



**HAL**  
open science

# Monolithes à porosité multi-échelle comme supports pour la réduction enzymatique du CO<sub>2</sub> en molécules d'intérêts

Mohamed Baccour

► **To cite this version:**

Mohamed Baccour. Monolithes à porosité multi-échelle comme supports pour la réduction enzymatique du CO<sub>2</sub> en molécules d'intérêts. Matériaux. Montpellier, Ecole nationale supérieure de chimie, 2018. Français. NNT : 2018ENCM0004 . tel-03664635

**HAL Id: tel-03664635**

**<https://theses.hal.science/tel-03664635>**

Submitted on 11 May 2022

**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.



# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par **L'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE  
DE CHIMIE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale **Sciences  
Chimiques Balard**  
Et de l'unité de recherche Institut Charles Gerhardt  
de Montpellier

Spécialité : **Chimie et Physico-chimie des Matériaux**

Présentée par **MOHAMED BACCOUR**

**Monolithes à porosité multi-échelle comme  
supports pour la réduction enzymatique du  
CO<sub>2</sub> en molécule d'intérêt**

Soutenue le 12 octobre 2018 devant le jury composé de

Mr Mathieu ETIENNE, Directeur de recherche CNRS, UMR7564-LCPME - Nancy	Rapporteur
Mme Vanessa FIERRO, Directeur de recherche CNRS, -UMR7198-IJL – Epinal	Rapporteur
Mme Sandrine BOURRELLY, Maitre de conférences, UMR7246-MADIREL – Aix-Marseille	Examineur
Mr Eric DUBREUCQ, Professeur, UMR-IATE – Montpellier	Président du jury
Mr Jullien DRONE, Maitre de conférences, UMR5253- ICG – Montpellier	Examineur
Mr Nicolas BRUN, Chargé de recherche CNRS, UMR5253-ICG – Montpellier	Encadrant
Mr Ahmad MEHDI, Professeur, UMR5253-ICG – Montpellier	Co-directeur de thèse
Mme Anne GALARNEAU, Directeur de recherche CNRS, UMR5253-ICG - Montpellier	Directeur de thèse







# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par **L'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE  
DE CHIMIE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale **Sciences  
Chimiques Balard**  
Et de l'unité de recherche Institut Charles Gerhardt  
de Montpellier

Spécialité : **Chimie et Physico-chimie des Matériaux**

Présentée par **MOHAMED BACCOUR**

**Monolithes à porosité multi-échelle comme  
supports pour la réduction enzymatique du  
CO<sub>2</sub> en molécule d'intérêt**

Soutenue le 12 octobre 2018 devant le jury composé de

Mr Mathieu ETIENNE, Directeur de recherche CNRS, UMR7564-LCPME – Nancy	Rapporteur
Mme Vanessa FIERRO, Directeur de recherche CNRS, -UMR7198-IJL – Epinal	Rapporteur
Mme Sandrine BOURRELLY, Maître de conférences, UMR7246-MADIREL – Aix-Marseille	Examineur
Mr Eric DUBREUCQ, Professeur, UMR-IATE – Montpellier	Président du jury
Mr Jullien DRONE, Maître de conférences, UMR5253- ICG – Montpellier	Examineur
Mr Nicolas BRUN, Chargé de recherche CNRS, UMR5253-ICG – Montpellier	Encadrant
Mr Ahmad MEHDI, Professeur, UMR5253-ICG – Montpellier	Co-directeur de thèse
Mme Anne GALARNEAU, Directeur de recherche CNRS, UMR5253-ICG - Montpellier	Directeur de thèse





## Remerciements

Clore une thèse de recherche de trois ans ne peut se faire sans référence à ceux qui, de loin ou de près, continuellement ou épisodiquement, ont contribué à bien la mener.

Mes remerciements les plus distingués se tournent tout d'abord envers toi, mon encadrant Dr. Nicolas Brun pour avoir cru en moi et en mes compétences et su gérer mes faiblesses. Je te suis reconnaissant de m'avoir transmis ton savoir-faire et exigé le meilleur de moi, me poussant ainsi à dépasser mes limites. Je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour avoir cru en la réussite de ce projet malgré sa pluridisciplinarité et avoir répondu présent à chaque fois que le besoin se faisait sentir. J'espère avoir été à la hauteur pendant ces trois années et que tu sois tout autant satisfait du notre travail que moi.

Merci aussi à mes deux directeurs de thèse, pour m'avoir donné la chance d'accéder à ce poste et de m'avoir disposé de l'environnement et des moyens humains et matériels nécessaires au bon déroulement de ce travail.

Ma directrice de thèse Dr. Anne Galarneau, merci pour tes conseils et tous le temps que tu m'as accordé. Des discussions qui, à chaque fois me poussaient de me poser des questions plus pertinentes que jamais. Je te remercie pour ton soutien et tes précieux conseils, je t'en suis reconnaissant.

Egalement, merci à mon co-directeur de thèse Pr. Ahmed Mehdi pour tes encouragements successifs, tes conseils, ta bonne humeur et ta positivité qui m'ont aiguillé tout au long de ces trois années tant sur le plan scientifiques qu'humain.

Merci aux rapporteurs de cette thèse Dr. Mathieu Etienne et Dr. Vanessa Fierro, ainsi qu'aux examinateurs, Dr. Sandrine Bourrelly, Pr. Eric Dubreucq et Dr. Jullien Drone. Vous me faites l'insigne honneur en acceptant de constituer le jury de ma soutenance et de juger trois années de travail approfondi et minutieux.

La réussite de ce travail n'aurait pas eu lieu sans la participation des collaborateurs, Dr. Julien Drone pour toute la partie biocatalyse et enzyme, Pr. Eric Dubreucq pour la partie biocatalyse et pour m'avoir formé sur l'utilisation de l'HPLC, Dr. Olivier Fontaine et Dr. Sophie Tingry pour la partie électrochimie, envers qui je suis gré.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma reconnaissance envers ceux qui m'ont formé sur l'utilisation d'appareils et initié aux procédés nécessaires aux expérimentations et qui ont bien gentiment offert leur aide et soutien sur le plan technique. Je fais ici référence à M. Thomas Cacciaguerra pour les analyses MEB et DRX, Dr. Géraldine Layrac et Mr. Christian Curtil pour m'avoir formé sur les appareils d'Adsorption-désorption d'azote et d'analyse thermogravimétrique ainsi que Mr. Serge Bertrand pour m'avoir mis à disposition les fournitures et produits consommables.

Un grand merci au Dr. Bilel Said pour m'avoir initié à la synthèse des monolithes pendant mon stage et m'avoir encouragé à faire une thèse.

Pendant ces trois années j'ai aussi eu la chance de faire la connaissance de personnes inspirantes et dévouées, des personnes envers qui je tiens à exprimer mes remerciements les plus affectueux pour leur aide précieuse aussi et surtout sur le plan moral. À vous, mes collègues Wassim Sebail, Youcef Didi, Angel Manuel Escamilla Perez, Radu Dorin, Wala Nacer Al Dine, Rajesh Bahandary, Sanghoon Kim, Rimeh Mighri, Rémi Beucher et Ismail Can Oguz... ; à vous les stagiaires qui m'ont été d'une grande aide- Alexandra Lamotte, Orlane Bouzard, Shuxian Zou et Xiaoyu Wang.

Et plus particulièrement à toi ma collègue et très bonne amie Maroua Bouchneb qui a su apaiser mes doutes et égayer mes journées...

Je ne peux remercier assez celles qui ont facilité toute opération administrative, le sourire aux lèvres, mesdames Isabelle Girard, Fatima Rezkallah et Tzvetelina Efremova.

## Remerciements

---

Merci aux équipes matériaux avancés pour la santé et la catalyse (MACS) et chimie moléculaire et organisation du solide (CMOS) de l'institut Charles Gerhardt de Montpellier pour votre accueil, ainsi que toute l'équipe du laboratoire IATE Montpellier SupAgro qui m'ont permis d'analyser mes échantillons par HPLC.

Je dédie ce travail à mon frère Faiz, ma belle-sœur Manel, ma sœur Mariam, mon beau-frère Mahmoud et mes nièces Zeineb, Aïcha, Khadija et Fatma. A mes parents pour votre patience et votre soutien moral ..., à ma grand-mère qui m'a toujours encouragé et qui est partie tôt avant que je termine ce projet.

A toi Salma, merci pour tout le bonheur que tu me procures chaque jour...



## Liste des abréviations

**ATG** : analyse thermogravimétrique

**BSA** : Albumine de sérum bovin (bovine serum albumin)

**CLEA** : Agrégats d'enzymes réticulées (cross-linked enzyme aggregate)

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**CTAB** : cétyl triméthylamonium bromide

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**DRX** : diffraction des rayons X

**FDH** : formiate déshydrogénase

**HMF** : hydroxyméthylfurfural

**MEB** : microscopie électronique à balayage

**MeFDH** : FDH issue de *Methylobacterium extorquens*

**MET** : microscopie électronique à transmission

**NAD<sup>+</sup>/NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide

**PEG** : poly éthylèneglycol

**PtDH** : phosphite déshydrogénase

**SDS-PAGE** : sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**TEOS** : tetraethyl orthosilicate

**TOF** : *turnover frequencies* (nombre de moles transformées par moles de catalyseur et par unité de temps)

**TTN** : *turnover number* (nombre de moles transformées par moles de catalyseur)



# Table des matières

Avant-propos .....	1
<b>Chapitre 1 - Etat de l'art : Monolithes à porosité hiérarchique et biocatalyse supportée .....</b>	<b>7</b>
1.1. Monolithe à porosité hiérarchique .....	9
1.1.1. Généralités sur les matériaux poreux.....	9
1.1.2. Cas de la silice : procédé sol-gel inorganique .....	11
1.1.3. Cas du carbone.....	13
1.1.4. Monolithes macroporeux à porosité hiérarchique .....	14
1.1.5. Caractérisations des matériaux poreux .....	16
1.1.5.1. Analyse d'adsorption désorption d'azote.....	17
1.1.5.2. Porosimétrie à Mercure.....	21
1.1.5.3. Microscopie électronique à balayage.....	22
1.1.5.4. Microscopie électronique à transmission.....	23
1.2. Monolithes à porosité hiérarchique en (bio)catalyse .....	24
1.2.1. Catalyse enzymatique : une rapide introduction.....	24
1.2.2. Catalyse enzymatique supportée .....	25
1.2.2.1. Intérêt de l'immobilisation sur un support poreux.....	26
1.2.2.2. Stratégies d'immobilisation .....	27
1.2.2.2.1. Par liaison au support.....	29
1.2.2.2.2. Agrégats d'enzymes .....	30
1.2.2.2.3. Encapsulation .....	31
1.2.2.2.4. Adsorption-réticulation .....	31
1.2.3. Monolithes à porosité hiérarchique en (bio)catalyse .....	32
1.2.3.1. Intérêt de la porosité hiérarchique: exemple de la catalyse en flux continu .....	32
1.2.3.2. Intérêt de la porosité hiérarchique en biocatalyse .....	33
1.3. Conversion enzymatique du CO <sub>2</sub> .....	34
1.3.1. Contexte et problématiques .....	34
1.3.2. Les formiates déshydrogénases (FDHs).....	38
1.4. Objectifs et dispositif visé .....	40
<b>Chapitre 2 - Matériels et méthodes.....</b>	<b>43</b>
2.1. Synthèses des monolithes .....	46
2.1.1. Synthèse de monolithes de silice .....	46
2.1.1.1. Synthèse du SiO <sub>2</sub> -3 .....	47

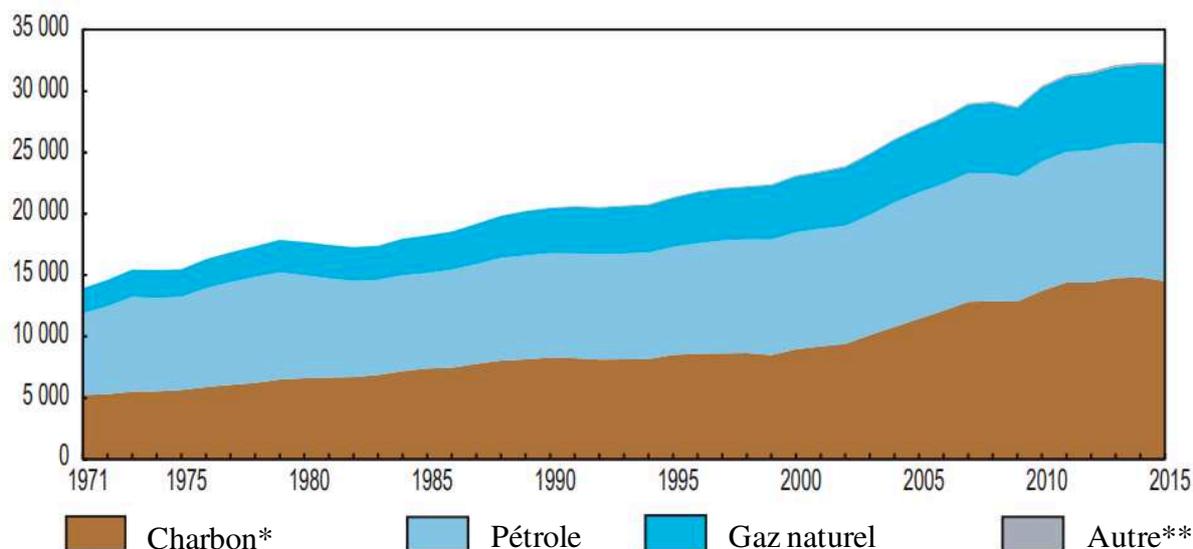
2.1.1.2. Synthèse du SiO <sub>2</sub> -40 .....	48
2.1.1.3. Contrôle de la mésoporosité.....	49
2.1.1.4. Fonctionnalisation de la surface par greffage post-synthèse.....	50
2.1.2. Monolithes carbonés par décomposition spinodale <sup>63</sup> .....	51
2.1.3. Monolithes carbonés <i>via</i> empreinte « dure » de silice.....	52
2.1.3.1. Synthèse des monolithes composites silice/ <i>hydrochar</i> .....	53
2.1.3.2. Synthèse de monolithes composites silice-carbone .....	54
2.1.3.3. Obtention de la réplique inverse du monolithe de silice en carbone..	54
2.2. Caractérisations des matériaux .....	55
2.2.1. Microscopie électronique à balayage .....	55
2.2.2. Porosimétrie à Mercure .....	55
2.2.3. Adsorption-désorption d'azote .....	56
2.2.4. Microscopie électronique à transmission .....	56
2.2.5. Analyse thermogravimétrique .....	56
2.2.6. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	57
2.2.7. Spectroscopie Raman .....	57
2.2.8. Diffraction des rayons X .....	57
2.2.9. Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X.....	58
2.3. Biocatalyse : préparation des enzymes et réduction du CO <sub>2</sub> .....	58
2.3.1. Phosphite déshydrogénase (PtDH) .....	58
2.3.2. Formiate déshydrogénase (MeFDH) .....	60
2.3.3. Détermination de la concentration en enzyme .....	61
2.3.4. Détermination de l'activité spécifique de la MeFDH (UMeFDH).....	62
2.3.5. Détermination de l'activité spécifique de la PtDH (UPtDH) .....	62
2.3.6. Analyse de la réduction enzymatique du CO <sub>2</sub> .....	63
2.3.7. Préparation des réacteurs .....	63
2.3.7.1. Préparation des réacteurs en silice .....	63
2.3.7.2. Préparation des réacteurs en carbone .....	64
2.4. Fonctionnalisation des monolithes de carbone .....	65
2.4.1. Voie diazonium .....	65
2.4.1.1. Greffage du phénylène diamine par sel de diazonium sur monolithe	65
2.4.1.2. Greffage des phénazines par sel de diazonium sur monolithe .....	65
2.4.1.3. Electropolymérisation du neutral red sur électrode de carbone vitreux	67
2.4.2. Voie Diels-Alder .....	67
2.4.2.1. Greffage par voie Diels-Alder sur monolithe de carbone .....	67

2.4.2.2. Immobilisation du cofacteur sur nanotubes de carbones par voie Diels-Alder .....	67
2.5. Tests électrochimiques de régénération du NADH .....	69
2.5.1. Régénération du cofacteur et électrocatalyse .....	70
<b>Chapitre 3 - Monolithes à porosité hiérarchique .....</b>	<b>73</b>
3.1. Monolithes de silice par décomposition spinodale .....	75
3.1.1. Optimisation de la synthèse de monolithe à grand diamètre de macropores .....	76
3.1.2. Contrôle de la macroporosité.....	79
3.1.3. Contrôle de la mésoporosité .....	81
3.2. Monolithes de carbone par décomposition spinodale.....	84
3.3. Monolithes Carbonés <i>via</i> empreinte « dure » de silice.....	85
3.3.1. Fonctionnalisation des monolithes de silice par l'aminopropyl triéthoxysilane (APTES).....	87
3.3.2. Intérêt de la fonctionnalisation des monolithes de silice .....	90
3.3.3. Obtention d'une empreinte carbonée : paramètres importants .....	92
3.3.3.1. Contrôle du taux de remplissage d' <i>hydrochar</i> dans le squelette silicique.....	92
3.3.3.2. Stabilité du squelette silicique amino-fonctionnalisé en conditions hydrothermales.....	95
3.3.3.3. Caractérisation du dépôt d' <i>hydrochar</i> .....	97
3.3.4. Contrôle textural : macro- méso- microporosité.....	98
3.3.5. Contrôle structural et chimie de surface .....	111
3.4. Propriétés intrinsèques des monolithes.....	116
3.4.1. Propriétés mécaniques .....	116
3.5. Conclusions .....	117
<b>Chapitre 4 - Réduction du CO<sub>2</sub> en formiate par catalyse enzymatique .....</b>	<b>119</b>
4.1. Conception du système de réduction enzymatique du CO <sub>2</sub> .....	121
4.2. Résultats et discussions .....	125
4.2.1. Activité spécifique de la MeFDH ( $U_{MeFDH}$ ) .....	126
4.2.2. Activité spécifique de la PtDH ( $U_{PtDH}$ ).....	127
4.2.3. Détermination des temps de rétention des espèces ioniques présentes dans le milieu réactionnel .....	128
4.3. Etude de la bioréduction du CO <sub>2</sub> en <i>batch</i> .....	130
4.3.1. Influence du PEGDGE .....	131
4.3.2. Influence de la concentration en enzymes .....	133

4.3.3. Influence du barbotage au CO <sub>2</sub> .....	134
4.3.4. Influence du ratio d'activité $U_{MeFDH}/U_{PtDH}$ .....	135
4.4. Catalyse supportée sur monolithes et flux continu (PtDH + MeFDH).....	137
4.4.1. Catalyse supportée sur monolithe de silice et flux continu .....	138
4.4.2. Catalyse supportée sur monolithe de carbone et flux continu .....	139
4.5. Conclusions .....	142
<b>Chapitre 5 - Fonctionnalisation des monolithes carbonés et électrochimie .....</b>	<b>145</b>
5.1. Fonctionnalisation des monolithes carbonés .....	147
5.1.1. Voie diazonium .....	147
5.1.2. Voie Diels-Alder .....	148
5.1.3. Molécules modèles : diazonium vs. Diels-Alder .....	149
5.2. Régénération électrochimique du cofacteur NADH : greffage de médiateurs .....	153
5.2.1. Greffage des phénazines sur monolithe C-RF .....	156
5.2.2. Greffage des phénazines sur GCE .....	158
5.3. Immobilisation covalente du cofacteur NADH .....	162
5.4. Conclusions .....	170
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>169</b>
<b>Références.....</b>	<b>177</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>179</b>

## Avant-propos

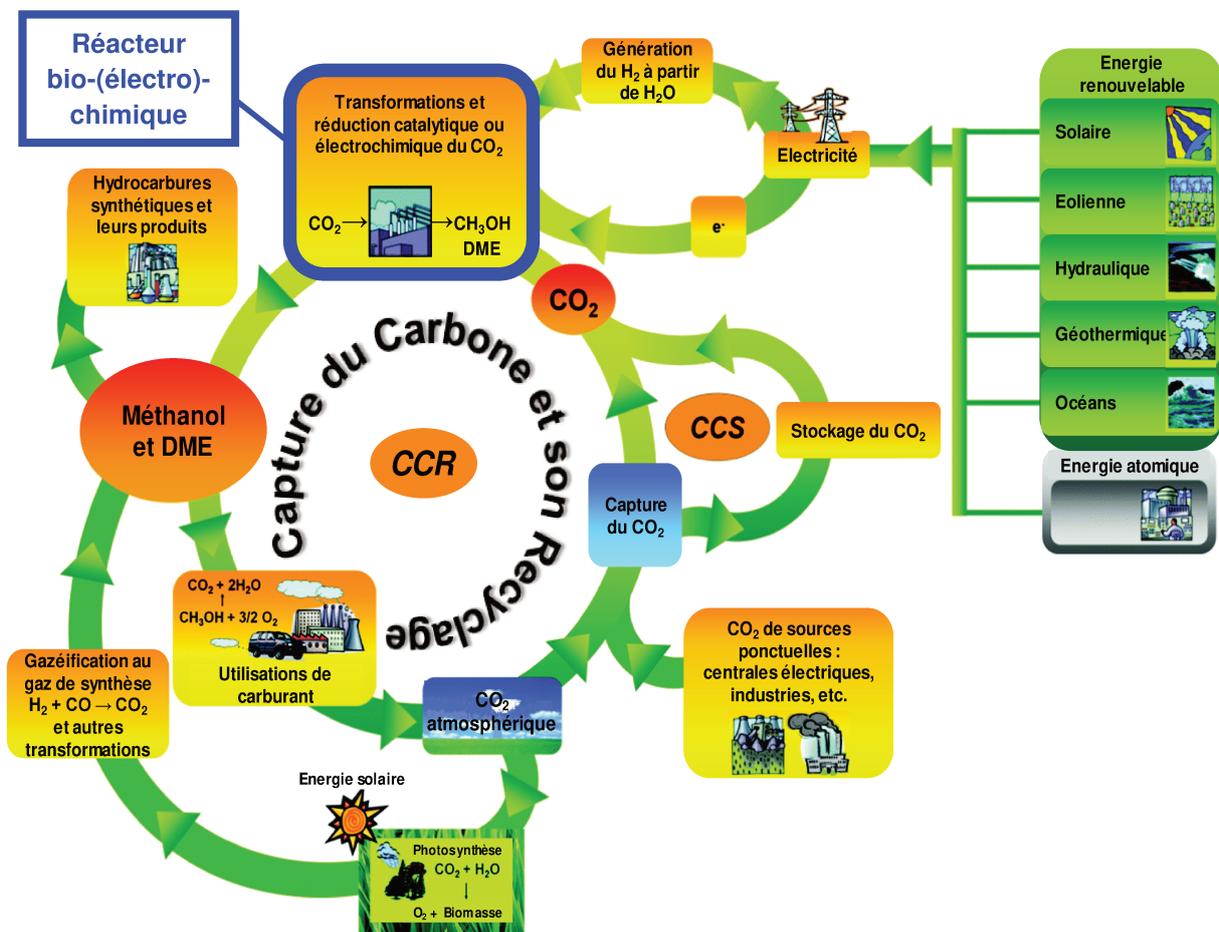
Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est un gaz à effet de serre qui résulte, en partie, des activités humaines. Les émissions du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère dépassent le stockage naturel (dans les océans et la biomasse) et engendre une perturbation de l'équilibre naturel du cycle du carbone. Ces concentrations accrues de gaz à effet de serre dans l'atmosphère renforcent l'effet de serre naturel et favorisent ainsi le changement climatique, l'acidification des océans et le réchauffement climatique du fait que l'atmosphère est un isolant thermique. On appelle cela l'effet de serre anthropique ou additionnel. D'après l'agence internationale de l'énergie (IEA) « *International Energy Agency* »,<sup>1, 2</sup> parmi les gaz à effets de serre anthropique, le CO<sub>2</sub> libéré du secteur énergie – *i.e.* résultant de l'oxydation du carbone – représente 70 % des émissions totales. En 2015, les combustibles fossiles – *i.e.* charbon, pétrole et gaz naturel - représentaient plus de 80 % de l'approvisionnement total en énergie primaire.<sup>2</sup> Actuellement, environ 22 millions de tonnes de charbon, 12 millions de tonnes de pétrole et 10 milliards de mètres cubes de gaz naturels sont consommés chaque jour au niveau mondial. Les émissions mondiales en CO<sub>2</sub> provenant de la combustion de combustibles fossiles ont atteint 32,3 gigatonnes en 2015, contre environ 15 Gt en 1971 (fig. 1).<sup>1, 2</sup> En brûlant des combustibles fossiles, le CO<sub>2</sub> est libéré dans l'atmosphère de manière très rapide de telle sorte que les processus naturels n'arrivent plus à le capter. Conséquence directe, la concentration atmosphérique de CO<sub>2</sub> augmente à un rythme accéléré et a atteint 410,79 ppm en juin 2018, contre 317,10 ppm en juin 1958 (selon l'Observatoire Mauna Loa à Hawaii).<sup>3</sup> L'épuisement prévu des réserves de combustibles fossiles, bien qu'inévitable, a été et pourrait continuer à être retardé par l'exploitation de ressources non conventionnelles telles que l'huile de schiste, le gaz de schiste, le gaz de réservoir compact et probablement les hydrates de méthane à l'avenir.<sup>4</sup> Les combustibles fossiles dominant l'approvisionnement total en énergie primaire et pourraient continuer à le faire dans un avenir prévisible. Selon l'IEA, l'accès continu aux combustibles fossiles est moins susceptible d'être limité par l'épuisement des ressources, mais davantage par la politique et les réglementations gouvernementales.<sup>4</sup>



**Figure 1.** Emissions mondiales en CO<sub>2</sub> issues de la combustion de combustibles fossiles depuis 1971 (Mégatonnes de CO<sub>2</sub>). \*La tourbe et le schiste bitumineux sont agrégés avec le charbon. \*\*Comprend les déchets industriels et les déchets municipaux non renouvelables. Source : IEA, *Key world energy statistics*, 2017.<sup>1</sup>

Pour relever le défi que représentent les émissions de gaz à effet de serre et le changement climatique, les efforts d'atténuation intergouvernementaux ont été combinés depuis 1992 dans le cadre de la Convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques (CCNUCC). La CCNUCC a reconnu "*que le changement du climat et de la planète et leurs effets néfastes sont un sujet de préoccupation pour l'humanité, [...] que l'activité humaine a augmenté sensiblement les concentrations de gaz à effet de serre dans l'atmosphère, [...] et qu'il en résultera en moyenne un réchauffement supplémentaire de la surface terrestre et de l'atmosphère, ce dont risquent de souffrir les écosystèmes naturels et l'humanité*".<sup>5</sup> Les premiers accords contraignants pour réduire les gaz à effet de serre ont été établis dans le cadre de la première période d'engagement du Protocole de Kyoto de 2008 à 2012 adoptés à la COP3 en 1997. Selon l'article 3.1,<sup>6</sup> les Parties visées à l'Annexe I - les pays qui se sont engagés à des objectifs de réduction des émissions - étaient tenus de "*réduire le total de leurs émissions de ces gaz d'au moins 5 % par rapport au niveau de 1990 au cours de la période d'engagement allant de 2008 à 2012*". Malgré leur participation étendue et l'accord pour une deuxième période d'engagement de 2013 à 2020, les objectifs du protocole représentent toujours moins du quart des émissions mondiales de CO<sub>2</sub>. Toutefois, comme l'indiquent les rapports de l'IEA, compte tenu de la longue durée de vie du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère, stabiliser les concentrations des gaz à effet de serre à tous les niveaux

nécessiterait d'importantes réductions des émissions mondiales de CO<sub>2</sub>.<sup>2</sup> Etant donné qu'il n'y aura probablement pas de réductions drastiques atteintes dans un avenir proche,<sup>7</sup> la solution la plus souvent proposée consiste à Capturer le Carbone et le Séquestrer (CCS, fig. 2). Le CO<sub>2</sub> émis par les centrales électriques à charbon – comme par exemple la centrale Petra Nova au Texas, USA<sup>8</sup> – serait capturé, concentré, pressurisé et puis injecté sous terre pour le stockage géologique. Cependant, la CCS fait face à l'opposition du grand public et la faisabilité technique et économique n'a pas encore été prouvée à grande échelle.<sup>9</sup> L'humanité est confrontée à une énigme du carbone nécessitant un changement de paradigme. Dans ce contexte, la Capture du Carbone et son Recyclage (CCR, fig. 2) apparaît comme un défi majeur.



**Figure 2.** Cycle du carbone anthropique à court terme dans l'économie du méthanol proposé par Olah, Prakash and Goepfert.<sup>10</sup>

L'économie du méthanol, préconisée par Prof. George A. Olah, prix Nobel de chimie en 1994, repose sur le recyclage chimique du CO<sub>2</sub> en méthanol et dérivés. Ce concept

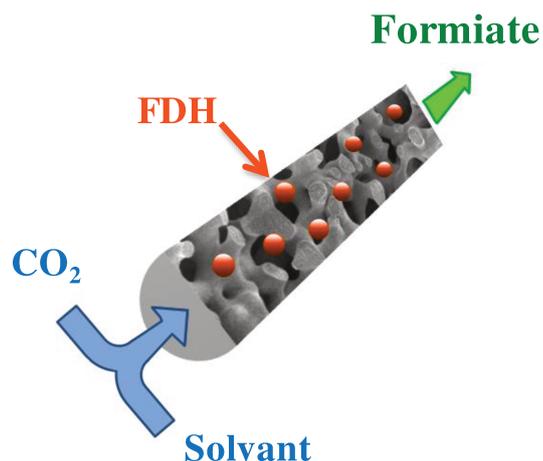
considère le méthanol comme un combustible de substitution et de produit de départ pour d'autres produits chimiques à haute valeur ajoutée.<sup>10, 11</sup> Le méthanol (MeOH) est un excellent carburant pour les moteurs à combustion interne pur ou mélangé à l'essence (en raison de son indice d'octane élevé ~ 100) et peut être utilisé sous forme de diméthyle éther, formé par la condensation de deux molécules de méthanol (DME) dans les moteurs diesel. Il peut également être utilisé dans des piles à combustible (*piles à combustible à méthanol direct*). On peut également transformer le méthanol en éthylène ou polypropylène, deux composés de base de l'industrie des matériaux aujourd'hui issus du pétrole, ou encore en diesel de synthèse extrêmement pur. De plus, le méthanol présente un avantage du fait qu'il est à l'état liquide dans les conditions ambiantes, ce qui permet un stockage et un transport plus facile. Par conséquent, l'économie du méthanol peut être considérée comme une alternative prometteuse plus écologique que les combustibles fossiles et une alternative plus sûre et plus pratique à l'économie de l'hydrogène proposé dans les années 1970. Comme préconisé par le professeur George A. Olah, parmi les voies possibles pour la synthèse du méthanol renouvelable, la conversion du CO<sub>2</sub> est une façon rationnelle pour développer un cycle anthropique à court terme du carbone (fig. 2).

La conversion du CO<sub>2</sub> en méthanol, ou autres molécules carbonées, présente quelques inconvénients.<sup>10-12</sup> L'activation chimique du CO<sub>2</sub> étant très difficile, ceci a incité la communauté scientifique à développer des stratégies de conceptions rationnelles pour de nouveaux catalyseurs hétérogènes.<sup>13-18</sup> D'une part, le processus d'hydrogénation, qui consiste à produire du MeOH à partir du CO<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub>, a été largement étudié et démontré à l'échelle pilote.<sup>10, 11</sup> Cependant, la conversion catalytique par hydrogénation se fait à des pressions et températures élevées (> 20 bar et 200 °C) et nécessite une compression/concentration du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. En ce qui concerne le stockage et la sécurité, l'utilisation de l'hydrogène gazeux à haute pression est un problème majeur. D'autre part, les voies de réduction électrochimiques sur des électrodes de métaux, typiquement en cuivre et ses alliages, pourraient permettre un stockage électrochimique de l'énergie en utilisant le courant électrique issu d'énergies renouvelables (par exemple, panneaux photovoltaïques, éolienne, *etc.*).<sup>15-18</sup> Les catalyseurs moléculaires, comme les porphyrines de fer, ont été aussi proposés par Costentin *et al.*<sup>17</sup> Cependant, de telles voies électrochimiques donnent généralement de faibles sélectivités et activités catalytiques,<sup>15</sup> et l'électroréduction du CO<sub>2</sub> est souvent limitée au monoxyde de carbone.<sup>16-18</sup> Une autre stratégie concerne les processus de réduction photovoltaïque mettant en jeu des semi-conducteurs comme le TiO<sub>2</sub>,<sup>19</sup> InTaO<sub>4</sub>,<sup>20</sup> GaP<sup>21</sup> ou C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> graphitique.<sup>22</sup> Bien que la

plupart des photocatalyseurs présentent une constante catalytique faible (*Turnover frequencies TOFs*), par exemple, inférieure à  $6 \mu\text{mol} [\text{MeOH}] \text{g}^{-1} [\text{catalyseur}] \text{h}^{-1}$ , et une faible sélectivité, des études ont reporté une constante catalytique compétitive de  $500 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  sur des matériaux à base de titane.<sup>23, 24</sup> Cependant, de tels systèmes sont limités à la composante ultra-violette du spectre solaire, représentant moins de 5 % de la radiation solaire terrestre en termes d'énergie. Il est intéressant de noter que quelques études récentes ont proposé une conversion photovoltaïque du  $\text{CO}_2$  en méthanol sous irradiation de lumière visible.<sup>25, 26</sup> Ainsi, Li *et al.*<sup>25</sup> ont atteint une constante catalytique élevée de  $38 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  en utilisant comme photocatalyseurs des nanoparticules de SiC modifiés par  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Plus récemment, MacFarlane *et al.*<sup>26</sup> ont proposé l'utilisation d'hétérostructures de nanocarbone/ $\text{Cu}_2\text{O}$ , qui atteignent, à notre connaissance, les plus hautes constantes catalytiques reportées sous irradiation de lumière solaire de  $56 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

Enfin, la conversion biocatalytique du  $\text{CO}_2$  est une approche prometteuse du fait qu'elle est très sélective et s'effectue dans des conditions douces.<sup>27-35</sup> Cette voie de conversion a été étudiée pendant plus de deux décennies<sup>27</sup> et a été récemment reprise par A. Galarneau *et al.* dans notre institut.<sup>33, 34</sup> En effet, cette conversion biocatalytique est une réaction enzymatique en cascade qui fait intervenir trois enzymes pouvant réduire le  $\text{CO}_2$  jusqu'au méthanol. Nous nous intéressons dans cette thèse à la première réaction enzymatique : la réduction du  $\text{CO}_2$  en formiate qui nécessite la présence d'une seule enzyme, la formiate déshydrogénase (FDH) et un cofacteur, le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) dans sa forme réduite active (1,4-NADH) vis-à-vis des déshydrogénases. La FDH réduit le  $\text{CO}_2$  en formiate et oxyde le 1,4-NADH en  $\text{NAD}^+$ . Le NAD est coûteux d'où l'intérêt de le régénérer *in situ*.

Notre étude se porte sur la bioréduction du  $\text{CO}_2$  en flux continu, où les enzymes sont supportées sur un matériau poreux, à travers lequel une solution aqueuse saturée en  $\text{CO}_2$  circule (fig. 3). Pour atteindre cet objectif, nous synthétisons différents matériaux monolithiques à porosité hiérarchique à base de silice et de carbone. Les matériaux les plus prometteurs sont sélectionnés et sont utilisés comme supports pour l'immobilisation des enzymes et ce afin d'arriver à la conversion du  $\text{CO}_2$  en flux continu par voie biocatalytique.



**Figure 3.** Schématisation du bioréacteur pour la conversion enzymatique en flux continu du  $\text{CO}_2$  en formiate à l'aide de la formiate déshydrogénase.

Nous commençons ce manuscrit par un chapitre bibliographique sur la synthèse de monolithes à porosité hiérarchique et leur utilisation en biocatalyse. Le deuxième chapitre présente les différents matériels et méthodes utilisés dans ce projet pour la synthèse des matériaux, la biocatalyse et la fonctionnalisation de ces matériaux. Le troisième chapitre s'intéresse à la synthèse de monolithes à porosité hiérarchique et leur caractérisation. Le quatrième chapitre présente l'étude de la réduction du  $\text{CO}_2$  en formiate par voie biocatalytique. Le cinquième et dernier chapitre est un chapitre prospectif qui présente différentes voies de fonctionnalisation des matériaux carbonés, la régénération électrochimique du cofacteur NAD ainsi que son immobilisation.

## **Chapitre 1 - Etat de l’art : Monolithes à porosité hiérarchique et biocatalyse supportée**

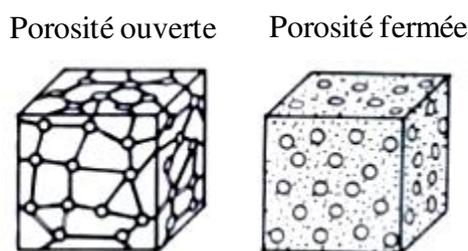
Nous nous intéressons dans ce premier chapitre à l’étude bibliographique des différents aspects fondamentaux permettant la compréhension et l’élaboration du dispositif visé dans ces travaux, *i.e.* l’élaboration d’un réacteur enzymatique en flux continu pour la réduction du dioxyde de carbone en formiate. Dans un premier temps, nous présentons un état de l’art non-exhaustif quant à l’élaboration, la caractérisation et les propriétés de matériaux monolithiques à porosité hiérarchique. Le contrôle et la hiérarchisation de la porosité représentent des challenges fondamentaux afin de moduler les propriétés de ces matériaux. Nous montrerons notamment dans ce chapitre l’intérêt de la macroporosité pour l’utilisation de monolithes dans des réacteurs en flux continu, notamment pour des applications en catalyse et biocatalyse. Dans un second temps, nous présentons les différentes stratégies d’immobilisation d’enzymes sur des supports poreux ainsi que l’influence du type de fonctionnalisation du support. Enfin, nous nous intéressons plus particulièrement au système biocatalytique étudié au cours de ces travaux, *i.e.* la réduction du CO<sub>2</sub> en formiate, avant de présenter brièvement le dispositif en flux continu visé.

1.1. Monolithe à porosité hiérarchique .....	9
1.1.1. Généralités sur les matériaux poreux.....	9
1.1.2. Cas de la silice : procédé sol-gel inorganique .....	11
1.1.3. Cas du carbone.....	13
1.1.4. Monolithes macroporeux à porosité hiérarchique .....	14
1.1.5. Caractérisations des matériaux poreux .....	16
1.1.5.1. Analyse d’adsorption désorption d’azote.....	17
1.1.5.2. Porosimétrie à Mercure.....	21
1.1.5.3. Microscopie électronique à balayage.....	22
1.1.5.4. Microscopie électronique à transmission.....	23
1.2. Monolithes à porosité hiérarchique en (bio)catalyse .....	24
1.2.1. Catalyse enzymatique : une rapide introduction.....	24
1.2.2. Catalyse enzymatique supportée .....	25
1.2.2.1. Intérêt de l’immobilisation sur un support poreux.....	26
1.2.2.2. Stratégies d’immobilisation .....	27
1.2.2.2.1. Par liaison au support.....	29
1.2.2.2.2. Agrégats d’enzymes .....	30
1.2.2.2.3. Encapsulation .....	31
1.2.2.2.4. Adsorption-réticulation .....	31
1.2.3. Monolithes à porosité hiérarchique en (bio)catalyse .....	32
1.2.3.1. Intérêt de la porosité hiérarchique: exemple de la catalyse en flux continu .....	32
1.2.3.2. Intérêt de la porosité hiérarchique en biocatalyse .....	33
1.3. Conversion enzymatique du CO <sub>2</sub> .....	34
1.3.1. Contexte et problématiques .....	34
1.3.2. Les formiates déshydrogénases (FDHs).....	38
1.4. Objectifs et dispositif visé .....	40

## 1.1. Monolithe à porosité hiérarchique

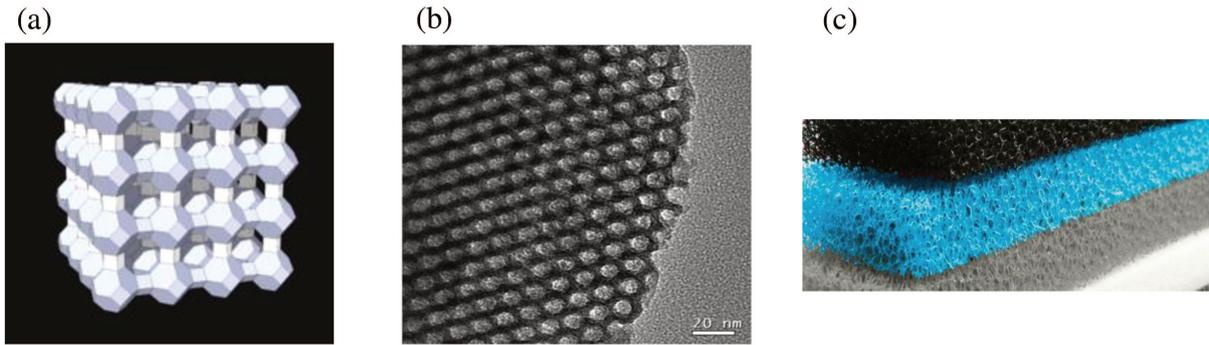
### 1.1.1. Généralités sur les matériaux poreux

Un matériau poreux est composé d’une phase solide continue et d’une phase gazeuse.<sup>36</sup> Cette dernière est contenue dans des cavités ou canaux appelés pores. Ce sont les parois des pores qui sont responsables de l’augmentation de la surface spécifique. Par définition, un pore est plus profond qu’il n’est large et leur ensemble forme ainsi le réseau poreux. Il existe deux types de porosité (fig. 4), la porosité ouverte, accessible par un fluide extérieur, et la porosité fermée. Cette dernière présente un intérêt pour des matériaux utilisés comme isolants thermiques, phoniques ou adsorbants de l’énergie mécanique par exemple. En revanche, dans le cas où l’application visée nécessite un échange de la matière comme par exemple la catalyse et/ou la séparation, des matériaux présentant une porosité ouverte seront plus adaptés. Seule la porosité ouverte sera ici prise en compte, compte tenu de l’application visée : le design d’un bioréacteur en flux continu pour la conversion du CO<sub>2</sub>.



**Figure 4.** Types de porosité.<sup>37</sup>

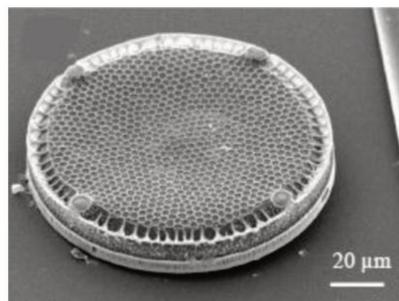
L’ensemble de la porosité d’un matériau forme le réseau poreux. Il est nécessaire de suivre les recommandations de *l’International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* et de distinguer les pores selon leur « diamètre » ( $\emptyset$ pore) : les micropores ( $\emptyset$ pore < 2 nm) par exemple les zéolithes (fig. 5 (a)) ; les mésopores (2 nm <  $\emptyset$ pore < 50 nm) par exemple les silices MCM41 et SBA15 (fig. 5 (b)), et les macropores ( $\emptyset$ pore > 50 nm) par exemple les mousses de polyuréthane (fig. 5 (c)).



**Figure 5.** (a) Schématisation d’une zéolithe ; (b) Cliché de microscopie électronique à transmission d’une silice mésoporeuse type SBA15 ; (c) Image d’une mousse de polyuréthane.

De nombreuses propriétés physiques dépendent de la structure poreuse d’un matériau, comme la densité, la conductivité thermique, la résistance mécanique ou encore la perméabilité. Les macropores fournissent une structure interconnectée améliorant la diffusion dans le réseau poreux et l’accessibilité aux sites actifs. De plus, les micro-mésopores permettent de générer une grande surface spécifique. La combinaison de ces avantages conduit à la synthèse de nouveaux matériaux à porosité multi-échelle et aux propriétés améliorées.

Dans la nature, de nombreux organismes vivants fabriquent des structures hiérarchisées, à base de silice, comme par exemple les diatomées, algues unicellulaires planctoniques qui possèdent un exosquelette en silice appelé frustule (fig. 6). Ces matériaux naturels se révèlent être une source d’inspiration pour la synthèse en laboratoire de matériaux poreux.



**Figure 6.** Frustule de diatomées

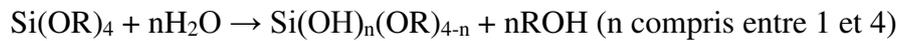
### 1.1.2. Cas de la silice : procédé sol-gel inorganique

De manière à obtenir des matériaux siliciques à porosité hiérarchique, différentes voies de synthèses, basées sur le procédé sol-gel, ont été proposées dans la littérature.<sup>38</sup> La synthèse de matériaux poreux par procédé sol-gel présente de nombreux avantages tels que des conditions réactionnelles douces (pression, température, solvant) et la possibilité de le combiner à différentes empreintes sacrificielles, *i.e.* micelles d’agents tensioactifs, émulsions, mousses, *etc.*

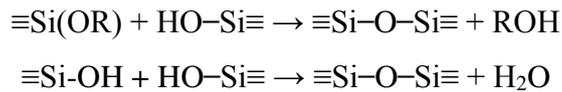
L’appellation sol-gel est une contraction des termes « solution-gélification ». Par définition, un « procédé » sol-gel ou une « voie » sol-gel est une réaction de polymérisation inorganique en solution permettant ainsi la production de matériaux éventuellement micro- à macroporeux.

Le procédé sol-gel se décompose en deux grandes étapes. La première étape est une hydrolyse d’alcoxysilane  $\text{Si(OR)}_n$  conduisant à la réalisation d’une dispersion stable de particules colloïdales, appelée sol de silice. Tandis que la deuxième consiste en une condensation et une polymérisation entraînant la formation de polysilanes.

Hydrolyse :

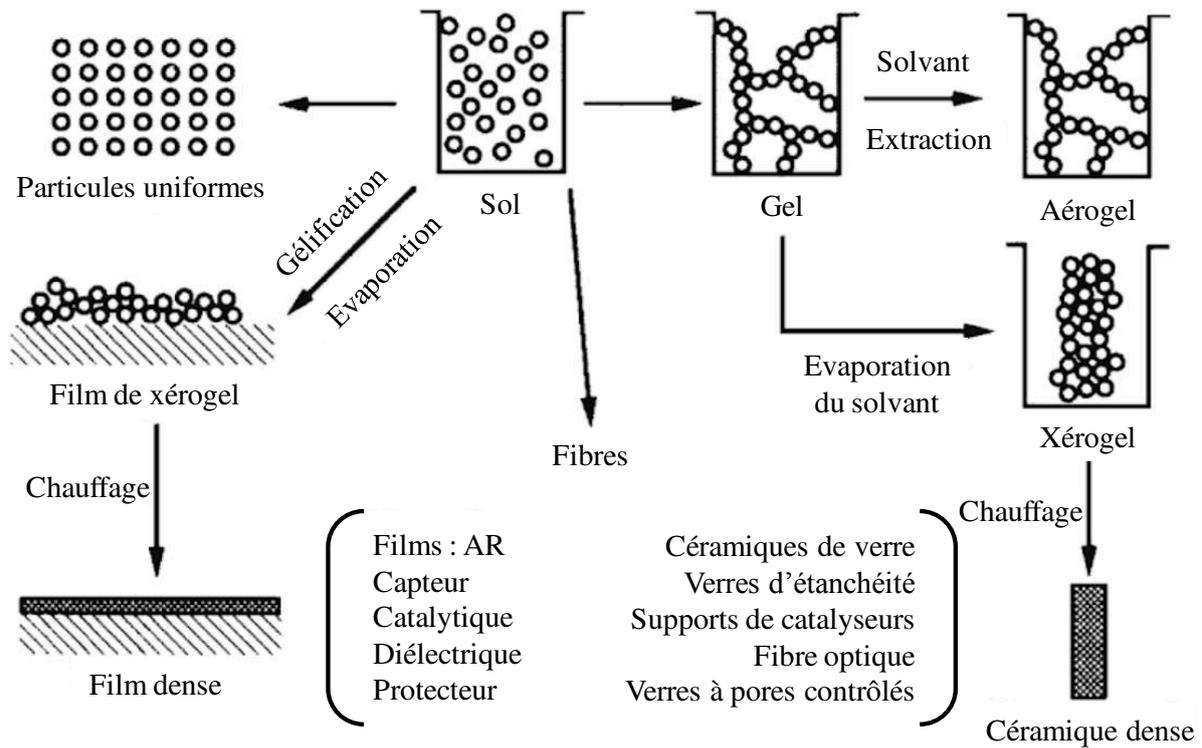


Polycondensation :



Les alcoxydes de silicium réagissent très lentement avec l’eau. C’est pourquoi, la synthèse de gels de silice requiert une étape d’hydrolyse. Les précurseurs commerciaux les plus répandus sont les tétraméthoxysilanes et tétraéthoxysilanes (en abrégé TMOS et TEOS respectivement). Comme les alcoxydes de silicium ne sont pas miscibles dans l’eau, on utilise un co-solvant (généralement un alcool) pour effectuer la réaction. L’étape d’hydrolyse étant très lente avec l’eau pure, on ajoute toujours un catalyseur, qui peut être un acide ou une base.

Selon la cinétique de la réaction et le procédé de mise en forme/séchage utilisé, différentes structures siliciques peuvent être obtenues (particules, fibres, films, ou bien comme nous le souhaitons, des monolithes). (Fig. 7)



**Figure 7.** Les différentes structures obtenues par voies sol-gel.<sup>39</sup>

Lors d’une réaction sol-gel, plusieurs paramètres doivent être maîtrisés afin d’avoir un contrôle sur le gel et le matériau final. Les données essentielles sont la concentration en eau, et le pH du milieu réactionnel. En effet, les propriétés du gel changent avec la concentration en eau, en particulier dans la région où le rapport eau/alcoxyde est entre 2 et 4. Pour un rapport égal ou inférieur à 2, un gel avec moins de liaisons est formé. Si le rapport eau/alcoxyde est égal ou supérieur à 4 des gels avec beaucoup de liaisons sont formés et sont donc plus denses.

Le pH a également une influence sur la réaction. Une catalyse acide favorise l’hydrolyse et conduit à la formation de fibres longitudinales. A l’inverse une catalyse basique va augmenter la vitesse de condensation et mènera alors à des agrégats de particules de silice, de forme sphérique.

En milieu acide, le temps de formation du gel est aussi fonction du pH. Le temps de gélification est long pour des pH entre 2 et 3, ce qui correspond au point isoélectrique (point correspondant au pH auquel la charge globale du matériau est nulle) de la silice et augmente pour des pH > 3 et pH < 1.

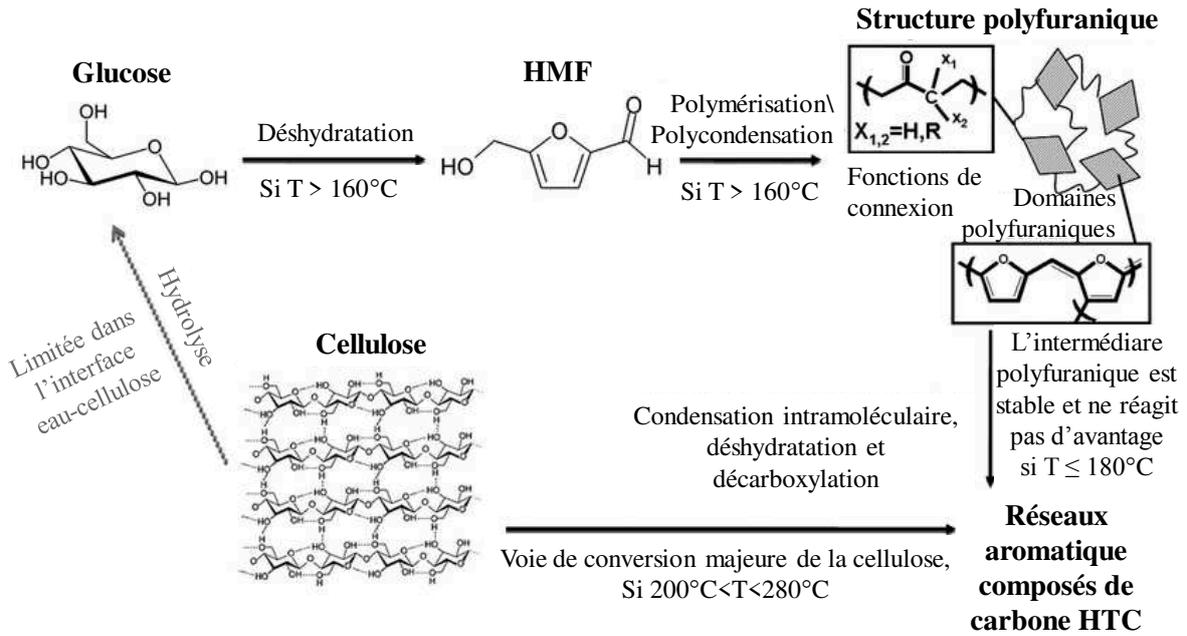
### 1.1.3. Cas du carbone

Au-delà de la silice, un engouement croissant s’est récemment renforcé pour la synthèse de matériaux poreux conducteurs, notamment à base de carbone partiellement graphitisé. Ces matériaux carbonés sont de très bons candidats pour diverses applications grâce à une surface spécifique souvent très développée, une stabilité chimique et thermique élevée et une conductivité électrique satisfaisante pour un grand nombre d’applications. Ces avantages les rendent séduisants comme supports catalytiques, adsorbants et matériaux d’électrode.

Différentes voies de synthèses ont été développées pour l’élaboration de tels matériaux carbonés poreux. Nous citons parmi ces voies : l’activation catalytique en ayant recours à des composés organométalliques,<sup>40</sup> l’activation physique ou chimique d’agro-déchets et autres dérivés lignocellulosiques<sup>41</sup> ou encore la carbonisation d’aérogel.<sup>42</sup> En particulier, la préparation d’aérogels carbonés *via* la voie phénol-formaldéhyde (ou résorcinol-formaldéhyde) développée par R. Pekala *et al.*<sup>42</sup> dans les années 90s présente des similitudes avec le procédé sol-gel inorganique classique. On parle alors de sol-gel organique. Récemment ce procédé sol-gel organique a été étendu à des précurseurs biosourcés, tels que des saccharides,<sup>43</sup> de la lignine ou encore des tannins.<sup>44-46</sup>

En particulier, le traitement hydrothermal de la biomasse dans l’eau, dans des conditions relativement douces, permet d’obtenir des matériaux carbonés poreux, ou structurés à l’échelle nanométrique.<sup>47, 48</sup> Cette technique est connue depuis de nombreuses années.<sup>49</sup> Cependant, la nécessité d’explorer de nouvelles voies, plus économiques et durables, pour obtenir des matériaux carbonés à partir de matières premières autres que le pétrole ou le gaz naturel, a conduit à ré-explorer cette technique au début des années 2000.<sup>50, 51</sup>

Dans des conditions hydrothermales ( $T > 160$  °C,  $P < 10$  bar), un saccharide (par exemple le glucose) se déshydrate pour donner un composé furanique (par exemple l’hydroxymethylfurfural (HMF)), suivi par une polymérisation pour produire des matériaux carbonés hydrophiles. La carbonisation hydrothermale de saccharides a notamment permis la préparation d’hydrogels et aérogels carbonés<sup>43</sup> ou encore de matériaux carbonés mésostructurés.<sup>52</sup>



**Figure 8.** Mécanisme de la carbonisation hydrothermale dans des conditions douces ( $180^{\circ}\text{C} < T < 280^{\circ}\text{C}$ ).<sup>53</sup>

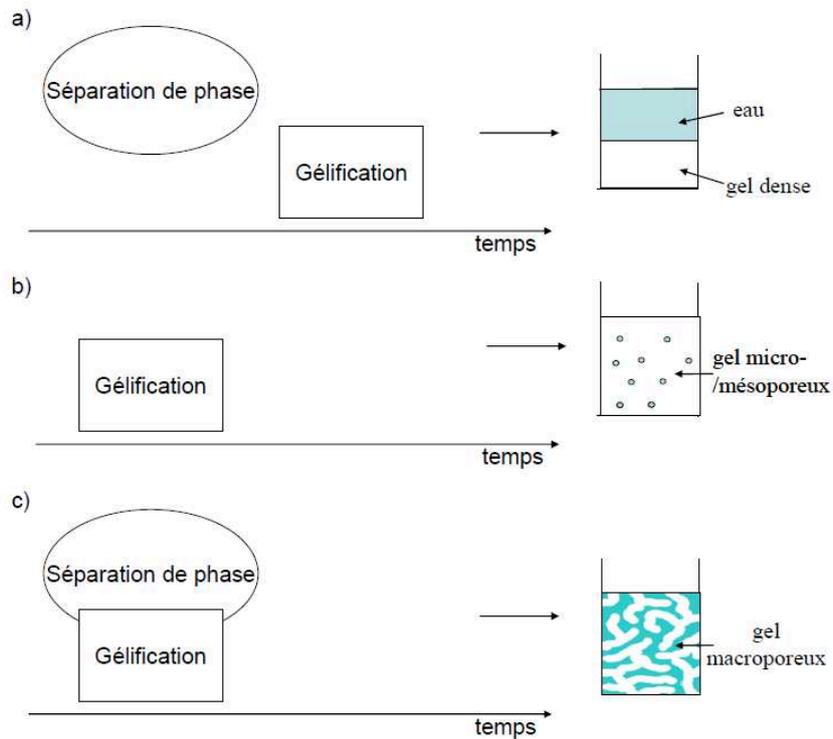
### 1.1.4. Monolithes macroporeux à porosité hiérarchique

De manière à obtenir des monolithes macroporeux à porosité hiérarchique, différentes voies de synthèses ont été proposées dans la littérature.<sup>38</sup> On cite notamment l'utilisation d'empreintes dites sacrificielles telles que :

- des bulles de gaz *via* la préparation de mousses air-liquide et la polycondensation de la phase liquide continue ;
- des gouttes de liquide dispersées (souvent une phase huile) dans un autre liquide (souvent une phase aqueuse) *via* la formulation d'émulsions concentrées pour l'obtention de *HIFE* (pour l'anglicisme *high internal phase emulsion*<sup>54</sup> ou émulsion à phase interne hautement concentrée) ;
- des microparticules (polymère organique, silice, *etc.*) ou encore des monolithes poreux préalablement synthétisés. L'utilisation de matrices siliciques poreuses synthétisées par voie « sol-gel » comme empreinte « dure »<sup>55</sup> pour l'élaboration de matériaux carbonés poreux a été largement rapportée dans la littérature<sup>56</sup>. Cette voie de synthèse, également appelée *nanocasting*, permet une calibration et un contrôle fin de la porosité.

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la décomposition spinodale, procédé développé par l’équipe de Kazuki Nakanishi dans les années 1990.<sup>57</sup> La décomposition spinodale est un processus par lequel un mélange de deux constituants ou plus peut se séparer en régions distinctes.<sup>58</sup> Cette séparation de phase est induite par des agents structurants. Dans notre cas, un polymère, le polyéthylène glycol (PEG), est utilisé. En début de réaction, nous avons un mélange homogène entre le polymère et l’alcoxyde de silicium. Le PEG entoure les particules de silice qui deviennent très hydrophobes, et se séparent alors du mélange eau/polymère, c’est la décomposition spinodale. Pour réaliser la synthèse de monolithes de silice à porosité hiérarchique, il faut que la transition sol-gel et la décomposition spinodale aient lieu simultanément. C’est pour cela, qu’un contrôle cinétique de la réaction est nécessaire.

Si la transition sol-gel a lieu après la décomposition spinodale, le phénomène qui apparaît est la nucléation de particules et la séparation en deux phases (fig. 9 (a)). Au contraire, si la gélification est trop rapide, la décomposition spinodale ne peut pas avoir lieu. Le résultat obtenu est un gel micro et mésoporeux. (Fig. 9 (b))



**Figure 9.** Cinétique de la séparation de phases lors de la synthèse des monolithes.

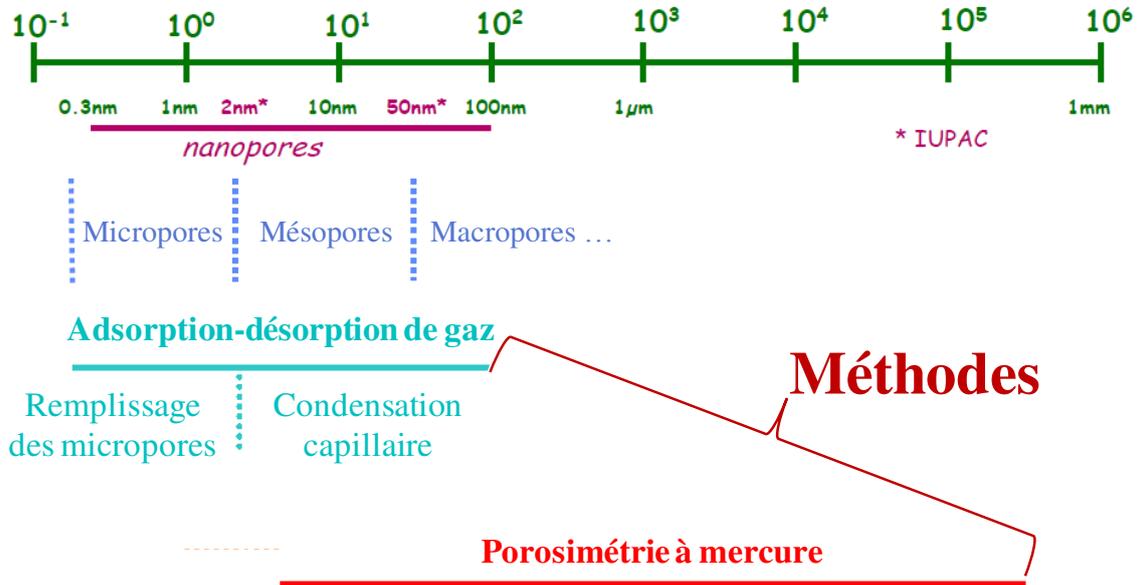
Au-delà de la silice, la décomposition spinodale a été utilisée pour la synthèse d’un grand nombre de monolithes macroporeux incluant des oxydes<sup>59</sup> et sous-oxydes de titane,<sup>60</sup> des hydroxydes de cuivre,<sup>61</sup> des phosphates de zirconium,<sup>62</sup> mais également des carbones.<sup>63, 64</sup>

Nous nous intéressons dans cette thèse à deux voies de synthèses de carbones monolithique à porosité multi-échelle : (i) une méthode de *nanocasting* inspirée de N. Brun *et al.*<sup>65</sup> en utilisant une empreinte « dure » silicique (monolithe de silice macroporeux) et le dépôt de précurseurs carbonés par carbonisation hydrothermale de saccharose. Cette méthode multi-étape permet un contrôle fin et multi-échelle de la porosité, mais nécessite une élimination de l’empreinte silicique après pyrolyse sous atmosphère inerte ; (ii) une méthode plus directe inspirée de G. Hasegawa *et al.*<sup>63</sup> au cours de laquelle un xérogel est synthétisé par la voie résorcinol-formaldéhyde combinée à une décomposition spinodale.

### **1.1.5. Caractérisations des matériaux poreux**

Afin de caractériser les matériaux poreux, différentes techniques peuvent être utilisées en fonction de l’échelle de porosité. Comme le montre la figure 10, la caractérisation des micro-mésopores se fait par adsorption-désorption d’azote à 77 K, où il y aura un remplissage des micropores et une condensation capillaire dans les mésopores. La caractérisation des pores dont la taille est plus grande, notamment les macropores, se fait par intrusion-extrusion de mercure. Cette deuxième méthode concerne aussi bien les macropores ainsi que les mésopores.

## Echelle de taille des pores



**Figure 10.** Méthodes de caractérisation en fonction de l'échelle de taille de pores.

En plus de l'adsorption-désorption d'azote à 77 K et de la porosimétrie à mercure, nous avons fait recours à la microscopie électronique à balayage (MEB) qui permet de visualiser la forme et la surface d'un échantillon et la microscopie électronique à transmission (MET) qui permet l'observation de l'organisation et de la structure interne de l'échantillon.

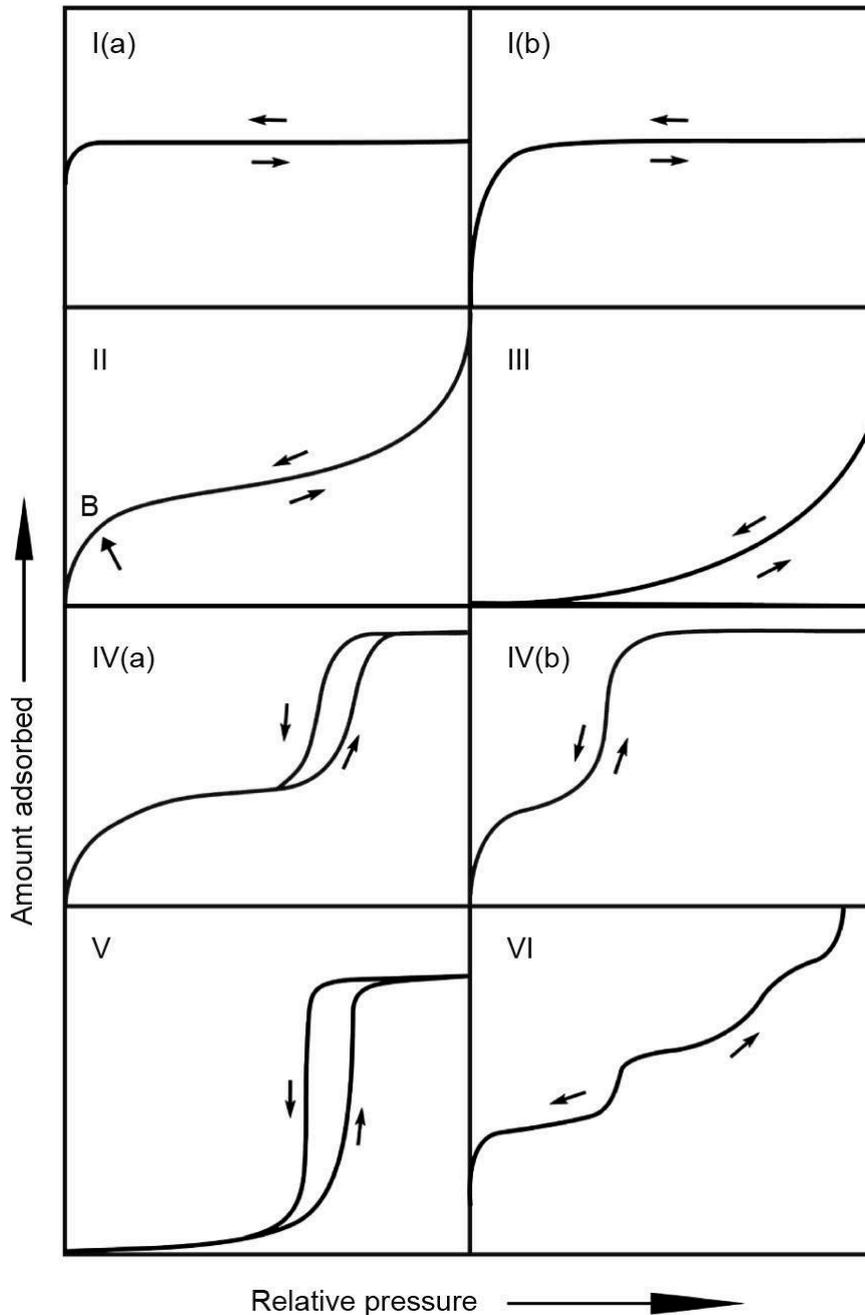
### 1.1.5.1. Analyse d'adsorption désorption d'azote

La volumétrie d'adsorption-désorption d'azote est une technique permettant de déterminer plusieurs caractéristiques propres à la structure d'un matériau poreux telles que la surface spécifique, la taille des pores, la distribution de taille de pores et le volume poreux. Le principe de cette technique est basé sur la physisorption d'un gaz tel que l'azote par un solide adsorbant. L'expérience consiste à mesurer pour plusieurs pressions partielles en gaz, la quantité adsorbée et désorbée par le solide poreux. Ces mesures sont faites dans des conditions isothermes, à 77 K, température de l'azote liquide.

