



HAL
open science

Synthèse catalytique des hydroxyacides en C3 par oxydation chimio-enzymatique du glycérol et du carbonate de glycérol sous atmosphère enrichie en oxygène ou sous air ambiant en milieu aqueux

Mathilde Amouroux

► **To cite this version:**

Mathilde Amouroux. Synthèse catalytique des hydroxyacides en C3 par oxydation chimio-enzymatique du glycérol et du carbonate de glycérol sous atmosphère enrichie en oxygène ou sous air ambiant en milieu aqueux. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2017. Français. NNT : 2017INPT0047 . tel-04222802

HAL Id: tel-04222802

<https://theses.hal.science/tel-04222802v1>

Submitted on 29 Sep 2023

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

Mme MATHILDE AMOUROUX

le jeudi 1 juin 2017

Titre :

Synthèse catalytique des hydroxyacides en C3 par oxydation chimio-enzymatique du glycérol et du carbonate de glycérol en présence ou en l'absence d'oxygène en milieux aqueux

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (L.C.A.)

Directeur(s) de Thèse :

M. ZEPHIRIN MOULOUNGUI

Rapporteurs :

Mme FRANÇOISE QUIGNARD, ECOLE NLE SUP DE CHIMIE DE MONTPELLIER

Mme VERONIQUE RATAJ, UNIVERSITE LILLE 1

Membre(s) du jury :

M. PHILIPPE URBAN, INSA TOULOUSE, Président

M. CARLOS VACA GARCIA, INP TOULOUSE, Membre

M. ERIC DUBREUCQ, MONTPELLIER SUPAGRO, Membre

M. ZEPHIRIN MOULOUNGUI, INP TOULOUSE, Membre

Rien ne va de soi. Rien n'est donné. Tout est construit.

Gaston Bachelard

I. Remerciements

Je remercie M. Mouloungui de m'avoir permis de réaliser ma thèse au laboratoire de chimie agroindustrielle et de m'avoir soutenue tout au long de ces 3 ans pour la réalisation de ces travaux notamment grâce à ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie Cédric Cabanes, Faouzi Attia et Céline Durieu de m'avoir offert la possibilité de réaliser ma thèse au sein d'Agronutrition, et en partenariat avec l'ANRT qui a cofinancé ce projet (contrat de collaboration AGRONUTRITION/INPT-INRA intitulé 3BCAR II « néo systèmes d'adjuvantation industriels, de complexation et de vectorisation en agrochimie » n° 2014-025).

Je remercie également la structure du LabCom (Laboratoires communs organismes de recherche publics) immergée dans le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle qui m'a permis de mener ce projet à bien (contrat LABCOM C2R-BIONUT : ANR14-LAB3-0009-01 C2R BioNut). Mes vifs remerciements sont aussi adressés au directeur du LCA et au personnel de la logistique de m'avoir accueillie et donnée les moyens techniques pour réaliser ce projet.

Je remercie Mme Quignard d'avoir accepté d'examiner mon travail en tant que rapporteur et jurée et de m'avoir apportée son aide sur les alginates, ainsi que Mme Rataj d'avoir également bien voulu être rapporteur et jurée pour ces travaux.

Je remercie M. Urban, d'avoir accepté d'être président de mon jury et leurs membres, Éric Dubreucq qui m'a beaucoup conseillée pour l'utilisation des enzymes et le professeur Carlos Vaca-Garcia pour tous ses conseils avisés qui m'ont permis de trouver mon chemin dans mes raisonnements, et pour tout le temps qu'il m'a consacré.

Je remercie toutes les personnes d'Agronutrition, en particulier : Audrey et Audrey, Christelle, Alexia, Ali, Dominique, Marie-Dominique et Camille pour leur gentillesse tout au long de ma présence au sein de l'entreprise.

Je remercie Julien qui m'a aidé dans mes travaux par sa bonne volonté, ses idées et tout le soin qu'il a mis dans le travail que je lui avais confié.

Je remercie Jésus pour son aide, Winda et Pablo pour leur accueil, mais aussi Jérôme pour m'avoir apporté ses lumières dans mes montages pas toujours très logiques ! Sans oublier Romain pour ses conseils sur les alginates.

Je remercie petit Romain pour toute la bonne volonté qu'il a mise à me procurer les produits dont j'avais besoin, et dans la même fibre Ingrid.

Je remercie David Riboul, Marc Vedrenne et Stéphane Massou pour toute l'attention qu'ils ont portée à mon travail ainsi que leurs bons conseils et leur disponibilité.

Je remercie Marine pour tous nos petits papotages, nos cafés et nos grosses rigolades devant l'HPLC ainsi que pour son aide et ses bonnes idées.

Je remercie Jeff, Audrey et Mike de m'avoir adoptée dans leur bureau et pour la super ambiance de celui-ci. Mention spéciale à Mike qui a accepté de m'aider dans toutes mes manipulations sur les protéines pourtant récalcitrantes !!! A Audrey pour ses tous ses bons conseils, ses encouragements, pour m'avoir fait partager sa passion et son savoir en RMN et pour tout le temps qu'elle m'a consacré avec bonne humeur. Enfin, une grosse pensée à Jeff, pour son écoute, sa gentillesse et toutes les impressions que j'ai faites avec son ordinateur ^^.

Je remercie aussi Nathalie Palomino et sa collègue pour toutes les recherches d'articles qu'elles ont effectuées pour moi dans les entrailles d'Internet et des bibliothèques de France et d'ailleurs.

Je remercie enfin ma « première famille » d'avoir courageusement supporté de corriger mes fautes d'orthographe tout au long (long !) de ce manuscrit et à ma « deuxième famille » de m'avoir aidée même à 10h du soir devant Chroméléon et de croire en moi tous les jours.

Je remercie enfin tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à ce travail et que j'aurais oubliées. ☺

II. Table des matières

I.	REMERCIEMENTS	4	
II.	TABLE DES MATIERES	8	
III.	TABLE DES FIGURES.....	12	
IV.	TABLE DES TABLEAUX	20	
V.	GLOSSAIRE ET DEFINITIONS	24	
VI.	INTRODUCTION.....	28	
CHAPITRE 1 : MISE EN PLACE D'UNE DEMARCHE PLUS DURABLE INSPIREE DU VIVANT POUR LA SELECTION DES SUBSTRATS ET DES PROTOCOLES DE SYNTHESE NECESSAIRES A L'ELABORATION DE NOUVEAUX AGENTS DE VECTORISATION			34
1.1	DES MOLECULES INSPIREES DU VIVANT	36	
1.1.1	<i>Les barrières végétales : source d'inspiration dans le choix des substrats</i>	36	
1.1.2	<i>Les chélatants chez les végétaux</i>	40	
1.1.3	<i>Les hydroxyacides importants du métabolisme</i>	44	
1.1.4	<i>Détermination des substrats pour la fabrication des futurs agents de vectorisation</i>	46	
1.2	DETERMINATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR L'OXYDATION DES SUBSTRATS	61	
1.2.1	<i>Les contraintes du projet</i>	61	
1.2.2	<i>Recherche des protocoles les plus adéquats pour l'oxydation des substrats</i>	62	
CHAPITRE 2 :RESULTATS ET DISCUSSION DES ESSAIS EN CATALYSE HOMOGENE			98
2.1	IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES PRODUITS FORMES EN CATALYSE HOMOGENE	100	
2.1.1	<i>Identification et quantification des produits par chromatographie liquide associée à la détection par réfractométrie (HPLC)</i>	100	
2.1.2	<i>Identification et quantification des diacides par chromatographie ionique HPIC associée à une détection par conductimétrie</i>	105	
2.1.3	<i>Analyse des milieux réactionnels par spectrométrie de masse</i>	108	
2.2	ANALYSE FINE POUR L'IDENTIFICATION TOTALE DES COMPOSES DE LA REACTION ENZYMATIQUE LACCASE / TEMPO (CE6)	113	
2.2.1	<i>Séparation des produits contenus dans les mélanges réactionnels issus de la voie catalytique enzymatique</i>	114	
2.2.2	<i>Identification des produits formés</i>	115	
2.2.3	<i>Conclusion : mise au point d'une plateforme analytique pour la caractérisation des HA</i>	148	
2.3	OPTIMISATION DE LA FORMATION DES HA D'INTERET PAR LA MISE EN PLACE ET LA REALISATION DE PLAN D'EXPERIENCES (PEX)	149	
2.3.1	<i>Détermination des paramètres d'entrée ayant une influence majeure sur la formation des HA au cours de l'oxydation grâce au logiciel CORICO</i>	150	
2.3.2	<i>Détermination des domaines expérimentaux pour les variables retenues</i>	154	
2.3.3	<i>Résultats des plans d'expériences</i>	160	
2.4	APPLICATION DU PROTOCOLE CE6 EN CATALYSE HOMOGENE POUR L'OXYDATION DU DIGLYCEROL ET DU TRIGLYCEROL	180	
CHAPITRE 3 :UTILISATION DE LA CATALYSE HETEROGENE POUR LA PRESERVATION DES CATALYSEURS			184
3.1	FIXATION DU TEMPO SUR SUPPORT.....	186	
3.1.1	<i>Etude préliminaire</i>	186	
3.1.2	<i>Les réactions avec le TEMPO immobilisé</i>	187	
3.2	IMMOBILISATION DE LA LACCASE SUR SUPPORT	190	
3.2.1	<i>Etude préliminaire</i>	190	

3.2.2	<i>Choix de l'alginate</i>	192
3.2.3	<i>Choix des conditions de fabrication</i>	194
3.2.4	<i>Fabrication des billes d'alginate</i>	195
3.2.5	<i>Analyses des billes d'alginate formées</i>	195
3.2.6	<i>Utilisation de la laccase immobilisée en billes d'alginate pour les réactions d'oxydation avec le protocole enzymatique CE6</i>	211
3.3	CONCLUSIONS	220
CHAPITRE 4 :AMELIORATIONS ET PERSPECTIVES		222
4.1	HYPOTHESE D'AMELIORATION CONCERNANT LA CATALYSE HETEROGENE	224
4.1.1	<i>Amélioration en vue d'une application sur le di et le triglycérol</i>	224
4.1.2	<i>Proposition d'un nouveau réacteur pour l'application de la catalyse hétérogène avec le protocole enzymatique dans le cas de l'oxydation du glycérol et du CG</i>	225
4.2	PROPOSITION DE NOUVELLES ORGANISATIONS POUR LE MILIEU REACTIONNEL DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE CE6	226
4.2.1	<i>Utilisation d'un milieu biphasique pour l'amélioration des rendements en acide glycérique</i>	226
4.2.2	<i>Utilisation de milieux non conventionnels</i>	228
4.3	LIMITES ET NOUVELLES VOIES POUR LES METHODES ANALYTIQUES EMPLOYEES	229
4.3.1	<i>La spectrométrie de masse</i>	229
4.3.2	<i>Propositions supplémentaires pour la RMN</i>	229
4.3.3	<i>La mesure du dégagement de dioxyde de carbone</i>	230
4.4	PERSPECTIVES : UNE NOUVELLE VOIE POUR LES HA DU GLYCEROL ET DU CG	231
4.4.1	<i>Une voie alternative pour la synthèse des HA ?</i>	231
4.4.2	<i>Applications potentielles futures pour les HA issus de l'oxydation du CG et du glycérol par la voie enzymatique CE6</i>	233
CHAPITRE 5 :PARTIE EXPERIMENTALE		236
5.1	PROTOCOLES DES REACTIONS TESTEES AU COURS DE LA THESE	238
5.1.1	<i>Protocole enzymatique avec le système laccase/TEMPO CE6 en catalyse homogène</i>	238
5.1.2	<i>Protocole avec l'ensemble de métaux non-nobles Mn(NO₃)₂/ Cu(NO₃)₂ associé à TEMPO, CC33</i>	240
5.1.3	<i>Protocole pour l'oxydation du glycérol avec le HDL cuivre, aluminium, magnésium CC21</i>	241
5.1.4	<i>Protocole d'oxydation du CG par le cuivre associé à du TEMPO : CC29</i>	248
5.1.5	<i>Protocole pour les analyses en chromatographie</i>	250
5.1.6	<i>Extraction de fraction</i>	260
5.2	REALISATION DES PLANS D'EXPERIENCES	264
5.2.1	<i>Mesure de la viscosité des solutions de glycérol</i>	264
5.2.2	<i>Réalisation du plan d'expériences dans le cas du glycérol</i>	266
5.2.3	<i>Réalisation du plan d'expériences dans le cas du CG</i>	271
5.3	DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ENZYME NECESSAIRE A LA CATALYSE PAR LE CALCUL DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	278
5.3.1	<i>Matériel et méthode</i>	278
5.3.2	<i>Résultats des mesures</i>	279
5.4	OXYDATION DES SUBSTRATS EN CATALYSE HETEROGENE	282
5.4.1	<i>Calcul de la quantité de TEMPO immobilisé introduite pour l'oxydation des substrats glycérol et CG avec le protocole CE6</i>	282
5.4.2	<i>Protocole de fixation de la laccase en billes d'alginate</i>	283
5.4.3	<i>Détermination de la quantité de protéines dans les milieux réactionnels par électrophorèse</i>	285
5.4.4	<i>Analyse des billes au microscope électronique à balayage</i>	285
VII.	CONCLUSION	286
VIII.	BIBLIOGRAPHIE	290

IX. ANNEXES.....	312
Annexe 1 : Liste des acides aminés.....	313
Annexe 2 : Origine des réactifs.....	314
Annexe 3 : RMN 1D et 2D complémentaires	315
Annexe 4 : Comparaison entre les brevets de fabrication du CG oxydé actuels et la synthèse mise au point au cours des travaux de thèse	322

III. Table des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION DE LA FERTILISATION A L'AIDE D'AGENTS DE VECTORISATION (CAS DU FER)	31
FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA FEUILLE ET ORGANISATION DE LA CUTICULE (POLLARD, BEISSON, LI, & OHLROGGE, 2008)	36
FIGURE 3 : REPRESENTATION DES UNITES DE BASE DE LA SUBERINE ET DE LA CUTINE DE LA CUTICULE (POLLARD, BEISSON, LI, & OHLROGGE, 2008)	37
FIGURE 4 : STRUCTURE DE BASE D'UN ESTER AVEC EN R, UNE CHAINE GRASSE	37
FIGURE 5 : LA CELLULOSE, POLYMER DE GLUCOSE, RELIES PAR DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES	38
FIGURE 6 : XYLOSE A GAUCHE ET ACIDE MANNURONIQUE A DROITE	38
FIGURE 7 : 1-OLEYL-2-STEARYL-PHOSPHATIDYLCHOLINE	39
FIGURE 8 : CHELATANTS CHEZ LA PLANTE (CALLAHAN, BAKER, KOLEV, & WEDD, 2006)	40
FIGURE 9 : CITRATE DE Fe(III)	41
FIGURE 10 : EXEMPLE DE FORMULATION UTILISANT L'ACIDE GLYCOLIQUE (ETATS-UNIS BREVET N° 3,131,048, 1964).....	41
FIGURE 11 : ACIDE GLYCOLIQUE.....	41
FIGURE 12 : ACIDE OXALIQUE.....	41
FIGURE 13 : MODELE DU MECANISME DE TOLERANCE AU ZINC CHEZ LES HERBACES (P = MEMBRANE PLASMIQUE, T = TONOPLASTE) (LANGE, NOBEL, OSMOND, & ZIEGLER, 1983).	42
FIGURE 14 : ACIDE MALIQUE	42
FIGURE 15 : INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DU CYCLE DE CALVIN-BENSON.....	44
FIGURE 16 : INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA GLYCOLYSE	44
FIGURE 17 : LES PRODUITS DE L'OXYDATION PAR VOIE CHIMIQUE DU GLYCEROL (CORMA, IBORRA, & VELTY, 2007)	45
FIGURE 18 : ACIDE GLYCERIQUE	45
FIGURE 19 : GLYCEROL	46
FIGURE 20 : CARBONATE DE GLYCEROL	46
FIGURE 21 : LES VOIES DE VALORISATION DU GLYCEROL. EN VERT LES VOIES A APPROFONDIR POUR LE PROJET 3BCARII (BEHR, EILTING, IRAWADI, LESCHINSKI, & LINDNER, 2008)	48
FIGURE 22 : LES PRODUITS DERIVES DU GLYCEROL ET LEURS UTILISATIONS DANS LA VIE COURANTE (CORMA, IBORRA, & VELTY, 2007)....	49
FIGURE 23 : NOMBRE DE PUBLICATIONS SUR L'OXYDATION DU GLYCEROL DE 1980 A 2016 (SOURCE ACS).....	50
FIGURE 24 : LES FONCTIONS ALCOOLS DU GLYCEROL	50
FIGURE 25 : LES PRODUITS ISSUS DE L'OXYDATION DU GLYCEROL	51
FIGURE 26 : PRESENTATION DES VOIES DE SYNTHSE LES PLUS IMPORTANTES DU CG A PARTIR DU GLYCEROL ET SES VOIES DE VALORISATION	53
FIGURE 27 : SYNTHSE DU CG A PARTIR DU GLYCEROL (BEHR, EILTING, IRAWADI, LESCHINSKI, & LINDNER, 2008).....	53
FIGURE 28 : NOMBRE DE PUBLICATIONS PARUES SUR LE CG PAR ANNEE DE 1990 A 2016 (SOURCE ACS)	54
FIGURE 29 : LES VOIES DE VALORISATION DU CG (NOHRA, ET AL., 2013, P. 3784).....	55
FIGURE 30 : STRUCTURE DE REFERENCE D'UN ISOCYANATE : ISOCYANATE DE METHYLE.....	56
FIGURE 31 : FABRICATION DU BUILDING BLOCK A PARTIR DE CARBONATE (VAN VELTHOVEN, GOOTJES, VAN ES, NOORDOVER, & MEULDIJK, 2015)	56
FIGURE 32 : UTILISATION DES CARBONATES POUR LA FORMATION DE POLYURETHANES (VAN VELTHOVEN, GOOTJES, VAN ES, NOORDOVER, & MEULDIJK, 2015).....	56
FIGURE 33 : SYNTHSE DU 2-OXO-1,3-DIOXOLANE-4-CARBOXAMIDE, BUILDING BLOCK D'INTERET (BREVET N° EP 2951166 A1, 2014) A L'AIDE DU ACIDE 2-OXO1,3 DIOXOLAN -4-CARBOXYLIQUE ISSU DU CG.....	57
FIGURE 34 : SYNTHSE PLUS COMPLEXE UTILISANT LE BUILDING BLOCK AVEC DU POLYPROPYLENE GLYCOL (BREVET N° EP 2951166 A1, 2014)	57
FIGURE 35 : SYNTHSE D'HYDROXYURETHANE PAR L'UTILISATION DIRECTE DE CG OXYDE (R = H) OU D'ESTER DE CG OXYDE (R = CHAINE ALKYLE) (BREVET N° WO2011157551 A1, 2011).....	58
FIGURE 36 : ESTER DE CG OXYDE AVEC UNE CHAINE GRASSE POSSEDANT ENTRE 2 ET 12 CARBONES	58

FIGURE 37 : ILLUSTRATION DE LA REPARTITION DES CHARGES PARTIELLES A LA SURFACE DU CG	59
FIGURE 38 : ACIDE GLYCERIQUE	60
FIGURE 39 : CG OXYDE (ACIDE 2-OXO1,3 DIOXOLAN -4-CARBOXYLIQUE).....	60
FIGURE 40 : VUE ENERGETIQUE DES DIFFERENTES ETAPES D'OXYDATION DES ALCOOLS EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE BASE, D'APRES (DAVIS, IDE, & DAVIS, 2013).....	63
FIGURE 41 : MECANISME D'OXYDATION GENERAL SUR CATALYSEUR METALLIQUE (FRASSOLDATI, 2011).....	65
FIGURE 42 : HYPOTHESE DU DEROULEMENT DE LA CATALYSE SUR L'ENSEMBLE DU HDL (RATIO DES METAUX MG/CU/AL 20/100/200) (ZHOU, ET AL., 2011).....	67
FIGURE 43 : COMPLEXE C1 CONTENANT DU CUIVRE (CU (II)) (VELUSAMY, SRINIVASAN, & PUNNIYAMURTHY, 2006).....	68
FIGURE 44 : TEMPO	68
FIGURE 45 : 1,10 PHENANTHROLINE	68
FIGURE 46 : 2,2-BIPYRIDINE.....	69
FIGURE 47 : SOLKETAL	69
FIGURE 48 : ENSEMBLE DES ALDEHYDES FORMES PAR L'OXYDATION DES ALCOOLS CORRESPONDANTS	69
FIGURE 49 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS SYSTEME D'OXYDATION DES ALCOOLS PAR LE CUIVRE EN PRESENCE D'OXYGENE (STAHL, HOOVER, & SHANNON, 2011). EN VERT : LES REACTIFS RETENUS POUR LE PROTOCOLE DE LA PUBLICATION	69
FIGURE 50 : MECANISME DE REACTION PROPOSE POUR L'OXYDATION DES ALCOOLS PRIMAIRES EN PRESENCE DE TEMPO (HOOVER, BRADFORD, & STAHL, 2013)	71
FIGURE 51 : MOLECULE (3) DEVELOPPEE AVEC LES AZOTES (N) APPARTENANT A LA BIPYRIDINE (BPY).....	71
FIGURE 52 : FORMATION DU LIGAND PEROXYDE A PARTIR DE LA MOLECULE (3) AU COURS DE L'ETAPE 3 ET DONNANT (4)	72
FIGURE 53 : OXYDATION DE L'ALCOOL PAR LA COOPERATION CU/TEMPO AU COURS DE L'ETAPE 7	72
FIGURE 54 : LES TROIS FORMES DU TEMPO	73
FIGURE 55 : OXYDATION DES ALCOOLS GRACE A LA COOPERATION TEMPO/ [Mn(NO ₃) ₂] ET [Co(NO ₃) ₂] (CECCHETTO, FONTANA, MINISCI, & RECUPERO, 2001). LE MECANISME EST LE MEME POUR [Mn(NO ₃) ₂] ET [Cu(NO ₃) ₂].....	74
FIGURE 56 : EXEMPLE DE L'HEME DE LA HORSERADISH PEROXYDASE (HRP) (VEITCH, 2004).....	75
FIGURE 57 : REPRESENTATION EN TROIS DIMENSIONS DE LA STRUCTURE DE LA HRP PAR DIFFRACTION DES RAYONS X (VEITCH, 2004)	76
FIGURE 58 : MODE DE FONCTIONNEMENT DES DESHYDROGENASES : ILLUSTRATION DE LA DEPENDANCE AU NADP (KROUTIL, MANG, EDEGGER, & FABER, 2004)	76
FIGURE 59 : NADP+ : NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE	77
FIGURE 60 : FORMATION DU DIOL GEMINAL PAR HYDRATATION DE L'ALDEHYDE AVEC OXYDATION SUCCESSIVE EN ACIDE.....	78
FIGURE 61 : FORMATION DE COPRODUITS AU COURS DE L'OXYDATION PAR CERTAINES OXYDASES (KROUTIL, MANG, EDEGGER, & FABER, 2004)	79
FIGURE 62 : ELIMINATION DU PEROXYDE D'HYDROGENE H ₂ O ₂ PAR UNE CATALASE (KROUTIL, MANG, EDEGGER, & FABER, 2004).....	79
FIGURE 63 : SYSTEME PROPOSE POUR LE TRIO BIOCATALYTIQUE ENZYMATIQUE : GLYOXAL OXYDASE (GLOX), HORSERADISH PEROXYDASE (HRP) ET CATALASE (RONCAL, MUÑOZ, LORENZO, MAESTRO, & DIAZ DE GUEREÑU, 2012)	80
FIGURE 64 : STRUCTURE D'UNE MOLECULE DE FERROCENE	80
FIGURE 65 : REOXYDATION DES MEDIATEURS REDOX GRACE A LA LACCASE (KROUTIL, MANG, EDEGGER, & FABER, 2004)	81
FIGURE 66 : TEMPO	81
FIGURE 67 : SEQUENCE POLYPEPTIDIQUE DE LA LACCASE DE <i>T. VERSICOLOR</i>	85
FIGURE 68 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DES RELATIONS ENTRE LES CUIVRES AU COURS DE L'ACTIVITE DE LA LACCASE LORS DE L'OXYDATION DE QUATRE MOLECULES DE SUBSTRAT (BALDRIAN, 2006)	86
FIGURE 69 : RESIDUS LIES AU CUIVRE CHEZ <i>T. VERSICOLOR</i> . LES CENTRES CUIVRE SONT EN ORANGE ET LES RESIDUS INTERAGISSANT AVEC LE CUIVRE SONT JAUNE, BLEU, VERT ET ROSE FONCE (SIRIM, WAGNER, WANG, SCHMID, & PLEISS, 2011).....	87
FIGURE 70 : SCHEMA DU SITE CATALYTIQUE CHEZ <i>T. VERSICOLOR</i> , AVEC REDUCTION DES 4 MOLECULES DE SUBSTRAT SUR T1 ET REDUCTION DU DIOXYGENE SUR T2/T3 (RIVA, 2006)	87
FIGURE 71 : OXYDATION ET REDUCTION REALISEES AU SEIN DE LA LACCASE (RIVA, 2006)	88
FIGURE 72 : MECANISME D'OXYDATION/REDUCTION DES SUBSTRATS AU SEIN DE LA LACCASE (SCHEMA INSPIRE DE LA REVUE DE JONES ET SOLOMON (2015) (JONES & SOLOMON, 2015))	89

FIGURE 73 : MECANISME D'OXYDATION/REDUCTION DES SUBSTRATS AU SEIN DE LA LACCASE.....	90
FIGURE 74 : ILLUSTRATION DES CANAUX A EAU (POINTS ROUGES) DANS L'ENZYME (POINTS BLEUS = CUIVRES) (PIONTEK, ANTORINI, & CHOINOWSKI, 2002).....	91
FIGURE 75 : LES DIFFERENTES POSSIBILITES D'INTERACTIONS ENTRE LA LACCASE ET SON SUBSTRAT (RIVA, 2006).....	92
FIGURE 76 : TEMPO SOUS FORME RADICAL N-OXYL PUIS ACTIVE EN ION OXOAMMONIUM (FABBRINI, GALLI, GENTILI, & MACCHITELLA, 2001).....	92
FIGURE 77 : SEQUENCE NECESSAIRE A L'OXYDATION PAR LA LACCASE (GALLI & GENTILI, 2004).....	93
FIGURE 78 : MECANISME DE SEMMELHACK POUR L'OXYDATION CATALYTIQUE PAR LE COUPLE CuCl/TEMPO DES ALCOOLS (SHELDON & ARENDS, 2006).....	93
FIGURE 79 : OXYDATION PAR VOIE IONIQUE AVEC UN SUBSTRAT PHENOLIQUE (WITAYAKRAN & RAGAUSKAS, 2009). « B » EST UNE BASE.....	94
FIGURE 80 : LES DIFFERENTS ETATS DE TEMPO DE SON ACTIVATION A L'OXYDATION (ARENDS, LI, AUSAN, & SHELDON, 2006).....	94
FIGURE 81 : TEMPS DE RETENTION POUR CHAQUE STANDARD DETECTEE DANS LES CONDITIONS D'ANALYSE CHOISIES.....	102
FIGURE 82 : QUANTITE DE CHAQUE PRODUIT FORME (MG) DANS LES MILIEUX REACTIONNELS PAR QUANTITE DE SUBSTRAT (MG) A L'ETAT INITIAL, QUANTIFIEES PAR HPLC.....	102
FIGURE 83 : CHROMATOGRAMME D'UN MELANGE DE STANDARDS ANALYSES A L'AIDE DE LA COLONNE AMINEX HPX 87 H A 25°C, ELUANT 0,012N H ₂ SO ₄ ET ACETONITRILE 10,8% (DEBIT A 0,5 ML/MIN) (GUERRANT, LAMBERT, & MOSS, 1982) EN DETECTION RI. DE GAUCHE A DROITE : 1 = ACIDE OXALIQUE, 2 = ACIDE TARTRONIQUE, 3 = ACIDE GLYOXYLIQUE, 4 = ACIDE GLYCERIQUE, 5 = GLYCERALDEHYDE, 6 = ACIDE GLYCOLIQUE, 7 = GLYCEROL ET DHA.....	104
FIGURE 84 : CHROMATOGRAMME REALISE SUR LE MILIEU REACTIONNEL ISSU DU PROTOCOLE CE6 AVEC GLYCEROL SOUS DIOXYGENE.....	106
FIGURE 85 : MASSE MOYENNE (MG) DE DIACIDE FORME, PAR QUANTITE DE DE SUBSTRAT (MG) INTRODUIT A L'ETAT INITIAL POUR CHAQUE REACTION EFFECTUEE.....	107
FIGURE 86 : CHROMATOGRAMME OBTENU PAR HPLC DE LA REACTION DE CE6 LACCASE/TEMPO SOUS AIR AMBIANT. PICS INCONNUS ENCADRES EN VERT.....	112
FIGURE 87 : FRACTIONS COLLECTEES (EN VERT) SUR L'ECHANTILLON DE LA REACTION DE LACCASE/TEMPO EFFECTUEE SUR GLYCEROL EN PRESENCE DE DIOXYGENE.....	114
FIGURE 88 : MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'ACIDE GLYOXYLIQUE AU TRAVERS DU SPECTRE (EN BAS) ET DU CHROMATOGRAMME (EN HAUT) ASSOCIEE AUX MILIEU ISSU DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE SUR GLYCEROL ¹³ C EN PRESENCE DE DIOXYGENE.....	119
FIGURE 89 : : SPECTRE DE MASSE ET CHROMATOGRAMME UV OBTENUS SUR LA FRACTION F6 AVEC UN DETECTEUR ORBITRAP.....	123
FIGURE 90 : MISE EN EVIDENCE DE L'ACIDE MESOXALIQUE SUR LE CHROMATOGRAMME UV DE LA FRACTION F4 ET LE SPECTRE DE MASSE ASSOCIE.....	123
FIGURE 91 : SPECTRE RMN ¹³ C{ ¹ H} DE LA FRACTION F4 DANS D ₂ O A 298 K.....	124
FIGURE 92 : ACIDE TARTRONIQUE MIS EN EVIDENCE PAR LE CHROMATOGRAMME UV (EN HAUT) ET LE SPECTRE DE MASSE DE LA FRACTION F5 (EN BAS).....	125
FIGURE 93 : SPECTRE DE MASSE (EN BAS) ET CHROMATOGRAMME UV (EN HAUT) DE LA FRACTION F5 OBTENUS EN ORBITRAP.....	125
FIGURE 94 : SPECTRE RMN ¹³ C{ ¹ H} DE LA FRACTION F7 DANS D ₂ O A 298K.....	126
FIGURE 95 : SPECTRE DE MASSE ET CHROMATOGRAMMES UV OBTENUS EN ORBITRAP.....	127
FIGURE 96 : SPECTRE RMN ¹³ C{ ¹ H} DES FRACTIONS F7 (AU-DESSUS) ET F8 (AU-DESSOUS) DANS D ₂ O A 298 K.....	128
FIGURE 97 : FORMULE SEMI-DEVELOPPEE DES PRODUITS ASSOCIES RESPECTIVEMENT A LEUR SIGNAL HPLC. LE TEMPS DE RETENTION EST INDIQUE APRES LE NUMERO DU PIC (ALLANT DE 1 A 9).....	129
FIGURE 98 : CHROMATOGRAMME (EN HAUT) ET DU SPECTRE DE MASSE (EN BAS) DU CG OXYDE.....	131
FIGURE 99 : SPECTRE RMN ¹³ C{ ¹ H} JMOD DE LA FRACTION F6 DANS D ₂ O A 298 K (500,11 MHz).....	132
FIGURE 100 : SPECTRE RMN ¹ H DE LA FRACTION F6 DANS D ₂ O A 298 K (500,11 MHz).....	133
FIGURE 101 : SPECTRE RMN 2D HMBC ¹³ C/ ¹ H SUR LA FRACTION F6 A 298K (500,11 MHz).....	134
FIGURE 102 : SPECTRE RMN 2D HSQC ¹³ C/ ¹ H SUR LA FRACTION F6 A 298K (500,11 MHz).....	134
FIGURE 103 : SPECTRE RMN ¹³ C{ ¹ H} JMOD DE LA FRACTION F8 DANS D ₂ O A 298 K. EN NOIR LES SIGNAUX DU CG HEMIACETAL, EN BLEU DU CG OXYDE ET EN ORANGE DE L'ACIDE GLYCERIQUE.....	135
FIGURE 104 : SPECTRE RMN ¹ H DE LA FRACTION F8 DANS D ₂ O A 298 K.....	136

FIGURE 105 : ZOOM EFFECTUE SUR LE SPECTRE ^1H DE LA FRACTION F8	137
FIGURE 106 : SPECTRE RMN 2D HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ SUR LA FRACTION F8 A 298K (500,11 MHz)	137
FIGURE 107 : SPECTRE RMN 2D HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ SUR LA FRACTION F8 A 298K (500,11 MHz)	138
FIGURE 108 : LOCALISATION DE LA MOLECULE EN FONCTION DU TEMPS DE RETENTION POUR LA REACTION DE CE6 SUR CG	139
FIGURE 109 : CHROMATOGRAMME EN DETECTION RI DE LA REACTION FAISANT APPEL AU PROTOCOLE CE6 SUR CG	141
FIGURE 110 : CRISTAUX EN AIGUILLES ISSUS DE F1	142
FIGURE 111 :SPECTRE INFRA-ROUGE DE LA FRACTION F1 (EN HAUT) ET DE LA FRACTION F2 (EN BAS) (EN HAUT) AVEC UN ATR 400.....	143
FIGURE 112 : CHROMATOGRAMME DE LA REACTION ISSUE DU PROTOCOLE CE6 SUR LE GLYCEROL MAIS SANS TEMPO ET SOUS AIR	144
FIGURE 113 : CHROMATOGRAMME DE LA REACTION ISSUE DU PROTOCOLE CE6 SUR LE GLYCEROL SOUS DIOXYGENE MAIS SANS TEMPO	144
FIGURE 114 : CHROMATOGRAMME DE LA REACTION ISSUE DU PROTOCOLE CE6 SUR CG MAIS SOUS AIR SANS TEMPO.....	145
FIGURE 115 : CHROMATOGRAMME DE LA REACTION ISSUE DU PROTOCOLE CE6 SUR CG SOUS DIOXYGENE SANS TEMPO	145
FIGURE 116 : ENZYME DANS LES CONDITIONS DE REACTION ISSUE DU PROTOCOLE CE6 MAIS SANS SUBSTRAT	145
FIGURE 117 : SUPERPOSITION DU CHROMATOGRAMME DE LA REACTION DE CE6 SUR CG ET DE L'ENZYME UNIQUEMENT SOUS DIOXYGENE, PENDANT 9 HEURES (PAS DE REACTIF AUTRE)	146
FIGURE 118 : SUPERPOSITION DU CHROMATOGRAMME DE CE6 SUR GLYCEROL ET DE L'ENZYME UNIQUEMENT SOUS DIOXYGENE PENDANT 9 HEURES (PAS DE REACTIF AUTRE)	147
FIGURE 119 : PLATEFORME DE CARACTERISATION DES HA STRUCTURELLEMENT PROCHES DU GLYCEROL	148
FIGURE 120 : DEMARCHE SUIVIE POUR LA MISE EN EVIDENCE DES RELATIONS ENTRE LES PARAMETRES D'ENTREE (CONDITIONS EXPERIMENTALES) ET CEUX DE SORTIE A L'AIDE DU LOGICIEL CORICO	150
FIGURE 121 : ILLUSTRATION DE LA DEPENDANCE ENZYME/TEMPO POUR LA CATALYSE.....	153
FIGURE 122: EVOLUTION DE LA QUANTITE D'ACIDE GLYCERIQUE FORMEE ET DE LA QUANTITE DE GLYCEROL CONSOMMEE AU COURS DU TEMPS.....	153
FIGURE 123 : VISUALISATION D'UN MODELE DE MAUVAISE QUALITE ETABLI SUR DES TENDANCES DIFFERENTES	154
FIGURE 124 : ILLUSTRATION DES TENDANCES 1 ET 2 POSSIBLES DANS LA REPONSE DE LA QUANTITE D'ACIDE GLYCERIQUE FORMEE (EN AIRE) PAR RAPPORT A LA QUANTITE DE TEMPO INTRODUIT	155
FIGURE 125 : ETUDE DE L'INFLUENCE DE K SUR LA CORRELATION ENTRE LE MODELE THEORIQUE ETABLI PAR CORICO ET LES VALEURS REELLES	156
FIGURE 126 : CONCLUSION SUR LA QUANTITE DE TEMPO MINIMALE A INTRODUIRE POUR QUE LA QUANTITE D'ACIDE GLYCERIQUE FORMEE (EN AIRE) DECRIVE UNE TENDANCE UNIQUE EN FONCTION DE LA QUANTITE DE TEMPO.....	158
FIGURE 127 : EVOLUTION DE LA VISCOSITE DU MILIEU EN FONCTION DE LA MASSE DE GLYCEROL INTRODUITE	159
FIGURE 128 : CHROMATOGRAMME DE L'EXPERIENCE N°9 DU PEX SUR GLYCEROL. LES NUMEROS DES PICS REPERTORIES SONT INDIQUES EN VIOLET.....	163
FIGURE 129 : VISUALISATION DES GRANDEURS STATISTIQUES (VACA-GARCIA, 2015)	167
FIGURE 130 : FORMULE DE CALCUL DE L'INCERTITUDE DES COEFFICIENTS « AI », NOTEE « Σ_{AI} ».....	168
FIGURE 131 : CHROMATOGRAMME DU MELANGE REACTIONNEL DE CE6 SUR CG EN REACTEUR OUVERT.....	170
FIGURE 132 CHROMATOGRAMME DU MELANGE REACTIONNEL DE CE6 SUR CG DANS UN REACTEUR AUTOCLAVE	171
FIGURE 133 : VISUALISATION DE L'IMPORTANCE DES VARIABLES X1 ET X2 EN FONCTION DE LEURS COEFFICIENTS.....	174
FIGURE 134 : POURCENTAGE D'AIRE RELATIVE DE CG OXYDE (« % AREA ») EN FONCTION DE LA QUANTITE (MG) DE TEMPO ET DE SUBSTRAT (« SUBSTRATE » EN MG) APRES MODELISATION.....	174
FIGURE 135 : FORMATION DE L'HEMIACETAL DU GLUCOSE A L'AIDE D'UNE OXYDASE (SCHOEVAART & KIEBOOM, 2002).....	176
FIGURE 136 : PROPOSITION DE TROIS VOIES POUR LA FABRICATION DU CG HEMIACETAL.....	176
FIGURE 137 : CHROMATOGRAMME DE LA REACTION TEMOIN 1 (SANS ENZYME) SUR LE DIGLYCEROL ET DU DIGLYCEROL DE DEPART DU FABRICANT	181
FIGURE 138 : CHROMATOGRAMME DE LA REACTION TEMOIN 2 SUR DIGLYCEROL (SANS TEMPO)	181
FIGURE 139 : CHROMATOGRAMME DES ESSAIS SUR DIGLYCEROL DANS LES CONDITIONS DU PROTOCOLE CE6 SOUS DIOXYGENE.....	182
FIGURE 140 : SILIACAT TEMPO [®] REFERENCE SIGMA 709859.....	187
FIGURE 141 : T1, TEMPO SUR METHACRYLATE SCHEMATISE (SIGMA ALDRICH)	187

FIGURE 142 : CHROMATOGRAMME DU MILIEU REACTIONNEL ISSU DE L' OXYDATION DU GLYCEROL PAR LE PROTOCOLE CE6 ET EFFECTUE AVEC T1 OU T2.....	188
FIGURE 143 : COMPARAISON ENTRE LES MILIEUX REACTIONNELS ISSUS DE CE6 SUR GLYCEROL AVEC LE TEMPO LIBRE (EN ROUGE) ET CELUI AVEC LE TEMPO FIXE SUR SUPPORT (EN NOIR)	188
FIGURE 144 : RESULTATS DE LA REACTION CE6 AVEC GLYCEROL ET TEMPO SUR T2 AVEC UNE POROSITE FORTE	189
FIGURE 145 : CHAINE DE POLYOSIDES CONSTITUANT L'ALGINATE.....	192
FIGURE 146 : GELIFICATION DE L'ALGINATE (EXEMPLE DU CALCIUM) (BERTHERAT-DENTONE & NOVA, S.D.)	192
FIGURE 147 : BILLES D'ALGINATE AVEC ENZYMES (A GAUCHE) ET BILLES D'ALGINATE VIDES (A DROITE).....	195
FIGURE 148 : BILLE NEUVE ENTIERE AVEC ENZYME X 38.....	196
FIGURE 149 : BILLE VIDE ET NEUVE X 46.....	196
FIGURE 150 : BILLE AVEC ENZYME USAGEE X 41.....	196
FIGURE 151 : BILLE VIDE USAGEE X 69	196
FIGURE 152 : BILLE D'ALGINATE DE MASSE MOLECULAIRE FAIBLE AVEC ENZYME ET NEUVE	197
FIGURE 153 : SURFACE D'UNE BILLE NEUVE ET VIDE (X 7865) A GAUCHE ET SURFACE D'UNE BILLE NEUVE AVEC ENZYMES (X6537) A DROITE	198
FIGURE 154 : SURFACE D'UNE BILLE D'ALGINATE DE MASSE MOLECULAIRE FAIBLE AVEC ENZYMES (X 5316)	198
FIGURE 155 : SURFACE D'UNE BILLE NEUVE AVEC ENZYME A GAUCHE (X 662) ET D'UNE BILLE USAGEE AVEC ENZYME A DROITE (X 648)	199
FIGURE 156 : A GAUCHE LA SURFACE D'UNE BILLE USAGEE AVEC ENZYME (X 17 000) ET A DROITE, LA SURFACE D'UNE BILLE VIDE USAGEE (X 12 000).....	199
FIGURE 157 : DEMI-BILLE NEUVE SANS ENZYME A GAUCHE (X 45) ET DEMI-BILLE NEUVE AVEC ENZYME A DROITE (X 38)	200
FIGURE 158 : DEMI-BILLE AVEC ENZYME ET ALGINATE DE TAILLE MOLECULAIRE PLUS FAIBLE.....	200
FIGURE 159 : BILLE USAGEE AVEC ENZYME EN COUPE A GAUCHE (X 52), ZOOM SUR LA PARTIE AVEC TROU A DROITE	201
FIGURE 160 : BILLE NEUVE AVEC ENZYMES A GAUCHE (X 662) ET BILLE VIDE NEUVE SANS ENZYME A DROITE (X 562)	202
FIGURE 161 : COUPE D'UNE BILLE NEUVE D'ALGINATE AVEC ENZYMES AU MICROSCOPE OPTIQUE (X 4)	203
FIGURE 162 : FORMATION DES CAPILLAIRES AU COURS DE LA GELIFICATION. CAS DE L'ALGINATE DE CUIVRE (ISAIAH, 2011)	203
FIGURE 163 : INTERIEUR DE BILLE VIDE NEUVE USAGEE A GAUCHE ET INTERIEUR DE BILLE AVEC ENZYME USAGEE A DROITE	204
FIGURE 164 : INTERIEUR DE BILLE VIDE USAGEE A GAUCHE ET INTERIEUR DE BILLE AVEC ENZYME USAGEE A DROITE	204
FIGURE 165 : COMPARAISON ENTRE BILLES SANS CATALYSEUR NEUVES OU USEEES	205
FIGURE 166 : BILLES USEEES (A GAUCHE) ET NEUVES (A DROITE) SUR PAPIER	205
FIGURE 167 : BILLE USAGEE AVEC ENZYME ET BILLE NEUVE AVEC ENZYME	205
FIGURE 168 : ELECTROPHORESE PRELIMINAIRE	206
FIGURE 169 : ELECTROPHORESE AVEC DES MILIEUX PLUS CONCENTRES	207
FIGURE 170 : EVOLUTION DES ABSORBANCES (AEN ABSCISSE), AU COURS DU TEMPS (EN SECONDES, EN ORDONNEE)	208
FIGURE 171 : BILLE DANS LA SOLUTION D'ABTS POUR LA MESURE DE L'ABSORBANCE.....	209
FIGURE 172 : CHROMATOGRAMME DES PRODUITS DE LA REACTION DE CE6, EN CATALYSE HETEROGENE (EN HAUT) ET EN CATALYSE HOMOGENE (EN BAS) SUR LE CG. VERT = PRODUITS DE DEGRADATION DE L' ENZYME	213
FIGURE 173 : CHROMATOGRAMMES DE LA REACTION DU PROTOCOLE CE6 EN CATALYSE HETEROGENE SUR GLYCEROL SOUS AIR (EN NOIR) OU SOUS DIOXYGENE (EN BLEU).....	215
FIGURE 174 : CHROMATOGRAMME DE LA REACTION DU PROTOCOLE CE6 SUR GLYCEROL EN CATALYSE HOMOGENE EN REACTEUR OUVERT ET SOUS DIOXYGENE.....	215
FIGURE 175 : COMPARAISON DES RESULTATS DE CHROMATOGRAPHIE ISSUS DE L' OXYDATION DU DIGLYCEROL PAR VOIE ENZYMATIQUE EN CATALYSE HETEROGENE (EN VERT) OU HOMOGENE (EN NOIR).....	219
FIGURE 176 : CHROMATOGRAMME DE L' OXYDATION DU TRIGLYCEROL EN CATALYSE HETEROGENE APPLIQUE AU PROTOCOLE CE6	219
FIGURE 177 : HYDROGEL D'ALGINATE MINERALISE (A DROITE) AU COURS DE LA GELIFICATION A GAUCHE ET AEROGEL FORME PAR LA SUITE A PARTIR DU PRECEDENT A DROITE (DI RENZO, ET AL., 2005)	224
FIGURE 178 : PROPOSITION D'UN REACTEUR AUTOCLAVE AVEC LIT D'ALGINATE ET UNE MEMBRANE DE FILTRATION UTILISABLE POUR CE6 SUR CG OU SUR GLYCEROL	225
FIGURE 179 : REPRESENTATION DE L'HYPOTHESE DE TRAVAIL EN EMULSION	227

FIGURE 180 : A GAUCHE LES MICELLES FLUORESCENTES TRADUISANT LA PRESENCE DES ENZYMES DANS LES STRUCTURES DE DROITE VUES EN FE-SEM (ZHANG, ET AL., 2013)	228
FIGURE 181 : ACTIVATION DU POM PAR LES PHOTONS ET OXYDATION DES ALCOOLS VIA LE PEROXYDE D'HYDROGENE (H ₂ O ₂) (MOLINARI, MALDOTTI, BRATOVVIC, & MAGNACCA, 2013)	231
FIGURE 182 : LIAISON DE POM AVEC DES MOLECULES ORGANIQUES HYDROPHOBES PAR LIAISON COVALENTE (ZHANG, YIN, HASO, HU, & LIU, 2013)	232
FIGURE 183 : ESTER DE CG ELABORE A PARTIR D'UN ALCOOL GRAS ET DU CG OXYDE (A GAUCHE) OU DU CG HEMIACETAL (A DROITE) ...	234
FIGURE 184 : ACIDES POLYCARBOXYLIQUES HYPOTHETIQUES, ISSUS DE L'OXYDATION DES OLIGOCARBONATES FABRIQUES DANS LE CADRE DU PROJET 3BCAR	235
FIGURE 185 : ACIDE GLYCERIQUE A GAUCHE, PHOSPHOGLYCERATE A DROITE	235
FIGURE 186 : MONTAGE POUR LE SYSTEME LACCASE/TEMPO (CE6) AVEC LE REACTEUR EN VERRE, OUVERT	239
FIGURE 187 : MONTAGE POUR LE PROTOCOLE CC33	240
FIGURE 188 : PREPARATION AU COURS DE L'ETAPE 6	243
FIGURE 189 : PRODUIT OBTENU APRES CENTRIFUGATION ET RETRAIT DU SURNAGEANT	244
FIGURE 190 : CATALYSEUR A LA SORTIE DE L'ETUVE	244
FIGURE 191 : CATALYSEUR UNE FOIS CALCINE 6 HEURES, 650°C	245
FIGURE 192 : MONTAGE POUR PROTOCOLE CC21	246
FIGURE 193 : MONTAGE POUR LE PROTOCOLE CC29	249
FIGURE 194 : MECANISME DE SEPARATION DES ESPECES PAR EXCLUSION IONIQUE (BHATTACHARYYA & ROHRER, 2012)	255
FIGURE 195 : CHROMATOGRAMME DE L'ECHANTILLON DE LA REACTION D'OXYDATION DU GLYCEROL AVEC LE PROTOCOLE CE6 SOUS DIOXYGENE ET 10.10 ⁻³ MOL.L ⁻¹ D'ACIDE SULFURIQUE, 60°C	256
FIGURE 196 : CHROMATOGRAMME DE L'ECHANTILLON DE LA REACTION D'OXYDATION GLYCEROL AVEC LE PROTOCOLE CE6 SOUS DIOXYGENE ET 5.10 ⁻³ MOL.L ⁻¹ D'ACIDE SULFURIQUE, 60°C	256
FIGURE 197 : CHROMATOGRAMME DE L'ECHANTILLON DE LA REACTION D'OXYDATION GLYCEROL AVEC LE PROTOCOLE CE6 SOUS DIOXYGENE ET 3.10 ⁻³ MOL.L ⁻¹ D'ACIDE SULFURIQUE, 60°C	257
FIGURE 198 : CHROMATOGRAMME ISSU DE L'OXYDATION DU CG AVEC LE PROTOCOLE ENZYMATIQUE CE6 EN PRESENCE DE DIOXYGENE, 10.10 ⁻³ MOL.L ⁻¹ D'ACIDE SULFURIQUE , 60°C	257
FIGURE 199 : CHROMATOGRAMME ISSU DE L'OXYDATION DU CG AVEC LE PROTOCOLE ENZYMATIQUE CE6 EN PRESENCE DE DIOXYGENE, 5.10 ⁻³ MOL.L ⁻¹ D'ACIDE SULFURIQUE , 60°C	258
FIGURE 200 : CHROMATOGRAMME ISSU DE L'OXYDATION DU CG AVEC LE PROTOCOLE ENZYMATIQUE CE6 EN PRESENCE DE DIOXYGENE, 3.10 ⁻³ MOL.L ⁻¹ D'ACIDE SULFURIQUE , 60°C	258
FIGURE 201 : DISTANCE PARCOURUE PAR LA SOLUTION ASSOCIEE AU TEMPS 1 ET 2	264
FIGURE 202 : MONTAGE DU PEX AVEC 4 MONTAGES EN SERIE POUR 4 REACTIONS REALISEES SIMULTANEMENT	268
FIGURE 203 : STRUCTURE DE L'AUTOCLAVE UTILISE POUR DES ESSAIS EN CONDITIONS ETANCHES	272
FIGURE 204 : AUTOCLAVE EN COURS DE REACTION	273
FIGURE 205: ABTS	278
FIGURE 206 : MANIPULATION AU COURS DE LA MESURE AU SPECTROPHOTOMETRE	279
FIGURE 207 : A = F(TEMPS) C _{M4} = S 0.4, C _{M3} = S 3.6 ET C _{M2} = S 1.2	279
FIGURE 208 : SILIACAT TEMPO [®] REFERENCE SIGMA 709859	282
FIGURE 209 : T1, TEMPO SUR METHACRYLATE SCHEMATISE (SIGMA ALDRICH)	282
FIGURE 210 : POUSSOIR AUTOMATIQUE AVEC LA SERINGUE CONTENANT LA SOLUTION D'ALGINATE DONT LA SORTIE EST SITUEE AU-DESSUS DE LA SOLUTION DE COAGULATION DU GEL	283
FIGURE 211 : DIFFERENCE D'ETAT ENTRE LE LIQUIDE SORTANT DE L'AIGUILLE, ET CELUI PLONGE DANS LA SOLUTION DE PRECIPITATION EN COURS DE GELIFICATION	284
FIGURE 212 : BILLES D'ALGINATE AVEC ENZYMES (A GAUCHE) ET BILLE D'ALGINATE VIDES (A DROITE)	284
FIGURE 213 : SPECTRE RMN 2D HMBC ¹³ C/ ¹ H DE LA FRACTION F6 DANS D ₂ O A 298 K (125,77 MHz)	315
FIGURE 214 : SPECTRE RMN ¹³ C{ ¹ H} DE LA FRACTION F7 DANS D ₂ O A 298 K (125,77 MHz)	315
FIGURE 215 : SPECTRE RMN ¹ H DE LA FRACTION F7 DANS D ₂ O A 298 K (500,11 MHz)	316

FIGURE 216 : SPECTRE RMN 2D HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DE LA FRACTION F7.....	316
FIGURE 217 : SPECTRE RMN 2D HMBC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DE LA FRACTION F7.....	317
FIGURE 218 : SPECTRE RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ DE LA FRACTION F7 DANS D_2O , 298K	317
FIGURE 219 : SPECTRE RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ DE LA FRACTION F8 DANS D_2O , 298K	318
FIGURE 220 : SPECTRE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE LA FRACTION F9 DANS D_2O A 298 K (125,77 MHz)	318
FIGURE 221 : SPECTRE RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ DE LA FRACTION F9 DANS D_2O , 298K	319
FIGURE 222 : SPECTRE RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ DE LA FRACTION F9 DANS D_2O , 298K	319
FIGURE 223 : SPECTRE RMN 2D HMBC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DE LA FRACTION F9 DANS D_2O	320
FIGURE 224 : SUPERPOSITION DES EXPERIENCES HSQC PRATIQUEES SUR LA FRACTION F8 (EN BLEU) ENRICHI EN ^{13}C , DU STANDARD DE L'ACIDE GLYCERIQUE (EN ROUGE), DU GLYCERALDEHYDE (EN VERT) ET DU GLYCEROL (EN ROSE)	321
FIGURE 225 : SUPERPOSITION DES EXPERIENCES HSQC PRATIQUEES SUR LA FRACTION F7 (EN BLEU) ENRICHI EN ^{13}C , DU STANDARD DE L'ACIDE GLYCERIQUE (EN ROUGE) ET DU GLYCERALDEHYDE (EN VERT).....	321

IV. Table des tableaux

TABLEAU 1 : ELEMENTS ESSENTIELS DES PLANTES SUPERIEURES : ESTIMATION DES CONCENTRATIONS OPTIMALES PERMETTANT UNE CROISSANCE NORMALE (HOPKINS & ÉVRARD, 2003, P. 65)	28
TABLEAU 2 : CONSTANCE DE STABILITE (LOG K1) METAL-ACIDES CARBOXYLIQUES NATURELS (SMITH & A.MARTELL, 1998) (FURIA, 1990)	43
TABLEAU 3 : PROPRIETES DU CG (MATEO, 2001)	59
TABLEAU 4 : PARAMETRES DE HANSEN : COMPARAISON ENTRE LE CG ET UN AUTRE SOLVANT, L'EAU (MATEO, 2001).....	59
TABLEAU 5 : TABLEAU COMPARATIF DES CONDITIONS EXPERIMENTALES DES DIFFERENTS PROTOCOLES RETENUS POUR LA FABRICATION D'HA A PARTIR DU GLYCEROL ET DU CG	96
TABLEAU 6 : MASSES DES STANDARDS DETECTEES EN ELECTROSPRAY NEGATIF (ES)	108
TABLEAU 7 : MASSES DETECTEES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (ES ⁻) DANS LES ECHANTILLONS DE MILIEUX REACTIONNELS	110
TABLEAU 8 : RECAPITULATIF DES MASSES DES PRODUITS D'INTERET IDENTIFIES DANS LES MILIEUX REACTIONNELS ISSUS DE L'OXYDATION DU GLYCEROL (BLEU = MASSE DETECTEE, ROUGE = MASSE NON DETECTEE)	111
TABLEAU 9 : RECAPITULATIF DES MASSES DES PRODUITS D'INTERETS IDENTIFIEES DANS LES MILIEUX REACTIONNELS ISSUS DU CG (BLEU = MASSE DETECTEE, ROUGE = MASSE NON DETECTEE).....	111
TABLEAU 10 : TEMPS DE RETENTION DES FRACTIONS ISSUES DE L'OXYDATION DU GLYCEROL SOUS DIOXYGENE AVEC LE DUO LACCASE/TEMPO	115
TABLEAU 11 : TEMPS DE RETENTION DES FRACTIONS ISSUES DE L'OXYDATION DU CG AVEC LE DUO LACCASE/TEMPO	115
TABLEAU 12 : MASSES DES STANDARDS DETECTEES EN ELECTROSPRAY NEGATIF (N.D = NON DETECTE) AVEC UN ORBITRAP	117
TABLEAU 13 : MASSES DES STANDARDS DETECTEES EN ELECTROSPRAY POSITIF (SIGNAL > 10 ⁶) AVEC UN ORBITRAP	118
TABLEAU 14 : MASSES REPERTORIEES DANS LES MILIEUX REACTIONNELS TEMOINS EFFECTUEES DANS LE CAS DU GLYCEROL ET DU CG	118
TABLEAU 15 : MASSES RECHERCHEES DE FAÇON SYSTEMATIQUE (VIA LE LOGICIEL DE TRAITEMENT) EN SPECTROMETRIE DE MASSE DANS LES ECHANTILLONS POUR LE GLYCEROL ¹³ C.....	121
TABLEAU 16 : MASSES DETECTEES DANS LES FRACTIONS. EN GRAS LE PRODUIT MAJORITAIRE (SIGNAL FORT DETECTE EN MASSE ET EN LC)	122
TABLEAU 17 : CONTENU DE CHAQUE FRACTION, ISSU DE LA REACTION D'OXYDATION DU GLYCEROL PAR LA VOIE CATALYTIQUE (CE6) LACCASE/TEMPO SOUS OXYGENE (+ = PRESENCE, +++= MAJORITAIRE DANS LA FRACTION)	128
TABLEAU 18 : TEMPS DE COLLECTE DES FRACTIONS ISSUES DE LA REACTION D'OXYDATION DU CG PAR LE DUO LACCASE / TEMPO SOUS AIR	130
TABLEAU 19 : MASSES RECHERCHEES DE FAÇON AUTOMATIQUE ET SYSTEMATIQUE EN SPECTROMETRIE DE MASSE DANS LES ECHANTILLONS POUR DE L'OXYDATION DU CG PAR VOIE ENZYMATIQUE.	130
TABLEAU 20 : MASSES DETECTEES DANS CHAQUE FRACTION ISSUE DE L'OXYDATION DU CG. LE PRODUIT MAJORITAIRE EST INDIQUE EN GRAS	131
TABLEAU 21 : CONTENU DE CHAQUE FRACTION ISSUE DE L'OXYDATION DU CG PAR VOIE ENZYMATIQUE (+ = PRESENCE, +++= MAJORITAIRE)	139
TABLEAU 22 : TABLEAU DES CORRELATIONS ETABLIES PAR CORICO ENTRE LES PARAMETRES DES REACTIONS ET LES VARIABLES DE SORTIE	151
TABLEAU 23 : A GAUCHE, LE TABLEAU RECAPITULATIF DES R ² OBTENUS EN FONCTION DE K ET A DROITE R ² = F(K)	157
TABLEAU 24 : A GAUCHE : TABLEAU RECAPITULATIF DES R ² OBTENUS EN FONCTION DE K ET A DROITE R ² = F(K).....	157
TABLEAU 25 : DOMAINES EXPERIMENTAUX POUR LES EXPERIENCES DU PEX	160
TABLEAU 26 : RESULTAT DU PEX REALISE AVEC LE GLYCEROL. LES RESULTATS SONT DONNES EN POURCENTAGE D'AIRE RELATIF. EN GRAS LES AIRES LES PLUS ELEVEES OBTENUES POUR L'ACIDE GLYCERIQUE ET LE GLYCERALDEHYDE.	162
TABLEAU 27 : VALEURS OBTENUES POUR LES COEFFICIENTS DU POLYNOME (MATRICE A).....	165
TABLEAU 28 : CALCUL DES VALEURS DE «Y MOYEN» ET DE LA DIFFERENCE ENTRE LES VALEURS DE Y CALCULEES PAR LE MODELE «Y PREDIT», ET LES VALEURS REELLES «Y REEL»	166
TABLEAU 29 : TERMES STATISTIQUES	167

TABLEAU 30 : MATRICE DES INCERTITUDES Σ AI SUR LES COEFFICIENTS DU POLYNOME	168
TABLEAU 31 : INCERTITUDES LIEES AUX COEFFICIENTS ET SIGNIFICATIVITE DES COEFFICIENTS	169
TABLEAU 32 : TRIPLET OPTIMAL POUR LA MAXIMISATION DU RENDEMENT EN ACIDE GLYCERIQUE	169
TABLEAU 33 : POURCENTAGES D'AIRES RELATIVES OBTENUS POUR DES MOLECULES PRESENTES DANS LES MILIEUX ISSUS DU PEX	172
TABLEAU 34 : VALEURS OBTENUES DES COEFFICIENTS DU POLYNOME	173
TABLEAU 35 : RESOLUTION SOUS SOLVEUR POUR OBTENIR UN RENDEMENT MAXIMUM EN CG OXYDE EN AIRE RELATIVE.....	175
TABLEAU 36 : MATRICE A, DES COEFFICIENTS DE L'EQUATION $Y(F(X_1, X_2))$	175
TABLEAU 37 : TABLEAU COMPARATIF DES SELECTIVITES ENTRE LE PROTOCOLE DE DEPART NOMME CE6 ET LES QUANTITES DE PRODUITS FORMES A L'AIDE DU PEX	177
TABLEAU 38 : COMPARAISON DES VOIES DE SYNTHESE DU CG OXYDE.....	178
TABLEAU 39 : EVOLUTION DU PH AU COURS DES REACTIONS (ESSAI 1) ET DE LEURS REPETITIONS (ESSAI 2)	180
TABLEAU 40 : QUANTIFICATION ET ANALYSES DES PRODUITS DE DE L'OXYDATION DU DI ET TRIGLYCEROL PAR HPIC	182
TABLEAU 41 : CALCUL DE L'ACTIVITE DES BILLES D'ALGINATE AVANT ET APRES REACTION	208
TABLEAU 42 : CONDITIONS TESTEES AU COURS DES ESSAIS	211
TABLEAU 43 : CONDITIONS EXPERIMENTALES ET EVOLUTION DU PH (Ei = ETAT INITIAL, Ef = ETAT FINAL)	212
TABLEAU 44 : COMPARAISON DES RENDEMENTS EN CHAQUE MOLECULE FORMEE EN FONCTION DU TYPE DE CATALYSE , DES CONDITIONS ET DU REACTEUR CHOISI. EN GRAS LES VALEURS LES PLUS INTERESSANTES.	214
TABLEAU 45 : COMPARAISON DU POURCENTAGE DE CHAQUE PRODUIT DES MILIEUX REACTIONNELS OBTENUS EN CATALYSE HOMOGENE OU HETEROGENE AU COURS DE LA CATALYSE DU PROTOCOLE CE6, SUR GLYCEROL	216
TABLEAU 46 : COMPARAISON DES CONDITIONS EXPERIMENTALES ENTRE LE PROTOCOLE CE6 EN PRESENCE DE BILLES D'ALGINATE AVEC ENZYMES ET UN PROTOCOLE SIMILAIRE DE L'ETAT DE L'ART.....	217
TABLEAU 47 : ILLUSTRATION DES EFFETS DE LA CATALYSE HETEROGENE PAR RAPPORT A LA CATALYSE HOMOGENE SUR LES RENDEMENTS EN PRODUITS FORMES ET LA CONVERSION DES SUBSTRATS.....	217
TABLEAU 48 : CONDITIONS TESTEES POUR LA CATALYSE HETEROGENE.....	218
TABLEAU 49 : COMPARAISON DES QUANTITES D'OXALATE ET DE TARTRONATE PAR HPIC ENTRE LES DIFFERENTS MODES DE CATALYSE....	220
TABLEAU 50 : QUANTITES DE REACTIFS DEMANDEES POUR LA REALISATION DU PROTOCOLE CE6	238
TABLEAU 51 : QUANTITES DE REACTIFS NECESSAIRES POUR LE SYSTEME CATALYTIQUE DE CC 33.....	240
TABLEAU 52 : QUANTITES DE METAUX UTILISEES POUR FORMER LE HDL.....	242
TABLEAU 53 : TABLEAU COMPARATIF D'UN ENSEMBLE D'ARTICLES TRAITANT DE L'ANALYSES DES PRODUITS D'OXYDATION DU GLYCEROL PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	254
TABLEAU 54 : PROGRAMME ANION ORG AC	259
TABLEAU 55 : GRADIENT POUR L'ANALYSE AVEC LA TRINITY P2.....	262
TABLEAU 56 : GRADIENT POUR L'ANALYSE AVEC LA PFP	263
TABLEAU 57 : QUANTITE DE GLYCEROL DANS LES SOLUTIONS DE 20 ML TESTEES	264
TABLEAU 58 : TEMPS 1 ET 2 EN MINUTES POUR LES SOLUTIONS TESTEES.....	265
TABLEAU 59 : VISCOSITES CALCULEES POUR LES SOLUTIONS TESTEES	265
TABLEAU 60 : DOMAINES EXPERIMENTAUX POUR LES EXPERIENCES DU PEX	266
TABLEAU 61 : CONDITIONS EXPERIMENTALES TESTEES AU COURS DU PEX SUR GLYCEROL EN VALEURS REELLES	266
TABLEAU 62 : DONNEES D'ENTREE EN VALEURS REELLES A GAUCHE ET EN VALEURS CODEES A DROITE (EN ROUGE)	267
TABLEAU 63 : MATRICE ASSOCIANT LES VALEURS DES VARIABLES CODEES A CELLES DE LA VARIABLE DE SORTIE (LES AIRES DES PICS DE L'ACIDE GLYCERIQUE FORME)	269
TABLEAU 64 : MATRICE X DES COEFFICIENTS DU POLYNOME.....	270
TABLEAU 65 : VALEURS OBTENUES POUR LES COEFFICIENTS DU POLYNOME (MATRICE A).....	270
TABLEAU 66 : DOMAINES EXPERIMENTAUX, CENTRE ET PAS.....	271
TABLEAU 67 : CONDITIONS DES ESSAIS DU PEX SUR CG	271
TABLEAU 68 : CONVERSION DES VALEURS REELLES (DEUX COLONNES DE GAUCHE), EN VALEURS CODEES (DEUX COLONNES DE DROITE)...	272
TABLEAU 69 : MATRICE ASSOCIANT LES VALEURS DES VARIABLES CODEES A CELLES DE LA VARIABLE DE SORTIE, ICI LES AIRES DE CG OXYDEE OBTENUE	273

TABLEAU 70 : MATRICE X.....	274
TABLEAU 71 : VALEURS DES COEFFICIENTS DU POLYNOME OBTENUES	274
TABLEAU 72 : CALCUL DE Y MOYEN ET DE LA DIFFERENCE ENTRE Y PREDIT PAR LE MODELE ET Y REEL	275
TABLEAU 73 : MATRICE DES INCERTITUDES SUR LES COEFFICIENTS DU POLYNOME	276
TABLEAU 74 : VALIDATION DES COEFFICIENTS A _i , DE LA MATRICE A, PAR UN TEST DE STUDENT	276
TABLEAU 75 : CALCUL DE LA DIFFERENCE ENTRE Y REEL ET Y CALCULE A PARTIR DU MODELE ETABLI. EN ROSE, LES VALEURS SORTANT DE LA ZONE DE TOLERANCE.	277
TABLEAU 76 : CALCULS DES GRANDEURS NECESSAIRES A LA VALIDATION DU MODELE.....	277
TABLEAU 77 : CONCENTRATION REELLE DES SOLUTIONS PERMETTANT LE CALCUL DE L'ABSORBANCE	280
TABLEAU 78 : CALCUL DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	281
TABLEAU 79 : PROTOCOLE TRAVAILLANT A PARTIR DE L'ACRYLATE ET DU CO ₂ COMME SUBSTRATS.....	323
TABLEAU 80 : PROTOCOLES TRAVAILLANT A PARTIR DU CG COMME SUBSTRAT ET A L'AIDE DU TEMPO	323

V. Glossaire et définitions

Aérogel : gel qui a été déshydraté en conservant cependant l'organisation que celui-ci possédait en étant humide. Il diffère donc du **xérogel** qui est un hydrogel qui a rétréci et qui est devenu quasiment non poreux à la suite de ce séchage. Le liquide de l'hydrogel est remplacé par du gaz pour donner un aérogel.

Agent de vectorisation : substance capable de transporter en son sein un élément (tout en conservant les propriétés chimiques et physiques) afin de lui faire traverser une barrière ou un milieu (exemple : cuticule, membrane, etc.) et ainsi de permettre son transport dans des espaces auxquels seule, elle n'aurait pas accès. L'agent de vectorisation est donc compatible avec la molécule à transporter comme avec les barrières à franchir. Les agents de vectorisation assurant une translocation/absorption plus rapide des minéraux dont la plante a besoin.

Biostimulant : matériel, substance(s) et/ou microorganisme(s) dont la fonction, après application aux plantes ou à la rhizosphère, est de stimuler les processus naturels afin de favoriser les prélèvements des nutriments, l'efficacité de leur utilisation, la tolérance aux stress abiotiques et/ou la qualité de la culture **indépendamment du contenu nutritif** (Bio by Deloitte- RITMO, 2014).

Chaîne grasse, lipidique : molécules hydrophobes ou constituées de parties hydrophiles restreintes, très riches en carbone (au moins 4). Exemple : graisse animale, cire, huile végétale.

Chitosane : polyoside dérivé de la chitine, composant de l'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamars par exemple) ou encore de la paroi des champignons.

Cuticule : la cuticule est la couche externe qui recouvre et protège les organes aériens des végétaux

Cytoplasme : milieu intracellulaire délimité par une bicouche de lipides et qui contient toute la machinerie cellulaire (chromosomes, réticulum...).

EBIC : « The European Biostimulant Industry Council » est une organisation dédiée aux biostimulants. Elle favorise la contribution des biostimulants des plantes pour rendre l'agriculture plus durable et plus résistante et favorise ainsi la croissance et le développement de l'industrie européenne des biostimulants. Elle a été fondée en juin 2011 sous le nom de European Biostimulant Industry Consortium et a changé de nom lorsqu'elle a acquis son identité légale en 2013. (EBIC Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable, s.d.).

Isocyanate : produit de formule $R-N=C=O$.

Membrane plasmique : bicouche constituée de lipides (phospholipides, acides gras) et de protéines permettant de séparer le milieu extracellulaire du milieu intracellulaire (cytoplasme).

MilliQ : L'eau appelée milli-Q (marque déposée de la société Millipore Corporation) est une eau purifiée par un système de filtres/résines/membranes dont la résistivité est de 18,2 M Ω ·cm. C'est une eau sans ions.

Oligomère : molécule constituée d'un ou de plusieurs motifs répétitifs reliés par liaison covalente et dont la masse est inférieure à 2000 g/mol.

Paroi pectocellulosique : structure rigide constituée de cellulose (polymère de glucose) entourant la membrane de chaque cellule végétale

Polymère : molécule d'au moins 2000 g/mol (en moyenne 10 000 g/mol) constituée d'un ou plusieurs motifs de répétition reliés les uns aux autres par liaison covalente.

Polysaccharide : polymère de plusieurs sucres simples appelés « ose » (glucose, mannose, etc.) reliés entre eux par des liaisons dites osidiques (covalentes). Exemple : amidon, cellulose, pectine etc.

Polyuréthane : polymère d'uréthane. La partie uréthane est également nommée « carbamate » et correspond au produit de la réaction d'un isocyanate et d'un alcool.

Synérèse : action d'expulser son solvant.

Tonoplaste : membrane qui sépare la vacuole du cytoplasme.

Vacuole : compartiment contenant de l'eau et diverses molécules, dont la forme et le volume peuvent évoluer.

Xénobiotique : substance possédant des propriétés toxiques, même à très faible concentration (exemple des pesticides) ; produit chimique ou matériau qui ne se trouve pas dans la nature et qui n'est normalement pas considéré comme un élément constitutif d'un système biologique particulier.

VI. Introduction

De nos jours, avec une demande mondiale et nationale toujours plus forte, la fertilisation pour l'augmentation ou le maintien des rendements agricoles est devenue une priorité. Cependant, la production agricole doit de plus en plus composer avec le respect de l'environnement, des sols, ainsi que la préservation des ressources naturelles qu'elle exploite. C'est ainsi qu'en 2007 a été proposé le plan Ecophyto au Grenelle de l'environnement. Celui-ci, repris par le Plan National Santé Environnement, prévoit de diminuer, si possible, de 50 % l'utilisation des produits phytosanitaires d'ici 2018 (Collet, 2017).

Par ailleurs, les métaux (cuivre, manganèse...) et autres éléments nutritifs pour les cultures deviennent de plus en plus rares et chers mais demeurent indispensables (Tableau 1). Ainsi, 40% de la production de protéines végétales dépend de l'apport en engrais azotés de synthèse tandis que les stocks de phosphate, qui seront épuisés d'ici 100 à 300 ans, menacent la sécurité alimentaire mondiale. D'autre part, la fertilisation utilisant ces produits n'est pas toujours efficace puisqu'il est à noter que 52% du phosphore apporté par les engrais phosphatés de synthèse est perdu chaque année (ruissellement) (Ringeval, Hinsinger, & Pellerin, 2015).

Élément	Symbole chimique	Forme disponible	Concentration dans la MS (mmol/kg)
<i>Macroéléments</i>			
Hydrogène	H	H ₂ O	60 000
Carbone	C	CO ₂	40 000
Oxygène	O	O ₂ , CO ₂	30 000
Azote	N	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	1 000
Potassium	K	K ⁺	250
Calcium	Ca	Ca ²⁺	125
Magnésium	Mg	Mg ²⁺	80
Phosphore	P	HPO ₄ ⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻	60
Soufre	S	SO ₄ ²⁻	30
<i>Microéléments</i>			
Chlore	Cl	Cl ⁻	3,0
Bore	B	BO ₃ ³⁻	2,0
Fer	Fe	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	2,0
Manganèse	Mn	Mn ²⁺	1,0
Zinc	Zn	Zn ²⁺	0,3
Cuivre	Cu	Cu ²⁺	0,1
Nickel	Ni	Ni ²⁺	0,05
Molybdène	Mo	Mo ₄ ⁻	0,001

Tableau 1 : Éléments essentiels des plantes supérieures : estimation des concentrations optimales permettant une croissance normale (Hopkins & Évrard, 2003, p. 65)

Il est donc nécessaire de mettre au point des méthodes de nutrition végétale plus durables et plus économiques, tant au niveau de la production, de leur utilisation mais aussi de leur dégradation. Des démarches ont donc été effectuées dans le but de créer et de fabriquer des produits en accord avec une approche plus respectueuse de l'environnement. Ainsi, le marché des produits phytosanitaires propose aujourd'hui des biostimulants dont il existe, par exemple, 300 formes différentes disponibles sur le marché Français (Bio by Deloitte- RITMO, 2014).

Etant composés de substances d'origine vivantes (bactéries, spores, mycorhizes, extraits d'algues et de plantes), de protéines, de peptides ou de lipides mais aussi d'extraits minéraux ou d'origine xénobiotiques, ces compléments proposent une alternative tant au niveau de leur origine que de leur application pour le traitement des cultures en comparaison des phytosanitaires actuels. En effet, ils sont utilisables tout au long de l'itinéraire agricole comme traitement préventif aussi bien que curatif.

C'est en fait leur action, plus que leur composition, qui est importante car il s'agit ici de stimuler les fonctions biologiques des cultures plutôt que de les compléter. Cette nouvelle façon de traiter les surfaces est en plein essor et pèse 500 millions d'euros en Europe (estimation de l'EBIC) avec 3 millions d'hectares traités soit une part de 0,6% du marché mondial des intrants pour la production végétale en 2013 (Bio by Deloitte- RITTMO, 2014).

Dans le même cadre que les biostimulants, des additifs agronomiques sont également disponibles (The European commission, 2014) (Bio by Deloitte- RITTMO, 2014). Il s'agit de : « substances ou micro-organismes, dans la forme commercialisée à l'utilisateur, ajoutée à un engrais, ou un support de culture dans l'intention d'augmenter l'efficacité agronomique du produit final et/ou de modifier le devenir des éléments nutritifs provenant du fertilisant, de l'amendement ou du support de culture ». Ces produits visent donc à faciliter l'absorption des nutriments ainsi que leur efficacité. Les chélatants et les agents de vectorisation entrent dans ce cadre. En d'autres termes, cette définition nous indique que leur fonction n'est pas forcément d'activer des mécanismes physiologiques chez la plante. Ils diffèrent donc des biostimulants.

En effet, les chélatants sont utilisés pour favoriser l'absorption des minéraux par les plantes en les protégeant notamment des altérations extérieures. Les plus utilisés comme l'EDTA (Acide éthylène-diamine-tétraacétique) représente 100 000 tonnes consommées par an dans le monde avec 5 592 tonnes (1999) utilisées dans le secteur de l'agriculture et donc émises directement dans le sol (Schmidt, Fleig, Sacher, & Brauch, 2004). Cependant, celui-ci ayant une faible vitesse de décomposition, il contribue à la diminution des réserves en minéraux du sol car ils provoquent l'augmentation des risques de lixiviation en rendant les éléments qu'il chélate solubles (Do Nascimento, Amarasiriwardena, & Baoshan, 2006). De plus, l'EDTA provoque, sur le long terme, la formation de composés toxiques et l'oxydation de molécules dans la plante induisant sénescence et retard de croissance (Commission Européenne, 2004) (Do Nascimento, Amarasiriwardena, & Baoshan, 2006). Par ailleurs, il s'agit d'un chélatant non sélectif des métaux. Ce qui est un inconvénient lorsque celui-ci est présent dans le sol puisque il peut s'associer à des minéraux très abondants comme rares, et donc rendre accessible ou lixiviable des éléments fertilisants ou non désirés (Evangelou, Ebel, & Schaeffer, 2006). Enfin, la synthèse de ce composé se fait par cyanométhylation à partir de l'éthylène diamine, de formaldéhyde et de cyanures hautement toxiques (Brignon & Gouzy, 2011). L'EDTA n'est donc pas une molécule correspondant aux impératifs du plan Ecophyto.

Ainsi, nous proposons dans cette thèse d'élaborer des additifs agronomiques en s'appuyant sur un procédé durable, en accord avec les exigences d'une fertilisation plus respectueuse de l'environnement. Notre but est d'élaborer, par un procédé satisfaisant les exigences de la chimie verte, des agents de chélation mais aussi de vectorisation d'éléments nutritifs pour les plantes, afin d'en optimiser l'efficacité et d'en raisonner l'utilisation : un produit plus actif et pénétrant mieux dans la plante implique une utilisation moindre. L'idée a donc été de proposer des molécules susceptibles de chélater les éléments nutritifs que nous souhaitons apporter afin de les protéger, mais aussi ayant des propriétés de transport afin de traverser les barrières des organes végétaux, c'est-à-dire dotées des propriétés de vectorisation et de biodégradabilité (Figure 1).

Afin de s'assurer une compatibilité maximale avec le végétal, nous nous sommes inspirés des chélatants et vecteurs naturellement présents dans la plante. Cette démarche de biomimétisme nous a permis d'établir un design adapté pour nos agents de vectorisation. Il a en effet été démontré que les acides hydroxycarboxyliques, qui jouent un rôle important dans les échanges au sein des végétaux comme le présentent les travaux de Callahan, Baker, Kolev, & Wedd, constituent des agents de chélation et de transfert efficaces grâce à la présence de fonctions carboxyliques et hydroxyles (Callahan, Baker, Kolev, & Wedd, 2006).

Ainsi, les substrats de départ et les produits résultants des synthèses ont été choisis afin d'être structurellement et chimiquement les plus similaires possible à ce qui existe dans l'organisme de la plante.

Enfin, pour être en accord avec la démarche d'écoconception et les points précédemment cités, les matières premières sélectionnées pour nos synthèses sont donc des molécules biosourcées tels que le glycérol, le carbonate de glycérol (noté CG) ou des molécules émanant de ces derniers. Celles-ci sont biodégradables, non toxiques, faciles à se procurer et, pour le glycérol, déjà présent dans le végétal. Ce dernier est par ailleurs une ressource en abondance sur le marché car il constitue un coproduit de la synthèse de biocarburants (biodiesel), production faite à l'échelle mondiale (Mouloungui Z. , 2008).

En conclusion, afin de coupler les propriétés d'association et de transport ainsi que l'origine biosourcée, nous souhaitons produire des agents de vectorisation à base d'acides carboxyliques de glycérol et de carbonate de glycérol.

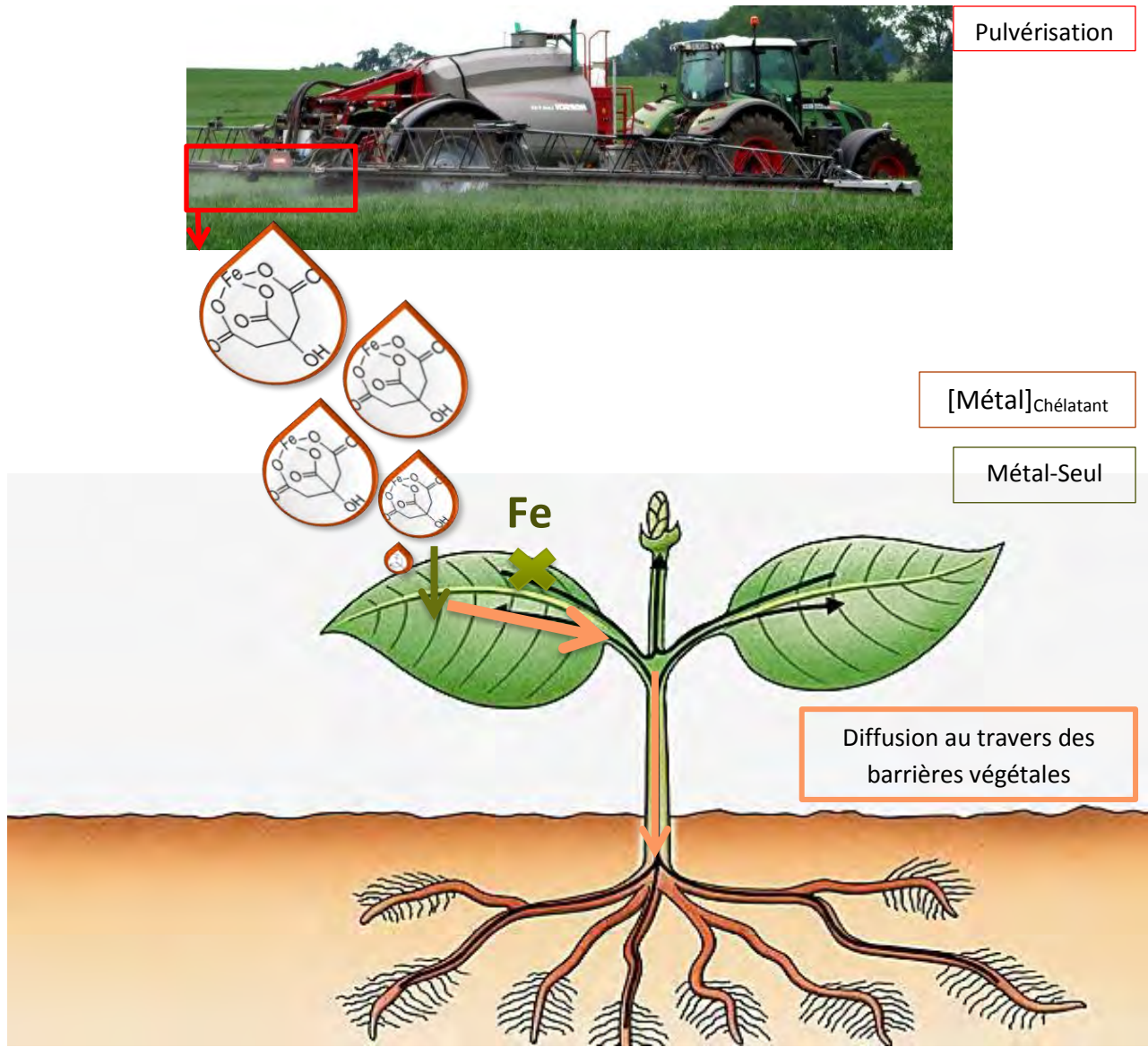


Figure 1 : Représentation de la fertilisation à l'aide d'agents de vectorisation (cas du fer)

Les objectifs de cette thèse sont donc de fournir, dans un premier temps, des acides carboxyliques à partir de différents substrats que sont le glycérol et le carbonate de glycérol en utilisant des oxydants respectueux de l'environnement.

Dans un second temps, nous chercherons à oxyder des molécules plus complexes comme le diglycérol et le triglycérol. Dans cette optique, deux grands types de catalyses ont été étudiées : la catalyse par voie chimique et la catalyse par voie enzymatique.

Enfin, des améliorations seront apportées aux protocoles ainsi mis en place, par l'utilisation de catalyseurs immobilisés sur support en vue de les recycler.

Dans un premier chapitre, nous chercherons tout d'abord à déterminer la structure du futur chélatant visant à remplacer l'EDTA. Pour cela, nous nous inspirerons des différentes familles de molécules qui constituent les barrières végétales, qui assurent la chélation et le transport des métaux entre les différentes parties de la plante ou qui sont impliquées à un haut degré dans le métabolisme cellulaire. Ces observations croisées permettront de sélectionner deux substrats, le glycérol et le carbonate de glycérol, pour la synthèse des produits recherchés. Dans un second temps, nous présenterons les modes opératoires actuels permettant l'oxydation des substrats. Nous effectuerons alors une sélection de 4 protocoles en catalyse homogène, correspondant le plus aux exigences de la chimie verte et aux contraintes de l'industriel.

Dans un second chapitre, nous réaliserons les essais expérimentaux des réactions de catalyse homogène sur le glycérol et le carbonate de glycérol. Nous chercherons ensuite à identifier et quantifier les molécules formées par chromatographie liquide couplée à trois détections distinctes : la réfractométrie (HPLC), la spectrométrie de masse (LCMS) et la conductimétrie (HPIC). L'ensemble de ces analyses permettra d'identifier le protocole qui fournit le plus des hydroxyacides désirés, nommés acide glycérique et carbonate de glycérol oxydé. Dans un second temps, nous chercherons à caractériser par résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse de haute résolution les composés du mode opératoire à base d'enzyme précédemment choisi pour sa sélectivité envers les molécules attendues. L'ensemble de ces techniques analytiques seront regroupées afin de proposer une plateforme analytique générique permettant la détermination des composés oxydés de la famille du glycérol. Enfin, nous essaierons d'optimiser les rendements pour les deux hydroxyacides souhaités. Pour conclure, le protocole sera effectué sur deux substrats plus encombrants : le diglycérol et le triglycérol.

Dans un troisième chapitre, nous travaillerons en catalyse hétérogène en choisissant, parmi la multitude de techniques de la bibliographie, une méthode d'immobilisation des catalyseurs en accord avec la chimie verte. L'objectif est d'assurer le recyclage et de conserver l'intégrité des catalyseurs au cours des réactions. Des essais en catalyse hétérogène seront ensuite effectués sur glycérol, carbonate de glycérol et sur le di et triglycérol.

Dans un quatrième chapitre, nous présenterons les perspectives des travaux de thèse ainsi que les applications envisageables pour les molécules qui auront été élaborées dans les parties précédentes. Ainsi, nous exposerons une proposition de réacteur à échelle pré-pilote en catalyse hétérogène et nous fournirons des améliorations concernant la caractérisation et la structure des catalyseurs fixés sur support. En outre, nous indiquerons la possibilité d'utiliser de techniques analytiques supplémentaires pour la caractérisation des molécules par chromatographie. Dans un dernier temps, différentes applications pour les hydroxyacides seront indiquées : en les utilisant directement sous leur forme actuelle en tant que potentiels chélatants en remplacement de l'EDTA, ou sous forme d'oligomères polycarboxyliques, et/ou polycarbonatés après leur oligomérisation.

Enfin, dans un cinquième chapitre, nous expliquerons dans le détail les processus des méthodes expérimentales employées aux cours de la thèse. Une conclusion générale suivra et récapitulera les points importants de l'ensemble de ce travail, dont la démarche a été de se baser sur le végétal au niveau de la réflexion et de la fabrication, pour y retourner au niveau des applications.

Chapitre 1 : Mise en place d'une démarche plus durable inspirée du vivant pour la sélection des substrats et des protocoles de synthèse nécessaires à l'élaboration de nouveaux agents de vectorisation

1.1 Des molécules inspirées du vivant

1.1.1 Les barrières végétales : source d'inspiration dans le choix des substrats

Afin de pouvoir traverser les barrières naturelles de la plante, nos produits (chélatants - transporteurs) se doivent d'être compatibles avec celles-ci. Nous avons donc cherché à savoir qu'elles étaient ces structures et étudié leur composition dans le but de déterminer le type de substrat adapté en vue de nos futures synthèses.

La feuille en coupe transversale apparaît en Figure 2 (a) :

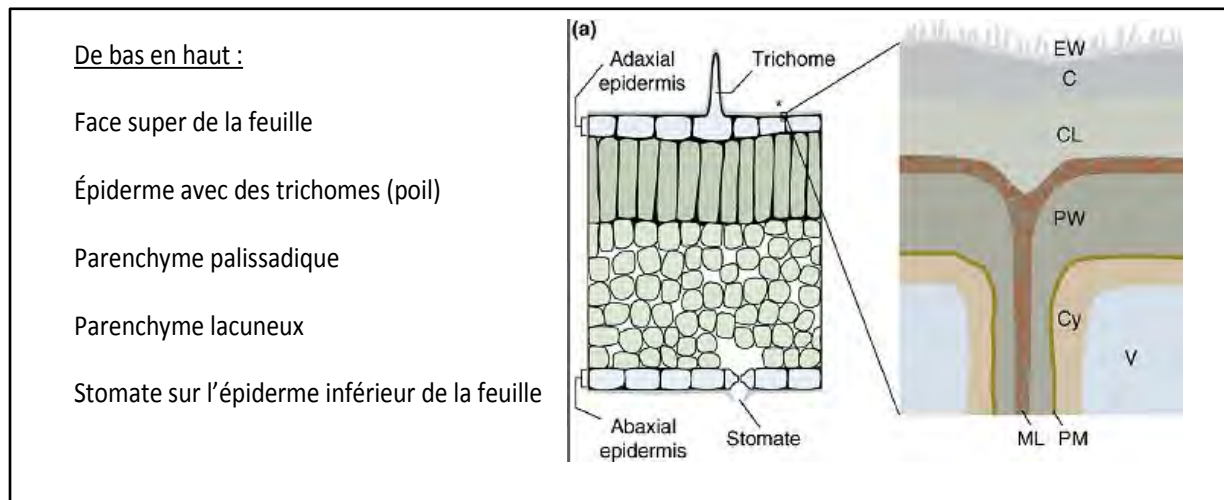


Figure 2 : Structure de la feuille et organisation de la cuticule (Pollard, Beisson, Li, & Ohlrogge, 2008)

Un grossissement de la partie supérieure de celle-ci est représenté à droite Figure 2. De bas en haut, les couches contrôlant l'entrée de substances dans la feuille sont EW : les cires épicuticulaires, puis C : la couche composée de cutine et de cires, CL : constituée de cutine, de cires, et de polysaccharides de la barrière suivante qu'est la paroi pectocellulosique (PW). Enfin, nous trouvons la membrane plasmique (MP) qui isole des compartiments intracellulaires (avec le cytoplasme (Cy) et la vacuole (V)).

Les couches EW, C et CL forment une zone nommée cuticule. Ainsi, les différentes barrières de la plante considérées (de la plus externe à la plus interne) seront : la cuticule, la paroi pectocellulosique et la membrane plasmique. La question est donc de savoir quelles molécules entrent dans leur composition afin de pouvoir s'en inspirer pour s'assurer une compatibilité forte avec ces ensembles.

1.1.1.1 Compositions

1.1.1.1.1 La cuticule

Les couches EW, C et CL sont principalement composées de cutine et de subérine dont les structures sont présentées par la suite. Il s'agit de polymères hydrophobes disposés en couches sur la feuille. Celles-ci contrôlent notamment l'entrée des gaz, des solutés et d'eau dans la feuille (Pollard, Beisson, Li, & Ohlrogge, 2008).

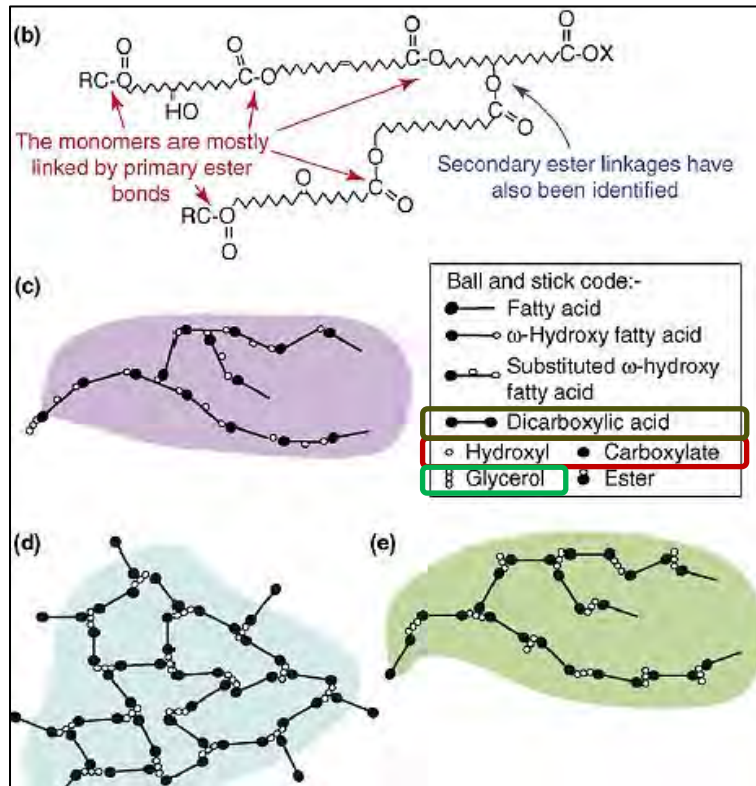


Figure 3 : Représentation des unités de base de la subérine et de la cutine de la cuticule (Pollard, Beisson, Li, & Ohlrogge, 2008)

Les quatre formes (b), (c), (d) et (e) sur la Figure 3 constituent les principaux monomères entrant dans la formation de la cutine et de la subérine. Nous constatons une forte abondance de chaînes grasses dites lipidiques (« fatty acids ») porteuses de fonctions **acide carboxylique (COOH)** (« dicarboxylic acid »), de groupes **hydroxyles (OH) et carboxylates (COO-)** et de motif espaceur constitué du squelette **glycérol** (1 à 14% dans la cutine et 14 à 26% dans la subérine (Pollard, Beisson, Li, & Ohlrogge, 2008). Ces molécules sont des esters de glycérol, c'est-à-dire sous forme :

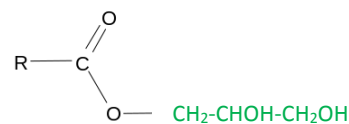


Figure 4 : Structure de base d'un ester avec en R, une chaîne grasse

Nous retiendrons donc qu'une forte proportion d'esters et en particulier d'ester de glycérol composent la barrière la plus externe de la feuille (Figure 4).

