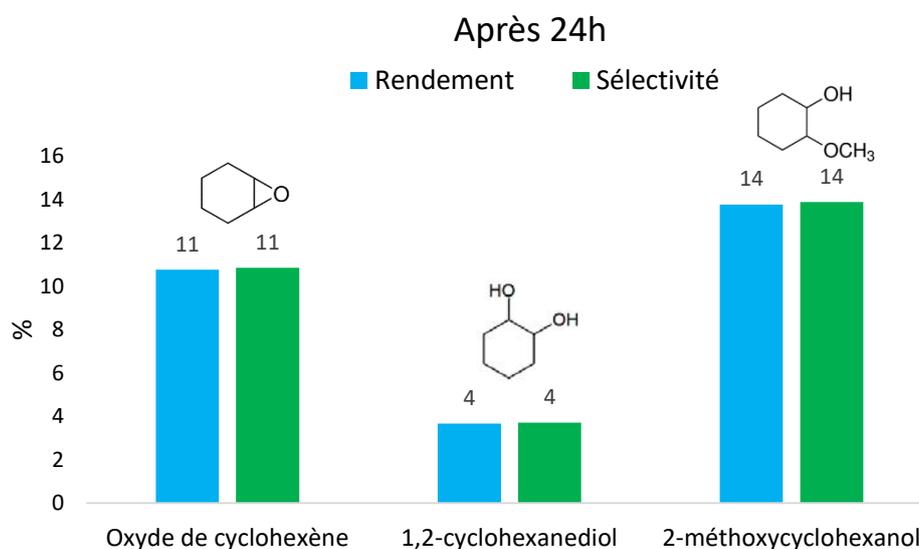


Figure 131: Rendements et sélectivités des produits d'époxydation du cyclohexène en présence de TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) dans MeOH à 50°C. H₂O₂/substrat (5 : 1 mol.), Ti/substrat (1 : 4 mol.) et Ti/H₂O₂ (1 : 19 mol.) pour [cyclohexène] = 50 mM

Après 24 h, le 2-méthoxycyclohexanol est le produit majoritaire avec 14% de rendement contre 11% pour l'époxyde et environ 4% pour le 1,2-cyclohexanediol. L'activité de la zéolithe TS-1 que nous avons synthétisée est plutôt raisonnable en comparaison avec celle d'autres zéolithes TS-1 équivalentes utilisées dans des conditions proches. Cela est lié en partie au choix de nos conditions dans lesquelles le ratio Ti/substrat est plutôt favorable (1 : 4 mol.). Fan et *al.* [30] ont, par exemple, fait état d'un taux de conversion de seulement 1% après 4 h de réaction à 60°C dans du MeOH, soit une température de 10°C supérieure et pour 1 h de temps de réaction supplémentaire par rapport à nos conditions mais en travaillant avec un catalyseur moins riche en titane (Si/Ti = 60), un rapport H₂O₂/cyclohexène équimolaire et un rapport molaire de Ti/substrat de 1 : 1000.

Ici, en apparence, le bilan de matière n'est pas bouclé. Des expériences témoin ont été effectuées dans les mêmes conditions²³ en présence ou non de catalyseur et sans ajouter l'oxydant. Ces dernières ont montré qu'une partie du cyclohexène introduit à t = 0 s'adsorbe sur le solide (environ 42%). Aussi la conversion ramenée à 100% du cyclohexène introduit est erronée ; sa valeur doit être corrigée pour tenir compte des problèmes d'adsorption ce qui donnerait plutôt 60%. En prenant compte cela, le bilan de matière n'est pas encore tout à fait bouclé. Cela peut s'expliquer par

²³ Témoin 1 : cyclohexène, 2-hexanone, MeOH et Témoin 2 : cyclohexène, 2-hexanone, MeOH et TS-1

le caractère hydrophile des produits obtenus, qui en milieu organique s'adsorbent eux aussi à la surface du catalyseur. Entre les descripteurs « rendement » et « sélectivité », le rendement, qui n'est pas défini par rapport à la quantité de substrat consommé, est *a priori* la grandeur la plus adaptée pour rendre compte correctement de l'évolution du système. Ce sera la seule à laquelle nous nous référerons dans le cas des milieux hydro-alcooliques et des alcènes organosolubles.

2.2.2. Epoxydation en milieu MeOH/tampon acétate

L'effet de l'introduction de 40% de tampon acétate, rendue nécessaire pour les futurs essais avec l'enzyme, a été étudié dans les mêmes conditions. Les courbes ci-dessous Figure 132 montrent les évolutions des rendements en époxyde dans un milieu 100% MeOH et MeOH/tampon acétate (v/v) 60 : 40, sur une durée de 24 h. Ici, les courbes de rendement en époxyde ont sensiblement la même allure, à savoir en cloche. Comme attendu, l'ajout d'eau (via le tampon) dans le milieu d'époxydation a pour conséquence d'accélérer l'ouverture de l'époxyde (Figure 132). En effet, contrairement au milieu purement organique où le rendement en époxyde est maximal après 6 h de réaction, en présence d'eau dès 3 h de réaction, le rendement commence à diminuer pour devenir nul après 24 h.

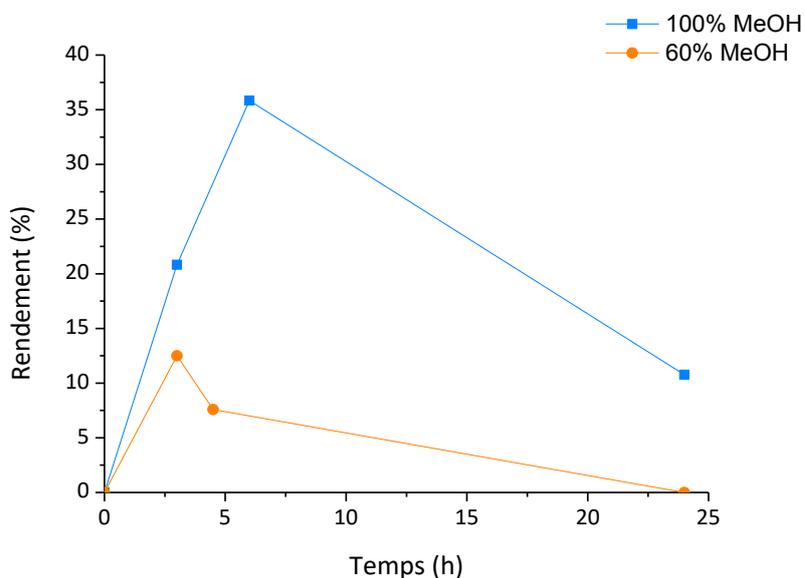


Figure 132: Epoxydation du cyclohexène avec TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) dans un mélange 60% MeOH et 100% MeOH à 50°C. H₂O₂/substrat (5 : 1 mol.), Ti/substrat (1 : 4 mol.) et Ti/H₂O₂ (1 : 19 mol.) pour [cyclohexène] = 50 mM

L'apparition de produits d'époxydation montre que la zéolithe TS-1 conserve malgré tout une certaine activité.

Le diagramme Figure 133 regroupe les rendements des différents produits obtenus après 24 h dans les milieux réactionnels comprenant respectivement 60% et 100% de MeOH. Le rendement global en produits d'oxydation et d'ouverture de cycle oxirane est de 46% en milieu hydro-organique alors qu'il est de 30% en milieu organique. Cela pourrait s'expliquer par l'affinité des produits avec l'eau, contenue à présent dans le milieu réactionnel, diminuant sans doute leur adsorption sur le solide.

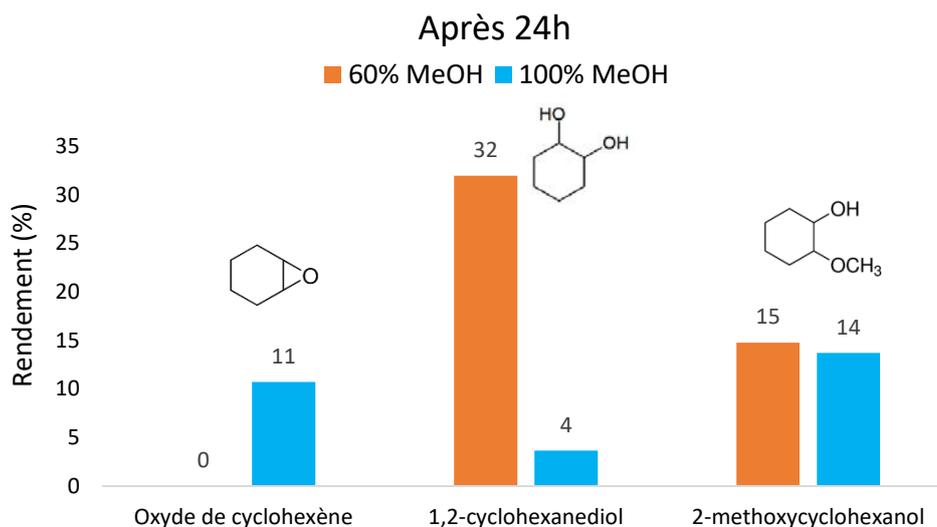


Figure 133: Rendements des produits obtenus après 24h de réaction dans 60% MeOH et 100% MeOH avec TS-1 (Si/Ti = 31 mol.), H₂O₂/substrat (5 : 1 mol.), Ti/substrat (1 : 4 mol.) et Ti/H₂O₂ (1 : 19 mol.) pour [cyclohexène] = 50 mM

En solvant hydro-alcoolique, le 1,2-cyclohexanediol est le produit désormais majoritaire avec environ 32% de rendement, suivi du 2-méthoxycyclohexanol, avec un rendement d'environ 15%. Après 24 h de réaction, l'époxyde a été complètement ouvert, tandis que dans 100% de MeOH, le rendement en époxyde est encore de 11%.

Pour conclure, les essais détaillés dans les paragraphes 2.2.1 et 2.2.2 ont montré la faisabilité de la réaction d'époxydation du cyclohexène y compris en présence d'eau lorsque le catalyseur utilisé est la zéolithe TS-1, alors que le solide mésoporeux, MCF-Ti, était inefficace pour l'époxydation d'un cycloalcène homologue, le cyclooctène dans les mêmes conditions (cf. chapitre II).

2.3. Oxydations chimio-enzymatiques: couplage de la zéolithe TS-1 avec la GOx immobilisée sur MCF-NH₂

Les essais présentés au point ci-dessus ont prouvé que la zéolithe TS-1 pouvait conserver une certaine activité catalytique en forte présence d'eau (40%) permettant l'oxydation du cyclohexène. La structure de la zéolithe TS-1 rendant impossible l'insertion de la GOx à l'intérieur du matériau, une première approche du système catalytique tandem a consisté à utiliser la zéolithe associée à la GOx immobilisée au sein de la porosité du solide MCF-NH₂. Un tel mélange mécanique devrait pouvoir fonctionner en milieu aqueux ou hydro-organique. Dans le second cas en particulier, l'enzyme sera ainsi stabilisée dans des conditions de solvant et de température défavorables sinon à son usage, mais nécessaires pour la réaction en cascade. Il est attendu de plus que cet ensemble de catalyseurs se comporte comme un catalyseur hétérogène et puisse être réutilisé, après filtration du mélange en fin de réaction. S'est posée alors la question de la quantité d'enzyme immobilisée à introduire pour atteindre notre objectif. En première approche, nous avons pris le parti de travailler dans la plupart des cas avec 15 U de MCF-NH₂-GOx, soit environ 6 mg²⁴ de solide, ajoutés au début de la réaction, soit une production de 15 μmol de H₂O₂/min en présence d'une concentration de glucose saturante.

²⁴ Ratio massique MCF-NH₂-GOx/TS-1 (1 : 8,3).

Théoriquement, la GOx aura produit l'équivalent de la quantité de substrat (100 μmol) en environ 7 min et un excès de 5 fois plus de H_2O_2 en quasiment 35 min.

Pour faciliter l'étude et établir une preuve de concept, il a paru plus judicieux de tester d'abord l'oxydation de substrats hydrosolubles tels que le prop-2-ène-1-ol, le but-3-ène-2-ol. Dans un second temps, d'autres essais ont été effectués en conditions moins favorables en termes de solubilité, en utilisant le cyclohexène permettant ainsi d'élargir le champ d'application du système catalytique tandem mis au point. Les paramètres tels que la concentration de glucose, la quantité de GOx ou même l'ajout d'un surfactant pour améliorer la solubilité, seront étudiés.

2.3.1. Epoxydation des alcools allyliques

Parmi les alcènes abondamment étudiés en catalyse d'époxydation, en particulier avec Ti, figurent les alcools allyliques. Ces derniers, de par la présence de la fonction alcool ont plus d'affinité pour l'eau, en particulier ceux à faible nombre d'atomes de carbone. Il est de plus reconnu que la présence de la fonction alcool, en position allylique, capable de se coordiner au titane peut constituer un facteur favorable sur le plan mécanistique, comme l'a montré Sharpless [31]. Dans le contexte de notre étude, l'hydro-solubilité des plus petits d'entre eux est un réel avantage. En effet, les tests d'époxydation pourront être effectués dans le tampon acétate (pH = 6, 100 mM). Nous nous intéresserons en particulier à l'époxydation du prop-2-ène-1-ol (R = H) et du but-3-ène-2-ol (R = Me) (Figure 134).

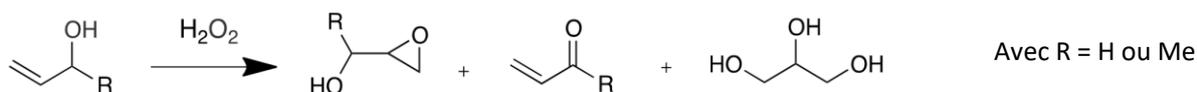


Figure 134: Produits possibles lors de l'oxydation d'alcools allyliques par H_2O_2

Le glycérol issu du glycidol, l'époxyde dérivé du prop-2-ène-1-ol est utilisé dans de nombreux domaines tels que pharmaceutique, cosmétique, alimentaire ou comme plastifiant et lubrifiant. Le 1,2-époxy-3-butanol obtenu par époxydation du but-3-ène-2-ol est également un composé d'intérêt. L'utilisation de l'isomère 2S, 3R, en particulier a été rapportée dans le cadre de la synthèse multi-étapes de molécules macrolides constituant des antibiotiques (Epothilone B et A) lesquelles sont isolées sinon de cultures de bactéries *Sorangium Cellulosum* [32].

Comme cela a rapidement été discuté dans le Chapitre I 1.3.2. (ii), Vennestrøm et al. [33] ont immobilisé la GOx sur une zéolithe TS-1 (donc en surface puisqu'aucun traitement particulier visant à la rendre mésoporeuse n'a été effectué) afin d'étudier l'oxydation du prop-2-ène-1-ol. Cette étude n'a pas donné suite à d'autres travaux publiés. Aussi, il nous a semblé légitime de tester le même substrat avec un système mieux défini, notamment en ce qui concerne la zéolithe et l'activité de la GOx immobilisée (cf. chapitre II) [34].

Les premiers tests d'activité du mélange mécanique TS-1 + MCF-NH₂-GOx eût égard à l'oxydation chimioenzymatique des alcènes ont donc concerné les alcools allyliques cités plus haut, solubilisés en milieu hydro-organique (MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50) à 35°C ; puis des essais ont été réalisés en milieu purement aqueux (tampon acétate pH = 6, 100 mM) dans lequel la GOx peut travailler à plus haute température (50°C, voire 60°C, cf. chapitre II).

- *Tests préalables effectués dans le mélange MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50*

Dans un premier temps, l'activité du système catalytique a été éprouvée dans le cadre de l'oxydation du but-3-ène-2-ol. Les résultats sont montrés Figure 135 ci-dessous.

En 24 h, la conversion du but-3-ène-2-ol a atteint 50%. L'époxyde est produit avec une sélectivité de l'ordre de 95%. Il est possible d'observer que la sélectivité en époxyde après 3 h est relativement faible. Cela pourrait s'expliquer par le phénomène d'adsorption du substrat au début de la réaction, qui une fois époxydé présente moins d'affinité avec la surface hydrophobe et retourne en solution d'où la disparition de l'adsorption. La sélectivité initiale serait alors fortement sous-estimée. Aucun produit résultant de l'ouverture du cycle oxirane n'a été détecté. Une analyse complémentaire par CPG-MS a dévoilé la présence de traces de 2-butène-3-one, la cétone associée à cet alcool. Le bilan de matière ici est équilibré (cf. Annexe 2.).

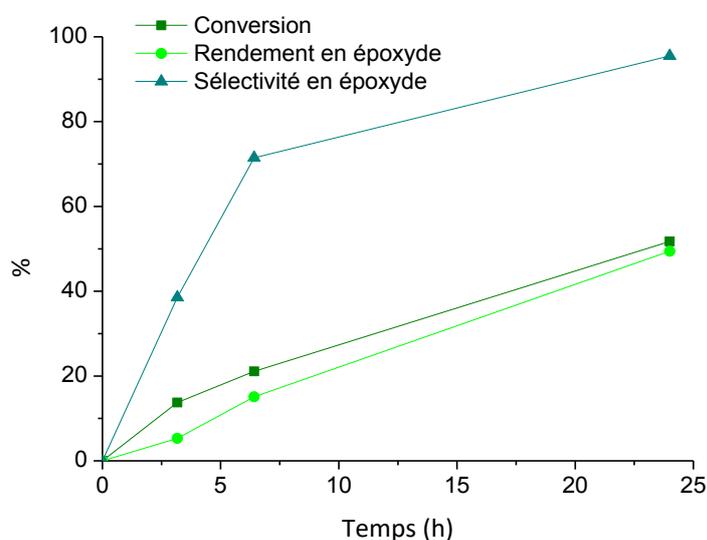


Figure 135 : Epoxydation du but-3-ène-2-ol en présence de TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (15 U) (GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) dans un mélange tampon acétate (barbotage préalable de O₂)/MeOH (v/v) 50 : 50 à 35°C. Ti/substrat (1 :4 mol.) pour [but-3-ène-2-ol] = 50 mM et [glucose] = 300 mM

L'influence de la concentration en glucose a été étudiée, en se plaçant à 150 mM, autrement dit juste sous la concentration conduisant à la saturation de l'enzyme (Figure 136). L'impact est notable, puisqu'en défaut de glucose, l'activité du système catalytique est divisée par 2. La conversion du but-3-ène-2-ol est passée d'environ 50 à 25% et le rendement de 50 à 27%, la sélectivité étant quant à elle conservée. Comme attendu, l'enzyme fonctionne moins rapidement dans ces conditions, ce qui a conduit à un ralentissement notable de la cinétique de production de H₂O₂ et donc d'oxydation de l'alcène.

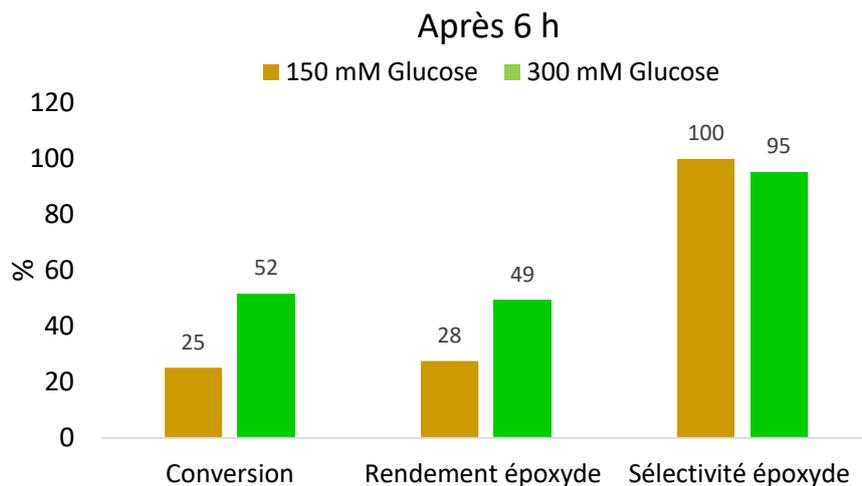


Figure 136: Comparaison des performances du système TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (15 U) dans le cadre de l'époxydation du but-3-ène-2-ol (GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) dans un mélange tampon acétate (barbotage préalable de O₂)/MeOH (v/v) 50 : 50 à 35°C pour [glucose] = 300 mM et 150 mM. Ti/substrat (1 : 4 mol.) pour [but-3-ène-2-ol] = 50 mM

L'oxydation du prop-2-ène-1-ol a également été testée dans les conditions les plus favorables au but-3-ène-2-ol ([glucose] = 300 mM). Les résultats sont montrés Figure 137 ci-dessous.

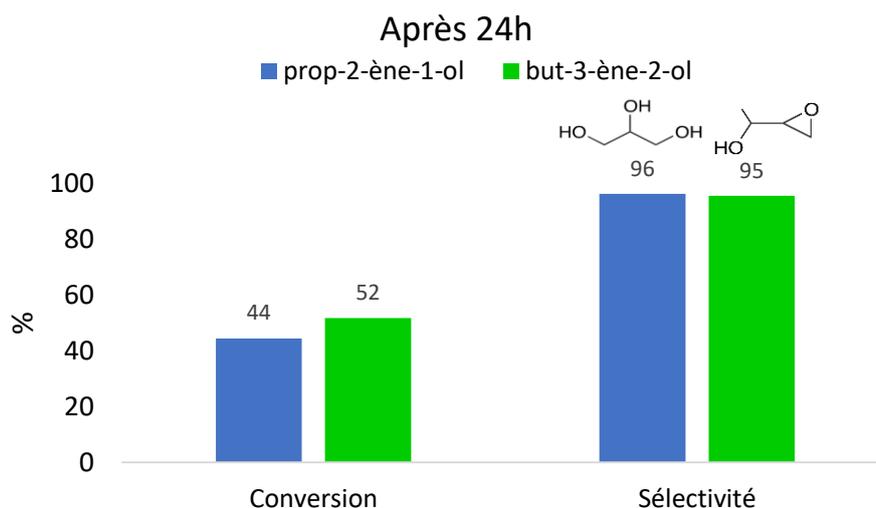


Figure 137: Comparaison des résultats d'oxydation du but-3-ène-2-ol et du prop-2-ène-1-ol en présence de TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (15 U) (GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) dans un mélange tampon acétate (barbotage préalable de O₂)/MeOH (v/v) 50 : 50 à 35°C pour [glucose] = 300 mM. Ti/substrat (1 : 4 mol.), [alcool allylique] = 50 mM

Les résultats d'oxydation pour ces deux alcools allyliques sont très proches avec une conversion de l'ordre de 50% et une sélectivité en produit d'oxydation (glycérol et 1,2-époxy-3-butanol pour le prop-2-ène-1-ol et but-3-ène-2-ol, respectivement) proche de 100% après 24 h. Dans nos conditions, il semblerait que l'époxyde dérivé du prop-2-ène-1-ol, le glycidol, s'ouvre *in-situ* pour donner du glycérol [35]. Sur une durée de 24 h, il apparaît que le substituant méthyle supplémentaire dans le but-3-ène-2-ol n'a pas d'influence sur la conversion mais il joue *a priori* sur la sélectivité diol vs. époxyde.

- *Tests effectués dans le tampon acétate*

La littérature a déjà fait état de réactions d'oxydation catalysées par la même zéolithe en milieu aqueux, par exemple les travaux d'Alonso-Fagúndez *et al.* [36] relatifs à la conversion du furfural en

acide maléïque. Pour ce premier test réalisé en milieu aqueux, l'activité du mélange mécanique TS-1 + MCF-NH₂-GOx a été étudiée dans le cadre de l'oxydation du prop-2-ène-1-ol à 40°C en présence de 5 U d'enzyme, 200 mM de glucose et en conservant le ratio TS-1/GOx précédent (Figure 138). Ainsi, dans ces conditions de solvant plus favorables à l'activité de l'enzyme, la concentration en glucose et le nombre d'unités d'enzymes ont été réduites mais la température légèrement augmentée, afin d'améliorer la réactivité de la zéolithe. Cette dernière augmentation est justifiée dans la mesure où les courbes de stabilité de l'enzyme immobilisée à 50°C dans du tampon acétate (pH = 6, 100 mM), présentées au Chapitre II, suggèrent que l'activité enzymatique sera suffisamment conservée après 24 h à 40°C (à 50°C, 80% de l'activité de départ est conservée). D'après les courbes d'activité de la GOx fournies en Annexe 1, la concentration en glucose adoptée devrait encore permettre à l'enzyme de fonctionner à sa vitesse maximale (solide moins chargé en GOx avec environ 0,85 U/mg_{solide}, soit 0,85 μmol H₂O₂/min.mg_{solide}). En effet, le K_M mesuré dans le tampon est de 33 mM (concentration de glucose pour laquelle la vitesse de production de H₂O₂ par la GOx vaut V_{max}/2). Ainsi en se plaçant à 200 mM la concentration est 7 fois supérieure à K_M et donc bien assez suffisante. Il n'est pas forcément adapté d'apporter trop de glucose, puisque dans le Chapitre I, il a été indiqué que l'enzyme pouvait se retrouver désactivée lorsque la quantité de son substrat (le glucose) ou celles de H₂O₂ ou d'acide gluconique produits sont trop importantes. Quant à la quantité d'enzyme supportée, celle-ci a été abaissée pour augmenter la progressivité de la production de H₂O₂ et éviter une accumulation de l'oxydant.

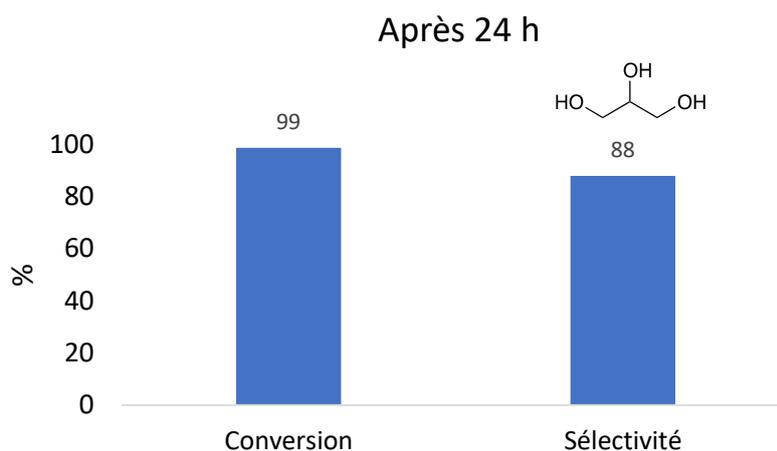


Figure 138: Epoxydation du prop-2-ène-1-ol en présence de TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (5 U) (GOx/Ti = 1 : 108 333 mol.) dans du tampon acétate (barbotage préalable de O₂) (pH = 6, 100 mM) à 40°C. Ti/substrat (1 : 4 mol.) pour [prop-2-ène-1-ol] = 50 mM et [glucose] = 200 mM

L'oxydation du prop-2-ène-1-ol conduit à environ 99% de conversion et 86% de sélectivité en glycérol. L'écart entre sélectivité et conversion peut s'expliquer par des incertitudes expérimentales au niveau de l'analyse ou de la pesée des produits.

Après 24 h de réaction, l'acide gluconique co-produit et le glucose résiduel ont été quantifiés par HPLC. Il apparaît que 393 μmol de H₂O₂ ont été produites. Cela correspond à un ratio molaire H₂O₂ cumulé²⁵/substrat égal à 4. La quantité d'oxydant produite par l'enzyme est donc largement suffisante, puisqu'en excès.

²⁵ La concentration instantanée en peroxyde d'hydrogène n'a pu être évaluée en lien avec le très faible volume total de réaction et l'important volume de prélèvement requis pour les dosages par voltampérométrie. Nous sommes conscients que la donnée H₂O₂ cumulé/substrat doit être utilisée avec précaution car ne permettant pas d'intégrer les phénomènes de dismutation de l'oxydant qui, s'ils ont eu lieu, auront peut-être influencé la cinétique de la réaction d'oxydation.

Comme indiqué précédemment, Vennestrøm *et al.* ont étudié l'oxydation de l'alcool allylique en utilisant en particulier un mélange TS-1 et GOx libre. Une tentative de comparaison de nos résultats avec ceux de Vennestrøm *et al.*²⁶ [33] est proposée ci-après (Tableau 27).

Tableau 27 : Comparaison du système TS-1 + MCF-NH₂-GOx avec TS-1 + GOx libre décrit par Vennestrøm *et al.* [33]. Nos conditions : Ti/substrat = 1 : 4 mol. et GOx/Ti (1 : 108 333 mol.) dans tampon acétate (pH = 6, 100 mM) (préalablement aéré avec O₂) à 40°C. Vennestrøm *et al.* : Ti/substrat (1 : 4,6 mol.) et GOx/Ti = 1 : 107 187 mol. à 30°C dans H₂O sous flux de O₂ dans le milieu réactionnel (< 5 mL/min)

	Prop-2-ène-1-ol (mM)	GOx (U/ml)	Glucose (mM)	Ti (mg/mL)	Conversion (%)	Rendement (%)	
						Glycérol	Glycidol
TS-1 + MCF-NH ₂ -GOx	50	2,5	200	25	98,7	85	
TS-1 + GOx libre [33]	237	10,1	100	2,5	15	12	3

La comparaison n'est pas évidente. Nous avons choisi d'opter pour une normalisation de toutes les quantités (enzyme libre ou immobilisée, glucose, prop-2-ène-1-ol et titane) par rapport au volume de solvant. Ainsi, il apparaît que nous avons travaillé avec davantage de titane que Vennestrøm *et al.* (10 fois plus) mais beaucoup moins d'enzyme (4 fois moins) et plus de glucose (2 fois plus). La teneur de ce dernier est quatre fois plus élevée dans notre cas que celle du substrat alors qu'elle est deux fois plus petite dans leurs conditions. D'après les résultats du Tableau 27, la saturation de l'enzyme et les fortes teneurs en titane ainsi que la plus faible concentration en prop-2-ène-1-ol apportent *a priori* un jeu de conditions favorables à la production de H₂O₂ et à la production de glycérol, en dépit de l'immobilisation de l'enzyme sur un solide extérieur, MCF-NH₂. Le mélange mécanique des deux catalyseurs ne semble donc pas être une mauvaise option puisqu'il est plus ou moins équivalent au système TS-1 + GOx libre à la différence que l'enzyme immobilisée est stabilisée (cf. Chapitre II) et réutilisable.