Le résultat final se présente sous la forme d'une isotherme présentant en fonction de la pression partielle en gaz, la quantité adsorbée et désorbée par le solide. Selon le type de

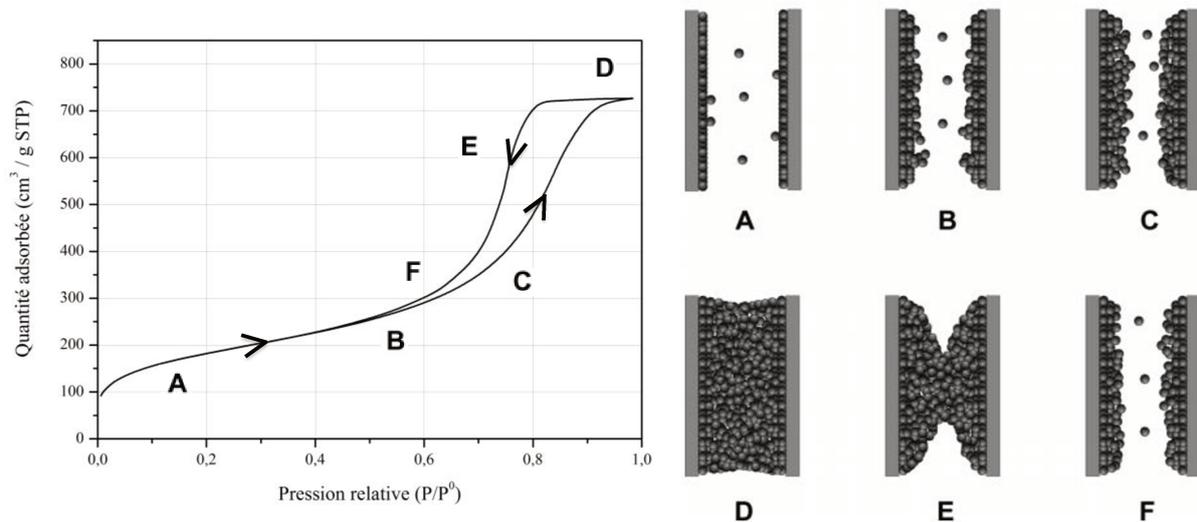
matériau, on obtient des isothermes différentes classées selon six types (fig. 11) d’après l’IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Le type I caractéristique des matériaux microporeux, le type II représente les matériaux macroporeux présentant des énergies d’adsorption élevées, le type III est caractéristique des matériaux non-poreux ou macroporeux avec une faible affinité pour l’adsorbat utilisé, le type IV pour les matériaux mésoporeux avec des énergies d’adsorption élevées, le type V désigne lui les matériaux mésoporeux avec des énergies d’adsorption faibles, et enfin le type VI est caractéristique d’une structure en feuillets.



**Figure 11.** Classification des isothermes d’adsorption physiques donnée par l’IUPAC<sup>66</sup>

Nous nous intéressons au type IV matériaux mésoporeux avec des énergies d’adsorption élevées qui correspond parfaitement à nos monolithes de silice. L’isotherme d’adsorption désorption d’azote obtenue peut être interprétée en le décomposant en différentes zones (fig. 12). La zone A correspond à l’adsorption d’une monocouche d’azote dans les mésopores ainsi que le remplissage des micropores le cas échéant. La zone B correspond à une condensation capillaire d’une multicouche d’azote. La zone C correspond à la condensation capillaire de l’azote dans les mésopores jusqu’à atteindre la zone D où il y a remplissage total de la mésoporosité et apparition de l’hystérèse à une pression partielle  $P/P^0 = 1$ . Par la suite, la zone E correspond à la diminution de la pression partielle où la désorption d’azote a lieu. Cette désorption est expliquée par une dépression capillaire dans les pores qui induit une vidange des pores jusqu’à attendre la zone F où il y a boucle de l’hystérèse.



**Figure 12.** Adsorption - désorption d'azote

La surface spécifique d’un matériau poreux peut être déterminée à partir de l’isotherme d’adsorption-désorption d’azote à 77 K en appliquant la théorie de Brunauer-Emmett-Teller (BET). L’équation BET peut être exprimée, pour des pressions partielles faibles ( $0,05 < P/P_0 < 0,35$ ), sous une forme linéaire :<sup>67</sup>

$$\frac{p/p_0}{V_a (1 - \frac{p}{p_0})} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C - 1}{V_m C} \left(\frac{p}{p_0}\right)$$

Avec :

- $P/P_0$  : pression relative ;  $P_0$  est la pression de saturation de l’adsorbat
- $V_a$  : Volume adsorbé
- $V_m$  : Volume monocouche
- $C$  : constante BET relative à l’énergie d’adsorption de l’adsorbat sur l’adsorbant

A partir de cette équation, il est possible de tracer la courbe BET :  $(P/P_0)/(V_a(1-P/P_0))$  en fonction de  $P/P_0$ , une droite est obtenue dans certain domaine de pression où la pente est égale à  $(C-1)/V_m C$  et l’ordonnée à l’origine est égale à  $1/V_m C$ . La courbe BET est, en général, linéaire pour des valeurs de  $P/P_0$  entre 0,10 et 0,25 pour les matériaux mésoporeux.<sup>67</sup> Connaissant l’aire de la section transversale d’une molécule d’adsorbat (pour l’azote à 77 K :  $a_m = 16,2 \text{ \AA}^2$ ) permet de calculer la surface spécifique du matériau.

La surface spécifique  $S = a_m \times N$ . Avec  $a_m$  : la superficie occupée par une molécule adsorbée et  $N$  : le nombre de molécules adsorbées contenues dans le volume  $V_m$ .

→  $S = a_m \times N_a \times n$ . Avec  $N_a$  est le nombre d’Avogadro et  $n$  le nombre de mole d’adsorbat.

En appliquant l’équation des gaz parfaits :

$$\rightarrow S = a_m N_a (PV_m/RT)$$

Avec :

$P$  : la pression exprimée en Pa ;

$T$  : la température en Kelvin ;

$R$  : la constante des gaz parfaits dans les unités du système international ;

$V_m$  : le volume de gaz de la monocouche (mL/g)

Ainsi, dans les conditions de pression et de température standard (conditions STP), la surface spécifique d’un solide (exprimée en  $\text{m}^2/\text{g}$ ) est :

<b><math>S_{\text{BET}} = 4,35 \times V_m</math></b>
--

Il existe différentes méthodes de détermination de la distribution de tailles des mésopores proposées sur les appareils d’adsorption-désorption d’azote. Dans cette thèse, la détermination de la distribution des tailles des mésopores est effectuée soit par la méthode de Barrett, Joyner et Halenda « BJH »<sup>68</sup> soit par la méthode Broekhoff et de Boer (BdB).<sup>69</sup>

### 1.1.5.2. Porosimétrie à Mercure

La porosimétrie à mercure nous donne une idée sur la taille de grands mésopores (> 3,6 nm) et des macropores (< 400 μm) contenus dans un solide ainsi que leur volume respectif.

Pour réaliser une analyse d’intrusion de mercure, l’échantillon est dégazé à température ambiante et placé dans un pénétromètre où il sera mis en contact avec le mercure. Le mercure est un liquide non mouillant pour presque tous les solides et doit être forcé à rentrer à l’intérieur des pores par application d’une pression. La pression à laquelle ce dernier entre dans les pores est inversement proportionnelle à la taille d’ouverture des pores. Plus la pression appliquée est élevée, plus le mercure est forcé à entrer dans les pores ayant un diamètre de pores plus faible. L’augmentation du volume de mercure dans les pores est suivie en fonction de l’augmentation de la pression d’intrusion.

Le volume d’intrusion est mesuré en fonction de la pression. Les volumes enregistrés sont transformés en diamètres de pores par application de l’équation de Washburn-Laplace. La détermination de la taille des pores se base sur le comportement d’un liquide non mouillant dans un capillaire. Un liquide ne peut pas entrer dans un pore ayant un diamètre très petit avec un angle de mouillage supérieur à 90 °C, dû à la tension de surface (dépression capillaire) qui peut être surmontée en exerçant une pression externe.

Equation de Washburn-Laplace

$$r_{int} = \frac{2 \gamma \cos(\phi_{int})}{P_{int}}$$

Le résultat obtenu par porosimétrie à mercure nous permet de tracer le volume de mercure lors de l’intrusion et de l’extrusion en fonction de la pression appliquée.

L’isotherme obtenue des deux cycles d’intrusion et d’extrusion peut être décomposée en différentes régions (fig. 13). Dans le cas des monolithes la région (a) correspond au remplissage des grands pores ( $> 400 \mu\text{m}$ ), suivie par une intrusion dans les macropores dont le diamètre est inférieur à  $400 \mu\text{m}$  (b). Le remplissage total de ces macropores est atteint au palier entre les deux régions (b et c). La région (c) correspond au remplissage des mésopores jusqu’à atteindre la région (d) où quelques matériaux (réversible) peuvent se compresser sous très hautes pressions. Par la suite, la pression appliquée est diminuée et nous obtenons alors notre hystérèse. L’extrusion (e) se fait à des valeurs de pression différentes de celle appliquées lors de l’intrusion. À l’issue du premier cycle d’intrusion-extrusion, du mercure reste parfois retenu par l’échantillon (dans le cas où il y a des pores bloquants), ce qui empêche l’isotherme de se boucler (f). Les cycles d’intrusion-extrusion réalisés après le premier cycle nous montrent une hystérèse (g), cependant, avec une boucle fermée confirmant qu’il n’y a pas de piégeage du mercure. L’intérêt de faire plusieurs cycles nous donne une idée sur les performances mécaniques du matériau analysé.

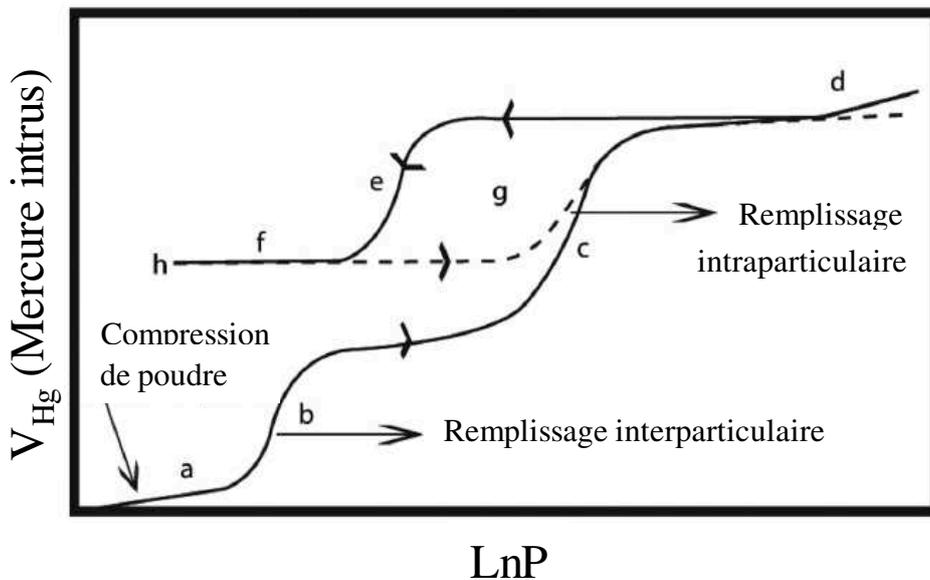


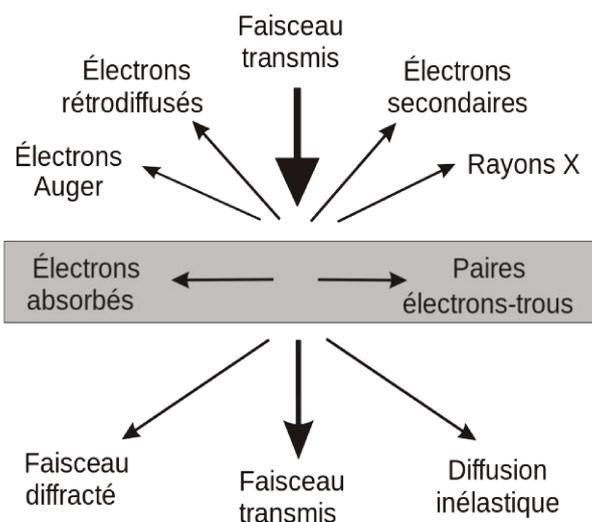
Figure 13. Deux cycles d’intrusion et d’extrusion de mercure.<sup>70</sup>

### 1.1.5.3. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage MEB ou « *Scanning Electron Microscopy SEM* » est une technique puissante permettant l’observation de la topographie des surfaces. Cette technique détecte des électrons secondaires qui émergent de la surface sous l’impact d’un très fin pinceau d’électrons primaire balayant la surface observée à l’aide de bobines

électromagnétiques et permettant ainsi d’avoir des images avec un pouvoir séparateur inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ.

Il existe d’autres interactions entre les électrons primaires et l’échantillon qui complètent l’observation de la topographie et/ou la composition de la surface. Ces interactions peuvent être l’émergence des électrons rétrodiffusés, l’adsorption des électrons primaires, l’émission des photons X et quelquefois celles des photons proches du visible.



**Figure 14.** Les interactions possibles entre le faisceau d’électrons et l’échantillon.

#### 1.1.5.4. Microscopie électronique à transmission

Le microscope électronique à transmission, aussi appelé MET ou TEM en anglais, utilise un faisceau d’électrons qui traverse l’échantillon. Ce faisceau sera impacté par la composition et la conformation de l’échantillon qui le traverse, et sera réceptionné par un système de lentilles magnétiques. Enfin le signal peut être détecté par fluorescence afin de fournir une image.

Le faisceau électronique interagit avec l’échantillon suivant l’épaisseur, la densité ou la nature chimique de celui-ci, ce qui conduit à la formation d’une image contrastée.

## **1.2. Monolithes à porosité hiérarchique en (bio)catalyse**

### **1.2.1. Catalyse enzymatique : une rapide introduction**

La biocatalyse est le fait de déclencher et accélérer une réaction chimique en présence de biocatalyseurs qui peuvent être des enzymes, des bactéries ou des micro-organismes. Le rôle principal est d’abaisser la barrière énergétique qui sépare le produit de départ du produit final.

La biocatalyse a émergé, dans les dernières décennies, comme une nouvelle technologie importante reliant la chimie verte et durable. C’est une technique que les industriels ne peuvent ignorer. Elle est prête à bouleverser les procédés et à répondre à la demande des grandes industries dont l’industrie pharmaceutique, où la vitamine C par exemple sera le premier produit grand public synthétisé par le groupe chimique Eastman grâce à ce bioprocédé.<sup>71</sup>

Les innombrables réactions chimiques qui se produisent au sein des organismes vivants sont pour la plupart dépendantes de biocatalyseurs incroyables : les enzymes.<sup>72</sup> Les vitesses de réactions catalysées par les enzymes sont multipliées par des facteurs compris entre 10<sup>6</sup> et 10<sup>12</sup> par rapport aux réactions chimiques classiques. Ces biocatalyseurs, fonctionnent dans des conditions douces de température et de pression : température inférieure à 100 °C, pression atmosphérique et un pH souvent proche de la neutralité. De plus, elles présentent une plus grande spécificité vis-à-vis de leur substrat et ne donnent ainsi quasiment pas de produits secondaires.<sup>73</sup>

Auparavant, les chimistes utilisaient habituellement des catalyseurs chimiques : des organométalliques. Avec la biocatalyse, c’est les ressources du vivant qui y contribuent. Les mécanismes mis en jeu pour les catalyseurs chimiques conventionnels et les enzymes sont presque identiques. Néanmoins, la spécificité de ces enzymes est la liaison spécifique au substrat. L’enjeu est grand, et la tendance est d’adapter des enzymes spécifiques pour un bioprocédé tout en augmentant leur stabilité en les immobilisant sur des supports adéquats et arriver à la biocatalyse supportée.<sup>71</sup> Et grâce aux avancées en biotechnologie et en ingénierie des protéines, il est possible de produire des enzymes spécifiques pour une catalyse donnée à des prix abordables avec les propriétés voulues de point de vue spécificité, activité, stabilité et pH optimum. Ces enzymes sont des catalyseurs du vivant ; elles sont biocompatibles, biodégradables et sont issues de sources renouvelables. Le processus enzymatique ou

bioprocédé est réalisé sous des conditions opératoires douces de température et de pression avec un grand taux de sélectivité et d'activité catalytique. Les bioprocédés sont respectueux de l'environnement, économiques et durables.<sup>71</sup>

Malgré tous ces avantages, les applications industrielles de la biocatalyse en solution sont freinées par les grandes opérations de stabilité, et la difficulté de réutilisation des enzymes. Ces inconvénients peuvent généralement être surmontés par leur immobilisation sur des supports adaptés. Ce qui facilite la séparation du produit final en aval et évite la contamination de ce dernier par le catalyseur ce qui conduit à un gain énergétique et économique. Ne reste par la suite qu'à trouver le support adéquat combiné au meilleur type d'immobilisation spécifique aux enzymes étudiées pour une meilleure productivité.

Les supports quant à eux peuvent avoir plusieurs aspects et différentes formes. Les matériaux poreux ont suscité le plus grand intérêt pour la biocatalyse supportée vu qu'ils se rapprochent le plus des supports naturels des enzymes. Ces matériaux peuvent être des zéolithes<sup>74</sup>, des polymères<sup>75</sup>, des nanoparticules<sup>33</sup>, *etc.*. Dans ce contexte, les industriels sont à la recherche du meilleur support pour l'amélioration du transfert de matière et réduire le coût énergétique en augmentant la stabilité du catalyseur.

Cette optimisation est réalisée sur ces matériaux poreux, par la création d'une porosité hiérarchique, ayant des micro-mésopores et des macropores. Ces matériaux peuvent être utilisés sous forme monolithique, où ils seront intégrés dans un processus en flux continu. Les micro-mésopores ainsi, augmentent la surface spécifique et permettent l'immobilisation des enzymes et les macropores garantissent un meilleur transport de matières dans le réacteur en flux continu.

Dans ce contexte, Nous nous intéressons à étudier la mise en forme du matériau qui servira de bioréacteur enzymatique, ainsi que l'optimisation des paramètres influençant la biocatalyse au sein des monolithes.

### **1.2.2. Catalyse enzymatique supportée**

Les processus enzymatiques sont effectués dans des conditions douces proches de la température ambiante, à pression atmosphérique et à pH physiologique. Ces processus sont très sélectifs. L'utilisation des enzymes évite généralement la nécessité d'un groupe de

protection et/ou d'activation fonctionnelle, offrant des voies de synthèse plus économiques, qui génèrent moins de déchets et qui sont plus éco énergétiques que les synthèses organiques classiques. Dans les deux dernières décennies la biocatalyse a émergé comme une technologie importante pour satisfaire la demande croissante pour les produits chimiques verts et durables,<sup>76, 77</sup> en particulier dans la synthèse de produits pharmaceutiques, les parfums, les vitamines et autres produits chimiques fins.<sup>78, 79</sup>

### **1.2.2.1. Intérêt de l’immobilisation sur un support poreux**

Les enzymes sont des catalyseurs biocompatibles, biodégradables et sont issus de ressources renouvelables. Les catalyseurs, par définition, augmentent la vitesse d'approche vers l'équilibre d'une réaction sans être consommé pendant la réaction. De ce fait, un catalyseur doit être recyclable. Dans ce contexte, l’immobilisation d'un catalyseur est une approche permettant son recyclage. Les enzymes sont une classe polyvalente de catalyseurs, ce sont des biocatalyseurs très efficaces et précis qui effectuent et régulent les processus dans la matière vivante.

Malgré tous ces avantages, l’application industrielle des enzymes est souvent entravée par un manque de stabilité opérationnelle à long terme et une difficulté de récupération et de réutilisation. Ces inconvénients peuvent être surmontés en ayant recours à l'immobilisation. Cela permet une manipulation plus pratique de l’enzyme (immobilisée sur un support solide au lieu d’une formulation liquide) et une séparation plus facile du produit.

Les enzymes immobilisées sont souvent stabilisées, et donc moins sensibles à l’égard de leur environnement. Même les procédés utilisant des enzymes en suspension insolubles dans des milieux organiques hydrophobes nécessitent une immobilisation pour optimiser leur dispersion afin d’éviter l'agrégation des particules protéiques hydrophiles et devenir plus accessible. En outre, l'immobilisation assure le recyclage de ces biocatalyseurs donc facilite également la récupération et la réutilisation efficace de l'enzyme, ce qui permet son utilisation rentable dans, par exemple, un fonctionnement en continu, en lit fixe.<sup>80</sup>

L'immobilisation d'une enzyme implique certaines interactions entre deux éléments, l'enzyme et le support.<sup>81-84</sup> Les propriétés de surface des deux sont très importantes. Pour les enzymes, les groupes polaires amine dans lysine ou acide dans glutamine changent en fonction du pH de la solution où elles baignent. Une immobilisation efficace doit prendre en

compte les facteurs pris dans le tableau suivant, où, le meilleur compromis entre stabilité, activité, facilité de manipulation et coût est atteint.

**Tableau 1.** Paramètres pris en compte pour l’immobilisation d’un catalyseur et son support.<sup>80</sup>

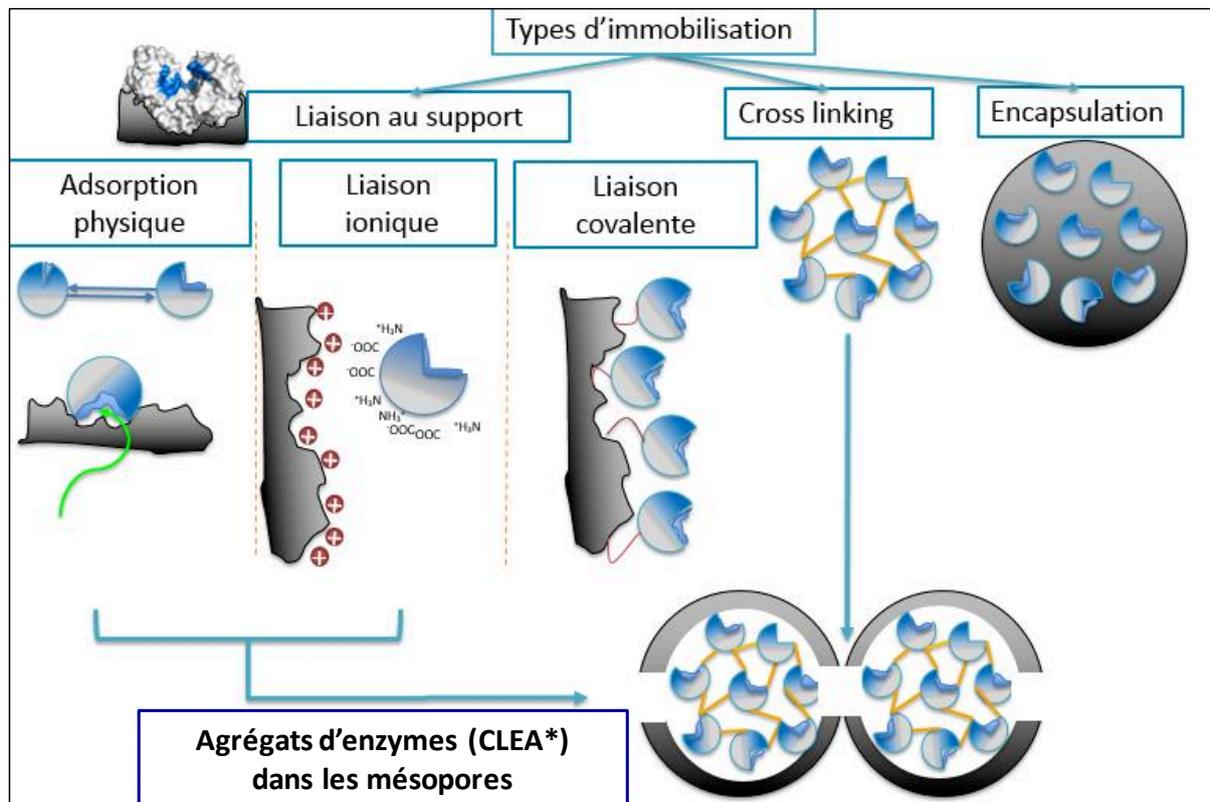
<b>Enzyme</b>	<b>Support</b>	<b>Facteurs spécifiques concernant la réaction dans le système</b>
Taille des enzymes		
Flexibilité conformationnelle		
due à la réaction	Organique ou inorganique	Limites de diffusion
Point isoélectrique	Hydrophobe / Hydrophile	Inhibition des enzymes
Surface fonctionnelle	Charge de surface	Précipitation des produits
Densité de charge	Surface fonctionnalisée	Viscosité de la solution
Stabilité sous les conditions d’immobilisation	Stabilité mécanique et chimique	Thermodynamique de réaction
Présence des régions hydrophobes/hydrophile	Porosité	Interaction non spécifique soluté-support
Additifs lors de la préparation des enzymes		

Il est insinué que l’enzyme immobilisée aura toujours une performance plus médiocre que l’enzyme native. Cela n’est pas forcément le cas.<sup>82</sup> En se basant sur la propriété de surface des enzymes et du support cela pousse à une meilleure préparation des deux qui dépasse les performances de l’enzyme native. Idéalement, le support est préparé au mieux pour correspondre aux propriétés hydrophobes/hydrophiles de l’enzyme.

### **1.2.2.2. Stratégies d’immobilisation**

Il n’existe pas de méthode générale pour l’immobilisation des enzymes.<sup>85</sup> Typiquement, choisir la méthode d’immobilisation la plus adaptée nécessite plusieurs essais et est intrinsèquement relié au type de support et au type d’enzyme étudiés.<sup>80, 86</sup> Les

techniques d’immobilisation les plus utilisées se divisent en quatre catégories, chacune ayant ses avantages et inconvénients que nous schématisons dans la figure 15.



**Figure 15.** Schéma représentatif des différents types d’immobilisation des enzymes sur les supports inspiré de l’article de Hartmann *et al.*<sup>86</sup> \* CLEA : *Cross-linking enzyme aggregates*.

Le plus souvent, les groupements amines de l'enzyme sont utilisés pour l’immobilisation covalente. Cependant, d'autres groupes fonctionnels sur la surface de l'enzyme peuvent également être utilisés, y compris des résidus de sucre. Le groupement amine comme agent nucléophile peut attaquer par exemple un époxyde ou un aldéhyde pour former une liaison covalente au support ou pour générer des agrégats d’enzymes (appelés également *CLEAs* de l’anglicisme *Cross-Linked Enzyme Aggregates*).

Une autre approche concerne le piégeage qui nécessite généralement la synthèse du support en présence de l'enzyme.<sup>87</sup> Ces différentes approches d’immobilisation sont présentées plus en détails dans les paragraphes suivants.<sup>80</sup>

### **1.2.2.2.1. Par liaison au support**

#### **Adsorption**

En général, l’adsorption des enzymes sur un support peut être effectuée par différentes interactions. Ce type d’immobilisation peut être assuré par des forces de Van der Waals et des interactions hydrophobes. Les propriétés du support et des enzymes doivent alors être prises en considération. Dans ce contexte, les enzymes avec une grande surface lipophile interagissent bien avec des supports hydrophobes. Plus encore, les résidus de sucre des enzymes glycosylés peuvent eux aussi assurer leur immobilisation par liaisons hydrogènes.

L’avantage de cette stratégie d’immobilisation est que l’enzyme n’a pas besoin de subir un prétraitement ou une modification chimique. Son inconvénient est que les enzymes adsorbées doivent être appliquées dans des solvants organiques ou dans des milieux réactionnels hydrophobes purs pour éviter la lixiviation. De plus, la liaison physique est généralement trop faible pour maintenir l’enzyme fixe au support dans des conditions industrielles rigoureuses de haute concentration de réactifs et de produits et de force ionique élevée.<sup>80</sup>

#### **Liaison ionique**

Essentiellement, tout type de support polaire peut être un support pour une liaison ionique et une grande interaction polaire. Cette liaison ionique dépend de la charge prédominante de l’enzyme et la charge globale du support qui doit être positive pour faire des liaisons avec les groupements carboxylates et négatifs pour les liaisons avec les groupements amine. L’activité enzymatique et la sélectivité dépendent du pH et de la température choisie pour l’immobilisation.

Il a été démontré, que l’adsorption des protéines est renforcée lorsqu’il y a une grande interaction entre enzymes et support.<sup>80</sup> La charge de surface de l’enzyme dépend du pH de la solution, le point isoélectrique de l’enzyme et la charge de surface du support aussi. Sachant que dans le cas des silices le PI est égale à 2.

#### **Liaison covalente**

L’une des méthodes les plus courantes pour la prévention de la lixiviation des enzymes, est l’immobilisation par liaison covalente des enzymes sur les supports. Cette stratégie d’immobilisation consiste à créer une liaison covalente entre des groupes

fonctionnels de l’enzyme et du support, en gardant l’intégrité réactionnelle de l’enzyme. Par exemple, dans le cas de la silice, les groupements silanols à la surface d’un support silicique sont condensés avec un organotrialkoxysilane ou avec un autre réactif silane pour générer la liaison entre support et enzymes.<sup>86, 88</sup>

En général, les groupements amines de l’enzyme sont employés pour cette technique.<sup>82</sup> Le groupe amine étant nucléophile peut attaquer un époxyde ou un aldéhyde. Le glutaraldéhyde est un exemple d’agent de liaison. L’immobilisation des enzymes avec le glutaraldéhyde<sup>89</sup> est utilisée pour immobiliser les protéines aux supports pour les réacteurs enzymatiques, l’affinité chromatographique, dans la recherche immunologique, ou encore comme agent de réticulation pour les biocapteurs.



**Figure 16.** Réaction de l’immobilisation covalente des enzymes par le glutaraldéhyde sur une silice greffée aminopropyl<sup>86</sup>

Les enzymes immobilisées de manière covalente peuvent être utilisées dans n’importe quel milieu. Un avantage évident du couplage covalent par rapport à l’adsorption est que l’enzyme reste immobilisée sur le support, même dans des conditions difficiles, par exemple en présence de tensioactifs. Néanmoins, l’enzyme étant chimiquement modifiée, elle peut subir des modifications conformationnelles irréversibles. Ceci est d’autant plus vrai dans le cas où l’immobilisation est effectuée par un attachement multipoint. L’enzyme immobilisée peut alors perdre sa flexibilité et devenir ainsi inactive.

### 1.2.2.2. Agrégats d’enzymes

Selon l’IUPAC, l’agrégation ou *cross-linking* est une réaction qui fait intervenir des sites ou groupements sur des macromolécules existantes ou une interaction entre des macromolécules existantes qui a pour résultat la formation d’une petite région dans une macromolécule à partir de laquelle au moins quatre chaînes émanent.<sup>79</sup>

La formation d’agrégats d’enzymes ou *CLEA* (pour *Cross-Linked Enzyme Aggregates*) est une approche de catalyse sans support, les enzymes elles-mêmes étant le support de la catalyse. La précipitation des enzymes dans la solution se fait grâce à des agents de linkage comme le polyéthylène glycol (PEG) ou le glutaraldéhyde. Dans ce cas d’immobilisation, les enzymes ne sont plus aussi pures qu’au départ et l’inconvénient majeur est qu’elles deviennent non réutilisables avec une mauvaise reproductibilité.<sup>80, 87, 90</sup>

### **1.2.2.2.3. Encapsulation**

Le meilleur moyen pour éviter toute influence sur le changement de la structure de l’enzyme est de l’encapsuler. Plusieurs méthodes d’encapsulation ont été développées où l’encapsulation par sol-gel est la plus utilisée.<sup>91</sup> Dans ce cas, le support est formé en présence de l’enzyme de sorte qu’elle devient piégée à l’intérieur plutôt que sur le support. Dans la pratique, la technique est plus utilisée avec des biocatalyseurs de cellules entières plutôt que des enzymes libres. L’avantage de cette méthode est de réduire la lixiviation des enzymes.

### **1.2.2.2.4. Adsorption-réticulation**

La formation de *CLEAs* dans des pores, souvent des mésopores, est une stratégie d’immobilisation alternative qui consiste à immobiliser les enzymes par adsorption, avant de les faire réagir avec un agent précipitant ou réticulant (comme par exemple acétone, sulfate d’ammonium ou glutaraldéhyde). Des *CLEAs* sont ainsi formés dans la porosité du support, minimisant l’effet de lixiviation sans changer la conformation ou nuire à l’activité enzymatique.<sup>86</sup> Cette approche peut rendre les enzymes mécaniquement plus stable et insolubles dans les solvants.<sup>89</sup>

Comme mentionné précédemment, il n’existe pas de méthode générale pour l’immobilisation des enzymes. Le choix de la méthode d’immobilisation dépend non seulement de l’enzyme et du support mais également de la réaction catalytique (solvant, température, affinité des produits et réactifs avec le support, *etc.*) et du dispositif catalytique visé (flux continu, *batch*, *etc.*).

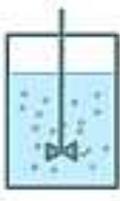
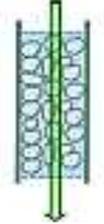
### **1.2.3. Monolithes à porosité hiérarchique en (bio)catalyse**

#### **1.2.3.1. Intérêt de la porosité hiérarchique: exemple de la catalyse en flux continu**

Comme montré dans l’article de A. Galarnau *et al.*<sup>91</sup> sur des monolithes de silice, un monolithe dont le squelette a une épaisseur de 3  $\mu\text{m}$  a la même efficacité et le même transfert de matière que des particules de même taille mises sous forme de lit fluidisé. En revanche, la perte de charge est beaucoup plus faible avec les monolithes.

La perméabilité dans ces monolithes est beaucoup plus élevée que dans un lit fluidisé. En effet, la perméabilité dépend du volume poreux, de la connectivité et de la taille des pores, mais aussi de leur homogénéité. Dans les monolithes, pour un même chemin de diffusion (taille de particule ou épaisseur de squelette) dans les mésopores, les macropores sont plus grands et plus homogènes en raison de l’absence d’embouchure de pore entre les particules. Ainsi, la couche de stagnation à la surface des macropores est d’épaisseur constante, ce qui n’est pas le cas pour un lit fluidisé où les points de contact entre les particules créent des zones de stagnation de plus grande épaisseur. La diffusion à travers la couche de stagnation pour entrer dans la mésoporosité est équivalente sur tout le monolithe, conduisant à un meilleur contrôle du temps de contact. La grande homogénéité de la taille des macropores dans les monolithes peut être mise en évidence par porosimétrie à mercure (voir précédemment).

L’utilisation de monolithes à porosité hiérarchique pour la catalyse en flux continu a fait l’objet de plusieurs articles d’état de l’art qui démontrent l’intérêt de ces matériaux.<sup>91, 92</sup> Il a été démontré que l’utilisation de monolithes de silice fonctionnalisés en tant que catalyseurs en flux continu est significativement plus efficient qu’en *batch* ainsi qu’en lit fixe (fig. 17).<sup>93</sup>

	Réacteur		
	Batch	Lit-fixe	Monolithe de silice
			
	Productivité (mol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )×10 <sup>5</sup>		
Knoevenagel	24	108	178
Transestérification	2,5	28	82

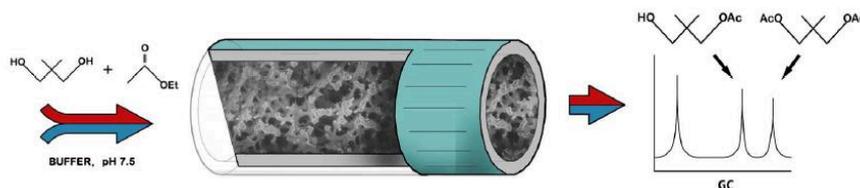
**Figure 17.** Productivités de monolithes de silice fonctionnalisés NH<sub>2</sub>- et HSO<sub>3</sub>- en réacteurs en *batch* (poudre de monolithes de silice), à lit-fixe (poudre de monolithes) et monolithiques utilisés comme catalyseurs pour deux réactions catalytiques.

### 1.2.3.2. Intérêt de la porosité hiérarchique en biocatalyse

L’importance des matériaux poreux et du diamètre des pores en catalyse enzymatique supportée a été démontrée par plusieurs études. On citera par exemple les travaux de K. Szymańska *et al.*<sup>94</sup> sur l’immobilisation covalente de différentes enzymes (invertases et glucoamylases) dans des mousses de silice (MCF). Ces mousses présentent des mésopores de diamètre supérieur à 20 nm interconnectés par des « fenêtres » de 12-14 nm. Immobilisées dans ces mousses, les enzymes sont jusqu’à mille fois plus actives que celles immobilisées sur des gels de silice présentant des mésopores de diamètre inférieur (*i.e.* de 2 à 5 nm). Plus récemment, le même groupe a démontré l’intérêt d’une porosité hiérarchique en comparant ces mêmes mousses de silice mésoporeuses (MCF) avec des monolithes de silice méso-macroporeux (35 µm de diamètre) obtenus par décomposition spinodale<sup>95</sup>. Ces monolithes présentent de nombreux avantages tels qu’une productivité très élevée, une faible perte de charge à hauts débits ainsi qu’une grande stabilité des enzymes sous flux continu. Szymańska *et al.*<sup>95</sup> ont utilisé ces monolithes pour l’hydrolyse du saccharose en flux continu et ont démontré une vitesse de réaction maximale près de 1000 fois supérieure par rapport à un réacteur préparé avec MCF. De plus, l’activité initiale a pu être préservée sur plus de six

semaines en conservant le bioréacteur à 4°C. D’autres supports monolithiques à porosité hiérarchique ont également été rapportés dans la littérature. R. Backov *et al.*<sup>96</sup> ont quant à eux synthétisé des mousses macro-mésoporeuses obtenues *via* des émulsions directes concentrées. Ces monolithes ont été utilisés pour l’immobilisation covalente d’enzymes, des lipases, et la production de biodiesel en flux continu sur près de deux mois.

La technologie des bioréacteurs monolithiques à porosité hiérarchique en flux continu offre ainsi plusieurs avantages. Au-delà des mésopores qui peuvent directement affecter la quantité d’enzymes immobilisées mais également la qualité de l’immobilisation (l’interface enzyme/support est directement relié au diamètre des mésopores et donc au rayon de courbure de ces derniers), la structure et la taille des macropores modifient la perte de charge liée au débit. A ce propos, Szymańska *et al.*<sup>97</sup> ont récemment montré qu’une modification de la taille des macropores de monolithes de silice de 5 µm à 35 µm permet d’abaisser considérablement la perte de charge et d’atteindre ainsi des productivités élevées en catalyse enzymatique. Les monolithes à porosité hiérarchique (méso-macroporeux) semblent donc être des supports très prometteurs permettant un compromis rationnel entre débit et perte de charge.<sup>74</sup>



**Figure 18.** Représentation de la réaction de biocatalyse du neopentylglycol par MsAcT dans un monolithe de silice.<sup>97</sup>

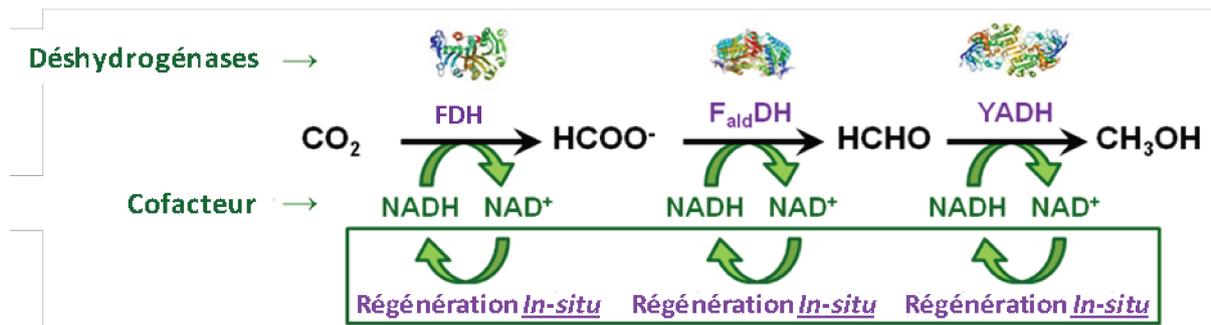
## 1.3. Conversion enzymatique du CO<sub>2</sub>

### 1.3.1. Contexte et problématiques

La conversion du CO<sub>2</sub> en molécules d’intérêt, en particulier le méthanol, peut être réalisé selon différents processus catalytiques (voir avant-propos). Les processus biocatalytiques, en particulier les processus enzymatiques, pourraient être une alternative prometteuse, vu qu’ils fonctionnent dans des conditions douces, sont écologiques et très sélectifs.<sup>27-35</sup> Cette réduction enzymatique est réalisée en inversant les voies métaboliques de la réaction biologique. Cependant, jusqu’à présent, il y a eu peu de discussions sur la

faisabilité thermodynamique d'inverser ces voies biologiques. Généralement, les rendements en méthanol sont très faibles dans des conditions réactionnelles régulières en utilisant des enzymes évoluées naturellement. D'un point de vue thermodynamique, il existe plusieurs facteurs qui influencent l'équilibre de la réaction. Il a été démontré que la conversion enzymatique du CO<sub>2</sub> en méthanol est hautement sensible au pH du milieu réactionnel, et en travaillant à de faibles forces ioniques et pH faible (i.e. pH 5 ou 6), il est possible de décaler significativement la constante d'équilibre de la réaction métabolique biologique pour favoriser la synthèse du méthanol.<sup>98</sup>

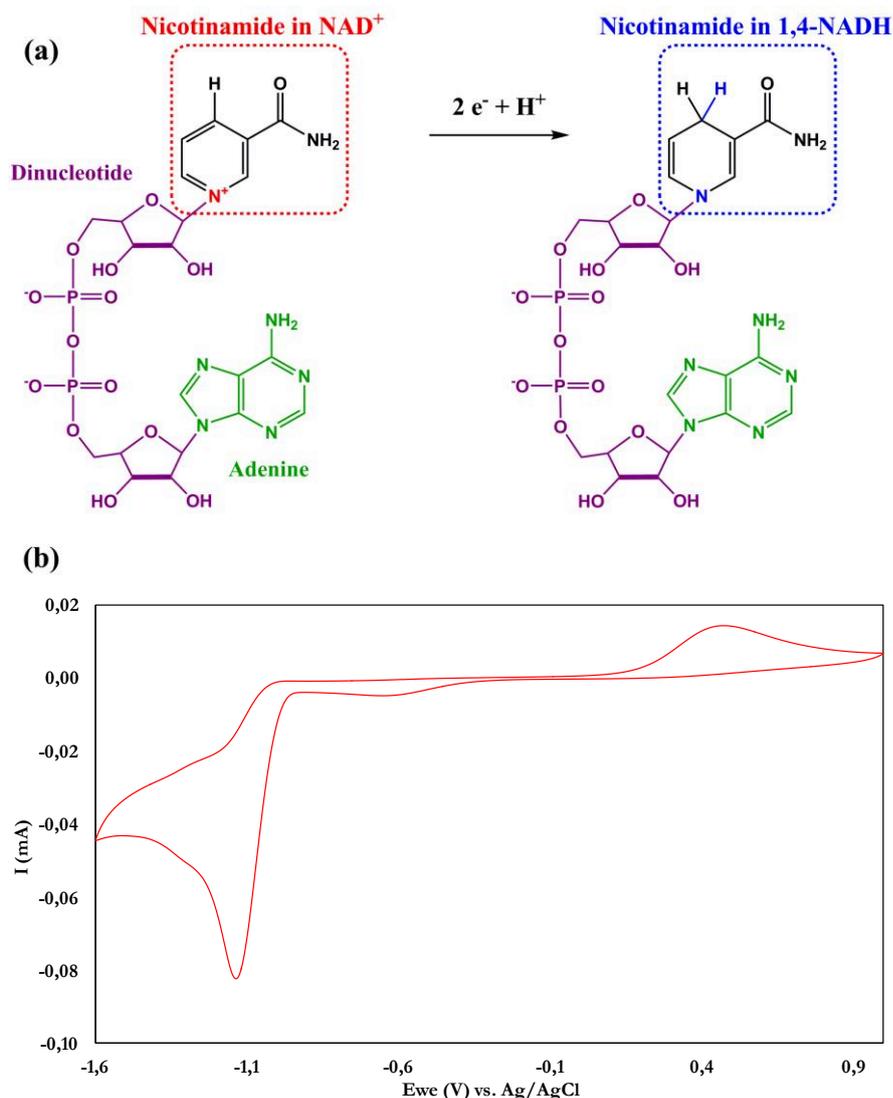
De tels processus ont été étudiés pendant plus de deux décennies<sup>27</sup> et ont été récemment développés dans notre institut.<sup>33, 34</sup> Cependant, la conversion biocatalytique du CO<sub>2</sub> en MeOH nécessite des réactions enzymatiques multiples en ayant recours à la formiate déshydrogénase (FDH), la formaldéhyde déshydrogénase (FaldDH) et l'alcool déshydrogénase (YADH), ainsi que le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) dans sa forme réduite active vis-à-vis des déshydrogénase (1,4-NADH). Dans le but de produire du méthanol ou autres molécules d'intérêt en flux continu, les enzymes et, d'une manière plus problématique, les cofacteurs devraient être stabilisés et/ou immobilisés tout en préservant leur activité.<sup>28-32</sup> Bien que l'immobilisation des enzymes sur support poreux a été largement étudiée et appliquée avec succès à la catalyse, certains défis subsistent en ce qui concerne la conversion multiple en cascade enzymatique du CO<sub>2</sub> en méthanol.



**Figure 19.** Représentation schématique de la cascade enzymatique pour la conversion du CO<sub>2</sub> en MeOH

Une autre restriction majeure de ce processus enzymatique est associée au cofacteur lui-même. En effet, bien que l'injection directe d'électrons dans les déshydrogénases immobilisées, c'est-à-dire sans cofacteur, a été reportée récemment par S. Schlager *et al.*<sup>99</sup> pour la réduction électrochimique du CO<sub>2</sub> en méthanol, de faibles rendements faradiques ont été atteints. Ainsi, la présence du NAD semble obligatoire afin d'atteindre des productivités

compétitives. Comme le NAD est relativement cher, il doit être idéalement immobilisé tout en préservant son activité. Ce point fait partie des objectifs de la thèse et représente un vrai challenge du fait que le cofacteur immobilisé ne doit pas changer de forme vu que les déshydrogénases ont une reconnaissance spécifique du cofacteur. Par ailleurs, il doit être aussi régénéré *in situ* (c’est-à-dire la forme oxydée  $\text{NAD}^+$  doit être réduite en 1,4-NADH). Pour ce faire, différentes voies chimiques, enzymatiques, photochimiques et même électrochimiques ont été développées.<sup>27-35, 100-102</sup> En effet, les systèmes de régénérations chimiques semblent peu pratiques et complexes vu qu’ils génèrent des sous-produits et nécessitent des étapes de séparations supplémentaires. Les processus de régénération photochimique<sup>34</sup> sont confrontés à des limitations inhérentes majeures dues à une oxydation potentielle du produit en parallèle et donnent de faibles rendements. En ce qui concerne les voies de régénération électrochimique,<sup>103</sup> l’isomérisation non-sélective et la dimérisation favorisée cinétiquement (produisant 1,6-NADH et  $\text{NAD}_2$  inactifs *vis-à-vis* l’enzymes) ont limités la plupart des études reportées à des processus de régénération indirecte.<sup>100</sup> En effet, les processus de régénération indirecte nécessitent une enzyme soluble supplémentaire et/ou un médiateur redox à base de métaux de transition, ce qui engendre une complexité et un coût supplémentaire sans pour autant dépasser les limitations citées précédemment. Théoriquement, le potentiel redox standard du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  à pH 7,0 et 25 °C est de 0,315 V. Cependant, la plupart des systèmes de régénération électrochimique nécessitent de hauts sur-potentiels, c’est-à-dire une différence de potentiel élevée entre le potentiel standard et le potentiel auquel l’oxydation et la réduction sont observées expérimentalement. Par exemple, en utilisant une électrode de carbone vitreux nue, nous pourrions observer la réduction directe du  $\text{NAD}^+$  à 1,0 V *vs.* Ag/AgCl comme montré dans la figure 4b (0,8 V *vs.* SHE).



**Figure 20.** (a) Formule chimique du NAD<sup>+</sup> et NADH. (b) Voltammogramme cyclique montrant l’oxydoréduction électrochimique du couple NAD<sup>+</sup>/NADH sur électrode de carbone vitreux enregistré dans une solution tampon phosphate pH 6,5 à température ambiante. Vitesse de balayage 20 mV.s<sup>-1</sup>.

Minteer *et al.*<sup>35</sup> ont démontré la faisabilité de la régénération électrochimique directe du 1,4-NADH pour la cascade enzymatique de la conversion du CO<sub>2</sub> en MeOH à un potentiel constant de -0,8 V (*vs.* électrode de calomel saturé, ce qui équivaut à -0,560 V *vs.* SHE). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des électrodes modifiées par du poly(*neutral red*). Cependant, très peu de paramètres ont été étudiés et une étude plus systématique prenant en considération la morphologie et la porosité des matériaux de l’électrode, la modification de surface et les stratégies d’immobilisation serait d’une grande importance.

Enfin, la régénération enzymatique<sup>29, 31, 33, 101, 102</sup> est une option pratique et probablement la plus utilisée. En particulier, la phosphite déshydrogénase PtDH s’est révélée

très utile pour la régénération du cofacteur par l’oxydation du phosphite en phosphate.<sup>33, 101</sup> Même si les enzymes de régénération semblent efficaces, rajouter une enzyme supplémentaire pourrait complexifier encore plus la cascade enzymatique. Ce système biocatalytique avec régénération du cofacteur par voie enzymatique a notamment été développé à l’ICGM. Dans cette étude systématique trois déshydrogénases (FDH, FaldDH et YADH) ont été encapsulées ensemble dans des nanocapsules de silice-phospholipides avec un système de régénération enzymatique utilisant la phosphite déshydrogénase. Une production en méthanol de 1,4 mmol [MeOH] g<sup>-1</sup> [poudre enzymatique commerciale] h<sup>-1</sup> a ainsi été rapportée.

Néanmoins, cette dernière étude, comme beaucoup d’autres, emploie des enzymes commerciales. Ces enzymes sont souvent non-purifiées voire très peu active. Ce constat est notamment vrai pour la première réaction, *i.e.* la réduction du CO<sub>2</sub> en formiate *via* la formiate déshydrogénase, qui fait l’objet de la prochaine section.

### 1.3.2. Les formiates déshydrogénases (FDHs)

Les enzymes sont caractérisées par un numéro de classification numérique (EC x.x.x.x). Le premier x donne le type de réaction chimique réalisé (« 1 » pour les réactions d’oxydoréduction), le deuxième donne le type de donneur d’électron ou de proton (« 1 » pour les alcools, « 2 » pour les acides, aldéhydes et cétones), le troisième le type d’accepteur (« 1 » pour les dérivés nicotinique) et le quatrième donne la sous-classe de l’enzyme. Les formiates déshydrogénase sont des oxydoréductases (E.C.1.2.1.2) ubiquitaires dans le vivant. De ce fait, une grande diversité biochimique existe au sein de cette famille d’enzymes.

Les structures quaternaires de certaines FDHs s’organisent en monomère (*Escherichia Coli*)<sup>104</sup> ou multimères : par exemple homodimère (*Candida boidinii*)<sup>105</sup>, hétérotetramère (*Ralstonia eutropha*)<sup>104</sup>. Les FDHs issues d’organismes anaérobies stricts sont en général des métalloenzymes (tungstène et/ou molybdène) plus ou moins sensibles à l’oxygène moléculaire. D’autres FDHs sont NAD-dépendantes, comme celle issue de *Candida boidinii*.<sup>106</sup> Enfin, certaines FDHs possèdent les deux caractéristiques à savoir un centre métallique et une NAD-dépendance (ex : FDH issue de *Methylobacterium extorquens*).<sup>107</sup>

La plupart des études portant sur les FDHs ont consisté à utiliser ou améliorer leur capacité à réduire le cofacteur NAD<sup>+</sup> en NADH en présence d’ions formiate. Cette réaction

génère du CO<sub>2</sub> ce qui la rend, pour ainsi dire, irréversible en vertu de la loi de déplacement des équilibres chimiques de Le Chatelier. Leur utilisation a donc d’abord visé la régénération du NADH dans des systèmes jusqu’à l’échelle industrielle permettant d’utiliser des quantités sous stœchiométriques de cofacteur dont le cout s’avère prohibitif (environ 9000 € / mol).

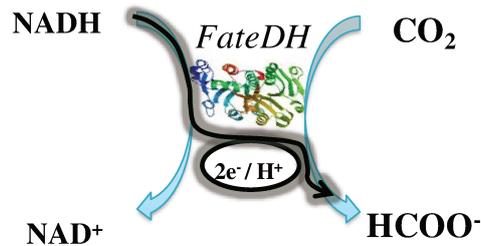
Les FDHs peuvent également catalyser la réaction inverse, c’est-à-dire la réduction du CO<sub>2</sub>, en présence d’un excès de NADH et c’est cette réaction qui, *in fine*, sera fondamentale dans le système biocatalytique étudié dans cette thèse.

Les FDHs NAD-indépendantes sont très actives pour la réduction du CO<sub>2</sub>, mais sont extrêmement sensibles au dioxygène – en raison de la présence de centres métalliques tungstène ou molybdène, de clusters fer-soufre et de sélénocystéines. L’intégration de FDHs NAD-indépendantes dans des réacteurs à l’échelle industrielle est ainsi difficilement envisageable. Les FDHs NAD-dépendantes sont très souvent préférées pour le développement de systèmes catalytiques. En particulier, la formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* – CbFDH – est une enzyme commerciale, présente notamment dans le catalogue de Sigma-Aldrich. Cette dernière a été très largement utilisée comme catalyseur dans des réacteurs électrochimiques, photochimiques et enzymatiques de réduction du CO<sub>2</sub>, mais également dans des systèmes de régénération du cofacteur 1,4-NADH jusqu’à une échelle industrielle. Plusieurs verrous technologiques majeurs limitent cependant le champ d’applications pratiques de CbFDH : (i) une faible activité notamment vis-à-vis de la réduction du CO<sub>2</sub> ; (ii) une stabilité modérée ; et (iii) le coût relativement élevé du cofacteur NAD et la nécessité de le régénérer *in situ*. Pour pallier à ces limitations, la recherche de nouvelles FDHs plus actives et/ou pouvant fonctionner sans cofacteur NAD est nécessaire afin de substituer la CbFDH. Parmi les différentes FDH d’intérêt, nous pouvons citer deux sources rapportées dans la littérature : *Thiobacillus sp.* KNK65MA (TsFDH) et *Methylobacterium extorquens* AM1 (MeFDH).<sup>108</sup> La première (TsFDH) a récemment démontré une activité exceptionnellement élevée pour la réduction du CO<sub>2</sub> en formiate,<sup>109</sup> tandis que la seconde (MeFDH) présente une activité bioélectrocatalytique intéressante en l’absence de NAD pour la réduction du CO<sub>2</sub>.<sup>110</sup>

Les FDHs décrites dans la littérature comme étant sensibles à l’oxygène pour des concentrations égales ou inférieures à celle de l’atmosphère ont été éliminées. En effet, une enzyme sensible à l’oxydation ne peut pas être utilisée dans le système biocatalytique visé car cela impliquerait des conditions réactionnelles strictes (atmosphère contrôlée) trop complexes à appliquer industriellement.<sup>111</sup>

## 1.4. Objectifs et dispositif visé

Pour récapituler, cette thèse a pour objectif de réduire le  $\text{CO}_2$  par voie enzymatique en utilisant la formiate déshydrogénase. Cette formiate déshydrogénase nécessite la présence d’un cofacteur : le nicotinamide adénine dinucléotide NAD sous sa forme réduite NADH qui sera oxydé en  $\text{NAD}^+$  (fig. 21).



**Figure 21.** Schématisation de la bioréduction du  $\text{CO}_2$  par la formiate déshydrogénase en présence du cofacteur Nicotinamide adénine dinucléotide NAD.

Ce cofacteur est très coûteux, d’où l’intérêt de le régénérer *in situ*. Nous nous intéressons dans ce projet à le régénérer essentiellement par voie enzymatique en utilisant une deuxième enzyme la phosphite déshydrogénase qui réduit le  $\text{NAD}^+$  en NADH en oxydant du phosphite en phosphate.

Comme montré dans ce chapitre, la productivité d’une réaction biocatalytique en flux continu est plus élevée qu’en *batch*. Il est alors intéressant d’immobiliser les enzymes utilisées dans ce système catalytique dans la porosité d’un matériau. Nous nous intéressons dans un premier temps (*cf.* chapitre 3) à la synthèse de monolithes à porosité hiérarchique à base de silice et de carbone où nous étudierons leur morphologie, nature chimique et porosité. Nous nous intéressons dans un second temps au choix de la formiate déshydrogénase en fonction de sa stabilité et de son activité vis-à-vis la réduction du  $\text{CO}_2$ . Par la suite, la formiate déshydrogénase sélectionnée est combinée à la phosphite déshydrogénase afin de réduire le  $\text{CO}_2$  en présence du système de régénération du NAD et le ratio d’activité entre ces deux enzymes sera étudié en *batch* (*cf.* Chapitre 4). Le ratio d’activité optimal sera utilisé pour l’immobilisation de ces deux enzymes sur monolithe pour arriver à la preuve de concept de la réduction du  $\text{CO}_2$  en flux continu. Dans un troisième temps, nous nous intéressons à la modification de surface des matériaux carbonés dans le but de greffer des médiateurs qui pourront favoriser la régénération du cofacteur par voie électrochimique ou bien de greffer un

espaceur pour l’immobilisation du NAD. Cette partie est présentée dans le chapitre prospectif (*cf.* chapitre 5).



## **Chapitre 2 - *Matériels et méthodes***

Ce chapitre décrit les différents matériels utilisés pour la préparation, la caractérisation et la fonctionnalisation des matériaux synthétisés et la méthodologie de travail suivie. Aussi, sont présentés : l'immobilisation du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide et sa régénération électrochimique, la mesure d'activité spécifique des enzymes et la détermination de leur concentration.

2.1.	Synthèses des monolithes .....	46
2.1.1.	Synthèse de monolithes de silice .....	46
2.1.1.1.	Synthèse du SiO <sub>2</sub> -3 .....	47
2.1.1.2.	Synthèse du SiO <sub>2</sub> -40 .....	48
2.1.1.3.	Contrôle de la mésoporosité.....	49
2.1.1.4.	Fonctionnalisation de la surface par greffage post-synthèse.....	50
2.1.2.	Monolithes carbonés par décomposition spinodale <sup>63</sup> .....	51
2.1.3.	Monolithes carbonés <i>via</i> empreinte « dure » de silice.....	52
2.1.3.1.	Synthèse des monolithes composites silice/ <i>hydrochar</i> .....	53
2.1.3.2.	Synthèse de monolithes composites silice-carbone .....	54
2.1.3.3.	Obtention de la réplique inverse du monolithe de silice en carbone..	54
2.2.	Caractérisations des matériaux .....	55
2.2.1.	Microscopie électronique à balayage .....	55
2.2.2.	Porosimétrie à Mercure .....	55
2.2.3.	Adsorption-désorption d'azote .....	56
2.2.4.	Microscopie électronique à transmission .....	56
2.2.5.	Analyse thermogravimétrique .....	56
2.2.6.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	57
2.2.7.	Spectroscopie Raman .....	57
2.2.8.	Diffraction des rayons X .....	57
2.2.9.	Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X.....	58
2.3.	Biocatalyse : préparation des enzymes et réduction du CO <sub>2</sub> .....	58
2.3.1.	Phosphite déshydrogénase (PtDH) .....	58
2.3.2.	Formiate déshydrogénase (MeFDH) .....	60
2.3.3.	Détermination de la concentration en enzyme .....	61
2.3.4.	Détermination de l'activité spécifique de la MeFDH (UMeFDH).....	62
2.3.5.	Détermination de l'activité spécifique de la PtDH (UPtDH) .....	62
2.3.6.	Analyse de la réduction enzymatique du CO <sub>2</sub> .....	63
2.3.7.	Préparation des réacteurs .....	63
2.3.7.1.	Préparation des réacteurs en silice .....	63
2.3.7.2.	Préparation des réacteurs en carbone .....	64
2.4.	Fonctionnalisation des monolithes de carbone .....	65
2.4.1.	Voie diazonium .....	65
2.4.1.1.	Greffage du phénylène diamine par sel de diazonium sur monolithe	65

2.4.1.2. Greffage des phénazines par sel de diazonium sur monolithe .....	65
2.4.1.3. Electropolymérisation du neutral red sur électrode de carbone vitreux .....	67
2.4.2. Voie Diels-Alder .....	67
2.4.2.1. Greffage par voie Diels-Alder sur monolithe de carbone .....	67
2.4.2.2. Immobilisation du cofacteur sur nanotubes de carbones par voie Diels-Alder .....	67
2.5. Tests électrochimiques de régénération du NADH .....	69
2.5.1. Régénération du cofacteur et électrocatalyse .....	70

## 2.1. Synthèses des monolithes

Dans cette section, nous présentons les différentes voies de synthèses utilisées dans cette thèse pour la genèse de matériaux à porosité hiérarchique à base de silice et de carbone. Ces monolithes serviront de support pour l'immobilisation des enzymes pour des applications de biocatalyse en flux continu. Nous commençons par la synthèse de monolithes de silice, ensuite nous présentons deux voies permettant la synthèse de monolithes carbonés.

### 2.1.1. Synthèse de monolithes de silice

Nous nous intéressons, dans un premier lieu, à synthétiser des monolithes de silice à porosité hiérarchique. Deux tailles de macropores (3 et 40  $\mu\text{m}$ ) ont été visées et sont obtenues par deux voies différentes. La première famille de monolithe est nommée **SiO<sub>2</sub>-3** et la deuxième **SiO<sub>2</sub>-40** faisant respectivement référence à la nature du monolithe qui est la silice (SiO<sub>2</sub>) et les diamètres des macropores 3 et 40  $\mu\text{m}$ . Ces monolithes ont subi un traitement basique afin de générer la mésoporosité dans le squelette silicique. Ainsi, différents diamètres de mésopores sont obtenus. Les monolithes de silice synthétisés sont nommés **SiO<sub>2</sub>-X-Y** où Y fait référence au diamètre des mésopores en nanomètres comme présenté dans le tableau suivant (Tableau 2).

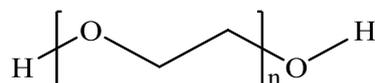
**Tableau 2.** Nomenclatures des monolithes de silice synthétisés

Nomenclatures	Nature	Diamètre des macropores ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre des mésopores (nm)
<b>SiO<sub>2</sub>-3-8</b>	Silice	3,5	8
<b>SiO<sub>2</sub>-3-10</b>	Silice	3,5	10
<b>SiO<sub>2</sub>-3-20</b>	Silice	3,5	20
<b>SiO<sub>2</sub>-40-20</b>	Silice	41	20

Ces monolithes seront utilisés comme moule pour la synthèse de monolithes de carbone par empreinte « dure » ainsi que comme support pour l'immobilisation des enzymes et par la suite de bioréacteurs en flux continu.

### 2.1.1.1. Synthèse du SiO<sub>2</sub>-3

Pour la synthèse des monolithes de silice avec un diamètre des macropores de 3 µm SiO<sub>2</sub>-3, le tétraéthyl orthosilicate (TEOS) est ajouté à une solution aqueuse d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) contenant du polyéthylène glycol, PEG 20 000 (fig. 22) jouant le rôle de *template*. Les proportions utilisées sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).



**Figure 22.** Formule chimique du polyéthylène glycol

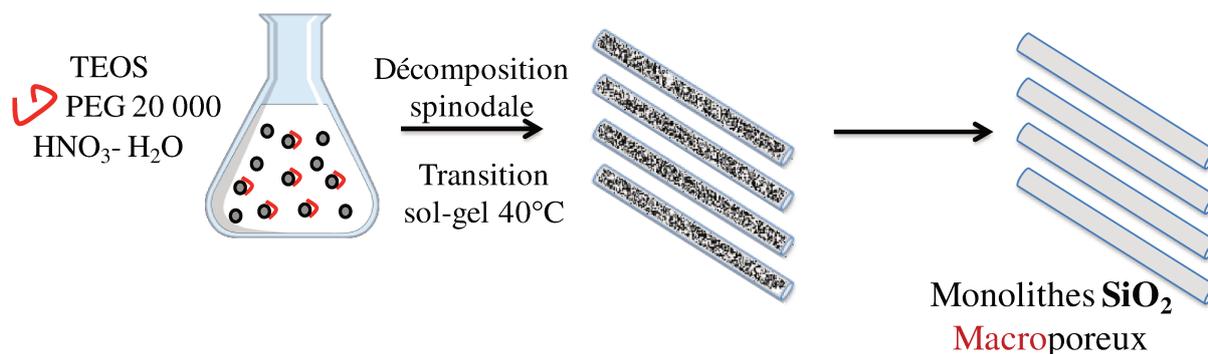
**Tableau 3.** Quantités de matières pour la synthèse des monolithes de silice SiO<sub>2</sub>-3-10 et SiO<sub>2</sub>-3-20

Composés	TEOS	H <sub>2</sub> O	HNO <sub>3</sub>	PEG 20 000
Ratio molaire	1,00	14,21	0,26	0,60
Masse molaire (g/mol)	208	18	63	44

Comme mentionné dans le premier chapitre (*cf.* Chapitre 1. Etat de l'art), la synthèse de ces matériaux est très sensible et dépend fortement de la quantité de chaque composant. Ces proportions sont le fruit de dizaines d'années de recherche, afin de trouver les conditions optimales nécessaires pour la réussite de cette synthèse.<sup>91</sup>

Tout d'abord, l'eau, l'acide et le PEG sont mélangés à température ambiante et mis sous agitation à 500 tours par minute jusqu'à dissolution complète du polymère. Par la suite, la solution obtenue est mise à 0 °C (bain de glace) et le TEOS est ajouté. Le mélange est placé 30 minutes sous agitation, toujours à 0 °C, afin d'éviter que la transition sol-gel et la décomposition spinodale ne s'effectuent. Ensuite, des tubes en PVC sont remplis avec la solution obtenue, puis fermés aux deux extrémités avec des bouchons hermétiques et du parafilm, pour éviter que la solution ne s'échappe. Puis, ces échantillons sont immergés dans de l'eau à 40°C, durant trois jours. A cette température, les deux phénomènes cités auparavant, ont lieu simultanément et permettent ainsi la formation de monolithes macroporeux. Les tubes sont retirés de l'eau et les monolithes de silice sont démoulés avec précaution pour éviter qu'ils se cassent. Ils sont plongés dans un grand béccher rempli d'eau.