1.1.1.1.2 La paroi cellulaire

La paroi cellulaire, rigide, est constituée principalement de :

- Cellulose : polymère de glucose (Figure 5),
- Hémicellulose constituée de sucres proches du glucose comme par exemple le xylose, le galactose ou encore le fucose,
- Protéines comme la HRPG riche en acides aminés hydroxylés (hydroxyproline).

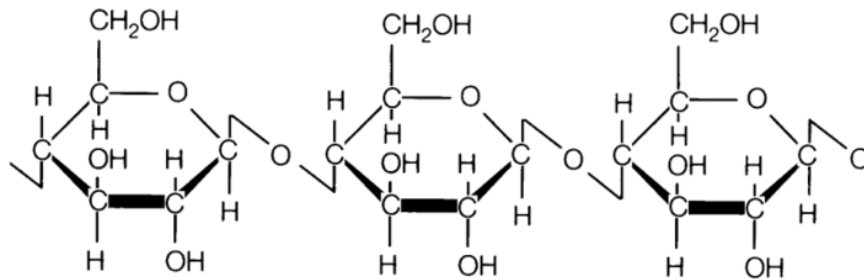


Figure 5 : La cellulose, polymère de glucose, reliés par des liaisons O-glycosidiques

Ainsi, nous pouvons dire que la paroi végétale est, de façon simplifiée, principalement composée de polymères de sucres cycliques, riches en fonction hydroxyles mais aussi en fonction aldéhyde (xylose) et acide (tel que l'acide mannuronique des hémicelluloses Figure 6). Les molécules pourraient donc être nommées hydroxyacides étant donné la présence conjointe de fonction hydroxyles et carboxyliques sur le même squelette.

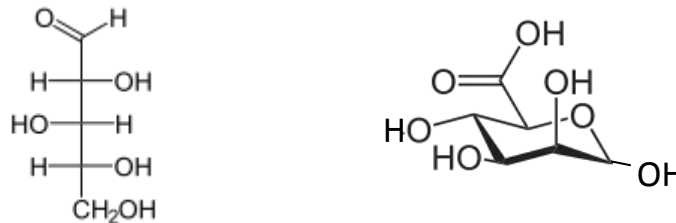


Figure 6 : Xylose à gauche et acide mannuronique à droite

1.1.1.1.3 La membrane cellulaire

La membrane cellulaire est constituée principalement de protéines, d'acides gras et de molécules nommées phospholipides dont la Figure 7 est un exemple représentatif. Les phospholipides se caractérisent par la présence d'un **groupement phosphate** lié à un **glycérol**, lui-même associé à différents acides gras (longue chaîne hydrogénocarbonée avec une fonction acide à son extrémité). C'est aussi un diester.

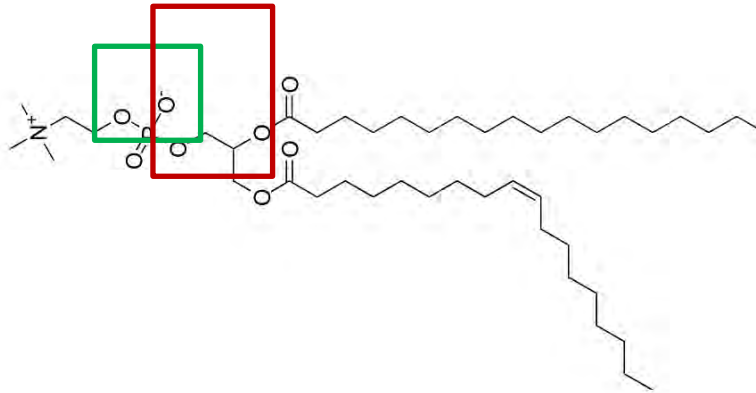


Figure 7 : 1-oléyl-2-stéaryl-phosphatidylcholine

Nous retrouvons ainsi deux éléments déjà présents dans les barrières précédentes : le glycérol et les groupements carboxyliques des acides gras.

1.1.1.2 Conclusion

Le bilan des compositions des différentes barrières du végétal indique que les futurs agents de chélation doivent être de type hydrogénocarbonées, avec de nombreuses fonctions acides et hydroxyles (hydroxyacides, nommé HA), qu'elles peuvent être sous forme d'ester (lipide membranaire) ou encore sous forme de sucre cyclique (comme dans le cas de la cellulose).

Une molécule retient cependant déjà notre attention. Il s'agit du glycérol présent non seulement dans la cuticule mais aussi dans la membrane plasmique sous forme estérifiée en tant que glycolipide ou glycérolipide.

Cependant, nos agents de vectorisation doivent aussi posséder des propriétés de transport. Nous avons donc effectué une étude des agents naturels de chélation utilisés par la plante afin de s'en inspirer pour proposer le design le plus compatible avec le végétal et le rôle souhaité.

1.1.2 Les chélatants chez les végétaux

D'une façon plus générale, les molécules permettant le transport des éléments nutritifs entre les compartiments cellulaires ou entre les organes végétaux appartiennent aux familles de chélatants présentées ci-dessous :

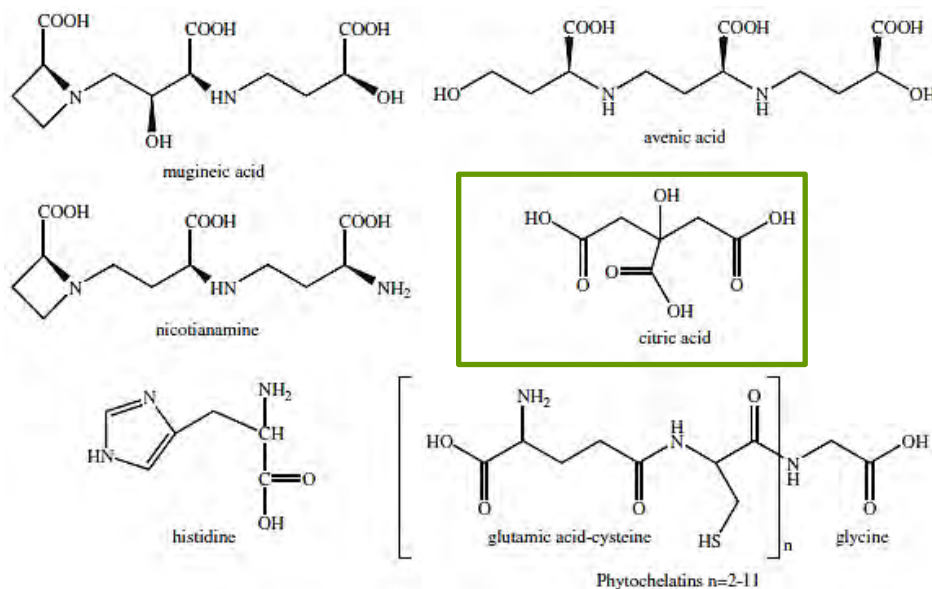


Figure 8 : Chélatants chez la plante (Callahan, Baker, Kolev, & Wedd, 2006)

Nous constatons une grande abondance de fonctions hydroxyles (-OH) et carboxyliques (-COOH) dans tous ces chélatants naturels (Figure 8). L'acide avénique et l'acide mugénique sont connus comme des phytosidérophores, c'est-à-dire des chélatants de faible masse moléculaire sécrétés par la racine et qui permettent la chélation et l'absorption par cette dernière du fer ferrique Fe^{3+} grâce à leur abondance en fonctions COOH (Hopkins & Évrard, 2003, p. 72).

La plante réalise donc des transferts au niveau cellulaire entre ses différents compartiments par le biais d'hydroxyacides. Nous avons donc recherché les HA impliqués dans des cas concrets d'échanges entre compartiments cellulaires afin d'affiner notre recherche. Leurs structures et propriétés sont représentées en suivant.

1.1.2.1 L'acide citrique ou citrate

Godbold et al., indique que des complexes [Zn-citrate] se forment dans les plantes afin d'assurer l'accumulation du métal dans la vacuole des racines (Godbold, Horst, Collins, Thurman, & Marschner, 1984). Ce mécanisme apparaît chez les végétaux lorsque ceux-ci sont exposés dans des sols saturés et donc toxiques en ce dernier. Le malate agirait d'ailleurs de concert avec le citrate pour augmenter la protection de la plante (Godbold, Horst, Collins, Thurman, & Marschner, 1984).

Différents phénomènes d'associations se produisent également avec le fer dans le même objectif de défense pour le végétal, et donnent alors naissance aux complexes suivants : $[\text{Fe(III)}_3\text{Cit}_2\text{Mal}_2]$, $[\text{Fe(III)}_3\text{Cit}_3\text{Mal}_1]$, $[\text{Fe(III)}\text{Cit}_2]$ (Grillet, et al., 2014) (Figure 9). Nous notons encore que dans certains cas, le citrate n'est pas le seul impliqué mais que d'autres hydroxyacides sous forme protonée, comme le malate, interviennent.

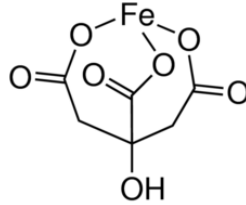


Figure 9 : Citrate de Fe(III)

1.1.2.2 L'acide glycolique ou glycolate

L'acide glycolique (Figure 11) est aussi capable de chélater le fer (Chemours (TM) glycolic acid). C'est un acide organique que nous rencontrons dans le métabolisme végétal. L'acide glycolique entre ainsi dans la formulation de solutions de nutrition utilisées pour les carences en Zn, Cu, Fe (Figure 10) (Brevet n° 3,131,048, 1964).

	Parts by weight		Parts by weight
CuSO ₄ .5H ₂ O -----	250	Zn(NO ₃) ₂ .3H ₂ O -----	243
Glycolic acid (70%) -----	435	Glycolic acid (70%) -----	435
Water -----	600	Water -----	100
Urea -----	300	Urea -----	300
	Parts by weight		Parts by weight
FeCl ₃ .6H ₂ O -----	270	Mn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O -----	287
Glycolic acid (70%) -----	217	Glycolic acid -----	651
Water -----	217	Water -----	200
		Urea -----	300

Figure 10 : Exemple de formulation utilisant l'acide glycolique (Etats-Unis Brevet n° 3,131,048, 1964)

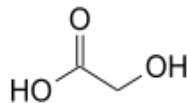


Figure 11 : Acide glycolique

1.1.2.3 L'acide oxalique ou oxalate

L'acide oxalique (Figure 12) est une molécule très présente chez les végétaux. Nous retrouvons par exemple des quantités importantes dans l'oseille, la rhubarbe ou encore le chou. L'oxalate est également connu pour s'associer de façon extrêmement forte avec le calcium créant ainsi de l'oxalate de calcium.

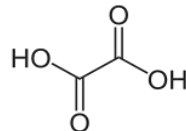


Figure 12 : Acide oxalique

Cependant, l'oxalate peut s'associer avec d'autres métaux comme le zinc ou le magnésium (Harmens, Koevoets, Verkleij, & Ernst, 1994). Il permet également la circulation du zinc entre le cytoplasme et la vacuole, en coopération avec le malate, comme présenté Figure 13.

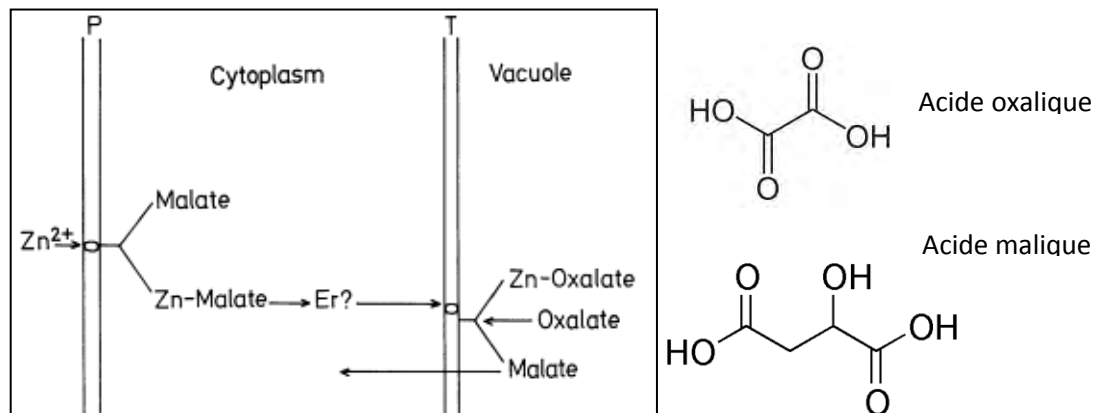


Figure 13 : Modèle du mécanisme de tolérance au Zinc chez les herbacés (P = membrane plasmique, T = tonoplaste) (Lange, Nobel, Osmond, & Ziegler, 1983).

1.1.2.4 L'acide malique ou malate

L'acide malique (

Figure 14) est un chélatant important capable de s'associer à de nombreux métaux comme le fer, ou encore le cuivre et le zinc (Foy, Chaney, & White, 1978), (Lange, Nobel, Osmond, & Ziegler, 1983). Grillet, et al. précisent que ce HA est présent en très grande quantité dans les feuilles des plantes hyperaccumulatrices en zinc, comme *Arabidopsis halleri*, et se complexe également avec le nickel comme chez *Alyssum serpyllifolium*, permettant ainsi son transport dans la sève du xylème (Grillet, et al., 2014). Enfin, cette acide est indispensable à la résistance des plantes à l'aluminium (Hoekenga, et al., 2006). Grâce à son excrétion dans le sol par les racines, ce dernier les protège des effets nocifs de la présence massive du métal.

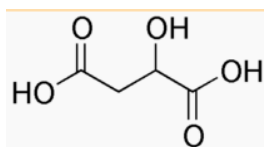


Figure 14 : Acide malique

Les hydroxyacides ainsi présentés jouent donc un rôle très important et reconnu dans les végétaux : en tant que chélatant en réalisant le transport de métaux, ou en tant qu'agent de bioaccumulation des ions métalliques dans certains organes. Nous pouvons donc dire que les molécules que nous souhaitons fabriquer doivent être des hydroxyacides constitués de carbone (C), d'oxygène (O) et d'hydrogène (H) uniquement et posséder entre deux (oxalate) et cinq carbonnes (citrate).

1.1.2.5 Illustration par quelques constantes de chélation

Nous rappelons que la constante de stabilité d'un ensemble métal-acide [Métal-acide] satisfait la relation

$$\text{suivante : } K = \frac{[\text{Métal-acide}]}{[\text{Métal}] \times [\text{Acide}]}$$

Sous réserve d'un pH et de proportions fixées pour l'acide et le métal à 25°C, l'état de l'art fourni :

Acide	Ba	Ca	Co(II)	Cu	Fe(II)	Fe(III)	Hg	Mg	Mn	Ni	Sr	Zn
Citrique	2,3	3,5	4,4	6,1	3,2	11,85	10,9	2,8	3,2	4,8	2,8	4,5
EDTA (référence)	7,78	10,7	16,21	18,8	14,3	25,7	21,5	8,69	13,56	18,56	8,63	16,5
Glycérique	0,8	1,18	—	—	—	—	—	0,86	—	—	0,89	1,80
Glycolique	0,66	1,11	1,60	2,81	—	4,7	—	0,92	—	—	0,8	1,92
Lactique	0,55	1,07	1,89	3,02	—	6,4	—	0,93	1,19	2,21	0,7	1,86
Acétique	0,39	0,53	2,24	—	—	—	3,7	0,51	—	0,74	0,43	1,03
Oxalique	2,31	3	4,7	6,3	>4,7	9,4	—	2,55	3,9	5,16	2,54	4,9

Tableau 2 : Constante de stabilité (log K1) métal-acides carboxyliques naturels (Smith & A.Martell, 1998)
(Furia, 1990)

Par ailleurs, nous cherchons à assurer la bonne assimilation des futurs agents de chélation une fois que ceux-ci auront pénétré dans le végétal. Par conséquent, nous nous sommes intéressés aux intermédiaires métaboliques de la cellule dans le but de produire des structures similaires et donc capables de s'intégrer dans les voies majeures de catabolisme et d'anabolisme de la plante. L'objectif est ici de s'affranchir des contraintes de l'EDTA, produit ayant des effets délétères sur la croissance des plantes après absorption.

1.1.3 Les hydroxyacides importants du métabolisme

Ci-dessous sont présentés deux ensembles de réactions primordiales chez la plante : la phase sombre de la photosynthèse (Figure 15) et la glycolyse (Figure 16).

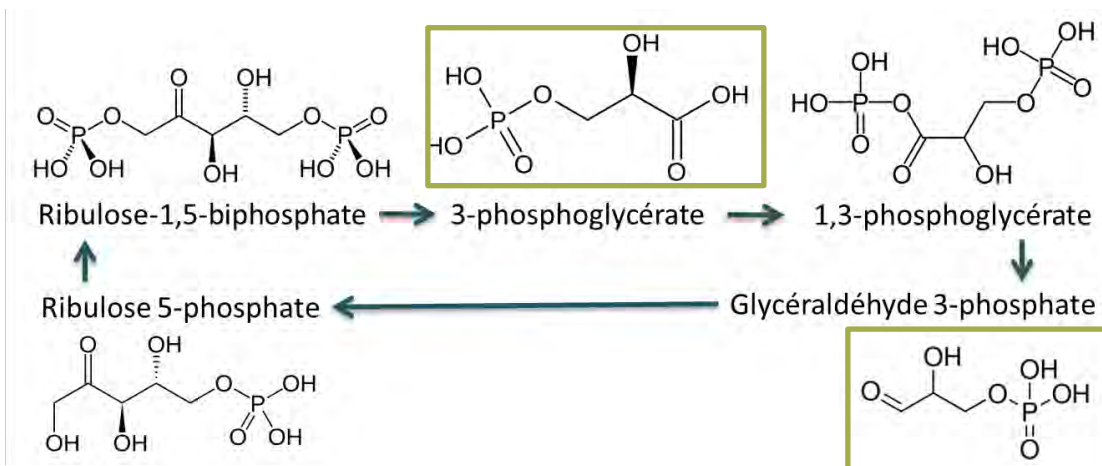


Figure 15 : Intermédiaires métaboliques du cycle de Calvin-Benson

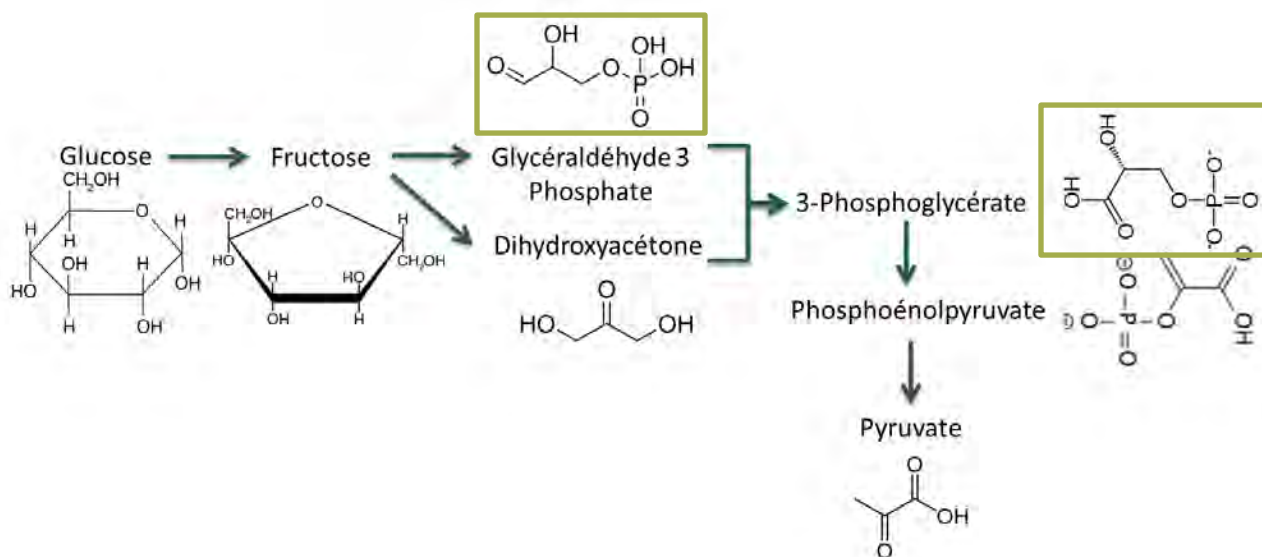


Figure 16 : Intermédiaires métaboliques de la glycolyse

Nous constatons que tous les intermédiaires métaboliques présents dans le cycle de Calvin-Benson et de la glycolyse sont des HA. D'autre part, deux hydroxyacides en C3 retiennent notre attention : l'acide glycérique et le glycéraldéhyde, utilisés sous forme phosphatée en tant que **phosphoglycérate et glyceraldéhyde-3-phosphate** (Corma, Iborra, & Velyt, 2007, p. 2457). En effet, ces composés sont présents dans les deux voies biologiques et se retrouvent dans les dérivés issus de l'oxydation par voies chimiques du glycérol (Figure 17).

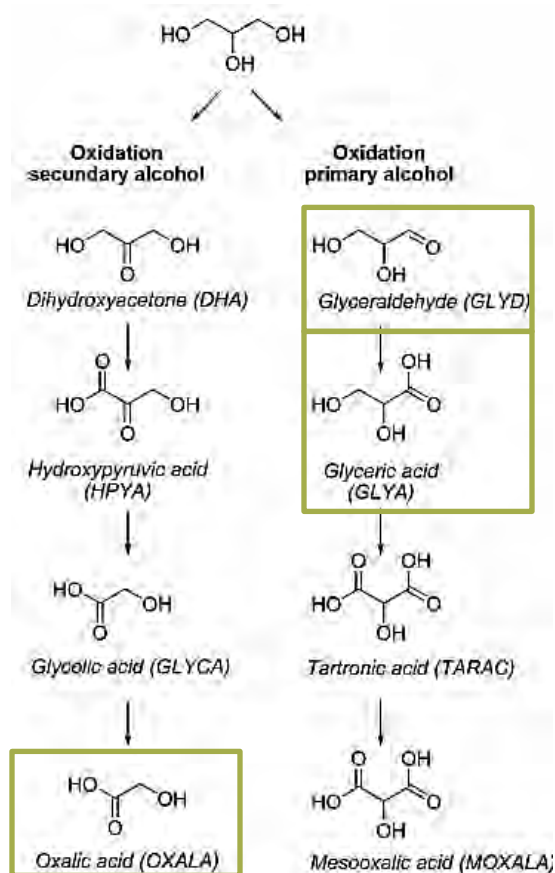


Figure 17 : Les produits de l'oxydation par voie chimique du glycérol (Corma, Iborra, & Velty, 2007)

Par ailleurs, l'acide glycérique (glycérate) (Figure 18) est un chélatant du calcium (Sullivan & Burnham, 2015). Deux molécules de celui-ci se coordinent autour de l'ion Ca²⁺ pour former de l'acide glycérique hémicalcium. Ce mécanisme est aussi valable pour le Ba²⁺. L'acide glycérique est par ailleurs capable de chélater le couple Mn²⁺/Mn³⁺ (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012). Il est également indiqué comme chélatant du zinc et du magnésium (Cannan & André, 1938).

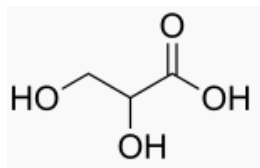


Figure 18 : Acide glycérique

Enfin, les hydroxyacides issus de la suroxydation du glycérol par voies chimiques (acide oxalique, acide glycolique sur la Figure 17) font aussi partie des chélatants naturels observés chez les plantes.

1.1.4 Détermination des substrats pour la fabrication des futurs agents de vectorisation

1.1.4.1 Choix des substrats

L'étude de la composition de la plante et de son fonctionnement cellulaire ou à l'échelle de son organisme nous permet d'avoir une image plus claire des propriétés attendues pour l'agent de vectorisation. Celui-ci doit être :

- Un hydroxyacides en C3 pour s'assurer la compatibilité avec le métabolisme de la plante et le transport des métaux dans le végétal,
- Un ester à base de glycérol ou proche de celui-ci,
- Ou un sucre cyclique pour être compatible avec les barrières de la plante.

Ainsi, le glycérol (Figure 19) a constitué notre premier choix de substrat car il est présent dans toutes les familles de molécules étudiées dans la plante et son oxydation permet d'obtenir des composés comme l'acide glycérique qui présente toutes les caractéristiques requises (hydroxyacides en C3) ou encore l'oxalate, chélatant naturel connu.

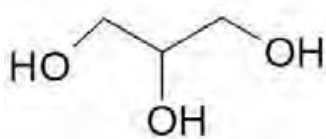


Figure 19 : Glycérol

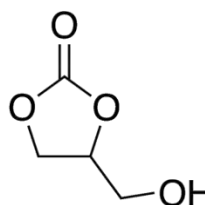


Figure 20 : carbonate de glycérol

Par ailleurs, afin de satisfaire le besoin en sucres cycliques et en esters, un autre substrat a été choisi : le carbonate de glycérol (noté CG, Figure 20). Cette molécule étant dérivée du glycérol, elle appartient à la famille des sucres, est cyclique, et l'acide qui y est associé est souvent estérifié pour la fabrication d'additifs agronomiques.

Par conséquent, nous chercherons à oxyder le glycérol et le carbonate de glycérol dans le but d'élaborer des agents de vectorisation chélatants pour la fertilisation.

1.1.4.2 Présentation des substrats

1.1.4.2.1 Le glycérol

1.1.4.2.1.1 Origines et applications du glycérol

Le glycérol (glycérine, propan-1,2,3-triol ou 1,2,3-propanetriol) est une molécule capitale de l'industrie oléochimique. Elle a été retenue en 2004 par le département américain de l'énergie comme faisant partie du Top 10 des molécules plateforme. Il s'agit d'une molécule polyvalente majeure au carrefour d'une multitude d'utilisations. Ses principales voies de production sont la transestérification, l'hydrolyse et la saponification des huiles végétales. En 2004, la production mondiale de glycérol était entre 500 000 et 750 000 tonnes avec pour exemple aux Etats-Unis : 75% d'origine naturelle provenant de l'oléochimie et 25 % synthétique, obtenus à partir du polypropylène (Werpy, et al., 2004).

En 2011, le marché mondial a atteint 1,5 millions de tonnes de glycérol produit du fait de l'augmentation de la synthèse des biodiesels mais aussi par la volonté des industriels de trouver de nouvelles possibilités de valorisation pour cette molécule (Quispe, Coronado, & Carvalho, 2013). Ainsi, elle est aujourd'hui en voie de devenir un additif pour le béton ou encore un précurseur pour la chimie fine (Pagliaro, Ciriminna, Kimura, Ross, & Pina, 2007).

Nous la rencontrons dans tout le monde vivant (membrane de cellule végétale, animale), mais aussi dans un très grand nombre de synthèses car cette molécule offre une myriade de possibilités pour des réactions plus complexes. Diverses applications sont possibles. L'élaboration d'esters de glycérol et plus précisément de di et triglycérides retient notre attention car ces substances sont semblables aux molécules constitutives des cires végétales ou des membranes cellulaires (comme démontré précédemment). Cependant, beaucoup **d'autres transformations et produits** d'applications sont possibles avec le glycérol, comme présenté Figure 21, renforçant notre choix pour cette molécule.

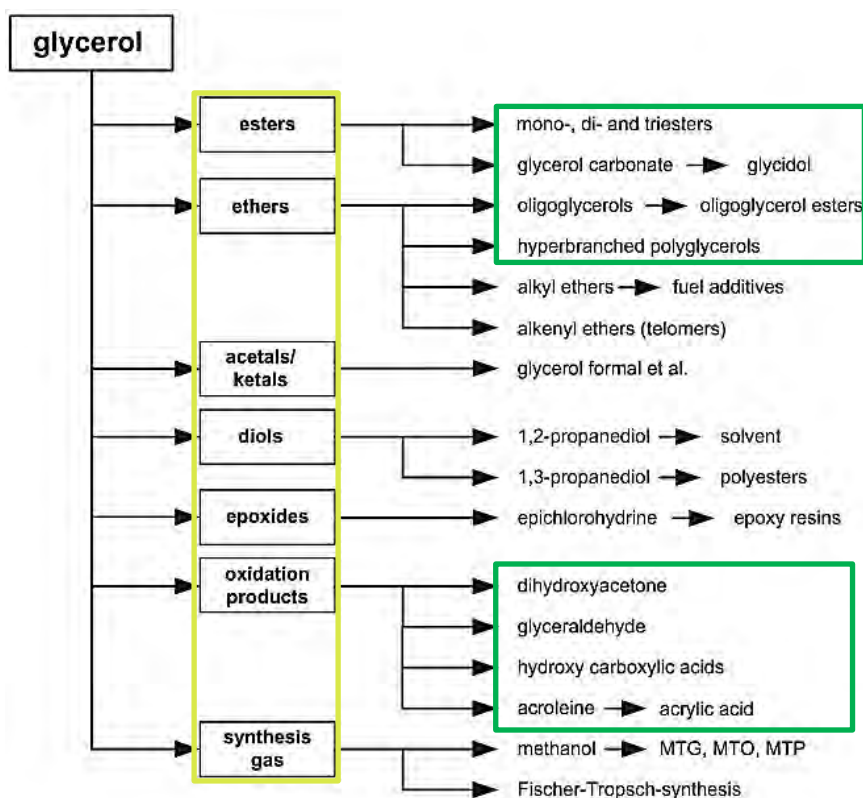


Figure 21 : Les voies de valorisation du glycérol. En vert les voies à approfondir pour le projet 3BCARII (Behr, Eilting, Irawadi, Leschinski, & Lindner, 2008)

Les familles de molécules issues du glycérol (Figure 21) sont de grands intermédiaires chimiques, tels que les esters, les éthers, les diols ou les cétales et acétales qui constituent des monomères pour de l'oligo ou la polymérisation, ou encore des molécules de base pour la production d'énergie comme le méthanol dans le cadre de la réaction de Fisher-Tropsch.

De façon plus concrète, les applications des dérivés du glycérol sont les suivantes :

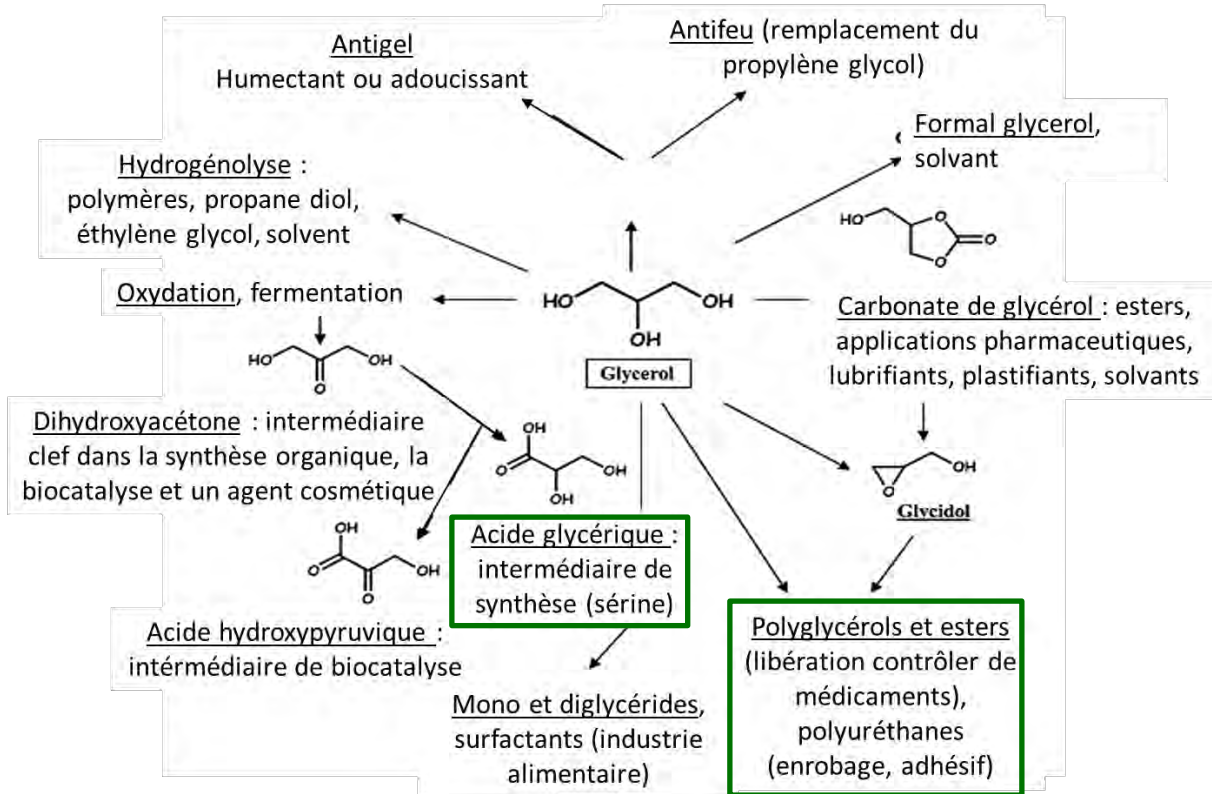


Figure 22 : Les produits dérivés du glycérol et leurs utilisations dans la vie courante (Corma, Iborra, & Velty, 2007)

Il est enfin à noter que l'exploitation du glycérol est en plein essor puisqu'il est utilisé de façon directe pour la fabrication de médicaments (et dans la pharmacopée de façon plus générale), pour l'alimentation et les boissons ou pour les soins à la personne. Enfin ses dérivés, comme l'acide glycérique, sont de plus en plus demandés. Cette molécule fait ainsi l'objet d'un véritable engouement comme le témoigne l'augmentation du nombre de publications associées à son oxydation depuis 2008, en passant de 250 articles par an, à trois fois cette valeur ces dix dernières années (Figure 23).

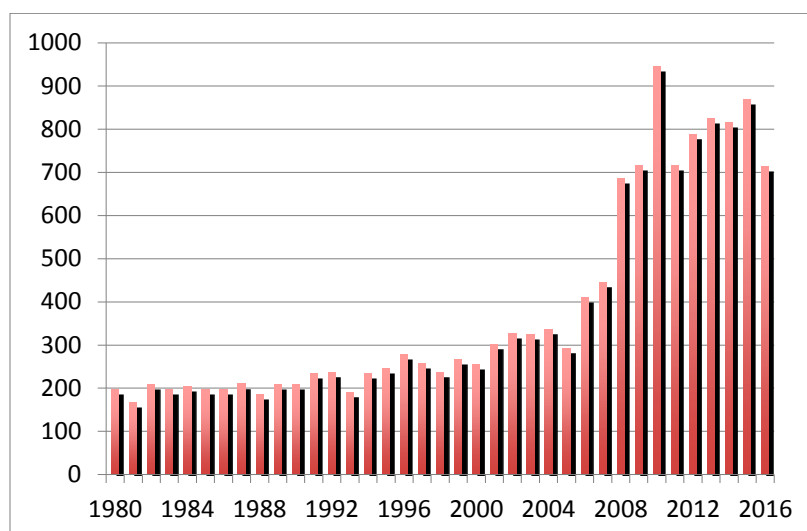


Figure 23 : Nombre de publications sur l'oxydation du glycérol de 1980 à 2016 (source ACS)

Le glycérol fait enfin partie des produits **biosourcés** de par son origine principalement naturelle (huiles végétales), argument supplémentaire dans le choix de son utilisation.

1.1.4.2.1.2 Les propriétés du glycérol

1.1.4.2.1.2.1 Réactivité du glycérol

Le glycérol (CAS : 56-81-5) est un triol de masse molaire 92,09 g/mol qui peut se dissoudre dans les solvants polaires grâce à ses trois groupes hydroxyles. Il est miscible dans l'eau et l'éthanol, le méthanol et le diméthyle sulfoxyde mais insoluble dans le benzène, le chloroforme, le tétrachlorométhane, le cyclohexane et l'acétonitrile (tests réalisés au laboratoire).

Les produits le plus recherché est l'acide glycérique, HA issus de l'oxydation d'une des deux fonctions alcools primaires du glycérol et qui conservent ses trois carbones et deux fonctions hydroxyles. Le glycérol possède aussi une fonction alcool secondaire, qui occupe l'axe de symétrie de la molécule, engendrant une équiréactivité des fonctions hydroxyles primaires (Figure 24).

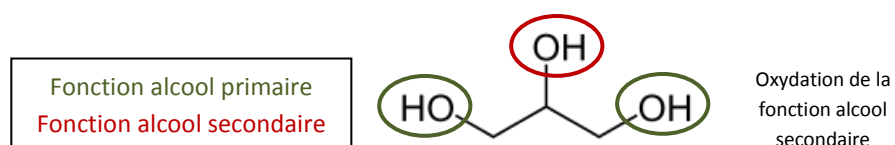


Figure 24 : Les fonctions alcools du glycérol

Le produit non désiré de l'oxydation correspond donc à l'oxydation unique de la fonction alcool secondaire du glycérol qui donne alors du dihydroxyacétone (noté DHA par la suite). Il s'agit d'une cétone et ne présente donc pas les fonctions recherchées (Figure 25).

La sélectivité de l'oxydation du substrat est donc un point essentiel pour obtenir l'HA désiré puisque seules les fonctions alcools primaires doivent réagir.

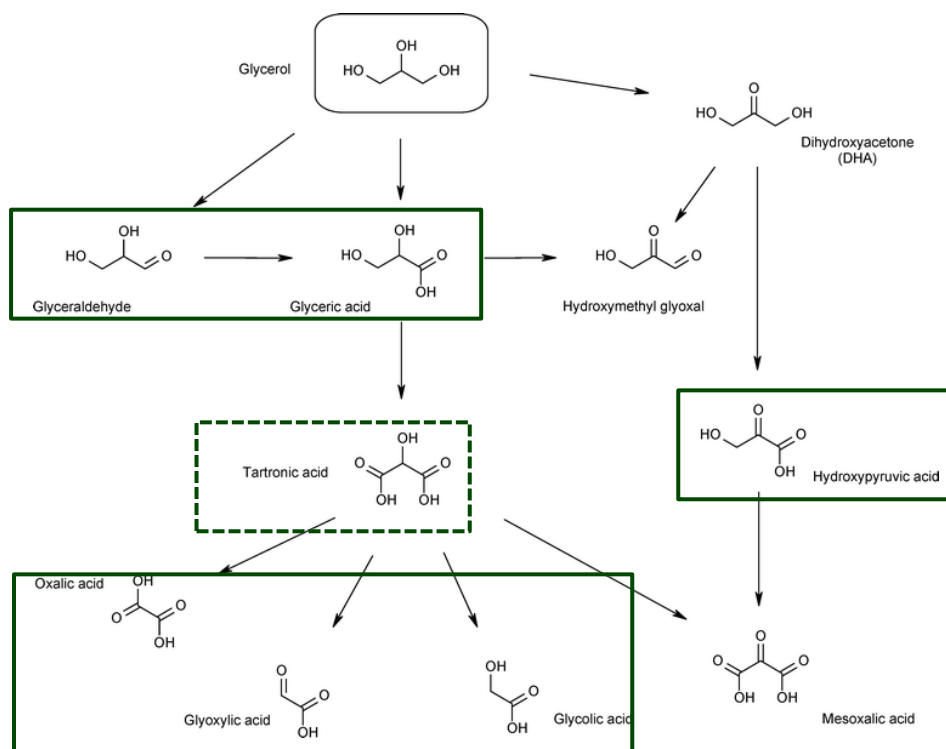


Figure 25 : Les produits issus de l'oxydation du glycérol

En conclusion, les **produits recherchés** sont ceux oxydés au moins sur une fonction alcool primaire, à savoir : l'acide glycérique en priorité, mais aussi le glycéraldéhyde, l'acide tartronique, l'acide oxalique, l'acide mésoxalique, l'acide hydroxypyruvique, l'acide glycolique et l'acide glyoxylique.

Un autre verrou de la réactivité du glycérol réside dans la suroxydation qui provoque la formation de produits suroxydés tel que l'acide tartronique et mésoxalique (figure ci-dessus). Cependant, ces produits de suroxydation peuvent apparaître et certains d'entre eux sont valorisables, comme l'acide oxalique qui possède des propriétés de chélation reconnues, mais pourraient aussi servir de synthons de base pour la fabrication de polyesters.

1.1.4.2.1.2.2 Propriétés physico-chimiques du glycérol

Les travaux de thèse de Sandrine Mateo réalisés au laboratoire en 2001 proposent par ailleurs une caractérisation complète des propriétés du glycérol.

Dans notre cas, nous nous focaliserons sur les propriétés de solvant du glycérol comme en témoigne sa constante diélectrique ϵ . En effet, d'une façon générale, les molécules sont normalement orientées au hasard. Cependant lorsqu'elles sont polaires et en présence d'un champ électrique, elles vont s'orienter toutes de la même façon, parallèlement au champ appliqué. Les composés polaires ont alors une constante diélectrique élevée. Il en découle que les solvants à fort ϵ sont capables de réduire l'attraction électrostatique entre les ions de charges opposées, et vont conduire à leur dissociation. Le solvant est alors dit dissociant. Le glycérol présente une constante diélectrique de 42,5 (22°C), celui-ci est donc considéré comme fortement dissociant (Mateo, 2001). La polarité du glycérol est bien illustrée par la valeur de son moment dipolaire μ important de 2,67 (25°C) (Mateo, 2001). Ces caractéristiques sont donc favorables à la formation de liaisons faibles avec des métaux à chélater et apportent donc des arguments supplémentaires dans le choix de ce substrat.

Enfin, le glycérol est facilement biodégradable (95%) selon les critères de la directive OCDE 301B et ne présente pas d'effet inhibiteur sur les micro-organismes des boues activées permettant le test. Ce sucre satisfait donc les exigences de la chimie verte.

1.1.4.2.2 Le carbonate de glycérol (CG)

1.1.4.2.2.1 Origine et valorisation du CG

Le CG : Carbonate de glycérol (glycérine carbonate ou 4-hydroxyméthyl-2-oxo-1,3-dioxolane) de numéro CAS (931-40-8) appartient à la famille des sucres étant donné son origine, le glycérol. Sa structure cyclique nous permet de nous rapprocher du constituant majoritaire de la paroi cellulaire : la cellulose et s'inscrit donc bien dans la démarche de biomimétisme du projet.

Le CG est fabriqué à partir du glycérol selon deux voies majeures : la transcarbonatation et la carboxylation (Figure 26 (Ochoa-Gómez, Gómez-Jiménez-Aberasturi, Ramírez-López, & Belsué, 2012), (Valentin, et al., 2012), (Mouloungui & Pelet, 2001), (Parzuchowski, Kizlińska, & Rokicki, 2007)).

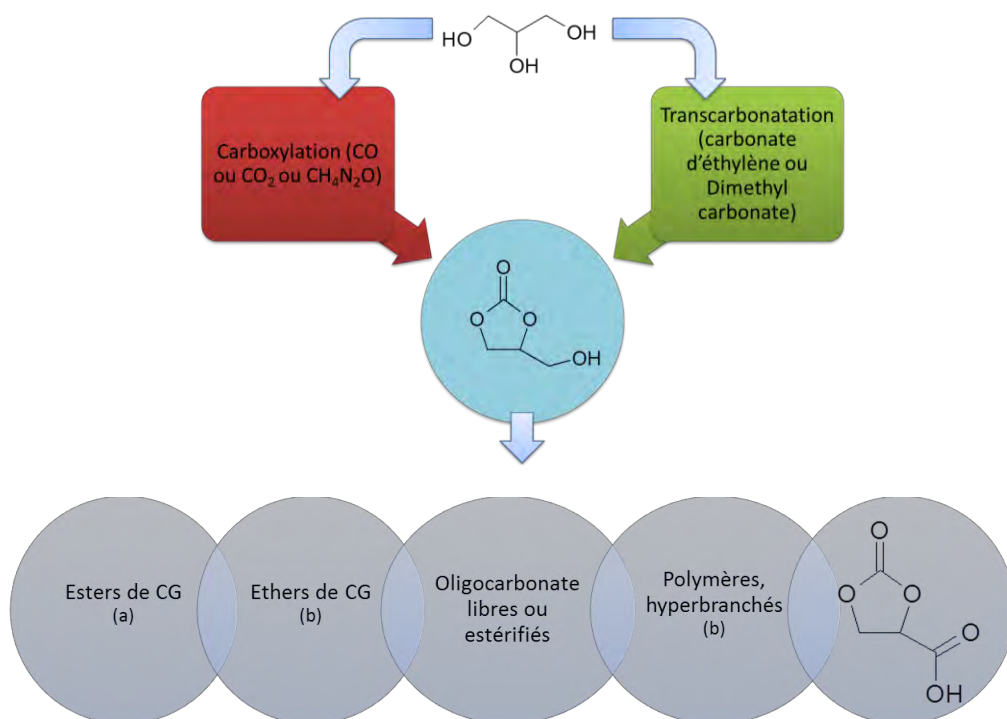


Figure 26 : Présentation des voies de synthèse les plus importantes du CG à partir du glycérol et ses voies de valorisation

De façon plus précise, nous présentons en A (Figure 27), la fabrication du CG en deux étapes à partir de l'oxyde d'éthylène en présence de CO₂. Le carbone d'éthylène cyclique établi au cours de la première réaction est ensuite employé pour une transcarbonatation avec le glycérol pour former du CG. Dans le cas de réactions directes (voies B et C Figure 27), l'urée et le glycérol réagissent en proportion équimolaire à 30 mbar pendant 2 heures, en présence de sulfate de zinc comme catalyseur, fournissant ainsi 80% de CG en fin de réaction (Yoo & Mouloungui, 2003). Enfin, le glycérol peut subir une carbonatation en présence de CO₂ (supercritique) afin d'obtenir le produit attendu et de l'eau (Vieville, Yoo, Pelet, & Mouloungui, 1998), (Sonnati, et al., 2013).

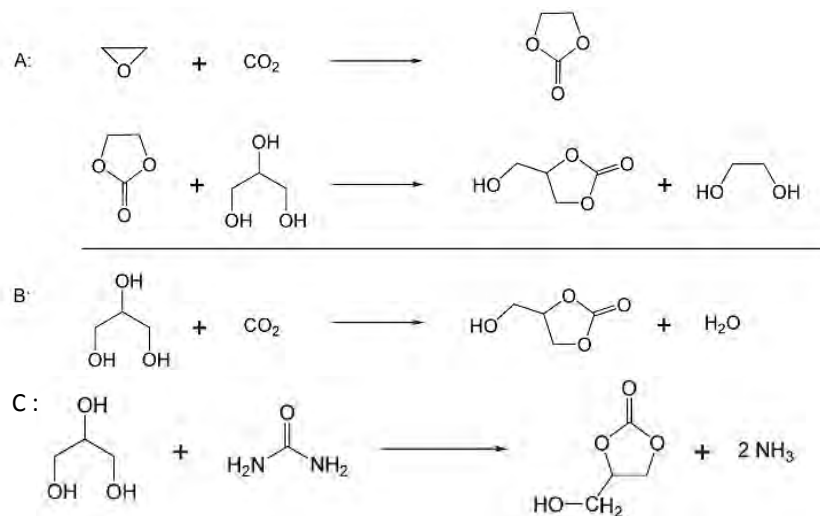


Figure 27 : Synthèse du CG à partir du glycérol (Behr, Eilting, Irawadi, Leschinski, & Lindner, 2008)

Le CG est une molécule présentant donc l'avantage d'être issue d'un substrat biosourcé. Dans le domaine scientifique, le CG fait d'ailleurs l'objet d'un vrai intérêt depuis 2010, puisque le nombre de publications associées au CG est passé de 52 à 113 en six ans, soit environ 80 parutions chaque année sur cette période (Figure 28).

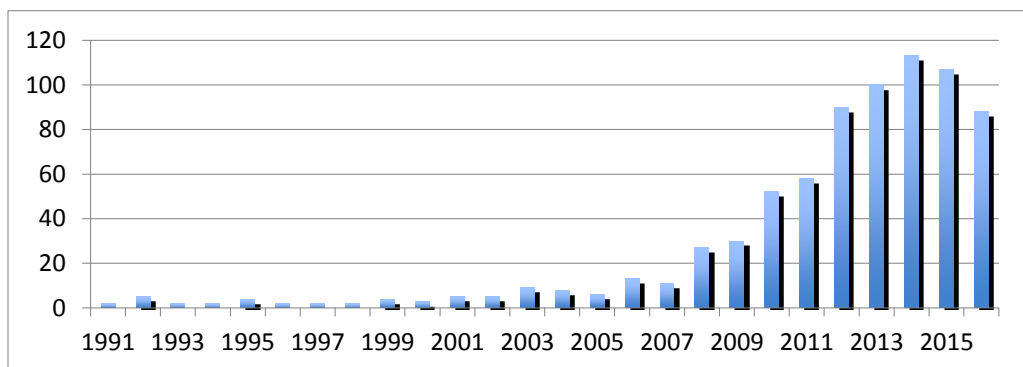


Figure 28 : Nombre de publications parues sur le CG par année de 1990 à 2016 (source ACS)

Il est ainsi devenu le point de départ d'une large gamme de synthèses pour la fabrication d'esters, de polymères (oligocarbonates, hyperbranchés) ou encore d'acides carboxyliques (Figure 26), structures nous rappelant les cires végétales et les esters constitutifs des membranes lipidiques.

Grâce à son origine biosourcée, la molécule est ainsi devenue un précurseur alternatif à de nombreuses substances chimiques couramment utilisées identifiées comme toxiques et employées à l'échelle industrielle.

Le carbonate de glycérol est donc régulièrement utilisé dans les produits cosmétiques (Brevet n° EP 2951166 A1, 2014) et constitue le point de départ de très nombreuses valorisations (Nohra, et al., 2013) comme présentées ci-dessous :

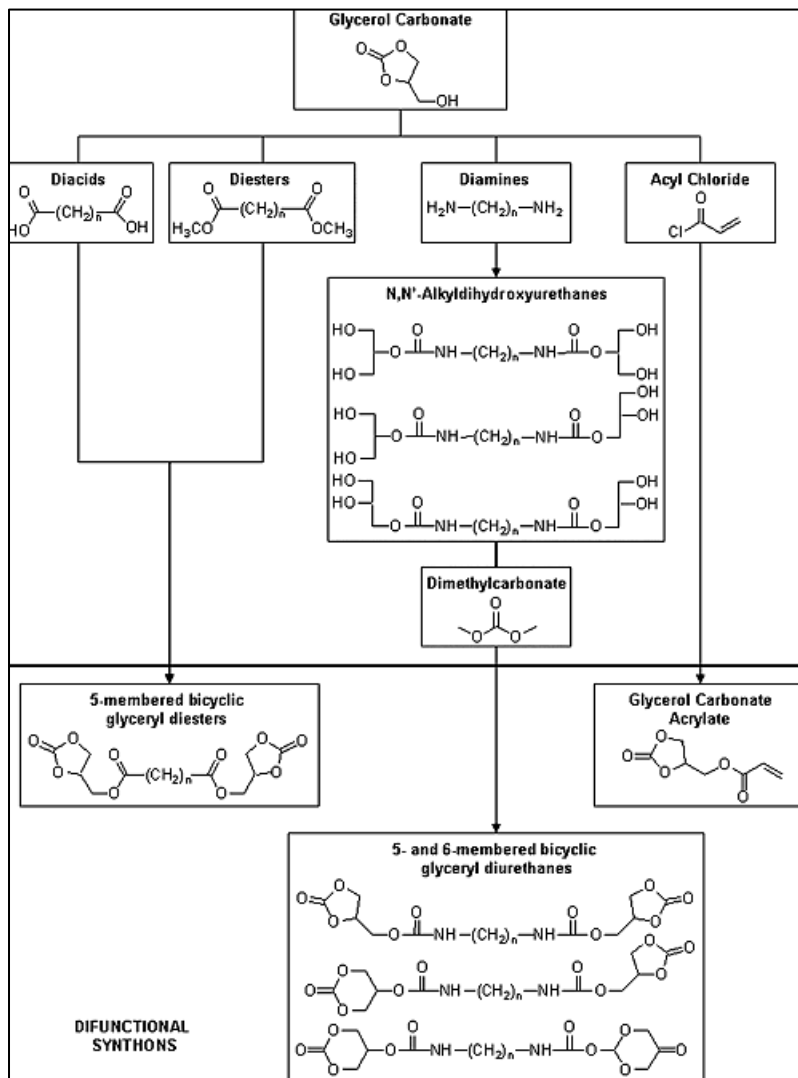


Figure 29 : Les voies de valorisation du CG (Nohra, et al., 2013, p. 3784)

Le cas des polyuréthanes à base de polyisocyanates est une illustration importante des avantages du CG. Cette famille de polymères, très largement employée, est utilisée pour les chaussures, les matelas, les pièces automobiles, les équipements de sport, le cuir artificiel mais aussi dans la chimie de construction, pour les produits d'étanchéité, les adhésifs, les revêtements et les mousses, la toiture, le revêtement de sol, la fixation des carreaux et l'imperméabilisation, pour n'en nommer que quelques-uns.

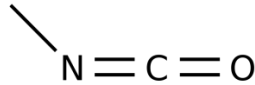


Figure 30 : Structure de référence d'un isocyanate : isocyanate de méthyle

Cependant, les monomères d'isocyanate (Figure 30) sont de bas poids moléculaire et par conséquent toxiques et sensibilisants, notamment du fait de leur volatilité. Dans les procédés de production industrielle fermés (chaussures, mousses, pièces façonnées, etc.), ces faits jouent un rôle mineur, mais sont en revanche majeurs quand il s'agit d'applications où le durcissement est effectué en plein air.

Ainsi, des voies de production pour l'élaboration de polyhydroxyuréthanes à base de carbonate ont été proposées afin de s'affranchir de l'utilisation des isocyanates. Les substances élaborées sont donc moins nocives (Figure 31, Figure 32).

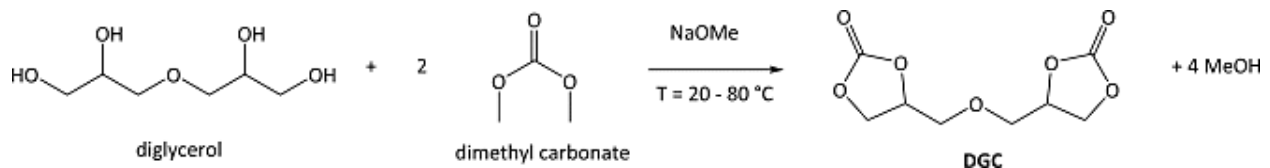


Figure 31 : Fabrication du building block à partir de carbonate (Van Velthoven, Gootjes, van Es, Noordover, & Meuldijk, 2015)

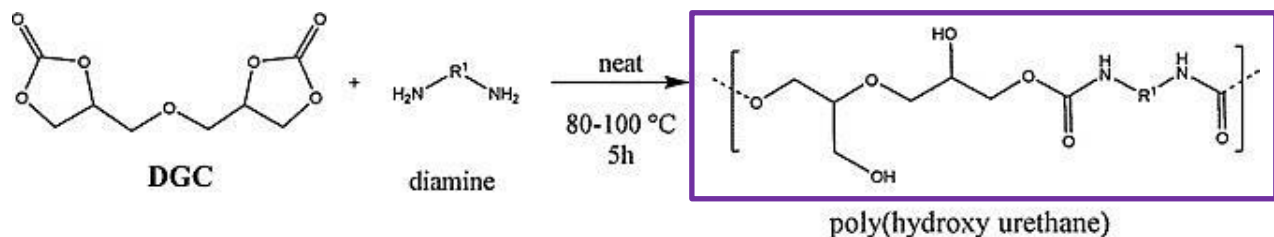


Figure 32 : Utilisation des carbonates pour la formation de polyuréthanes (Van Velthoven, Gootjes, van Es, Noordover, & Meuldijk, 2015)

Cet exemple permet de comprendre le potentiel du CG en tant que synthons de base pour des fabrications très variées, nous confortant donc dans le choix de celui-ci. La molécule promet donc d'être réactive dans une multitude de cas, augmentant donc les chances d'obtenir les dérivés attendus dans le projet (polyesters, polycarboxyliques).

En effet, les produits dérivés du CG ont eux aussi des applications importantes comme dans le remplacement de monomères volatiles et toxiques nécessaires pour la synthèse d'hydroxyuréthanes en présence d'amines (Figure 33) (Brevet n° EP 2951166 A1, 2014). Ainsi, une voie prometteuse est l'utilisation de l'acide 2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxylique, une forme acide du carbonate de glycérol, nommée par la suite « CG oxydé » dans les travaux.

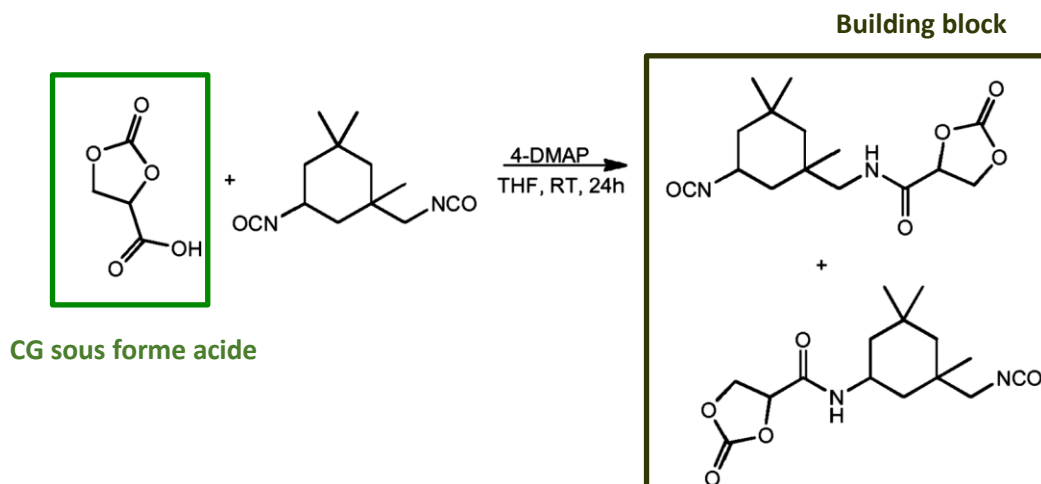


Figure 33 : Synthèse du 2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxamide, building block d'intérêt (Brevet n° EP 2951166 A1, 2014) à l'aide du acide 2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxylique issu du CG

La Figure 34 figure ainsi une des utilisations des building blocks à base de CG oxydé ayant pour but de remplacer les polyuréthanes classiques.

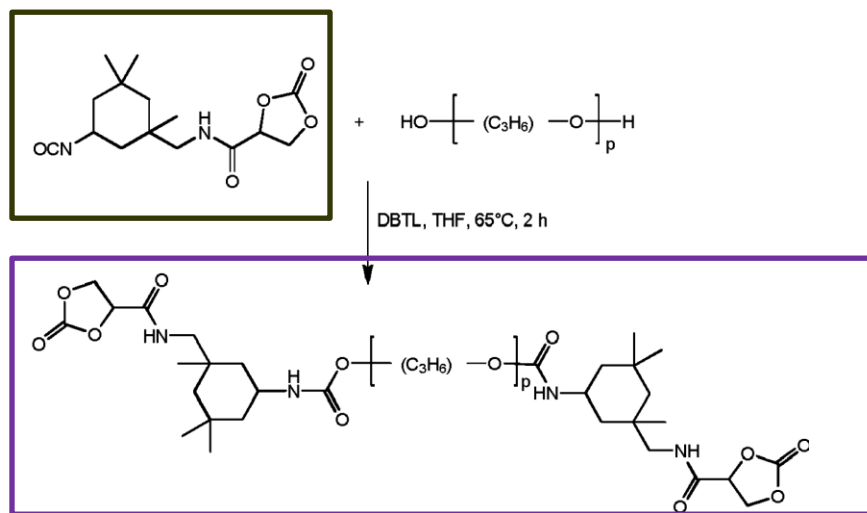


Figure 34 : Synthèse plus complexe utilisant le building block avec du polypropylène glycol (Brevet n° EP 2951166 A1, 2014)

Il est encore utilisé dans la même optique que précédemment mais par des voies plus directes :

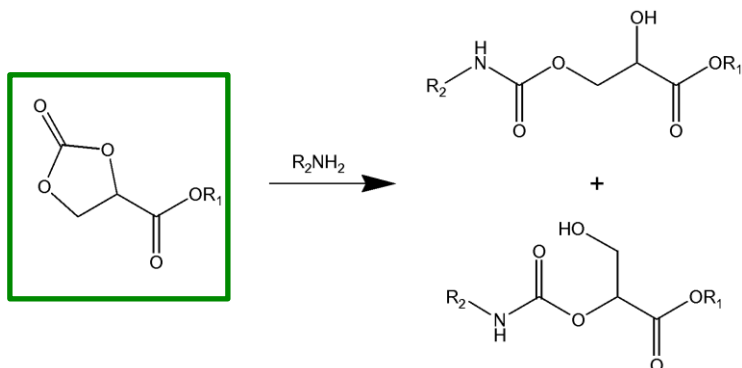


Figure 35 : Synthèse d'hydroxyuréthane par l'utilisation directe de CG oxydé (R = H) ou d'ester de CG oxydé (R = chaîne alkyle) (Brevet n° WO2011157551 A1, 2011)

Les dérivés du CG oxydé s'emploient aussi dans le cadre de l'agriculture comme adjuvants aux pesticides (Brevet n° WO2016071331 A1, 2016). Dans ce cas, ce sont des esters (Figure 36) qui sont fabriqués pour l'amélioration des propriétés des formulations.

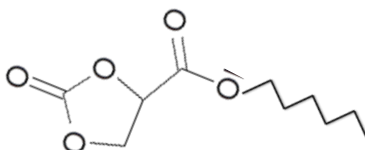


Figure 36 : Ester de CG oxydé avec une chaîne grasse possédant entre 2 et 12 carbones

Ces composé diminuent la tension de surface des mélanges (propriétés tensioactives) (Mouloungui & Pelet, 2001), augmentent la stabilité et l'efficacité du pesticide actif et en diminuent les effets indésirables (phytotoxicité).

Enfin, les carbonates d'alcools gras sont employés comme solvants pour les préparations agricoles (Brevet n° WO 1999029170 A1, 1999). Ainsi, nous remarquons que l'implication des dérivés du CG est très importante dans une multitude de domaines et notamment l'agriculture. Les produits carbonatés y sont utilisés en tant qu'additifs agronomiques dans le but d'améliorer les propriétés des éléments actifs des formulations. Ce point vient confirmer le choix du CG comme substrat de travail dans le cadre de la fabrication de produits d'adjuvantation pour le traitement des carences végétales. Nous notons d'autre part que la forme acide du CG (CG oxydé ou acide 2-oxo1,3 dioxolan -4-carboxylique) est essentielle dans la fabrication des différents produits présentés précédemment.

Cette fonction acide lui conférerait les propriétés de chélation attendues. Par conséquent, nous souhaitons uniquement oxyder la fonction hydroxyle exogène du CG afin de conserver les propriétés de la molécule de départ tout en y associant la potentielle capacité de chélation

1.1.4.2.2 Les propriétés du CG

Une caractérisation complète des propriétés du CG est disponible dans les travaux de thèse de Sandrine Matéo (Mateo, 2001). Dans notre cas, nous nous intéresserons seulement à certains d'entre eux. Quelques propriétés du CG sont donc rassemblées dans le tableau suivant :

T° fusion	T° ébullition	Point éclair	Masse volumique	Viscosité cinématique	Viscosité dynamique
-66.7°C	351°C	212°C	1.39 g/cm ³	0,61 cm ² /sec	85 mPa.sec

Tableau 3 : Propriétés du CG (Mateo, 2001)

Le CG est connu pour avoir des capacités intéressantes en tant que solvant grâce à sa température de fusion basse et d'ébullition élevée. D'autre part, ses paramètres de solubilité définis par la théorie de Hansen (δ_d , δ_p et δ_h) permettent d'illustrer le propos (Tableau 4).

Composé/paramètre	δ_d	δ_p	δ_h
Glycérol	17,4	12,1	29,3
Eau	13,5	42,9	17,2
CG	19,5	26,0	12,5

Tableau 4 : Paramètres de Hansen : comparaison entre le CG et un autre solvant, l'eau (Mateo, 2001)

Le Tableau 4 nous permet de constater que le CG présente des valeurs plus élevées, pour les interactions δ_d , δ_p par rapport au glycérol, qui résultent de la présence du cycle cyclocarbonate. Le CG possède en effet deux sites à forte polarité (site cyclocarbonate et site hydroxyle), à l'origine d'une valeur importante pour δ_p . D'autre part, même plus faible que le glycérol, le δ_h du CG reste important, traduisant le caractère donneur-accepteur de la liaison H à l'origine de la forte association des molécules de CG. Ces points sont confirmés par Sonnati et al., précisant que le CG possède un caractère donneur-accepteur de liaison hydrogène pour le motif OH (O donneur et H accepteur) (Sonnati, et al., 2013). Il possède également un caractère accepteur de liaison hydrogène pour le motif cyclocarbonate ($\delta +$).

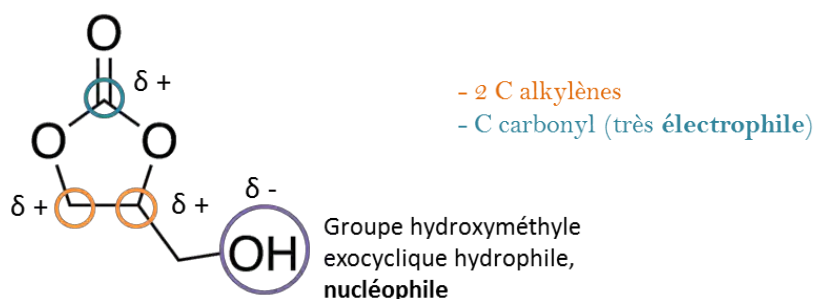


Figure 37 : Illustration de la répartition des charges partielles à la surface du CG

Le CG présente un moment dipolaire $\mu = 5,4518$ (25°C) et une constante diélectrique $\epsilon = 121,8$ (22°C) particulièrement élevés et qui s'explique par la présence simultanée au sein de la molécule d'un groupement à caractère $\delta +$ (le cycle carbonate) et un groupement plutôt $\delta -$ (tête hydroxyle exocyclique). Ainsi, l'ensemble donne une molécule très polaire qui lui confère ces caractéristiques. D'autre part, le cycle rigide du CG empêche la neutralisation de ses charges internes entre elles, ce qui contribue à renforcer la polarité de la molécule (Mateo, 2001).

Le CG possède en outre une structure assimilée à un diester, formé par la fonction carbonate et les deux oxygènes intra-cycliques, qui renforcent la polarité. La présence de la fonction OH exogène peut par ailleurs provoquer l'apparition de cycles contigus, c'est-à-dire formés par plusieurs molécules de CG établissant des liaisons hydrogène entre eux. Le CG est plus soluble dans des solvants davantage hydrophobes, en comparaison du glycérol, car la présence d'un groupement carbonate à la place de deux fonctions OH confère au CG une lipophilie plus forte.

Le CG présente par ailleurs une très bonne biodégradabilité (> 90%) et sans effets inhibiteur sur les micro-organismes. Selon la directive OCDE 301B, il se classe donc dans la catégorie des éco-produits, ainsi en accord avec les contraintes du projet de thèse.

1.1.4.3 Conclusion

Le glycérol et le carbonate de glycérol présentent des caractéristiques en accord avec la démarche de biomimétisme souhaitée dans le projet. Ils font partie de la famille des sucres, sont biosourcés et l'acide glycérique et le CG oxydé issus de leur oxydation sont : soit des HA naturellement présents dans la plante, ou, dans le cas du CG oxydé, sont utilisés pour la fabrication d'additifs agronomiques proches des cires végétales. Par conséquent, notre objectif sera d'oxyder le glycérol et le carbonate de glycérol dans le but d'obtenir de l'acide glycérique et du CG oxydé grâce à un protocole satisfaisant les exigences d'une démarche plus durable et les contraintes de l'industriel.

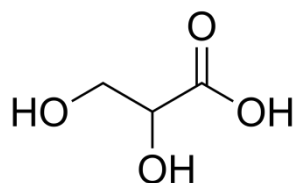


Figure 38 : Acide glycérique

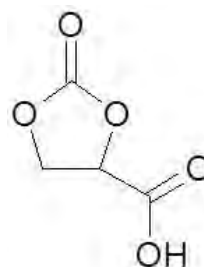


Figure 39 : CG oxydé (acide 2-oxo-1,3-dioxolan-4-carboxylique)

1.2 Détermination des conditions expérimentales pour l'oxydation des substrats

1.2.1 Les contraintes du projet

L'emploi d'oxydants toxiques nécessaires dans beaucoup de synthèses est aujourd'hui décrié. Le choix de ces réactifs est donc devenu une préoccupation partagée par les domaines académique et industriel (Werpy, et al., 2004). Afin de s'inscrire dans une démarche plus actuelle, un ensemble de critères à remplir a donc été déterminé afin de respecter les contraintes de la chimie verte et en vue d'une future application industrielle. Il en découle que les points suivants sont à prendre en compte dans la sélection des protocoles d'oxydation des substrats.

- Les oxydants seront le dioxygène(O_2) et le peroxyde d'hydrogène(H_2O_2) car ils sont non polluants (le peroxyde d'hydrogène se dismute pour former de l'eau), sont peu chers et il est facile de se les procurer,
- Pour des raisons de sécurité, de facilité de mise en place, et pour rester dans le cadre de réactions proches de celles du vivant, nous cherchons à privilégier des réactions dont les pressions sont proches de la pression atmosphérique,
- Dans une démarche d'économie d'énergie, et de biomimétisme nous proposons également de travailler dans une gamme de température faible : 20-60°C,
- Nous limiterons au maximum l'utilisation de solvants,
- L'oxydation doit se faire sur les fonctions primaires d'alcools (pour l'obtention d'acides carboxyliques),
- Les catalyseurs choisis doivent être abondants (facilité d'approvisionnement),
- Les coûts doivent être réduits ou potentiellement divisés par la suite (recyclage, achat en gros),
- Nous orienterons nos recherches bibliographiques principalement sur les protocoles permettant l'oxydation du glycérol en acide glycérique et sur des protocoles d'oxydation d'alcools primaires présentant des similarités structurales avec le CG, car il n'existe pas de réaction décrite à ce jour pour son oxydation spécifique (à l'exception de quelques brevets).

1.2.2 Recherche des protocoles les plus adéquats pour l'oxydation des substrats

1.2.2.1 Les procédés d'oxydation par voie chimique

1.2.2.1.1 Oxydation des substrats par les métaux nobles

Les recherches bibliographiques effectuées ont montré que les principales techniques d'oxydation des alcools, plus respectueuses de l'environnement, font majoritairement appel au dioxygène et au peroxyde d'hydrogène et des métaux nobles (Davis, Ide, & Davis, 2013). Les métaux les plus utilisés sont l'or (Porta & Prati, 2004), (Carrettin S., McMorn, Johnston, Griffin, & Hutchings, 2002), (Bianchi, Canton, Dimitratos, Porta, & Prati, 2005) (Taarning, Madsen, Marchetti, Egeblad, & Christensen, 2008), le platine (Sproge, et al., 2013), (Liang, et al., 2011), le palladium (Dimitratos, Porta, & Prati, 2005), (Brink, Arends, & Sheldon, 2000), le ruthénium (Chinchilla, et al., 2015) et le bismuth (Worz, Brandner, & Claus, 2010).

Cependant, le platine est un métal sensible au dioxygène. En sa présence, il est désactivé, en particulier sous haute pression (Porta & Prati, 2004), ce qui impose d'en restreindre le flux. Par conséquent, la conversion du glycérol et la sélectivité de la réaction en sont affectées car elles sont toujours sous la contrainte d'une limitation en réactif. De plus, la sélectivité pour l'acide glycérique des métaux de la famille du platine est toujours inférieure à celle de l'or (57 % de sélectivité pour 92% de conversion (Sproge, et al., 2013)). Les métaux du groupe platine utilisés seuls comme catalyseur n'ont donc pas été sélectionnés.

L'or est beaucoup plus stable et résistant à l'altération par le dioxygène en comparaison des autres métaux nobles et permet également de stabiliser les acides carboxyliques formés (acide glycérique par exemple) qui ne subissent alors presque plus de suroxydation (Bianchi, Canton, Dimitratos, Porta, & Prati, 2005).

De plus, l'or est un des métaux les plus sélectifs pour l'oxydation des diols et des triols en acide monocarboxylique en milieu aqueux (Frassoldati, 2011) (Taarning, Madsen, Marchetti, Egeblad, & Christensen, 2008). Il est même considéré comme un des métaux les plus adaptés pour obtenir des acides carboxyliques car il oxyde sélectivement les fonctions alcools primaires (Taarning, Madsen, Marchetti, Egeblad, & Christensen, 2008).

Son activité est en revanche plus faible que celles des métaux du groupe du platine. Des alliages ont donc été proposés tel que Platine-Or comme dans les travaux de Royker, Case, & Van Steen, ou Palladium-Platine, proposé par Dimitratos, Porta, & Prati pour augmenter l'activité du catalyseur (Bianchi, Canton, Dimitratos, Porta, & Prati, 2005) (Dimitratos, Porta, & Prati, 2005) (Royker, Case, & Van Steen, 2012). Cependant, ces couples présentent toujours une sélectivité inférieure à celle de l'or seul pour l'acide glycérique (Dimitratos, Porta, & Prati, 2005). En effet, sous forme monométallique, l'or présente la sélectivité (90%) et la conversion (93%) les plus élevées (Porta & Prati, 2004). Les associations bimétalliques n'ont donc pas été choisies du fait de la diminution de la sélectivité qu'elle engendre.

Enfin, les métaux comme le ruthénium ou le bismuth sont sélectifs vis-à-vis du DHA (Porta & Prati, 2004), produit qui n'est pas visé pour ces travaux de recherche. Par conséquent ces catalyseurs n'ont pas non plus été retenus en catalyse mono ou bimétallique (où ils influent aussi sur la sélectivité) (Frassoldati, 2011).

En conclusion, l'or semble être le meilleur candidat. Cependant, l'utilisation d'une base (en particulier l'hydroxyde de sodium) est très employée dans une majorité des protocoles avec métaux précieux (notamment ceux ayant les meilleures conversions). L'or réclame ainsi impérativement la présence de soude pour oxyder le glycérol en acide glycérique (Carretin S. , McMorn, Johnston, Griffin, & Hutchings, 2002) (Dimitratos, Porta, & Prati, 2005) (Bianchi, Canton, Dimitratos, Porta, & Prati, 2005). En effet, des conditions basiques favorisent l'oxydation préférentielle des alcools primaires, tandis que les conditions acides favorisent l'oxydation d'alcools secondaires (Dimitratos, Porta, & Prati, 2005). Les articles de Davis, Ide, & Davis et Kondamudi, Misra, Banerjee, Mohapatra, & Mohapatra confirment également que la présence de base accroît la sélectivité pour la formation d'acide carboxylique (Davis, Ide, & Davis, 2013) (Kondamudi, Misra, Banerjee, Mohapatra, & Mohapatra, 2012). D'après les travaux de Frassoldati, le mécanisme généralement accepté pour l'oxydation des alcools en aldéhydes, cétones ou en acides carboxyliques avec l'oxygène de l'air est une déshydrogénation oxydante avec la perte de deux atomes d'hydrogène et la formation d'un groupement carbonyle (Frassoldati, 2011). La figure ci-dessous (Figure 40) établie à partir de la revue de Davis et al., représente le cas d'une oxydation avec ou sans base (Davis, Ide, & Davis, 2013). Le mécanisme d'oxydation sur or (et platine) est le suivant avec : * = « sur site catalytique »

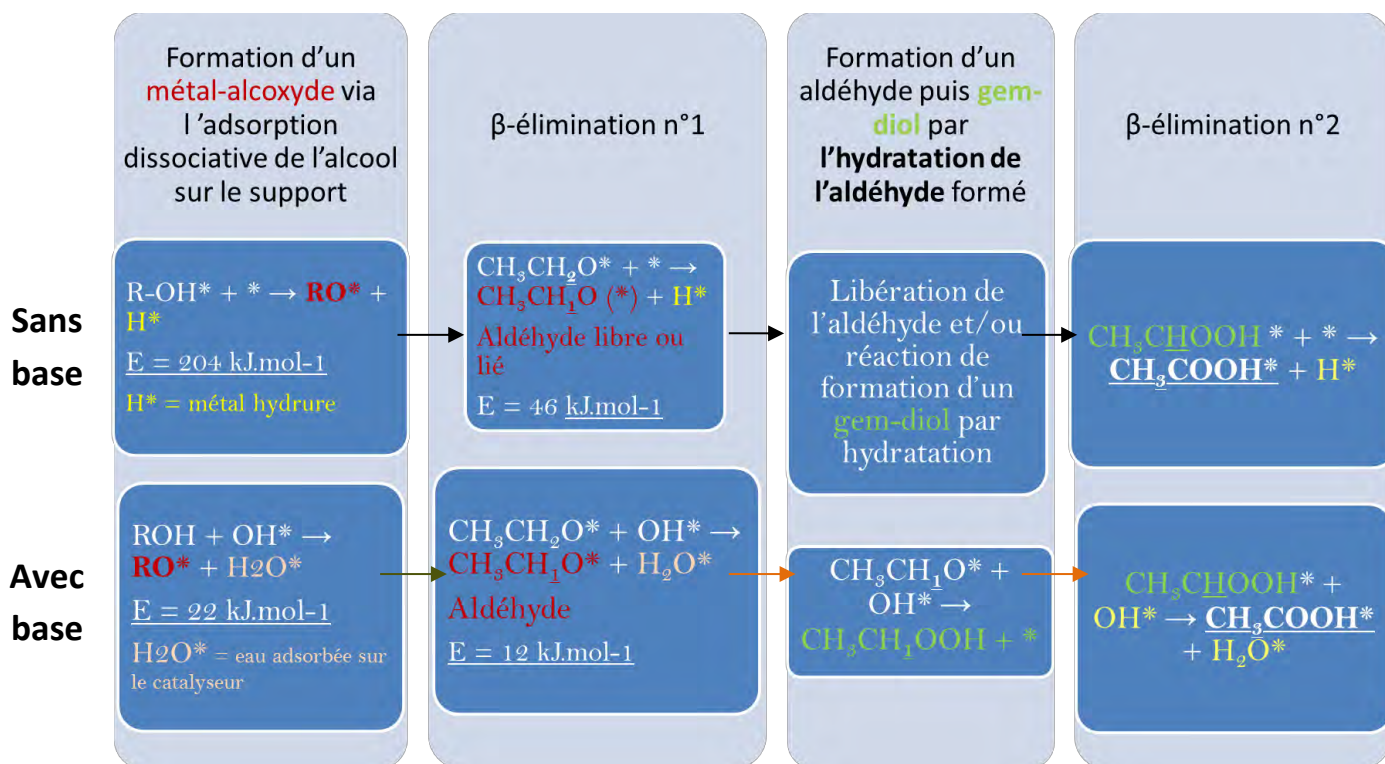


Figure 40 : Vue énergétique des différentes étapes d'oxydation des alcools en présence ou en absence de base, d'après (Davis, Ide, & Davis, 2013)


Nous constatons que la première réaction du mécanisme met en jeu « l'abstraction » d'un atome d'hydrogène, ce qui demande beaucoup d'énergie dans le cas d'une réaction directement sur l'alcool. L'utilisation d'une base permet alors de fragiliser la liaison entre l'oxygène et l'hydrogène du groupement hydroxyle diminuant ainsi l'énergie d'activation E de la liaison O-H de 204 à 22 kJ.mol⁻¹.

En ce qui concerne le dioxygène nécessaire à la formation des dérivés carbonyles (intégré dans leur structure), il ne provient pas du dioxygène qui diffuse dans le milieu, mais de l'eau présente dans la solution (Davis, Ide, & Davis, 2013). D'où la nécessité de se trouver en présence d'eau pour la formation des groupes carbonyles.

Le dioxygène qui diffuse joue en réalité un rôle primordial dans la régénération du catalyseur (Frassoldati, 2011). Ainsi les H* (hydrures) et H₂O* (obtenus avec les mécanismes Figure 40) adsorbés sur la surface active du catalyseur sont libérés par réaction avec le dioxygène selon les réactions suivantes (Sara E. Davis, 2013) :

1) Réduction du dioxygène par les électrons des nanoparticules de métal : $O_2^* + H_2O^* \rightarrow *OOH + OH^*$

2) Suite de la réaction selon deux issues possibles. Seule la voie thermodynamiquement la plus favorable est ici présentée : $*OOH + H_2O^* \rightarrow H_2O_2^* + OH^*$ (dont l'Energie d'activation est de 48 kJ. mol⁻¹, contre 83 kJ. mol⁻¹ pour la voie thermodynamiquement moins favorable).

3) $H_2O_2^* + * \rightarrow OH^* + OH^*$ et $OH^* + H^* \rightarrow H_2O^* + *$  Site catalytique de nouveau libre

Ainsi, on constate la production de 3 -OH qui sont régénérés sur les sites actifs des métaux du catalyseur.

Il y a donc, grâce à l'oxydation par le dioxygène, restitution de sites libres catalytiques et de base nécessaire pour faciliter les réactions (Figure 40). Le schéma ci-dessous (Figure 41) vient illustrer les différents stades de processus de la Figure 40. Cependant, il n'est centré que sur les étapes qui correspondent à l'obtention des aldéhydes. La formation des acides apparaît en pointillés et ne correspond qu'à une étape supplémentaire de ce dernier.

1 et 2 : Adsorption dissociative

3 : Rupture de la liaison C-H en β de l'oxygène : formation d'un composé carbonylé et d'un H adsorbé

⇒ Le composé carbonylé désorbe.

(3' : Il est hydraté et réadsorbé (4'))

4 : Le dioxygène libère les sites métalliques en oxydant les H adsorbés en H_2O

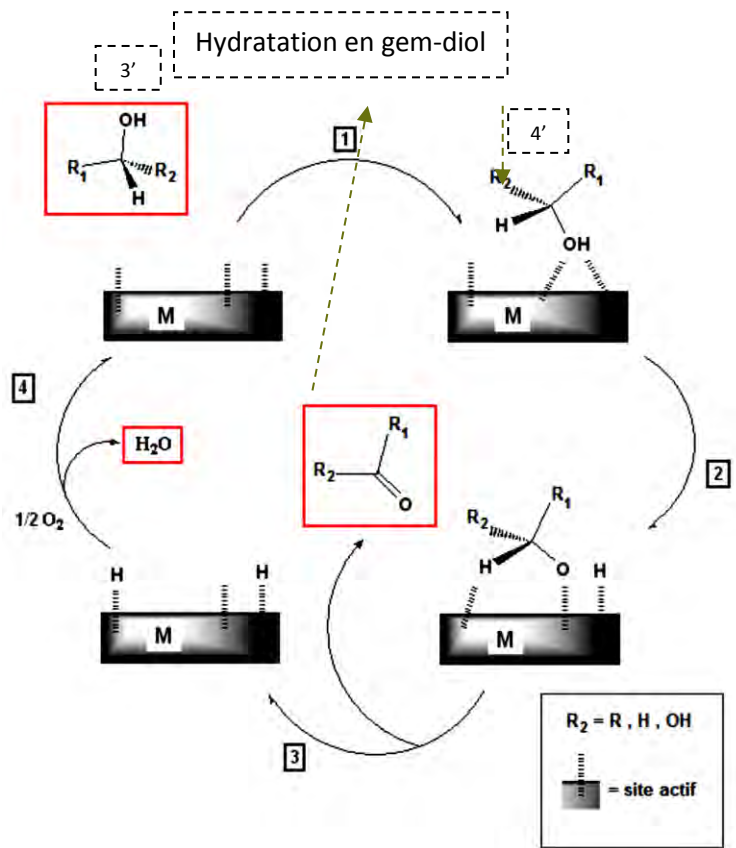


Figure 41 : Mécanisme d'oxydation général sur catalyseur métallique (Frassoldati, 2011)

D'une façon générale, l'ensemble des auteurs précédemment cités utilisent une quantité de base égale à deux et quatre fois la quantité de substrat, ce qui représente une proportion importante, et aboutit à des pH élevés entre 10 et 11. Les bases étant corrosives, l'utilisation de solutions aussi concentrées en NaOH représente un obstacle de taille pour l'utilisation de l'or en catalyse. Les liquides résultant de la synthèse sont moins bien recyclables, et demanderont un traitement supplémentaire coûteux, ou nécessiteront la mise en place de protocoles de sécurité pour de futures utilisations à l'échelle industrielle. Par ailleurs, ces conditions basiques ne sont pas compatibles avec le carbonate de glycérol dont la fonction carbonate est détruite au-delà d'un pH 7.

Il existe cependant des protocoles sans base oxydant le glycérol (Liang, et al., 2009). Mais, les métaux utilisés ne sont pas les plus sélectifs pour l'acide glycérique (Platine) et la technologie complexe requise pour la fixation sur support du platine tel que les nanotubes de carbone (Liang, et al., 2011) représente un savoir-faire difficile à mettre en place et coûteux. Enfin, du fait de leur plus faible efficacité (sélectivité de 47 % pour l'acide glycérique pour une conversion de 50% du glycérol), ces protocoles n'ont pas été choisis.

Enfin, les protocoles avec l'or demandent la mise en place de pressions considérables (6 à 30 bars) incompatibles avec les exigences et le matériel de l'entreprise (Taarning, Madsen, Marchetti, Egeblad, & Christensen, 2008) (Brink, Arends, & Sheldon, 2000).

Il est également à noter que les métaux sont fixés sur support dans le but de les séparer et les recycler de façon efficace après l'oxydation du glycérol. Des produits comme le THPC (chlorure de tétrakis hydroxyméthyl phosphonium) sont ainsi employés pour la fixation d'or (méthode sol ou déposition/précipitation) sur du carbone ou encore sur les oxydes comme l'oxyde de titane TiO_2 ou l'oxyde d'aluminium Al_2O_3 (Demirel-Gülen, Lucas, & Claus, 2005), (Sobczak, Jagodzinska, & Ziolek, 2010). Ce produit étant toxique, il est exclu de la démarche verte engagée dans le cadre de cette thèse.

En conclusion, les métaux précieux n'ont donc pas été retenus pour nos travaux car même s'il s'agit d'une voie efficace pour la production d'acides carboxyliques, elle n'est pas compatible avec les contraintes du projet même en ne considérant que le cas du glycérol. En effet, les catalyseurs à base de métaux précieux ont une disponibilité qui restent encore trop réduite tant à cause de leurs prix que de leurs stocks, les rendant non renouvelables.

1.2.2.1.2 Oxydation des substrats en présence de métaux non nobles

Les métaux non nobles comme le fer, le cuivre ou encore le magnésium ou l'aluminium sont devenus une alternative non négligeable face aux métaux nobles dans le cas de l'oxydation. Le coût et la disponibilité sont des avantages à leur utilisation. Leur mise en œuvre demande des conditions plus douces. Ainsi, les pressions sont comprises entre la pression atmosphérique et 10 bar et les températures entre 60 et 100°C. Enfin, le milieu réactionnel peut-être de l'eau (Lahtinen, et al., 2007). Les travaux de la bibliographie désignent le cuivre, le magnésium, le fer comme principaux candidats. C'est essentiellement le cuivre qui semble le plus intéressant (Lahtinen, et al., 2007) (Zhou, et al., 2011).

1.2.2.1.2.1 Oxydation avec un système HDL (double couche lamellaire hydroxyde)

Contrairement aux métaux nobles, les métaux non nobles ne sont pas fixés sur supports minéraux (charbon actif comme présenté par Anderson, Griffin, Johnston, & Alsters, Al_2O_3 utilisé par Royker, Case, & Van Steen) ou organique (tel que le graphite indiqué par Dimitratos, Porta, & Prati) qui requièrent les méthodes habituelles de fabrication : imprégnation, sol-immobilisation, précipitation (Porta & Prati, 2004) etc.) (Anderson, Griffin, Johnston, & Alsters, 2003) (Royker, Case, & Van Steen, 2012). (Dimitratos, Porta, & Prati, 2005). Ils sont souvent intégrés dans une structure tridimensionnelle. Celle-ci peut être nommée HDL (« double couche lamellaire hydroxyde ou « double layered hydrotalcite »), qui pourrait se rapprocher de la structure d'une argile et qui est construite de façon à avoir une architecture basée sur un motif Cuivre-Aluminium-Magnésium (Figure 42).

Cette architecture formée par trois métaux à l'avantage de permettre le « dopage » de l'activité du catalyseur, notamment avec le cuivre comme métal actif car il a le plus d'impact sur l'amélioration de la catalyse et renforce la sélectivité pour l'acide glycérique. Ainsi, le cuivre a été choisi comme composant du catalyseur parmi tous les autres métaux testés comme le cobalt, le zinc ou encore le molybdène (Zhou, et al., 2011).

Le cristal HDL se forme de la même façon, quel que soit le métal ajouté dans l'ensemble X-Mg-Al (avec le métal actif nommé X, Figure 42) (Chun-Hui Zhou, 2011), ce qui signifie que le perfectionnement de l'activité du catalyseur est bien dû au cuivre.

La catalyse de l'oxydation du glycérol sur le HDL est décrite comme suit par les auteurs :

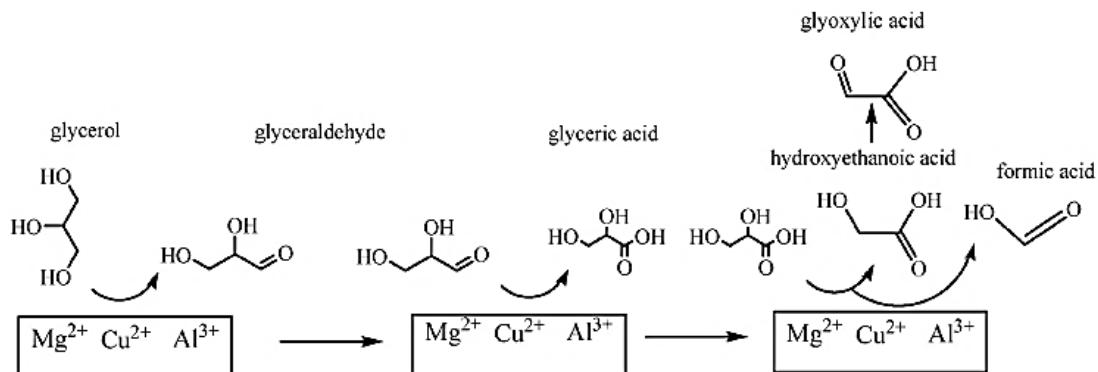


Figure 42 : Hypothèse du déroulement de la catalyse sur l'ensemble du HDL (ratio des métaux Mg/Cu/Al 20/100/200) (Zhou, et al., 2011)

Le mécanisme d'oxydation est mal connu pour le moment. Le glycérol est facilement adsorbé sur la surface du catalyseur grâce à ses fonctions alcools primaires. Le cuivre reconnaît alors très bien les groupements hydroxyles terminaux, et oxyde le substrat en glycéraldéhyde. Ce dernier agirait comme un intermédiaire, plus actif que le glycérol, et serait oxydé en acide glycérique (Zhou, et al., 2011).

Un traitement par calcination améliore en outre les capacités du HDL en provoquant le collapse de la structure du catalyseur. Ce processus donne naissance à des particules en forme de plaques à l'origine de la macroporosité dans le catalyseur. Tandis que l'agrégation de l'organisation lamellaire du HDL fournit des pores en forme de fente, source de microporosité dans le catalyseur.

En outre, le cuivre est alors sous forme d'oxyde (+II), plus actif que sous forme $\text{Cu}(\text{OH})_2$ dans le HDL non calciné (Zhou, et al., 2011). Ainsi traité, le HDL présente des espèces actives bien dispersées ce qui augmente de 86 à 97,3% la conversion du substrat, ici le glycérol, et de 47 à 72 % la sélectivité pour l'acide glycérique.

Grâce à ses fortes conversions et sélectivité pour l'acide glycérique, ce protocole a été retenu mais ne sera effectué que dans le cas du glycérol car il requiert l'utilisation importante de soude incompatible avec l'oxydation du CG.

Il existe en outre une autre façon de protéger les métaux non nobles des altérations de la catalyse. Pour cela, il est possible d'employer un complexe de protection qui viendra se placer autour du métal afin de le conserver dans un état actif.

1.2.2.1.2.2 Oxydation avec un métal inclus dans un complexe de protection

Le métal actif peut être complexé dans une structure rigide (Figure 43) afin de le protéger du phénomène de réduction, lui faisant perdre son activité catalytique. Le dioxygène vient comme accepteur final d'électrons et régénère le complexe C1-Cu(II) et le TEMPO (2,2,6,6-Tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy (Figure 44), réduits après l'oxydation de l'alcool (Velusamy, Srinivasan, & Punniyamurthy, 2006).

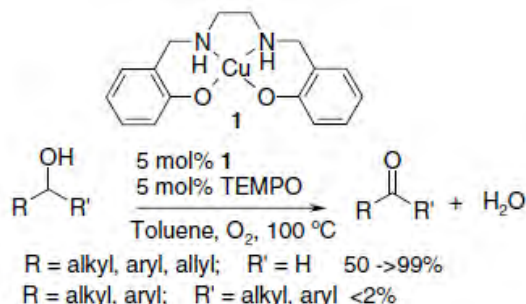


Figure 43 : Complexe C1 contenant du cuivre (Cu (II)) (Velusamy, Srinivasan, & Punniyamurthy, 2006)

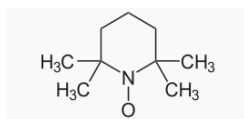


Figure 44 : TEMPO

Le complexe de cuivre(II)C1 (Figure 43), est parfois associé à un ETM « electron transfer mediator », c'est-à-dire une navette à électrons (Velusamy, Srinivasan, & Punniyamurthy, 2006) qui remplit le rôle de transporteur d'électrons : il s'agit ici de la molécule nommée TEMPO. Ces protocoles sont effectués dans le cadre de l'oxydation des alcools primaires avec une bonne efficacité : à titre d'exemple, pour 25 heures de réactions dans le cas d'une molécule peu réactive comme le décanol, les auteurs obtiennent 84 % de rendement en l'aldéhyde correspondant. Par ailleurs, certains protocoles utilisent des hydrazines comme ETM (Marko, et al., 1999). Ces substances étant toxiques, les protocoles les utilisant ont été exclus.