Le mélange mécanique peut être réutilisé après centrifugation, rinçage et filtration du solide. Les tests étant effectués sur de très faibles quantités de substrat et solides (100 µmol de substrat, 50 mg de TS-1 et 6 mg de MCF-NH₂-GOx), la moindre perte de solide risque d'avoir un impact sur l'activité globale du système catalytique. Les résultats correspondants sont présentés Figure 139. Dans ces conditions, les performances du catalyseur ont diminué avec 65% de conversion contre 99% la première fois. Comparé au premier test, environ 4,4 fois moins de H₂O₂ a été produit (90 µmol contre 400 auparavant) et le ratio H₂O₂ cumulé/substrat n'est plus que de 1,25, donc quasi équimolaire. Cependant, la quantité de H₂O₂ produite reste encore deux fois plus élevée que celle de l'alcool consommé. En guise d'explication, peuvent être évoquées des raisons intrinsèques telles que le lessivage, la désactivation d'une partie de l'enzyme ou bien des raisons liées au protocole opératoire de recyclage. Une optimisation de ces étapes de récupération est alors à envisager. Une autre manière d'améliorer les performances catalytiques serait l'utilisation d'un solide plus chargé en enzyme. En effet, si la diminution d'activité catalytique est due à la désactivation de la GOx, une quantité plus importante au départ permettra peut-être de conserver plus d'enzymes actives en fin de réaction, qui produiront un excès de H₂O₂ plus important.

²⁶ Cela a nécessité que nous calculions les descripteurs d'activité catalytique non donnés par Vennestrøm *et al.* à partir des informations figurant notamment au niveau du matériel supplémentaire de leur publication.

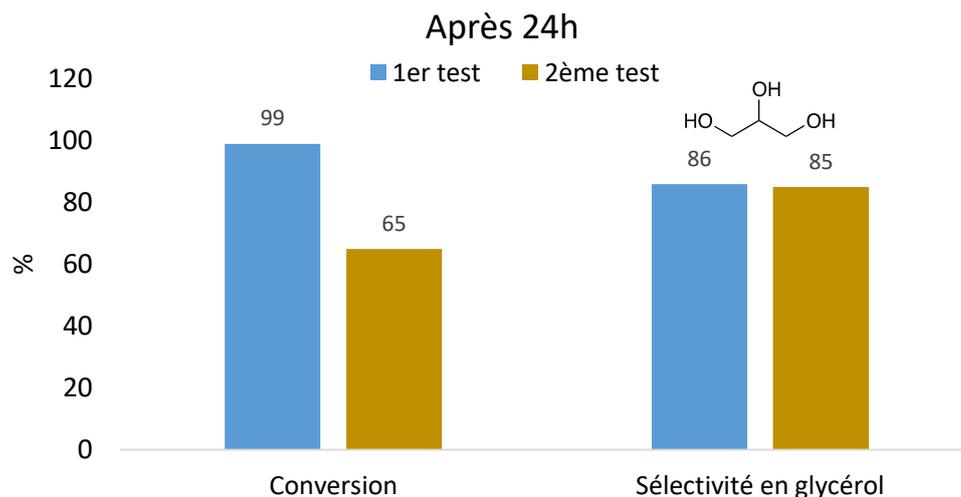


Figure 139: Comparaison des résultats du **premier** et du **second** test catalytique d'époxydation du prop-2-ène-1-ol réalisés à 40°C en présence de TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (5 U) dispersés en tampon acétate (barbotage préalable de O₂) (pH = 6, 100 mM). Ti/substrat (1 : 4 mol.) pour [alcool] = 50 mM et [glucose] = 200 mM

2.3.2. Epoxydation d'un substrat organosoluble : le cyclohexène

La mise en place du système catalytique tandem suppose un certain nombre de compromis, en particulier, l'adjonction d'un solvant organique si des substrats à tendance organosoluble sont envisagés ce qui est le cas du cyclohexène. Dans le milieu MeOH/tampon (v/v) 60 : 40 utilisé précédemment afin d'évaluer l'activité du catalyseur TS-1 (cf. Figure 132), les mesures d'activité de la GOx immobilisée sur MCF-NH₂ (Chapitre II) ont montré que l'enzyme n'est pas active à 50°C. Aussi, la proportion de tampon a dû être portée ici à 50% et la température à 35°C, sous peine d'inactiver l'enzyme. L'accroissement de la quantité d'eau est également requis pour permettre une meilleure dissolution du glucose lequel sera incorporé à 300 mM. Ces modifications de teneur en eau, de température et l'ajout d'un co-substrat ne vont malheureusement pas dans le sens de l'amélioration de la solubilité du cyclohexène. Les mélanges réactionnels seront laissés sous agitation vive, afin d'optimiser le contact entre tous les réactifs du mélange. Seules les valeurs des rendements en produits de réaction sont présentées dans ce qui suit. Elles ont été calculées à partir de la quantité de cyclohexène pesée lors de réalisation du mélange réactionnel. Les analyses en CPG ne permettant d'accéder à la quantité totale de cyclohexène consommée au cours de la réaction (sauf dans le cas où la concentration de cyclohexène mesurée est inférieure à la limite de solubilité du composé), il a été décidé de ne pas présenter de données de conversion ni de sélectivité.

Une méthode classique pour homogénéiser des mélanges de composés non miscibles consiste à utiliser un agent tensio-actif. Cependant, l'ajout d'un composé supplémentaire dans le système le complexifie et peut engendrer de nouveaux problèmes. En particulier, la présence de la molécule amphiphile peut entraîner une réduction de l'activité enzymatique, voire la rendre nulle, en dénaturant la protéine. Dans un premier temps, le système catalytique tandem a été testé sans ajout de surfactant (2.3.2.1.), puis en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS, cf. 2.3.2.2.).

2.3.2.1. En l'absence de surfactant

La Figure 140 ci-dessous montre que le système catalytique constitué d'un mélange mécanique de TS-1 et de GOx immobilisée sur MCF-NH₂ est actif pour l'oxydation du cyclohexène. Même dans un milieu hydro-organique non-homogène, les produits d'époxydation habituels sont bien présents après 24 h de réaction.

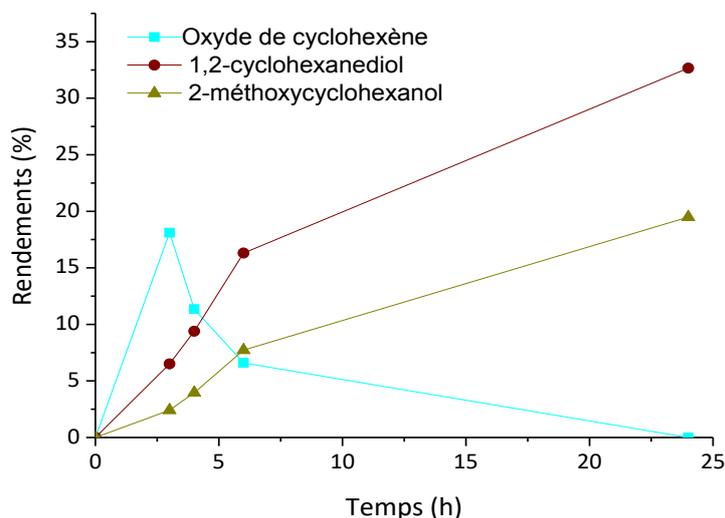


Figure 140: Epoxydation du cyclohexène en présence d'un mélange de TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ 15 U) (GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) dans MeOH : tampon acétate (v/v) 50 : 50, à 35°C. Ti/substrat (1 : 4 mol.) et [cyclohexène] = 50 mM, [glucose] = 300 mM

Le rendement en époxyde est maximal après 3 h (environ 20%) puis la présence d'eau dans le milieu entraîne son ouverture en 1,2-cyclohexanediol et 2-méthoxycyclohexanol. Après 24 h, on atteint un rendement d'environ 30% pour le diol et de 20% pour le 2-méthoxycyclohexanol. Ces résultats sont proches de ceux (Figure 132) obtenus lors de l'époxydation du cyclohexène par H₂O₂ en présence de TS-1 dans MeOH : tampon acétate (v/v) 60 : 40 à 50°C, où les rendements en 1,2-cyclohexanediol et 2-méthoxycyclohexanol étaient respectivement de 32 et 15%. Rappelons cependant que dans le cas présent, la température est de 35°C au lieu de 50°C et que la quantité d'eau est plus importante de 10%, avec 300 mM de glucose en plus.

Dans le cas du but-3-ène-2-ol, le test effectué dans les mêmes conditions (cf. Figure 135) a conduit à un rendement en époxyde de 49% après 24 h, contre un total de produits d'époxydation d'environ 50% ici. Nous pouvons donc considérer que le catalyseur chimio-enzymatique est plutôt performant pour l'oxydation d'alcènes organosolubles même dans des conditions de solubilité du substrat peu favorables car en présence d'eau. Ce premier test a donc permis d'établir une preuve de concept de la faisabilité de l'oxydation chimio-enzymatique du cyclohexène, un substrat organosoluble, en milieu hydro-organique.

- *Effet de la concentration en glucose*

Le glucose est un composé hydrosoluble mais assez peu soluble dans le méthanol. Dans le mélange tampon acétate : MeOH (v/v) 50 : 50, une concentration de 300 mM a pu être atteinte néanmoins. Dans ces conditions, la GOx fonctionne à sa vitesse maximale (cf. Annexe 1). En revanche, en présence d'autant de glucose, le cyclohexène est moins soluble que dans les tests effectués sans

glucose. Cela nous a amené à réduire la concentration de glucose à 200 mM, valeur pour laquelle la GOx fonctionne encore à 100% de sa vitesse maximale. La Figure 141 ci-dessous compare les performances du système catalytique tandem après 6 h de réaction pour des concentrations de 200 et 300 mM de glucose, toutes choses égales par ailleurs.

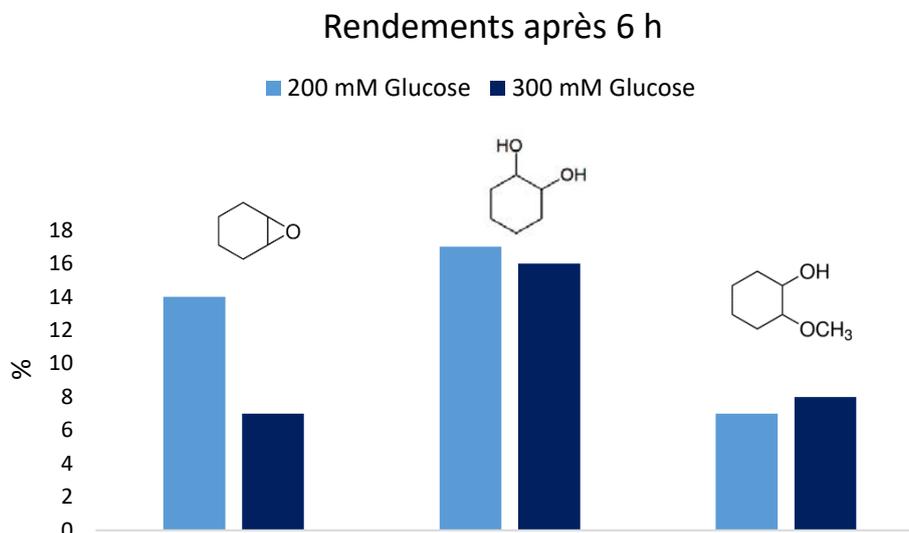


Figure 141: Comparaison de la distribution en époxyde et dérivés suite à la variation de [glucose] de 200 à 300 mM. Le mélange TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ 15 U) (GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) est contenu dans MeOH : tampon acétate (barbotage préalable de O₂) (v/v) 50 : 50 à 35°C avec Ti/substrat (1 : 4 mol.) pour [cyclohexène] = 50 mM

Au vu des valeurs, travailler à une concentration moindre en glucose, 200 mM, ne perturbe pas la réactivité du système et tend même à améliorer les résultats si l'on s'en réfère d'une part au rendement de l'époxyde qui est deux fois supérieur et également au rendement total en époxyde et ses dérivés de 38% (au lieu de 31% précédemment). Dans la suite, nous travaillerons avec cette concentration en glucose.

- *Effets l'apport de O₂ et de la quantité de GOx*

L'oxydant primaire dans notre système est le dioxygène de l'air. Il nous a paru intéressant de vérifier comment la cinétique de production de H₂O₂ par l'enzyme dans les conditions ci-dessus (MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50, à 35°C, 200 mM glucose, 15 U MCF-NH₂-GOx et sans cyclohexène) est influencée par la concentration en dioxygène. On a donc comparé la production de H₂O₂ en l'absence ou en présence d'un flux continu de dioxygène (de l'ordre de 0,03 mL/s) (Figure 142). Noter que dans les deux cas la solution a préalablement été saturée en O₂. La production de H₂O₂ a été déduite de la quantité d'acide gluconique produit qui peut être quantifié par HPLC (cf. conditions expérimentales). Chaque mole d'acide gluconique quantifiée en solution correspond effectivement à une mole de H₂O₂ formée puisque l'enzyme transforme 1 mole de D-glucose et 1 mole d'O₂ en 1 mole d'acide gluconique et 1 mole de H₂O₂.

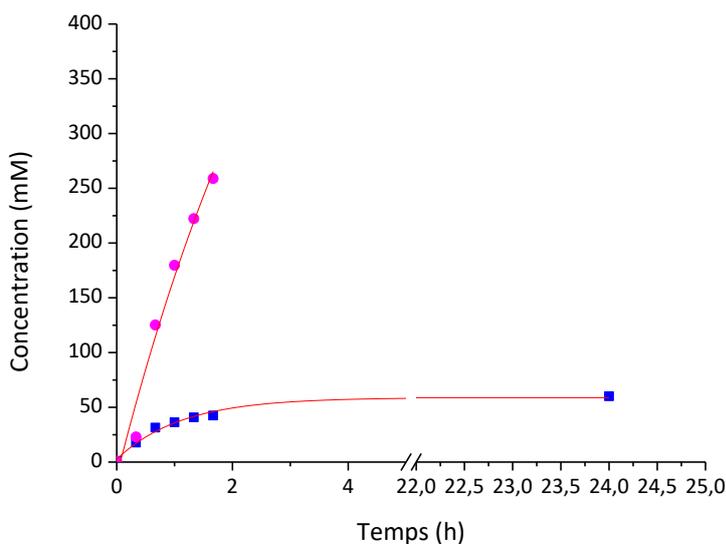


Figure 142: Evolution de la production de H_2O_2 par la GOx immobilisée (15 U) avec flux et sans flux de O_2 (environ 0,03 mL/s). MeOH : tampon acétate (v/v) 50 : 50, à 35°C, [glucose] = 200 mM

L'apport régulier de dioxygène par barbotage dans le milieu améliore donc de manière significative la production de H_2O_2 . Après 1,5 h environ, l'enzyme semble avoir produit 6 fois plus de peroxyde d'hydrogène : 260 contre ~ 40 mM avec et sans barbotage de O_2 , respectivement. La concentration finale de H_2O_2 sous flux de dioxygène dépasse même la concentration en glucose de départ ce qui peut s'expliquer par l'évaporation du solvant, non négligeable ici puisque le volume de solution est faible (2 mL). Toutefois, un flux de dioxygène continu ne peut être mis en œuvre lors de la réaction d'époxydation du cyclohexène, car elle entrainerait une évaporation de l'alcène, d'où la préférence pour l'utilisation d'un léger flux d' O_2 au-dessus de la solution, à la suite d'une pré-saturation de cette dernière avant réaction. Cette double condition a été appliquée à certains des tests présentés dans cette étude.

Dans des conditions optimales, c'est-à-dire à saturation de dioxygène, avec une activité de 15 U, il faut théoriquement 27 min²⁷ à la GOx immobilisée pour convertir la quantité de glucose correspondant à 200 mM de glucose introduits. Or sous flux de O_2 , après 30 minutes, l'enzyme a produit environ 60 mM de H_2O_2 . Cette plus faible activité s'explique par la forte teneur en MeOH dans le milieu.

L'essai Figure 142 montre clairement que le dioxygène est le réactif limitant pour le fonctionnement de l'enzyme. La quantité d' O_2 dissoute dans le mélange tampon acétate/MeOH peut être évaluée à l'aide des travaux de Kutsche et al. [37] à environ 0,2 mM (6,3 mg/L). Dans les conditions de l'essai de catalyse d'époxydation Figure 141 (à 200 mM de glucose, sans flux de O_2 , mais avec pré-saturation du milieu au préalable), si l'on s'en réfère à la Figure 142, la GOx immobilisée devrait donc avoir produit sur une durée de 24 h au maximum 60 mM d'acide gluconique (donc autant de H_2O_2), soit 10 mM de plus que le cyclohexène initialement introduit (sachant qu'une partie seulement est soluble). Ainsi, même si l'ajout régulier de dioxygène dans le milieu améliore fortement les performances catalytiques de l'enzyme, celui-ci n'est pas indispensable pour produire une quantité suffisante d'oxydant avec 15 U d'enzyme, tout comme le confirme le test Figure 138.

²⁷ Ceci constitue une première estimation qui ne tient pas compte en particulier de l'épuisement progressif du glucose qui affecte la vitesse de production de H_2O_2 .

Il nous a semblé également intéressant de faire varier la quantité de MCF-NH₂-GOx dans le milieu (Figure 143). En effet, travailler avec une quantité plus faible d'enzyme pourrait permettre de produire H₂O₂ de manière encore plus progressive. Les essais qui suivent ont été réalisés avec des quantités de solide équivalentes à 15 et 5 U de GOx. A noter que la réaction avec 5 U a été effectuée sous flux d'air continu au-dessus du milieu, cet apport de dioxygène s'ajoutant à la saturation en présence d'air du tampon utilisé dans l'expérience. Dans ces conditions, la diminution de la quantité d'enzyme ne semble pas réellement influencer les rendements des produits d'époxydation qui sont relativement proches : 30% pour le diol et 16% pour le 2-méthoxycyclohexanol, après 24 h. Notons qu'avec 5 U de GOx, des composés issus de l'oxydation des liaisons C-H en position allylique, à savoir le cyclohexène-1-ol et la cyclohexène-1-one (ci-après désignés dérivés allyliques) sont également détectés en CPG. Ceux-ci, comme discuté au début du point 2.2., sont souvent associés à la participation de processus radicalaires faisant intervenir le cyclohexène et le dioxygène du milieu [27, 28] *a priori* facilités dès lors que le dioxygène circule en permanence dans un système appauvri en unités d'enzymes.

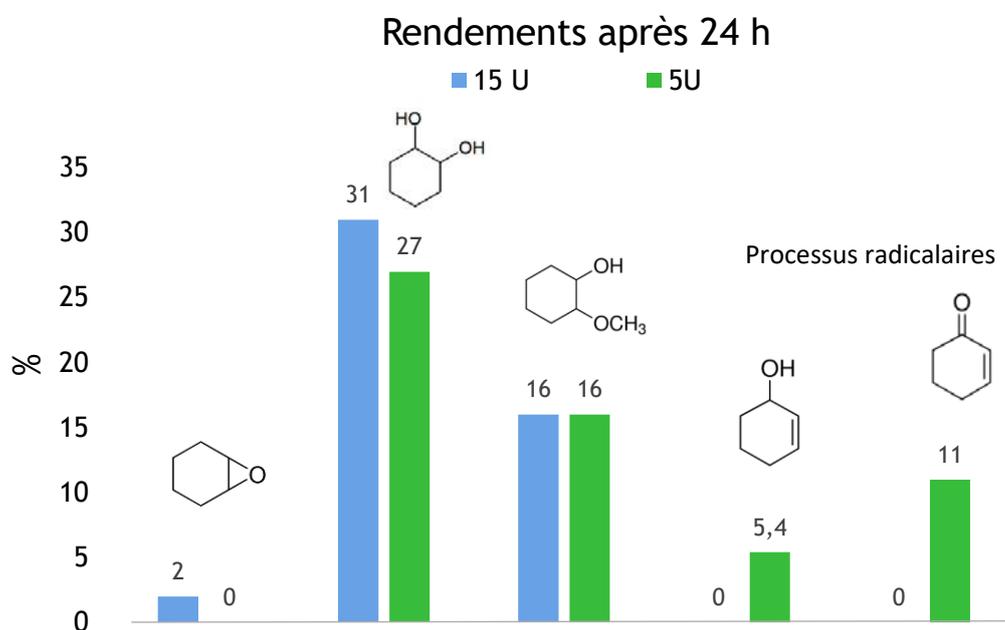


Figure 143: Comparaison de la distribution en époxyde et dérivés suite à la variation de la quantité de GOx de 15 à 5 U. Le mélange TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) avec (GOx/Ti = 1 : 108 333 mol.) est contenu dans MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50 à 35°C avec Ti/substrat (1 : 4 mol.) pour [cyclohexène] = 50 mM et [glucose] = 200 mM. Pour 15 U le tampon est saturé en O₂ en début de test et pour 5 U un flux au-dessus de la solution est ajouté au cours du test.

Jusqu'à présent, la faible solubilité du cyclohexène nous a amenés à travailler dans des conditions (réactif/Ti) de l'ordre de 4 donc à un ratio relativement faible. Un moyen d'augmenter le ratio réactif/Ti pourrait consister à introduire un agent tensioactif. Cette approche fait l'objet du point 2.3.2.2 suivant.

- *Oxydation potentielle compétitive du glucose*

Dans la littérature, il est fait référence à l'oxydation du D-glucose par H₂O₂ en présence de TS-1 [38] en milieu aqueux dans les conditions qui suivent : Ti/glucose (1 : 242 mol.), H₂O₂/glucose (1,3 : 1 mol.) en milieu aqueux. Cette réaction menée à 70°C est moyennement efficace ; elle se traduit par un taux de conversion du glucose de 27% et une sélectivité en acide gluconique de 12% après 3 h de

réaction. Néanmoins, nous avons souhaité tester l'éventualité que cette réaction ait lieu en nous plaçant exactement dans nos conditions mais sans ajouter de cyclohexène, à savoir pour [glucose] = 200 mM, Ti/glucose (1 : 15 mol.), H₂O₂/glucose (1,25 : 1 mol.) à 35°C dans le mélange MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50 avec une introduction progressive de l'oxydant en 3 fois avec une heure d'intervalle. Après 24 h, aucune trace d'acide gluconique n'a été détectée par analyse HPLC du milieu. Cette réaction qui aurait été en compétition avec l'époxydation n'a donc pas lieu. La température de travail plus basse est certainement le facteur prépondérant.

2.3.2.2. Avec utilisation d'un surfactant

Des travaux effectués par Tong et *al.* [39] portent sur l'oxydation d'alcènes en milieux aqueux (tampon phosphate/D₂O) par catalyse homogène chimioenzymatique, en combinant la GOx à un système bicarbonate de sodium/sulfate de manganèse/SDS. Le SDS a été utilisé pour solubiliser des alcènes organosolubles. En nous appuyant sur ces travaux, nous avons donc pris le parti d'ajouter du dodécylsulfate de sodium (SDS) à raison de 5 mM. Cette modification a conduit à une homogénéisation visible du milieu réactionnel. Dans ces conditions, les quantités de cyclohexène déterminées par CPG à t=0 sont identiques à celles pesées et introduites dans le mélange réactionnel. Le test catalytique correspondant a été réalisé sous flux de dioxygène en surface de la solution (environ 0,05 mL/s) afin d'optimiser le fonctionnement de l'enzyme. Ainsi, nous avons pu montrer que de l'acide gluconique a été produit sur un laps de temps de 24 h à hauteur de 140 mM, démontrant que la GOx immobilisée est au moins partiellement active²⁸ malgré l'apport de tensioactif. En comparaison Figure 142 dans le même milieu MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50 sous barbotage d'O₂ et sans substrat, la GOx immobilisée produit deux fois plus de H₂O₂ (bien que sans doute surestimée à cause de l'évaporation) et deux fois moins en ayant uniquement saturé la solution en O₂ au départ. Rappelons que Jones et *al.* ont indiqué que, pour un pH ≥ 6, les interactions entre la GOx et le SDS (10 mM dans leur étude) sont coopératives et n'entraînent pas la dissociation du dimère. Cela s'explique par la forte proportion d'acides aminés négativement chargés comparé à ceux présentant une charge positive (rapport de 3,4). Dans ces conditions, les acides carboxyliques ionisés écrantent *a priori* les résidus cationiques (lysine, histidine et arginine) qui peuvent interagir avec la partie anionique du surfactant [40].

Les résultats Figure 144 montrent que la somme des rendements de tous les composés détectés en présence de SDS est de 73% contre 49% sans l'utilisation du surfactant. Cela s'explique d'abord par l'homogénéisation du milieu et donc une quantité plus importante du substrat accessible. Même si l'apparition de quantités significatives de dérivés allyliques était attendue, l'utilisation de SDS semble avoir bouleversé la distribution des composés formés en leur faveur. L'effet de l'ajout du surfactant sur le catalyseur est certain puisque l'hydrolyse de l'époxyde n'a plus lieu : on ne décèle pas de présence de diol en solution. La réaction majoritaire correspond *a priori* à un processus d'autoxydation conduisant à un rendement de près de 49% en cyclohexène-1-one. Ici les rendements sont calculés à partir de la quantité de substrat en solution obtenue par CPG à t = 0 puisque le milieu est homogène (voir Annexe 3. pour la correspondance entre la quantité de matière obtenue par CPG et pesée).

²⁸ La quantité de H₂O₂ produite correspond à 140 mM soit une concentration quasiment trois fois plus élevée que celle du substrat de départ.

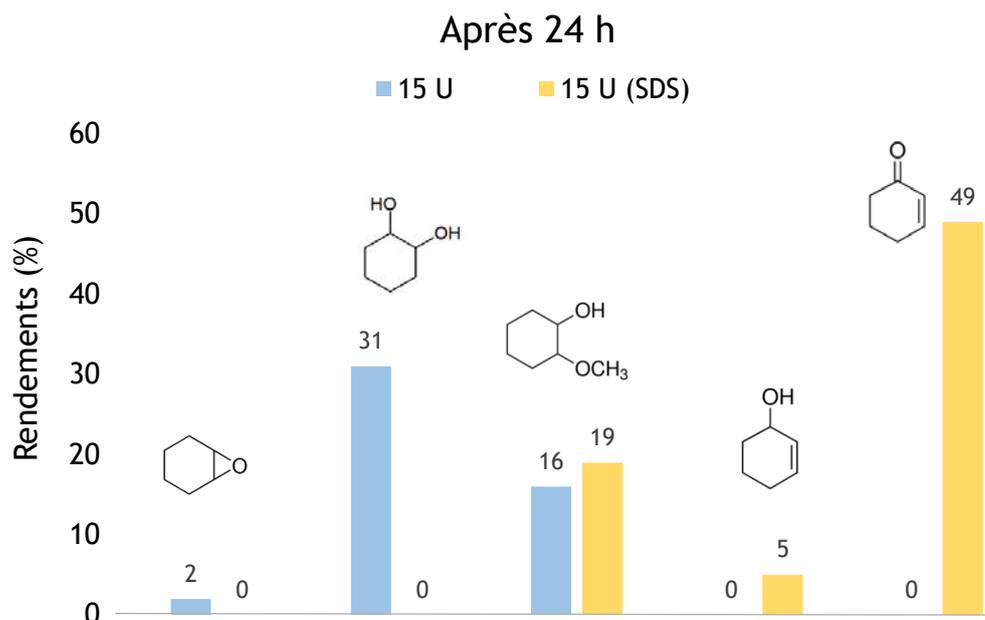


Figure 144: Comparaison des distributions des différents produits formés **en présence de SDS (5 mM)** et **sans SDS**. Le mélange TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ 15 U) (GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) est contenu dans une solution MeOH : tampon acétate 50 : 50 à 35°C avec Ti/substrat (1 : 4 mol.) pour [cyclohexène] = 50 mM et [glucose] = 200 mM. En présence de SDS un flux de O₂ est ajouté en surface de la solution

Deux hypothèses peuvent être faites : la présence de surfactant améliore la solubilité d'O₂ ou du moins favorise sa diffusion, privilégiant la voie radicalaire et le surfactant accélère la dismutation de l'oxydant, entraînant la production de O₂.

Le bilan matière dans ce cas est également bouclé à 75 %. La matière manquante peut être due à l'adsorption du substrat sur le solide (cf. annexe 3).

2.4. Oxydations chimio-enzymatiques : Vers un système catalytique plus intégré impliquant un support mésoporeux

Du fait de l'utilisation d'agents structurants moléculaires plutôt que supramoléculaires lors de leurs synthèses, la plupart des zéolithes, renferment essentiellement des micropores. Cela limite leur exploitation en catalyse à des substrats de faible rayon hydrodynamique sous peine de bloquer leur accès aux sites actifs. Cette partie propose deux pistes qui ont été exploitées en fin des travaux de thèse afin de tendre vers l'utilisation d'un unique support pour les deux phases actives. La première a consisté à tirer profit des bons résultats obtenus précédemment avec la zéolithe TS-1 en exploitant cette fois-ci une forme désilicatée de cette dernière renfermant désormais une part non négligeable de mésopores. La seconde, en fait le système idéal, visait à loger l'enzyme au sein d'un support MCF-Ti dont on sait, à coup sûr, que ses cellules présentent des dimensions adaptées.

2.4.1. Vers une utilisation de la zéolithe TS-1 désilicatée

La création de mésoporosité au sein du matériau TS-1 via un processus de désilication (TS-1-d) nous a semblé intéressante pour notre application finale visant à y intégrer l'enzyme. Seulement, comme démontré dans la partie caractérisations (2.1.1.), le traitement à la soude appliqué ne semble pas laisser indemne la partie cristalline résiduelle. L'étude préliminaire, développée ci-après, avait pour objectif de déterminer l'activité du matériau résultant dans le cadre de l'époxydation du cyclohexène par H_2O_2 . Comme précédemment dans ce chapitre, les tests ont été effectués i) dans le méthanol pur et ii) dans un milieu MeOH/tampon acétate à 60% (v/v) pour permettre des recoupements avec les résultats du paragraphe 2.3.2.

La Figure 145 compare la conversion du cyclohexène et la sélectivité en époxyde dans le méthanol pour les solides TS-1 et TS-1-d à 50°C dans le MeOH pur après trois ajouts manuels de H_2O_2 (30% mass.) séparés d'une heure d'intervalle. Semblables aux temps courts, les conversions en cyclohexène se distinguent un peu plus par la suite. Les résultats obtenus (conversion et sélectivité) indiquent que la conversion est de 52% après 3 h puis de 80% après 24 h pour le matériau TS-1-d soit 20% de moins qu'avec la zéolithe TS-1.