Plusieurs lavages successifs (toutes les 20 min) sont nécessaires pour passer d'un pH acide à un pH neutre (fig. 23).



**Figure 23.** Synthèse des monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-3**.<sup>57</sup>

A ce stade, la silice est uniquement macro- et potentiellement microporeuse (après calcination à plus haute température). Nous cherchons à avoir un monolithe à porosité hiérarchique possédant trois échelles de porosité. Nous devons donc développer de la mésoporosité (*cf.* 2.1.1.3).

### 2.1.1.2. Synthèse du SiO<sub>2</sub>-40

A l'instar du **SiO<sub>2</sub>-3**, le précurseur utilisé pour la synthèse du **SiO<sub>2</sub>-40**<sup>97</sup> est le tétraéthyl orthosilicate (TEOS), qui est ajouté à une solution aqueuse d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) contenant du polyéthylène glycol (PEG 35 000) et du bromure du cétyltriméthylammonium (CTAB), dans les proportions ci-dessous (Tableau 4). La principale différence entre les deux synthèses des **SiO<sub>2</sub>-3** et **SiO<sub>2</sub>-40** réside dans la masse moléculaire du PEG.

**Tableau 4.** Quantités de matières pour la synthèse du monolithe de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20**.

Composés	TEOS	H <sub>2</sub> O	HNO <sub>3</sub>	PEG 35 000	CTAB
Ratio molaire	1,00	14,70	0,27	0,53	0,03
Masse molaire (g/mol)	208	18	63	44	364

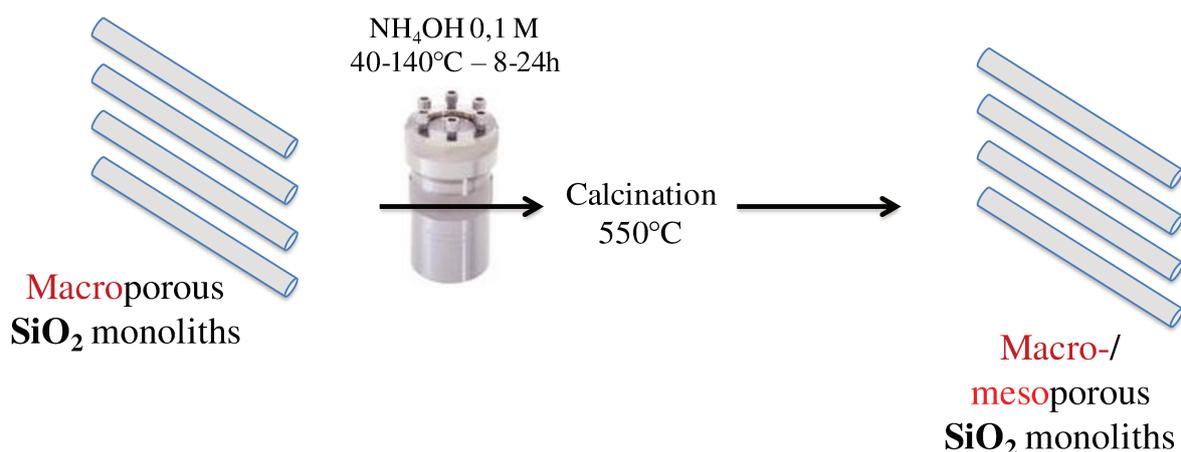
Le protocole expérimental consiste à dissoudre 2,27 g de polyéthylène glycol 35 000 Da (PEG 35 kDa) dans 26,15 mL de solution d'acide nitrique 1M HNO<sub>3</sub>. Après dissolution

totale du PEG 35 kDa, 21,78 mL de tétraéthyl orthosilicate sont rajoutés progressivement à la solution du PEG sous agitation à 500 tours par minute dans un bain de glace (afin de bloquer la transition sol-gel et la décomposition spinodale). Ensuite, 1,00 g de bromure du céthyltriméthylammonium sont rajoutés au mélange. Par la suite, des tubes en PVC sont remplis avec cette solution et sont fermés aux deux extrémités avec des bouchons, bien scellés avec du parafilm et placés dans un bain à 40 °C pendant 11 jours. Une transition sol-gel et une décomposition spinodale ont lieu. Le gel obtenu est neutralisé en effectuant des lavages successifs à l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH neutre de la solution de lavage.

### 2.1.1.3. Contrôle de la mésoporosité

Pour générer la mésoporosité dans le squelette silicique des deux types de monolithes **SiO<sub>2</sub>-3** et **SiO<sub>2</sub>-40**, ces derniers sont placés dans une solution d'ammoniaque à une concentration de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> et sont traités à différentes températures (40, 100 et 140 °C) durant 8 et 24h (fig. 24). Les mésopores sont obtenus par dissolution et reprécipitation des nanoparticules de silice.

Afin de moduler les diamètres des mésopores, idéalement 20 nm pour pouvoir immobiliser des agrégats d'enzymes dans ces derniers, différents traitements à l'ammoniaque ont été réalisés (tableau 5) tout en variant la température et le temps de séjour.



**Figure 24.** Contrôle de la mésoporosité, traitement des monolithes de silice à l'ammoniaque.

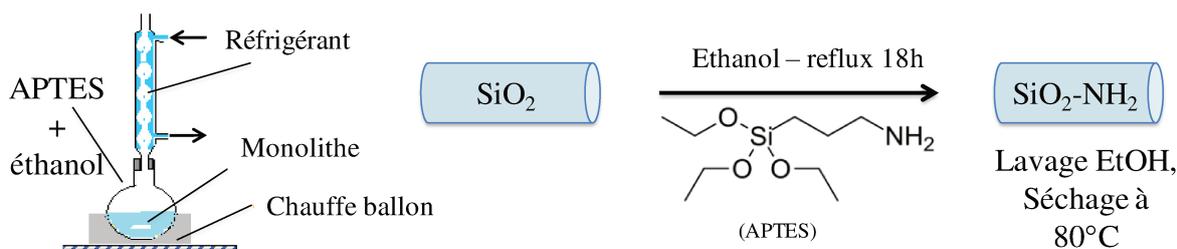
**Tableau 5.** Les paramètres utilisés pour la génération des mésopores.

Température (°C)	temps de séjour (heure)
40	8
40	24
100	24
140	24

Une fois les monolithes traités à l'ammoniaque, ces derniers sont lavés successivement à l'eau distillée jusqu'à avoir un pH neutre. Ensuite, ils sont séchés à température ambiante pendant 24 heures et finalement calcinés. En effet, après synthèse, une partie de la porosité est occupée par le polymère restant (PEG utilisé lors de la synthèse). Cette calcination consiste à traiter ces monolithes à une température de 550 °C durant 8 h. Le programme de calcination utilisé est le suivant : rampe 2 °C/min jusqu'à 40 °C pendant 15 h, ensuite 2 °C/min jusqu'à 80 °C pendant 15 h et enfin 2 °C/min jusqu'à 550 °C pendant 8 h. Cela permet de bien sécher les monolithes, éviter qu'ils se cassent dans le cas où nous montons en température directement à 550 °C, et retirer le PEG du squelette à 550 °C (et de ce fait libérer la porosité). Des monolithes de silice à porosité hiérarchisée sont alors obtenus.

#### **2.1.1.4. Fonctionnalisation de la surface par greffage post-synthèse**

Nous voulons fonctionnaliser la silice par du 3-(aminopropyl) triéthoxysilane (APTES) de formule brute  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ . Cette fonctionnalisation nécessite l'éthanol comme solvant. Le greffage se fait dans un montage à reflux où les monolithes de silice sont immergés dans 50 mL d'éthanol. Le volume d'APTES est calculé de manière à avoir un excès de 10 greffons par  $\text{nm}^2$  (Calcul ci-dessous). Une fois le volume d'APTES ajouté dans le ballon, ce dernier est monté à un réfrigérant et laissé sous reflux à 80 °C pendant 18h (fig. 25).



**Figure 25.** Mode opératoire de la fonctionnalisation des monolithes de silice par de l'APTES.

$$\text{Nombre de moles de greffon} : \text{Nombre de moles de greffon} = \frac{\text{Nombre de greffon}}{\text{Nombre d'Avogadro}}$$

**Tableau 6.** Paramètres utilisés pour le greffage de l'APTES

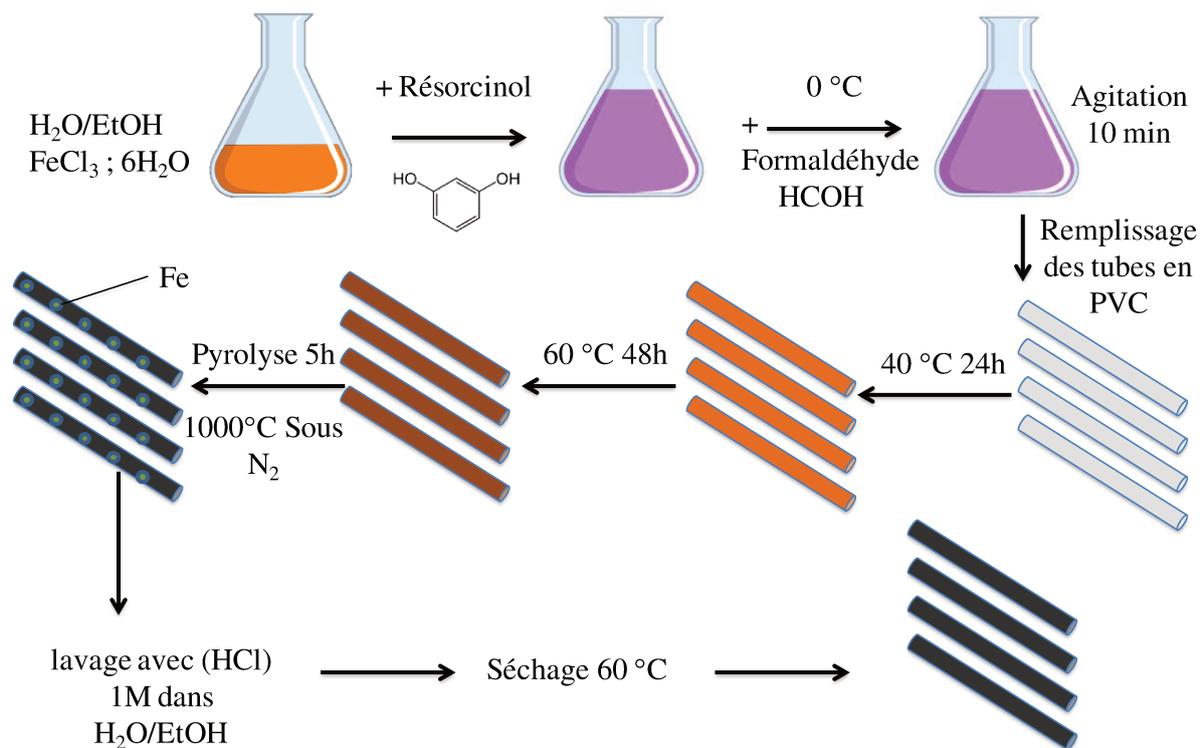
Masse de monolithe de silice (mg)	Surface spécifique ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Volume d'APTES (mL)	Volume éthanol (mL)	Nombre de greffons par $\text{nm}^2$
1305,7	700	3,6	50	10

Les monolithes, une fois greffés, sont lavés à l'éthanol afin d'éliminer l'excès d'APTES non greffé, puis séchés une nuit à  $80^\circ\text{C}$ . Nous obtenons alors des monolithes de silice amino fonctionnalisés nommés  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-X-Y}$  ( $\text{NH}_2$  pour la fonction amine, X correspond au diamètre des macropores en  $\mu\text{m}$  et Y correspond au diamètre des mésopores en nm).

### 2.1.2. Monolithes carbonés par décomposition spinodale<sup>63</sup>

La première étape de cette synthèse consiste à dissoudre le résorcinol (benzène-1,3-diol en nomenclature *IUPAC* qui est l'isomère méta du benzènediol ( $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ )) et le chlorure de fer (III) hexa-hydraté ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) dans un mélange de solvant eau/éthanol (40 mL/6 mL). Après agitation, une solution violette est obtenue qui est refroidie à  $0^\circ\text{C}$  dans un bain de glace. Par la suite le formaldéhyde est rajouté à  $0^\circ\text{C}$  et la solution est mise sous agitation à 500 tours par minute, pendant 10 min. Des tubes en PVC sont remplis avec la

solution obtenue et mis dans l'étuve à 40 °C pendant 24 h puis à 60 °C pendant 48 h pour les sécher avant d'être démoulés (fig. 26).



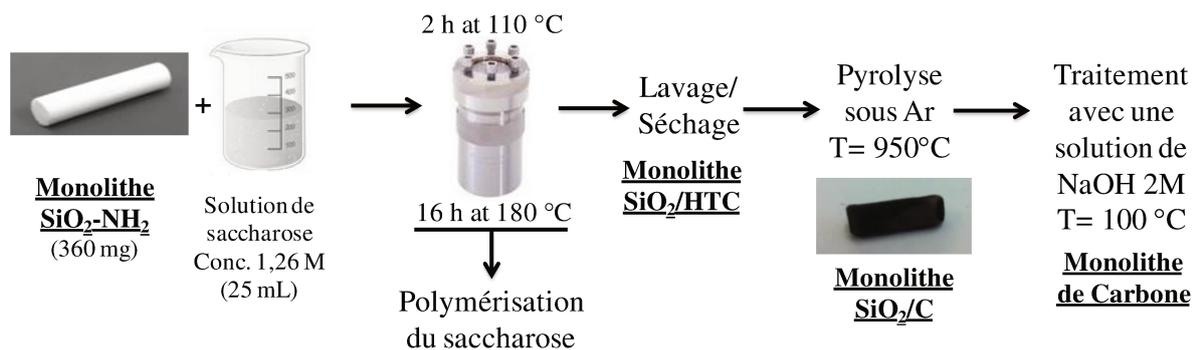
**Figure 26.** Synthèse des monolithes de carbone C-RF par décomposition spinodale.<sup>63</sup>

Les monolithes sont traités thermiquement à  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 5 h sous azote. La vitesse de la rampe de montée en température est de  $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Des monolithes de carbone sont obtenus puis lavés avec une solution d'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ) 1M dans un mélange eau/éthanol (1/1 en volume). Finalement, ces matériaux sont séchés à  $60\text{ }^\circ\text{C}$  et des monolithes macroporeux sans fissures sont obtenus.

### 2.1.3. Monolithes carbonés *via* empreinte « dure » de silice

Notre objectif est de synthétiser des monolithes à porosité hiérarchique conducteurs à base de carbone ayant des caractéristiques morphologiques proches de celles des monolithes siliciques  $\text{SiO}_2\text{-3-10}$  ;  $\text{SiO}_2\text{-3-20}$  et  $\text{SiO}_2\text{-40-20}$  et ce afin de comparer l'effet de la nature du support sur les applications visées. Pour ce faire, les monolithes siliciques synthétisés sont utilisés comme matériaux « moules » sur lesquels le précurseur de carbone : l'*hydrochar* est déposés. Cet *hydrochar* est obtenu par déshydratation/polymérisation du saccharose grâce à

un traitement hydrothermal. Un composite silice/*hydrochar* est obtenu, nommé **SiO<sub>2</sub>-HTC-X-Y** (où HTC pour *hydrochar*, X est le diamètre des macropores du monolithe de silice de départ et Y est le diamètre des mésopores du monolithe de silice de départ). Ce composite **SiO<sub>2</sub>-HTC-X-Y** sera pyrolysé à 950 °C sous atmosphère inerte pour donner le composite silice/carbone nommé **SiO<sub>2</sub>-C-X-Y**. Finalement, le composite **SiO<sub>2</sub>-C-X-Y** sera traité à la soude afin de dissoudre la structure silicique et avoir la réplique du monolithe de silice utilisé comme moule sacrificiel en carbone (fig. 27).



**Figure 27.** Les différentes étapes de la synthèse des monolithes de carbone par empreinte « dure » de silice.

### 2.1.3.1. Synthèse des monolithes composites silice/*hydrochar*

Tout d'abord, un monolithe de silice greffé par des fonctions amine est imprégné avec une solution de saccharose. Un monolithe **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-X-Y** de masse 360 mg est immergé dans 25 mL de solution de saccharose à 1,26 mol.L<sup>-1</sup> avant traitement hydrothermal. Le monolithe et la solution sont placés dans un autoclave de 37 mL, le taux de remplissage correspond à 68%.

Le monolithe et le saccharose subissent alors un traitement hydrothermal en deux étapes : la première étape consiste à placer l'autoclave dans une étuve à 110 °C pendant 2 heures, pour forcer la solution de saccharose à pénétrer dans les mésopores sans démarrer la déshydratation/polymérisation du saccharose, et la deuxième étape consiste en un traitement à 180 °C durant 16 h pour que la carbonisation hydrothermale du saccharose ait lieu.<sup>112</sup>

Le monolithe obtenu de couleur brune (fig. 28) est ensuite lavé à l'eau désionisée, puis à l'éthanol pour enlever l'excès d'*hydrochar* qui ne serait pas fixé, puis séché à température ambiante pendant 24 h.



**Figure 28.** Photo du monolithe composite silice/hydrochar obtenu par imprégnation d'un monolithe de silice

### 2.1.3.2. Synthèse de monolithes composites silice-carbone

Les monolithes composites silice/hydrochar  $\text{SiO}_2\text{-HTC}$  subissent une pyrolyse sous atmosphère inerte (sous flux d'argon à  $250 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) pour passer d'un hydrochar (carbone hydrothermal fortement oxygéné) à un carbone partiellement graphitisé pauvre en oxygène. En effet, les monolithes  $\text{SiO}_2\text{-HTC}$  préalablement séchés à température ambiante, sont pyrolysés à  $950 \text{ }^\circ\text{C}$  sous argon. La pyrolyse se fait sous atmosphère inerte, car à haute température et sous air, le carbone se dégrade/décompose, principalement en  $\text{CO}_2$ . Trois paliers intermédiaires à  $100$ ,  $350$  et  $550 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 2 heures chacun, sont nécessaires afin de préserver la forme monolithique et éviter la fissuration du monolithe. L'étape de pyrolyse permet d'augmenter la microporosité et la conductivité des matériaux carbonés. Les monolithes composites silice/carbone obtenus sont nommés  $\text{SiO}_2\text{-C-X-Y}$ .

### 2.1.3.3. Obtention de la réplique inverse du monolithe de silice en carbone

Pour obtenir la réplique inverse du monolithe de silice en carbone, il faut dissoudre la structure silicique du monolithe composite  $\text{SiO}_2\text{-C}$ . Ce dernier est traité dans une solution d'hydroxyde de sodium ( $2 \text{ M}$ ) à  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. Les répliques en carbone sont ensuite lavées à l'eau désionisée jusqu'à avoir un pH neutre de la solution de lavage et séchées à température ambiante. Un monolithe de carbone sans fissure, présentant une bonne tenue mécanique est obtenu (fig. 29)



**Figure 29.** Photo du monolithe de carbone obtenu par empreinte « dure » d'un monolithe de silice

## **2.2. Caractérisations des matériaux**

Les monolithes synthétisés ont été caractérisés par différentes méthodes. Ici, nous présentons les appareils utilisés pour ces caractérisations, la manière avec laquelle les échantillons ont été préparés et les personnes impliquées.

### **2.2.1. Microscopie électronique à balayage**

Les échantillons ont été préparés par Mr. Thomas Cacciaguera (MACS, ICGM) où un disque de monolithe est collé sur un porte échantillon et la structure macroporeuse est observée avec un microscope Hitachi S4800 avec une tension d'accélération entre 5 et 15 kV. Les matériaux sont préalablement exposés à un plasma de platine *via* un métalliseur Quorum Technologies.

### **2.2.2. Porosimétrie à Mercure**

Les monolithes de silice et de carbone ont été caractérisés par porosimétrie à Mercure avec un iAutoPore IV 9500 de marque Micromeritics. Les analyses ont été effectuées par Mr. Abdesslam El Manssouri à l'Institut Européen des Membranes.

### **2.2.3. Adsorption-désorption d'azote**

Les monolithes de silice ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote sur un appareil Micromeritics Tristar 3000 permettant d'analyser trois échantillons. La formation pour l'utilisation de l'appareil est donnée par Dr Géraldine Layrac (MACS, ICGM). Environ 30 mg d'échantillons sont dégazés pendant 6 heures à 250 °C pour les monolithes de silice native et à 80 °C pour les monolithes de silice fonctionnalisés par des fonctions aminopropyl avec un Micromeritics VacPrep 061.

Les monolithes de carbone ont été analysés par un Micromeritics 3Flex. La formation sur l'appareil est assurée par Mr. Christian Curtil (CMOS, ICGM). 30 mg d'échantillons sont dégazés pendant 1 heure à 200 °C et 5 heures à 250 °C sur un Micromeritics SmartVacPrep.

### **2.2.4. Microscopie électronique à transmission**

La microscopie électronique en transmission permet d'obtenir des informations structurales sur le matériau par imagerie. Un faisceau d'électrons focalisé par des lentilles électromagnétiques passe au travers de l'échantillon et permet d'obtenir une image avec une résolution de l'ordre du nanomètre du matériau observé. Cette analyse est principalement utilisée pour voir si l'échantillon est structuré à l'échelle mésoscopique.

Les monolithes de silice et de carbone caractérisés par microscopie électronique à transmission ont été préparés par Mme Véronique Viguier en utilisant la technique ultramicrotomie avec une épaisseur de coupe de 80 nm. Les observations ont été réalisées sur un JEOL JEM-2200FS Field Emission Electron Microscope par Dr Erwan Oliviero.

### **2.2.5. Analyse thermogravimétrique**

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées sur un appareil Perkin Elmer STA 6000. La formation est assurée par Dr Géraldine Layrac (MACS, ICGM). Le traitement thermique utilisé pour l'analyse est une rampe de température de 32 °C à 900°C sous flux d'air. La vitesse de montée en température est de 10°C par minute pour tous les échantillons.

### **2.2.6. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier**

La spectroscopie infrarouge est l'un des outils les plus utilisés pour la caractérisation et l'identification de composés moléculaires. On mesure l'intensité du rayonnement qui traverse un matériau en fonction de la longueur d'onde. Une signature vibrationnelle est alors obtenue et va permettre de caractériser le composé. Elle s'utilise principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule en mettant en évidence la présence de liaisons entre les atomes (fonctions et groupements).

Les monolithes analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont été broyés et analysés en absorbance en utilisant la réflectance totale atténuée (ATR de l'anglais *Attenuated Total Reflectance*) sur un appareil PerkinElmer FT-IR Spectrometer Spectrum Two.

### **2.2.7. Spectroscopie Raman**

Les monolithes de silice et de carbone caractérisés par spectroscopie Raman ont été broyés et analysés par Mme Léa Daenens de la nacelle Raman de Montpellier. Les analyses ont été réalisées sur un appareil Horiba Jobin Yvon – LabRAM ARAMIS avec un détecteur C.C.D refroidi par un module à effet Peltier et un laser 473 nm.

### **2.2.8. Diffraction des rayons X**

Les monolithes de silice et de carbone analysés par diffraction des rayons X ont été broyés et analysés par Mr. Thomas Cacciaguerra (MACS, ICGM) avec un diffractomètre Bruker D8 Advance (radiation Cu K $\alpha$  à  $\lambda=1,5405$  Å) avec une configuration Bragg-Brentano et équipé d'un détecteur Bruker Lynx Eye.

## 2.2.9. Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X

Les analyses sont réalisées par Valérie Flaud avec l'appareil ESCALAB 250 de Thermo Electron. La source d'excitation est une onde monochromatique, raie Al K $\alpha$  (1486.6 eV). La surface analysée a un diamètre de 400  $\mu$ m. Les spectres de photoélectrons sont calibrés en énergie de liaison par rapport à l'énergie de la composante C=C du carbone C1s à 284,4 eV.

## 2.3. Biocatalyse : préparation des enzymes et réduction du CO<sub>2</sub>

La formiate déshydrogénase issue de *Methylobacterium extorquens* AM1<sup>108</sup> (**MeFDH**) utilisée pour la réduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup> est fournie par notre collaborateur Pr. Kenji Kano de l'université de Kyoto. La phosphite déshydrogénase est un mutant 12X-A176R de la phosphite déshydrogénase de *Pseudomonas stutzeri* (**PtDH**) utilisée pour la régénération du cofacteur NAD<sup>+</sup> en 1,4-NADH est fournie par nos collaborateurs Pr. Eric Dubreucq et Dr. Jullien Drone de l'UMR-IATE et de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier, respectivement.

### 2.3.1. Phosphite déshydrogénase (PtDH)

La production de la phosphite déshydrogénase a été effectuée par Rémi Cazelles dans le cadre de sa thèse. L'ADN recombinant de la phosphite déshydrogénase a été fourni transformé dans des cellules compétentes (souches *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3)) par le Pr. H.M Zhao (Université of Illinois, USA). Ces cellules compétentes contiennent le plasmide pET15b-PTDH12x. Les milieux de cultures utilisés sont le Terrific Broth (TB) et le milieu de Riesenberg. Le plasmide est inoculé dans 100 mL de milieu TB en présence d'ampiciline (TB-amp). La préculture est diluée (1% v/v) pour une deuxième préculture de 24 heures à 37 °C dans un milieu TB-amp.

Les cellules sont récupérées par centrifugation (5000 tours/min, 20 °C, 5 min) quand la densité optique ( $DO_{600\text{ nm}} = 3,10$ ) et sont transférées dans un fermenteur. Le volume du milieu de culture de Riesenbergl est de 0,5 L, constitué de différents oligoéléments, l'antibiotique ampiciline, de l'antimousse et du glycérol. La première phase de croissance cellulaire dure 19 h avec un ajout de glycérol après 7 heures. Les cellules se multiplient et consomment de plus en plus d'oxygène. Le glycérol est à nouveau ajouté et consommé au bout de 2 heures ( $DO_{600\text{ nm}} = 14$ ). Par la suite, une culture à taux de croissance fixe a eu lieu pendant 11 heures. Le taux de croissance des cellules est contrôlé par la vitesse d'ajout du glycérol. Le contrôle du pH se fait par l'ajout d'hydroxyde d'ammonium. La croissance est ensuite linéaire pendant 14 heures, l'agitation est augmentée après 40 heures de culture pour que la pression partielle d'oxygène  $PO_2$  soit maintenue supérieure à 20 %. A une  $DO_{600\text{ nm}} = 96$  l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside est ajouté pour induire l'expression de la protéine recombinante. Du glycérol et de l'hydroxyde d'ammonium sont ajoutés pendant la phase d'expression qui dure 20 heures. La  $DO_{600\text{ nm}}$  est constante, les cellules ont cessé de se développer et utilisent le glycérol pour la fabrication des protéines. La suspension cellulaire est récupérée et les cellules sont lysées par ultrasons et les protéines sont récupérées par centrifugation (5000 tours/min, 1 heures, 4°C).

La purification de la phosphite déshydrogénase PtDH, nécessite un tampon de chargement (SBA), un tampon de lavage (SBB), un deuxième tampon de lavage (SBC), un tampon d'élution (EB) et un tampon de conservation (CB). La composition des solutions tampons est décrite en annexe.

Les protéines sont purifiées par chromatographie de perfusion avec un détecteur UV à 280 nm et par conductimétrie. La colonne de séparation (HisPrep FF 16/10 pré-chargée par du nickel) est équilibrée avec la solution SBA. La solution clarifiée de PtDH est chargée, par la suite, dans la colonne. Les protéines sont fixées par leur étiquettes histidine, lavées avec les solutions SBB et SBC et éluées avec la solution EB (plus de détails en annexe).

Le dessalage de la suspension de protéines qui contient l'imidazole à 0,5 M se fait par ultrafiltration (*Amicon® Ultra-15 30k centrifugal Filter Device*). Le tube à filtrer laisse passer toutes les protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 30 kDa permettant ainsi la purification de la **PtDH** dont le poids moléculaire est de 36,415 kDa.

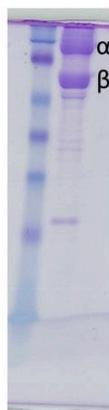
### 2.3.2. Formiate déshydrogénase (MeFDH)

Les enzymes formiate déshydrogénase issues de *Methylobacterium extorquens* **MeFDH** ont été fournies par l'équipe japonaise du Pr. Kano de l'université de Kyoto. Elles ont été purifiées de la manière suivante par nos collaborateurs.<sup>108</sup>

*Methylobacterium extorquens* AM1 (NCIMB 9133) a été acheté auprès de NCIMB (Aberdeen, Ecosse, Royaume-Uni). Les cellules ont été cultivées à 28 °C dans un milieu de culture modifié *Luria broth*, qui consistait en 1% d'hipolypepton, 1% d'extrait de levure, 0,5% de chlorure de sodium, 1 mM de tungstate de sodium et 0,5 M de molybdate de sodium. Les cellules ont été cultivées dans des fioles Erlenmeyer de 500 ml remplies de 150 ml du milieu de culture.

Les cellules ont été recueillies, mises en suspension avec du tampon phosphate de potassium 20 mM (KPB) pH 6,0 et ensuite rompues deux fois avec une presse à pression française (Otake Works, Japon) à 100 MPa.

La centrifugation a été effectuée à 100 000×g pendant 1 heure à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été chargé sur une colonne Toyopearl DEAE-650 M (Tosoh Corporation, Japon) équilibrée avec du KPB 20 mM pH 6,0. **MeFDH** a été élué avec un gradient linéaire de NaCl de 120 à 180 mM dans le KPB pH 6,0. L'échantillon a été recueilli et passé sur une colonne Toyopearl Butyl-650 M (Tosoh Corporation, Japon) équilibrée avec le KPB contenant 20 % (massique) de sulfate d'ammonium. L'élution du **MeFDH** a été réalisée sous un gradient linéaire de sulfate d'ammonium de 12 à 8 % dans la même solution de KPB pH 6,0. Toutes les étapes de purification ont été effectuées à 4 °C dans des conditions aérobies. Les concentrations de protéines ont été déterminées avec le Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA) en utilisant de la BSA comme référence. Les puretés du **MeFDH** ont été déterminées par coloration au bleu de Coomassie R-250 avec SDS-PAGE (fig. 30).



**Figure 30.** SDS-PAGE de l'enzyme MeFDH

L'enzyme est un hétérodimère de deux unités ( $\alpha\beta$ ) de 107 et 61 kDa, respectivement.

D'autres FDHs ont été produites dans le cadre du stage d'Alexandra Lamotte financé par l'institut Canot Chimie Balard et le LabEx Agro. Les enzymes sont CbFDH, PsFDH et TsFDH qui ont été produites grâce à un système d'expression hétérologue dans *Escherichia coli*. Les constructions plasmidiques ont été réalisées par l'intermédiaire de la société Life Technologies. Les séquences des gènes codant pour les FDHs de *C. boidinii* (CbFDH, CAA09466.2), *P. sp.* 12-A (PsFDH, BAB64941.1) et *T. sp.* KNK 65MA (TsFDH, BAC92737.1) ont été déduites des séquences protéiques.

### 2.3.3. Détermination de la concentration en enzyme

Les concentrations protéiques des enzymes **MeFDH** et **PtDH** ont été déterminées par la méthode de Bradford en utilisant la BSA (albumine de sérum bovin qui est l'une des protéines extraites du sérum de bovin largement utilisée en laboratoire de biologie vu sa disponibilité et son coût réduit) en tant que standard (annexe).

Pour la PtDH : (Quantité de protéine) = 7,3 mg équivalent BSA pour 1 mL de la solution enzymatique PtDH.

Pour la MeFDH : (Quantité de protéine) = 15,4 mg équivalent BSA pour 1 mL de la solution enzymatique MeFDH.

### 2.3.4. Détermination de l'activité spécifique de la MeFDH ( $U_{\text{MeFDH}}$ )

L'activité de la formiate déshydrogénase **MeFDH** est déterminée de la manière suivante : l'enzyme est placée en solution avec du carbonate  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et le cofacteur NADH sous sa forme réduite, la MeFDH réduit le carbonate en formiate et oxyde le cofacteur NADH en  $\text{NAD}^+$ . En effet, la forme réduite du cofacteur NADH absorbe à 340 nm. L'absorbance de la solution est suivie à 340 nm au cours du temps ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) à 25 °C en utilisant un spectrophotomètre UV-visible en fonction du temps toutes les 30 s et ce afin de déterminer la vitesse initiale de la disparition du NADH et déduire la vitesse initiale de conversion de l'enzyme **MeFDH**. Le protocole expérimental consiste à préparer deux cuves en quartz de 2,5 mL contenant chacune 1996  $\mu\text{L}$  d'une solution 0,25 mM NADH ; 100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans un tampon phosphite 0,5 M pH 6,4. Dans la première cuve 4  $\mu\text{L}$  d'eau milli-Q ont été ajoutés, celle-ci est utilisée comme un blanc. Dans la deuxième cuve et à  $t = 0$ , un volume de 4  $\mu\text{L}$  de la solution d'enzyme MeFDH a été ajouté.

### 2.3.5. Détermination de l'activité spécifique de la PtDH ( $U_{\text{PtDH}}$ )

Afin de déterminer l'activité spécifique de la **PtDH**, une méthode indirecte a été utilisée. Il s'agit de la réaction de régénération de la forme réduite du cofacteur NADH à partir de sa forme oxydée  $\text{NAD}^+$ . En effet, si la PtDH est active, elle va réduire le  $\text{NAD}^+$  en NADH. La détermination de la vitesse initiale de la réaction de régénération nous donne une idée sur l'activité spécifique  $U$  du PtDH. Cette vitesse initiale de la réaction de régénération est déterminée par la mesure de l'augmentation d'absorbance du NADH à 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) à 25 °C en utilisant un spectrophotomètre UV-visible.<sup>113</sup>

Deux cuves en quartz de 2,5 mL ont été utilisées pour cette mesure de l'activité. Les deux contiennent 1996  $\mu\text{L}$  d'une solution  $\text{NAD}^+$  0,25 mM dans un tampon phosphite 0,5 M pH 6,4. Dans la première 4  $\mu\text{L}$  tampon phosphite ont été rajoutés, et dans la deuxième un volume de 4  $\mu\text{L}$  de la solution d'enzyme PtDH a été rajouté. L'absorbance de la solution est suivie à 340 nm en fonction du temps (toutes les 30 s).

### 2.3.6. Analyse de la réduction enzymatique du CO<sub>2</sub>

Afin de suivre la réduction du CO<sub>2</sub> par biocatalyse en utilisant la MeFDH, la chromatographie en phase liquide à haute performance a été utilisée pour la détection de l'acide formique.<sup>114</sup> La colonne utilisée est une Supelco gel H (25 × 4,6 mm) Sulfonated polystyrène/divinylbenzène. La température a été réglée à 65 °C, le débit à 0,2 mL.min<sup>-1</sup>, la pression est de 42 bars et le volume d'injection est de 10 µL. La solution d'éluant utilisée est une solution d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 mM filtrée ( $\phi_{\text{filtre}} = 0,22 \mu\text{m}$ ).

Les espèces présentes dans le milieu réactionnel (bioréduction du CO<sub>2</sub>) ont été passées afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de pics qui ressortent au temps de rétention  $t_r$  du formiate. Le milieu réactionnel de la bioréduction du CO<sub>2</sub> contient du tampon phosphite, du carbonate NaHCO<sub>3</sub>, et du formiate HCOO<sup>-</sup>. Une solution de chaque espèce présente dans le milieu réactionnel a été préparée : une solution tampon phosphite [Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>] = 500 mM ; une solution de bicarbonate de sodium [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] = 100 mM et une solution d'acide formique [NaHCO<sub>2</sub>] = 50 mM qui ont été acidifiées en rajoutant de l'acide sulfurique à la même concentration que la phase mobile H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 mM. Ces échantillons ont été filtrés ( $\phi_{\text{filtre}} = 0,22 \mu\text{m}$ ) et ont été injectés.

### 2.3.7. Préparation des réacteurs

#### 2.3.7.1. Préparation des réacteurs en silice

Les réacteurs en silice sont préparés de manière à placer 100 mg de monolithe de silice entre deux tubes en acier et le tout sera fixé avec du Teflon thermorétractable à 350 °C. Les deux tubes en acier et le monolithe de silice sont placés dans la gaine en Teflon thermorétractable dans une nacelle en verre qui est placée pendant 10 min dans un four tubulaire préchauffé à 350 °C. Le réacteur obtenu est monté dans un montage en flux continu et la solution à passer à travers le monolithe est pompé à l'aide d'une pompe péristaltique.



**Figure 31.** Photo du Teflon thermorétractable à gauche et du réacteur microfluidique composé de monolithe de Silice entouré par deux tubes en inox gainés par téflon thermorétractable.

### 2.3.7.2. Préparation des réacteurs en carbone

Le design des réacteurs avec des monolithes de carbone est effectué de la même manière. Un monolithe de carbone (100 mg) est placé entre deux tubes en acier et le tout dans une gaine en Teflon thermorétractable. Le réacteur est placé dans une nacelle qui est placée dans un four tubulaire. Le tube est tiré sous vide à l'aide d'une pompe et laissé sous flux d'argon afin de préserver le monolithe de carbone lors du traitement thermique. La température est fixée à 350 °C avec une rampe de montée en température de 10 °C/min pendant 10 min.



**Figure 32.** Photo du Teflon thermorétractable à gauche et du réacteur microfluidique composé de monolithe de carbone entouré par deux tubes en inox gainés par téflon thermorétractable.

## **2.4. Fonctionnalisation des monolithes de carbone**

### **2.4.1. Voie diazonium**

#### **2.4.1.1. Greffage du phénylène diamine par sel de diazonium sur monolithe**

Les dérivés de l'aniline (1,4-benzènediamine ; 5 mmol) et le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ; 5 mmol) ont été dissous dans un mélange de solvant : (20 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) et (20 mL EtOH), dégazés préalablement par barbotage d'azote gazeux. Les monolithes de carbone (400 mg) sont ensuite ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 60 °C sous agitation lente afin de préserver les monolithes. La synthèse a été effectuée dans des conditions acides, en ajoutant 250  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 98 %), en barbotant un courant du diazote. Après 24 h de réaction les monolithes sont lavés en utilisant un Soxhlet avec de l'éthanol pendant 24 h, puis séchés à 80 °C pendant une nuit.

#### **2.4.1.2. Greffage des phénazines par sel de diazonium sur monolithe**

D'autres molécules ont été greffées sur ces monolithes de carbone **C-RF** par couplage diazonium. Les molécules greffées sont des phénazines (fig. 33). Le protocole expérimental utilisé pour le greffage des phénazines par sel de diazonium est le même que celui utilisé pour le greffage du 1,4-benzènediamine. Cependant, la quantité de matière en phénazines et en nitrite de sodium utilisée est de 1 mmol.

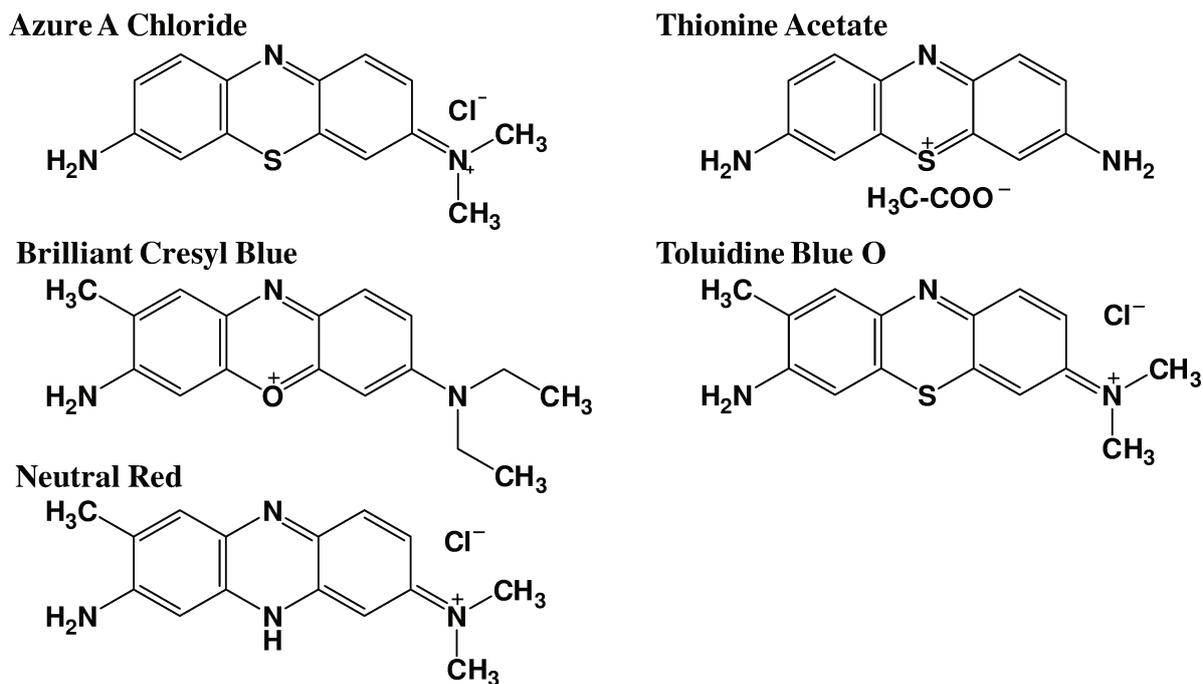


Figure 33. Structures chimiques semi-développées des phénazines.

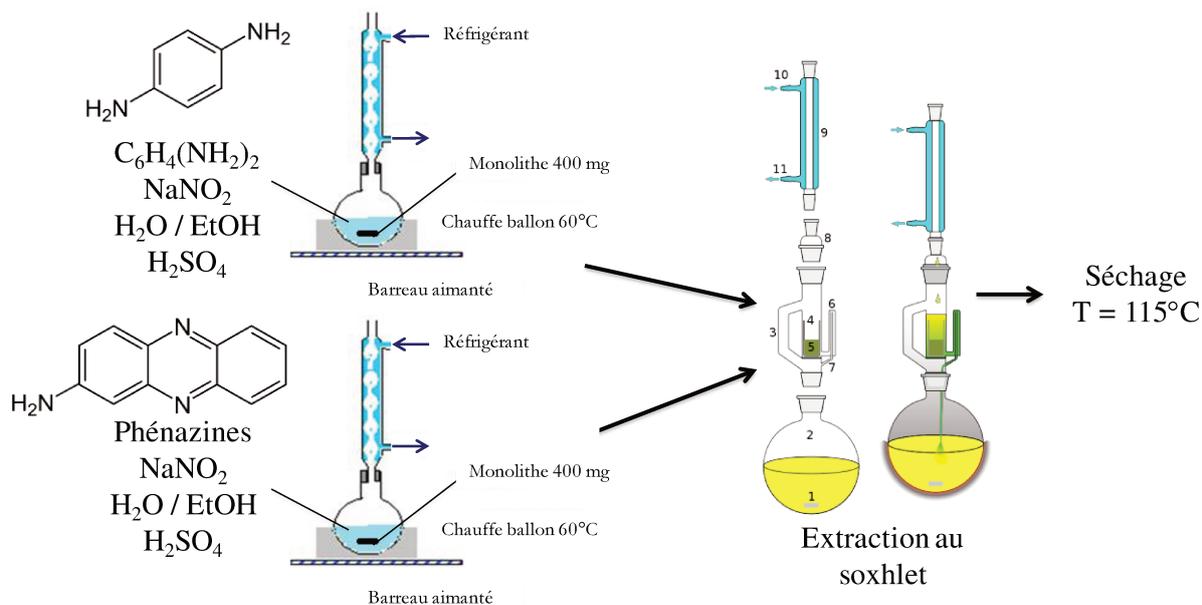


Figure 34. Montages utilisés pour le greffage des molécules par sel de diazonium et de l'extraction au Soxhlet. Pour le montage de l'extraction au Soxhlet les numéros correspondent à 1 agitateur magnétique, 2 ballon à col rodé, 3 retour de distillation (tube d'adduction), 4 corps en verre, 5 filtre, 6 haut du siphon, 7 sortie du siphon, 8 adaptateur d'expansion, 9 condenseur, 10 entrée de l'eau de refroidissement et 11 sortie de l'eau de refroidissement.

### 2.4.1.3. Electropolymérisation du *neutral red* sur électrode de carbone vitreux

Une électrode de carbone vitreux polie a été plongée dans 25 mL d'une solution tampon phosphate 25 mM pH 6 contenant 0,4 mM *neutral red* et 0,1 M nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ). Une voltammétrie cyclique a été réalisées entre -0,755 et 0,845 V vs Ag/AgCl à une vitesse de balayage de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

## 2.4.2. Voie Diels-Alder

### 2.4.2.1. Greffage par voie Diels-Alder sur monolithe de carbone

Les monolithes de carbone ont été également fonctionnalisés par traitement thermique en présence d'excès de diénophile (propargylamine, fig. 35). 400 mg de monolithes de carbone sont placés dans un autoclave en acier-téflon contenant 10 mL de toluène comme solvant, 1 mmol de propargylamine et sont traités à trois températures différentes (60 ; 80 et 100 °C) pendant 24 h. Ce greffage a aussi été réalisé sous agitation dans un ballon monté d'un reflux. Après réaction, les réactifs en excès sont éliminés par extraction au Soxhlet avec de l'acétone pendant 24 h. Enfin, les échantillons sont séchés à 80 °C.

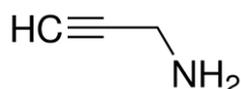
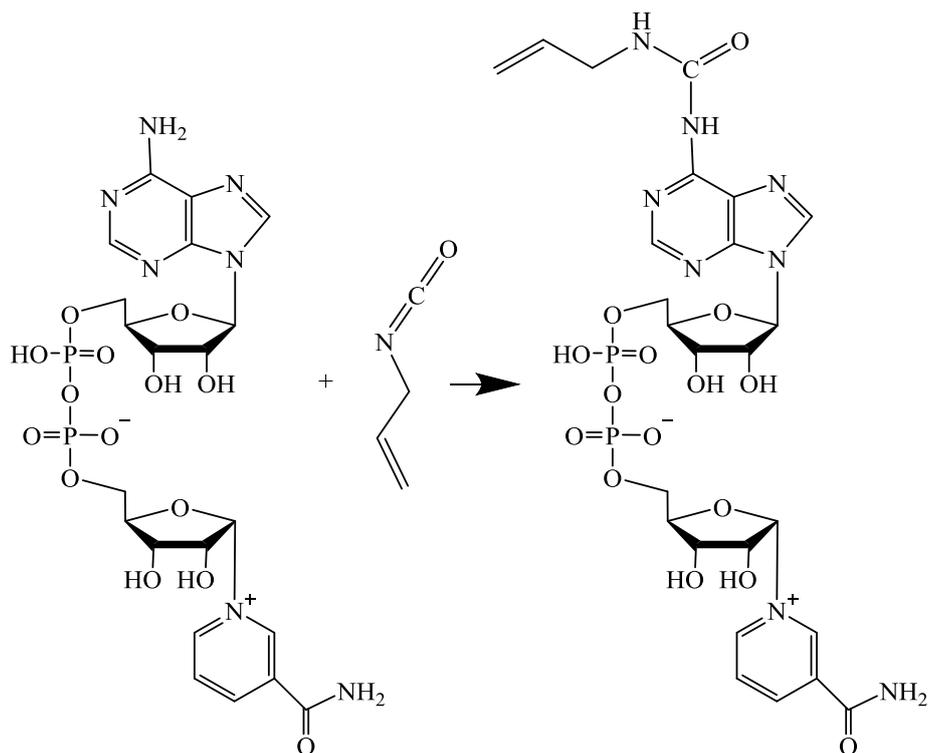


Figure 35. Structure chimique du propargylamine.

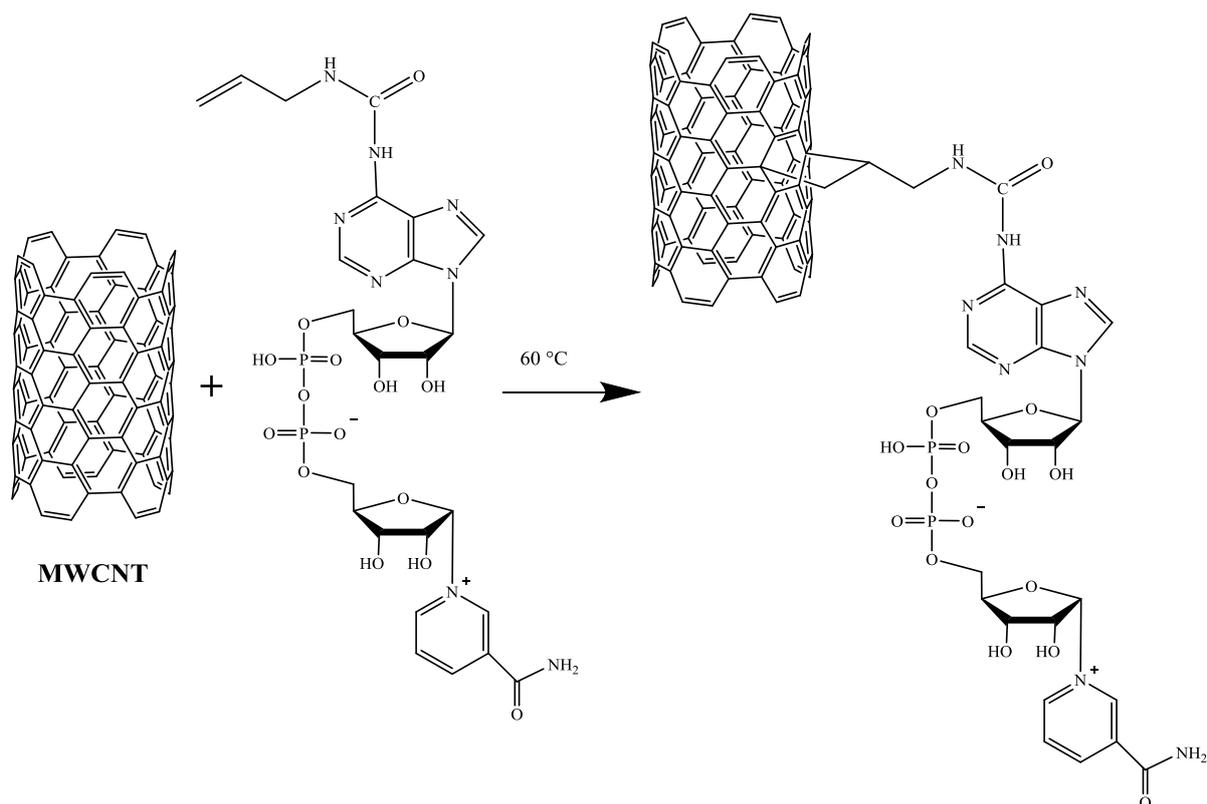
### 2.4.2.2. Immobilisation du cofacteur sur nanotubes de carbones par voie Diels-Alder

La première étape consiste à solubiliser 50 mg du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide  $\text{NAD}^+$  dans 0,5 mL diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant 6 heures jusqu'à obtention d'une solution limpide. Ensuite, 5,8  $\mu\text{L}$  d'allyl isocyanate sont rajoutés à cette solution. La réaction entre le  $\text{NAD}^+$  et l'allyl isocyanate est très rapide (20 minutes) (fig. 36).



**Figure 36.** Réaction entre le NAD<sup>+</sup> et l'allyl isocyanate.

Par la suite 20 mg de nanotubes de carbones multi-parois (6 - 9 nm de diamètre, ~5 µm de longueur et une pureté > 95 %), traduction littérale de *Multi-Walled Carbon NanoTubes* « *MWCNTs* » sont rajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est placé sous agitation pendant 18 heures et ensuite chauffé à 60 °C pendant 7 heures toujours sous agitation. Les MWCNTs modifiés ont été lavés trois fois à l'eau distillée (pour éliminer les NAD<sup>+</sup> qui n'ont pas été greffés sur les MWCNTs, l'eau étant un très bon solvant pour le NAD<sup>+</sup>) et centrifugés afin d'éliminer le solvant et séparer les MWCNTs.



**Figure 37.** Greffage du NAD<sup>+</sup> sur MWCNT par Diels-Alder.

Après avoir immobilisé le cofacteur (NAD<sup>+</sup>) sur MWCNTs en utilisant comme espaceur l'allyl isocyanate (AI), des essais de régénération de ce dernier par voltammétrie cyclique ont été réalisés afin de valider l'immobilisation du cofacteur sur les MWCNTs, et essayer de le régénérer sous sa forme réduite NADH.

Un essai d'immobilisation du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide sur un monolithe **C-RF** broyés (20 mg) a été également effectué en suivant le même mode opératoire utilisé pour l'immobilisation sur MWCNTs.

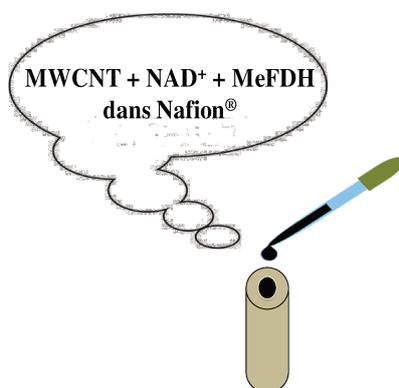
## 2.5. Tests électrochimiques de régénération du NADH

Des essais de régénération du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide par voie électrochimique ont été réalisés en utilisant un potentiostat VSP-300 BioLogic. Les essais ont été effectués avec des électrodes de carbone vitreux tournantes montées sur un appareil RRDE-3A (*Rotating Ring Disk Electrode*), une contre électrode en fil de platine et une électrode de référence Ag/AgCl, KCl saturée. Les essais sont pilotés par le logiciel EC-Lab

V10.40 qui permet l'obtention des courbes courant/potentiel. Les électrodes sont plongées dans 25 mL d'électrolyte (solution tampon phosphate 0,1 M pH 6,3). L'électrolyte est dégazé préalablement en barbotant de l'argon ou du CO<sub>2</sub> pendant 20 min.

### 2.5.1. Régénération du cofacteur et électrocatalyse

Afin de valider le fait que le cofacteur NAD reste actif d'un point de vue enzymatique après immobilisation, une encre a été préparée, déposée sur une électrode de carbone vitreux et étudiée en voltammétrie cyclique. L'encre contient des nanotubes de carbone (3,4 mg MWCNTs), le cofacteur non immobilisé (8,5 mg NAD<sup>+</sup>), la formiate déshydrogénase MeFDH (30 mg), 300 µL de Nafion et 300 µL de solution tampon phosphate. Ce mélange a été homogénéisé au bain ultrason pendant 5 min à 0°C (dans un bain de glace). Après dispersion, 5 µL de cette encre sont déposés sur des électrodes de carbone vitreux préalablement polies (fig. 38).



**Figure 38.** Dépôt des encres sur GCEs.

Cette électrode est plongée dans une solution tampon phosphate contenant 200 mM de carbonate de sodium soumis préalablement à un barbotage de CO<sub>2</sub> pendant 20 min. Trois cycles de voltammétrie cyclique sont effectués en balayant le potentiel à une vitesse de balayage de 50 mV.s<sup>-1</sup> entre -1,4 et 0,6 V vs. Ag/AgCl / KCl.

Des essais similaires ont été réalisés avec des MWCNTs modifiés, nommés MWCNT-AI-NAD (sur lesquels le NAD<sup>+</sup> est immobilisé de manière covalente avec l'espaceur allyl isocyanate). Dans ce cas, l'encre contient 12 mg MWCNT-AI-NAD et 30 mg MeFDH dispersés dans 300 µL de Nafion et 300 µL de solution tampon phosphate. Le mélange a été

dispersé dans un bain ultrason à 0°C puis déposé sur une électrode de carbone vitreux selon la même procédure que celle décrite précédemment.



## Chapitre 3 - *Monolithes à porosité hiérarchique*

La synthèse de matériaux à porosité hiérarchisée (*i.e.* présentant une porosité à différentes échelles de tailles) est aujourd'hui un important domaine de recherche. Ces matériaux sont utilisés dans de nombreuses applications. En effet, ces textures allient les avantages structuraux des macropores (pores dont le diamètre ( $\varnothing_{\text{pore}}$ ) est supérieur à 50 nm), et les avantages des pores plus petits (micro et mésopores ( $\varnothing_{\text{pore}} < 2 \text{ nm}$  et  $2 \text{ nm} < \varnothing_{\text{pore}} < 50 \text{ nm}$ , respectivement))<sup>115</sup> pour former des matériaux aux propriétés améliorées. En effet, les macropores permettent le transport de la matière et l'accessibilité au sein du matériau, offrant la possibilité de l'utiliser sous forme monolithique, tandis que les micro-mésopores augmentent la surface spécifique et génèrent des sites actifs pour l'adsorption, la fonctionnalisation de surface, les réactions catalytiques et biocatalytiques (voir Chapitre 1).

Dans ce contexte, ce chapitre est dédié à la synthèse de matériaux monolithiques à base de silice et carbone par différentes approches. Ces monolithes seront utilisés en biocatalyse et plus particulièrement dans des réacteurs enzymatiques en flux continu.

C'est dans cette optique que mon travail consiste d'abord à synthétiser différents types de monolithes à porosité hiérarchique. Des monolithes inorganiques à base de silice ( $\text{SiO}_2$ ) seront obtenus par décomposition spinodale. Ces monolithes présentent (i) des macropores avec des diamètres contrôlés (de 3 à 40  $\mu\text{m}$ ) afin d'assurer le transport de matière à travers le monolithe tout en minimisant la perte de charge ; et (ii) des mésopores avec des diamètres entre 10 et 20 nm qui devraient permettre l'immobilisation d'enzymes en vue de l'application visée dans ce travail de thèse. Ces monolithes de silice peuvent aussi servir d'empreinte « dure » pour la synthèse de monolithes carbonés avec une porosité hiérarchique finement contrôlée très proches du moule de départ. Des matériaux carbonés à porosité hiérarchique seront également préparés par décomposition spinodale en s'inspirant du mode opératoire décrit par Hasegawa *et al.*<sup>63</sup> Cette voie permet d'obtenir des monolithes de carbone semi graphitisés. Cependant, elle ne permet pas de contrôler la mésoporosité.

Nous nous sommes intéressés à la caractérisation texturale et structurale de tous ces monolithes ainsi qu'à l'étude de leur chimie de surface et de quelques propriétés physico-chimiques. Un contrôle morphologique, textural et structural fin devrait nous permettre de sélectionner les matériaux les plus adaptés à l'application visée.

3.1. Monolithes de silice par décomposition spinodale .....	75
3.1.1. Optimisation de la synthèse de monolithe à grand diamètre de macropores .....	76
3.1.2. Contrôle de la macroporosité.....	79
3.1.3. Contrôle de la mésoporosité .....	81
3.2. Monolithes de carbone par décomposition spinodale.....	84
3.3. Monolithes Carbonés <i>via</i> empreinte « dure » de silice.....	85
3.3.1. Fonctionnalisation des monolithes de silice par l'aminopropyl triéthoxysilane (APTES).....	87
3.3.2. Intérêt de la fonctionnalisation des monolithes de silice .....	90
3.3.3. Obtention d'une empreinte carbonée : paramètres importants .....	92
3.3.3.1. Contrôle du taux de remplissage d' <i>hydrochar</i> dans le squelette silicique.....	92
3.3.3.2. Stabilité du squelette silicique amino-fonctionnalisé en conditions hydrothermales.....	95
3.3.3.3. Caractérisation du dépôt d' <i>hydrochar</i> .....	97
3.3.4. Contrôle textural : macro- méso- microporosité.....	98
3.3.5. Contrôle structural et chimie de surface .....	111
3.4. Propriétés intrinsèques des monolithes.....	116
3.4.1. Propriétés mécaniques .....	116
3.5. Conclusions .....	117

### 3.1. Monolithes de silice par décomposition spinodale

Nous avons synthétisé des monolithes de silice ( $\text{SiO}_2$ ) avec une porosité hiérarchique par procédé sol-gel et décomposition spinodale. La première synthèse des monolithes élaborée au laboratoire permet d'obtenir des monolithes blancs et de forme cylindrique de 10 cm de longueur et de 6 mm de diamètre (fig. 39). La morphologie et les dimensions de ces monolithes sont modulables et dépendent du moule choisi. Ces monolithes présentent une macroporosité autour de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre et une mésoporosité dont le diamètre est ajustable entre 10 et 20 nm. Nous avons cherché à augmenter le diamètre des macropores pour réduire les pertes de charge et avoir une macroporosité la plus adaptée à la biocatalyse sous flux continu. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des travaux de Szymanska *et al.*<sup>97</sup>.



**Figure 39.** Photographie d'un monolithe de silice

Les monolithes de silice synthétisés sont nommés **SiO<sub>2</sub>-X-Y** (où  $\text{SiO}_2$  fait référence à la nature du monolithe de silice, X correspond à la taille des macropores en micromètres et Y correspond au diamètre des mésopores en nanomètres) comme présenté dans le tableau suivant (tableau 7).

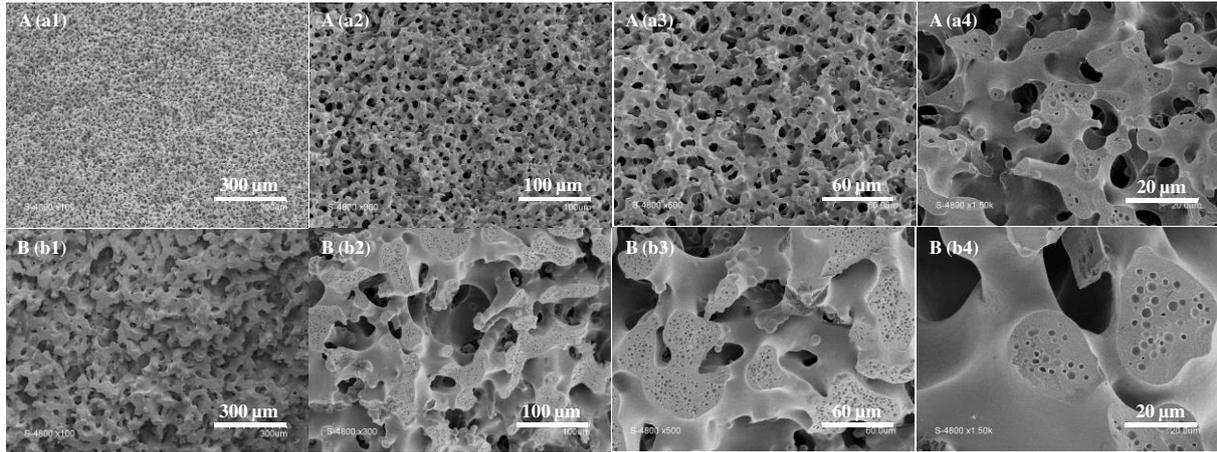
**Tableau 7.** Nomenclatures des monolithes de silice synthétisés

Nomenclatures	Nature	Diamètre des macropores ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre des mésopores (nm)
<b>SiO<sub>2</sub>-3-8</b>	Silice	3,5	8
<b>SiO<sub>2</sub>-3-10</b>	Silice	3,5	10
<b>SiO<sub>2</sub>-3-20</b>	Silice	3,5	20
<b>SiO<sub>2</sub>-40-20</b>	Silice	41 $\pm$ 4	20

La synthèse des monolithes de silice avec un diamètre de macropores de 5  $\mu\text{m}$  a bien été optimisée au laboratoire auparavant pour avoir une bonne répétabilité.<sup>91</sup> En ce qui concerne la synthèse des monolithes de silice avec un diamètre de macropores plus large, des soucis liés à la répétabilité de la synthèse ont été rencontrés. Ceci nous a conduit à optimiser le mode opératoire suivi lors de cette synthèse.

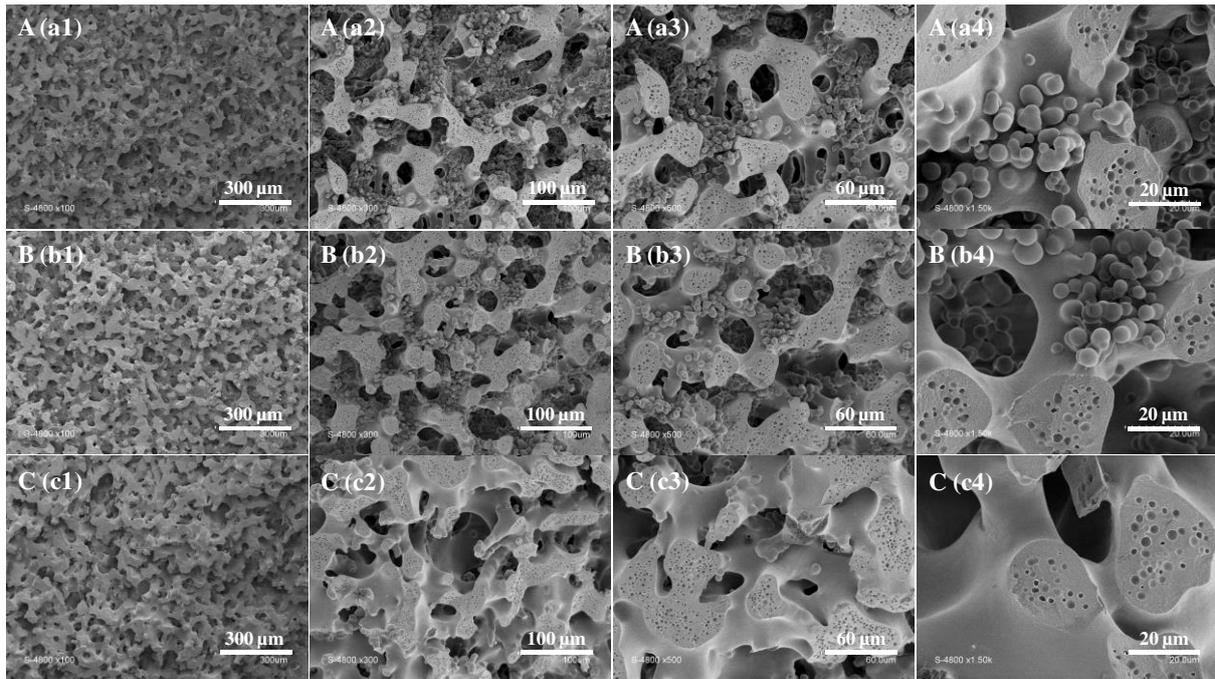
### **3.1.1. Optimisation de la synthèse de monolithe à grand diamètre de macropores**

Afin d'obtenir un diamètre de macropores plus large et homogène, nous nous sommes inspirés des travaux de Szymanska *et al.*<sup>97</sup> où des monolithes du type **SiO<sub>2</sub>-40-20** ont été synthétisés. Différentes expériences ont été réalisées afin d'optimiser les conditions opératoires pour obtenir ces monolithes. En effet, nous constatons que différents paramètres expérimentaux influencent la structure du squelette silicique ainsi que le diamètre des macropores, comme par exemple, la manière dont le TEOS est ajouté lors de la synthèse. La première expérience a consisté à ajouter le TEOS goutte à goutte à la solution (eau-acide nitrique et PEG 35 000 Da) alors que dans la deuxième expérience le TEOS a été ajouté 10 mL par 10 mL. Les résultats obtenus prouvent que la manière avec laquelle le TEOS est ajouté influence le diamètre des macropores. En effet, pour l'ajout goutte à goutte, nous obtenons une distribution des tailles des macropores ainsi qu'une structure silicique bien homogènes comme le montre les clichés MEB (fig. 40A). Cependant, le diamètre des macropores est plus petit (10 – 20  $\mu\text{m}$ ) que le diamètre souhaité (entre 35 et 50  $\mu\text{m}$ ). En revanche, dans le cas où le TEOS est ajouté par 10 mL à la solution, nous remarquons, d'après les clichés MEB (fig. 40B), que nous atteignons le diamètre des macropores souhaité avec une distribution des tailles de diamètres entre 35 et 50  $\mu\text{m}$ .