Il existe d'autres chélatants de protection des métaux non-nobles comme le DAPHEN qui peut se coordiner à du cuivre, du fer ou du cobalt pour réaliser l'oxydation des alcools primaires (Lahtinen, et al., 2007). Cependant, cette molécule a une faible durée de vie (deux heures) pour envisager plusieurs recyclages ce qui n'est pas compatible avec nos attentes. La 1,10-Phénanthroline (Figure 45) est aussi un ligand utilisé dans les travaux de Biswas, et al., pour protéger les métaux comme le Fe(III), ou encore le cuivre comme dans le cas des expériences de Marko, et al. (Biswas, et al., 2012), (Marko, et al., 1999). Mais cette molécule étant classée toxique (T), elle ne peut pas être employée.

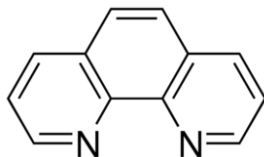


Figure 45 : 1,10 Phénanthroline

Il existe encore un autre chélatant fréquemment utilisé, la 2,2'-Bipyridine (Figure 46). Cette dernière est également toxique. Cependant, nous avons tout de même conservé le protocole décrit par Stahl, Hoover, & Shannon qui en contenait car celui-ci catalyse l'oxydation du DL-1,2-Isopropylidenglycerol (solkétal Figure 47) structuralement très proche du CG, et présente une forte sélectivité pour les alcools primaires (Figure 48) (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011). Le Solkétal est ainsi oxydé en l'aldéhyde correspondant avec une conversion totale et un rendement de 79%.

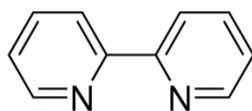


Figure 46 : 2,2-Bipyridine

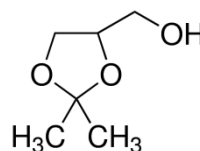


Figure 47 : Solkétal

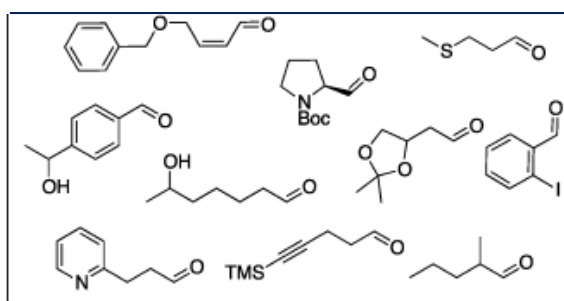


Figure 48 : Ensemble des aldéhydes formés par l'oxydation des alcools correspondants

Le protocole proposé par Stahl, Hoover, & Shannon est issu d'une compilation des trois mécanismes les plus courants de la bibliographie impliquant l'oxydation des alcools via le cuivre : selon « Semmelhack », selon « Sheldon » et selon « Markó » (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011). L'étude croisée des protocoles de référence permet aux auteurs de proposer le système **(bpy)Cu/TEMPO/NMI** (Figure 49), établi en retirant le « meilleur » de chaque proposition (Gamez, Arends, Reedijk, & Sheldon, 2003), (Semmelhack, Schmid, Cortes, & Chou, 1984).

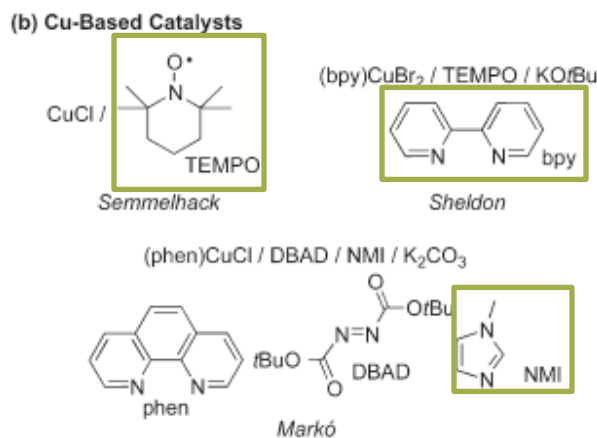


Figure 49 : Représentation des différents système d'oxydation des alcools par le cuivre en présence d'oxygène (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011). En vert : les réactifs retenus pour le protocole de la publication

Stahl, Hoover, & Shannon justifient leurs choix de réactifs par plusieurs points. Tout d'abord, les auteurs indiquent que l'utilisation de sels de Cu(+I) avec des anions non coordonnés donne de bons résultats pour l'oxydation des alcools en aldéhydes et sont plus efficaces que ceux de Cu(+II) (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011). Ce sel est nommé CuOTf (cuivre triflate). Ce dernier peut convenir pour l'oxydation des alcools primaires même dans le cas des diols car le système est plus sélectif des fonctions alcools primaires que secondaires. Nous remarquons donc une augmentation du rendement en aldéhyde lorsque Cu(+II) est remplacé par Cu(+I) comme source de cuivre (Hoover, Bradford, & Stahl, 2013). Par ce système, Stahl, Hoover, & Shannon améliorent la réactivité des catalyseurs pour les alcools aliphatiques par rapport par exemple au système de Gamez, Arends, Reedijk, & Sheldon, (Figure 49), très peu réactif pour ces espèces.

Les travaux de Hoover, Bradford, & Stahl indiquent en outre que le couple Cu/TEMPO, dans le système (bpy)Cu^I/TEMPO/NMI, permet l'oxydation de tous les alcools même aliphatiques ou désactivés (Hoover, Bradford, & Stahl, 2013). Ce point est important dans notre cas puisque ce protocole a été sélectionné pour être pratiqué avec le CG, fragile et peu réactif au niveau de sa fonction alcool primaire.

Par ailleurs, ce protocole de compilation présente plusieurs avantages par rapport aux protocoles dont ils sont issus. Le chlore (« Semmelhack » Figure 49) et la 1,10 phénanthroline, produits toxiques ou complexe à retraiter, sont ainsi évités tout comme le fluorobenzène remplissant le rôle de solvant dans le protocole de « Markó » Figure 49 (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011). La bipyridine a en revanche été choisie car sa présence stimule la réaction avec les alcools aliphatiques. De plus, cette dernière et l'acétonitrile sont des stabilisants de Cu^I (Hoover, Bradford, & Stahl, 2013).

La base NMI utilisée est également importante car associée au cuivre, elle fournit le système le plus actif (Molinari, Maldotti, Bratovcic, & Magnacca, 2013; Molinari, Maldotti, Bratovcic, & Magnacca, 2013). Enfin, ce mécanisme semble limiter la suroxydation des produits (Isaiah, 2011).

Le mécanisme proposé pour la réaction est le suivant :

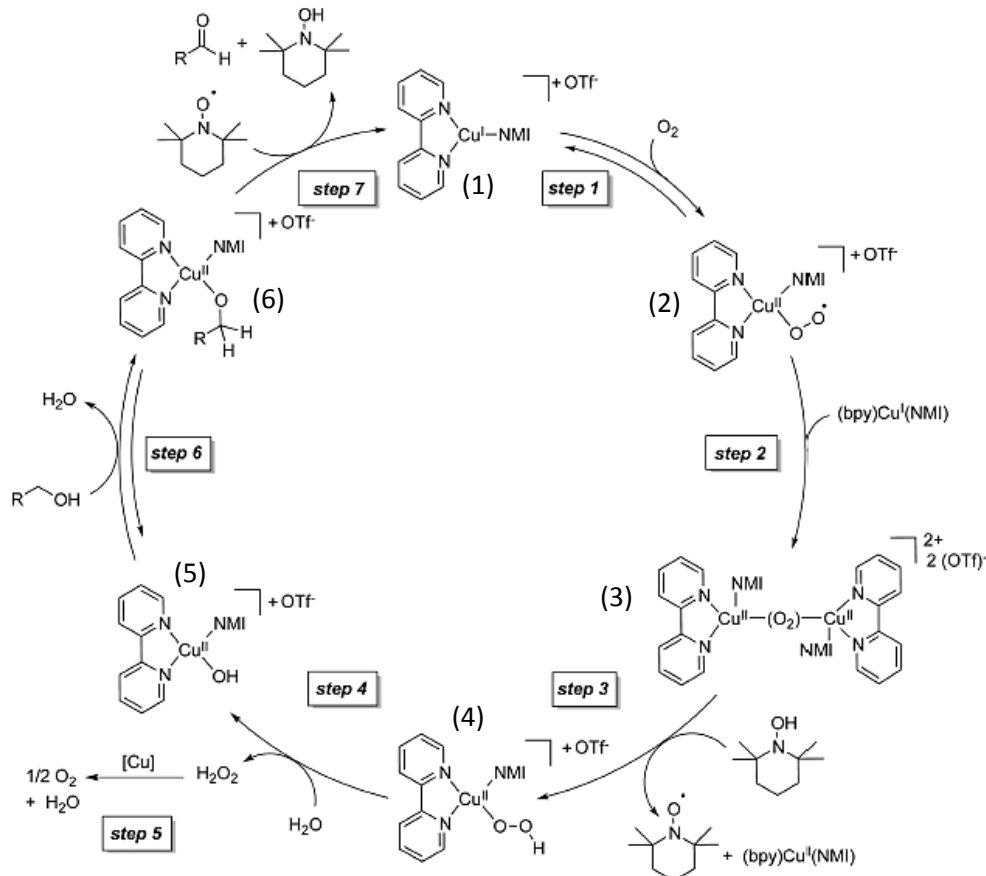


Figure 50 : Mécanisme de réaction proposé pour l'oxydation des alcools primaires en présence de TEMPO (Hoover, Bradford, & Stahl, 2013)

En début de réaction, le cuivre coordine le doublet non liant de l'imidazole (NMI). Son degré d'oxydation reste donc de +I. Le triflate, en tant que contre-ion vient s'associer au cuivre dans cet état. Au cours de l'étape 1, ce complexe (1) réagit avec le dioxygène de l'air : le cuivre se coordine au dioxygène, s'oxyde et lui donne un électron. Il devient donc Cu (+II) et forme la molécule (2), où le ligand dioxygène est sous forme $O_2^{\bullet-}$. Ce dernier remplit donc le rôle de ligand auprès du cuivre en plus du triflate car il y est coordonné.

Au cours de l'étape 2, un second équivalent du complexe (1) vient se coordiner avec le deuxième atome d'oxygène, s'oxyde et donne un électron à O^{\bullet} . La molécule (3), qui contient O_2^{2-} est alors formée (Figure 51).

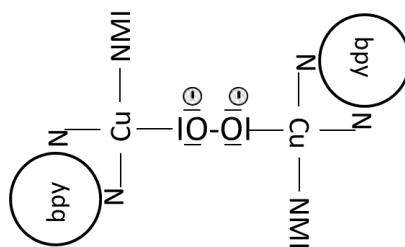


Figure 51 : molécule (3) développée avec les azotes (N) appartenant à la bipyridine (bpy)

Durant l'étape 3, O_2^{2-} réalise une abstraction d'un atome d'hydrogène sur le TEMPOH. La liaison TEMPO-H subit alors une rupture homolytique aboutissant à la formation de TEMPO• et d'un ligand peroxyde (Figure 52) sur la molécule (4) ce qui provoque la libération d'un équivalent du complexe (1).

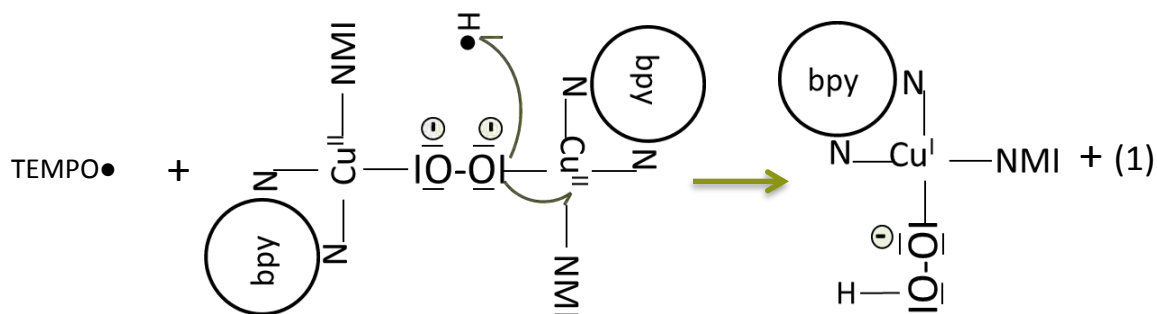


Figure 52 : Formation du ligand peroxyde à partir de la molécule (3) au cours de l'étape 3 et donnant (4)

Au cours de l'étape 4, une molécule d'eau (mais cela peut aussi être un alcool) réagit avec le complexe (4) pour donner le composé (5) et du peroxyde d'hydrogène. Pendant l'étape 6, il y a un échange de ligands entre le ligand hydroxyde et le ligand alkoxyde libérant une molécule d'eau, formant alors la structure (6) au sein de laquelle a lieu l'oxydation de l'alcool et la réduction du cuivre (+II) en (+I).

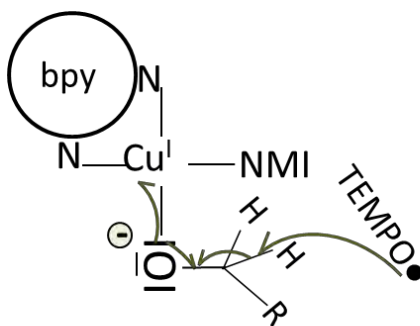


Figure 53 : Oxydation de l'alcool par la coopération Cu/TEMPO au cours de l'étape 7

En effet, au cours de l'étape 7, le TEMPO• se régénère sous forme TEMPOH en réalisant l'abstraction d'un atome d'hydrogène sur le carbone de l'alcool. L'électron « restant » est alors récupéré par l'oxygène, ligand du cuivre (+II), qui transfère en parallèle un de ses électrons au centre cuivre et réduit ainsi le métal (Figure 53), qui retrouve son état d'oxydation de départ (1).

La compréhension de ce mécanisme et les observations faites à partir de ce dernier nous permettent de conclure que l'implication de la formation d'un cation oxoammonium issu de TEMPO existe et est possible dans de nombreuses catalyses avec le cuivre (comme c'est le cas chez les enzymes). Cependant, dans le cas présenté ici, le TEMPO ne prend pas cette forme dans la réaction. En effet, nous constatons qu'afin que le mécanisme soit possible, le cuivre(+II) doit être capable d'oxyder TEMPO. Seul dans le milieu, le métal en est capable. Cependant, en présence de bpy, son potentiel redox passe de +0.66V à -0.18V. De plus, lorsque la base NMI est ajoutée, le potentiel du couple Cuivre(+II)/Cuivre(+I) chute à -0.32V. Dans ces conditions, le métal ne peut plus oxyder le TEMPO. Ce fait témoigne que le cuivre ne peut-être l'oxydant actif de la catalyse et du TEMPO et donc que le mécanisme de réaction ne passe pas par la formation d'un cation oxoammonium (Figure 54), (Hoover, Bradford, & Stahl, 2013).

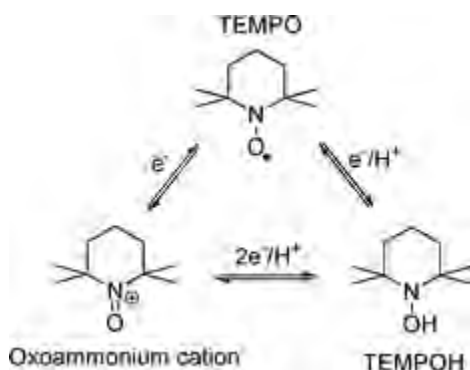


Figure 54 : Les trois formes du TEMPO

1.2.2.1.2.3 Association de métaux

Peu de protocoles proposent d'associer des métaux pour la catalyse. Zhou et al. utilisent (comme vu précédemment) trois métaux formant un agencement particulier nommé HDL (Zhou, et al., 2011). Mais, en réalité, seul le cuivre est actif dans cet ensemble, les deux autres métaux jouant uniquement un rôle de structurant (Zhou, et al., 2011). Cependant, d'autres auteurs utilisent simultanément plusieurs métaux, ayant cette fois tous une activité catalytique au cours de la réaction. Le cuivre sous forme nitrate $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2]$ peut ainsi être employé comme régénérant adjoint à un complexe de molybdène $[\text{MoO}_2(\text{acac})_2]$ qui constitue le catalyseur (Piera & Bäckvall, 2008). Mais la sélectivité et les rendements étant très faibles pour les alcools aliphatiques, ce protocole a été exclu.

Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero, proposent une autre association qui sera retenue pour l'oxydation de nos substrats : Les auteurs effectuent l'oxydation d'alcools, sous conditions douces, grâce au duo $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ et $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ou au duo $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ et $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero, 2001). Nous pouvons noter qu'ici les métaux sont maintenus dans leur état oxydé et donc actif grâce au ligand NO_3^- . Du TEMPO est également ajouté. Il passe sous forme oxoammonium dans un milieu riche en acide acétique.

Le couple catalytique oxyde les alcools en aldéhyde/cétone selon les étapes suivantes :

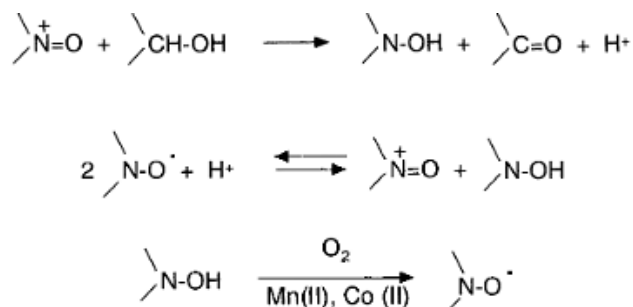


Figure 55 : Oxydation des alcools grâce à la coopération TEMPO/ [Mn(NO₃)₂] et [Co(NO₃)₂] (Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero, 2001). Le mécanisme est le même pour [Mn(NO₃)₂] et [Cu(NO₃)₂]

La réaction donne de bons résultats pour l'oxydation des alcools primaires en acides carboxyliques. Le cyclohexanol, peu réactif est converti à 98%.

Cependant, des freins à l'utilisation de métaux non-nobles ont été identifiés. Le protocole proposé par Velusamy, Srinivasan, & Punniyamurthy, utilise du toluène (Velusamy, Srinivasan, & Punniyamurthy, 2006). Des solvants comme le PhCF₃ (trifluorotoluène) sont par ailleurs employés et jouent un rôle clef dans l'augmentation des rendements, ils ne sont donc pas remplaçables (Wang, Liu, Chen, & Liang, 2005).

1.2.2.1.3 Conclusion

Trois protocoles sont retenus à l'issue de cette première étude :

Le protocole décrit par Zhou, et al., et qui met en jeu le HDL cuivre, aluminium magnésium en présence de soude sera uniquement testé sur le glycérol (Zhou, et al., 2011). Il sera nommé CC21.

Le protocole décrit par Stahl, Hoover, & Shannon et qui utilise du cuivre protégé par de la bipyridine en présence de TEMPO sera testé uniquement sur carbonate de glycérol étant donné la similitude qui existe entre les substrats utilisés dans la publication et le CG (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011). Il sera nommé CC29.

Le protocole décrit par Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero et mettant en jeu le duo nitrate de cuivre et nitrate de manganèse associé à l'ETM TEMPO sera testé sur glycérol et carbonate de glycérol du fait de sa spécificité pour les alcools primaires dans des conditions en accord avec nos contraintes (Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero, 2001). Il sera nommé CC33.

Les métaux ne sont pas la seule voie pour réaliser l'oxydation des substrats. Il existe un autre type de synthèse, inspirée du vivant et mettant en jeu des catalyseurs d'origine naturelle : les enzymes.

1.2.2.2 Sélection des protocoles par voie chimio-enzymatique

La catalyse enzymatique fait appel à des catalyseurs naturels, protéiques, extraits le plus souvent des cellules. Elles font donc partie des ressources renouvelables et biodégradables. D'autre part, ce genre de catalyseur travaille dans des conditions douces (température et pression faibles).

En effet, les enzymes étudiées par la suite nécessitent des pH doux qui se situent à peu près dans leurs optimums de pH. Ainsi, dans les cas étudiés, la gamme de pH se situe entre 5,5 et 9 (les pH 8 et 7 sont les plus employés si l'on prend en compte toutes les enzymes sélectionnées au départ). La gamme de température est comprise entre 20 et 50°C, ce qui est tout à fait raisonnable d'un point de vue énergétique et facile à mettre en œuvre, tout comme la pression qui est atmosphérique.

Enfin, aucun solvant organique n'est ajouté. Le milieu réactionnel est seulement constitué d'eau. Selon les cas, un tampon non toxique pourra être utilisé pour stabiliser le pH (bicine, tris, l'acétate de sodium, l'oxalate de sodium). Ainsi, contrairement à la catalyse chimique qui réclame des pH plus basiques et surtout une quantité de base importante, la catalyse enzymatique se déroule dans des conditions proches du vivant.

1.2.2.2.1 Screening des enzymes candidates

Les enzymes qui nous intéressent sont celles qui sont capables d'oxyder les alcools primaires et en particulier le glycérol, aucune n'étant décrite dans le cas du CG.

La majorité des enzymes capables d'oxyder les alcools sont des métalloenzymes. Elles se caractérisent par la présence d'un groupe dit prosthétique qui contient le plus souvent un métal pris dans une structure rigide (Figure 56) et d'un groupe apoprotéique, partie purement protéique qui forme une poche protectrice autour de l'ensemble contenant le métal (Figure 57).

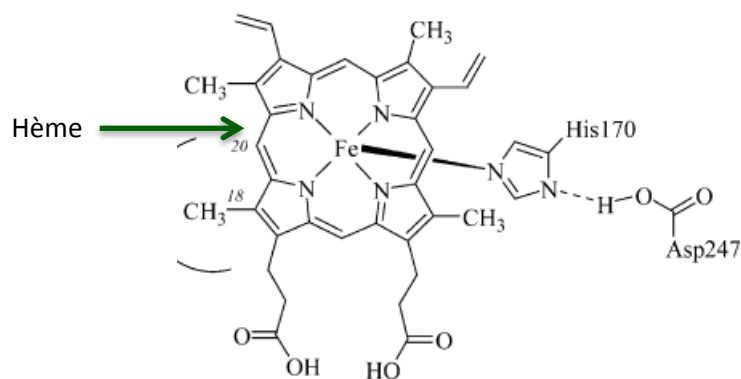


Figure 56 : Exemple de l'hème de la Horseradish peroxydase (HRP) (Veitch, 2004)

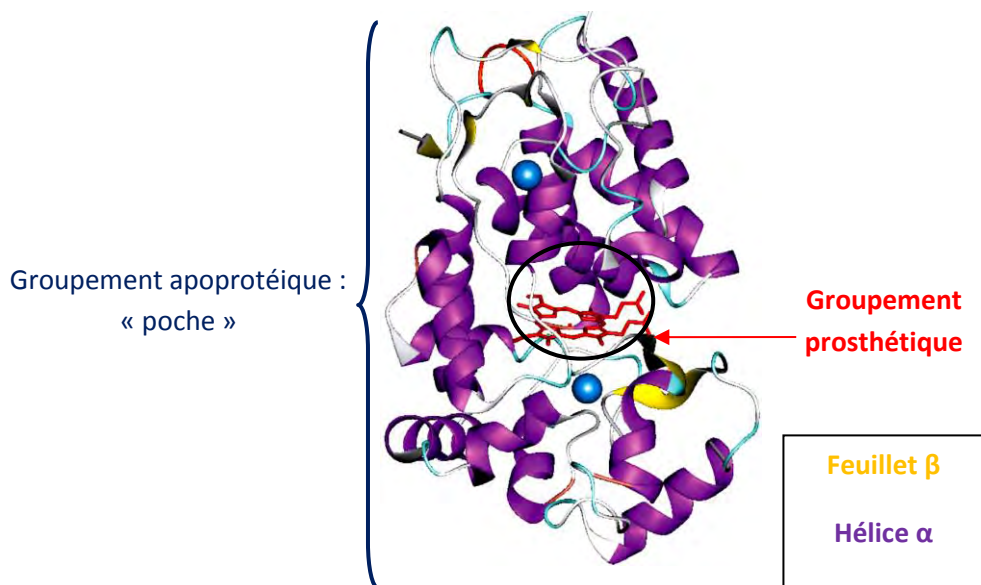


Figure 57 : Représentation en trois dimensions de la structure de la HRP par diffraction des rayons X (Veitch, 2004)

Il existe dans les métalloenzymes, la grande famille des oxydoréductases (code : EC 1.). Cette famille se compose de deux catégories d'enzymes pouvant oxyder les alcools : les déshydrogénases et les oxydases. Cependant, nous conserverons seulement les oxydases car les déshydrogénases oxydent préférentiellement les fonctions alcools secondaires, contribuant à la formation de DHA à partir du glycérol (Arechederra & Minteer, 2009), (Lin & Magasanik, 1960). Ce degré d'oxydation n'est pas recherché pour les travaux de thèse. De plus, celles-ci nécessitent souvent l'utilisation de cofacteurs (Figure 58) type NAD(P)/NAD(P)H₂ (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (Figure 59), chers et souvent fragiles (Gerstenbruch, et al., 2012).

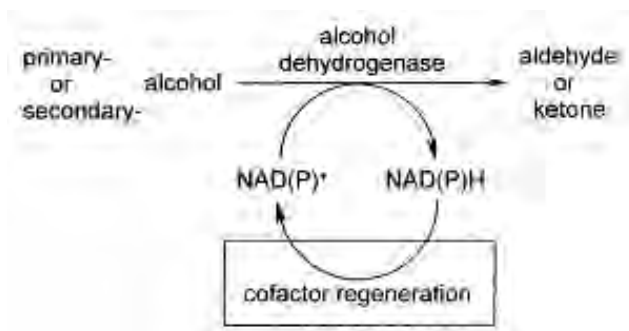


Figure 58 : Mode de fonctionnement des déshydrogénases : illustration de la dépendance au NADP (Kroutil, Mang, Edegger, & Faber, 2004)

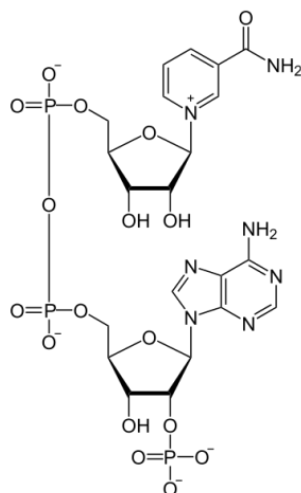


Figure 59 : NADP+ : Nicotinamide adénine dinucléotide

Seules les oxydases sont conservées car celles-ci oxydent sélectivement les alcools primaires (Brevet n° US4353987 A, 1982). Dans toute cette catégorie, certains critères ont permis d'affiner la sélection des oxydases candidates. Ainsi cinq oxydases, capables d'oxyder sélectivement les fonctions primaires des alcools, fonctionnant sans cofacteur et mettant en jeu des substrats identiques ou proches du glycérol (glycérol, alditol et glyoxal) ont attiré notre attention :

- la glycérol oxydase (Lin, Chiou, & Tsai, 1996), (Uwajima, Shimizu, & Terada, 1984), (Japon Brevet n° US4266023 A, 1981)
- la galactose oxydase (Siebum, van Wijk, Schoevaart, & Kieboom, 2006), (Klibanov, Alberti, & Marletta, 1982)
- la glyoxal oxydase (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012)
- la laccase (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009)
- l'alditol oxydase (Gerstenbruch, et al., 2012) (van Hellemond, et al., 2009)

Cependant, la glycérol oxydase (EC 1.1.3.21) n'est disponible chez aucun fabricant et l'alditol oxydase (EC 1.1.3.41) a été fabriquée à façon par les auteurs (Brevet n° US4353987 A, 1982). Ces enzymes ont donc été écartées. Ainsi, dans une première sélection, nous avons conservé la galactose oxydase, la laccase et la glyoxal oxydase.

Une étude plus approfondie du déroulement des réactions de catalyse de ces trois enzymes a par la suite été effectuée afin de confirmer ou d'infirmer ces choix.

1.2.2.2.2 Etude des réactions mettant en jeu les enzymes candidates

1.2.2.2.2.1 Mécanisme général de la réaction sur le substrat

Les enzymes fonctionnent majoritairement avec un hème contenant un métal actif tel que le cuivre (laccase) ou un ligand associé à du cuivre (galactose oxydase, glyoxal oxydase) (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012) (Siebum, van Wijk, Schoevaart, & Kieboom, 2006). Un protohème IX au fer associé à du cuivre peut aussi former la structure active (glycérol oxydase I et II) (Uwajima, Shimizu, & Terada, 1984).

Au cours de la catalyse, les enzymes peuvent arrêter l'oxydation dès la formation de l'aldéhyde, ou poursuivre pour aboutir à l'acide carboxylique. En effet, les aldéhydes formés au cours de l'oxydation par les enzymes (glyoxal et alditol oxydase) sont ensuite hydratés pour former des diols géminaux (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012) (van Hellemond, et al., 2009). Cette hydratation fait « passer » les aldéhydes pour des alcools (Figure 60). Ainsi, la glyoxal oxydase reconnaît de nouveau le produit comme un de ses substrats (c'est-à-dire un alcool). Par conséquent, elle réalise une seconde oxydation sur le produit pour donner un acide carboxylique. Cependant, il est noté que les alcools cycliques par exemple ne peuvent pas s'hydrater au niveau du cycle. Ainsi, ce mécanisme a des limites (van Hellemond, et al., 2009).

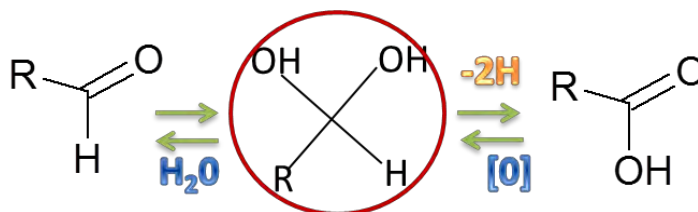


Figure 60 : Formation du diol géminaux par hydratation de l'aldéhyde avec oxydation successive en acide

Ce mécanisme général est par la suite étudié plus précisément.

1.2.2.2.2.2 Présentation des coopérations indispensables aux oxydations catalysées par voie enzymatique

Les enzymes candidates se caractérisent toutes par le fait qu'elles ne peuvent, seules, oxyder le glycérol. En réalité, elles font partie d'un système coopératif. Dans le cas de la laccase, son substrat spécifique n'est pas le glycérol. Elle n'est donc pas en mesure de l'oxyder directement. La galactose oxydase et la glyoxal oxydase quant à elles sont capables de reconnaître le glycérol comme substrat mais nécessitent la présence d'une ou plusieurs autres enzymes pour continuer leur activité (élimination de coproduits nuisant à l'intégrité des enzymes, régénération des catalyseurs). Il s'agit d'une coopération entre enzymes.

1.2.2.2.2.1 *Coopération enzyme/enzyme*

La galactose oxydase, la glyoxal oxydase (ou la glycérol oxydase), provoque la formation de peroxyde d'hydrogène au cours de leurs activités (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012) (Japon Brevet n° US4266023 A, 1981) (Franssen, Steunenberg, Scott, Zuilhof, & Sanders, 2013). Le peroxyde d'hydrogène est un agent d'altération puissant des enzymes et un facteur de suroxydation de l'acide glycérique (ou du glycéraldéhyde) aboutissant à la formation d'acide tartronique ou mésoxalique (Figure 61). Ainsi, pour éviter la formation de coproduits indésirables les enzymes fonctionnent souvent en duo ou trio.

Une catalase (EC 1.11.1.6), métalloenzyme, oxydoréductase à hème de fer permettant la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau par l'utilisation de dioxygène est donc associée aux autres enzymes afin de détruire le peroxyde d'hydrogène formé (Figure 62).

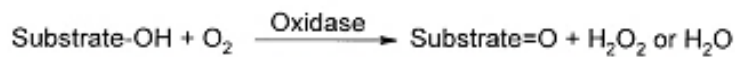


Figure 61 : Formation de coproduits au cours de l'oxydation par certaines oxydases (Kroutil, Mang, Edegger, & Faber, 2004)

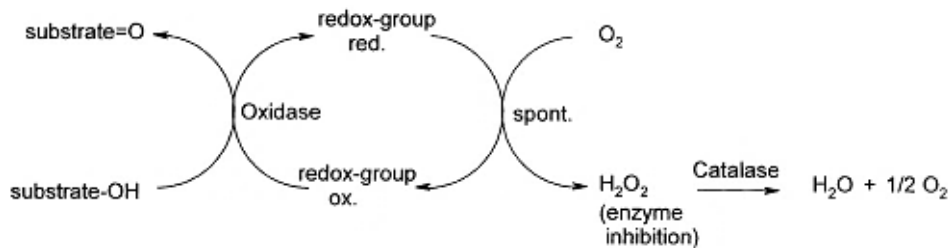


Figure 62 : Elimination du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ par une catalase (Kroutil, Mang, Edegger, & Faber, 2004)

Cependant, la glyoxal oxydase nécessite des coopérations supplémentaires pour fonctionner.

1.2.2.2.2.2 *Coopération enzyme/métaux/enzyme*

Au cours de l'oxydation, des transferts d'électrons et d'ions H⁺ interviennent entre les métalloenzymes et leurs substrats. Il faut donc que les catalyseurs enzymatiques soient régénérés (par le retrait des électrons et des H⁺ acquis dans leur structure) pour entamer un nouveau cycle catalytique et oxyder une nouvelle molécule de substrat.

Ainsi, la glyoxal oxydase (notée GLOX par la suite) est par exemple associée à un couple de métaux Mn(II)/Mn(III) qui capte son surplus d'électrons une fois qu'elle les a retirés du substrat. Une Horseradish peroxydase (EC 1.11.1.7, métalloenzymes à hème de fer) régénère alors le couple métallique réduit. Enfin, une catalase intervient pour détruire le peroxyde d'hydrogène formée par l'activité de la GLOX (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012) (Figure 63).

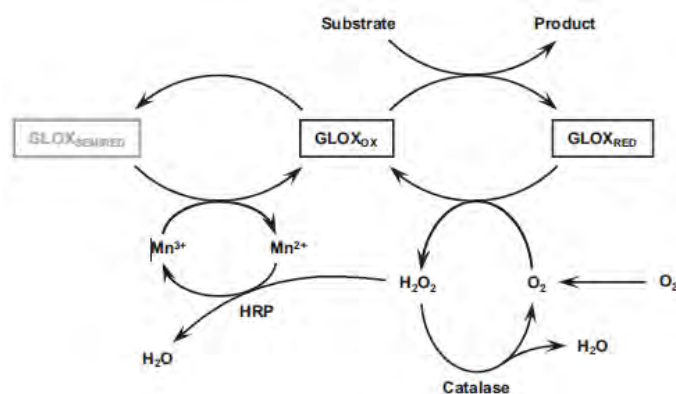


Figure 63 : Système proposé pour le trio biocatalytique enzymatique : Glyoxal oxydase (GLOX), Horseradish peroxydase (HRP) et Catalase (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012)

Ce problème de régénération des enzymes dans leur état oxydé (actif), peut aussi être assuré par l'utilisation de ferrocène (Figure 64) qui a la capacité de réoxyder sous conditions aérobies (par exemple) la galactose oxydase lorsque celle-ci a été réduite et ainsi de lui redonner sa configuration active (Kroutil, Mang, Edegger, & Faber, 2004).

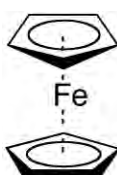


Figure 64 : Structure d'une molécule de ferrocène

Ainsi, Figure 63, la GLOX utilise directement le dioxygène comme accepteur d'hydrogène et d'électrons et produit donc du peroxyde d'hydrogène. Il est à noter que, sans toutes les structures « acceptrices » exposées, les enzymes restent parfois semi-réduites (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012). Le système ne fonctionne alors pas correctement. Il existe enfin des enzymes dont le glycérol n'est pas le substrat et qui ne le reconnaissent pas. Elles ne jouent alors plus le rôle d'oxydant mais de régénérant du véritable système oxydatif.

1.2.2.2.2.3 Système médiateur redox/enzyme : le cas de la laccase

Jusqu'ici ont été décrits des systèmes où l'enzyme oxyde directement le substrat puis est régénérée. Nous décidons de proposer un autre système faisant appel à une navette à électrons aussi nommée médiateur redox (ou ETM comme vu dans la partie précédente). Dans ce cas, l'oxydation du substrat est réellement effectuée par la navette, qui est par la suite réoxydée par l'enzyme. Ce système permet de s'affranchir des véritables substrats de l'enzyme et conduit donc à oxyder une plus large gamme d'alcools dont certains qui ne sont habituellement pas reconnus par l'enzyme. Ce point est intéressant en vue d'une application avec le CG. Ce principe est utilisé avec la laccase. En effet, contrairement à toutes les autres enzymes citées qui peuvent reconnaître et oxyder directement le glycérol, la laccase n'en est pas capable (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009).

Le système implique donc une navette qui transporte les électrons et une enzyme de régénération telle que la laccase (Kroutil, Mang, Edegger, & Faber, 2004). (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). Le dioxygène constitue alors l'accepteur final d'électrons (Figure 65).

La laccase (« p-diphenol : dioxygène oxidoreductase ») est capable d'oxyder naturellement une grande diversité d'alcools. Sa structure est basée sur quatre groupements contenant du cuivre dans des hèmes d'où son nom « d'oxydase multi-cuivre ». Elle agit comme un accepteur d'électrons et possède une performance accrue en présence de dioxygène dans le cadre de l'oxydation d'un substrat (Figure 65).

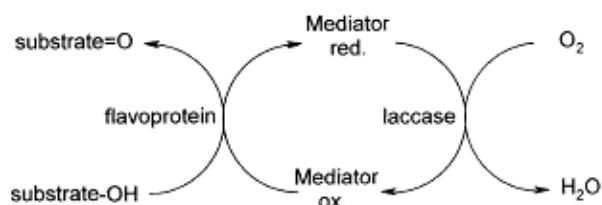


Figure 65 : Réoxydation des médiateurs redox grâce à la laccase (Kroutil, Mang, Edegger, & Faber, 2004)

Le composé chimique jouant le rôle d'unité de transfert d'électrons entre l'enzyme et l'alcool afin de faciliter la réaction est le TEMPO (Figure 66) non toxique et disponible. Il est associé à la laccase pour l'oxydation. Cette association laccase/TEMPO a une haute sélectivité pour les alcools (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009) (Franssen, Steunenbergh, Scott, Zuilhof, & Sanders, 2013).

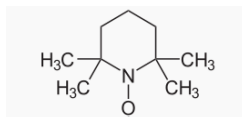


Figure 66 : TEMPO

Les navettes redox doivent présenter deux caractéristiques principales (Baminger, et al., 2001): fonctionner à basses concentrations et être actives avec les autres enzymes. De façon plus précise, la laccase active d'abord en oxydant le TEMPO en sa forme cationique correspondante, puis le régénère dans cet état lorsqu'il est sous forme réduite, c'est-à-dire après avoir oxydé l'alcool (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009).

1.2.2.2.3 Conclusion

La présentation des systèmes enzymatiques associés aux trois enzymes retenues nous permet de conclure que seule le système laccase/TEMPO proposé par Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz est intéressant dans le cadre de nos travaux (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). En effet, nous constatons que la galactose oxydase et la glyoxal oxydase nécessitent l'utilisation d'une ou deux enzymes supplémentaires et parfois d'un couple métallique ce qui représente un coût supplémentaire important et une mise en place plus complexe au niveau des réacteurs ce qui n'est pas réalisable avec le matériel d'Agronutrition.

Par ailleurs, le système laccase/TEMPO présente l'avantage de pouvoir oxyder une très large gamme de substrats (Klibanov, Alberti, & Marletta, 1982).

Enfin, contrairement à la plupart des autres protocoles, le système ici en jeu donne directement de l'acide glycérique alors que les autres ont tendance à s'arrêter à un degré d'oxydation inférieur c'est-à-dire au glycéraldéhyde et cela tout en conservant des rendements et des taux de conversion acceptables ou prometteurs.

Les deux facteurs limitants pour l'utilisation de l'enzyme se situent au niveau de la diffusion du dioxygène dans le milieu (Baminger, et al., 2001). Celui-ci n'est soluble que difficilement dans l'eau, milieu réactionnel enzymatique, et est nécessaire au processus de régénération du système catalytique puisqu'il constitue l'accepteur final d'électrons. Enfin, les temps de réaction sont souvent longs (20 à 72 heures). Il conviendra donc d'essayer de traiter ces inconvénients dans la suite des travaux.

Enfin, le système de Liebminger, Siebenhofer et Guebitz, utilisant la laccase, se base sur une fabrication à façon de l'enzyme par *Trametes Hirsuta* (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). Celle-ci n'est pas disponible sur le marché. Nous l'avons donc remplacée par la laccase de *Trametes versicolor* qui est disponible, même à échelle industrielle, et qui constitue la plus proche parente en termes de structure et de réactivité de *Trametes Hirsuta*. Ainsi, dans tous les travaux de thèse, nous utiliserons la laccase de *Trametes versicolor* et le protocole dit « enzymatique » et utilisant le système laccase/TEMPO sera nommé CE6.

Nous proposons par la suite une description approfondie de la coopération laccase/TEMPO pour l'oxydation du substrat.

1.2.2.2.3 Description détaillée du mécanisme avec les catalyseurs laccase/TEMPO (CE6)

1.2.2.2.3.1 Présentation générale de la famille de la laccase

La laccase décrite par le protocole enzymatique d'oxydation du glycérol provient du champignon *Trametes hirsuta* (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). Elle appartient aux oxydases à cuivre multinucléaire ou oxydases multi-cuivres « bleue », du fait de la couleur obtenue lors de l'observation en spectroscopie d'un de ses sites cuivre (T1) qui absorbe fortement à 600 nm, donnant un bleu particulier (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002). Cette absorption intense est causée par la liaison covalente cuivre-cystéine (Witayakran & Ragauskas, 2009). La laccase de *Trametes hirsuta* n'étant pas disponible dans le commerce, nous utiliserons dans nos travaux sa plus proche cousine (structurellement) : la laccase de *Trametes versicolor* très disponible sur le marché. Cependant, des informations structurales précises sur *T. hirsuta* sont disponibles dans les travaux de Polyakov, et al (Polyakov, et al., 2009). Il est également possible de comparer les différentes oxydases multicuivres en fonction de leur origine grâce aux travaux de Sirim, Wagner, Wang, Schmid, & Pleiss (Sirim, Wagner, Wang, Schmid, & Pleiss, 2011).

D'une façon générale, les laccases (benzènediol : oxygène oxydoréductase) E.C 1.10.3.2, sont des enzymes robustes, capables de transformer une large variété de composés polymériques et phénoliques comme la lignine ou des substances humiques (Baldrian, 2006). Elles sont très utilisées dans divers domaines : le blanchiment du papier, la décoloration textile ou encore la dépollution (Riva, 2006) (Claus, 2004) (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006). Le vrai rôle biologique de la laccase se situe cependant dans la lignification et comme agents de défense des champignons lors de leurs attaques pathogènes sur les plantes (Mayer & Staples, 2002). Il est à noter que les laccases, en présence de médiateur (ETM), sont capables d'oxyder une gamme de substrats plus importante que seule (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002).

Plus précisément, les oxydases multicuivres, se caractérisent par la capacité de catalyser la réaction de réduction à quatre électrons du dioxygène en eau, couplée à l'oxydation à un électron de quatre molécules de substrat (Augustine, et al., 2008), (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002). L'enzyme est donc en accord avec les critères du projet puisque le dioxygène fait partie des oxydants souhaités et parce que le sous-produit de la réaction est de l'eau (non toxique, pas de suroxydation).

Nous proposons de présenter le fonctionnement global des laccases, associé aux spécificités de fonctionnement et de structure de celle issue de *T. versicolor*.

Une liste des noms des acides aminés (AA) sous leur forme abrégée et de leur correspondance est disponible en annexe p.313.

1.2.2.2.3.2 Composition générale des laccases et fonctionnement catalytique de *T. versicolor*

La laccase est une glycoprotéine présentant des résidus glycosidiques qui représentent entre 10 et 45% du poids pour les auteurs comme Claus et jusqu'à 86 et 91 % selon Yaropolov, Skorobogat'ko, Vartanov, & Varfolomeyev (Yaropolov, Skorobogat'ko, Vartanov, & Varfolomeyev, 1994) (Claus, 2004). Les sucres fréquemment rencontrés sont : le glucose, le mannose, le galactose, le fructose et l'arabinose, ainsi que des hexosamines (Yaropolov, Skorobogat'ko, Vartanov, & Varfolomeyev, 1994). Les auteurs ne s'accordent pas tous sur la masse de l'enzyme. Les principales différences se situent au niveau des résidus osidiques. Cependant, la laccase semble d'un commun accord avoir 499 AA et celles du genre *Trametes* possèdent 3 domaines polypeptidiques (nommés 1, 2 et 3) (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002). D'autre part, la masse de l'enzyme est aussi fonction de son origine biologique. Ainsi, la laccase provenant de *Trametes versicolor*, la plus proche cousine de *Trametes Hirsuta*, aurait par exemple une masse entre 43 et 66 KDa.

La laccase contient 4 atomes de cuivre. Ces atomes peuvent être classés en trois catégories différentes (qui s'opposent par leur accessibilité au solvant, leur signal en EPR) (Yaropolov, Skorobogat'ko, Vartanov, & Varfolomeyev, 1994) :

- Le cuivre de la catégorie 1 (Cu 1 ou T1) disponible pour l'action du solvant, comme par exemple l'eau, et responsable de la couleur bleue. Il peut être éliminé de l'enzyme par de nombreux complexant, ou être remplacée par du mercure ou du cobalt ce qui altère son activité,
- Le cuivre de la seconde classe (Cu 2 ou T2), est très facile à éliminer. La partie de la protéine environnant ce cuivre peut subir des changements conformationnels. Il peut être totalement exclu de la laccase en utilisant du cyanure et capable d'interagir avec les ponts disulfures de l'enzyme, modifiant la protéine. Une fois tous éliminés, il est impossible de réintégrer les cuivres de la catégorie 1 et 2. Cependant, le cuivre de la catégorie 3, une fois éliminé, peut être réintroduit dans l'apoenzyme.
- Les deux atomes de cuivre de la classe 3 (Cu 3 ou T3). Il existe en deux exemplaires dans la laccase : nommés α et β .

1.2.2.2.3.3 Structure générale de l'enzyme chez *T. versicolor*

D'après les auteurs Piontek, Antorini, et Choinowski, la structure primaire de la laccase est présentée Figure 67 : l'enzyme est constitué de 7 résidus de sucres sur l'ensemble de ses chaînes polypeptidiques et de 3 domaines (1, 2 et 3) dont l'ensemble a les dimensions suivantes : $65 \times 55 \times 45 \text{ \AA}^3$ (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002). L'enzyme possède également plusieurs ponts disulfures. Le premier (cystéine 85- cystéine 488) connecte le domaine 1 et le second connecte les domaines 1 et 2 (cystéine 117- cystéine 205). La rigidité de la molécule est conférée par les nombreuses liaisons hydrogène grâce aux atomes d'azote et aux fonctions carboxyliques terminales des acides aminés. D'autre part, la distribution électrostatique de la molécule montre que celle-ci possède une prédominance de charges négatives (en accord avec son point isoélectrique de 3,5 (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002).

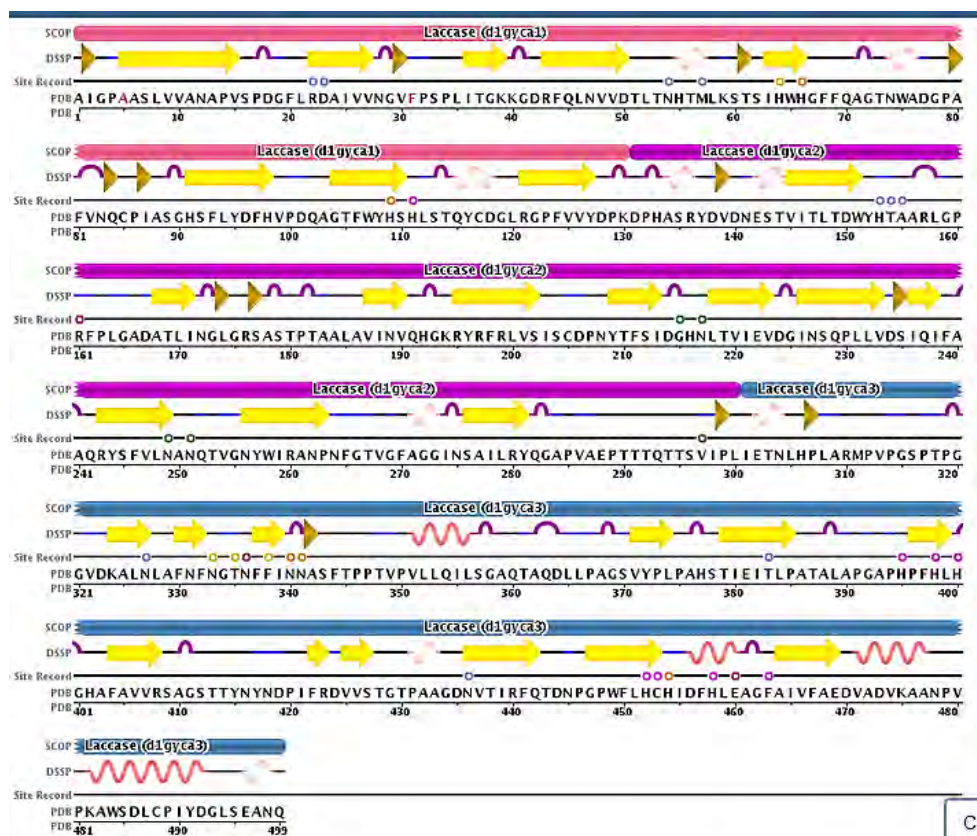


Figure 67 : Séquence polypeptidique de la laccase de *T. versicolor*

1.2.2.2.3.4 Présentation du site catalytique et de son fonctionnement : cas de l'enzyme chez *T. versicolor*

Le centre actif de la laccase est composé de quatre atomes de cuivre des trois familles précédemment citées : Cu T1, Cu T2 et deux Cu de la famille T3. (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002).

Le domaine 3 contient la cavité dans laquelle se trouve le cuivre T1, à environ 6,5 Å de profondeur en dessous de la surface de l'enzyme. T1 se trouve dans une dépression bien délimitée par un tour (ou « coude ») bêta du domaine 1 associé à deux tours bêta du domaine 3 impliqués dans la liaison avec le substrat. Pour cette raison, T1 est décrit comme étant le premier site accepteur d'électrons (Witayakran & Ragauskas, 2009).

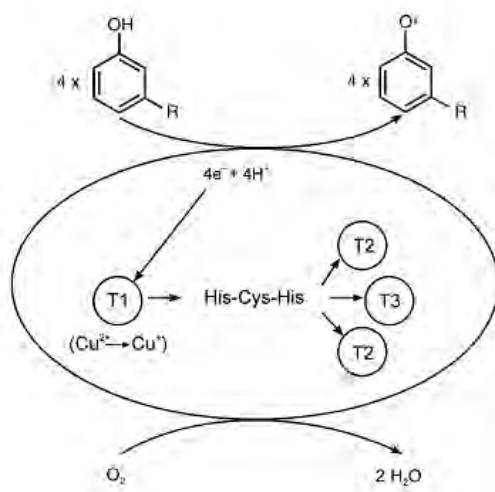


Figure 68 : Représentation simplifiée des relations entre les cuivres au cours de l'activité de la laccase lors de l'oxydation de quatre molécules de substrat (Baldrian, 2006)

De façon simplifiée les laccases possèdent donc un site catalytique constitué d'une structure nommée « cluster trinuéculaire » ou « TNC », comprenant les deux cuivres T3 et le cuivre T2, responsable de la réduction du dioxygène (Polyakov, et al., 2009) (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002) (Witayakran & Ragauskas, 2009). Et du centre d'oxydation du substrat : le cuivre T1 (domaine 3). Le TNC est porté par les domaines 1 et 3 de la protéine à 12 Å de profondeur (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002) (Yaropolov, Skorobogat'ko, Vartanov, & Varfolomeyev, 1994) (Witayakran & Ragauskas, 2009)), tandis que la poche de fixation du substrat contenant le cuivre T1 est positionnée entre le domaine 2 et 3 (Polyakov, et al., 2009). Le TNC et le cuivre T1 sont connectés par un tripeptide Histidine-Cystéine-Histidine (très conservé parmi les oxydases multicuivres bleues) (Figure 76) de 12 à 14 Å. Etant donc proches, les transferts intramoléculaires d'électrons entre eux sont facilités (Lalaoui, 2016).

Une étude plus fine de la structure du cluster révèle que les trois cuivres qui le composent sont disposés selon un triangle quasiment équilatéral (distances les uns des autres de l'ordre de 3,9 Å). C'est entre les deux cuivres T3 qu'est localisé le site de liaison au dioxygène. Le substrat se lie quant à lui à la protéine dans une petite cavité chargée négativement et proche de T1. Les charges présentes assurent la stabilisation du radical cationique du produit formé durant la catalyse (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002). Au total, six histidines coordinent les cuivres T3 du cluster de façon symétrique. Les cuivres possèdent chacun 4 ligands (géométrie tétraédrique tordue). Le cuivre T2 est relié par les azotes de ses deux ligands histidines et à un atome oxygène appartenant à une molécule d'eau (géométrie coplanaire trigonale) (Figure 69 et Figure 70).

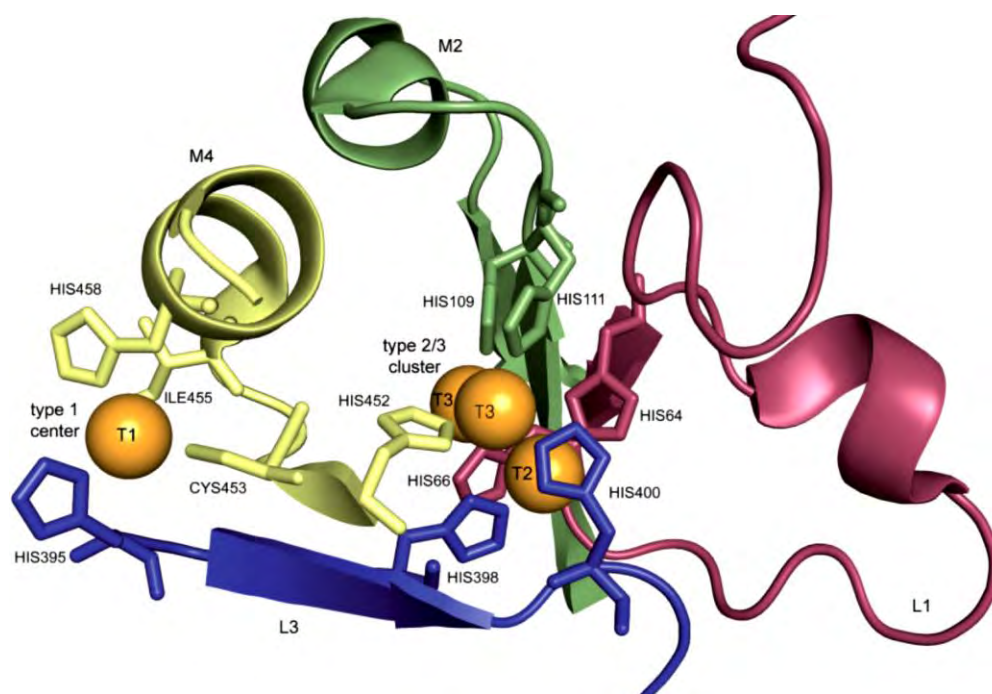


Figure 69 : Résidus liés au cuivre chez *T. versicolor*. Les centres cuivre sont en orange et les résidus interagissant avec le cuivre sont jaune, bleu, vert et rose foncé (Sirim, Wagner, Wang, Schmid, & Pleiss, 2011).

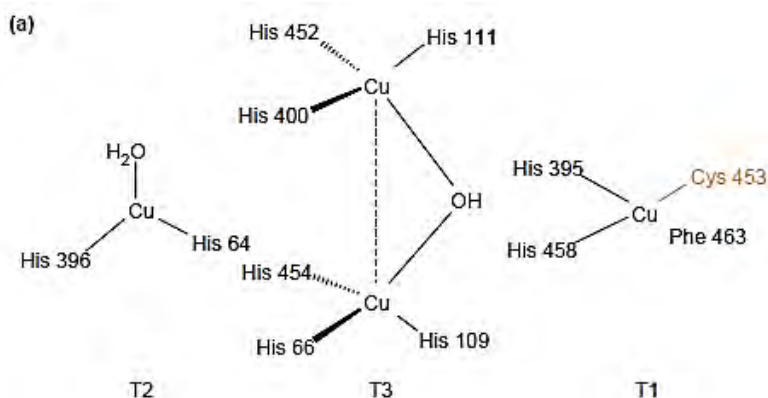


Figure 70 : Schéma du site catalytique chez *T. versicolor*, avec réduction des 4 molécules de substrat sur T1 et réduction du dioxygène sur T2/T3 (Riva, 2006)

Par ailleurs, chez *T. versicolor*, T1 est dit à haut potentiel car il n'a pas un ligand axial classique (Lalaoui, 2016). La plupart du temps, chez les oxydases bleues, les ligands du cuivre sont : un atome de soufre provenant d'une cystéine, deux atomes d'azotes des deux histidines environnantes et un soufre appartenant à une méthionine comme ligand additionnel axial. Ici, c'est une phénylalanine qui remplit ce rôle et ne participe donc pas à la coordination du cuivre T1, car il est trop loin et plus faible qu'une méthionine (3,6 Å) (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002). Tous les ligands sont donc coordonnés au cuivre T1 dans un plan (2N-1S). La coordination est donc dite trigonale coplanaire. Ainsi, grâce à l'absence de coordination axiale forte, le potentiel redox (E^0) de la laccase est plus élevé (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002).

En outre, le phénomène de coordination dans l'enzyme, permet d'obtenir un potentiel redox plus élevé chez le Cu(II) de T1 ($E^0 = 0,8V$) par rapport un couple classique Cu(II)/Cu(I) ($E^0 = 0,15V$) car le cuivre coordonné dans l'enzyme est davantage sous tension, ce qui n'est pas le cas du métal seul (Sheldon & Arends, 2006). L'enzyme semble donc contraindre le métal en le plaçant en conformation tendue, ce qui se manifeste par un potentiel redox plus élevé.

Cependant, d'autres éléments jouent un rôle dans l'augmentation du pouvoir oxydant de l'enzyme, comme par exemple la distance cuivre-histidine 458. Celle-ci étant plus longue chez *T. versicolor*, les électrons transmis arrivent davantage sur l'azote de l'histidine que sur le cuivre, rendant donc ce dernier plus déstabilisé et de ce fait plus oxydant. Ce phénomène reste encore mal compris (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002) et il en résulte que le potentiel redox de *T. versicolor* est plus élevé que celui des autres oxydases bleues.

Dans cette configuration, l'ensemble des cuivres de la laccase et des acides aminés environnants permettent la réaction d'oxydation à 4 électrons du substrat avec, en parallèle, la réduction à deux électrons du dioxygène en deux molécules d'eau (Figure 71).

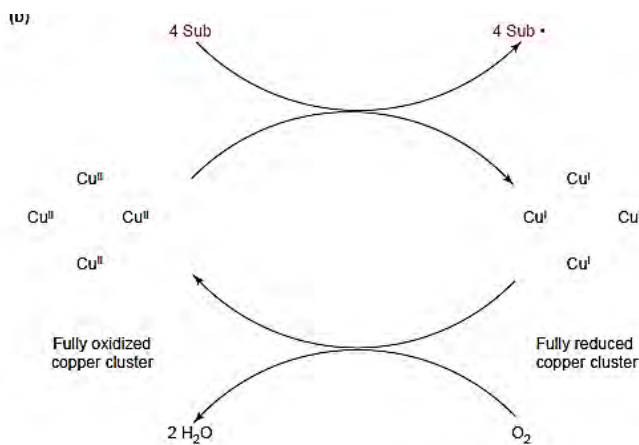
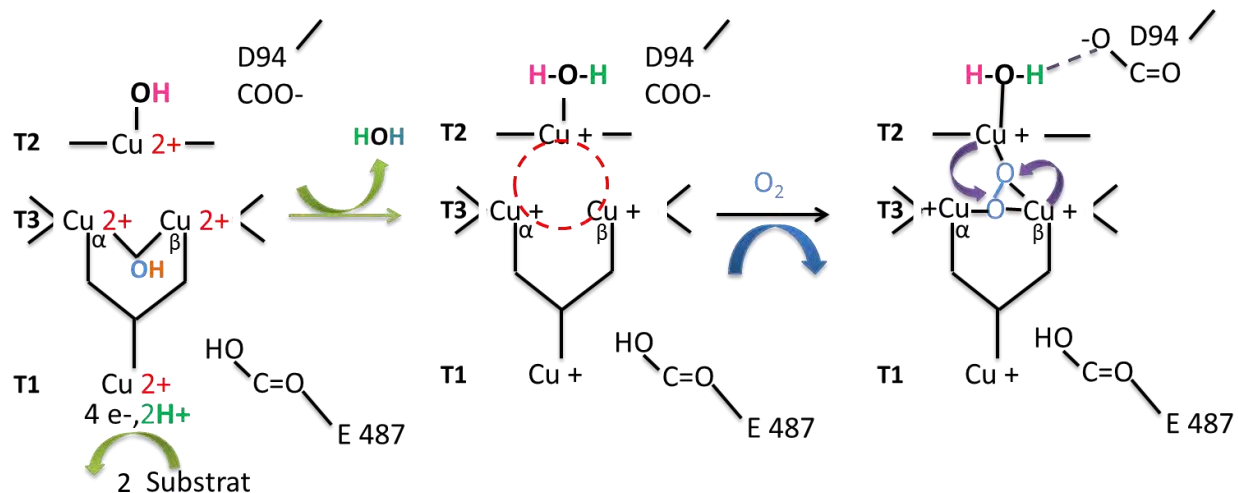


Figure 71 : Oxydation et réduction réalisées au sein de la laccase (Riva, 2006)

1.2.2.3.5 Mécanisme d'oxydation du substrat par la laccase

Le mécanisme d'oxydation du substrat au sein du site catalytique de la laccase (et les métalloenzymes d'une façon plus générale) est représenté dans les Figure 72 et Figure 73 et a été établi grâce aux travaux de Jones & Solomon (Jones & Solomon, 2015). Nous y retrouvons les cuivres T1, T2 et T3 et les acides aminés du site catalytique indispensables à la réaction (D94 et E487).



1) Etat « Resting oxidized » RO
 pont hydroxyde en μ_2
Transfert de 4 électrons et de 2 protons du substrat au cuivre T1 par superposition des orbitales du substrat, du métal et de ses ligands (His-Cyst-His)
 → Oxydation du substrat

2) Etat « fully reduced »
Transfert des électrons depuis T1 et ses ligands au TNC (superposition successive des orbitales)
 Rupture du pont hydroxyde en μ_2 par l'apport d'un des protons du substrat, transféré depuis T1 :
 → Libération de H_2O
 → Site TNC disponible la coordination de O_2

3) « Peroxide intermediate »
 L'oxygène forme un ligand peroxyde O_2^{2-}
 Le résidu carboxylate (D94) met en tension les cuivres du TNC via le proton de la molécule de l'eau coordonnée avec le centre T2 permettant l'acquisition par T2 et T3 β d'un pouvoir réducteur suffisant pour transférer, chacun, un de leur électron depuis leurs orbitales vers le dioxygène : **réduction à 2 e- de O_2**

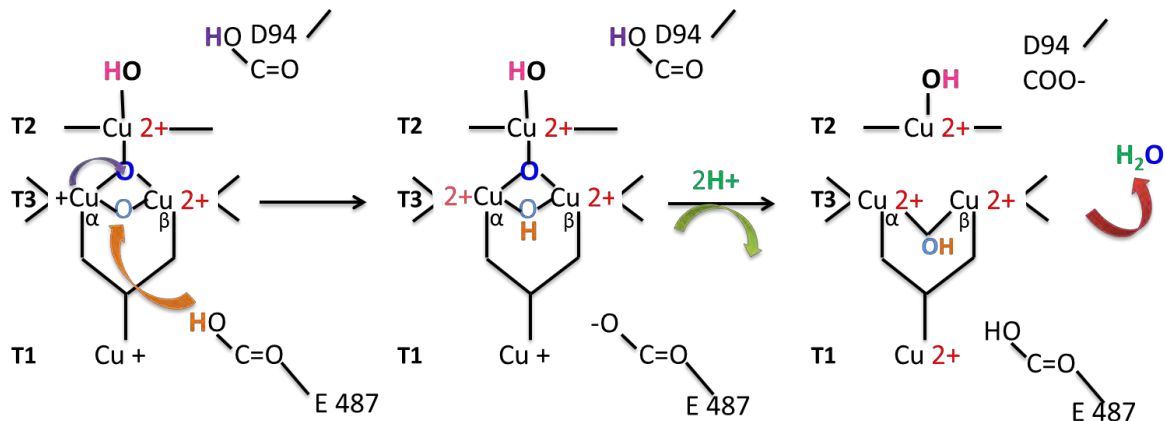
Figure 72 : Mécanisme d'oxydation/réduction des substrats au sein de la laccase (schéma inspiré de la revue de Jones et Solomon (2015) (Jones & Solomon, 2015))

Nous nous plaçons du point de vue de l'oxydation du substrat comme première étape. Dans l'étape 1 l'ensemble des cuivres est oxydé sous forme (+II). Deux molécules de substrat sont alors oxydées au niveau du cuivre T1 par transfert intermoléculaire d'électrons. Il en résulte que celui-ci est alors porteur de deux protons et de quatre électrons. Grâce au recouvrement des orbitales de T1 et de ses ligands histidine-cystéine-histidine, eux même en contact avec les orbitales de T2/T3, le cuivre T1 va transférer, de proche en proche, 3 électrons et les deux protons aux cuivres du TNC. Il s'agit d'un transfert intramoléculaire des charges, qui permet la réduction de tous les cuivres sous forme (+I). D'autre part, l'acquisition d'un proton par le ligand pontant μ_2 hydroxyde entre les cuivres T3 permet la libération d'une molécule d'eau entraînant la libération du site de fixation du dioxygène. Enfin, le groupement hydroxyde du cuivre T2 capte aussi un proton et devient un ligand H_2O .

A ce stade, l'ensemble du site catalytique est donc sous forme entièrement réduite. Cet état est primordial car c'est sous cette forme seulement que la fixation et la réduction du dioxygène peuvent avoir lieu.

En effet, dans cet état, le dioxygène peut se coordiner aux cuivres, capter deux électrons et former un ligand peroxyde « O_2^{2-} » dont les orbitales recouvrent en fait celles des cuivres T2 et T3 β (état « Peroxide intermédiaire »). Le résidu carboxylate D 94 va alors exercer une tension sur l'ensemble du TNC en captant un des protons de la molécule d'eau coordonnée au cuivre T2 à proximité. Dans cette conformation, les cuivres T2 et T3 β deviennent beaucoup plus réducteurs, leur permettant de transférer chacun un électron, formant ainsi le ligand peroxyde à un état d'oxydation +II. Il s'agit d'une réduction à deux électrons.

Cette étape est suivie du transfert d'un électron à l'orbitale de T3 α vers le ligand peroxy (étape 3').



3') Transfert d'un électron de l'orbitale de T3 α vers un des oxygène
Rupture de la liaison entre les deux oxygènes de O₂ du fait de la répulsion des charges accumulées des électrons qui leur ont été précédemment transmis
Transfert d'un proton du résidu E487 vers l'oxygène relié aux T3

4) « Native intermédiaire »
Pont hydroxyde en μ_2 entre les cuivres T3
pont hydroxyde μ_3 entre les T3 et T2
Oxydation de 2 molécules de substrat : transfert de 2 protons

5) Retour à l'état « RO »
Libération d'une molécule d'eau

Figure 73 : Mécanisme d'oxydation/réduction des substrats au sein de la laccase

Comme nous venons de le voir, le résidu D94 récupère le proton de la molécule d'eau coordonnée à T2. Celui-ci se retrouve donc avec un ligand hydroxyde. Enfin, la densité électronique au sein du ligand peroxy tend à éloigner les atomes d'oxygènes les uns des autres de dioxygène et provoque la rupture de la liaison O-O. Il se forme alors un ligand oxo μ^3 entre les cuivres T3 et T2 et un ligand pontant μ^2 entre les cuivres T3. Il capte alors un proton transféré depuis le résidu E487.

Les deux protons issus de l'oxydation du substrat sont enfin transférés au site actif, aboutissant à la formation et à la libération d'une molécule d'eau à partir du ligand oxo pontant μ^3 . En effet, les travaux de Jones & Solomon (2015) indiquent que la molécule d'eau ne peut se former à partir de l'autre atome d'oxygène (ligand hydroxo), car les cuivres de T3 alors libérés seraient dans un état ferromagnétique non observé expérimentalement. D'autre part, il est précisé que l'atome d'oxygène en μ^3 (« O^{2-} ») est beaucoup plus électro-négatif que le ligand pontant hydroxyde (OH^-). Les protons s'y lient donc préférentiellement (Jones & Solomon, 2015).

D'un point de vue structurale, le cluster est accessible au solvant via deux canaux qui conduisent respectivement à T3 et T2 (un canal chacun). Le site T2 est beaucoup plus exposé et labile que ceux des sites T3. Des molécules d'eau sont présentes dans les canaux et sont très liées aux résidus d'acides aminés environnants (Figure 74). Les acides aminés des canaux sont très conservés chez l'enzyme (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002).

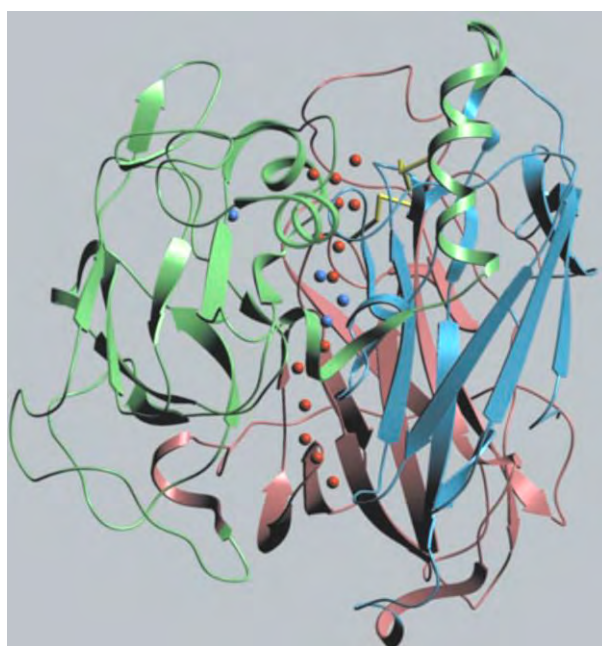


Figure 74 : Illustration des canaux à eau (points rouges) dans l'enzyme (points bleus = cuivres) (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002)

Les canaux à solvant (Figure 74) assurent en outre un accès très facile pour le dioxygène jusqu'au cluster trinuécléaire. Il est également indiqué que le produit formé par l'enzyme est libéré avant qu'une autre molécule de substrat ne se lie (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002).

1.2.2.3.6 Utilisation de l'activité catalytique de la laccase de *T. Versicolor* avec TEMPO pour l'oxydation des alcools primaires

Dans le cas où le substrat est trop volumineux pour entrer dans le site actif de l'enzyme, ou que son potentiel redox est supérieur à celui de la laccase, l'oxydation ne peut avoir lieu car il n'y a pas d'interactions directes avec les cuivres de l'enzyme (Riva, 2006).

En mimant la nature, il est cependant possible de remédier à cette incompatibilité par l'utilisation de médiateurs chimiques (ETM), qui agissent comme des intermédiaires entre l'enzyme et le substrat. Ils remplissent la fonction de « relais », en tant que navette à électrons entre les deux molécules (Figure 75 (b) et (c)) (Yaropolov, Skorobogat'ko, Vartanov, & Varfolomeyev, 1994).

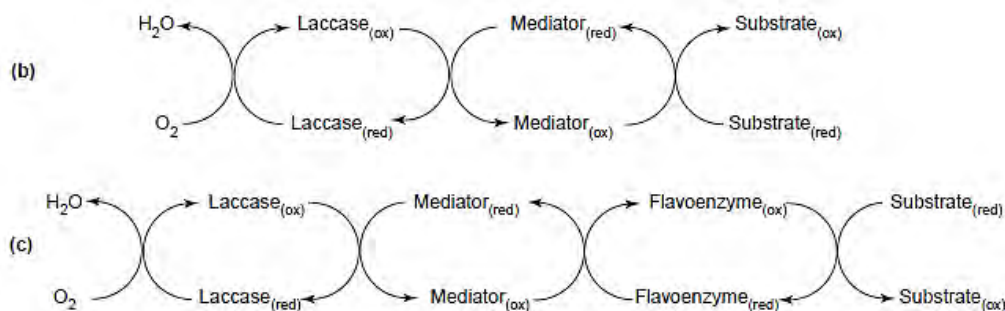


Figure 75 : Les différentes possibilités d'interactions entre la laccase et son substrat (Riva, 2006)

La laccase est ainsi utilisée avec le TEMPO (2,2,6,6-Tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy), qui joue le rôle d'ETM ou de « médiateur », afin de pouvoir oxyder des substrats qui ne correspondent pas à ceux reconnus par l'enzyme. Le TEMPO intervient en réalisant la première oxydation du substrat en transférant les électrons depuis celui-ci vers les centres métalliques de l'enzyme (Sheldon & Arends, 2006).

Le TEMPO fait partie des médiateurs ayant une structure N-OH, nommé radical aminoxyle stable. Dans ses travaux de 2002, Fabbrini et al., indique que celui-ci, sous forme n-oxyl, ne réagit pas et doit être activé en ion oxoammonium (Fabbrini, Galli, & Gentili, 2002). L'enzyme est responsable de l'oxydation permettant l'activation du TEMPO Figure 79. (Witayakran & Ragauskas, 2009).

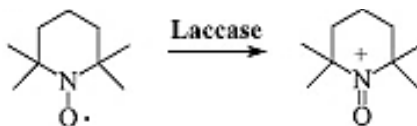


Figure 76 : TEMPO sous forme radical N-oxyl puis activé en ion oxoammonium (Fabbrini, Galli, Gentili, & Macchitella, 2001)

Pour réaliser l'activation du radical aminoxyle l'enzyme doit être (comme vu précédemment) activée par le dioxygène présent dans le milieu comme nous pouvons le voir Figure 77 (Galli & Gentili, 2004).

Les atomes de cuivres de l'enzyme sont alors dans un état d'oxydation (+II) nécessaire à la réaction d'oxydation du TEMPO (nommé « Med » sur la Figure 77).

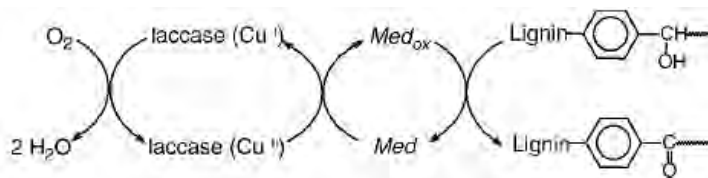


Figure 77 : Séquence nécessaire à l'oxydation par la laccase (Galli & Gentili, 2004)

Sheldon & Arends proposent une vision globale du déroulement de la réaction depuis l'oxydation du substrat par le TEMPO jusqu'à la régénération de celui-ci par l'enzyme (Sheldon & Arends, 2006). Nous retrouvons le déroulement de l'oxydation chez la laccase avec quatre oxydations concomitantes à 1 électron du TEMPO, et, en parallèle, la réduction par le transfert de 4 électrons du dioxygène pour former de l'eau (Figure 78) (Sheldon & Arends, 2006). Ainsi, le TEMPO donne le cation oxoammonium via un transfert d'électrons aux cuivres (+II) de la laccase selon le mécanisme suivant :

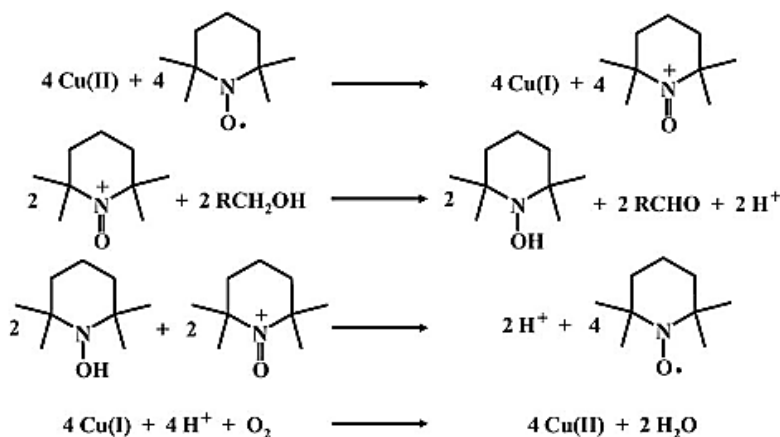


Figure 78 : Mécanisme de Semmelhack pour l'oxydation catalytique par le couple CuCl/TEMPO des alcools (Sheldon & Arends, 2006)

Plus précisément, le substrat, ici le médiateur TEMPO, subit une oxydation à un électron sur Cu(II) pendant que se déroule la réduction du dioxygène en eau sur le TNC de la laccase (Sheldon & Arends, 2006). Sous forme d'ion oxoammonium (N=O⁺), le TEMPO peut alors oxyder les substrats non phénoliques selon un mécanisme dit « ionique » présenté sur la Figure 80 (Galli & Gentili, 2004), (Witayakran & Ragauskas, 2009).

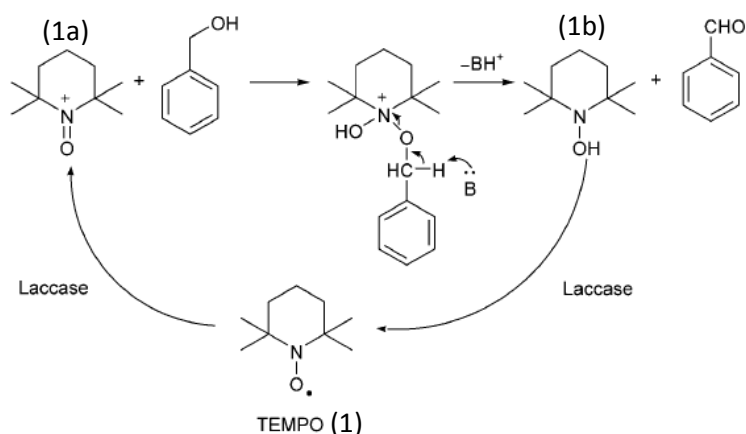


Figure 79 : Oxydation par voie ionique avec un substrat phénolique (Witayakran & Ragauskas, 2009). « B » est une base

La base formée attaque le substrat en se comportant comme un nucléophile pour aboutir à une molécule d'association. La perte du proton en position α sur l'ensemble TEMPO-substrat conduit enfin au produit d'oxydation. Le TEMPO est alors sous la forme N-OH. L'oxydation par la laccase le régénère sous forme active (N=O⁺) (Galli & Gentili, 2004) (Fabbrini, Galli, & Gentili, 2002).

De façon plus détaillée la Figure 80 montre l'oxydation à un électron du TEMPO (état natif (1)) qui donne le cation oxoammonium (1a) comme le confirment les essais de Arends, Li, Ausan, & Sheldon et Sheldon & Arends. Ce cation oxyde alors l'alcool par une voie hétérolytique, donnant en fin de réaction un carbonyle et un hydroxylamine inactif (1b) (Arends, Li, Ausan, & Sheldon, 2006) (Sheldon & Arends, 2006). La régénération de la molécule se fait grâce au centre cuivre T1 de la laccase joint au dioxygène

Dans leur article, Arends, Li, Ausan, & Sheldon signalent que le TEMPO pourrait également être régénéré par l'action seule du dioxygène ou par le composé (1a) Figure 80 (Arends, Li, Ausan, & Sheldon, 2006). Les travaux des auteurs indiquent également que la ré-oxydation de l'intermédiaire (1b) est lente en conditions acides sans catalyseur. Le système laccase/dioxygène serait alors responsable de la régénération de l'intermédiaire (1b) en TEMPO (1) (Arends, Li, Ausan, & Sheldon, 2006).

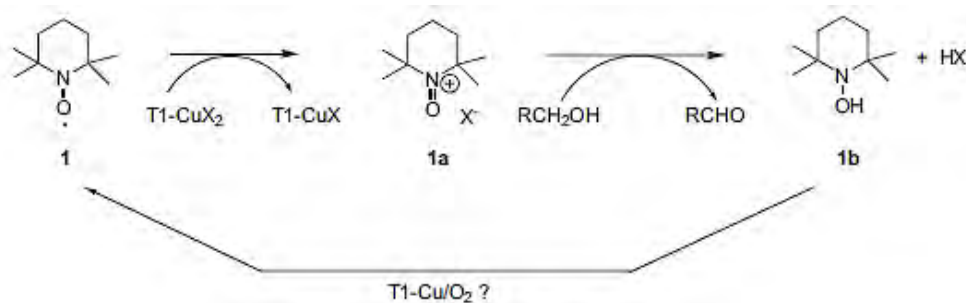


Figure 80 : Les différents états de TEMPO de son activation à l'oxydation (Arends, Li, Ausan, & Sheldon, 2006)

Il est possible d'employer d'autres ETM pour l'oxydation des alcools, comme l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique)), le VLA (acide violurique), le NHA (N-hydroxyacetanilide), le NHPI, le HBT (1-hydroxybenzotriazole), mais ces derniers sont moins efficaces pour l'oxydation des alcools non-phénoliques en présence de laccase (Witayakran & Ragauskas, 2009). Notre choix s'est donc limité au TEMPO car celui-ci, associé à l'enzyme, est le plus efficient pour l'oxydation des alcools non phénoliques, dont la réactivité est celle qui se rapproche le plus de nos substrats (Fabbrini, Galli, & Gentili, 2002). En effet, Sheldon & Arends indiquent que TEMPO reste le meilleur des médiateurs par rapport aux autres mais nécessite d'être en quantité importante dans le milieu réactionnel (Sheldon & Arends, 2006, p. 211).

1.2.2.3 Conclusion générale

L'étude bibliographique effectuée pour la recherche de protocole d'oxydation et satisfaisant les contraintes présentées en suivant sont répertoriés dans le Tableau 5.

Les contraintes sont :

- Utiliser des catalyseurs renouvelables (ressources suffisamment importantes ou molécules élaborée pour un coût raisonnable),
- Mettre en jeu des réactions donnant les meilleurs rendements possibles en acide glycérique et d'une façon plus générale en acides carboxyliques à partir d'alcools aliphatiques, car ce sont les plus proches en terme de réactivité et de structure du glycérol et du carbonate de glycérol,
- Qui nécessitent des pressions et des températures proches du vivant (économie d'énergie, sécurité),
- Qui font appel à des molécules le moins toxiques possible (solvants, catalyseurs etc.).

Ainsi quatre protocoles, dont trois chimiques et un enzymatique ont été retenus :

Protocole	CE6 ENZYMATIQUE	CC33 DUO NON NOBLE	CC21 GLYCEROL	CC29 CG
Substrat testé	CG, GLYCEROL		GLYCEROL	CG
Oxydant	TEMPO	TEMPO	HDL Cuivre, Aluminium, Magnésium	Bipyridine Cuivre (II) triflate (CuOTf)
Régénérateur	Laccase	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$	NaOH/glycérol = 2	TEMPO
Température	22°C	40°C	60°C	50°C
Solvant	Eau (pH 4,5)	Acide acétique pur	Eau	CH_3CN
Durée de réaction	3 à 24 heures	9 heures	3 heures	24 heures
Atmosphère appliquée	Dioxygène OU air ambiant		Dioxygène	Dioxygène (purge)
Sélectivité	25%	–	70%	
Conversion	70%	98% (sur cyclohexanol)	97,3%	100% (sur solkétal)
Rendement	–	100%	–	79%
Référence	(Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009)	(Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero, 2001)	(Zhou, et al., 2011)	(Stahl, Hoover, & Shannon, 2011)

Tableau 5 : Tableau comparatif des conditions expérimentales des différents protocoles retenus pour la fabrication d'HA à partir du glycérol et du CG

Le Tableau 5 nous permet de visualiser les différents réactifs qui seront utilisés dans le but de produire les HA d'intérêt. Tout d'abord, nous notons bien ici que deux protocoles, l'enzymatique et celui utilisant le duo manganèse / cuivre sous forme de nitrate (CC33) seront testés sur les deux substrats glycérol et CG. Tandis que le protocole ayant pour catalyseur un HDL sera effectué uniquement sur glycérol (CC21) du fait de l'utilisation d'une base forte et, que le protocole ayant pour substrat d'origine le solkétal (CC29) sera uniquement pratiqué sur CG puisqu'il met en jeu de la bipyridine toxique et que c'est la similitude du substrat avec le CG qui a justifié son emploi.

Par ailleurs, les durées de réaction sont ici celles précisées par les auteurs (entre 3 et 24 heures) mais les protocoles seront en fait réalisés sur neuf à dix heures maximum afin de répondre aux contraintes de sécurité du laboratoire. Il est également à noter que le protocole enzymatique sera testé sous air ambiant et sous bullage de dioxygène, ce qui constitue une modification par rapport aux travaux des auteurs Liebminger, Siebenhofer et Guebitz, car il est indiqué que celui-ci est le réactif limitant de la réaction (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009).

Enfin, d'un point de vue mécanistique, nous remarquons que le protocole enzymatique et le protocole avec cuivre/manganèse ont pour réel oxydant le TEMPO tandis que les autres réactions font appel à un métal protégé par un contre-ion triflate (protocole sur CG) ou par une structure HDL (protocole sur glycérol). De façon plus précise le protocole enzymatique est celui se rapprochant le plus des modalités du vivant du fait des conditions très douces (22°C) et de la nature biodégradable d'un des catalyseurs.

Le protocole avec le duo $[\text{Mn}(\text{NO}_3)_2]$ et $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2]$ présente des rendements importants (97 à 100 %) en acide cyclohexanoïque, pourtant peu réactif, promesse intéressante en vue de l'application sur des substrats de réactivité proche comme le glycérol et le CG. En outre, l'acide acétique en tant que solvant peut être recyclable par évaporation et les métaux impliqués sont plus abondants et moins chers que ceux de la catégorie noble.

La réaction d'oxydation du glycérol utilisant le HDL comme catalyseur présente une grande sélectivité (70%) pour l'acide glycérique et un taux de conversion fort (97,3%), améliorée grâce à la présence de cuivre et au processus de calcination du catalyseur. Celui-ci présente d'autre part une structure proche des argiles. Nous pourrions donc envisager de le remplacer par des terres naturelles. La structure présente enfin l'avantage de permettre un réglage précis du ratio atome/métal (Zhou, et al., 2011). Enfin les réactifs du protocole pour le CG sont capables de réagir avec une grande variété d'alcools pour une conversion du substrat forte (entre 79 %) et le catalyseur ainsi que le solvant (acétonitrile) sont recyclables.

L'objectif de la partie suivante sera donc de réaliser les essais pour chaque protocole en catalyse homogène, sur CG et glycérol (CE6, CC33), sur CG seulement (CC29) ou sur glycérol uniquement (CC21). Une identification et une quantification des produits formés seront par la suite réalisées afin de déterminer le protocole qui produit le plus d'acide glycérique. Le mode opératoire alors sélectionné fera l'objet d'une étude approfondie dans le but d'encore améliorer les rendements en HA d'intérêt.

Les conditions et mode opératoires relatifs aux protocoles présentés ici et mis en œuvre dans ces travaux sont disponibles dans la section expérimentales chapitre 5 : p.238 et p.278 pour le système laccase/TEMPO CE6, p.240 pour l'oxydation avec le duo non noble cuivre/magnésium CC33, p.241 pour l'oxydation spécifique du glycérol CC21 et p.248 pour l'oxydation spécifique du CG CC29.

Chapitre 2 : Résultats et discussion des essais en catalyse homogène

2.1 Identification et quantification des produits formés en catalyse homogène

Ce chapitre a pour objectif de présenter les résultats des essais effectués pour les quatre protocoles candidats, en catalyse homogène, sur le glycérol et le carbonate de glycérol. Par comparaison entre eux, nous en déduisons les conditions optimales pour la fabrication d'acide glycérique et de CG oxydé.

A partir du protocole le plus prometteur ainsi choisi, nous effectuerons une caractérisation complète des produits formés. Par la suite, nous essayerons d'améliorer les rendements en produits d'intérêt à l'aide d'un plan d'expérience. Ce dernier permettra d'avoir une idée des mécanismes de la formation des HA désirés et de prédire les quantités formées en fonction des conditions de départ en réactifs.

Tout au long de cette partie de quantification des produits formés, nous ne raisonnerons pas en rendements pour chaque molécule formée mais en « masse de produit formé par masse de substrat introduite à l'état initial ». En effet, chaque protocole requiert des proportions différentes en substrat, conditionnées par celles de catalyseur et donc non modifiables. Afin de comparer les quantités de chaque molécule formée en s'affranchissant de l'influence de la masse de substrat de départ, nous avons donc utilisé la « masse de produit formé par masse de substrat introduite à l'état initial ».

2.1.1 Identification et quantification des produits par chromatographie liquide associée à la détection par réfractométrie (HPLC)

L'objectif est la sélection du protocole permettant de fabriquer les plus grandes quantités d'HA et en particulier d'acide glycérique et de CG oxydé. Cependant les produits issus de l'oxydation du CG ne sont à ce jour pas décrits. Il n'existe donc pas de standards disponibles permettant leur identification simple, fiable et rapide. Par conséquent, le choix du protocole le plus performant par HPLC associée à une détection RI sera uniquement basée sur la comparaison des temps de rétention des produits issus de l'oxydation du glycérol (et plus précisément, la quantité d'acide glycérique formée) avec les chromatogrammes correspondant aux réactions effectuées.

2.1.1.1 Détermination des conditions d'analyses

Il existe une multitude de méthodes proposées pour l'identification des produits d'oxydation du glycérol. Afin de choisir les conditions les plus performantes, une étude exhaustive de la bibliographie présentant l'analyse de ces produits a donc été réalisée et un tableau récapitulatif est présente p.250.

Cette étude a permis de conclure que le type de colonne séparative nécessaire devait mettre en jeu une séparation fondée sur le phénomène d'exclusion ionique. Nous avons ainsi choisi l'Aminex HPX 87 H décrite p.255.

D'autres critères pour la mise au point des conditions expérimentales ont aussi été pris en compte :

- ❖ La détection en HPLC se fait grâce à un détecteur à indice de réfraction (RI) car le glycérol et le CG ne sont visibles qu'en RI
- ❖ Des températures élevées permettent d'augmenter le nombre de plateaux théoriques de la colonne et donc la qualité de l'analyse. En outre, il est indiqué qu'une température de 30°C minimum est requise pour empêcher la superposition des signaux de l'acide glycérique/glycéraldéhyde/glycérol (Beltran-Prieto, Pecha, Kasparkova, & Kolomaznik, 2013). Dans notre cas, nous appliquerons donc une température de 60° qui permet d'avoir des pressions convenables au cours de l'analyse tout en assurant une qualité satisfaisante.
- ❖ Par ailleurs, il est essentiel d'utiliser un éluant acide comme l'acide sulfurique car le pKa des acides a une grande influence sur la qualité de la séparation (Hajós & Nagy, 1998). En effet, si le pH de l'éluant se trouve dans la gamme de pKa des produits testés, la qualité des analyses en sera affectée : lorsqu'un acide carboxylique se trouve dans un milieu dont le pH = pKa +/-2, la substance n'est pas totalement sous forme moléculaire (neutre) mais existe aussi sous forme chargée. Elle sera donc exclue par la colonne d'exclusion ionique sans être analysée ou diffusera très lentement, créant des pics trainant. Enfin, en pH acide, les carboxylates encore présents dans l'échantillon pourront s'associer aux protons libres de l'éluant, formant donc un nombre plus élevé de molécules sous forme neutre. Une plus grande quantité de molécules diffuseront alors vers les pores de la résine ce qui augmentera le signal mais améliorera aussi la forme du pic. En effet, les molécules étant alors très rapidement sous forme neutre, il n'y aura pas une perte de qualité dû à l'attente nécessaire au passage de celles-ci de leur forme chargée à leur forme moléculaire. Les molécules diffuseront donc toutes en même temps dans la colonne et sortiront dans un laps très court du système. Le pic formé sera donc fin et bien défini (Bhattacharyya & Rohrer, 2012). Il est cependant à noter que pour conserver l'intégrité de la colonne, il n'est pas possible de tester des concentrations en acide sulfurique supérieures à $10 \cdot 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (cf. support technique Biorad).

L'ensemble de ces données nous ont permis de conclure que pour des analyses de qualité une température de 60°C, avec un éluant dont la concentration en acide sulfurique est comprise entre 3 et $10 \cdot 10^{-3}$ mol. L⁻¹ étaient nécessaires. Trois concentrations en acide sulfurique ont donc été testés : 3, 5 et $10 \cdot 10^{-3}$ mol. L⁻¹. Les résultats des analyses des milieux réactionnels (présents p.256) nous ont permis de conclure qu'une concentration de $3 \cdot 10^{-3}$ mol. L⁻¹ fournie les meilleurs résultats. Le protocole d'analyse est donné dans la partie expérimentale p.250 et p.256.

2.1.1.2 Identification et quantification des produits formés

Les temps de rétention obtenus pour les molécules de standards sont :

Standard	Temps de rétention (min) (RI)
Glycéraldéhyde	12,96
Acide glycérique	12,23
Acide glyoxylique	10,85
Acide glycolique	13,89
DHA	15,19
Glycérol	15,24
Acide hydroxypyruvique	9,5
Acide oxalique	N. D
Acide tartronique	N. D

Figure 81 : Temps de rétention pour chaque standard détectée dans les conditions d'analyse choisies

Un étalonnage externe en HPLC a ensuite permis de quantifier les molécules détectées en comparant les signaux avec les temps de rétention répertoriés Figure 81. L'histogramme Figure 82 permet de comparer les masses de chaque produit formé au cours des réactions des quatre protocoles choisis et effectués sur glycérol ou CG, sous dioxygène ou sous air ambiant.

Les résultats présentés sur la figure sont des valeurs moyennes sur trois expériences. Les barres en noir représentent l'écart type autour de la moyenne. Les cinq familles de pics présentes sur la gauche de la Figure 82 sont obtenues à partir des essais sur glycérol tandis que les cinq familles de droite sont issues du carbonate de glycérol.