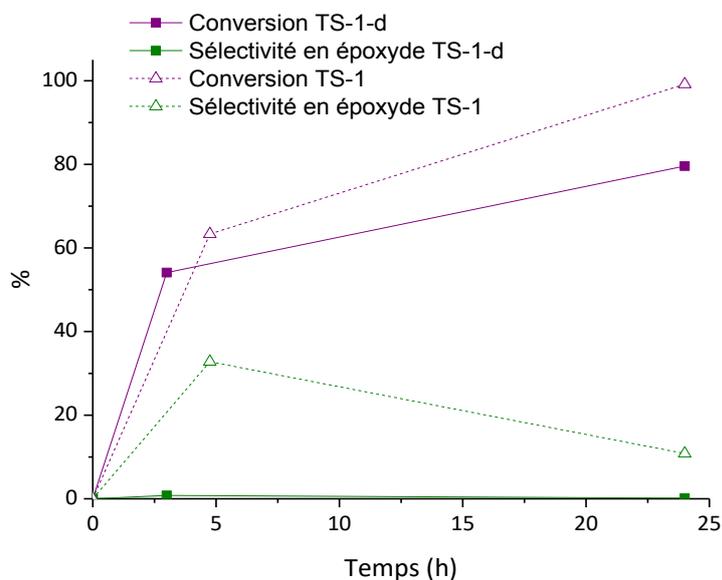


Figure 145 : Epoxydation du cyclohexène (50 mM) par H_2O_2 dans MeOH à 50°C avec TS-1 (Si/Ti = 31 mol.), Ti/substrat (1 : 4 mol.), Ti/ H_2O_2 (1 : 19 mol.) ou TS-1-d (Si/Ti = 1,8 mol.), Ti/substrat (2,6 : 1 mol.), Ti/ H_2O_2 (1 : 2 mol.). H_2O_2 /substrat (5 : 1 mol.)

Ici, il n'a pas été possible d'effectuer un test témoin de l'adsorption éventuelle du substrat sur le solide par manque de quantité suffisante de matériau TS-1-d²⁹. Les analyses du caractère hydrophobe du solide TS-1-d (2.1.3.) ayant permis de montrer que ce dernier se situe entre ceux des solides TS-1 et MCF-Ti, on peut s'attendre à ce que le solide TS-1-d adsorbe moins de cyclohexène ce qui va bien dans le sens d'un affaiblissement de la conversion évaluée par CPG³⁰ à 24 h en comparaison avec TS-1, Figure 145.

²⁹ Pour 1 gramme de zéolithe TS-1 traitée à la soude, uniquement une centaine de milligrammes a pu être récupérée.

³⁰ La conversion a été calculée à partir de la concentration de substrat mesurée par CPG. Elle englobe donc le substrat réellement transformé et également la part adsorbée sur support. Plus le substrat est adsorbé sur le support, plus la conversion est sur-évaluée.

Après 24 h, le catalyseur TS-1-d conduit à des rendements en 1,2-cyclohexanediol et 2-méthoxycyclohexanol plus faibles qu'avec TS-1 (Figure 146). Ceux-ci dépassent à peine 10% tous cumulés contre 30% pour TS-1 et la quantité d'époxyde résiduelle est quasi-nulle. Le produit majoritaire est alors le 2-méthoxycyclohexanol, tout comme avec TS-1, avec un rendement de presque 10%. La quantité en masse de catalyseurs utilisée ici était de 50 mg, correspondant à une surface exposée de 23,25 m²/g et 18,75 m²/g pour TS-1-d et TS-1 respectivement, selon les mesures de sorption d'azote. Ces surfaces sont quasi similaires et la volonté de travailler à iso-quantité de catalyseurs (même si TS-1-d est plus chargé en Ti) réside dans le fait qu'une grande partie du titane dans TS-1-d a certainement perdu la réactivité typique de la zéolithe TS-1. Autrement dit, cette comparaison n'est pas si évidente et doit être considérée avec prudence, puisque les rapports Ti/substrat et Ti/H₂O₂ sont très différents : (1 : 4 mol.) vs. (2,6 : 1 mol.) et (1 : 19 mol.) vs. (1 : 2 mol.) pour TS-1 et TS-1-d respectivement.

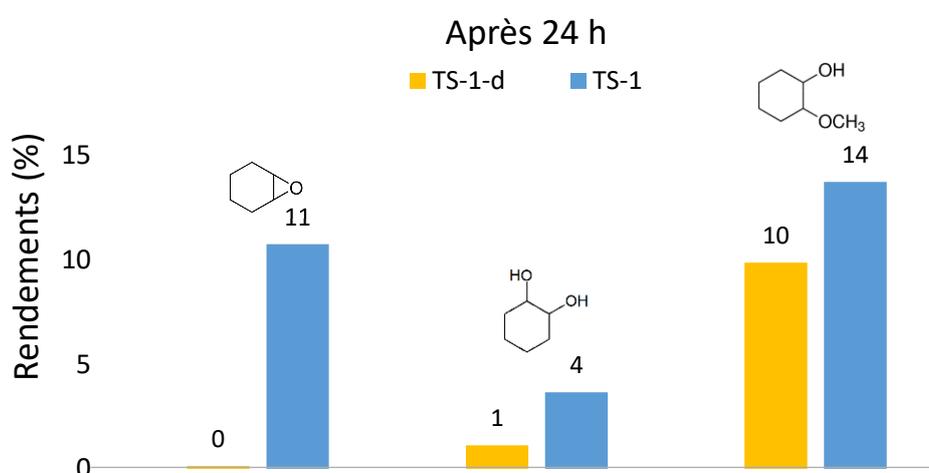


Figure 146: Comparaison de l'activité catalytique de la TS-1 et TS-1-d en présence de H₂O₂ dans MeOH à 50°C après 24 h de réaction. TS-1 (Si/Ti = 31 mol.), Ti/substrat (1 : 4 mol.), Ti/H₂O₂ (1 : 19 mol.) et TS-1-d (Si/Ti = 1,8 mol.), Ti/substrat (2,6 : 1 mol.), Ti/H₂O₂ (1 : 2 mol.). H₂O₂/substrat (5 : 1 mol.), pour [cyclohexène] = 50 mM

Les analyses BET et les mesures d'affinité pour l'eau ont permis de montrer que le catalyseur TS-1-d était plus hydrophile. Dans le méthanol, on peut donc supposer que l'eau issue de la réduction de H₂O₂ sera davantage en compétition avec le substrat pour les sites catalytiques que dans le cas de la zéolithe TS-1. De plus, l'affinité du cyclohexène pour ce catalyseur est possiblement réduite, d'où un abaissement d'activité attendu. Il n'en reste pas moins que l'apparition d'époxyde, caractérisée par la présence de ses dérivés, prouve qu'une certaine quantité de sites Ti sont configurés correctement pour que le contact avec le substrat soit encore possible et que la réaction prenne place. Cependant, le catalyseur TS-1-d n'est plus réactif en ajoutant du tampon dans le milieu d'oxydation, puisque pour l'essai avec 60% de MeOH, aucun produit de réaction n'a été décelé. Dans ce cas, il a été uniquement possible d'observer la disparition du cyclohexène par adsorption.

Silvestre-Albero et al. [1], les auteurs dont nous nous sommes inspirés pour la synthèse de TS-1-d avaient, pour leur part, constaté que le matériau TS-1-d utilisé pour l'oxydation par H₂O₂ de molécules volumineuses telles que le 1-tert-butyl-1-cyclohexène était bénéfique en milieu organique. Cependant pour les petites molécules telles que le cyclohexène, ils avaient eux-mêmes observé un gain moindre d'activité par rapport à TS-1 car dans ce cas, la réduction de la proportion de Ti actifs semble l'emporter sur l'accroissement de la fraction de mésopores. Il en va de même dans notre cas apparemment.

Ces premiers essais avaient pour objectif d'analyser l'activité de la zéolithe désilicatée selon un protocole issu de la littérature en vue d'une utilisation combinée avec l'enzyme GOx, puis d'optimiser si nécessaire le protocole de désilication afin d'obtenir une mésoporosité adéquate pour la GOx. Même si l'activité catalytique est moins importante avec ce matériau pour l'oxydation du cyclohexène, et nulle lorsque l'on ajoute du tampon, nous avons tout de même réalisé un essai de catalyse chimio-enzymatique en mélangeant cette fois-ci la zéolithe TS-1-d avec la GOx supportée sur MCF-NH₂ (avec 300 mM de glucose, cet essai ayant été effectué avant l'étude de la quantité de ce sucre dans le système). Cependant, aucun produit de réaction n'a été décelé.

2.4.2. Vers une utilisation de MCF-Ti ou de sa forme «zéolithisée» TS-1@MCF-Ti

Du point de vue des capacités d'accueil de l'enzyme, le mieux serait de pouvoir loger à la fois cette dernière et le titane au sein des cellules d'un support de type mousse mésocellulaire. Seulement, comme vu au paragraphe 2.3.1. du Chapitre II (cas du cyclooctène), les matériaux MCF-Ti ne sont pas efficace pour l'oxydation de substrats organosolubles dans des milieux hydro-organiques. Aussi, il nous a semblé plus adapté de traiter ici le cas de substrats hydrosolubles, avec l'exemple du prop-2-ène-1-ol. Une première version du catalyseur MCF-Ti-NH₂-GOx est présentée ainsi qu'une variante basée sur l'emploi d'un matériau composite TS-1@MCF-Ti.

Le prop-2-ène-1-ol est *a priori* un bon candidat pour l'oxydation avec MCF-Ti puisque, de par sa structure, celui-ci est plus facile à oxyder que le cyclooctène ou le cyclohexène. De plus, en milieu hydro-organique, la plus grande affinité du prop-2-ène-1-ol pour l'eau devrait permettre à ce substrat d'entrer en compétition avec H₂O sur les sites catalytiques du matériau hydrophile ce qui ne pouvait être le cas des cycloalcènes.

La capacité du matériau MCF-Ti à catalyser l'oxydation du prop-2-ène-1-ol par H₂O₂ introduit progressivement a été testée en milieu tampon acétate (pH = 6, 100 mM) à 40 et 50°C (Figure 147). En effet, les résultats obtenus avec la zéolithe TS-1 dans le même milieu à 40°C (Figure 138) étaient très concluants (conversion de 99% et sélectivité de 88%, cf. 2.3.1.).

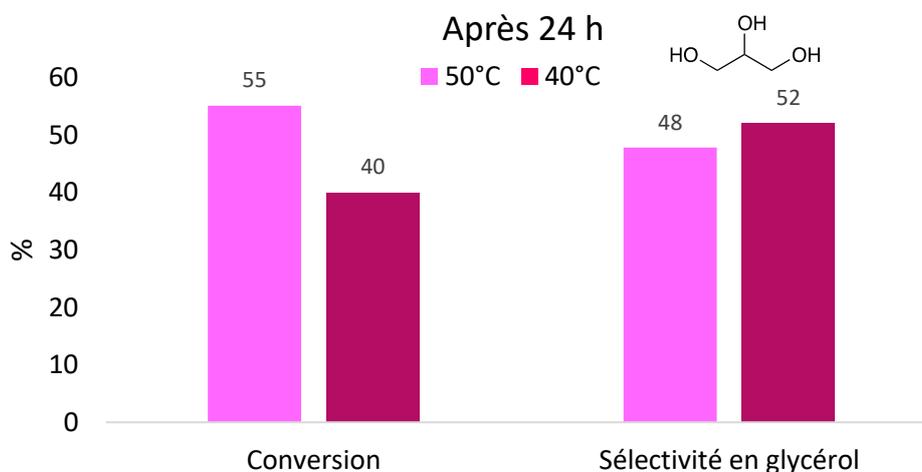


Figure 147 : Comparaison de l'activité catalytique de MCF-Ti (Si/Ti = 21,2 mol.) lors de l'oxydation du prop-2-ène-1-ol par H₂O₂ ajouté en trois fois, H₂O₂/substrat = 5 : 1 mol. à 40°C et 50°C. Ti/substrat (1 : 3 mol.) et Ti/H₂O₂ (1 : 13 mol.) pour [prop-2-ène-1-ol] = 50 mM

Un essai à plus haute température a été envisagé avec MCF-Ti dans la mesure où l'on s'attend à ce que les performances de ce catalyseur hydrophile soient moins élevées dans le tampon (compétition possible entre H₂O et H₂O₂ au niveau des sites catalytiques). Augmenter la température pourrait permettre d'améliorer son efficacité. Dans ces conditions, MCF-Ti est actif ; il conduit, en 24 h, à une conversion du prop-2-ène-1-ol allant de 40% à 40°C à 55% à 50°C. Dans les deux cas, la sélectivité en glycérol est de l'ordre de 50%, contre 88% en utilisant le catalyseur TS-1. Avec le catalyseur MCF-Ti hydrophile, le glycérol très polaire et constitué de plusieurs -OH est plus adsorbé en surface que sur la zéolithe et moins présent en solution.

La meilleure activité des zéolithes comparée aux matériaux mésoporeux de même composition dans des processus de catalyse acide ou d'oxydation a souvent amené, ces dernières années, les équipes de recherche à transformer la surface de ces derniers par le dépôt d'une couche de nanocristaux de zéolithes (« zéolithisation » [41, 42]). C'est le cas en particulier de Kaliaguine [2] qui rapporte avoir déposé TS-1 sur un support équivalent à MCF-Ti et qui a montré les bienfaits du matériau composite obtenu pour l'hydroxylation du 1-naphthol. Comme indiqué précédemment, nous avons repris la procédure de synthèse décrite par cette équipe et obtenu deux matériaux TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti² renfermant du titane à hauteur de Si/Ti de 40 et 53 respectivement.

- TS-1@MCF-Ti, a été testé comme catalyseur d'époxydation du but-3-ène-2-ol par H₂O₂ dans du tampon acétate (pH = 6, 100 mM)³¹ sans apporter d'augmentation significative de la conversion (différence de 7%), ni de la sélectivité en époxyde (différence de 8%) par rapport à MCF-Ti. Ces variations semblent même être juste liées à des conditions d'ajout de H₂O₂ différentes plutôt qu'à une modification du catalyseur.
- L'activité de TS-1@MCF-Ti, a été comparée à celle de MCF-Ti de départ (Figure 148) dans le cadre de l'oxydation du prop-2-ène-1-ol.

Avec un matériau plus abouti (deux étapes de dépôt successives), il est clairement visible que l'introduction de nanocristaux de TS-1 améliore significativement l'activité du catalyseur puisque la conversion passe de 55 à 74% et la sélectivité en glycérol de 48 à 84% pour MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti² respectivement (Figure 148). Le caractère hydrophobe de TS-1@MCF-Ti² augmentant, l'affinité du glycérol avec le matériau est beaucoup moins importante. Ces résultats sont significatifs puisque, dans l'étude de l'équipe de Kaliaguine portant sur l'hydroxylation du 1-naphthol, seule une augmentation de conversion de 2,5% avait été constatée [2, 9]. A nos yeux, cet essai valide l'introduction de TS-1 dans le matériau TS-1@MCF-Ti².

³¹ Conditions exactes :

- TS1@MCF-Ti (Si/Ti = 40 mol.) et Ti/substrat (1 : 31 mol.), en particulier l'essai avec TS-1@MCF-Ti a été effectué dans des conditions optimisées, à savoir à 60°C et pour une introduction lente de H₂O₂: 500 μmol ajoutés en **cinq fois** à raison d'un ajout toutes les trente minutes.
- Essai avec MCF-Ti (Si/Ti = 23,8 mol.) et Ti/substrat (1 : 13 mol.) à 40°C avec des ajouts de H₂O₂ (**en 3 fois**).

[but-3-ène-2-ol] = 250 mM et H₂O₂/substrat (1 : 1 mol.) dans les deux cas.

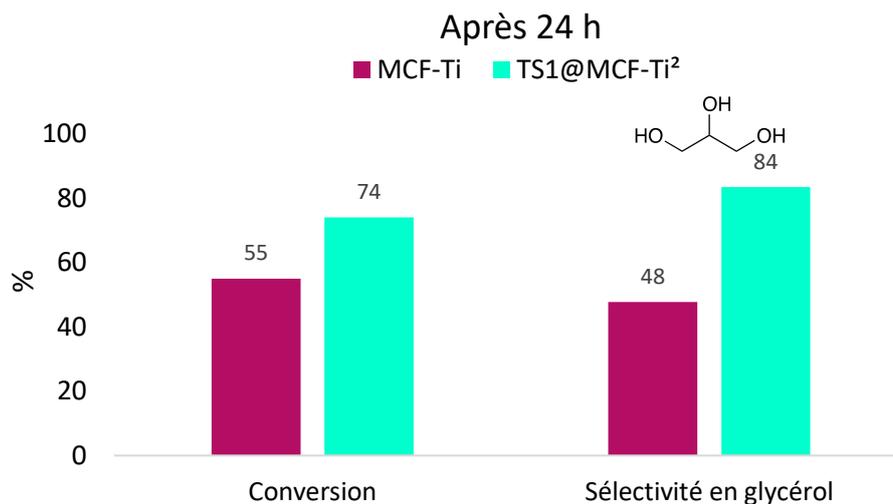


Figure 148: Comparaison des résultats d'oxydation du prop-2-ène-1-ol par les systèmes **TS-1@MCF-Ti²** (Si/Ti = 53 mol.), Ti/substrat (1 : 6 mol.), Ti/H₂O₂ (1 : 31 mol.) et **MCF-Ti** (Si/Ti = 21,2 mol.), Ti/substrat (1 : 3 mol.) avec des ajouts de H₂O₂ (en 3 fois), Ti/H₂O₂ (1 : 13 mol.) et H₂O₂/substrat (5 : 1 molaire) à 50°C pour [alcool] = 50 mM dans du tampon acétate (pH = 6, 100 mM)

Ces travaux préliminaires ayant montré la faisabilité de l'oxydation d'alcools allyliques par H₂O₂ en milieu purement aqueux, la prochaine étape concernait l'exploitation de matériaux, plus complexes, dotés à la fois des espèces actives de Ti vis-à-vis du prop-2-ène-1-ol et de l'enzyme, convenablement protégée, pour produire H₂O₂ à partir d'O₂ et de glucose. Un seul exemple a pu être développé dans le temps imparti. Ce catalyseur en tandem tel que nous l'avons imaginé au départ de cette thèse a été synthétisé à partir de 100 mg de MCF-Ti (1,79 -NH₂/nm) avec 4 mg de GOx initialement et une concentration en agent de couplage (EDC/NHS 1 : 1) de 5 mM (cf. 1.6. Chapitre II). 1,5 U de GOx par mg de solide ont pu y être greffés ce qui donne un ratio GOx/Ti (1 : 10 780 mol.), soit plus que tous les tests effectués en présence de GOx ((GOx/Ti = 1 : 36 620 mol.) ou (GOx/Ti = 1 : 108 333 mol.)). Nous l'avons testé à deux reprises pour époxyder le but-3-ène-2-ol dans du tampon acétate préalablement aéré renfermant également du glucose à 200 mM³² à 40°C. Malheureusement aucune trace de produit d'oxydation n'a pu être décelée après 24 h. Des analyses par HPLC ont pourtant bien validé la production de H₂O₂ par la GOx ainsi immobilisée sur le catalyseur, grâce à la mise en évidence et à la quantification d'acide gluconique (870 μmol, soit presque deux fois plus que ce qui était nécessaire pour époxyder 485 μmol de substrat). Chacun des éléments du tandem ayant démontré son aptitude à fonctionner séparément dans ces conditions (cf. paragraphes 2.4.2 de ce chapitre et 2.2.2.2 Chapitre II, tant pour MCF-Ti et tant pour GOx/MCF), nous pensons que le recouvrement de la surface de MCF-Ti par les groupements aminopropyle dans MCF-Ti-NH₂ est trop important, empêchant ainsi le substrat d'atteindre les sites catalytiques Ti. Cette hypothèse a été validée par une expérience témoin menée avec MCF-Ti-NH₂ (avant ancrage de la GOx) dans laquelle ce solide a été testé comme catalyseur d'époxydation du cyclooctène dans MeOH en présence de H₂O₂ introduit progressivement³³. Ce dernier, contrairement à MCF-Ti utilisé exactement dans le même contexte (cf. chapitre II) n'a conduit en effet à aucune transformation probante du cyclooctène. L'une des pistes pouvant être explorées pour pallier cette absence d'activité de MCF-Ti-NH₂, serait de faire varier le taux de recouvrement de l'amine.

³² Conditions : MCF-Ti-NH₂-GOx (Si/Ti = 23,8 mol.), GOx/Ti (1 : 10 780 mol.) dans un mélange tampon acétate (pH = 6, 100 mM et barbotage O₂) à 40°C. Ti/substrat (1 : 6 mol.) pour [but-3-ène-2-ol] = 250 mM et [glucose] = 200 mM

³³ Conditions : MCF-Ti-NH₂ (Si/Ti = 23,8) pour Ti/substrat (1 : 14 mol.) dans MeOH et H₂O₂/Cyclooctène (5 : 1 mol.), Ti/H₂O₂ (1 : 65 mol.) à 50°C, [cyclooctène] = 55 mM

3. Conclusion

Cette partie avait pour objectif le développement de systèmes catalytiques tandem intégrant une composante MCF-NH₂-GOx dont les bonnes performances en matière de production de H₂O₂ dans des milieux méthanol/tampon acétate ont été établies au chapitre II. Deux types d'approches ont été envisagées, l'une couplant MCF-NH₂-GOx avec TS-1, l'autre impliquant le matériau amorphe MCF-Ti ou des matériaux mésoporeux à composante zéolithique. L'étude comportait donc un volet de synthèse et caractérisation d'un certain nombre de matériaux à base de Ti ainsi que la réalisation de nombreux tests catalytiques avec différents alcènes de tendance lipo- ou hydrophile.

Concernant la synthèse des matériaux, les propriétés texturales, la proportion en Ti et les propriétés de surfaces sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 28: Récapitulatif des paramètres texturaux, de Si/Ti et du caractère hydrophobe/-ile des matériaux étudiés dans ce chapitre

Catalyseur	S _{BET} (m ² /g)	V _{micro} (cm ³ /g)	V _{meso} (cm ³ /g)	∅ _{Cellule} (nm)	∅ _{Fenetre} (nm)	μmol H ₂ O/m ²	Si/Ti
TS-1	376	0,18	0,26	-	-	5,3	31,2
TS-1-d	465	0,20	0,51	-	-	27,4	1,8
MCF-Ti	619	-	2,00	37,1	11,1	42,2	21,2
TS-1@MCF-Ti	359	-	1,20	24,7	9,6	5,9	53,0

Le matériau TS-1 synthétisé présente les caractéristiques attendues de cette zéolithe à savoir des espèces Ti sous forme majoritairement tétraédriques et un caractère hydrophobe important (5,3 molécules /nm² lors de l'essai d'adsorption).

Les différentes caractérisations de TS-1-d ont montré une création évidente de mésoporosité, qui permettrait d'insérer la GOx à certains endroits, mais également la création de sites Ti hors réseaux, (UV-DR et XANES). Cela dit, la conservation d'une partie de la structure cristalline de départ a été observée grâce aux images MET. La structure de la TS-1-d synthétisée est cependant moins ouverte que celle des MCFs, mais la quantification des molécules d'eau adsorbées en surface suggère une amélioration significative du caractère hydrophobe du matériau, recherchée pour les applications d'oxydation en milieu hydro-organique.

La modification du matériau MCF-Ti par deux étapes de *coating* successives (menant à TS-1@MCF-Ti²) a été validée par les différentes techniques de caractérisation utilisées. Bien que la présence de TS-1 introduit ait été difficilement détectable du fait de la taille présumée des nanocristaux attendus (< 4 nm), la quantification d'adsorption d'eau par ATG apparaît comme être une preuve crédible de la formation de ces cristaux hydrophobes au sein du matériau de départ.

D'ailleurs, l'analyse de la quantité d'eau adsorbée en surface montre l'évolution suivante : MCF-Ti > TS-1-d > TS-1@MCF-Ti² ≥ TS-1, prouvant que les modifications effectuées sur les matériaux ont atteint leur objectif. Le matériau qui semble le plus intéressant est le catalyseur TS-1@MCF-Ti² puisque ses paramètres texturaux sont suffisamment élevés pour envisager le logement de l'enzyme

et son caractère hydrophobe est très proche de celui de la zéolithe TS-1. Cependant, ce matériau n'a pu être fonctionnalisé par des groupements aminopropyle dans cette étude faute de temps.

Concernant les essais d'époxydation, plusieurs systèmes ont été évalués : dans MeOH ou avec ajout de tampon acétate, avec ajouts de H₂O₂ ou production biocatalysée par la GOx immobilisée sur MCF-NH₂.

L'époxydation du cyclohexène avec H₂O₂ à 50°C dans MeOH avec la TS-1 synthétisée a permis d'obtenir un rendement en époxyde de 11% après 24 h de réaction. L'apparition de produits d'ouverture de l'époxyde par hydrolyse, avec le 1,2-cyclohexanediol et solvolyses, avec le 2-méthoxycyclohexanol, a été observée. Ce dernier produit est d'ailleurs majoritaire après 24 h de réaction avec 14% de rendement, contre 4% pour le diol associé. L'adsorption du substrat et des produits sur le solide dans ce cas, c'est-à-dire un substrat organosoluble, font du rendement la grandeur la plus appropriée pour rendre compte de la réaction d'oxydation. L'ajout de 40% de tampon acétate dans le milieu entraîne l'ouverture totale de l'époxyde après 24 h. Le produit majoritaire est alors le diol avec un rendement de 32%, contre 15% pour le 2-méthoxycyclohexanol. Ces essais ont ainsi démontré la faisabilité de l'époxydation du cyclohexène en présence d'eau avec TS-1, contrairement au catalyseur MCF-Ti dans les mêmes conditions pour l'oxydation d'un cycloalcène homologue, le cyclooctène.

Des essais utilisant la bioproduction de H₂O₂ par l'enzyme immobilisée sur MCF-NH₂ ont également été effectués, notamment pour l'oxydation de substrats hydrosolubles tels que le prop-2-ène-1-ol et le but-3-ène-1-ol, en utilisant un mélange de MCF-NH₂-GOx et de TS-1. L'oxydation du prop-2-ène-1-ol dans un tampon à 40°C a été très concluante avec une conversion de 99% et une sélectivité de 88%. Les essais de recyclabilité de ce système ont cependant mis en évidence une diminution des performances catalytiques avec une diminution d'environ 30% de la conversion (la sélectivité restant identique de l'ordre de 85%). Le protocole expérimental de récupération du catalyseur pourrait être à l'origine de cette perte d'efficacité, tout comme la désactivation de l'enzyme dont la production de H₂O₂ a diminué d'un facteur 4. Cependant la quantité équimolaire d'oxydant produite était suffisante pour l'oxydation du substrat.

Ce mélange MCF-NH₂-GOx/TS-1 a également été évalué dans un milieu MeOH/tampon (v/v) 50 : 50 pour l'oxydation des substrats hydrosolubles cités et du cyclohexène. Afin de conserver l'activité catalytique de l'enzyme les essais ont été effectués à 35°C. Dans ces conditions les oxydations du prop-2-ène-1-ol et du but-3-ène-1-ol ont montré des résultats similaires de l'ordre de 50% pour la conversion et 95% pour la sélectivité : en glycérol issu de l'ouverture de l'époxyde associé, le glycidol pour le prop-2-ène-1-ol ; en 1,2-époxy-3-butanol pour le but-3-ène-1-ol. Le substituant méthyle supplémentaire de ce substrat semble donc jouer un rôle sur la stabilité de l'époxyde face à son ouverture. Le cyclohexène a également été oxydé dans ces conditions, à l'aide du même système catalytique et de manière efficace puisqu'un total de 50% des produits d'époxydation a été obtenu. Après 24 h de réaction aucun époxyde n'a été décelé et le produit majoritaire est le 1,2-cyclohexanediol (30% de rendement) issu de l'hydrolyse de l'époxyde. L'ajout de SDS a permis de solubiliser totalement le cyclohexène dans le milieu réactionnel, mais la mise en oeuvre d'un flux d'oxygène en surface a modifié la sélectivité de la réaction vers la formation d'environ 50% de dérivés allyliques tels que le cyclohexène-1-ol et la cyclohexène-1-one. On suppose, qu'en plus de solubiliser le cyclohexène, le surfactant favorise la solubilité d'O₂ dans le milieu.

L'étude de la production de H_2O_2 dans un mélange MeOH/ H_2O (v/v) 50 : 50 par la GOx immobilisée a montré que l'apport régulier d' O_2 améliore l'activité enzymatique, l'oxygène dissous étant le composé limitant de la production de H_2O_2 en présence de 300 mM de glucose. Cependant, il a été mesuré que 60 mM de H_2O_2 sont formés dans un milieu réactionnel dans lequel on a incorporé du tampon préalablement saturé en oxygène, comme c'est le cas de la quasi-totalité des réactions réalisées dans cette étude. La concentration de cyclohexène initiale étant toujours inférieure à cette concentration, la production d'oxydant nécessaire à la réaction est donc suffisante. Ces conditions permettent en outre d'éviter l'apparition de produits d'autoxydation en présence d'un flux permanent de dioxygène pendant la réaction.

Enfin, les matériaux modifiés tels que TS-1-d et TS-1@MCF-Ti², prometteurs pour les applications d'oxydation couplées à l'utilisation simultanée de la GOx, ont été évalués.

Le cyclohexène dans MeOH à 50°C n'est pas oxydé avec TS-1-d. L'attaque acide semble avoir détérioré significativement la coordinence des sites actifs de Ti. Il aurait pu être intéressant d'adapter le protocole de recristallisation utilisé dans la littérature [3, 7, 19] afin d'obtenir des mésopores suffisamment grands pour y placer l'enzyme et permettre de conserver de manière plus importante la structure cristalline de la TS-1.

Le catalyseur TS-1@MCF-Ti² montre quant à lui une amélioration significative des performances catalytiques pour l'oxydation du prop-2-ène-1-ol à 50°C en milieu aqueux, comparé au matériau de départ MCF-Ti. Ainsi, la conversion passe de 55% à 74% et la sélectivité en glycérol de 48% à 84%. Ce catalyseur semble être le plus prometteur pour des essais d'oxydation en tandem avec la GOx, à condition d'effectuer une étude réfléchie sur la fonctionnalisation du support. En effet, le catalyseur en tandem MCF-Ti-NH₂-GOx utilisé pour l'oxydation du but-3-ène-1-ol dans le tampon acétate à 40°C s'est révélé inactif. MCF-Ti-NH₂ s'étant montré lui aussi inactif pour l'époxydation du cyclooctène par H_2O_2 dans MeOH à 50°C, contrairement à MCF-Ti, on peut faire l'hypothèse que le taux de recouvrement des -NH₂ en surface est trop élevé et qu'il bloque l'accès des sites Ti.