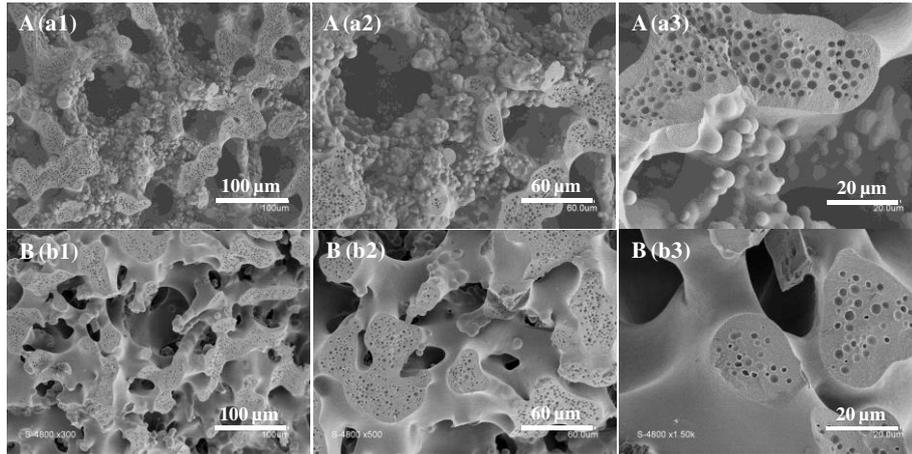
**Figure 40.** Clichés MEB : Influence de la manière de l'ajout du TEOS sur la macroporosité : (A) ajout goutte à goutte (B) ajout 10 mL par 10 mL.

Le deuxième paramètre expérimental étudié est le temps de séjour (4, 5 et 11 jours) des monolithes (dans les tubes en PVC) dans le bain à 40 °C lors de la transition sol-gel et la décomposition spinodale. Les monolithes issus des différents temps de séjour ont subi tous le même post-traitement à l'hydroxyde d'ammonium 1 M à 100 °C pendant 24 h pour générer la mésoporosité (voir section 3.1.3) et une calcination à 550 °C sous air pour éliminer le polyéthylène glycol. Nous constatons que plus le temps de réaction à 40 °C est long, plus le squelette silicique est lisse et homogène. Pour le temps de séjour 4 jours, nous observons sur les clichés MEB de la fig. 41 des nodules sur toute la surface macroporeuse du monolithe de silice. Ces nodules sont moins importants pour le temps de réaction 5 jours et disparaissent pour un temps de séjour de 11 jours à 40 °C qui sera appliqué par la suite pour obtenir une surface homogène.



**Figure 41.** Clichés MEB : Influence du temps de séjour des monolithes silicique à 40 °C (A) 4 jours, (B) 5 jours et (C) 11 jours, lors de la transition sol-gel et la décomposition spinodale sur le squelette silicique.

Le troisième paramètre expérimental étudié est la qualité de l'eau utilisée dans la synthèse pour la préparation de la solution d'acide nitrique 1 M. Deux sources d'eau ont été testées pour cette optimisation : une eau avec une résistivité de 18 M $\Omega$ .cm et une eau de résistivité 15 M $\Omega$ .cm. En se basant sur les clichés MEB (fig. 42 A et B) des deux monolithes obtenus à partir des deux synthèses, nous remarquons que nous obtenons une structure silicique plus lisse et une macroporosité plus homogène en utilisant une eau de résistivité 15 M $\Omega$ .cm. A ce stade nécessaire, une étude plus poussée serait nécessaire pour mieux comprendre l'influence de la présence de sels minéraux sur le mécanisme de décomposition spinodale.

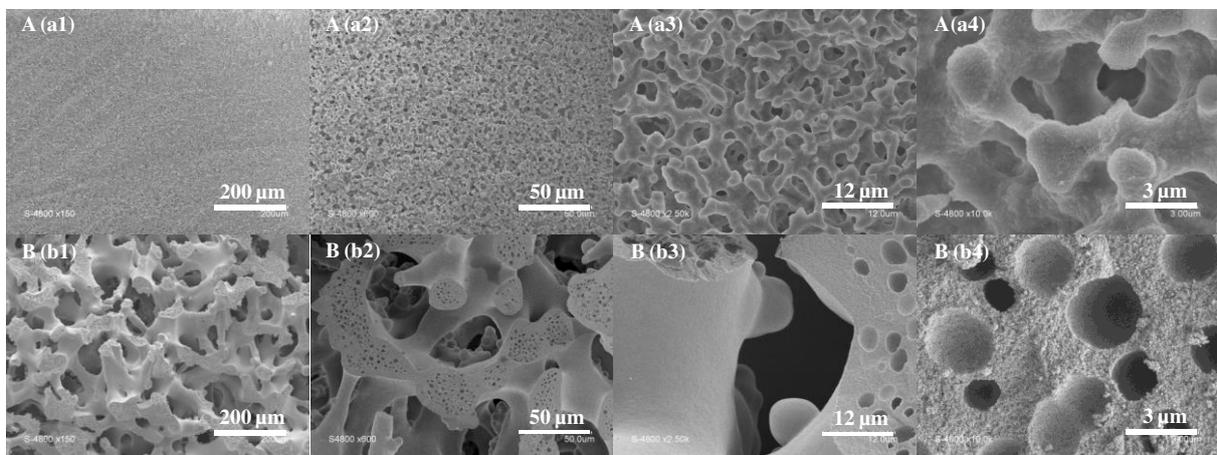


**Figure 42.** Clichés MEB : Influence de la résistivité de l'eau utilisée (A) 18,2 MΩ.cm (B) 15 MΩ.cm sur la structure silicique et le diamètre des macropores.

### 3.1.2. Contrôle de la macroporosité

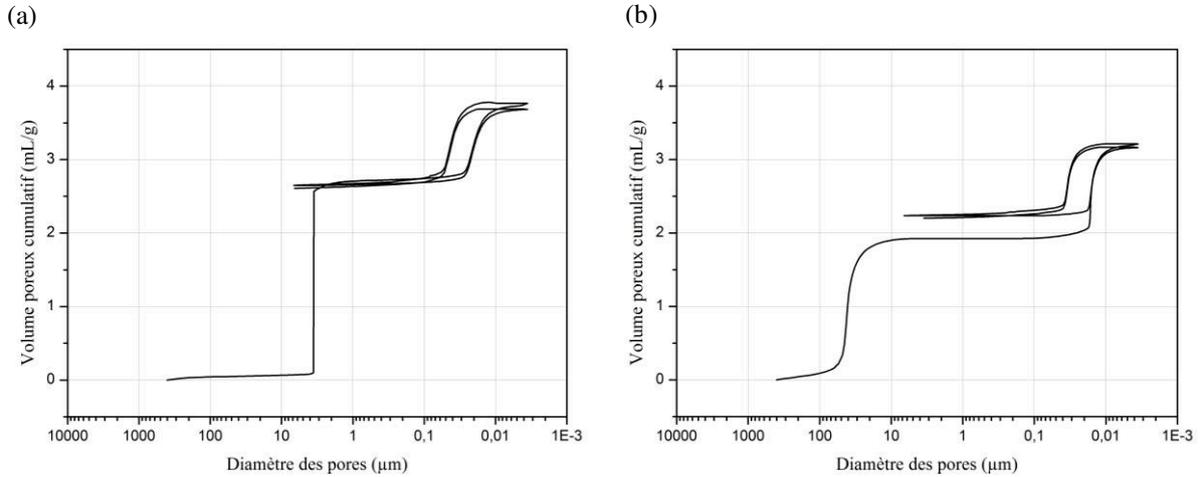
Pour les monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-3-20** synthétisés avec du PEG 20 kDa, l'épaisseur du squelette de silice est d'environ 3 μm et le diamètre des macropores est compris entre 2 et 4 μm (fig. 43A). Pour les monolithes de silices **SiO<sub>2</sub>-40-20** synthétisé avec le PEG 35 kDa, l'épaisseur du squelette de silice est d'environ 20 μm et le diamètre des macropores est compris entre 30 et 50 μm déterminés à partir des images MEB (fig. 43B).

Sur les images MEB des monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20** (fig. 43B), nous observons dans le squelette, l'existence de petites cavités de 1 à 3 μm qui peuvent être dues à une deuxième séparation de phase qui s'effectue dans la structure lors de la synthèse.



**Figure 43.** Clichés de microscopie électronique à balayage et comparaison des deux monolithes (A) SiO<sub>2</sub>-3-20 et (B) SiO<sub>2</sub>-40-20 à une même échelle

La porosité des deux monolithes **SiO<sub>2</sub>-3-20** et **SiO<sub>2</sub>-40-20** a aussi été caractérisé par intrusion-extrusion de mercure pour confirmer les diamètres des macropores estimés par MEB.



**Figure 44.** Volume poreux en fonction du diamètre des pores (a) pour un monolithe SiO<sub>2</sub>-3-20 (b) pour un monolithe SiO<sub>2</sub>-40-20 obtenu par porosimétrie à intrusion extrusion de mercure.

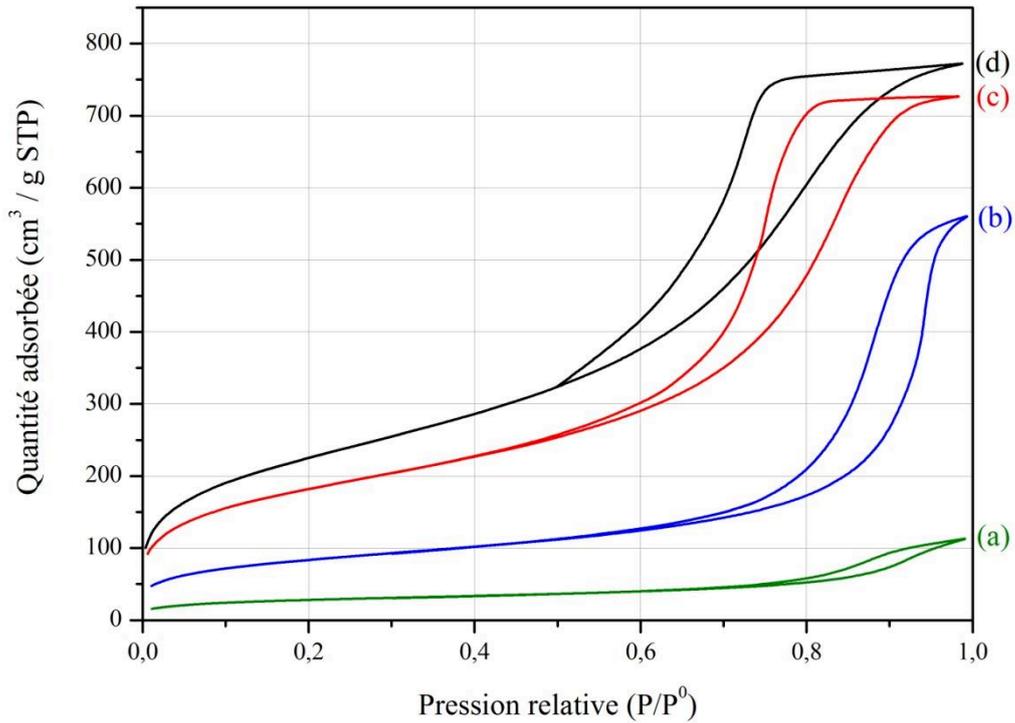
L'intrusion de mercure (fig. 44a) obtenue pour le monolithe **SiO<sub>2</sub>-3-20** montre qu'une première montée brusque en volume correspondant au remplissage des macropores jusqu'à atteindre un palier correspondant à un volume macroporeux de 2,5 mL.g<sup>-1</sup>. Le diamètre moyen des macropores est de 3,5 μm. La verticalité de la pente montre que la distribution des diamètres des macropores est étroite. La deuxième montée en volume correspond au remplissage des mésopores estimé à 18 ± 4 nm qui donne au palier le volume total de la porosité dans le monolithe estimé à 3,76 mL.g<sup>-1</sup>. L'extrusion du mercure des mésopores et le deuxième cycle d'intrusion/extrusion dans les mésopores montrent que la structure est stable et qu'il n'y a pas de pores au sein desquels le mercure resterait emprisonné. La porosité de ce monolithe est estimée à 83 % du volume total du monolithe et la porosité macroporeuse à 55 %.

L'intrusion de mercure dans le monolithe **SiO<sub>2</sub>-40-20** (fig. 44b), montre une première montée en volume jusqu'à atteindre un palier correspondant au volume macroporeux estimé à 1,9 mL/g. Cette montée est moins abrupte que celle obtenue pour le **SiO<sub>2</sub>-3-20**. Le diamètre des macropores est moins homogène et est estimé à 41 ± 4 μm. La deuxième montée en volume correspond au remplissage des mésopores dont le diamètre est estimé à 16 ± 4 nm. A la fin du remplissage, un palier est obtenu correspondant au volume total de la porosité du

monolithe estimé à 3,21 mL.g<sup>-1</sup>. A l'extrusion du mercure et pendant le deuxième cycle d'intrusion/extrusion, nous constatons que le volume extrudé est plus faible que le volume intrudé initialement, ce qui montre qu'il y a du mercure (estimé à 0,4 mL.g<sup>-1</sup>) qui reste piégé dans le monolithe. Ceci peut s'expliquer par le piégeage du mercure dans les cavités sphériques de 1 à 3 µm observées par MEB dans le squelette (fig. 43B). La porosité totale de ce monolithe est estimée à 86 % du volume total du monolithe et la porosité macroporeuse à 47 %.

### 3.1.3. Contrôle de la mésoporosité

Les monolithes de silice obtenus après la première étape de synthèse en milieu acide sont macroporeux et éventuellement microporeux après calcination. Pour obtenir de la mésoporosité, un post-traitement en milieu basique est nécessaire. En effet, la formation de la mésoporosité est assurée par la dissolution et la reprécipitation de la silice amorphe en une agrégation de nanoparticules. Ce phénomène s'explique par un procédé de Mûrissement d'Ostwald.<sup>91</sup> Grâce à ce processus, la silice sera restructurée en nanoparticules qui augmentent en taille avec l'augmentation du temps du post-traitement ou de la température dans le squelette silicique du monolithe.<sup>116</sup> Le post-traitement des monolithes de silice a été effectué avec une solution d'hydroxyde d'ammonium à différentes températures et différents temps de traitement. Les monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-3-(8, 10 et 20)** obtenus ont été caractérisés par adsorption/désorption d'azote à 77 K. Les isothermes obtenues (fig. 45) et le tableau regroupant les diamètres moyens des mésopores, les volumes mésoporeux et les surfaces spécifiques (tableau 8), montrent l'augmentation du diamètre des mésopores avec l'augmentation de la température et de la durée du post-traitement accompagnée d'une diminution du volume mésoporeux et de la surface spécifique.

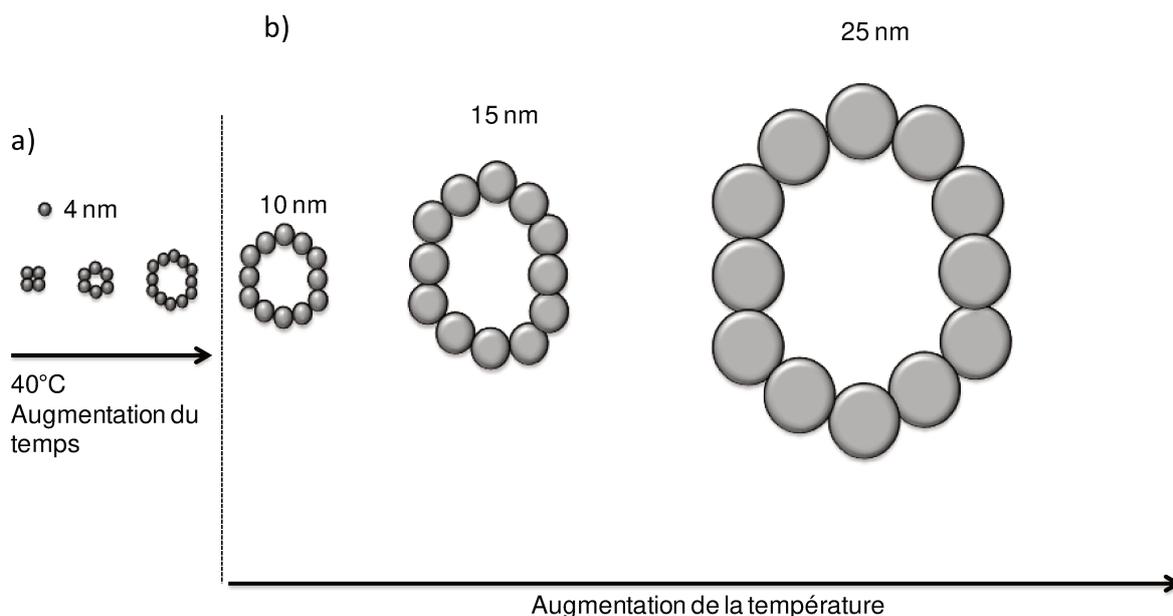


**Figure 45.** Contrôle de la mesoporosité - Isothermes d'adsorption - désorption d'azote à 77 K pour un monolithe **SiO<sub>2</sub>-3** traité à l'hydroxyde d'ammonium à (a) 140 °C pendant 24 h (b) 100 °C pendant 24 h (c) 40 °C pendant 24 h (d) 40 °C pendant 8 h.

**Tableau 8.** Résultats obtenus par la volumétrie d'adsorption désorption d'azote

<b>SiO<sub>2</sub>-3</b> traité à	Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	Volume mésoporeux (cm <sup>3</sup> /g)	Ø mésopores (nm)
40°C pendant 8h	813	1,19	8,4
40°C pendant 24h	651	1,12	10,3
<b>100°C pendant 24h</b>	302	0,87 (N <sub>2</sub> )	21,2 (N <sub>2</sub> )
		1,30 (Hg)	17 (Hg)
140°C pendant 24h	102	0,18	19,5

Le diamètre des mésopores dans la structure du monolithe augmente avec la température et la durée du traitement basique à l'hydroxyde d'ammonium. Une étude précédente a été réalisée au laboratoire et a montré que le diamètre des mésopores est ajustable entre 7 et 35 nm.<sup>117</sup> A plus haute température le processus de dissolution/reprécipitation des nanoparticules de silice entraîne la formation de plus grosses nanoparticules par mûrissement d'Ostwald (Schématisation fig. 46). Ce qui entraîne également la diminution de la surface spécifique des matériaux obtenus.



**Figure 46.** Schématisation de l'organisation des nanoparticules de silice par Murissement d'Ostwald (a) en fonction de l'augmentation du temps (b) en fonction de l'augmentation de la température.<sup>67</sup>

**Tableau 9.** Récapitulatif des monolithes de silice synthétisés et qui seront utilisés comme empreinte « dure » pour la synthèse de monolithe de carbone.

Monolithes de silice utilisés comme empreinte « dure »	Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	Volume mésoporeux (cm <sup>3</sup> /g)	Ø mésopores (nm)
SiO <sub>2</sub> -3-10	651	1,12	10,3
SiO <sub>2</sub> -3-20	302	0,87	21,2
SiO <sub>2</sub> -40-20	385	0,88	19,5

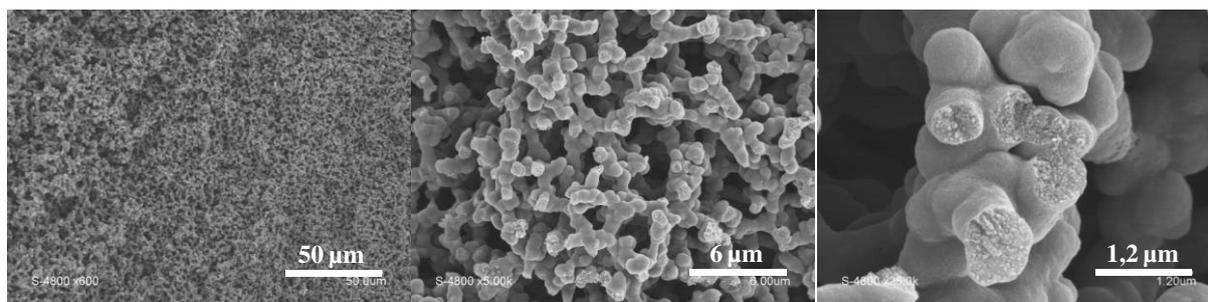
### 3.2. Monolithes de carbone par décomposition spinodale

Une synthèse de monolithe macroporeux de carbone par décomposition spinodale a été également développée par Hasegawa *et al.*<sup>63</sup> Le polymère précurseur, résorcinol-formaldéhyde (RF) est mélangé avec de l'eau et de l'éthanol sans surfactant ou polymère.<sup>63</sup> Le chlorure de fer (III) hexahydraté est ajouté pour initier la polymérisation par catalyse acide. Au cours de la polymérisation, la décomposition spinodale s'effectue.<sup>63</sup> Les monolithes macroporeux organiques, sans fissures, obtenus après séchage à 60 °C sont de couleur orange foncée (fig. 47). Ils ont une bonne résistance mécanique. Le fer permet de plus de catalyser la graphitisation à une température de 1000 °C. Le monolithe de carbone obtenu après pyrolyse est nommé **C-RF**.



**Figure 47.** Monolithe organique résorcinol-formaldéhyde avant pyrolyse

La microstructure est observée par microscope électronique à balayage (fig. 48).

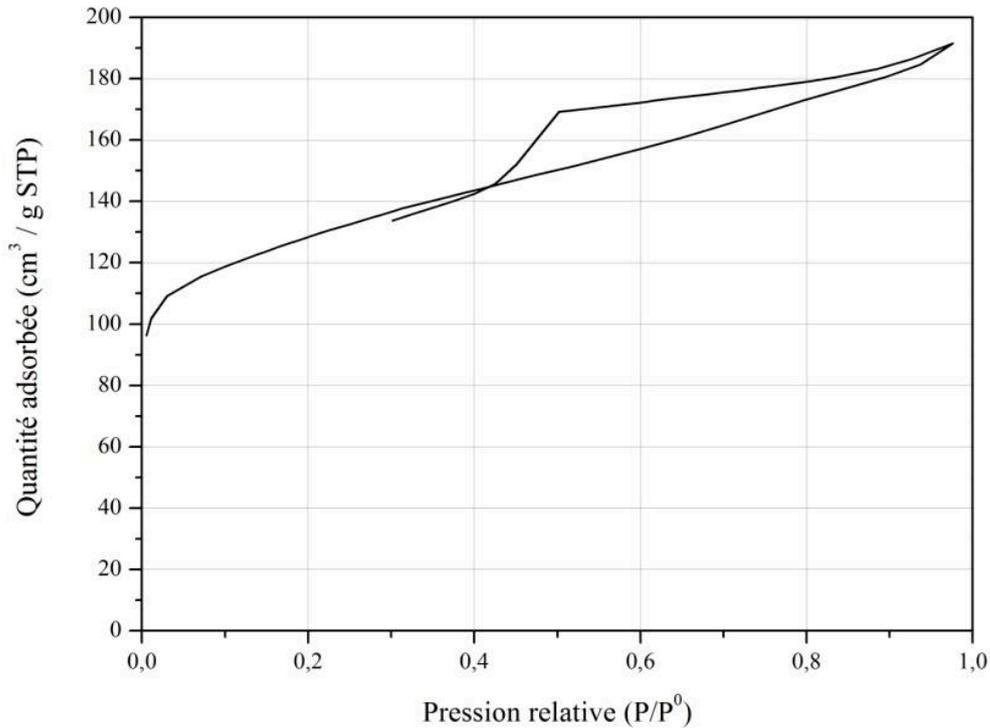


**Figure 48.** Clichés MEB du monolithe de carbone **C-RF**.

Les clichés obtenus par microscopie électronique à balayage présentent la structure macroporeuse des monolithes de carbones synthétisés en une seule étape. Cette structure macroporeuse a une distribution de taille de macropores homogène. Le squelette a une épaisseur d'environ 1 µm et les macropores ont une taille moyenne de 2 µm.

Ce monolithe **C-RF** a été analysé par adsorption/désorption d'azote à 77 K. L'isotherme obtenue (fig. 49) montre que ce monolithe présente une faible proportion de

mésopores accessibles avec une grande distribution de taille. La surface spécifique BET est évaluée à 432 m<sup>2</sup>/g.



**Figure 49.** Isotherme d'adsorption-désorption d'azote à 77 K du monolithe de carbone C-RF.

Une autre synthèse a récemment été développée par Hasegawa *et al.*<sup>64</sup> où ils ont réussi à obtenir des monolithes de carbone avec une mésoporosité bien définie. Cependant, le diamètre moyen des mésopores est de l'ordre de 3 – 4 nm, trop petit pour immobiliser les enzymes considérées dans cette thèse. Une autre alternative pour obtenir des mésopores de plus grands diamètres est de faire une empreinte « dure » des monolithes siliciques à porosité hiérarchique méso-/macroporeux.

### 3.3. Monolithes Carbonés *via* empreinte « dure » de silice

Les monolithes carbonés obtenus par empreinte « dure » de monolithes de silice ont des diamètres des macropores et volumes macroporeux proches des monolithes siliciques de départ utilisés comme moules sacrificiels. L'approche est de déposer dans la mésoporosité des monolithes siliciques des polymères de sucre qui vont boucher partiellement ou totalement la

mésoporosité des monolithes siliciques pour obtenir, après pyrolyse puis dissolution de la silice, une réplique inverse de la mésoporosité des monolithes de silice en carbone.

Le protocole expérimental consiste à fonctionnaliser les monolithes de silice par des groupements aminopropyl par silanisation avec du triéthoxy aminopropylsilane (dont le rôle sera expliqué dans la section 3.3.2) puis à imprégner ces monolithes de silice fonctionnalisés par des groupements amine ( $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ) avec une solution aqueuse de saccharose et les traiter en autoclave pour conversion hydrothermal du saccharose en *hydrochar* (voir Chapitre 2).<sup>47, 53, 118-120</sup> Après ce traitement hydrothermal, nous obtenons un monolithe composite silice/*hydrochar* de couleur brune (fig. 28). Ce monolithe composite est ensuite pyrolysé à 1000 °C sous argon pour donner le composite silice/carbone qui est ensuite traité avec de l'hydroxyde de sodium pour dissoudre la structure silicique afin d'avoir la réplique carbonée.

Les matériaux synthétisés sont nommés comme présenté dans le tableau suivant (Tableau 10).

**Tableau 10.** Nomenclatures des monolithes Composites et répliques synthétisés ( $\text{SiO}_2\text{-X-Y}$ , X diamètre des macropores en  $\mu\text{m}$ , Y diamètre des mésopores en nm). \*F pour fonctionnalisation avec APTES ; HTC pour traitement hydrothermal ; P pour pyrolyse ; et NaOH pour traitement à l'hydroxyde de sodium.

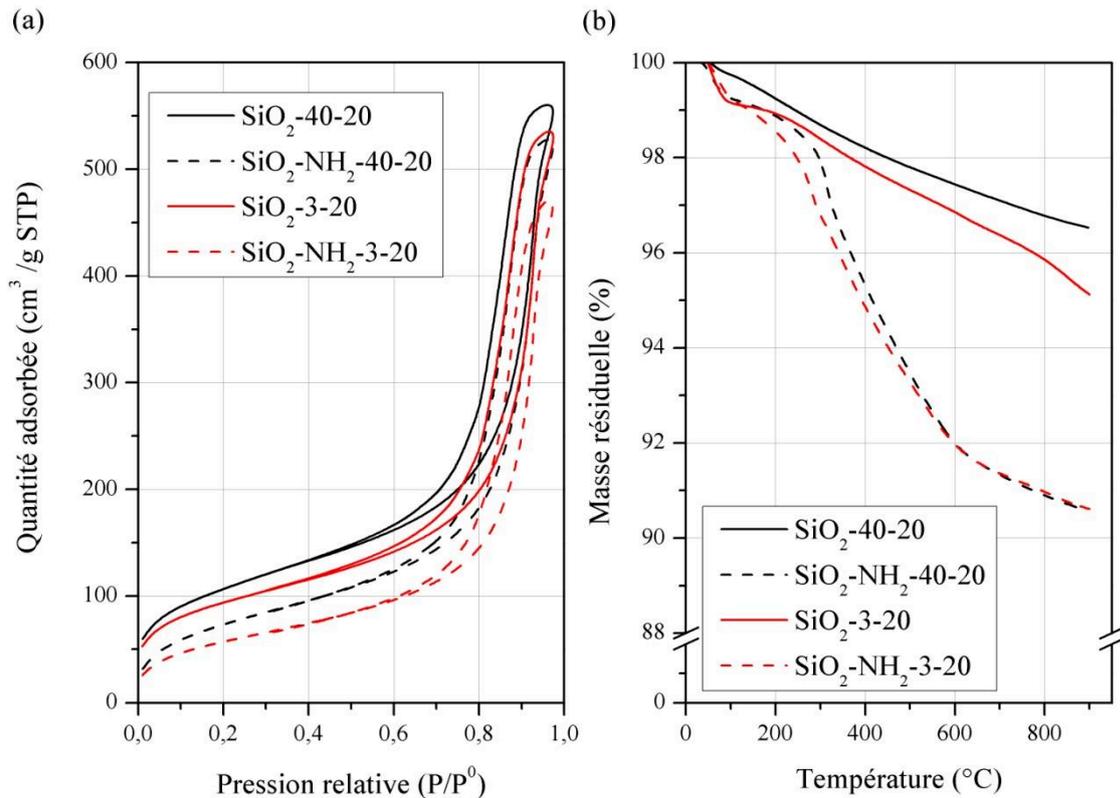
Nomenclature	Nature	Moule natif	Post-traitement*
<b><math>\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-3-10}</math></b>	Silice	-	F
<b><math>\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-3-20}</math></b>	Silice	-	F
<b><math>\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-40-20}</math></b>	Silice	-	F
<b><math>\text{SiO}_2\text{-HTC-3-10}</math></b>	Silice- <i>hydrochar</i>	$\text{SiO}_2\text{-3-10}$	F + HTC
<b><math>\text{SiO}_2\text{-HTC-3-20}</math></b>	Silice- <i>hydrochar</i>	$\text{SiO}_2\text{-3-20}$	F + HTC
<b><math>\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}</math></b>	Silice- <i>hydrochar</i>	$\text{SiO}_2\text{-40-20}$	F + HTC
<b><math>\text{SiO}_2\text{-C-3-10}</math></b>	Silice-carbone	$\text{SiO}_2\text{-3-10}$	F + HTC + P
<b><math>\text{SiO}_2\text{-C-3-20}</math></b>	Silice-carbone	$\text{SiO}_2\text{-3-20}$	F + HTC + P
<b><math>\text{SiO}_2\text{-C-40-20}</math></b>	Silice-carbone	$\text{SiO}_2\text{-40-20}$	F + HTC + P
<b>C-3-10</b>	Carbone	$\text{SiO}_2\text{-3-10}$	F + HTC + P + NaOH
<b>C-3-20</b>	Carbone	$\text{SiO}_2\text{-3-20}$	F + HTC + P + NaOH
<b>C-40-20</b>	Carbone	$\text{SiO}_2\text{-40-20}$	F + HTC + P + NaOH

Les caractéristiques des différents monolithes sont présentées dans la suite avec dans l'ordre les monolithes silicieux fonctionnalisés  $\text{NH}_2$ , les composites silice/*hydrochar*, les composites silice/carbone et les répliques carbonées.

### 3.3.1. Fonctionnalisation des monolithes de silice par l'aminopropyl triéthoxysilane (APTES)

La fonctionnalisation des monolithes de silice avec des groupements amine par greffage post-synthèse permet une répartition plus homogène du saccharose et par la suite un dépôt plus homogène de l'*hydrochar* après traitement hydrothermal.

Les monolithes de silice fonctionnalisés par des aminopropylsilane ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote à 77 K (fig. 50 (a)) et analyse thermogravimétrique (fig. 50 (b)).

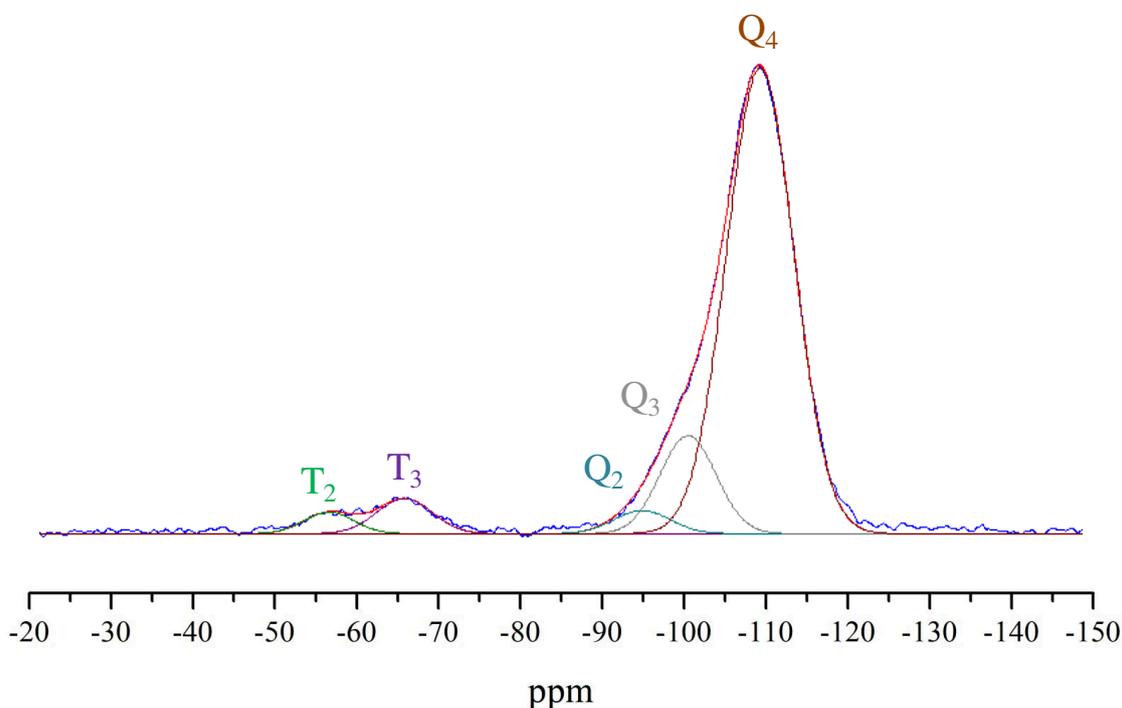


**Figure 50.** (a) Isothermes d'adsorption - désorption d'azote à 77K (b) Analyse thermogravimétrique : perte de masse en fonction de la température

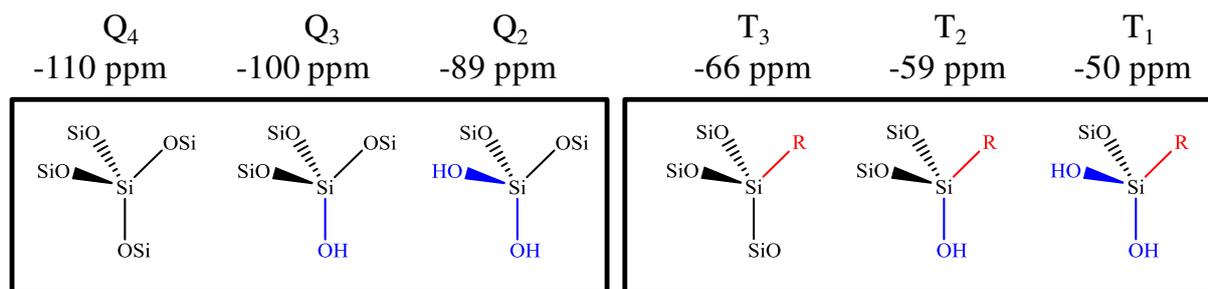
Les isothermes des monolithes  $\text{SiO}_2$  greffés par groupements propylaminosilane (fig. 50 (a)) montrent une baisse notable de la surface spécifique et du volume mésoporeux des monolithes de silice par rapport aux monolithes greffés confirmant que les greffons sont présents. Le diamètre des mésopores augmentent légèrement, montrant un mûrissement d'Ostwald supplémentaire avec la procédure de greffage (ajout de groupement basique  $\text{NH}_2$  ou de l'eau dans le lavage).

L'analyse thermogravimétrique (fig. 50 (b)), permet de calculer le nombre de greffons propylamine présents dans les monolithes de silice. Les monolithes siliciques **SiO<sub>2</sub>-3-20** ont un nombre de greffons propylamine de 0,77 mmol/g de matériaux correspondant à 1,7 greffons/nm<sup>2</sup> de silice de départ. Les monolithes siliciques **SiO<sub>2</sub>-40-20** ont un nombre de greffons de 0,95 mmol/g correspondant à 1,5 greffons/nm<sup>2</sup>. Pour rappel, les greffages ont été effectués en *batch* avec un excès de 10 greffons/nm<sup>2</sup> (voir Chapitre 2).

Les monolithes **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-40-20** (cf. 2.1.1.4) ont été caractérisés par résonance magnétique nucléaire RMN MAS du silicium <sup>29</sup>Si (fig. 51). Cette caractérisation permet de déterminer le taux de greffage des fonctions aminopropyl à la surface du matériau et de vérifier le taux qui a été déterminé par analyse thermogravimétrique. Il est important de rappeler les notations conventionnelles des attributions des pics RMN du <sup>29</sup>Si en fonction de l'environnement chimique de celui-ci (fig. 52).<sup>36</sup>



**Figure 51.** Spectre de résonance magnétique nucléaire du silicium, <sup>29</sup>Si, avec rotation de l'angle magique (MAS) du monolithe **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-40-20**.



**Figure 52.** Attributions des pics RMN MAS du  $^{29}\text{Si}$ , dans notre cas, R représente le groupement aminopropyl.<sup>36</sup>

Le spectre RMN MAS du  $^{29}\text{Si}$  pour le monolithe **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-40-20** (fig. 51), montrent des pics significatifs des espèces T<sub>n</sub> (Tableau 11) confirmant le greffage des fonctions aminopropyl sur la surface des monolithes siliciques. Afin de déterminer le nombre de greffons par nm<sup>2</sup> par RMN, il est nécessaire de déterminer la composition chimique du matériau obtenu ainsi que sa masse molaire. Pour ce faire, des déconvolutions du spectre par fonction de Voigt (*produit de convolution de deux fonctions gaussienne et lorentzienne*) permettent une décomposition et une intégration des pics correspondant aux espèces silanes présentes. Les positions des pics ainsi que leur pourcentage déterminé à partir des aires des pics obtenus par déconvolution sont rassemblés dans le tableau 11.

**Tableau 11.** Pourcentage des pics RMN MAS du  $^{29}\text{Si}$ , leur position et leur attribution.

Groupe	Notation	Position (ppm)	%
T <sub>n</sub>	T <sub>2</sub>	-56,55	2,59
	T <sub>3</sub>	-65,71	4,71
	Q <sub>2</sub>	-94,62	3,16
Q <sub>n</sub>	Q <sub>3</sub>	-100,23	13,29
	Q <sub>4</sub>	-109,00	76,25

Pour le groupe T<sub>n</sub> associés aux espèces organosilanes présentant une liaison Si-C, le pourcentage de silicium greffé par rapport au silicium total est de 4,71 %, pour les greffons tridentate et 2,59 % pour les greffons bidentate, soit 7,30 % de greffons sur les monolithes de silice.

La masse molaire du monolithe **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-40-20** de formule chimique SiO<sub>(2-x)</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>N)<sub>x</sub> où  $\frac{x}{2} = 7,3 \%$ . Nous concluons donc que la formule chimique du matériau s'écrit comme suit : SiO<sub>1,854</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>N)<sub>0,146</sub> de masse molaire 66,132 g.mol<sup>-1</sup>.

Le nombre de greffon de fonction aminopropyl peut donc être calculé :

$$N_{\text{greffon}} = \frac{\% T_n \times N_A}{100 \times S_{\text{BET}} \times M_{\text{mat}}}$$

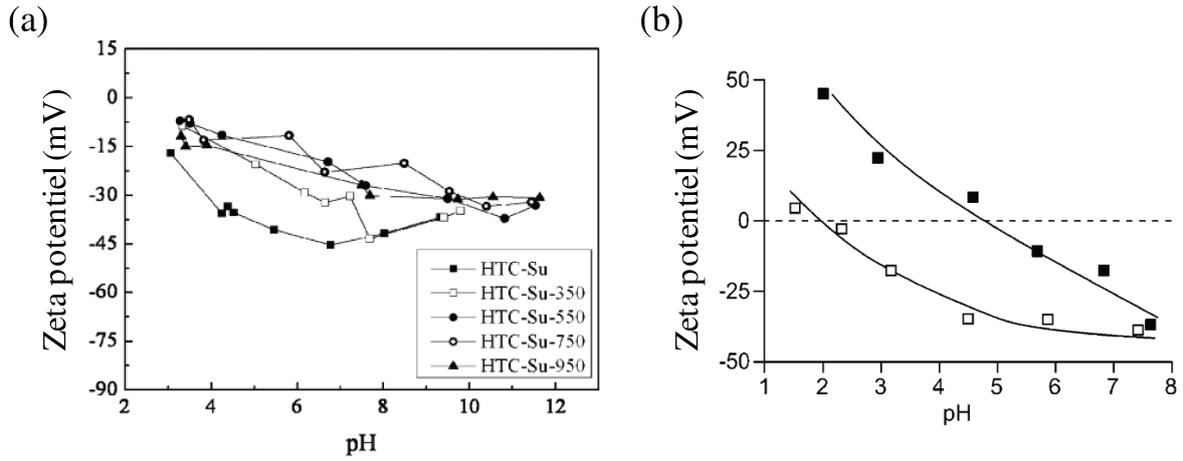
Avec - %  $T_n$  pourcentage d'espèce organosilane

- $N_A$  Nombre d'Avogadro
- $S_{\text{BET}}$  Surface BET en  $\text{nm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  du monolithe de silice non greffé
- $M_{\text{mat}}$  masse molaire du monolithe de silice greffé par APTES

Le nombre de greffon d'APTES déterminé par RMN du  $^{29}\text{Si}$  est égal à 1,7 greffon/ $\text{nm}^2$  et correspond donc à celui déterminé par analyse thermogravimétrique.

### 3.3.2. Intérêt de la fonctionnalisation des monolithes de silice

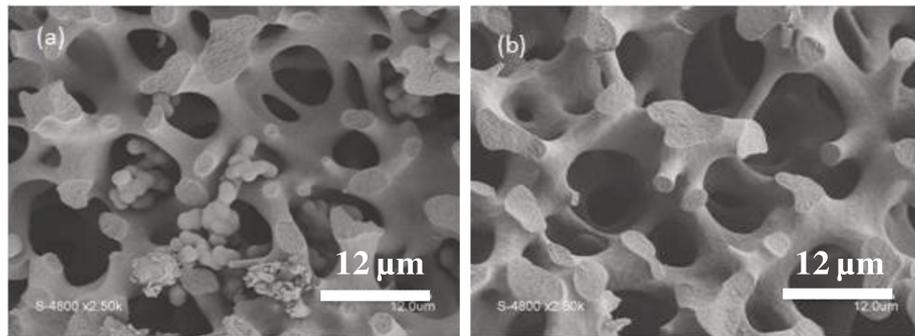
La fonctionnalisation des monolithes de silice est effectuée par un greffage post-synthèse de fonction amine à la surface des matériaux siliciques. Le greffage du 3-aminopropyl triéthoxysilane (APTES) est effectué pour garantir un dépôt homogène du saccharose sur la surface du monolithe. En effet, lors du traitement hydrothermal effectué à une température de  $180^\circ\text{C}$  et une pression de 10 bar, le pH de la solution est égal à 3. A ce pH, les précurseurs de carbone sont chargés négativement (fig. 53 (a)) ainsi que la silice non greffée, son point isoélectrique étant égal à 2.<sup>121</sup> Ceci entraîne des répulsions électrostatiques et un dépôt d'*hydrochar* hétérogène avec nucléation de microparticules d'*hydrochar* (fig. 55 (a)). En revanche, le PI de la silice greffée avec APTES déterminé par mesure de potentiel zêta est égal à 5 (fig. 53 (b)).<sup>121</sup> A pH 3, la silice fonctionnalisée présente donc une charge globale positive, et les précurseurs de carbone chargés négativement se répartissent de façon homogène sur les charges positives du monolithe par interactions électrostatiques (fig. 54(b)). Un dépôt homogène de l'*hydrochar* sur le squelette silicique et dans ses mésopores est obtenu. (Fig. 55 (b)).



**Figure 53.** (a) Potentiel Zeta de l'*hydrochar* traité hydrothermalement dérivé du saccharose et pyrolysé à différente température en fonction du pH<sup>122</sup> (b) Potentiel Zeta du SiO<sub>2</sub> (cercle vide) et le SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (cercle remplie) en fonction du pH.<sup>121</sup>



**Figure 54.** Schématisation des états de surface des matériaux (SiO<sub>2</sub> et SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) ainsi que les interactions entre le matériau et le précurseur de l'*hydrochar*.



**Figure 55.** Clichés de microscopie électronique à balayage (a) d'un monolithe SiO<sub>2</sub> non fonctionnalisé après carbonisation hydrothermal du saccharose (b) et d'un monolithe SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> fonctionnalisé après carbonisation hydrothermal du saccharose.

Le dépôt homogène sur la silice greffée NH<sub>2</sub> peut aussi être expliqué par la réaction Maillard (fig. 56) entre le saccharose et les fonctions amines greffées du monolithe silicique.

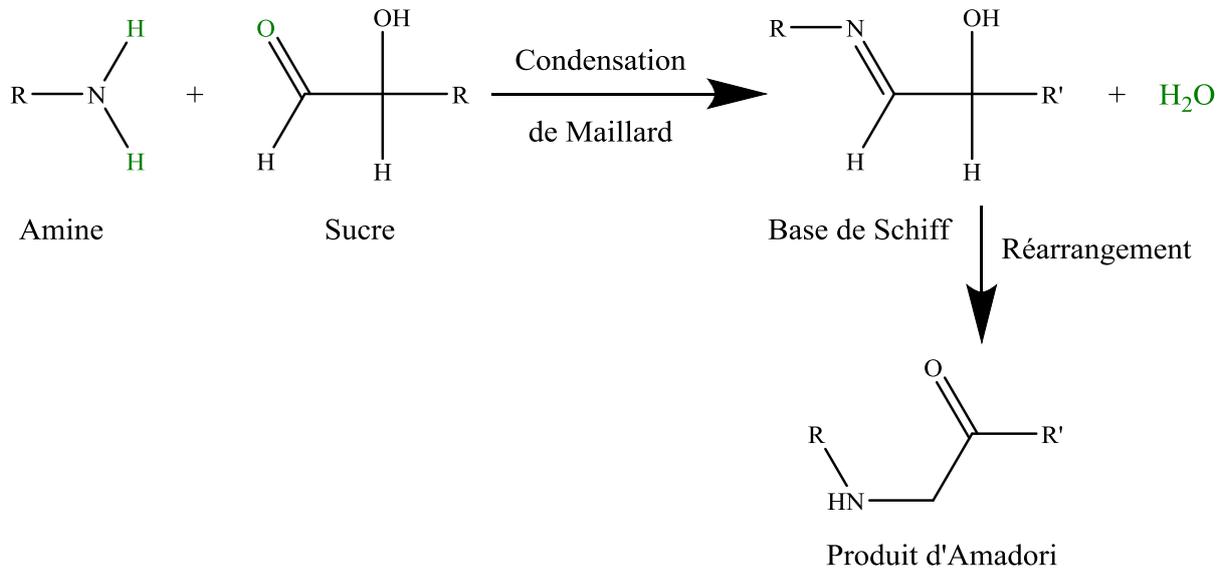


Figure 56. Réaction de Maillard.<sup>123</sup>

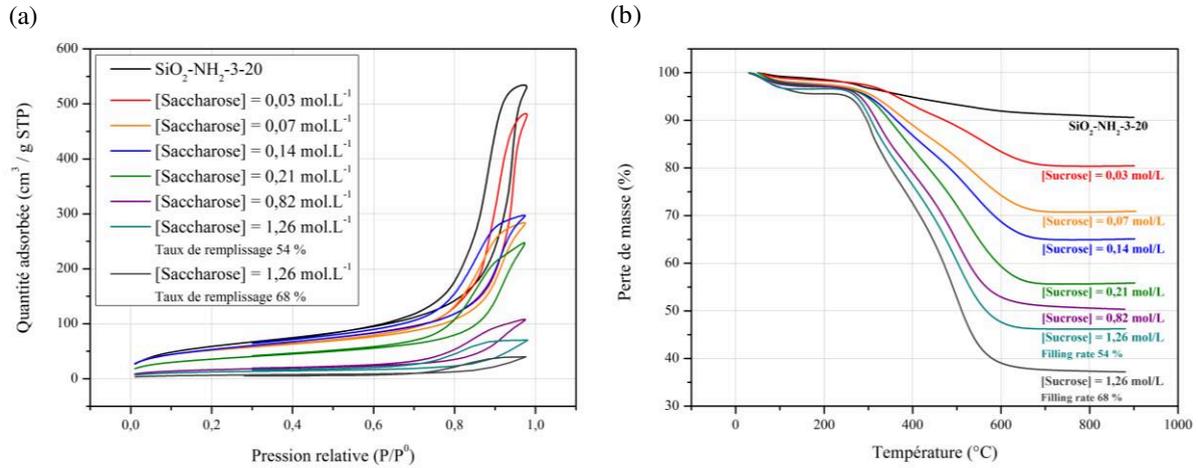
### 3.3.3. Obtention d'une empreinte carbonée : paramètres importants

Dans le but d'avoir une empreinte monolithique carbonée du monolithe de silice sans fissure et avec une bonne tenue mécanique, une étude a été menée afin de déterminer les paramètres importants permettant l'optimisation de la synthèse. Il existe différents paramètres qui influencent cette synthèse. Nous citons parmi ces paramètres : la concentration en saccharose, le taux de remplissage de l'autoclave lors du traitement hydrothermal.

#### 3.3.3.1. Contrôle du taux de remplissage d'hydrochar dans le squelette silicique

Différents essais ont été réalisés en variant la concentration en saccharose entre 0,03 et 1,26 mol.L<sup>-1</sup> tout en gardant le même taux de remplissage de l'autoclave à 54 %. Les isothermes d'adsorption-désorption d'azote (fig. 57 (a)) pour le monolithe de silice de départ fonctionnalisé NH<sub>2</sub> SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-3-20 (macro 3 μm, méso 20 nm) après traitement hydrothermal montrent une diminution du volume mésoporeux, du diamètre moyen des mésopores et de la

surface spécifique (tableau 12) avec l'augmentation de la concentration de la solution de saccharose.



**Figure 57.** (a) Isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77 K et (b) Analyses thermogravimétriques du monolithe SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-3-20 et des monolithes silice/hydrochar obtenus après traitement hydrothermal en fonction de la concentration en saccharose utilisée pour l'imprégnation et du taux de remplissage de l'autoclave.

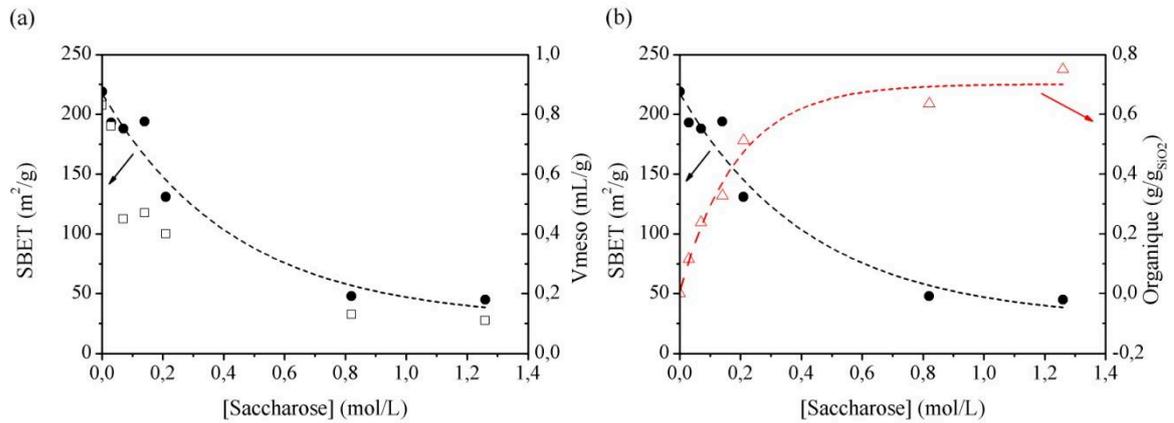
**Tableau 12.** Caractérisations des monolithes silice/hydrochar obtenus par volumétrie d'adsorption-désorption d'azote à 77K.

Taux de remplissage (%)	[Saccharose] (mol.L <sup>-1</sup> )	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Volume (mL.g <sup>-1</sup> )	Diamètre moyen des mésopores (nm)
54	<b>SiO<sub>2</sub>- NH<sub>2</sub>-3-20</b>	219	0,83	20
54	0,03	193	0,76	26
54	0,07	188	0,45	18
54	0,14	194	0,47	17
54	0,21	131	0,4	17
54	0,82	48	0,13	12
54	1,26	45	0,11	12
68	1,26	23	0,06	12

L'analyse thermogravimétrique du monolithe de silice amino fonctionnalisé de départ et des monolithes composites silice/hydrochar (Fig. 57 (b)), montre que plus la concentration en saccharose utilisée pour l'imprégnation du monolithe silice-NH<sub>2</sub> est élevée, plus la quantité

d'*hydrochar* dans la structure silicique est importante. La perte de masse augmente avec l'augmentation de la concentration en saccharose (Fig. 57(b)) d'abord très rapidement entre 0 et 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (de 0 à 35 %) puis plus légèrement pour les concentrations supérieures avec 42 % pour 1,26 mol.L<sup>-1</sup>. La silice imprégnée avec différentes solutions de saccharose, montre une diminution du volume poreux par rapport à la silice amino fonctionnalisée ce qui laisse présager une imprégnation efficace de la mésoporosité. Cette diminution n'est pas significative pour les quatre concentrations les plus basses (0,03 ; 0,07 ; 0,14 et 0,21 mol.L<sup>-1</sup>). En revanche, elle est beaucoup plus considérable pour les concentrations les plus élevées (0,82 et 1,26 mol.L<sup>-1</sup>). En ce qui concerne la solution de saccharose la moins concentrée (0,03 mol.L<sup>-1</sup>), nous constatons une augmentation inattendue du diamètre des mésopores. Cet aspect sera discuté ultérieurement (cf. 3.3.3.2).

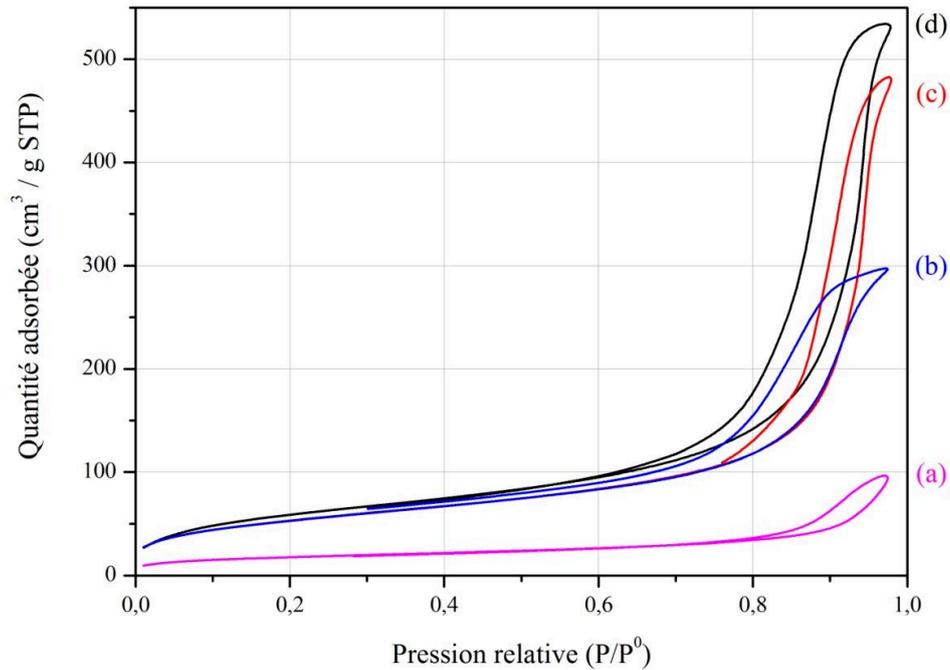
Afin d'avoir une idée sur la limite de dépôt d'*hydrochar* sur la structure silicique, nous schématisons la quantité d'*hydrochar* ( $\frac{g_{\text{organique}}}{g_{\text{Silice}}}$ ) en fonction de la concentration en saccharose à un taux de remplissage fixe 54 % (fig. 58(b) courbe rouge). Nous constatons que nous atteignons un palier pour la quantité d'*hydrochar* déposée sur la structure silicique. Et si nous augmentons le taux de remplissage à 68% tout en gardant la concentration en saccharose la plus élevée (1,26 mol.L<sup>-1</sup>), nous remarquons une augmentation de la quantité d'*hydrochar* déposée (fig. 57 (b)) et une baisse de la surface spécifique et du volume poreux (fig. 57 (a) et tableau 12). Nous pouvons affirmer que la concentration en saccharose joue un rôle important pour déposer une quantité suffisante d'*hydrochar* pour tapisser le squelette silicique et avoir un monolithe carboné qui tient après dissolution de la silice. En revanche cette empreinte carbonée peut présenter des fissures ce qui nous a poussé à augmenter le taux de remplissage de l'autoclave afin d'avoir une réplique carbonée ayant une bonne tenue mécanique après pyrolyse et dissolution de la structure silicique.



**Figure 58.** (a) Corrélation entre la concentration en saccharose et la surface spécifique (●) et le volume mésoporeux (□). (b) Corrélation entre la concentration en saccharose et la surface spécifique (●) et la quantité d'*hydrochar* déposé sur la structure silicique à un taux de remplissage de l'autoclave de 54 % ( $g_{\text{organique}}/g_{\text{SiO}_2}$ ) (Δ).

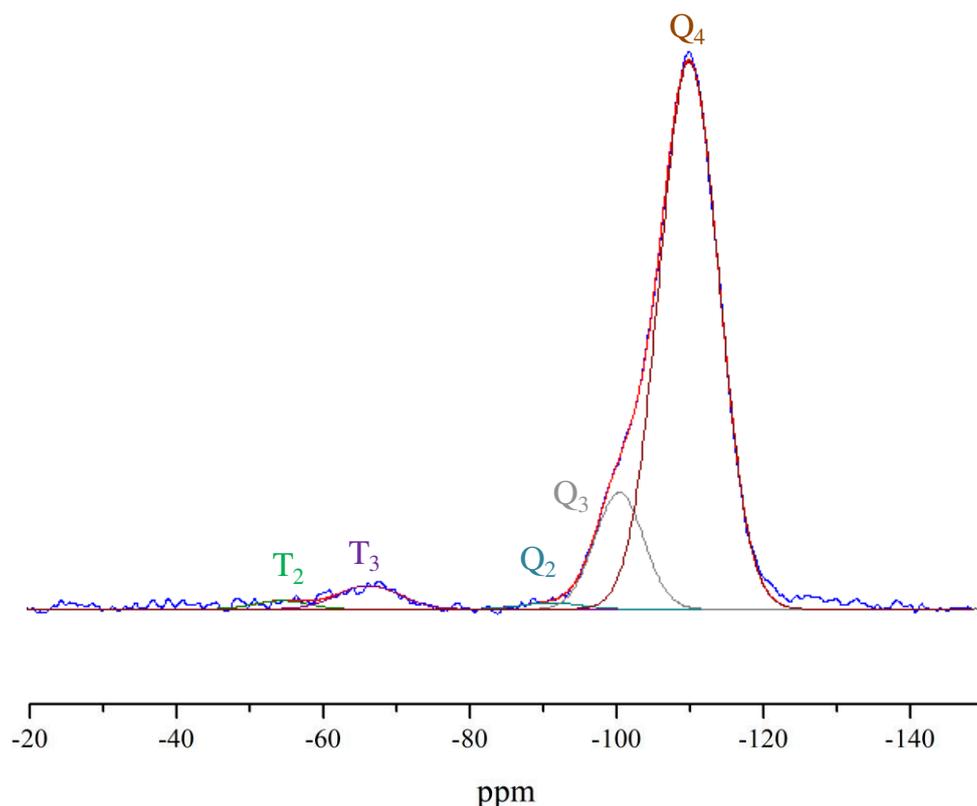
### 3.3.3.2. Stabilité du squelette silicique amino-fonctionnalisé en conditions hydrothermales

Comme mentionné précédemment, pour la synthèse utilisant la solution de saccharose la moins concentrée (0,03 mol.L<sup>-1</sup>), nous constatons une augmentation inattendue du diamètre des mésopores du squelette silicique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la quantité de saccharose n'est pas suffisante pour tapisser la surface totale du matériau. La surface du monolithe de silice est donc pleinement exposée aux conditions hydrothermales, ce qui pourrait provoquer une restructuration. Pour confirmer cela, nous avons réalisé un traitement hydrothermal d'un monolithe de silice fonctionnalisé par des fonctions amine dans l'eau sans saccharose et dans les mêmes conditions du traitement (2 h à 110 °C suivi de 16 h à 180 °C). Cette hypothèse est bien confirmée comme nous pouvons le constater sur les isothermes d'adsorption/désorption d'azote (fig. 59). En effet, le monolithe de silice qui a subi un traitement hydrothermal sans saccharose, présente un diamètre des mésopores plus grand, ainsi qu'une surface spécifique et un volume poreux plus faibles. Nous concluons alors que le traitement hydrothermal affecte la structure silicique et le fait d'avoir une quantité suffisante de saccharose pour tapisser toute la surface du monolithe permet de préserver la structure silicique d'une restructuration lors du traitement hydrothermal.



**Figure 59.** Isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77 K du (a) monolithe de silice amino fonctionnalisé traité hydrothermalement sans saccharose ; des monolithes composite silice/*hydrochar* préparés avec une solution de saccharose de concentration (b)  $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$  (c)  $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$  et (d) du monolithe de silice amino fonctionnalisé  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-3-20}$  seul.

Par ailleurs, nous avons caractérisé le monolithe composite synthétisé en utilisant les conditions opératoires optimisées (concentration la plus élevée et taux de remplissage de 68 %)  $\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}$  par résonance magnétique nucléaire RMN du  $^{29}\text{Si}$ . D'après le spectre RMN du  $^{29}\text{Si}$  (fig. 60), nous nous apercevons que même en utilisant une solution concentrée en saccharose, il y a modification de surface du monolithe silicique du fait que le pourcentage d'espèces organosilanes a baissé comparé au monolithe  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-40-20}$  avant traitement hydrothermal (tableau 13). Ceci peut être expliqué par une dissolution et restructuration de la surface silicique. Cependant ce phénomène semble être limité par le dépôt d'*hydrochar* ce qui préserve la structure silicique.



**Figure 60.** Spectre de résonance magnétique nucléaire du silicium,  $^{29}\text{Si}$ , avec rotation de l'angle magique (MAS) du monolithe  $\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}$ .

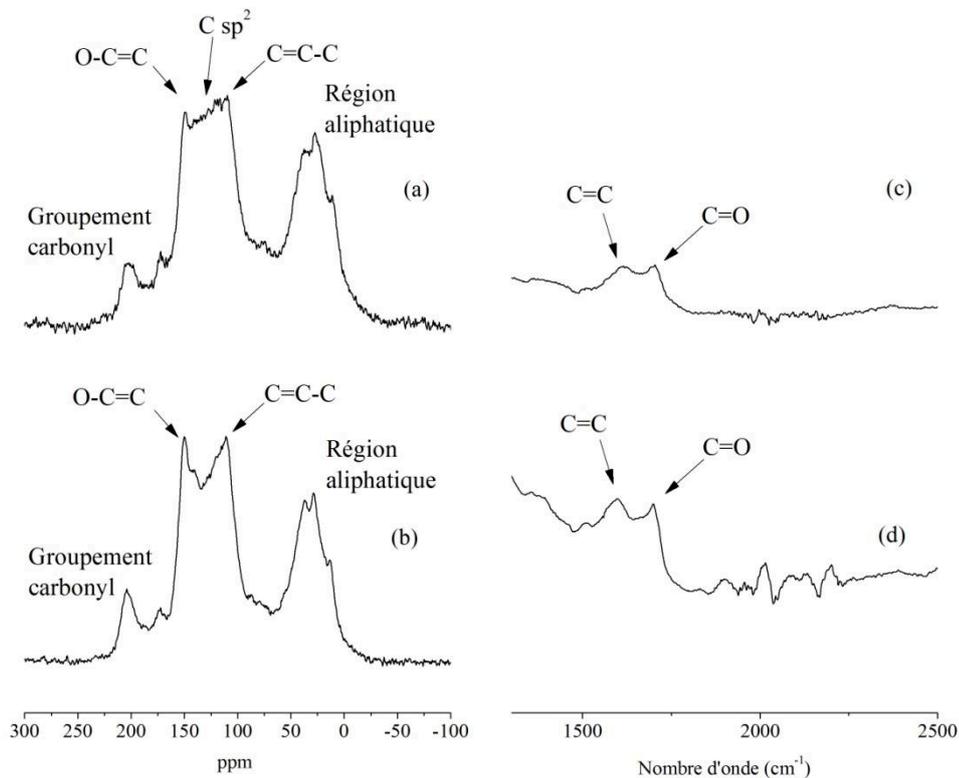
**Tableau 13.** Pourcentage des espèces organosilanes avant traitement hydrothermal ( $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-40-20}$ ) et après traitement hydrothermal ( $\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}$ ).