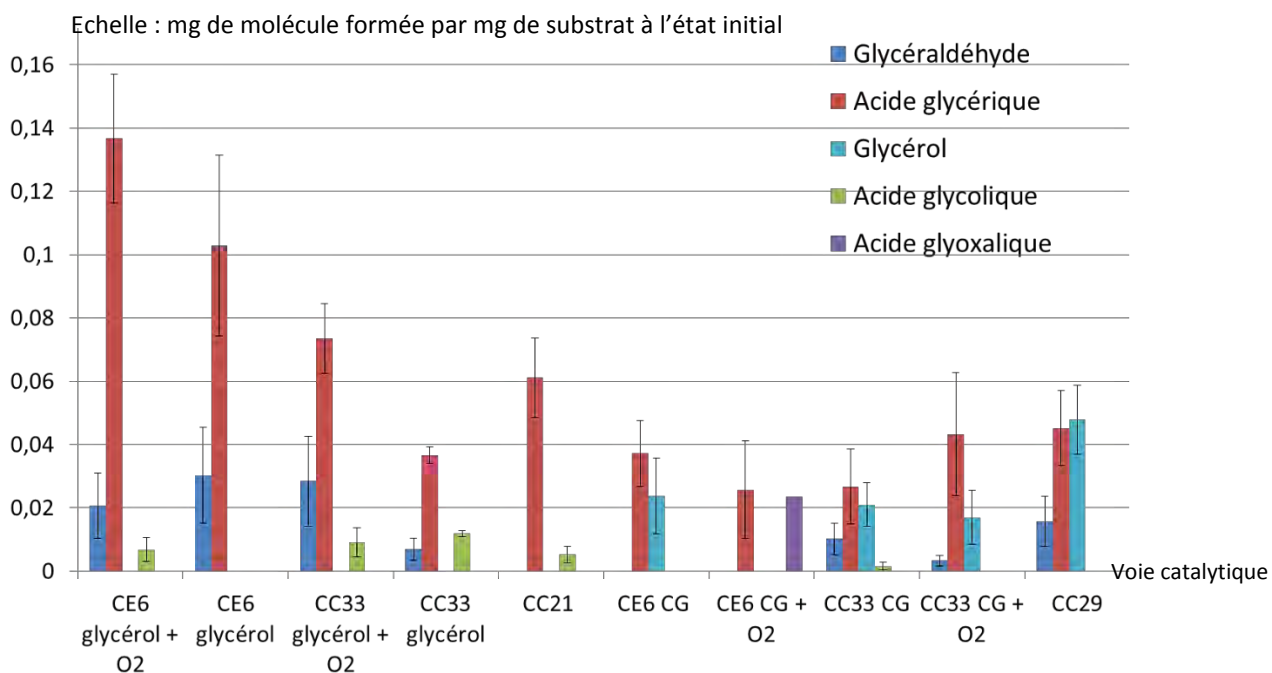


Figure 82 : Quantité de chaque produit formé (mg) dans les milieux réactionnels par quantité de substrat (mg) à l'état initial, quantifiées par HPLC.

L'observation générale des résultats de l'histogramme nous montre que l'acide glycérique (en rouge) est présent dans l'ensemble des produits de réaction. La sélection des protocoles d'oxydation pour la fabrication d'HA a donc été pertinente et cela quel que soit le substrat considéré.

Avec le glycérol comme substrat, nous remarquons que les réactions qui fournissent le plus d'acide glycérique sont celles mettant en jeu le système laccase/TEMPO (CE6) et en particulier sous dioxygène (CE6+O₂). Nous obtenons en effet entre 0,14 et 0,16 mg d'acide glycérique par mg de glycérol dans ce cas, contre 0,07 mg maximum pour la réaction avec le duo cuivre/manganèse sous dioxygène (CC33 + O₂) et 0,06 mg pour la réaction spécifique du glycérol (CC21). Ainsi, même si la réaction utilisant un HDL (CC21) est la plus sélective (deux produits formés contre trois pour les autres), il ne fournit pas la masse d'HA la plus intéressante.

En outre, la réaction enzymatique produit une proportion importante de glycéraldéhyde même sous air ambiant (0,03 à 0,05 mg par mg de glycérol) ce qui est également un point en faveur de ce système catalytique car cette molécule est décrite comme un précurseur de l'acide glycérique

Dans le cas du glycérol, c'est donc la réaction avec l'ensemble laccase/TEMPO sous dioxygène qui est retenu comme le plus prometteur.

Dans le cas du CG, nous constatons que nous retrouvons des produits de l'oxydation du glycérol (acide glycérique, glycéraldéhyde, acide glycolique et glyoxylique). Nous reconnaissons d'ailleurs celui-ci (qui est ici un produit) ainsi que de l'acide glycérique dans toutes les réactions testées. Du glycéraldéhyde est aussi détecté dans la réaction avec le duo cuivre/manganèse (CC33, CC33 + O₂) avec ou sans dioxygène, et dans la réaction spécifique du CG (CC29). Il apparaît donc que si toutes les voies catalytiques produisent approximativement la même masse d'acide glycérique (entre 0,01 et 0,05 mg par mg de substrat) comme en témoigne la superposition de l'ensemble des écarts type, c'est la voie catalytique avec la laccase et le TEMPO (CE6) qui est la plus sélective pour l'acide glycérique (deux produits formés contre trois ou quatre dans les autres cas). Par ailleurs, la présence de dioxygène ne semble pas y augmenter la quantité d'acide formée (entre 0,01 et 0,04 mg par mg de CG dans les deux cas). Ce n'est donc pas un réactif indispensable pour ce système oxydatif, contrairement à la réaction spécifique du CG (CC29) ou pour avoir une forte masse acide glycérique avec la réaction utilisant le duo de métaux non nobles (0,07 mg par mg de substrat CC33 + O₂).

En conclusion, le protocole enzymatique semble le plus encourageant de par sa sélectivité pour l'acide glycérique et par ce que l'enrichissement en dioxygène n'est pas indispensable pour la fabrication d'un des HA intéressants. Seul celui contenu dans l'air ambiant est suffisant. Cependant, dans la mesure où le CG oxydé n'est pas détecté par cette méthode analytique, et cela quel que soit le système catalytique considéré, des analyses supplémentaires sont nécessaires.

En outre, il est à noter que les molécules identifiées et quantifiées sont uniquement celles qui ont pu être comparées avec les standards connus de l'oxydation du glycérol, à savoir l'acide glycérique, glycolique, glyoxylique, le dihydroxyacétone (DHA), le glycéraldéhyde, le glycérol et le CG.

Par ailleurs, l'acide mésoxalique, oxalique, tartronique n'ont pas pu être analysés par HPLC. Le standard de la première substance n'est pas disponible sur le marché et elle est peu ou pas caractérisée dans la bibliographie. Les deux dernières sont en revanche très mal éluées par cette méthode et ne peuvent donc être reconnues et quantifiées de façon sûre. Les acides dicarboxyliques donnent en effet des signaux de mauvaise qualité. Les pics sont extrêmement larges, asymétriques, mal définis et les signaux ne sont pas superposables pour un même échantillon et cela même en présence de modificateur de phase

D'autres conditions qui requièrent la colonne Aminex HPX 87 H et garantissent l'obtention de meilleurs chromatogrammes pour l'acide oxalique ont donc été testées (Pecina, Bonn, Burtscher, & Bobleter, 1984), (Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012), (Simões, Baranton, & Coutanceau, 2011), (Royker, Case, & Van Steen, 2012), (Beltrán-Prieto, Kolomazník, & Pecha, 2013), (Chen, Fang, & Hu, 2007), (Demirel-Gülen, Lucas, & Claus, 2005), (Roquet, Belgsir, Léger, & Lamy, 1994). Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir des chromatogrammes interprétables, avec un pic fin et bien défini pour l'acide oxalique, comme décrit par les auteurs Albarrán & Collins et Rajakylä (Albarrán & Collins, 1989) et (Rajakylä, 1981).

Des essais avec des modificateurs de phase comme l'acétonitrile en association avec l'acide sulfurique ont aussi été pratiqués sur un mélange de standards pour obtenir une bonne définition du pic de l'acide oxalique mais ces ajouts n'ont pas permis l'obtention d'une meilleure qualité comme cela est visible sur la Figure 83 (Guerrant, Lambert, & Moss, 1982). Ces conditions n'ont donc pas été retenus. La figure illustre également le phénomène de collapse entre les pics de l'acide glycérique et du glycéraldéhyde pour des températures d'analyse inférieures à 30°C.

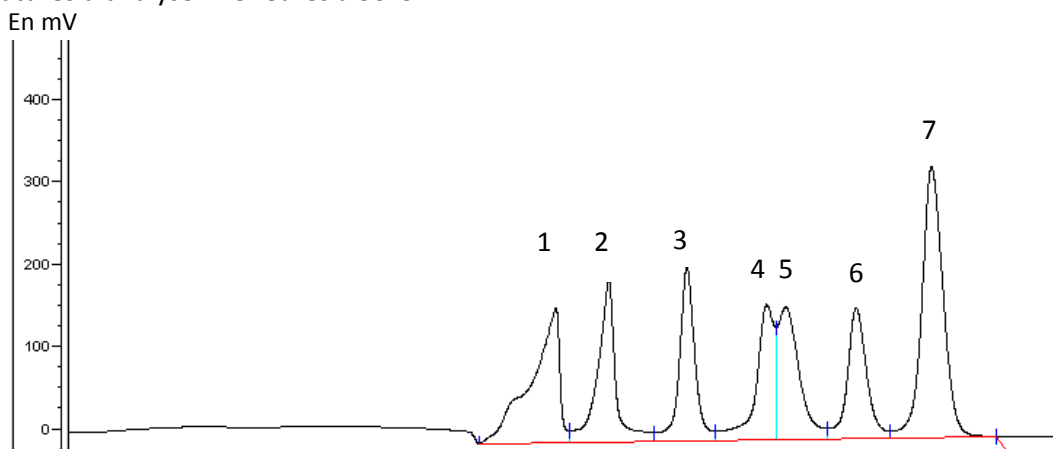


Figure 83 : Chromatogramme d'un mélange de standards analysés à l'aide de la colonne Aminex HPX 87 H à 25°C, éluant 0,012N H₂SO₄ et acétonitrile 10,8% (débit à 0,5 ml/min) (Guerrant, Lambert, & Moss, 1982) en détection RI. De gauche à droite : 1 = acide oxalique, 2 = acide tartronique, 3 = Acide glyoxylique, 4 = acide glycérique, 5 = glycéraldéhyde, 6 = acide glycolique, 7 = glycérol et DHA

Les raisons des résultats médiocres sur les pics 1 et 2 de la Figure 83 sont multiples. Tout d'abord, les pH des éluants contenant de l'acide sulfurique, entre 3 et 10.10⁻³ mol. L⁻¹, sont compris entre 1,7 et 1,91. Or les pKa de l'acide oxalique sont de 1,2 et 4,3 à 25°C. Par conséquent, il n'y a pas 2 unités d'écart entre le pH et le pKa (Jacob, 2010). Ainsi, l'acide oxalique doit être majoritairement présent sous forme monocarboxylate (une fonction protonée et une fonction chargée négativement).

L'ion doit donc être en partie exclu, ou diffusé de façon lente dans la colonne. Ainsi, au lieu de sortir en une fois, les molécules migreraient progressivement dans la colonne par diffusion longitudinale ce qui formerait ce pic traînant. D'autre part, le facteur de capacité k' de l'Aminex HPX 87 H pour l'acide oxalique est de 0,172 alors qu'il doit être compris entre 1 et 5 pour une bonne élution (Haddad, Jackson, & Greenway, 1990) (Guerrant, Lambert, & Moss, 1982).

Nous supposons que ce sont les mêmes facteurs qui entrent en jeu pour l'acide tartronique. Par ailleurs, l'acide mésoxalique n'est pas visible sur le chromatogramme puisque le standard n'est pas disponible. Nous ne pouvons donc pas le visualiser et l'associer par comparaison. Enfin, le CG oxydé ne peut être reconnu par cette méthode. Nous proposons donc de faire appel à une technique de chromatographie différente, dite ionique afin d'améliorer la caractérisation des milieux réactionnels fabriqués.

2.1.2 Identification et quantification des diacides par chromatographie ionique HPIC associée à une détection par conductimétrie

2.1.2.1 Méthode

L'HPIC est une méthode d'analyse rapide et fiable. D'autre part, celle-ci permet de travailler dans des gammes de pH très basique. Les acides mono et dicarboxyliques sont donc toujours dans un milieu dont le pH est suffisamment éloigné de leur pKa. Le pH de notre éluant étant de 14, nous nous trouvons donc bien à au moins deux unités au-dessus des pKa de l'acide oxalique et tartronique. Les détails des conditions expérimentales se trouvent p.259.

Pour l'analyse des milieux réactionnels nous utilisons le processus suivant au cours de l'élution, et mettant en jeu 4 étapes successives :

- 1) Une première stabilisation de la phase stationnaire de la colonne avec une concentration en potasse (KOH) faible, permettant aux échanges anions/contre-ions sur la colonne de se faire, et ainsi aux molécules d'intérêt de remplacer les ions hydroxydes (HO⁻) présents sur les sites de la résine,
- 2) L'augmentation importante de la concentration en potasse afin de favoriser la concurrence entre les anions à analyser et les contre-ions pour les sites fixes de la colonne. Le but est d'éviter que les molécules d'intérêt demeurent trop longtemps sur la résine et sortent trop lentement ce qui peut provoquer de la diffusion longitudinale (étalement de pic) ou de la superposition de pics,
- 3) La concentration en potasse arrive alors à son maximum afin de nettoyer la colonne en décrochant tous les anions grâce à la saturation de la phase mobile en ions hydroxyde (HO⁻),
- 4) Retour à une concentration faible en potasse afin de rejoindre les conditions initiales pour l'analyse suivante.

2.1.2.2 Résultats

Avec notre méthode, l'acide tartronique et l'acide oxalique sont bien séparés (Figure 84) mais, les signaux des **acides monocarboxyliques (glycérique, glycolique, glyoxylique,...)** de faible masses molaires sont superposés ou trop proches les uns des autres pour être identifiés avec certitude (les temps de rétention sont compris entre 4,5 et 8 minutes donc différents mais les pics demeurent superposés).

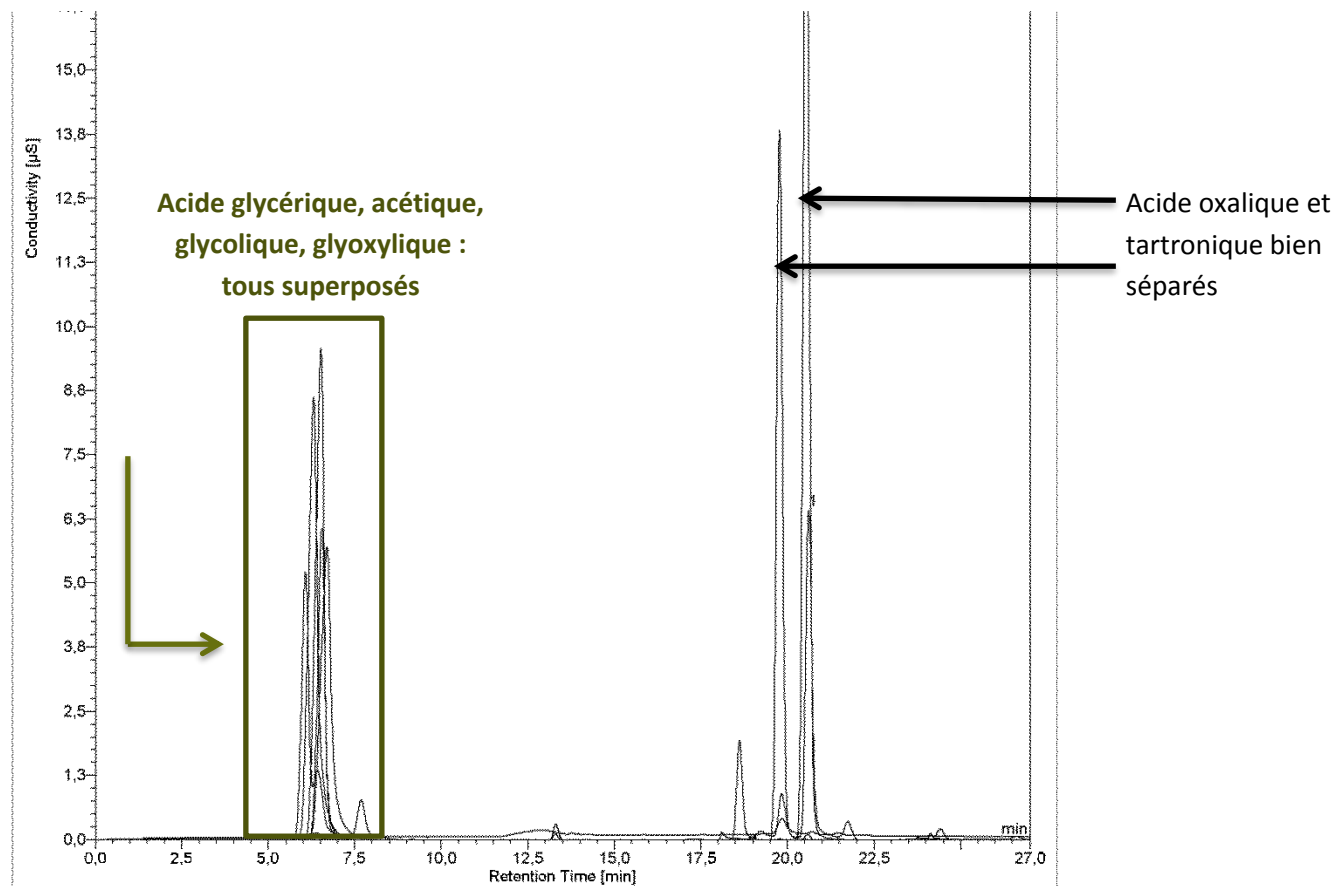


Figure 84 : Chromatogramme réalisé sur le milieu réactionnel issu du protocole CE6 avec glycérol sous dioxygène

Des essais supplémentaires ont été effectués dans le but d'améliorer la séparation des espèces en début de chromatogrammes. Ainsi, une augmentation de la concentration en potasse en début d'élution ou une augmentation du pH des échantillons ont été testées. Cependant, cela n'a fait progresser la séparation des molécules.

Nous pouvons donc conclure que cette méthode est bien spécifique de la quantification et l'identification des diacides.

Nous poursuivons nos analyses en cherchant à quantifier par étalonnage externe les diacides formés dans les milieux réactionnels.

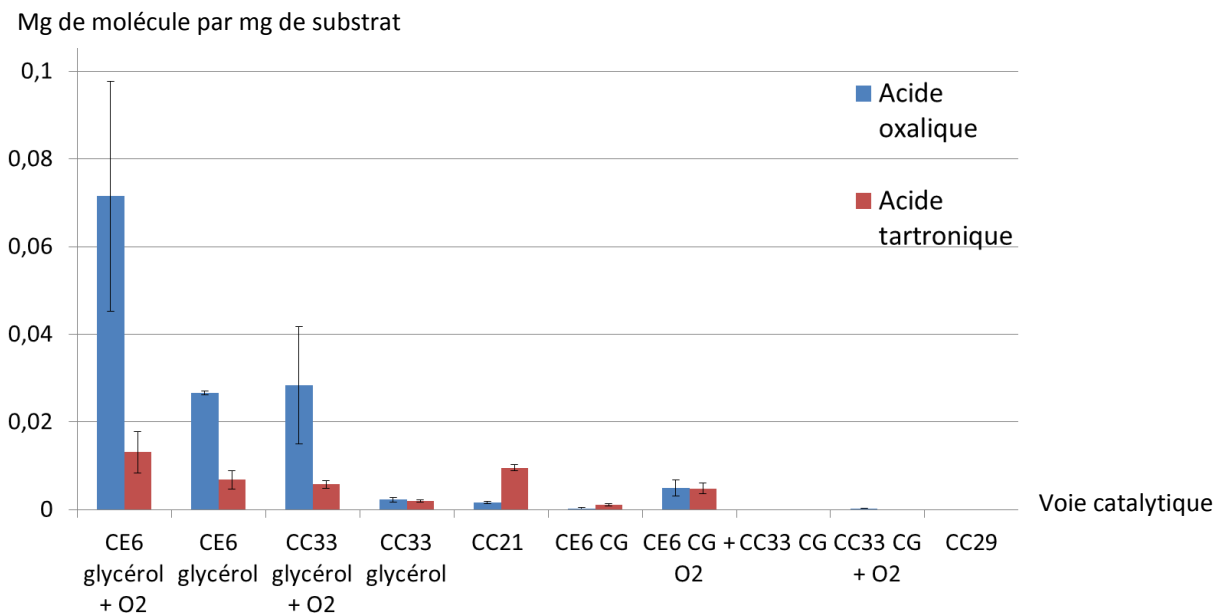


Figure 85 : Masse moyenne (mg) de diacide formé, par quantité de de substrat (mg) introduit à l'état initial pour chaque réaction effectuée

L'histogramme (Figure 85) présente les masses obtenues pour chaque produit (moyenne sur trois essais). Nous constatons tout d'abord que les réactions avec le CG comme substrat ne produisent presque pas ou pas d'acide tartrique et oxalique. Nous pouvons donc dire que, protégée sous forme carbonatée, le glycérol subit beaucoup moins de suroxydation (phénomène donnant naissance aux diacides).

Les conclusions se portent donc principalement sur les essais avec le glycérol. Dans ce cas, les quantités de tartrate formées sont assez similaires d'un protocole à un autre. En effet, la superposition des écarts type entre les réactions avec le duo de métaux non nobles cuivre/manganèse (CC33), le protocole spécifique du glycérol (CC21) et le protocole enzymatique (CE6) sous air ou sous dioxygène témoignent de ce fait.

En revanche, en ce qui concerne l'oxalate, des divergences sont bien visibles. La réaction qui en produit le plus est celle avec le duo TEMPO/laccase sous dioxygène (CE6 + O₂) avec 0,07 mg formé par mg de glycérol contre 0,025 mg pour le protocole enzymatique sous air (CE6), jusqu'au maximum de 0,04 mg pour les catalyseurs cuivre/manganèse sous dioxygène (CC33 + O₂).

Nous pouvons en outre penser que la présence de dioxygène pur facilite, quel que soit le protocole, le phénomène de suroxydation puisqu'en présence d'oxygène, l'ensemble des réactions aboutissent à davantage de diacides (0,07 mg et 0,027 mg d'oxalate pour respectivement (CE6 + O₂) et (CC33 + O₂) contre 0,025 et 0,006 mg pour CE6 et CC33). L'oxalate étant un chélatant connu des métaux, sa présence n'est pas un inconvénient. Cependant, la sélectivité de celui-ci devra être améliorée.

Il est à noter que le glycérol et le glycéraldéhyde ne sont pas détectés en HPIC car ils ne s'ionisent pas quelles que soient les conditions. En revanche, les diacides ou les acides assez forts comme l'acide oxalique et tartronique sortent très bien par cette méthode, les pics sont bien définis, symétriques et bien séparés. L'HPIC intervient donc comme méthode complémentaire de l'HPLC mais ne la remplace pas du fait de l'impossibilité de doser et observer les molécules non ionisables.

Enfin, l'acide mésoxalique et le CG oxydé non pas pu être mis en évidence par cette méthode. Nous avons donc fait appel à une dernière méthode de chromatographie, mais associée à de la spectrométrie de masse. L'objectif n'étant pas de quantifier les molécules mais d'arriver à les observer et de confirmer ou infirmer leur existence dans les milieux réactionnels.

2.1.3 Analyse des milieux réactionnels par spectrométrie de masse

2.1.3.1 Méthode

En s'inspirant de la méthode d'analyse en HPLC précédemment mise au point, les conditions sélectionnées pour l'analyse en spectrométrie de masse sont les suivantes (l'ensemble des conditions se trouvent en p.259) :

- Un éluant acide est nécessaire pour la séparation des molécules, comme expliqué précédemment. Cependant, l'acide sulfurique n'est pas utilisable pour réaliser des analyses de masse car celui-ci ne s'évapore pas suffisamment bien. La nébulisation indispensable des molécules n'aurait donc pas lieu, empêchant toute analyse. L'éluant est donc de l'acide formique à 0,1% dans de l'eau milliQ. Il s'agit d'un éluant classique en HPLC de masse et qui fournit une séparation suffisante pour les molécules des milieux réactionnels étudiées,
- L'ensemble des standards a été analysé en ESI (électrospray) négatif et positif. Seuls les résultats en négatif ont été conservés car aucun résultat n'était visible en ES+.

2.1.3.2 Résultats et discussions

Le Tableau 6 récapitule les masses détectées pour chaque standard analysé.

Standards analysés	Temps de rétention (UV) en minutes	Masse(s) détectée(s) [M-H ⁻]						
CG	Non détecté							
TEMPO								
Laccase	10,10-10,65	86,9	88,9	119	179,1	177,1	100,9	44,9
Acide glycolique	13,84-14,4	75	120,9	158,9				
Acide glycérique	12,04-12,55	104,9						
Glycéraldéhyde	Non détecté							
DHA	Non détecté							
Acide oxalique	7,23-7,64	88,8						
Acide glyoxylique	10,48-10,87	73						
Acide tartronique	8,07-8,51	118,9	175					
Acide hydroxypyruvique	8,76-9,09	102,9						

Tableau 6 : Masses des standards détectées en électrospray négatif (ES⁻).

Le CG, le glycérol, le DHA, le TEMPO et le glycéraldéhyde ne s'ionisent pas (Tableau 6). En effet, aucun signal les concernant n'est visible en électrospray positif ou négatif. En revanche, l'acide oxalique, tartronique, glycolique et glyoxylique sont détectables en ESI négatif ainsi que certains constituants de la laccase. La présence de plusieurs signaux comme dans le cas de l'échantillon de l'acide glycolique ou de l'acide tartronique peut-être dûe à des impuretés présentes dans le standard du fournisseur ou à des adduits qui se forment au cours de l'analyse. Par ailleurs, en ESI négatif, les molécules sont détectées sous leur forme carboxylate (avec $z = 1$), donc avec un proton en moins. Par conséquent, la masse réelle des produits est égale à celle du tableau, additionnée de un.

Dans ces conditions, les masses détectées dans les échantillons de milieux réactionnels sont répertoriés dans le Tableau 7.

Voie de synthèse testée	Temps de rétention (UV) (min)	Masse(s) détectée(s) (g/mol) [M-H ⁻]				
CE6 glycérol	9,7-10,0	101	102,9			
	16,8 -17,3	152,8	154,7			
	13,2-13,0	105	173			
	14,0-14,4	153	155			
CE6 +O₂ glycérol	13,1 -14,0	105	173			
	10,9-11,2	195,1				
	9,6-9,9	73	101	103	119	169
	8,1-8,4	117				
	7,7-7,9	62				
CE6 CG	13,4-13,7	105	173	163		
	9,6-9,9	131				
	10,9-11,2	195,1				
CE6 CG +O₂	9,6-9,9	131				
	13,3-13,7	105	173			
	9,4-9,7	199				
	9,8-10,1	199				
CC 33 + O₂ glycérol	7,6-8,0	62				
CC 33 glycérol	9,6-9,9	73	100,9	169		
	11,6-11,9	73,2				
	13,2-13,7	105	172,9			
CC33 CG	16,8-17,5	153	154			
	13,9-14,6	105	153			
	12,3-12,6	179				
	11,5-11,8	179				
	9,4-9,9	173	176			
	13,6-13,9	105	173			
	13,1-13,4	105	172			
CC33 +O₂ CG	12,3-12,8	181				
	11,5-11,9	179				
	13,4-13,7	73	105			
	9,6-9,9	59	131			
	10,8-11,1	105				
CC21 (glycérol)	12,1-12,5	104,9	75			
	6,8					
	9,9-10,4	154,7	172,9	184,9	198,9	
CC29 (CG)	6,9-7,2	149	151	80	89	
	11,8-12,2	105	106	75	69	59

Tableau 7 : Masses détectées par spectrométrie de masse (ES⁻) dans les échantillons de milieux réactionnels

Nous remarquons que la masse de l'acide glycérique (avec la masse de 104,9 à 105 g/mol et un temps de rétention compris entre 13,1 et 14,6 minutes) apparaît dans toutes les voies de synthèse, quel que soit le substrat, à l'exception de celui mettant en jeu le duo de métaux non nobles sur glycérol (CC33). En effet, il s'agit d'une molécule s'ionisant facilement et très visible en termes d'intensité de signal ce qui pourrait expliquer qu'elle soit aussi souvent détectée, même à des concentrations faibles.

D'autre part, dans le cas des protocoles mettant en jeu le glycérol, de l'acide glyoxylique est (73 g/mol) entre 9,6 et 9,9 minutes dans la voie avec le duo cuivre/manganèse (CC33) sous air seulement, ainsi que dans le système enzymatique sous dioxygène (CE6 + O₂). Cet élément est en faveur de ces deux catalyses. Cependant, cette dernière conclusion est à prendre avec réserve car, les résultats ne sont pas toujours répétables puisque nous n'avons pas détecté les masses de 73 (et 75) g/mol dans toutes les expériences associées à un même protocole. Il est possible que les molécules n'étant pas assez concentrées, leur signal soit en partie caché dans le bruit de fond de l'éluant (acide formique). Enfin, nous ne pouvons pas conclure pour les autres masses répertoriées dans les échantillons. En effet, les temps de rétention ne correspondent pas toujours exactement. En revanche, ces analyses permettent bien de confirmer la présence d'acide glycérique.

Dans le cas des réactions avec le CG, le signal du CG oxydé est enfin détecté avec une masse de 131 g/mol entre 9,6 et 9,9 minutes dans les échantillons des systèmes enzymatiques sous air ou sous oxygène (CE6, CE6 + O₂) et le duo non noble sous oxygène seulement (CC33 + O₂). La catalyse spécifique du CG ne donne pas de résultat concernant ce produit.

Ainsi, les tableaux de synthèse suivant sont établis :

GLYCEROL						
Masse détectée		CE6 +O ₂	CE6	CC33	CC33+O ₂	CC21
Acide glycérique	105					
Acide glyoxylique	73					

Tableau 8 : Récapitulatif des masses des produits d'intérêt identifiés dans les milieux réactionnels issus de l'oxydation du glycérol (bleu = masse détectée, rouge = masse non détectée)

CG						
Masse détectée		CE6 +O ₂	CE6	CC33	CC33+O ₂	CC29
Acide glycérique	105					
CG oxydé (théorique)	131					

Tableau 9 : Récapitulatif des masses des produits d'intérêts identifiées dans les milieux réactionnels issus du CG (bleu = masse détectée, rouge = masse non détectée)

En HPLC, nous avons constaté que les masses d'acide glycérique les plus importantes étaient produites par la catalyse laccase /TEMPO sous dioxygène avec le glycérol (CE6+ O₂). A l'aide des données du Tableau 8, nous pouvons valider ce choix comme étant le plus adapté pour l'oxydation du glycérol. En effet, c'est également le protocole enzymatique sous oxygène (CE6+O₂) qui donne les meilleurs résultats en spectrométrie de masse car il fournit de l'acide glycérique mais aussi de l'acide glyoxylique.

Par ailleurs, ce système catalytique enzymatique permet de fabriquer l'autre HA attendu : le CG oxydé comme en témoigne la détection de sa masse théorique à 131g/mol (Tableau 9)(CE6+ O₂). Un unique protocole permet donc d'oxyder deux substrats. La masse du CG oxydé est cependant aussi détectée dans le milieu réactionnel même si celui-ci est seulement sous air (CE6).

Ainsi, le protocole enzymatique CE6 est le plus intéressant pour l'oxydation du CG car la présence de dioxygène pur n'est pas indispensable à la formation de l'acide carboxylique associé, contrairement aux autres protocoles comme le duo métallique non noble (CC33) ou celui spécifique du CG (CC29). En outre, il s'agit de celui qui présentait la meilleure sélectivité pour le CG oxydé (comme présenté en HPLC).

2.1.3.3 Conclusions

En conclusion des trois analyses de chromatographie effectuées : par réfractométrie différentielle, par conductimétrie et par spectrométrie, nous sélectionnons la voie de synthèse laccase/TEMPO sous dioxygène pour réaliser l'oxydation du glycérol et la voie de synthèse laccase/TEMPO sous air ambiant pour l'oxydation du CG.

Ces premières analyses nous ont donc permises de faire un choix parmi les quatre systèmes catalytiques sélectionnés. Cependant, de nombreuses inconnues demeurent sur la nature de molécules dans le milieu réactionnel issu de TEMPO/laccase avec le glycérol comme avec le CG (en vert Figure 85). Par exemple, malgré la fiabilité de l'électrospray négatif pour confirmer la présence des acides carboxyliques, et l'intensité du signal obtenu pour la masse de 131g/mol (suggérant fortement que la molécule correspondante est un acide carboxylique dérivant du CG oxydé), nous ne savons pas, où se situe ce produit sur le chromatogramme de l'échantillon du protocole enzymatique (Figure 85).

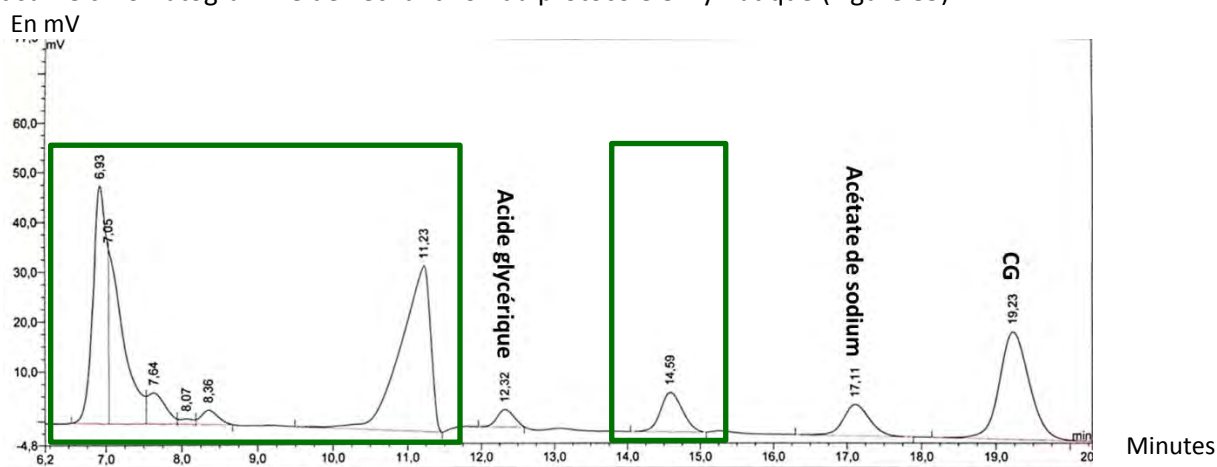


Figure 86 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la réaction de CE6 laccase/TEMPO sous air ambiant. Pics inconnus encadrés en vert

Enfin, l'acide mésoxalique n'a toujours pas été mis en évidence et la présence de molécules minoritaires identifiées par HPLC comme acide glycolique ou l'acide glyoxylique doit être confirmée ou infirmée. Nous proposons donc d'étudier de façon plus poussée les différentes molécules fabriquées, car une connaissance de l'ensemble des produits synthétisés est indispensable à l'amélioration des rendements de la réaction en HA et à la maîtrise du projet.

Une étude plus approfondie des structures moléculaires issues de CE6 est donc proposée et fait appel à des méthodes d'analyse plus fines qui viendront en soutien aux observations faites en chromatographie associée aux détecteurs conventionnels (RI, UV) et aux conclusions de la spectrométrie de masse. En effet, ces méthodes, faciles à mettre en œuvre, ne permettent pas d'accéder à la structure exacte des molécules et rend leur identification dépendante de l'existence d'un standard adapté ou d'une ionisation forte ainsi que d'une connaissance minimum du mécanisme réactionnel.

2.2 Analyse fine pour l'identification totale des composés de la réaction enzymatique laccase / TEMPO (CE6)

Toutes les analyses présentées précédemment et en suivant ont été répétées pour s'assurer de la fiabilité des résultats. Nous souhaitons effectuer une détermination structurale précise des molécules fabriquées au cours de l'oxydation du glycérol et du CG par le système laccase/TEMPO. Cependant, une simple observation des molécules issues de l'oxydation du glycérol démontre que celles-ci possèdent des structures chimiques très proches, des masses identiques pour certaines (acide mésoxalique et glycéraldéhyde par exemple) et des propriétés physico-chimiques si similaires que toute discrimination est très compliquée.

Il n'est donc pas possible de réaliser une analyse RMN ou infra-rouge des mélanges réactionnels car l'abondance de signaux rendrait l'attribution des signaux propres à chaque impossible. Ce problème est amplifié par la méconnaissance des produits issus du CG car nous ne savons pas ce que nous attendons comme structure de produit. Enfin, la plupart des produits ne sont solubles que dans l'eau. La purification des différentes substances est donc très complexe.

Afin de pouvoir extraire chaque produit indépendamment des autres, pour l'analyser seul, nous pratiquerons une extraction ou collecte de fractions sur les milieux issus de l'oxydation du glycérol et du CG.

2.2.1 Séparation des produits contenus dans les mélanges réactionnels issus de la voie catalytique enzymatique

La technique d'extraction de fractions avec un module préparatif consiste à prélever chaque produit indépendamment des autres dans un échantillon où ils sont pourtant mélangés, et de les collecter séparément. Pour ce faire, le module de préparative Ultimate 3000 fraction collector (Dionex) est utilisé afin d'extraire le liquide sortant de la colonne, correspondant à certaines périodes de temps qui lui ont été indiquées par programmation (Figure 87).

L'extraction de fraction a pour objectif de transformer un milieu réactionnel riche constitué d'un grand nombre de produits en plusieurs sous-milieus (douze dans le cas de la réaction sur le CG et huit dans le cas du glycérol) composés d'une à trois espèces maximum. Ainsi, les analyses effectuées sur ces mélanges simplifiés nous permettront une meilleure caractérisation des produits à l'aide des analyses en RMN et par spectrométrie de masse de haute résolution. Il sera donc possible d'attribuer à chaque substance ses propres signaux et donc d'en déduire sa structure exacte.

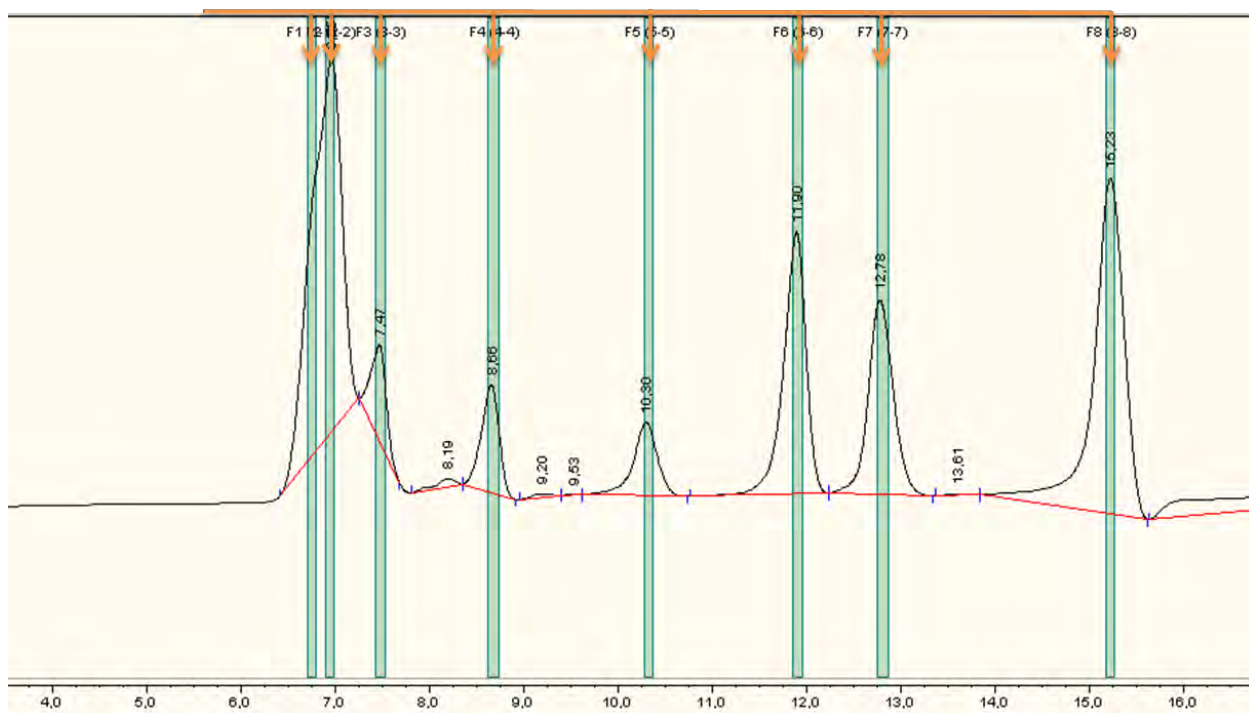


Figure 87 : Fractions collectées (en vert) sur l'échantillon de la réaction de laccase/TEMPO effectué sur glycérol en présence de dioxygène

Afin de s'assurer au maximum de l'exactitude de nos caractérisations, nous avons effectué les réactions de CE6 avec du glycérol marqué au ^{13}C sur ses trois carbones. Le but est de pouvoir mieux détecter les produits qui seront formés à partir de celui-ci par analyse RMN et par spectrométrie de masse. En effet, nous avons utilisé du glycérol dont l'enrichissement en ^{13}C permet d'avoir un signal beaucoup plus intense en RMN et de visualiser des masses spécifiques des molécules formées au cours de la réaction à partir de celui-ci.

La phase stationnaire de la colonne Aminex HPX 87 H n'existe pas en format préparative. Nous avons donc travaillé avec une colonne analytique ne pouvant traiter qu'un volume restreint d'échantillon. Ainsi, pour avoir une bonne qualité d'analyse, la concentration optimale déterminée pour collecter les produits dans les échantillons est de 20 mg/ml avec un volume d'injection de 20 à 40 µL.

L'acide formique a été sélectionné comme composante acide de la phase mobile. Le chromatogramme est de moins bonne qualité mais suffit à obtenir des fractions séparées. Par ailleurs, l'acide sulfurique n'étant pas volatile, l'évaporation de l'excédent de liquide des échantillons collectés aurait provoqué son accumulation et donc une destruction des molécules d'intérêt. L'acide formique était donc requis pour la collecte. L'intégralité des conditions de collecte se trouve en p.260.

Nous avons donc isolé huit fractions (Tableau 10) dans le milieu réactionnel issu de l'oxydation du glycérol sous dioxygène avec le duo laccase/TEMPO, et douze dans le cas de l'oxydation du CG avec le duo laccase/TEMPO sous air ambiant (Tableau 11).

Nom de la fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Temps de rétention (début du pic) (min)	6,5	6,96	7,46	8,66	10,3	11,89	12,78	15,23

Tableau 10 : Temps de rétention des fractions issues de l'oxydation du glycérol sous dioxygène avec le duo laccase/TEMPO

Nom de la fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Temps de rétention (début du pic) (min)	6,7	7,08	7,65	8,31	9,2	9,6	12	14,76	15,7	21,8

Tableau 11 : Temps de rétention des fractions issues de l'oxydation du CG avec le duo laccase/TEMPO

2.2.2 Identification des produits formés

2.2.2.1 Analyse en spectrométrie de masse de haute résolution : LC-HRMS

Afin d'observer plus en détails la structure fine des molécules et notamment d'obtenir des masses plus fiables pour ces dernières, nous décidons d'utiliser un détecteur de spectrométrie de masses très sensible et qui permet par ailleurs d'observer le CG et le glycérol, invisibles avec un quadripôle (comme utilisé dans les premières analyses de spectrométrie). Il s'agit d'un détecteur nommé orbitrap. Nous souhaitons ainsi mettre au point une technique plus performante permettant d'accéder à une gamme plus large de produits. Un travail collaboratif a donc été réalisé avec M. David Riboul du Laboratoire de Génie Chimique (ENSIACET) dans le but de mettre au point une méthode d'analyse par Spectrométrie de Masse Haute Résolution (LC-HRMS) à l'aide de ce détecteur.

Notre démarche a été, dans un premier temps, d'étudier les standards correspondant aux produits d'oxydation du glycérol (acide glycérique, glycolique, DHA, glycérol etc.) afin de mettre au point le protocole d'analyse (colonne la plus adéquate, éluant, gradient, etc.). Nous avons ensuite examiné les milieux réactionnels du protocole enzymatique (CE6 avec dioxygène ou sous air) avec ces conditions afin d'avoir une vue d'ensemble des signaux des mélanges. Enfin, des réactions témoins (avec un catalyseur manquant) ont été étudiées dans le but de discriminer les signaux des produits de synthèse de ceux des éléments indépendants de la réaction d'oxydation.

Dans un second temps, nous avons analysé les fractions extraites comme précédemment indiqué afin d'affiner et de compléter les résultats obtenus sur les mélanges réactionnels complets.

2.2.2.1.1 Méthode

Dans le but d'établir une méthode d'analyse adaptée pour les échantillons issus de l'oxydation du CG et du glycérol, les points suivants ont été pris en compte :

- Le CG ionisé par électrospray positif forme de nombreux clusters, correspondant à l'association de plusieurs molécules donnant naissance à une grande variété d'adduits. Ces derniers sont constitués de CG, d'acide formique et de sodium cationique voire de molécules d'eau. La source d'ionisation est connue pour générer ce type de réaction lorsque la température de formation du cône de Taylor est trop basse. Par conséquent, nous avons choisi une température supérieure pour limiter la formation de ces clusters dont les masses parasitent le signal et ne sont pas répétables.
- Afin de vérifier si les masses observées n'ont pas pour origine une contamination externe, ou n'aurait pas le CG ou le glycérol comme origine, l'eau milliQ et les milieux des expériences témoins (sans TEMPO, sans enzyme ou sans substrat c'est-à-dire uniquement avec les catalyseurs) sont analysés.
- Nous avons recherché spécifiquement les masses du glycérol dans les échantillons du CG pur, servant de substrat à nos réactions.
- Dans le but de confirmer que les masses détectées respectivement sur CG et sur glycérol étaient bien dues à une réaction spécifique sur chaque substrat, les masses identifiées dans chaque situation ont ensuite été recherchées dans les échantillons des réactions du duo laccase/TEMPO sur glycérol avec ou sans dioxygène puis dans les échantillons des réactions du duo laccase/TEMPO sur CG sous air.
- Le Traitement du signal de masse résultant se fera :
 - Au travers d'un screening : nous recherchons dans les spectres toutes les masses exactes correspondant aux formules brutes de tous les intermédiaires réactionnels et standards connus (DHA, glycérol acide glycérique etc.) et les pics correspondants.
 - Au travers d'un screening non ciblé (nous recherchons des molécules dont nous ne connaissons pas la masse) en répertoriant tous les signaux significatifs des spectres. Les données brutes sont donc débruitées à l'aide d'un algorithme de suppression du bruit de fond (MetAlign). Ainsi, il sera possible de distinguer les signaux de molécules existantes des signaux parasites et des artefacts.

2.2.2.1.2 Résultats préliminaires des analyses des échantillons en LC-HRMS

Les colonnes analytiques choisies, la PFP et la Trinity P2, ne permettent pas de discriminer de façon très sûre les molécules au travers de leur temps de rétention car les produits en sortent assez proches les uns des autres. En revanche, la masse de chacun et la forme de leur pic rend leur distinction possible. Une première approche rapide a été effectuée en analysant les standards, les milieux réactionnels dans leur ensemble et les expériences témoins afin de repérer les grandes tendances. L'utilisation de deux colonnes a pour but de trouver la meilleure mais aussi de confirmer les résultats obtenus. Les conditions analytiques et la description des colonnes sont p.262.

2.2.2.1.2.1 Utilisation de la colonne Trinity P2

Standard	Masse molaire détectée (g/mol)	Masse réelle (g/mol)
Acide glycolique	75,006	76,006
Acide glyoxylique	72,99	73,99
Acide glycérique	105,01	106,01
Acide oxalique	N.D	N.D
Acide tartronique	N.D	N.D
DHA	N.D	N.D
Glycéraldéhyde	N.D	N.D
CG	163,02	118,02

Tableau 12 : Masses des standards détectées en Electrospray négatif (N.D = non détecté) avec un orbitrap

Dans le Tableau 12, nous constatons que l'acide oxalique et tartronique ne sont pas détectés. En effet, les diacides migrent de façon horizontale dans la colonne et sortent donc de celle-ci en permanence. Pour pouvoir être observables, il aurait fallu une sortie massive à un moment précis dans la colonne. Le signal qui leur est associé est donc faible et présent sur l'intégralité du chromatogramme, masqué dans le bruit de fond. Par conséquent, il n'est pas interprétable. D'autre part, il n'y a pas de signal pour le glycéraldéhyde et le DHA car ces molécules n'ont pas la capacité de s'ioniser. De plus, les adduits qu'ils peuvent former avec l'acide formique de l'éluant (ionisable) ne sont pas répétables. En conclusion, cette méthode en électrospray négatif ne permet de détecter que les standards de l'oxydation du glycérol des trois premières lignes du Tableau 12.

En revanche, en ce qui concerne le CG, un résultat majeur est ici mis en évidence. En effet, le CG est repéré sous forme d'adduit, c'est-à-dire du CG associé à de l'acide formique ($C_5H_7O_6$) avec une masse de 163,02 g/mol. A ce jour, le CG n'avait jamais été visualisé en spectrométrie de masse. Ce résultat est donc une nouveauté des travaux de thèse.

La détection des substrats de départ, Tableau 13, est quant à elle faite en ESI positif car leurs signaux ne sont visibles que dans ce mode. Nous identifions ainsi le CG et le glycérol (non enrichi). Ce point est également très important puisque jusqu'ici, ces molécules difficilement ionisables n'avaient pas pu être mises en évidence en spectroscopie. Cependant, l'utilisation de l'orbitrap a permis d'arriver à ce résultat en fournissant la masse exacte de l'espèce, additionnée d'un du fait du mode d'ionisation choisi (93,05 g/mol pour le glycérol et 119,02 g/mol pour le CG).

En électrospray positif	Masse molaire détectée	Masse réelle (g/mol)	Adduits détectés (g/mol)
CG	119,02	118,02	148,5
Glycérol	93,05	92,05	75,04 :

Tableau 13 : Masses des standards détectées en Electro spray positif (signal > 10⁶) avec un orbitrap

D'autre part, il est possible de détecter la masse d'adduits ou du substrat de départ, modifiée par le processus d'analyse. Ainsi, la déshydratation du glycérol abouti à la présence d'une masse à 75,04 g/mol, dont le pic existe avec une forme identique quel que soit le spectre de masse et est détectée au même temps de rétention. De la même façon un adduit du CG est formé à 148,5 g/mol (Tableau 13).

Il est à noter qu'il existe du glycérol à l'état de traces (signal en HR-LCMS < 10⁴) dans le CG pur utilisé comme substrat. Cela s'explique par le fait que le CG est synthétisé à partir de glycérol. Cependant, le signal est très faible, ce qui indique que sa présence n'aboutira à aucun produit pouvant fausser les interprétations et ne pourra être à l'origine d'aucun signal du glycérol si celui-ci venait à être détecté dans les produits d'oxydation du CG avec la voie catalytique enzymatique.

Des analyses préalables sont par la suite effectuées pour vérifier si les masses observées dans les milieux de réaction ne sont pas des pollutions ou des artefacts. Comme indiqué dans la méthode, l'eau milliQ et les milieux des expériences témoins (réalisées sans enzyme ou sans TEMPO ou en présence de tous les catalyseurs mais sans substrat, nommées « Blanc ») sont étudiés Tableau 14. Ce point est nécessaire car l'orbitrap étant très sensible, nous devons être sûr que les espèces détectées résultent bien des réactions sur le substrat et qu'il ne s'agit pas d'impuretés ou de produits de réactions entre catalyseurs.

Milieu réactionnel	Espèce détectée
CE6 +O ₂ Glycérol	Glycérol, acide glycérique
CE6 CG	CG, CG oxydé (131 g/mol), acide glycérique
« Blanc » sans enzyme ou sans TEMPO avec glycérol	Glycérol
« Blanc » sans enzyme ou sans TEMPO avec CG	CG
Eau milliQ sans substrat	-

Tableau 14 : Masses répertoriées dans les milieux réactionnels témoins effectués dans le cas du glycérol et du CG

Nous constatons qu'aucune masse n'a été répertoriée à l'exception du glycérol ou du CG dans les expériences témoins « blancs » Tableau 14 sans enzyme ou sans TEMPO. Ainsi, toutes les masses répertoriées par la suite et en particulier dans les deux premières lignes en début du Tableau 14 ((CE6 + O₂ glycérol) et (CE6 CG)) ont bien l'assurance d'être issues de la réaction enzymatique de catalyse sur le glycérol ou sur le CG (cela dépend du substrat de départ).

De surcroît, les échantillons de réactions de la voie enzymatique sur glycérol ne contiennent aucune masse détectée propre aux mélanges provenant du CG (à l'exception de celles des différents standards connus de l'oxydation du glycérol) et réciproquement.

En conclusion, les produits d'oxydation par la suite décrits dans le cas du glycérol comme dans le cas du CG découlent obligatoirement de la réaction qui a eu lieu sur ces substrats.

2.2.2.1.2.2 Utilisation de la colonne PFP

2.2.2.1.2.2.1 Résultats dans le cas du glycérol

Nous repérons les mêmes masses qu'avec la colonne Trinity P2 pour l'analyse des blancs, de l'eau milliQ et des standards mais l'acide tartronique est en plus détecté avec cette colonne avec une masse de 118,998 en électrospray négatif. D'autre part, dans le milieu réactionnel total issu de l'oxydation du glycérol ^{13}C (sur ses 3 carbones) par le protocole enzymatique sous dioxygène, nous détectons du glycérol, de l'acide glycérique, mais aussi de l'acide glyoxylique (Figure 88).

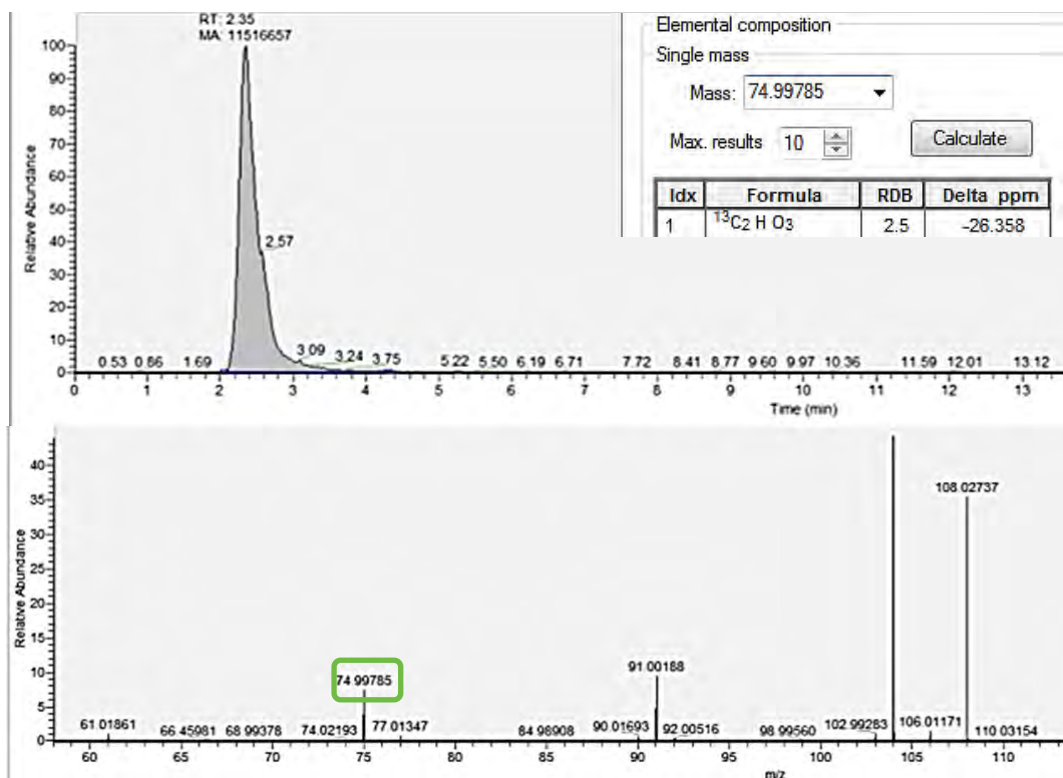


Figure 88 : Mise en évidence de la présence d'acide glyoxylique au travers du spectre (en bas) et du chromatogramme (en haut) associée aux milieux issus de la catalyse enzymatique sur glycérol ^{13}C en présence de dioxygène

La détection de l'acide glyoxylique est un point important de nos travaux car ce composé n'avait jusqu'ici pas pu être mis en évidence de façon sûre, c'est-à-dire avec une méthode plus sensible que l'HPLC en détection RI. Ce résultat nous permet en outre, de constater qu'avec une analyse rapide, nous obtenons déjà des renseignements sur la composition des milieux. L'utilisation de deux colonnes différentes permet de valider les conditions du protocole établies, la qualité des analyses et les données recueillies.

2.2.2.1.2.2.2 Résultats dans le cas du CG

Dans le cas du CG, les masses détectées dans la totalité du milieu réactionnel issu de la catalyse enzymatique sont répertoriés dans le Tableau 14 (CE6 CG). Nous détectons ainsi de les masses correspondante à l'acide glycérique, la masse du CG oxydé et du CG.

2.2.2.1.2.3 Conclusions

Les résultats obtenus sur l'ensemble des milieux réactionnels nous fournissent des renseignements généraux sur la composition des milieux. Il est cependant nécessaire d'effectuer une recherche de masses plus poussée afin de ne pas manquer des produits qui seraient cachés dans le bruit de fond généré par les éléments résultants probablement de l'altération de l'enzyme (ce point sera abordé par la suite) et par l'éluant lui-même. Ainsi, nous décidons d'analyser les fractions issues de la catalyse TEMPO/laccase sur glycérol marqué au ^{13}C en présence de dioxygène et sur les fractions extraites du milieu réactionnel provenant du CG avec la même catalyse mais sous air selon la méthode précédemment établie et à l'aide de la colonne PFP.

En outre, afin de proposer une structure fiable pour les molécules ainsi détectées, nous associeront à chaque fraction une analyse RMN 1D du carbone et du proton et en 2D (HSQC, HMBC, COSY). Les fractions avant toute analyse seront donc placées dans de l'eau deutérée (seul solvant qui assure la solubilité de tous les composés) avec de l'acide formique pour stabiliser les acides carboxyliques sous forme acide et ainsi augmenter la qualité du signal RMN des fractions. Les conditions expérimentales se trouvent p.260.

L'ensemble de ces travaux de RMN ont été réalisés en collaboration avec Marc Vedrenne et Stéphane Massou du service commun de RMN de l'université Paul Sabatier de Toulouse.

2.2.2.2 Analyse des fractions par LC-HRMS et RMN

- Seules les masses ayant un signal au-dessus de 10^5 ont été retenues car celles dont le signal est plus faible peuvent être considérées comme faisant partie du bruit de fond.
- Une analyse par RMN pour chaque fraction a été réalisée. Seuls les résultats les plus importants seront présentés ici, mais une description des molécules les plus importantes est fournie dans la partie expérimentale p. 260 et en annexe à partir de la p. 315 où se trouvent les données complémentaires des fractions non présentées ici dans le détail.

2.2.2.2.1 Le cas de l'oxydation du glycérol ^{13}C

Dans la mesure où nous étudions les masses des produits issus de la réactivité du glycérol marqué au ^{13}C sur ses trois carbones, celles-ci sont plus élevées que dans le cas d'un substrat non enrichi. Le Tableau 15 répertorie donc les masses des espèces produites, potentiellement présentes, et marquées au ^{13}C qui seront recherchées dans les échantillons.

Molécule	Masse réelle (^{13}C)(g/mol)	Masse de l'ion moléculaire en ionisation positive	Masse de l'ion moléculaire en ionisation négative
Acide glycolique	78,02	79,03	77,01
Acide glyoxylique	76,007	77,01	74,99
Acide oxalique	92,00	93,009	90,99
Acide mésoxalique	121,00	122,008	119,99
Acide glycérique	109,03	110,04	108,02
Acide tartronique	123,01	124,02	122,008
Acide hydroxypyruvique	107,02	108,02	106,01
Glycéraldéhyde	93,04	94,049	92,03
DHA	93,04	94,04	92,03
Glycérol	95,05	96,06	94,04

Tableau 15 : Masses recherchées de façon systématique (via le logiciel de traitement) en spectrométrie de masse dans les échantillons pour le glycérol ^{13}C

Nous utiliserons à la fois l'ESI positive et négative pour s'assurer de s'être placé dans toutes les conditions expérimentales pouvant révéler la présence des produits. L'ensemble des valeurs du Tableau 15 ont donc été recherchées par un logiciel prévu à cet effet dans toutes les fractions provenant de l'oxydation sous dioxygène du glycérol par le duo laccase/TEMPO.

En outre, les fractions 3 à 5 ont fait l'objet d'une recherche de masses non spécifiques (screening non ciblé). Le but est d'essayer de trouver toutes les masses ayant un signal significatif et non répertoriées dans le Tableau 15 pouvant potentiellement exister à la suite de l'oxydation du glycérol. Les masses exactes sont écrites avec deux chiffres significatifs, c'est-à-dire suivant la précision du détecteur orbitrap. Des analyses supplémentaires sont disponibles p. 321.

Les résultats de spectrométrie de masse sont listés dans le Tableau 16 :

Fraction	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Masses détectées en ionisation positif	–	–	–	–	–	–
Masses détectées en ionisation négatif	108,02	–	108,02	108,02	108,02	–
	119,99	119,99	119,99	–	–	–
	–	–	122,006	–	–	–
	–	–	106,01	–	–	–
	–	–	74,99	74,99	–	–
	–	–	–	–	–	96,06

Tableau 16 : Masses détectées dans les fractions. En gras le produit majoritaire (signal fort détecté en masse et en LC).

Les fractions F1 et F2 Tableau 16 ne présentent pas de signaux interprétables et ne sont donc pas répertoriées dans le tableau. Il n'est pas possible de faire de conclusions en spectrométrie de masse à l'exception de la présence de glycérol dans la fraction F1 (une analyse de ces fractions par une autre méthode analytique sera présentée dans la suite du manuscrit). La RMN ne nous a pas fourni plus d'information les concernant.

La présence du glycérol dans la fraction F1, mais surtout dans la fraction F8 où il est le plus abondant, donc dans les fractions temporellement les plus éloignées est remarquable. Cela s'explique par le fait que le bras collecteur chargé de récupérer les fractions termine le cycle par la fraction F8 puis recommence un nouveau cycle de collecte en F1 sans rinçage préalable. Or, une goutte de la fraction précédente a souvent tendance à rester en sortie de valve du collecteur après chaque fraction. Ainsi, des traces du contenu d'une fraction précédente peuvent se retrouver dans la fraction suivante (Tableau 16).

Ces problèmes de conception de l'appareil sont probablement à l'origine de la détection d'une même molécule dans deux fractions distinctes. Cette observation est valable pour presque tout l'ensemble des fractions se suivant deux à deux (F8 et F1, F2 et F3, etc.) comme nous le voyons dans le Tableau 16 (mais comme nous le verrons aussi dans les analyses RMN). Cependant, les proportions d'une même substance y sont différentes.

Ainsi, l'acide glycérique, bien que présent dans toutes les fractions, est à son maximum dans la fraction F6 avec une valeur de 108,02 g/mol (Tableau 16) et facilement visualisable dans le spectre de masse et le chromatogramme UV (Figure 89).

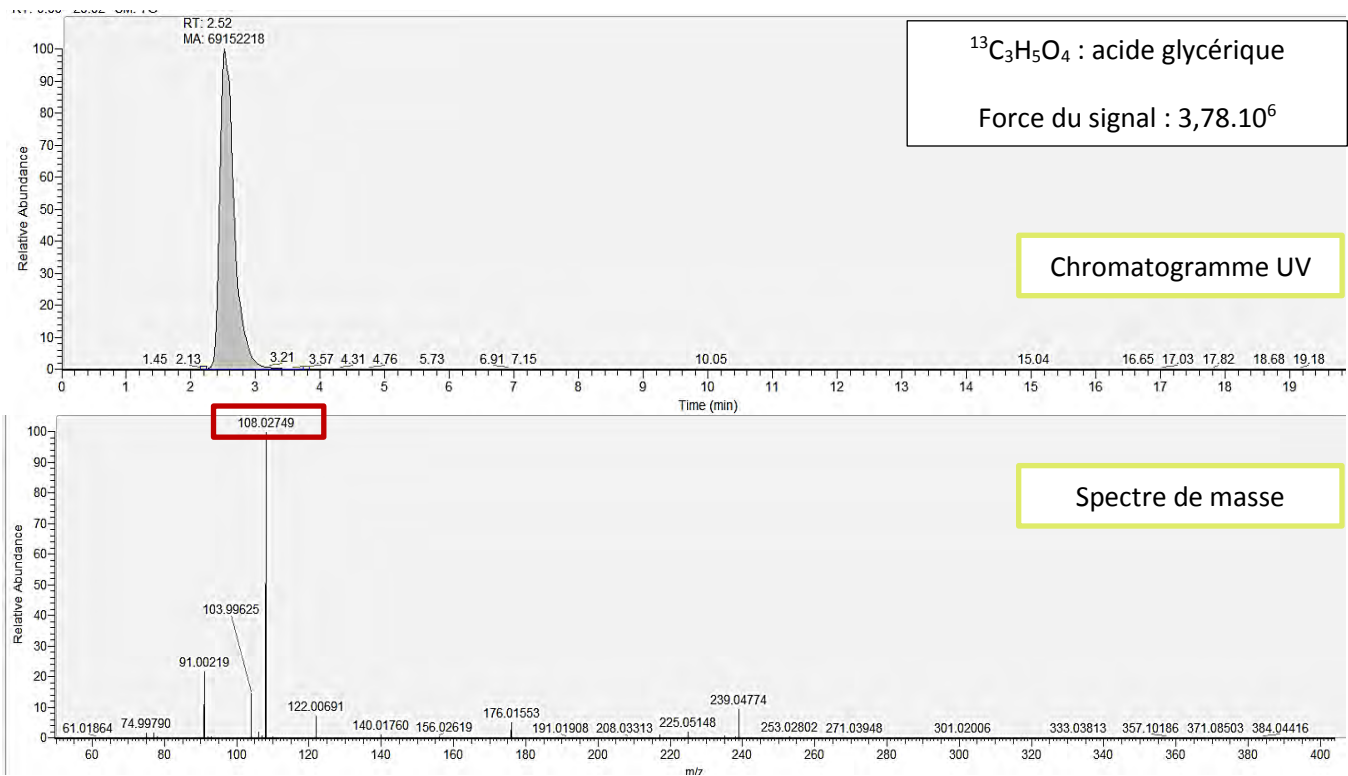


Figure 89 : : Spectre de masse et chromatogramme UV obtenus sur la fraction F6 avec un détecteur orbitrap

Par ailleurs, l'acide mésoxalique, qui n'était jusqu'alors pas identifiable dans nos échantillons est mis en évidence en F3 et en F4 (et F5 où il est minoritaire) comme en témoigne le spectre de masse de la fraction F4 Figure 90.

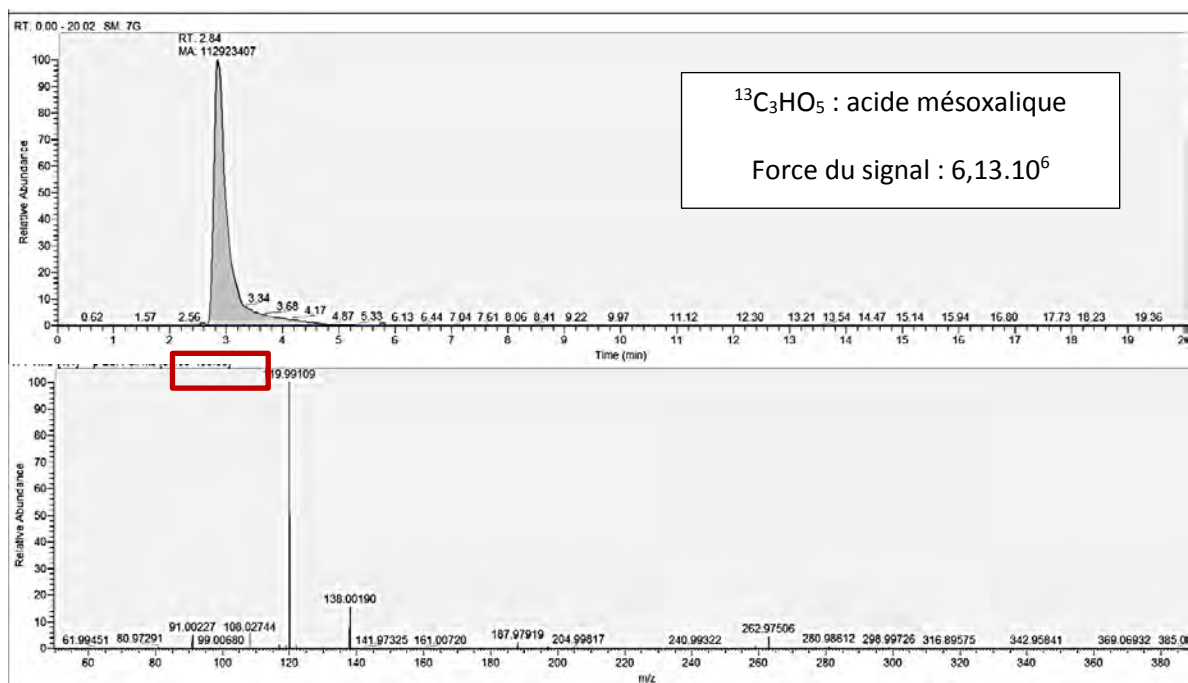


Figure 90 : Mise en évidence de l'acide mésoxalique sur le chromatogramme UV de la fraction F4 et le spectre de masse associé

La RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de la fraction F4 confirme le résultat du Tableau 16 et nous fournit les informations nécessaires à la confirmation de la structure de l'acide mésoxalique :

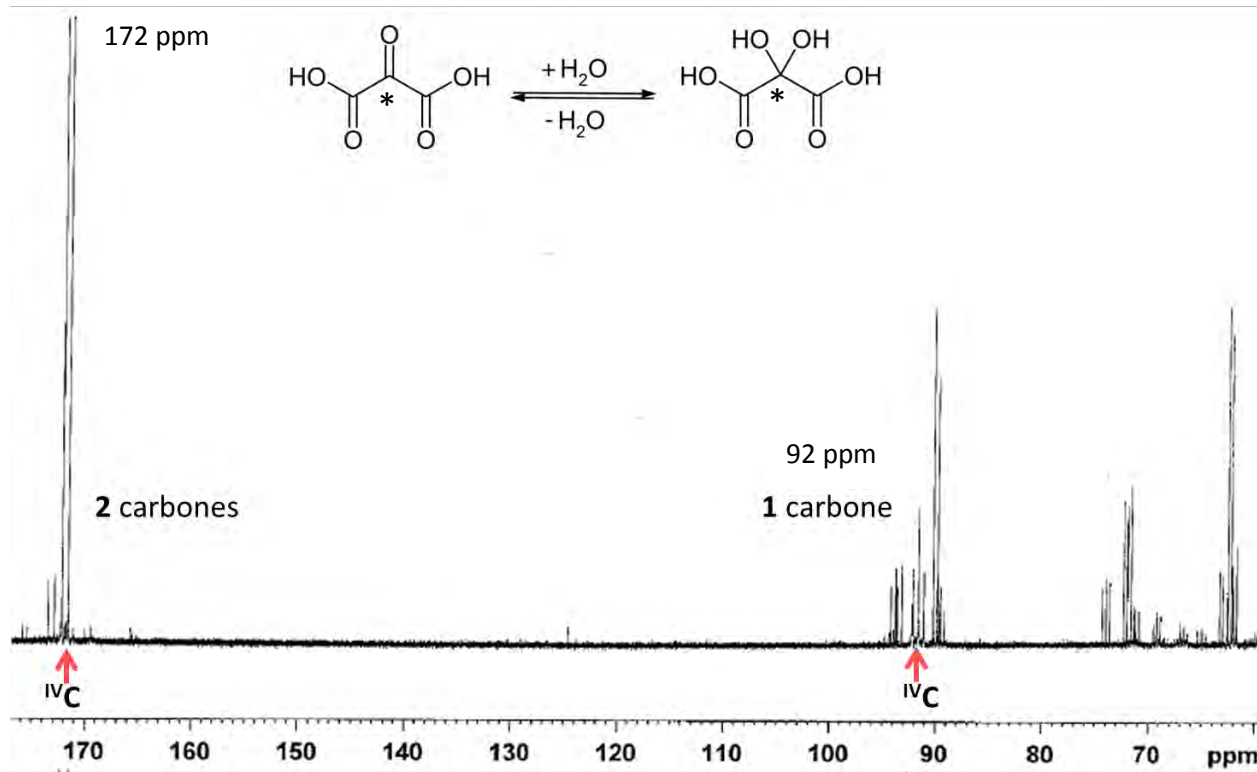


Figure 91 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de la fraction F4 dans D_2O à 298 K

Nous constatons Figure 91 la présence de deux groupes de carbone quaternaires dans la molécule. Le premier, très déblindés à 172 ppm, correspond, si nous observons l'importance du signal, à deux carbones, constituant chacun une fonction carboxylique. La molécule est donc symétrique. En revanche, le second signal d'un carbone quaternaire (vérifié par la RMN 2D) est très peu déblindé par rapport à la valeur attendue compte tenu de son état d'oxydation (92 ppm). Ce carbone, noté (*) est en fait hydraté au cours de l'analyse et relié à un groupement hydroxyle (OH) au lieu de former une fonction $\text{C}=\text{O}$. Il s'agit ici d'un résultat important puisque l'acide mésoxalique est très peu décrit dans la bibliographie. Ces résultats constituent donc une avancée dans la description des acides issus de l'oxydation du glycérol.

Dans la fraction F5, nous révélons la présence d'acide tartronique à une masse de 122,006 g/mol (Tableau 16), majoritaire (Figure 92), ce qui permet de confirmer sa présence par un autre mode de détection que la réfractométrie. En outre, nous arrivons à mettre en évidence la présence de l'acide hydroxypyruvique de masse égale à 106,01 g/mol (Tableau 16), qui n'avait pas encore été identifié. Le temps de rétention de ce composé détecté dans la fraction 5 correspond d'ailleurs parfaitement à celui du standard (Figure 93).

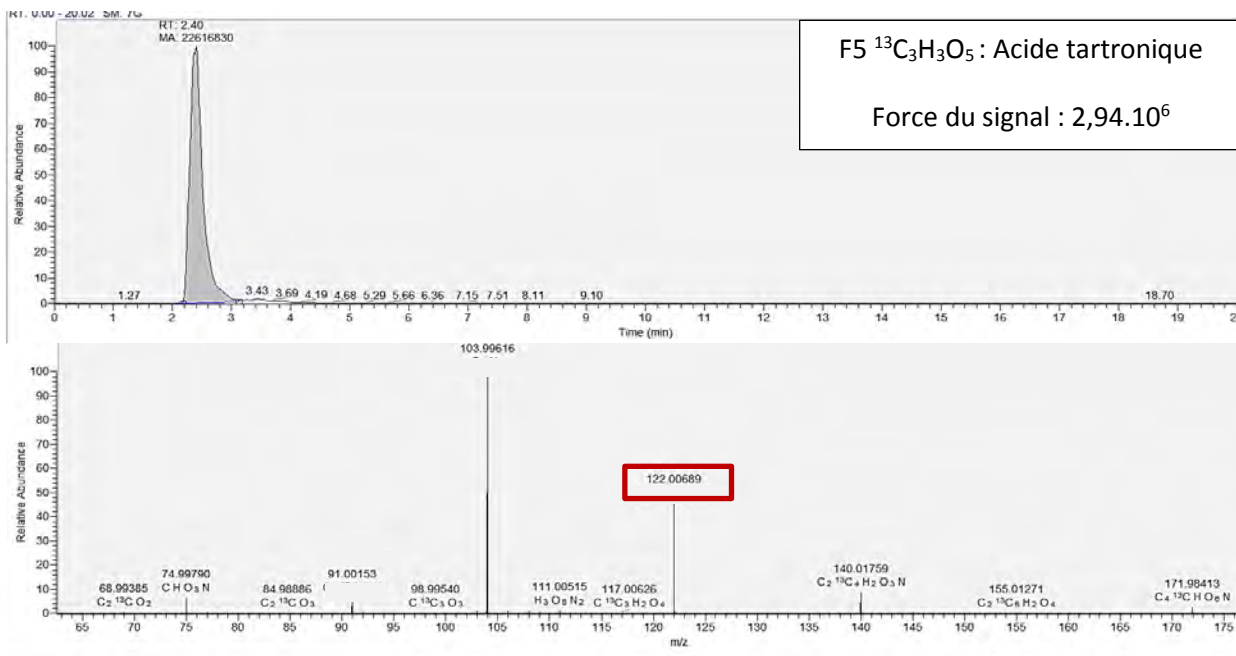


Figure 92 : Acide tartronique mis en évidence par le chromatogramme UV (en haut) et le spectre de masse de la fraction F5 (en bas)

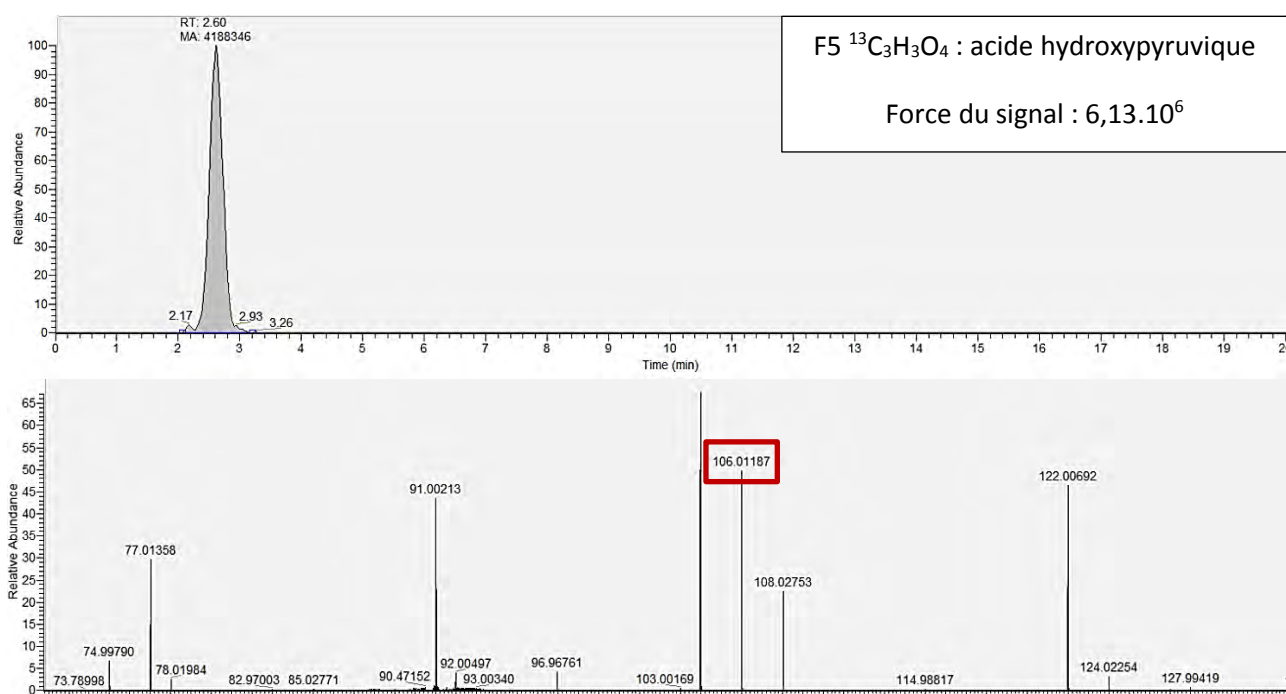


Figure 93 : Spectre de masse (en bas) et chromatogramme UV (en haut) de la fraction F5 obtenus en orbitrap

Enfin, nous n'avons retrouvé que peu d'acide glyoxylique (avec une masse de 74, 99 Tableau 16) dans les fractions F5 et F6 avec respectivement un signal à 2.10^5 seulement dans la fraction F5 et $1,87.10^5$ dans la fraction F6. Il est possible que celui-ci n'ait été que très peu prélevé et donc qu'il soit masqué par des signaux plus intenses dans les fractions comme celui de l'acide mésoxalique. Nous discernons également des traces d'acide glycolique dans les fractions F5 et F6, mais le signal est faible ($1,5.10^5$).

Dans la fraction F7, nous n'avons pas détecté de molécules autres que l'acide glycérique par spectrométrie de masse. Cependant, le croisement des résultats avec la RMN a permis la mise en évidence de glycéraldéhyde dont la structure a bien été confirmée, grâce à l'utilisation de glycérol ^{13}C (Figure 94). La RMN révèle en outre sa présence dans la fraction précédente F6 et la suivante F8, mais dans des proportions moindres. C'est bien dans F7 qu'il est le plus abondant.

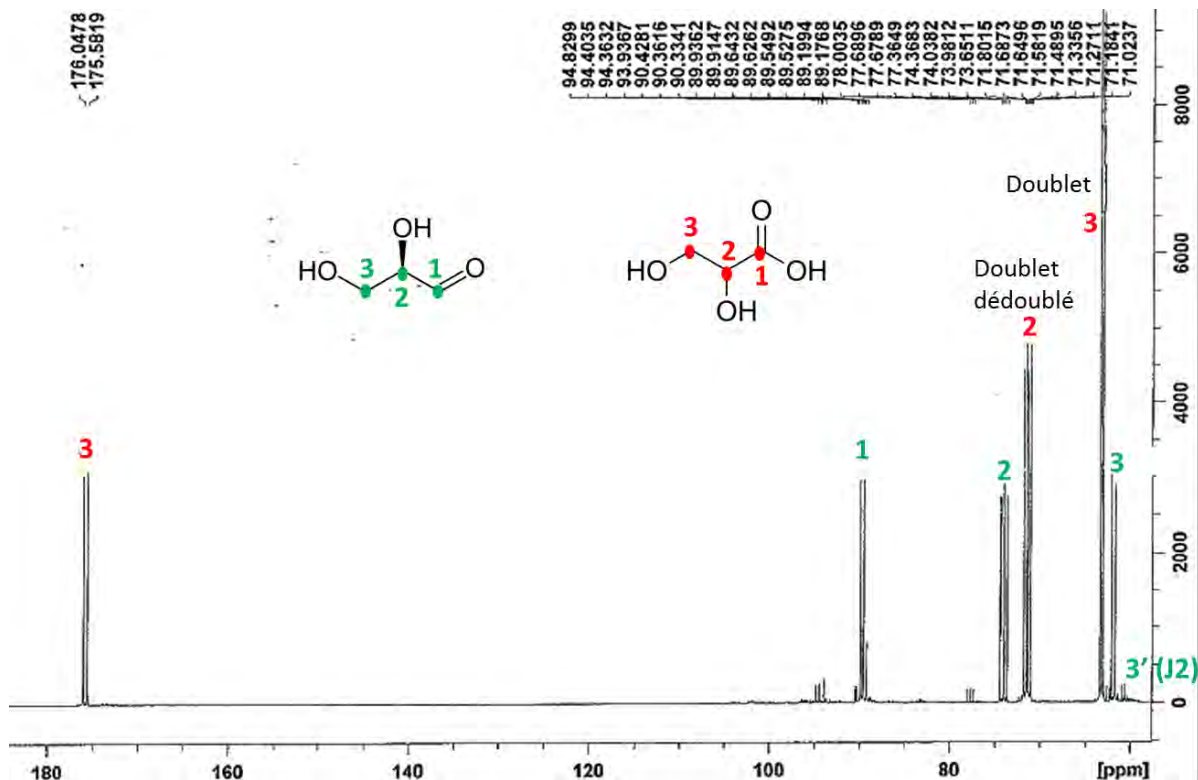


Figure 94 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de la fraction F7 dans D_2O à 298K

L'ensemble des produits issus du glycérol ^{13}C étant enrichi, un phénomène de couplage est visible entre les carbones au sein des molécules. Ainsi, le spectre carbone (Figure 94) de la fraction 7 nous renseigne de façon précise sur les espèces chimiques présentes. Les carbones (en vert, Figure 94) du glycéraldéhyde numérotés 1, 2 et 3 y sont donc reconnaissables. Le signal en doublet de la fonction aldéhyde du carbone 1 est le plus déblindé (89,7 ppm). Ce dernier couplant en ^1J avec le carbone 2 (48,5 Hz), et en ^2J avec le carbone 3 (2,6 Hz). De la même façon, le carbone 2 couple en ^1J avec le carbone 3 (41,6 Hz) et le carbone 1 (48,7 Hz) comme l'atteste le doublet dédoublé à 74,0 ppm. Enfin, le carbone 3 couple avec le 2 en ^1J (41,4 Hz) et avec le carbone 1 en ^2J (2,6 Hz) comme nous le voyons avec un signal à 61,9 ppm. La redondance des valeurs des constantes de couplages confirme nos conclusions.

En outre, puisqu'il reste de l'acide glycérique dans la fraction, nous présentons ici le spectre RMN de l'acide glycérique, qui confirme bien son existence et sa structure. Ainsi, le carbone 1 le plus déblindé est présent donne un doublet (couplage uniquement avec le carbone 2 en 1J) à 176,0 ppm, le carbone 2 couplant en 1J avec les carbone 1 et 3 donne un doublet dédoublé à 71,6 ppm, et enfin, le carbone 3 forme un doublet (couplage uniquement en 1J avec le carbone 2) à 63,3 ppm.

Enfin, comme déjà précisé auparavant, la fraction F8 (96,06 g/mol, Tableau 16) contient majoritairement du glycérol, fraction où il est le plus abondant. Ce résultat est, comme déjà précisé, un point très important des travaux puisque le glycérol s'ionise mal en spectrométrie de masse et était jusqu'ici difficile à observer (Figure 95).

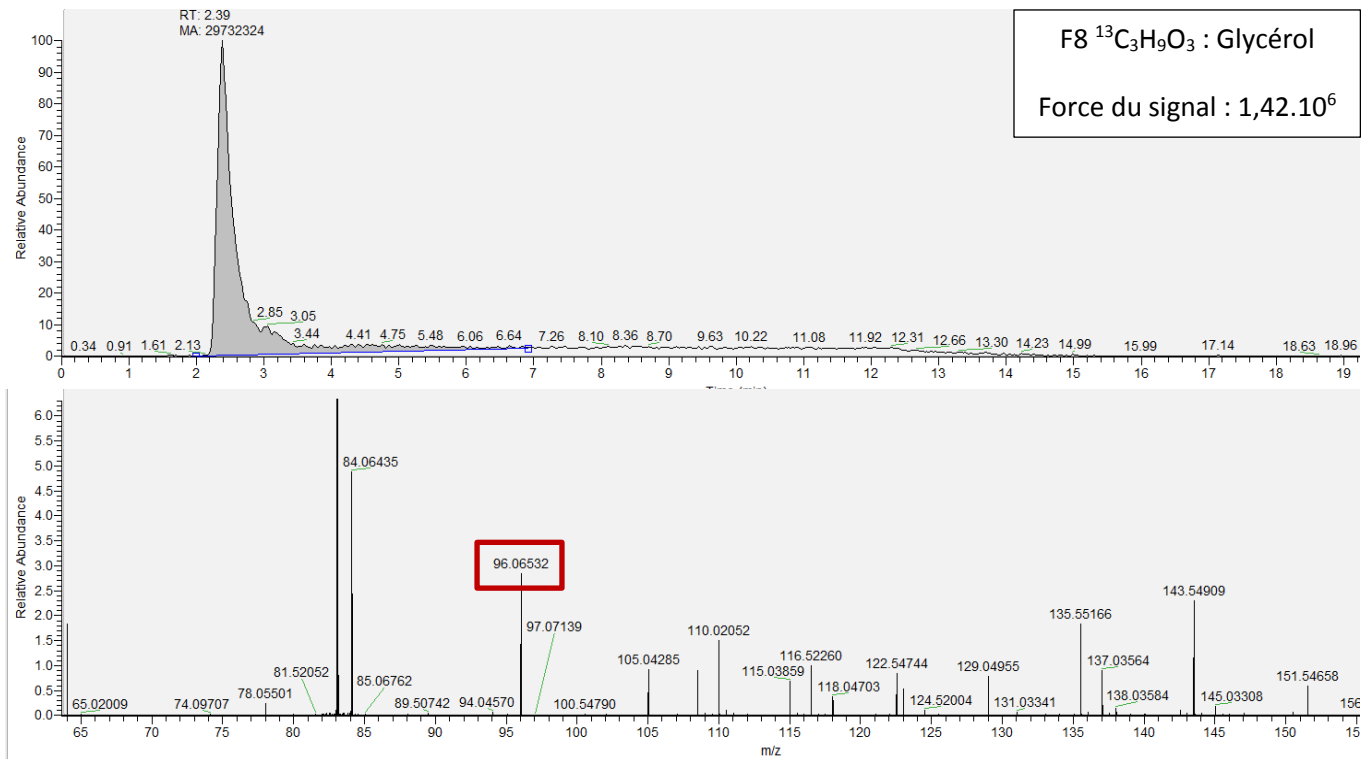


Figure 95 : Spectre de masse et chromatogrammes UV obtenus en orbitrap

Les résultats de la RMN nous permettent d'identifier le glycérol dans la fraction F8, noté « G » et « Glycérol » en rose sur la Figure 96. S'y trouvent également l'acide glycérique en rouge (« AG ») et le glycéraldéhyde en vert (« glycéraldéhyde »).

De façon plus précise, la présence d'un pseudo doublet dédoublé à 72 ppm correspond à deux carbones équivalents. En effet, de par les valeurs des constantes de couplages en 1J extrêmement proches (40,6 et 41,1 Hz) nous avons conclu que ce signal pouvait s'assimiler à un triplet, cohérent avec le glycérol, qui est une molécule symétrique. Il s'agit donc des deux carbones placés aux extrémités de la molécule et porteuses d'une fonction hydroxyle chacune. Ces carbones sont sous forme d'un doublet à 62,4 ppm. La multiplicité de ce signal indique un couplage avec les deux autres carbones qui sont magnétiquement équivalents.

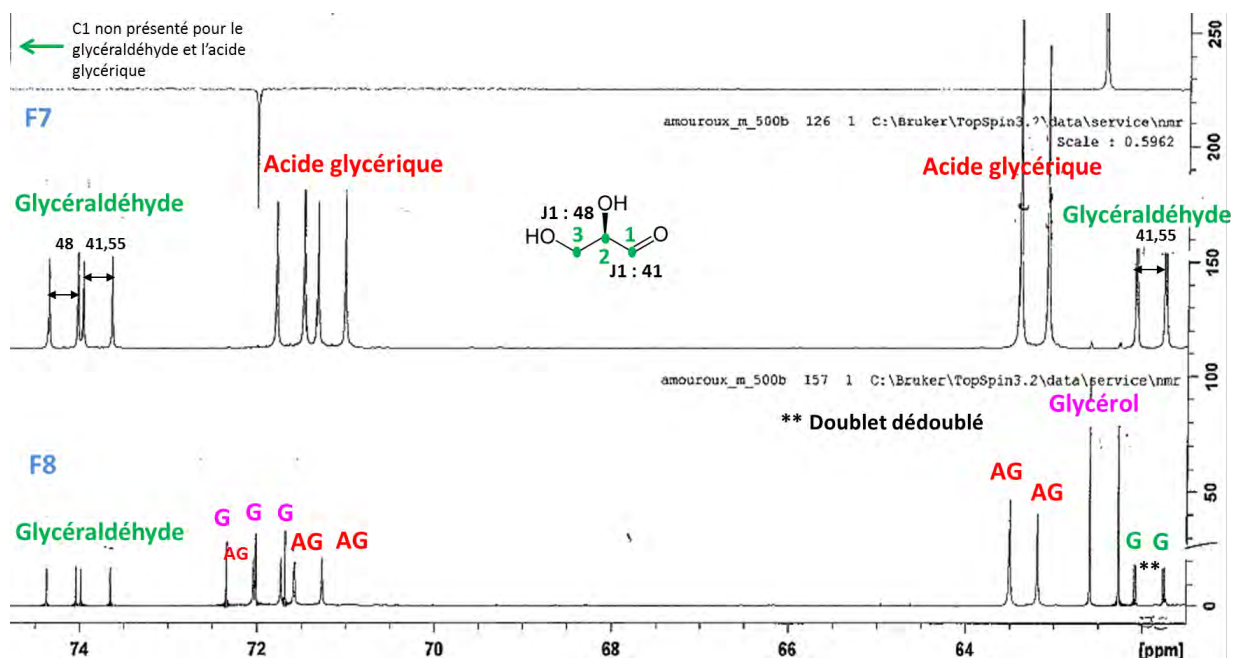


Figure 96 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ des fractions F7 (au-dessus) et F8 (au-dessous) dans D_2O à 298 K

Il est à noter que tous les produits repérés sont bien constitués uniquement de C, H et O puisque nous ne retrouvons pas le massif isotopique correspondant à l'azote sur les divers spectres de masse. Les analyses en RMN des fractions permettent de compléter les résultats précédents. Seuls les spectres du ^{13}C sont présentés puisque du fait de l'enrichissement de la molécule en celui-ci, les spectres du ^1H étaient trop confus à cause de l'abondance d'informations. En conclusion, le recoupement des analyses de spectrométrie de masse avec le détecteur orbitrap et ceux de la RMN ^{13}C , nous permettent de faire le bilan suivant :

	Acide mésoxalique	Acide tartronique	Acide glycérique	Glycéraldéhyde	Acide glyoxylique	Acide hydroxypyruvique	Glycérol
(min)	<chem>OC(=O)C(=O)C(=O)O</chem>	<chem>OC(O)C(O)C(O)C(=O)O</chem>	<chem>OC(O)C(O)C(=O)O</chem>	<chem>OC(O)C(O)C=O</chem>	<chem>O=C(O)C=O</chem>	<chem>CC(=O)C(O)C(=O)O</chem>	<chem>OC(O)C(O)CO</chem>
F3 : 7,46	+		+				
F4 : 8,66	+++		+				
F5 : 10,3		+++	+		+	+	
F6 : 11,89			+++		+		
F7 : 12,78			+	+++			+
F8 : 15,23			+	+			+++

Tableau 17 : Contenu de chaque fraction, issu de la réaction d'oxydation du glycérol par la voie catalytique (CE6) laccase/TEMPO sous oxygène (+ = présence, +++= majoritaire dans la fraction)

Le Tableau 17 permet de visualiser rapidement le produit majoritaire de chaque fraction. Il est ainsi possible d'attribuer à chaque temps de rétention sur le chromatogramme de la réaction, la molécule associée. Ces résultats sont un point important par rapport à la littérature puisqu'ils constituent une caractérisation complète des molécules issues de l'oxydation du glycérol, avec des analyses structurales par RMN et par LC-HRMS à l'appui.