En conclusion, les tests présentés dans ce chapitre montrent le fort potentiel d'un système chimioenzymatique autant en milieu aqueux qu'hydro-organique et pour des alcènes de nature variée. L'optimisation des conditions d'oxydation (solvant, SDS...), de recyclage, tout comme des matériaux utilisés reste alors à effectuer, mais la preuve de concept est bel et bien validée. De plus, le matériau MCF-Ti@TS-1² semble très prometteur et il serait intéressant de tester son activité avec un substrat organo-soluble.

Références :

- [1] A. Silvestre-Albero, A. Grau-Atienza, E. Serrano, J. García-Martínez, J. Silvestre-Albero, *Catal. Commun.* 44 (2014) 35-39.
- [2] D. Trong-On, A. Ungureanu, S. Kaliaguine, *PCCP* 5 (2003) 3534-3538.
- [3] D.P. Serrano, R. Sanz, P. Pizarro, I. Moreno, *Appl.Catal.*, A 435-436 (2012) 32-42.
- [4] J. Zhou, Z. Hua, X. Cui, Z. Ye, F. Cui, J. Shi, *Chem. Commun.* 46 (2010) 4994-4996.
- [5] Y. Cheneviere, F. Chieux, V. Caps, A. Tuel, *J. Catal.* 269 (2010) 161-168.
- [6] D. Serrano, R. Sanz, P. Pizarro, I. Moreno, *Chem. Commun.* (2009) 1407-1409.
- [7] N. Wilde, M. Pelz, S.G. Gebhardt, R. Gläser, *Green Chem.* 17 (2015) 3378-3389.
- [8] Y. Ding, Q. Ke, T. Liu, W. Wang, M. He, K. Yang, H. Jin, S. Wang, T. Tang, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 13903-13909.
- [9] A. Ungureanu, D. Trong On, E. Dumitriu, S. Kaliaguine, *Appl. Catal.*, A 254 (2003) 203-223.
- [10] F. Zhang, X. Carrier, J.-M. Krafft, Y. Yoshimura, J. Blanchard, *New J. Chem.* 34 (2010) 508-516.
- [11] F. Farges, G.E. Brown Jr., J.J. Rehr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter* 56 (1997) 1809-1819.
- [12] M. Rangus, M. Mazaj, I. Arčon, G. Mali, V.e. Kaučič, *Chem. Mater.* 23 (2011) 1337-1346.
- [13] S. Bordiga, S. Coluccia, C. Lamberti, L. Marchese, A. Zecchina, F. Boscherini, F. Buffa, F. Genoni, G. Leofanti, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 4125-4132.
- [14] A. Lopez, M.H. Tuilier, J.L. Guth, L. Delmontte, J.M. Popa, *J. Solid State Chem.* 102 (1993) 480-491.
- [15] S. Bordiga, F. Bonino, A. Damin, C. Lamberti, *PCCP* 9 (2007) 4854-4878.
- [16] G. Artioli, C. Lamberti, G.L. Marra, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci.* 56 (2000) 2-10.
- [17] C. Lamberti, S. Bordiga, A. Zecchina, G. Artioli, G. Marra, G. Spanò, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2204-2212.
- [18] W.O. Parker, R. Millini, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 1450-1451.
- [19] Y. Wang, M. Lin, A. Tuel, *Microporous Mesoporous Mater.* 102 (2007) 80-85.
- [20] P.P.E.A. De Moor, T.P.M. Beelen, R.A. Van Santen, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 7600-7611.
- [21] T.T. Peng Wu, Takayuki Komatsu, Tatsuaki Yashima, *Chem. Mater.* 14 (2002) 1657-1664.
- [22] A.s. Mirabaud, Development of a host-guest chemistry for the valorization of CO₂ through an eco-compatible catalysis, Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015.
- [23] J. Silvestre-Alberó, M.E. Domine, J.L. Jordá, M.T. Navarro, F. Rey, F. Rodríguez-Reinoso, A. Corma, *Appl.Catal.*, A 507 (2015) 14-25.
- [24] B. Prelot, S. Lantenois, C. Chorro, M.-C. Charbonnel, J. Zajac, J.M. Douillard, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 19686-19695.
- [25] P.B. Sarawade, J.-K. Kim, A. Hilonga, H.T. Kim, *Powder Technol.* 197 (2010) 288-294.
- [26] B.A. Kowert, R.M. Turner, C.V.C. Caldwell, *Chem. Phys.* 344 (2008) 114-120.
- [27] D.A.R. Richard L. Brutchey, Lars K. Andersen, and, T.D. Tilley, *Langmuir* 21 (2005) 9576-9583.
- [28] M.G. Clerici, *Kinet. Catal.* 56 (2015) 450-455.
- [29] A. Corma, P. Esteve, A. Martínez, *J. Catal.* 161 (1996) 11-19.
- [30] W. Fan, P. Wu, T. Tatsumi, *J. Catal.* 256 (2008) 62-73.
- [31] K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (12) (2002) 2024-2032.
- [32] A. Wróblewska, J. Wajzberg, A. Fajdek, E. Milchert, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 1344-1349.
- [33] P.N.R. Vennestrøm, E. Taarning, C.H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt, J.M. Woodley, *ChemCatChem* 2 (2010) 943-945.
- [34] N. Balistreri, D. Gaboriau, C. Jolival, F. Launay, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 127 (2016) 26-33.
- [35] R.A. Johnson, C.E. Burgos-Lepley, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- [36] N. Alonso-Fagúndez, I. Agirrezabal-Telleria, P.L. Arias, J.L.G. Fierro, R. Mariscal, M. López Granados, *RSC Adv.* 4 (2014) 54960-54972.
- [37] I. Kutsche, G. Giidehaus, D. Schuler, A. Schumpe, *J. Chem. Eng. Data* 29 (1984) 286-287.
- [38] P.B. A. Martínez Velarde, T.E.W. NieBen, W.F. Hoelderich, *J. Mol. Catal.* (2000) 225-236.
- [39] K.-H. Tong, K.-Y. Wong, T.H. Chan, *Tetrahedron* 61 (2005) 6009-6014.
- [40] M.N. Jones, P. Manley, A. Wilkinson, *Biochem. J* 203 (1982) 285-291.
- [41] A. Azhati, S. Xie, W. Wang, A.A. Elzatahry, Y. Yan, J. Zhou, D. Al-Dhayan, Y. Zhang, Y. Tang, D. Zhao, *Chem. Mater.* 28 (2016) 4859-4866.
- [42] S. Habib, F. Launay, M.-A. Springuel-Huet, F. Guenneau, V. Semmer-Herlédan, N. Novak Tušar, V. Kaučič, A. Gédéon, *New J. Chem.* 30 (2006) 1163-1170.

Chapitre IV. Utilisation d'une porphyrine couplée à la production biocatalysée de H₂O₂

Introduction

L'utilisation d'un biocatalyseur en tandem avec un catalyseur inorganique implique des restrictions sur les conditions de fonctionnement de ce dernier afin qu'elles soient compatibles avec le maintien de l'activité enzymatique, notamment en termes de température ou de présence de solvant organique. Pour atteindre l'objectif fixé, *i.e.* l'époxydation d'alcènes par H₂O₂ produit par la GOx *in-situ*, le chapitre précédent a montré que la zéolithe TS-1, permet à la fois une utilisation en milieu aqueux et à basse température. Une stratégie alternative consiste à utiliser des métalloporphyrines comme catalyseurs d'oxydation de l'alcène. Certaines d'entre elles sont en effet connues pour utiliser H₂O₂ comme oxydant [1-6]. De plus, certaines de ces porphyrines sont efficaces à température ambiante, permettant donc de travailler dans des milieux contenant une plus grande proportion de solvant organique, puisqu'on sait que la stabilité de la GOx en solvant organique décroît d'autant plus vite avec la température, que la proportion de solvant organique augmente.

Une porphyrine intéressante dans le cas de notre étude est la Mn-TCPP (Mn-5, 10, 15, 20-(tetrakis-4-carboxyphényl) porphyrine) dont la structure est rappelée Figure 149. Cette porphyrine utilise H₂O₂ comme oxydant, à température ambiante et est soluble en milieu organique (EtOH [7, 8], nitrobenzène [9], DMSO et DMF [10], DMF/acétique acide (v/v) 1 : 1 [11] par exemple). Une étude menée par Ferrer-Sueta et *al.* [12] sur la réduction de porphyrines(Mn), dont la Mn-TCPP, par des flavo-protéines (xanthine et glucose oxydases) utilise même un milieu aqueux (tampon phosphate pH = 7). Cependant, la solubilité de ce type de porphyrine est limitée en phase aqueuse, puisque cette molécule est composée d'un important réseau lipophile [10]. Pour des pH compris entre 5 et 7 les groupements carboxylates la constituant sont facilement neutralisés (pKa autour de 6,6), conduisant à une espèce neutre peu soluble dans les solutions aqueuses [13]. Il est donc préférable de travailler à des pH ≥ 7 où les groupements carboxyliques sont déprotonés et facilitent la solubilité de la porphyrine. De plus, celle-ci dépend également de la concentration ou force ionique, pouvant entraîner l'agrégation des molécules de porphyrine, comme par exemple, dans 10 mM de tampon Tris³⁴ ou dans 100 mM de KNO₃, à pH = 7,5 [14].

³⁴ Tampon Tris : tampon trishydroxyméthylaminométhane

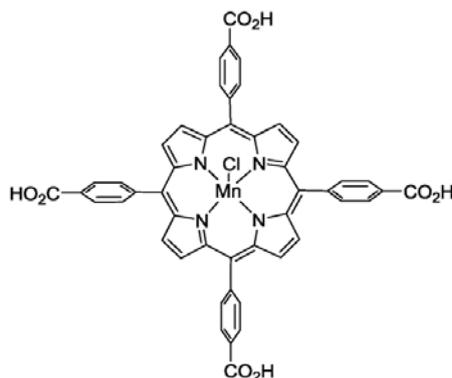


Figure 149: Structure de la porphyrine Mn-TCPP

L'intérêt de cette porphyrine pour notre étude est la présence de quatre fonctions acide carboxylique qui peuvent être utilisés comme sites de greffage avec les amines à la surface de MCF-NH₂, permettant ainsi d'hétérogénéiser ce catalyseur. De fait, un certain nombre d'exemples de greffage de porphyrines sur des matériaux fonctionnalisés -NH₂ sont reportés dans la littérature. A noter que le lien ne se fait pas forcément avec -COOH, puisque plusieurs porphyrines contiennent des fonctions halogénées en bout de bras (Ar, F) [1, 4, 15, 16]. Le métal complexé par la porphyrine joue le rôle de catalyseur d'oxydation, tout comme dans les hémoprotéines. Les porphyrines ont déjà été utilisées en association avec la GOx dans le cadre d'applications électrochimiques et de détection de glucose [15, 17-21]. Les porphyrines à base de fer (FeTCPP par exemple), immobilisées par adsorption sur des supports conducteurs carbonés, possèdent une excellente activité électro-catalytique de transfert direct des électrons et sont couplées à la GOx pour former des biocapteurs basés sur la consommation de O₂ [18, 19]. D'autres propriétés des porphyrines, comme la fluorescence, sont également utilisées. En effet grâce à une irradiation appropriée, les porphyrines peuvent émettre une fluorescence importante, qui en présence de H₂O₂ peut réduire de manière quantitative. Cette technique associée à la GOx, comme catalyseur de conversion de glucose en H₂O₂, pourrait être utilisée comme capteur de H₂O₂ ou glucose [15, 20]. Quelques études utilisent les porphyrines (notamment à base de fer) avec H₂O₂ pour l'oxydation de molécules telles que cyclooctène [22], le cyclohexène et le styrène [1], mais la combinaison GOx-porphyrine n'est pas utilisée pour la production de composés d'oxydation et constitue donc une étude originale.

En plus de porphyrines à base de fer, on trouve dans la littérature des exemples d'oxydation du cyclooctène par H₂O₂ à l'aide de différentes porphyrines au manganèse immobilisées [2, 16, 22]. Par exemple, l'immobilisation d'une porphyrine Mn-TFPP (porphyrine au manganèse avec des groupes fluorés au niveau des 4 extrémités) sur un gel silicique fonctionnalisé par -NH₂, mène à un rendement en époxyde de 5%, après 24 h³⁵ [1]. De Paula et *al.* [2], quant à eux, annoncent une conversion du cyclooctène en époxyde maximum de 99%, après 2,5h, en utilisant une autre porphyrine de manganèse (5,10,15,20-tetrakis(1-méthylimidazol-2-yl)-21H,23H-porphyrine) immobilisée sur un gel de silice fonctionnalisé par des groupements 3-bromopropyle³⁶. Dans les deux cas, l'immobilisation de la porphyrine améliore la réactivité catalytique par rapport à son utilisation en solution. S'agissant des travaux de Faria et *al.* [1] impliquant le greffage de Mn-TFPP sur un gel silicique fonctionnalisé par -

³⁵ [Mn-TFPP]/[H₂O₂]/[cyclooctène]= 1 : 100 : 2000, dans le mélange dichlorométhane/acétonitrile (1:1), [Mn-TFPP]/[imidazole] = 1 : 30, à température ambiante

³⁶ [Mn-porph]/[H₂O₂]/[cyclooctène]= 1 : 51 : 102, dans CH₃CN, ([Mn-porph]/[imidazole] = 1 : 1130, à température ambiante

NH₂, il a été proposé que l'acidité du support favorise la protonation de l'oxygène et le clivage hétérolytique de la liaison O-O. En plus du fait que l'immobilisation de la porphyrine est un atout majeur pour sa réutilisation, l'environnement local du support peut également entraîner une plus grande sélectivité et empêcher le catalyseur de s'auto-oxyder [23].

Différentes méthodes ont été proposées pour immobiliser les porphyrines sur des supports : par interactions électrostatiques, par piégeage dans une matrice solide ou par greffage covalent, qui dans notre étude est celle privilégiée. Dans ces travaux, nous avons dans un premier temps testé la porphyrine Mn-TCPP en solution et en présence de GOx afin de réaliser l'oxydation du cyclooctène par catalyse homogène et établir la faisabilité de la catalyse tandem. Dans un second temps, des expériences d'hétérogénéisation partielle ont été réalisées soit avec la porphyrine en solution et l'enzyme immobilisée, soit l'inverse. Les résultats présentés seront appuyés par des caractérisations, notamment pour l'étape de greffage de la porphyrine.

1. Matériels & Méthodes

L'immobilisation de l'enzyme a été effectuée suivant le protocole présenté précédemment (Chapitre II 1.6), sur un support MCF-NH₂ préalablement fonctionnalisé avec environ 2 molécules de –NH₂/nm² (Chapitre II 2.1.4.1). La porphyrine Mn-TCPP utilisée dans ces travaux a été métallée au sein du laboratoire par Julien Reboul. Les quantités de substrat, étalon ou solide introduites en début des réactions sont pesées avec une incertitude-type de 0,06 mg (balance AB204-s de Mettler Toledo).

1.1. Greffage covalent de la porphyrine sur MCF-NH₂

Afin, dans un premier temps, d'évaluer le protocole sans en utiliser trop, la quantité de porphyrine Mn-TCPP mise en jeu lors de ce premier greffage sur MCF-NH₂ a été fixée à 1/30 d'équivalent molaire des groupements amine du support. Ainsi, 12,1 mg (13,73 μmol) de Mn-TCPP sont dissous dans 5,72 mL de mélange EtOH/tampon phosphate (pH = 7, 40 mM, Fluka) (v : v) 80 : 20) puis 3,55 mg d'EDC (3 mM finales) et 6,58 mg de NHS (10 mM finales) sont pesées et ajoutés à la solution précédente et le tout homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 2 min. Ensuite 0,2 g de MCF-NH₂ sont dispersés dans le mélange à l'aide d'ultra-sons, puis la dispersion est placée 24 h à 4°C.

Dans ces conditions, si toute la porphyrine était immobilisée (en faisant l'hypothèse qu'une porphyrine est liée à un seul groupement –NH₂), le solide serait chargé de 69 μmol de Mn/g_{support}, soit environ dix fois moins d'espèces métalliques que pour TS-1 et MCF-Ti avec 520 μmol/ g_{support} et 771 μmol/ g_{support} respectivement.

Enfin une trentaine de lavages du solide à l'eau distillée, suivi d'un lavage avec 60% EtOH, puis enfin 2 lavages avec du tampon phosphate ont été effectués. Les surnageants ont été analysés par spectroscopie UV-visible afin de vérifier que ces derniers ne contiennent plus de porphyrine à l'issue des lavages.

1.2. Caractérisation du greffage covalent de Mn-TCPP sur MCF-NH₂

Le matériau MCF-NH₂-Mn-TCPP a été caractérisé à l'aide de mesures de sorption de N₂, de fluorescence X et d'UV-RD afin de connaître les paramètres texturaux après greffage et d'évaluer la quantité de porphyrine fixée. Les appareils et les méthodes utilisés sont décrits au niveau du chapitre II.

1.3. Tests d'époxydation d'alcènes

Les conditions d'époxydation utilisées au départ dans cette étude ont été adaptées d'autres travaux avec Mn-TCPP effectués au laboratoire par Julien Reboul.

Il a été d'autre part décidé d'utiliser de l'imidazole comme cofacteur. Ce ligand axial de la porphyrine ajouté en excès se coordine au manganèse (III) lui procurant ainsi un supplément de densité électronique suffisant pour faciliter la rupture hétérolytique de la liaison O-O de l'espèce peroxy initialement formée entre Mn et H₂O₂ (voir Figure ci-dessous, étape 3). En fait, l'imidazole libre peut agir également en tant que catalyseur acido-basique facilitant la coordination de H₂O₂ par déprotonation et la rupture de la liaison O-O par départ d'une molécule d'eau (étape 2). A la fin de ce processus, l'espèce active résultante est un complexe oxo-Mn-porphyrine. Le manganèse présente alors un degré d'oxydation V. La présence de l'imidazole a pour effet également d'affaiblir la liaison Mn=O, qui en se déstabilisant va mener à l'oxydation du substrat.

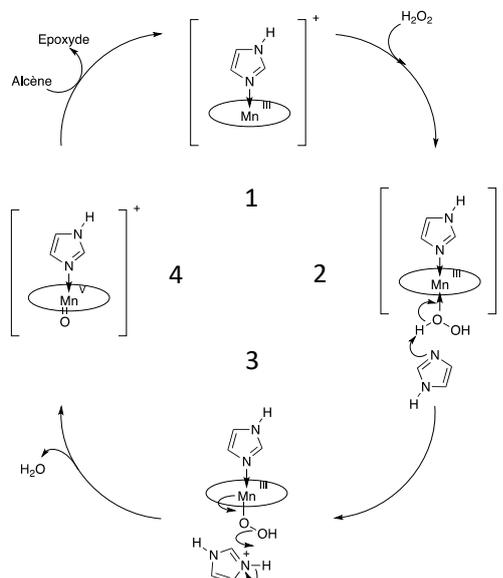


Figure 150: Rôles de l'imidazole lors de l'époxydation d'alcènes par H₂O₂ catalysée par une porphyrine de manganèse [24]

Il a donc été observé à maintes reprises que l'utilisation de l'imidazole couplé aux porphyrines améliore leur efficacité [5, 25-27].

L'identification et la quantification des réactifs et des produits des réactions d'époxydation ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse (He comme gaz vecteur) après 3, 6 et 20h de réaction. Un appareil Perichrom utilisant un détecteur FID et une colonne capillaire de 30 mètres (diamètre interne de 0,25 mm) rempli d'une phase stationnaire OPTIMA 1 Accent (100% diméthylsiloxane), d'une épaisseur de 0,25 μm a été utilisé. Le programme en température utilisé est

identique à celui du Chapitre II. Dans le cas des suspensions, l'agitation est stoppée avant prélèvement de manière à ne prélever que le surnageant exempt de particules. Les courbes de calibration des différents composés ont été effectuées à l'aide d'étalons commerciaux. Les coefficients de réponse utilisés ici sont ceux présentés Tableau 4, Chapitre II dans MeOH/tampon acétate (v/v) 60 : 40.

Tous les essais d'époxydation ont été effectués sans ajouter de source externe de lumière sous la hotte puisque la porphyrine y est sensible [28].

1.3.1. Catalyse homogène en tandem Mn-TCPP/GOx

Dans un premier temps, le catalyseur et le biocatalyseur utilisés en tandem ont été testés en réaction homogène pour l'époxydation du *cis*-cyclooctène (95%, Aldrich). 60 µmol de substrat ([cyclooctène] = 34 mM) ainsi que 6 µl (27 mM) de 2-hexanone (pureté > 98%, Fluka), qui servira d'étalon interne lors de l'analyse en CPG, ont été mélangés à 1,2 mL de MeOH ou EtOH (Sigma-Aldrich), 0,570 mL de tampon phosphate (pH = 7, 40 mM) préalablement aéré et 0,2 g (concentration finale de 617 mM) de glucose, afin d'obtenir un milieu à 67% de solvant organique. Ensuite, 2 mg d'imidazole (≥ 99,5%, Sigma-Aldrich) ont été ajoutées au mélange (17 mM), puis, 4,8 mg de Mn-TCPP (6,1 µmol) sont dissous dans le milieu réactionnel (Mn-TCPP/cyclooctène = 1 : 9,8 mol.). Le mélange est maintenu sous agitation au moins 1 h et également sous ultrasons pendant 15 à 30 min afin de s'assurer de la solubilisation de la porphyrine. Au dernier moment, 0,3 mg (36 U) de GOx sont dissous dans la solution (Mn-TCPP/GOx = 3558 : 1 mol.) et le tout est maintenu sous agitation magnétique dans un bain à 24°C. Un suivi cinétique est effectué à 3, 6 et 24h.

1.3.2. Catalyse semi-homogène : Mn-TCPP en solution et MCF-NH₂-GOx

Dans un second temps, la porphyrine libre, Mn-TCPP, et le biocatalyseur immobilisé, MCF-NH₂-GOx ont été testés en tandem pour l'époxydation du *cis*-cyclooctène dans les mêmes conditions de solvant (67% MeOH ou EtOH) que pour les tests de pure catalyse homogène.

Plus précisément, les conditions expérimentales sont les suivantes :

- 60 µmol de cyclooctène (34 mM) et 6 µL d'étalon (2-hexanone) ont été mélangés à 1,2 mL de solvant pur (MeOH ou EtOH) et 0,57 mL de tampon phosphate (pH = 7, 40 mM) préalablement aéré. Le solvant est donc constitué d'un mélange EtOH (ou MeOH)/H₂O (v/v) 67 : 33.
- Puis, 0,2 g (617 mM finale) de glucose sont ajoutées au mélange, ainsi que 2 mg d'imidazole (17 mM).
- 4,8 mg de Mn-TCPP (6,1 µmol) sont ajoutés au milieu réactionnel et mélangées au moins 1 h et également sous ultrasons pendant 15 à 30 min.
- 36 U de GOx immobilisée (soit 13 mg de MCF-NH₂-GOx) sont introduites finalement à la solution au dernier moment (Mn-TCPP/GOx = 3558 : 1 mol.).

Le tout est maintenu sous agitation magnétique dans un bain à 24°C pendant 24 h. Un suivi cinétique est effectué à 3, 6 et 24h.

A noter qu'une seconde série d'essais a été réalisée dans EtOH/tampon acétate (v/v) 70 : 30 avec 300 mM de glucose.

Le solide issu de l'essai d'oxydation du cyclooctène avec Mn-TCPP et MCF-NH₂-GOx a été récupéré après sept lavages consécutifs avec du tampon phosphate à pH = 7 puis de l'eau distillée, afin de retirer le plus de porphyrine possible du mélange final. Le dernier surnageant a été analysé en UV-visible afin de s'assurer de l'absence de porphyrine en solution. Après cela, une mesure d'activité du solide a été effectuée en spectroscopie UV-visible à l'aide d'un appareil UVIKON 930 (Kontron), comme décrit au Chapitre II 1.7.1. Finalement, le solide a été séché une nuit à l'étuve à 60°C et étudié par thermogravimétrie selon le matériel et la méthode décrits précédemment.

1.3.3. Catalyse semi homogène : GOx ou H₂O₂ en solution et MCF-NH₂-Mn-TCPP

Les résultats obtenus au paragraphe précédent nous ont amenés à modifier les conditions expérimentales (substrat, quantité de GOx plus importante et imidazole plus faible). Pour ces essais, le substrat utilisé a été le cyclohexène (99%, Sigma-Aldrich) et les conditions expérimentales sont les suivantes :

- 92 µmol de cyclohexène (30 mM) et 6 µL d'étalon (2-hexanone) ont été mélangés à de l'éthanol ou méthanol et du tampon phosphate (pH = 7, 40 mM) préalablement aéré, le tout dans des proportions EtOH/ tampon phosphate (v/v) 70 : 30.
- La solution résultante a été additionnée à 477 µL de glucose (300 mM finale), ainsi qu'à 1 mg d'imidazole (8,3 mM).
- Le mélange est homogénéisé le temps nécessaire puis 50 mg de MCF-NH₂-Mn-TCPP sont dispersés dans le milieu (Mn-TCPP/cyclohexène = 1 : 403,5 mol.).
- Deux types d'essais ont été effectués : le premier avec 96 U de GOx libre (Mn-TCPP/GOx = 1 : 50 mol.) dans EtOH/ tampon phosphate, puis le second en procédant à des ajouts manuels de H₂O₂ (30 wt%, Sigma) en cinq fois, chacun des ajouts étant séparés de 30 min, H₂O₂/substrat (5 : 1mol.) dans MeOH/ tampon phosphate.

Le mélange est maintenu sous agitation magnétique dans un bain à 24°C. Un suivi cinétique est effectué à 3, 6 et 24h.

2. Résultats et discussion

2.1. Caractérisation du matériau MCF-NH₂-Mn-TCPP

Le greffage de la porphyrine sur MCF-NH₂ a été analysé par mesure de sorption de N₂ afin d'évaluer son influence sur les paramètres structuraux du support. Il a ensuite été étudié par fluorescence X afin de quantifier la Mn-TCPP sur la silice.

Le matériau MCF-NH₂-Mn-TCPP a été caractérisé par fluorescence X, UV-RD et sorption de N₂ afin de rassembler quelques preuves préliminaires de l'ancrage de la porphyrine sur MCF-NH₂.

Une première estimation de la quantité de porphyrine greffée sur le support a été obtenue à partir des dosages de Mn et Si par fluorescence X. Le rapport Mn/Si de départ était de 0,004; celui estimé expérimentalement à l'arrivée vaut 0,0000056. Cela correspondrait à seulement 0,1% de la quantité initiale de Mn-TCPP utilisée lors de l'étape d'immobilisation. Ramenée à la surface spécifique, cela correspond à une densité d'environ 0,8 porphyrine pour 100 nm², soit un recouvrement des -NH₂ de 0,4%. Pour rappel, dans les catalyseurs TS-1 (cf. chapitre III) et MCF-Ti (cf. chapitre II et III), les ratios Ti/Si valaient 0,032 et 0,047, respectivement.

Les analyses UV-RD de la porphyrine TCPP, métallée Mn-TCPP et immobilisée sur MCF-NH₂ sont présentées figure ci-dessous.

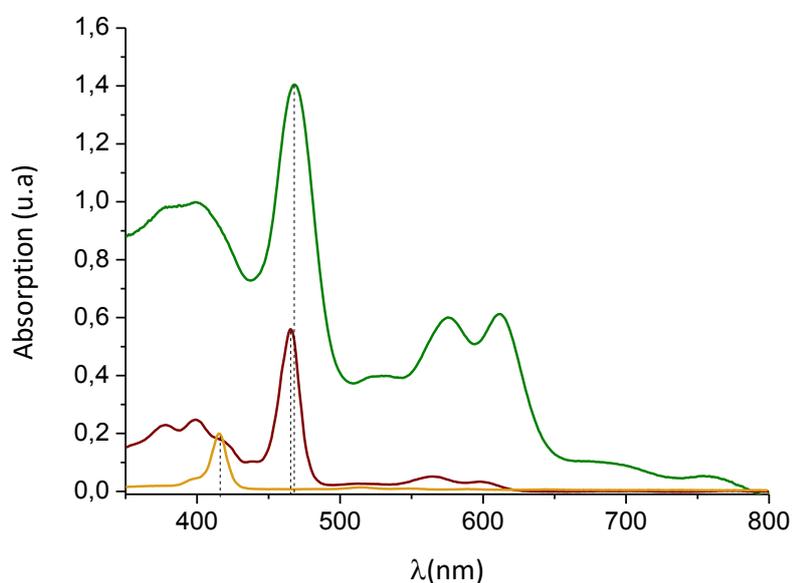


Figure 151: Spectres UV-vis. de la porphyrine TCPP et Mn-TCPP (dans EtOH) et MCF-NH₂-Mn-TCPP (réflexion diffuse)

Les spectres sont caractéristiques de porphyrines avec la présence d'une bande de Soret entre environ 405 et 470 nm et deux bandes Q (α et β) de plus faibles intensités entre 550 nm et 650 nm pour les porphyrines métallées [2, 7, 28]. Ces absorptions proviennent de transitions π - π^* du macrocycle de la porphyrine. Noter que la métallation (avec Mn) de la porphyrine TCPP se traduit par un décalage de la bande de Soret de 415 à 466 et 468 nm respectivement pour Mn-TCPP et MCF-NH₂-

TCPP. L'existence de ces bandes sur le spectre de MCF-NH₂-Mn-TCPP démontre clairement la conservation de la structure de Mn-TCPP sur le support même après avoir subi le protocole de greffage.

Les isothermes d'adsorption/désorption de N₂ sur MCF-NH₂-Mn-TCPP et le support de départ, MCF-NH₂, sont présentées ci-dessous.