Groupe	Notation	Position (ppm)	% avant	% après
			traitement hydrothermal	traitement hydrothermal
$T_n$	$T_2$	-53,41	2,59	1,09
	$T_3$	-65,34	4,71	3,6
	$Q_2$	-90,19	3,16	0,93
$Q_n$	$Q_3$	-99,56	13,29	14,00
	$Q_4$	-109,08	76,25	80,38

### 3.3.3.3. Caractérisation du dépôt d'*hydrochar*

Afin de s'assurer que la nature chimique de l'*hydrochar* déposé sur le monolithe silicique est la même que celle de l'*hydrochar* généré dans l'autoclave à côté du monolithe,

nous avons caractérisé cet *hydrochar* par résonance magnétique nucléaire RMN du carbone,  $^{13}\text{C}$ , et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR (fig. 61). Nous constatons d'après ces deux caractérisations que les spectres  $^{13}\text{C}$  RMN et FTIR de l'*hydrochar* déposé sur la structure silicique sont similaires à ceux de l'*hydrochar* récupéré dispersés en solution dans l'autoclave. Seule une légère différence peut être observée sur les spectres  $^{13}\text{C}$  RMN dans la zone des carbones  $\text{sp}^2$ . Néanmoins, nous pouvons en conclure que le confinement du sucre dans la structure silicique lors du traitement hydrothermal n'affecte que très peu l'*hydrochar* obtenu *in fine*.

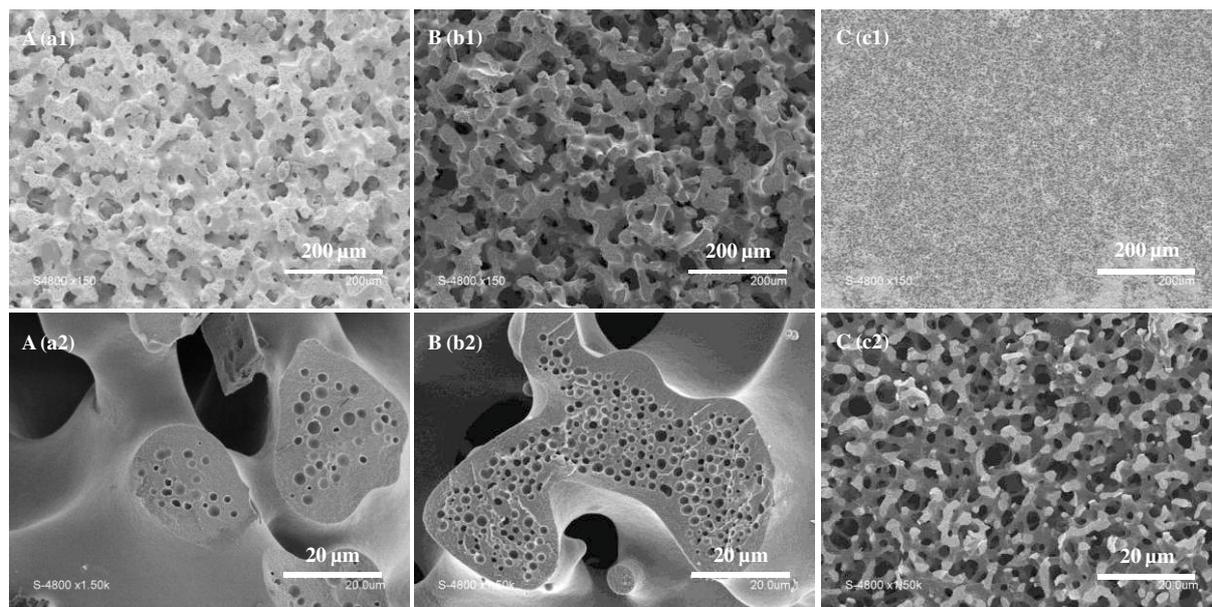


**Figure 61.** (a) Spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , pour l'*hydrochar* déposé sur le monolithe  $\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}$  ; (b) Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ , pour l'*hydrochar* généré dans l'autoclave lors de la synthèse du  $\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}$  (c) spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de l'*hydrochar* déposé sur le monolithe  $\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}$  et (d) spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour l'*hydrochar* généré dans l'autoclave lors de la synthèse du  $\text{SiO}_2\text{-HTC-40-20}$ . Attribution des pics.<sup>53, 122</sup>

### 3.3.4. Contrôle textural : macro- méso- microporosité

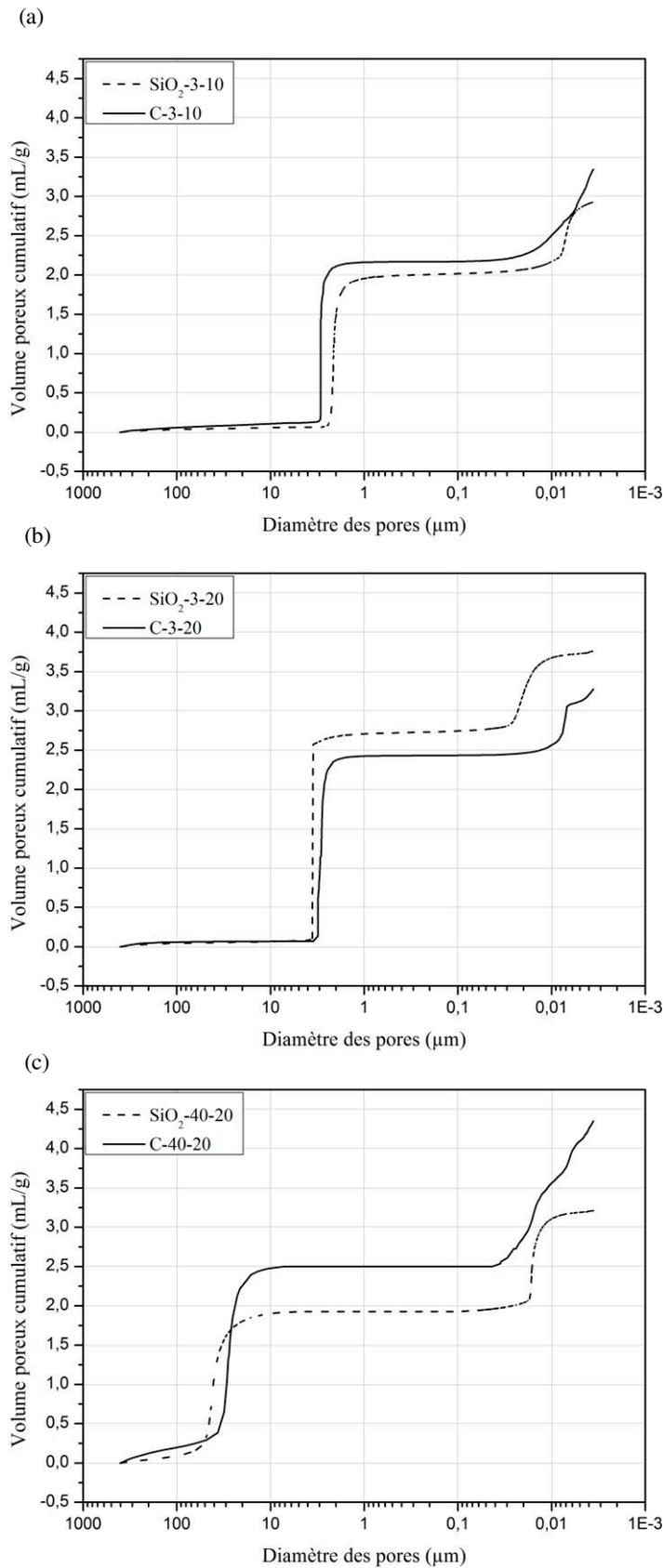
Afin d'avoir un contrôle fin de la porosité hiérarchique des monolithes carbonés obtenus par réplique inverse d'une empreinte « dure », différents essais ont été réalisés en

variant les paramètres qui influencent le contrôle textural de ces matériaux. Dans un premier temps, nous nous intéressons au contrôle de la macroporosité des monolithes carbonés. En effet, le diamètre des macropores ainsi que l'épaisseur du squelette de la réplique carbonée sont identiques à ceux du monolithe silicique utilisé comme moule sacrificiel. Comme nous pouvons le voir sur les clichés de microscopie électronique à balayage (fig. 62), les images (a1) et (a2) correspondent à un monolithe **SiO<sub>2</sub>-40-20** utilisé comme empreinte « dure » présentant une macroporosité de 35-50  $\mu\text{m}$ . La réplique de ce dernier est un monolithe de carbone **C-40-20** ayant la même macroporosité que le monolithe silicique de départ comme nous pouvons le constater sur les clichés (b1) et (b2). De plus, dans le cas où nous utilisons un monolithe de silice sacrificiel **SiO<sub>2</sub>-3-20** avec un diamètre moyen des macropores de 5  $\mu\text{m}$ , nous obtenons une réplique en carbone présentant la même distribution des macropores comme présentés sur les images (c1) et (c2) d'un monolithe **C-3-20**. Nous pouvons donc conclure que nous arrivons à contrôler finement la macroporosité des monolithes de carbone en contrôlant celle des monolithes de silice de départ.



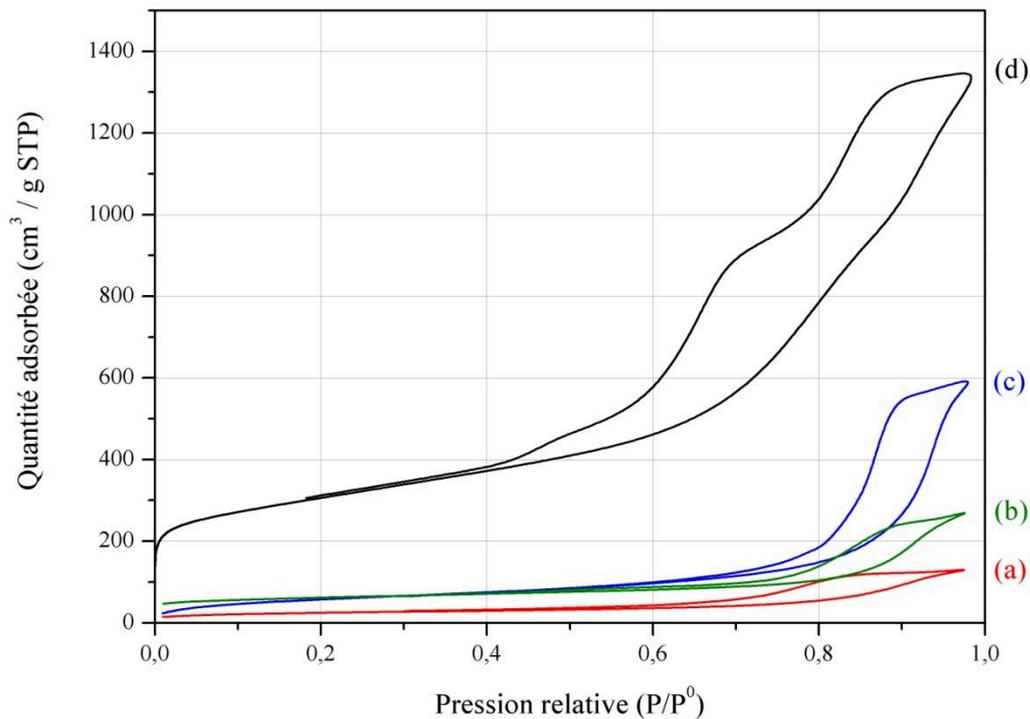
**Figure 62.** Clichés MEB (A) pour un monolithe **SiO<sub>2</sub>-40-20** (B) pour un monolithe **C-40-20** (C) pour un monolithe **C-3-20**.

Cette hypothèse est confirmée par porosimétrie à mercure où une comparaison entre les monolithes de silice de départ et les monolithes de carbone a été réalisée (fig. 63). La distribution des diamètres des macropores est quasiment la même pour le moule sacrificiel et sa réplique inverse.



**Figure 63.** Volume poreux en fonction du diamètre des pores (a) pour les monolithes **SiO<sub>2</sub>-3-10** en pointillé et **C-3-10** en trait plein, (b) pour les monolithes **SiO<sub>2</sub>-3-20** en pointillé et **C-3-20** en trait plein, (c) pour les monolithes **SiO<sub>2</sub>-3-20** en pointillé et **C-3-20** en trait plein, obtenus par intrusion-extrusion de mercure.

Dans un second temps, nous nous intéressons au contrôle de la mésoporosité des monolithes de carbone. Nous avons commencé par caractériser le monolithe **C-40-20** et nous nous intéressons par la suite à le comparer aux monolithes **C-3-10** et **C-3-20**. Pour ce faire, nous avons caractérisé le monolithe de silice de départ, le monolithe de carbone obtenu par réplique inverse ainsi que les deux monolithes composites intermédiaires silice/*hydrochar* et silice/carbone par adsorption-désorption d'azote à 77 K (fig. 64). L'isotherme (c) correspondant au monolithe de silice amino-fonctionnalisé de départ (**SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-40-20**) montre que un diamètre moyen des mésopores de 19 nm (tableau 14). Après dépôt d'*hydrochar* (**SiO<sub>2</sub>-HTC-40-20**) le diamètre des mésopores devient logiquement plus étroit, *i.e.* 11 nm, tandis que le volume et la surface spécifique diminuent significativement (isotherme (a)). Après pyrolyse (**SiO<sub>2</sub>-C-40-20**), le diamètre des mésopores grandit légèrement en raison du retrait du squelette carboné pendant le traitement thermique, tandis que la surface microporeuse augmente (isotherme (b)). Après dissolution de la silice (réplique inverse en carbone **C-40-20**), la porosité est pleinement libérée, ce qui se traduit par une augmentation de la surface spécifique ( $1100 \pm 65 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) et du volume poreux total ( $2,07 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). De manière intéressante, une mésoporosité bimodale est également révélée avec deux familles de mésopores centrés à 7 et 15 nm.

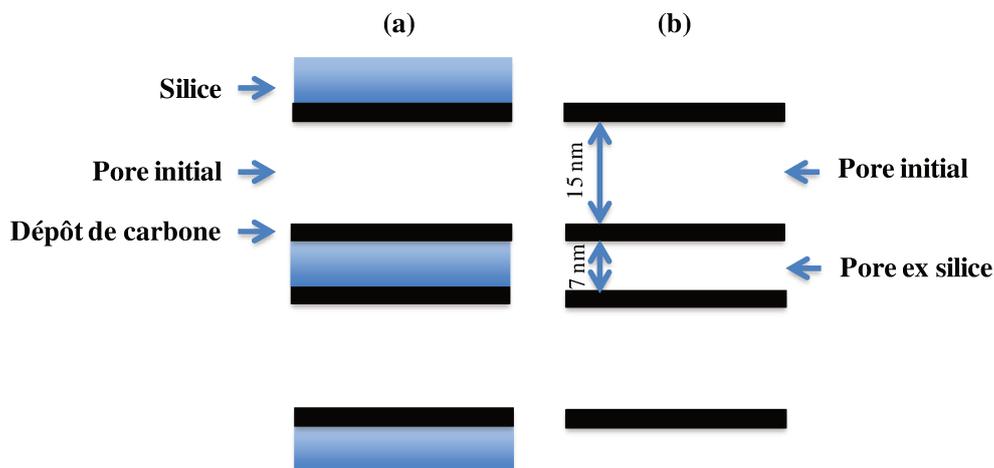


**Figure 64.** Isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77 K des monolithes (a) **SiO<sub>2</sub>-HTC-40-20**, (b) **SiO<sub>2</sub>-C-40-20**, (c) **SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-40-20**, et (d) **C-40-20**.

**Tableau 14.** Résultats obtenus par volumétrie d'adsorption/désorption d'azote à 77 K des monolithes SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>-hydrochar, SiO<sub>2</sub>-carbone et carbone.

Echantillons	Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	Volume total (cm <sup>3</sup> /g)	$\phi_{\text{mésopores}}$ BdB <sub>désorption</sub> (nm)
<b>SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-40-20</b>	215	0,9	19
<b>SiO<sub>2</sub>-HTC-40-20</b>	87	0,21	11
<b>SiO<sub>2</sub>-C-40-20</b>	215	0,43	15
<b>C-40-20</b>	1092	2,07	7 & 15

La mésoporosité bimodale du **C-40-20** est expliquée, d'une part, par la mésoporosité restante après dépôt du carbone sur le monolithe de silice (mésopores centrés à 15 nm), d'autre part, par la mésoporosité libérée lors de la dissolution de la structure silicique (mésopores centrés à 7 nm). Ceci peut être schématisé comme le montre la figure suivante (fig. 65). Sur les murs de silice (fig. 65(a)), qui ont une épaisseur de 7 nm, une fine couche de carbone d'une épaisseur estimée à 2,5 nm a été déposée. Les mésopores ne sont donc pas totalement remplis, préservant un réseau mésoporeux pour lequel le diamètre moyen des pores est estimé à 15 nm (tableau 14). La partie (b) schématise la mésoporosité de la réplique inverse en carbone. La dissolution du squelette silicique libère une deuxième famille de mésopores d'un diamètre équivalent à l'épaisseur des murs de silices, *i.e.* 7 nm.



**Figure 65.** Schématisation de la formation des mésopores (a) pour un composite silice/carbone avant dissolution de la silice (b) pour la réplique inverse en carbone après dissolution de la silice

Les trois monolithes obtenus par empreinte « dure » **C-3-10** ; **C-3-20** et **C-40-20**, ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote à 77 K afin de comparer leur mésoporosité. Les isothermes obtenues (fig. 67) montrent que les trois matériaux ont une mésoporosité différente. Pour le **C-3-10**, nous constatons qu'il ne présente pas de mésoporosité bimodale, du fait que le diamètre des mésopores issus de la mésoporosité de la silice de départ et le diamètre des mésopores générés après dissolution de la silice sont très proches. Le diamètre des mésopores déterminés par  $\text{BJH}_{\text{désorption}}$  est de 6 nm (Tableau 16). En ce qui concerne le monolithe de carbone **C-3-20**, nous nous attendions à avoir une mésoporosité bimodale comme pour le **C-40-20** étudié précédemment. En effet, ces deux matériaux présentent un diamètre de mésopores et un volume mésoporeux identiques. Cependant, nous n'arrivons pas à voir le caractère bimodal de la mésoporosité sur l'isotherme de sorption d'azote à 77 K (fig. 67). Ceci peut être expliqué par la présence de pores bloquants dans la mésoporosité, hypothèse confirmée par les courbes de balayage, discutées ultérieurement dans ce chapitre (paragraphe suivant). Une explication rationnelle concerne la différence d'épaisseur des murs mésoporeux du squelette silicique macroporeux (voir micrographies MEB fig. 43). En effet dans le cas des monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20**, l'épaisseur des murs est d'environ 20  $\mu\text{m}$  contre 3  $\mu\text{m}$  pour les **SiO<sub>2</sub>-3-20**. Plus ces murs sont épais, plus le dépôt d'*hydrochar* dans les mésopores est limité par la diffusion. De plus, les monolithes **SiO<sub>2</sub>-40-20** présentent des cavités dans la structure silicique (voir micrographie fig. 62(A)). Ces cavités représentent un volume supplémentaire dans lequel le saccharose peut migrer par gradient de concentration au cours du traitement hydrothermal et limiter ainsi la quantité d'*hydrochar* déposée dans les mésopores. Par ailleurs, nous avons constaté que le monolithe **SiO<sub>2</sub>-3-20** présente parfois des fissures après pyrolyse. Cette observation semble confirmer que les mésopores sont totalement obstrués par l'*hydrochar* déposé. Les huiles et gaz de pyrolyse confinés ont alors plus de mal à s'évacuer et peuvent provoquer des contraintes sur le monolithe générant des fissures (fig. 66).



**Figure 66.** Photographie des monolithes  $\text{SiO}_2\text{-C-3-20}$  fissuré et  $\text{SiO}_2\text{-C-40-20}$  non fissuré

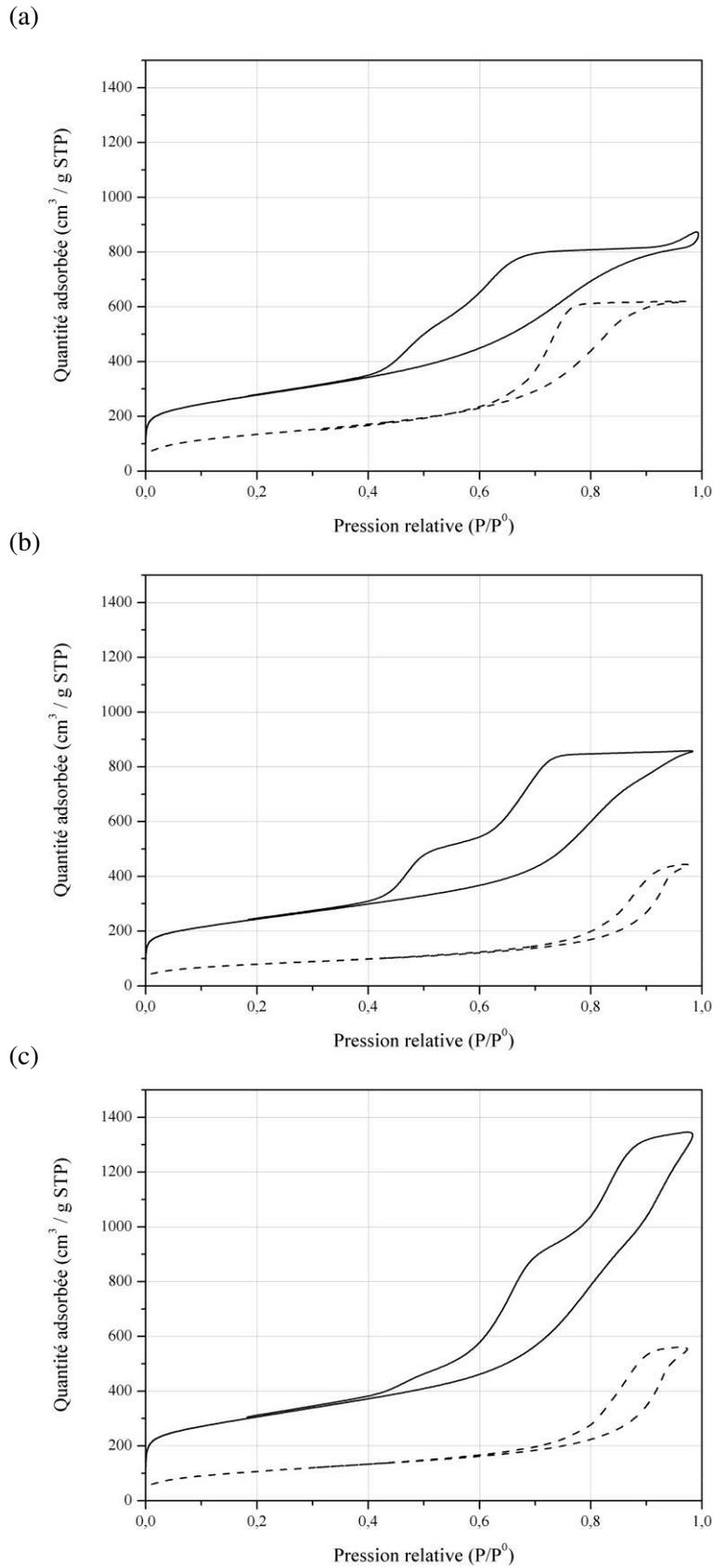
Les trois monolithes de carbone synthétisés ont été rigoureusement caractérisés par sorption d'azote (voir tableaux 15 et 16 et fig. 67). Ils présentent tous les trois une surface microporeuse et un diamètre de micropores très proches. Concernant la mésoporosité, le monolithe **C-40-20** présente un volume mésoporeux 50 % plus important que les monolithes **C-3-10** et **C-3-20**, confirmant les hypothèses développées précédemment. A noter que le diamètre des mésopores a également été déterminé par la méthode BJH (voir tableau 16) et comparé avec ceux déterminés par la méthode BdB. Comme attendu, la méthode BJH semble sous-estimer légèrement les diamètres des pores.<sup>124</sup>

**Tableau 15.** Résultats obtenus par adsorption désorption d'azote à 77 K pour les monolithes **SiO<sub>2</sub>-3-10** ; **C-3-10** ; **SiO<sub>2</sub>-3-20** ; **C-3-20** ; **SiO<sub>2</sub>-40-20** et **C-40-20**.

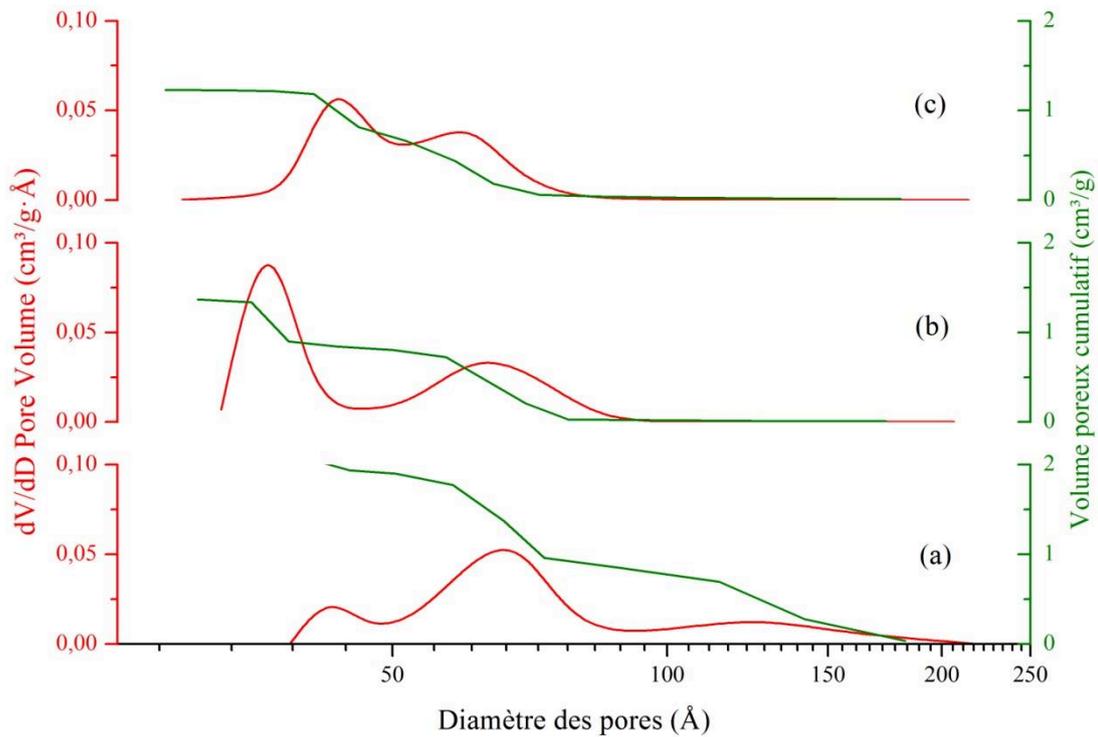
Monolithe	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )	$V_{\text{total}}$ ( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	Diamètre moyen des mésopores BdB <sub>désorption</sub> (nm)
<b>SiO<sub>2</sub>-3-10</b>	486	0,96	9,6
<b>C-3-10</b>	1136	1,33	7
<b>SiO<sub>2</sub>-3-20</b>	339	0,84	19,5
<b>C-3-20</b>	1106	1,37	8,4
<b>SiO<sub>2</sub>-40-20</b>	385	0,88	19,5
<b>C-40-20</b>	1092	2,07	7 & 15

**Tableau 16.** Résultats obtenus par adsorption désorption d'azote à 77 K pour les monolithes de carbone **C-3-10** ; **C-3-20** et **C-40-20**. \*Diamètre moyen des mésopores déterminé par la méthode BJH appliquée à la désorption. <sup>a</sup>Diamètre moyen des micropores déterminé par la méthode Horvath-Kawazoe (HK). <sup>£</sup>Volume mésoporeux déterminé par la méthode BJH appliquée à la désorption entre 17 et 502,1 Å. <sup>§</sup>Volume microporeux déterminé par la méthode Horvath-Kawazoe (HK) à  $P/P^0 = 0,169$ .

Monolithe	$\phi_{\text{més}}^*$ BJH <sub>désorption</sub> (nm)	$\phi_{\text{micro}}^a$ HK (Å)	$V_{\text{més}}^{\text{£}}$ BJH <sub>désorption</sub> ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	$V_{\text{micro}}^{\text{§}}$ HK ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )
<b>C-3-10</b>	6,11	5,59	1,33	0,42
<b>C-3-20</b>	6,98	5,52	1,37	0,36
<b>C-40-20</b>	6,9 & 12,5	5,53	2,07	0,45



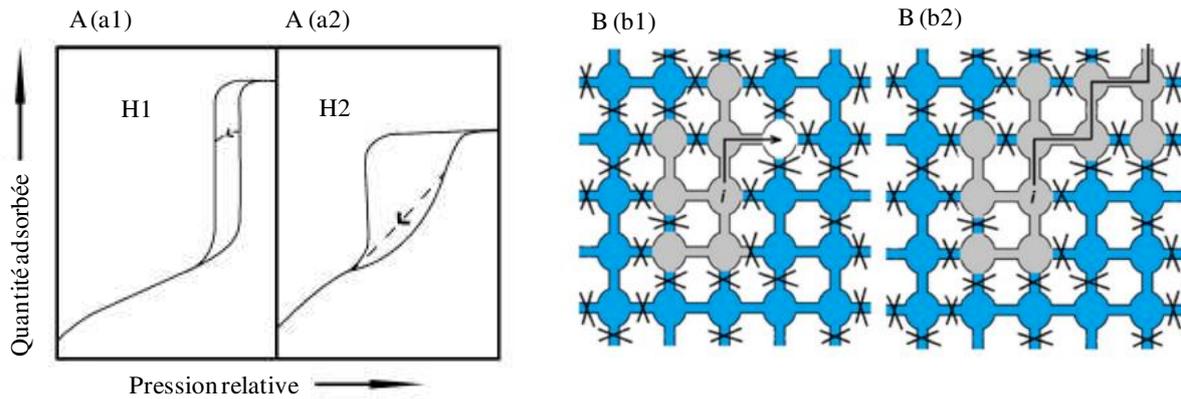
**Figure 67.** Isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77K des monolithes (a) SiO<sub>2</sub>-3-10 en pointillé C-3-10 en trait plein (b) SiO<sub>2</sub>-3-20 en pointillé C-3-20 en trait plein (c) SiO<sub>2</sub>-40-20 en pointillé ; C-40-20 en trait plein.



**Figure 68.** Distribution des diamètres des pores et volume poreux cumulé en fonction des diamètres des pores déterminés par la méthode BJH en désorption pour les monolithes (a) C-40-20 (b) C-3-20 (c) C-3-10.

Afin d'étudier la connectivité entre les mésopores nous avons eu recours aux « courbes de balayage » (*traduction littérale de l'anglicisme « scanning curves »*) pour les trois monolithes de carbone C-3-10 ; C-3-20 et C-40-20 (fig. 70). En effet, les courbes de balayage nous donnent une idée sur la structure du pore et le fait qu'il y ait un effet bloquant dans la porosité ou non. Les courbes de balayage consistent à réaliser des isothermes adsorption-désorption d'azote à 77 K pour un même échantillon tout en s'arrêtant à des pressions relatives inférieures à 1. L'allure de ces isothermes donne une idée sur la forme du pore : s'il est parfaitement cylindrique ou bien s'il présente des constriction. Il existe deux types d'isothermes qui peuvent être obtenues comme le montre la figure 69 (A) : type H1 (fig. 69 A(a1)) où la courbe retombe directement sur la courbe de désorption, dans ce cas le pore est parfaitement cylindrique et ne présente pas d'effet bloquant. Le deuxième type est le type H2 (fig. 69 A(a2)) où la courbe revient à la boucle d'hystérèse, dans ce cas le pore est accessible par des pores de taille plus petite. Ceci est expliqué par le schéma (fig. 69 B). En effet, quand nous remplissons les pores totalement ( $P/P^0 = 1$ ), l'azote reste piégé dans la plus grande

porosité et ne sera désorbé qu'à une pression relative assez basse pour passer à travers les pores de plus petites taille (fig. 69 B(b1)). Dans le cas où nous nous arrêtons à une pression relative inférieure à 1, nous ne remplissons pas totalement les pores et par conséquent l'accès aux pores les plus larges reste possible par les plus petits pores. Dans ce cas, la désorption se fait directement en baissant la pression relative ( $P/P^0$ ) et la courbe rejoint la boucle de l'hystérèse (fig. 69 B(b2)).



**Figure 69.** (A) Exemples de *courbes de balayage* de types (a1) H1 ; (a2) H2. (B) Schématisation d'un réseau poreux présentant un pore bloquant à (b1)  $P/P^0 = 1$  (b2)  $P/P^0 < 1$ .

Les courbes de balayage obtenues pour le monolithe **C-3-10** (fig. 70 (a)) sont du type H1 et ne présentent pas d'effet bloquant ; la courbe de désorption rejoint directement la courbe d'adsorption quel que soit la valeur de  $P/P^0$  maximale atteinte lors du balayage. Par ailleurs, les courbes de balayage confirment la présence d'une seule famille apparente de mésopores. A l'inverse, les courbes de balayage obtenues pour le monolithe **C-3-20** (fig.70 (b)) sont du type H2 ; en effet entre les deux isothermes ( $P/P^0 = 1$  et  $P/P^0 = 0,94$ ) nous constatons qu'il y a un effet bloquant et nous arrivons à distinguer les deux familles de mésopores. Ainsi, à l'instar des monolithes **C-40-20**, les monolithes **C-3-2** présentent bien une mésoporosité bimodale. En revanche, dans ces derniers, les pores les plus larges présentent très certainement des constriction (effet bloquant) en raison d'un taux de remplissage par les *hydrochars* plus élevé que pour les monolithes **C-40-20**. En ce qui concerne le **C-40-20**, les courbes de balayage sont du type H1 et les deux familles de mésopores semblent totalement indépendantes sans le moindre effet bloquant. Ceci confirme les observations réalisées précédemment.

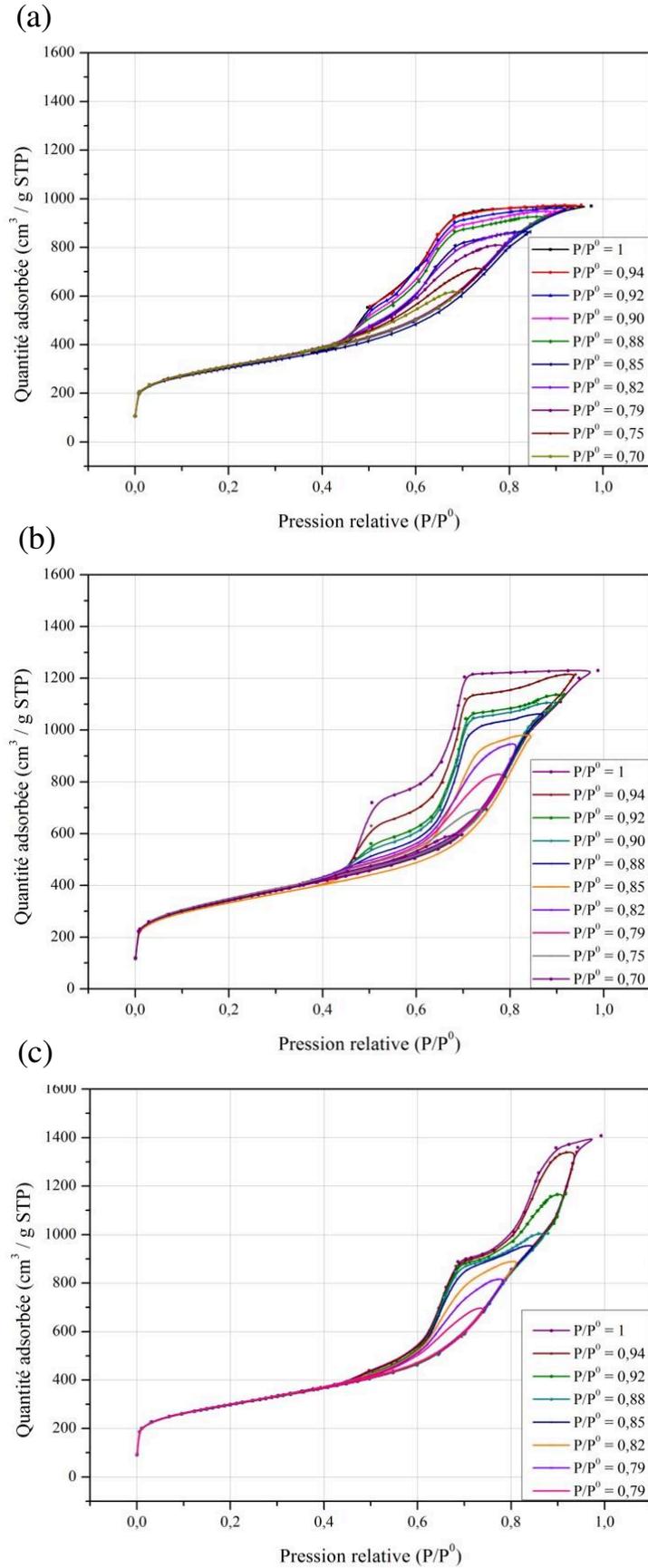
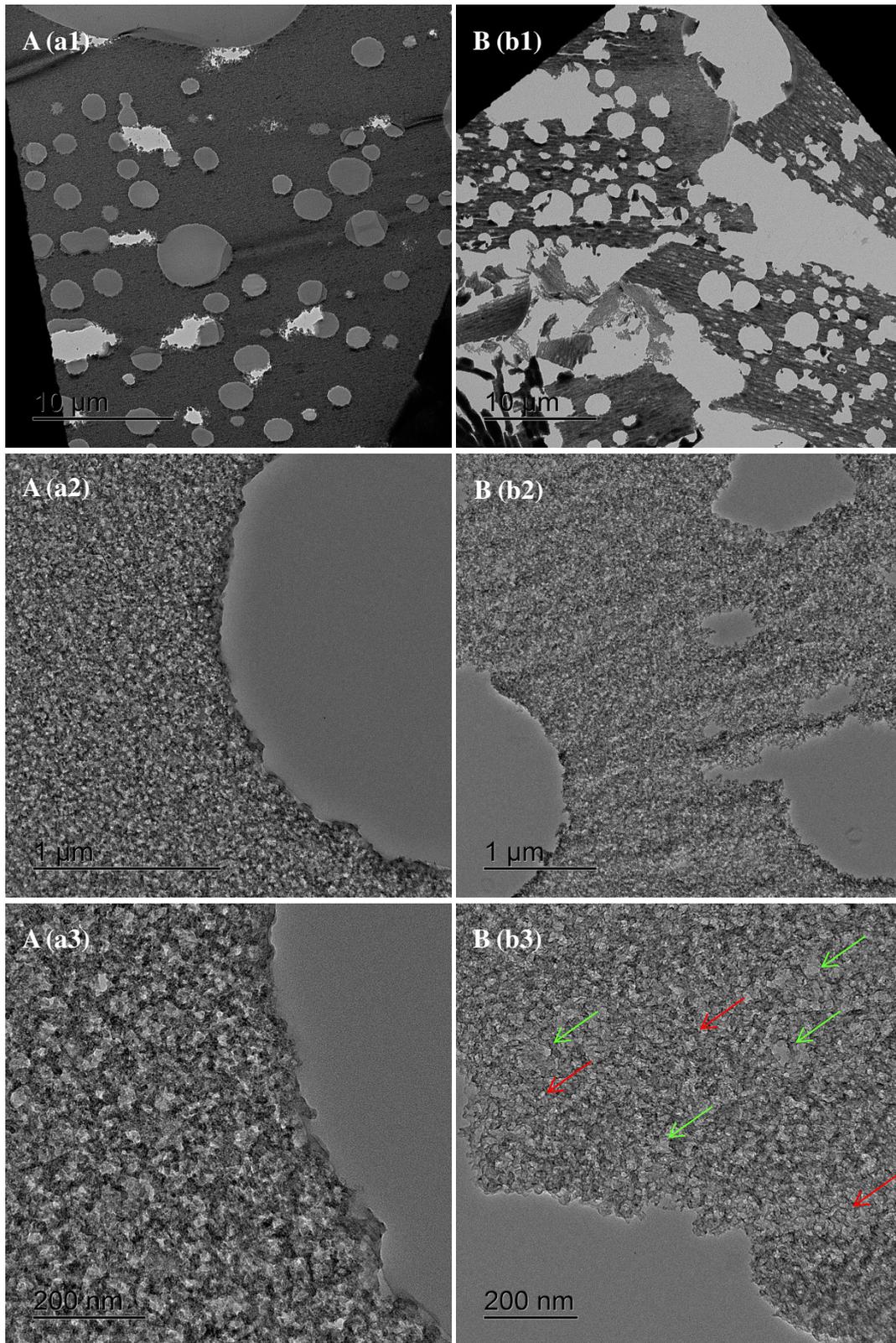


Figure 70. Courbes de balayage pour les monolithes de carbone (a) C-3-10 (b) C-3-20 (c) C-40-20.

Afin de compléter les observations réalisées par sorption d'azote à 77 K, nous avons caractérisé les monolithes **SiO<sub>2</sub>-40-20** et **C-40-20** par microscopie électronique à transmission sur une coupe transversale coupée par ultra-microtomie (fig. 71). Nous constatons que pour les deux monolithes nous pouvons voir des macropores larges sur les micrographies A(a1) et B(b1) (fig. 71). Ces pores correspondent aux les cavités présentes dans le squelette du matériau. Pour le monolithe **SiO<sub>2</sub>-40-20** nous observons sur les images A(a1 et a2) (fig. 71) des pores avec une distribution des taille relativement homogène correspondant à un diamètre proche de 20 nm. En ce qui concerne la réplique inverse en carbone **C-40-20**, nous observons des mésopores de diamètre plus petit comparés à ceux de la silice de départ. Sur l'image B(b3) nous pouvons distinguer deux familles de mésopores : les mésopores larges (15 nm) sont marqués par des flèches vertes et les mésopores étroits (6-7 nm) sont marqués par des flèches rouges.



**Figure 71.** Micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission sur une coupe transversale de 80 nm d'épaisseur des monolithes (A) SiO<sub>2</sub>-40-20 (B) C-40-20 réalisée par microtomie. Les flèches vertes sont pointées sur des pores avec un diamètre plus grand (15nm) et les flèches rouges sont pointées sur des pores avec un diamètre plus petit (7 nm)

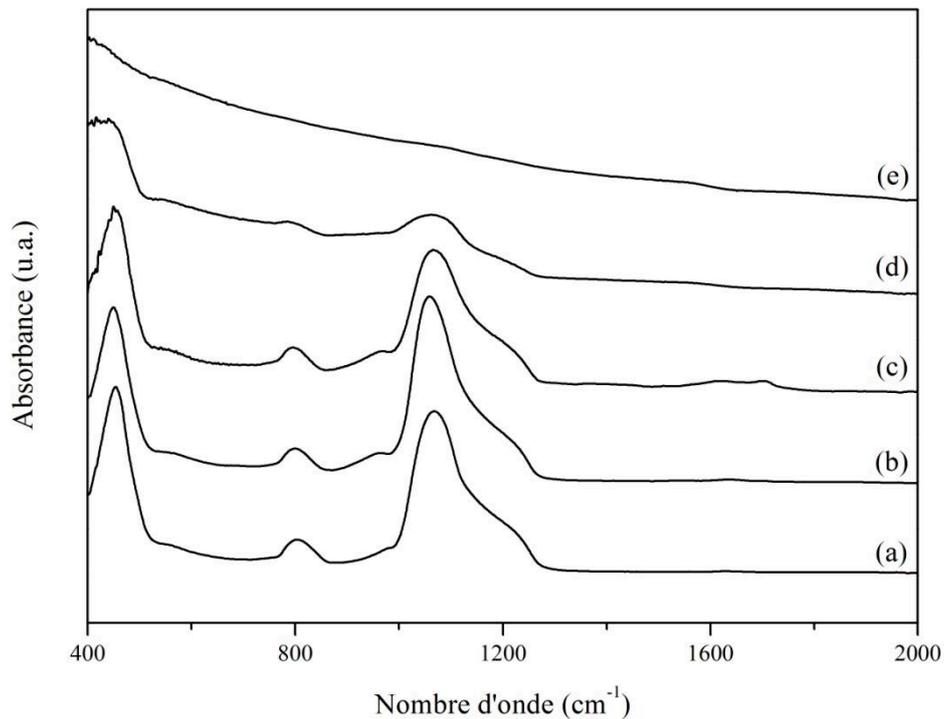
### 3.3.5. Contrôle structural et chimie de surface

En vue de l'application visée (support pour immobilisation d'enzymes dans des dispositifs biocatalytiques voire bio-électrocatalytiques), il est nécessaire de caractériser la chimie de surface et la composition chimique de ces monolithes de carbone. En effet, leur hydrophobicité et leur comportement électrochimique peuvent être influencés par la présence éventuelle de groupements fonctionnels à leur surface.

Ces matériaux ont été synthétisés en utilisant une empreinte « dure » à base de silice qui a été éliminée par un traitement à la soude. Il est donc important de s'assurer de la dissolution totale de la structure silicique.

#### Dissolution de la structure silicique

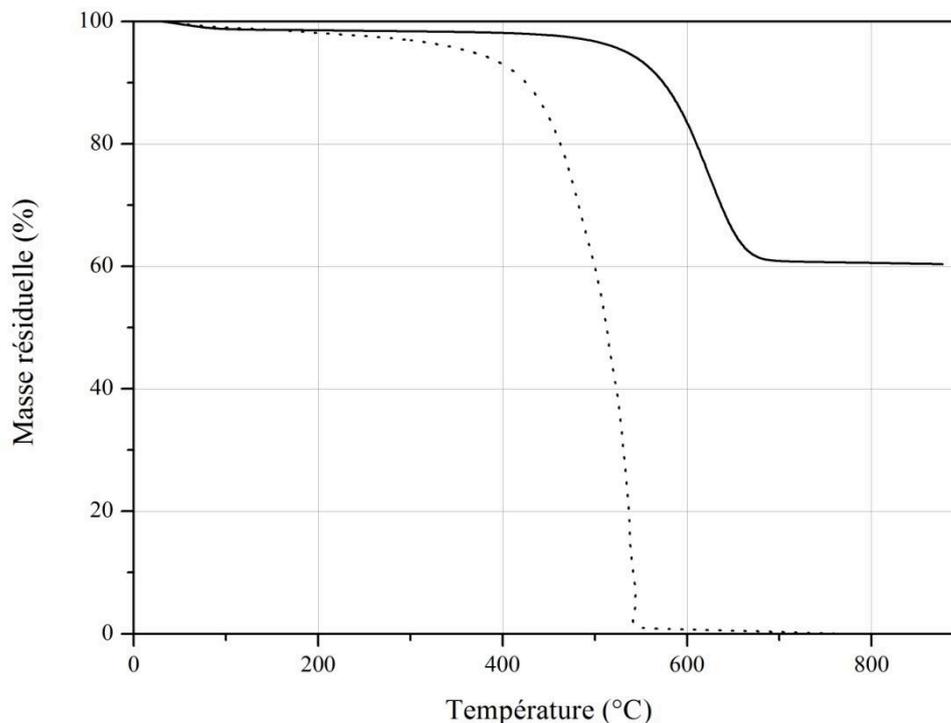
Afin de s'assurer que la structure silicique a bien été dissoute, nous avons eu recours à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (fig. 72).



**Figure 72.** Spectres infrarouge entre 400 et 2000  $\text{cm}^{-1}$  de la silice native (a), de la silice greffée APTES (b), du composite silice-hydrochar (c), du composite silice-carbone (d) et de la réplique en carbone (e).

Les spectres (a), (b), (c) et (d) présentent chacun une bande d'absorbance à  $1076\text{ cm}^{-1}$ , correspondant à la fréquence d'étirement,  $\nu_{(\text{Si-O})}$ , de la silice. Le spectre (e) correspond à la réplique inverse du monolithe de silice en carbone après élimination de la silice avec un traitement à la soude 1 M à  $100\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 24 h, la disparition de cette bande d'adsorption traduit une dissolution totale de la structure silicique. Le spectre (c) correspond au composite silice/hydrochar présente une bande d'absorbance à  $1615\text{ cm}^{-1}$  correspondant à la fréquence d'élongation,  $\nu_{(\text{C=C})}$ , et  $1700\text{ cm}^{-1}$  correspondant à la fréquence d'étirement,  $\nu_{(\text{C=O})}$ . De plus, le spectre (e) ne présente pas de pic, ce qui laisse présager que notre monolithe de carbone présente peu de fonctions oxygénées à sa surface.

Pour confirmer la dissolution totale de la silice validée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, nous avons caractérisé la réplique en carbone par analyse thermogravimétrique (fig. 73, perte de masse en fonction de la température). Nous constatons que la perte de masse pour le monolithe composite **SiO<sub>2</sub>-C-40-20** est de 40 %, ceci veut dire que le pourcentage de la silice est de 60 % et le pourcentage de carbone est de 40 %. En ce qui concerne la réplique en carbone, la perte de masse est de 100 %, nous concluons alors que le monolithe de carbone **C-40-20** ne contient plus de silice et par conséquent nous avons éliminé toute la structure silicique.



**Figure 73.** Analyse thermogravimétrique d'un monolithe composite **SiO<sub>2</sub>-C-40-20** en trait plein et d'une réplique inverse en carbone **C-40-20** traité à la soude 2M à  $100\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 24 h en pointillé.

Par la suite, nous nous intéressons à savoir si le traitement à la soude à deux températures différentes a une influence sur la chimie de surface de nos matériaux carbonés poreux et si le fait de refaire une pyrolyse après traitement à la soude change cette chimie de surface. Pour ce faire, une étude a été réalisée par spectroscopie de photoélectrons X (tableau 17). Nous nous intéressons à la détection de deux éléments, le carbone et l'oxygène.

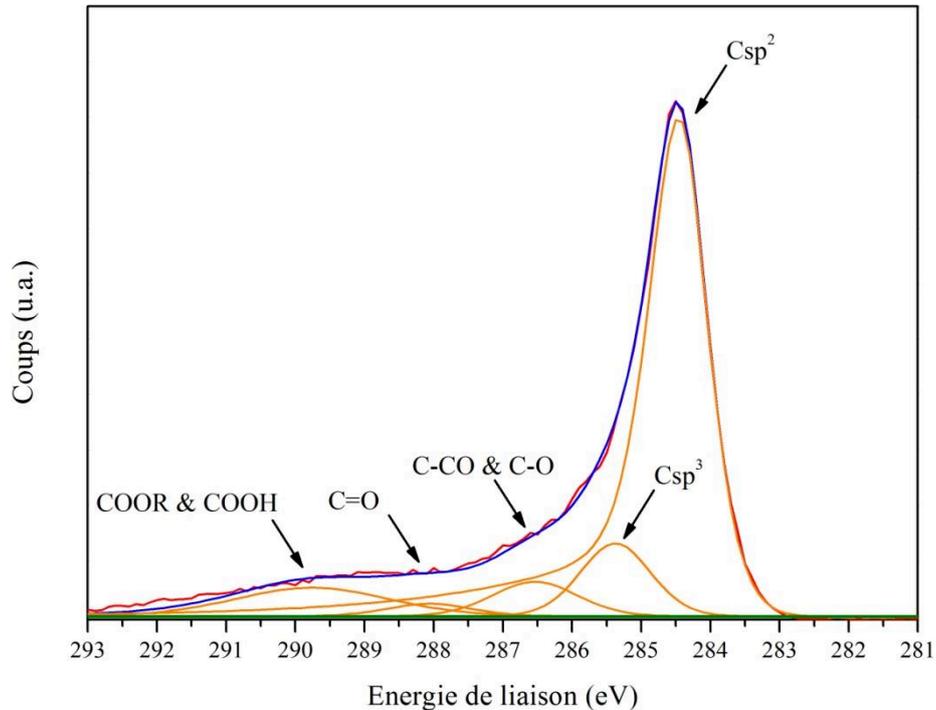
**Tableau 17.** Données de spectroscopie de photoélectron X obtenus sur poudres. <sup>a</sup>Energie de liaison. <sup>b</sup>Ratios Oxygène/Carbone et pourcentage atomiques déterminés par intégrations des aires des pics après soustraction de la ligne de base et ajustement par application de fonctions gaussiennes-lorentziennes. L'acquisition des spectres haute-résolution a été réalisée avec une énergie passante constante de 40eV.

<i>Données obtenues après déconvolution des spectres XPS<sup>b</sup> (% atomiques)</i>						
EL <sup>a</sup> (eV)		284,4	285,1	286,0 & 286,8	287,8	289 & 290
	O <sub>tot</sub> /C <sub>tot</sub>	Csp <sup>2</sup>	Csp <sup>3</sup>	C-CO & C-O	C=O	COOR & COOH
<b>SiO<sub>2</sub>-C-40-20</b>	0,4	76,6	9,1	5,1	3,0	6,2
<b>C-40-20 NaOH 37°C</b>	0,09	70	12,5	6,3	2	
<b>C-40-20 NaOH 100°C</b>	0,06	73,9	9,9	5,7	2,1	8,5
<b>C-40-20 NaOH 100°C re-pyrolysé</b>	0,048	74,2	10,5	4,3	2,2	8,8

La déconvolution des spectres, réalisée pour les orbitales C1s du carbone et O1s de l'oxygène, ont permis de deviner les groupements fonctionnels de surface. La spectroscopie de photoélectrons X est une méthode de caractérisation semi-quantitative, par conséquent les pourcentages atomiques obtenus doivent être relativisés.

Différents échantillons ont été analysés et une comparaison a été effectuée entre le composite silice-carbone, une réplique en carbone traitée à la soude à 37 °C, une traitée à la soude à 100 °C et une traitée à la soude à 100 °C et repyrolysée. Ici l'objectif est de déterminer l'influence des différents traitements post-synthèse et caractériser l'état de surface de ces matériaux. Nous constatons que le pourcentage d'oxygène par rapport au pourcentage de carbone a baissé après traitement à la soude et a encore baissé après repyrolyse. Ceci laisse présager qu'après élimination de la silice, il y a des groupements fonctionnels de type carbonés oxydés, et ce quel que soit le traitement que le matériau a subi. Bien que ce

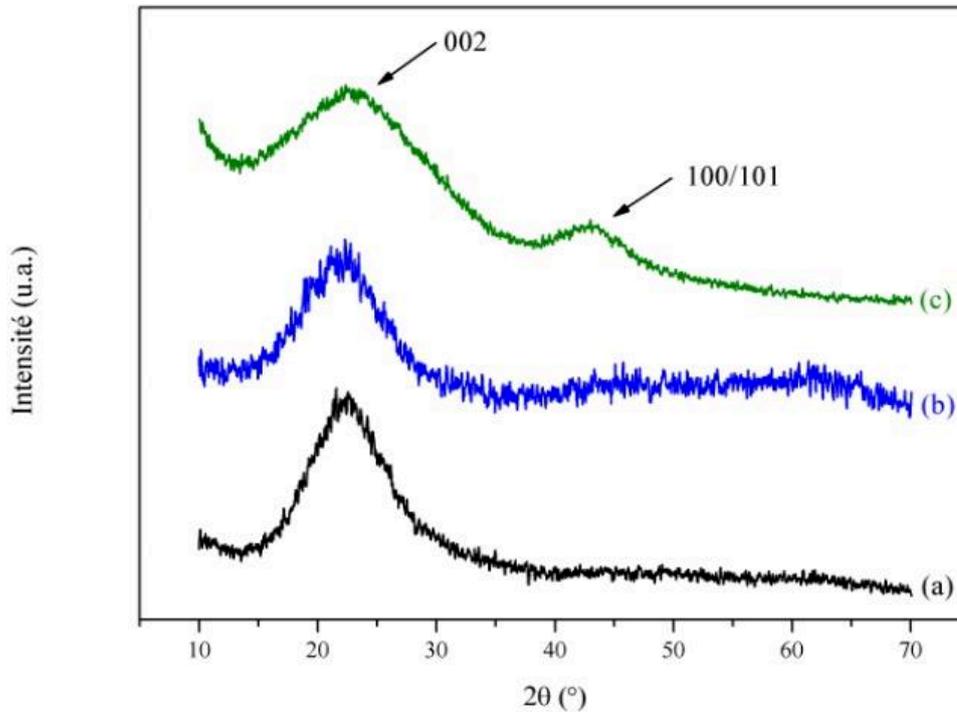
pourcentage soit minime, ces groupements fonctionnels peuvent générer une réactivité de surface non-négligeable.



**Figure 74.** Spectre de spectroscopie de photoélectrons X du **C-40-20** traité à la soude à 100 °C pendant 24h et spectres de déconvolution associés pour le pic C1s. L'acquisition du spectre a été réalisée avec une énergie passante constante de 20 eV.

### Graphitisation du carbone

Pour mieux caractériser la microstructure de nos monolithes, nous avons passé les différents matériaux **SiO<sub>2</sub>-40-20** ; **SiO<sub>2</sub>-C-40-20** et **C-40-20** en diffraction des rayons X. Les diffractogrammes montrent que la silice de départ est amorphe comme attendu. En ce qui concerne la réplique en carbone obtenue, nous observons deux pics relativement larges, centrés à  $2\theta = 21,5^\circ$  et  $43,5^\circ$ , correspondant respectivement aux plans (002), (100) et (101) (fig. 75).



**Figure 75.** Diffractogrammes rayons X pour une poudre de monolithe (a)  $\text{SiO}_2\text{-40-20}$ ; (b)  $\text{SiO}_2\text{-C-40-20}$  et (c)  $\text{C-40-20}$ .

Cette graphitisation partielle a été également confirmée par spectroscopie Raman (fig. 76). En outre, la seconde pyrolyse après traitement à la soude ne semble pas modifier le taux de graphitisation. En ce qui concerne le monolithe de carbone synthétisé par résorcinol-formaldéhyde, les pics des deux bandes D et G sont plus fins, nous pouvons conclure que la microstructure de ce monolithe est plus graphitique. Ceci est dû au fer utilisé lors de la synthèse et qui est connu comme étant un très bon catalyseur pour la graphitisation du carbone à basse température.<sup>63</sup> A ce titre, l'ajout de sel de fer lors de la synthèse des monolithes de carbone par une empreinte silicique sacrificielle pourrait être envisagé.

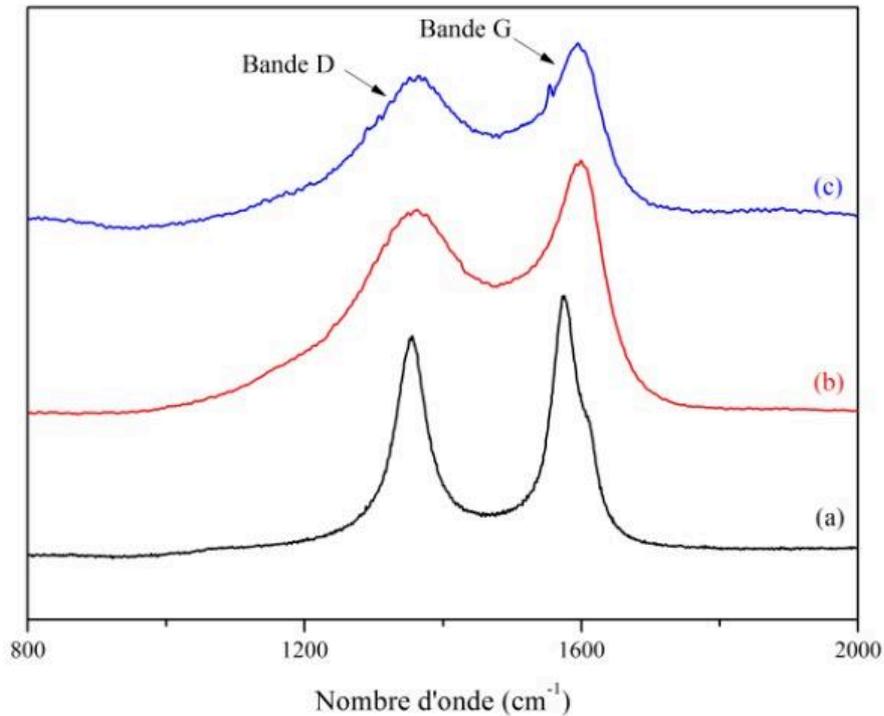


Figure 76. Spectres Raman des échantillons (a) C-RF (b) C-40-20 (c) C-40-20 repyrolysé.

## 3.4. Propriétés intrinsèques des monolithes

### 3.4.1. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de ces monolithes ont été évaluées par compression entre deux plaques rigides. Nous obtenons alors une valeur de contrainte à rupture pour chacun des matériaux, exprimée en Pascal (tableau 18). Nous constatons que les trois monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-3-10** ; **SiO<sub>2</sub>-3-20** ; **SiO<sub>2</sub>-40-20** ont une contrainte à rupture équivalente. En ce qui concerne les trois répliques en carbone, elles ont une contrainte à rupture plus importante comparée à celles des monolithes de silice de départ. Le monolithe composite **SiO<sub>2</sub>-HTC-3-10** présente la force de rupture la plus élevée.

Ces résultats confirment que les monolithes synthétisés présentent une tenue mécanique adaptée pour une intégration dans un réacteur sous flux continu. Une étude plus poussée avec tracé des courbes contrainte-déformation en compression devra cependant être envisagée pour mieux comprendre le comportement de ces matériaux sous contrainte mécanique.

**Tableau 18.** Force de rupture déterminée par compression des monolithes entre deux plaques

Echantillons	Contrainte à rupture [Pa]
<b>SiO<sub>2</sub>-3-10</b>	1,99
<b>SiO<sub>2</sub>-3-20</b>	1,72
<b>SiO<sub>2</sub>-40-20</b>	1,86
<b>SiO<sub>2</sub>-HTC-3-10</b>	6,53
<b>C-3-10</b>	2,65
<b>C-3-20</b>	2,67
<b>C-40-20</b>	1,90

### 3.5. Conclusions

Notre problématique était de réussir à synthétiser des monolithes de carbone à porosité hiérarchique finement contrôlée et ayant une surface spécifique élevée. Deux voies de synthèse ont été mises en œuvre. La première voie passe par différentes étapes où des monolithes inorganiques à porosité hiérarchique à base de silice ont été obtenus à l'aide du procédé sol-gel combiné à une décomposition spinodale. Cela nous a permis d'obtenir des monolithes de silice macroporeux de deux tailles de macropores de 3 et de 41  $\mu\text{m}$ . Ensuite, un traitement basique effectué sous différentes conditions, a permis le contrôle de la mésoporosité de ces matériaux. Puis, une étape de greffage post-synthèse était nécessaire pour fonctionnaliser la silice, et permettre une meilleure imprégnation de la solution en précurseurs de carbone (saccharose). Par la suite, le monolithe imprégné subit une carbonisation hydrothermale qui permet de polymériser le sucre, recouvrant ainsi toute la surface du matériau de départ. Cette étape de dépôt d'*hydrochar* a été optimisée dans cette thèse dans le but d'avoir un monolithe de carbone avec une bonne tenue mécanique et sans fissure. Par la suite, une étape de pyrolyse qui transforme le réseau d'*hydrochar* en carbone a été réalisée. Finalement, un traitement à la soude de ces composites silice/carbone a permis de dissoudre la structure silicique et obtenir sa réplique en carbone. Partant de ces expérimentations, les résultats obtenus sont très intéressants. En effet, nos matériaux carbonés ont une forme monolithique avec une très bonne tenue mécanique. De plus, ces matériaux présentent une grande surface spécifique supérieure à  $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  ainsi qu'une mésoporosité bimodale (dans le cas du C-40-20).

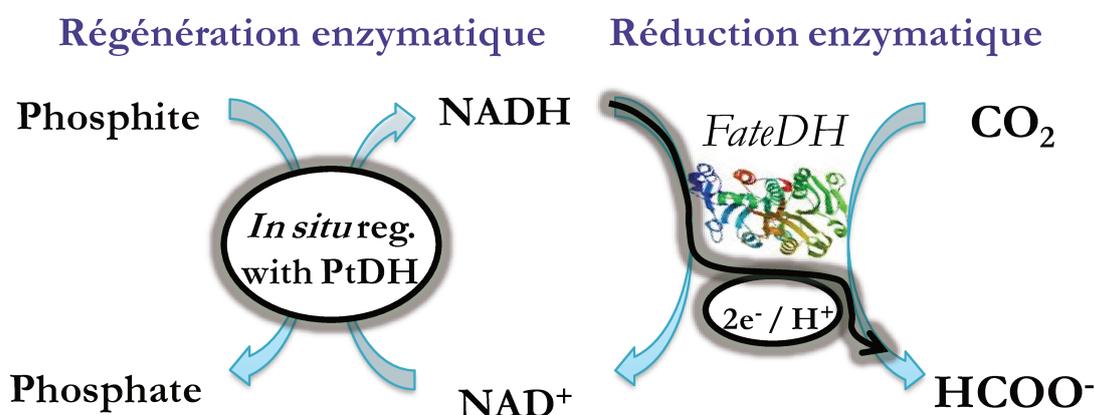
La deuxième voie, où des monolithes organiques à base du gel de résorcinol-formaldéhyde macroporeux ont été synthétisés à l'aide du procédé sol-gel combiné à une décomposition spinodale. Ensuite ces monolithes ont été graphitisés à 1000 °C pour obtenir des monolithes à base de carbone graphite en une seule étape, sans passage par une voie silicique.

L'ensemble des matériaux synthétisés ont donc fait l'objet de plusieurs caractérisations permettant d'une part de déterminer leurs caractéristiques texturales (surface spécifique, porosité *etc.*), structurales et l'état de leur chimie de surface.

Ces matériaux seront utilisés comme supports pour l'immobilisation d'enzymes et intégrés dans des réacteurs en flux continu pour la conversion du CO<sub>2</sub> en formiate.