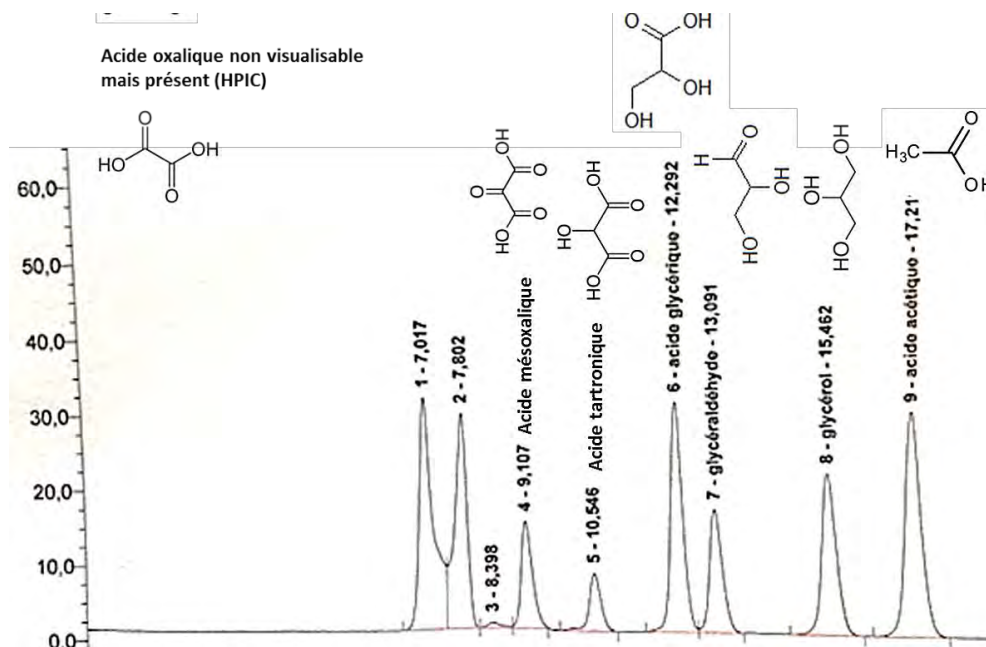


Figure 97 : Formule semi-développée des produits associés respectivement à leur signal HPLC. Le temps de rétention est indiqué après le numéro du pic (allant de 1 à 9)

Selon les mêmes méthodes, nous procédons à l'analyse des fractions issues de l'oxydation du CG

2.2.2.2 Le cas de l'oxydation du CG

Nous récupérons dix fractions différentes à partir du protocole CE6 sur le CG que nous cherchons à analyser par RMN et par spectrométrie de masse de haute résolution.

Nom de la fraction	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Temps de rétention (début du pic) (min)	8,31	9,2	9,6	12	14,76	15,7	21,8

Tableau 18 : Temps de collecte des fractions issues de la réaction d'oxydation du CG par le duo laccase / TEMPO sous air

Nous recherchons de façon automatique dans les fractions collectées, grâce à un logiciel en LC-HRMS, les masses répertoriées dans le Tableau 19 (dans le cas de molécule non enrichie en ^{13}C). Nous trouvons les produits issus de l'oxydation du glycérol, et deux espèces supplémentaires : le CG (118,02 g/mol) et le CG oxydé (132,00 g/mol).

Molécule	Masse réelle	Masse en ionisation positive	Masse en ionisation négative
Acide glycolique	76,016	77,02	75,008
Acide glyoxylique	74,00	75,00	72,99
Acide oxalique	89,99	91,00	88,98
Acide mésoxalique	117,99	118,99	116,98
Acide glycérique	106,02	107,03	105,01
Acide tartronique	120,00	121,01	118,99
Acide hydroxypyruvique	104,01	105,01	103,00
Glycéraldéhyde	90,03	91,03	89,02
DHA	90,03	91,03	89,02
Glycérol	92,04	93,05	91,039
CG	118,02	119,03	117,01
CG oxydé	132,00	133,01	130,99

Tableau 19 : Masses recherchées de façon automatique et systématique en spectrométrie de masse dans les échantillons pour de l'oxydation du CG par voie enzymatique.

Ces fractions feront aussi l'objet d'un screening non ciblés, dont le but est de trouver les signaux importants dans les échantillons, et qui ne correspondent à aucune masse connue et listés dans le Tableau 19. Les résultats pour chaque fraction sont présentés ci-après Tableau 20. Seuls les spectres de masse et de RMN les plus pertinents seront exposés. Cependant, des résultats supplémentaires non exploités ici se trouvent en annexe p.315 ainsi que les résultats de la RMN 2D (HSQC et HMBC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$).

Les résultats sont :

Fractions	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Masses en ionisation positive	–	–	–	135,93	135,93	
	–	–	–	93,05	93,05	
						119,13
Masses en ionisation négative	–	–	–	–	–	–
	131,00	131,00	131,00	131,00	131,00 traces	–
	89,02	–	–	–	–	–
	105,01	105,01	105,01	105,01	105,01	105,01 traces

Tableau 20 : Masses détectées dans chaque fraction issue de l'oxydation du CG. Le produit majoritaire est indiqué en gras

Les fractions F1, F2, F3 et F4 ne présentant pas de signaux significatifs, leur étude n'est pas présentée. Les résultats majeurs se trouvent cependant dans les fractions suivantes (F5 à F10).

Des traces de glycéraldéhyde sont détectées dans les fractions F4 mais surtout F5 avec une masse de 89,02g/mol (Tableau 20) en ionisation négative. La nature de la molécule a été déduite du fait que le DHA, qui a la même masse que le glycéraldéhyde, n'est pas présent dans le milieu (non observé en HPLC, détection RI et UV, alors que la molécule y est détectable).

Dans la fraction F5, nous détectons de l'acide glycérique (105,01 g/mol) mais aussi une autre molécule avec une masse de 131,00 g/mol (Tableau 20) qui est le CG oxydé (Figure 98).

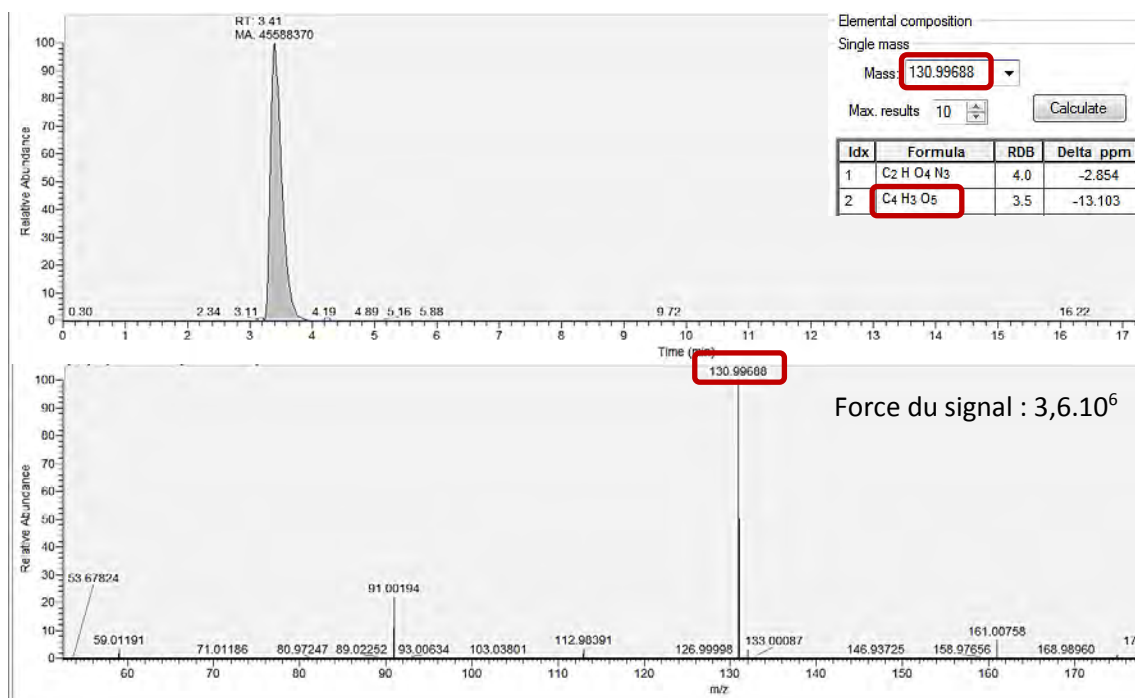


Figure 98 : Chromatogramme (en haut) et du spectre de masse (en bas) du CG oxydé

En effet, la structure du CG oxydé est confirmée par RMN du ¹³C (Figure 99) et du ¹H (Figure 100) et vient en complément de la spectrométrie de masse obtenue par LC-HRMS.

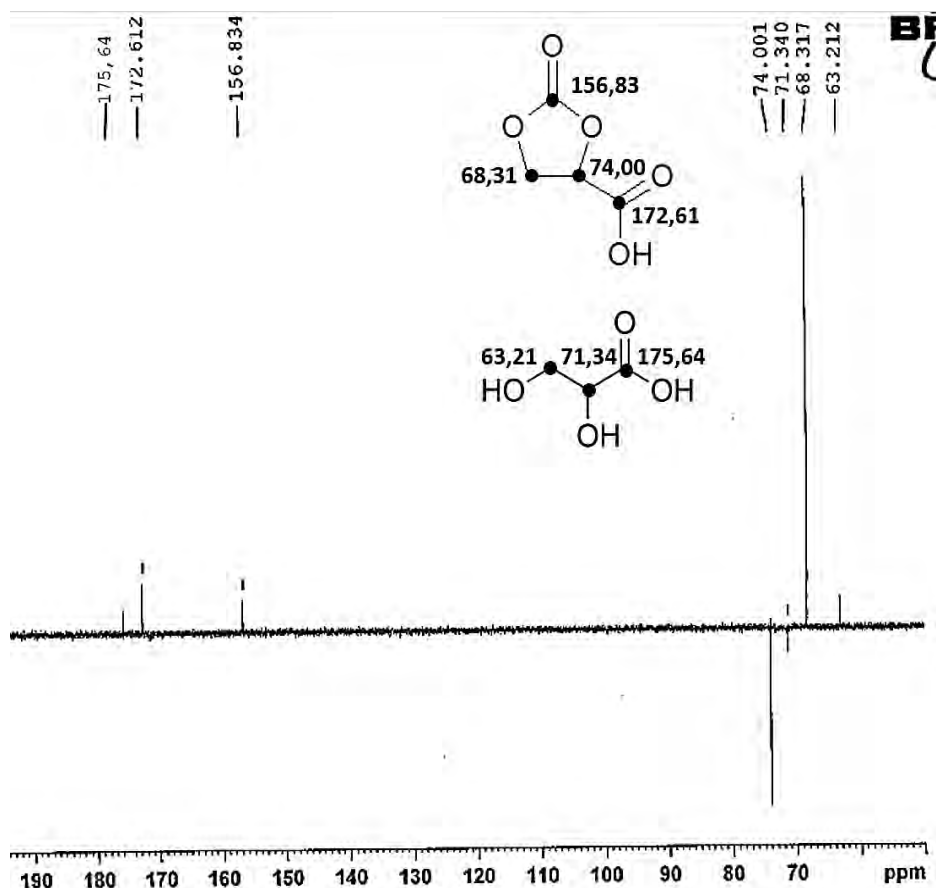


Figure 99 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Jmod de la fraction F6 dans D $_2\text{O}$ à 298 K (500,11 MHz)

Sur la Figure 99, l'utilisation du Jmod permet de repérer en négatif les groupements CH et CH₃ (74 ppm) et en positif les groupements CH₂ et carbone quaternaire (68,3 ppm, Figure 99). Nous retrouvons ainsi le signal spécifique de la fonction carbonate cyclique à 156,8 ppm et celui des fonctions acides carboxyliques à 172,6 ppm.

En outre, nous découvrons une autre molécule : l'acide glycérique, présent également dans cette fraction. Selon la même logique, la fonction acide se trouve à 175,64 ppm (Figure 99) et le signal de son groupement CH₂ à 71,3 en négatif. Ces résultats ont été confirmés par la RMN 2D.

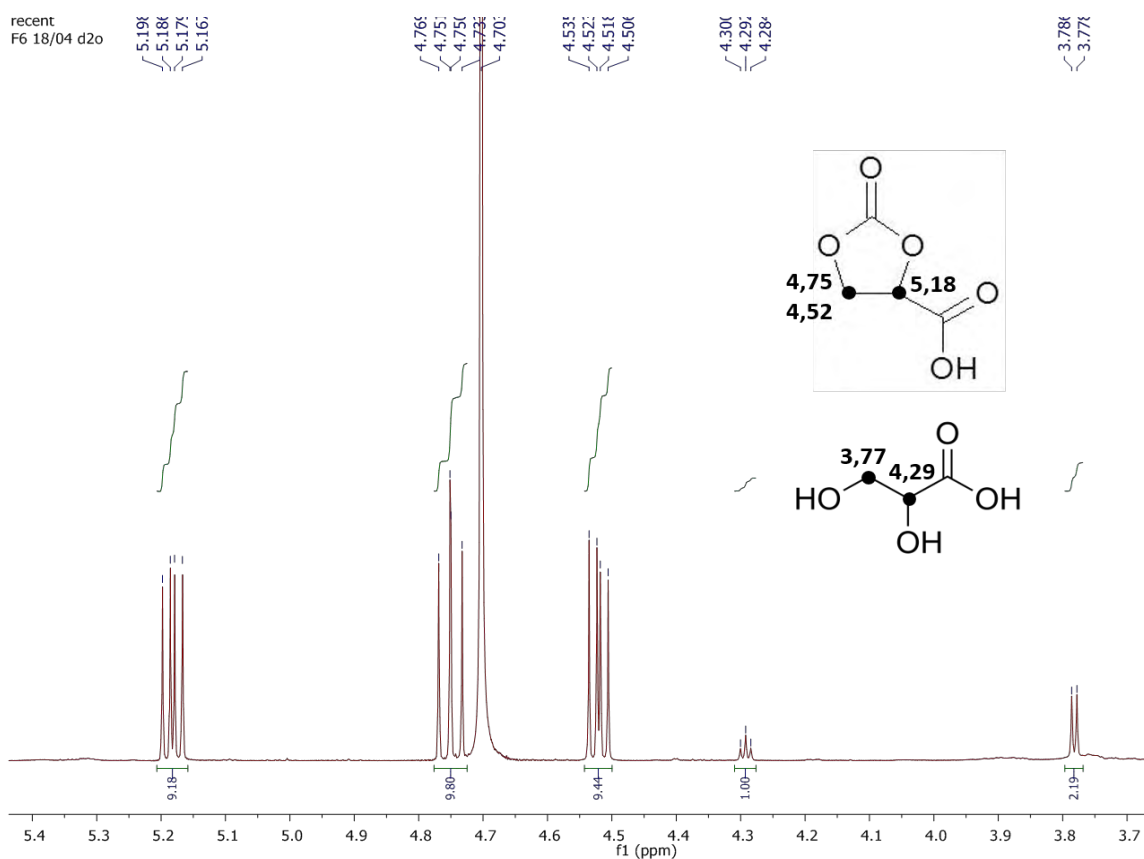


Figure 100 : Spectre RMN ^1H de la fraction F6 dans D_2O à 298 K (500,11 MHz)

Le spectre ^1H de la fraction F6 permet de visualiser les signaux spécifiques de chaque molécule. Ainsi, dans le cas du CG oxydé, nous visualisons à 5,18 ppm le signal d'un doublet dédoublé du proton qui couple avec ses deux voisins inéquivalents à 4,75 et 4,52 ppm. Les valeurs des constantes de couplage sont de 6 Hz en ^2J et 9,5 en ^3J et se retrouvent bien lorsque nous étudions les couplages des protons à 4,52 ppm et 4,75 ppm. Ces informations, en plus de la RMN 2D (HMBC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ Figure 101 et HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ Figure 102) nous permettent de fournir les structures des molécules sans équivoque.

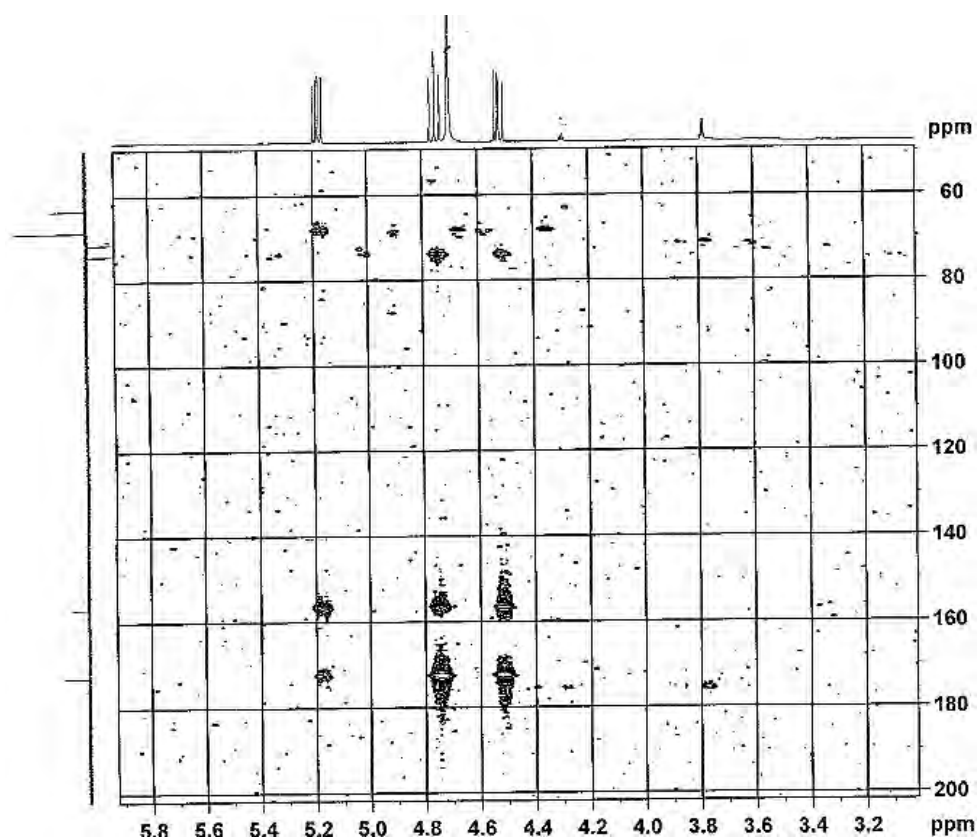


Figure 101 : Spectre RMN 2D HMBC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ sur la fraction F6 à 298K (500,11 MHz)

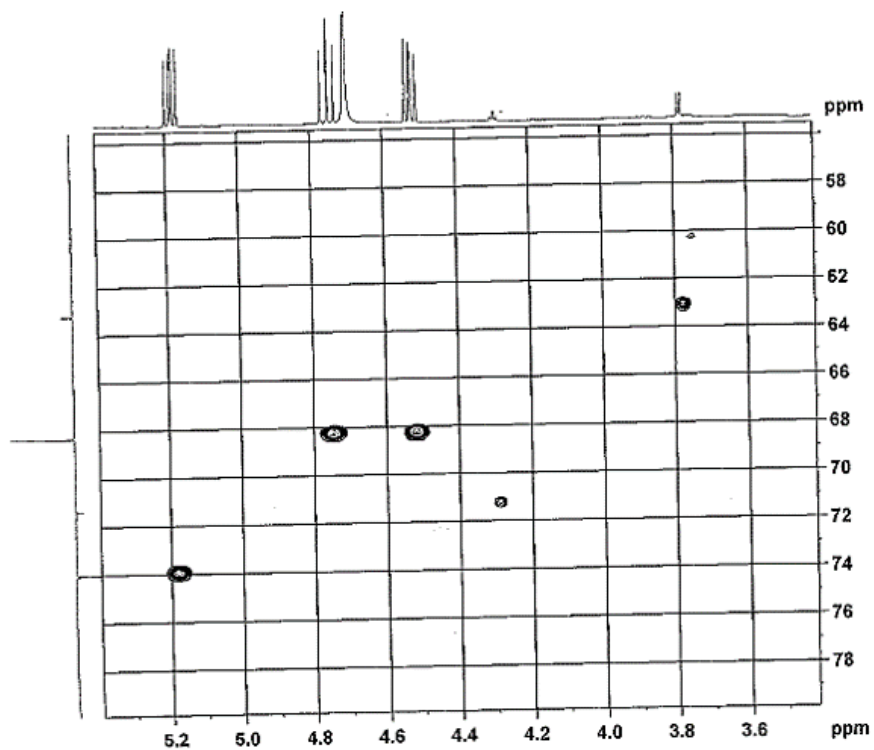


Figure 102 : Spectre RMN 2D HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ sur la fraction F6 à 298K (500,11 MHz)

La RMN ^1H (Figure 100) permet par ailleurs de connaître la proportion d'acide glycérique et de CG oxydé. Le premier est à hauteur de 10% et le second de 90%. Le CG oxydé est ainsi présent dans les proportions les plus importantes dans les fractions 5 et 6 (la fraction F6 contient exactement la même proportion de CG oxydé que la fraction F5 car il s'agit d'une fraction de contrôle de la précédente). L'acide glycérique est quant à lui aussi détecté dans la fraction F7 où il est le plus abondant avec un pourcentage relatif de 15% (et 85% de CG oxydé). Nous en observons enfin dans la fraction F8 mais dans une proportion moindre.

La fraction F8 contient donc des traces d'acide glycérique, mais aussi du glycérol avec une masse de 93,05g/mol (Tableau 20) et un autre composé majoritaire (mis en évidence grâce au screening non ciblé), de masse 135,93 g/mol en ionisation positive. La formule $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ est proposée pour ce composé avec une masse réelle exacte de 134,02 g/mol. Cette formule brute est confirmée par la suite, au travers des spectres de la RMN ^1H et ^{13}C (Figure 104 et Figure 103) associés aux expériences de 2D (HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) qui fournissent ensemble son organisation complète.

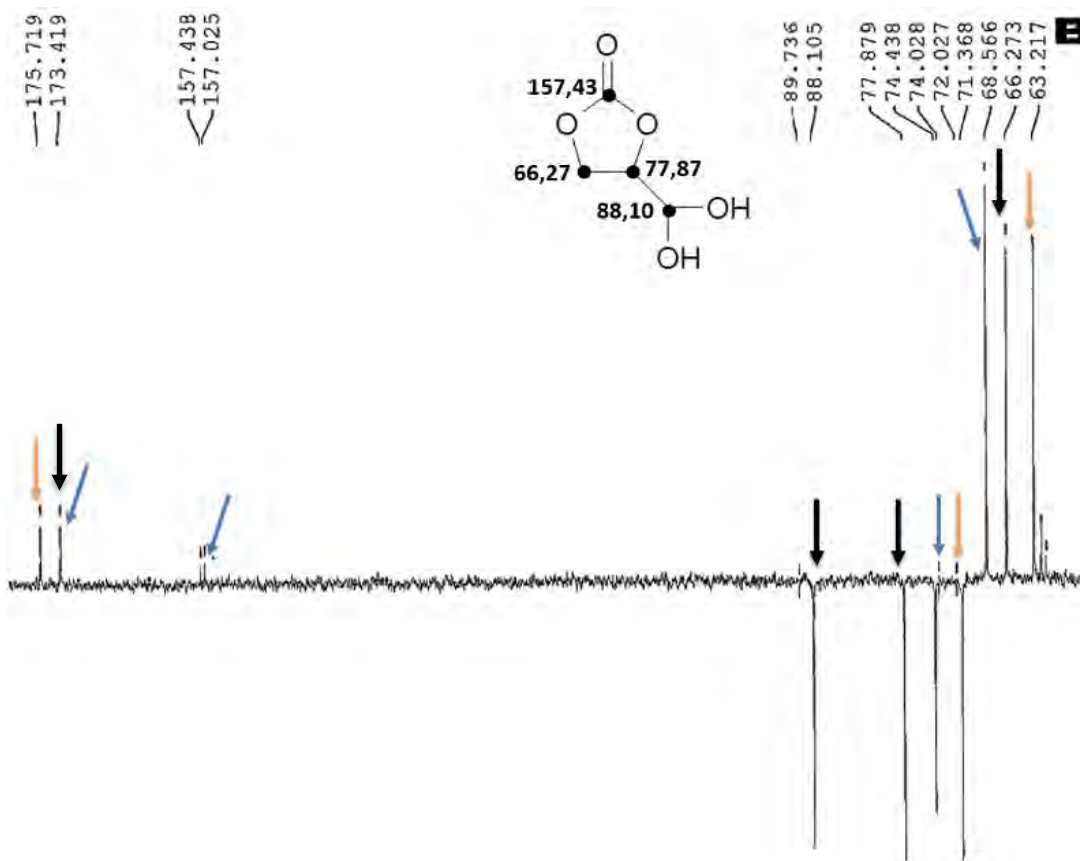


Figure 103 : Spectre RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Jmod de la fraction F8 dans D_2O à 298 K. En noir les signaux du CG hémiacétal, en bleu du CG oxydé et en orange de l'acide glycérique

Sur la Figure 103, les signaux bleu et orange correspondent respectivement au CG oxydé et à l'acide glycérique également présent dans la fraction. Nous nous intéresserons cependant aux flèches noires, propres aux signaux spécifiques de la molécule que nous cherchons à décrire. Ainsi, l'espèce inconnue possède quatre atomes de carbone avec une fonction carbonate à 157,43 ppm, et une double fonction hydroxyle à 88,10 ppm. La Figure 104 vient fournir des données supplémentaires comme la présence d'un doublet dédoublé à 4,44 ppm et d'un triplet à 4,57 ppm traduisant la présence de deux protons non équivalents couplant avec un troisième en 3J . Le proton à 5,14 ppm correspond à un doublet couplant donc avec un autre proton en 3J . Le calcul des constantes de couplages permet de conclure sur leur position et donc de les relier comme présenté sur la figure. Seul le multiplet Figure 105 correspondant au proton à 4,73 ppm restait difficile à décrire sans informations supplémentaires.

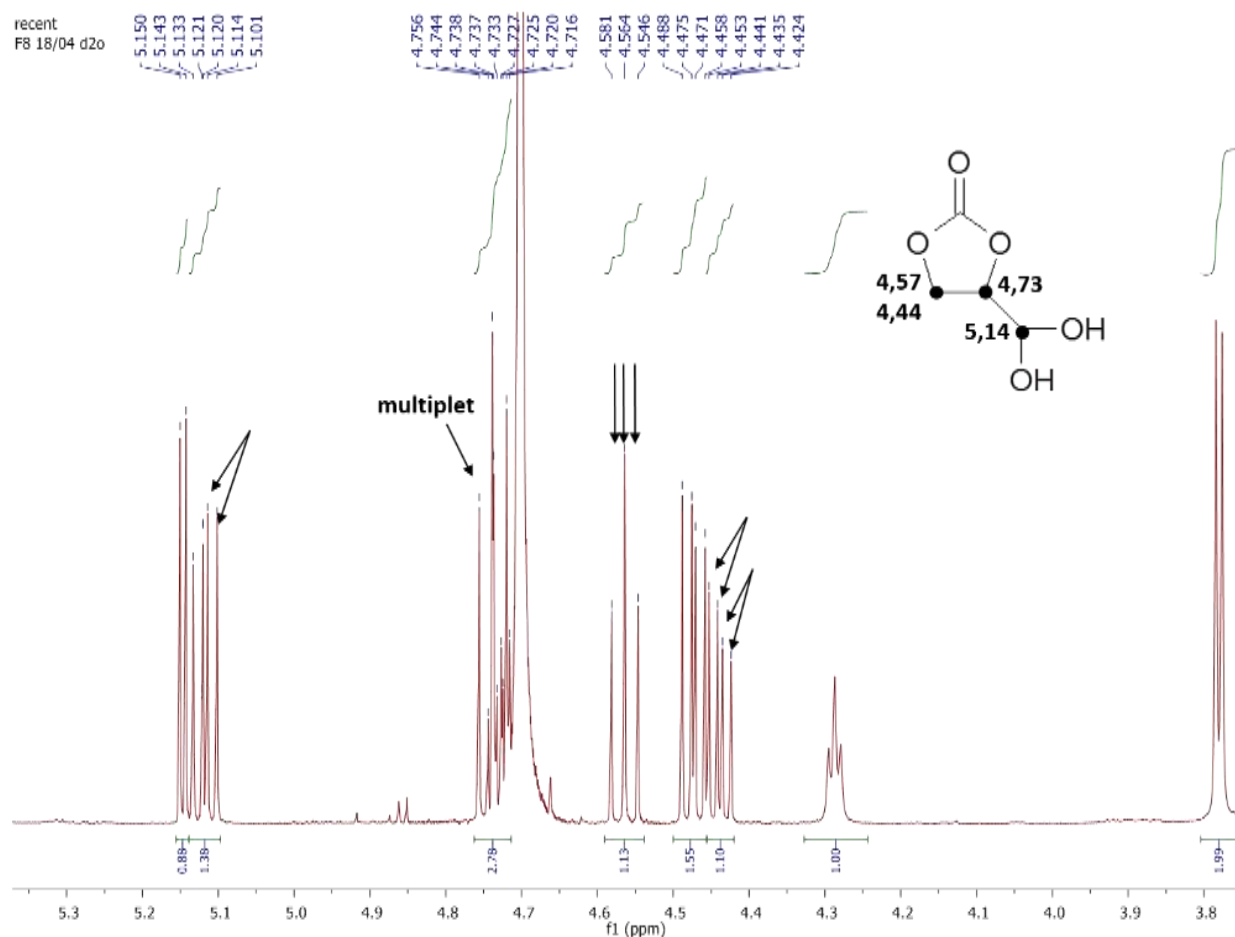


Figure 104 : Spectre RMN 1H de la fraction F8 dans D_2O à 298 K

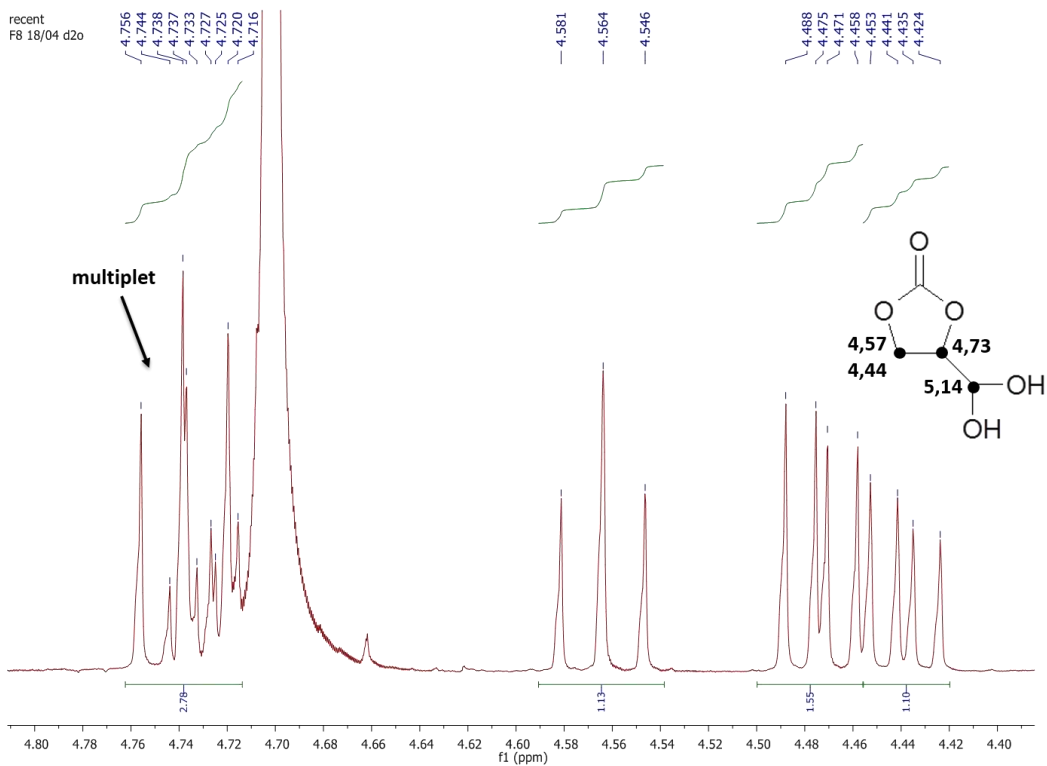


Figure 105 : Zoom effectué sur le spectre ^1H de la fraction F8

Les analyses 2D de la Figure 106 et de la Figure 107 ci-dessous, associées à la connaissance de la masse de la molécule de 134g/mol, nous ont donc permis de vérifier nos conclusions sur la forme de la molécule.

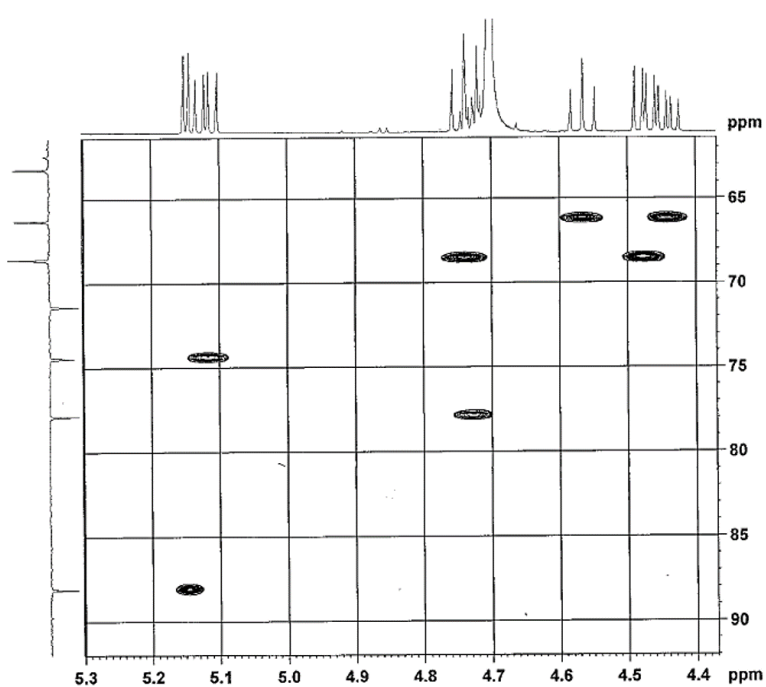


Figure 106 : Spectre RMN 2D HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ sur la fraction F8 à 298K (500,11 MHz)

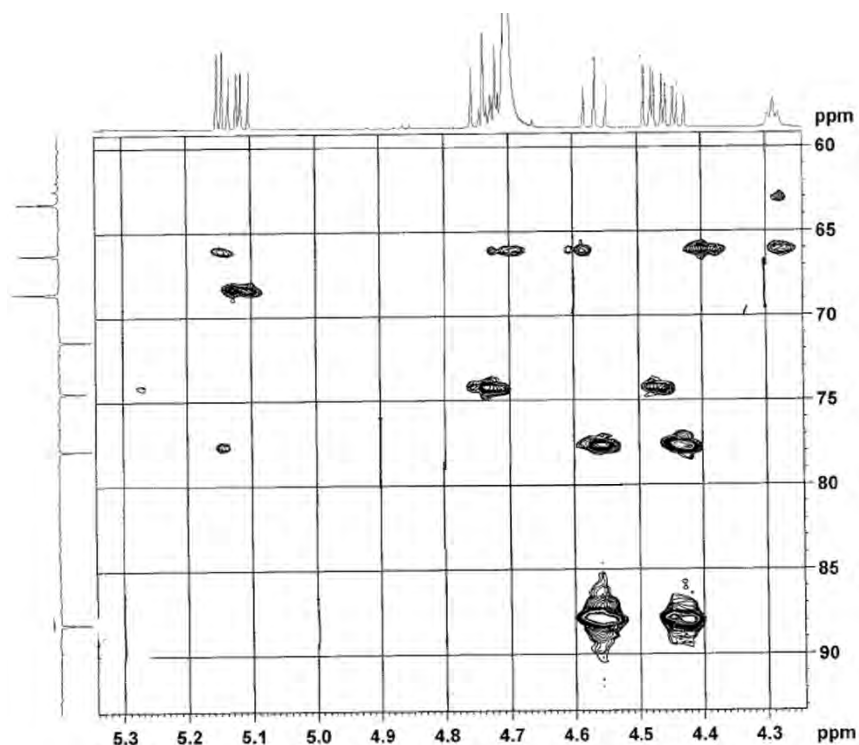


Figure 107 : Spectre RMN 2D HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ sur la fraction F8 à 298K (500,11 MHz)

Ainsi, la molécule dont la formule est donnée Figure 103 et Figure 104 est bien confirmée par l'ensemble de ces analyses. Elle est nommée CG hémiacétal du fait de la position de deux fonctions hydroxyles en position géminale. La fraction contient donc trois molécules : 27% de CG hémiacétal, de l'acide glycérique à hauteur de 28%, et 41% de CG oxydé.

La caractérisation de cette molécule représente une avancée très importante puisqu'elle n'a encore été jamais décrite à ce jour. Ces travaux constituent donc une avancée dans la connaissance des produits issus de l'oxydation du CG.

Le CG hémiacétal est aussi détecté dans la fraction F9 aussi bien en spectrométrie de masse que par RMN mais dans une quantité moindre que dans F8. Nous détectons par ailleurs la présence de glycérol. C'est en F9 que ce dernier est le plus abondant (25%) comparativement aux autres fractions

Enfin, la fraction F10, fraction de contrôle, contient majoritairement du CG comme observé en spectrométrie de masse en ionisation positive à 119,13 g/mol. Sa détection en spectrométrie est une nouveauté puisque la molécule est connue pour ne pas s'ioniser, difficulté dont nous nous sommes affranchie. Sa structure a ensuite été confirmée par RMN.

En conclusion, la répartition des produits dans chaque fraction peut-être résumée dans le Tableau 21 :

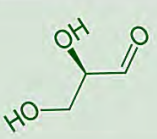
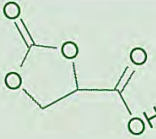
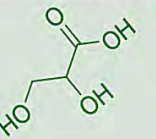
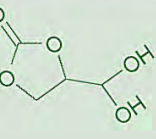
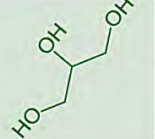
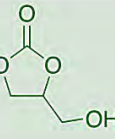
	Glycéradéhyde	CG oxydé	Acide glycérique	CG hémiacétal C4H6O5	Glycérol	CG
Début du moment de collecte pour chaque fraction (min)						
F5 : 9,2	+	+++	+			
F6 : 9,6		+++	+			
F7 : 12,0		+	+++			
F8 : 14,76		+	+	+++		
F9 : 15,7				++	+	
F10 : 21,8						+++

Tableau 21 : Contenu de chaque fraction issue de l'oxydation du CG par voie enzymatique (+ = présence, +++ majoritaire)

Ces données (Tableau 21) nous ont permis d'associer à chaque temps de collecte des fractions, la principale molécule responsable du signal observé par chromatographie (HPLC en détection RI) (Figure 108).

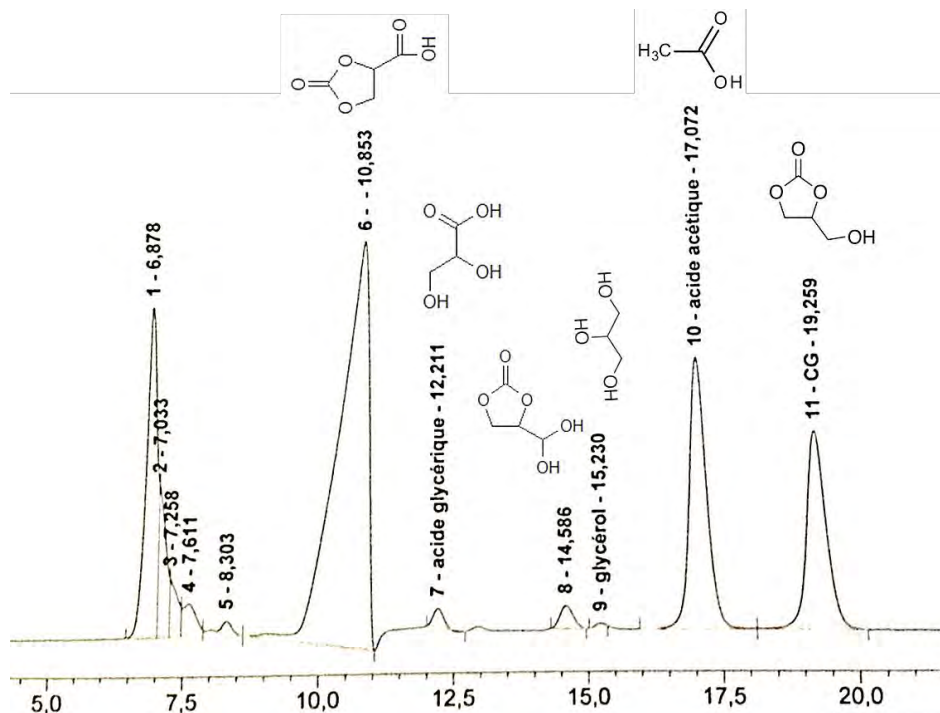


Figure 108 : Localisation de la molécule en fonction du temps de rétention pour la réaction de CE6 sur CG

En conclusion : il est à noter que la collecte de fraction a permis de purifier les différentes espèces chimiques qui constituent les milieux de réactions. Malheureusement, au vue des analyses, nous avons pu constater que cette purification n'était que partielle (deux ou trois produits par fraction au lieu d'une seul). Plusieurs causes sont possibles.

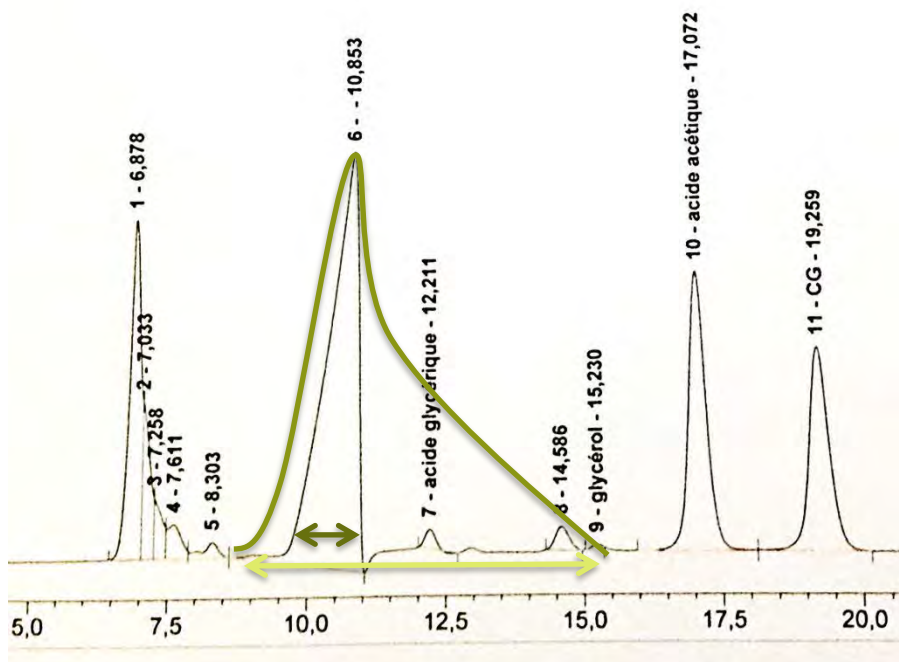
Tout d'abord, la colonne utilisée est une colonne analytique et non préparative (ce format n'existe pas pour l'Aminex HPX 87-H). Par conséquent, seuls de faibles volumes de milieu de réaction sont traités et les quantités de produits récupérées pour chaque fraction ne dépassent pas les 10 mg, ce qui est faible.

Il en découle que si le bras collecteur permettant de récupérer les fractions n'est pas rincé entre deux prélèvements de fraction, celui-ci accumule des traces du produit de la fraction précédente dans la fraction suivante. Ainsi, nous avons constaté la présence d'un même produit dans plusieurs fractions successives. Si nous avons utilisé une préparative, la pollution d'une fraction à une autre aurait été beaucoup plus négligeable puisque la quantité de liquide restée dans le bras de collecte aurait été très inférieure à la quantité d'échantillon récupérée en fin d'extraction.

Une autre solution aurait été de collecter également le liquide entre les différentes fractions afin de savoir qu'étaient les molécules traces ou les molécules évoluant difficilement dans la colonne séparative. D'autre part, cela aurait pu nous renseigner sur les signaux présents en permanence et non spécifiques d'une fraction en particulier.

Enfin, la présence de CG oxydé dans quatre fractions différentes (Tableau 21), s'explique par le fait que la colonne s'est trouvée saturée en cette espèce. En effet, le pic correspondant à cette molécule présente le front caractéristique d'une molécule dont la séparation est difficile mais surtout en surcharge dans la colonne. Cela n'est pas forcément visible sur le chromatogramme obtenu par détection en RI car si la molécule sature la colonne, son signal n'atteint pas forcément la limite de détection du RI.

Ainsi :



Réel front de migration :
saturation de la colonne et pollution des autres fractions (invisible dans cet état)

Zone de saturation

Pic vu en RI, avec front de surcharge

Figure 109 : Chromatogramme en détection RI de la réaction faisant appel au protocole CE6 sur CG

En outre, même si le signal des molécules en LC-HRMS est d'excellente qualité et fiable, car répétable, il est à noter que la méthode possède également deux limites :

- L'étude de petites molécules implique que celles-ci n'ont pas de spectres de masse spécifiques. En effet, la fragmentation de molécules aussi simples n'entraîne pas la formation d'un spectre d'ions fils spécifiques à leur structure. Par conséquent, les acides organiques observés sont reconnaissables grâce à la forme de leur pic, leur temps de rétention, leur masse exacte et le massif isotopique associé. Il est cependant à noter que l'utilisation d'un isotope en C^{13} du glycérol a permis d'améliorer la fiabilité de détection des masses observées. En effet, le substrat étant marqué, tous les produits qui en seront issus le seront également. D'autre part, la présence de ^{13}C dans les molécules synthétisées rend la détermination de leur structure beaucoup plus simple. En effet, leurs masses exactes est alors différentes des composés constitués de ^{12}C , réduisant donc considérablement le nombre de possibilités de structures pour les molécules en C, H et O.
- L'utilisation d'acide formique (ou même acétique) est indispensable à la bonne séparation des molécules. Cependant, ce dernier génère un bruit de fond fort qui rend plus complexe le travail de débruitage et d'analyse.

2.2.2.2.3 Analyse des fractions F1, F2 sur glycérol et sur CG

Les fractions F1, F2, (ainsi que F3 et F4 dans le cas du CG) issues des milieux réactionnels provenant de l'oxydation par le système laccase/TEMPO du glycérol ou du CG n'ont pas pu être identifiées par spectrométrie de masse ou par RMN du fait de la mauvaise qualité des signaux. Nous présenterons donc des résultats et des analyses supplémentaires afin de déterminer la nature des composés contenus dans ces fractions.

Dans un premier temps, nous avons essayé de faire cristalliser les produits des fractions F1 et F2 après collecte. Cependant, celles-ci forment des cristaux en aiguilles après évaporation de l'éluant excédentaire de chromatographie. Nous avons pensé réaliser de la diffraction aux rayons X sur ces échantillons (Figure 110). Malheureusement, la forme des cristaux est inutilisable pour les analyses.

Nous avons donc essayé de solubiliser les cristaux dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) et dans D₂O afin de réaliser une étude par RMN d'un produit pur mais sans plus de succès.



Figure 110 : Cristaux en aiguilles issus de F1

Par la suite, les cristaux des fractions ont été analysés par infra-rouge du solide (

Figure 111). La présence des bandes caractéristiques de groupements NH₂ nous a permis d'émettre des hypothèses quant à la nature de ces molécules.

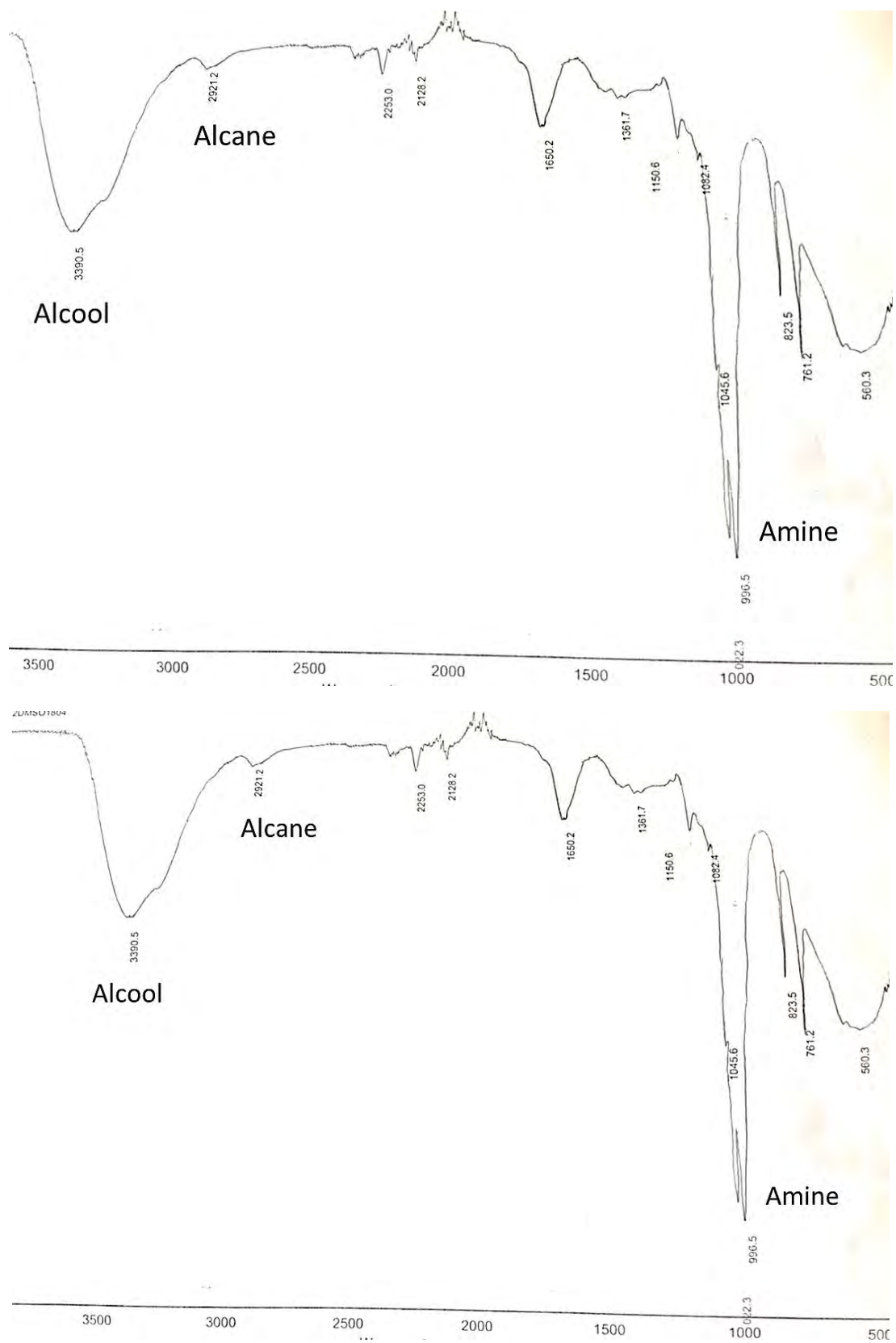


Figure 111 :Spectre Infra-rouge de la fraction F1 (en haut) et de la fraction F2 (en bas) avec un ATR 400

Les produits formés au cours de la réaction ne sont pas aminés comme l'ont démontré les analyses de spectrométrie de masse avec l'orbitrap, où les massifs isotopiques de l'azote n'ont pas été détectés. Ainsi, le seul élément pouvant être responsable de la présence de ces groupements, est donc probablement l'enzyme.

Nous avons donc superposé les chromatogrammes des réactions témoins afin de vérifier notre hypothèse. Si ces produits sont bien issus de la protéine, ils doivent exister même si le substrat ou l'un des réactifs est absent au départ du milieu réactionnel.

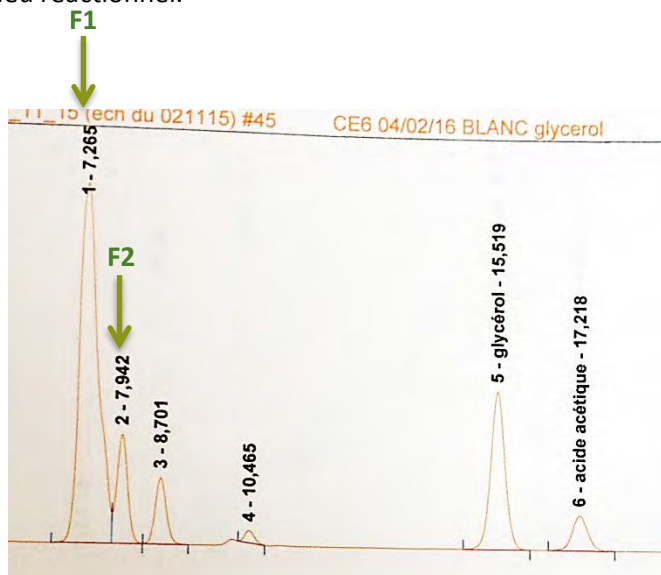


Figure 112 : Chromatogramme de la réaction issue du protocole CE6 sur le glycérol mais sans TEMPO et sous air

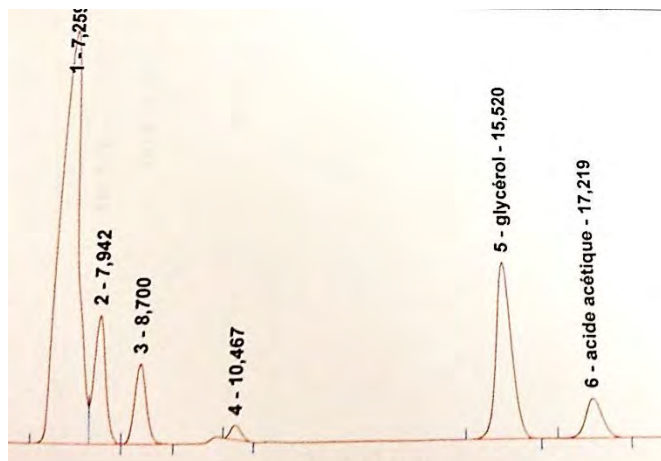


Figure 113 : Chromatogramme de la réaction issue du protocole CE6 sur le glycérol sous dioxygène mais sans TEMPO

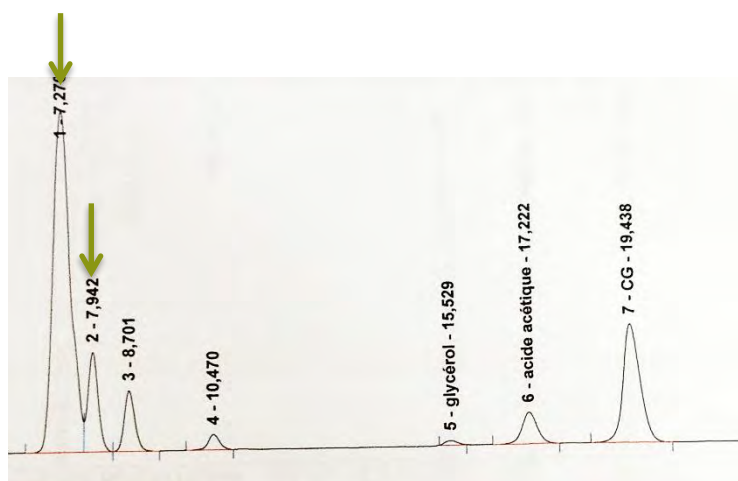


Figure 114 : Chromatogramme de la réaction issue du protocole CE6 sur CG mais sous air sans TEMPO

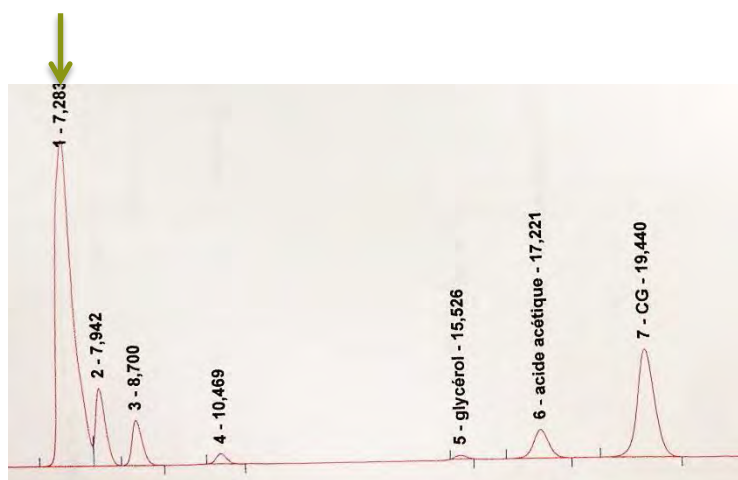


Figure 115 : Chromatogramme de la réaction issue du protocole CE6 sur CG sous dioxygène sans TEMPO

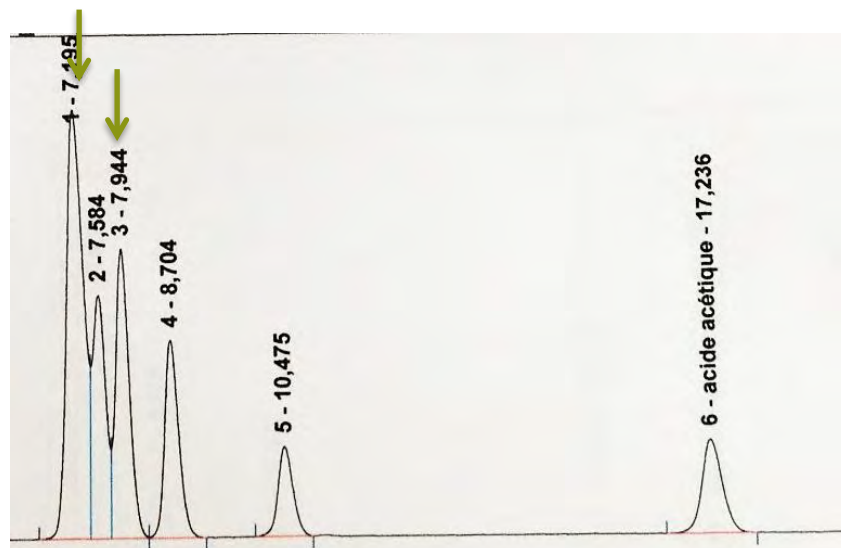


Figure 116 : Enzyme dans les conditions de réaction issue du protocole CE6 mais sans substrat

Lorsque nous étudions tous ces chromatogrammes (Figure 112, Figure 113, Figure 114, Figure 115 et Figure 116), les pics à 7,2 et 7,9 minutes (**en vert**) sont présents chacun d'entre eux, en particulier lorsque l'enzyme est seule dans le milieu sans autre réactif (hormis le tampon). Ces pics correspondent donc probablement à la simple dégradation de l'enzyme au cours de la réaction. Il s'agit donc, vraisemblablement, de peptides mais de tailles et de compositions inconnues. De la même façon les pics à 10,4 et 8,7 minutes pourraient aussi être des produits uniquement issus de l'enzyme.

Afin de confirmer qu'il s'agit bien des mêmes molécules dans les milieux réactionnels, quel que soit le substrat de départ, nous superposons les chromatogrammes correspondant à l'enzyme seule dans le milieu et celui d'une réaction d'oxydation sur le CG avec la même voie catalytique laccase/TEMPO (Figure 117).

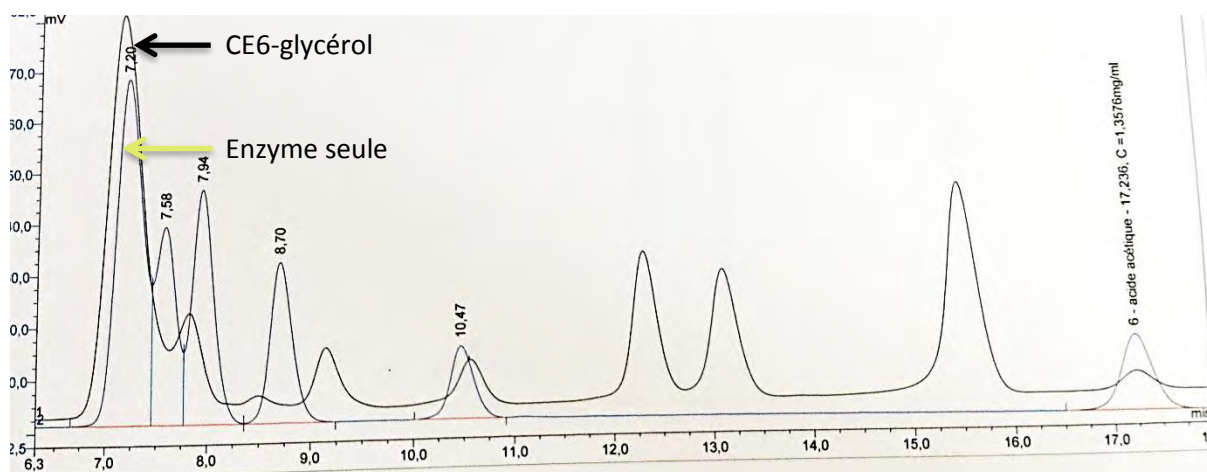


Figure 117 : Superposition du chromatogramme de la réaction de CE6 sur CG et de l'enzyme uniquement sous dioxygène, pendant 9 heures (pas de réactif autre)

Nous constatons que les pics à 7,2 minutes se superposent très bien dans le cas de l'oxydation du CG (Figure 117). Il en est de même dans le cas du chromatogramme des produits d'oxydation du glycérol (Figure 118). En revanche, pour le pic de F2 à 7,9 minutes, cela reste à prouver. Nous notons aussi que les pics à 10,5 et 8,7 minutes du chromatogramme de l'enzyme se superposent peu avec ceux des chromatogrammes des milieux réactionnels. Cependant, il n'est pas exclu qu'une partie de ces molécules y soient tout de même présentes, car la ligne de base du chromatogramme de la réaction sur glycérol ne revient pas à 0 mV, ce qui indique qu'il existe un flux de molécules parasitant l'ensemble.

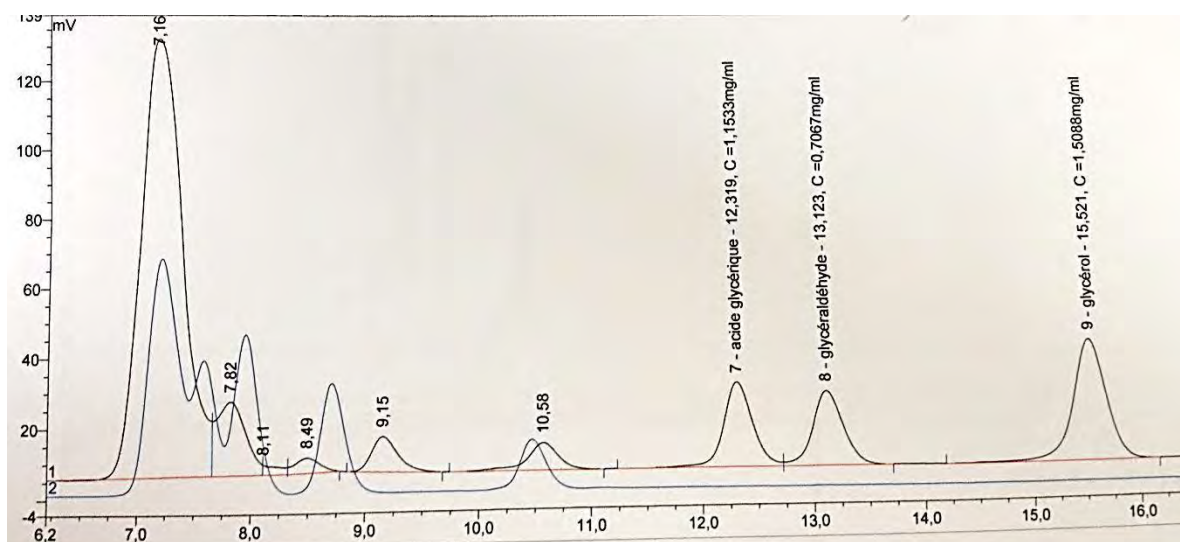


Figure 118 : Superposition du chromatogramme de CE6 sur glycérol et de l'enzyme uniquement sous dioxygène pendant 9 heures (pas de réactif autre)

Une autre donnée vient cependant abonder dans le sens de notre hypothèse, à savoir qu'il s'agit bien de produits issus de l'altération de la laccase. Lorsque nous avons inclus celle-ci dans des billes d'alginate (point abordé dans le chapitre sur la catalyse hétérogène), les pics correspondant à ces composés deviennent très minoritaires. Leur proportion est donc fortement réduite. Cette disparition va dans le sens des interprétations de ce paragraphe.

Enfin, des corrélations ont été mises en évidence par le logiciel CORICO (point abordé dans la partie suivante de ce chapitre) sur les données du plan d'expériences effectué pour l'optimisation de l'oxydation du glycérol. Les relations suivantes sont obtenues : « si pic 4 alors pic 1 $R = 0,931$ ». Avec « pic 4 » et « pic 1 » correspondant à des signaux identifiés comme ceux de sous-produits de la laccase. En effet, ils se situent aux temps de rétention observés sur les chromatogrammes de l'enzyme seule dans le milieu. Ces pics sont corrélés positivement ($0,931$), ce qui est en accord avec une formation simultanée, à partir de la même molécule de départ telle que la protéine.

Enfin, le logiciel CORICO indique que « si pic 1 alors pic glycérol $R = -0,925$ », c'est-à-dire qu'un pic qui appartient à un sous-produit de l'enzyme est corrélé négativement avec le pic du glycérol. Cela indique que moins il y a de produit de dégradation de l'enzyme, plus le glycérol est consommé. Ce résultat pourrait traduire indirectement le fonctionnement de la laccase, qui consommerait (via le TEMPO) d'autant plus de glycérol que sa structure reste intacte (et donc qu'il n'y a pas de produit provenant de sa dégradation).

2.2.3 Conclusion : mise au point d'une plateforme analytique pour la caractérisation des HA

La chromatographie liquide en éluant acide à l'aide de la colonne Aminex HPX 87 H et d'un éluant acide nous a permis de réaliser une première identification des produits de réactions que sont : le glycérol, l'acide glycérique, le glycéraldéhyde, le DHA, l'acide glyoxylique et le CG. Ces analyses ont été complétées par de l'HPIC, qui, grâce à l'emploi d'un éluant fortement basique, permet la mise en évidence des diacides (acide oxalique et acide tartronique) jusqu'ici non distingués. Une quantification de ces substances a aussi été possible grâce au programme Chroméléon® associé à la mise en œuvre préalable de courbes de calibrations.

Enfin, les analyses par RMN, de spectrométrie de masse de haute résolution à l'aide d'un orbitrap combinées à de l'extraction de fractions opérée à des temps spécifiques nous ont permis de confirmer la présence de certaines molécules (acide hydroxypyruvique, acide mésoxalique) auparavant non répertoriées ou identifiées de façon incertaine (acide glyoxylique) et d'affecter à chaque pic (et temps de rétention) la molécule associée au signal.

Le système catalytique laccase/TEMPO sous dioxygène a donc permis l'oxydation du glycérol en acide glycérique (12,29 min), produit le plus recherché, en glycéraldéhyde (13,09 min), mais aussi en diacides comme l'acide mésoxalique (9,1 min), oxalique et tartronique visibles uniquement en HPIC. Par ailleurs, cette même catalyse employée pour l'oxydation du carbonate de glycérol sous air ambiant donne naissance à du glycérol (15,3 min), de l'acide glycérique (12,2 min) mais surtout à deux molécules ayant conservées le cycle carbonate ainsi que des fonctions issues de l'oxydation du CG. Il s'agit :

- de l'hémiacétal du CG (14,58 min), qui possède un carbone de degré d'oxydation (+II) et,
- du CG oxydé avec un carbone de degré d'oxydation (+III) (10,4 à 10,8 min).

La réaction enzymatique a donc bien fonctionné et a permis la substitution de la fonction hydroxyle du CG par deux fonctions hydroxyles en position géminale ou par un groupement carboxylique. D'autre part, l'identification qualitative des molécules associées aux pics des chromatogrammes issus de cette réaction est maintenant complète. Enfin, les produits présents en début des chromatogrammes (entre 6 et 7,5 minutes) des milieux réactionnels correspondent probablement à des polypeptides issus de l'altération de l'enzyme au cours de la réaction d'oxydation. L'ensemble des différentes méthodes analytiques testées pour l'identification des produits issus de l'oxydations du glycérol et du CG nous ont permis de mettre au point un processus analytique fiable pour la caractérisation des hydroxyacides structurellement proches du glycérol (Figure 119).

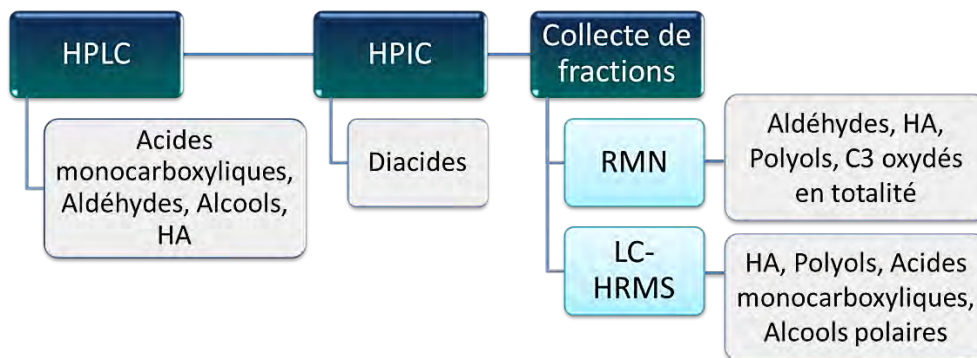


Figure 119 : Plateforme de caractérisation des HA structurellement proches du glycérol

Les molécules présentant un carbone à degré d'oxydation élevé, comme l'acide glycérique, le CG oxydé ou ayant un fort potentiel de fonctionnalisation comme l'hémiacétal de CG sont recherchées dans ces travaux de thèse. Nous avons donc, par la suite, essayé d'en augmenter les rendements au cours de la réaction enzymatique sous dioxygène dans le cas de l'oxydation du glycérol, et sous air dans le cas du CG.

2.3 Optimisation de la formation des HA d'intérêt par la mise en place et la réalisation de plan d'expériences (PEX)

Dans le but d'optimiser les productions en acide glycérique, en CG oxydé et en CG hémiacétal nous décidons de mettre en place un plan d'expérience (PEX), ensemble d'essais rigoureusement organisés nous permettant de :

- Faire une modélisation polynomiale et une modélisation logique
- Déterminer quels paramètres sont les plus influents pour augmenter les rendements
- Et si possible, grâce à l'interprétation des modèles, obtenir des informations sur les mécanismes de réaction

Il existe une multitude de PEX ne procurant pas tous la même précision et n'ayant pas les mêmes objectifs. Nous avons choisi un plan nommé « composite centré » nous permettant de réaliser une modélisation polynomiale du second degré avec des incertitudes moindres et sans covariance (biais) sur les effets principaux. Celui-ci nécessite une matrice d'expérience devant respecter des contraintes mathématiques sur un nombre restreint d'expériences en faisant varier les paramètres contrôlables.

Les conditions qui peuvent être modifiées à chaque synthèse sont : la température, le pH, le volume de solvant de la réaction, la quantité de substrat, la quantité de TEMPO, la quantité d'enzyme, le débit d'oxygène, la durée d'expérience. Cependant, il n'est pas raisonnable de faire varier toutes ces grandeurs à la fois. Il faut au préalable déterminer celles ayant le plus de poids dans le déroulement de la réaction parmi toutes les grandeurs citées afin d'établir un modèle à la fois réduit et significatif.

2.3.1 Détermination des paramètres d'entrée ayant une influence majeure sur la formation des HA au cours de l'oxydation grâce au logiciel CORICO

Ayant réalisé au préalable une trentaine d'expériences d'oxydation par le duo laccase/TEMPO sur le CG et sur le glycérol (sans suivre de matrice correspondant à un plan d'expériences), nous nous proposons d'utiliser cet ensemble de données (nommée A) afin de déterminer quels sont les paramètres qui ont un rôle majeur dans l'obtention de bons rendements en HA. Nous considérons ici les deux substrats (le CG et le glycérol) car nous souhaitons déterminer les grandes tendances du mécanisme réactionnel qui sont indépendantes du type de substrat choisi.

Le logiciel CORICO[®] nous permet de rechercher les corrélations entre tous les paramètres, classifiés en :

- Variables d'entrée ou paramètres contrôlables,
- Et en variables de sortie (ou paramètres modifiés par la variation des premiers) à savoir : les quantités d'acide glycérique, tartronique, oxalique, glycolique, glyoxylique, DHA, glycéraldéhyde, glycérol et CG présentes dans les échantillons et représentées par l'aire relative de chaque pic en HPLC de chaque molécule sur les chromatogrammes associés (Figure 120).

CORICO nous instruit également sur les liens possibles entre les variables de sortie. Toute cette partie a été réalisée en collaboration avec le professeur Carlos Vaca-Garcia, enseignant de plan d'expérience à l'INP-ENSIACET.

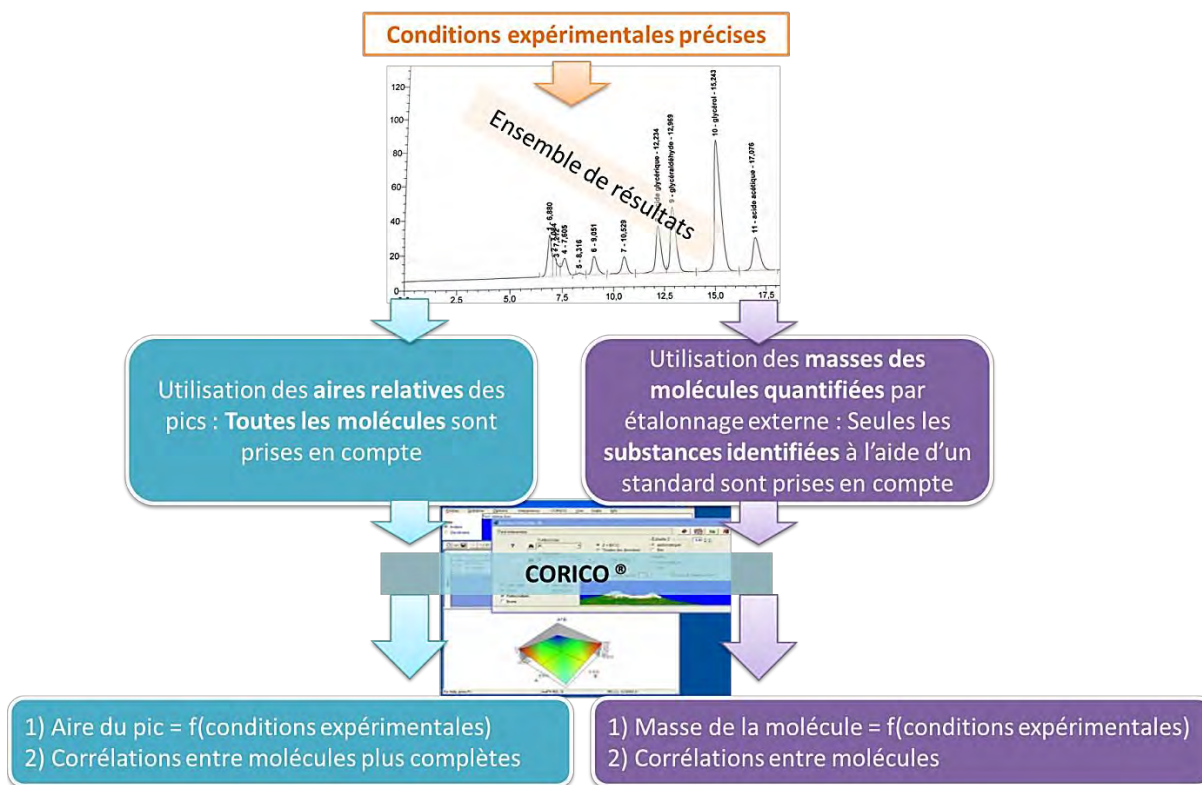


Figure 120 : Démarche suivie pour la mise en évidence des relations entre les paramètres d'entrée (conditions expérimentales) et ceux de sortie à l'aide du logiciel CORICO

CORICO est capable de trouver les corrélations logiques entre les différentes variables d'entrée et de sortie en y associant la valeur du coefficient de corrélation R. Parmi toutes les corrélations possibles, deux retiennent notre attention par leur grande valeur de R :

- Si Quantité de TEMPO ALORS Masse d'acide glycérique : R = 0,954 et,
- Si Masse d'acide glycérique ALORS Masse de glycéraldéhyde : R = 0,999

La première modélisation logique n'est guère surprenante. La quantité d'acide glycérique formé dépend directement de la quantité de TEMPO ajoutée, ce qui confirme notre intuition. Mais elle a le mérite d'être confirmée. Par contre, le deuxième modèle logique est plus révélateur. Les deux produits de réaction sont incontestablement liés l'un à l'autre car CORICO exprime leur corrélation avec un facteur de 0,999. Cet aspect est très intéressant puisqu'il permet de supposer que certains produits sont synthétisés à partir du même réactif.

Les résultats de corrélations entre les variables d'entrée et de sortie issus du jeu de données A sont :

Phrase logique de CORICO avec coefficient de corrélation entre les variables	Interprétation
SI Masse glycéraldéhyde ALORS pic 10 R = 0,857	La masse de glycéraldéhyde formée est fortement liée au pic 10. Formation conjointe ?
SI Masse de glycérol ALORS Quantité de TEMPO R = -0,856	La masse de glycérol diminue quand la quantité de TEMPO augmente
SI Quantité d'enzyme ALORS pic 9 R = 0,737	Le pic 9 augmente quand la quantité d'enzyme augmente
SI pic glycérol ALORS pic glycéraldéhyde R = 0,873	Le pic de glycéraldéhyde augmente quand le pic d'acide glycérique augmente
SI pic CG alors pic CG oxydé R = 0,988	Le pic de CG oxydé augmente quand il y a plus de substrat

Tableau 22 : Tableau des corrélations établies par CORICO entre les paramètres des réactions et les variables de sortie

CORICO représente également, sous forme d'équation, les liens existants entre les variables. Il calcule en outre, pour chaque équation, le khi deux (χ^2), le nombre de Fisher (F) et le coefficient de détermination (R^2) afin de vérifier, par une approche statistique, la validité du modèle proposé.

- Masse d'acide glycérique = $8,385 - 26,46$ Quantité de TEMPO \ast Activité enzymatique $- 12,55$ Quantité de substrat \wedge Activité enzymatique $+ 5,859$ Activité enzymatique \wedge O₂ $- 6,373$ O₂ \ast type de substrat $+ 4,566$ O₂ \ast Activité enzymatique $+ 14,69$ O₂ \ast Quantité de substrat
 $R^2 = 0,993$ $\chi^2 = 0,990$ $F = 178,8$
- Masse de glycéraldéhyde = $5,331 + 11,08$ Quantité de TEMPO $\{-$ type de substrat $- 2,164$ type de substrat \wedge O₂ $- 3,406$ Quantité de TEMPO $\&$ Activité enzymatique $- 3,070$ Activité enzymatique $\&$ Activité enzymatique $- 3,370$ O₂ $\&$ Quantité de substrat $+ 1,239$ Quantité de TEMPO $\&$ Quantité de TEMPO
 $R^2 = 0,995$ $\chi^2 = 0,996$ $F = 254,5$

Avec « O₂ » = Débit en dioxygène en ml/min, « Quantité de TEMPO » et « Quantité de substrat » qui sont respectivement les masses de TEMPO en mg et de substrat en mg introduit en début de réaction et enfin « Activité enzymatique », qui représente le pouvoir catalytique des enzymes, est en U.

De la même façon, nous obtenons des équations pour l'aire du pic de CG oxydé et pour celle du CG hémiacétal :

Pic CG oxydé = 18,62 – 33,84 Quantité de substrat ^ Quantité de substrat + 9,887 Quantité de TEMPO]-
Quantité de substrat

$$R^2 = 0,954 \quad \chi^2 = 0,931 \quad F = 115,8$$

La quantité de CG oxydé est donc maximale s'il n'y a pas trop de substrat et si la quantité de ce dernier est réduite par rapport à celle de TEMPO.

Pic CG hémiacétal = 5,469 + 7,374 Quantité de substrat]- Quantité de substrat – 0,8461 Quantité de TEMPO
* Quantité de substrat + 0,3264 Quantité de TEMPO {Quantité de TEMPO – 4,234 Quantité de substrat ^
Quantité de TEMPO + 15,72 Quantité de substrat {Quantité de TEMPO + 1,364 Quantité de substrat!
Quantité de TEMPO 11,39 Quantité de TEMPO} Quantité de substrat – 8,465 Quantité de substrat {-
Quantité de substrat – 0,3722 Quantité de TEMPO} Quantité de TEMPO + 4,261 Quantité de TEMPO &-
Quantité de TEMPO

$$R_2 = 1,000 \quad \chi^2 = 1,000 \quad F = 0,1042E+05$$

L'équation étant beaucoup plus complexe, aussi ne retiendrons-nous que les termes les plus influents pour une explication plus simple mais prenant tout de même en compte les facteurs primordiaux. Ainsi, la quantité de CG hémiacétal serait augmentée si la quantité de substrat n'est pas trop importante et si dans le cas où celle-ci est forte celle de TEMPO est faible ou inversement.

Dans l'ensemble des équations nous retrouvons certains paramètres de façon récurrente. Leur redondance indique que ces derniers jouent un rôle majeur dans les rendements en acide glycérique, en CG oxydé et en CG hémiacétal. Il s'agit de :

- La quantité de substrat,
- La quantité de TEMPO,
- L'activité enzymatique,
- La quantité d'oxygène dans le cas uniquement de l'acide issu du glycérol

Si nous nous référons à l'état de l'art, il est décrit que TEMPO et la laccase fonctionnent de pair : l'oxydant du substrat est TEMPO, lui-même régénéré par l'enzyme. Ainsi, nous pouvons émettre le postulat que la définition de variable la plus opportune est le rapport quantité de TEMPO/quantité d'enzyme car c'est la proportion relative qui conditionne la catalyse : le TEMPO est nécessaire à l'oxydation mais ne peut l'effectuer de façon optimale sans une quantité suffisante d'enzyme pour le régénérer.

Ainsi, il est indispensable que les masses d'enzymes et de TEMPO soient proportionnelles afin que le TEMPO soit toujours sous forme active (Figure 121).

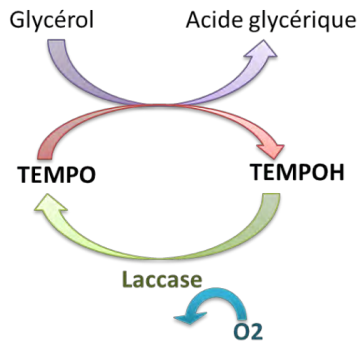


Figure 121 : Illustration de la dépendance Enzyme/TEMPO pour la catalyse

Les autres paramètres ont donc été exclus du plan d'expérience et leur valeur a été fixée pour l'ensemble de la campagne d'essais. Il s'agit de la température, de la durée d'expérience, le volume de milieu réactionnel et le pH.

L'augmentation de la température diminue la solubilité de l'oxygène dans l'eau ce qui est contreproductif pour le rendement en acide glycérique. Par ailleurs, nous cherchons à économiser de l'énergie, ce qui passe aussi par un chauffage faible de la réaction. La température a donc été fixée à 22°C. L'agitation magnétique est de 550 rpm. Elle n'a pas été signalée par CORICO comme une variable d'entrée de poids. Nous restons donc à cette valeur qui suffit à assurer une bonne homogénéité du milieu.

La durée d'expérience a été fixée à 9 heures. Il s'agit d'une durée minimale de réaction, qui permet de se placer dans le domaine à partir duquel la quantité d'acide glycérique formé atteint presque sa valeur maximale comme l'indique les données expérimentales ci-dessous :

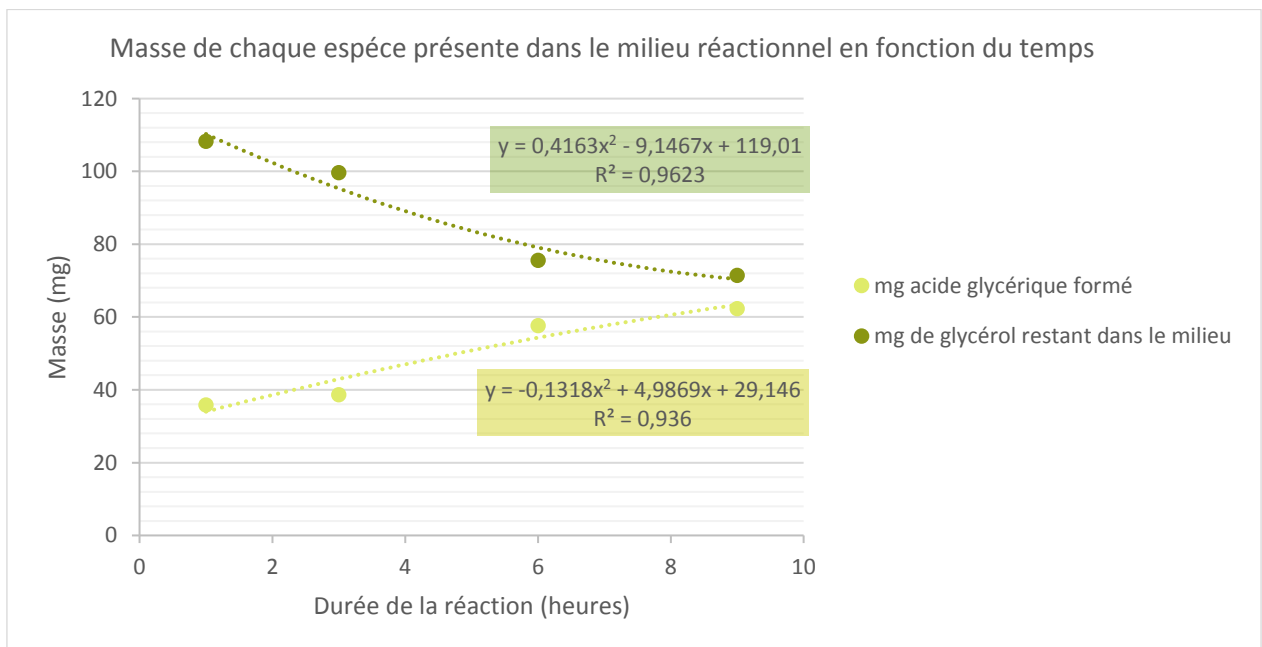


Figure 122: Evolution de la quantité d'acide glycérique formée et de la quantité de glycérol consommée au cours du temps

Nous constatons sur la Figure 122 que le premier terme de l'équation décrivant la formation de l'acide glycérique en fonction du temps (avec un coefficient de corrélation acceptable), est un terme négatif (- 0,13) devant un membre au carré (x^2). Cela indique donc que la formation de l'acide glycérique au cours du temps suit une parabole inversée. La masse d'acide formée au bout de 9 heures de réaction se trouve donc dans la zone où la parabole est proche de son maximum. Par ailleurs, cette durée permet l'exécution de la réaction en une journée.

Le volume d'expérience influence la synthèse mais pour des raisons cinétiques et non thermodynamiques. Ce sont souvent des problématiques de mélange du milieu réactionnel. Il a été fixé à 20 ml. Le pH de 4,5 étant indiqué comme à l'optimum pour l'enzyme, il n'a pas à être modifié. Cette grandeur est très importante pour le bon déroulement de la réaction (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009).

Ces variables fixées, il est nécessaire de déterminer les domaines expérimentaux de celles que nous souhaitons faire évoluer au cours des plans d'expériences.

2.3.2 Détermination des domaines expérimentaux pour les variables retenues

2.3.2.1 Rapport laccase/TEMPO

La quantité d'enzyme sera fixée à 87 mg (soit 20 U /ml) pour tous les essais. Le même lot d'enzyme sera utilisé pour toutes les expériences afin de ne pas induire de biais du fait de son origine. C'est donc la masse de TEMPO qui sera variable au cours du PEX. Cette masse d'enzyme correspond au nombre d'unités demandées par le protocole d'oxydation laccase/TEMPO. Seule la quantité de TEMPO sera variable et nous espérons la minimiser, vu son coût.

Une stratégie plus subtile sera abordée. Le domaine expérimental doit concerner les points où le TEMPO induit une même tendance sur la réaction. Il est attendu, qu'en deçà d'une certaine quantité, la réaction suit une évolution pouvant se diviser en deux domaines trop dissemblables pour être décrits par une seule équation. Ainsi, si la totalité des points sont introduits dans le PEX, la qualité du modèle du second degré recherché sera très mauvaise (Figure 123).

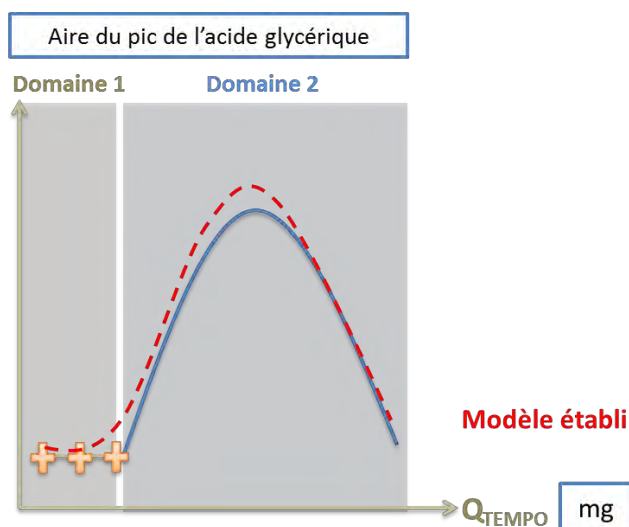


Figure 123 : Visualisation d'un modèle de mauvaise qualité établi sur des tendances différentes

La difficulté est que nous ne savons pas, *a priori*, où se trouvent les différents domaines induits par les variations de la quantité de TEMPO. Afin d'identifier et d'écartier du plan les points ne suivant pas la même tendance que les autres dans le modèle (en orange sur la Figure 123), nous allons utiliser les capacités de CORICO et le jeu de données déjà utilisé auparavant (matrice A).

Nous définirons Q_t comme la quantité de TEMPO ayant un effet propre à la tendance majoritaire du mécanisme (ici la tendance 2) et K la quantité au-delà de laquelle les données correspondent à cette évolution (Figure 124). Ainsi, K est le seuil à partir duquel le TEMPO a un effet correspondant à une unique tendance. Nous pouvons écrire : $Q_{\text{TEMPO}} = Q_t + K$ ou encore $Q_t = Q_{\text{TEMPO}} - K$

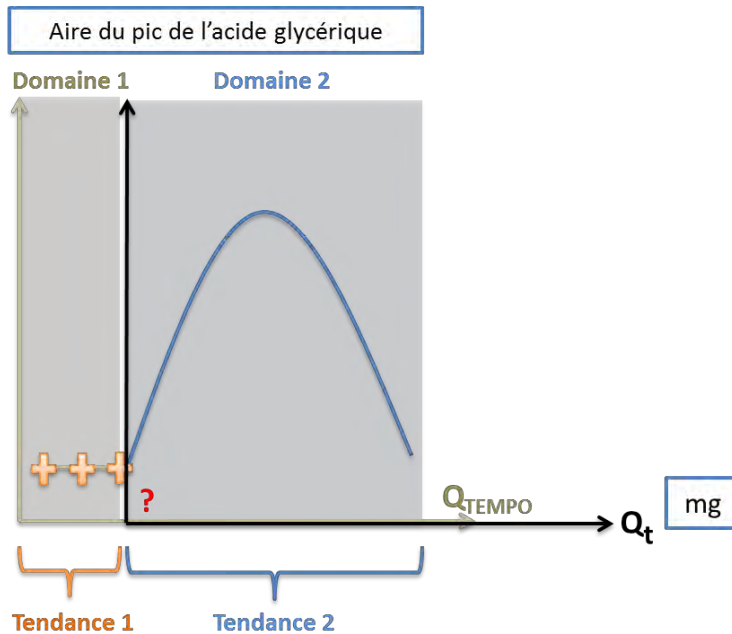
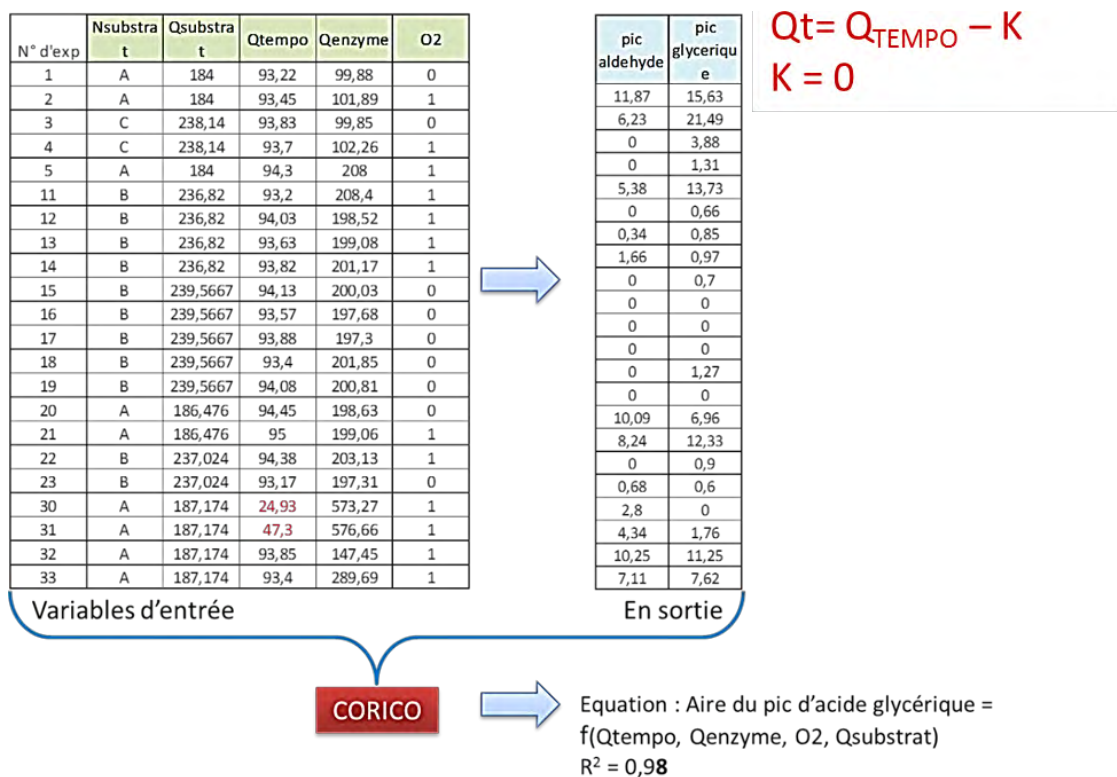


Figure 124 : Illustration des tendances 1 et 2 possibles dans la réponse de la quantité d'acide glycérique formée (en aire) par rapport à la quantité de TEMPO introduit

Nous avons fait fonctionner les algorithmes de CORICO avec des valeurs de K distinctes. A chaque itération, nous avons obtenu un coefficient de corrélation différent pour le postulat suivant : Aire du pic de l'acide glycérique = $f(\text{présence de dioxygène, quantité de TEMPO, quantité d'enzyme, quantité de substrat})$ (Figure 125).