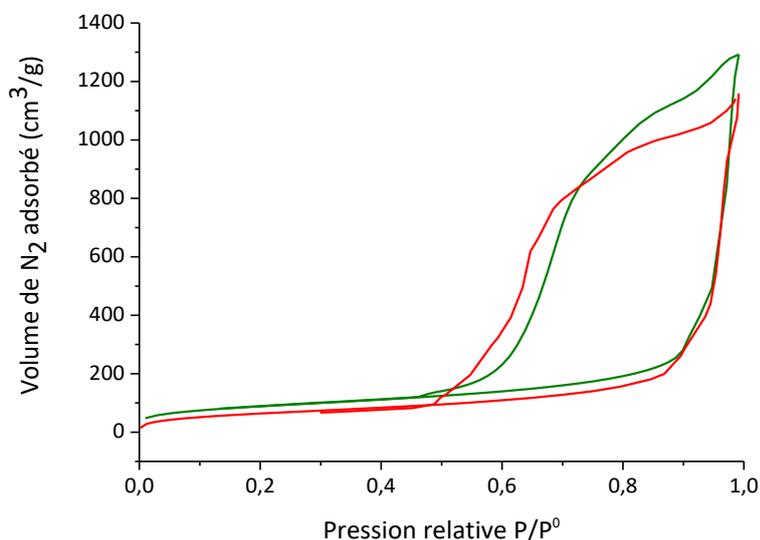


Figure 152: Isothermes d'adsorption/désorption d'azote de **MCF-NH₂-Mn-TCPP** et **MCF-NH₂**

Ces mesures de sorption de N₂ et les informations qui en découlent (paramètres texturaux, dont C_{BET}) sur Mn-TCPP et plus particulièrement sur MCF-NH₂-TCPP doivent être considérées avec précaution :

- d'une part, parce que ces matériaux hybrides organiques/inorganiques sont difficilement stables d'où des conditions de prétraitement adoucies mais pas forcément adaptées à un bon dégazage des surfaces,
- d'autre part, parce que les modèles de traitement des données, BET et Bdb-FHH n'ont pas été conçus initialement pour des surfaces fortement recouvertes de matière organique.

En tout cas, tout comme pour MCF-NH₂, l'isotherme de désorption de MCF-NH₂-TCPP est une courbe de type IV ; elle forme une boucle d'hystérésis de type H1 avec la branche d'adsorption, laquelle est typique des matériaux mésoporeux à larges pores [29].

Tableau 29 : Paramètres texturaux de MCF-NH₂ et MCF-NH₂-Mn-TCPP

Matériaux	S _{BET} ^a (m ² /g)	∅ ^b _c (nm)	∅ ^b _f (nm)	Volume pore (cm ³ /g)
MCF-NH ₂	233	46,5	6,5	0,64
MCF-NH ₂ -Mn-TCPP	319	37,7	8,6	1,3

^a Calculées selon Brunauer-Emmett-Teller BET.

^b Calculées selon le modèle Broekhoff-de-Boer Bdb-FHH modifié.

La diminution des diamètres des cellules, après le greffage de Mn-TCPP comparé à MCF-NH₂, va dans le sens de l'immobilisation de la porphyrine sur le matériau. L'augmentation du volume des pores, de la taille des fenêtres et de la surface spécifique n'est pas attendue et ne peut être expliquée en l'état

sauf à redire que les mesures sur ces matériaux sont délicates. Elles sont données ici pour information mais devront être répétées. Il faudra s'assurer en particulier que l'échantillon analysé après pré-traitement est conforme à celui de départ.

Les valeurs des coefficients C_{BET} de MCF-NH₂ et MCF-NH₂-Mn-TCPP (Tableau 30), respectivement égales à 70,8 et 96,7, ne sont pas significativement différentes sans doute en raison de l'assez faible quantité de porphyrine fixée sur le support. L'évolution observée apparaît être dans le mauvais sens puisque l'on s'attend à une augmentation du caractère hydrophobe avec l'introduction du macrocycle sur le support, encore que celui-ci est substitué par quatre groupements acide carboxylique pas forcément convertis en fonctions amide.

Tableau 30: Evolution du coefficient C_{BET} représentatif du caractère hydrophobe des matériaux MCF-NH₂-Mn-TCPP et MCF-NH₂

Catalyseur	Coefficient C_{BET}
MCF-NH ₂ -Mn-TCPP	96,7
MCF-NH ₂	70,8

Les tests ci-dessous rapportent les performances catalytiques de catalyseurs couplés Mn-TCPP/GOx, pour l'oxydation du cyclooctène et du cyclohexène, que ces deux catalyseurs soient en solution ou immobilisés sur le support MCF-NH₂.

2.2. Résultats des tests d'oxydation d'alcènes

Les tests ci-dessous rapportent les performances des catalyseurs Mn-TCPP et GOx utilisés de façon couplée pour réaliser l'oxydation du cyclooctène ou du cyclohexène. Trois variantes ont été testées selon que les deux catalyseurs soient en solution ou à tour de rôle immobilisés sur le support MCF-NH₂.

2.2.1. Catalyse homogène en tandem Mn-TCPP/GOx

La Figure 153 ci-dessous présente le résultat d'oxydation du cyclooctène en présence des deux catalyseurs : Mn-TCPP et GOx en solution, dans un milieu hydro-organique à température ambiante. Du peroxyde d'hydrogène est bien produit *in-situ* et activé par la porphyrine. Le rendement en oxyde de cyclooctène augmente avec le temps pour atteindre 17% après 26 h de réaction. L'époxyde est le seul produit de réaction détecté par analyse en chromatographie phase gaz. On remarque que le bilan matière est bouclé à l'issue de la réaction. Initialement, on a introduit 60 μ mol de cyclooctène et après 26 h de réaction, la somme du cyclooctène restant et de l'époxyde formé s'élève à 70 μ mol (cette valeur un peu plus élevée peut être attribuée à l'erreur expérimentale).

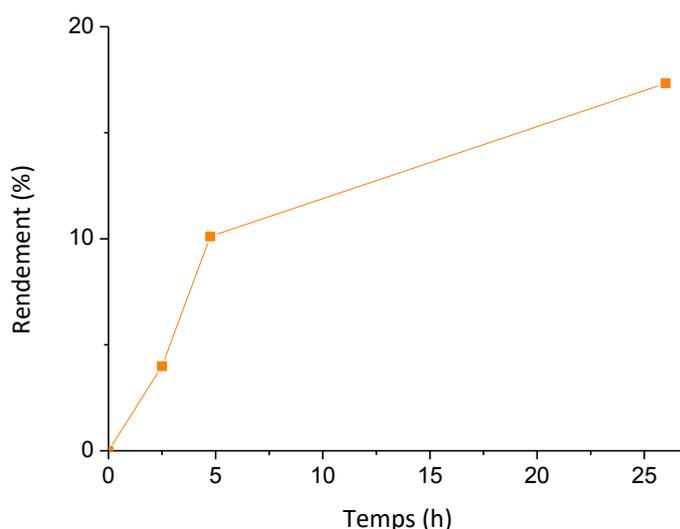


Figure 153: Epoxydation du cyclooctène (34 mM) avec 36 U de GOx libre et 6,1 μ mol de Mn-TCPP libre (Mn-TCPP/GOx = 3558 : 1 mol.) dans MeOH/ tampon phosphate (v/v) (67 : 33), Mn-TCPP/cyclooctène (1 : 9,8 mol.), [imidazole] = 17 mM, [glucose] = 617 mM, à 24°C

Ainsi, le calcul du rendement en époxyde montre que l'association de ces deux catalyseurs homogènes en cascade est donc un système d'époxydation du cyclooctène efficace.

Un essai a ensuite été effectué dans les mêmes conditions, excepté que le méthanol est remplacé par de l'éthanol, afin d'observer l'influence du solvant. Les résultats sont montrés Figure 154 et sont comparés à ceux obtenus dans MeOH/ tampon phosphate (v/v) 67 : 33.

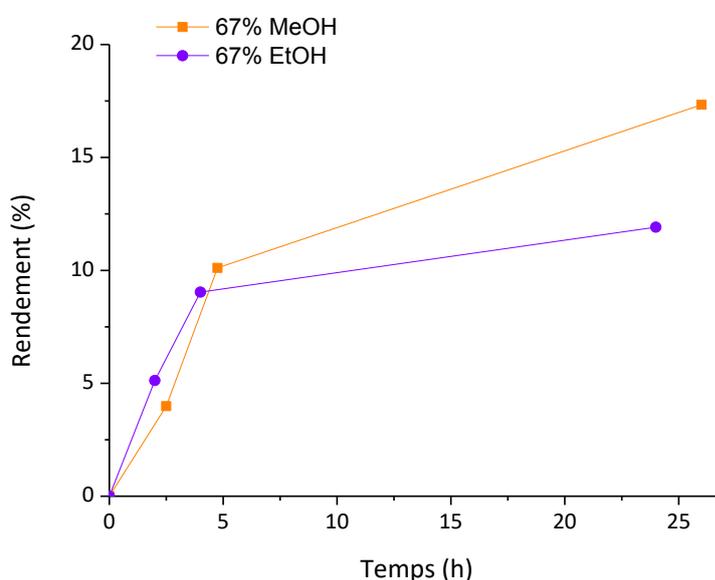


Figure 154: Epoxydation du cyclooctène (34 mM) en présence de 36 U de GOx libre et 6,1 μ mol de Mn-TCPP libre (Mn-TCPP/GOx 3558 : 1 mol.) dans MeOH/ tampon phosphate (v/v) 67 : 33 et EtOH/ tampon phosphate (v/v) 67 : 33, Mn-TCPP/cyclooctène (1 : 9,8 mol.), [imidazole] = 17 mM, [glucose] = 617 mM, à 24°C

Après une vingtaine d'heures, le rendement passe de 17% dans MeOH à 12% dans EtOH. La différence est de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale (5%) même si on peut s'interroger sur l'existence d'une oxydation compétitive du solvant dans le cas où ce dernier est l'éthanol. Cette hypothèse n'a pas pu être validée ou invalidée du fait de la difficulté à détecter l'acétaldéhyde ou l'acide acétique en

aussi faibles quantités dans nos conditions d'analyse en CPG. De même un essai a montré que la GOx est plus active dans un milieu composé de MeOH plutôt que EtOH, ce qui pourrait expliquer cette faible différence de rendement.

Après 24 h, l'utilisation d'éthanol comme solvant aboutit à une réactivité catalytique semblable. Cependant nous avons observé que la dissolution de la porphyrine est plus rapide dans ce solvant, son utilisation est alors plus commode d'un point de vue expérimental.

2.2.2. Catalyse semi-homogène en tandem : Mn-TCPP en solution et MCF-NH₂-GOx

La GOx étant immobilisée et la porphyrine se solubilisant plus facilement dans l'éthanol, les essais avec MCF-NH₂-GOx ont été effectués dans EtOH/ tampon phosphate (v/v) 67 : 33. Les résultats Figure 156 montrent que la réaction présente un temps de latence puisque, jusqu'à 4,5 h, on ne détecte pas d'époxyde. Un tel phénomène a précédemment été observé dans la littérature avec un système chimioenzymatique homogène associant la GOx au bicarbonate de sodium pour l'époxydation de l'acide 4-styrènesulfonique [30]. Tong et *al.* ont rapporté que pour une concentration supérieure à 300 mM de glucose, la réaction d'époxydation était d'autant plus retardée que la concentration en glucose augmentait.

Dans le cas présent, après 23 h, le rendement en époxyde n'est que de 1,7% contre 12% avec la GOx libre toutes conditions égales par ailleurs, notamment les rapports Mn-TCPP/GOx. Cela rappelle les résultats de Faria et *al.* [1] présentés en introduction, qui utilisent une porphyrine Mn-TFPP immobilisée sur un gel silicique fonctionnalisé -NH₂ avec laquelle ils obtiennent 5 % de rendement en époxyde de cyclooctène avec H₂O₂, contre 10% en utilisant la porphyrine libre en solution. L'immobilisation de l'enzyme n'améliore donc pas l'efficacité de la réaction, au contraire.

Une hypothèse peut être proposée pour expliquer la faible quantité d'époxyde observé. Il s'agit de la réaction de l'époxyde formé avec les fonctions -NH₂ libres du support, comme montré figure ci-dessous.

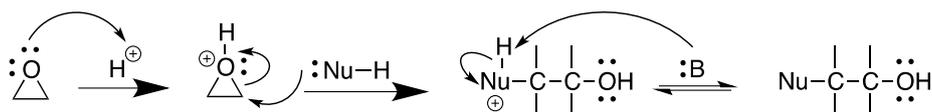


Figure 155: Ouverture de l'époxyde par un nucléophile Nu-H (par exemple -NH₂)

Généralement, cette réaction est catalysée en présence d'acide, mais elle est également utilisée pour réaliser l'immobilisation de protéines à un pH proche de la neutralité. Ainsi, Pramparo et *al.* [31] ont immobilisé la peroxidase de Raifort sur un support de type Eupergit C[®] dans des conditions douces (à 4°C et dans du tampon phosphate à pH = 7,4). Si cette réaction prenait place, l'époxyde observé serait plus faible que celui réellement produit. A noter que ce type de réaction parasite n'est pas à exclure également dans certains essais d'oxydation effectués dans les chapitres précédents.

Voilà pourquoi deux essais témoins ont été effectués pour 34 mM d'oxyde de cyclooctène et 617 mM de glucose dans EtOH/tampon phosphate (v/v) 67 : 33, en présence de 10 mg de MCF et 10 mg de MCF-NH₂, respectivement. Dans les deux cas, après plus de 20 h à 24°C et sous agitation, la quantité d'oxyde de cyclooctène est restée constante. Cette hypothèse n'a donc pas été confirmée.

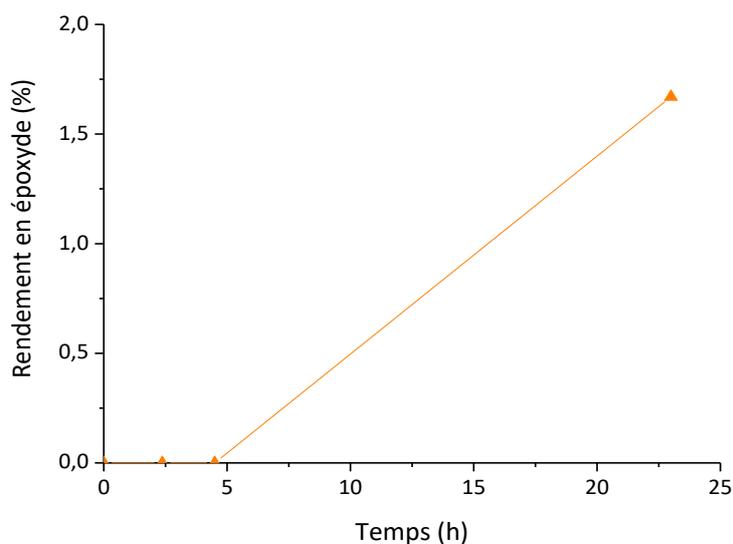


Figure 156: Epoxydation du cyclooctène (34 mM) en présence de 36 U de MCF-NH₂-GOx et 6,1 μmol de Mn-TCPP libre, Mn-TCPP/GOx (3558 : 1 mol.) dans EtOH/ tampon phosphate (v/v) 67 : 33, Mn-TCPP/cyclooctène (1 : 9,8 mol.), [imidazole] = 17 mM, [glucose] = 617 mM, à 24°C

De plus, un précipité gélatineux est obtenu en fin de réaction, témoignant d'une réaction entre la porphyrine et la silice. Une explication possible des faibles rendements observés serait la complexation de la porphyrine avec les silanols déprotonés du support qui joueraient le rôle de ligand axial, conduisant à une diminution de l'électrophilie du complexe Mn-oxo, et donc de la réactivité du catalyseur [32]. A noter qu'à ce pH les fonctions amine sont protonées, ne permettant pas la complexation avec la porphyrine.

Le solide MCF-NH₂-GOx a été récupéré, lavé plusieurs fois (suivi en spectroscopie UV-visible des surnageants de lavage jusqu'à disparition des traces de porphyrine). Aucune activité enzymatique résiduelle n'a pu être mesurée. Il a été montré (Chapitre III) que la GOx pouvait être réutilisée en partie après un test dans MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50 à 35°C, mais il est possible qu'à une concentration plus importante de solvant (ici 67% EtOH), après une vingtaine d'heures de réaction, celle-ci ne soit plus active. Le solide semble avoir un rôle dans cette désactivation qui n'est pas observée lorsque la réaction a lieu en solution (test de catalyse homogène). Une analyse ATG de MCF-NH₂-GOx après utilisation et lavages a été effectuée et comparée à celle des solides MCF-NH₂-GOx et et MCF-NH₂ (présentés Chapitre II) qui n'ont pas été utilisés pour une expérience d'époxydation.

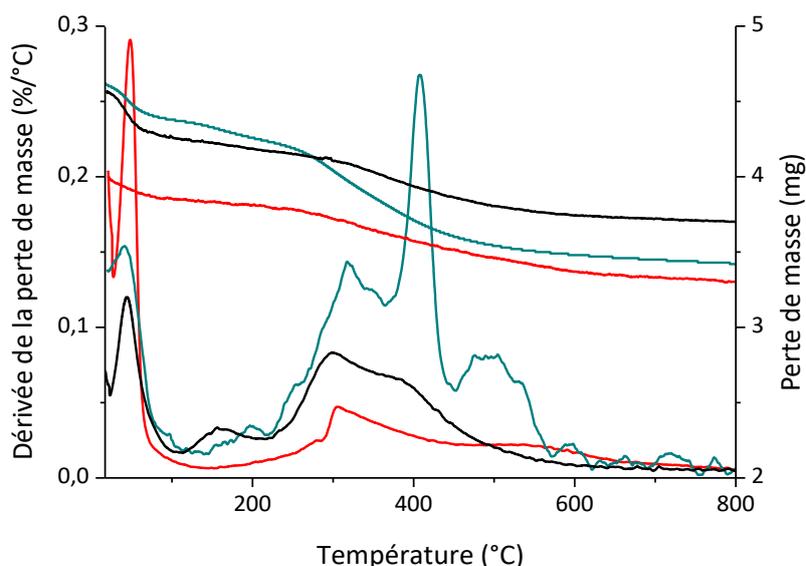


Figure 157: Dérivées et la perte de masse obtenues par ATG pour les matériaux, **MCF-NH₂**, **MCF-NH₂-GOx** et **MCF-NH₂-GOx+Mn-TCPP**, effectuées de 24°C à 900°C, sous 100 mL/min d'air avec une rampe en température de 10°C/min

Hormis la perte de masse vers 50°C caractéristique de l'eau, le solide MCF-NH₂-GOx+Mn-TCPP présente trois événements thermiques à 317°C, à 407°C et autour de 500°C. On retrouve le pic à 317°C, sur le solide MCF-NH₂-GOx, mais pas ceux à plus haute température, qui pourraient donc correspondre à la dégradation de la porphyrine, ce qui est conforme aux données de la littérature [33]. En faisant la différence entre la perte de masse des supports MCF-NH₂-GOx+Mn-TCPP et MCF-NH₂-GOx, on a pu estimer la quantité de porphyrine sur le solide à 0,55 mmol/g_{support}, soit 100 fois plus que sur le support MCF-NH₂-Mn-TCPP, qui lui a également été lavé à l'éthanol après l'opération de greffage de la porphyrine. Ce résultat appuie donc l'hypothèse d'une forte affinité entre solide MCF et la porphyrine.

On a ensuite cherché à limiter la formation de précipité formé en cours de réaction en diminuant la concentration de glucose utilisée de 617 à 300 mM. Dans ces conditions, c'est-à-dire à une concentration de glucose 10 fois supérieure au K_M de la GO_x (33 mM), l'enzyme reste à saturation de substrat, et donc à son turnover maximum (cf. Chapitre I 1.3.2.a). D'autre part, la proportion de EtOH a été légèrement augmentée jusqu'à 70%, ce qui reste en deçà de la valeur pour laquelle on observe une diminution de l'activité de la GO_x (à partir de 80% l'activité enzymatique diminue), avec l'objectif d'améliorer la solubilité de la porphyrine. Les résultats d'époxydation obtenus dans ces conditions sont présentés Figure 158.

L'utilisation d'une concentration moindre de glucose montre la disparition de la période de latence observée Figure 156. L'époxyde est formé dès 3 h de réaction. Au bout de 24 h, celui-ci atteint 2,4%. Une diminution de la concentration de glucose d'un facteur 2 permet donc d'améliorer l'efficacité de la réaction d'un facteur 2 par rapport à l'essai en présence de 617 mM de glucose.

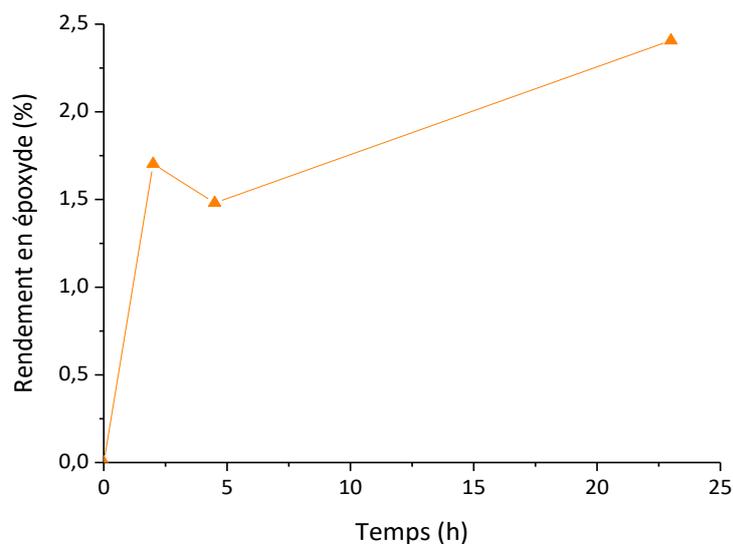


Figure 158: Epoxydation du cyclooctène (34 mM) en présence de 36 U de MCF-NH₂-GOx et 6,1 μmol de Mn-TCCP libre, Mn-TCCP/GOx (3558 : 1 mol.) dans EtOH/ tampon phosphate (v/v) 70 : 30 avec Mn-TCCP/cyclooctène (1 : 9,8 mol.), [imidazole] = 17 mM, [glucose] = 300 mM, à 24°C

Les rendements mesurés sont malgré tout assez faibles, mais on peut faire l'hypothèse qu'ils sont sous-estimés. Suite à la formation d'un précipité, une hypothèse serait en effet que l'époxyde formé reste piégé à l'intérieur de ce dernier.

En conclusion, l'immobilisation de la GOx sur le support silicique MCF-NH₂ ne permet donc pas d'améliorer la réaction par rapport aux conditions de catalyse homogène. Il a alors été décidé de changer de stratégie en greffant la porphyrine sur le support, et d'utiliser l'enzyme en solution.

2.2.3. Catalyse semi homogène en tandem : GOx ou H₂O₂ en solution et MCF-NH₂-Mn-TCCP

Deux séries d'expériences d'oxydation du cyclohexène ont été réalisées avec le catalyseur MCF-NH₂-Mn-TCCP, la première en ajoutant directement H₂O₂ en cinq fois, au rythme d'un ajout toutes les 30 minutes (Figure 159), l'autre en le produisant *in-situ* par la GOx en solution. Le solvant organique utilisé ici est le MeOH, dans lequel l'enzyme préserve 80% de son activité s'il est mélangé avec du tampon dans les proportions MeOH/tampon phosphate (v/v) 70 : 30 (Chapitre II 2.2.2.2.). Notons ici que dans la mesure où la porphyrine est immobilisée, celle-ci n'a pas à être solubilisée.

Dans ces conditions, le rendement en époxyde ne dépasse pas 0,8% (maximum après 3 h de réaction). De plus, aucun autre produit n'a pu être détecté. L'efficacité de la porphyrine à catalyser la réaction d'époxydation est donc plus que faible dans ces conditions. Rappelons que la porphyrine immobilisée a été introduite en bien plus faible quantité que précédemment (50 mg de solide soit 0,228 μmol d'espèces actives d'où un déficit de Mn comparé aux essais précédents). Il se peut également que l'immobilisation rende plus difficile l'accessibilité des réactifs au niveau du site Mn de la porphyrine. Des baisses d'activité après immobilisation ont d'ailleurs déjà été observées dans la littérature [22].

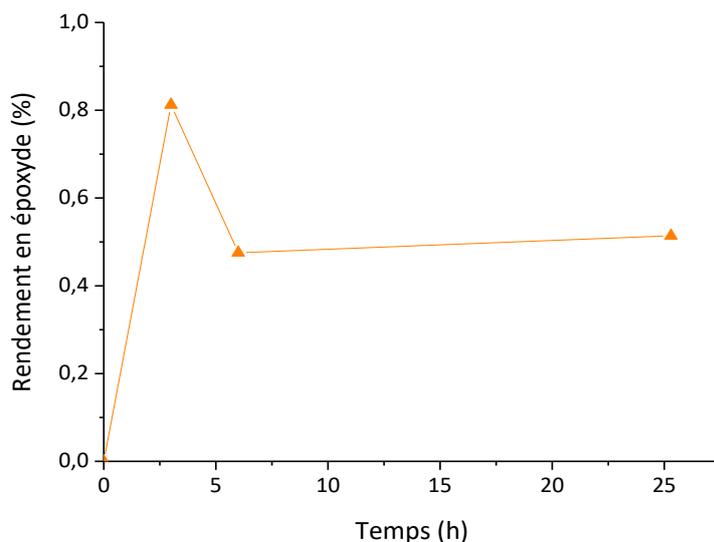


Figure 159: Epoxydation du cyclohexène (30 mM) par H₂O₂ dans MeOH/tampon acétate (v/v) (70 : 30) en présence de 50 mg de MCF-NH₂-Mn-TCPP, avec H₂O₂/substrat (5 : 1 mol.), Mn-TCPP/cyclohexène (1 : 403,5 mol.). Mn/H₂O₂ (1 : 133 mol.), [imidazole] = 8,3 mM à 24°C

Le changement de coloration du mélange qui passe du vert kaki à un vert plus clair, puis orange et enfin jaune au cours de la réaction suggère une dégradation oxydante progressive du macrocycle conjugué de la porphyrine par H₂O₂. Ainsi Hyun et *al.* [34], lors de l'étude de deux porphyrines au manganèse (le chloro (tétramésitylporphyrinato)manganèse (III) [TMP(MnCl)] et le chlorotetrakis((pentafluorophényl)porphyrinato)manganèse(III) [F₂₀TPP(MnCl)]), ont proposé un mécanisme d'oxydation d'oléfines par les peracides, transposable aux hydroperoxydes, faisant intervenir différentes espèces actives Mn^V=O, Mn^{IV}=O et Mn^{III}OO-(O)CR ou- OOR. Le peracide ou l'hydroperoxyde réagit avec le complexe de manganèse afin de former un intermédiaire Mn^{III}OO-(O)CR ou- OOR, qui subit ensuite un clivage hétérolytique ou homolytique de la liaison O-O pour former les espèces Mn^V=O ou Mn^{IV}=O respectivement, ou qui transfère directement son atome d'oxygène au substrat (Mn^{III}). Il a été montré notamment que la proportion de chaque espèce dépend de plusieurs facteurs tels que la polarité du solvant, la concentration et la nature du substrat, ainsi que les substituants de la porphyrine. Par exemple, avec [TMP(MnCl)], le clivage de la liaison O-O s'effectue plutôt de manière hétérolytique (83%) en présence de solvant protique. Des espèces oxydantes de nature radicalaire formées en parallèle de Mn^{IV}=O (clivage homolytique de la liaison O-O) pourraient intervenir en particulier dans la dégradation de la porphyrine au cours du temps. Si tel est le cas, des expériences en présence d'une quantité plus faible de H₂O₂ devraient permettre d'éviter cette dégradation du catalyseur d'époxydation.

Un essai impliquant 96 U de GOx libre en lieu et place de H₂O₂ (correspondant à une production de 2,88 mmol en 30 min) a également été effectué. La quantité de GOx a été augmentée par rapport aux essais avec MCF-NH₂-GOx au 2.2.2. (qui correspondait à 36 U de GOx active sur le solide), dans l'idée de conserver une partie active si celle-ci se fixe à la porphyrine. Cependant, le test n'a pas été concluant : aucune conversion du cyclohexène (ou formation d'oxyde de cyclohexène) n'a pu être observée et il y a toujours apparition d'un précipité. La faible quantité de porphyrine est un facteur particulièrement défavorable mais, étant donné son faible du taux de greffage, il était impossible d'effectuer un test dans des conditions similaires au 2.2.1. et 2.2.2 car il aurait nécessité une quantité déraisonnable de solide.

3. Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif d'explorer un système catalytique tandem pour l'époxydation d'alcènes à partir de H₂O₂ produit *in-situ* qui puisse servir d'alternative à la combinaison Ti/GOx présentée au niveau des chapitres II et III. Le remplacement des catalyseurs à base de Ti par la porphyrine Mn-TCPP a été considéré moyennant une étude du greffage covalent de cette porphyrine sur le support MCF-NH₂ (obtention de MCF-NH₂-Mn-TCPP) et des essais préliminaires de différentes possibilités de combinaisons Mn-TCPP/GOx.

S'agissant du matériau MCF-NH₂-Mn-TCPP, il est clair, d'après les analyses par UV-vis. RD, que ce dernier renferme de la porphyrine métallée (conservation de la bande de Soret autour de 468 nm et des bandes Q observées en UV-vis). D'après la spectroscopie de fluorescence X, la quantité de Mn-TCPP supportée serait de l'ordre de 4,6 $\mu\text{mol/g}_{\text{support}}$ (taux de recouvrement de 0,4%), soit plus de 100 fois moins d'espèces actives que sur MCF-Ti et TS-1 (Tableau 31). Des caractérisations plus étoffées du matériau obtenu devraient permettre de préciser en particulier la nature du lien entre la porphyrine de manganèse et le support.

Tableau 31: Teneurs en espèces actives des différents catalyseurs d'époxydation hétérogènes : MCF-NH₂-Mn-TCPP, TS-1 et MCF-Ti

Catalyseurs	$\mu\text{mol/g}_{\text{support}}$
MCF-NH ₂ -Mn-TCPP	4,6
TS-1	520
MCF-Ti	771

Les résultats des tests d'époxydation du cyclooctène ou du cyclohexène effectués sur trois types de systèmes (Mn-TCPP/GOx libres, MCF-NH₂-GOx/MnTCPP libre et MCF-NH₂-Mn-TCPP/H₂O₂ ou GOx libre) sont récapitulés dans le tableau qui suit.

Tableau 32: Tests d'époxydation effectués avec les différents systèmes H₂O₂ ou GOx / Mn-TCPP en milieu solvant organique/tampon phosphate à 24°C

Système Catalytique	Substrat	% v/v solvant	GOx/ H ₂ O ₂	Glucose (mM)	Mn-TCPP (μmol)	Rendement en époxyde après 24 h (%)
Mn-TCPP/GOx	cyclooctène	67% MeOH	36 U	617	308	17 ^a
Mn-TCPP/GOx	cyclooctène	67% EtOH	36 U	617	308	12 ^a
MCF-NH ₂ -GOx/Mn-TCPP	cyclooctène	67% EtOH	36 U	617	308	1,7 ^a
MCF-NH ₂ -GOx/Mn-TCPP	cyclooctène	70% EtOH	36 U	300	308	2,4 ^a
MCF-NH ₂ -Mn-TCPP	cyclohexène	70% MeOH	266 μmol	-	0,228 (50 mg)	0,5 ^b
MCF-NH ₂ -Mn-TCPP/GOx	cyclohexène	67% MeOH	36 U	300	0,228	0 ^b

^a [imidazole] = 17 mM

^b [imidazole] = 8,3 mM

Les essais en solution ont montré la faisabilité de la réaction en cascade pour l'époxydation du cyclooctène.