## Chapitre 4 - Réduction du CO<sub>2</sub> en formiate par catalyse enzymatique

Les processus biocatalytiques pour la conversion du CO<sub>2</sub> sont une approche prometteuse du fait qu'ils fonctionnent dans des conditions douces, sont écologiques et très sélectifs.<sup>27-35</sup> De tels processus ont été étudiés pendant plus de deux décennies<sup>27</sup> et ont été récemment repris par A. Galarneau *et al.* dans notre institut.<sup>33, 34</sup> En effet, la conversion biocatalytique du CO<sub>2</sub> en formiate nécessite une enzyme, la formiate déshydrogénase (FDH), ainsi que le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) dans sa forme réduite active (1,4-NADH) vis-à-vis des déshydrogénases. En effet, la FDH réduit le CO<sub>2</sub> en formiate et oxyde le 1,4-NADH en NAD<sup>+</sup> (fig. 77 réduction enzymatique). Afin d'avoir le cofacteur NAD toujours sous sa forme réduite 1,4-NADH, nous avons choisi d'employer une deuxième enzyme la phosphite déshydrogénase (PtDH). Celle-ci réduit le NAD<sup>+</sup> en 1,4-NADH et oxyde le phosphite en phosphate (fig. 77 régénération enzymatique). Dans le but de convertir le CO<sub>2</sub> en flux continu, une étude visant à déterminer le ratio d'activité optimal entre les deux enzymes en *batch* a été effectuée. Par la suite, des essais de conversion du CO<sub>2</sub> en *batch* ont été réalisés en barbotant du CO<sub>2</sub> et en présence d'un agent réticulant, le poly(éthylène glycol) diglycidyl ether (PEGDGE). Ces essais ont permis d'affiner les paramètres expérimentaux affectant la réaction catalytique et d'atteindre une productivité compétitive en formiate. Enfin, les paramètres les plus prometteurs ont été appliqués à un dispositif en flux continu. Les deux enzymes et, d'une manière plus problématique, le cofacteur ont été immobilisés tout en préservant leur activité.<sup>28-32</sup>

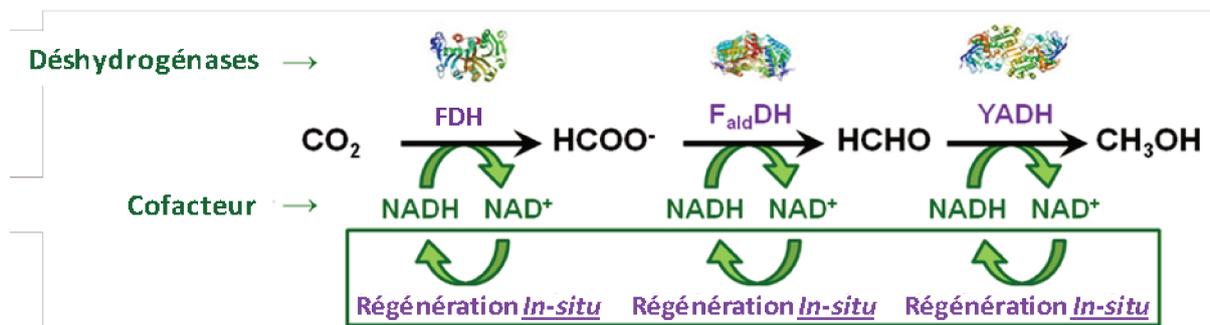


**Figure 77.** Schéma de la réduction enzymatique du CO<sub>2</sub> avec le système de régénération enzymatique.

4.1. Conception du système de réduction enzymatique du CO <sub>2</sub> .....	121
4.2. Résultats et discussions .....	125
4.2.1. Activité spécifique de la MeFDH ( $U_{MeFDH}$ ).....	126
4.2.2. Activité spécifique de la PtDH ( $U_{PtDH}$ ).....	127
4.2.3. Détermination des temps de rétention des espèces ioniques présentes dans le milieu réactionnel .....	128
4.3. Etude de la bioréduction du CO <sub>2</sub> en <i>batch</i> .....	130
4.3.1. Influence du PEGDGE .....	131
4.3.2. Influence de la concentration en enzymes .....	133
4.3.3. Influence du barbotage au CO <sub>2</sub> .....	134
4.3.4. Influence du ratio d'activité $U_{MeFDH}/U_{PtDH}$ .....	135
4.4. Catalyse supportée sur monolithes et flux continu (PtDH + MeFDH).....	137
4.4.1. Catalyse supportée sur monolithe de silice et flux continu .....	138
4.4.2. Catalyse supportée sur monolithe de carbone et flux continu .....	139
4.5. Conclusions .....	142

## 4.1. Conception du système de réduction enzymatique du CO<sub>2</sub>

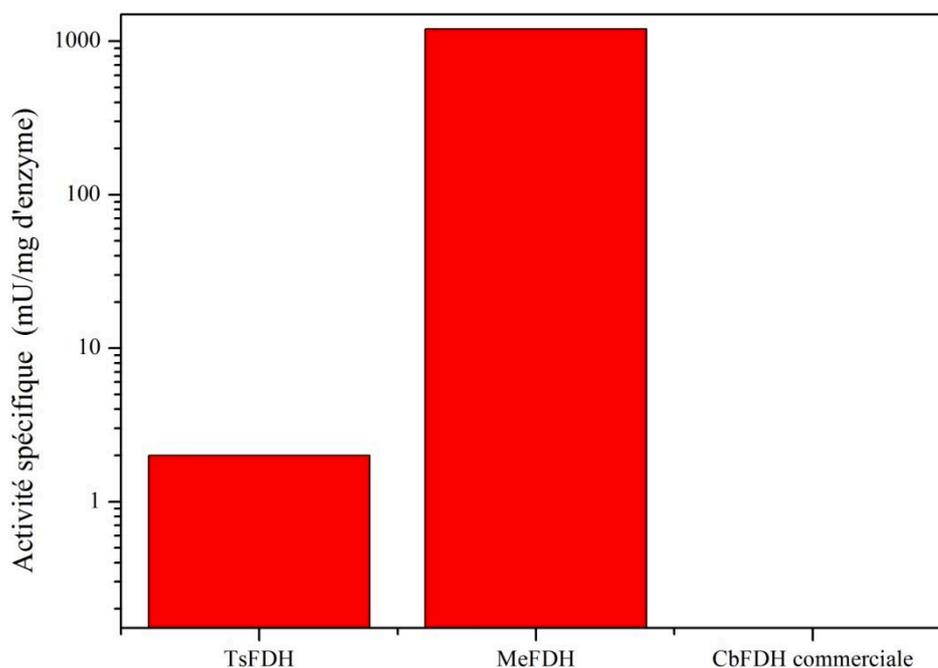
Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est un gaz à effet de serre qui résulte, en partie, des activités humaines. Les émissions du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère dépassent le stockage naturel et engendre une perturbation de l'équilibre naturel du cycle du carbone. Comme mentionné dans le chapitre 1 - Etat de l'art, plusieurs voies de réduction du CO<sub>2</sub> ont été rapportées dans la littérature. Nous nous sommes intéressés aux processus biocatalytiques de réduction du CO<sub>2</sub> du fait qu'ils fonctionnent dans des conditions douces, sont écologiques et très sélectifs.<sup>27-35</sup> Le projet vise à développer un système biocatalytique utilisant des déshydrogénases pour la réduction sélective en flux continu du CO<sub>2</sub> en molécules d'intérêt telles que le méthanol. Un tel système nécessite plusieurs réactions enzymatiques en cascade et l'utilisation de la forme réduite du cofacteur nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). La cascade enzymatique utilise trois déshydrogénases : la formiate déshydrogénase (**F<sub>ate</sub>DH**) pour la réduction et l'utilisation d'un cofacteur du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>, la formaldéhyde déshydrogénase (**F<sub>ald</sub>DH**) pour la réduction du HCOO<sup>-</sup> en HCHO et l'alcool déshydrogénase (**YADH**) pour la réduction du HCHO en CH<sub>3</sub>OH (fig. 78).



**Figure 78.** Représentation schématique de la cascade enzymatique pour la conversion du CO<sub>2</sub> en MeOH.

La régénération *in situ* du cofacteur est proposée *via* l'utilisation d'une autre enzyme la phosphite déshydrogénase (**PtDH**). Cette enzyme a été produite et utilisée dans des travaux antérieurs réalisés au laboratoire, notamment dans le cadre de la thèse de Rémi Cazelles.<sup>125</sup> Cette **PtDH** a montré son efficacité pour la réduction sélective du NAD<sup>+</sup> en 1,4-NADH actif vis-à-vis des déshydrogénases. Nous nous intéressons dans cette thèse à l'étude de la première réaction de cette cascade enzymatique, la réduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup> en flux continu en utilisant la formiate déshydrogénase et son système de régénération enzymatique en présence de la phosphite déshydrogénase.

Pour la conception de ce système de bioréduction du CO<sub>2</sub> en flux continu, il nous a fallu dans un premier temps sélectionner une formiate déshydrogénase stable et active. Comme mentionné dans le chapitre 1 état de l'art, il existe différentes souches à partir desquelles la formiate déshydrogénase est surexprimée. Tous les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont utilisé la FDH commerciale NAD-dépendante issue de *C. boidinii* (CbFDH). En plus de son faible activité de réduction du CO<sub>2</sub> cette source commerciale présente des contraintes de coût et d'hétérogénéité des lots. Comme mentionné dans le chapitre 2 matériels et méthodes, trois formiates déshydrogénase ont été produites dans le cadre du stage d'Alexandra Lamotte financé par l'institut Carnot Chimie Balard – LabEx AGRO en 2016. Ces formiates déshydrogénases sont NAD-dépendantes issues de *C. Boidinii* (CbFDH), *Paracoccus* sp. 12-A (PsFDH) et *Thiobacillus* sp. KNK65MA (TsFDH). Une quatrième formiate déshydrogénase NAD- et W-dépendante issue de *Methylobacterium extorques* AM1 (MeFDH) nous a été fournie par le Pr. Kenji Kano de l'université de Kyoto. Le choix de la formiate déshydrogénase doit prendre en considération la stabilité et l'activité de cette enzyme vis-à-vis de la réduction du CO<sub>2</sub>. A ce titre, la MeFDH présente une activité spécifique vis-à-vis de la réduction du CO<sub>2</sub> bien supérieure aux autres enzymes étudiées (fig. 79).

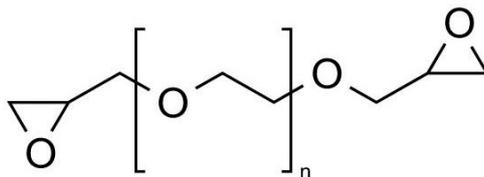


**Figure 79.** Activité spécifique des FDHs : TsFDH, MeFDH et CbFDH vis-à-vis la réduction du CO<sub>2</sub> en mU/mg d'enzyme.

Ainsi, dans ce projet, notre choix s'est orienté vers la formiate déshydrogénase MeFDH, NAD- et W-dépendante issue de *Methylobacterium extorques* AM1 en raison de son activité très supérieure et des résultats publiés en 2015 par Sakai *et al.*<sup>108</sup> Ces résultats montrent que cette enzyme est capable de réduire efficacement le CO<sub>2</sub> dans un système électrocatalytique sans NAD ouvrant potentiellement la voie à des réacteurs bioélectrocatalytiques (voir Chapitre 5). A noter que **MeFDH** est un hétérodimère relativement volumineux composé d'une sous-unité  $\alpha$  et une  $\beta$ , de poids moléculaire respectifs 107 et 61 kDa. Cette caractéristique s'avère importante quant au choix du support.

Afin de développer un réacteur en flux continu, les deux enzymes sélectionnées **MeFDH** et **PtDH** pour la réduction du CO<sub>2</sub> et la régénération du cofacteur, respectivement, doivent être immobilisées sur un support de forme monolithique à porosité hiérarchique (voir Chapitre 3). Les deux monolithes qui ont été sélectionnés pour cette application, sont un monolithe de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20** présentant un diamètre de macropores de 41  $\mu\text{m}$  et un diamètre de mésopores de 20 nm et un monolithe de carbone **C-40-20** qui est le réplique inverse du **SiO<sub>2</sub>-40-20**. Eu égard à l'état de l'art présenté dans le chapitre 1, nous avons choisi de travailler avec des monolithes présentant (i) un diamètre de mésopores larges (supérieur à 15 nm), afin de favoriser l'immobilisation et l'accessibilité des enzymes ; et (ii) un diamètre de macropores large (de l'ordre de 40  $\mu\text{m}$ ), afin de limiter la perte de charge et d'augmenter la productivité.<sup>74</sup>

Concernant l'immobilisation du système biocatalytique, il existe, comme mentionné dans le chapitre 1, différentes méthodes telles que l'adsorption, l'adsorption-réticulation et l'immobilisation covalente au support. L'adsorption-réticulation s'avère être une voie d'immobilisation prometteuse, puisqu'elle permet de limiter la lixiviation des enzymes sous flux continu *via* une réticulation inter-enzyme, tout en limitant les changements conformationnels souvent rencontrés par immobilisation covalente sur support. Le liant qui sera utilisée pour la réticulation des enzymes est le poly(éthylène glycol) diglycidyl éther (**PEGDGE**) (fig. 80).



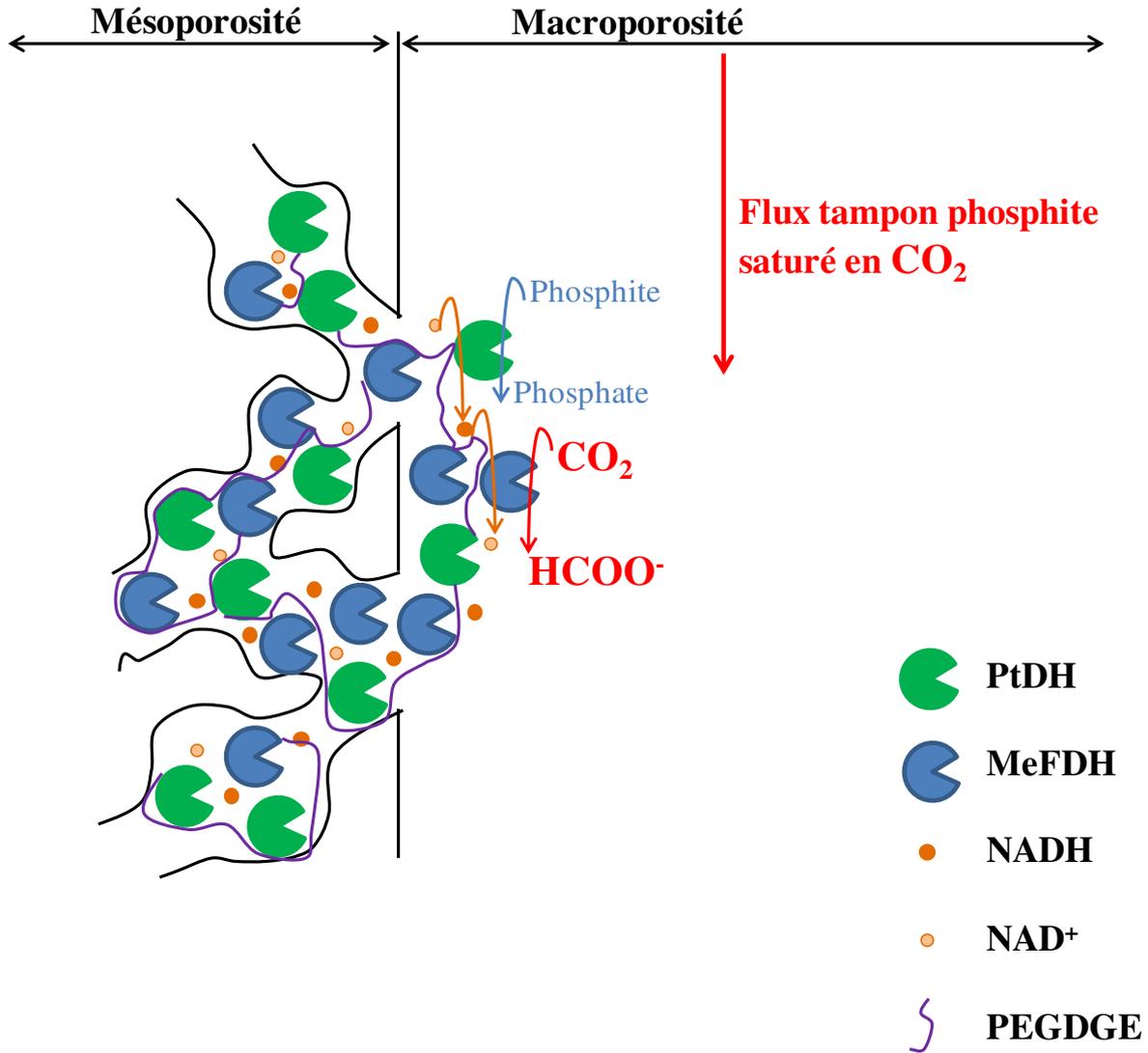
**Figure 80.** Formule chimique semi-développée du poly(éthylène glycol) diglycidyl éther.

Le **PEGDGE** présente deux fonctions époxy qui pourraient réagir avec les fonctions amine de surface des enzymes et de ce fait, réticuler les enzymes en formant des **CLEAs** (*Cross-linking enzymes aggregates*). De plus, il a été démontré dans la thèse de Rémi Cazelles que la PEGylation augmente la solubilité du CO<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel, ce qui confère au **PEGDGE** une double fonction, d'une part immobiliser les enzymes et d'autre part augmenter localement la concentration en CO<sub>2</sub>.

Afin de développer le dispositif de réduction enzymatique du CO<sub>2</sub> en flux continu, il est nécessaire d'étudier le comportement des deux enzymes sélectionnées ensemble et étudier la bioréduction en *batch*. Cette étude a pour objectif de déterminer l'influence de différents paramètres sur la productivité, tels que le ratio d'activité entre la **MeFDH** et la **PtDH**, ou encore l'ajout du **PEGDGE**. Dans la suite de l'étude la source du CO<sub>2</sub> est le bicarbonate de sodium. Nous étudierons par ailleurs l'effet du barbotage du CO<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel sur la production du formiate HCOO<sup>-</sup>.

La production de l'ion formiate est suivie par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Seront présentées dans la partie suivante : la limite de détection de l'acide formique par HPLC, les temps de rétention des différentes espèces ioniques présentes dans le milieu réactionnel ainsi qu'une gamme d'étalonnage permettant la détermination de la concentration en acide formique.

L'optimisation des paramètres étudiés en *batch* seront ensuite appliqués sur un dispositif en flux continu en utilisant un monolithe de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20** et un monolithe de carbone **C-40-20**. L'approche ici, est de réticuler les deux enzymes en présence du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide **NAD**, idéalement dans la mésoporosité à l'aide de l'agent réticulant : le **PEGDGE**. Les deux bioréacteurs obtenus seront utilisés pour la conversion du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup> en flux continu (fig. 81).



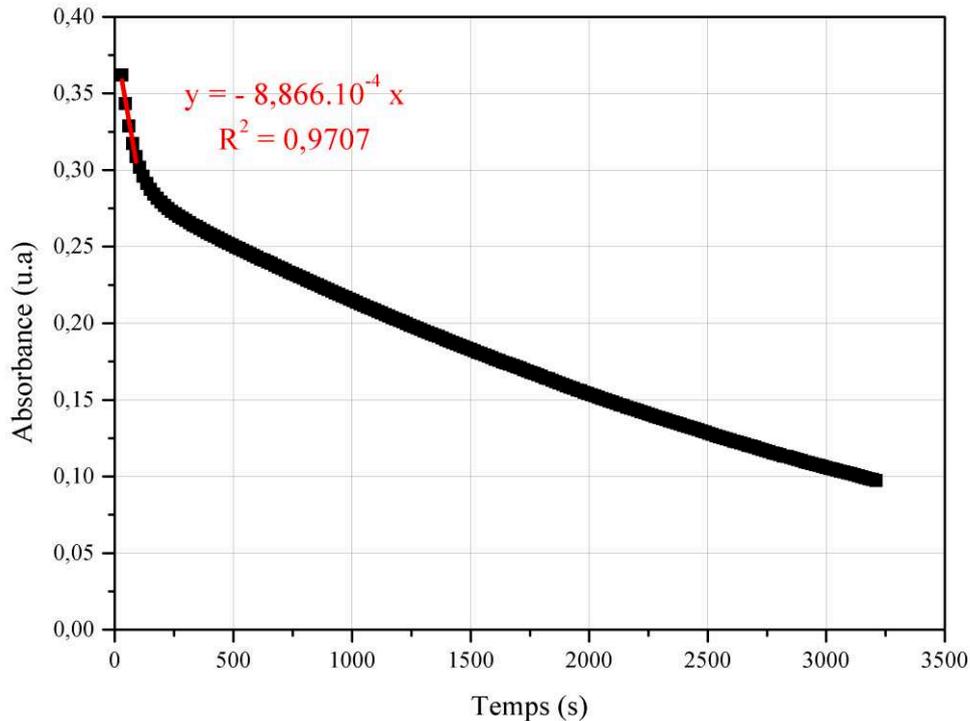
**Figure 81.** Schématisation du bioréacteur avec les enzymes immobilisées dans la mésoporosité du monolithe et la réduction du CO<sub>2</sub> en flux continu en présence du système de régénération du cofacteur NAD.

## 4.2. Résultats et discussions

Nous présentons dans un premier temps les activités spécifiques des deux enzymes **MeFDH** et **PtDH**. Ensuite, la détermination des temps de rétention des espèces ioniques présentes dans le milieu réactionnel par HPLC ainsi qu'une gamme d'étalonnage pour la détermination de la concentration en acide formique. Nous présentons par la suite les résultats de l'étude de la réaction de bioréduction du CO<sub>2</sub> en *batch* et les différents paramètres étudiés. Et pour finir, les résultats du système de bioréduction en flux continu seront présentés.

### 4.2.1. Activité spécifique de la MeFDH (U<sub>MeFDH</sub>)

Afin de déterminer l'activité spécifique de la **MeFDH** (U<sub>MeFDH</sub>), l'oxydation de la forme réduite du cofacteur a été suivie par absorbance UV à 340 nm lors de la réaction de réduction du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. L'absorbance de la solution en fonction du temps est représentée sur la figure suivante (fig. 82).



**Figure 82.** Absorbance = f (temps) de la consommation du NADH par la MeFDH à 340 nm en fonction du temps.

La vitesse initiale de la consommation du NADH a été calculée à partir de la pente entre 0 et 90 sec.

$$\text{Abs} = -8,86693 \cdot 10^{-4} t$$

$$V = \frac{\text{Abs}}{t} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot C}{t} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot n}{t \cdot V} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot U}{V} = -8,86693 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

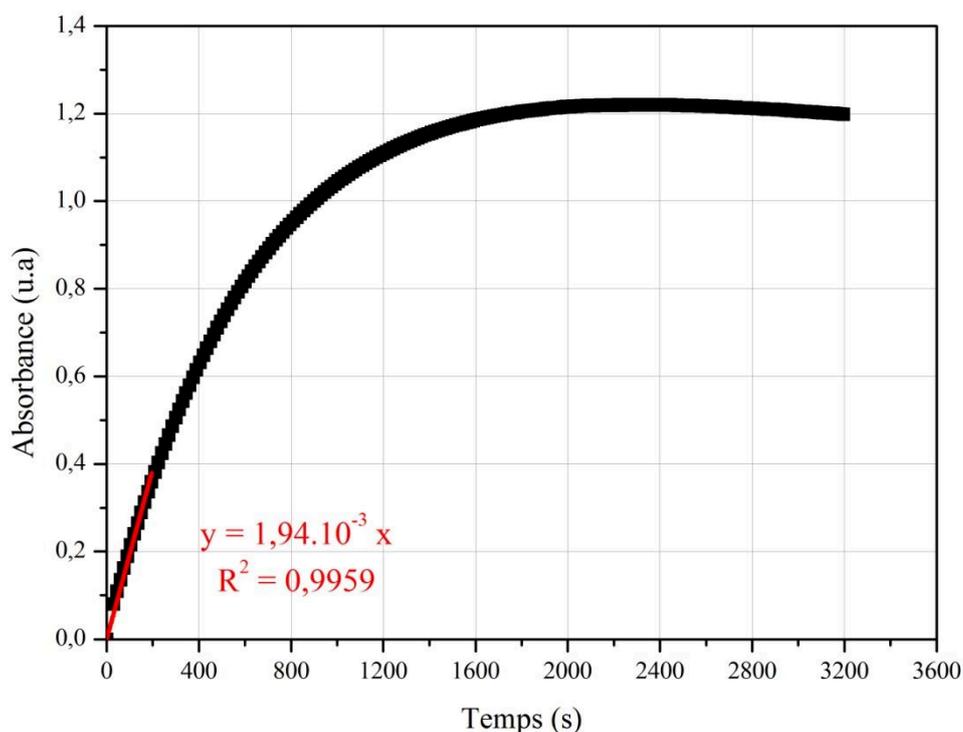
$$U = \frac{v \cdot V}{\varepsilon \cdot l} = 0,017 \text{ } \mu\text{mol NAD}^+_{\text{produit}}/\text{min} \text{ (pour } 4 \text{ } \mu\text{L de la solution d'enzymes MeFDH)}$$

$$\text{Or la concentration en MeFDH} = 15,4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$$

**U<sub>MeFDH</sub> = 2,76.10<sup>-4</sup> μmol NAD<sup>+</sup><sub>produit</sub>/min pour 1 μg MeFDH en phase de vitesse initiale.**

### 4.2.2. Activité spécifique de la PtDH (U<sub>PtDH</sub>)

L'activité spécifique de la **PtDH** (U<sub>PtDH</sub>) a été déterminée par un suivi de la réduction du cofacteur NAD et la production du NADH qui absorbe à 340 nm. Le profil de l'évolution de l'absorbance est représenté en fonction du temps sur la figure suivante (fig. 83).



**Figure 83.** Absorbance = f (temps) de la production du NADH par la **PtDH** à 340 nm en fonction du temps.

La vitesse initiale a été calculée à partir de la pente entre 0 et 195 s.

$$\text{Abs} = 0,00194 t$$

$$V = \frac{\text{Abs}}{t} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot C}{t} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot n}{t \cdot V} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot U}{V} = 0,00194 \text{ s}^{-1}$$

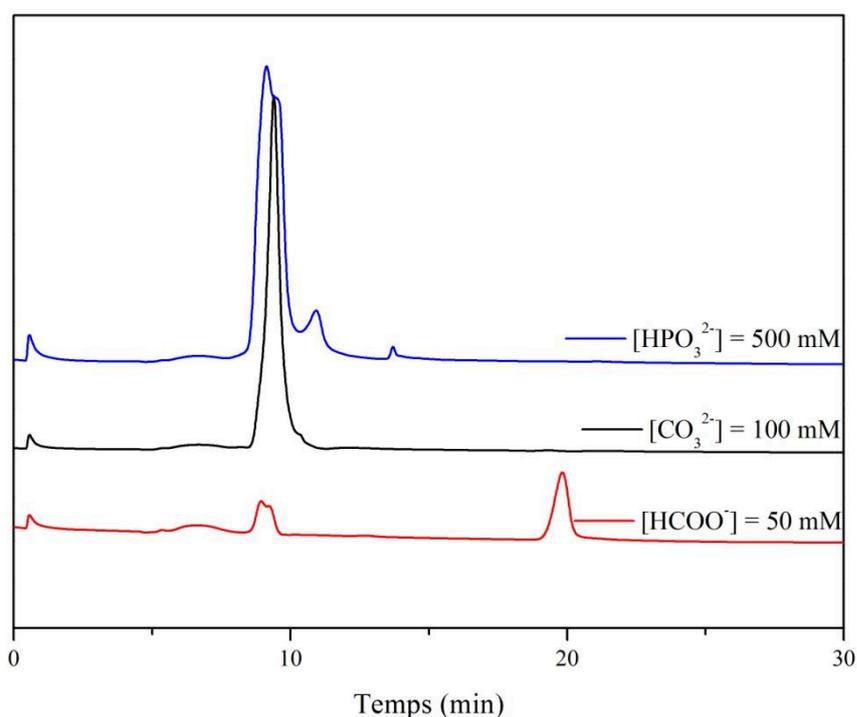
$$U_{\text{PtDH}} = \frac{v \cdot V}{\varepsilon \cdot l} = 3,743 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol NADH}_{\text{produit}}/\text{min} \text{ (pour } 4 \mu\text{L de la solution d'enzymes PtDH)}$$

Or la concentration en **PtDH** est de 7,3 μg/μL

$$U_{\text{PtDH}} = 1,28 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol NADH}_{\text{produit}}/\text{min pour } 1 \mu\text{g PtDH en phase de vitesse initiale.}$$

### 4.2.3. Détermination des temps de rétention des espèces ioniques présentes dans le milieu réactionnel

Afin de déterminer le temps de rétention des différentes espèces et vérifier s'il est possible de doser le formiate. Une solution de chaque espèce ionique a été analysée par chromatographie en phase liquide à haute performance. La détection se fait par un détecteur UV à 210 nm. Les chromatogrammes obtenus (fig. 84) montrent que l'acide formique sort à un temps de rétention égal à  $19,97 \pm 0,38$  min.

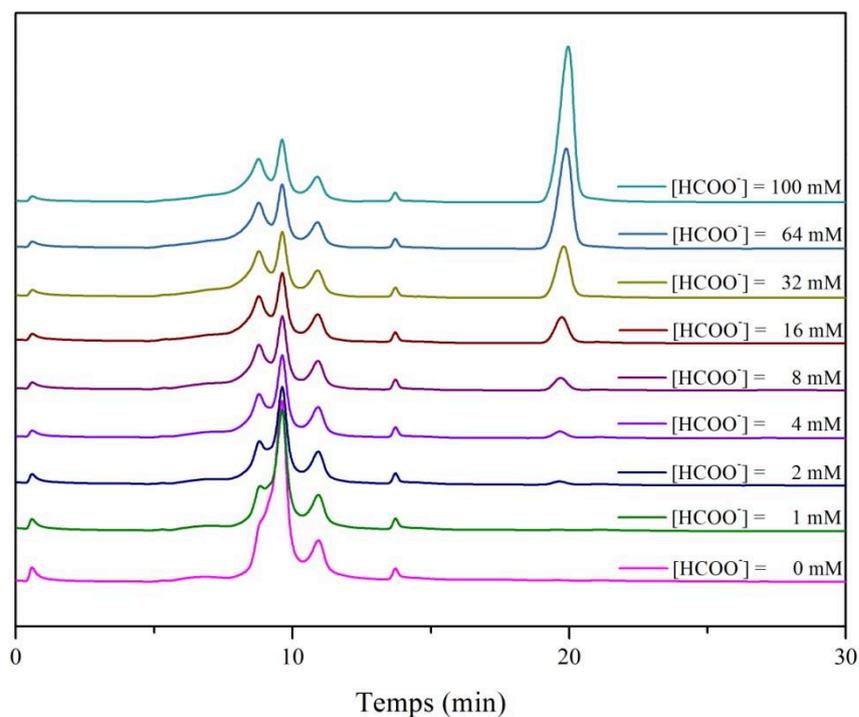


**Figure 84.** Chromatogrammes des trois échantillons : acide formique, carbonate et tampon phosphite.

Les chromatogrammes obtenus montrent que seule la solution d'acide formique présente un pic à un temps de rétention égal à  $19,97 \pm 0,38$  min. Ce pic n'apparaît pas sur les chromatogrammes des autres échantillons qui ne contiennent pas de formiate. Par conséquent, il est possible de suivre la bioréduction du CO<sub>2</sub> en formiate en dosant l'acide formique formé par biocatalyse par chromatographie échangeuse d'ion.

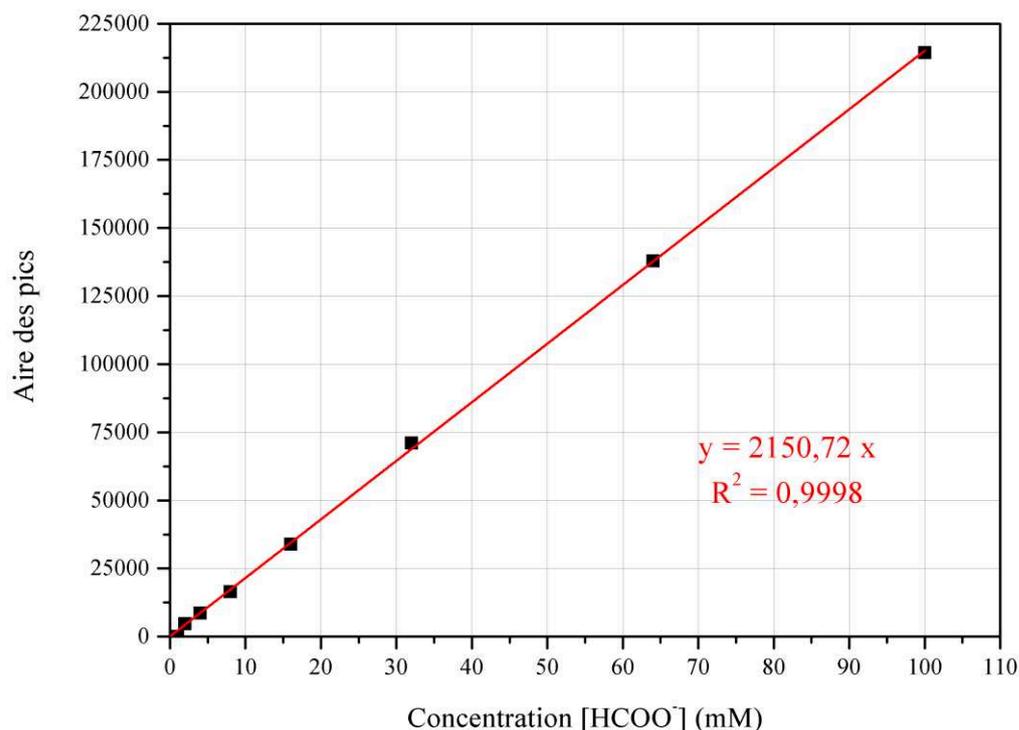
Une gamme étalon avec différentes concentrations en formiate a été préparée en présence des deux autres espèces : le bicarbonate de sodium [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] = 100 mM et le

tampon phosphite [Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>] = 500 mM. Les concentrations en formiate choisies pour la gamme d'étalonnage sont les suivantes : 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; 64 et 100 mM. Notre gamme étalon a été préparée de manière à avoir une concentration en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> équivalente à celle de la phase mobile [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] = 2,5 mM.



**Figure 85.** Chromatogrammes obtenus pour la gamme d'étalonnage du formiate.

Les chromatogrammes obtenus montrent que l'intensité et l'aire du pic au temps de rétention  $19,97 \pm 0,38$  min augmentent avec la concentration en formiate [HCOO<sup>-</sup>]. Une gamme d'étalonnage (aire du pic à  $t_r = 19,97 \pm 0,38$  min) = fonction ([HCOO<sup>-</sup>]) est alors tracée (fig. 86).



**Figure 86.** Gamme d'étalonnage (aire du pic à  $t_r = 19,97 \pm 0,38$  min) = fonction ([HCOO<sup>-</sup>])

### 4.3. Etude de la bioréduction du CO<sub>2</sub> en *batch*

Des essais de bioréduction du CO<sub>2</sub> avec l'enzyme formiate déshydrogénase (**MeFDH**) en *batch* et en présence du système de régénération enzymatique utilisant la phosphite déshydrogénase (**PtDH**) ont été réalisés. Ces essais permettent l'optimisation des conditions opératoires afin d'augmenter la productivité en formiate et pouvoir appliquer ces conditions optimales en flux continu.

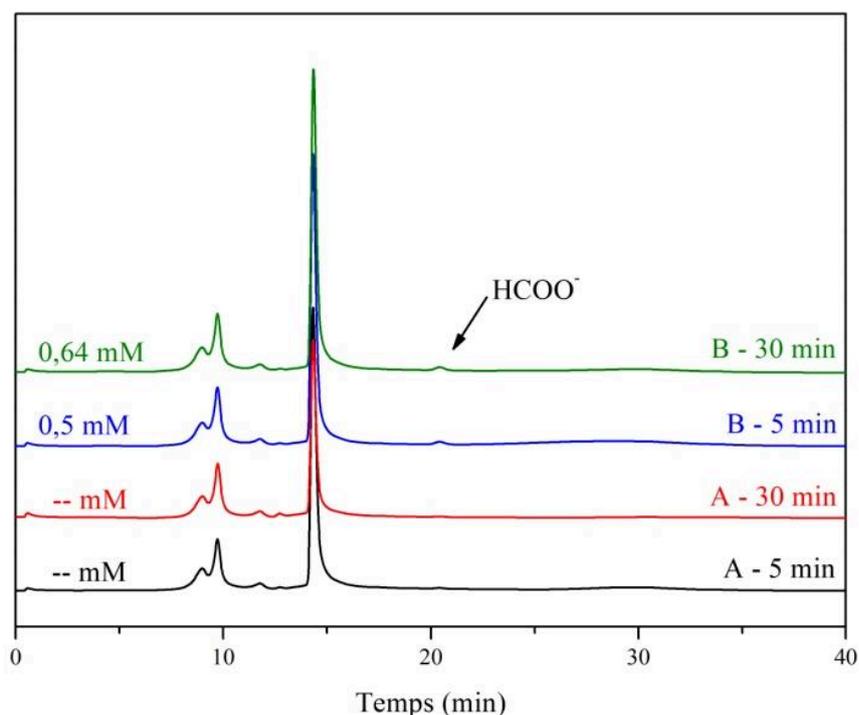
Nous montrons dans cette partie, l'influence des différents paramètres pouvant donner une meilleure productivité en formiate. Parmi ces paramètres, nous citons : (i) l'ajout du PEGDGE permettant d'augmenter la solubilité du CO<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel et de former des CLEAs entre les deux enzymes utilisées **MeFDH** et **PtDH** ; (ii) l'influence du barbotage du CO<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel ; (iii) le ratio d'activité optimal entre les deux enzymes.

### 4.3.1. Influence du PEGDGE

Les essais d'optimisation ont été réalisés en *batch* dans un volume total de solution de 2 mL. Cette solution contient [NaHCO<sub>3</sub>] = 100 mM ; [Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>] = 500 mM ; [NAD<sup>+</sup>] = 0,25 mM. Les deux expériences « A et B » ont été réalisées sous barbotage de CO<sub>2</sub> et avec les mêmes quantités d'enzymes **MeFDH** et **PtDH** (Tableau 19). Afin de mettre en avant l'influence du PEGDGE sur la bioréduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>, l'expérience A a été réalisé sans ajout de PEGDGE et l'expérience B a été effectuée en ajoutant 1 μL PEGDGE. La quantité de formiate produite est dosée par HPLC au bout de 5 et 30 min de réaction par HPLC (fig. 87).

**Tableau 19.** Expériences A et B : Influence de l'ajout du PEGDGE dans le milieu réactionnel, quantités d'enzymes et formiate produit

Manip	Volume total de la solution (mL)	Ratio U <sub>MeFDH</sub> /U <sub>PtDH</sub>	Masse PtDH (μg)	Masse MeFDH (μg)	Volume PEGDGE (μL)	Barbotage CO <sub>2</sub>	Formiate produit 5 min (mM)	Formiate produit 30 min (mM)
A	2	1/5	65,81	61,61	0	oui	--	--
B	2	1/5	65,81	61,61	1	oui	0,5	0,64

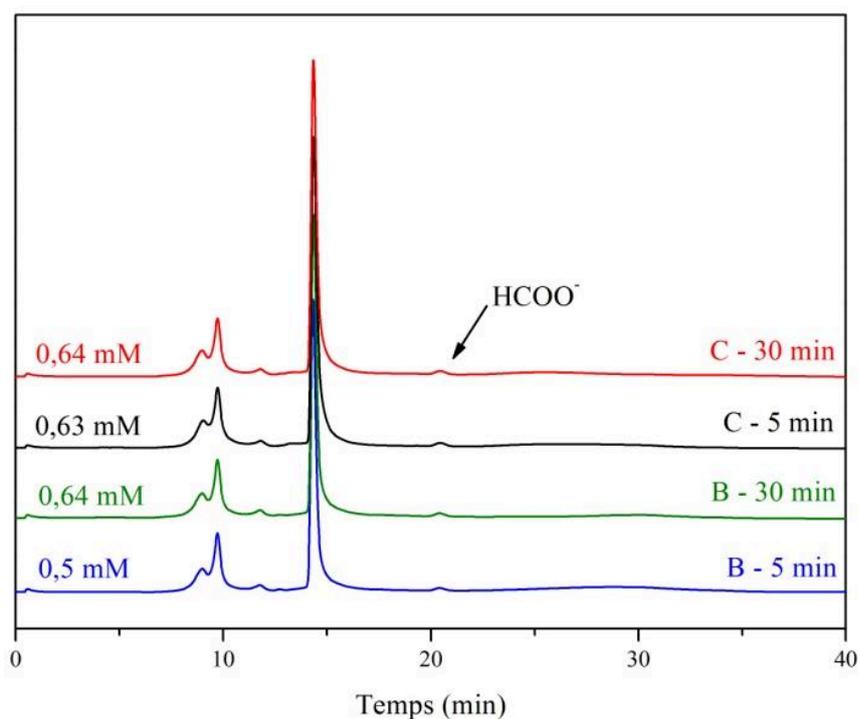


**Figure 87.** Chromatogrammes obtenus par HPLC : Influence de l'ajout du PEGDGE sur la bioréduction du CO<sub>2</sub>

Les chromatogrammes montrent qu'en absence du PEGDGE, la bioréduction du CO<sub>2</sub> est limitée par la solubilisation du CO<sub>2</sub> et les enzymes sont moins stables. En effet, dans les mêmes conditions et en présence du PEGDGE, 0,64 mM de formiate sont produits par bioréduction du CO<sub>2</sub>. En multipliant la quantité de PEGDGE par 10 dans (expérience C) tout en gardant les mêmes quantités d'enzymes que dans l'expérience B, il apparaît que la productivité de la bioréduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup> reste presque inchangée (Tableau 20) (fig. 88). Malgré une augmentation locale de la solubilité en CO<sub>2</sub> en multipliant la concentration en PEGDGE, l'hypothèse d'un trop grand nombre de ponts de réticulation entre les enzymes et donc d'une modification conformationnelle des biocatalyseurs est envisageable.

**Tableau 20.** Expériences B et C : Influence de l'augmentation de la quantité du PEGDGE

Manip	Volume total de la solution (mL)	Ratio $U_{MeFDH}/U_{PjDH}$	Masse PtDH (µg)	Masse MeFDH (µg)	Volume PEGDGE (µL)	Barbotage CO <sub>2</sub>	Formiate produit 5 min (mM)	Formiate produit 30 min (mM)
B	2	1/5	65,81	61,61	1	oui	0,5	0,64
C	2	1/5	65,81	61,61	10	oui	0,63	0,64



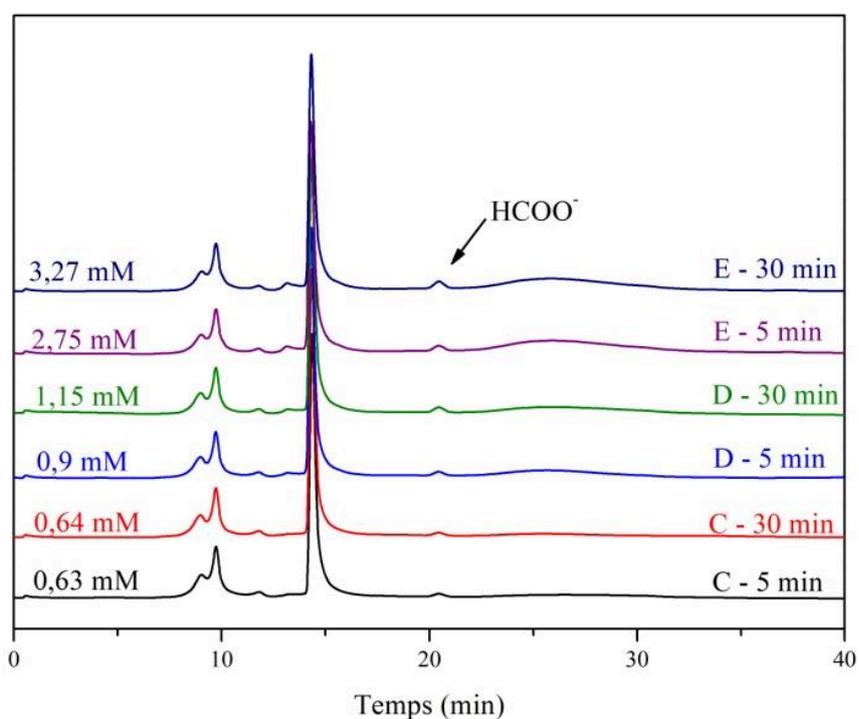
**Figure 88.** Chromatogrammes obtenus par HPLC : Influence de la concentration en PEGDGE sur la bioréduction du CO<sub>2</sub>

### 4.3.2. Influence de la concentration en enzymes

Pour l'étude de l'influence de la concentration en enzymes sur la bioréduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>, les quantités des deux enzymes **MeFDH** et **PtDH** de l'essai « C » ont été multiplié par 2 « D » et par 4 « E », en gardant  $\frac{\text{masse PEGDGE}}{\text{masse enzyme}} = \text{constante}$ . Les essais sont détaillés dans le tableau 21 et les chromatogrammes sont présentés sur la figure 89.

**Tableau 21.** Expériences C, D et E : Influence de la concentration en enzymes sur la bioréduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>

Manip	Volume total de la solution (mL)	Ratio $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}}$	Masse PtDH (µg)	Masse MeFDH (µg)	Volume PEGDGE (µL)	Barbotage CO <sub>2</sub>	Formiate produit 5 min (mM)	Formiate produit 30 min (mM)
C	2	1/5	65,81	61,61	10	oui	0,63	0,64
D	2	1/5	131,62	123,22	20	oui	0,9	1,15
E	2	1/5	263,24	246,44	40	oui	2,75	3,27



**Figure 89.** Chromatogrammes obtenus par HPLC : Influence de la concentration en enzymes sur la bioréduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>

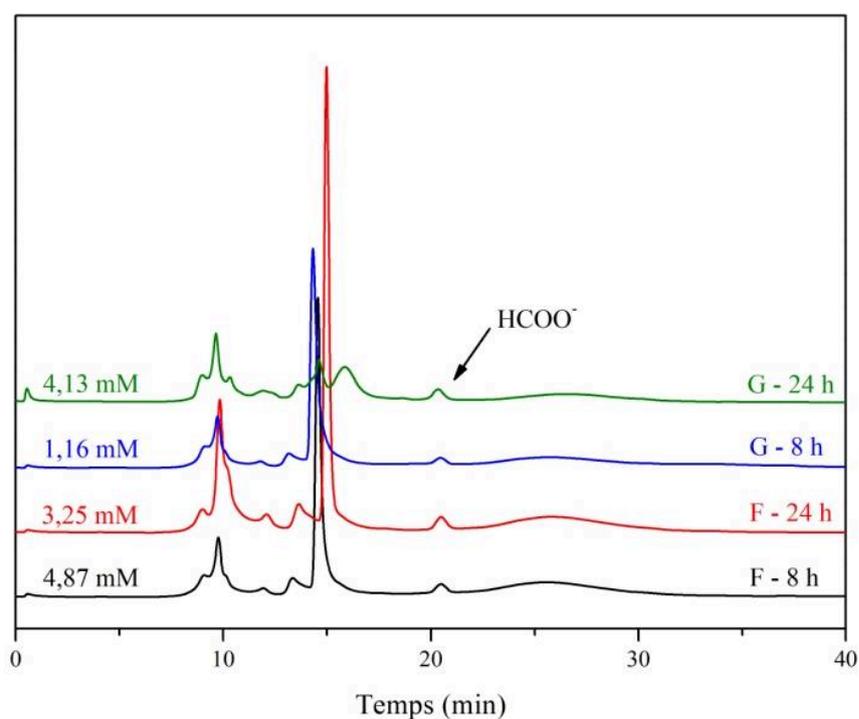
Les chromatogrammes des expériences C, D et E montrent que la production du HCOO<sup>-</sup> augmente avec l'augmentation de la concentration des enzymes pour atteindre 3,27 mM HCOO<sup>-</sup> au bout de 30 min pour la concentration la plus élevée.

### 4.3.3. Influence du barbotage au CO<sub>2</sub>

L'expérience E a été gardée pour l'étude de l'influence du barbotage au CO<sub>2</sub> lors de la réaction de conversion enzymatique du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>. En effet, deux expériences ont été réalisées ; F avec barbotage au CO<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel et G sans barbotage au CO<sub>2</sub> avec un suivi de la production du formiate au bout de 8 et 24 heures.

**Tableau 22.** Expériences F et G : Influence du barbotage au CO<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel.

Manip	Volume total de la solution (mL)	Ratio U <sub>MeFDH</sub> /U <sub>PtDH</sub>	Masse PtDH (µg)	Masse MeFDH (µg)	Volume PEGDGE (µL)	Barbotage CO <sub>2</sub>	Formiate produit (mM) 8 heures	Formiate produit (mM) 24 heures
F	2	1/5	263,24	246,44	40	Oui	4,87	3,25
G	2	1/5	263,24	246,44	40	non	1,16	4,13



**Figure 90.** Chromatogrammes obtenus par HPLC : Influence du barbotage au CO<sub>2</sub> sur la bioréduction du CO<sub>2</sub>

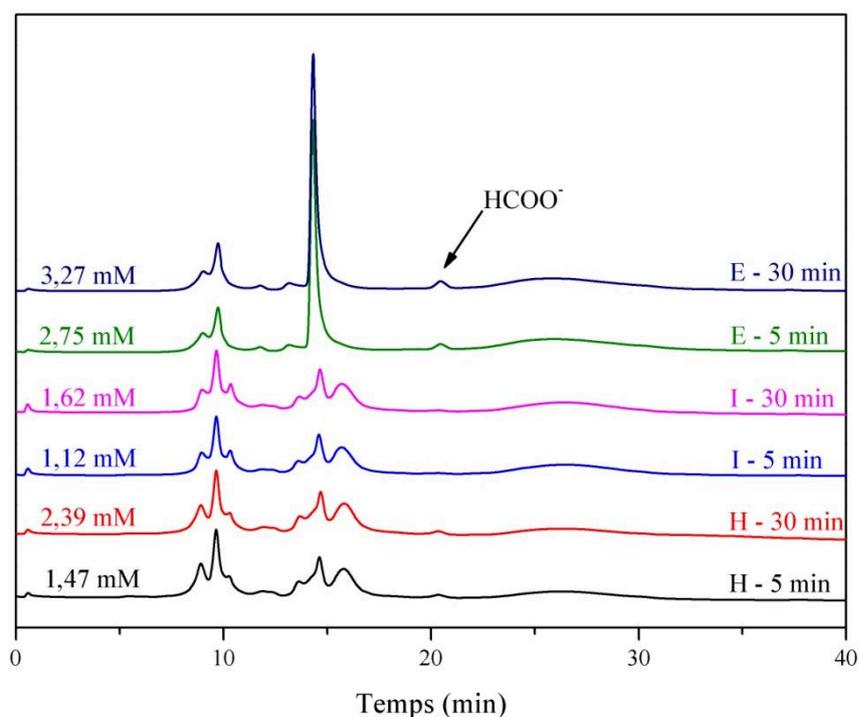
Les chromatogrammes obtenus par HPLC des deux expériences G et F montrent que le barbotage au CO<sub>2</sub> permet d'atteindre plus rapidement le palier de conversion du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup> avec une concentration en formiate de 4,87 mM après seulement huit heures.

#### 4.3.4. Influence du ratio d'activité $U_{MeFDH}/U_{PtDH}$

Il est intéressant d'étudier le comportement des deux enzymes l'une vis-à-vis de l'autre. Trois expériences ont été réalisées en modifiant le ratio des activités spécifiques entre les deux enzymes  $U_{MeFDH}/U_{PtDH} = (1/5 ; 1 ; 5)$ .

**Tableau 23.** Expériences E, H et I : Influence du ratio des activités entre les deux enzymes  $U_{MeFDH}/U_{PtDH}$  sur la bio réduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>.

Manip	Volume total de la solution (mL)	Ratio $U_{MeFDH}/U_{PtDH}$	Masse PtDH (µg)	Masse MeFDH (µg)	Volume PEGDGE (µL)	Barbotage CO <sub>2</sub>	Formiate produit 5 min (mM)	Formiate produit 30 min (mM)
E	2	1/5	263,24	246,44	40	Oui	2,75	3,27
H	2	1	52,65	246,44	40	Oui	1,47	2,39
I	2	5	52,65	1232,2	40	Oui	1,12	1,62

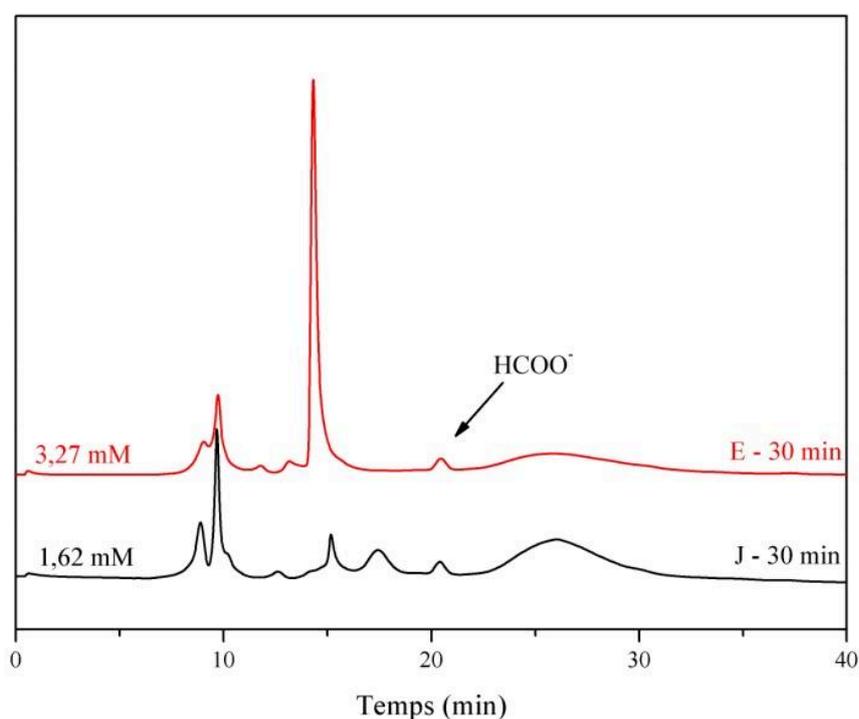


**Figure 91.** Chromatogrammes obtenus par HPLC : Influence du ratio d'activité entre les deux enzymes  $U_{MeFDH}/U_{PtDH}$  des expériences H (ratio 1), I (ratio 5) et E (ratio 1/5)

Les chromatogrammes obtenus pour les expériences E, H et I montrent que la productivité en formiate augmente avec la diminution du ratio  $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}}$ . Il est intéressant de baisser encore plus le ratio des activités spécifiques entre les deux enzymes  $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}}$  de 1/5 à 1/25.

**Tableau 24.** Expériences E et J : Influence de la baisse du ratio des activités entre les deux enzymes à  $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}} = 1/25$  sur la bio réduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup>.

Manip	Volume total de la solution (mL)	Ratio $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}}$	Masse PtDH (μg)	Masse MeFDH (μg)	Volume PEGDGE (μL)	Barbotage CO <sub>2</sub>	Formiate produit 30 min (mM)
E	2	1/5	263,24	246,44	40	Oui	3,27
J	2	1/25	1316,2	246,44	40	Oui	1,62



**Figure 92.** Chromatogrammes obtenus HPLC pour les expériences E et J : Influence de la baisse du ratio des activités spécifiques entre les deux enzymes à  $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}} = 1/25$ .

Les chromatogrammes montrent que la productivité en formiate par bioréduction du CO<sub>2</sub> atteint un palier à 3,27 mM au bout de 30 min pour le ratio des activités spécifiques entre

les deux enzymes  $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}} = 1/5$  et baisser ce ratio à  $1/25$  n'augmente pas la productivité en formiate (au contraire, celle-ci diminue).

Il est intéressant de déterminer le *turn-over number* (TON) et le *turn-over frequencies* (TOF) pour les deux enzymes **PtDH** et **MeFDH** (calcul, voir Annexe 4) ainsi que pour le cofacteur NAD<sup>+</sup> pour le ratio d'activité entre les deux enzymes  $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}} = 1/5$  sous bullage de CO<sub>2</sub> (l'essai E). Ces valeurs donnent une idée respectivement sur le nombre de moles transformées par mole de catalyseur et le nombre de moles transformées par mole de catalyseur et par unité de temps.

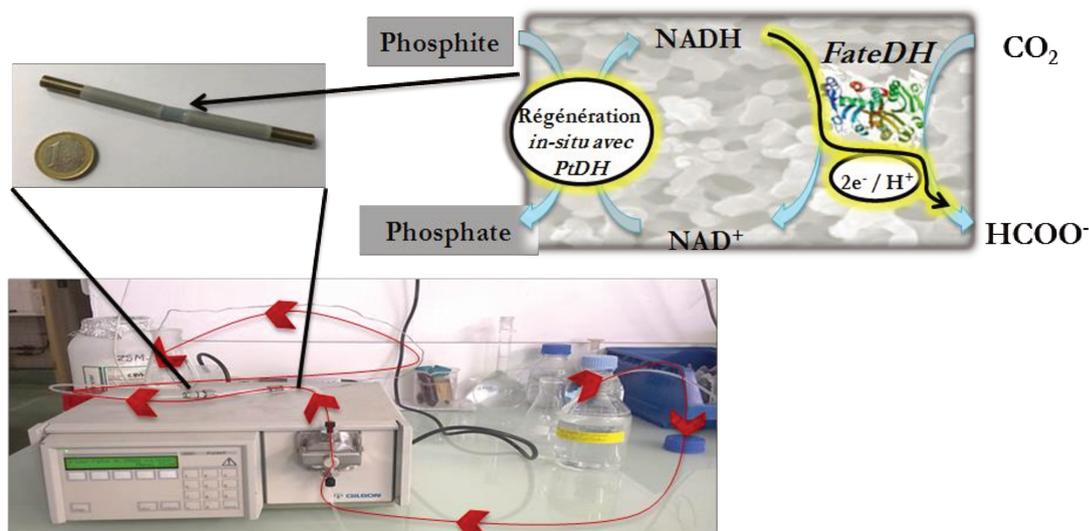
**Tableau 25.** Résultats des *turn-over number* (TON) et *turn-over frequencies* (TOF) pour les deux enzymes **PtDH** et **MeFDH** ainsi que pour le cofacteur NAD<sup>+</sup>.

	TTN	TOF (min <sup>-1</sup> )
NAD <sup>+</sup>	14	0,47
PtDH	890	29,8
MeFDH	4460	149

Pour le développement et l'étude du dispositif en flux continu, nous choisissons alors de travailler avec les conditions opératoires optimisées de l'expérience E. Le système biocatalytique étudié en *batch* sera immobilisé sur deux monolithes à porosité hiérarchique : un de silice (**SiO<sub>2</sub>-40-20**) et un de carbone (**C-40-20**) correspondant à la réplique inverse de la même silice.

#### 4.4. Catalyse supportée sur monolithes et flux continu (PtDH + MeFDH)

Après avoir optimisé les conditions opératoires de la conversion enzymatique du CO<sub>2</sub> avec la **MeFDH** et la **PtDH** en *batch*, les conditions optimisées ont été appliquées sur deux monolithes de silice et de carbone synthétisés préalablement au laboratoire (voir chapitre 3). Les monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20** et de carbone **C-40-20** ont été préparés sous forme de réacteurs (*cf.* 2.3.7) qui sont intégrés dans un montage en flux continu pour l'immobilisation des enzymes et la réduction du CO<sub>2</sub> (fig. 93).

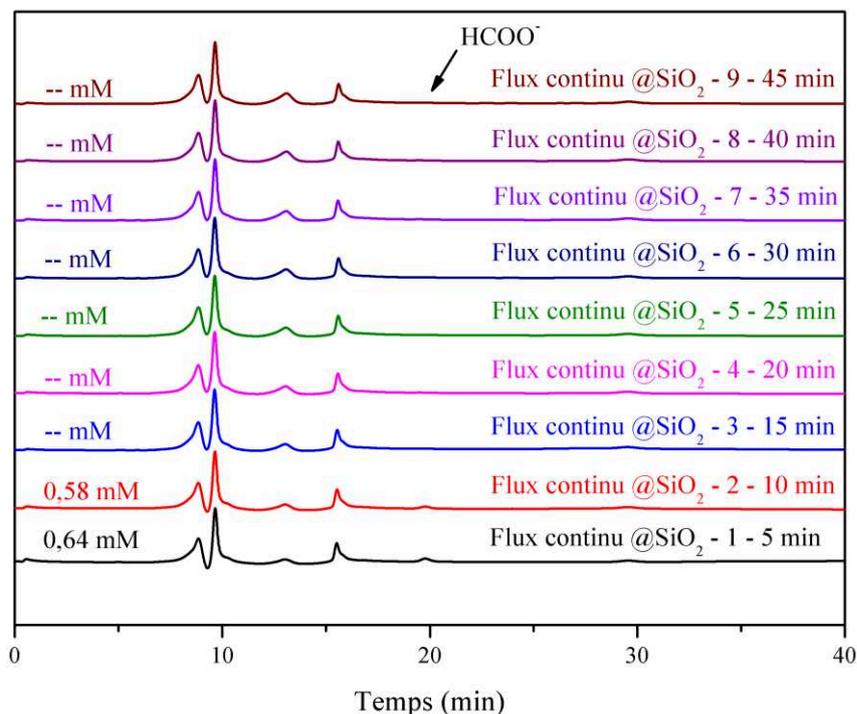


**Figure 93.** Montage en flux continu et schématisation de la réduction du CO<sub>2</sub> avec formiate déshydrogénase **MeFDH** immobilisée sur monolithe poreux en présence du système de régénération du cofacteur NAD avec la phosphite déshydrogénase **PtDH**.

#### 4.4.1. Catalyse supportée sur monolithe de silice et flux continu

Après avoir préparé le réacteur à base de monolithe de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20**, 20 mL d'une solution tampon phosphite 500 mM, pH 6,4 ont été passés à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> à travers le réacteur permettant ainsi son conditionnement avant l'immobilisation des enzymes. Par la suite, une solution enzymatique de volume 0,276 mL, égal au volume total du monolithe de silice, contenant 500 mM tampon phosphite pH 6,4, 263,23 µg PtDH, 246,44 µg MeFDH, 40 µL PEGDGE et 0,25 mM NAD<sup>+</sup> est passée sous flux à travers le monolithe à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> afin de remplir sa porosité. Une fois l'ensemble du volume poreux est rempli par la solution enzymatique, le flux est arrêté et le monolithe est laissé pendant 24 heures au frigo à 4 °C. Des agrégats d'enzymes (**MeFDH + PtDH**) sont obtenus à l'aide du PEGDGE dans lesquels le cofacteur NAD est piégé. Après immobilisation des enzymes par CLEAs, le bioréacteur obtenu est lavé avec 20 mL d'une solution tampon phosphite 500 mM, pH 6,4 à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>.

Une solution contenant 500 mM tampon phosphite pH 6,4 et 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, où est barboté du CO<sub>2</sub> est passée à travers le bioréacteur à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> et des fractions de 1 mL sont récupérées à la sortie du réacteur tous les 5 min pendant 45 min. Les fractions sont analysées par HPLC pour déterminer la quantité produite en HCOO<sup>-</sup> (fig. 94).



**Figure 94.** Chromatogrammes obtenus par HPLC des fractions récupérées après bioréduction du CO<sub>2</sub> avec un bioréacteur où un monolithe de silice **SiO<sub>2</sub>-40-20** est utilisé comme support pour l'immobilisation d'enzymes. Un zoom sur le signal de l'acide formique entre 16 et 24 minutes a été tracé (voir annexe 6).

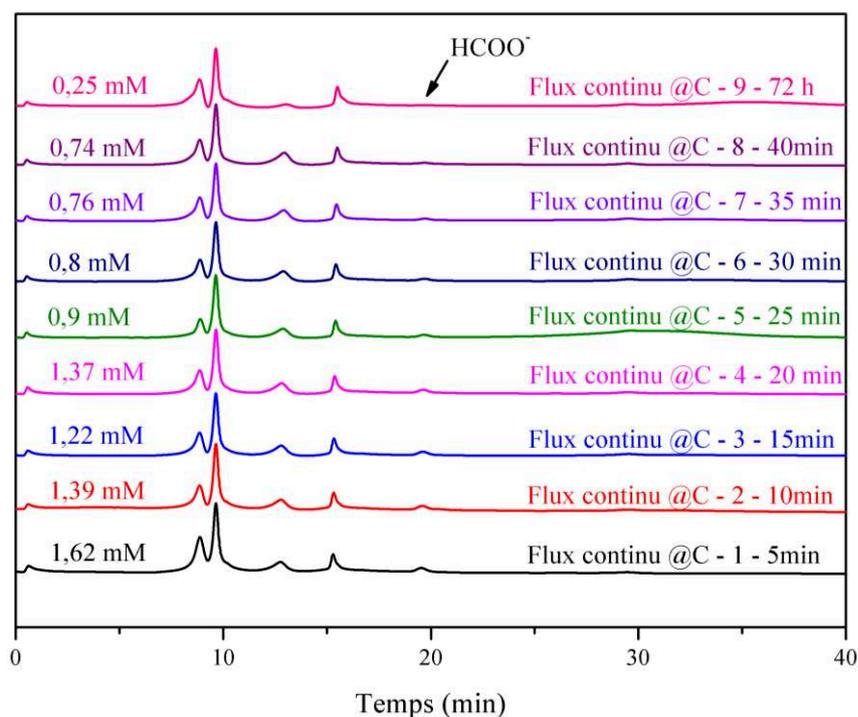
Les chromatogrammes montrent que la bioréduction du CO<sub>2</sub> en HCOO<sup>-</sup> sous flux continu est stable pendant 10 minutes. En revanche, au bout de 15 min la concentration en HCOO<sup>-</sup> n'est plus détectable, elle est en dessous de la limite de détection. La productivité en flux continu sur monolithe de silice calculée sur 10 minutes est de 0,49 μmol<sub>HCOO<sup>-</sup></sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> contre 0,88 μmol<sub>HCOO<sup>-</sup></sub>·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> en *batch*.

#### 4.4.2. Catalyse supportée sur monolithe de carbone et flux continu

La même expérience a été réalisée sur un monolithe de carbone **C-40-20**. Le réacteur à base de monolithe de Carbone **C-40-20** a été conditionné de la même manière que le réacteur à base de silice. Les enzymes ont été immobilisées comme décrit précédemment (*cf.* 4.4.1).

La bioréduction du CO<sub>2</sub> se fait en suivant le même protocole expérimental utilisé avec le monolithe de silice. Des fractions de 1 mL sont récupérées à la sortie du réacteur tous les 5

min pendant 40 min. Les fractions sont analysées par HPLC pour déterminer la quantité produite en HCOO<sup>-</sup> (fig. 95).



**Figure 95.** Chromatogrammes obtenus par HPLC des fractions récupérées après bioréduction du CO<sub>2</sub> avec un bioréacteur où un monolithe de carbone C-40-20 est utilisé comme support pour l'immobilisation d'enzymes. Un zoom sur le signal de l'acide formique entre 16 et 24 minutes a été tracé (voir annexe6).

Les chromatogrammes obtenus par HPLC montrent que la productivité en HCOO<sup>-</sup> obtenue sur un monolithe de carbone comme support est supérieure à celle obtenue sur un monolithe de silice. Sur monolithe de carbone, la productivité en flux continu est de 0,99  $\mu\text{mol}_{\text{HCOO}^-} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$ , contre 0,49  $\mu\text{mol}_{\text{HCOO}^-} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$  pour une bioréduction réalisée sur monolithe de silice. En outre, la productivité sur monolithe de carbone est supérieure à celle obtenue en *batch* (*i.e.* 0,88  $\mu\text{mol}_{\text{HCOO}^-} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$ ).

Ce bioréacteur à base de monolithe de carbone a été lavé avec 20 mL d'une solution tampon phosphite 500 mM pH 6,4 avec un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> et a été stocké pendant 72 heures à 4 °C pour être ensuite réutilisé pour la bioréduction du CO<sub>2</sub>. La production d'acide formique peut être à nouveau détectée, supportant une stabilité des enzymes dans le temps.

Afin d'évaluer les performances et la compétitivité de notre système biocatalytique, il est intéressant de comparer nos travaux avec des études récentes rapportées dans la littérature

s'intéressant à la conversion du CO<sub>2</sub> par voie enzymatique. Les valeurs de productivité en formiate (ou en méthanol) sont présentées dans le tableau suivant (tableau 26) et ont été calculées sur une durée d'une minute. Tous ces systèmes biocatalytiques utilisent des enzymes commerciales, notamment la CbFDH.