■ ■ ■ **K = 10, K = 20 etc.**

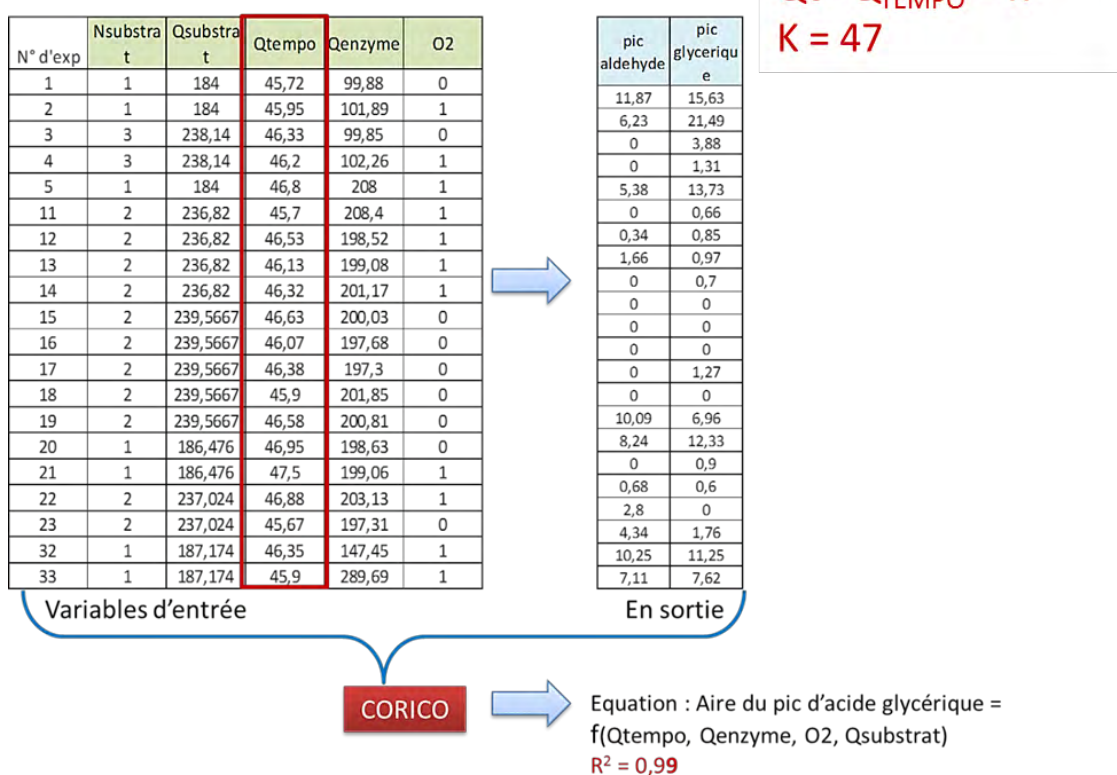


Figure 125 : Etude de l'influence de K sur la corrélation entre le modèle théorique établi par CORICO et les valeurs réelles

Nous regroupons alors les résultats et traçons alors la courbe $R^2 = f(K)$:

k	coeff d	F (coeff Fisher)	Q2
0	0,985	231,5	0,973
10	0,985	231,5	0,973
20	0,985	231,5	0,973
30	0,981	205,8	0,966
40	0,981	205,8	0,966
45	0,981	205,8	0,966
46,25	0,981	205,8	0,966
46,5	0,981	205,8	0,966
47	0,99	369,5	0,984
47,5	0,99	369,5	0,984
50	0,99	369,5	0,984
60	0,99	369,5	0,984
80	0,99	369,5	0,984
90	0,99	369,5	0,984

R pour l'équation : Aire du pic du acide glycérique (A) = f(K)

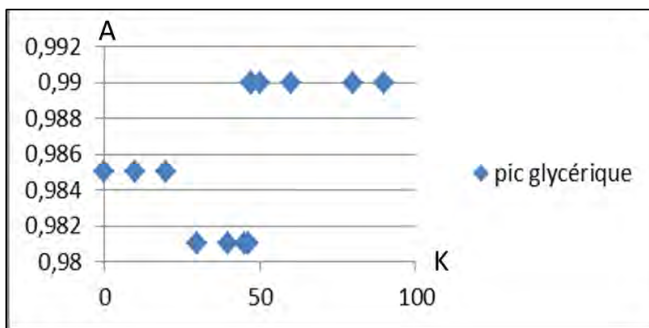


Tableau 23 : A gauche, le tableau récapitulatif des R^2 obtenus en fonction de K et à droite $R^2 = f(K)$

Nous faisons la même chose pour la formation de glycéraldéhyde afin de vérifier notre démarche :

k	coeff d	F (coeff Fisher)	Q2
0	0,969	162,9	0,958
10	0,969	162,9	0,958
20	0,969	162,9	0,958
30	0,975	154,3	0,966
40	0,975	154,3	0,966
45	0,975	154,3	0,966
46,25	0,975	154,3	0,966
46,5	0,975	154,3	0,966
47	0,985	127,8	0,979
47,5	0,985	127,8	0,979
50	0,985	127,8	0,979
60	0,985	127,8	0,979
80	0,985	127,8	0,979
90	0,985	127,8	0,979

R pour l'équation : Aire du pic du glycéraldéhyde = f(K)

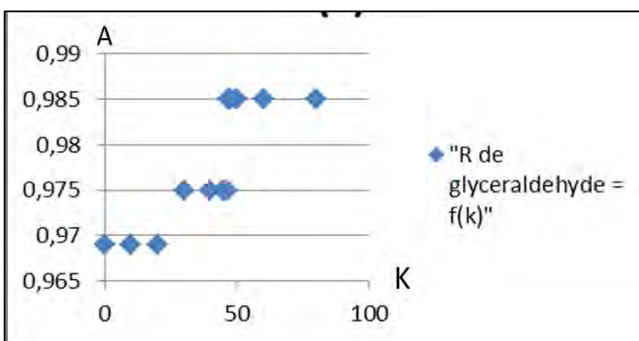


Tableau 24 : A gauche : tableau récapitulatif des R^2 obtenus en fonction de K et à droite $R^2 = f(K)$

Il apparaît que la valeur de K pour laquelle le R^2 est le meilleur est de 48 mg environ. Par conséquent, nous pouvons en déduire qu'afin d'éliminer les points de moins bonne corrélation, la quantité de TEMPO doit être au minimum de 48 mg.

Si la quantité de TEMPO pour le PEX utilisé est inférieure à la valeur de seuil ainsi établie, alors nous risquons d'avoir des résultats en dehors de la tendance générale, ce qui aboutirait à un modèle moins précis. En conclusion :

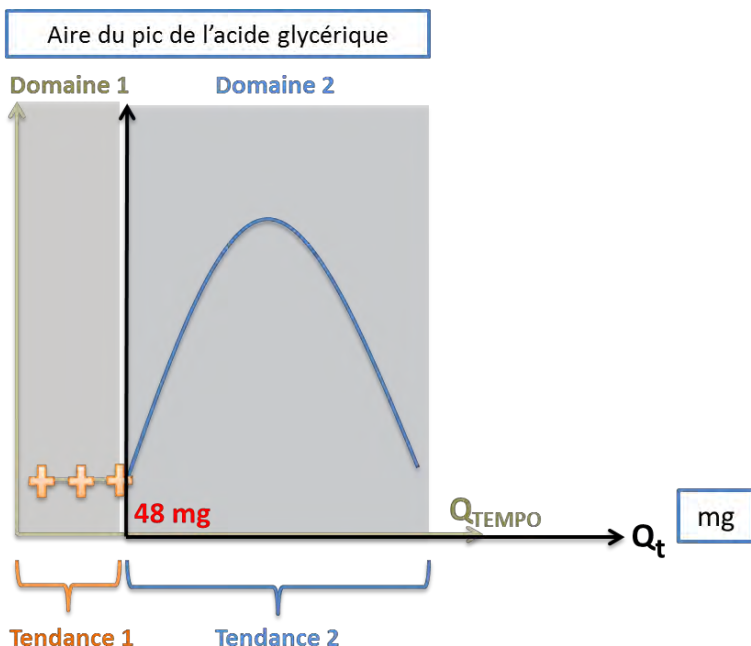


Figure 126 : Conclusion sur la quantité de TEMPO minimale à introduire pour que la quantité d'acide glycérique formée (en aire) décrive une tendance unique en fonction de la quantité de TEMPO

Enfin, le TEMPO étant un réactif cher, la quantité maximale que nous fixerons pour le PEX sera d'environ trois fois la quantité minimale déterminée, soit 150 mg. Cette condition sera valable pour les expériences aussi bien avec le glycérol comme substrat qu'avec le CG.

Remarque : Nous nous sommes basés sur l'étude d'un seul des deux substrats puisque, selon le mécanisme de l'oxydation décrit dans le chapitre 1, c'est surtout l'interaction entre le TEMPO et l'enzyme qui doit être pris en compte, donc indépendamment du substrat choisi. Or, ayant plus d'information sur l'acide glycérique car il est quantifiable avec un étalon externe, nous avons privilégié l'étude de l'oxydation du glycérol.

2.3.2.2 Tests de viscosité et détermination de la quantité maximale de substrat testée

La concentration en substrat est une des variables. L'augmentation de la quantité de celui-ci peut faire varier la viscosité du milieu. Ainsi, si celle-ci augmente trop, et que nous constatons une diminution de la réactivité, il serait possible d'attribuer cela, non pas à un mauvais ratio catalyseur(s)/substrat, mais à l'augmentation de la viscosité du milieu, limitant la diffusion.

Le glycérol est le produit le plus visqueux de nos deux substrats. Par conséquent, il sera pris comme référence pour la détermination de la quantité maximale de substrat admise, en dessous de laquelle il n'y a pas d'effet majeur sur la diffusion. Nous étudions donc la viscosité du mélange réactionnel laccase/TEMPO avec du glycérol afin d'établir une valeur de référence. Puis nous mesurerons celles de solutions plus concentrées en glycérol (jusqu'à dix fois). Nous comparerons ensuite les valeurs obtenues afin de déterminer la quantité de glycérol pour laquelle la viscosité dépassera de façon trop conséquente la valeur du mélange d'origine. Nous trouverons ainsi la valeur maximale pour la concentration en substrat (glycérol ou CG).

Nous souhaitons garder le volume fixe de solution à 20 ml (conditions d'origine) afin de ne pas induire un effet de dilution dû à l'ajout de glycérol dans la solution tampon de départ, et donc, une potentielle diminution de réactivité. Après mesure, nous obtenons l'évolution suivante de la viscosité en fonction de la masse de glycérol ajoutée dans le milieu réactionnel :

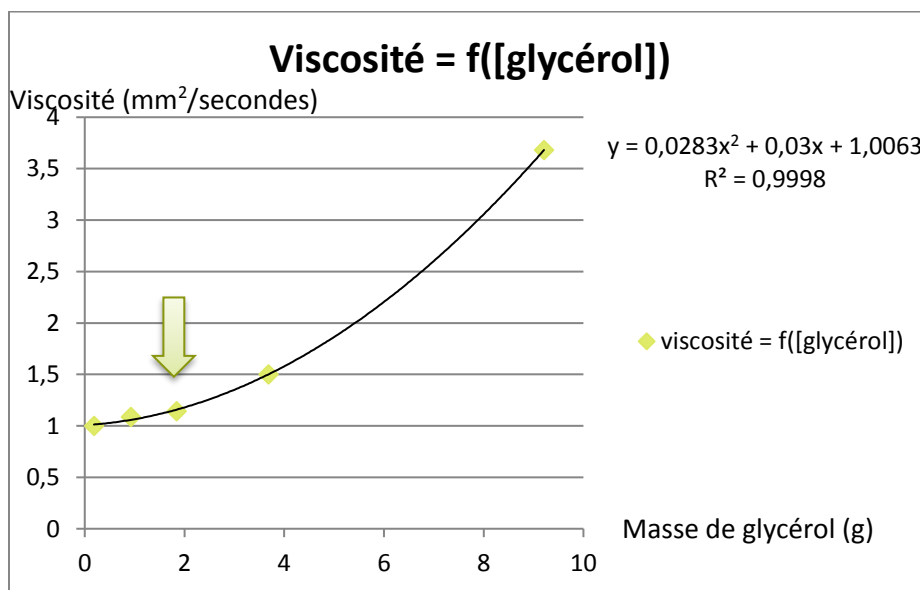


Figure 127 : Evolution de la viscosité du milieu en fonction de la masse de glycérol introduite

Sachant que la viscosité du mélange de référence est de 1,028364 mm²/sec, nous en déduisons que la quantité maximale de glycérol à introduire est 1,8418 g, soit dix fois la valeur de départ. Le détail de la méthode de mesure de la viscosité se trouve p.264.

2.3.2.3 Détermination de la pression en dioxygène maximale : cas de l'oxydation du glycérol part le duo laccase/TEMPO

Nous souhaitons connaître le débit maximal en dioxygène applicable dans le ballon contenant les réactifs du protocole CE6 sous dioxygène, avant qu'un moussage trop important ait lieu et conduise à la perte de réactifs (dépôts sur les parois du réfrigérant). Nous réalisons donc un montage simple constitué d'une bougie frittée de la porosité zéro choisie pour le PEX, du débitmètre qui y est branché afin de faire la mesure, et de la bouteille de dioxygène. Nous appliquons alors un débit en gaz de plus en plus fort jusqu'à observer le phénomène non souhaité.

Le débit maximal est ainsi déterminé à 0,45 ml/min (en valeur de débit en air).

2.3.2.4 Conclusion

Le Tableau 25 présente un récapitulatif des intervalles de valeurs utilisés pour faire varier les grandeurs choisies.

	Quantité de glycérol (mg)	Quantité de CG (mg)	Quantité de TEMPO (mg)	Débit O ₂ (ml/min) <u>donné en débit d'air</u>
Minimum	184	548	48	0,20
Maximum	1843	1296	148	0,45

Tableau 25 : Domaines expérimentaux pour les expériences du PEX

L'ensemble de ces données permettront la réalisation des plans d'expériences en accord avec les contraintes citées précédemment.

2.3.3 Résultats des plans d'expériences

2.3.3.1 Démarche pour l'interprétation des résultats

Dix-huit réactions seront réalisées dans le cas de l'oxydation du glycérol pour la réalisation du PEX, avec quatre répétitions au centre (expériences 15 à 18). Dans le cas du CG, nous exécutons 16 expériences dont deux répétitions au centre. Les montages associés à ces essais ainsi que les matrices utilisées et les calculs se trouvent chapitre 5 p.271.

Par ailleurs, afin de réaliser une interprétation complète des résultats issus des chromatogrammes des réactions, il était nécessaire de trouver une méthode permettant d'intégrer les molécules non visibles (acide oxalique ou mésoxalique), ou non quantifiables (standards absents comme pour le CG oxydé) dans les jeux de données transmis à la modélisation. Les résultats du PEX utilisés pour établir le modèle ont donc été exprimés en pourcentage d'aire relatif de chaque pic. La somme des aires de ces pics sur le chromatogramme étant égale à 100%.

L'aire est proportionnelle à la concentration en produit. Ainsi, plus un composé sera concentré (m), plus l'aire du pic (A) sera grande. En réalité, cette relation entre l'aire du pic et la concentration est à moduler en fonction du coefficient de réponse (k) de la molécule :

$$m = k.A$$

Le risque que représente cette relation est qu'une molécule à fort coefficient de réponse paraisse avoir une aire de pic supérieure à celles des autres molécules, alors que cela n'est dû qu'au coefficient k qui lui correspond. De la même façon, une molécule avec un faible coefficient k pourrait paraître moins concentrée que les autres substances.

Nous avons choisi de négliger ce coefficient k pour les molécules qui n'ont pas pu être quantifiées pour trois raisons :

- Nous travaillons avec un détecteur RI, beaucoup moins sensible qu'un détecteur U.V. Ainsi, pour cette méthode de détection, une variation du k de chaque molécule modifie de façon moins significative la relation entre l'aire du pic correspondant et la concentration qui y est reliée,
- Nos molécules possèdent des réponses assez proches. Par exemple, le glycéraldéhyde et l'acide glycérique, pour la même concentration dans le milieu, ont des aires de pics similaires. Leurs k sont donc proches,
- Nous cherchons à savoir dans quelles conditions la molécule A est le plus fabriquée. Par conséquent, nous ne comparons pas vraiment les rendements des molécules entre elles mais plutôt les rendements d'une même molécule d'une expérience à une autre. Ainsi, c'est surtout la différence entre deux aires pour une même substance, et donc un même coefficient de réponse, qui compte.

2.3.3.2 Résultats et modélisation de la formation d'acide glycérique

Les résultats bruts sont présentés Tableau 26. Les « pics » sont attribués à leur temps de rétention.

n° ex.	pic 1	pic 2	pic 3	pic 4	pic 5	pic 6 (mésoxalique)	pic 7 (tartronique)	pic glycérique	pic glycéraldéhyde	pic glycérol	pic acétique	pic 12	pic 13
Temps de rétention associé (min)	6,89	7,08	7,26	7,61	8,32	9,05	10,54	12,24	12,96	15,25	17,08	11,9	8,49
1	5,5	3,5	1,43	2,44	0,41	2,45	3,06	8,33	17,09	44,6	11,12	0	0
2	1,35	1,48	0,49	0,63	0,14	0,32	1,05	1,97	13,78	75,2	3,58	0	0
3	7,85	3,96	0	6,15	0,2	5,62	3,95	14,52	15,51	31,7	10,54	0	0
4	1,9	1,28	0,6	1,3	0,14	2,18	2,7	7,25	17,9	60,8	3,5	0,36	0
5	5,99	3,75	1,24	2,16	0,48	2,02	2,65	6,79	16,19	47,7	10,7	0,21	0
6	0,91	1,3	0,48	0,75	0,1	0,09	0,53	0,55	8,9	82,9	3,26	0	0,24
7	6,95	2,51	1,45	3,96	0,27	4,03	3,86	11,31	16,9	38,3	10,4	0	0
8	1,48	1,48	0,6	0,78	0,17	0,65	1,96	3,05	15,9	70,3	3,16	0,31	0,12
9	13,9	4,08	2,96	6,51	0,33	4,88	3,98	12,27	12,1	20,5	18,3	0	0
10	1,5	1,76	0	0,86	0	1,38	2,16	5,1	16,9	66,7	3,15	0,37	0
11	1,58	1,43	1,03	1,36	0,17	0,21	0,62	0,45	10,3	76,9	5,4	0	0,46
12	2,75	2,76	0	2,01	0,16	2,83	3,09	8,63	18,4	53,9	5,07	0,38	0
13	2,88	2,09	0,52	1,9	0,21	2,75	2,98	8,76	17,7	54,3	5,47	0,34	0
14	2,29	1,91	0,7	0,88	0,27	1,04	2,12	3,98	16,4	64,7	5,29	0,28	0
15	2,57	2,05	0,67	1,14	0,33	1,23	2,13	4,55	16,7	63,1	5,24	0,25	0
16	2,57	2,18	0,69	1,28	0,33	1,43	2,28	5,1	17,19	61,5	5,22	0,25	0
17	2,53	2,33	0,48	1,23	0,28	1,48	2,34	5,23	17,34	61,3	5,24	0,24	0
18	2,39	2,2	0,51	1,03	0,23	1,32	2,26	4,69	17,21	62,6	5,29	0,28	0

Tableau 26 : Résultat du PEX réalisé avec le glycérol. Les résultats sont donnés en pourcentage d'aire relatif. En gras les aires les plus élevées obtenues pour l'acide glycérique et le glycéraldéhyde.

Grâce aux analyses fines de RMN et de spectrométrie de masse, il nous a été simple d'identifier quelle molécule était présente sur le chromatogramme et ainsi quelle aire celle-ci occupait dans l'ensemble de pics visibles. Le pic 6 correspond ainsi à l'acide mésoxalique et le 7 au tartronique (Tableau 26). La Figure 128 nous permet de visualiser de façon plus claire la position des pics numérotés de 1 à 7 et les produits correspondants pour les autres.

Nous précisons que les temps de rétention apparaissent différents de ceux des fractions car les produits sont ici analysés avec de l'acide sulfurique dans l'éluant au lieu de l'acide formique.

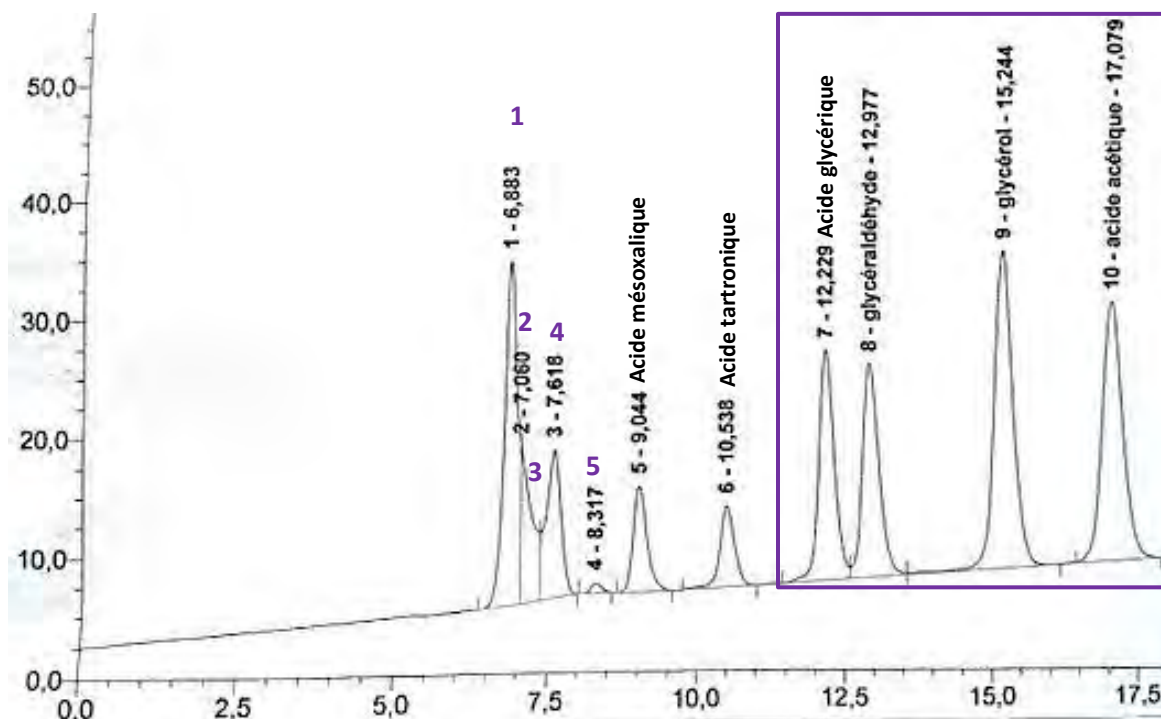


Figure 128 : Chromatogramme de l'expérience n°9 du PEX sur glycérol. Les numéros des pics répertoriés sont indiqués en violet

Grâce à ces données, nous allons pouvoir établir un modèle prévisionnel du déroulement de la réaction en se basant sur un modèle polynomial afin :

- De maximiser la quantité d'acide glycérique formée
- De prédire quelle quantité de celui-ci sera formée en précisant uniquement en entrée les valeurs du débit de dioxygène et les quantités utilisées de TEMPO et de substrat
- Nous y associerons enfin une validation statistique

2.3.3.2.1 Résultats obtenus avec CORICO

2.3.3.2.1.1 Interprétations avec les données en aires relatives

Le logiciel CORICO permet d'obtenir des corrélations entre les variables de sortie et celles d'entrée, mais aussi entre les variables de sorties deux à deux. Afin de comparer les données associées à l'intégralité des molécules qui ont pu être identifiées (pics Figure 128), nous utiliserons tout d'abord les résultats du PEX en pourcentage d'aire. Nous avons obtenu les relations suivantes :

- a) Si pic 4 ALORS pic acide mésoxalique $R = 0,928$
- b) Si pic acide mésoxalique ALORS pic acide glycérique $R = 0,986$
- c) Si pic acide tartronique ALORS pic acide glycérique $R = 0,968$

Avec la relation « a) », le pic 4 et le pic de l'acide mésoxalique sont corrélés fortement et de façon positive. Nous pouvons donc penser qu'ils sont formés à partir du même point de départ et que la formation de l'un est complémentaire de l'autre. Cette observation est aussi valable pour la formation de l'acide glycérique et du pic acide mésoxalique en « b) ».

Il en est de même pour le pic de l'acide tartronique et celui de l'acide glycérique en « c) ». Ces deux derniers points pourraient suggérer qu'il existe plusieurs voies d'oxydation simultanées du glycérol. Cependant, il est difficile de pouvoir exploiter plus loin ces interprétations.

2.3.3.2.1.2 Résultats en équations

CORICO établit des équations avec des relations logiques qui permettent de visualiser de façon rapide et simple quels sont les paramètres jouant un rôle majeur dans la formation d'une molécule. Le logiciel renvoie également des données statistiques, afin de valider les modèles qu'il propose, comme le coefficient de détermination (R^2), le khi² (χ^2) et le nombre de Fisher (F). Ainsi, nous obtenons les équations ci-dessous.

Nous avons choisi de nous intéresser uniquement aux modélisations concernant les aires relatives du glycéraldéhyde et de l'acide glycérique (représentées par le mot « pic ») car ce sont les produits les plus recherchés.

Pic acide glycérique = 6,252 + 14,22 Quantité de TEMPO - Quantité de substrat - 5,244 Débit d'O₂ ^ Débit d'O₂ - 4,364 Quantité de substrat * Quantité de substrat - 2,506 Quantité de TEMPO & Quantité de substrat + 1,125 Débit d'O₂ #- Quantité de TEMPO + 1,843 Quantité de TEMPO { Quantité de substrat

$$R^2 = 0,978 \quad \chi^2 = 0,963 \quad F = 126,6$$

Pic glycéraldéhyde = 15,71 + 6,478 Quantité de TEMPO] Quantité de substrat + 4,142 Quantité de TEMPO Quantité de substrat - 2,595 Débit d'O₂] Quantité de substrat - 128,7 Quantité de substrat } Débit d'O₂- 2,794 Quantité de substrat } Quantité de substrat + 134,2 Quantité de substrat } Quantité de TEMPO - 1,801 Débit d'O₂* Quantité de TEMPO + 3,034 Quantité de TEMPO } Débit d'O₂ - 2,415 Quantité de TEMPO ^ Quantité de substrat + 1,214 Débit d'O₂* Quantité de substrat

$$R^2 = 0,988 \quad \chi^2 = 0,970 \quad F = 135,4$$

Les opérateurs logiques des équations permettent de renvoyer les interprétations suivantes (en se basant seulement sur les termes ayant l'influence la plus forte, soient les deux premiers) :

Pour l'acide glycérique, le premier membre nous indique une influence importante de la quantité de TEMPO et de substrat et que, pour un bon résultat, il faut beaucoup de TEMPO pour peu de substrat (**opérateur « - »**). Le second terme est au carré et concerne le dioxygène qui a une influence négative comme son coefficient directeur l'indique. Le lien entre la quantité d'acide formée et l'O₂ est sous forme d'une parabole inversée.

Pour le glycéraldéhyde, il serait nécessaire d'avoir beaucoup de TEMPO et de substrat de façon simultanée (**opérateur «] »**) mais avec des valeurs pour la quantité de TEMPO et de substrat qui ne doivent pas être extrêmes pour le second terme de l'équation (**opérateur « ! »**). Les paramètres ayant donc le plus d'influence sur la formation de l'aldéhyde sont donc le TEMPO et le substrat, mais pas l'oxygène, car ce terme est peu présent et vers la fin de l'équation.

2.3.3.2.2 Interprétations avec un modèle polynômial

Pour pouvoir réaliser une modélisation il est d'abord nécessaire de transformer les données d'entrée en valeurs normalisées codées nommées X_i . L'ensemble des calculs pour la mise au point du modèle se trouve dans la partie expérimentale p.266.

- Le débit de dioxygène nommé X_1
- La quantité de TEMPO nommée X_2
- La quantité de substrat nommée X_3
- Y = la réponse, le résultat de (1) qui représente l'aire relative associée aux pics d'acide glycérique fabriqué

Une fois transformées, les variables sont intégrées dans un polynôme de second degré dont le but est de décrire la réponse Y :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

Nous calculons ensuite les estimations de chaque coefficient du polynôme selon la méthode des moindres carrés, regroupés dans la matrice à Tableau 27.

Coefficient de l'équation (1)	Valeurs calculées
a0	5,032300007
a1	-1,421625251
a2	2,52410419
a3	-3,195338368
a11	0,521611132
a22	-0,387063452
a33	1,684535922
a12	-0,566425487
a13	-0,106209797
a23	-0,368706778

Tableau 27 : Valeurs obtenues pour les coefficients du polynôme (matrice â)

Par conséquent, le modèle total polynômial décrit la quantité d'acide glycérique comme le résultat de :

$$Y = 5,032300007 - 1,421625251X_1 + 2,52410419 X_2 - 3,195338368 X_3 + 0,521611132 X_1^2 - 0,387063452 X_2^2 + 1,684535922 X_3^2 - 0,566425487 X_1X_2 - 0,106209797X_1X_3 - 0,368706778 X_2X_3 \quad (2).$$

Ce modèle nous permet de prédire la quantité d'acide glycérique pour chacune des conditions expérimentales. Nous comparons Tableau 28 les différentes (« % différence ») valeurs prédites (« Y prédit ») et expérimentales (« Y »).

Y	Y prédit, calculé à partir du modèle (2)	%Différence	Y moyen = moyenne de Y réel sur le type de l'expérience
8,33	7,944014635	5	8,33
1,97	2,525152259	-28	1,97
14,52	14,79696161	-2	14,52
7,25	7,897222563	-9	7,25
6,79	6,422382141	5	6,79
0,55	0,564104343	-3	0,55
11,31	11,04334655	2	11,31
3,05	3,71519781	-22	3,05
12,27	12,91235514	-5	12,27
5,1	3,87870013	24	5,1
0,45	0,704319744	-57	0,45
8,63	7,817528397	9	8,63
8,76	8,104767354	7	8,76
3,98	4,066041692	-2	3,98
4,55	5,03876388	-11	4,8925
5,1	5,017985008	2	4,8925
5,23	5,052868737	3	4,8925
4,69	5,028288011	-7	4,8925

} Valeurs de la moyenne des répétitions

Tableau 28 : Calcul des valeurs de «Y moyen» et de la différence entre les valeurs de Y calculées par le modèle «Y prédit» , et les valeurs réelles «Y réel »

Nous constatons que les écarts entre ces valeurs sont raisonnables, à l'exception d'un point (28% de différence), mais seule l'analyse des variances (test de Fischer) est un critère statistique valable pour valider l'expression proposée et les valeurs résultantes.

A l'aide du Tableau 28, nous allons donc calculer différentes grandeurs (Figure 129) qui nous permettront d'évaluer l'écart entre le modèle polynômial et le modèle réel, afin d'éprouver la validité de l'équation établie.

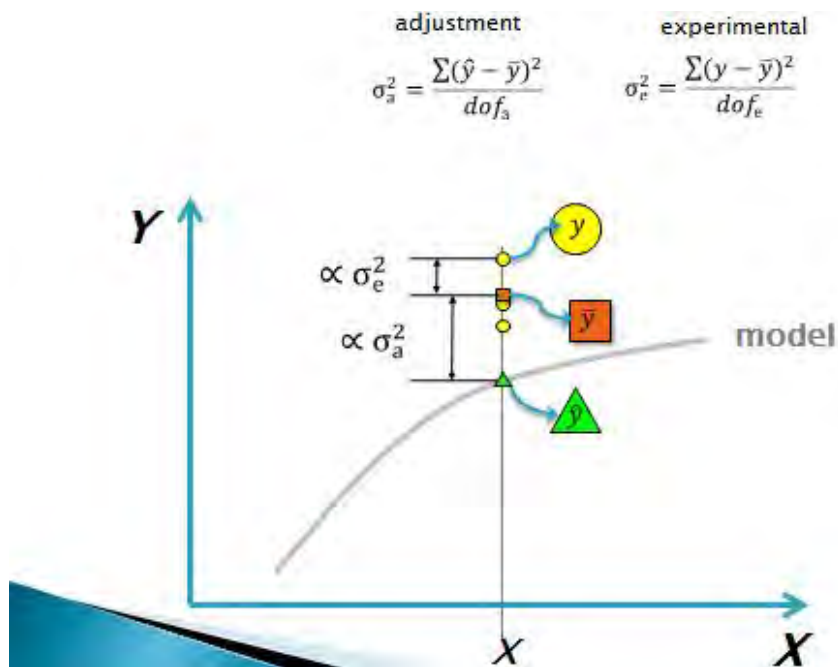


Figure 129 : Visualisation des grandeurs statistiques (Vaca-Garcia, 2015)

La Figure 129, traduit le fait que σ_e est le reflet de l'écart entre la valeur réelle de Y (« y ») et la valeur moyenne de Y réel (\bar{y}), tandis que σ_a représente la différence entre la valeur de Y calculée par le modèle (\hat{y}) et la valeur réelle associée.

Degré de liberté de l'ajustement (dofa)	5
Degré de liberté de l'expérimentale (dofe)	3
Degré de liberté des résidus (dofr)	8
Ajustement de la variance : σ_a	0,949745756
Variance expérimentale : σ_e (5)	0,105091667
Variance résiduelle : σ_r (6)	0,632357938
Fisher calculé avec (5) et (6)	9,037307959
F correspondant dans la table de Fisher	9,013455168

Tableau 29 : Termes statistiques

Avec :

$$\sigma_r^2 = \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{dofr} \quad \sigma_a^2 = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2}{dofa} \quad \sigma_e^2 = \frac{\sum(y_i - \bar{y}_i)^2}{dofe} \quad \left(F = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_e^2} \right) \leq F_{Fisher}$$

Équation 1: Equations pour les calculs (Vaca-Garcia, 2015)

La variance expérimentale nous renseigne sur la dispersion des données, ce qui permet d'éviter qu'un point « ne tire » les autres vers une certaine tendance.

Nous constatons que notre coefficient de Fisher est quasiment égal à celui de référence. Pour être absolument validé, il faudrait que notre valeur soit inférieure à celle de la table. Cependant, notre écart étant minime (trois chiffres après la virgule) nous le considérons approuvé. Ce test est important car il tient compte du nombre de points et donc d'expériences, il est donc plus pertinent qu'un coefficient de corrélation classique comme R^2 .

D'autre part, il est nécessaire de calculer l'incertitude des coefficients « ai », notée « σ_{ai} ». Celle-ci se calcule uniquement avec les valeurs de la diagonale de la matrice X. Elle est fonction du type de plan choisi (ici un composite centré). La formule est :

$$\sigma_{a_i} = \sqrt{\sigma_r^2 \cdot \text{diag}({}^tX \cdot X)^{-1}}$$

Figure 130 : Formule de calcul de l'incertitude des coefficients « ai », notée « σ_{ai} »

Nous obtenons :

A0	A1	A2	A3	A11	A22	A33	A12	A13	A23
0,22	0,00	0,00	0,00	-0,08	-0,08	-0,08	0,00	0,00	0,00
0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
-0,08	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
-0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
-0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13

Tableau 30 : Matrice des incertitudes σ_{ai} sur les coefficients du polynôme

La matrice Tableau 30 correspond à un PEX composite centré, dont la caractéristique essentielle est la « presque-orthogonalité » afin d'éviter les covariances entre les facteurs principaux. L'intervalle de confiance de chaque coefficient se calcule comme $t\sigma$. La valeur de t-student utilisée correspond à *dofr* (8) degrés de liberté et 95% de probabilité : $t = 2,306$.

Si la valeur absolue du coefficient considéré est supérieure à son intervalle de confiance, le coefficient est significatif à 95% de probabilité. Les coefficients non significatifs peuvent être exclus du modèle polynomial sans que cela apporte un changement majeur à l'estimation.

Valeur de la diagonal de la matrice	$\sigma = \sqrt{(\sigma^2_r * \text{diag})}$	$t\sigma$	\hat{a}	Coefficient significatif?	Coefficient associé
0,22	0,372986255	0,860107846	5,03230001	n. a.	a0
0,08	0,224919174	0,518664546	-1,42162525	oui	a1
0,08	0,224919174	0,518664546	2,52410419	oui	a2
0,08	0,224919174	0,518664546	-3,19533837	oui	a3
0,13	0,286716815	0,661170161	0,52161113	non significatif	a11
0,13	0,286716815	0,661170161	-0,38706345	non significatif	a22
0,12	0,275468605	0,635231743	1,68453592	oui	a33
0,13	0,286716815	0,661170161	-0,56642549	non significatif	a12
0,12	0,275468605	0,635231743	-0,1062098	non significatif	a13
0,13	0,286716815	0,661170161	-0,36870678	non significatif	a23

Tableau 31 : Incertitudes liées aux coefficients et significativité des coefficients

Ainsi, nous concluons que : l'aire relative d'acide glycérique formée = $5,03230001 + -1,42162525 X_1 + 2,52410419X_2 - 3,19533837 X_3 + 1,68453592 X_3^2$

Il est à noter qu'il n'y a pas d'effet de synergie entre les variables car les coefficients a12, a13, a23 sont non significatifs.

La quantité d'acide glycérique formée a donc une relation linéaire avec la quantité de TEMPO et d'oxygène, mais une relation qui contient un terme parabolique pour le substrat. Le terme au carré pourrait être la conséquence de la présence d'un mécanisme se basant sur une réaction enzymatique, car ce dernier est souvent sujet à des mécanismes d'inhibition en présence d'une trop forte quantité de substrat.

En résolvant l'équation à l'aide du « Solveur » d'Excel®, afin de maximiser la quantité d'acide glycérique formée, nous trouvons le triplet suivant :

0,208578644 ml/min	Débit d'O ₂
148,15 mg	Quantité de TEMPO
184,7mg	Quantité de glycérol
Aire relative maximale attendue	20%

Tableau 32 : Triplet optimal pour la maximisation du rendement en acide glycérique

Le protocole choisi nous permettrait donc de produire de l'acide glycérique à hauteur de 20 % en aire relative en réacteur ouvert. Le triplet optimal n'a cependant pas été testé en laboratoire. Avec une modélisation rapide mais non validée, nous formerions une quantité de 125 mg d'acide glycérique. Ainsi, dans ces conditions, l'acide glycérique formé représenterait 67% du glycérol mis à l'état initial et donc transformé, pour une conversion totale du substrat (100 %).

Nous décidons d'utiliser la même procédure dans le cas de l'oxydation par catalyse enzymatique du CG afin de maximiser les autres hydroxyacides d'intérêts: le CG oxydé et le CG hémiacétal.

2.3.3.3 Résultats et modélisation de la formation des HA d'intérêts avec le CG

Dans le cas de l'étude de l'oxydation du CG par le duo laccase/TEMPO, le choix du réacteur pour la réalisation des essais a été différent des expériences sur glycérol.

En effet, au cours des réactions en milieu ouvert sur glycérol, nous avons constaté une perte importante d'un des réactifs, le TEMPO. Après neuf heures de réaction, la coloration orange du milieu témoignant de la présence de ce réactif avait diminué. En parallèle, nous avons constaté la présence de vapeur orange dans la partie supérieure du réacteur ouvert en verre ou encore la coloration dans la même teinte des parties en silicone du montage permettant l'arrivée du dioxygène dans le milieu.

Par ailleurs, des essais de la réaction d'oxydation du glycérol avec le protocole CE6 en autoclave (réacteur hermétique) a permis d'aboutir à des rendements en acide glycérique et à une consommation du substrat plus élevés à l'état final. Nous avons donc conclu, qu'en milieu ouvert, avait lieu une perte de TEMPO (renforcée par le flux d'oxygène) diminuant les rendements même dans des conditions optimisées grâce au PEX. Nous avons donc décidé d'employer un autoclave en inox de 200 ml pour procéder aux réactions du PEX sur CG afin de se placer dans les meilleures conditions.

Dans le but de confirmer l'intérêt de l'utilisation d'un autoclave pour le PEX sur CG, des essais préalables avec ce réacteur hermétique ont confirmé une amélioration des rendements en milieu fermé par rapport au réacteur ouvert pour la fabrication du CG oxydé. Celui-ci représente entre 23 et 29% de l'aire relative du chromatogramme pour une réaction en milieu ouvert contre 36% environ en milieu fermé sans optimisation (Figure 131, Figure 132).

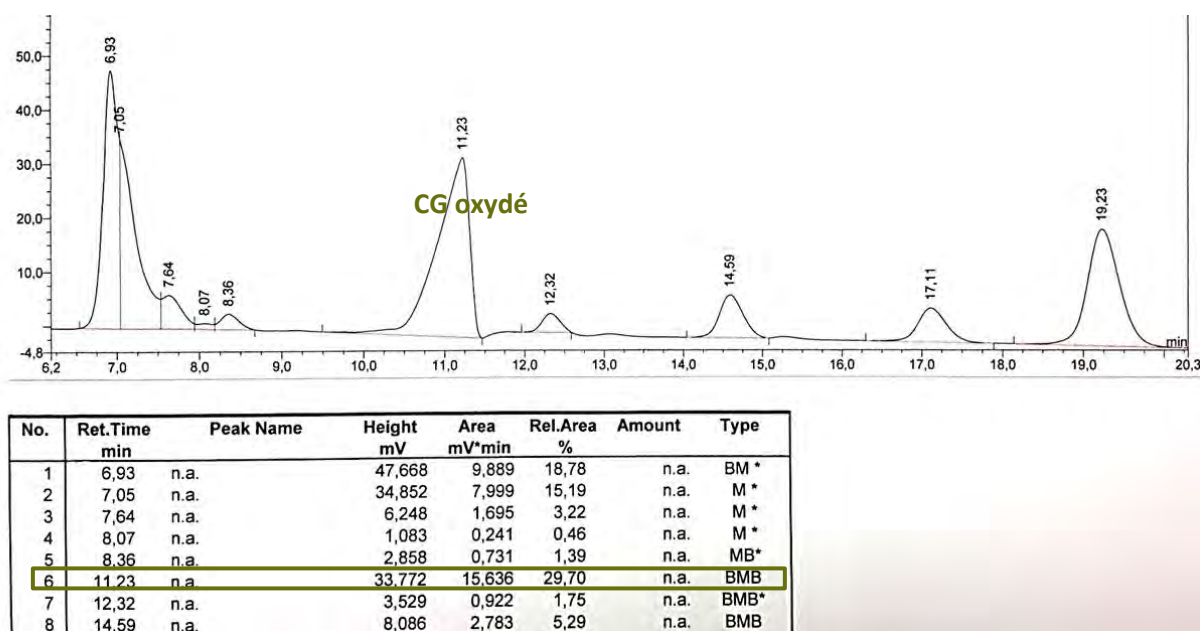
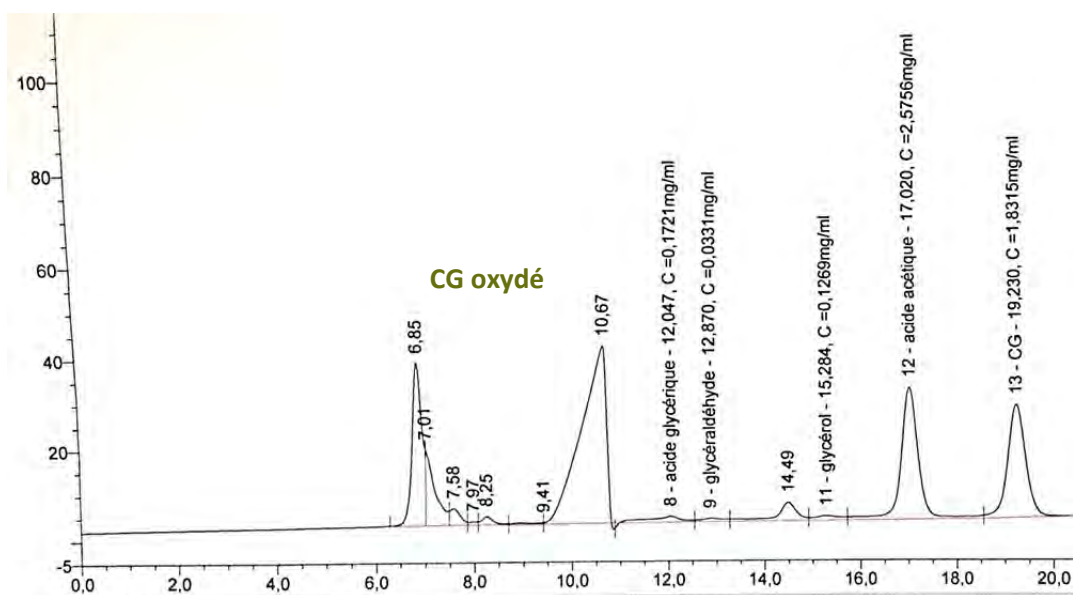


Figure 131 : Chromatogramme du mélange réactionnel de CE6 sur CG en réacteur ouvert



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mV	Area mV*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	6,85	n.a.	36,058	8,444	13,02	n.a.	BM *
2	7,01	n.a.	16,864	3,678	5,67	n.a.	M *
3	7,58	n.a.	3,709	0,916	1,41	n.a.	M *
4	7,97	n.a.	0,749	0,151	0,23	n.a.	M *
5	8,25	n.a.	1,832	0,511	0,79	n.a.	M *
6	9,41	n.a.	0,294	0,187	0,29	n.a.	M *
7	10,67	n.a.	39,459	23,372	36,04	n.a.	M *
8	12,05	acide glycérique	1,296	1,019	1,57	0,172	M *
9	12,87	glycéraldéhyde	0,759	0,414	0,64	0,033	M *

Figure 132 Chromatogramme du mélange réactionnel de CE6 sur CG dans un réacteur autoclave

L'ensemble du montage, les calculs et les matrices nécessaires à la réalisation des essais du PEX se trouvent dans la partie expérimentale p.271.

Nous rappelons que les molécules recherchées (CG oxydé, CG hémiacétal) ne sont pas quantifiables (les standards n'existent pas). Les résultats du PEX utilisés pour établir les interprétations ont donc été exprimés en pourcentage d'aire relatif.

Expériences	pic à 6,89	pic à 7,09	pic à 7,26	pic à 7,66	pic 8,32	pic CG oxydé	Pic acide glycérique	Pic glycéraldéhyde	Pic hémiacétal de CG	pic glycérol	Pic du CG restant
1	5,4	5,41	0	1,39	0,62	24,25	0,76	0	4,24	0,32	45,79
2	1,29	2,54	0	0,53	0,1	8,42	0,15	0,14	6,49	1,17	73,23
3	6	4,93	0	1,17	0,46	36,85	0	0,64	0,16	0,39	35,15
4	1,23	2,23	0	0,31	0,2	10,97	0,22	0,13	6,86	1,32	70,72
5	12,77	4,13	1,64	1,67	0,82	45,58	0,65	0	1,1	0,12	14,14
6	0,98	1,93	0	0,28	0,06	8,55	0,11	0,16	6,81	1,57	73,97
7	1,96	3,03	0	0,39	0,32	11,66	0	0,25	6,68	2,53	64,05
8	2,24	2,77	0	0,31	0,19	18,64	0,08	0,22	6,48	1,84	60,02
9	2,16	2,84	0	0,36	0,24	17,26	0,13	0,22	6,61	1,97	60,84
10	2,05	3,49	0	0,47	0,33	11,7	0	0,07	6,83	0,68	72,14
11	2,17	2,91	0	0,42	0,23	16,04	0,15	0,31	6,7	2,35	61,35
12	2,19	3,1	0	0,5	0,23	16,12	0,31	0,21	6,7	2,37	61,30
13	2,19	2,88	0	0,47	0,2	15,99	0,23	0,31	6,8	2,20	59,2
14	2,17	2,91	0	0,42	0,23	16,04	0,15	0,31	6,7	2,35	61,42
15	1,8	3,2	0	0,2	0,3	16,10	0,1	1,31	5,8	2,34	62,23
16	2,39	2,87	0	0,42	0,1	16,09	0,19	1,31	6,7	4,1	63,1

Tableau 33 : Pourcentages d'aires relatives obtenus pour des molécules présentes dans les milieux issus du PEX

2.3.3.3.1 Résultats obtenus avec CORICO

Voici les corrélations entre les variables d'entrée et celles de sortie que le logiciel CORICO renvoie grâce au Tableau 33 :

- a) SI pic 7,66 ALORS pic 6,89 $R = 0,918$
- b) SI pic 8,32 ALORS pic 6,89 $R = 0,921$
- c) SI pic 7,66 ALORS pic 8,32 $R = 0,92$
- d) SI pic CG oxydé ALORS pic 14,59 $R = - 0,937$
- e) SI pic CG ALORS pic CG oxydé $R = - 0,988$

Pour les corrélations « a) », « b) » et « c) », il est difficile de conclure car ces produits sont en partie issus de l'enzyme et sont, d'autre part, superposés entre eux. La proposition « e) » indique qu'il existe une très forte corrélation négative entre le CG et le CG oxydé, ce qui confirme l'hypothèse que le second est produit à partir du premier. D'autre part, avec « d) », nous constatons qu'il existe une corrélation négative entre le CG oxydé et le CG hémiacétal. Ainsi, nous pourrions supposer que l'un est produit à partir de l'autre mais cela ne se vérifie pas en observant les rendements. En effet, si c'était bien le cas, une augmentation des rendements de l'un induirait une diminution franche de la quantité de CG hémiacétal. Or, nous constatons qu'il y ait 18 ou 8% de CG oxydé formé (Tableau 33), nous obtenons dans les deux cas environ 6% de CG hémiacétal (Tableau 33). Leurs synthèses pourraient donc être en concurrence, avec l'une qui défavoriserait l'autre, mais leur lien n'est pas direct.

2.3.3.3.2 Interprétations avec un modèle polynômial

A partir des données brutes Tableau 33, nous avons essayé d'établir une équation de connaissance de type polynômiale, c'est-à-dire qui permet de prédire les quantités de produits formés les plus recherchés en fonction des quantités de réactifs placées au départ dans le réacteur.

Pour pouvoir réaliser une modélisation il est nécessaire de transformer les données en valeurs codées. Pour cela, toutes les données sont converties en valeurs codées avec X1 qui correspond à la quantité de substrat à l'état initial et X2 qui représente la quantité de TEMPO.

Nous choisirons comme réponse :

- Y = aire relative de CG oxydée formé ou,
- Y = aire relative de CG hémiacétal formé.

Nous essayons ensuite de décrire à l'aide du modèle polynômial (1) la réponse Y choisie, avec : $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12} X_1X_2$ (1)

2.3.3.3.2.1 Modélisation de la formation du CG oxydé

A l'aide de la réponse Y (ensemble des aires relatives représentant le CG oxydé Tableau 33) nous calculons les estimations des coefficients du polynôme Tableau 34 (avec la méthode des moindres carrés) :

	valeurs des coefficients
a0	15,41179437
a1	-11,7453786
a2	3,164485135
a12	-2,55314668
a11	5,53900434
a22	-0,35485275

Tableau 34 : Valeurs obtenues des coefficients du polynôme

Par conséquent, le modèle total polynômial (1) associé aux valeurs Tableau 34, décrit l'aire du pic de CG comme le résultat de :

$$Y = 15,41179437 - 11,7453786 X_1 + 3,164485135 X_2 - 2,55314668 X_1X_2 + 5,53900434 X_1^2 - 0,35485275 X_2^2 \quad (2)$$

A l'aide du test de Student et du calcul de l'incertitude des coefficients du polynôme (2), nous proposons le modèle final suivant (3) pour décrire la formation du CG oxydé (l'ensemble des calculs est disponible dans la partie expérimentale p.273) : $Y = 15,4118 - 11,745 X_1 + 3,16449 X_2 + 5,539 X_1^2$ (3)

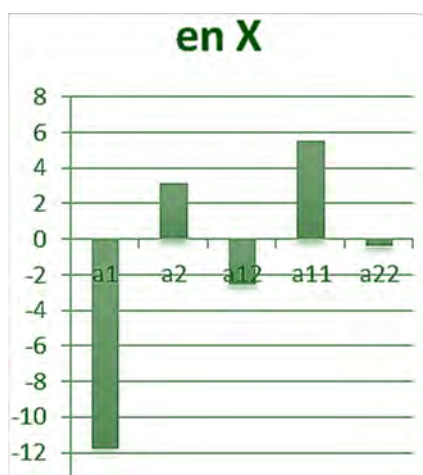


Figure 133 : Visualisation de l'importance des variables X1 et X2 en fonction de leurs coefficients

Nous pouvons ainsi conclure à l'aide du modèle final et de la Figure 133 que :

- Il n'y a pas d'effet collaboratif entre le TEMPO et le substrat (a_{12} non significatif).
- X_1 joue un rôle majeur dans la contribution à la formation du CG oxydé (a_1) de façon linéaire mais aussi au carré (a_{11}) car ses coefficients sont les plus importants (Figure 133). Cependant, X_2 joue également un rôle important d'un point de vue linéaire (puisque a_{22} est non significatif et faible de surcroît).

Nous obtenons la modélisation suivante :

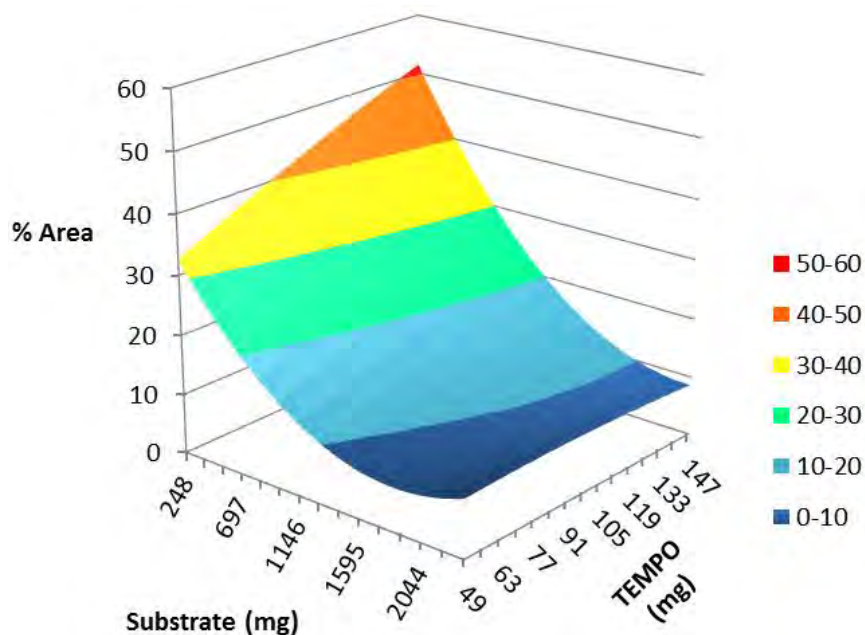


Figure 134 : Pourcentage d'aire relative de CG oxydé (« % Area ») en fonction de la quantité (mg) de TEMPO et de substrat (« Substrate » en mg) après modélisation

Nous constatons ainsi Figure 134 qu'une quantité importante de TEMPO, mais qu'une quantité faible de substrat, sont nécessaires à l'obtention du CG oxydé en forte proportion.

Grâce au modèle établi, nous pouvons trouver le couple optimal (Quantité de TEMPO, Quantité de substrat) à l'obtention d'une quantité maximale de CG oxydé. Nous résolvons donc l'équation (3) à l'aide du « Solveur » d'Excel® en travaillant dans les gammes de valeurs du PEX :

Solveur	Valeurs codées	Valeurs réelles
X1	-1,41025377	238
X2	1,431466996	148
Rendement en CG oxydé théorique (en pourcentage d'aire)	51,94866396	

Tableau 35 : Résolution sous solveur pour obtenir un rendement maximum en CG oxydé en aire relative

Le couple recherché en mg est donc (Quantité de TEMPO, Quantité de substrat) = (238 ; 148).

De la même façon, nous avons établi le modèle pour la formation du CG hémiacétal.

2.3.3.3.2 Amélioration des rendements en CG hémiacétal

Le modèle polynômial (1) décrivant la réponse « Y = pourcentage d'aire du CG hémiacétal » et les variables codées X1 et X2 sont identiques à ceux utilisés dans le cas de l'amélioration des rendements en CG oxydé.

Ainsi, les coefficients calculés pour le polynôme sont :

â	Valeurs codées
a0	6,553917152
a1	2,117173727
a2	-0,49884396
a12	1,111407648
a11	-1,49934156
a22	-0,19438398

Tableau 36 : Matrice â, des coefficients de l'équation Y(f(X₁,X₂))

Les calculs permettant d'affiner et de valider le polynôme (1) se trouvent en p.277. Ainsi, nous concluons après l'étude des incertitudes des coefficients du polynôme que le modèle décrivant la réponse Y est :

$$Y = 6,55392 + 2,11717 X_1 - 0,4988 X_2 + 1,11141 X_1 X_2 - 1,4993 X_1^2 \quad (2)$$

Le modèle (2) n'est cependant pas validé par le test de Fisher. Ce résultat doit donc simplement être considéré comme indication d'une tendance. Cela est probablement dû au fait que le mécanisme de formation de cette molécule n'est pas majoritairement influencé par la quantité de TEMPO et de substrat. Une étude de la bibliographie sur la formation de molécule avec deux fonctions hydroxyles en position géminale à partir d'un sucre a donc été effectuée. Le but est d'avoir une idée des mécanismes pouvant aboutir à la formation d'une telle structure.

Notre étude des travaux de Schoevaart & Kieboom, présente la formation de l'hémiacétal en C6 du D-glucose à partir du D-glucose et de la galactose oxydase Figure 135 (Schoevaart & Kieboom, 2002). Or cette enzyme est de la même famille que la laccase. Le carbonate de glycérol est, quant à lui, la forme protégée du glycérol et fait donc partie de la famille des sucres.

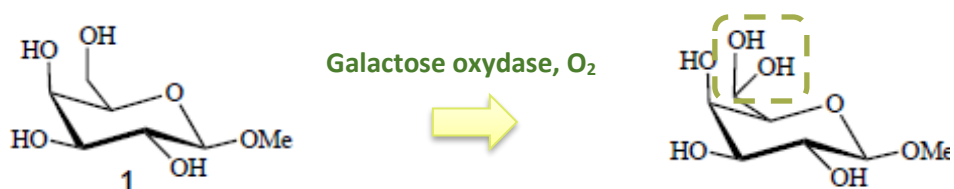


Figure 135 : Formation de l'hémiacétal du glucose à l'aide d'une oxydase (Schoevaart & Kieboom, 2002)

La formation de l'hémiacétal du CG pourrait donc avoir pour origine l'enzyme et non l'action directe du TEMPO. Cette hypothèse est renforcée par la faible influence de la quantité de substrat et de TEMPO sur l'apparition de cette espèce, comme l'indique le modèle établi non significatif. L'enzyme est donc probablement plus impliquée que les autres réactifs et il serait nécessaire de réaliser des essais complémentaires car il n'est pas possible de conclure en l'état. Il serait donc intéressant de recommencer le PEX mais en faisant davantage varier la quantité d'enzyme et celle de substrat.

En conclusion, nous proposons trois systèmes Figure 136 pour la formation de ce composé. En « 1 »), il s'agit de l'action directe de la laccase (à la manière de la galactose oxydase), en « 2 ») avec le système TEMPO/laccase, par oxydation et en « 3 ») par hydratation du CG oxydé formé.

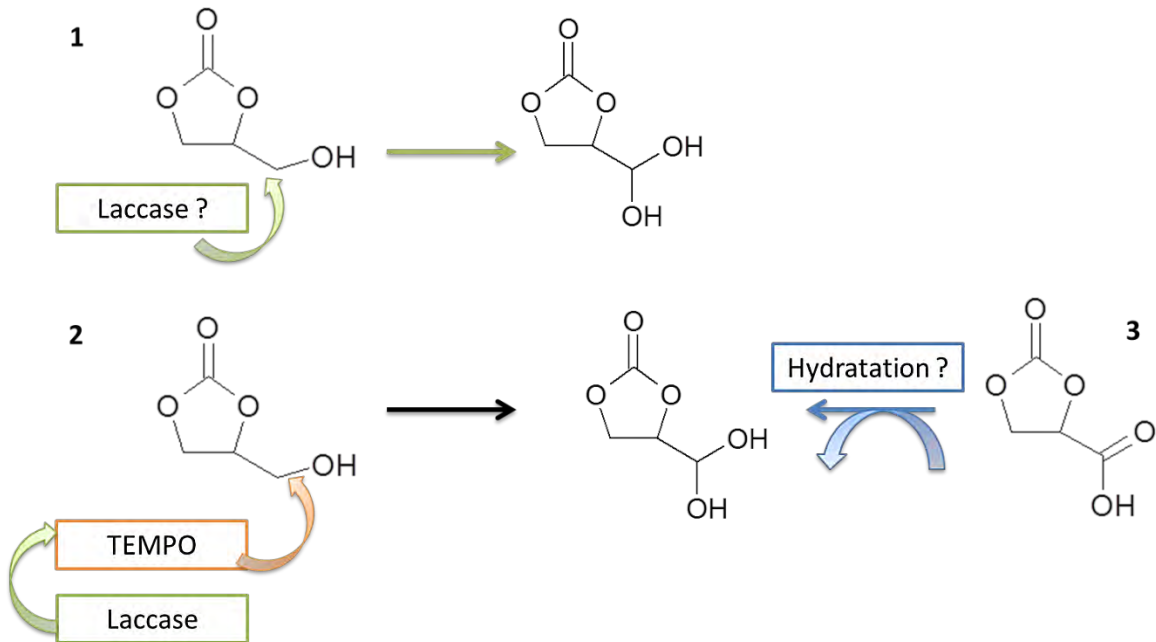


Figure 136 : Proposition de trois voies pour la fabrication du CG hémiacétal

En conclusion, nous pouvons retenir que les quantités de CG oxydé formé serait maximisées jusqu'à 52% du milieu réactionnel total avec 238 mg de TEMPO pour 148 mg de CG soit $1,6 \cdot 10^{-3}$ mol. L⁻¹ de CG pour $1,5 \cdot 10^{-3}$ mol. L⁻¹ de TEMPO, donc presque un rapport équimolaire. Le CG hémiacétal ne peut pas être décrit de façon satisfaisante avec les paramètres choisis (quantités de substrat et de TEMPO). Des essais supplémentaires seraient nécessaires pour conclure sur les mécanismes de sa formation.

Afin de se replacer dans le contexte économique et scientifique actuel, nous proposons de comparer les résultats de nos travaux pour la fabrication d'HA issus du glycérol et du CG avec la bibliographie.

2.3.3.4 Comparaison des travaux de thèse avec les protocoles actuels pour la fabrication des HA issus du CG et du glycérol

2.3.3.4.1 Comparaison dans le cas de la fabrication de l'acide glycérique par le duo laccase/TEMPO

Afin de comparer deux situations réelles, nous avons ici répertorié les sélectivités associées aux conditions de la publication de départ du protocole d'oxydation du glycérol CE6 avec celles du triplet le plus efficace testé au cours du PEX : (184 ; 98 ; 0,35). Les sélectivités obtenues ont été calculées en retirant les aires du glycérol et de l'acide acétique du milieu réactionnel car il ne s'agit pas de produits formés au cours de la réaction.

Molécule	Sélectivité avec CE6	Sélectivité avec les travaux de la thèse (triplet (184 ; 98 ; 0,35))
Acide glycérique	25%	38%
Glycéraldéhyde	20%	25%
Acide tartronique	13%	2%
Acide mésoxalique	20%	11 à 15% ⁽¹⁾
Autres	–	acide oxalique (11,5%)
Durée de réaction	24 heures	9 heures
Conversion du glycérol	70%	66%

Tableau 37 : Tableau comparatif des sélectivités entre le protocole de départ nommé CE6 et les quantités de produits formés à l'aide du PEX

La sélectivité pour l'acide mésoxalique (1) du Tableau 37 est une estimation basée sur l'aire relative du chromatogramme associé au mélange réactionnel total. Cette valeur n'a pas été obtenue à l'aide d'une courbe de calibration contrairement aux autres résultats. Nous constatons que les conditions du triplet testé permettent une meilleure sélectivité pour l'acide glycérique mais aussi pour le glycéraldéhyde (38 et 25% au lieu de 20 et 25% Tableau 37) en comparaison du protocole de départ (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). Cela peut s'expliquer par la quantité plus importante de TEMPO utilisée dans les travaux de la thèse (98 mg) par rapport à l'article d'origine (93 mg). En effet, Liebminger, Siebenhofer, et Guebitz indiquent qu'au-delà de $6 \cdot 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (soit 93 mg ici) de TEMPO, il y a une amélioration de la production d'acide glycérique (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). Cependant, cette augmentation peut aussi avoir pour cause l'ajout de dioxygène. La présence supplémentaire de ce réactif pourrait également expliquer l'apparition de l'acide oxalique, absent des milieux du protocole de départ (11,5% Tableau 37).

Cette comparaison a aussi été effectuée avec les protocoles de fabrication actuels du CG oxydé.

2.3.3.4.2 Comparaison dans le cas de la fabrication du CG oxydé avec les brevets actuels

La fabrication du CG oxydé a fait l'objet de nombreux travaux. Nous proposons de présenter les différences de notre protocole laccase/TEMPO avec ceux déjà existants.

Le Tableau 38 récapitule donc les conditions de fabrication du HA en fonction de trois voies qui se distinguent par le substrat de départ pour la synthèse (un acrylate dans la voie 1 ou du CG dans les voies 2 et 3) ou part le type de catalyse : purement chimique dans la voie 1 et 2 et chimio-enzymatique dans la voie 3. Nous comparons le nombre et le type de réactifs, et les conditions appliquées pour la réaction (Brevet n° EP 2951166 A1, 2014), (Brevet n° US20110313177A1, 2011), (Brevet n° WO2014118268A1, 2014), (Brevet n° US8742137, 2014)). Un tableau plus détaillé est présent en annexe p.322. En outre, certaines références correspondent aux versions des brevets dans d'autres pays que la France (CA2802266A1, WO2011157551 A1).

	Voie 1	Voie 2	Voie 3
Substrat de départ	Méthyl-époxy-propionate (acrylate), CO ₂ (deux étapes de réaction)	CG (une étape de réaction)	CG (une étape de réaction)
Pression appliquée	20 à 30 bars	Sous dioxygène (pression atmosphérique)	Air ambiant
Durée de réaction	4 à 6 jours	12 à 72 heures	9 heures
Traitement post-réactionnel	Purification	Filtration, résine	Filtration
Solvant(s)	CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ CN...	Acide acétique, acétone	Eau
Température	0 à 70°C	0° à T° ambiante	22°C
Réactifs employés	NaOCl, benzyl triméthylammonium chloride, ZnBr ₂ ...	TEMPO, Co(II), Cu(NO ₃) ₂ , Mn(NO ₃) ₂ , trichloroisocyanurique acide, acide chlorobenzoïque, N hydroxyphthalimide, ...	TEMPO, laccase
Rendements en CG oxydé	50%	15 à 97%	45% ET CG hémiacétal
Référence	EP 2 762 471 A1 et US20110313177A1, WO2011157551A1, WO2013092011A1, WO2014118268A1, EP2397474A1, US8742137, CA2802266A1	EP 2 762 471 A1, WO2013092011A1, EP2397474A1	Travaux de thèse

Tableau 38 : Comparaison des voies de synthèse du CG oxydé

Le CG oxydé peut être formé à partir d'époxyde, d'acrylate et de dioxyde de carbone comme substrats de départ dans la voie 1. Ces réactifs sont parfois décriés ainsi que l'utilisation de solvant comme le dichlorométhane ou des réactifs tel que benzyl triméthylammonium, classés toxiques. De la même façon la voie 2, qui fait appel de façon plus intéressante directement au CG, nécessite cependant toujours l'emploi d'acide trichloroisocyanurique classé toxique. En outre, les conditions de réactions sont parfois contraignantes et consommatrices en énergie comme dans le cas de la voie 1 (pression forte entre 20 et 30 bars) avec des durées de réaction importantes comme pour la voie 2 (jusqu'à 72 heures).

Les travaux de la thèse constituent donc une alternative prometteuse car le seul solvant employé est l'eau, les conditions de réactions sont similaires à celles du vivant (22°C), et ne requiert pas une mise en place complexe puisque la réaction se fait sous air ambiant sans enrichissement en dioxygène comme c'est le cas pour la voie 2.

Nous obtenons par ailleurs des rendements intéressants pour des conditions optimisées (45%) et notre protocole est plus direct puisque la voie 1 se déroule en deux étapes pour des rendements presque équivalents (50%). Enfin, même avec des valeurs plus faibles que la voie 2 qui forment du CG oxydé avec 97% de rendement maximum, celle-ci ne permet pas la formation d'une nouvelle molécule comme le CG hémicétal.

2.3.3.5 Conclusion

La réalisation des plans d'expériences a permis d'augmenter les quantités d'HA d'intérêt désirés. Nous avons ainsi augmenté de 8% la quantité d'acide glycérique dans le milieu réactionnel issu de l'oxydation du glycérol par le système catalytique du protocole CE6 avec le duo laccase/TEMPO sous dioxygène en réacteur ouvert. Cependant, afin encore d'accroître la proportion d'acide glycérique, il serait nécessaire de travailler en milieu fermé afin de conserver tous les réactifs dans le réacteur. Malgré cette observation, nous notons cependant une amélioration de la production d'HA d'intérêt par rapport aux conditions du protocole CE6 de départ. La sélectivité pour l'acide glycérique s'élève ainsi de 13% avec nos conditions.

Le PEX effectué sur l'oxydation du CG au cours du protocole CE6 par l'enzyme associée au TEMPO, nous a en outre permis d'amplifier la quantité de CG oxydé formée de 29% dans le milieu réactionnel, grâce à l'utilisation d'un réacteur fermé. La formation du second produit désiré n'a cependant pas abouti à des résultats concluants car la fabrication du CG hémicétal n'est pas principalement sous l'influence des variables « quantité de TEMPO » et « quantité d'enzyme ». Une étude sur l'influence de l'enzyme sur la formation de cette molécule serait donc souhaitable.

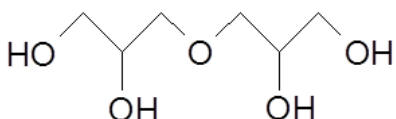
Ainsi, avec un même système catalytique laccase/TEMPO de CE6, il est possible d'oxyder deux substrats différents : le glycérol et le CG. La seule différence réside dans la proportion de dioxygène présente dans l'atmosphère au cours de la synthèse (enrichie en dioxygène pour le glycérol et simplement sous air pour le CG). Cet avantage est considérable par rapport à la bibliographie qui nécessite l'emploi d'une catalyse par substrat, parfois consommatrice de produits toxiques et d'énergie. Compte-tenu de cette observation, nous proposons d'essayer d'oxyder, grâce à la catalyse du protocole CE6, des substrats plus complexes que le CG et le glycérol.

2.4 Application du protocole CE6 en catalyse homogène pour l'oxydation du diglycérol et du triglycérol

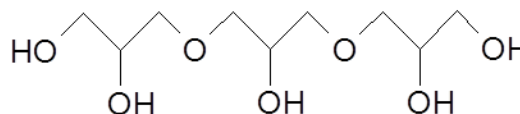
2.4.1.1 Les substrats

Afin de savoir si le protocole CE6 que nous proposons pour la synthèse d'acide glycérique et de CG oxydé fonctionne aussi pour des substrats plus complexes que le CG et le glycérol, nous proposons de réaliser des essais sur les substrats nommés di- et triglycérol. Les conditions expérimentales sont les mêmes que dans le cas de l'oxydation du glycérol, c'est-à-dire sous dioxygène, en réacteur ouvert en verre. Le traitement post-réactionnel est aussi identique.

Diglycérol C₆H₁₄O₅ : M = 166,173 g/mol



Triglycérol C₉H₂₀O₇ : M = 240 g/mol



Le triglycérol utilisé n'est pas pur. Il contient également du diglycérol et du tétraglycérol à hauteur de 20% maximum (indication fournisseur). De même, le diglycérol présente un certain pourcentage de triglycérol.

2.4.1.2 Résultats

En fin de réaction, nous réalisons Tableau 39 l'étude des pH des milieux réactionnels car la diminution de celui-ci est le reflet de la présence d'acide dans le milieu.

Substrat de la réaction	Diglycérol essai 1	Triglycérol essai 1	Témoin 1 avec le diglycérol	Témoin 2 avec le diglycérol	Témoin 1 avec le triglycérol	Témoin 1 avec le triglycérol	Diglycérol essai 2	Triglycérol essai 2
pH état initial	4,6	4,6	4,52	4,51	4,52	4,49	4,9	4,85
pH état final	4,28	4,27	4,52	4,54	4,59	4,59	4,22	4,23

Tableau 39 : Evolution du pH au cours des réactions (essai 1) et de leurs répétitions (essai 2)

Les réactions nommées « Témoin 1 » et « Témoin 2 » sont respectivement réalisées sans enzyme ou sans TEMPO. Nous constatons dans leur cas que, quel que soit le substrat considéré, le pH reste compris entre 4,52 et 4,59. Il n'y a donc pas de différence significative entre eux et les pH à l'état initial, indiquant donc qu'il n'y a pas eu formation d'acide. En revanche, nous remarquons que les réactions dans les conditions du protocole CE6 et sous dioxygène, aboutissent bien à une diminution importante du pH entre 0,33 et 0,68 unités de pH avec le diglycérol et le triglycérol. Ces résultats sont confirmés par les essais et leurs répétitions (« essai 1 » et « essai 2 »).

Les chromatogrammes des réactions obtenus en HPLC par détection RI confirment ces observations.

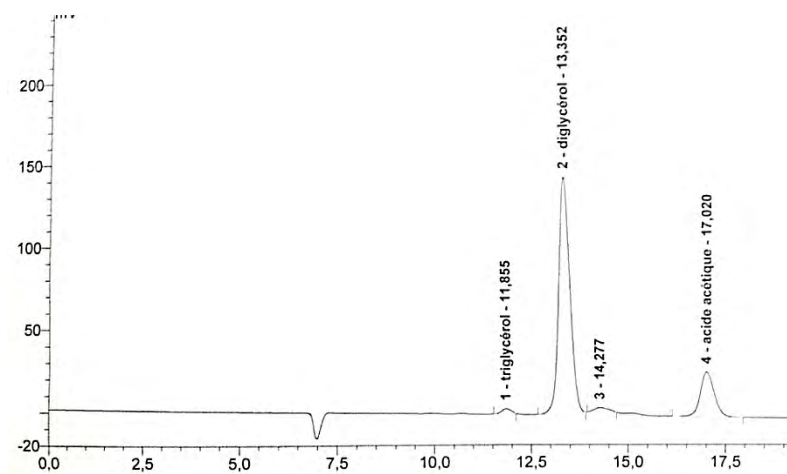


Figure 137 : Chromatogramme de la réaction témoin 1 (sans enzyme) sur le diglycérol et du diglycérol de départ du fabricant

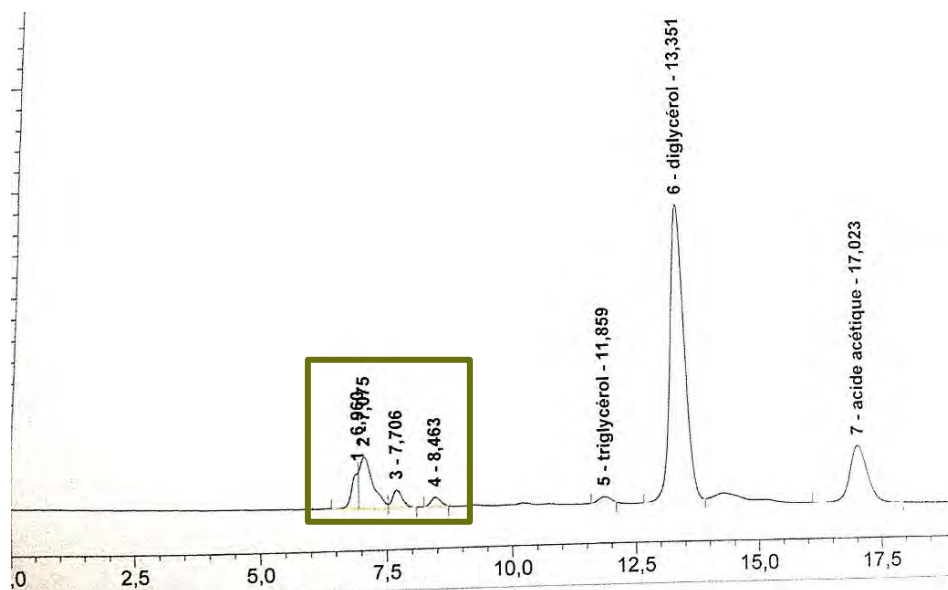


Figure 138 : Chromatogramme de la réaction témoin 2 sur diglycérol (sans TEMPO)

Le chromatogramme est identique au chromatogramme du diglycérol du fabricant, à l'exception de la présence de l'acide acétique, le tampon de la réaction (Figure 137). Du triglycérol est également présent. Il provient du réactif qui en contient dès le départ. En revanche, le témoin 2 sans TEMPO forme quelques produits supplémentaires présents en début de chromatogramme, dans lesquels nous reconnaissons les **résidus issus de l'enzyme**.

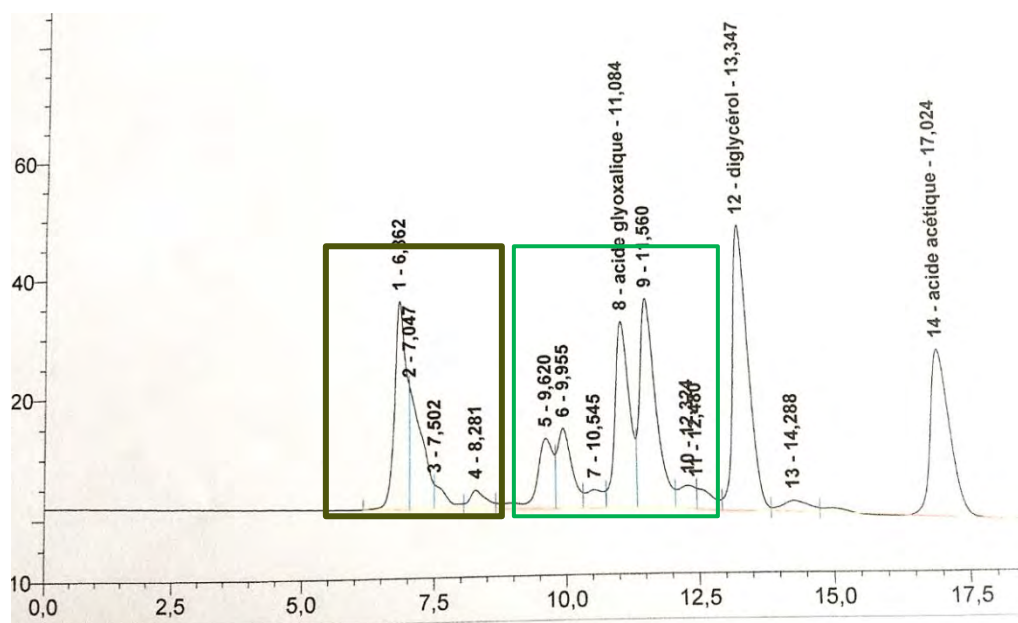


Figure 139 : Chromatogramme des essais sur diglycérol dans les conditions du protocole CE6 sous dioxygène

Si nous comparons les Figure 137 et Figure 138 des expériences témoins avec la Figure 139 qui présente le chromatogramme de la réaction du duo laccase/TEMPO sous dioxygène en présence de diglycérol, nous constatons bien l'apparition **de nouveaux produits**. Le pH a donc diminué (Tableau 39) et de nouvelles molécules sont détectées (Figure 139). Il y a donc eu réaction et formation d'acides carboxyliques.

Nous discernons également des produits identifiés comme ceux de **dégradation de l'enzyme** (Figure 139) de par leur temps de rétention (entre 6,8 et 8,2 minutes) et leur présence dans les mêmes proportions que le substrat soit du di ou du triglycérol. Ainsi, l'exception du diglycérol, du triglycérol, du tampon acétate de sodium et de l'acide glyoxylique, aucune autre molécule n'a été identifiée. Pour se faire, des analyses par LC-HRMS et par RMN après une extraction de fraction seraient nécessaires. Ces résultats sont identiques pour le triglycérol.

Enfin, des analyses complémentaires en HPIC permettent la mise en évidence d'oxalate et de tartronate.

Conditions des essais	Tartronate mg/ml	Oxalate mg/ml
Diglycérol avec dioxygène essai 1	183	230
Diglycérol avec dioxygène sans laccase (témoin)	0	0
Diglycérol avec dioxygène sans TEMPO (témoin)	0	0
Diglycérol avec dioxygène essai 2	153	211
Triglycérol avec dioxygène essai 1	13	120
Triglycérol avec dioxygène sans TEMPO (témoin)	0	0
Triglycérol avec dioxygène sans laccase (témoin)	0	0
Triglycérol avec dioxygène essai 2	19	110

Tableau 40 : Quantification et analyses des produits de de l'oxydation du di et triglycérol par HPIC

Le Tableau 40 nous permet de constater que l'oxydation du di- et du triglycérol donnent respectivement de 153 à 183 mg/ml puis 13 à 19 mg/ml d'oxalate et de 211 à 230 mg/ml puis 110 à 120 mg/ml de tartronate. Le diglycérol forme donc davantage de diacides que le triglycérol.

Le protocole CE6 avec le système laccase/TEMPO sous dioxygène est donc validé pour la formation d'acides carboxyliques pour des molécules de la famille du glycérol mais de poids moléculaires allant jusqu'à 240 g/mol.

En conclusion, le protocole CE6 avec le système laccase/TEMPO est apparu comme le candidat le plus satisfaisant parmi toutes les conditions testées. Celui-ci en effet permis la production d'acide glycérique à partir du glycérol sous dioxygène et sous air, ainsi que de CG oxydé et de CG hémiacétal, à partir du CG, sous air.

La combinaison de plusieurs techniques analytiques que sont la spectrométrie de masse, la chromatographie liquide et la RMN nous ont permis de déterminer avec certitudes les structures des produits formés et les rendements en chacun. Ces rendements ont été augmentés grâce à la mise en place d'un plan d'expérience permettant d'atteindre 20% d'acide glycérique et presque 50 % de CG oxydé.

L'objectif du prochain chapitre sera d'essayer de supprimer les molécules issues de la dégradation de l'enzyme présentent quel que soit le substrat, en travaillant en catalyse hétérogène. Le but est de maintenir l'intégrité des catalyseurs au cours des réactions en les immobilisant sur des supports.

Chapitre 3 : Utilisation de la catalyse hétérogène pour la préservation des catalyseurs

Le but de ce chapitre est de diminuer les pertes de réactifs constatées au cours des expériences du protocole CE6. Ainsi, nous essayerons de protéger le TEMPO et l'enzyme en les « convertissant » en catalyseur hétérogène afin de faciliter leur réutilisation, leur recyclage et leur retrait des milieux réactionnels. En outre, nous utiliserons cette nouvelle forme de l'enzyme pour le protocole CE6 sur glycérol, sur CG et sur di et triglycérol.

3.1 Fixation du TEMPO sur support

3.1.1 Etude préliminaire

Au cours des réactions d'oxydation en milieu ouvert nous avons constaté une perte importante du TEMPO, notamment par entrainement dû au flux de dioxygène dans le réacteur. Nous avons donc offert de rendre ce réactif moins volatil en le fixant sur support. Un certain nombre de publications relatent la fixation du TEMPO sur supports parmi lesquels nous trouvons les liquides ioniques (LI) comme par exemple le 1-méthyl-3-butylimidazolium, ou encore le 1-((4-diacetoxiodobenzyl)-3-méthyl imidazolium tetrafluoroborate) (Karimi & Badreh, 2011) (Karimi, Biglari, Clark, & Budarin, 2007). Cependant, ce ne sont pas les seuls puisque les auteurs Qian, Jin, Bao, & Zhang, Fall, Sene, Gaye, Gómez, & Fall, Wu, Ma, Ding, & Gao, et Lui, Ji, & Wei en présentent d'autres dans leurs travaux (Qian, Jin, Bao, & Zhang, 2006), (Fall, Sene, Gaye, Gómez, & Fall, 2010), (Wu, Ma, Ding, & Gao, 2005) et (Lui, Ji, & Wei, 2008).

Les polymères sont de même largement représentés avec une marque déposée comme FibreCat® (Gilhespy, Loka, & Baucherel, 2005). Le polyéthylène glycol est aussi un support fréquemment utilisé et dont la structure peut ensuite être ramifiée (Ferreira, Phillips, Rippon, & Tsang, 2005) (Ferreira, Phillips, Rippon, Tsang, & Hayes, 2004). Le polystyrène isocyanate (PS) ou polyuréthane (PU) sont aussi employés (Subhani, Beigi, & Eilbracht, 2008), du polystyrène azidométhyl (Gheorghe, Matsuno, & Reiser, 2006). Parmi les polymères, nous rencontrons également le PIPO constitué de TEMPO polymérisé à du Chimassorb 944® (Dijksman, Arends, & Sheldon, 2001). Nous notons également l'emploi de microsphères de polymères réticulés notées CPGMA, élaborées à partir de glycidyl méthacrylate comme monomère et de diméthacrylate comme réticulant (Yu, Gao, & Li, 2013). La fixation du catalyseur sur une électrode en utilisant du benzoyloxy-TEMPO et un polymère nommé PIMEATB est aussi une solution proposée (Kolodziej, et al., 2015).

La silice constitue par ailleurs un support intéressant et très régulier (Bolm & Fey, 1999). Celle-ci peut être aminopropylée comme indiqué par Heeres, Van Doren, Gotlieb, & Bleeker, mais nous la rencontrons aussi sous la forme plus classique de billes mésoporeuses comme dans le cas du support nommé SBA-15 présenté par Machado, et al, (Heeres, Van Doren, Gotlieb, & Bleeker, 1997) (Machado, et al., 2015). Enfin, la silice peut être employée sous forme du support nommé MCM 41, qui peut être additionné à des amides (Brunel, et al., 2001). La silice peut encore être utilisée sous forme de verre comme dans le cas du Trisoperl aminopropylé® (Fey, Fischer, Bachmann, Albert, & Bolm, 2001) ou être transformée en Aerosil 200 (Tsubokawa, Kimoto, & Endo, 1995). Celle-ci peut enfin servir comme enrobage autour des nanoparticules de Fe₃O₄ (Karimi & Farhangi, 2011) (Tucker-Schwartz & Garrell, 2010). Les auteurs Tsubokawa, Kimoto, & Endo proposent également une structure constituée d'une surface ultrafine en ferrite (NiO, ZnOFe, O) pour jouer le rôle de support attendu (Tsubokawa, Kimoto, & Endo, 1995). Nous avons enfin remarqué la présence de supports plus exotiques pour le TEMPO comme le norbonène modifié (Tanyeli & Gümüş, 2003).

3.1.2 Les réactions avec le TEMPO immobilisé

3.1.2.1 Démarche

Les protocoles de fixation du TEMPO étant assez lourds à mettre en place, nous avons souhaité savoir, avant de les tester, si la réaction se déroulerait correctement en présence de TEMPO immobilisé. Ce dernier n'étant plus mobile, nous pouvons nous interroger sur la viabilité du mécanisme avec la laccase, notamment dans le cas de substrat peu réactif comme le glycérol, le carbonate de glycérol mais aussi le diglycérol et le triglycérol dans une plus large mesure.

Nous avons donc testé des produits déjà présents dans le commerce, afin d'étudier la réactivité de la réaction du protocole CE6 avec le TEMPO immobilisé sous deux formes commerciales : Siliacat-TEMPO® et du TEMPO fixé sur du méthacrylate.

Le produit Siliacat-TEMPO® est un catalyseur dont la molécule active est fixée sur silice avec une charge en azote de $0,7 \cdot 10^{-3}$ moles de N/g (indication du fabricant). Nous le nommerons T2.

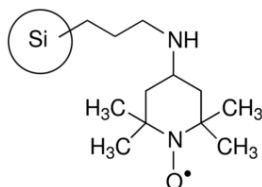


Figure 140 : Siliacat TEMPO® référence Sigma 709859

L'autre produit commercial est fait de TEMPO fixé sur support méthacrylate. Nous le nommons T1. Sa concentration est de $1,0 \cdot 10^{-3}$ mole de TEMPO/g de polymère.

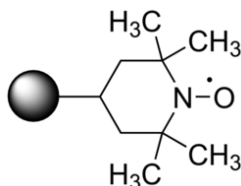


Figure 141 : T1, TEMPO sur méthacrylate schématisé (Sigma Aldrich)

Pour effectuer le protocole CE6, les autres conditions resteront inchangées. Seul le TEMPO sera utilisé sous ses formes supportées. Les calculs des quantités de catalyseur à introduire dans le milieu réactionnel sont présents dans la partie expérimentale p.282 ainsi que leur traitement post-réactionnel.

Les tests sont effectués sur glycérol, en présence de dioxygène car les molécules issues de l'oxydation de celui-ci sont davantage décrites. Ainsi, en cas d'apparition de pic nouveau par rapport aux conditions d'origine, une identification serait plus simple que dans le cas de l'oxydation du CG.

3.1.2.2 Résultats

L'analyse HPLC (Figure 142) nous permet de constater que les milieux réactionnels formés en présence de TEMPO immobilisé sont identiques quel que soit le support (T1 ou T2). En effet, les signaux sont parfaitement superposés.

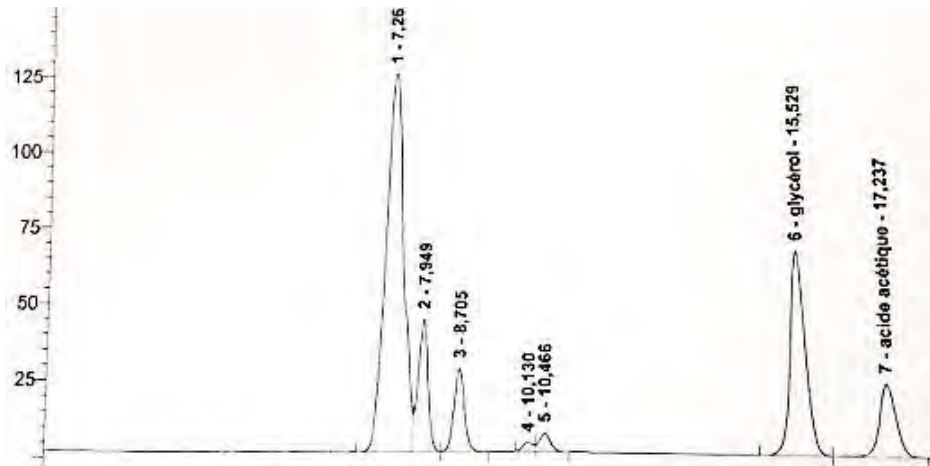


Figure 142 : Chromatogramme du milieu réactionnel issu de l'oxydation du glycérol par le protocole CE6 et effectué avec T1 ou T2

L'analyse HPLC Figure 143 révèle en outre que le pic du **produit recherché (acide glycérique) et de son précurseur (glycéraldéhyde)** ne sont pas présents que ce soit dans le cas du TEMPO fixé dans T1 ou dans T2. En effet, les pics caractéristiques de ces molécules (à 12 et 13 minutes) ne sont pas présents parmi les signaux correspondant au milieu réactionnel obtenu par emploi du TEMPO fixé sur support (en noir Figure 143). Seuls ceux identifiés comme des produits de dégradation de l'enzyme (entre 7,2 et 8,7 minutes) sont présents sur les chromatogrammes des réactions quelle que soit la forme de TEMPO utilisé. Nous constatons donc qu'il n'y a ni acide glycérique ni glycéraldéhyde dans le cas de l'utilisation du TEMPO immobilisé, mais du glycérol a pourtant été consommé.

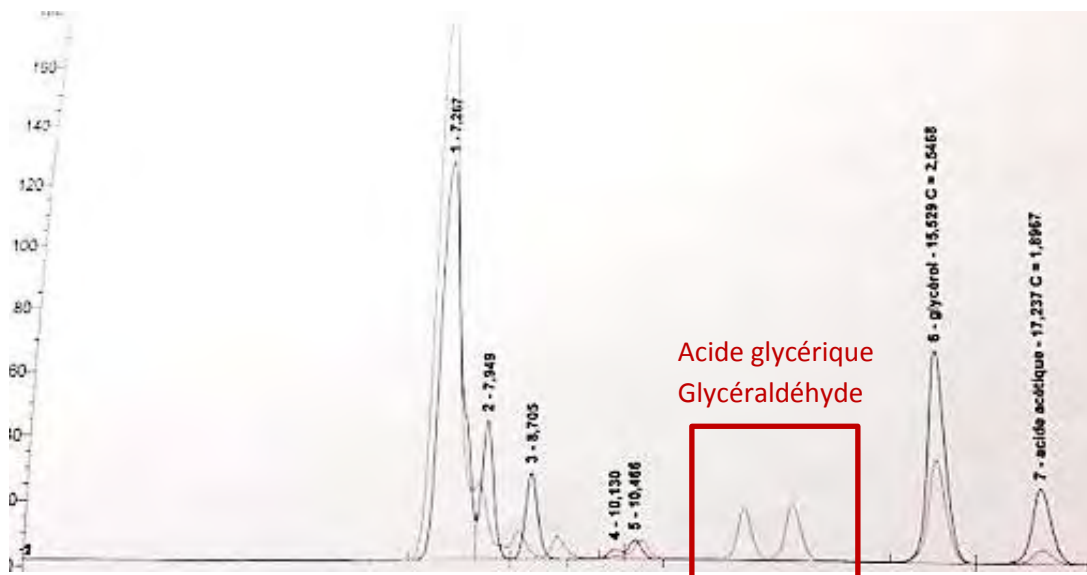


Figure 143 : Comparaison entre les milieux réactionnels issus de CE6 sur glycérol avec le **TEMPO libre (en rouge)** et celui avec le **TEMPO fixé sur support (en noir)**

Les analyses par HPIC révèlent d'autre part la présence d'acide tartronique et oxalique dans l'échantillon. Nous avons donc décidé d'ajouter au milieu réactionnel précédemment obtenu les standards de ces molécules. Si l'un des pics du chromatogramme de départ devient alors plus important après l'addition, cela permettra d'identifier la molécule. Nous observons effectivement l'augmentation de taille du pic à 7,9. Cependant, le résultat concernant l'acide tartronique n'était pas répétable.