L'introduction du support silicique avec MCF-NH₂-GOx a pour effet de diminuer de 90% le rendement en époxyde, qui passe à 1,7%. La formation d'un précipité résultant d'une interaction entre le support silicique et la porphyrine, confirmée par des analyses ATG, jouerait un rôle majeur dans cette perte de réactivité.

La concentration très élevée de glucose a également été mise en cause dans cette très faible réactivité et diminuer la concentration d'un facteur deux a amélioré le rendement en époxyde d'un facteur deux pour atteindre 2,4%.

L'époxyde étant le seul produit formé, nous avons également émis l'hypothèse qu'une partie de celui-ci était piégée au niveau du précipité.

Enfin, les essais d'oxydation du cyclohexène effectués avec la porphyrine greffée en assez faible quantité sur le support n'ont pas été concluants, puisque seulement 0,5% de rendement en époxyde a été obtenu en ajoutant lentement H₂O₂ au système tandis qu'aucune formation d'époxyde n'a été détectée en présence de la GOx en solution.

Tout un travail reste donc à effectuer concernant l'élaboration d'un système couplant GOx et Mn-TCPP sur un même support, dont la présence influence fortement la réactivité catalytique. Cependant les essais préliminaires en solution ont démontré la faisabilité d'un système en cascade et pourraient même être améliorés (en diminuant la quantité de glucose par exemple). Une étude de l'influence de la concentration d'imidazole pourrait également être envisagée s'il s'avère qu'il y a bien compétition entre ce co-catalyseur et les -NH₂ du support. Enfin une étude plus approfondie du greffage de Mn-TCPP doit également être entreprise afin d'attendre des taux de chargement au moins aussi importants que dans le cas des catalyseurs à base de Ti utilisés dans les chapitres précédents.

Références :

- [1] A.L. Faria, T.O.C. C. Mac Leod, V.P. Barros, M.D. Assis, *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (2009) 895-906.
- [2] R. De Paula, I.C.M.S. Santos, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 404-405 (2015) 156-166.
- [3] Cláudia M. B. Neves, Mário M. Q. Simões, Fernando M. J. Domingues, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, *Quim. Nova* 35 (2012) 1477-1481.
- [4] S.L.H. Rebelo, A.R. Gonçalves, M.M. Pereira, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 256 (2006) 321-323.
- [5] H. Srour, P. Le Maux, G. Simonneaux, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 5850-5856.
- [6] R.R.L. Martins, M.G.P.M.S. Neves, A.J.D. Silvestre, M.M.Q. Simões, A.M.S. Silva, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, P. Tagliatesta, C. Crestini, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 172 (2001) 33-42.
- [7] A. Farokhi, H. Hosseini-Monfared, *New J. Chem.* 40 (2016) 5032-5043.
- [8] G. Huang, W.L. Wang, X.X. Ning, Y. Liu, S.K. Zhao, Y.-A. Guo, S.J. Wei, H. Zhou, *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (2016) 2959-2969.
- [9] S. George, S. Lipstman, S. Muniappan, I. Goldberg, *Cryst. Eng. Comm.* 8 (2006) 417-424.
- [10] M. Shmilovits, M. Vinodu, I. Goldberg, *New J. Chem.* 28 (2004) 223-227.
- [11] C. Zou, T. Zhang, M.H. Xie, L. Yan, G.Q. Kong, X.L. Yang, A. Ma, C.D. Wu, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 3620-3626.
- [12] G. Ferrer-Sueta, L. Hannibal, I. Batinic-Haberle, R. Radi, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 503-512.
- [13] M.A. Castriciano, A. Romeo, N. Angelini, N. Micali, A. Longo, A. Mazzaglia, L.M. Scolaro, *Macromolecules* 39 (2006) 5489-5496.
- [14] R.F. Pasternack, P.R. Huber, P. Boyd, G. Engasser, L. Francesconi, E. Gibbs, P. Fasella, G. Cerio Venturo, L.d. Hinds, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 4511-4517.
- [15] Y. Lee, J. Kim, S. Kim, W.-D. Jang, S. Park, W.-G. Koh, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 5643-5647.
- [16] E. Brulé, Y.R. De Miguel, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 8555-8558.
- [17] X. Wanga, H. Chena, T. Zhoua, Z. Lina, J. Zenga, Z. Xie, X. Chena, K. Wongd, G. Chene, X. Wanga, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3702-3705.
- [18] S. Zhang, S. Tang, J. Lei, H. Dong, H. Ju, *J. Electroanal. Chem.* 656 (2011) 285-288.
- [19] P. Ling, Q. Hao, J. Lei, H. Ju, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 1335-1341.
- [20] Y.F. Huan, Q. Fei, H.Y. Shan, B.J. Wang, H. Xu, G.D. Feng, *Analyst* 140 (2015) 1655-1661.
- [21] J. Shu, Z. Qiu, J. Zhuang, M. Xu, D. Tang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 23812-23818.
- [22] K.A.D.F. Castro, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, F. Wypych, S. Nakagaki, *Catal. Sci. Technol.* 4 (2014) 129-141.
- [23] J.R.L. Smith, in: R.A. Sheldon (Ed.), *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 325-368.
- [24] P. Battioni, J.P. Renaud, J.F. Bartoli, M. Reina-Artiles, M. Fort, D. Mansuy, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 8462-8470.
- [25] Z. Li, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 214 (2004) 95-101.
- [26] Adriana Nascimento de Sousa, Maria Eliza Moreira Dai de Carvalho, Y.M. Idemori, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 169 (2001) 1-10.
- [27] J.A.A.W. Elemans, E.J.A. Bijsterveld, A.E. Rowan, R.J.M. Nolte, *Eur. J. Org. Chem.* 2007 (2007) 751-757.
- [28]
- [29] S.J. Gregg, K.S.W. Sing, *Adsorption, surface area, and porosity*, Academic Press, 1991.
- [30] K.-H. Tong, K.-Y. Wong, T.H. Chan, *Tetrahedron* 61 (2005) 6009-6014.
- [31] L. Pramparo, F. Stuber, J. Font, A. Fortuny, A. Fabregat, C. Bengoa, *J. Hazard. Mater.* 177 (2010) 990-1000.
- [32] W.J. Song, M.S. Seo, S.D. George, T. Ohta, R. Song, M.-J. Kang, T. Tosha, T. Kitagawa, E.I. Solomon, W. Nam, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1268-1277.
- [33] E.-Y. Jeong, A. Burri, S.-Y. Lee, S.-E. Park, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 10869.
- [34] M.Y. Hyun, Y.D. Jo, J.H. Lee, H.G. Lee, H.M. Park, I.H. Hwang, K.B. Kim, S.J. Lee, C. Kim, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 1810-1818.

Chapitre V. Vers une immobilisation alternative par reconstitution de la GOx

Introduction

L'immobilisation covalente de l'enzyme est une étape importante dans l'élaboration du catalyseur hybride et il a été observé que l'utilisation d'agents de couplage lors de cette étape désactive environ un tiers de la protéine, avant même l'ajout du solide (cf. Chapitre II). De plus la réaction de l'agent de couplage EDC avec les groupements carboxyliques de la GOx peut mener à la formation de groupements de type N-acylurées, obtenus par réarrangement via un transfert intramoléculaire d'un groupement acyle, qui ne permettront pas le couplage ultérieur en présence des groupements fonctionnels -NH₂ du support [1] (Chapitre I 2.1.3). Une alternative au greffage de la GOx ne nécessitant pas l'utilisation d'agents de couplage consisterait à reconstituer la partie protéique de l'enzyme (l'apo-enzyme) autour de son cofacteur FAD qui aura été préalablement greffé sur le matériau MCF aminé.

Outre le fait qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'agents de couplage, cette méthode présente l'avantage d'orienter l'enzyme, dans la mesure où celle-ci se reconstitue autour du FAD, préalablement greffé sur le solide, à partir de l'amine contenue dans son adénine. Toutes les enzymes seront alors immobilisées de la même façon, permettant de maîtriser la réactivité du catalyseur enzymatique. Ainsi si des problèmes de diffusion sont présents, ils seront identiques pour toutes les protéines.

Ce type de greffage permet alors de placer les sites actifs de la GOx le plus près possible du matériau. H₂O₂ formé en surface sera le plus proche des sites inorganiques catalytiques, limitant ainsi sa diffusion. De ce fait nous pouvons imaginer que toutes les molécules de H₂O₂ produites soient immédiatement adsorbées à la surface du matériau et transformées au niveau des sites actifs Ti. La dénaturation de l'enzyme par H₂O₂, immédiatement transformé, sera ainsi limitée.

Dans un premier temps, l'apo-GOx est préparée par séparation du FAD. D'autre part, le FAD est greffé au support MCF-NH₂, puis l'apo-GOx est mise au contact de celui-ci afin de reconstituer l'enzyme. Ce chapitre se décompose donc en trois parties : la décomposition de l'enzyme, le greffage du FAD et sa caractérisation, puis la reconstitution de la GOx en solution et sur le support.

1. Matériels & Méthodes

Dans un premier temps, la GOx a été séparée de son cofacteur FAD afin d'obtenir l'apo-GOx. Parallèlement plusieurs essais de greffage du FAD sur différents solides (MCF-NH₂, SBA-1-NH₂ et MCF-Ti-NH₂) ont été effectués en faisant varier les conditions de greffage. Enfin, la reconstitution de la GOx en solution et sur les différents solides a été testée. Les pesées de composés et solide dans ce qui suit ont été effectuées avec une incertitude-type de 0,06 mg (balance AB204-s de Mettler Toledo).

1.1. Préparation de l'apo-GOx

Le protocole utilisé pour décomposer l'enzyme est issu des travaux de Şenel et *al.* [2]. Il est basé sur une méthode de précipitation de la GOx en présence de sulfate d'ammonium à pH = 1,5. Un pH acide permet de séparer l'apo-GOx du FAD, celui-ci n'étant pas lié à la protéine de façon covalente. En pratique, cette réaction est mise en œuvre dans un bain de glace contenant du NaCl (Température environ -5°C). 10 mg de GOx sont dissous dans 10 mL de (NH₄)₂SO₄ saturé, ramenée à pH = 1,5 avec H₂SO₄ (95%, Fluka) et placés dans le bain de glace. Après 2 minutes, la solution est centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min à 3°C. Le surnageant est retiré (et conservé pour analyse par spectrométrie UV-visible). 10 mL de (NH₄)₂SO₄ saturé à pH = 1,5 sont ajoutés au culot pendant 2 minutes, suivi d'une nouvelle centrifugation. Cette étape est répétée 2 fois. Enfin le culot (un précipité blanc) est lavé dans une solution de (NH₄)₂SO₄ saturée, utilisée à pH = 7. Le précipité d'apo-GOx obtenu est ensuite dissous dans 10 mL de tampon phosphate (pH = 7, 100 mM) pour analyse par spectroscopie UV-visible, puis lyophilisé et conservé à -20°C.

Dans certains cas, après la première centrifugation, il a été observé qu'une petite partie de GOx est précipitée sans être ouverte (visuellement les amas précipités seront encore jaunes) et flotte en surface. On soumet de nouveau cette GOx à l'étape de séparation d'avec le FAD. Les échantillons d'apo-GOx obtenus sont notés Décomposition, puis Décomposition 1 et Décomposition 2, pour ceux préparés à partir de la GOx solide mais surnageant en surface. Ces trois échantillons sont donc issus de la même quantité de GOx initiale.

Le bilan matière de la préparation de l'apo-GOx est basé sur des mesures de spectroscopie UV-visible en utilisant les coefficients d'extinction de l'apo-GOx à 280 nm et du FAD à 450 nm, dont les valeurs sont rappelées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 33: Coefficients d'extinction et masses molaires de l'apo-GOx et du FAD

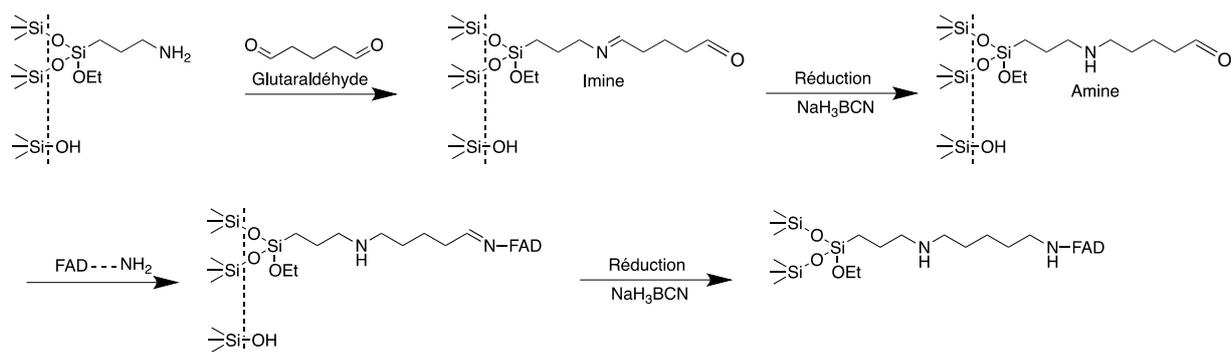
$\epsilon_{280\text{ nm (apo-GOx)}} (M^{-1}.cm^{-1})$	$M_{\text{apo-GOx}} (g/mol)$	$\epsilon_{450\text{ nm (FAD)}} (M^{-1}.cm^{-1})$	$M_{\text{FAD}} (g/mol)$
148 282 [3]	86715 ^a	11 300 [4]	785,5 [5]

^a La masse de l'apo-GOx, supposée majoritairement monomérique, a été évaluée à partir de celle du dimère [6] à laquelle a été enlevée la contribution du FAD, afin de ne tenir compte que de la partie protéique.

A noter que les valeurs d'absorbance des solutions testées ont été corrigées de celles des solutions de (NH₄)₂SO₄ ou de tampon phosphate (pH = 7, 100 mM), selon le milieu utilisé. L'activité résiduelle des échantillons d'apo-GOx obtenus a été mesurée suivant le protocole présenté dans le Chapitre II au point 1.6.

1.2. Greffage du FAD sur le support MCF-NH₂ et caractérisation

Le greffage du FAD sur le solide MCF-NH₂ s'est inspiré de travaux de Ghasemi et *al.* [7] et utilise le glutaraldéhyde, comme agent de couplage entre les amines de surface du solide et celui contenu dans l'adénine du FAD. Il s'effectue en 3 étapes successives, décrites sur la figure ci-dessous :

Figure 160: Greffage du cofacteur FAD sur le solide MCF fonctionnalisé -NH₂

- Formation de l'imine GA-NH-MCF.
- Réduction de cette imine en amine par NaH₃BCN.
- Formation et réduction de l'imine FAD-NH-GA-NH-MCF, que l'on nommera par la suite MCF-FAD.

100 mg de MCF-NH₂ ($1,9 \pm 0,6$ amines/nm²) sont dispersés dans 10 mL de tampon carbonate (pH = 10, 100 mM) contenant 800 μ L de glutaraldéhyde (GA, 25% dans H₂O, Sigma-Aldrich) (GA/-NH₂ = 9,7 : 1 mol.). La dispersion est agitée pendant 5 h à température ambiante, puis filtrée et lavée avec 5 mL d'eau distillée. Le solide est re-dispersé dans 10 mL de tampon phosphate (pH = 6, 100 mM), auxquels sont ajoutés 0,318 mL de NaH₃BCN (0,1 g pesé et 5 M final), préparés au préalable dans NaOH à 1 M. Le mélange est placé sous agitation pendant 1 h à température ambiante, puis à nouveau filtré et lavé avec 5 mL d'eau distillée. Le solide est ensuite dispersé dans 10 mL de tampon phosphate (pH = 6, 100 mM). Puis, 31 mg de FAD (pureté > 95%, Sigma) sont ajoutés à la dispersion (FAD/-NH₂ = 1 : 5,5 mol.) qui est ensuite agitée pendant une nuit à température ambiante. Le solide est ensuite filtré et dispersé dans 10 mL de tampon phosphate (pH = 6, 100 mM), auxquels sont ajoutés 0,318 mL de NaH₃BCN (5 M), puis agité 1 h à température ambiante. Enfin, le solide est filtré et lavé à l'eau distillée, puis conservé dans 10 mL de tampon acétate (pH = 6, 100 mM). Ce protocole de greffage a également été utilisé avec des solides de type SBA-15 fonctionnalisé -NH₂ ($1,05 \pm 0,2$ amines/nm²) et MCF-Ti-NH₂ ($1,8$ amines/nm²) nommés dans la suite respectivement SBA-15-FAD et MCF-Ti-FAD. Pour l'essai avec MCF-Ti-NH₂, on a utilisé du FAD recyclé lyophilisé (environ 40 mg) après les étapes de séparation de la GOx au lieu de FAD solide commercial (FAD/-NH₂ = 1 : 3 mol.). Dans le cas du SBA-15-FAD, le solide est filtré à l'issue du protocole de greffage du GA, séché à 60°C et conservé sous forme solide.

A la suite des premiers essais, le protocole a été modifié en supprimant la première étape de réduction, afin d'éviter que la fonction aldéhyde du GA greffé ne soit éventuellement réduite, ce qui empêcherait toute réaction ultérieure avec la fonction amine du FAD, bien que le réducteur utilisé, NaH₃BCN, est réputé pour réduire les imines mais pas les aldéhydes. Une autre modification du protocole est à signaler dans ce cas : les 3 lavages sont effectués avec 10 mL de tampon carbonate pH = 10 (100mM) au lieu d'eau distillée, afin de retirer tout le FAD adsorbé en surface.

Les solides ont été caractérisés par plusieurs techniques (UV-DR, l'XPS, fluorescence X ou ATG, cf. Chapitre II 1.5.), après une étape de séchage à l'étuve à 60°C pendant une nuit.

1.3. Reconstitution de la GOx en solution et sur le support

Dans un premier temps, l'enzyme a été reconstituée en solution puis sur les différents supports présentés précédemment.

1.3.1. Reconstitution en solution

1,8 μM d'apo-GOx contenues dans 1,5 mL de tampon phosphate (pH = 7, 100 mM), sont mélangées à 1,2 μmol de FAD commercial (>95%, Sigma). Le mélange (FAD/apo-GOx = 444 : 1 mol.) est ensuite agité pendant une nuit à 4°C sous agitation modérée, puis son activité mesurée.

La reconstitution de 3,4 μM d'apo-GOx contenues dans 1,5 mL de tampon phosphate (pH = 7, 100 mM), mélangés également à 1,2 μmol de FAD (FAD/apo-GOx = 235 : 1 mol.), est incubée une nuit à 4°C, sous faible agitation. Deux dialyses successives sont ensuite effectuées sur cet échantillon, plongé dans 500 mL de tampon phosphate (pH = 7, 100 mM), à l'aide d'une membrane de seuil de coupure de 10 000 Da. L'activité de la solution de reconstitution est ensuite mesurée.

1.3.2. Reconstitution sur MCF-FAD

3 mg de MCF-FAD sont dispersés 30 sec sous ultra-sons dans 1,5 mL d'une solution d'apo-GOx à 3,5 μM dans du tampon acétate (pH = 6, 100 mM) et agités une nuit à 4°C (FAD/apo-GOx = 20 : 1 mol.). Un échantillon de contrôle contenant 1 mg de MCF-NH₂ et 0,5 mL d'apo-GOx à 3,5 μM est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions. L'activité résiduelle des solutions d'apo-protéine sont mesurées avant l'introduction du solide. La quantité de GOx reconstituée est estimée par mesure de l'activité enzymatique à l'issue de la période d'incubation.

1.3.3. Reconstitution sur SBA-15-FAD

3 mg de SBA-15-FAD sont dispersés 30 sec sous ultra-sons dans 20 μM d'apo-GOx contenus dans 1,5 mL de tampon phosphate (pH = 7, 100 mM) (FAD/apo-GOx = 92 : 1 mol.). L'activité résiduelle de la solution d'apo-protéine a été mesurée préalablement. La dispersion est incubée une nuit sous agitation à 4°C. L'activité est mesurée après l'incubation, puis le solide est lavé 3 fois avec du tampon phosphate (pH = 8, 100 mM) de la même manière que lors du greffage de l'enzyme sur le support MCF-NH₂. Le solide est ensuite dispersé dans 2 mL de tampon acétate (pH = 6, 100 mM) et son activité mesurée.

1.3.4. Reconstitution sur MCF-Ti-NH₂

L'expérience de reconstitution est effectuée en dispersant 20 mg de solide, pendant 30 sec aux ultra-sons dans 1 mL d'apo-GOx, soit 2,1 μM dans du tampon phosphate (pH = 7, 100 mM) (FAD/Apo-GOx = 69 : 1 mol.). Le mélange est incubé une nuit sous agitation à 4°C. Le solide résultant est lavé trois fois avec du tampon phosphate (pH = 8, 100 mM). Les lavages sont effectués à 4°C. Le solide est ensuite dispersé dans 1 mL de tampon acétate (pH = 6, 100 mM), puis l'activité du solide est mesurée.

2. Résultats et discussion

2.1. Préparation de l'apo-GOx par précipitation

La quantité d'apo-GOx obtenue par la méthode de précipitation en présence de sulfate d'ammonium était de $5,4 \pm 0,2$ mg en moyenne, sur la base de deux expériences indépendantes (Tableau 34). La quantité initiale de GOx étant de 10 mg, le rendement massique de l'opération est donc de 54 % environ. Toutefois, une activité résiduelle, de 2,5 U/mL ayant été mesurée, on peut estimer que le solide obtenu (dans sa totalité) contient 3,8 % (mass.) de GOx intacte et donc 96,2 % (mass.) d'apo-GOx. Cela signifie qu'une faible quantité de GOx sous forme de dimère actif est encore présente dans les échantillons d'apo-GOx, bien qu'elle ne soit pas détectable par UV-visible, car aucune absorbance à 450 nm n'a pu être détectée pour cet échantillon. Cette activité résiduelle contenue dans les échantillons d'apo-GOx devra être prise en compte pour les mesures d'activité lors de la reconstitution.

Tableau 34: Quantité d'apo-GOx récupérée lors de la décomposition de l'enzyme

	$DO_{280\text{ nm}}$	$C_{\text{protéine}} \text{ (mg/ml)}$	Protéine totale (dans 10 mL) (mg)	Activité résiduelle (U/ml)
Décomposition	0,31	0,28	1,8	1,17
Décomposition 1	0,51	0,46	3,0	1,06
Décomposition 2	0,07	0,06	0,39	0,23
		Total:	5,2	

Les mesures de densités optiques des surnageants à 450 nm et 280 nm ont permis d'estimer la quantité de FAD libre et lié à la GOx, ainsi que l'enzyme résiduelle, soit 26,3% des 10 mg initiaux. Le bilan matière de l'opération de préparation de l'apo-GOx se boucle donc à 80%. La perte de matière peut s'expliquer par les différentes étapes expérimentales lors de la décomposition de l'enzyme et lors des mesures d'absorbances.

Une méthode alternative de préparation de l'apo-GOx a également été utilisée dans ce travail, qui consiste à séparer la partie protéique de la GOx du FAD à pH acide (H_2SO_4 (95%) à un pH final de 1,7) en présence de glycérol 30 % (v/v) à 0°C. La principale différence avec la méthode précédente est qu'on n'utilise pas de sulfate d'ammonium, de sorte que l'apo-GOx ne précipite pas après libération du FAD. Il faut donc mettre en œuvre une opération de séparation. Elle consiste à utiliser une colonne d'exclusion de taille (PD-10, GE Health Care), équilibrée avec un tampon phosphate (pH = 6, 10 mM) selon un protocole de la littérature [3]. Cette méthode a permis d'obtenir 5,0 mg de protéine, soit environ la moitié de la quantité de GOx de départ, similairement à la littérature [8]. Le rendement est identique à celui obtenu par précipitation de l'apo-GOx, mais la méthode plus longue à mettre en œuvre.

Ces solutions d'apo-GOx contiennent un mélange de monomère, dimère et oligomère, ainsi que Posthuma-Trumpie et *al.* l'ont déterminé par filtration sur gel [8]. En effet, les deux sous unités de la GOx sont maintenues par une liaison covalente entre deux cystéines. Il a donc été constaté que seulement 50 % de l'apo-GOx se trouve sous forme monomérique.

2.2. Caractérisation du greffage du FAD sur les supports

2.2.1. Caractérisation du FAD sur MCF-NH₂

Les échantillons MCF-NH₂ et MCF-FAD (plus précisément MCF-NH-GA-NH-FAD) ont été analysés en XPS et comparés en se focalisant sur le carbone, l'azote et le phosphore, puisque le FAD comprend deux atomes de phosphore, neuf d'azote, 27 de carbone et le glutaraldéhyde utilisé lors du greffage introduit également cinq atomes de carbone.

On a observé la présence de phosphore en quantité faible, mais significative avec un rapport P/Si de 0,004. Contrairement au carbone et à l'azote, éléments présents dans le matériau MCF-NH₂ de départ, le phosphore est un marqueur de la présence de FAD sur la surface. Le tableau ci-dessous récapitule la composition de 100 mg de support greffé déterminée par XPS.

Tableau 35: Composition élémentaire du matériau greffé MCF-FAD déduite des mesures XPS

	Si	O	N	P	C
% at (XPS)	21,36	39,99	2,89	0,09	35,67
<i>n</i> (mole, sur la base de 100 mg de SiO ₂)	1,64.10 ⁻³	3,38.10 ⁻³	2,22.10 ⁻⁴	7,13.10 ⁻⁶	2,73.10 ⁻³

100 mg de support greffé contiennent donc environ 7 μmol de phosphore. Sachant que le FAD contient deux atomes de phosphore, on peut donc en déduire que 3,5 μmol de FAD seraient greffées sur le support. Cela correspond à 9,3 mol.% du FAD introduit lors de l'étape de greffage, bien que le nombre de groupements NH₂ sur le support soit en excès par rapport au nombre de FAD introduit, dans l'hypothèse où l'analyse XPS est représentative de l'ensemble de l'échantillon. Ce résultat pourrait être sous-estimé, en supposant que le phosphore serait réparti de façon anisotrope dans le matériau, la surface étant plus pauvre en phosphore celui-ci se concentrant dans les pores du matériau. Ce phosphore présent en profondeur dans le matériau serait indétectable par XPS. Cette méthode ne permet en effet d'analyser que les 10 nm en surface du matériau.

La quantité de FAD greffé sur le support peut également être évaluée par le biais des résultats XPS concernant l'élément azote. On sait d'après les mesures d'ATG que 100 mg de support MCF-NH₂ fonctionnalisé avec des groupements -NH₂ contient 206 μmol d'azote (2,06 mmol d'APTES greffées/g_{support}). L'analyse XPS permet d'établir qu'après greffage du FAD, 100 mg de SiO₂ contient 222 μmol d'azote. On peut donc estimer que le nombre de moles de FAD sur le support est de [(222-206)/9] = 1,77 μmol. Il y a donc un facteur 2 entre la quantité de FAD estimée à partir des analyses de l'azote et du phosphore. Toutefois, cet écart peut s'expliquer d'une part par l'incertitude expérimentale sur les analyses d'XPS, et sur l'approximation faite dans l'exploitation des résultats expérimentaux (effectuée pour 100 mg de SiO₂) pour en déduire la quantité des éléments présents sur le support.

Les échantillons de MCF-NH₂ et MCF-FAD ont également été analysés en UV-DR et les spectres sont présentés Figure 161 ci-dessous. A noter que la brusque diminution de l'absorbance autour de 350 nm correspond au changement de lampe.

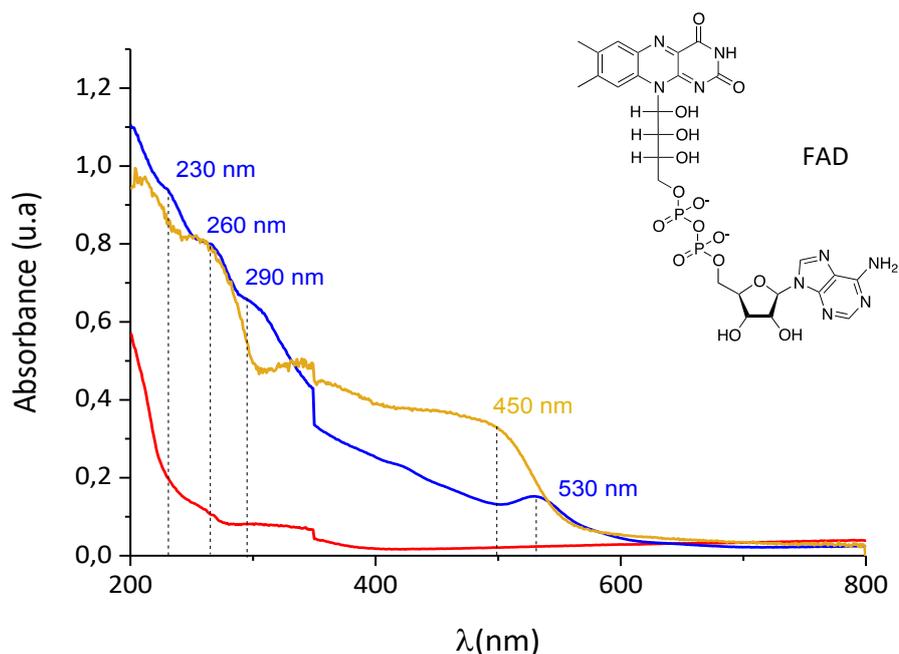


Figure 161: Spectres UV-DR de MCF-NH₂, MCF-FAD et FAD libre

Le spectre de MCF-FAD, comparé à celui de MCF-NH₂, présente plusieurs bandes d'adsorption dont une à environ 530 nm, donc avec un décalage par rapport au spectre du FAD libre (et donc similaire à la GOx initiale) dont le maximum d'absorbance dans cette zone est à 450 nm. La modification du spectre UV-DR après greffage laisse à penser que le FAD subit un changement de la conjugaison de ses liaisons, par exemple dans le cas où il est lié au support via la formation d'une base de Schiff qui n'aurait pas été réduite. En plus de l'adsorption autour de 290 nm, également présente pour le FAD libre et caractéristique de composés protéiques (acides aminés : tyrosine, tryptophane, phénylalanine) [9], deux autres contributions sont observables autour de 260 et 230 nm. La première est liée aux bases azotées contenues dans le FAD, tandis que la seconde est due à des traces de molécules organiques contenues par exemple dans le tampon avant séchage du solide.