**Tableau 26.** Comparaison avec les résultats de réduction du CO<sub>2</sub> dans la littérature. Le tableau présente le type du catalyseur utilisé pour la réduction du CO<sub>2</sub>, le cofacteur utilisé, la référence et la production en formiate ou en méthanol. \*à un potentiel de -1,75 V vs. Fc<sup>+</sup>/Fc

Type de catalyse	Catalyseur	Co-catalyseur(s)	Référence	Production (μmol <sub>produit</sub> .mg <sup>-1</sup> <sub>catalyseur</sub> .min <sup>-1</sup> )
Biocatalyse	<b>MeFDH</b>	PtDH NADH	Notre étude	
			Monolithe de carbone	<b>0,99</b> μmol <sub>HCOO</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> <sub>MeFDH</sub>
			Monolithe de silice	<b>0,49</b> μmol <sub>HCOO</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> <sub>MeFDH</sub>
			En <i>batch</i>	<b>0,88</b> μmol <sub>HCOO</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> <sub>MeFDH</sub>
Biocatalyse	<b>CbFDH commerciale</b>	PtDH NADH	Ref <sup>33</sup>	<b>0,023</b> μmol <sub>MeOH</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> <sub>poudre enzymatique commerciale</sub>
	FaldDH commerciale			
	YADH commerciale			
Bioélectrocatalyse	<b>CbFDH commerciale</b>	Sans NADH. Viologènes	Ref <sup>126</sup>	<b>0,21</b> μmol <sub>HCOO</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> <sub>poudre enzymatique commerciale</sub>
Bioélectrocatalyse	<b>CbFDH commerciale,</b>	Transfert direct d'électron	Ref <sup>127</sup>	<b>9,75.10<sup>-6</sup></b> μmol <sub>MeOH</sub> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> <sub>poudre enzymatique commerciale</sub>
	FaldDH et ADH commerciale			
Electrocatalyse	Cu dendritique	--	Ref <sup>128</sup>	<b>1,5</b> μmol <sub>HCOO</sub> ·min <sup>-1</sup> *

A noter qu'une seule étude en catalyse enzymatique nous a permis de remonter à des valeurs de productivité en formiate.<sup>126</sup> Dans cette étude, Y. Amao *et al.* ont développé un système bioélectrocatalytique en utilisant une co-enzyme artificielle à base de viologène pour remplacer le cofacteur naturel, *i.e.* le 1,4-NADH. Une productivité en formiate de **0,21**  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  poudre enzymatique commerciale est rapportée, contre **0,99**  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$  pour notre système supporté sur monolithe de carbone en flux continu.

Bien qu'une comparaison avec des systèmes enzymatiques en cascade menant jusqu'au méthanol soit plus délicate, elle peut nous apporter une indication quant aux performances de notre système. La productivité en formiate de notre réacteur en flux continu sur monolithe de carbone est ainsi 40 fois supérieure à celle en méthanol rapportée dans la thèse de Rémi Cazelle. Dans cette dernière étude, les trois enzymes de la réaction en cascade ainsi que le cofacteur NAD et la PtDH ont été encapsulés dans des nanocapsules à base de silice. Ce système reste un des plus compétitifs à ce jour pour la conversion enzymatique du CO<sub>2</sub> en méthanol. Une comparaison rigoureuse pourrait être réalisée en ajoutant la FaldDH et la YADH à notre réacteur en flux continu. Une telle étude fait partie des perspectives à court terme de ce travail de thèse.

Enfin, nous avons comparé notre système biocatalytique à un système électrocatalytique sur dendrites de cuivre développé par M. Fontecave *et al.*<sup>128</sup>. Les auteurs ont rapporté une productivité en acide formique de **1,5**  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ , 50% supérieure à celle obtenue en flux continu sur monolithe de carbone pour un milligramme d'enzyme. A noter que ces travaux ont été réalisés dans un électrolyte à base d'eau et de liquide ionique, permettant d'augmenter considérablement la solubilité du CO<sub>2</sub>.

## 4.5. Conclusions

Il a été montré dans ce chapitre qu'il est possible de réduire le CO<sub>2</sub> en flux continu en utilisant la formiate déshydrogénase issue de *Methylobacterium extorques* AM1 (**MeFDH**) immobilisée avec la phosphite déshydrogénase (**PtDH**) en présence du cofacteur sous sa forme oxydée NAD<sup>+</sup> sur un support monolithique. Ce résultat est une preuve de concept et ouvre de nombreuses perspectives. Il s'est avéré que le réacteur sur monolithe de carbone présente une productivité en formiate plus élevée que celui sur monolithe de silice, *i.e.* 0,99  $\mu\text{mol}_{\text{HCOO}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$  contre 0,49  $\mu\text{mol}_{\text{HCOO}}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$  sur un monolithe de silice.

Ce résultat préliminaire est encore incompris mais peut-être dû à la présence d'une plus grande surface spécifique et d'un plus grand volume poreux. La chimie de surface et le caractère hydrophobe/hydrophile des monolithes utilisés peuvent également influencer l'affinité entre l'enzyme et le support et ainsi affecter l'activité enzymatique.

Comme perspectives, il serait intéressant de travailler dans un milieu réactionnel non conventionnel, par exemple un liquide ionique qui pourrait augmenter la solubilité du CO<sub>2</sub> comme ce qui a été montré dans le travail de Fontecave *et al.*<sup>128</sup> De plus, il serait intéressant de combiner le système de réduction biocatalytique au système de régénération du cofacteur par voie électrochimique et réduire le CO<sub>2</sub> par voie bio-électrocatalytique. La possibilité d'utiliser la MeFDH en électrocatalyse par transfert direct d'électron (sans cofacteur ou autres médiateurs) semble également être prometteur. Une étude sur monolithe de carbone et autres carbones poreux serait également pertinente.

Aussi, il serait pertinent de tester les autres monolithes synthétisés dans le chapitre 3 notamment le monolithe de carbone **C-RF** qui est uniquement micro-macroporeux afin d'étudier l'influence de la mésoporosité sur l'immobilisation des enzymes et la réduction biocatalytique du CO<sub>2</sub>. De plus, tester des monolithes de silice **SiO<sub>2</sub>-3-20** permet d'étudier l'effet de la macroporosité en biocatalyse.



## Chapitre 5 - Fonctionnalisation des monolithes carbonés et électrochimie

Il s'agit d'un chapitre prospectif visant à ouvrir des perspectives quant au développement de réacteurs bio-électrocatalytiques en flux continu pour la conversion du CO<sub>2</sub>. Une attention particulière a été portée sur la fonctionnalisation de matériaux carbonés, notamment les monolithes synthétisés dans le chapitre 3, afin de favoriser la régénération électrochimique du cofacteur NAD voire permettre son immobilisation covalente. En effet, ce cofacteur est très coûteux et délicat à régénérer. Des études ont été rapportées dans la littérature montrant l'importance de médiateurs, par exemple des phénazines, sur la régénération de ce cofacteur par voie électrochimique. Nous nous sommes alors intéressés au greffage de ces médiateurs, dans un premier temps, sur un monolithe de carbone utilisé comme référence le **C-RF** par voie diazonium, et dans un second temps, sur des électrodes de carbone vitreux par électropolymérisation après avoir généré un sel de diazonium de ces médiateurs. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'immobilisation de ce cofacteur de manière covalente sur supports carbonés. Cette immobilisation sera effectuée par voie Diels-Alder en utilisant un espaceur.

Dans un premier temps, nous montrons dans ce chapitre la faisabilité de modification de surface de monolithes de carbone **C-RF** par voie diazonium et Diels-Alder en utilisant des molécules modèles. Nous passons par la suite au greffage des médiateurs (*i.e* phénazines) par voie diazonium sur monolithe de carbone **C-RF** et sur électrode de carbone vitreux. Nous finirons ce chapitre par l'étude de l'immobilisation du cofacteur par voie Diels-Alder sur un carbone modèle : des nanotubes de carbone multi-parois.

5.1. Fonctionnalisation des monolithes carbonés .....	147
5.1.1. Voie diazonium .....	147
5.1.2. Voie Diels-Alder .....	148
5.1.3. Molécules modèles : diazonium <i>vs.</i> Diels-Alder .....	149
5.2. Régénération électrochimique du cofacteur NADH : greffage de médiateurs .....	153
5.2.1. Greffage des phénazines sur monolithe C-RF .....	156
5.2.2. Greffage des phénazines sur GCE .....	158
5.3. Immobilisation covalente du cofacteur NADH .....	162
5.4. Conclusions .....	170

## 5.1. Fonctionnalisation des monolithes carbonés

Il est intéressant de fonctionnaliser la surface des monolithes de carbone pour pouvoir immobiliser soit des molécules permettant de catalyser la régénération du cofacteur, soit le cofacteur lui-même. Différentes méthodes de fonctionnalisation existent, parmi lesquelles la méthode de greffage par formation du sel de diazonium *in situ* et la voie Diels-Alder. En fonction de la molécule à greffer, la voie de greffage sera sélectionnée.

### 5.1.1. Voie diazonium

La voie de synthèse du sel de diazonium est la suivante (fig. 96 et 97), l'acide nitreux est formé à partir du nitrite de sodium et de l'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ou l'acide chlorhydrique  $\text{HCl}$ ). La perte d'eau à partir de l'acide nitreux protoné génère des ions de nitrosonium (fig. 96).

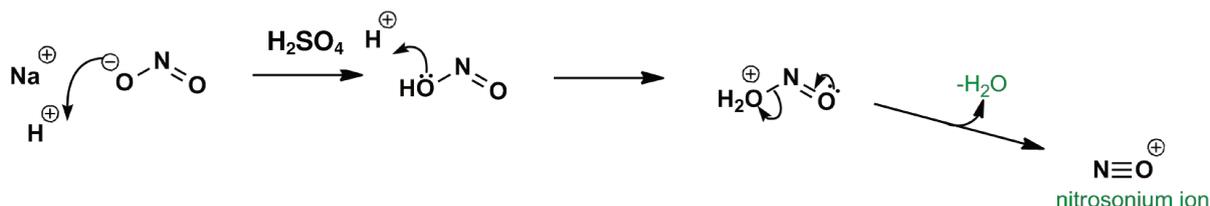


Figure 96. Synthèse des ions nitrosonium<sup>129</sup>

Les ions nitrosonium obtenus réagissent avec les amines primaires (*i.e* les fonctions amine du p-phénylènediamine) formant ainsi des nitrosamines. Il y aura par la suite une délocalisation des paires d'électrons de l'azote sur les nitrosamines, suivie d'une prototropie (déplacement d'un atome d'hydrogène au sein de la même molécule, de l'azote vers l'oxygène). Finalement, une reprotonation de l'oxygène et une délocalisation des paires d'électrons de l'azote provoquent l'élimination d'une molécule d'eau et la formation de l'ion diazonium (fig. 97).

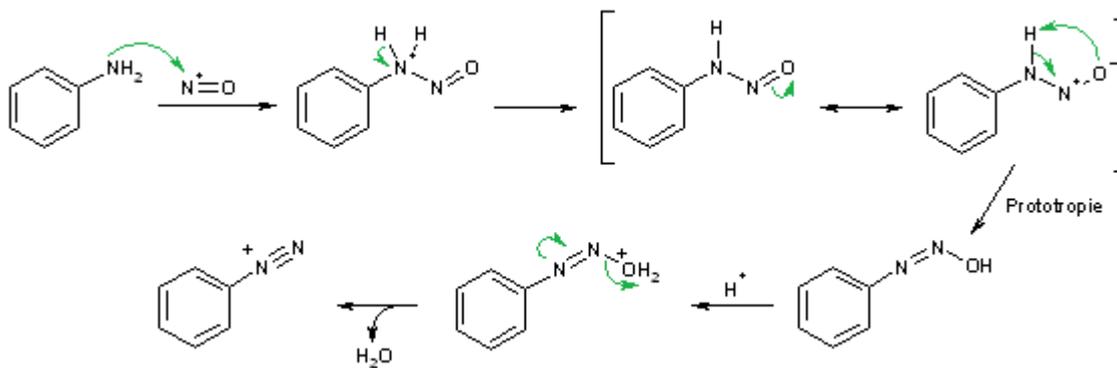


Figure 97. Synthèse des ions diazonium.

Les systèmes  $\pi$  de la structure carbonée du monolithe de carbone préalablement dégazé, pour s'assurer que les pores sont vides, réagissent avec les ions diazonium synthétisés *in situ* sous chauffage.<sup>130-132</sup> (Fig. 98)

Dans le cas du greffage par voie diazonium avec une réduction électrochimique,<sup>133</sup> la réaction de synthèse du sel de diazonium se fait à 0°C (dans un bain eau/glace) car le composé produit n'est pas stable et se décompose spontanément pour former un carbocation. Le sel de diazonium est stable en solution aqueuse glacée.<sup>134</sup>



Figure 98. Greffage de fonctions amine.

### 5.1.2. Voie Diels-Alder

La voie Diels-Alder est une réaction chimique où un alcène (diénophile) s'additionne à un diène conjugué pour former un dérivé cyclohexène. La réaction de Diels-Alder est une réaction de cycloaddition entre systèmes  $\pi$ . En effet, les quatre électrons  $\pi$  du diène réagissent avec la double liaison de l'alcène contenant deux électrons  $\pi$  (fig. 99). La réalisation de ces réactions nécessite un chauffage.<sup>135</sup>

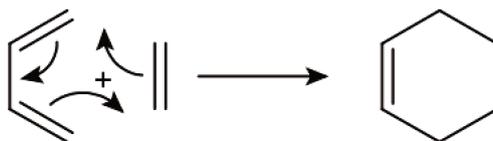


Figure 99. Mécanisme de la réaction de Diels-Alder.

### 5.1.3. Molécules modèles : diazonium vs. Diels-Alder

La fonctionnalisation du monolithe de carbone **C-RF** par voie diazonium en utilisant le p-phénylènediamine a été effectuée en présence du nitrite de sodium et d'acide sulfurique à 60 °C pendant 24 heures où l'ion nitrosonium a été généré *in situ*. Le sel de diazonium réagit avec le système  $\pi$  du monolithe de carbone.

Après greffage par voie diazonium, le monolithe obtenu a été caractérisé par adsorption-désorption d'azote à 77 K.

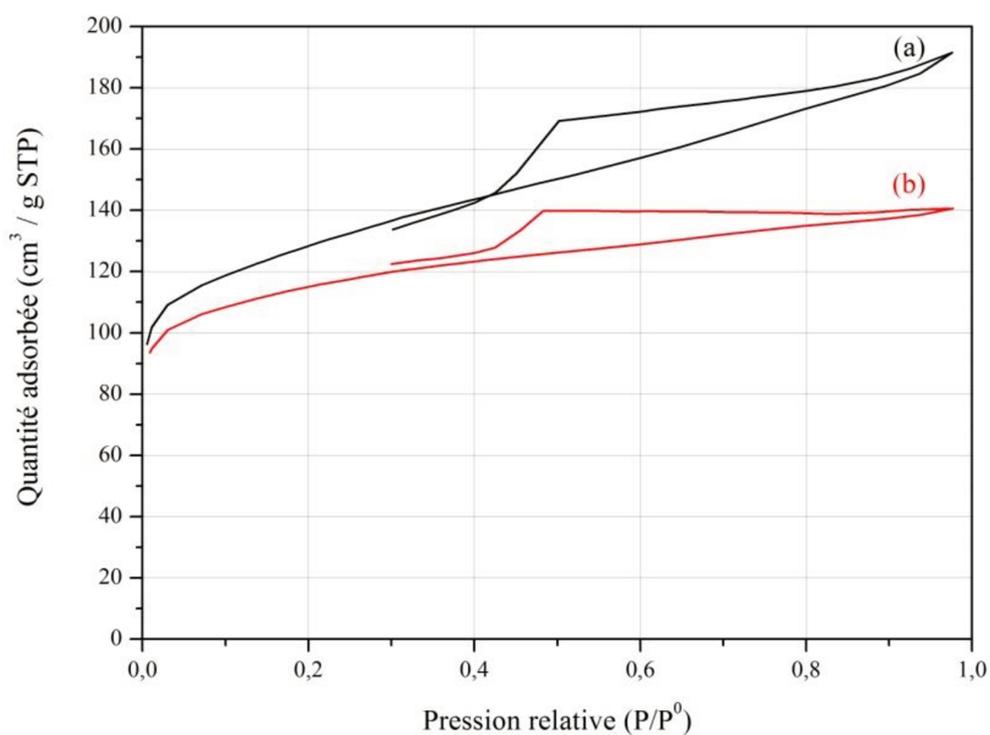
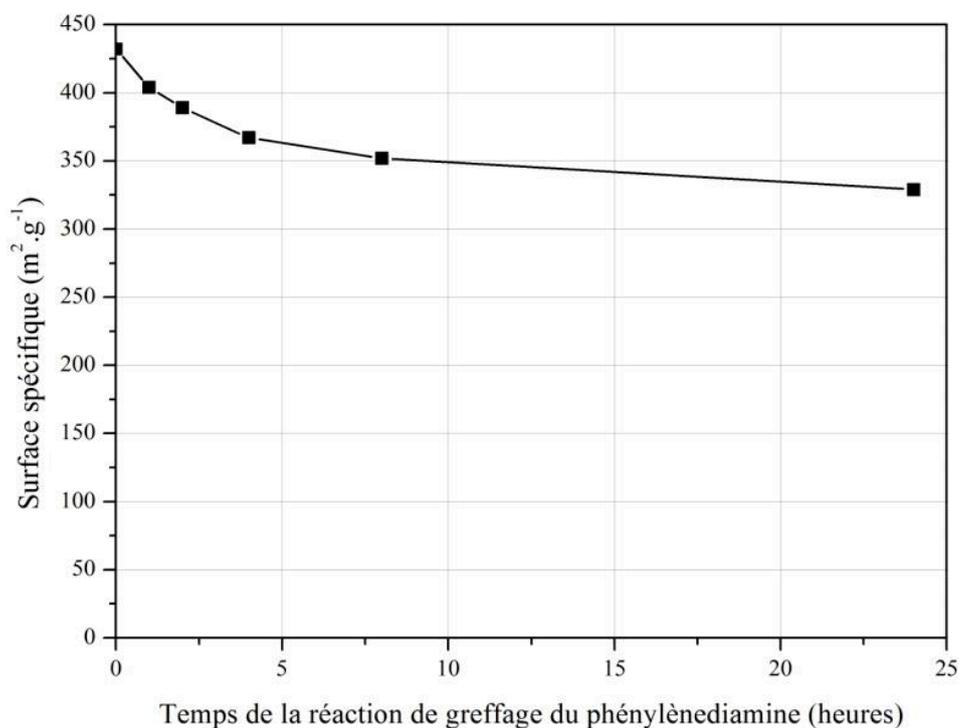


Figure 100. Isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77 K des monolithes (a) **C-RF** (b) **C-RF** greffé par 1,4-phénylènediamine par formation d'un sel de diazonium.

Les isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77 K montrent qu'après greffage du phénylènediamine par diazonium, il y a une baisse de la surface spécifique et du volume poreux (fig. 100).

Une cinétique de la réaction de greffage par voie diazonium a été effectuée sur 24 heures. Les monolithes fonctionnalisés dont le temps de réaction été de 1 ; 2 ; 4 ; 8 et 24 heures ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote à 77 K. La variation de la surface spécifique du monolithe **C-RF** a été tracée en fonction du temps de réaction (fig. 101).



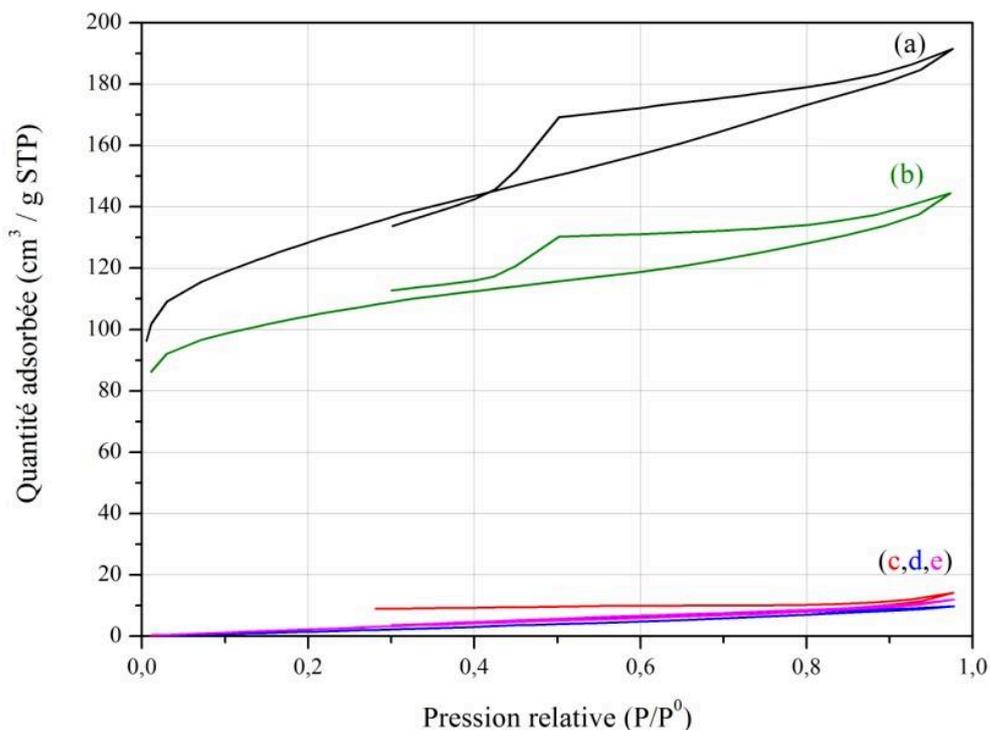
**Figure 101.** Variation de la surface spécifique en fonction de la durée de la réaction du greffage du 1,4-phénylènediamine.

La variation de la surface spécifique en fonction du temps de greffage par voie diazonium montre une baisse rapide de la surface spécifique pour une durée comprise entre 1 et 4 heures. Cette baisse atteint progressivement un palier au bout de 24 heures. Il est possible alors de contrôler ce greffage en fonction du temps de réaction.

Les monolithes de carbone **C-RF** ont été aussi fonctionnalisés par voie Diels-Alder en utilisant une molécule modèle, *i.e.* le propargylamine. Cette réaction a été effectuée en

autoclave dans le toluène à différentes températures (60 ; 80 et 100 °C) pendant 24 heures.<sup>136</sup> Un traitement du monolithe de départ dans le toluène a été effectué à 100 °C servant ainsi de blanc.

Les monolithes **C-RF** fonctionnalisés et le monolithe de départ ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote à 77 K (fig. 102).



**Figure 102.** Isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77K des monolithes (a) **C-RF** (b) **C-RF** traité dans le toluène à 100 °C et des monolithes **C-RF** fonctionnalisés par Diels-Alder avec du propargylamine dans le toluène à (c) 60 °C (d) 80 °C (e) 100 °C.

Les isothermes des matériaux greffés par voie Diels-Alder (fig. 102) montrent une grande diminution de la surface spécifique en comparaison avec le matériau de départ. De plus, ces isothermes sont planes pour les monolithes greffés, supportant une obstruction des pores et un greffage efficace.

**Tableau 27.** Résultats obtenus par la volumétrie d'adsorption-désorption d'azote et comparaison entre les deux voies de greffage Diazonium et Diels-Alder.

Echantillons	Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	Volume mésoporeux total (cm <sup>3</sup> /g)
<b>C-RF</b>	463	0,30
<b>C-RF</b> Diels-Alder 60°C 24h	9	0,02
<b>C-RF</b> Diels-Alder 80°C 24h	10	0,02
<b>C-RF</b> Diels-Alder 100°C 24h	14	0,02
<b>C-RF</b> Sel de Diazonium	425	0,22

De plus, la volumétrie d'adsorption-désorption d'azote ne montre pas une différence significative entre les isothermes des différents monolithe **C-RF** greffés avec propargylamine par Diels-Alder aux différentes températures du greffage utilisées. Pour confirmer ces résultats, une analyse élémentaire a été effectuée (Tableau 28).

**Tableau 28.** Résultats de l'analyse élémentaire et comparaison entre les deux voies de greffage.

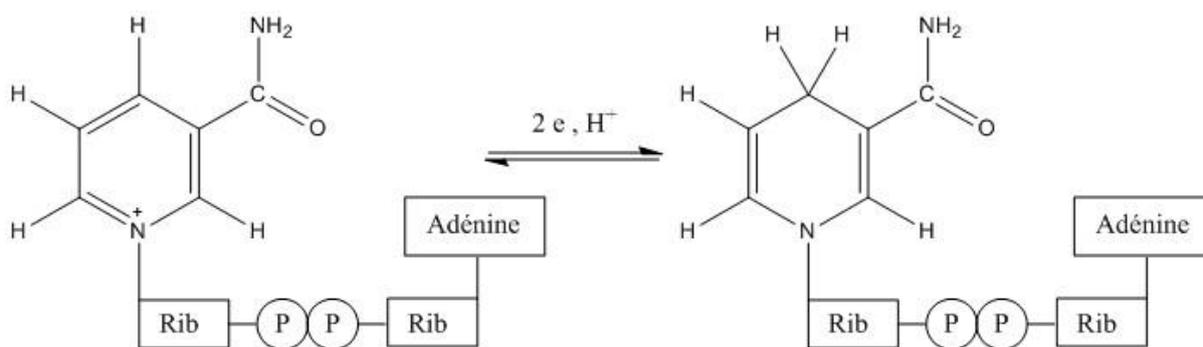
Echantillon	C (%)	H (%)	N (%)	%N greffé
<b>C-RF</b>	94,989	0,956	0,357	0
<b>C-RF</b> DA 60°C	94,316	1,377	0,423	0,066
<b>C-RF</b> DA 80°C	94,805	2,823	0,452	0,095
<b>C-RF</b> DA 100°C	93,045	1,34	0,646	0,289

L'analyse élémentaire donne une idée sur le pourcentage massique des éléments chimiques présents dans les échantillons. Afin de vérifier si le greffage de la fonction amine sur ces monolithes a bien été effectué, le pourcentage massique d'azote a été déterminé. Le monolithe de carbone **C-RF** de départ traité dans le même solvant que celui utilisé pour le greffage par Diels-Alder à 100 °C, présente un pourcentage massique d'azote de 0,357 (tableau 28). Cette quantité d'azote est peut-être due au fait que les réactifs de synthèse ne sont pas purs à 100 % ou bien elle provient de l'azote contenu dans l'eau utilisée lors de la synthèse. Pour déterminer le pourcentage massique de l'azote qui a été greffé, ce pourcentage massique d'azote contenu dans l'échantillon blanc est soustrait du pourcentage massique

d'azote déterminé pour les autres échantillons. Le pourcentage massique d'azote greffé par Diels-Alder augmente avec l'augmentation de la température appliquée lors de la réaction de greffage.

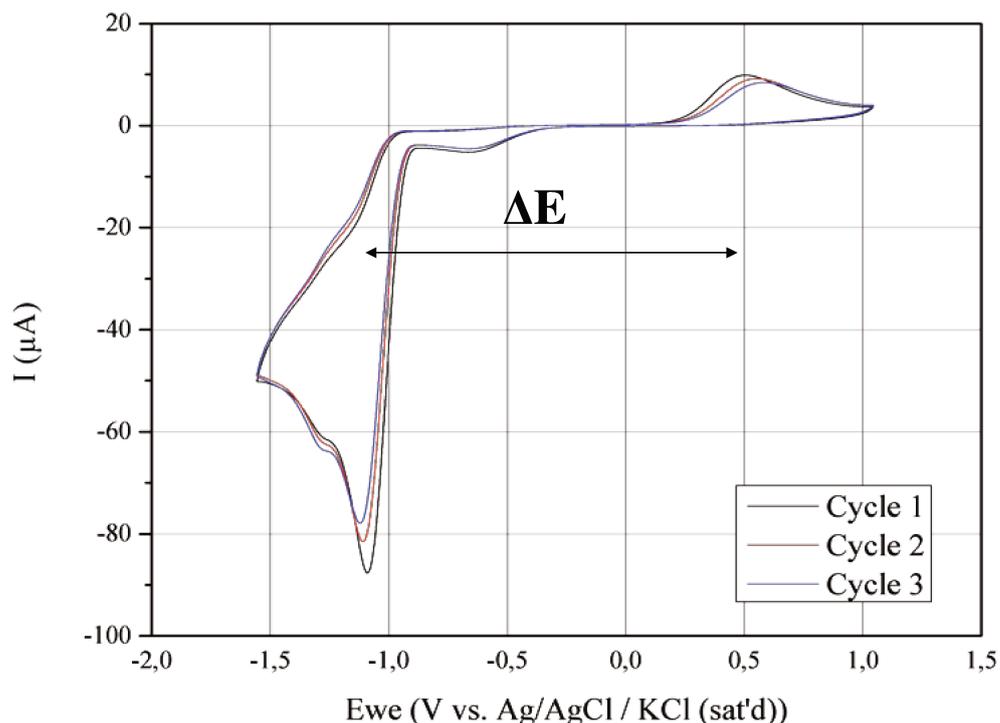
## 5.2. Régénération électrochimique du cofacteur NADH : greffage de médiateurs

Les réactions enzymatiques dépendantes d'un cofacteur sont très intéressantes pour de nombreuses réactions biocatalytiques. Les cofacteurs sont des porteurs d'électron nécessaires pour ces réactions. En particulier, le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide NAD est utilisé comme un générateur d'hydrures (fig. 103) dans des biosynthèses d'alcools, aldéhyde, *etc.*



**Figure 103.** Oxydoréduction du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide NAD.

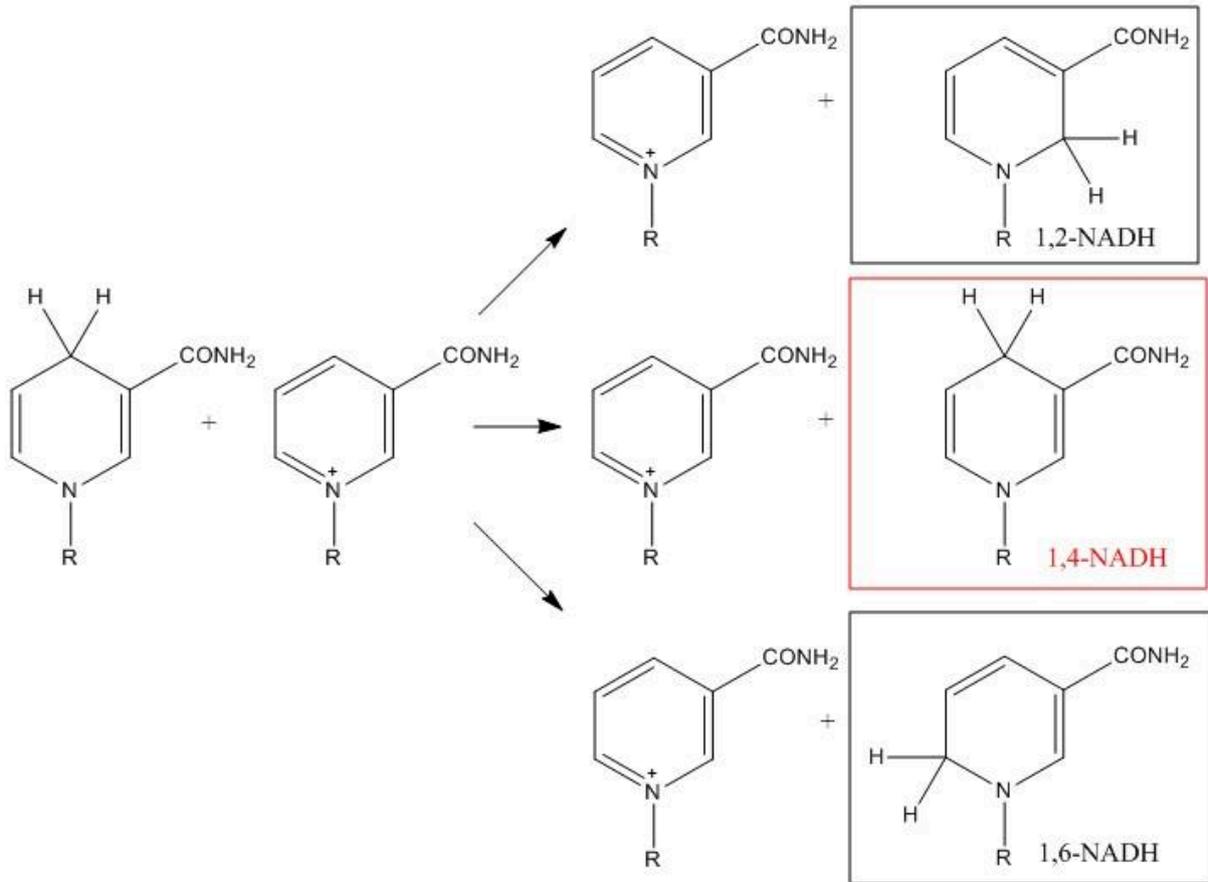
Il existe différentes méthodes de régénération du cofacteur NAD, notamment la régénération par voie électrochimique. Des essais de régénération électrochimique du cofacteur ont été effectués en plongeant une électrode de carbone vitreux dans une solution tampon phosphate 100 mM pH 6,3 contenant 25 mM  $\text{NAD}^+$  et par voltamétrie cyclique entre -1,6 et 1,2 V vs Ag/AgCl. Deux pics d'oxydation et de réduction du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ont été observés à 0,5 et -1,1 V vs Ag/AgCl (fig. 104).



**Figure 104.** Voltammétrie cyclique entre -1,6 et 1,2 V vs. Ag/AgCl / KCl à 20 mV/s d'une électrode de carbone vitreux plongée dans une solution tampon phosphate 100 mM pH 6,3.

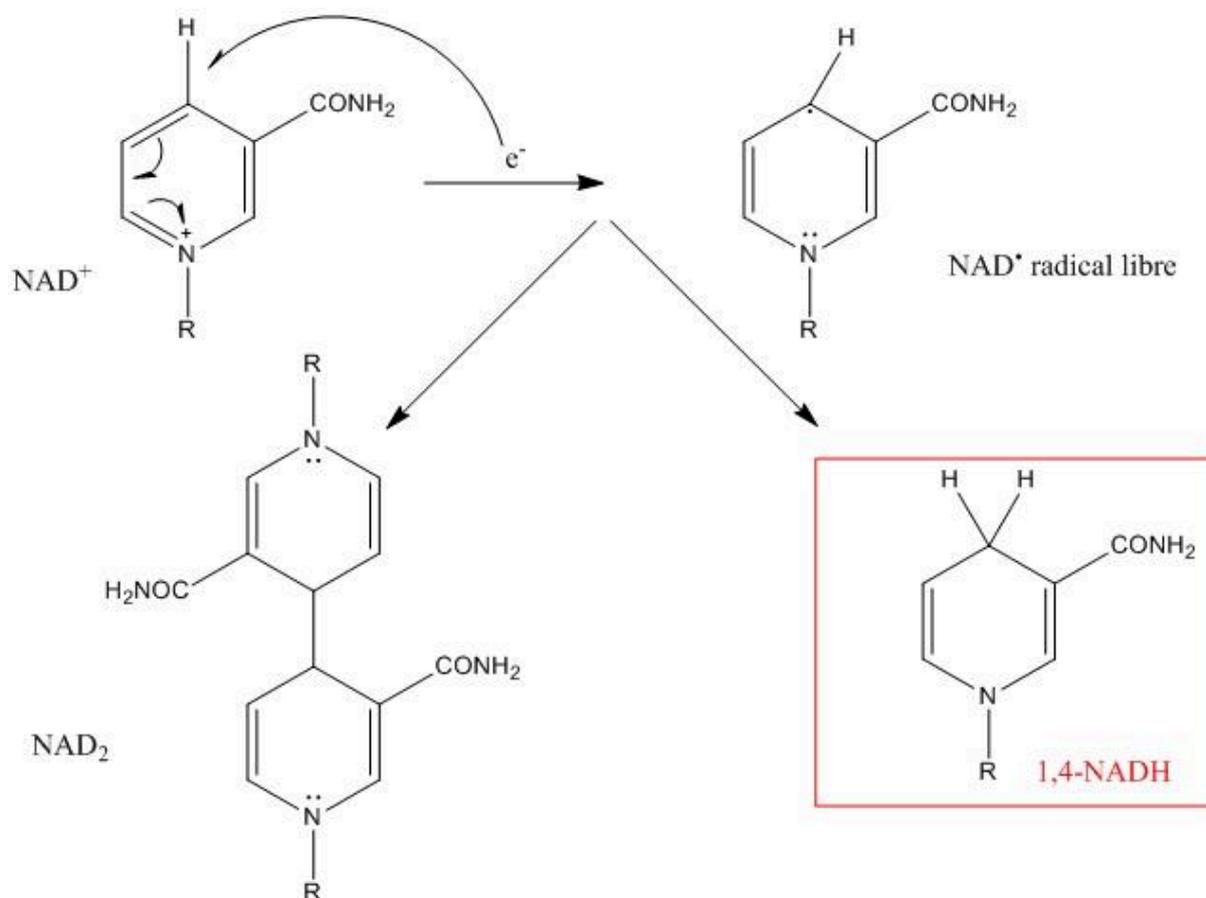
Les voltammogrammes obtenus (Fig. 104) montrent que la différence de potentiel entre l'oxydation et la réduction du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  est très élevée. Il a été rapporté dans la littérature que l'utilisation d'un médiateur (*i.e* phénazines) permet de réduire cette différence de potentiel.

Outre un sur-potentiel élevé, un second inconvénient majeur de cette voie de régénération est la possibilité d'un transfert d'hydrure entre la forme oxydée et la forme réduite du cofacteur, générant différents isomères lors de la réduction électrochimique notamment le 1,2-NADH, le 1,4-NADH et le 1,6-NADH.<sup>137</sup> Seul le 1,4-NADH est actif de point de vue enzymatique. (Fig. 105)



**Figure 105.** Transfert hybride d'électron. Les différents isomères NADH obtenus par régénération électrochimique du  $\text{NAD}^+$ .<sup>137</sup>

En plus de ce transfert d'hydrure, il peut y avoir une dimérisation du  $\text{NAD}^+$  pour donner le  $\text{NAD}_2$  (fig. 106), qui est lui aussi inactif du point de vue enzymatique.<sup>103</sup>



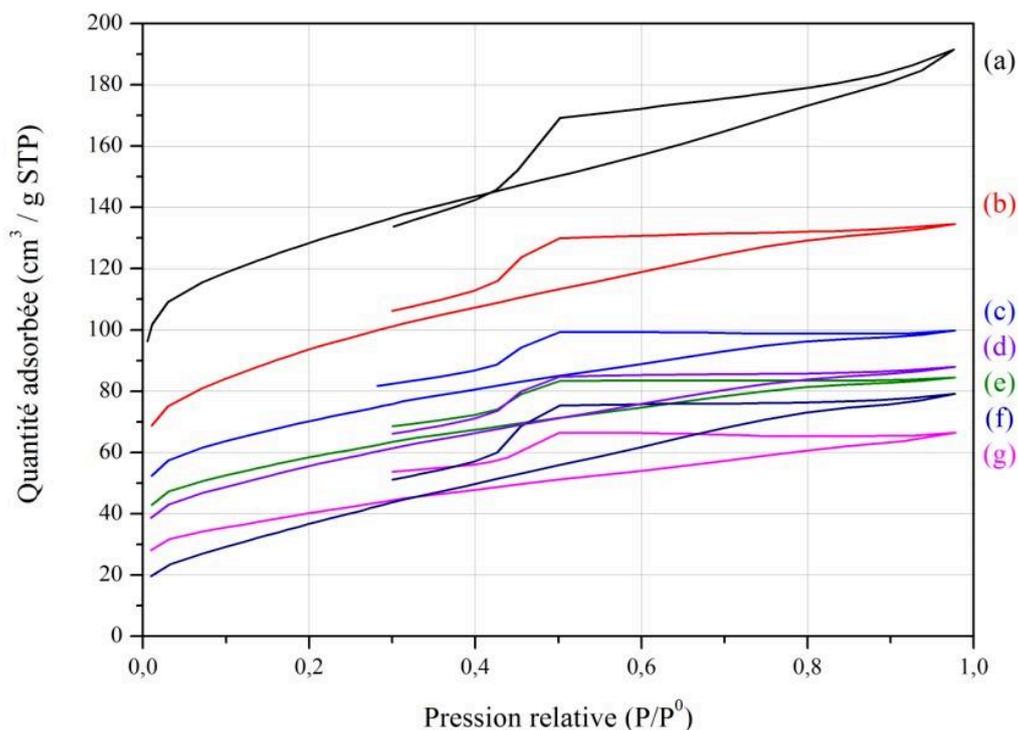
**Figure 106.** Dimérisation du cofacteur NAD lors de sa régénération électrochimique.<sup>103</sup>

Pour remédier à ces phénomènes, une étude a été reportée montrant l'influence des phénazines et plus particulièrement le rouge neutre sur la sélectivité de la régénération du cofacteur NAD<sup>+</sup> en NADH.<sup>138</sup>

### 5.2.1. Greffage des phénazines sur monolithe C-RF

Le greffage de phénazines (Azure A Chloride **AA**, Thionine Acétate **TA**, Brilliant Cresyl Blue **BCB**, Toluidine Blue O **TBO**, Neutral Red **NR**) a été effectué par voie diazonium par analogie au greffage du p-phénylènediamine par voie diazonium. Le greffage est effectué à 60 °C sur des monolithes de carbone **C-RF** dans les mêmes conditions opératoires.

Le monolithe **C-RF** de départ et les monolithes **C-RF** sur lesquels les phénazines sont greffées ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote à 77 K (fig. 107) et ont été comparés au monolithe fonctionnalisé avec le p-phénylènediamine.



**Figure 107.** Isothermes d'adsorption-desorption d'azote à 77 K du monolithe (a) **C-RF** et des monolithes **C-RF** fonctionnalisés par sel de diazonium par des molécules (b) 1,4-Phénylènediamine (c) BCB (d) AA (e) TBO (f) RN (g) TA.

Les isothermes des monolithes **C-RF** fonctionnalisés avec des phénazines montrent une baisse plus significative en volume et en surface spécifique que pour le monolithe **C-RF** fonctionnalisé avec le p-phénylènediamine. En effet, les phénazines sont des molécules plus grandes et occupent plus de volume et de surface. Les résultats de surface spécifique et de volume mésoporeux total sont présentés dans le tableau 29.

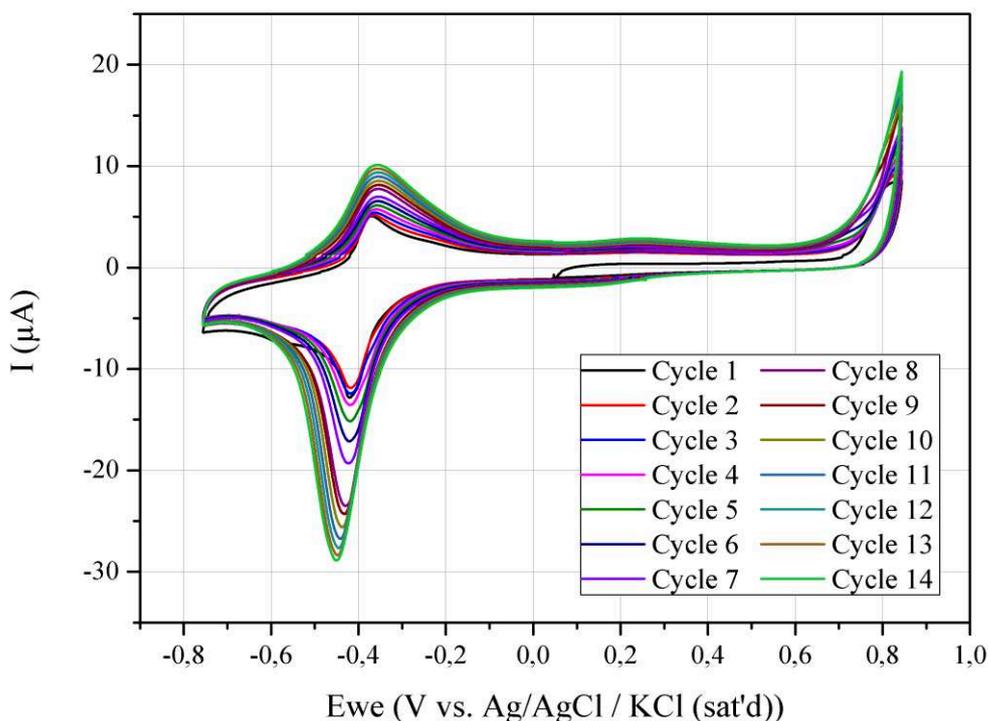
**Tableau 29.** Résultats obtenus par la volumétrie d'adsorption-désorption d'azote à 77K du monolithe **C-RF** et des monolithes **C-RF** fonctionnalisés par sel de diazonium par des molécules 1,4-Phénylènediamine ; BCB ; AA ; TBO ; RN et TA.

Echantillons	Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	Volume mésoporeux total (cm <sup>3</sup> /g)
<b>C-RF</b>	463	0,30
<b>C-RF-Phda</b>	329	0,21
<b>C-RF-BCB</b>	247	0,15
<b>C-RF-AA</b>	195	0,14
<b>C-RF-TBO</b>	205	0,13
<b>C-RF-RN</b>	131	0,12
<b>C-RF-TA</b>	141	0,10

### 5.2.2. Greffage des phénazines sur GCE

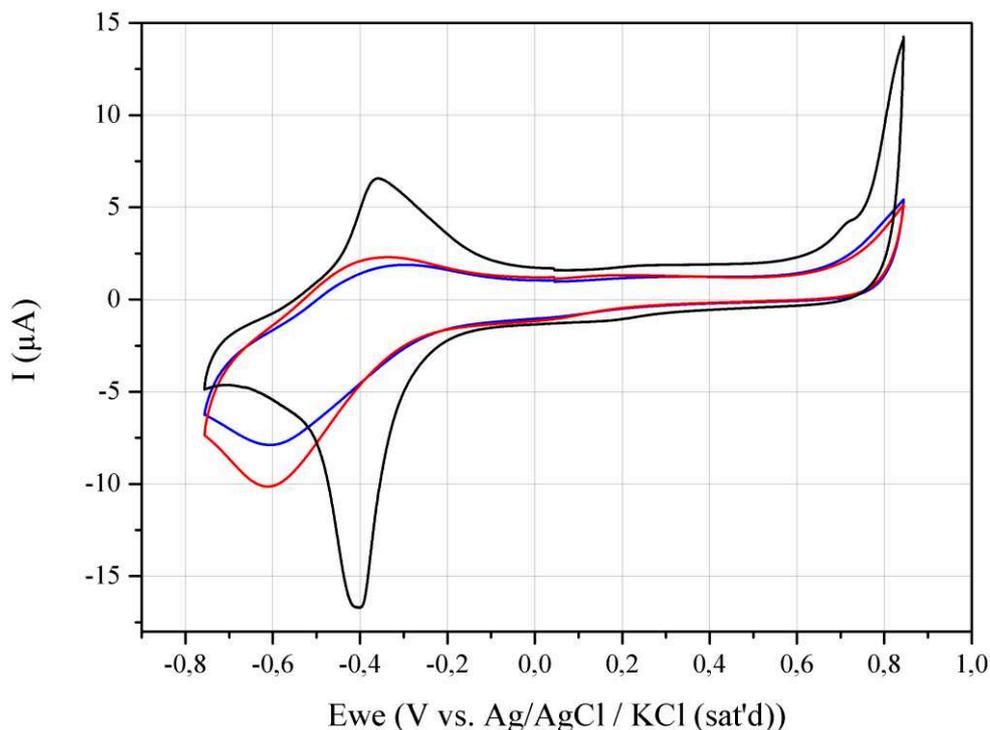
Il a été reporté dans l'article de Minter *et al.*<sup>138</sup> que l'utilisation d'un film de polymère à base de phénazine de rouge neutre (*neutral red NR*) déposé sur une électrode de carbone vitreux est un catalyseur pour la réduction du NAD<sup>+</sup> et l'oxydation du NADH. Nous nous sommes inspirés de cet article pour l'étude de la régénération du cofacteur NAD. Le dépôt du film de polymère **NR** se fait par électropolymérisation du rouge neutre sur une électrode de carbone vitreux par voie diazonium.

Une électrode de carbone vitreux polie a été plongé dans une solution contenant le *neutral red* et du nitrate de sodium et une voltammétrie cyclique a été réalisées entre -0,755 et 0,845 V vs Ag/AgCl à une vitesse de balayage de 50 mV.s<sup>-1</sup>. Le voltammogramme est représenté dans la figure 108.



**Figure 108.** Voltammogrammes cycliques de l'électropolymérisation du neutral red **NR**. L'électropolymérisation est réalisée à une vitesse de balayage de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . La solution contient  $0,4 \text{ mM}$  dans un tampon phosphate  $25 \text{ mM}$  pH 6 avec  $0,1 \text{ M NaNO}_3$ .

En se référant à l'article de Minter *et al.*<sup>35</sup> l'électrode est plongée dans une solution tampon Tris  $0,01 \text{ M}$  pH 7,4 en présence de  $5 \text{ mM ZnCl}_2$ . Les auteurs observent un pic d'oxydation et de réduction du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  à  $-0,4$  et  $-0,6 \text{ V vs Ag/AgCl}$  respectivement. L'intensité de ces deux pics augmente avec l'augmentation de la concentration en  $\text{NAD}^+$ . Nous avons repris le même mode opératoire en plongeant l'électrode de carbone vitreux d'abord dans une solution tampon Tris  $0,01 \text{ M}$  pH 7,4  $5 \text{ mM ZnCl}_2$  et en suite dans la même solution tampon Tris mais cette fois en présence de  $0,5 \text{ mM NAD}^+$ . Les voltammogrammes cycliques obtenus sont représentés dans la figure 109.

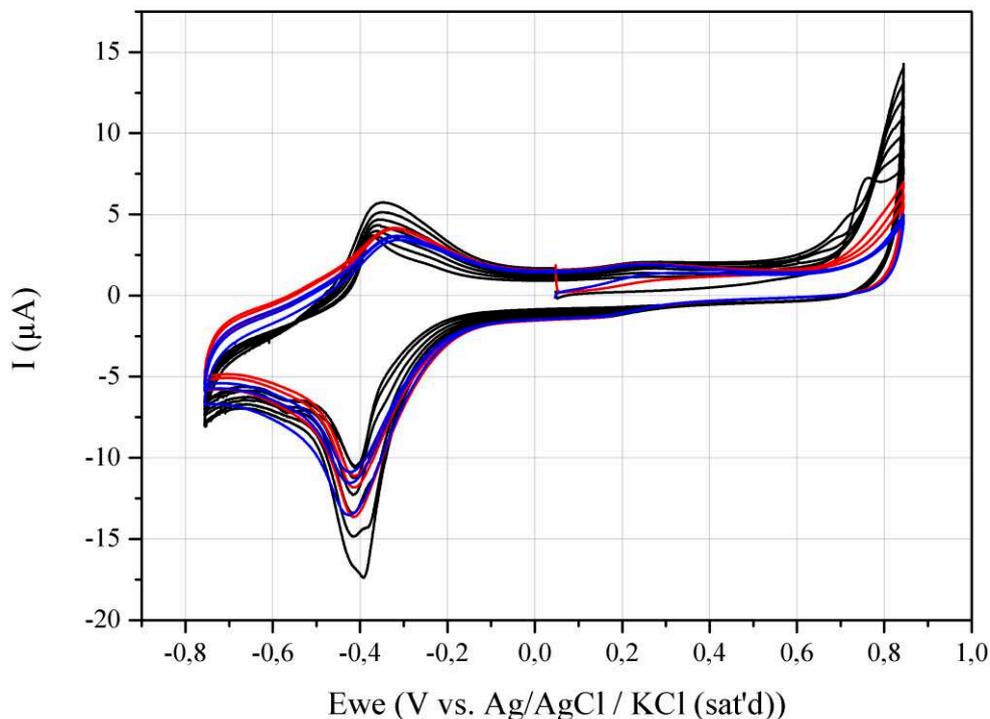


**Figure 109.** Voltammogrammes cycliques (**noir**) de l'électropolymérisation du neutral red (**rouge**) de l'électrode de carbone vitreux avec un film de polymère de neutral red plongée dans une solution tampon tris 0,01 M pH 7,4 ; 5 mM ZnCl (**bleu**) de l'électrode de carbone vitreux avec un film de polymère de neutral red plongée dans une solution tampon tris 0,01 M pH 7,4 ; 5 mM ZnCl ; 0,5 mM NAD<sup>+</sup>.

Les voltammogrammes obtenus montrent qu'il y a un pic de réduction à -0,6 V vs Ag/AgCl et un faible pic d'oxydation à -0,4 V vs Ag/AgCl en absence et en présence de NAD<sup>+</sup>. Le voltammogramme obtenu avec la solution tampon Tris sans NAD<sup>+</sup> est le premier cycle après électropolymérisation. Nous avons effectué 3 cycles de voltammétrie cyclique et nous avons constaté que l'intensité des pics diminue d'un cycle à l'autre. Ensuite l'électrode a été plongée dans la solution tampon Tris contenant 0,5 mM NAD<sup>+</sup>. Nous constatons que les intensités des pics continuent à baisser. Nous supposons que les pics observés à -0,6 et -0,4 V vs Ag/AgCl sont les pics de réduction et d'oxydation du film de *poly(neutral red)* déposé sur l'électrode de carbone vitreux et que la différence observée entre les potentiels d'oxydation et de réduction de ce polymère est dû au tampon dans lequel est plongée l'électrode.

Nous avons refait la même expérience d'électropolymérisation du *neutral red*. L'électrode a ensuite été plongée dans une solution tampon phosphate (le même tampon

utilisé lors de l'électropolymérisation) sans  $\text{NAD}^+$ , puis dans le tampon phosphate avec 0,5 mM  $\text{NAD}^+$ . Les voltammogrammes obtenus sont représentés dans la figure 110.



**Figure 110.** Voltammogrammes cycliques (**noir**) de l'électropolymérisation du neutral red (**rouge**) de l'électrode de carbone vitreux avec un film de polymère de neutral red plongée dans une solution tampon phosphate 250 mM pH 6 ; 5 mM  $\text{ZnCl}_2$  (**bleu**) de l'électrode de carbone vitreux avec un film de polymère de neutral red plongée dans une solution tampon phosphate 250 mM pH 6 ; 5 mM  $\text{ZnCl}_2$  ; 0,5 mM  $\text{NAD}^+$ .

Les voltammogrammes obtenus montrent que les potentiels des pics d'oxydation et de réduction obtenus après électropolymérisation du *neutral red* en plongeant l'électrode de carbone vitreux dans une solution tampon phosphate 250 mM pH 6 en présence et en absence du cofacteur NAD coïncident parfaitement avec les potentiels de l'électropolymérisation du *neutral red*. Ces pics observés sont dus à la présence du *poly(neutral red)* sur l'électrode et non à l'oxydoréduction du cofacteur NAD.

L'utilisation des phénazines n'a pas donné de résultats significatifs vis-à-vis de l'oxydoréduction du cofacteur NAD. Cette voie a été écartée pour la suite du travail et nous sommes intéressés à l'immobilisation du cofacteur.

### 5.3. Immobilisation covalente du cofacteur NADH

Pour les réactions biocatalytiques en flux continu, la régénération du cofacteur est généralement associée à la rétention des enzymes et du cofacteur dans le bioréacteur. Pour éviter le phénomène de lixiviation de ce cofacteur dans le milieu réactionnel, il serait intéressant d'immobiliser ce dernier sur le bioréacteur sans le dénaturer ou le rendre inactif vis-à-vis l'enzyme. Il existe diverses méthodes d'immobilisation des enzymes et du cofacteur sur des supports poreux, notamment physique, par encapsulation, et chimique, par liaisons covalentes (*cf.* 1.2.2.2). Le frein à cette immobilisation est que le cofacteur peut être inactif après son immobilisation.

Les liaisons covalentes entre le cofacteur et les matériaux insolubles sont plus efficaces pour la rétention du cofacteur notamment pour les matériaux ayant une structure ouverte et présentant une faible résistance au transfert de masse des substrats. Le challenge ici est d'immobiliser le cofacteur entre les enzymes. Il a été démontré que les cofacteurs immobilisés de manière covalente ont été utilisés pour des électrodes enzymatiques où le cofacteur peut être régénéré par voie électrochimique sans l'utilisation d'une seconde enzyme (*i.e.* phosphite déshydrogénase).<sup>139, 140</sup> D'autres études ont aussi montré la faisabilité de la biocatalyse en utilisant des cofacteurs immobilisés de manière covalente et des enzymes libres.<sup>141, 142</sup> Il a aussi été démontré qu'il est possible de réaliser un système où l'enzyme et le cofacteur sont immobilisés dans des nanopores.

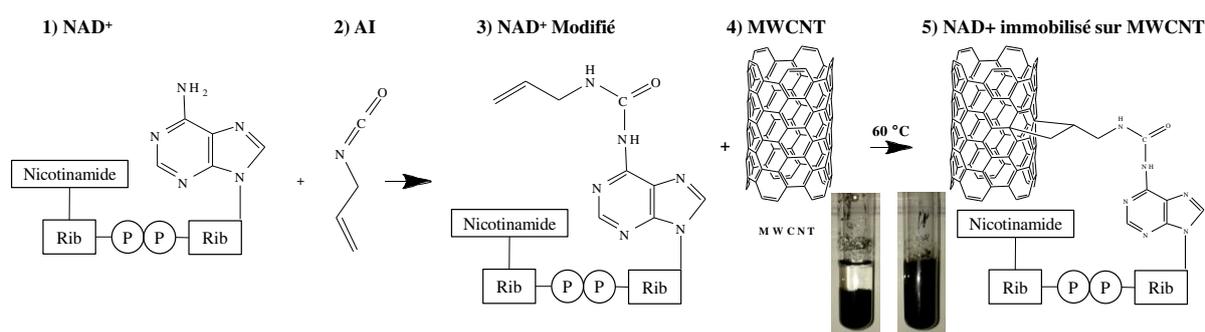
Une approche pour immobiliser le cofacteur et le régénérer *in situ* a été rapportée dans la littérature.<sup>31</sup> Dans ces travaux, le cofacteur est immobilisé de manière covalente sur des particules de polymère, tandis que les enzymes sont immobilisées sur le même type de polymère mais sur des particules différentes. Selon les auteurs, la collision entre ces particules facilite l'interaction entre le cofacteur et l'enzyme et par conséquent favorise la réaction de biotransformation. Dans ce cas, le système catalytique peut être séparé du milieu réactionnel pour une éventuelle réutilisation en effectuant une centrifugation ou une filtration.<sup>31</sup> Ce système catalytique a été appliqué pour la conversion enzymatique du dioxyde de carbone en méthanol.<sup>31</sup>

Ici, des essais d'immobilisation du cofacteur sur support carboné par voie Diels-Alder ont été réalisés. Cette immobilisation utilise un espaceur l'allyl isocyanate (AI) qui réagit d'une part avec le cofacteur et d'une autre part avec la matrice carbonée. La réaction d'immobilisation sera détaillée dans la partie qui suit. Cette immobilisation a été effectuée sur

le monolithe de carbone **C-RF** utilisé comme référence. Cependant, ce monolithe présentant un grand courant capacitif lorsqu'il est déposé sur une électrode de carbone vitreux, l'oxydation et la réduction du cofacteur  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  n'a pas pu être suivie par voie électrochimique. Nous nous sommes donc orientés dans la suite du travail à immobiliser le cofacteur sur des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) qui permettent d'observer les pics d'oxydation et de réduction sans perturbation du courant capacitif.

Le cofacteur est alors immobilisé sur des nanotubes de carbone par voie Diels-Alder. La première étape consiste à modifier le cofacteur par un espaceur. Cet espaceur est l'allyl isocyanate où la fonction isocyanate réagit avec la fonction amine de l'amide du cofacteur pour donner du  $\text{NAD}^+$  modifié. Après réaction, le cofacteur modifié présente donc une fonction allyl. Cette fonction peut alors réagir avec les carbones  $\text{sp}^2$  des nanotubes de carbones (fig. 109). Ces nanotubes de carbones modifiés ont été lavés à l'eau pour éliminer l'excès de  $\text{NAD}^+$  qui n'a pas été immobilisé. En effet, l'eau est un très bon solvant pour le  $\text{NAD}^+$ . Les nanotubes de carbone sont ensuite récupérés par centrifugation.

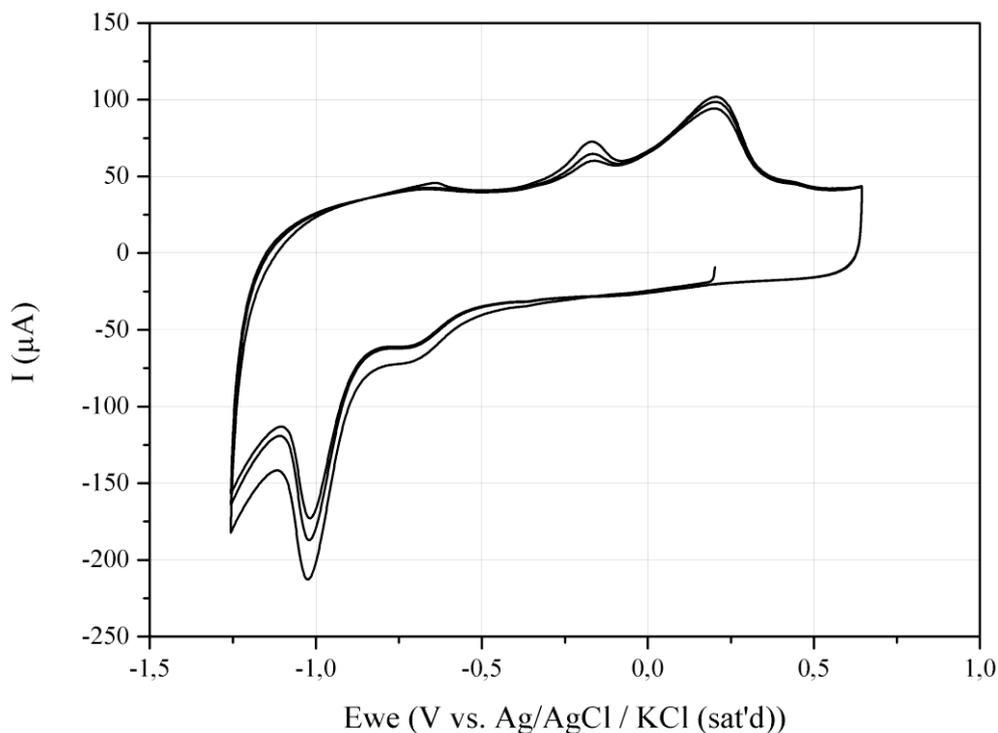
Une méthode simple a permis de s'assurer qu'un greffage covalent semble être effectif, en dispersant des nanotubes de carbone natifs et des nanotubes de carbone modifiés dans l'eau. Le résultat obtenu montre que les nanotubes de carbone natifs dispersés dans l'eau ont sédimenté en bas du tube. En revanche, les nanotubes de carbone modifiés restent dispersés dans l'eau ce qui est dû à la présence de fonctions hydrophiles (dus au  $\text{NAD}^+$ ) sur la surface des nanotubes de carbone (fig. 111).



**Figure 111.** Immobilisation des  $\text{NAD}^+$  sur des nanotubes de carbones MWCNTs.

Après avoir immobilisé le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ) sur des nanotubes de carbone MWCNTs en utilisant comme espaceur l'allyl isocyanate (AI), des essais de régénération par voltammétrie cyclique ont été réalisés afin de confirmer son

immobilisation. Avant de tester ces nanotubes de carbone modifiés par voltammetrie cyclique, des essais ont été réalisés en utilisant une encre constituée de nanotubes de carbone natifs mélangés avec le cofacteur  $\text{NAD}^+$  et l'enzyme formiate déshydrogénase **MeFDH** dispersés dans du Nafion<sup>®</sup>. Cette encre a été déposée sur une électrode de carbone vitreux plongée dans une solution tampon phosphate à pH 6,3 dégazée préalablement à l'argon pendant 30 min.

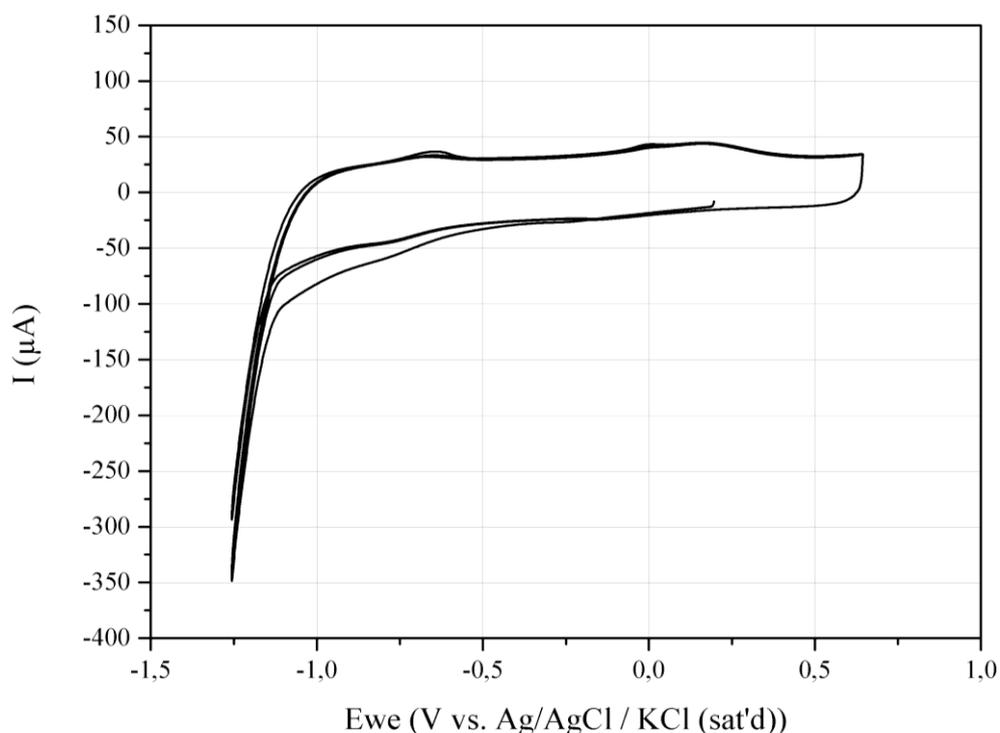


**Figure 112.** Voltammetrie cyclique entre -1,3 et 0,6 V vs. Ag/AgCl / KCl à 50 mV/s d'une encre de MWCNTs, NAD et MeFDH déposée sur une électrode de carbone vitreux plongée dans une solution tampon phosphate 100 mM pH 6,3.

Les voltammogrammes obtenus (fig. 112) montrent la présence d'un pic d'oxydation du  $\text{NAD}^+$  en NADH à 0,2 V vs. Ag/AgCl / KCl et un pic de réduction du NADH en  $\text{NAD}^+$  à -1 V vs. Ag/AgCl / KCl. Ce résultat montre que la présence de nanotube de carbone a réduit la différence de potentiel  $\Delta P$  entre le potentiel d'oxydation et le potentiel de réduction du  $\text{NAD}^+$ /NADH et que les deux pics sont présents.