Nous avons donc conclu que de l'acide oxalique était probablement présent dans le milieu, ce qui expliquerait la consommation de glycérol observée, mais il est difficile de trancher dans le cas des autres espèces. D'autres molécules ont cependant été produites mais elles ne se recoupent pas avec des standards connus de l'oxydation du glycérol. Seul le substrat et l'acide acétique (tampon) ont été identifiés. Des analyses par spectrométrie de masse ont également été réalisées. Nous avons détecté deux pics, l'un à 161 et l'autre à 299,1. Mais aucune molécule attendue issue du glycérol ne correspond à ces masses.

En conclusion, il semble qu'il n'y a pas d'interaction suffisante entre le TEMPO et la laccase pour permettre l'activation et la régénération du premier, pour oxyder le glycérol. L'hypothèse a été émise que l'absence d'interaction entre ces deux réactifs serait due au fait que la porosité du support du TEMPO est trop faible pour que l'enzyme puisse y pénétrer et réagir avec le TEMPO.

Une dernière stratégie a donc été expérimentée. Les résultats avec les produits T1 et T2 étant similaires, nous avons choisi d'approfondir uniquement le cas de l'utilisation de T2. En effet, les travaux de (Michaud Annie, 2007) décrivent ce produit comme un oxydant efficace pour la fabrication des acides carboxyliques à partir d'alcools. Ainsi, nous avons tenté d'augmenter la porosité du support T2 contenant le TEMPO afin de faciliter la pénétration des réactifs au travers de celui-ci et donc d'améliorer la réactivité. Ainsi, les 60 Å de porosité initiale de T2 ont été remplacés par l'entreprise Siliacat-TEMPO® afin d'obtenir une porosité maximale compatible avec une bonne résistance physique, soit 30 µm.

Le résultat obtenu sur glycérol en présence d'O₂ (Figure 144).

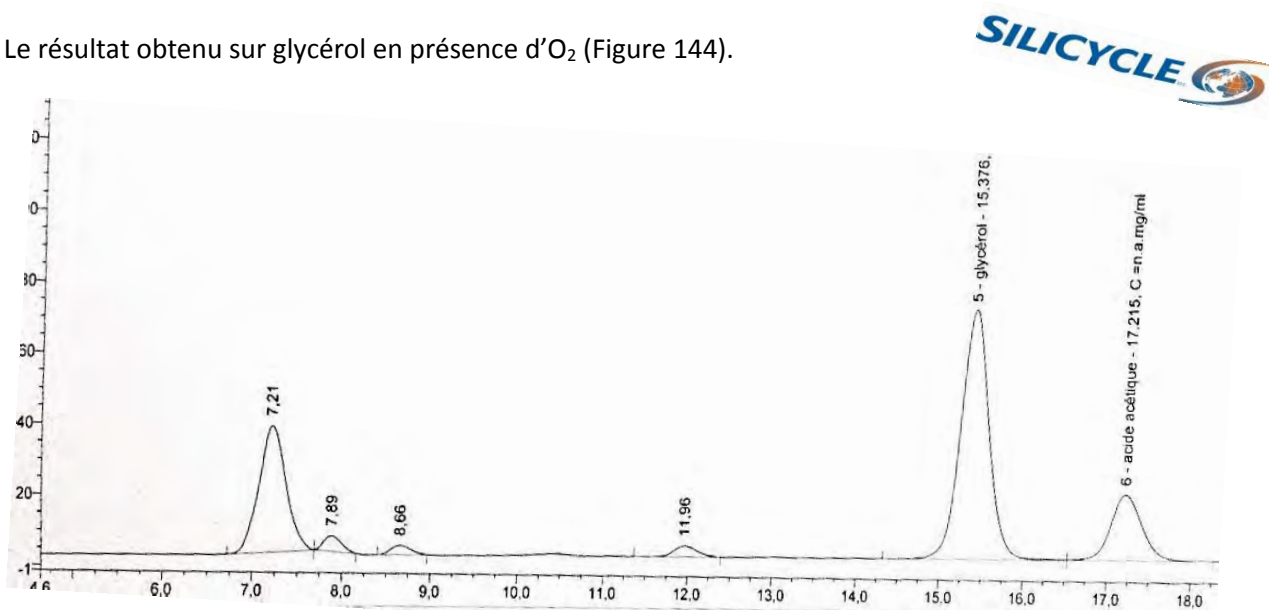


Figure 144 : Résultats de la réaction CE6 avec glycérol et TEMPO sur T2 avec une porosité forte

Nous ne constatons malheureusement pas d'amélioration. Il y a moins de produits de suroxydation ou dus à l'enzyme (pics à 7,21 min). En revanche, l'acide glycérique et le glycéraldéhyde désirés ne sont pas synthétisés. Seul un pic qui ne corrèle avec aucun standard à 11,96 minutes est formé et en faible proportion.

Compte-tenu de ces résultats, nous n'avons pas poursuivi la recherche avec le TEMPO fixé sur support. Nous avons cependant tenté de le fixer dans un gel d'alginate, mais le résultat fut infructueux puisque le réactif diffusait constamment depuis le gel vers le milieu de réaction, ce qui ne permettait pas de le conserver au cours du temps.

Nous avons donc choisi d'immobiliser la laccase sur support pour pouvoir la récupérer en fin de réaction, mais aussi afin de limiter les produits issus de sa dégradation lors de la réaction.

3.2 Immobilisation de la laccase sur support

3.2.1 Etude préliminaire

Plusieurs possibilités existent pour fixer la laccase sur support. Il est possible de faire appel à des perles de silice de porosité contrôlée et associées en chapelet noté CPC (Champagne & Ramsay, 2007). L'enzyme peut aussi être immobilisée sur trois types de lit poreux : le CPG qui est du verre poreux, l'APG qui est du verre poreux aminopropylé, du SBG correspondant à du verre silanisé non poreux et enfin, du GB, non poreux et non silanisé (Leonowicz, Sarkar, & Bollag, 1988).

La silice peut aussi être chimiquement modifiée avec des groupements imidazole afin de servir de base de fixation. La résine amberlite IRA-400, ou des support de type vitrocéramique ou encore de la montmorillonite modifiée avec de l'aminopropyltriéthoxysilane ou du glutaraldéhyde (Peralta-Zamora, et al., 2003) sont par ailleurs employés.

L'Amberlite est aussi proposée sous forme IR-120H (gel de type résine en polystyrène sulfoné échangeuse de cations, fortement acide sous la forme de billes sphériques) pour former des chapelets fonctionnalisés au glutaraldéhyde et sur lesquels les enzymes sont accrochées (Spinelli, Fatarella, Di Michele, & Pogni, 2013). L'Eupergit C 250 L[®] (résine acrylique activée avec des époxy) et des particules d'aluminium Al₂O₃ peuvent aussi servir de support (Guazzaroni, Bozzini, & Saladino, 2012).

Toujours dans l'idée de constituer des particules, des sphères en silice magnétiques mésoporeuses (MSS) qui contiennent de la magnétite, notées Fe₃O₄@MSS, sont utilisées (Zhu, Kaskel, Shi, Wage, & van Pée, 2007). Les enzymes y sont fixées par adsorption, grâce à des groupements NH₂, qui peuvent être additionnés sur le support.

La laccase peut encore être immobilisée sur une membrane de microfiltration en PVDF hydrophile avec des groupements hydrazines qui réagissent avec les groupements carbohydrates de l'enzyme (Jolival, Brenon, Caminade, Mougins, & Pontié, 2000).

Des polymères sont aussi utilisés comme support tel que le SBA-15. L'enzyme est alors fixée, soit par adsorption physique, soit par liaisons covalentes sur la structure préalablement fonctionnalisée avec de l'aminopropyl et aminobutyl. Ces derniers peuvent en plus être aminés avec de l'« aminobutyl-NH₂ », du « propyl-NH₂ » ou du « Phenyl-NH₂ » (Bautista, Morales, & Sanz, 2015). Le polyéthylène glycol peut aussi être un support (Brevet n° US 2008/0296231 A1, 2008).

Des polymères à base de sucres (K-carrageenan) peuvent enfin être employés avec ou sans acide itaconique, formant un réseau semi-interpénétrant où sont piégées les protéines (Makas, Kalkana, Aksoy, Altinok, & Hasirci, 2010). Toujours à base de molécules naturelles, trois supports de type hydrogel, à base de polyacrylamide avec de l'alginate, sont aussi mis en évidence (Yamak, Kalkan, Aksoy, Altinok, & Hasirci, 2009). Du glutaraldéhyde peut être utilisé avec ces structures pour fixer l'enzyme plus fortement (Noreen, Asgher, Hussain, & Iqbal, 2016). Cependant, l'immobilisation de la laccase peut se faire directement dans le gel sans ajout d'autres réactifs, comme dans le cas de la protéine de *Pleurotus ostreatus* (Palmieri, Giardina, & Sannia, 2005), *Trametes pubescens* (González, Ascencio, González-Williamson, & Osma, 2013) ou de *Streptomyces psammoticus* (Prema & Niladevi, 2008). Le produit nommé Eupergit C[®], polymère pareillement constitué d'alginate de cuivre ou de calcium est aussi un support intéressant qui emprisonne l'enzyme dans une structure dite « en boîte d'œufs » (Brandi, D'Annibale, Galli, & Gentili, 2006). L'alginate n'est pas le seul polysaccharide utilisable pour l'immobilisation car il peut être associé à du chitosane (Lu, Zhao, & Wang, 2007).

De façon beaucoup moins représentée, les liquides ioniques jouent aussi le rôle de support (Galai, P. de los Rios, Hernandez-Fernandez, Haj Kacem, & Tomas-Alonzo, 2015).

Un autre support, fréquemment employé, est l'argile (Mousty, Vieille, & Cosnier, 2007). Celle-ci, sous forme anionique avec une structure d'hydrotalcite, permet la formation d'HDL. Des limons, de la kaolinite comme présenté par Dodor, Hwang, & Ekunwe et Ruggiero, Sarkar, & Bollag ou encore de la montmorillonite de type 1 ou 2 sont aussi employés pour fixer les enzymes (Ruggiero, Sarkar, & Bollag, 1989) (Dodor, Hwang, & Ekunwe, 2004), (Ruggiero, Sarkar, & Bollag, 1989). En outre, de la montmorillonite-TiO₂ permet d'enrober les enzymes adsorbées (Wang, et al., 2013). Enfin, la précipitation des protéines et leur réticulation permet l'obtention d'un support nommé CLEAs[®] (Matijošytė, Arends, de Vries, & Sheldon, 2010) (Sheldon R. , 2007)

Enfin, l'encapsulation constitue un mode de fixation de la laccase. Cette dernière est fixée sur des billes d'aluminium ou enfermée dans des microcapsules. Dans les deux cas, la laccase est protégée par une couche de poly-électrolytes de charges opposées : cette méthode se nomme encapsulation LbL (« layer-by-layer ») (Crestini, Perazzini, & Saladino, 2010).

En définitive, parmi tous ces protocoles de fixation, seuls ceux à base de polysaccharides naturels (carraghénane, alginate) ont été retenus. En effet, les protocoles de fixation utilisant les argiles requièrent une première préparation avec de l'acide nitrique concentré. Cette étape présente de nombreux dangers et des conditions de sécurité difficiles à mettre en œuvre (hotte à aspiration puissante par exemple). Pour les autres réactions, les étapes de fonctionnalisation afin de fixer les enzymes demandent l'ajout indispensable de glutaraldéhyde, produit classé toxique (T) et CMR. Son application n'est donc pas compatible avec notre approche expérimentale.

Nous testerons donc un unique support d'immobilisation pour l'enzyme : l'alginate.

3.2.2 Choix de l'alginate

L'alginate est constitué de polysaccharides et de polyélectrolytes naturels capables de former un hydrogel stable. En effet, celui-ci est un polymère de deux monomères de base : l'acide D-mannuronique (**1**) et l'acide L-guluronique (**2**) associés par des liaisons $\beta(1-4)$ (*) (Figure 145). La proportion de chaque acide uronique varie avec la source d'alginate et la modification de leur proportion modifie leurs propriétés physico-chimiques (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008).

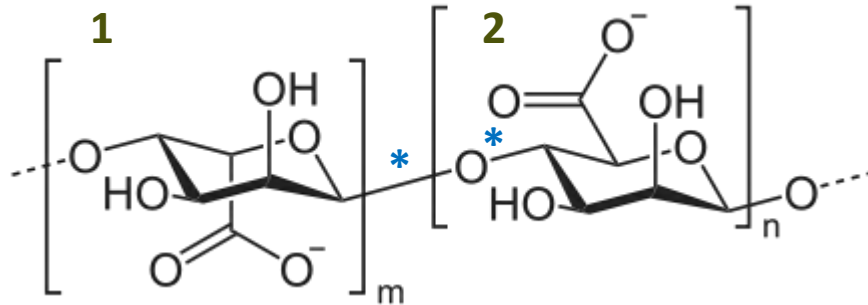


Figure 145 : Chaîne de polyosides constituant l'alginate

Il existe plusieurs possibilités pour provoquer la gélification du polyoside d'alginate. La méthode la plus employée est l'ajout d'un cation di ou trivalent. Celui-ci va alors se complexer avec les groupements carboxylates de l'alginate pour former un ensemble contenant 1 à 2% d'hydrogel pour 98 à 99 % d'eau. La structure du gel est dite en « boîte d'œufs » car chaque ion divalent est coordonné avec un groupement carboxylate ou hydroxy qui sont présents sur quatres groupements adjacents provenant eux-mêmes de deux chaînes contigües de polymère (Figure 146) (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008).

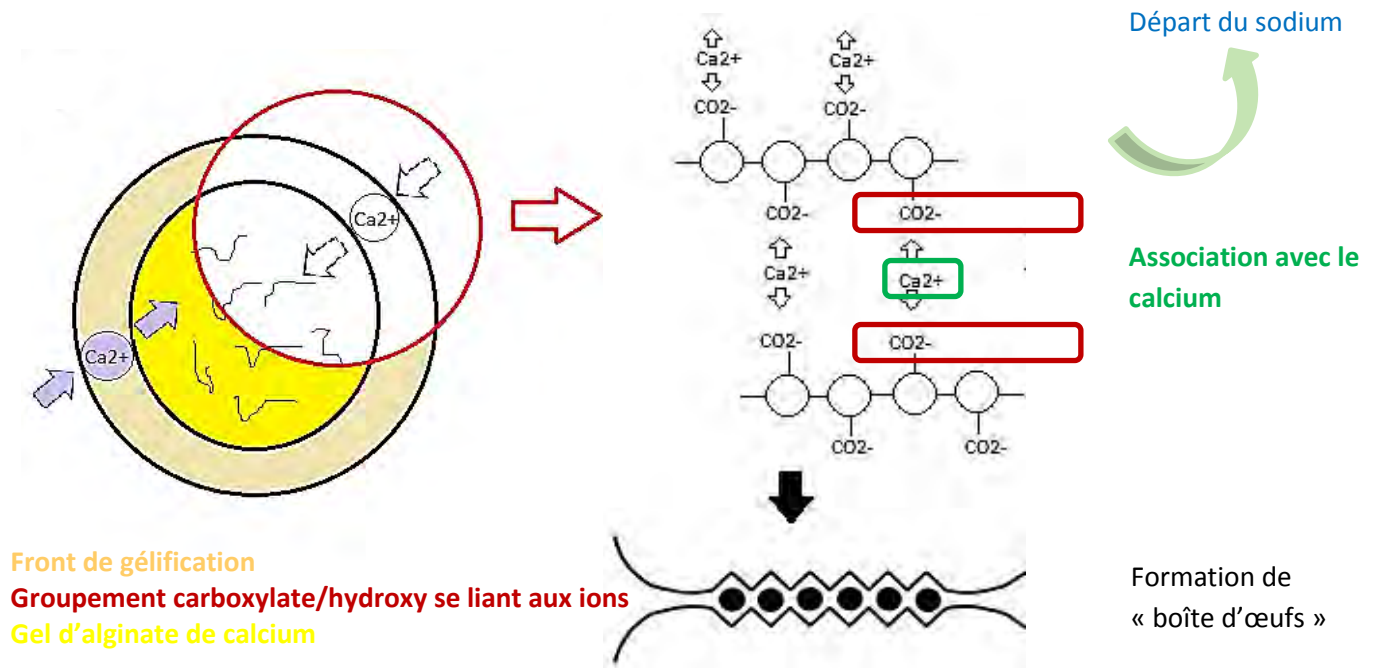


Figure 146 : Gélification de l'alginate (exemple du calcium) (Bertherat-Dentone & Nova, s.d.)

Lorsque nous souhaitons fabriquer, par exemple des billes de gel, le phénomène se déroule comme suit : une solution d'alginate de sodium tombe au goutte à goutte dans un bain contenant un cation de gélification. Dès le contact entre la goutte et le bain, la gélification se produit sur toute la surface de la bille qui va alors flotter en surface. Au bout d'un certain temps, les billes vont plonger au fond du récipient car leur densité augmente. C'est la période de maturation. Au cours de celle-ci, la réticulation du gel s'établit depuis la surface vers le cœur de la bille, simultanément avec une perte d'eau de celle-ci : c'est la synérèse. Ce phénomène se produit par la complexation des groupements carboxylates du gel avec le cation, diminuant ainsi le volume de la sphère. Au bout d'un certain temps ce phénomène s'arrête et la masse de la bille devient stable. Cette durée dépend du type d'alginate et des concentrations en cations gélifiants (Mestdagh & Velings, 1995).

Ainsi, pour provoquer la gélification, il faut ajouter aux sucres un cation « gélifiant » ou jouer sur le pH de la solution dans lesquelles les gouttes de liquides tombent (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008). Cependant, nous n'avons pas utilisé cette dernière option car le protocole final nécessitant le gel induit des changements dans le pH ce qui pourraient perturber le système, d'autant plus que les mécanismes de gélification par cette méthode sont mal connus, ce qui n'est pas intéressant pour la reproductibilité des essais.

D'autre part, certains auteurs proposent l'utilisation de gel type carraghénane (Makas, Kalkana, Aksoy, Altinok, & Hasirci, 2010). Cependant, nous ne l'avons pas retenu car ce dernier s'écrase sur lui-même lors du séchage nécessaire à l'observation de son organisation en microscopie (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008). En effet, la transformation de l'hydrogel en aérogel, associée au phénomène de synérèse, est indispensable afin d'étudier l'évolution du gel au cours des réactions selon le protocole enzymatique CE6.

Enfin, le chitosane a été éliminé des candidats pour la raison précédemment évoquée, mais aussi parce qu'il contient des groupements amines qui ne sont pas souhaités en vue d'applications futures. L'alginate, en revanche, est le polymère qui de par son agencement en « boîte d'œufs » résiste le mieux à l'écrasement (car cette organisation naturelle rigidifie les agrégats de chaîne polymériques (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008)). Ce dernier est donc le meilleur candidat pour nos travaux.

3.2.3 Choix des conditions de fabrication

Le protocole de fixation est celui indiqué par les travaux de Brandi, D'Annibale, Galli, & Gentili, où les billes sont fabriquées à l'aide de cuivre ou de calcium (Brandi, D'Annibale, Galli, & Gentili, 2006). Nous avons choisi le cuivre comme agent de précipitation. En effet, les protéines ont des facilités à interagir avec le calcium et c'est un métal qui chélate une large gamme d'espèces chimiques, notamment les acides carboxyliques. Ainsi, afin de ne prendre aucun risque de perturber le milieu réactionnel, nous avons décidé de nous diriger vers l'alginate de cuivre. En effet, l'utilisation de cuivre est intéressante car, contrairement aux autres ions, il est le seul à ne pas induire d'effet inhibiteur sur l'activité des phénol-oxydases dont la laccase est proche (Palmieri, et al., 1994). Par ailleurs, la laccase est moins immobilisée en alginate de cuivre que dans les autres gels du fait de la porosité importante de celui-ci ce qui offre plus de flexibilité à l'enzyme pour se déformer et donc être active (Palmieri, et al., 1994).

Enfin, s'il venait à rester du cuivre dans le milieu réactionnel et que celui-ci était dosé en vue d'une application directe en champs (application immédiate après synthèse sans autre traitement), cela pourrait représenter un avantage car le cuivre fait partie des oligoéléments dont les cultures sont carencées. Nous avons donc souhaité, dans une optique d'application directe, privilégier ce métal.

D'autre part, l'alginate de cuivre permet d'obtenir des gels sphériques (ce que nous recherchons), mais ce cation présente aussi l'avantage d'avoir une meilleure affinité pour l'alginate (Ouwexa, Velingsa, Mestdagha, & Axelosb, 1998). Par conséquent, il n'est pas nécessaire de saturer le milieu en cuivre pour induire la gélification. Le cuivre fournit en outre une grande élasticité au gel résultant (meilleur que ceux élaborés avec les ions Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ou Mn^{2+}). Cette capacité est dépendante du nombre de point de réticulation du réseau d'alginate mais n'est pas fonction de la concentration en cuivre. Il n'est pas nécessaire d'incorporer une dose élevée de cation. Cette élasticité est en outre importante car elle permet de contrebalancer la tension appliquée au gel au moment de la synérèse, et donc de le conserver en bon état. D'autre part, le cuivre présente l'avantage de pouvoir entrer en compétition, dans le gel, avec le sodium présent dans la composition de la solution d'alginate de sodium utilisée pour élaborer le support. Ainsi, dès que la concentration en cuivre est supérieure à $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, la solution de gélification contient assez de cuivre pour gélifier. Les autres cations ne sont pas aussi puissants et entrent moins en concurrence avec le sodium, ce qui peut provoquer des malformations du gel (Ouwexa, Velingsa, Mestdagha, & Axelosb, 1998).

Nous avons donc fait le choix de tester le protocole de fixation utilisé dans le cas de la laccase de *Trametes villosa* dans de l'alginate de cuivre, avec la laccase de *Trametes Versicolor*, ce polyoside assurant ainsi une encapsulation de l'enzyme au sein ses structures dites en « boîte à œufs » (Brandi, D'Annibale, Galli, & Gentili, 2006).

3.2.4 Fabrication des billes d'alginate

Le protocole utilisé est inspiré de celui de (Brandi, D'Annibale, Galli, & Gentili, 2006). Il se trouve en intégralité dans la partie expérimentale p.283.

Nous remarquons que la solution de sulfate de cuivre permettant la gélification des gels a pris une couleur légèrement jaune après utilisation pour la formation des billes. Cela indique que les enzymes intégrées à la solution d'alginate ont probablement diffusé depuis la bille vers l'extérieur (donc dans la solution de sulfate de cuivre). Il en est de même pour la solution de renforcement dans laquelle les billes, une fois formées, ont reposé toute la nuit. Nous essayerons par la suite d'estimer la quantité d'enzymes perdue.

Les calculs d'activité des enzymes et de leur proportion dans les billes d'alginate les contenant, indiquent qu'il faut 17 billes pour satisfaire les 20 unités catalytiques nécessaire à la réaction d'oxydation du duo laccase/TEMPO. Des billes sans enzymes sont également fabriquées selon le même processus à l'exception de l'ajout de protéines. Elles seront dites « vides » (Figure 147).



Figure 147 : Billes d'alginate avec enzymes (à gauche) et billes d'alginate vides (à droite)

La différence de forme des billes s'explique par la dissemblance de la viscosité des solutions d'alginate utilisées. Dans le cas où des enzymes sont ajoutées, la solution étant très visqueuse, le liquide est extrudé lentement et donne donc naissance à une goutte déformée qui va rester légèrement accrochée en sortie d'aiguille.

3.2.5 Analyses des billes d'alginate formées

Les billes d'alginate ont fait l'objet de plusieurs analyses afin d'essayer de déterminer leur teneur en protéines (électrophorèse, méthode de Kjeldhal), mais aussi leur structure interne et externe pour visualiser quelle organisation et quels dommages elles auraient subi au cours des réactions (microscopie électronique à balayage (MEB)). Les conditions expérimentales complémentaires sont fournies p.285.

3.2.5.1 Observations des billes d'alginate au Microscope Electronique à Balayage



3.2.5.1.1 Préparation des billes

Afin de pouvoir étudier les billes au MEB (MEB FEG FEI Quanta 250), sous vide, il est nécessaire de préparer les échantillons avant toutes observations. En effet, l'alginate contenant une forte proportion d'eau, celle-ci va s'évaporer en présence de vide et altérer la structure de l'hydrogel (effondrement, écrasement). Les billes ont donc été préalablement plongées dans différents bains de concentrations croissantes en éthanol afin d'échanger l'eau du gel par l'alcool, puis elles ont été placées en dioxyde de carbone supercritique afin de retirer tout le solvant.

Nous obtenons ainsi des aérogels. Cette procédure est décrite par Di Renzo, et al. (Di Renzo, et al., 2005)

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le CMEAB (plateforme GenoToul Imagerie) de Toulouse et en particulier avec M. Payre.

Nous avons observé les échantillons suivants :

- Des billes dites « neuves » c'est-à-dire n'ayant pas réagi et contenant des enzymes
- Des billes dites « usagées » c'est-à-dire ayant réagi et contenant des enzymes
- Des billes neuves vides («vides » signifie sans enzyme)
- Des billes vides ayant réagi dans les conditions du protocole de CE6

Les observations ont été faites sur la surface des billes mais aussi à l'intérieur après avoir découpé l'échantillon.

3.2.5.1.2 Résultats en images

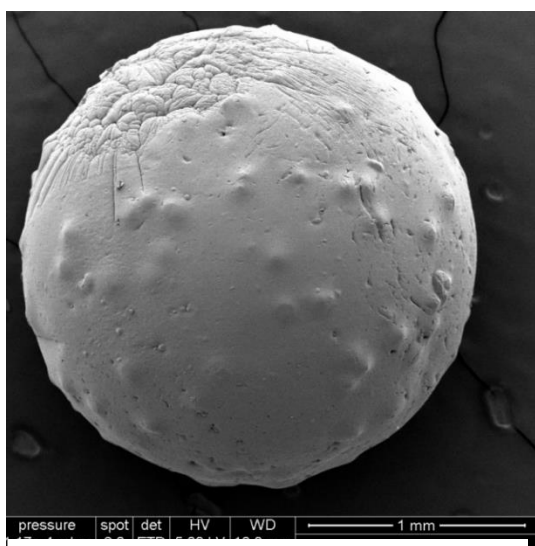


Figure 149 : Bille vide et neuve x 46



Figure 148 : Bille neuve entière avec enzyme x 38

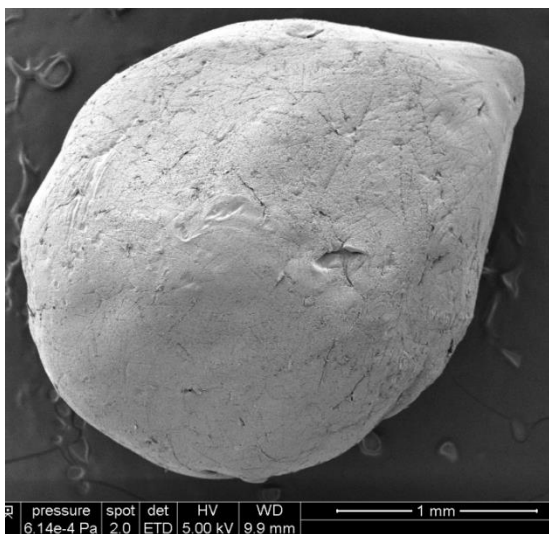


Figure 150 : Bille avec enzyme usagée x 41



Figure 151 : Bille vide usagée x 69

Si nous observons les billes de l'extérieur (Figure 149, Figure 148, Figure 150 et Figure 151), nous constatons que :

- La bille sans enzyme est sphérique et régulière à l'exception de quelques protubérances,
- Les billes avec enzymes sont en forme de goutte,
- La bille usagée vide présente plus d'altération que la bille usagée avec enzyme,
- Les billes usagées présentent des sillons et des craquelures après réaction,
- Les billes vides usagées sont plus petites (50%) que les billes vides neuves.

Nous pouvons donc conclure que la forme des billes en goutte ou en sphère est influencée par la viscosité du mélange. En effet, plus le mélange contient d'enzymes (et est donc visqueux) plus la bille est déformée. Cela semble expliquer l'étirement de l'hydrogel d'alginate d'un des côtés de la bille (Figure 148).

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons utilisé un gel d'alginate dont les unités polymériques sont d'une masse molaire plus faible et donc moins visqueux auquel nous avons ajouté les enzymes. La bille formée est la suivante :

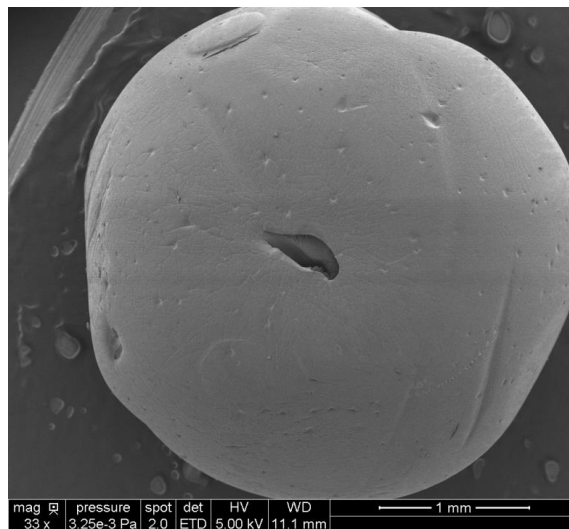


Figure 152 : Bille d'alginate de masse moléculaire faible avec enzyme et neuve

Nous constatons qu'elle est bien sphérique contrairement à celles avec alginate alimentaire, ce qui confirme bien que la taille des unités de base de l'hydrogel joue un rôle prépondérant dans la forme des billes.

D'autre part, les marques externes de dégradation sur les billes vides ou avec enzymes indiquent que dans le milieu de réaction, le gel d'alginate subit une altération. Cependant, cette détérioration semble plus importante dans le cas d'une bille sans enzyme. Nous pouvons relier cela à la différence de viscosité et donc de solidité du gel d'alginate de départ. En présence de laccase, le gel aggloméré bénéficie probablement d'un gain de résistance apporté par les protéines, tandis que le gel formé sans celle-ci n'a que sa structure propre pour résister aux frottements. Les protéines du gel semblent donc avoir la capacité de conférer un avantage en terme de recyclage.

En zoomant sur la surface de la bille, nous obtenons les images ci-dessous :

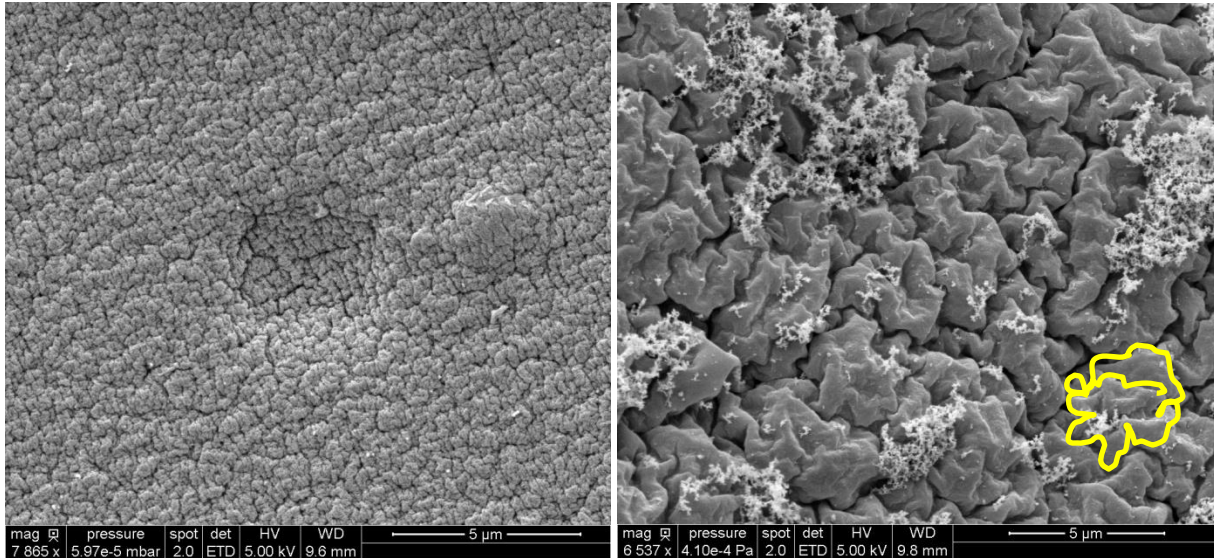


Figure 153 : Surface d'une bille neuve et vide (x 7865) à gauche et surface d'une bille neuve avec enzymes (x6537) à droite

Nous constatons que l'aspect externe de nos billes correspond bien à celui d'un alginate au cuivre comme indiqué dans les travaux de Di Renzo et al. (figure 4c) (Di Renzo, et al., 2005). C'est-à-dire que l'aérogel présente une surface irrégulière typique de « pomme flétrie » et, comme montré par la suite, une peau externe dense. Les auteurs Ouwerxa, Velingsa, Mestdagha, & Axelosb indiquent d'ailleurs que les gels à base de cuivre se complexent moins uniformément qu'avec du calcium (par exemple) ce qui déforme la bille au moment de son séchage d'où cet aspect ridé (Ouwerxa, Velingsa, Mestdagha, & Axelosb, 1998). D'autre part, la Figure 153 nous permet de constater que les surfaces des billes, avec ou sans enzyme, sont similaires. La seule différence réside dans la taille des structures (**contour en jaune**). Il semblerait que ce soit principalement le type d'alginate qui influence l'apparence de la surface. En effet, si nous comparons l'allure des surfaces Figure 153 et Figure 154, la seconde présente un aspect plus lisse (cette aspect est le même avec un grossissement de 10 000). Or cette dernière est obtenue avec un alginate de plus petite masse molaire.

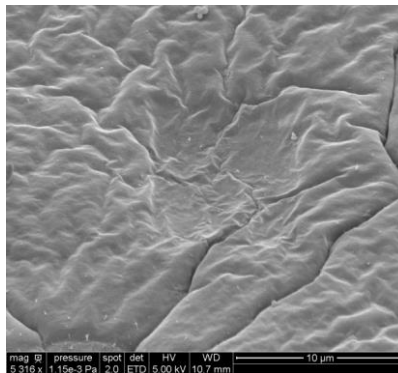


Figure 154 : Surface d'une bille d'alginate de masse molaire faible avec enzymes (x 5316)

Lorsque la surface est altérée, nous obtenons :

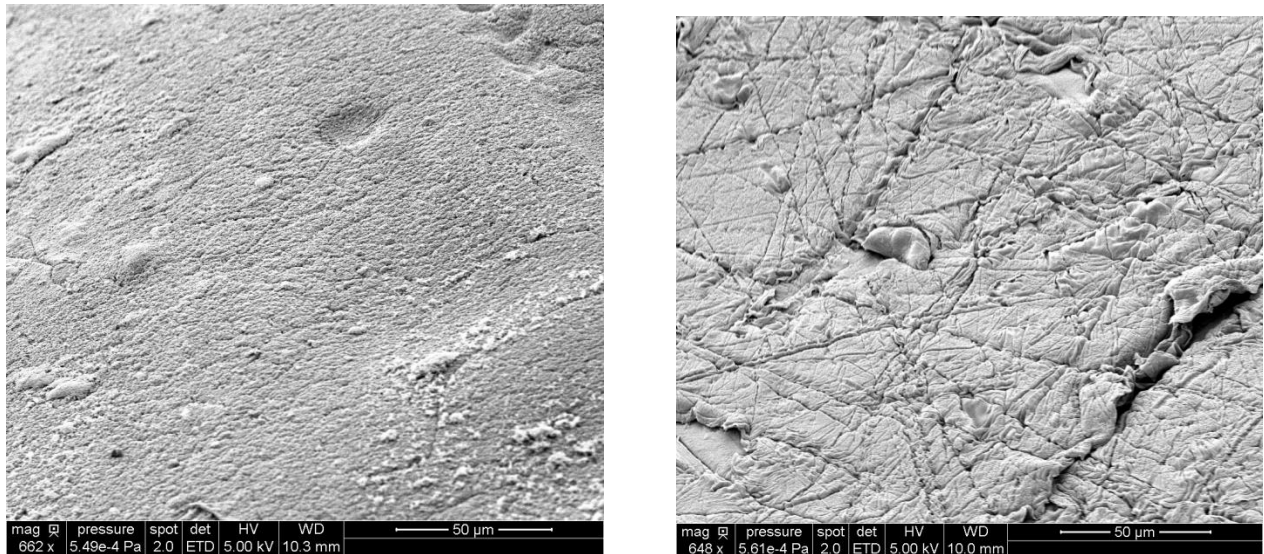


Figure 155 : Surface d'une bille neuve avec enzyme à gauche (x 662) et d'une bille usagée avec enzyme à droite (x 648)

A l'aide de la Figure 155 nous remarquons que la surface de la bille usagée est beaucoup plus altérée (sillons importants) que la bille neuve. La réaction, et probablement l'agitation, sont à l'origine de ces marques. Après réaction, et plus en profondeur, l'allure des surfaces est présentée Figure 156 :

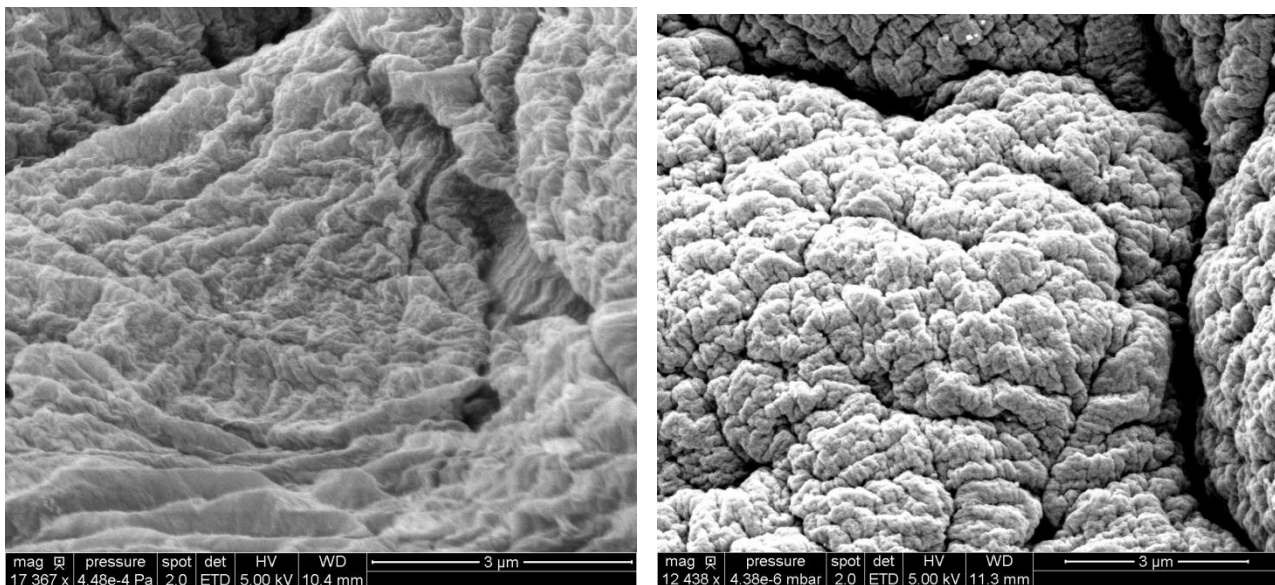


Figure 156 : A gauche la surface d'une bille usagée avec enzyme (x 17 000) et à droite, la surface d'une bille vide usagée (x 12 000)

La surface de la bille vide Figure 156 à droite semble plus altérée car les rides y sont plus nombreuses par rapport à la photographie de gauche. Nous avons ensuite coupé les billes afin d'en étudier la structure interne (Figure 157).

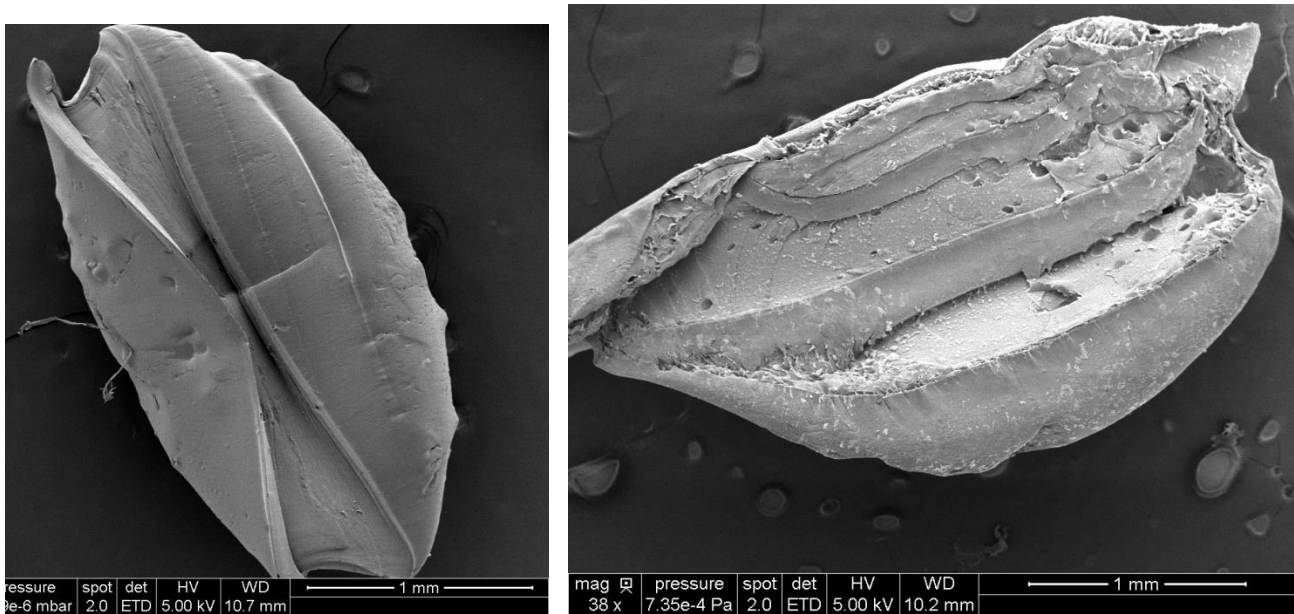


Figure 157 : Demi-bille neuve sans enzyme à gauche (x 45) et demi-bille neuve avec enzyme à droite (x 38)

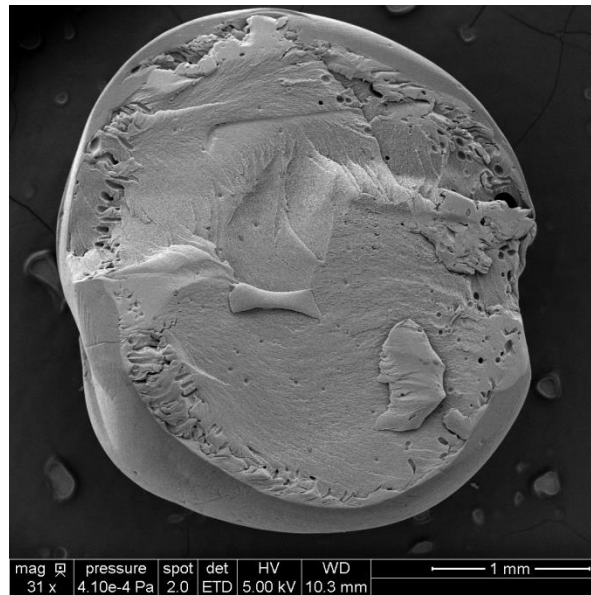


Figure 158 : Demi-bille avec enzyme et alginate de taille moléculaire plus faible

Nous constatons en premier lieu la présence d'une peau en périphérie de la (bille Figure 157), où le gel semble plus dense. En effet, au cours de la gélification de la bille, c'est-à-dire lors de l'entrée en contact de la solution d'alginate avec celle contenant le cation, une coque se forme en périphérie de la bille, lui conférant une sorte de « peau rigide », plus dense que le gel interne (Di Renzo, et al., 2005) (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008). Cette peau semble d'ailleurs légèrement se détacher du reste (Figure 159). Les auteurs précisent que cette coque externe est formée par des fibres emmêlées et densifiées par la rétractation du gel au cours du séchage (Di Renzo, et al., 2005).

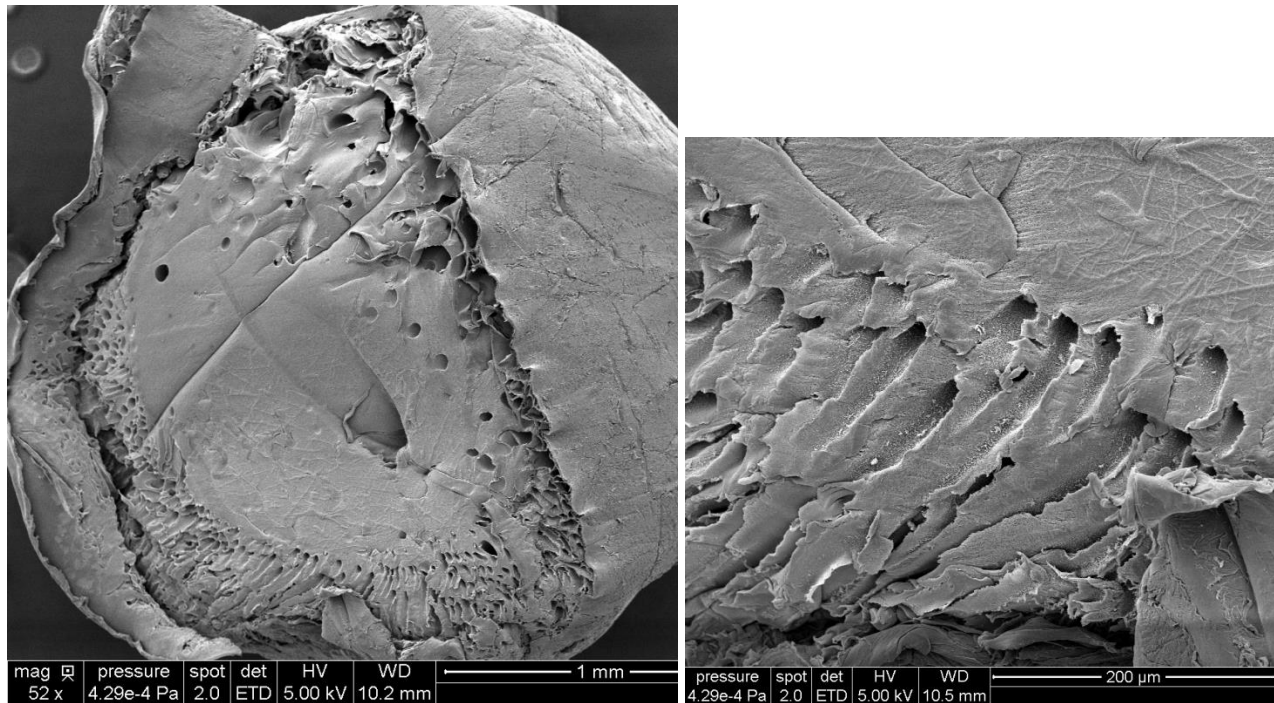


Figure 159 : Bille usagée avec enzyme en coupe à gauche (x 52), zoom sur la partie avec trou à droite

Sous celle-ci, nous découvrons des canaux radiaux (Figure 157 à droite et Figure 158) visibles par les cavités qui parcourent l'intérieur du gel et qui sont plus faciles à repérer sur la Figure 159. Ils sont localisés principalement en périphérie de la bille et semblent se répartir du centre vers l'extérieur. Le travail de Di Renzo, et al., nous permet d'expliquer leur origine. En effet, il est indiqué que la peau de la bille, lors du séchage sous dioxyde de carbone supercritique, va résister au retrait du gel provoquant ainsi la formation de canaux déployés dans la direction du front de séchage. La perméabilité de la coque influe ainsi sur la façon dont le gel va se contracter et donc sur le déroulement de la synérèse (Di Renzo, et al., 2005).

Ce point est confirmé par Quignard, Valentin, & Di Renzo, qui précisent que ce phénomène se produit de façon beaucoup plus accentuée dans les alginates (par rapport au carraghénane ou au chitosane) et que la principale porosité des aérogels alors obtenus est la macroporosité (diamètre > 50 nm) (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008). Cela est important puisqu'une porosité forte facilite la circulation des substrats lors de réactions les mettant en jeu. En outre, la résistance de l'alginate lui permet également de conserver la majeure partie de son volume, même après séchage, ce qui confirme que l'écrasement y est minimal. Tous ces points ont également joué en faveur de l'utilisation de ce polysaccharide.

Cependant, nous notons que l'intérieur de la bille uniquement constituée d'alginate (sans enzyme), semble dépourvu de canaux (à gauche, Figure 157). D'autre part, il semble que la bille élaborée avec un alginate de plus petite taille (Figure 158) aboutit à une bille avec moins de cavités que dans le cas d'un alginate de plus grande masse moléculaire (Figure 157, à droite). Ce point se vérifie si nous observons la coupe d'une bille faite à partir d'alginate de plus grande taille et contenant des enzymes (Figure 160).

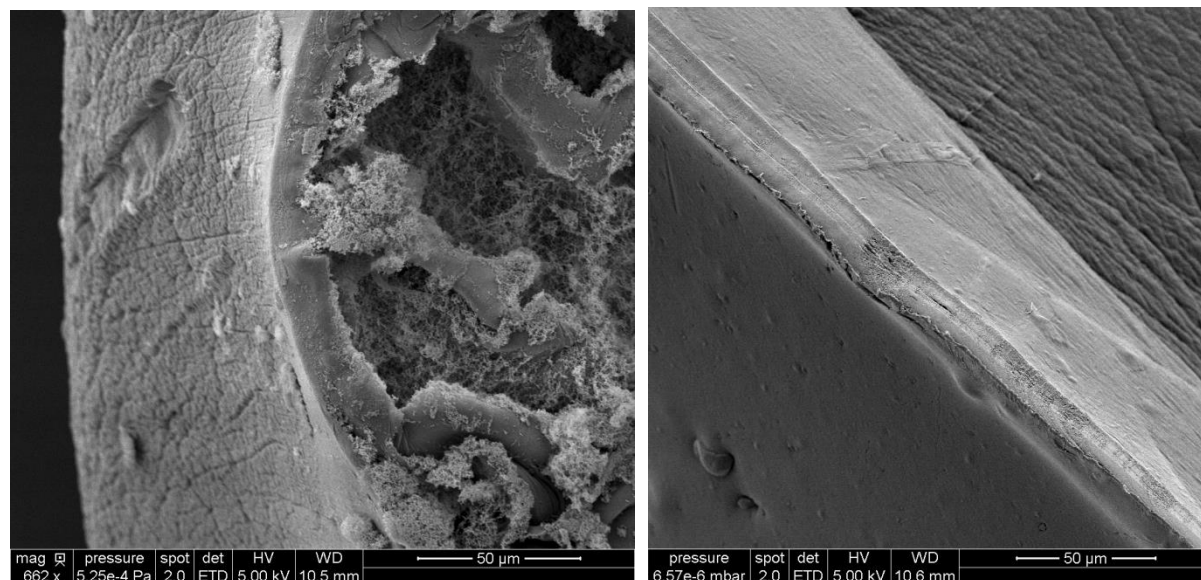


Figure 160 : Bille neuve avec enzymes à gauche (x 662) et bille vide neuve sans enzyme à droite (x 562)

Nous avons donc émis l'hypothèse que la forte viscosité du mélange du fait de la présence d'enzymes, ainsi que la viscosité d'origine de l'alginate, sont des facteurs clefs pour la formation de ces canaux et d'une façon plus générale de porosité, dans le gel. Il est en effet possible qu'en présence de protéines et d'un alginate de plus forte masse molaire, la coque externe de la bille présente une perméabilité plus réduite et diminue donc l'efficacité des échanges avec le solvant.

Ainsi, des traces d'eau et d'éthanol demeurent probablement piégées dans le gel. Au cours du passage en CO₂ supercritique les restes de solvants vont alors exercer sur le gel une tension, mais la peau de la bille étant dure elle va résister aux forces de tractions et des cavités se forment alors entre la peau et le cœur de la structure (Di Renzo, et al., 2005). Les auteurs précisent enfin que l'alginate de cuivre a la capacité de resserrer son gel, faisant donc chuter la perméabilité de 50 % au bout de 22 heures, ce qui facilite l'apparition des canaux.

Nous avons par ailleurs observé la présence de « trous » et canaux au microscope classique sur des billes fraîches (hydrogel) après avoir été coupées en lamelles entre deux morceaux de polystyrène pour éviter l'écrasement (Figure 161).

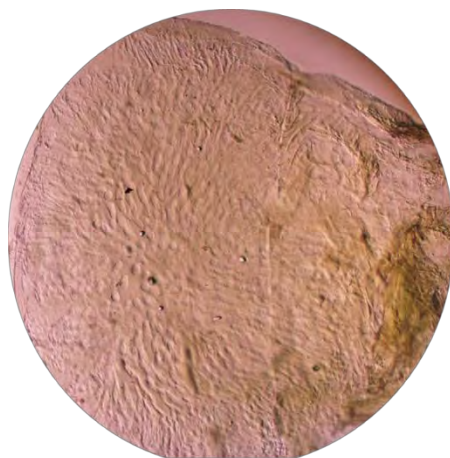


Figure 161 : Coupe d'une bille neuve d'alginate avec enzymes au microscope optique (x 4)

Nous avons donc pensé qu'il pourrait s'agir des capillaires dont la formation s'établie au moment de la création du gel (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008), (Di Renzo, et al., 2005), (Trembl & Kohler, 2000), (Trembl, Woelki, & Kohler, 2003), (Isaiah, 2011). Lors de la diffusion à contre-courant de la solution de polysaccharides et de l'agent gélifiant, il se forme des canaux normaux au front de gélification. Pour un ratio adapté entre la vitesse de diffusion et la vitesse de gélification, des cellules de convection contenant les cations de gélification apparaissent et alimentent le front (Francesco Di Renzo, 2005). Cette zone de mouvements est toujours présente en cas de formation de capillaires et contribue à leur élaboration. Ces structures apparaissent également lorsqu'un écoulement hydrodynamique dans le voisinage du front de gélification a lieu, c'est-à-dire lorsque le gel se contracte du fait de la réticulation des sucres (Di Renzo, et al., 2005) (Trembl, Woelki, & Kohler, 2003). Leur élaboration est aussi fonction de l'épaisseur de la couche d'alginate qui doit être de quelques micromètres seulement.

Isaiah indique en outre que les capillaires se forment lorsque les cations diffusent sur un large front à partir d'une même direction dans la solution d'alginate, tandis que les sucres s'allongent, s'associent et se complexent (Isaiah, 2011). La gélification se fait donc le long de zones parallèles entre elles, pour donner des canaux parcourant parfois tout le gel. La lumière des capillaires est remplie de solution d'électrolytes, tandis que les parois sont faites de complexes non solubles. Ce phénomène se produit facilement avec le cation cuivre (Figure 162).

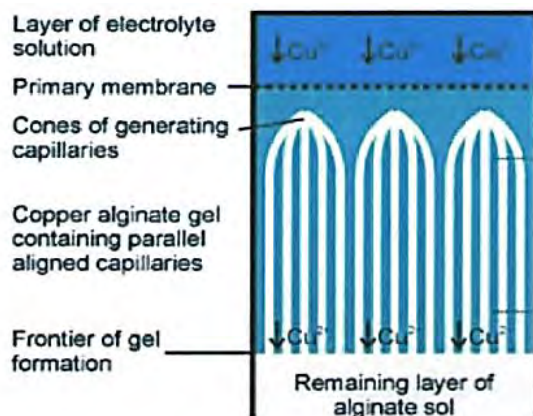


Figure 162 : Formation des capillaires au cours de la gélification. Cas de l'alginate de cuivre (Isaiah, 2011)

Cependant, nous avons des doutes quant à l'observation de ces structures dans nos gels. Car ces canaux sont classiquement très symétriques et parfaitement alignés ce qui n'est pas le cas dans nos échantillons.

D'autre part, si nous étudions de plus près les structures des billes, nous constatons des différences entre celles avec enzymes et celles sans (Figure 160). Nous remarquons en effet que l'intérieur de la bille avec enzymes est d'allure spongieuse alors que celui de la bille vide est lisse. Cette observation se vérifie à plus fort grossissement (Figure 163).

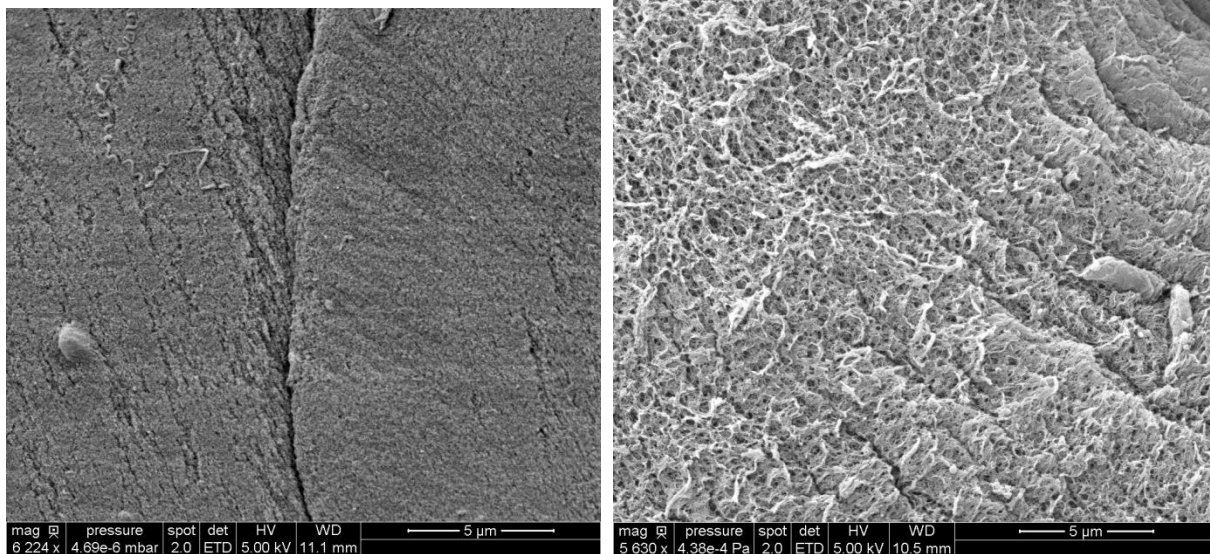


Figure 163 : Intérieur de bille vide neuve usagée à gauche et intérieur de bille avec enzyme usagée à droite

Nous observons (Figure 164), à l'agrandissement maximal compatible avec une qualité suffisante d'image, le cœur de la bille avec enzymes et celui de la bille sans enzyme. Nous constatons que le premier a un aspect filandreux tandis que le second possède un intérieur d'allure plus uniforme et très compact.

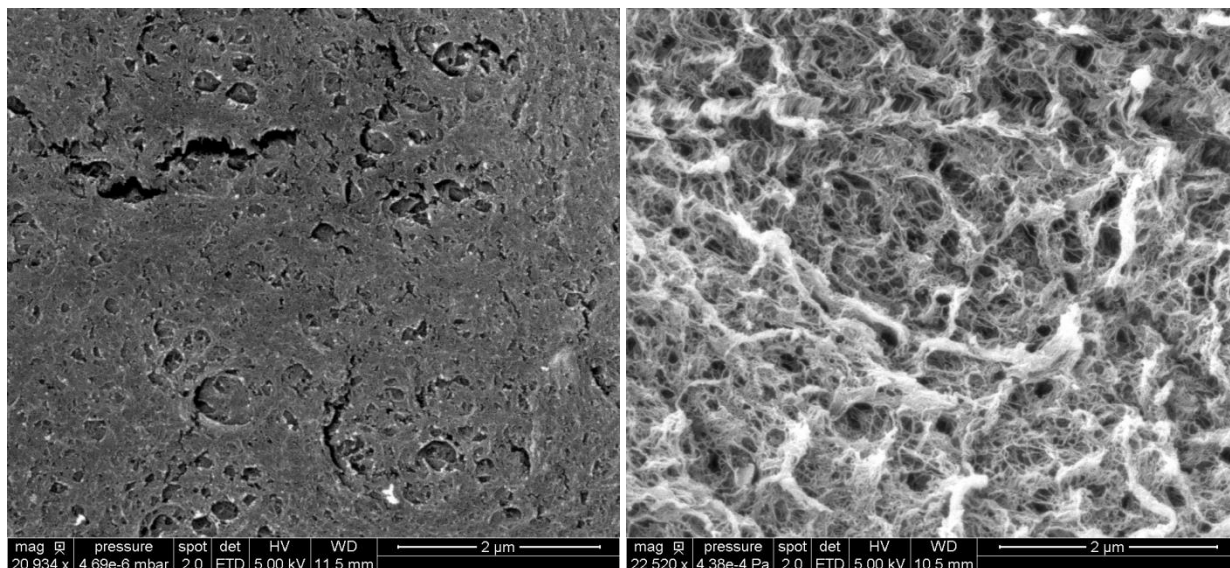


Figure 164 : Intérieur de bille vide usagée à gauche et intérieur de bille avec enzyme usagée à droite

Notre hypothèse est donc que les protéines diminuent la compaction du gel d'alginate en se plaçant entre les molécules de celui-ci, ce qui lui donne un aspect spongieux, contrairement à l'aspect uniforme et serré du gel d'une bille vide. Il est à noter que peu de différences sont visibles entre l'intérieur d'une bille avant et après réaction. Si la bille usagée avait subi plus de cycles de réaction, des différences plus notables seraient peut-être apparues.

Ces observations nous ont renseignées sur la structure des billes d'alginate mais pas sur leur composition. Nous avons donc décidé de procéder à deux autres analyses afin d'essayer d'avoir plus d'informations sur celle-ci.

En effet, après réaction, la constatation fut la suivante :

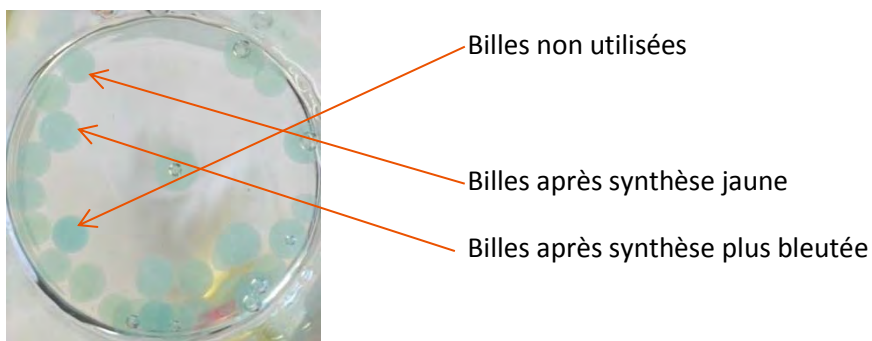


Figure 165 : Comparaison entre billes sans catalyseur neuves ou usagées

Les billes après synthèse sont moins colorées car nous constatons que les billes n'ayant pas servi sont plus foncées (Figure 165). De même, les billes de droite sont moins translucides que celles de gauche sur la Figure 166.



Figure 166 : Billes usagées (à gauche) et neuves (à droite) sur papier

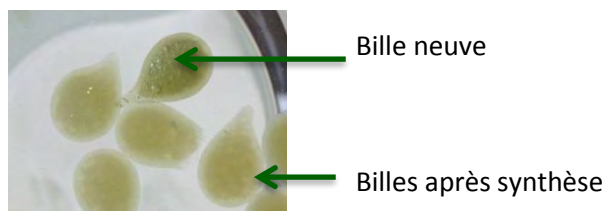


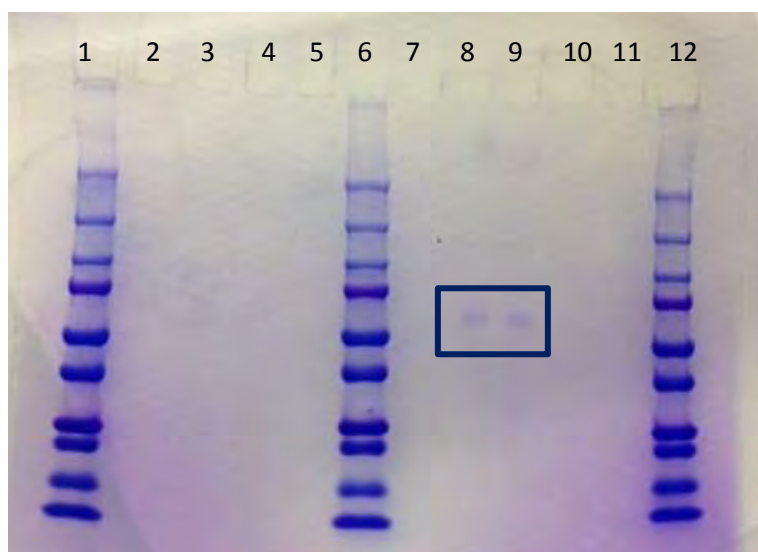
Figure 167 : Bille usagée avec enzyme et bille neuve avec enzyme

Nous constatons également une décoloration des billes usagées avec enzyme (Figure 167). Nous avons donc déduit qu'une partie de la solution de sulfate de cuivre (présente dans les billes vides et non vides) et des protéines piégées dans le gel avaient dû diffuser vers le milieu extérieur pendant la réaction provoquant donc cette différence de couleur.

3.2.5.2 Analyse des milieux de réaction par électrophorèse : estimation de la quantité de protéines libérées dans le milieu

Nous avons décidé de réaliser une électrophorèse des milieux de réaction ayant mis en jeu l'utilisation de billes d'alginate avec enzymes ou sans enzyme. Si l'électrophorèse révèle la présence de fragments de peptides dans les milieux réactionnels, cela nous permettra de savoir, rapidement, si des protéines ont diffusé vers l'extérieur depuis la bille où elles étaient enfermées (indispensable pour estimer la perte de catalyseur). En effet, nous ne pouvons pas directement doser l'activité du milieu réactionnel (après réaction et retrait des billes avec enzymes) par spectrophotométrie U.V car le co-catalyseur de l'oxydation (TEMPO) est encore dans le milieu et réagit également avec l'ABTS (utilisé comme indicateur de l'activité de l'enzyme). Nous analyserons aussi la solution à base de sulfate de cuivre qui a permis la formation des billes d'alginate. Le but est de savoir si des enzymes ont diffusé vers le liquide dans cette étape. D'autre part, la solution de précipitation qui n'a pas servi sera aussi analysée afin de savoir si le cuivre du liquide ne réagit pas avec les produits de l'électrophorèse (faux positif).

Le protocole d'électrophorèse se trouve dans la partie expérimentale p.285 et est issu des travaux de (Van Der Rest, Sanchez, Regad, Frasse, & Charton, 2010). La Figure 168 présente les résultats des essais des migrations des différents échantillons.



Puits :

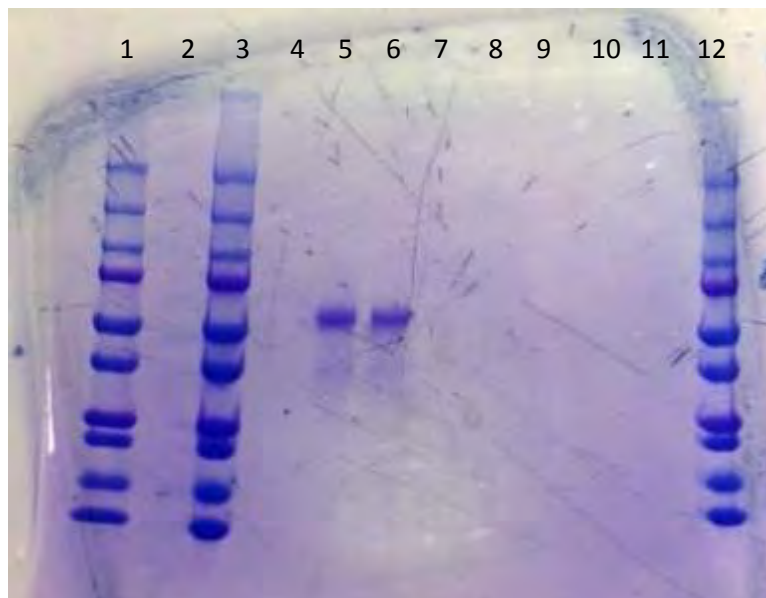
- 1, 6 et 12 : marqueurs Biorad (2 à 250 KDa)
- 2 : pas de milieu
- 3 et 4 : Enzymes seules dans du tampon acétate de sodium
- 5 et 7 : CE6 sur glycérol avec bille d'alginate vides, sans dioxygène
- 8 et 9 : Solution où les billes d'alginate ont précipité
- 10 et 11 : CE6 sur glycérol sous dioxygène (enzymes libres)

Figure 168 : Electrophorèse préliminaire

Nous constatons sur la Figure 168 qu'il n'y a aucune bande sur le gel à l'exception des puits 8 et 9. Nous pensons donc que les échantillons ne sont pas assez concentrés en protéines pour être observés, ou qu'un réactif comme le TEMPO fait obstacle à la fixation du marqueur coloré et empêche donc de voir les bandes à la révélation. En effet, nous avons noté que les solutions des puits 8, 9, 10 et 11 avaient décoloré la solution de coloration (réactif de Leamni) après mélange. Les puits étaient donc jaunes ou verts au lieu d'être bleus foncés avant d'effectuer la migration.

En revanche, la solution de sulfate de cuivre des bains des billes n'empêche pas la fixation du colorant de révélation puisque des bandes sont observables en puits 8 et 9. Cela permet en outre de conclure que des enzymes ont bien diffusé dans le milieu de précipitation des billes d'alginate.

Nous effectuons donc une seconde électrophorèse (Figure 169), mais avec des échantillons de milieux réactionnels plus concentrés dans le but d'obtenir de meilleurs résultats.



1, 3 et 12 : marqueurs

2 et 4 : Glycérol + billes d'alginate sans dioxygène

5 et 6 : Enzymes seules dans du tampon acétate de sodium

7 et 8 : CE6 sur glycérol avec dioxygène

8 et 9 : Solution où les billes d'alginate ont précipité

10 et 11 : CE6 sur CG en autoclave (enzymes libres)

Figure 169 : Electrophorèse avec des milieux plus concentrés

Nous remarquons (Figure 169) que seul l'échantillon qui ne contient pas de TEMPO est visible. Ce n'est donc pas un problème de concentration mais de réaction avec le TEMPO qui semble empêcher la fixation ou la révélation. Ce dernier étant complètement soluble dans le milieu, il n'a pas été possible de le retirer et d'obtenir des résultats plus concluants. Cependant, il est à noter que les bandes visibles correspondent bien à l'enzyme entière et confirment bien une masse à 64 kDa pour celle-ci.

3.2.5.3 Détermination de l'activité des billes d'alginate

3.2.5.3.1 Principe

Nous avons, dans une dernière approche, souhaité doser l'activité des billes d'alginate par spectrophotométrie UV. Pour cela, nous nous basons sur le protocole établi pour doser l'activité des enzymes, fourni dans la partie expérimentale p.278. Nous avons remplacé la solution d'enzymes par les échantillons dont nous souhaitons doser l'activité soit : la solution ayant servi à la précipitation des billes à base de sulfate de cuivre, la solution de précipitation avant utilisation (témoin), une bille neuve avec enzymes et une bille usagée avec enzymes.

3.2.5.3.2 Résultats

Dans la Figure 170, « CuSO4 seul » est la solution de sulfate de cuivre qui a permis la formation des billes d'alginate contenant la laccase, « bille neuve » correspond à une bille contenant des enzymes mais n'ayant pas servi au cours d'une réaction pour l'oxydation avec le protocole enzymatique CE6 et enfin, « bille usagée » correspond à une bille contenant des enzymes et ayant servi au cours d'une réaction pour l'oxydation avec le protocole CE6.

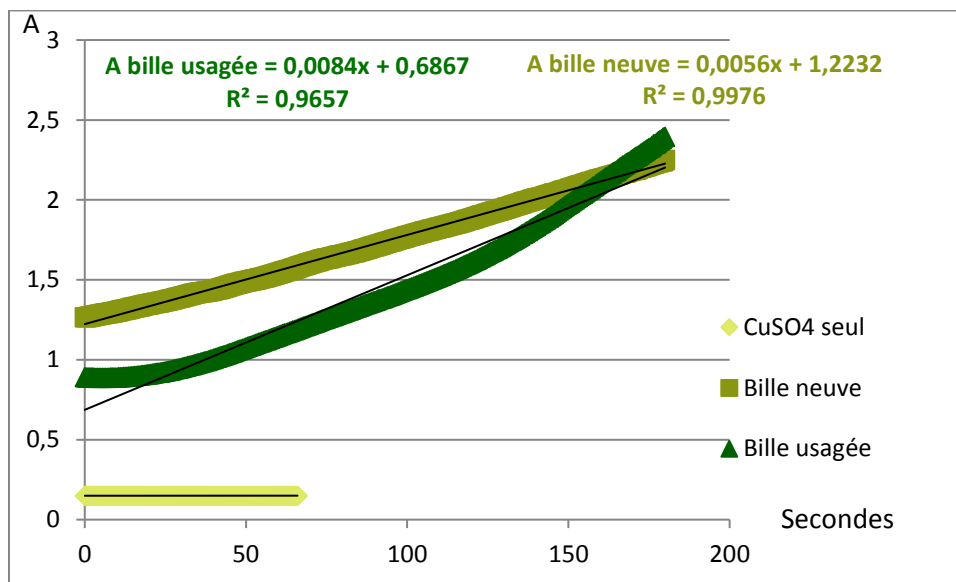


Figure 170 : Evolution des absorbances (A en abscisse), au cours du temps (en secondes, en ordonnée)

Sur la Figure 170, nous constatons que les évolutions des absorbances (« A ») de la bille usagée et de la bille neuve sont très similaires. Leur évolution se recoupe au bout de 170 secondes. Par ailleurs, l'observation des équations de droites décrivant l'évolution de « A » en fonction du temps nous indiquerait même que la bille usagée transformerait plus vite l'ABTS que la bille neuve. En effet, le coefficient directeur avec la première est de 0,0084, supérieur à celui avec la bille neuve de 0,0056.

Nous poursuivons donc notre étude avec les calculs associés à la Figure 170, présentés Tableau 41.

	Bille neuve	Bille usagée
Absorbance au bout de 180 secondes : A(t=180)	2,2501	2,3954
Absorbance à l'Ei : A(t=0)	1,2653	0,8919
$\Delta A = A(t=180) - A(t=0)$	0,9848	1,5035
$\Delta A / (l\epsilon)$ avec $l\epsilon = 29300$	3,36109E-05	5,1314E-05
$(\Delta A / (l\epsilon)) * \text{Volume total de solution dans la cuve} = \text{Quantité d'ABTS consommé en 180 sec (en moles) en imposant que } V = 3\text{ml et en négligeant les volumes des billes qui sont jugés identiques}$	1,01E-07	1,54E-07
en 1 minute : moles d'ABTS consommées	3,36E-08	5,13E-08

Tableau 41 : Calcul de l'activité des billes d'alginate avant et après réaction

Le Tableau 41 révèle le même phénomène, à savoir que la bille usagée à une activité de $5,13 \cdot 10^{-8}$ moles d'ABTS consommées par minute, ce qui est plus élevé que celle de la bille neuve de $3,36 \cdot 10^{-8}$. Cependant, ces résultats sont à prendre avec réserve car la mesure de l'absorbance de la cuve en présence de la bille reste imparfaite. Les enzymes piégées dans l'alginate sont très actives et provoquent donc un flux d'ABTS bleu dans la cuve mais ce dernier n'est pas mélangé au reste du liquide (Figure 171). Ainsi, n'étant pas pourvu d'agitation, la solution n'est pas homogène. Le faisceau permettant la mesure, par différence avec la référence, n'est pas dans les meilleures conditions car, en fonction de l'endroit où il se propagera, les résultats seront variables.

Nous obtenons donc des tendances mais sans pouvoir vraiment conclure, notamment entre la bille neuve et la bille usagée. Cependant, plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer une activité plus élevée chez la bille usagée : cette dernière contient probablement du TEMPO dans son réseau comme a pu l'attester l'observation des billes jaunies après réaction (le TEMPO est en partie responsable de cette coloration en milieu homogène). Nous avons également supposé que la bille altérée est peut-être davantage poreuse et laisse donc une circulation du substrat plus aisée que dans sa forme neuve.



Figure 171 : Bille dans la solution d'ABTS pour la mesure de l'absorbance

Enfin, la différence d'activité observée (Tableau 41) peut aussi être due au fait que la quantité d'enzymes n'est pas identique entre les deux billes bien qu'elles proviennent de la même fabrication.

L'activité de la solution de précipitation des billes d'alginate n'est pas présentée car elle n'a pu être analysée. Celle-ci était trop concentrée en protéines pour que le spectromètre U. V ne soit pas immédiatement à saturation avant d'avoir pu mesurer une quelconque évolution. Il aurait donc fallu tester différentes dilutions de cette solution afin de pouvoir réaliser un essai correct. Cependant, ces tests de dilution sont longs, ils n'ont donc pas été réalisés. Nous avons préféré privilégier la méthode du Kjeldhal dans ce cas présent pour estimer la quantité de protéines.

3.2.5.4 Analyse du taux de protéines dans les billes après fabrication et après réaction

3.2.5.4.1 Démarche

L'électrophorèse n'ayant pas donné de résultats concluant, nous avons essayé d'estimer la quantité d'enzymes qui diffuse depuis la formation des billes jusque dans le milieu, et la quantité de protéines dans les billes avant et après utilisation.

Pour ce faire, nous avons employé la méthode de Kjeldahl afin de doser la quantité d'azote présente dans :

- 1) La solution de sulfate de cuivre dans laquelle les billes sont formées par précipitation (« liquide bain 1 »),
- 2) Des billes neuves et contenant de l'enzyme (« bille neuve + enzyme »),
- 3) Des billes usagées avec enzymes (« billes usées avec dioxygène »),
- 4) Des billes vides ayant été utilisée dans une réaction d'oxydation selon le protocole CE6 (« bille usagée vide »).

Cela nous informera :

- De la quantité d'enzymes perdue au cours de la fixation en alginate,
- De la différence des valeurs entre les échantillons 2) et 3) et donc sur la quantité d'enzymes ayant diffusé au cours de la réaction vers le milieu extérieur.

Les billes vides nous permettront de soustraire la quantité de TEMPO résiduelle piégée dans le gel d'alginate de la bille. Cette valeur est importante car le TEMPO contient de l'azote et fausse donc la mesure de la quantité reflétant vraiment la proportion réelle de protéines dans le support (l'alginate $(C_6H_8O_6)_n$ ne contient pas d'azote). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir estimer la quantité de TEMPO dans les billes vides de façon plus sûre qu'avec la spectrophotométrie, ce qui permettrait d'avoir une estimation de la quantité d'enzymes plus fiable.

3.2.5.4.1.1 Méthode

La méthode de Kjeldahl est une technique de détermination du taux d'azote dans un échantillon. Elle est applicable pour le dosage de l'azote de différents composés azotés tels les amines. Quand l'azote est sous forme organique, il faut d'abord procéder à la minéralisation du composé pour passer à de l'azote minéral. Nous détruisons la molécule organique en l'oxydant à ébullition (421°C) avec de l'acide sulfurique, en présence de catalyseur (sulfate de cuivre) : le carbone s'élimine sous forme de dioxyde de carbone, l'hydrogène sous forme d'eau et l'azote reste en solution sous forme d'ion ammonium (Carlsberg, 2016).

Il faut alors transformer l'ammonium (NH_4^+) sous sa forme volatile : l'ammoniac (NH_3 , g). De la soude est donc ajoutée en excès afin de changer le pH acide en un pH basique, ce qui a pour effet d'obtenir de l'ammoniac. Celui-ci est entraîné par la vapeur d'eau au cours d'une distillation. Les vapeurs d'ammoniac sont condensées au contact d'un réfrigérant et recueillies dans une solution contenant deux indicateurs colorés (rouge de méthyle et bleu de bromothymol) et de l'acide borique. Ce dernier va retenir l'ammoniac sous sa forme acide. La troisième étape est le dosage de l'ammoniac par une solution titrée d'acide sulfurique : On titre la solution jusqu'à équivalence par le virage de l'indicateur coloré, le rouge de méthyle (couleur rose rouge). L'acide borique est un acide faible, il ne libère pas de proton et n'interfère donc pas avec le pH (Carlsberg, 2016). L'appareil utilisé est un 2013 Kjelttec 8400.

3.2.5.4.1.2 Résultats et conclusions

Nous n'avons pas pu conclure sur les quantités de protéines contenues dans les billes ou les liquides. Les résultats renvoyés étaient aberrants : les échantillons sans laccase contenaient plus d'azote que ceux qui en étaient dépourvus dès le départ (du fait de leur fabrication). Nous pensons que ces incohérences seraient dues au fait que les quantités d'azote contenues dans nos échantillons étaient sous la limite de détection de l'appareil de 0,1 mg. En effet, les quantités dosées par la machine, dans nos échantillons, étaient au maximum compris entre 0,06 et 0,001mg.

3.2.5.5 Conclusions et améliorations proposées au niveau des analyses

D'autres mesures et méthodes auraient pu être utilisées pour caractériser les billes d'alginate contenant l'enzyme nécessaire aux réactions d'oxydation avec le système laccase/TEMPO. Nous en avons établi la liste en perspective d'essais futurs :

- Des mesures de la porosité des billes par BET comme effectuées par (Quignard, Valentin, & Di Renzo, 2008) sont nécessaires
- La méthode de Bradford aurait dû être testée pour quantifier les protéines dans les solutions de gélification après formation des billes, dans les solutions de lavage des billes après la maturation.
- Une analyse élémentaire aurait aussi pu être envisagée afin de doser l'azote
- Enfin de la spectroscopie RAMAN pourrait nous aider à localiser la répartition des protéines dans les billes d'alginate car cette technique permet l'accès aux structures profondes du matériau.

3.2.6 Utilisation de la laccase immobilisée en billes d'alginate pour les réactions d'oxydation avec le protocole enzymatique CE6

Afin de savoir quelles sont les conséquences de l'immobilisation de la laccase en bille d'alginate sur le déroulement de la réaction de CE6, nous décidons d'utiliser cette nouvelle forme de catalyseur sur le glycérol puis sur le carbonate de glycérol. Nous utiliserons un réacteur ouvert en verre (comme dans la partie expérimentale p.238).

3.2.6.1 Conditions testées pour le protocole enzymatique CE6 en présence de laccase supportée

Chaque milieu testé possède un numéro (1 à 6) qui permettra son identification par la suite. L'ensemble des conditions est répertorié Tableau 42.

	1	2	3	4	5	6
Substrat	Glycérol	Glycérol	CG	CG	Glycérol	Glycérol
Catégorie de la bille	vide	Avec laccase	Avec laccase	vide	Avec laccase	vide
Atmosphère	Air	Dioxygène	Air	Air	Air	Air
	Témoin	Essai	Essai	Témoin	Essai	Témoin

Tableau 42 : Conditions testées au cours des essais

Les conditions expérimentales et de traitement des échantillons en fin de réaction restent les mêmes que pour le protocole CE6 avec le duo TEMPO/laccase en catalyse homogène et sont présentes dans la partie expérimentale p.238. La seule différence réside dans l'utilisation de dix-sept billes d'alginate avec laccase immobilisées (retirées en fin de réaction) pour remplacer la protéine sous forme libre. Les expériences témoins contiennent quant à elle dix-sept billes vides (sans enzyme).

Afin de savoir si le sulfate de cuivre pourrait interagir avec le TEMPO et le régénérer (dans un processus proche de celui du protocole CC33 avec le système de métaux non nobles cuivre/manganèse paragraphe 1.2.2.1.2) à la place de l'enzyme, nous réalisons les essais 1 et 4. Selon ces conditions, des billes vides mais contenant encore des traces de la solution du bain sont employées. Ainsi, si des produits se forment dans ces circonstances nous pourrions en déduire que le cuivre présent dans les hydrogels a servi d'activateur et de régénérant pour l'ion oxo-ammonium. L'essai 3 effectué sur CG est réalisé uniquement sous air puisque nous avons déjà constaté qu'un enrichissement en dioxygène n'apporte pas d'amélioration dans la formation des HA.

3.2.6.2 Résultats

3.2.6.2.1 Résultats et interprétations sur l'ensemble des milieux réactionnels

Pot	1	2	3	4	5	6
pH Ei	4,45	4,68	4,54	4,47	4,53	4,48
pH Ef	4,49	4,28	4,23	4,5	4,4	4,5
Nombre de billes à l'Ef	17	0	17	17	17	17

Tableau 43 : Conditions expérimentales et évolution du pH (Ei = état initial, Ef = état final)

En fin de réaction (Tableau 43), nous constatons que les essais 1, 4 (témoins) et 3 sur le CG, possèdent toujours le même nombre de billes qu'à l'état initial, en revanche, ce n'est pas le cas dans l'essai 2.

Plus aucune bille n'est visible, en revanche, la solution est devenue beaucoup plus visqueuse. Les billes se sont donc dissoutes. La manipulation a été répétée et le résultat fut identique. Ainsi, en présence de glycérol et de dioxygène, l'alginate contenant des enzymes se dissout dans le milieu réactionnel (essai 2) Ce phénomène se produit au bout d'environ quatre heures de réaction. La disparition des billes n'a cependant pas lieu avec le CG en présence de dioxygène (essai de contrôle pour les observation avec le glycérol non présenté Tableau 42).

D'autre part, les pH Tableau 43 indiquent :

- Qu'il n'y a pas eu d'acide formé dans les réactions témoins 1, 4 et 6 puisque le pH est resté très proche de 4,5. La présence de sulfate de cuivre résiduelle contenu dans les billes d'alginate vides ou du polyoside n'a donc aucun impact sur la régénération du TEMPO. En effet, il n'y a pas de diminution de pH dans les milieux réactionnels. Ainsi, sans enzyme, la réaction est impossible,
- La diminution significative ($> 0,1$) dans les milieux réactionnels 2, 3 et 5 indique la présence d'acides carboxyliques. Ainsi, il y a bien eu une réaction d'oxydation sur le glycérol (essais 2 et 5) et le CG (essai 3) avec les enzymes immobilisées. Enfin, que ce soit en présence d'air (essai 5) ou sous dioxygène (essai 2), l'oxydation du glycérol a eu lieu dans les deux cas.

Nous avons souhaité savoir si la nature des acides carboxyliques formés à partir du CG et du glycérol et leurs proportions seraient les mêmes avec la laccase libre et immobilisées dans l'alginate. Nous proposons donc de comparer les résultats des essais en catalyse hétérogène avec les éléments déjà disponibles sur les réactions effectuées en catalyse homogène.

3.2.6.2.2 Comparaison des résultats entre la catalyse homogène et la catalyse hétérogène

Les analyses des produits de réactions en catalyse hétérogène sont faites de la même façon qu'en catalyse homogène. Les réactions sont toutes comparées grâce à leur chromatogramme obtenu par HPLC et suivant les pourcentages d'aires relatives des produits formés.

3.2.6.2.2.1 Résultats de la catalyse hétérogène dans le cas de l'oxydation à l'aide du protocole CE6 dans le cas du CG

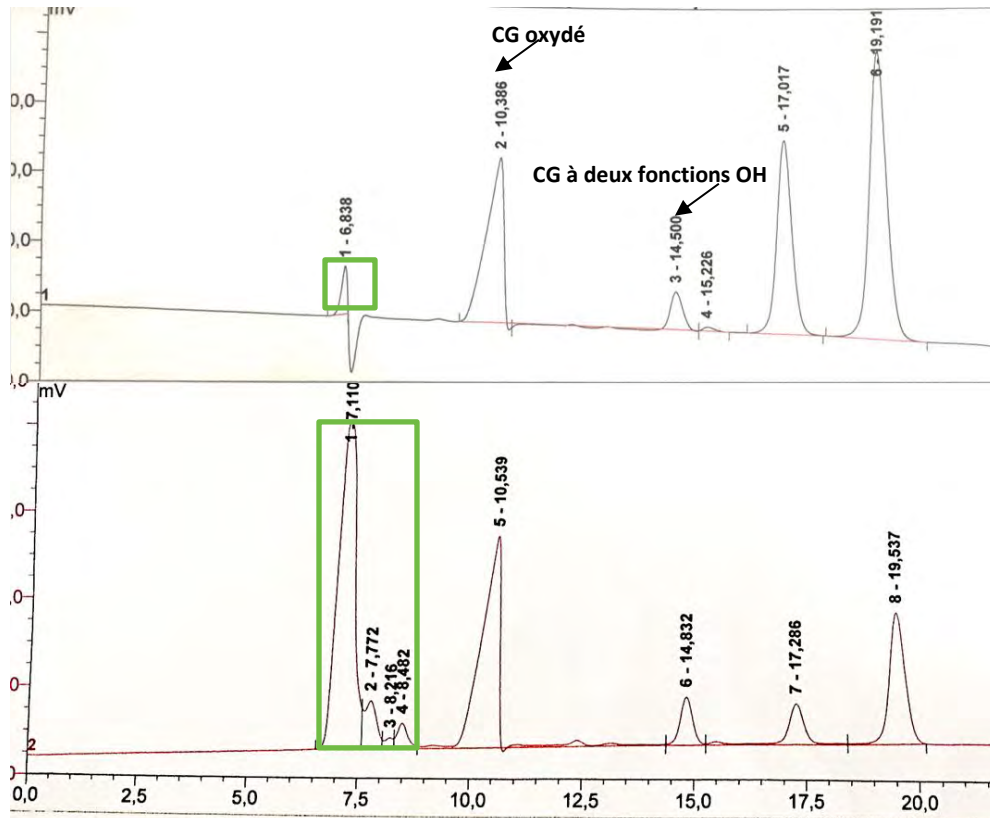


Figure 172 : Chromatogramme des produits de la réaction de CE6, en catalyse hétérogène (en haut) et en catalyse homogène (en bas) sur le CG. Vert = produits de dégradation de l'enzyme

Sur la Figure 172, nous remarquons une forte diminution de la proportion des produits issus de la dégradation de l'enzyme (6,8 à 7,1 minutes, encadrés vert). La fixation de l'enzyme sur un support semble donc améliorer sa tenue au cours de la catalyse.

Le Tableau 44 nous permet de comparer, de façon claire, les rendements de chaque produit au cours de l'oxydation du CG en fonction du type de catalyse employée.

Les sélectivités sont calculées uniquement à partir des produits formés : les aires du CG et du tampon n'ont donc pas été prises en compte (il s'agit respectivement du substrat et du tampon de réaction), mais celles des peptides sont considérées comme des produits puisqu'ils apparaissent bien après la réaction (leur formation est donc provoquée par cette dernière).

Conditions de réaction	Réacteur ouvert Catalyse hétérogène Conditions non optimisées	Réacteur ouvert Catalyse homogène Conditions non optimisées	Réacteur fermé Catalyse homogène Conditions optimisées
Rendements (Aire de chaque pic correspondant à la molécule indiquée)	- CG oxydé : 28 % - CG hémiacétal : 3,8% - Acide glycérique : 0% - Résidus de protéines formés au cours de la réaction : 2%	- CG oxydé : 23 % - CG hémiacétal : 1,2% - Acide glycérique : 2% - Résidus de protéines formés au cours de la réaction : 46%	- CG oxydé : 45 % - CG hémiacétal : 1,1 % - Acide glycérique : 1 à 2% - Résidus de protéines formés au cours de la réaction : 21%
Sélectivité pour le CG oxydé = Aire du pic du CG oxydé / (Aire des autres produits formés)	85%	30%	57%
Conversion du CG	35%	61%	68 à 73 %
Aire du pic de CG restant	40%	20%	15%

Tableau 44 : Comparaison des rendements en chaque molécule formée en fonction du type de catalyse , des conditions et du réacteur choisi. En gras les valeurs les plus intéressantes.

Le Tableau 44 nous permet de conclure que :

- Sans optimisation des conditions expérimentales, la conversion du substrat reste meilleure en catalyse homogène (61% contre 35%),
- Cependant, la quantité de molécules issues de l'altération des enzymes (« résidus de protéines ») est fortement diminuée dans le cas de la catalyse hétérogène (2%) par rapport aux cas de catalyse homogène avec ou sans optimisation (21 à 46% de peptides) (Figure 172),
- Dans le cas de la catalyse hétérogène, la sélectivité pour le CG oxydé est beaucoup plus importante (85% contre 57% maximum) ce qui permet de contrebalancer, en partie, une conversion plus faible du substrat (35% contre 61%),
- Le CG hémiacétal est aussi plus présent dans ce cas (3,8% contre 1% dans les autres cas).

En conclusion, nous pouvons dire que la fixation sur support des enzymes apporte une sélectivité très améliorée pour les produits issus spécifiquement du CG. Cela permet en outre, de contrebalancer dans une certaine mesure, la diminution de la conversion du substrat. Par ailleurs, l'objectif de conservation de l'enzyme est bien rempli puisque la quantité des produits de l'altération de celle-ci est diminuée d'un facteur 10 à 20.

3.2.6.2.2 Résultats de la catalyse hétérogène dans le cas de l'oxydation du glycérol à l'aide du protocole CE6 et en réacteur ouvert

Les résultats obtenus entre la catalyse homogène et hétérogène sont les suivants Figure 173 et Figure 174. Nous remarquons une diminution des produits issus de la dégradation de l'enzyme (6,8 et 7,6 minutes) dans le cas de la catalyse hétérogène. En outre, la présence de dioxygène semble favoriser leur formation puisque sur la Figure 173, la proportion de ceux-ci (en bleu) est plus élevée que sous air (en noir).