Le solide a également été analysé par ATG. La Figure 162 présente l'évolution des masses du FAD, MCF-NH₂ et MCF-FAD (normalisées à 100 par rapport à la masse finale), ainsi que leurs dérivés. La perte de masse du FAD seule étant trop importante, elle n'a pas été ajoutée aux courbes au risque d'écraser les deux autres.

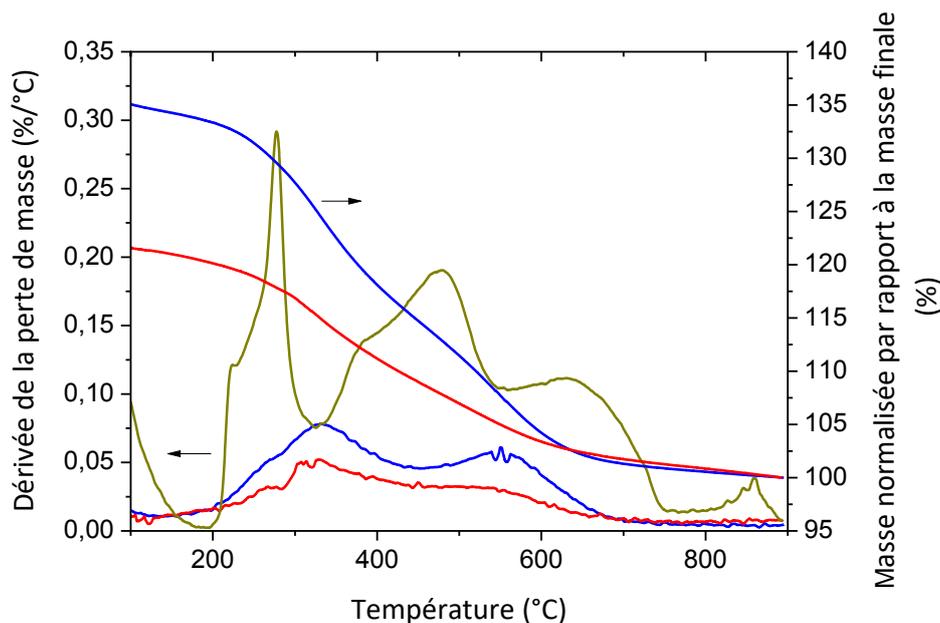


Figure 162 : Courbes des mesures d'ATG du FAD, MCF-NH₂ et MCF-FAD, effectuées de 24°C à 900°C, sous 100 mL/min d'air avec une rampe en température de 10°C/min.

Plusieurs choses sont observables sur cette figure. La perte de masse du MCF-FAD est clairement plus importante de 15% que MCF-NH₂ et démontre bien l'ajout de matière sur le solide qui correspond à la présence du GA et du FAD greffés. Ne pouvant pas séparer les contributions de MCF-NH₂-GA et celle après ajout du FAD, il est difficile de connaître précisément la quantité de FAD greffé.

Analysé seul, le FAD présente plusieurs événements thermiques caractéristiques de sa dégradation centrés à 279°C, 481°C, 646°C et 855°C. Cependant, la courbe caractéristique de MCF-FAD ne présente que deux événements, superposés à ceux de MCF-NH₂. Aucun pic caractéristique du FAD n'est observé sur MCF-FAD. En effet, 5 mg de MCF-FAD ont été analysés et si 100 mg comporte 3,5 μmoles de FAD alors il y aura $2,24 \cdot 10^{-4}$ μg de FAD sur les 5 mg, ce qui est nettement inférieur à la sensibilité de l'appareil (1 μg).

Pour conclure, la faible quantité de FAD greffée mise en évidence par analyse XPS peut s'expliquer soit par le fait que le FAD est à l'intérieur du matériau, soit parce que très peu de molécules ont été greffées. Cela pourrait s'expliquer par le nombre d'étapes constituant le protocole de greffage. D'autre part, la modification du spectre UV-DR du FAD après greffage laisse à penser qu'il subit un changement de la conjugaison de ses liaisons, par exemple dans le cas où il est lié au support via la formation d'une base de Schiff non réduite.

2.2.2. Caractérisation du FAD sur SBA-15-NH₂

Le greffage du cofacteur a également été effectué sur SBA-15-NH₂ (1,05 -NH₂/nm²), matériau dont la morphologie ne permet qu'une reconstitution en surface. Dans ce cas, le protocole de greffage a été légèrement modifié. Après la nuit d'incubation du cofacteur avec le solide, celui-ci est filtré puis rincé à l'aide de tampon phosphate (pH = 8, 100 mM) et non uniquement d'eau distillée. En effet sachant que le PZC de la surface SBA-15-NH₂ est de 6 (cf. Annexe 4.), au-dessus de cette valeur la surface du matériau est chargée négativement tout comme le FAD. Les interactions entre le cofacteur

et la surface étant défavorables, le FAD non lié de manière covalente sera donc lavé plus efficacement en présence de tampon à pH = 8 qu'avec de l'eau distillée à un pH d'environ 6.

Le solide résultant a été analysé par XPS après avoir été lavé dans du tampon acétate afin d'éliminer toute trace du tampon phosphate. Les résultats sont présentés Tableaux 36 et 37. A l'erreur expérimentale près, les contenus d'azote et de carbone sont identiques sur MCF-FAD et SBA-15-FAD. L'XPS ne permet donc pas de les différencier. Par contre, il y a presque 2 fois plus de phosphore et donc de FAD sur SBA-15-FAD que sur MCF-FAD, bien que SBA-15-NH₂ présente deux fois moins de groupements -NH₂ en surface. La densité plus importante de -NH₂ en surface pourrait donc favoriser une double réaction du dialdéhyde avec les -NH₂ de surface, au détriment du FAD.

Tableau 36: Rapports atomiques des éléments N, C et P sur Si obtenus par XPS pour MCF-NH₂, MCF-FAD et SBA-15-FAD

Rapport atomique	MCF-FAD	SBA-15-FAD
N/Si	0,135	0,141
C/Si	1,670	1,880
P/Si	0,004	0,007

Grâce aux valeurs ci-dessous (Tableau 37), il est possible de voir que 100 mg de SiO₂ présentent 12,2 µmol de phosphore et donc 6,12 µmol de FAD. Autrement dit 16 mol.% de FAD introduit au départ a été greffé sur le matériau, en comparaison des 9,3 mol.% sur MCF-NH₂.

Tableau 37: Quantités de matière de chaque composé obtenues grâce aux mesures XPS

	Si	O	N	P	C
% at (XPS)	21,36	39,99	2,89	0,09	35,67
<i>n</i> (mol, sur la base de 100 mg de SiO ₂)	1,64.10 ⁻³	2,99.10 ⁻³	2,31.10 ⁻⁴	1,22.10 ⁻⁵	3,08.10 ⁻³

La quantité de FAD greffée sur le support a aussi été évaluée grâce aux résultats XPS concernant l'élément azote. L'analyse XPS permet d'établir qu'après greffage du FAD, 100 mg de SiO₂ contient 231 µmol d'azote. De la même manière que pour le solide MCF-FAD, on peut donc estimer que le nombre de moles de FAD sur le support est de [(231-206)/9] = 2,8 µmol. Il y a donc également un facteur 2 entre la quantité de FAD estimée à partir des analyses de l'azote et du phosphore. Celui-ci peut, une fois de plus, s'expliquer par l'incertitude expérimentale sur les analyses d'XPS et l'approximation faite lors de l'exploitation des résultats expérimentaux pour en déduire la quantité des éléments présents sur le support.

2.2.3. Caractérisation du FAD sur MCF-Ti-NH₂

Le greffage du cofacteur a également été effectué sur MCF-Ti-NH₂ (1,79 -NH₂/nm²), afin de préparer un catalyseur en tandem pour un test d'époxydation. Dans ce cas la première étape de réduction avec NaH₃BCN a été supprimée et le solide obtenu après incubation avec le FAD a été filtré et lavé trois fois avec 10 mL de tampon carbonate pH = 10 (100 mM), afin de retirer au maximum le FAD adsorbé. A noter que le FAD utilisé cette fois-ci est celui issu de la séparation de la GOx, puis lyophilisé, et non pas le FAD commercial utilisé précédemment. Le solide obtenu a ensuite été analysé par fluorescence X. Une analyse thermogravimétrique a également été effectuée. Les résultats de ces

caractérisations sont présentés ci-dessous. Comparé au support MCF-Ti-NH₂, le solide après greffage présente un rapport P/Si (at.) = 0,0009, caractéristique de la présence de phosphore sur le matériau. Cependant ce rapport est 4 à 7 fois inférieures que ceux obtenus pour MCF-FAD et SBA-15-FAD.

Tableau 38 : Quantité de phosphore obtenue par fluorescence X et la quantité de FAD correspondante dans MCF-Ti-FAD

Matériau	P (% mass.)	Si (% mass.)	P/Si (at.)	P (μmol/g _{solide})	FAD (μmol/g _{solide})
MCF-Ti-NH ₂	< 0,0003			/	/
MCF-Ti-FAD	0,0447 ± 0,0005	46,175 ± 0,015	0,001	14,5 ± 0,2	7,25 ± 0,01
SBA-15-FAD			0,007		61,20 ^a
MCF-NH ₂ -FAD			0,004		35,70 ^a

^a Valeurs obtenues par XPS

D'après ces valeurs, 1,423 mol.% (± 0,002) de FAD de départ a été greffé sur le solide et la quantité de FAD dans l'échantillon est plus faible que sur MCF-NH₂. Plusieurs explications peuvent être données. Il est notamment possible que le nouveau protocole ait permis de retirer une quantité plus importante de FAD adsorbé sur le matériau, diminuant d'autant la quantité de FAD immobilisée. D'autre part, si la fluorescence X, méthode d'analyse représentative de l'ensemble du matériau, donne un % de FAD plus faible que l'XPS, analysant uniquement la surface du matériau sur 10 nm de profondeur, on pourrait conclure que le FAD est surtout greffé en surface. Enfin, le fait d'avoir supprimé la première étape de réduction est peut être contreproductive : la fonction imine instable a pu être hydrolysée, entraînant une quantité plus faible de GA actif avec le FAD sur le support, se traduisant par une diminution du FAD greffé.

Les courbes d'ATG des échantillons MCF-Ti-NH₂, MCF-FAD et MCF-Ti-FAD sont présentés Figure 163.

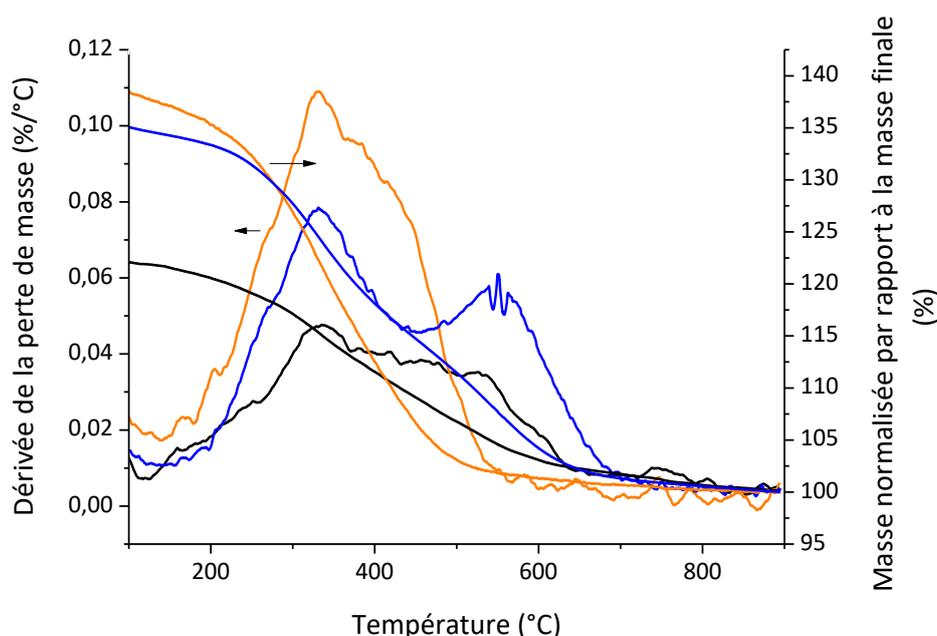


Figure 163: ATG de MCF-Ti-NH₂ et MCF-FAD et MCF-Ti-FAD, sous 100 mL/min d'air avec une rampe en température de 10°C/min.

La dérivée de la perte de masse présente un évènement thermique sur une large gamme de température entre 200 et 500°C, alors que dans le cas de MCF-NH₂ ou MCF-FAD on observe deux évènements thermiques distincts centrés à 330°C et 550°C. Les amines liées au GA actif avec FAD partiraient d'un bloc en ATG (si l'on suppose qu'une partie des imines du GA non réduites sont hydrolysées). Aucun des pics détectés dans l'analyse du FAD seul (Figure 162) n'est présent ici, comme c'était le cas pour MCF-FAD. La perte de masse de MCF-Ti-FAD est comparable à celle de MCF-FAD : 38,5% contre 35%, respectivement. Cette valeur est plus importante que pour MCF-Ti-NH₂ pour laquelle la perte de masse est de 22%, ce qui est attendu car elle rend compte de la présence des groupements greffés sur le matériau. La quantité de matière greffée sur le support est légèrement supérieure sur MCF-Ti-FAD comparé à MCF-FAD, alors que les résultats XPS montrent que la quantité de FAD est plus faible. La comparaison des résultats de ces deux techniques est donc à prendre avec précaution.

2.3. Reconstitution de la GOx

2.3.1. En solution

L'activité mesurée après reconstitution est de 5,5 U/mL. L'activité de la GOx résiduelle mesurée avant reconstitution (GOx intacte après l'étape de préparation de l'apo-GOx) est de 1,04 U/mL. Sachant donc que 5 % du contenu en protéine de la solution est constituée de GOx active (non loin des 3,8% obtenus à partir des solutions d'apo-GOx de départ), cela correspond à un taux de reconstitution de GOx active d'environ 23,4 %. La GOx étant active sous forme de dimère, cela montre qu'en solution l'apo-GOx et le FAD réussissent à former à nouveau cette structure ou que la majorité de l'apo-GOx est encore sous forme dimérique.

Une seconde reconstitution a été effectuée, suivie de deux dialyses successives qui ont montré que la totalité de l'apo-GOx s'était reconstituée. Une activité de 10,8 U/mL est mesurée (deux fois plus d'apo-GOx de départ que l'essai précédent, cf. 1.3.1), correspondant à seulement 33% de GOx sous forme active, ce qui est du même ordre de grandeur que la reconstitution précédente. Ces valeurs sont en accord avec la littérature puisque Posthuma- Trumpie et *al.* [8] reconstituent entre 25 et 50% de GOx. Cela signifie que les 67% restants mènent à des configurations de protéines inactives.

Pour conclure, l'apo-GOx préparée est donc susceptible de se reconstituer pour reformer au moins partiellement une enzyme active. Il est donc possible de tester la reconstitution de l'enzyme sur support solide.

2.3.2. Reconstitution sur MCF-FAD

L'activité mesurée sur les 3 mg de solide MCF-FAD après l'étape de reconstitution est de 0,79 U/mg_{solide}. Un échantillon de contrôle utilisant MCF-NH₂ a été réalisé en parallèle. Après incubation avec une solution d'apo-GOx à la même concentration (apo-GOx/solide), l'activité mesurée sur le support est de 0,75 U/mg_{solide} (donc due à la GOx résiduelle présente dans l'échantillon d'apo-GOx). On peut donc estimer que l'activité sur le solide MCF-FAD est majoritairement due à la GOx déjà active en solution et qui s'est adsorbée sur le support.

Finalement 0,04 U/mg_{solide} de GOx a été reconstituée. Cela correspond à un taux de reconstitution de 0,07% par rapport à la quantité de matière d'apo-GOx disponibles, en considérant que deux monomères sont nécessaires pour former une enzyme active.

Le très faible taux de reconstitution peut s'expliquer par le fait qu'il est sans doute plus difficile de reformer le dimère actif sur le solide, puisqu'il nécessite la présence de deux molécules de FAD suffisamment proches.

2.3.3. Reconstitution sur SBA-15-FAD

L'activité mesurée après l'incubation entre l'apo-GOx et 3 mg SBA-15-FAD est de 2,79 U/mg_{solide} soit 5,6 U/mL. Sachant que l'activité résiduelle mesurée dans la solution d'apo-GOx était de 1,3 U/mL (4% du contenu en protéine de départ), alors le taux de reconstitution est de 25,64% par rapport à la quantité de matière d'apo-GOx disponibles, en considérant que deux monomères sont nécessaires pour former une enzyme active.

Cependant après le lavage du solide de reconstitution avec un tampon phosphate pH = 8 (100 mM), l'activité de la suspension n'est plus que de 0,08 U/mg_{support}. Cela correspond à 0,97% d'enzymes actives réellement reconstituée sur le solide par rapport à la quantité de matière d'apo-GOx disponibles au départ. La reconstitution s'est donc principalement effectuée en solution. Malgré une étape de lavage à pH = 8 lors du greffage du FAD, une partie du cofacteur était donc encore adsorbée en surface et s'est désorbée lors de l'étape de reconstitution.

Cet essai montre donc l'importance du pH de lavage lors du greffage du FAD sur le support, puis après la reconstitution.

2.3.4. Reconstitution sur MCF-Ti-FAD

L'activité relevée après reconstitution sur 20 mg de MCF-Ti-FAD est de 0,008 U/mg_{solide}, soit 0,71% de GOx active reconstituée par rapport à la quantité de matière d'apo-GOx disponibles (en considérant que deux monomères sont nécessaires pour former une enzyme active). Grâce à trois lavages successifs à pH = 8 après reconstitution, l'activité relevée est uniquement celle due à la GOx reconstituée (plus d'activité dans les surnageants).

20 mg de solide greffé comporte donc 0,16 U ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ produit/min). Pour produire 100 μmol de H_2O_2 lors d'une réaction d'époxydation, avec 100 μmol de substrat il faudra alors 10h24. Ce temps est tout à fait raisonnable, puisque les tests d'époxydation dans les chapitres précédents (Chapitres II et III) étaient menés sur 24 h. Cependant pour un excès de 500 μmoles il faudra 52 h, ce qui n'est pas réaliste. L'essai avec ce catalyseur tandem n'a pu être réalisé puisqu'il a été démontré dans le Chapitre III que le recouvrement trop important des amines en surface de MCF-Ti-NH₂ inhibait la réaction d'époxydation avec Ti.

Bien que faibles, les valeurs d'activités obtenues pour ces trois solides ne sont pas négligeables en comparaison des résultats de la littérature pour d'autres oxydases à FAD. Ainsi la reconstitution de la phénylcétone monooxygénase, une flavo-enzyme immobilisée sur des billes d'agaroses par Krzek et *al.* [10] conduit à une activité de 0,003 U/mg. Leur accroche consistait à modifier le FAD en N6-(6-carboxyhexyl)-FAD succinimidylester, afin de le lier aux billes d'agarose présentant des amines en surface, comme montré Figure 164 ci-dessous.

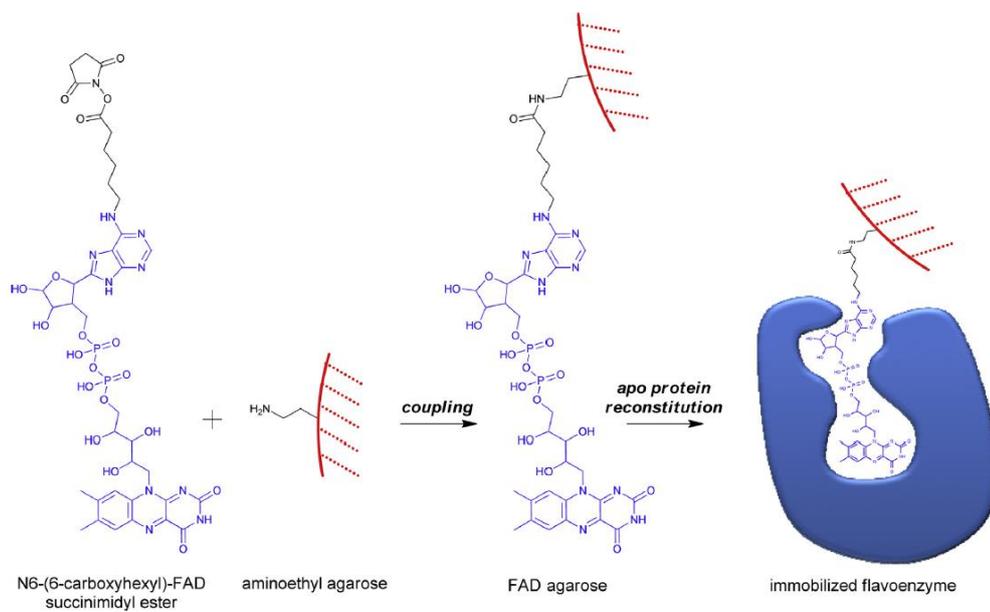


Figure 164: Méthode d'immobilisation de la phénylcétone monoxygénase sur des billes d'agarose, utilisée par Krzek et al. [10]

3. Conclusion

Pour résumer, environ 50% d'apo-GOx peuvent être obtenues par précipitation ou filtration sur gel. La solution protéique résultante est un mélange de monomère, dimère et oligomère, contenant entre 4 et 5% de GOx résiduelle intacte après les étapes de décomposition de l'enzyme.

L'ensemble des résultats de ce chapitre sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 39: Conditions et taux de reconstitution de la GOx en solution, sur MCF-FAD, SBA-15-FAD et MCF-Ti-FAD, ainsi que la production de H₂O₂ associée

Support	FAD/g _{support}	Solide pour reconstitution (mg)	FAD/Apo-GOx (mol.)	Taux de reconstitution (%) ^a	Production de 100 μmoles de H ₂ O ₂ ^b	Production de 500 μmoles de H ₂ O ₂ ^b
MCF-FAD	35,0 μmol	3	20 : 1	0,07 ^c	13 h 54	69 h 24
SBA-15-FAD	61,2 μmol	3	92 : 1	0,97	6 h 54	34 h 42
MCF-Ti-FAD	7,3 μmol	20	69 : 1	0,71	10 h 40	52 h
Solution (1,5 mL)			444 : 1	28 ± 5	15 min	1 h 14
			235 : 1		9 min 30	46 min

^a Basé la quantité de matière d'apo-GOx de départ en considérant que deux unités sont nécessaires pour reconstruire une GOx active

^b En utilisant l'intégralité du solide utilisé pour la reconstitution

^c Solide n'ayant pas subi de lavage à pH = 8 après l'étape de reconstitution

En conclusion, la reconstitution en solution prouve la faisabilité de ce concept (au moins 50% reconstituée). Concernant la reconstitution sur les solides, les pHs de lavage après le greffage de FAD (pH = 10 de préférence) et la reconstitution (au moins à pH = 8) sont essentiels pour ne garder sur le solide que la GOx reconstituée. Cependant la reconstitution sur le solide est beaucoup plus compliquée. En effet la GA est un composé difficile à maîtriser puisqu'étant bifonctionnel, ses deux extrémités peuvent réagir avec les amines de surface. Cela pourrait expliquer le faible greffage du FAD sur les différents solides, n'excédant pas 10%. De plus, il n'a pas été établi clairement dans la littérature que le monomère de GOx reconstitué a une activité enzymatique [8]. Si on considère que seule la GOx sous forme dimérique est active, c'est donc sous cette forme qu'il nous faudrait la reconstituer. Or dans le cas où le FAD est greffé sur le support, il faudrait que deux de ces molécules soient écartées d'une distance permettant la reconstitution de deux monomères, puis la formation du dimère. Dans le cas de la reconstitution d'un dimère d'apo-GOx, il faudrait qu'une autre molécule de FAD soit disponible sur le support à une distance convenable, afin de permettre la reconstitution de la seconde entité protéique. On peut penser qu'une telle configuration soit difficile à atteindre, ce qui explique le faible taux de reconstitution obtenu. Cependant la faisabilité de cette configuration est bien démontrée dans la littérature, où la reconstitution de la GOx a déjà été observée à travers l'échange électronique entre l'enzyme et une surface conductrice constituant une électrode [8, 11-15].

L'utilisation d'un bras espaceur tel que l'acide N-(4-phénylboronique)succinamique (Figure 165), après l'ajout de GA, pourrait être une option afin de faciliter le mouvement de l'holoenzyme sous forme de monomère pour former un dimère.

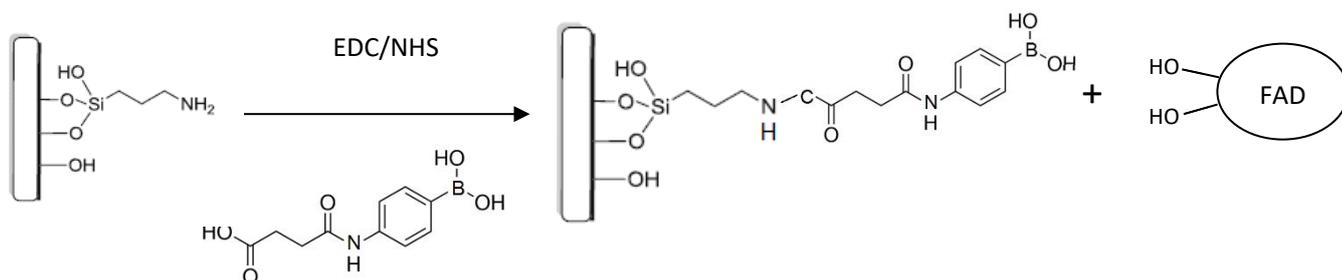


Figure 165: Possible voie de greffage du FAD à partir de l'acide N-(4-phénylboronique)succinamique, sur une surface présentant un groupe amine.

Les acides boroniques ont ainsi déjà été utilisés dans certains travaux [2, 12, 13, 16, 17] pour la conception de biocapteurs. Une autre possibilité peut être d'oxyder le sucre contenu dans le FAD par un periodate afin d'obtenir un aldéhyde, qui pourra réagir directement avec les amines de surface. Même si cette dernière méthode ouvre la voie à de possibles d'oxydations d'autres parties du FAD, l'oxydation des alcools secondaires n'est pas aisée. Enfin, la modification du FAD par l'accroche d'une amine pour obtenir le N⁶-(2-aminoethyl)-FAD a été également étudiée [11, 15, 18].

Pour finir le Tableau 39 montre que malgré un faible taux de reconstitution, comparé à l'apo-GOx disponible (FAD en excès sur le solide), les solides obtenus après reconstitution permettent de produire une quantité équimolaire de H₂O₂ comparé au substrat (100 μmoles) en un temps acceptable entre 7 et 14 h (cela suppose de travailler en milieux aqueux et à 35°C, conditions dans lesquelles la mesure d'activité est effectuée).

Références :

- [1] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.N. Chazalviel, A.C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, S. Djebbar, *Langmuir* 26 (2010) 809-814.
- [2] M. Şenel, M. Dervisevic, E. Çevik, *Curr. Appl. Phys.* 13 (2013) 1199-1204.
- [3] D.L. Morris, R.T. Buckler, in: J.J. Langone, H. Van Vunakis (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1983.
- [4] A. Aliverti, B. Curti, M.A. Vanoni, in: S.K.C.a.G.A.R.H.P. Inc. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ, 1999.
- [5] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID 643975, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/flavin_adenine_dinucleotide#section=Top, 04/01/2016
- [6] K. Takegawa, K. Fujiwara, S. Iwahara, *Biochem. Cell. Biol.* 67 (1989) 460-464.
- [7] M.M. Mahsa Ghasemi, Michaël Tatoulian, and Farzaneh Arefi-Khonsari, *Langmuir* 23 (2007) 11554-11561.
- [8] G.A. Posthuma-Trumpie, W.A. van den Berg, D.F. van de Wiel, W.M. Schaaper, J. Korf, W.J. van Berkel, *Biochim. Biophys. Acta* 1774 (2007) 803-812.
- [9] A. Aitken and M.P. Learmonth, in: J.M. Walker Humana (Eds), *The Protein Protocols Handbook*, 2nd Edition, Press Inc., Totowa, 1996.
- [10] M. Krzek, H.L. van Beek, H.P. Permentier, R. Bischoff, M.W. Fraaije, *Enzyme Microb. Technol.* 82 (2016) 138-143.
- [11] E. Katza, A. Riklina, V. Heleg-Shabtaia, I. Willner, A.F. Bückmann, *Anal. Chim. Acta* 385 (1999) 45-58.
- [12] M. Zayats, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2120-2121.
- [13] M. Şenel, C. Nergiz, M. Dervisevic, E. Çevik, *Electroanalysis* 25 (2013) 1194-1200.
- [14] M. Dervisevic, E. Cevik, M. Senel, *Enzyme Microb. Technol.* 68 (2015) 69-76.
- [15] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 10321-10322.
- [16] O. Yehezkeli, O. Ovits, R. Tel-Vered, S. Raichlin, I. Willner, *Electroanalysis* 22 (2010) 1817-1823.
- [17] J.C. Vidal, J. Espuelas, J.R. Castillo, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 88-98.
- [18] I. Willner, E. Katz, B. Willner, R. Blonder, V. Heleg-Shabtai, A.F. Bückmann, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 337-356.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette étude était de concevoir un catalyseur hétérogène hybride, associant une catalyse enzymatique et inorganique, travaillant en tandem pour l'époxydation aérobie d'alcènes avec la médiation de H₂O₂. La glucose oxydase, permettant la bioproduction de H₂O₂ par réduction de O₂ couplée à l'oxydation du D-glucose, serait ainsi associée à un catalyseur d'oxydation titané, greffés sur un support silicique commun. La production *in-situ* progressive de H₂O₂ permettrait d'améliorer les performances catalytiques du catalyseur inorganique, en diminuant les phénomènes de dismutation de H₂O₂ et le lessivage de l'espèce active. De plus, la proximité de la GOx et des sites Ti devrait réduire la limitation de diffusion des composés au sein du système.

L'idée était d'utiliser un support mésoporeux présentant des pores suffisamment larges pour accueillir l'enzyme à l'intérieur du matériau, augmentant la capacité d'immobilisation de l'enzyme et assurant, en plus de l'immobilisation covalente sur le support, une protection supplémentaire à la GOx face aux conditions d'époxydation.