Afin de confirmer ce résultat, un essai a été réalisé avec une encre contenant uniquement des nanotubes de carbone sans cofacteur  $\text{NAD}^+$  et sans enzyme **MeFDH**. Cet

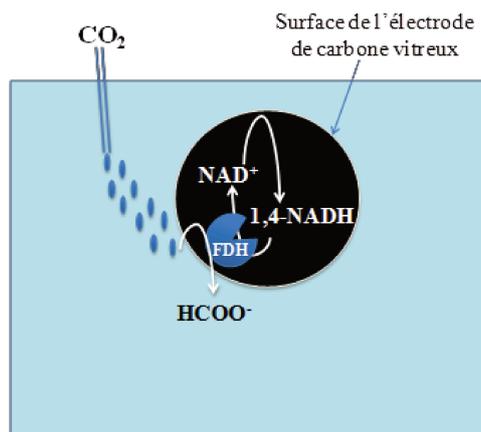
essai est un blanc et permet de vérifier si les pics d'oxydation et de réduction qui apparaissent sont bien ceux du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .



**Figure 113.** Voltammétrie cyclique entre -1,4 et 0,6 V vs. Ag/AgCl / KCl à 50 mV/s d'une encre de MWCNT déposée sur une électrode de carbone vitreux (**voltammogramme noir**) plongée dans une solution tampon phosphate 100 mM pH 6,3.

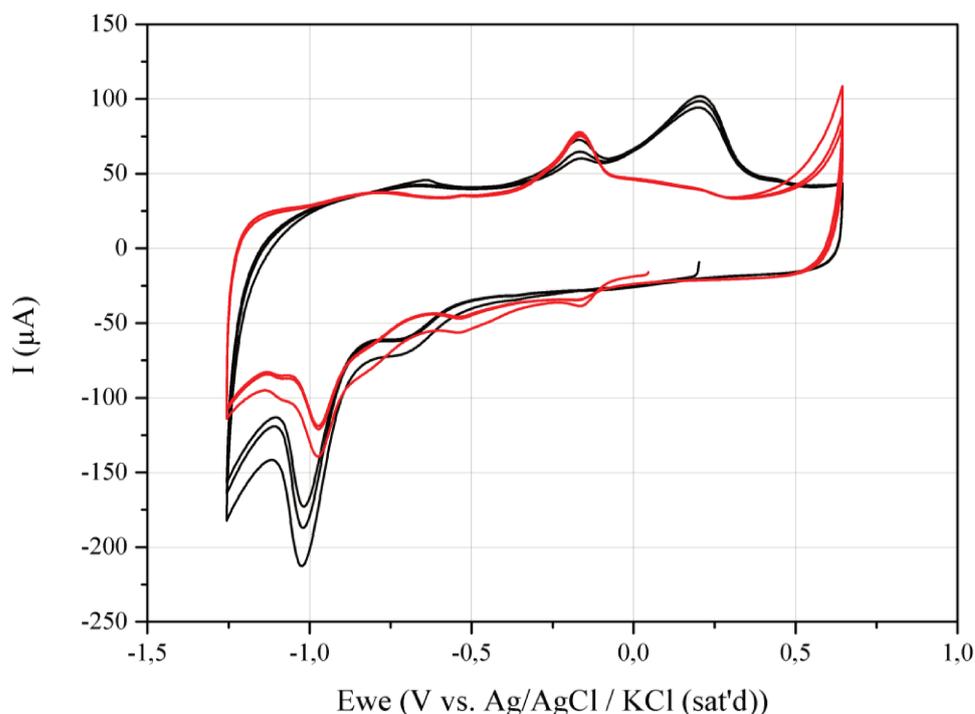
Le voltammogramme obtenu (fig. 113) ne présente pas de pic d'oxydation ni de réduction pour les nanotubes de carbone seuls et en absence de  $\text{NAD}^+$ . Ce résultat confirme que les pics d'oxydation et de réduction observés sur le chromatogramme (fig. 112) sont bien ceux du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

Pour s'assurer que le cofacteur reste actif vis-à-vis l'enzyme dans le Nafion<sup>®</sup> et en présence des nanotubes de carbone, un essai a été effectué en plongeant cette électrode dans une solution tampon phosphate contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,1 barboté au  $\text{CO}_2$ . En effet, en présence de l'enzyme **MeFDH** et du cofacteur NAD, le  $\text{CO}_2$  présent dans le milieu réactionnel en excès est réduit en ion formiate  $\text{HCOO}^-$  (fig. 114).



**Figure 114.** Schématisation du milieu réactionnel : de la réaction de réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ , de la réduction enzymatique du  $\text{CO}_2$  en  $\text{HCOO}^-$  par la  $\text{FDH}$  et de l'oxydation du  $\text{NADH}$  en  $\text{NAD}^+$  à la surface de l'électrode.

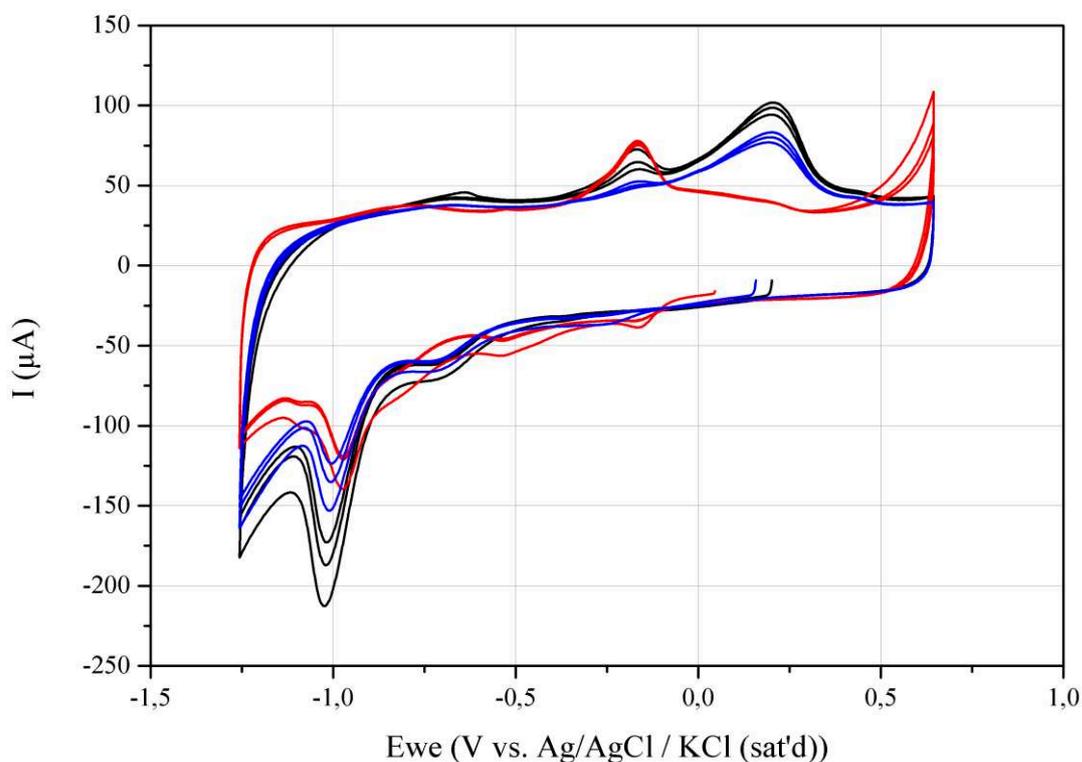
Le suivi de la réaction est effectué par voie électrochimique. Si la réaction de réduction du  $\text{CO}_2$  a lieu, le  $\text{NADH}$  est oxydé en  $\text{NAD}^+$  par la **MeFDH**. Une augmentation de l'intensité du pic de réduction du  $\text{NAD}^+$  et une diminution de l'intensité du pic d'oxydation du  $\text{NADH}$  sont alors observées.



**Figure 115.** Voltammétrie cyclique entre -1,4 et 0,6 V vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl} / \text{KCl}$  à 50 mV/s d'une encre de MWCNTs,  $\text{NAD}$  et  $\text{MeFDH}$  déposée sur une électrode de carbone vitreux (**voltammogramme noir**) plongée dans une solution tampon phosphate 100 mM pH 6,3 (**voltammogramme rouge**) plongée dans une solution tampon phosphate 100 mM contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,1.

Le voltammogramme obtenu par l'électrode plongée dans la solution contenant le  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (voltammogramme rouge fig. 115), montre qu'il y a disparition du pic d'oxydation à 0,2 V vs. Ag/Ag/Cl du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Ceci s'explique par le fait que la forme réduite du cofacteur NADH, réduite par voie électrochimique, a été oxydée en  $\text{NAD}^+$  par l'enzyme **MeFDH**, qui, en contrepartie, réduit le  $\text{CO}_3^{2-}$  en ion  $\text{HCOO}^-$ . Cet essai montre que l'enzyme **MeFDH** et le cofacteur  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  restent actifs, même quand ils sont mélangés avec du Nafion®.

Par la suite, cette même électrode a été replongée dans la solution tampon phosphate pH 6,3 afin de vérifier si le pic d'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  réapparaît.

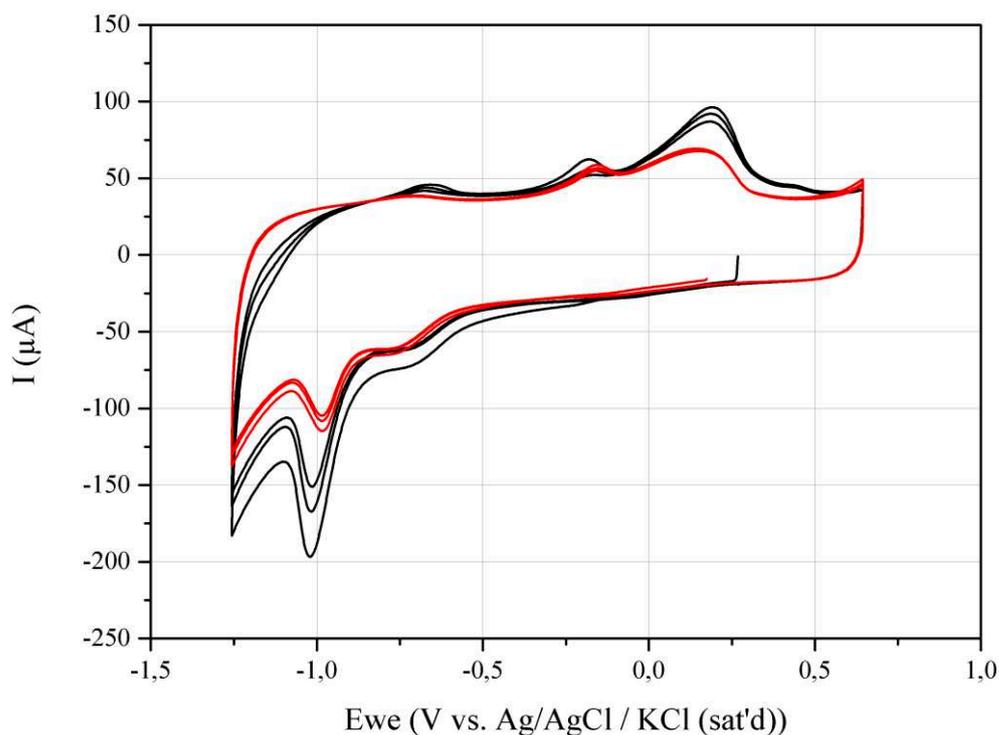


**Figure 116.** Voltammétrie cyclique entre -1,4 et 0,6 V vs. Ag/AgCl / KCl à 50 mV/s d'une encre de MWCNTs, NAD et MeFDH déposée sur une électrode de carbone vitreux (**voltammogramme noir**) plongée dans une solution tampon phosphate 100 mM pH 6,3 (**voltammogramme rouge**) plongée dans une solution tampon phosphate 100 mM contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,1 (**voltammogramme bleu**) replongée dans une solution tampon phosphate pH 6,3.

Le voltammogramme obtenu par l'électrode replongée dans la solution tampon phosphate pH 6,3 (voltammogramme bleu fig. 116), montre que le pic d'oxydation du NADH

en  $\text{NAD}^+$  réapparaît. Ceci confirme que la disparition du pic d'oxydation est bien due à l'oxydation du  $\text{NADH}$  par la **MeFDH** en présence du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

A ce stade, il a été montré que la présence des nanotubes de carbone a réduit la différence de potentiel  $\Delta P$  entre le potentiel d'oxydation et le potentiel de réduction du  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  et que la présence du Nafion n'affecte pas l'activité de l'enzyme vis-à-vis de la réduction du  $\text{CO}_2$  et l'oxydation du cofacteur  $\text{NADH}$ . Un essai supplémentaire a été effectué sans **MeFDH** en utilisant une encre avec des nanotubes de carbone dispersés avec le cofacteur  $\text{NAD}^+$  dans du Nafion<sup>®</sup>. Cette encre a été déposée sur une électrode de carbone vitreux qui a été plongée une fois dans un tampon phosphate 100 mM pH 6,3 et ensuite dans une solution tampon phosphate contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,1 afin de confirmer que la disparition du pic d'oxydation quand l'électrode de carbone vitreux est bien due à la réduction du carbonate par la **MeFDH** et donc la consommation du  $\text{NADH}$  réduit par voie électrochimique.

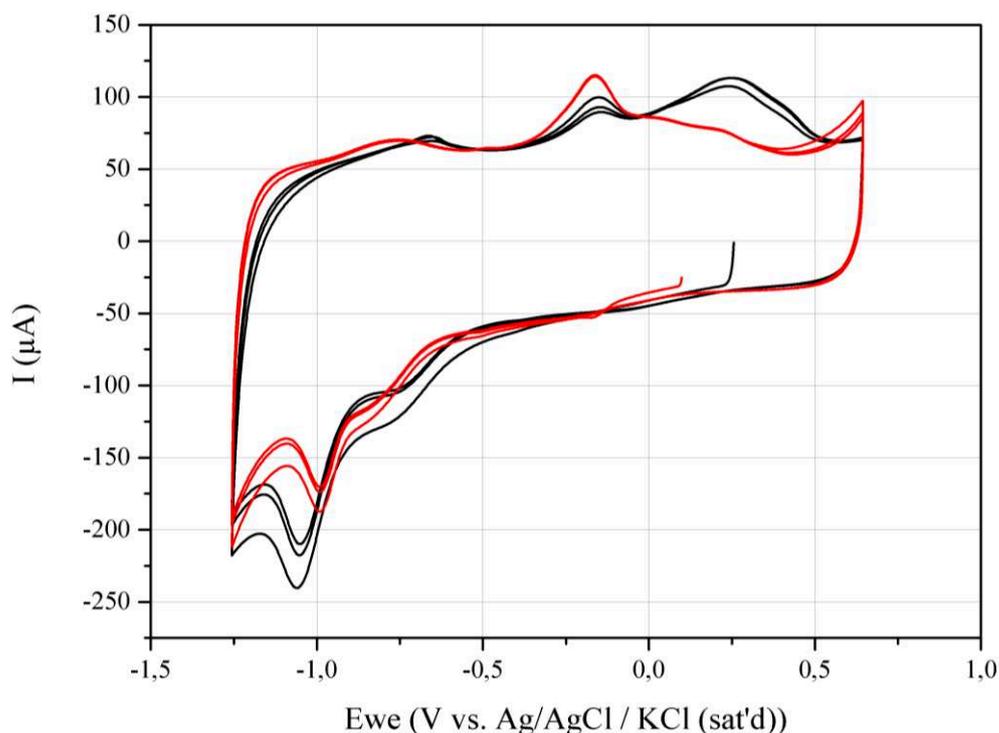


**Figure 117.** Voltammétrie cyclique entre -1,4 et 0,6 V vs. Ag/AgCl / KCl à 50 mV/s d'une encre de MWCNTs et NAD déposée sur une électrode de carbone vitreux (**voltammogramme noir**) plongée dans une solution tampon phosphate pH 6,3 (**voltammogramme rouge**) plongée dans une solution tampon phosphate contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,1.

Les voltammogrammes obtenus montrent une légère baisse pour les intensités des pics d'oxydation et de réduction du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  sans pour autant avoir une disparition totale du pic d'oxydation du NADH lorsque l'électrode est plongée dans une solution contenant du carbonate. Cette baisse est peut-être due au pH qui a augmenté en présence du carbonate dans la solution tampon phosphate.

Il est intéressant alors de tester les nanotubes de carbone modifiés sur lesquels le cofacteur est immobilisé, afin de s'assurer que le cofacteur reste actif après immobilisation. Pour ce faire, les mêmes essais ont été réalisés dans les mêmes conditions opératoires et les résultats ont été comparés.

Une encre a été préparée avec les nanotubes de carbone modifiés MWCNT-AI-NAD et la formiate déshydrogénase **MeFDH** dispersés dans du Nafion, puis déposée sur une électrode de carbone vitreux. Cette électrode a été plongée dans un premier temps dans une solution tampon phosphate pH 6,3 dégazée à l'argon et dans un deuxième temps dans une solution tampon phosphate contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,1.



**Figure 118.** Voltammétrie cyclique entre -1,4 et 0,6 V vs. Ag/AgCl / KCl à 50 mV/s d'une encre de MWCNT-AI-NAD et MeFDH déposée sur une électrode de carbone vitreux (**voltammogramme noir**) plongée dans une solution tampon phosphate pH 6,3 (**voltammogramme rouge**) plongée dans une solution tampon phosphate contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9,1.

Les voltammogrammes obtenus par voltammetrie cyclique des nanotubes de carbone modifiés montrent que lorsque l'électrode est plongée dans une solution tampon phosphate, il y a apparition de deux pics d'oxydation et de réduction du cofacteur  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  aux mêmes potentiels que les pics observés pour le cofacteur libre et mélangé aux nanotubes de carbone (0,2 et -1,1 V vs Ag/AgCl, respectivement). Ce résultat prouve qu'après immobilisation du cofacteur sur les nanotubes de carbone et lavage de ces derniers, le cofacteur reste immobilisé et n'a pas été dénaturé. Par la suite, cette même électrode a été plongée dans une solution tampon phosphate pH 9,1 contenant 200 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Idem que pour le cofacteur libre, le pic d'oxydation du  $\text{NADH}$  en  $\text{NAD}^+$  disparaît et les voltammogrammes obtenus pour le cofacteur immobilisé sont similaires aux voltammogrammes obtenus pour le cofacteur libre. Ceci confirme que le cofacteur reste actif et que la reconnaissance de ce dernier par l'enzyme **MeFDH** après immobilisation reste inchangée.

## 5.4. Conclusions

Ce chapitre prospectif avait pour objectif d'ouvrir des perspectives quant au développement de réacteurs bio-électrocatalytiques en flux continu pour la conversion du  $\text{CO}_2$  en formiate. D'une part, il s'agissait de greffer des molécules redox capables de favoriser la régénération électrochimique du cofacteur NAD. Différentes molécules, notamment des phénazines, ont pu être greffées sur des monolithes carbonés par deux voies diazonium et Diels-Alder. Néanmoins, l'influence des phénazines sur la régénération électrochimique du cofacteur n'a pas pu être démontrée, malgré les travaux rapportés dans la littérature. Cette voie a donc été écartée. A termes, il serait intéressant d'utiliser d'autres médiateurs comme les complexes de rhodium qui ont prouvé leur efficacité pour la régénération électrocatalytique du  $\text{NADH}$ .<sup>143</sup>

D'autre part, des essais d'immobilisation du cofacteur  $\text{NAD}^+$  sur des nanotubes de carbone multi-parois en utilisant un espaceur l'allyl isocyanate ont donné des résultats prometteurs. En effet la présence des nanotubes de carbone avec le cofacteur a permis de réduire la différence de potentiel entre l'oxydation et la réduction du NAD. De plus, malgré son immobilisation covalente, il reste toujours actif vis-à-vis de l'enzyme formiate déshydrogénase. Par ailleurs, il serait intéressant de caractériser cette immobilisation plus finement en utilisant la RMN liquide pour étudier l'environnement chimique de l'azote de la

fonction amine sur laquelle la fonction isocyanate a réagi. Aussi, il serait intéressant d'immobiliser le cofacteur NAD sur un monolithe de carbone, sur lequel les deux enzymes formiate déshydrogénase et phosphite déshydrogénase seraient immobilisées (voir Chapitre 4), et de tester les performances d'un tel système pour la réduction du CO<sub>2</sub> en flux continu.

Le développement d'un système bioélectrocatalytique, avec greffage covalent du cofacteur sur un monolithe de carbone à porosité hiérarchique (voir chapitre 3), pourrait également être privilégié dans le futur. Pour ce système la réduction du CO<sub>2</sub> se fera par voie biocatalytique à l'aide de la formiate déshydrogénase et la régénération du cofacteur se fera par voie électrocatalytique. Les performances d'un tel système pourront être comparées avec le système biocatalytique développé dans le chapitre 4.



## Conclusion générale

Cette thèse s'est portée sur la bioréduction du CO<sub>2</sub> en flux continu, ce dernier étant converti en formiate à travers un matériau monolithique poreux sur lequel des enzymes ont été supportées. Pour ce faire, différents matériaux monolithiques à porosité hiérarchique à base de silice et de carbone ont été synthétisés. Les matériaux les plus prometteurs ont été sélectionnés et ont été utilisés comme supports pour l'immobilisation des enzymes et la conversion du CO<sub>2</sub> en flux continu par voie biocatalytique.

La problématique de la première partie était de réussir à synthétiser des monolithes de carbone à porosité hiérarchique finement contrôlée et présentant une surface spécifique élevée supérieure à 1200 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, une mésoporosité bimodale. Deux voies de synthèse ont été proposées ; la première est une synthèse multi-étapes où des monolithes inorganiques à porosité hiérarchique à base de silice ont été obtenus à l'aide d'un procédé sol-gel combiné à une décomposition spinodale. Des monolithes de silice macroporeux de deux tailles de macropores de 3 et de 41 µm ont été obtenus. Le contrôle de la mésoporosité de ces matériaux a été réalisé par un traitement basique effectué sous différentes conditions. Puis, une étape de greffage post-synthèse était nécessaire pour fonctionnaliser la silice, et permettre une meilleure imprégnation de la solution de saccharose (précurseurs de carbone). Le monolithe imprégné a subi une carbonisation hydrothermale permettant la polymérisation du sucre en *hydrochar*, recouvrant ainsi toute la surface du matériau de départ. Cette étape de dépôt d'*hydrochar* a été optimisée et a permis l'obtention d'un monolithe de carbone avec une bonne tenue mécanique et sans fissure. Par la suite, le réseau d'*hydrochar* est transformé en carbone par pyrolyse sous atmosphère inerte. Finalement, la structure silicique est dissoute grâce à un traitement à la soude du composites silice/carbone permettant l'obtention de sa réplique en carbone sous forme monolithique.

La deuxième voie, quant à elle, est une synthèse en une seule étape, où des monolithes organiques à base du gel de résorcinol-formaldéhyde macroporeux ont été synthétisés à l'aide d'un procédé sol-gel combiné à une décomposition spinodale. Ensuite ces monolithes ont été graphitisés à 1000 °C pour obtenir des monolithes à base de carbone graphite, sans passer par les étapes de synthèse de l'empreinte silicique.

L'ensemble des matériaux synthétisés ont fait l'objet de plusieurs caractérisations permettant d'une part de déterminer leurs caractéristiques texturales (surface spécifique,

porosité...) structurales, morphologiques et état de leur chimie de surface. Il s'est avéré d'autre part que ces monolithes carbonés sont de très bons adsorbants d'où l'intérêt de les utiliser en séparation, purification d'effluents ou dépollution (*cf.* annexe 5).

La deuxième partie s'est portée sur l'étude de la réduction du CO<sub>2</sub> *en batch* en utilisant la formiate déshydrogénase issue de *Methylobacterium extorques* AM1 (**MeFDH**). Cette enzyme nécessite la présence d'un cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme réduite NADH. Ce cofacteur est coûteux, d'où l'intérêt de sa régénération *in situ* en utilisant une deuxième enzyme ; la phosphite déshydrogénase (**PtDH**). Différents essais ont été réalisés afin d'optimiser le ratio d'activité entre les deux enzymes  $U_{\text{MeFDH}}/U_{\text{PtDH}} = 1/5$  et augmenter la productivité en formiate. Ce ratio d'activité a été appliqué en flux continu où ces deux enzymes ont été immobilisées par réticulation-adsorption sur un monolithe de carbone et un monolithe de silice en utilisant un agent de couplage, le polyéthylène glycol diglycidyléther (**PEGDGE**).

Il s'est avéré que le monolithe à base de carbone poreux est plus intéressant pour cette application du fait qu'il donne une productivité en formiate plus élevée ; à noter 0,99  $\mu\text{mol}_{\text{HCOO}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$  pour un monolithe de carbone contre 0,49  $\mu\text{mol}_{\text{HCOO}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{MeFDH}}$  pour un monolithe de silice. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'une méso/microporosité supplémentaire présente pour le monolithe de carbone mais aussi à l'affinité entre l'enzyme et la surface carbonée. Des investigations supplémentaires sont cependant nécessaires. Afin d'augmenter la productivité en formiate, il serait intéressant de travailler dans un milieu réactionnel non conventionnel, par exemple un liquide ionique qui pourrait augmenter la solubilisation du CO<sub>2</sub> comme ce qui a été montré dans le travail de Fontecave *et al.*<sup>128</sup> De plus, il serait intéressant de combiner le système de réduction biocatalytique au système de régénération du cofacteur par voie électrochimique et réduire le CO<sub>2</sub> par voie bio-électrocatalytique.

Dans ce contexte, nous avons commencé à explorer cette voie de régénération électrochimique où des essais de réductions du cofacteur ont été réalisés. Il s'est avéré que cette réduction peut donner différents isomères et nécessite une différence de potentiel élevée entre la potentiel d'oxydation et le potentiel de réduction du couple NAD<sup>+</sup>/NADH. Il a été démontré dans la littérature que l'utilisation de médiateurs (*i.e* phénazines) pourrait rendre cette réduction plus sélective et réduire la différence de potentiel. Cinq phénazines ont été greffées sur un monolithe de carbone semi graphitisé. Ce greffage semble être effectif et ce

résultat montre que nous arrivons à immobiliser différentes molécules sur nos matériaux carbonés par voie diazonium. Une étude a rapporté l'utilisation d'un film de poly(*neutral red*) comme médiateur pour la réduction du  $\text{NAD}^+$ .<sup>138</sup> Cependant, en reproduisant cette étude, les résultats se sont avérés non significatifs. Néanmoins, il serait intéressant d'utiliser d'autres médiateurs comme les complexes de rhodium qui ont prouvés leur efficacité pour la régénération électrocatalytique du  $\text{NADH}$ .<sup>143</sup>

D'autre part, des essais d'immobilisation du cofacteur  $\text{NAD}^+$  sur des nanotubes de carbone multi-parois en utilisant un espaceur l'allyl isocyanate ont été effectués et ont donné de très bon résultats. En effet la présence des nanotubes de carbone avec le cofacteur a permis de réduire la différence de potentiel entre l'oxydation et la réduction du  $\text{NAD}$ . De plus, le cofacteur reste toujours actif vis-à-vis de l'enzyme formiate déshydrogénase après immobilisation. Par ailleurs, il serait intéressant de caractériser cette immobilisation plus finement en faisant recours à la RMN liquide pour étudier l'environnement chimique de l'azote de la fonction amine sur laquelle la fonction isocyanate a réagi. Aussi, il serait intéressant d'immobiliser le cofacteur  $\text{NAD}$  sur un monolithe de carbone, sur lequel les deux enzymes formiate déshydrogénase et phosphite déshydrogénase seront immobilisées par adsorption-réticulation et procéder à la réduction du  $\text{CO}_2$  en flux continu.

Un autre essai pourrait être très intéressant : développer un système bioélectrocatalytique. En effet, le cofacteur pourrait être greffé sur un monolithe de carbone à porosité hiérarhique, sur lequel le la formiate déshydrogénase serait immobilisé par adsorption-réticulation en présence du poly(éthylène glycol) diglycidyl éther. Ce monolithe serait collé sur une électrode de carbone vitreux avec une pâte de carbone conductrice *carbon paint*. Pour ce système la réduction du  $\text{CO}_2$  se ferait par voie biocatalytique à l'aide de la formiate déshydrogénase et la régénération du cofacteur se ferait par voie électrocatalytique. Comme il serait difficile de suivre l'oxydation et la réduction du cofacteur par voie électrochimique, il serait possible de doser la quantité de formiate produite par chromatographie en phase gaz à haute performance. Cette voie est actuellement en cours d'étude.



## Références

1. Key word  
<https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2017.pdf>).
2. CO<sub>2</sub> emissions from fuel combustion,  
<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/CO2EmissionsfromFuelCombustionHighlights2017.pdf>).
3. CO<sub>2</sub> Earth ppm, <https://www.co2.earth/>).
4. Ressources 2013,  
<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Resources2013.pdf>).
5. CONVENTION-CADRE DES NATIONS UNIES SUR LES CHANGEMENTS CLIMATIQUES,  
<https://unfccc.int/resource/ccsites/haiti/ccweb/conven/text/textcomplet.html>).
6. article 3 protocole de kyoto,  
<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpfrench.pdf#page=4>).
7. Accord de Paris,  
[http://unfccc.int/files/essential\\_background/convention/application/pdf/french\\_paris\\_agreement.pdf](http://unfccc.int/files/essential_background/convention/application/pdf/french_paris_agreement.pdf)).
8. Petra Nova, <https://www.energy.gov/fe/petra-nova-wa-parish-project>).
9. Carbon capture and storage, 2012,  
[http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/CCS\\_Review\\_3rdedition\\_FINAL.pdf](http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/CCS_Review_3rdedition_FINAL.pdf)
10. A. Goeppert, M. Czaun, J. P. Jones, G. K. S. Prakash and G. A. Olah, *Chem Soc Rev*, 2014, **43**, 7995-8048.
11. G. A. Olah, A. Goeppert and G. K. S. Prakash, *J Org Chem*, 2009, **74**, 487-498.
12. G. Centi and S. Perathoner, *Catalysis Today*, 2009, **148**, 191-205.
13. M. Behrens, F. Studt, I. Kasatkin, S. Kuhl, M. Havecker, F. Abild-Pedersen, S. Zander, F. Girgsdies, P. Kurr, B. L. Kniep, M. Tovar, R. W. Fischer, J. K. Norskov and R. Schlögl, *Science*, 2012, **336**, 893-897.
14. J. Graciani, K. Mudiyansele, F. Xu, A. E. Baber, J. Evans, S. D. Senanayake, D. J. Stacchiola, P. Liu, J. Hrbek, J. F. Sanz and J. A. Rodriguez, *Science*, 2014, **345**, 546-550.
15. K. Nakata, T. Ozaki, C. Terashima, A. Fujishima and Y. Einaga, *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, **53**, 871-874.
16. B. A. Rosen, A. Salehi-Khojin, M. R. Thorson, W. Zhu, D. T. Whipple, P. J. A. Kenis and R. I. Masel, *Science*, 2011, **334**, 643-644.
17. C. Costentin, S. Drouet, M. Robert and J. M. Saveant, *Science*, 2012, **338**, 90-94.
18. C. W. Li, J. Ciston and M. W. Kanan, *Nature*, 2014, **508**, 504.
19. S. N. Habisreutinger, L. Schmidt-Mende and J. K. Stolarczyk, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, **52**, 7372-7408.
20. P.-W. Pan and Y.-W. Chen, *Catalysis Communications*, 2007, **8**, 1546-1549.
21. E. E. Barton, D. M. Rampulla and A. B. Bocarsly, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 6342-6344.
22. J. Mao, T. Peng, X. Zhang, K. Li, L. Ye and L. Zan, *Catalysis Science & Technology*, 2013, **3**, 1253-1260.
23. Slamet, H. W. Nasution, E. Purnama, S. Kosela and J. Gunlazuardi, *Catalysis Communications*, 2005, **6**, 313-319.
24. H.-C. Yang, H.-Y. Lin, Y.-S. Chien, J. C.-S. Wu and H.-H. Wu, *Catalysis Letters*, 2009, **131**, 381-387.
25. H. Li, Y. Lei, Y. Huang, Y. Fang, Y. Xu, L. Zhu and X. Li, *Journal of Natural Gas Chemistry*, 2011, **20**, 145-150.

26. H. Li, X. Zhang and D. R. MacFarlane, *Advanced Energy Materials*, 2015, **5**, 1401077.
27. S. Kuwabata, R. Tsuda and H. Yoneyama, *Journal of the American Chemical Society*, 1994, **116**, 5437-5443.
28. R. Obert and B. C. Dave, *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**, 12192-12193.
29. B. Dave, *US Patent 6 440 711 B1*, 2002.
30. H. Wu, S. Huang and Z. Jiang, *Catalysis Today*, 2004, **98**, 545-552.
31. B. El-Zahab, D. Donnelly and P. Wang, *Biotechnol Bioeng*, 2008, **99**, 508-514.
32. Y. Jiang, Q. Sun, L. Zhang and Z. Jiang, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, **19**, 9068-9074.
33. R. Cazelles, J. Drone, F. Fajula, O. Ersen, S. Moldovan and A. Galarneau, *New J Chem*, 2013, **37**, 3721-3730.
34. J. Liu, R. Cazelles, Z. P. Chen, H. Zhou, A. Galarneau and M. Antonietti, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, **16**, 14699-14705.
35. P. K. Addo, R. L. Arechederra, A. Waheed, J. D. Shoemaker, W. S. Sly and S. D. Minter, *Electrochemical and Solid-State Letters*, 2011, **14**, E9-E13.
36. N. Brun, 2010.
37. G. LANOË, Synthèses et caractérisations de mousses de verres à partir de déchets. Valorisation de déchets marins et verriers, [http://pnr-rance-emeraude.fr/sites/pnr-rance-emeraude.fr/files/field/document/rapport\\_de\\_stage\\_guillaume\\_lanoe\\_iut\\_sgm\\_2016\\_version\\_vase\\_rance\\_0.pdf](http://pnr-rance-emeraude.fr/sites/pnr-rance-emeraude.fr/files/field/document/rapport_de_stage_guillaume_lanoe_iut_sgm_2016_version_vase_rance_0.pdf).
38. X.-Y. Yang, *Wiley-VCH*, **1**, 1-651.
39. C. J. Brinker and G. W. Scherer, in *Sol-Gel Science*, Academic Press, San Diego, 1990, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057103-4.50006-4>.
40. H. Tamai, T. Kakii, Y. Hirota, T. Kumamoto and H. Yasuda, *Chem Mater*, 1996, **8**, 454-462.
41. Z. H. Hu, M. P. Srinivasan and Y. M. Ni, *Adv Mater*, 2000, **12**, 62.
42. R. W. Pekala and D. W. Schaefer, *Macromolecules*, 1993, **26**, 5487-5493.
43. R. J. White, N. Brun, V. L. Budarin, J. H. Clark and M.-M. Titirici, *Chemsuschem*, 2014, **7**, 670-689.
44. L. I. Grishechko, G. Amaral-Labat, A. Szczurek, V. Fierro, B. N. Kuznetsov, A. Pizzi and A. Celzard, *Industrial Crops and Products*, 2013, **41**, 347-355.
45. A. Szczurek, G. Amaral-Labat, V. Fierro, A. Pizzi, E. Masson and A. Celzard, *Carbon*, 2011, **49**, 2773-2784.
46. G. Amaral-Labat, L. Grishechko, A. Szczurek, V. Fierro, A. Pizzi, B. Kuznetsov and A. Celzard, *Green Chem*, 2012, **14**, 3099-3106.
47. M. M. Titirici and M. Antonietti, *Chem Soc Rev*, 2010, **39**, 103-116.
48. M.-M. Titirici, A. Thomas and M. Antonietti, *New J Chem*, 2007, **31**, 787-789.
49. F. Bergius, *Naturwissenschaften*, 1928, **16**, 1-10.
50. Q. Wang, H. Li, L. Chen and X. Huang, *Carbon*, 2001, **39**, 2211-2214.
51. X. Sun and Y. Li, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, **43**, 597-601.
52. S. Kubo, R. J. White, N. Yoshizawa, M. Antonietti and M.-M. Titirici, *Chem Mater*, 2011, **23**, 4882-4885.
53. C. Falco, N. Baccile and M. M. Titirici, *Green Chemistry*, 2011, **13**, 3273-3281.
54. K. J. Lissant and K. G. Mayhan, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1973, **42**, 201-208.
55. R. Ryoo, S. H. Joo and S. Jun, *J Phys Chem B*, 1999, **103**, 7743-7746.
56. A. H. Lu and F. Schuth, *Adv Mater*, 2006, **18**, 1793-1805.

57. K. Nakanishi, *J Porous Mat*, 1997, **4**, 67-112.
58. E. L. Huston, J. W. Cahn and J. E. Hilliard, *Acta Metall Mater*, 1966, **14**, 1053.
59. G. Hasegawa, K. Kanamori, K. Nakanishi and T. Hanada, *J Am Ceram Soc*, 2010, **93**, 3110-3115.
60. A. Kitada, G. Hasegawa, Y. Kobayashi, K. Miyazaki, T. Abe, K. Kanamori, K. Nakanishi and H. Kageyama, *Rsc Adv*, 2013, **3**, 7205-7208.
61. S. Fukumoto, K. Nakanishi and K. Kanamori, *New J Chem*, 2015, **39**, 6771-6777.
62. Y. Zhu, K. Kanamori, N. Brun, C.-H. Péliesson, N. Moitra, F. Fajula, V. Hulea, A. Galarneau, K. Takeda and K. Nakanishi, *Catalysis Communications*, 2016, **87**, 112-115.
63. G. Hasegawa, K. Kanamori and K. Nakanishi, *Mater Lett*, 2012, **76**, 1-4.
64. G. Hasegawa, K. Kanamori, T. Kiyomura, H. Kurata, T. Abe and K. Nakanishi, *Chem Mater*, 2016, **28**, 3944-3950.
65. L. H. Yu, N. Brun, K. Sakaushi, J. Eckert and M. M. Titirici, *Carbon*, 2013, **61**, 245-253.
66. M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol and K. S. W. Sing, *Pure Appl Chem*, 2015, **87**.
67. B. Said, Université de Montpellier, 2015.
68. J. ROUQUEROL, *Techniques de l'ingénieur Analyses de surface et de matériaux*, 2003.
69. Broekhof.Jc and J. H. Deboer, *Journal of Catalysis*, 1968, **10**, 377.
70. J. Rouquerol, G. Baron, R. Denoyel, H. Giesche, J. Groen, P. Klobes, P. Levitz, A. V. Neimark, S. Rigby, R. Skudas, K. Sing, M. Thommes and K. Unger, *Pure Appl Chem*, 2012, **84**, 107-136.
71. La biocatalyse prête à BOULEVERSER vos procédés, <https://www.industrie-techno.com/la-biocatalyse-prete-a-bouleverser-vos-procedes.14772>).
72. G. M. Borrelli and D. Trono, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**, 20774-20840.
73. D. V. J. G. Voet, *De Boeck*, 2005.
74. K. Szymanska, M. Pietrowska, J. Kocurek, K. Maresz, A. Koreniuk, J. Mrowiec-Bialon, P. Widlak, E. Magner and A. Jarzebski, *Chem Eng J*, 2016, **287**, 148-154.
75. A. Pohar, P. Žnidaršič-Plazl and I. Plazl, *Chem Eng J*, 2012, **189-190**, 376-382.
76. J. T. R. J. Kazlauskas, in *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, New Jersey, 2011, DOI: doi:10.1002/9781118028308.ch2.
77. R. Wohlgemuth, *Curr Opin Biotech*, 2010, **21**, 713-724.
78. D. M. Solano, P. Hoyos, M. J. Hernaiz, A. R. Alcantara and J. M. Sanchez-Montero, *Bioresource Technol*, 2012, **115**, 196-207.
79. C. M. Clouthier and J. N. Pelletier, *Chem Soc Rev*, 2012, **41**, 1585-1605.
80. U. Hanefeld, L. Gardossi and E. Magner, *Chem Soc Rev*, 2009, **38**, 453-468.
81. L. Cao, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, 2005.
82. C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb Tech*, 2007, **40**, 1451-1463.
83. R. A. Sheldon, *Adv Synth Catal*, 2007, **349**, 1289-1307.
84. *Organic Process Research & Development*, 2006, **10**, 849-850.
85. L. Cao, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, 1-52.
86. M. Hartmann and D. Jung, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, **20**, 844-857.
87. R. A. Sheldon and S. van Pelt, *Chem Soc Rev*, 2013, **42**, 6223-6235.
88. H. H. P. Yiu and P. A. Wright, *J Mater Chem*, 2005, **15**, 3690-3700.
89. D. R. Walt and V. I. Agayn, *Trac-Trend Anal Chem*, 1994, **13**, 425-430.

90. L. Q. Cao, *Curr Opin Chem Biol*, 2005, **9**, 217-226.
91. A. Galarneau, A. Sachse, B. Said, C. H. Pelisson, P. Boscaro, N. Brun, L. Courtheoux, N. Olivi-Tran, B. Coasne and F. Fajula, *Cr Chim*, 2016, **19**, 231-247.
92. R. Munirathinam, J. Huskens and W. Verboom, *Adv Synth Catal*, 2015, **357**, 1093-1123.
93. A. El Kadib, R. Chimenton, A. Sachse, F. Fajula, A. Galarneau and B. Coq, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**, 4969-4972.
94. K. Szymanska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Bialon and A. B. Jarzebski, *Micropor Mesopor Mat*, 2007, **99**, 167-175.
95. K. Szymanska, W. Pudlo, J. Mrowiec-Bialon, A. Czardybon, J. Kocurek and A. B. Jarzebski, *Micropor Mesopor Mat*, 2013, **170**, 75-82.
96. N. Brun, A. Babeau-Garcia, M. F. Achard, C. Sanchez, F. Durand, G. Laurent, M. Birot, H. Deleuze and R. Backov, *Energ Environ Sci*, 2011, **4**, 2840-2844.
97. K. Szymanska, K. Odrozek, A. Zniszczol, G. Torrelo, V. Resch, U. Hanefeld and A. B. Jarzebski, *Catalysis Science & Technology*, 2016, **6**, 4882-4888.
98. F. S. Baskaya, X. Y. Zhao, M. C. Flickinger and P. Wang, *Appl Biochem Biotech*, 2010, **162**, 391-398.
99. S. Schlager, L. M. Dumitru, M. Haberbauer, A. Fuchsbauer, H. Neugebauer, D. Hiemetsberger, A. Wagner, E. Portenkirchner and N. S. Sariciftci, *Chemsuschem*, 2016, **9**, 631-635.
100. H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang and Z. Jiang, *Green Chemistry*, 2013, **15**, 1773-1789.
101. J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf and W. A. van der Donk, *Angew Chem Int Edit*, 2002, **41**, 3257.
102. Z. J. Wang, M. Etienne, F. Quiles, G. W. Kohring and A. Walcarius, *Biosens Bioelectron*, 2012, **32**, 111-117.
103. I. Ali, B. Soomro and S. Omanovic, *Electrochemistry Communications*, 2011, **13**, 562-565.
104. L. B. Maia, L. Fonseca, I. Moura and J. J. G. Moura, *J Am Chem Soc*, 2016, **138**, 8834-8846.
105. Q. Guo, L. Gakhar, K. Wickersham, K. Francis, A. Vardi-Kilshtain, D. T. Major, C. M. Cheatum and A. Kohen, *Biochemistry-Us*, 2016, **55**, 2760-2771.
106. A. M. Appel, J. E. Bercaw, A. B. Bocarsly, H. Dobbek, D. L. DuBois, M. Dupuis, J. G. Ferry, E. Fujita, R. Hille, P. J. A. Kenis, C. A. Kerfeld, R. H. Morris, C. H. F. Peden, A. R. Portis, S. W. Ragsdale, T. B. Rauchfuss, J. N. H. Reek, L. C. Seefeldt, R. K. Thauer and G. L. Waldrop, *Chemical Reviews*, 2013, **113**, 6621-6658.
107. M. Laukel, L. Chistoserdova, E. Lidstrom Mary and A. Vorholt Julia, *Eur J Biochem*, 2002, **270**, 325-333.
108. K. Sakai, B.-C. Hsieh, A. Maruyama, Y. Kitazumi, O. Shirai and K. Kano, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2015, **5**, 90-96.
109. H. Choe, J. C. Joo, D. H. Cho, M. H. Kim, S. H. Lee, K. D. Jung and Y. H. Kim, *Plos One*, 2014, **9**, e103111.
110. K. Sakai, Y. Kitazumi, O. Shirai and K. Kano, *Electrochemistry Communications*, 2016, **65**, 31-34.
111. A. Alissandratos, H.-K. Kim and C. J. Easton, *Bioengineered*, 2013, **4**, 348-350.
112. N. Brun, S. R. S. Prabaharan, C. Surcin, M. Morcrette, H. Deleuze, M. Birot, O. Babot, M. F. Achard and R. Backov, *J Phys Chem C*, 2012, **116**, 1408-1421.
113. T. Johannes, R. Woodyer, M. McLachlan and H. M. Zhao, *Abstr Pap Am Chem S*, 2006, **232**.

114. S. Grunwald, A. Mottet, E. Grousseau, K. Plassmeier Jens, K. Popović Milan, J.-L. Uribealarea, N. Gorret, E. Guillouet Stéphane and A. Sinskey, *Microbial Biotechnology*, 2014, **8**, 155-163.
115. J. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. M. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing and K. K. Unger, *Journal*, 1994, **66**, 1739.
116. A. Sachse, 2011.
117. A. Sachse, A. Galarneau, F. Fajula, F. Di Renzo, P. Creux and B. Coq, *Micropor Mesopor Mat*, 2011, **140**, 58-68.
118. M. M. Titirici, M. Antonietti and N. Baccile, *Green Chemistry*, 2008, **10**, 1204-1212.
119. N. Baccile, G. Laurent, F. Babonneau, F. Fayon, M. M. Titirici and M. Antonietti, *J Phys Chem C*, 2009, **113**, 9644-9654.
120. M. M. Titirici, R. J. White, C. Falco and M. Sevilla, *Energ Environ Sci*, 2012, **5**, 6796-6822.
121. S. Ikeda, K. Tachi, Y. H. Ng, Y. Ikoma, T. Sakata, H. Mori, T. Harada and M. Matsumura, *Chem Mater*, 2007, **19**, 4335-4340.
122. L. H. Yu, C. Falco, J. Weber, R. J. White, J. Y. Howe and M. M. Titirici, *Langmuir*, 2012, **28**, 12373-12383.
123. C. Darrigan, 2007.
124. A. Galarneau, D. Desplandier, R. Dutartre and F. Di Renzo, *Micropor Mesopor Mat*, 1999, **27**, 297-308.
125. R. Cazelles, Ecole nationale supérieure de chimie de Montpellier, 2013.
126. S. Ikeyama and Y. Amao, *ChemCatChem*, 2016, **9**, 833-838.
127. S. Schlager, M. Dumitru Liviu, M. Haberbauer, A. Fuchsbaauer, H. Neugebauer, D. Hiemetsberger, A. Wagner, E. Portenkirchner and S. Sariciftci Niyazi, *Chemsuschem*, 2016, **9**, 631-635.
128. T. N. Huan, P. Simon, G. Rousse, I. Génois, V. Artero and M. Fontecave, *Chemical Science*, 2017, **8**, 742-747.
129. Mechanism of diazotisation, <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/diazotisation.shtm>
130. J. L. Bahr and J. M. Tour, *Chem Mater*, 2001, **13**, 3823-3824.
131. Z. Li and S. Dai, *Chem Mater*, 2005, **17**, 1717-1721.
132. T. Ramanathan, F. T. Fisher, R. S. Ruoff and L. C. Brinson, *Chem Mater*, 2005, **17**, 1290-1295.
133. J. L. Bahr, J. Yang, D. V. Kosynkin, M. J. Bronikowski, R. E. Smalley and J. M. Tour, *J Am Chem Soc*, 2001, **123**, 6536-6542.
134. A. W. Johnson, *De Boeck Supérieur*, 2002, 784.
135. O. Diels and K. Alder, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1928, **460**, 98-122.
136. H. Kaper, A. Grandjean, C. Weidenthaler, F. Schuth and F. Goettmann, *Chem-Eur J*, 2012, **18**, 4099-4106.
137. S. E. Godtfredsen, M. Ottesen and N. R. Andersen, *Carlsberg Research Communications*, 1979, **44**, 65.
138. M. N. Arechederra, P. K. Addo and S. D. Minter, *Electrochim Acta*, 2011, **56**, 1585-1590.
139. A. Bardea, E. Katz, A. F. Buckmann and I. Willner, *J Am Chem Soc*, 1997, **119**, 9114-9119.
140. Y. Nakamura, S.-i. Suye, J.-i. Kira, H. Tera, I. Tabata and M. Senda, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1996, **1289**, 221-225.
141. C. A. Schall and J. M. Wiencek, *Biotechnol Bioeng*, 1997, **53**, 41-48.
142. *Japan Pat.*, 1993.

143. L. Zhang, N. Vilà, G.-W. Kohring, A. Walcarius and M. Etienne, *Acs Catal*, 2017, **7**, 4386-4394.

## **Annexes :**

### **Annexe 1 : Composition des solutions tampons utilisées pour la purification de la phosphite déshydrogénase.**

Les solutions tampons utilisées pour la purification des protéines incluent :

- Solution tampon A (SBA) dont sa composition est : 0,5 M NaCl, 20% glycérol et 20 mM Tris-HCl à pH 7,6.
- Solution tampon B (SBB) dont sa composition est : SBA et 10 mM imidazole pH 7,6.
- Solution tampon C (SBC) dont sa composition est : SBA et 50 mM Imidazole pH 7,6.
- Solution tampon d'éluion (EB) composée de : SBA et 0,5 M imidazole à pH 7,6.
- Solution de conservation (CB) dont sa composition est : HEPES 50 mM, NaCl 200 mM et 20% glycérol qui est utilisée dans un premier temps avant l'ajout du glycérol pour l'ultrafiltration et dans un second temps après l'ajout du glycérol pour la conservation et le stockage des protéines à - 80 °C.

## **Annexe 2 : Purification des protéines PtDH par FPLC.**

Avant de commencer la purification de la solution clarifiée, il est nécessaire de préparer l'appareil pour son bon fonctionnement. La colonne de séparation (HisPrep FF 16/10 pré-chargée par du nickel) est mise en place et ses paramètres sont fixés sur le logiciel de l'appareil ainsi que le débit à  $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  selon le protocole du constructeur de la colonne. Par la suite 5 volumes de colonne d'eau distillée ont été passés pour enlever l'éthanol contenu dans la colonne lors du stockage ainsi que les bulles d'air dans la tuyauterie.

Après le lavage de la colonne avec de l'eau distillée, 5 volumes de colonne de la solution tampon A (SBA) ont été passés. Par la suite, la solution clarifiée de PtDH à purifier est chargée dans la colonne. Un grand pic d'intensité supérieure à 3 apparaît sur le graphe (Absorbance à 280 nm) =  $f(\text{temps})$  ( $\epsilon = 30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Après avoir passé la totalité de la solution de protéine, la solution tampon A (SBA) est repassée jusqu'à obtenir un palier sur la courbe d'absorbance correspondant à une absorbance nulle à 280 nm. Par la suite, 5 volumes de colonne de la solution tampon B (SBB) sont passés. Cette solution est une solution de lavage et permet d'éliminer les protéines qui n'ont pas été retenues. Un pic apparaît sur la courbe d'absorbance correspondant à la quantité de protéines non retenues. Enfin, un deuxième lavage a été effectué avec la solution tampon C (SBC) et un deuxième pic moins important apparaît sur la courbe d'absorbance.

Après avoir passé la totalité de la solution de protéine, la solution tampon A (SBA) est repassée jusqu'à obtenir un palier sur la courbe d'absorbance correspondant à une absorbance nulle à 280 nm. Par la suite, 5 volumes de colonne de la solution tampon B (SBB) sont passés. Cette solution est une solution de lavage et permet d'éliminer les protéines qui n'ont pas été retenues. Un pic apparaît sur la courbe d'absorbance correspondant à la quantité de protéines non retenues. Enfin, un deuxième lavage a été effectué avec la solution tampon C (SBC) et un deuxième pic moins important apparaît sur la courbe d'absorbance.

Après avoir passé les deux solutions de lavage, toutes les protéines qui n'ont pas été retenues par la phase stationnaire ont été éliminées. La solution d'éluion est donc passée afin de récupérer les protéines PtDH pures. Dès l'apparition du pic sur le graph, des prélèvements de la solution de protéines pures en fraction de 5 mL sont effectués jusqu'à la disparition du pic. 10 fractions de 5 mL de protéines purifiées sont récupérées.

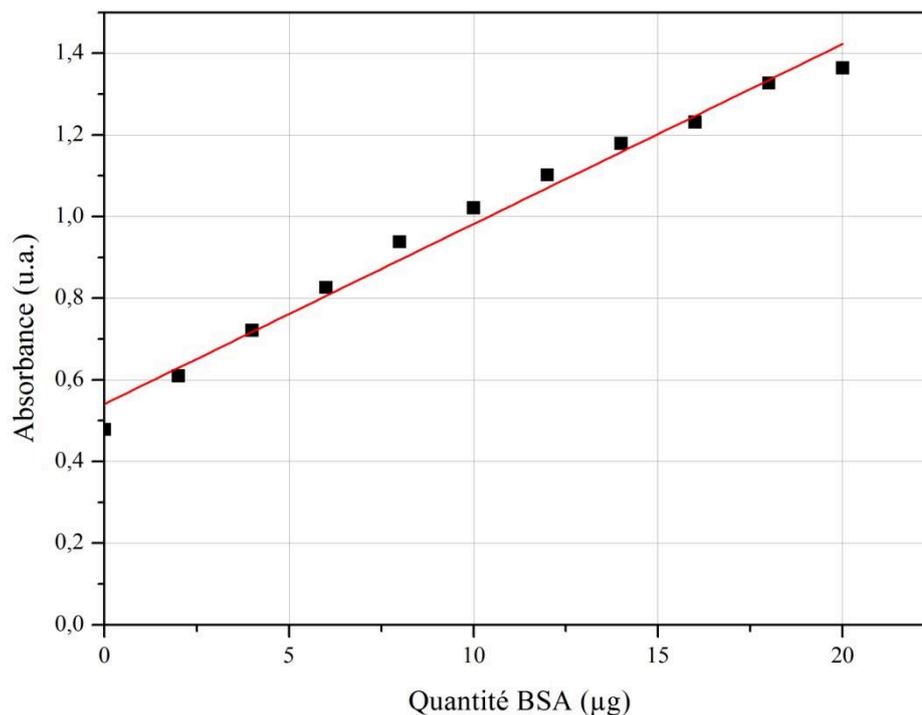
### Annexe 3 : Détermination de la concentration protéinique

Différentes solutions ont été préparées : une solution tampon phosphate 0,1 M pH 6,4 (Tp 1X) ; une solution BSA<sub>mère</sub> 1 mg/mL dans tampon phosphate 0,1 M pH 6,4 ; une solution BSA<sub>filie</sub> préparée en diluant 1/10 la solution BSA<sub>mère</sub> ; une solution tampon phosphate 0,01 M pH 6,4 (Tp 0,1X) a été préparée en diluant la solution tampon phosphate 0,1 M pH 6,4 au 1/10 et une solution de réactif de Bradford 1X a été préparée en diluant le réactif de Bradford au 1/5 (pour 10 mL de réactif de Bradford, 40 mL tampon phosphate 0,1 M pH 6,4).

La gamme étalon et les échantillons à doser ont été préparés de manière à mettre les volumes de la solution de BSA et de la solution du réactif de Bradford (reportés dans le tableau 30) dans des cuves en plastique de 1,5 mL. Le volume de la solution de Bradford est rajouté dans la cuve de spectroscopie en dernier lieu et au moment de l'ajout le chronomètre est déclenché, 10 minutes plus tard, les absorbances sont mesurées.

**Tableau 30.** Volumes des solutions utilisées pour la préparation de la gamme d'étalonnage et les valeurs d'absorbance

	Volume BSA <sub>filie</sub> ( $\mu$ L)	Volume d'enzyme à doser ( $\mu$ L)	Volume du tampon phosphate 0,01 M ( $\mu$ L)	Volume du Réactif de Bradford 1X ( $\mu$ L)	Absorbance
1	0	--	200	1000	0,4788
2	20	--	180	1000	0,6101
3	40	--	160	1000	0,7214
4	60	--	140	1000	0,8266
5	80	--	120	1000	0,9385
6	100	--	100	1000	1,0216
7	120	--	80	1000	1,1021
8	140	--	60	1000	1,1795
9	160	--	40	1000	1,2319
10	180	--	20	1000	1,3271
11	200	--	0	1000	1,3645
PtDH	--	1	199	1000	0,8637
MeFDH	--	1	199	1000	1,2202



**Figure 119.** Gamme d'étalonnage : Quantité BSA (µg) = f (absorbance)

L'équation de la courbe de tendance de la gamme d'étalonnage :

$$\text{Abs} = 0,04408 (\text{Quantité BSA}) + 0,5412$$

$$(\text{Quantité de protéine équivalent BSA}) = \frac{\text{Abs} - 0,5412}{0,04408}$$

Pour la PtDH : (Quantité de protéine) = 7,3 mg équivalent BSA pour 1 mL de la solution enzymatique PtDH.

Pour la MeFDH : (Quantité de protéine) = 15,4 mg équivalent BSA pour 1 mL de la solution enzymatique MeFDH.

### Annexe 4 : Calcul des constantes catalytiques TTN et *turn-over frequency* TOF

$$TTN_{NAD^+} = \frac{\text{concentration de formiate formé}}{\text{concentration du NAD}^+} = \frac{3,27}{0,25} + 1 = 14$$

$$TOF_{NAD^+} = \frac{TTN_{NAD^+}}{\text{temps de réaction}} = 0,47 \text{ min}^{-1}$$

Masse moléculaire MeFDH = 107 + 61 kDa

$$\text{Nombre de mole MeFDH} = \frac{246,44 \cdot 10^{-6}}{168000} = 1,467 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$$

$$\text{Concentration en MeFDH} = \frac{1,467 \cdot 10^{-9}}{0,002} = 7,33 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$TTN_{MeFDH} = \frac{\text{concentration de formiate formé}}{\text{concentration en MeFDH}} = \frac{3,27}{7,33 \cdot 10^{-4}} + 1 = 4,46 \cdot 10^3$$

$$TOF_{MeFDH} = \frac{TTN_{MeFDH}}{\text{temps de réaction}} = 1,49 \cdot 10^2 \text{ min}^{-1}$$

Masse moléculaire PtDH = 36 kDa

$$\text{Nombre de mole PtDH} = \frac{263,24 \cdot 10^{-6}}{36000} = 7,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$$

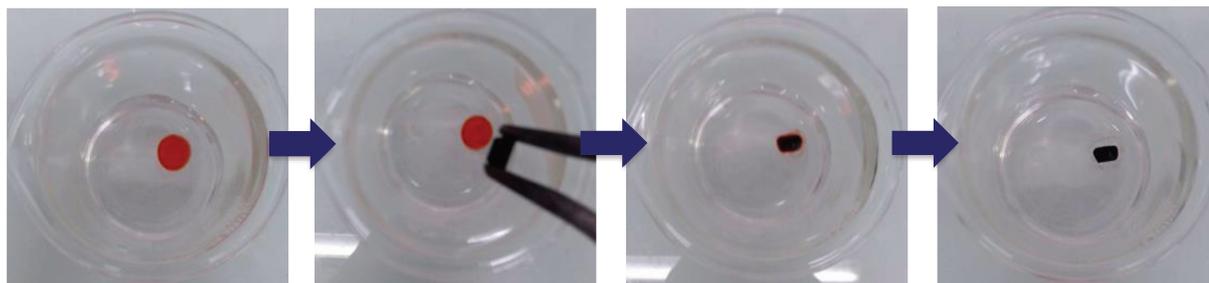
$$\text{Concentration en MeFDH} = \frac{7,3 \cdot 10^{-9}}{0,002} = 3,66 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$TTN_{PtDH} = \frac{\text{concentration de NADH formé}}{\text{concentration en PtDH}} = \frac{3,27}{3,66 \cdot 10^{-3}} + 1 = 8,9 \cdot 10^2$$

$$TOF_{PtDH} = \frac{TTN_{PtDH}}{\text{temps de réaction}} = 29,8 \text{ min}^{-1}$$

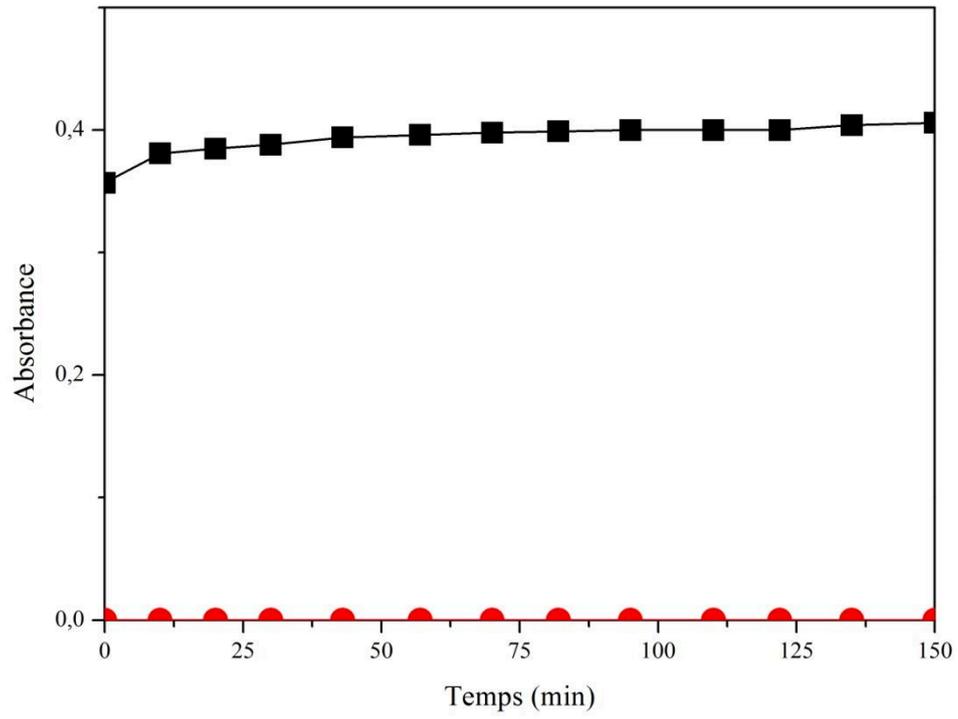
## Annexe 5 : Propriétés d'adsorption des monolithes de carbone C-40-20

Les monolithes de carbone synthétisés par empreinte « dure » sont de très bons adsorbants. En effet nous avons préparé une solution contenant du cyclohexane et du Sudan III comme colorant, et nous avons plongé le monolithe dans cette solution, nous constatons qu'au bout de quelques minutes le monolithe a absorbé toute la solution (fig. 120).

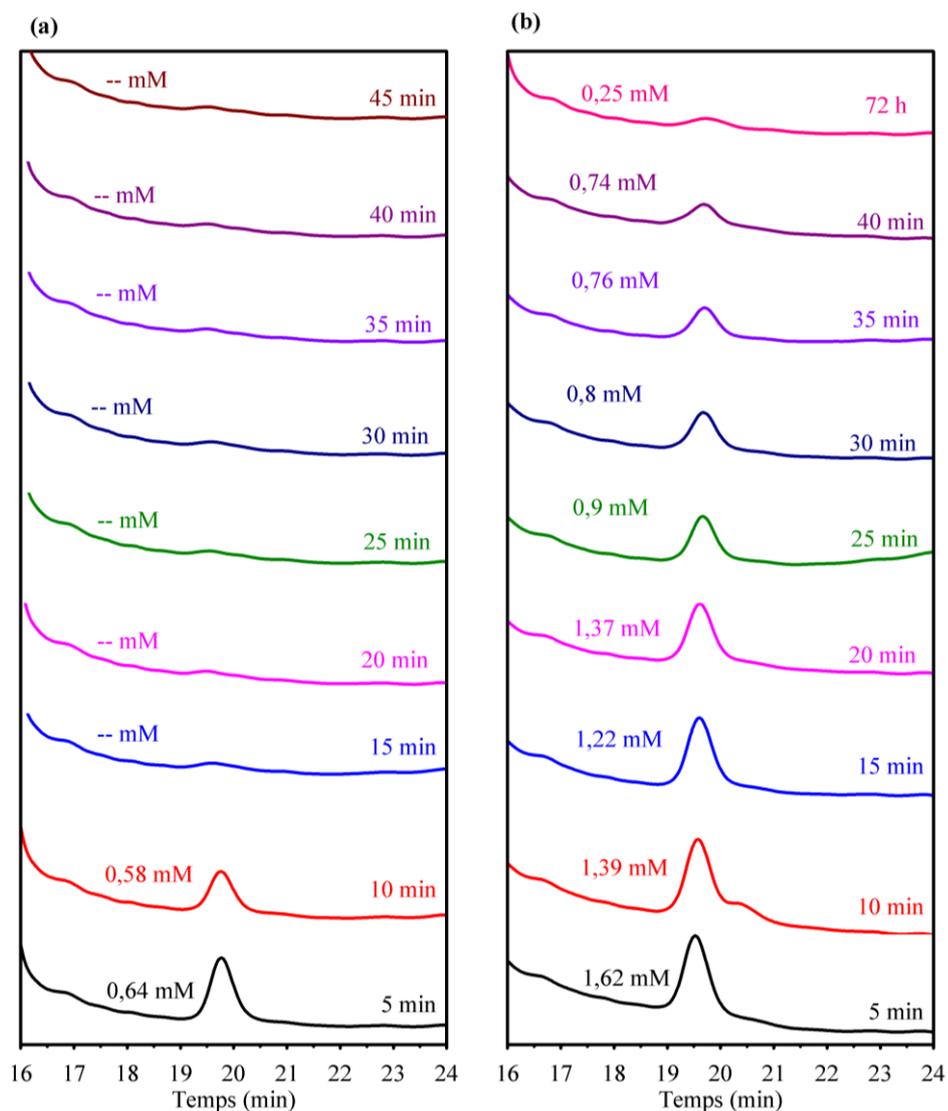


**Figure 120.** Absorption d'une solution de Sudan III dans le cyclohexane par un monolithe C-40-20

Une deuxième expérience a été réalisée en passant en flux continu une solution de p-nitrophénol  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$  à travers un monolithe de carbone C-40-20 de 1 cm de longueur. En effet, le p-nitrophénol absorbe à 400 nm. Nous mesurons alors l'absorbance de la solution à l'entrée et à la sortie du monolithe en fonction du temps (fig. 121). Nous constatons que l'absorbance à l'entrée du monolithe est de 0,4 et est constante en fonction du temps, en revanche l'absorbance à la sortie du monolithe est nulle. Ceci est expliqué par le fait que les molécules du p-nitrophénol se sont adsorbées sur le monolithe de carbone.



**Figure 121.** Absorbance à 400 nm (●) de la solution à l'entrée du monolithe (■) à la sortie du monolithe.

**Annexe 5 : Zoom sur le signal de l'acide formique déterminé**

**Figure 122.** Zoom sur les chromatogrammes obtenus par HPLC des fractions récupérées après bioréduction du CO<sub>2</sub> avec un bioréacteur où (a) un monolithe de silice SiO<sub>2</sub>-40-20 est utilisé comme support pour l'immobilisation d'enzymes (b) un monolithe de carbone C-40-20 est utilisé comme support pour l'immobilisation d'enzymes