Les enjeux initiaux étaient donc :

- Trouver le support silicique adéquat,
- Immobiliser l'enzyme de manière covalente sur ce support,
- Incorporer l'espèce active Ti de manière isolée et dispersée dans le matériau,
- Trouver un compromis au niveau des conditions de réaction, afin de faire fonctionner de concert la GOx, travaillant généralement dans des conditions douces (milieux aqueux, température < 40°C) et le catalyseur titané, fonctionnant à plus hautes températures que la GOx (< 100°C) et en milieu organique (CH₃CN, MeOH...).

La méthode d'immobilisation covalente choisie pour lier la GOx sur le support silicique consiste à activer les groupements carboxyliques de l'enzyme grâce aux agents de couplage EDC/NHS afin de créer une liaison amide avec des groupements -NH₂, préalablement greffés en surface du matériau silicique.

Le matériau MCF2-NH₂, appelé par la suite MCF-NH₂, est le matériau qui a montré la porosité la plus ouverte pour la diffusion de l'enzyme en son sein ($\phi_{\text{cellule}} = 34,4 \text{ nm}$ et $\phi_{\text{fenêtre}} = 11,7 \text{ nm}$), ainsi que la densité de -NH₂ la plus importante en surface (environ 2 -NH₂/nm², soit 2 mmol/g_{support}), comparé aux silices SBA-15 et MCF1 (synthèse identique à celle de MCF2 mais sans ajout d'un agent déstructurant en plus du surfactant).

L'optimisation des conditions expérimentales lors du greffage covalent a montré que plusieurs lavages du solide à pH = 8, pH pour lequel les interactions électrostatiques entre le support -NH₂ et la protéine sont défavorables, permettaient de retirer l'enzyme uniquement adsorbée en surface. Dans de telles conditions, au moins 80% de la GOx immobilisée est greffée de manière covalente sur le support et celle-ci présente une efficacité catalytique semblable à celle de la GOx libre (sur la base des K_M). L'étude des activités spécifiques de la GOx adsorbée ou liée de manière covalente, calculées à partir des résultats d'ATG, a permis de montrer que le processus d'immobilisation induit seulement une dénaturation de l'enzyme, de l'ordre de 10%, par rapport à la GOx libre. Il a été montré que le **greffage de l'enzyme sur le support améliore sa stabilité en température comparée à celle en**

solution puisqu'après 4 h de stockage à 50°C, la perte d'activité est seulement de 20% pour l'enzyme immobilisée contre 90% pour la GOx en solution.

Une alternative à la méthode de greffage par EDC/NHS et permettant de contrôler l'orientation de l'enzyme en surface consistait à effectuer un greffage par reconstitution de la partie protéique de la GOx autour du FAD, préalablement greffé sur le support. **Avec au moins 50% de GOx reconstituée, la reconstitution en solution prouve la faisabilité de ce concept.** Cependant la reconstitution sur le solide est beaucoup plus compliquée. Le greffage du FAD en surface n'excède pas 10% et les taux de reconstitution obtenus sur MCF-NH₂, SBA-15-NH₂ et MCF-Ti-NH₂, comparés à l'apo-GOx disponible, ne dépassent pas 1%. Le positionnement de deux molécules de FAD sur le solide permettant la formation d'un dimère actif peut être difficile à atteindre. Cependant, malgré un faible taux de reconstitution, les solides obtenus permettraient de produire une quantité équimolaire de H₂O₂ par rapport au substrat et en un temps acceptable (entre 7 et 14 h).

Une étude du comportement de MCF-NH₂-GOx (greffée par EDC/NHS) dans des milieux applicables aux réactions d'époxydation a été effectuée. L'analyse du solide MCF-NH₂-GOx dans différents mélanges hydro-organiques (tampon acétate/MeOH ou CH₃CN) à 25°C et 50°C a révélé que son activité était plus importante dans des mélanges eau/MeOH qu'avec CH₃CN. Cependant à 50°C, son activité chute à partir de 25% de MeOH et devient nulle à partir de 50% de solvant organique, engendrée par la dénaturation irréversible de la protéine. **A 35°C par contre, l'enzyme immobilisée conserve toute son activité pour des teneurs en MeOH inférieures à 50 %.**

Connaissant les conditions (solvant, température) compatibles avec une activité enzymatique, deux catalyseurs titanés, présentant des caractères hydrophile ou hydrophobe ont été élaborés et testés dans ces conditions: le catalyseur mésoporeux MCF-Ti et la zéolithe TS-1.

L'intérêt de la morphologie du support MCF est l'existence de pores suffisamment grands, interconnectés par des fenêtres de taille suffisante pour introduire l'enzyme dans le matériau. Le titane a été incorporé au matériau silicique selon une méthode post-synthèse et il a été montré qu'il est présent avec une coordinence majoritairement tétraédrique, gage d'une bonne activité catalytique. L'époxydation du cyclooctène dans MeOH à 50°C avec ce catalyseur permet d'atteindre 56% de conversion et une sélectivité en époxyde de 63%. Mais l'acidité de Lewis associée aux sites Ti agit sur l'ouverture de l'époxyde. L'utilisation d'un mélange hydro-organique, même pour une faible proportion de tampon, influe sur la solubilité du substrat et ajoute une compétition H₂O/cyclooctène défavorable à ce dernier pour l'accès à la surface hydrophile du matériau MCF, ce qui conduit à diminuer l'activité catalytique de Ti avec un rendement en époxyde d'uniquement 3% en ajoutant seulement 25% d'eau. **La silylation du catalyseur, destinée à augmenter son caractère hydrophobe, n'a pas permis d'améliorer l'activité catalytique en milieu hydro-alcoolique.** L'augmentation du taux de silylation n'est toutefois pas envisageable si nous souhaitons introduire la GOx à l'intérieur du matériau. De plus, l'écrantage des sites Ti par les groupements -CH₃ n'est pas à exclure.

L'utilisation d'un catalyseur plus hydrophobe tel que la zéolithe TS-1, connue pour fonctionner dans l'eau et avec H₂O₂, a donc été envisagée. Les caractérisations ont montré une structure et une texture caractéristiques de la zéolithe, hydrophobe, constituée de Ti majoritairement en coordinence tétraédrique et dont l'activité catalytique pour l'époxydation du cyclohexène a été vérifiée dans MeOH à 50°C avec H₂O₂ avec un rendement en époxyde de 11% après 24 h. L'apparition de produits d'ouverture de l'époxyde par hydrolyse, avec le 1,2-cyclohexanediol et solvolysé, avec le 2-méthoxycyclohexanol, produit majoritaire (24% de rendement) après 24 h a été observée. Dans ce cas, l'adsorption du cyclohexène et des produits de la réaction sur le catalyseur a été mise en évidence.

L'ajout de 40% de tampon acétate dans le milieu d'époxydation entraîne l'ouverture totale de l'époxyde après 24 h et le produit majoritaire est alors le diol (32% de rendement).

Après avoir montré la faisabilité de l'époxydation du cyclohexène en présence d'eau avec TS-1, des essais de catalyse couplée ont été réalisés. La bioproduction de H_2O_2 par l'enzyme immobilisée sur MCF-NH₂-GOx a ainsi été mise en œuvre, notamment pour l'oxydation de substrats hydrosolubles, en utilisant un mélange mécanique avec TS-1. **L'oxydation du prop-2-ène-1-ol dans un milieu purement aqueux à 40°C a permis une conversion de 99% et une sélectivité de 88%**. Lorsque le catalyseur a été recyclé cependant, une diminution d'environ 30% de la conversion a été observée, la sélectivité restant identique de l'ordre de 85%. Cette baisse de l'efficacité du catalyseur en tandem peut s'expliquer tant par la désactivation de l'enzyme, dont la production de H_2O_2 a diminué d'un facteur 4 menant à une quantité équimolaire d'oxydant produite par rapport au substrat, que par des pertes de matière lors de l'étape de récupération du catalyseur.

L'évaluation du tandem MCF-NH₂-GOx/TS-1 dans un milieu MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50 pour l'oxydation des substrats hydrosolubles et le cyclohexène a été effectuée à 35°C, conditions permettant la conservation de l'activité enzymatique. L'oxydation du prop-2-ène-1-ol et du but-3-ène-1-ol a montré des performances proches : de l'ordre de 50% pour la conversion et 95% pour la sélectivité en produit (glycérol et 1,2-époxy-3-butanol). **L'époxydation du cyclohexène quant à elle a permis d'obtenir un rendement cumulé de 50% pour les produits d'époxydation**, dont le majoritaire est le 1,2-cyclohexanediol avec 30% de rendement, l'époxyde étant totalement ouvert après 24 h de réaction. L'oxydation du cyclohexène, qui n'est que partiellement soluble dans un mélange MeOH/tampon acétate 50 : 50 a conduit à la formation d'environ 50% de dérivés allyliques tels que le cyclohexène-1-ol et cyclohexène-1-one en présence d'un agent tensioactif, le SDS. Toutefois il faut noter une modification supplémentaire du protocole : un flux permanent de dioxygène a été maintenu au-dessus du milieu réactionnel, favorisant la voie radicalaire. Dans le protocole habituel, le dioxygène est apporté par la saturation à l'air du tampon, avant le démarrage de la réaction. Dans ces conditions, il a été vérifié, via la mesure de la quantité d'acide gluconique produit, qu'au moins 60 mM de H_2O_2 est produit, soit une concentration suffisante pour assurer l'oxydation de la totalité de l'alcène introduit et évitant ainsi l'apparition de produit d'autoxydation. Il a été également montré que **le glucose, dans ces conditions d'oxydation, n'est pas oxydé en absence de GOx**.

La microporosité de la TS-1 ne permettant pas d'introduire la GOx à l'intérieur, des modifications par attaque acide afin de perforer la zéolithe ou le dépôt de nanocristaux de TS-1 sur MCF-Ti ont été entrepris. Les différentes caractérisations effectuées sur ces matériaux ont permis de valider ces modifications avec **la création de mésoporosité dans TS-1-d, qui permettrait d'insérer la GOx à l'intérieur de la porosité**. La conservation d'une partie de la structure cristalline de la zéolithe TS-1 et une amélioration significative du caractère hydrophobe du matériau par rapport à MCF-Ti, caractéristique recherchée pour les applications d'oxydation en milieu hydro-organique, ont été établies. Cependant, **le cyclohexène n'a pu être oxydé par H_2O_2 dans MeOH à 50°C avec TS-1d**. On suppose que l'attaque acide a largement détérioré la coordinence du Ti.

Bien que difficilement détectable du fait de la taille présumée des nano-cristaux attendus (< 4 nm), la modification du matériau MCF-Ti par deux étapes de « coating » successives (matériaux TS-1@MCF-Ti et TS-1@MCF-Ti², respectivement) a été validée par les différentes techniques de caractérisation utilisées. Celle-ci a fortement amélioré **le caractère hydrophobe de MCF-Ti puisque les mesures d'adsorption d'eau sur TS-1@MCF-Ti² sont quasi-identiques à celle de TS-1**. Le catalyseur TS-1@MCF-Ti² a ainsi montré une amélioration significative des performances catalytiques pour

l'oxydation du prop-2-ène-1-ol à 40°C en milieu aqueux, comparé au matériau de départ MCF-Ti, avec une conversion de 74% contre 55% et une sélectivité en glycérol de 84% contre 48%.

Le matériau **MCF2-Ti-NH₂-GOx, catalyseur tandem intégré s'est révélé inefficace pour l'oxydation dans un milieu aqueux à 40°C de substrats hydrosolubles tels que les alcools allyliques.** Ce manque d'activité est imputé à un taux de recouvrement trop élevé des groupements amine sur le matériau MCF-Ti puisque MCF-Ti-NH₂ est lui aussi incapable de catalyser l'époxydation de ces substrats en présence de H₂O₂, contrairement à MCF-Ti.

Les tests utilisant le couplage mécanique MCF-NH₂-GOx/TS-1 montrent le fort potentiel d'un système chimioenzymatique, autant en milieu aqueux qu'hydro-organique et pour des alcènes de nature variée. Parallèlement, une seconde stratégie a été envisagée à savoir non pas le changement de support mais de l'espèce catalytique. L'idée était d'utiliser une porphyrine au manganèse, la Mn-TCPP, connue pour travailler avec H₂O₂, et de la greffer sur MCF-NH₂ avec la GOx. Bien que Mn-TCPP soit utilisée généralement en milieu non aqueux, son fonctionnement à température ambiante permettait d'envisager une utilisation dans des milieux hydro-organiques encore riches en solvant organique (A l'ambiante, à 70% de MeOH, l'enzyme conserve environ 80% de son activité initiale). **Le taux de greffage de la porphyrine est cependant faible** (4,6 μmoles/g_{support} contre 520 et 771 μmoles de Ti/g_{support} dans TS-1 et MCF-Ti, respectivement), avec un taux de recouvrement de 0,4%. **Les tests d'oxydation utilisant à la fois Mn-TCPP et la GOx en solution ont montré la faisabilité de la réaction en cascade pour l'époxydation du cyclooctène dans 67% de MeOH ou EtOH** avec des rendements en époxyde très proches : 17% et 12% respectivement. Cependant, l'utilisation de MCF-NH₂-GOx pour bio-produire H₂O₂ et Mn-TCPP en solution a pour effet de diminuer de 90% le rendement en époxyde, qui passe à 1,7%. L'apparition d'un précipité est suspectée intervenir dans cette baisse de réactivité, de plusieurs manières : désactivation de l'enzyme, de Mn-TCPP ou inaccessibilité des substrats ou produits du fait de la viscosité du précipité. Pour les mêmes raisons auxquelles s'ajoute la faible teneur en Mn-TCPP supportée sur MCF-NH₂, les essais d'oxydation du cyclohexène effectués avec la porphyrine greffée et la GOx en solution n'ont pas été concluants, puisqu'uniquement 0,5% de rendement en époxyde a été obtenu en ajoutant lentement H₂O₂ au système.

Les perspectives envisagées pour ce travail sont multiples. Concernant le système MCF-NH₂-GOx/TS-1, l'amélioration du protocole de recyclage du solide ainsi que des tests de réutilisation sont à effectuer. Une étude de l'influence du SDS sur l'activité catalytique de la GOx et de Ti pourrait également être intéressante. Le matériau qui semble le plus intéressant est le catalyseur TS-1@MCF-Ti² puisque ces paramètres texturaux sont de taille suffisamment importante pour loger l'enzyme et son caractère hydrophobe est très proche de celui de la zéolithe TS-1. Les premiers tests ont également montré qu'il est le plus prometteur pour des essais d'oxydation en tandem avec la GOx, à condition d'effectuer des études plus approfondies sur la fonctionnalisation du support et sur l'immobilisation de la GOx.

Enfin concernant l'immobilisation de la GOx, la méthode de reconstitution via le FAD greffé en surface du matériau pourrait être améliorée par l'utilisation d'un bras espaceur tel que l'acide N-(4-phénylboronique)succinamique ou la modification du FAD en N⁶-(2-aminoéthyl)-FAD. Ceci augmenterait la mobilité de l'holoenzyme et favoriserait sa complexation avec le FAD en surface.

Annexes

Annexe 1. Courbes de Michaelis-Menten de la GOx en solution et immobilisée sur MCF-NH₂

La courbe de Michaelis-Menten Figure A1 ci-dessous a été obtenue en faisant varier la concentration de glucose de 20 mM à 500 mM ou 1000 mM dans le mélange pour mesurer l'activité. Le protocole de mesure d'activité utilisé est celui présenté au Chapitre II 1.7.1. pour l'enzyme libre et 1.7.2. pour la GOx immobilisée sur MCF-NH₂. Les échantillons contiennent 0,6 U/mL de GOx en solution et 3,5 U/mg solide de GOx immobilisée.

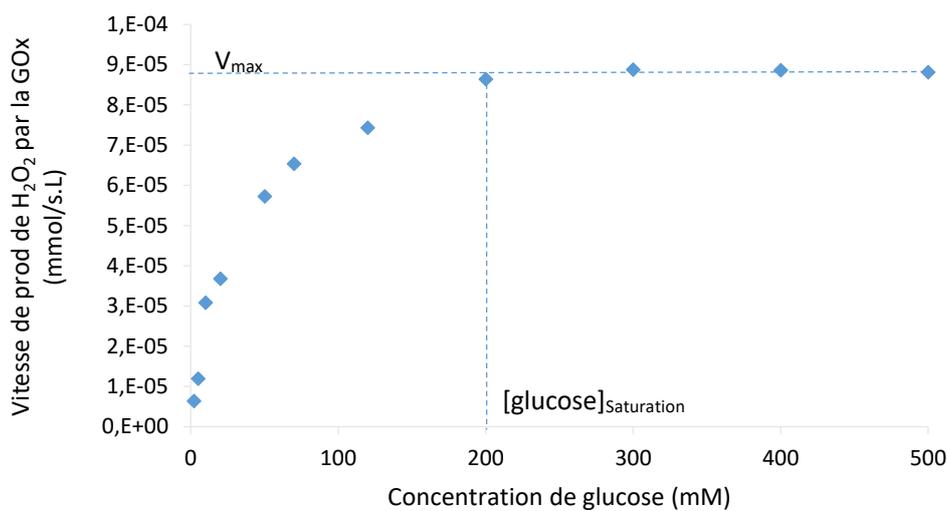


Figure A 1 : Courbe de Michaelis-Menten pour la GOx en solution (environ 0,6 U/mL) dans du tampon acétate (pH = 6, 100 mM)

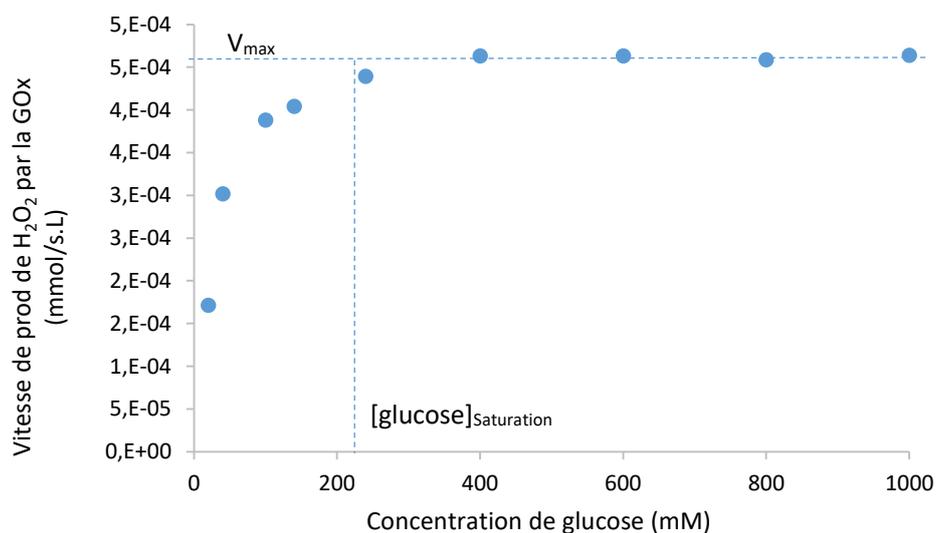


Figure A 2 : Courbe de Michaelis-Menten pour MCF-NH₂-GOx (3,5 U/mg solide) dans du tampon acétate (pH = 6, 100 mM)

Annexe 2. Bilan matière pour le test d'époxydation du but-3-ène-2-ol dans MeOH/tampon acétate (v/v) (50 : 50) à 35°C avec un mélange mécanique TS-1 et MCF-NH₂-GOx

- Conditions : TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ 15 U) dans un mélange MeOH/tampon acétate (v/v) 50 : 50 à 35°C. Ti/substrat (1 :4 mol.) pour [but-3-ène-2-ol] = 50 mM et [glucose] = 300 mM.

Le tableau ci-dessous montre les quantités de matière de chaque composé au cours du temps.

Temps de réaction	<i>But-3-ène-2-ol</i> (μmol)	<i>1,2-époxy-3-butanol</i> (μmol)	$\Sigma_{\text{composés}}$ (μmol)
0	86,9	0	86,9
3h	75,0	4,6	79,6
6h	68,6	13,1	81,7
24h	41,9	43,0	84,9

Annexe 3. Bilans matière des tests d'époxydation du cyclohexène dans MeOH/tampon acétate (v/v) (50 : 50) à 35°C avec un mélange mécanique TS-1 et MCF-NH₂-GOx

Dans les milieux utilisés pour l'époxydation du cyclohexène avec le mélange catalytique TS-1 et MCF-NH₂-GOx (MeOH/tampon acétate (v/v) (50 : 50), [glucose] = 200 mM ou 300 mM), la solubilité du substrat n'est pas maximale du fait de l'ajout de glucose concentré et de la part importante d'eau dans le solvant. En effet, contrairement aux essais dans MeOH/tampon acétate (v/v) (60 : 40), on constate ici une grande différence entre le nombre de moles de cyclohexène pesé au départ (théorique) et celui quantifié par CPG juste (substrat dissout) avant de démarrer le test d'époxydation (à t = 0). La Figure 3 illustre ce phénomène en montrant les rendements obtenus pour un essai (présenté ci-après avec 200 mM de glucose), en prenant comme référence la quantité de cyclohexène de départ obtenue soit à partir des aires en CPG (fraction soluble), soit à partir de la pesée : n_{C6} (aires) : 20 μ mol et n_{C6} (masse) : 80 μ mol.

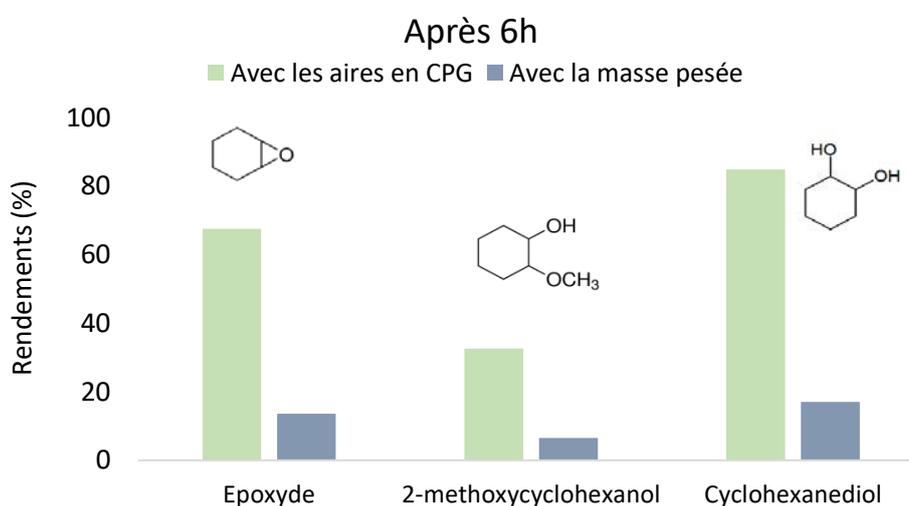


Figure A 3 : Différence entre les valeurs de rendements de chaque produit d'oxydation selon la quantité de cyclohexène prise en référence : celle de départ obtenue à partir des aires en CPG ou celle déterminée par pesée !

Il est possible de s'apercevoir que la somme de toutes les contributions des produits obtenus par le calcul d'aires est de 185%, ce qui n'est pas possible. Tandis qu'en considérant les quantités obtenues grâce à la masse initiale du cyclohexène, la somme des rendements est de 37% ce qui est plus raisonnable, dans la mesure où une partie du cyclohexène n'est pas soluble. Les valeurs de rendements présentés dans l'étude ont été déterminées sur la base de la quantité de cyclohexène obtenue par pesée en début d'essai. Cependant il est intéressant de garder en tête que la partie accessible de substrat est quant à elle entièrement transformée. En effet, en partant de la quantité soluble dans le mélange il est possible de se rendre compte que le bilan de matière est bouclé et que la quantité en solution au départ a été sous-estimée. Les tableaux ci-dessous regroupent les rendements obtenus à partir de la quantité de cyclohexène (nommé C6 dans les tableaux) pesée et soluble en début d'essais et également les quantités de matière de chaque composé, obtenue à partir des mesures de CPG. Les rendements calculés avec la quantité de substrat de départ obtenue par pesée ou CPG sont présentés pour comparaison dans chaque tableau ci-dessous, afin de rendre compte de la pertinence de notre choix.

- Conditions : TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ **15 U**) dans MeOH/tampon acétate (v/v) (50 : 50) , à 35°C. Ti/substrat (1 : 4 mol.) et [cyclohexène] = 50 mM, [glucose] = **300 mM**.

	Rendements (%) après 24 h		Composés après 24h	Quantités de matière obtenues par CPG	Quantités de matière obtenues par pesée
	A partir de C6 pesée introduit	A partir de C6 soluble au départ (CPG)	$\Sigma_{Produits}$ (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)
Cyclohexène	0	0	0	37	83
Oxyde de cyclohexène	0	0	0		
2-méthoxycyclohexanol	20	43	16		
1,2-cyclohexanediol	33	73	27		
Total	52	116	43		

- Conditions : TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ **15 U**) dans MeOH/tampon acétate 50 : 50 , à 35°C. Ti/substrat (1 : 4 mol.) et [cyclohexène] = 50 mM, [glucose] = **200 mM**.

	Rendements (%) après 24 h		Composés après 24h	Quantités de matière obtenues par CPG	Quantités de matière obtenues par pesée
	A partir de C6 pesée introduit	A partir de C6 soluble au départ (CPG)	$\Sigma_{Produits}$ (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)
Cyclohexène	0	0	0	16	77
Oxyde de cyclohexène	2	8	1		
2-méthoxycyclohexanol	16	81	13		
1,2-cyclohexanediol	17	153	17		
Total	35	242	31		

Ici il est possible de s'apercevoir que la quantité de substrat injectée à t = 0 est sous-estimée. Cela peut être dû à un facteur expérimental tel que le prélèvement du mélange avant injection. En regardant les valeurs détectées à t = 0 pour l'essai du dessus et du dessous, il est possible de supposer que la quantité de matière devait être comprise entre 30 μmol et 50 μmol , ce qui est cohérent avec la somme des produits obtenue en fin de réaction de 31 μmol .

- Conditions : TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ **5 U**) dans MeOH/tampon acétate (v/v) (50 : 50) , à 35°C. Ti/substrat (1 : 4 mol.) et [cyclohexène] = 50 mM, [glucose] = **200 mM**. Flux d'O₂ en surface du milieu réactionnel.

	Rendements (%) après 24 h		Composés après 24h	Quantités de matière obtenues par CPG	Quantités de matière obtenues par pesée
	A partir de C6 pesée introduit	A partir de C6 soluble au départ (CPG)	$\Sigma_{Produits}$ (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)
Cyclohexène	0	0	0		
Oxyde de cyclohexène	0	0	0		
Cyclohexène-1-ol	5	10	4		
Cyclohexène-1-one	11	20	9	44	80
2-méthoxycyclohexanol	16	28	12		
1,2-cyclohexanediol	27	48	21		
Total	58	107	47		

Le bilan matière en tenant compte de la quantité de substrat accessible à t = 0 (44 μmol) est bouclé.

- Conditions : TS-1 (Si/Ti = 31 mol.) et MCF-NH₂-GOx (environ **15 U**) dans MeOH/tampon acétate 50 : 50 , à 35°C. Ti/substrat (1 : 4 mol.) et [cyclohexène] = 50 mM, [glucose] = **200 mM**, [SDS] = **5 mM**. Flux d'O₂ en surface du milieu réactionnel.

	Rendements (%) Après 24 h		Composés après 24h	Quantités de matière obtenues par CPG	Quantités de matière obtenues par pesée
	A partir de C6 pesée introduit	A partir de C6 soluble au départ (CPG)	$\Sigma_{Produits}$ (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)	A t= 0 C6 (μmol)
Cyclohexène	0	0	0		
Oxyde de cyclohexène	0	0	0		
Cyclohexène-1-ol	5	4	4		
Cyclohexène-1-one	51	49	47	95	93
2-méthoxycyclohexanol	19	1	18		
1,2-cyclohexanediol	-		1		
Total	75	73	70		

Le bilan de matière est quasiment bouclé ici (à 74%) et le manque de matière peut être lié au phénomène d'adsorption du substrat sur la TS-1 comme cela a pu être visible dans un milieu purement organique (Chapitre III 2.2.1.). Il est également possible d'observer que l'ajout de SDS homogénéise la solution puisque les rendements calculés grâce à la quantité de départ de C6 obtenue par CPG et par pesée sont similaires.

Annexe 4. Mesure du potentiel zeta (PZC) du matériau SBA-15-NH₂

Des mesures ponctuelles de mobilités électrophorétiques de SBA-15-NH₂ ont été réalisées à différents pH. Il faut savoir que chaque point de mesure ne constitue qu'une estimation du potentiel Zeta (en tout cas au moins du signe de ce potentiel), et non une valeur précise de ce potentiel, car la taille des particules est relativement importante et dispersée, on ne peut donc relier directement la mobilité électrophorétique à la charge de surface précise du matériau.

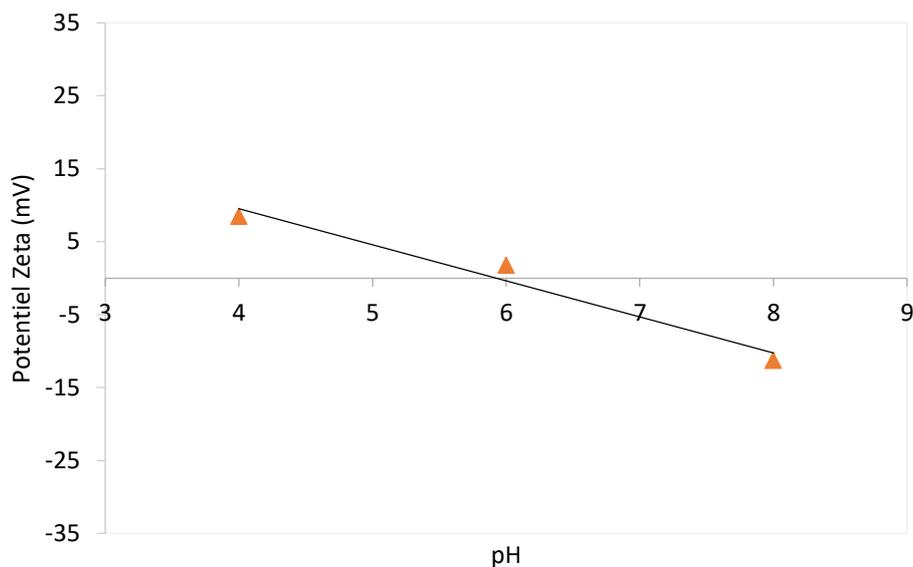


Figure A 4 : Evaluation du PZC du matériau SBA-15-NH₂