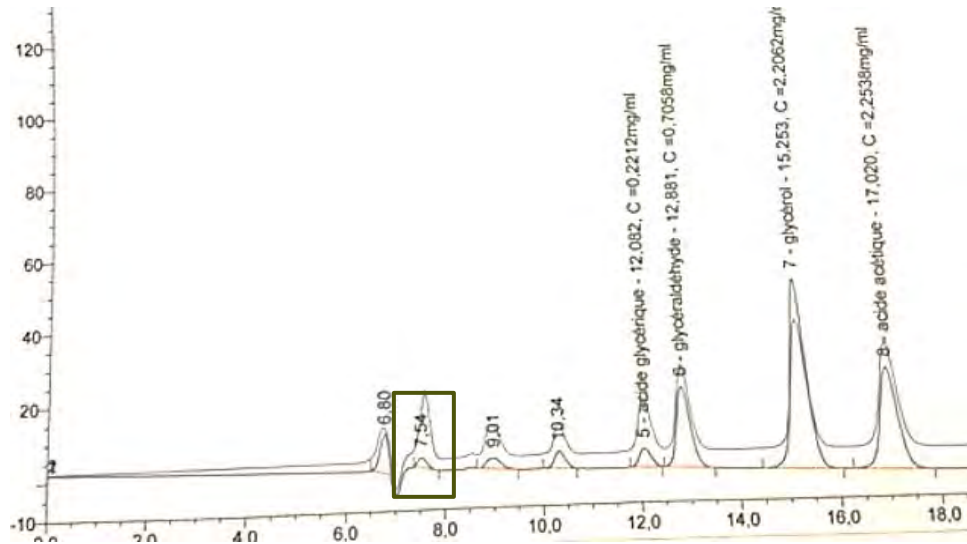


Figure 173 : Chromatogrammes de la réaction du protocole CE6 en catalyse hétérogène sur glycérol sous air (en noir) ou sous dioxygène (en bleu)

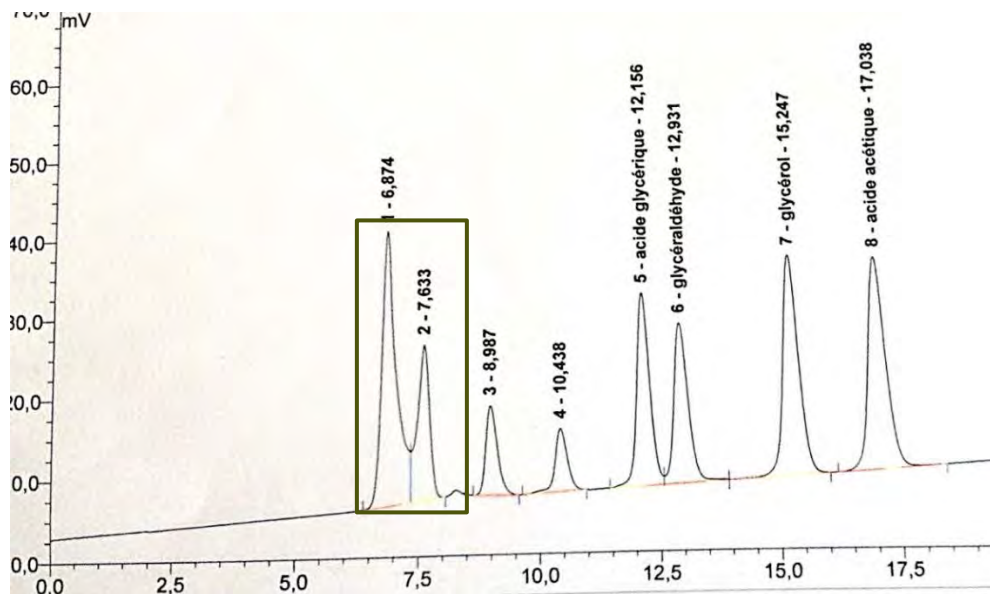


Figure 174 : Chromatogramme de la réaction du protocole CE6 sur glycérol en catalyse homogène en réacteur ouvert et sous dioxygène

Leur comparaison plus précise est réalisée Tableau 45 à l'aide des analyse HPLC et HPIC des milieux réactionnels.

	Catalyse hétérogène NON optimisée avec dioxygène	Catalyse hétérogène NON optimisée sans dioxygène	Catalyse homogène Conditions non optimisées avec dioxygène
Résultat en aire relative	Acide glycérique : 9,8% Glycéraldéhyde : 17 % Acide mésoxalique : 5% Acide tartronique 2% Acide mésoxalique 5% Produits issus de l'enzyme (sommes des aires de pics attribués à celle-ci) : 10 %	3,2% 16% 2,7% 2,7% 2,1% 5%	12% 8% 3,9% 3,8 % 5 % 29%
Glycérol restant (en aire relative)	28%	44%	20%

Tableau 45 : Comparaison du pourcentage de chaque produit des milieux réactionnels obtenus en catalyse homogène ou hétérogène au cours de la catalyse du protocole CE6, sur glycérol

A l'aide du Tableau 45 nous remarquons que :

- Les réactions en catalyse hétérogène aboutissent à des rendements plus faibles en acide glycérique (3 % d'aire contre 12 % en condition homogène) ainsi qu'à une conversion plus faible du glycérol (entre 31 et 44% de glycérol restant contre 20%),
- Concernant les réactions en catalyse hétérogène sous air, les rendements en acide glycérique sont moins importants qu'en présence du dioxygène (9,8 pour 3,2%). Cependant, l'association glycérol et dioxygène provoque la dissolution du support alginate. Ces conditions ne peuvent donc pas être retenues. En effet, les enzymes sont probablement en partie libérées du gel vers le milieu, d'où des quantités d'HA supérieures. Malgré cet obstacle, nous notons tout de même une diminution élevée des produits de l'altération des enzymes avec ou sans dioxygène (de 29%, nous atteignons 5%),
- En présence de laccases immobilisées la proportion de glycéraldéhyde est supérieure (16%) à la quantité obtenue avec les enzymes libres (8%),
- Il est cependant à noter que la fixation sur support ne semble pas diminuer la proportion des diacides formés (5% d'acide mésoxalique pour les réactions en présence de dioxygène). La suroxydation de l'acide glycérique semble donc se produire de la même façon.

En conclusion, la principale avancée de la catalyse supportée est la diminution de la formation des molécules issues de l'altération des enzymes (Figure 173). Afin d'avoir une idée du positionnement de nos travaux par rapport à la bibliographie, nous les comparons avec les résultats obtenus dans des conditions similaires du protocole de Chen, Fang, & Hu nommé « protocole 2 » Tableau 46 (Chen, Fang, & Hu, 2007).

Masse de réactif à l'état initial	Protocole CE6 de la thèse testé en catalyse hétérogène (bille d'alginate) sans ajout de dioxygène	Protocole 2 (catalyse hétérogène)
TEMPO	93 mg	234 mg
Laccase (<i>Trametes Versicolor</i>)	200U	500U
Glycérol	184 mg	460 mg
Méthode de fixation	Alginate de cuivre	Alginate de sodium + glutaraldéhyde

Tableau 46 : Comparaison des conditions expérimentales entre le protocole CE6 en présence de billes d'alginate avec enzymes et un protocole similaire de l'état de l'art

Nous notons que 7% d'acide glycérique et 20% de glycéraldéhyde associés à une conversion du glycérol de 30% sont obtenus pour le protocole 2 (Chen, Fang, & Hu, 2007) en comparaison, nous parvenons à 40% de conversion du glycérol pour 3% d'acide glycérique et 16% de glycéraldéhyde dans le mélange total. Nos résultats sont donc du même ordre de grandeur qu'avec le protocole 2 mais avec un temps de réaction très inférieur, ainsi que des quantités de catalyseurs moindres. Cela laisse supposer qu'avec une durée de réaction plus importante, nos résultats auraient été semblables. Par ailleurs, alors que Chen, Fang, & Hu utilisent du glutaraldéhyde classé toxique pour la fixation des enzymes dans le gel, nous n'avons pas employé ce composé (Chen, Fang, & Hu, 2007).

L'étude de cette forme de catalyse pour l'oxydation du glycérol est donc à poursuivre car elle semble offrir des possibilités d'améliorations importantes, tant au niveau des rendements en HA que pour la conservation des catalyseurs.

3.2.6.2.2.3 Conclusion

Le Tableau 47 permet de visualiser de façon rapide les apports obtenus au cours de nos travaux de la catalyse hétérogène par rapport à la catalyse homogène. Les flèches rouges indiquent une diminution et les bleues une augmentation de la valeur.

	Glycérol	CG
pH	4,2	4,2
Dégradation des protéines	↓ 22 %	↓ 44%
Sélectivité pour l'acide	↓ 2 à 9%	↑ 55%
Sélectivité pour l'aldéhyde/le diols	↑ 8%	↓ 2,4%
Quantité de substrat restante	↑ 8 à 24%	↑ 20%

Tableau 47 : Illustration des effets de la catalyse hétérogène par rapport à la catalyse homogène sur les rendements en produits formés et la conversion des substrats

La fixation de l'enzyme dans l'alginate permet de réduire la formation de ses produits de dégradation de 22% dans le cas de l'oxydation du glycérol et de 44% dans le cas du CG et favorise la formation préférentielle du CG oxydé de 55%. En revanche, la formation de l'acide glycérique diminue de 2 à 9% (respectivement sous dioxygène ou sous air) mais augmente la sélectivité pour le glycéraldéhyde de 8%. Enfin, il est vrai que la fixation sur support diminue la conversion du substrat, puisqu'il en reste 8 à 24 % de plus dans le milieu sur glycérol (respectivement sous dioxygène ou sous air) et 20% dans les milieux réactionnels sur CG. Cependant, des perspectives seront présentées chapitre 4 dans le but de réduire cet inconvénient.

Ces améliorations étant utiles, nous avons poursuivi notre étude avec l'application de la catalyse hétérogène au cas du diglycérol et triglycérol.

3.2.6.2.3 Application de la catalyse hétérogène dans le cas de l'oxydation du diglycérol et du triglycérol à l'aide du protocole CE6 et en réacteur ouvert

3.2.6.2.3.1 Présentation des essais

Nous testons quatre conditions différentes en catalyse hétérogène avec le di et le triglycérol (Tableau 48).

Numéro d'expérience	Mélange
9	Triglycérol avec billes d'alginate
10	Diglycérol avec billes d'alginate
11	Triglycérol avec billes d'alginate vides
12	diglycérol avec billes d'alginate vides

Tableau 48 : Conditions testées pour la catalyse hétérogène

Les réacteurs utilisés sont ceux présentés dans la partie expérimentale, dans le cas de l'oxydation du glycérol : ils sont en verre et ouvert. Les manipulations en billes d'alginate ont été effectuées sous air (donc sans dioxygène) car ne pouvant pas recommencer les expériences plusieurs fois, nous n'avons pas souhaité prendre le risque de dissoudre le gel comme cela a pu se produire en présence de glycérol et du gaz. Les conditions expérimentales sont donc les mêmes que dans le cas de l'oxydation du CG en catalyse hétérogène.

3.2.6.2.3.2 Résultats

En fin de réaction, aucune diminution de pH n'a lieu. Ce phénomène ne peut pas être dû à un problème de contact entre le TEMPO et le substrat car ils sont libres dans le milieu réactionnel. Cela ne peut pas non plus s'expliquer par une diffusion limitée du TEMPO dans l'alginate puisque comme démontré dans le cas de l'oxydation du CG et du glycérol, la réaction fonctionne. La différence ici réside dans l'utilisation de substrat plus encombrant.

Nous pensons donc qu'une interaction directe est nécessaire entre l'enzyme et le substrat pour que la réaction se produise, mais que la rencontre des réactifs n'est pas possible au travers du réseau d'alginate du fait de la taille plus importante du diglycérol et du triglycérol.

Si nous superposons les résultats de chromatographie (détection RI) des milieux réactionnels issus de l'oxydation du diglycérol avec le protocole CE6 en catalyse homogène (qui forme bien des HA) avec ceux de la catalyse hétérogène, nous obtenons la Figure 175.

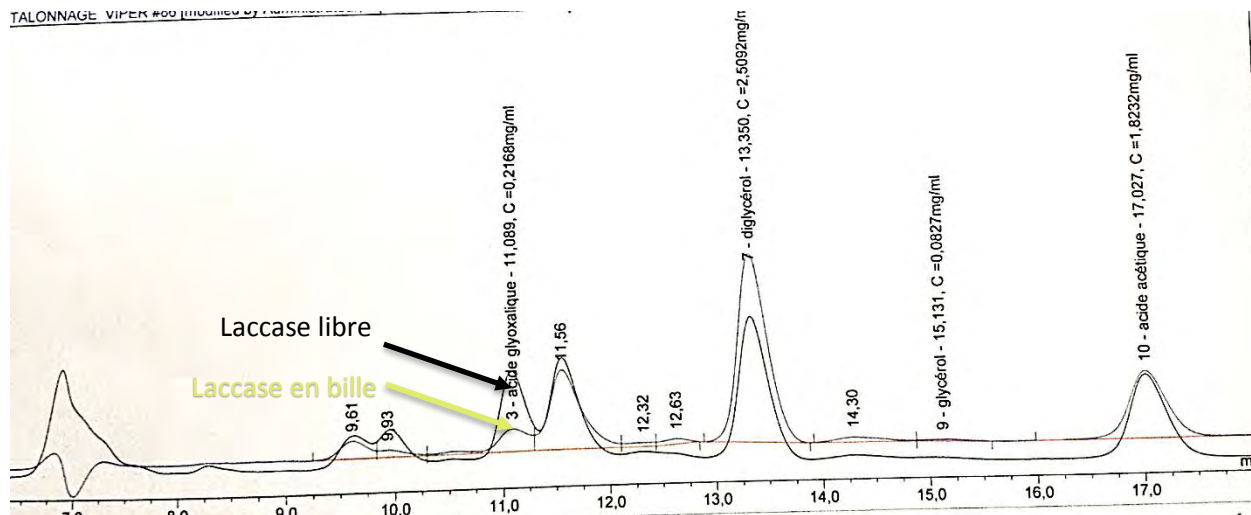


Figure 175 : Comparaison des résultats de chromatographie issus de l'oxydation du diglycérol par voie enzymatique en catalyse hétérogène (en vert) ou homogène (en noir)

La superposition des pics indique qu'il y a bien eu réaction, car de nouveaux produits sont observés. Mais leurs ratios sont différents. Il est donc possible qu'en recommençant l'expérience, mais avec une durée supérieure, les rendements soient similaires et la diminution du pH visible. Dans le cas du triglycérol, nous faisons la même observation au travers du chromatogramme du milieu réactionnel issu de l'oxydation de ce substrat par le protocole enzymatique en catalyse hétérogène (Figure 176).

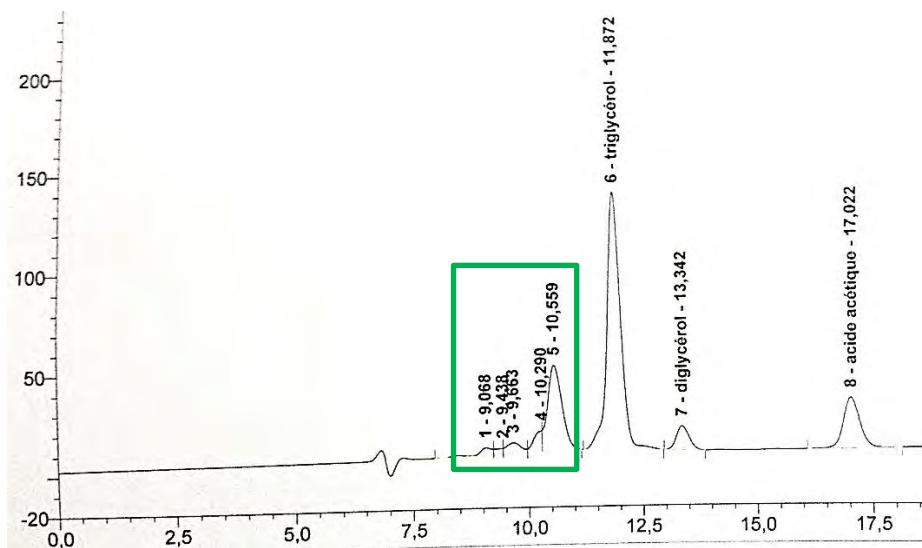


Figure 176 : Chromatogramme de l'oxydation du triglycérol en catalyse hétérogène appliqué au protocole CE6

La réaction semble très peu efficace dans ces conditions. Il y a cependant de nouveaux pics avec un signal significatif (> 5 mV) Le pic à 10,559 pourrait être du tétraglycérol mais la superposition n'est pas parfaite. Nous constatons en outre que les résidus de la laccase ne sont plus présents (Figure 176).

Les analyses HPIC fournissent, quant à elles, les résultats suivants :

Conditions des essais	Tartronate mg/ml	Oxalate mg/ml
Diglycérol avec billes d'alginate vides sous air	49	0
Diglycérol avec billes d'alginate avec enzymes sous air	343	199
Triglycérol avec billes d'alginate avec enzymes sous air	214	126
Triglycérol avec billes d'alginate vides sous air	51	0

Tableau 49 : Comparaison des quantités d'oxalate et de tartronate par HPIC entre les différents modes de catalyse

Nous pouvons conclure d'après les résultats du Tableau 49 que du tartronate et de l'oxalate sont bien présents dans les échantillons de réactions d'oxydation, par le protocole enzymatique, en catalyse hétérogène. Les quantités d'oxalate détectées sont du même ordre de grandeur que dans le cas de la catalyse homogène, puisque nous obtenons avec le diglycérol environ 200 mg/ml (pour 230 mg/ml en condition homogène) et 126 mg/ml (pour 120 mg/ml en conditions homogène Tableau 40), dans le cas du triglycérol.

Toutefois, les quantités de tartronate formées sont totalement différentes. Nous obtenons 183 mg/ml de celui-ci dans le cas de l'oxydation du diglycérol en milieu homogène, pour presque deux fois plus en catalyse hétérogène (343 mg/ml). Enfin, dans le cas du triglycérol, il y a 241 mg/ml de tartronate formés en catalyse hétérogène, soit presque dix fois plus que dans le cas homogène (19 mg/ml, Tableau 40).

Cependant, le pH n'étant pas en accord avec les quantités d'oxalate et de tartronate observées, ces derniers résultats sont à prendre avec précaution : l'HPIC n'est pas toujours une méthode bien répétable.

3.3 Conclusions

La catalyse hétérogène appliquée au protocole d'oxydation par voie enzymatique CE6 nous a permis de diminuer la destruction de l'enzyme au cours de la réaction, tout en assurant la formation d'acides carboxyliques comme le CG oxydé et l'acide glycérique. La laccase ainsi fixée dans le gel sans produit toxique est, par ailleurs, un catalyseur facile à fabriquer et peu coûteux.

L'augmentation de la sélectivité pour le CG oxydé est enfin un des résultats les plus importants de ces travaux. Des essais dans les mêmes conditions ont donc été réalisés afin d'oxyder des substrats plus complexes comme le diglycérol et triglycérol. Cela n'a pas fonctionné. L'hypothèse a donc été émise que la diffusion du substrat ne serait pas suffisante pour que la réaction se déroule correctement. Une diminution des conversions des substrats a aussi été observée dans le cas du glycérol et du CG. Nous proposons donc, dans le chapitre suivant un ensemble de solutions pour remédier à ces freins.

Chapitre 4 : Améliorations et perspectives

4.1 Hypothèse d'amélioration concernant la catalyse hétérogène

4.1.1 Amélioration en vue d'une application sur le di et le triglycérol

Comme constaté dans le chapitre 3, les réactions d'oxydation par voie enzymatique en catalyse hétérogène et ayant pour substrat le diglycérol ou le triglycérol n'aboutissent qu'à de très faible quantité de produits, voire pas du tout. Nous avons donc émis l'hypothèse que, puisque la réaction fonctionnait en catalyse homogène, le problème aurait pour origine la diffusion des réactifs et en particulier, au substrat. En effet, le gel d'alginate actuellement fabriqué présente peut-être une porosité trop faible pour permettre la régénération du TEMPO ou encore les interactions nécessaires entre le substrat et la laccase.

Afin de remédier à ce problème, nous proposons d'augmenter la porosité du gel d'alginate contenant les enzymes. L'alginate de cuivre se prête particulièrement bien à la création de porosité.

Nous proposons donc l'utilisation d'aérogels formés à partir des hydrogels alginate de cuivre-laccase car 99% de celui-ci est fait d'air, ce qui améliore l'accessibilité pour le substrat (Di Renzo, et al., 2005). (Ouwerxa, Velingsa, Mestdagha, & Axelosb, 1998). Il est important d'avoir choisi l'alginate de cuivre car comme démontré précédemment, cette association est celle qui favorise la formation de canaux et de macroporosité dans le gel au cours de son séchage. Des essais devront être effectués afin de trouver le meilleur ratio alginate/cuivre sera le meilleur pour obtenir un maximum de canaux au moment du séchage. Ces aérogels seraient imprégnés d'enzymes puis utilisés en synthèse après hydratation dans l'eau.

L'idée de minéraliser les gels d'alginate afin d'augmenter le phénomène de fabrication de canaux au cours du séchage pourrait aussi être un point de réflexion (Figure 177) (Di Renzo, et al., 2005).

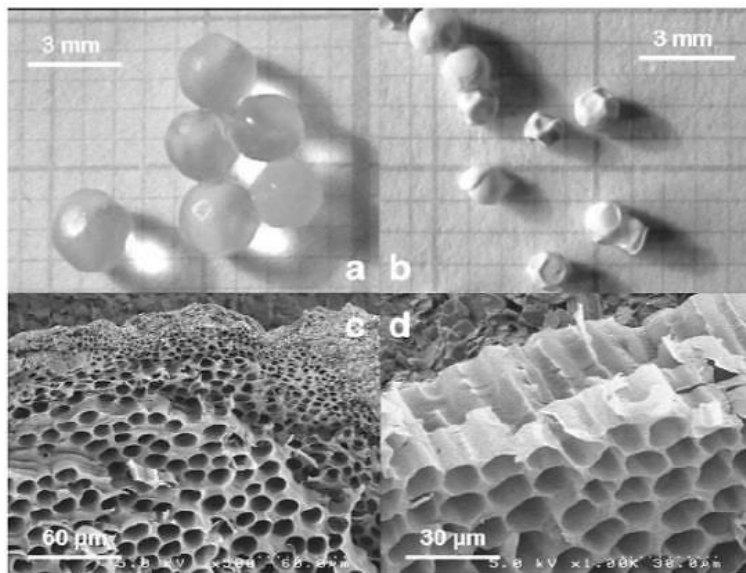


Figure 177 : Hydrogel d'alginate minéralisé (à droite) au cours de la gélification à gauche et aérogel formé par la suite à partir du précédent à droite (Di Renzo, et al., 2005)

En revanche, l'oxydation du glycérol et du CG se déroule très bien en catalyse hétérogène. Les billes d'alginate contenant les enzymes limitent la conversion du substrat mais les produits d'intérêts sont bien formés. Le recyclage de la laccase est donc assuré. En revanche, celui du TEMPO est toujours non résolu. Ainsi, dans le but de remédier à ce frein, mais aussi d'augmenter les volumes de milieu réactionnel (échelle pré-pilote), nous proposons un nouveau design de réacteur.

4.1.2 Proposition d'un nouveau réacteur pour l'application de la catalyse hétérogène avec le protocole enzymatique dans le cas de l'oxydation du glycérol et du CG

Nous proposons le design d'un réacteur autoclave utilisant les billes d'alginate contenant la laccase et une membrane de filtration dans le but de récupérer le TEMPO (toujours libre dans le milieu). L'autoclave est utilisé afin de ne pas perdre de TEMPO. La membrane devrait avoir un seuil de coupe inférieur à 150 KDa, c'est-à-dire en dessous de la masse molaire du TEMPO.

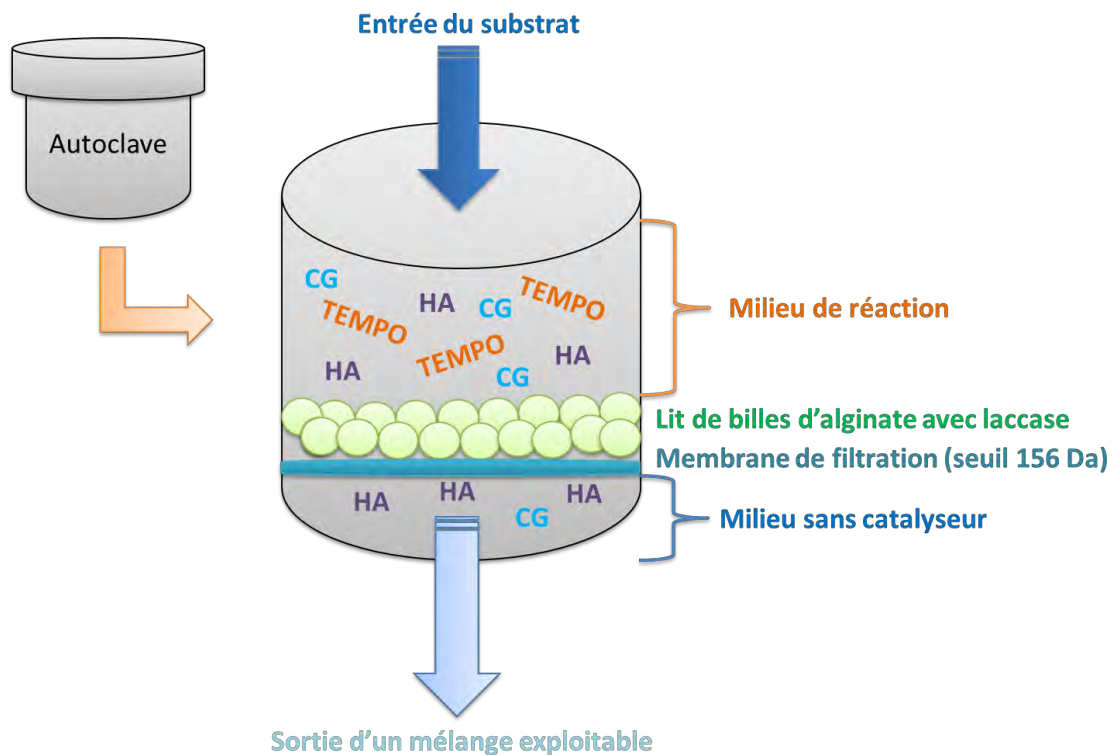


Figure 178 : Proposition d'un réacteur autoclave avec lit d'alginate et une membrane de filtration utilisable pour CE6 sur CG ou sur glycérol

Ainsi, le liquide contenant le CG ou le glycérol entre dans le réacteur (Figure 178). Il réagit avec le TEMPO, libre, et avec la laccase piégée dans les billes d'alginate qui forment un lit au fond de l'autoclave. Le milieu réactionnel sort alors au travers de la membrane qui retient le TEMPO dans l'enceinte. Ainsi, nous récupérons, en sortie, un mélange uniquement composé d'HA et de substrat de départ. Une réinjection de ce liquide est envisageable jusqu'à obtenir une conversion maximale.

Nous avons donc présenté une nouvelle organisation pour le réacteur. Nous offrons maintenant une amélioration de la structuration du milieu réactionnel afin d'augmenter les rendements en HA.

4.2 Proposition de nouvelles organisations pour le milieu réactionnel de la catalyse enzymatique CE6

4.2.1 Utilisation d'un milieu biphasique pour l'amélioration des rendements en acide glycérique

4.2.1.1 Proposition d'une nouvelle organisation pour le milieu réactionnel

Un des facteurs limitants de la réaction d'oxydation du système catalytique TEMPO/laccase sur glycérol est la mauvaise diffusion du dioxygène dans le milieu (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). D'après nos expériences, nous ajouterons également qu'un apport trop fort de celui-ci est délétère pour les rendements en acide, puisque le flux de gaz permettant un enrichissement du milieu en dioxygène cause la perte du TEMPO par entraînement. Ainsi, nous souhaiterions améliorer la dissolution du dioxygène dans le milieu tout en diminuant le flux de gaz nécessaire.

Au regard des données sur la solubilité du dioxygène en fonction du solvant, il s'avère que ce dernier est très peu soluble dans l'eau (solubilité du dioxygène dans l'eau = 0,23 (Frassoldati, 2011)). En revanche, les chiffres élevés de la solubilisation de ce gaz dans des milieux moins polaires (solubilité du dioxygène dans le n-heptane > 9,2 (Frassoldati, 2011)) nous ont donc donnés l'idée de proposer l'utilisation d'émulsion dans le cadre de l'oxydation du glycérol par la voie enzymatique CE6.

Les émulsions présentent de grands avantages par rapport à un milieu aqueux : elles évitent l'échauffement du milieu et favorisent la réaction en créant des microréacteurs à l'intérieur de chaque micelle qui la constitue. Ainsi, les contacts entre les réactifs sont favorisés. Le dioxygène qui diffuse très faiblement dans l'eau pourrait être plus accessible en émulsion, permettant donc de favoriser son apport tout en conservant un milieu aqueux propice à la formation d'acides.

Cependant, pour que le dioxygène puisse être utilisé au sein des micelles de l'émulsion, il est important que ces dernières ne soient pas constituées de lipides capables de réagir avec le dioxygène (comme les insaturés par exemple). Il faudra donc choisir des lipides permettant une bonne diffusion du gaz sans réagir avec lui et assurant aussi l'intégration de la laccase dans la structure du liposome (Figure 179).

En effet, afin de pouvoir aussi récupérer, protéger et recycler les enzymes en fin de réaction, nous proposons une autre option que l'immobilisation en billes d'alginate, à savoir élaborer des émulsions dans lesquelles les protéines seraient intégrées. De cette manière, elles seraient préservées des altérations dues à la réaction, tout en étant en contact avec l'eau dans laquelle les autres réactifs sont localisés.

Des recherches bibliographiques sur les lipides constitutifs des organites cellulaires réalisant des réactions d'oxydation (mitochondrie, peroxysome, chloroplaste) seraient un bon point de départ afin de faire un parallèle entre les lipides couramment utilisés en chimie des émulsions (présentant des avantages de stabilité, de structuration) et ceux issus du vivant, afin d'être au plus proche de la philosophie du biomimétisme et d'une compatibilité future avec des végétaux.

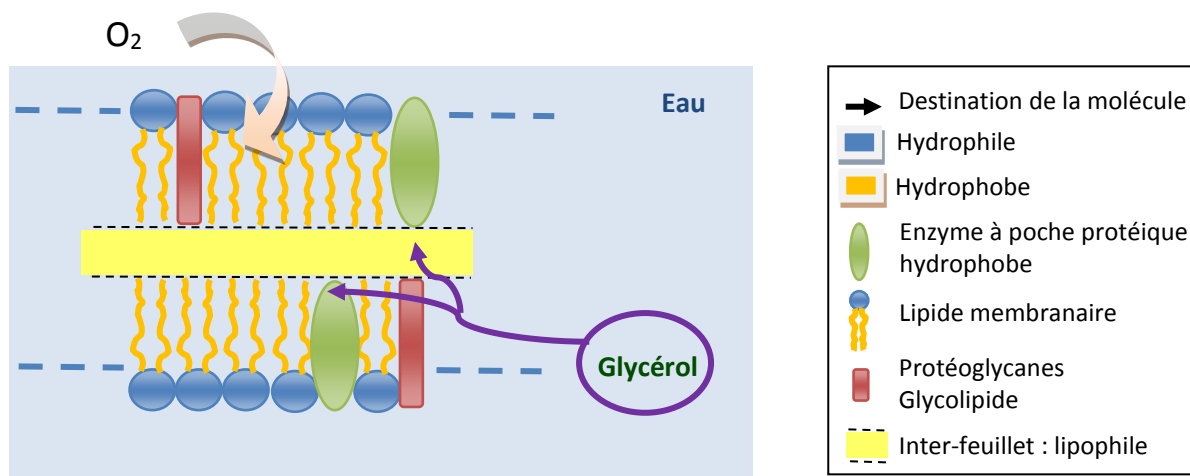


Figure 179 : Représentation de l'hypothèse de travail en émulsion

L'existence de transporteur membranaire du glycérol a par ailleurs été mise en évidence (Beltrán-Prieto, Kolomazník, & Pecha, 2013). Ceci constitue une piste dans l'amélioration du protocole d'oxydation avec le duo laccase/TEMPO associé à l'utilisation d'émulsion. Nous pourrions enfin envisager d'ajouter de l'alginate aux émulsions car celui-ci permet leur stabilisation (Ouwexa, Velingsa, Mestdagha, & Axelosb, 1998).

4.2.1.2 Localisation et intégration de la laccase pour l'utilisation de l'enzyme en émulsion

Afin de savoir si l'enzyme se situerait de façon bien intégrée dans les micelles, nous proposons de les marquer avec un fluorochrome. Ainsi identifiées, les protéines peuvent être révélées par microscopie confocale. Nous proposons ainsi les travaux de Zhang et al., pour le marquage de la laccase (Zhang, et al., 2013). Ceux-ci proposent ainsi de mélanger pendant vingt-quatre heures 10 mg de laccase avec 10 mg de FTIC (Fluorescéine isothiocyanate) dans du DMSO à l'abri de la lumière. Le liquide est ensuite placé dans une membrane de dialyse ayant un seuil de coupure de 14 000 Da en cellulose. Un lavage de trois jours est enfin pratiqué avec de l'eau milliQ afin de retirer l'excédent de FTIC non fixé à l'enzyme et le DMSO, toujours à l'abri de la lumière.

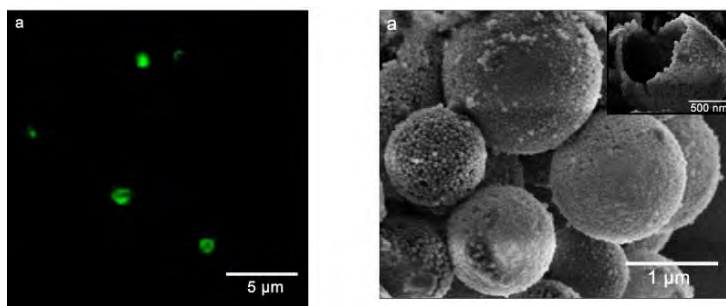


Figure 180 : A gauche les micelles fluorescentes traduisant la présence des enzymes dans les structures de droite vues en FE-SEM (Zhang, et al., 2013)

Une fois les enzymes marquées, il est nécessaire de les placer en émulsion. Pour ce faire, nous offrons de se baser sur les travaux de Marti, Zille, Cavaco-Paulo, Parra, & Cordech (Marti, Zille, Cavaco-Paulo, Parra, & Cordech, 2012). Ces derniers réalisent la microencapsulation des enzymes grâce à des films de lipides contenant de la phosphatidylcholine, lipide constitutif des membranes cellulaires (donc compatible avec nos attentes en termes de chimie verte et d'applications). Les films sont fabriqués à l'aide de la méthode dite de « film hydratation ». Des lipides sont ainsi mélangés à du chloroforme. Le solvant est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif afin de former un film homogène sur les parois du ballon. Cette fine couche est ensuite réhydratée avec une solution tamponnée contenant les enzymes.

D'autre part, il est possible d'utiliser des porines (ajoutées dans les couches des liposomes) afin de favoriser l'entrée des protéines dans les micelles (Marti, Zille, Cavaco-Paulo, Parra, & Cordech, 2012). En effet, ces canaux transmembranaires constituent un passage entre le milieu externe de la micelle, et son cœur.

4.2.2 Utilisation de milieux non conventionnels

Les enzymes sont des catalyseurs naturels qui proviennent d'organismes composés très majoritairement d'eau. Ainsi, ces catalyseurs effectuent toutes leurs réactions en milieu aqueux. Les descriptions des réactions les employant sont donc majoritairement effectuées dans des milieux riches en eau afin de se rapprocher de leurs optima de travail.

Dans ce type de milieu, les acides aminés (AA) subissent en permanence une tension sur leurs liaisons provoquées par les interactions avec les molécules d'eau. Ces dernières réalisent d'ailleurs, entre elles, des liaisons hydrogène qui vont par ailleurs appliquer sur la structure de l'enzyme une force de tension supplémentaire, la maintenant dans certaines conformations et la privant donc de degré de liberté. En effet, soumise à des tensions par l'eau, les AA ne peuvent pas se placer dans des configurations thermodynamiquement non favorables. L'enzyme conserve ainsi une forme spécifique.

Cependant, la protéine dans un milieu non conventionnel, c'est-à-dire où l'eau est remplacée par un solvant organique, lui permet de s'affranchir des tensions générées par les molécules d'eau. Les enzymes ont alors la capacité d'acquiescer des conformations « impossibles » ou défavorables en temps normal car les AA qu'elles contiennent, notamment les AA hydrophobes, ne sont plus contraints étant données leurs propriétés chimiques. Ainsi, une lipase peut devenir une estérase et catalyser la réaction inverse de sa réaction habituelle.

Travailler en milieu organique serait donc une piste à étudier, dans le but d'augmenter les rendements, d'obtenir des molécules nouvelles ou encore de favoriser la séparation des produits hydrophiles des catalyseurs solubles en fin de réaction, dans certains solvants hydrophobes.

Afin de ne pas tester une multitude de solvants, un état de l'art devrait être constitué ainsi qu'une étude des interactions possible entre le substrat, l'enzyme et le solvant par modélisation informatique. En effet, la laccase est une enzyme bien décrite. Reconstituer sa structure 3D serait donc envisageable grâce à la description de sa structure primaire.

4.3 Limites et nouvelles voies pour les méthodes analytiques employées

4.3.1 La spectrométrie de masse

Même si le signal des molécules obtenues par LC-HRMS est d'excellente qualité et fiable, car répétable, il est à noter que la méthode possède également deux limites :

- L'étude de petites molécules implique que celles-ci ne présentent pas de spectre spécifique. En effet, la fragmentation de molécules aussi simples n'entraîne pas la formation d'un spectre d'ions fils spécifiques à leur structure. Par conséquent, les acides organiques observés sont uniquement reconnaissables avec la forme de leur pic sur le chromatogramme, leur temps de rétention, leur masse exacte et le massif isotopique associé. Il est cependant à noter que l'utilisation du glycérol enrichi en ^{13}C a permis d'améliorer la fiabilité de détection. La transformation du substrat marqué en produits peut ainsi être suivie et l'accès à la masse exacte rend la détermination de leur construction beaucoup plus simple puisque la présence du ^{13}C donne un moins grand nombre de possibilités de structures.
- L'utilisation d'acide formique (ou même acétique) est indispensable à la bonne séparation des molécules. Cependant, ce dernier génère un bruit de fond fort qui rend plus complexe le travail de débruitage et d'analyse.

4.3.2 Propositions supplémentaires pour la RMN

En ce qui concerne le CG, l'absence de résultats fiables sur les fractions F3, F4 est en partie due à la concentration insuffisante de produits dans ces fractions, associées à des signaux forts comme celui du CG oxydé ou des restes de catalyseur qui masquent des molécules plus minoritaires.

En ce qui concerne le glycérol marqué au ^{13}C , d'autres utilisations pouvaient être envisagées. En effet, au lieu d'utiliser une molécule marquée sur ses 3 carbones, nous aurions pu faire la réaction sur un mélange de trois glycérol, chacun marqué sur un carbone différent. Cela aurait pu donner accès à des informations supplémentaires sur le déroulement de la réaction (localisation de la réactivité) mais aussi de diminuer les effets de couplage qui existe entre tous les ^{13}C lorsqu'ils sont sur une même molécule, rendant le travail d'analyse plus difficile en RMN. Dans la même idée, si nous avons introduit 50% de substrat totalement marqué et 50% de substrat non marqué, cela aurait permis de mettre en évidence d'éventuels réarrangements entre les molécules.

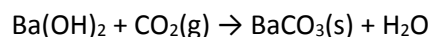
Par ailleurs, au lieu de concentrer les fractions associées aux réactions sur glycérol ^{13}C par une collecte longue, nous aurions pu réaliser un suivi cinétique d'une réaction et analyser directement par RMN le milieu total. En effet, le signal d'un glycérol marqué est très intense en RMN et aurait pu être dominant sur les autres molécules « parasites » permettant d'avoir une idée de l'évolution des produits au cours du temps.

Enfin, des analyses par IDMS (Isotopic Dilution Mass Spectrometry) auraient pu être effectuées grâce au glycérol marqué. Cette technique combine la spectrométrie de masse avec l'utilisation de molécules marquées au ^{13}C . Il s'agit d'effectuer la réaction dont nous cherchons à identifier les produits avec le substrat marqué. Puis, nous analysons en LCMS le milieu de réaction et des standards afin d'identifier et de quantifier chaque molécule. La présence de produits marqués permet d'avoir un signal spécifique à chacun.

Nous pouvons alors réaliser les réactions dont nous ne connaissons pas le résultat. Par exemple, si nous fabriquons un mélange inconnu, nous allons incorporer dans celui-ci une quantité précise du mélange marqué (préalablement cité et décrit). Par comparaison entre les signaux en LCMS de molécules marquées et non marquées, il sera alors possible de reconnaître chaque pic inconnu et de le quantifier.

4.3.3 La mesure du dégagement de dioxyde de carbone

Du dioxyde de carbone pourrait être produit au cours des réactions d'oxydation sur glycérol comme l'atteste la présence d'acide oxalique dans les milieux réactionnels, reflet d'une perte de carbone. Afin d'être le plus précis possible, il aurait fallu doser cette quantité émise. Pour se faire, nous proposons d'utiliser une solution d'hydroxyde de baryum à saturation. En présence de gaz carbonique, cette dernière se trouble et forme un précipité dont la masse est proportionnelle à la quantité de dioxyde de carbone formée, comme indiqué ci-dessous :



Cette manipulation n'a pu être réalisée mais elle aurait permis de compléter les bilans de matière effectués.

4.4 Perspectives : Une nouvelle voie pour les HA du glycérol et du CG

4.4.1 Une voie alternative pour la synthèse des HA ?

Il existe une autre voie potentielle de synthèse pour les HA : les polyoxométallates (POM). Il s'agit d'un ion polyatomique, généralement un anion, qui contient un atome central de métal, noté M, entouré par d'autres atomes, souvent de l'oxygène. Les métaux qui les constituent (vanadium (V), niobium (V), tantale (V), molybdène (VI), tungstène (VI)...) sont généralement dans un état d'oxydation élevé. L'ensemble forme un grand « cadre » fermé en 3 dimensions. Ils font ainsi partie des clusters polynucléaires de type métal-oxygène (Mouret, 2014). Les POM peuvent aussi contenir des hétéroatomes (nommé X) également appelés éléments primaires ou centraux qui sont différents de M (nommé addenda). Ces molécules sont caractérisées par leur rapport du nombre de M sur celui de X et sont définies comme des hétéropolyanions de formule $X_mM_nO_o$ avec $m \leq n$ (Mouret, 2014).

Un exemple de la bibliographie est l'anion phosphotungstate $[PW_{12}O_{40}]^{3-}$ qui est constitué d'un « cadre » de douze oxyanions de tungstène octaédrique entourant un groupe phosphate central.

Neumann & Levin indiquent que certains hétéropolyoxométallates, dans un état photooxydés, sont activés et ainsi capables dans ces conditions de réaliser la déshydrogénation de substrats (Neumann & Levin, 1991). D'autre part, l'utilisation du peroxyde d'hydrogène avec un POM, peut servir de précurseur pour l'oxydation des alcools (Rohit, Kala Raj, & Manikandan, 2007), (Sloboda-Rozner, Alsters, & Neumann, 2003) (Wang, et al., 2005). En outre, le dioxygène peut aussi être employé dans le même objectif (Maayan, Ganchegui, Leitner, & Neumann, 2006) (Ben-Daniel, Alsters, & Neumann, 2001), (Molinari, Maldotti, Bratovcic, & Magnacca, 2013). Ainsi, un exemple à retenir pour nos travaux est l'oxydation photocatalytique du glycérol dans un réacteur en pyrex, (Molinari, Maldotti, Bratovcic, & Magnacca, 2013) :

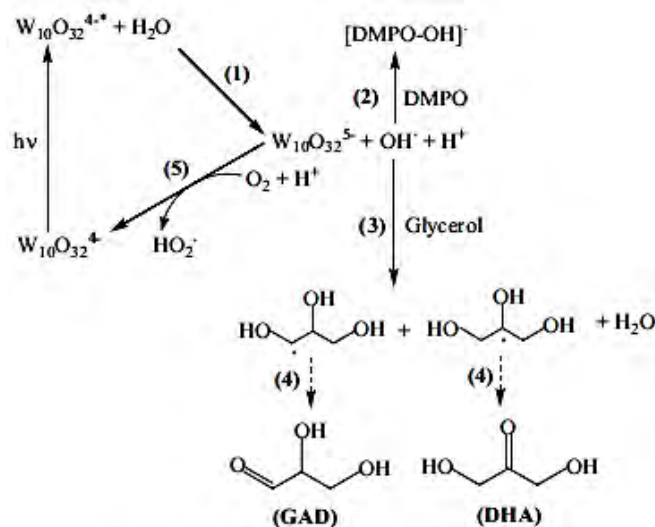


Figure 181 : Activation du POM par les photons et oxydation des alcools via le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Molinari, Maldotti, Bratovcic, & Magnacca, 2013)

Cependant, cette catalyse nécessitant l'emploi d'un réacteur indisponible chez Agronutrition n'a donc pas été testée.

Les POM présentent par ailleurs une capacité de recyclage élevée. Envisageables sous forme de poudre (Maayan, Ganchegui, Leitner, & Neumann, 2006) il est aussi possible de les employer en structure LDH où ils sont alors protégés et donc réutilisables (Song & Tsunashima, 2012). D'autre part, les POM sont adaptés pour une utilisation en émulsion car il est possible de leur greffer des groupements hydrophobes leur conférant ainsi des propriétés amphiphiles indispensables à la formation de micelles. Ces additions peuvent se faire par liaisons électrostatiques entre le POM et des groupements polymères/complexes/molécules, ou par liaisons covalentes (Song & Tsunashima, 2012), (Zhang, Yin, Haso, Hu, & Liu, 2013).

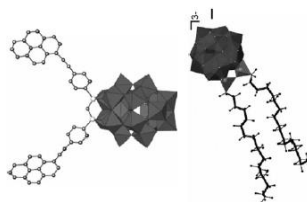


Figure 182 : liaison de POM avec des molécules organiques hydrophobes par liaison covalente (Zhang, Yin, Haso, Hu, & Liu, 2013)

Le greffage de groupe(s) hydrophobe(s) sur le POM se fait par utilisation d'un POM lacunaire c'est-à-dire privé d'un ou de plusieurs de ses groupements, nommés « addenda ». Les hybrides tensioactifs ainsi constitués peuvent s'associer entre eux pour former une multitude d'organisation tels que des films, des micelles, des fibres, des capsules (Song & Tsunashima, 2012). Cet auto-assemblage des hybrides de POM permet de faciliter leur récupération et donc leur recyclage par rupture de l'émulsion et/ou sédimentation en fin de réaction.

La meilleure illustration de cette propriété est l'émulsion "Pickering" à base de POM. Celle-ci est stabilisée par des particules solides qui sont adsorbées sur l'interface entre les deux phases constituant l'émulsion (Zhang, Yin, Haso, Hu, & Liu, 2013). Si les POM formant ces particules ont en plus des propriétés catalytiques, le catalyseur se trouve alors dans une zone stratégique (Zhang, Yin, Haso, Hu, & Liu, 2013). L'émulsion « Pickering » permet en fait l'obtention de gouttes micrométriques faisant office de microréacteurs permettant de récupérer le catalyseur solide en fin de réaction par simple centrifugation et filtration (Rohit, Kala Raj, & Manikandan, 2007). Le travail de Leclercq, et al., présente par exemple l'association électrostatique de cations alkyl (alkyl = décyl/dodécyl) tétradécyltriméthylammonium (nommé Cn, « n » de 6 à 16) avec le POM anionique catalytique $[PW_{12}O_{40}]^{3-}$ pour donner des nanoparticules sphériques et monodispersées capables de stabiliser les émulsions en présence d'eau et de solvant aromatique (Leclercq, et al., 2012). Nous avons donc un système triphasique basé sur un surfactant catalytique. D'autre part, les nanoparticules sont simples à fabriquer, par simple échange de cations. Ainsi, les précédents auteurs mélangent une solution de $H_3PW_{12}O_{40}$, y ajoutent de l'alkyltétradécyltriméthylammonium et obtiennent après agitation à 1500 rpm à 25°C un précipité : $[Cn]_3[PW_{12}O_{40}]$ amphiphile et solide.

Ainsi, les émulsions Pickering sont adaptées à des réactions d'oxydation en utilisant du dioxygène ou du peroxyde d'hydrogène. Les POM amphiphiles créés stabilisent l'émulsion et se trouvent à l'interface entre l'eau et le solvant organique, lieu de rencontre des réactifs. Jallet, et al., indiquent cependant que ce sont les POM de type Keggin $[PW_{12}O_{40}]^{3-}$ associés à des cations amphiphiles qu'il faut privilégier car ils ne sont pas solubles dans l'eau et préfèrent former des émulsions de type Pickering (en milieu biphasique eau/huile) (Jallet, et al., 2014). Tous les POM ne forment donc pas des émulsions (pour plus de détails sur les POM adaptés au Pickering, se référer à la thèse de (Mouret, 2014, pp. 92-102)).

Certaines difficultés demeurent cependant pour le choix de ce type de catalyseur. Tout d'abord, ils sont surtout utilisés avec des alcools exclusivement secondaires (Neumann & Levin, 1991), et (Khenkin & Neumann, 2006)) ou benzyliques. Ainsi, la catalyse n'est pas spécifique des alcools que nous ciblons (polyols, alcools primaires). Toutefois, certains POM possèdent une large gamme de substrats possibles et aucune donnée n'indique que les alcools primaires ne seraient pas des substrats adaptés. Il faudra donc veiller à bien exclure ceux qui présenteraient une spécificité pour les alcools secondaires (Sloboda-Rozner, Alsters, & Neumann, 2003), ainsi que ceux mettant en jeu des solvants toxiques ne peuvent être sélectionnés (Ben-Daniel & Neumann, 2003).

Par ailleurs, le choix de ce type catalyseur ne permet pas de s'inscrire jusqu'au bout dans une démarche de biomimétisme. Les conditions employées pour les synthèses sont respectueuses de l'environnement et proche du vivant (eau etc.) mais le catalyseur n'est pas de nature biologique. D'autre part, compte tenu des questionnements actuels sur les nanoparticules est à frein à l'utilisation des POM.

4.4.2 Applications potentielles futures pour les HA issus de l'oxydation du CG et du glycérol par la voie enzymatique CE6

Les produits d'oxydation du CG et du glycérol permettent de revendiquer une nouvelle filière de valorisation. Cependant, les propriétés de nouveaux produits, comme le CG hémiacétal ou de produits connus mais non utilisés pour des applications agronomiques tel que l'acide glycérique, doivent être étudiées sur le plan de la biodégradabilité et de la toxicité.

La valorisation des HA pose aussi la question de leur statut dans le domaine commercial. En effet, actuellement, nos produits feraient partie des additifs agronomiques mais une nouvelle détermination, (liée à la découverte de nouvelle fonction à la suite de l'étude approfondie des substances) est peut-être possible.

4.4.2.1 La chélation des HA

Actuellement, l'étude des capacités chélatantes (ou autre) du CG oxydé n'ont pas été étudiées car le standard n'est pas disponible sur le marché et nécessiterait une quantité assez conséquente de produit à fabriquer et isoler. Quant à l'acide glycérique, il n'est pas utilisé comme chélatant. Ainsi, aucune étude ne décrit ses propriétés de façon claire.

Ces produits devraient donc suivre une batterie d'essais pour tester les propriétés chélatantes. Cependant, la présence de fonction carboxylique et du groupement carbonate (CG oxydé), ou alcool (acide glycérique) laisse présager de bonnes aptitudes. Il est enfin possible de réaliser des esters et des molécules complexes à partir de ces HA dans le but de mimer les esters constituant les cires végétales.

4.4.2.2 *Elaboration de formulations et de nouveaux produits pour la nutrition des plantes à partir des HA fabriqués*

4.4.2.2.1 *Les agents de chélation*

L'acide glycérique, le CG oxydé, l'acide oxalique, l'acide tartronique, mésoxalique, ou encore glyoxylique pourraient être utilisés seul, ou en association les uns avec les autres (à savoir que plusieurs molécules prennent en charge un même atome de métal), dans le but de former une solution aux propriétés chélatantes. La purification de ces différents acides carboxyliques n'est donc pas nécessaire, puisque de par leur structure d'hydroxyacides, la chélation serait possible avec toutes les molécules présentes dans le mélange. Les solutions d'HA que nous proposons au travers de ces travaux d'oxydation sur le glycérol et le CG sont donc importants puisque l'intégralité des produits sont valorisables dès la sortie du réacteur et fonctionnent de concert pour la protection des éléments nutritifs à vectoriser.

Par ailleurs, ces HA peuvent être utilisés pour des synthèses d'agents de chélation plus complexes. La polymérisation des hydroxyacides, fabriqués par le protocole enzymatique CE6 à base du glycérol ou du CG, donnerait ainsi naissance à un ensemble d'acides polycarboxyliques. Ces derniers ne transporteraient alors plus un unique métal, mais plusieurs au sein d'une unique molécule. Les fonctions alcools, acides carboxyliques, mais aussi carbonates, contribueraient alors de façon simultanée au transport et à la chélation.

4.4.2.2.2 *La fabrication de cires proches des celles des plantes*

La polymérisation n'est pas la seule solution pour la fabrication de composés d'intérêt pour la fertilisation. En effet, nous avons constaté que la compatibilité avec les barrières de la plante constitue un point clef de la vectorisation des éléments nutritifs. Dans cet objectif, nous proposons d'estérifier les HA formés afin de fabriquer des composés mimant les cires végétales déposées sur les feuilles. Le CG oxydé se prête très bien à cette application, comme cela est d'ailleurs proposé dans les brevets WO 1999029170 A1 et WO 2011157551 A1 où les esters de CG sont des additifs agronomiques.

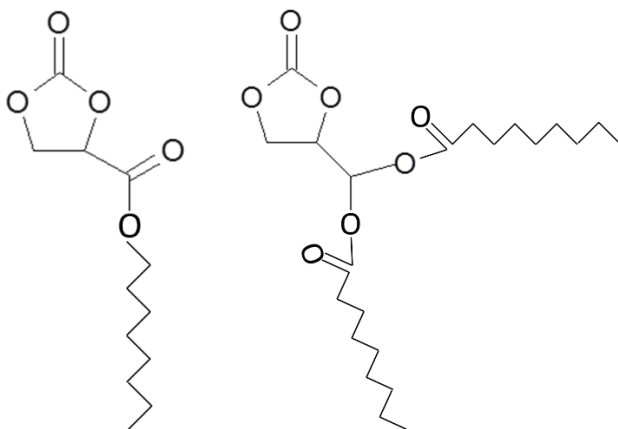


Figure 183 : Ester de CG élaboré à partir d'un alcool gras et du CG oxydé (à gauche) ou du CG hémiacétal (à droite)

Nos travaux apportent donc la possibilité de former des esters similaires aux cires de la plante (à gauche, Figure 183) mais présentent aussi une perspective nouvelle avec la fabrication de diesters à partir du CG hémiacétal (à droite, Figure 183) obtenu au cours de l'oxydation par le duo laccase /TEMPO présenté auparavant.

4.4.2.2.3 Les oligocarbonates de 3BCARII et la fabrication de polycarboxyliques

Au cours du projet avec notre partenaire industriel Agronutrition, des oligocarbonates (Figure 184) ont été fabriqués. Ceux-ci possèdent des fonctions hydroxyles pendantes (**en vert**, Figure 184) que nous pourrions essayer d'oxyder avec la voie enzymatique CE6 dans le but d'obtenir une nouvelle catégorie de polycarboxyliques.

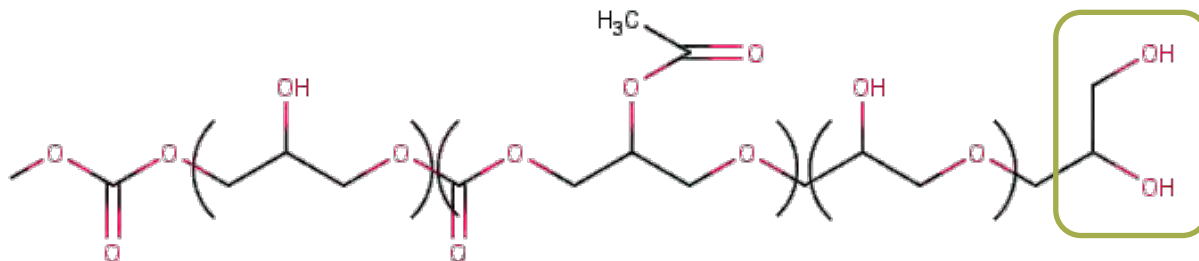


Figure 184 : Acides polycarboxyliques hypothétiques, issus de l'oxydation des oligocarbonates fabriqués dans le cadre du projet 3BCAR

4.4.2.3 De l'additif agronomique au biostimulant

Nos produits sont actuellement qualifiés d'additifs agronomiques. En effet, leur capacité à stimuler le métabolisme de la plante du fait de leur propre activité (indépendamment du contenant en métal) n'a, pour le moment, pas été testée.

Cependant, nous avons pu constater que le glycérol et les HA qui en découlent présentent des structures identiques aux intermédiaires métaboliques du végétal (cycle de Calvin-Benson, glycolyse, transports dans la plante dans le chapitre un). Par ailleurs, certains sont connus comme chélatant tel que l'acide oxalique.

Il est donc possible qu'une molécule comme l'acide glycérique, de par son aspect identique avec le 3-phosphoglycérate, puisse entrer dans le cycle de Calvin (après l'ajout d'un phosphate, Figure 185) et donc être traitée comme une molécule énergétique par la plante. Ainsi, l'acide glycérique deviendrait un biostimulant en plus d'un chélatant pour la plante. Cette capacité doit aussi être démontrée pour le CG oxydé et ses esters par des études énergétiques et cellulaires en présence de ces composés.

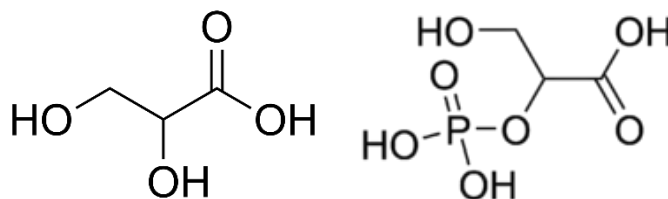


Figure 185 : Acide glycérique à gauche, phosphoglycérate à droite

Chapitre 5 : Partie expérimentale

5.1 Protocoles des réactions testées au cours de la thèse

L'ensemble des réactifs utilisés au cours de la thèse sont référencés p.314 en annexe 2.

5.1.1 Protocole enzymatique avec le système laccase/TEMPO CE6 en catalyse homogène

5.1.1.1 Paramètres de la réaction

Les quantités de réactifs introduites sont indiquées Tableau 50.

Protocole d'origine est celui des travaux de Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz (Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009). Les quantités de réactifs introduites sont :

Molécule	Substrat (glycérol, CG, triglycérol, diglycérol)	Laccase	TEMPO	Tampon acétate de sodium (milieu réactionnel)
Concentration requise	$100 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	10 unités /ml	$30 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (93,75 mg)	pH 4,5 20 ml à $100 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

Tableau 50 : Quantités de réactifs demandées pour la réalisation du protocole CE6

Nous plaçons d'abord le mélange tampon-substrat dans les ballons, puis nous ajoutons les réactifs (le TEMPO et l'enzyme préalablement pesés à la balance de précision et mis chacun dans un contenant indépendant).

Remarque : Pour l'oxydation du glycérol marqué, le substrat utilisé est marqué sur ses 3 carbones au carbone 13 et a pour référence : glycérol ^{13}C , 99,7% CAS 63346-81-6 TRC-Sigma Aldrich. Quant aux réactions du PEX, l'apport de dioxygène a été fait à l'aide de frittés de porosité zéro, à la place des seringues.

Le pH du mélange est mesuré en début et fin de réaction car ce dernier doit être de 4,5 en présence de tampon acétate pour que les enzymes soient dans les conditions les plus favorables pour leur activité. La réaction a lieu en multi-réacteurs, entre 21 à 25°C, sous agitation mécanique à 500 rpm, pendant 9 heures. Certains milieux sont mis sous bullage de dioxygène (intitulé « sous atmosphère de dioxygène ») au moyen d'une seringue dont l'aiguille barbotte dans le milieu tandis que d'autres sont simplement sous air ambiant. Le montage de la réaction est en suivant (Figure 186).

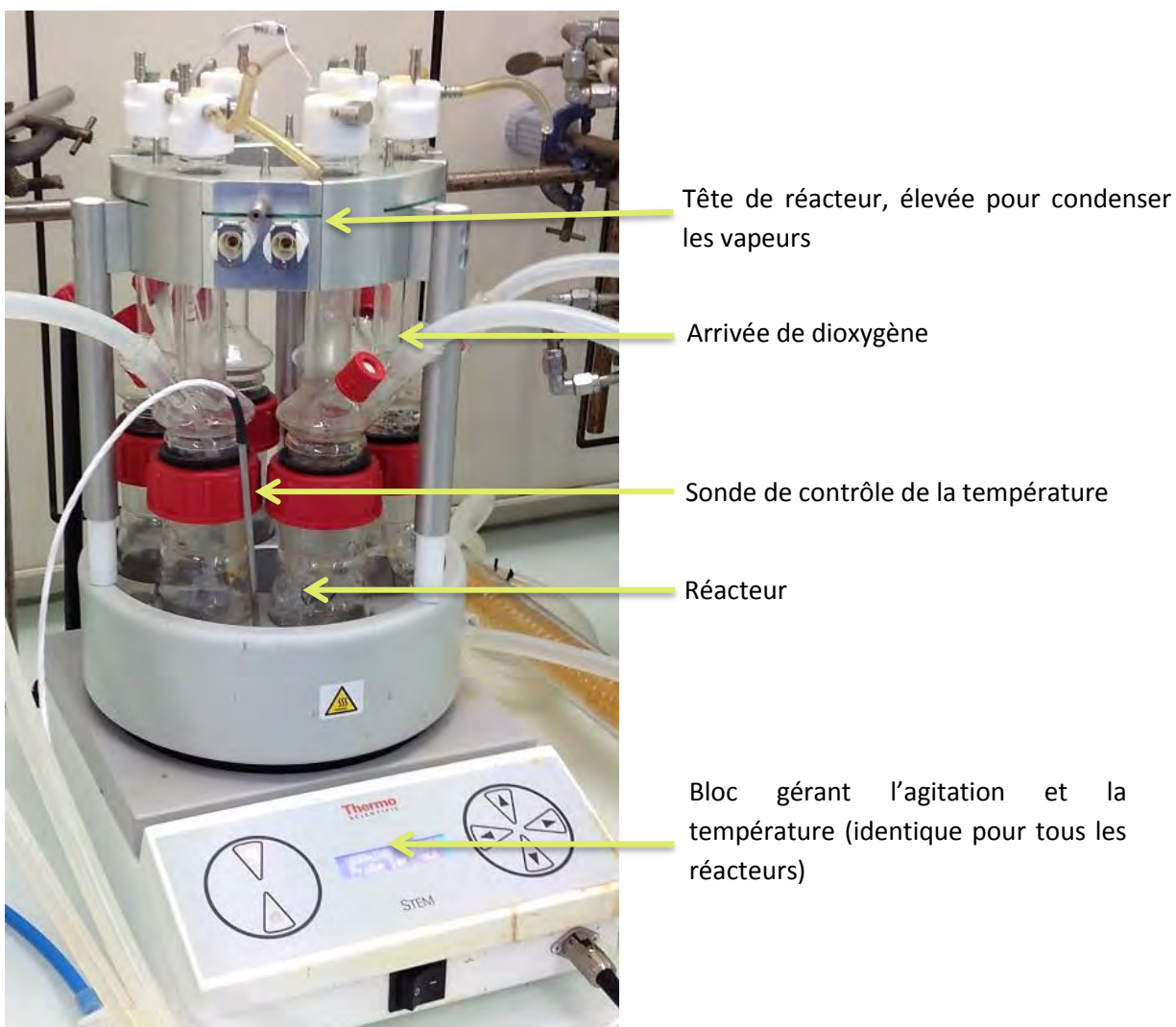


Figure 186 : Montage pour le système laccase/TEMPO (CE6) avec le réacteur en verre, ouvert

5.1.1.2 Traitement post-réactionnel

Après 9 heures de réaction,

- 1) Une filtration sur un filtre d'acétate de cellulose à 0,44µm des 20 ml de milieu,
- 2) Introduction du milieu réactionnel filtré dans une fiole de 50 ml et ajustement au niveau du trait de jauge avec l'eau milliQ.
- 3) Analyse de la solution
- 4) Evaporation à l'évaporateur rotatif puis stockage du résidu à 4°C.

5.1.2 Protocole avec l'ensemble de métaux non-nobles $Mn(NO_3)_2$ / $Cu(NO_3)_2$ associé à TEMPO, CC33

5.1.2.1 Paramètres de la réaction

Ce protocole est basé sur les travaux de Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero (Cecchetto, Fontana, Minisci, & Recupero, 2001). Les quantités de réactifs introduites sont :

Réactifs	Substrat	TEMPO	$Mn(NO_3)_2$	$Cu(NO_3)_2$
Quantité introduite (moles)	$12,5 \cdot 10^{-3}$ mol	$1,25 \cdot 10^{-3}$ mol	$0,25 \cdot 10^{-3}$ mol	$0,25 \cdot 10^{-3}$ mol

Tableau 51 : Quantités de réactifs nécessaires pour le système catalytique de CC 33

Tous les réactifs sont placés dans un ballon contenant 12,5 ml d'acide acétique pur. La réaction a lieu à 40°C pendant 9 heures, en multi-réacteur sous agitation magnétique, à 550 rpm. Chaque réacteur est placé sous bullage de dioxygène ou sous air ambiant amené par une tuyauterie en silicone et délivré par une seringue barbotant dans le milieu réactionnel (Figure 187).

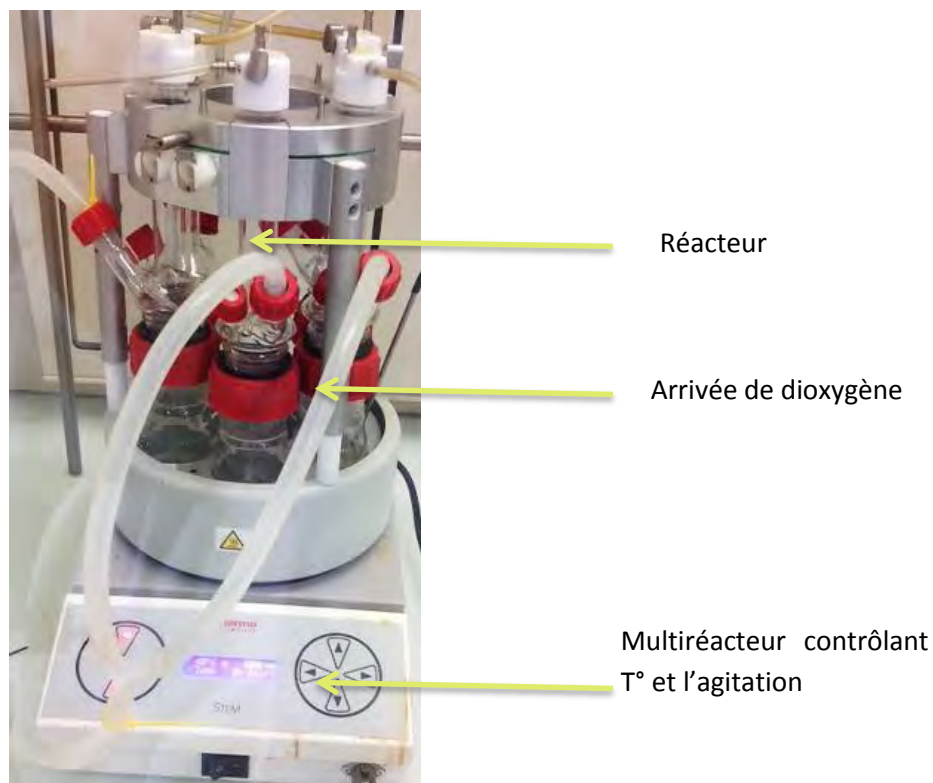


Figure 187 : Montage pour le protocole CC33

5.1.2.2 *Traitement post-réactionnel des échantillons*

Nous récupérons chaque milieu réactionnel et leur faisons subir la suite d'opérations suivante :

- 1) Filtration à 0,45 μm pour enlever les métaux en suspension dans le mélange sur acétate de cellulose,
- 2) Passage à l'évaporateur rotatif pour faire évaporer l'acide acétique,
- 3) Ajout d'eau (10 ml) dans l'échantillon évaporé afin de remettre l'ensemble en suspension,
- 4) Nouvelle évaporation afin d'enlever les traces d'acide acétique restantes. Si cela ne suffit pas, recommencer l'opération. Le pH doit être environ de 3. Le retrait de l'acide est nécessaire afin de pouvoir enlever les métaux du milieu réactionnel,
- 5) Une fois que le pH attendu est atteint, de l'eau milliQ est rajoutée afin d'être à un volume de 20 ml,
- 6) Introduction de la résine Amberlite IRC 748 (capacité cationique de 1,35 équivalent/kg). Dans chaque milieu de réaction, il y a $0,5 \cdot 10^{-3}$ moles de métaux. Ainsi, afin d'intégralement les retirer il faut : $0,5 \cdot 10^{-3} / 1,35 = 1,48 \cdot 10^{-3}$ kg soit 1,48 g de résine nécessaire. Nous multiplions par 6 cette quantité pour être sûr de ne pas être en conditions limitante, soit 9 g environ utilisés,
- 7) Cette résine est d'abord rincée avec 10 ml d'eau milliQ trois fois puis placée dans le milieu de réaction,
- 8) Les milieux sont ensuite agités pendant 3 heures et deviennent alors incolores et limpides,
- 9) La résine est ensuite filtrée du milieu à 0,45 μm sur acétate de cellulose,
- 10) Le milieu résultant est filtré à nouveau à 0,22 μm sur acétate de cellulose,
- 11) On ajuste alors le volume du liquide restant à 50 ml en fiole jaugée et on analyse ce milieu.

Ces opérations sont nécessaires car les métaux nuisent à la qualité des analyses et au matériel analytique. Il n'est donc pas envisageable de les laisser. Les échantillons en fin d'analyses sont évaporés et stockés à 4°C.

5.1.3 **Protocole pour l'oxydation du glycérol avec le HDL cuivre, aluminium, magnésium CC21**

Les conditions expérimentales sont données par les travaux de Zhou, et al., (Zhou, et al., 2011).

5.1.3.1 *Paramètres de la réaction*

5.1.3.1.1 **Préparation du catalyseur**

a) Solutions d'hydroxyde de sodium (soude) et de Na_2CO_3 nécessaires :

Utilisation de fioles jaugées pour la fabrication des solutions :

Solution à $C = 2 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH

Solution à $C = 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de Na_2CO_3

Solution à $C = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de Na_2CO_3

b) Détermination des quantités de métal à ajouter pour obtenir un HDL de ratio Cu/Al/Mg de 20 : 100 : 200 :

La procédure expérimentale fixant les quantités de $[\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}]$ et de $[\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}]$ à ajouter, indique un ratio molaire idéal des métaux de : 20 : 100 : 200 pour l'ensemble Cu/Al/Mg. Ainsi, nous obtenons :

$[\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}]$: 20,39g soit 0,10 mole (les masses prenant en compte l'hydratation)

$[\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}]$: 12,07 g soit 0,05 mole

Et $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}] = ?$ (Noté x en mole)

D'après les ratios entre les métaux fournis :

$$\begin{array}{llll} 20/100 = x \text{ mole}/0,05 & \text{ce qui donne :} & 20 \cdot 0,05 = 100 x & \text{ce qui donne :} & x = (200 \cdot 0,05)/100 \\ 20/200 = x \text{ mole}/0,10 & & 20 \cdot 0,10 = 200 x & & x = (20 \cdot 0,10)/200 \end{array}$$

Nous obtenons $x = 0,01$ mole de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$. Ainsi, il faut $m = n \cdot M = 0,01 \cdot 241,65 = 2,4165$ g arrondi à 2,42 g.

Réactifs	Masses réelles versées dans 200ml d'eau milliQ
MgCl₂, 6H₂O	20,397 g
Al(Cl)₃, 6 H₂O	12,077 g
Cu(NO₃)₂, 3 H₂O	2,426 g

Tableau 52 : Quantités de métaux utilisées pour former le HDL

c) Procédure de fabrication :

- 1) Mélanger les trois métaux Mg, Al et Cu selon le ratio : 20 : 100 : 200 dans 200 ml d'eau milliQ dans une fiole jaugée de 200 ml,
- 2) Transvasement de l'ensemble dans un ballon tricol de 250 ml,
- 3) Mise sous agitation magnétique du ballon à température ambiante (25°C). Prise du pH initial du mélange des métaux = 2,5 à 2,59,
- 4) Ajout d'une solution de soude NaOH de concentration 2 mol. L⁻¹ sous agitation magnétique jusqu'à atteindre un pH=10 stable. La formation de fils blancs et de paillettes oranges est observée.
- 5) Vérification, après 30 minutes d'attente, de la stabilité du pH. La valeur finale de celui-ci est de 10,3. En fin de réaction la solution est devenue laiteuse et bleue du fait de la présence du nitrate de cuivre,
- 6) Placer le ballon dans un bain d'huile à 70°C pendant 24 heures sous agitation douce (200 à 250 rpm). Le montage suivant illustre cette opération,

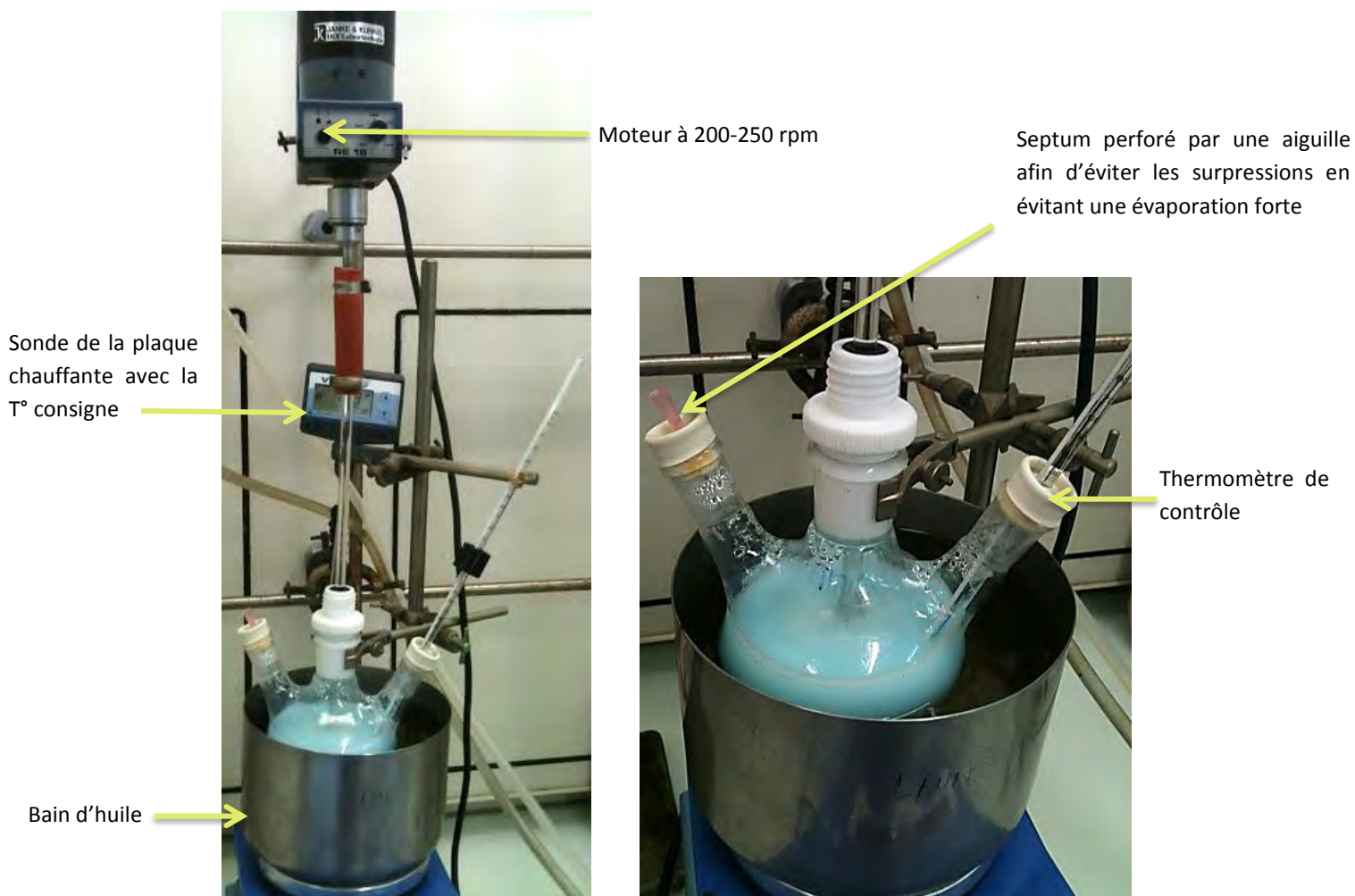


Figure 188 : Préparation au cours de l'étape 6

- 7) Après 24 heures, transvaser le contenu du ballon dans un récipient pour faciliter son refroidissement à température ambiante,
- 8) Nous centrifugeons alors l'ensemble pendant 12 minutes à 25°C (jusqu'à 20°C) à 5000 rpm. Un solide bleu parsemé de paillettes noires est obtenu dans le culot. Le surnageant issu de la centrifugation est translucide, limpide et presque incolore. Néanmoins il demeure une teinte bleutée très claire qui disparaît après une nuit de repos. Le culot obtenu est quant à lui collant, de consistance proche de la glaise humide (Figure 189),



Figure 189 : Produit obtenu après centrifugation et retrait du surnageant

- 9) Placer le solide 12 heures à 4°C puis le suspendre dans 250 ml de Na_2CO_3 à 0,1 mol.L⁻¹ dans un bécher de 500 ml,
- 10) Placer le bécher sous agitation mécanique à environ 200-250 rpm avec une tige de verre et une palle pendant six heures à température ambiante. Il est recouvert par un papier d'aluminium perforé qui n'est pas en contact avec le liquide,
- 11) Centrifuger le contenu du bécher à 5000 g pendant 12 minutes à 25°C. Le surnageant est alors retiré. L'eau milliQ est alors ajoutée afin de remettre en suspension le culot du pot,
- 12) Agiter vigoureusement et manuellement pour détacher les amas de solide afin de les solubiliser au maximum jusqu'à obtenir une solution d'aspect homogène,
- 13) Centrifuger le pot ainsi homogénéisé avec les mêmes paramètres. Les étapes 12 et 13 sont répétées trois fois,
- 14) Récupérer le solide après la dernière centrifugation est placé dans un cristalliseur recouvert de papier cuisson troué (l'aluminium est à proscrire car le catalyseur en contient et qu'il ne faudrait pas fausser les proportions des métaux). Déposer l'ensemble dans l'étuve à 103°C pendant 17 heures. Le produit résultant est bien sec, léger et présente des craquelures de séchage semblable à celle de l'argile lorsqu'elle est sèche (Figure 190),



Figure 190 : Catalyseur à la sortie de l'étuve

15) Mettre au four ce produit sec pour calcination à 650°C pendant 6 heures. Répartie la matière dans deux creusets différents. Récupération après calcination d'un produit de même aspect qu'avant calcination mais de couleur vert émeraude.

Il reste 6,221 g de catalyseur pour une quantité de 10 g avant traitement thermique. Le produit s'évacue très bien des creusets, les pots sont d'aspect très propre après calcination.

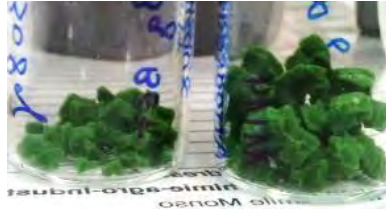


Figure 191 : Catalyseur une fois calciné 6 heures, 650°C

5.1.3.1.2 Protocole d'oxydation du glycérol

200 mg de catalyseur préalablement fabriqués sont broyés au mortier puis ajoutés aux autres réactifs déjà placés dans le ballon (5 ml d'une solution aqueuse de glycérol à 1 mol. L⁻¹ et 15 ml d'une solution aqueuse de soude à 2 mol. L⁻¹) une fois que la température de l'ensemble a atteint 55°C. Ce ballon de réaction a auparavant été fermé par des septums et un réfrigérant afin de limiter les pertes de milieu par évaporation. Un thermomètre est également placé dans un des septums.

Une fois la température de 60°C atteinte, le bullage de dioxygène est installé via une seringue (reliée à une bouteille de dioxygène) qui bulle dans le milieu, pendant les trois heures de réaction. Nous remarquons qu'au cours de la réaction, le catalyseur au départ de couleur vert émeraude devient bleu royal.

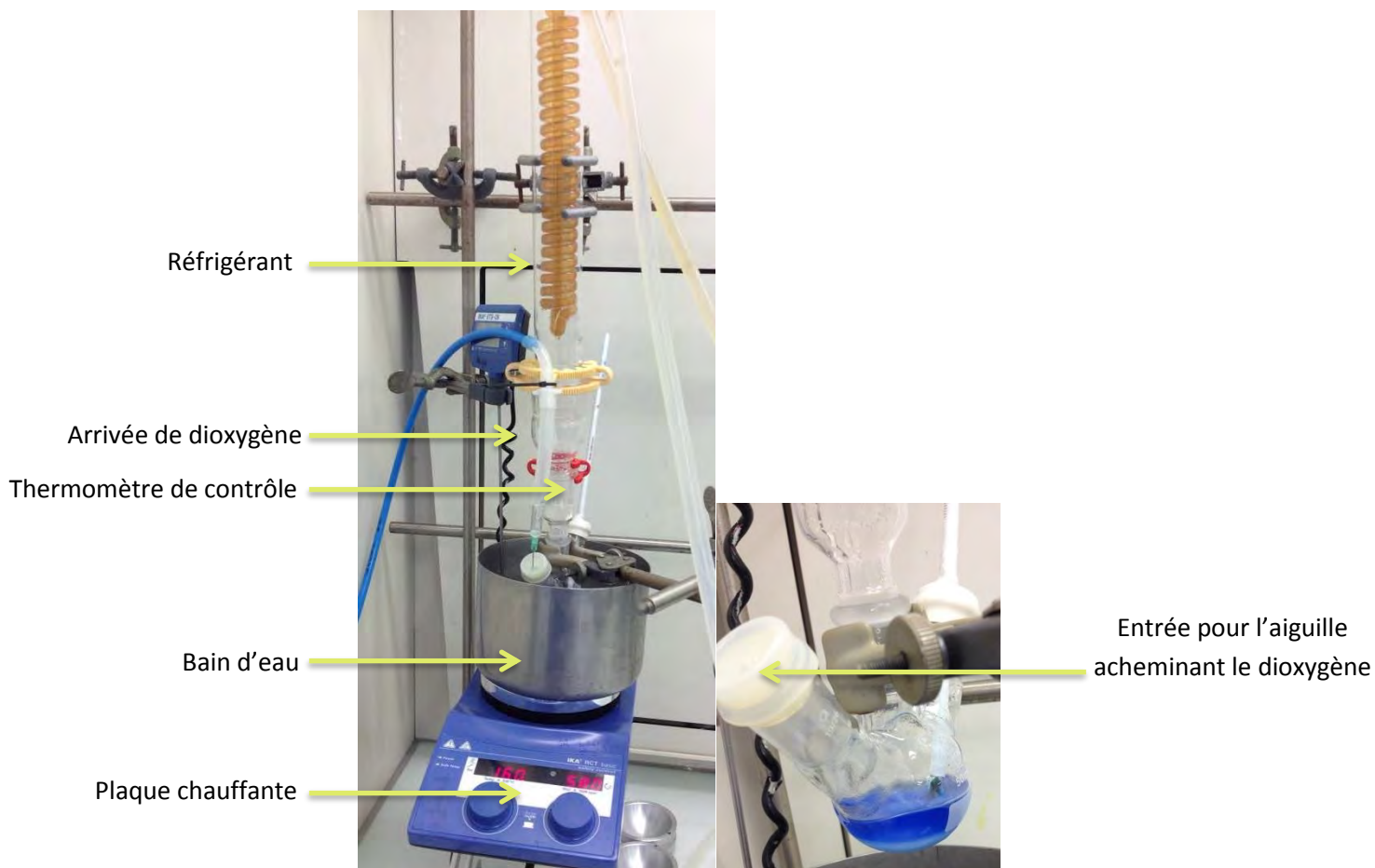


Figure 192 : Montage pour protocole CC21

5.1.3.2 *Traitement post-réactionnel*

- 1) Le liquide est vidé du ballon. Ce dernier est rincé à l'eau milliQ. Cette eau de rinçage est ajoutée au milieu réactionnel déjà récupéré,
- 2) Le milieu est alors filtré sur PTFE à 0,45 μm . Le liquide reste bleu mais devient plus clair. Cette opération permet d'enlever les grosses particules de catalyseur solubilisées ou en suspension dans le milieu,



- 3) Le filtrat est récupéré et nous y ajoutons de la résine amberlite IRC-748 en quantité précise après avoir nettoyé celle-ci à l'eau milliQ sur papier filtre, trois fois. Pour l'ensemble des métaux provenant du catalyseur et à extraire, il est nécessaire d'ajouter 3,5 g de résine,
- 4) L'ensemble résine-milieu réactionnel est placé sur plaque agitante pendant 3 heures,
- 5) Au bout de 3 heures, la solution devient limpide et incolore tandis que la résine devient bleue. Le liquide est alors récupéré à la seringue en évitant d'aspirer la résine et est filtré à 0,22 μm sur PTFE,
- 6) Le liquide obtenu est ensuite placé en fiole jaugée de 50 ml et ajustée avec de l'eau milliQ
- 7) Analyse de la solution
- 8) La solution est ensuite placée à l'évaporateur rotatif jusqu'à récupérer le résidu visqueux et blanc, stocké à 4°C.

5.1.4 Protocole d'oxydation du CG par le cuivre associé à du TEMPO : CC29

5.1.4.1 Paramètres de la réaction

Le protocole est tiré des travaux de (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011).

Réactifs	TEMPO	CuOTf	CG	N-imidazole	Bipyridine	Acétonitrile anhydre
Quantité introduite dans le réacteur	$0,5 \cdot 10^{-3}$ moles	$0,5 \cdot 10^{-3}$ moles	$10 \cdot 10^{-3}$ moles	$1 \cdot 10^{-3}$ moles	$0,5 \cdot 10^{-3}$ moles	50 ml

L'intégralité du montage est au préalable purger dans son intégralité avec du dioxygène. Pour se faire, le chauffe-ballon est ajusté à 50°C et toute la verrerie est positionnée dans le montage. Nous plaçons alors les différents septums : sur les deux entrées du ballon en verre et à la sortie du reflux. Du film plastique de paraffine est ensuite apposé sur toutes les jointures, y compris autour de l'aiguille du ballon de baudruche et autour du thermomètre enchâssé dans le septum. Nous piquons alors une aiguille dans le septum coiffant le reflux et une autre dans l'un des septums du ballon, et qui fait le lien avec la bouteille de dioxygène. Le système est ainsi purgé pendant une heure afin de chasser l'air et de laisser seulement du dioxygène. Le ballon de baudruche est ensuite rempli, via son entrée, avec du dioxygène, puis vidangé.

L'opération est répétée trois fois. Le ballon plein est ensuite mis en contact, via son aiguille, avec l'entrée du ballon en verre contenant les réactifs. Les produits sont alors ajoutés un par un à la seringue dans le montage sous dioxygène.

Chaque réactif a au préalable été placé pur dans un pot indépendamment des autres. L'acétonitrile anhydre nécessaire (50 ml) est prélevé à la seringue depuis la bouteille fermée (via la membrane du bouchon) et est placé dans une fiole jaugée (bouchée au film plastique de paraffine). Nous prélevons alors, à la seringue, depuis cette fiole, l'acétonitrile que nous ajoutons dans chacun des pots de réactifs, au travers du bouchon souple de chacun. Une fois ces solutions préparées et les produits bien solubilisés, nous repiquons au travers des bouchons pour récupérer les solutions que nous installons une par une dans le ballon en verre, via le septum (filmé en fin d'opération). La réaction dure 10 heures.

Comme indiqué dans la publication, la solution est passée de rouge brique foncé à vert bouteille foncé, une fois tous les réactifs ajoutés (Stahl, Hoover, & Shannon, 2011). Son pH est non mesurable puisque le milieu est non aqueux et que nous ne possédons pas les électrodes adaptées pour faire les mesures.

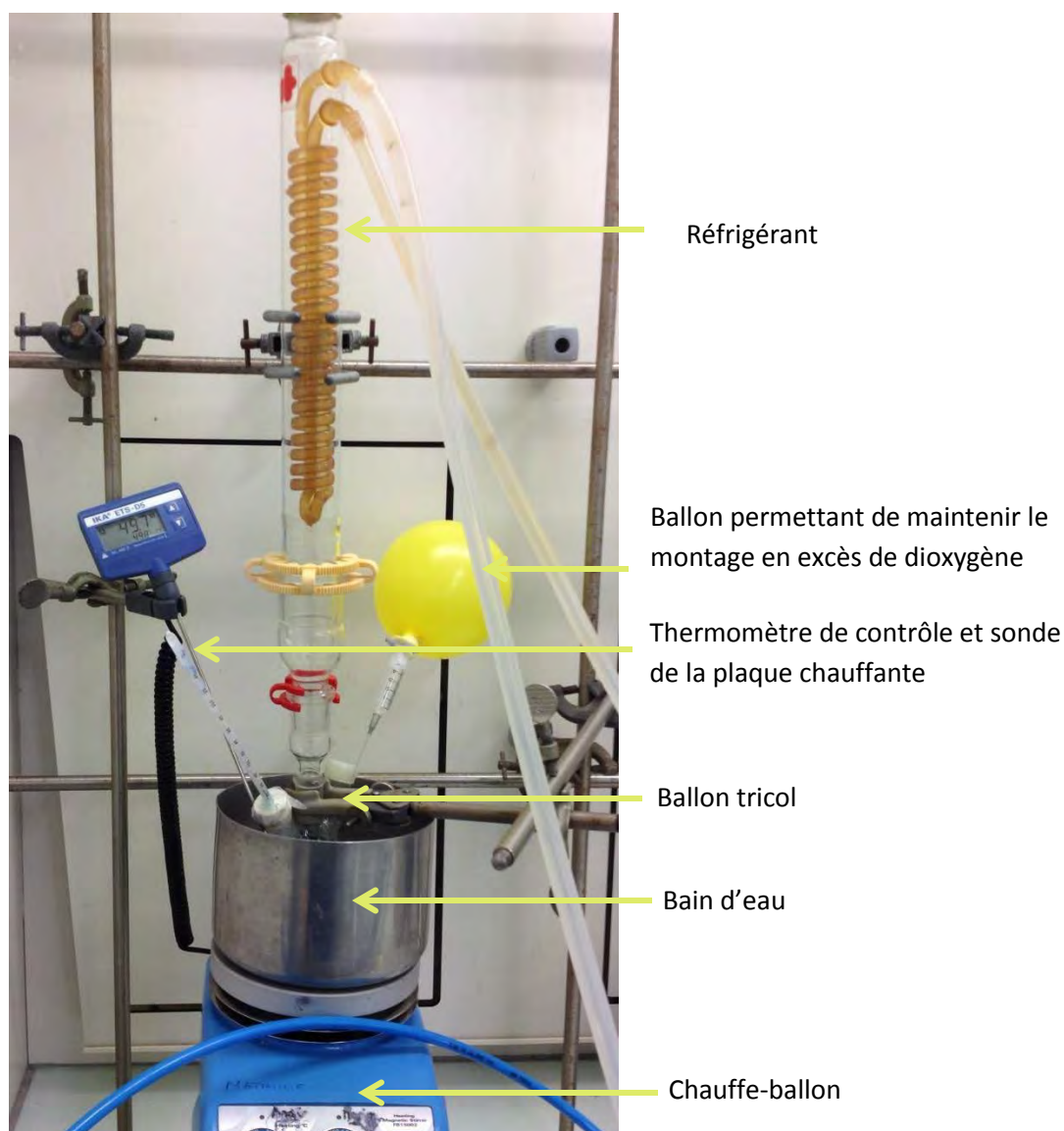


Figure 193 : Montage pour le protocole CC29

5.1.4.2 *Traitement post-réactionnel*

En fin de réaction, le contenu du ballon est filtré, puis l'acétonitrile est évaporé à l'évaporateur rotatif. Nous plaçons ensuite de l'eau milliQ au contact du résidu déposé au fond du ballon, et répétons l'opération d'évaporation (afin de bien retirer les traces d'acétonitrile car étant un modificateur de phase, il peut nuire à la qualité des analyses).

Nous réintroduisons alors 15 ml d'eau milliQ dans le ballon afin de dissoudre le résidu et de le verser depuis le ballon dans une fiole jaugée de 50 ml, dont le volume est ajusté avec de l'eau milliQ jusqu'au trait de jauge. La solution est ensuite analysée. Dans le but de stocker la solution restante, elle est placée à l'évaporateur rotatif. Nous obtenons un produit collant bleu nuit dû aux réactifs à base de cuivre, stocké à 4°C.

5.1.5 Protocole pour les analyses en chromatographie

5.1.5.1 Etude bibliographique des différents protocoles utilisés pour la caractérisation des produits issus de l'oxydation du glycérol par HPLC selon la chromatographie à exclusion ionique

1 ml de chaque solution des fioles jaugées de 50 ml préparées en fin de chaque protocole (CE6, CC33, CC21, CC29) est placé dans un vial de 4 ml. 40µL de ce milieu est alors analysé en mode automatique par l'HPLC Dionex WPS3000TSL, pendant 30 minutes, à un débit de 0,5 ml/min. Les détecteurs sont un RI (réfractomètre différentiel) et U.V (ultra-violets) à 210 nm.

L'identification d'une molécule inconnue est faite par comparaison entre le temps de rétention du pic associé à la substance indéterminée et le temps de rétention des standards issus de l'oxydation du glycérol.

5.1.5.1.1 Mise au point des conditions d'analyses en HPLC

Ci-dessous, est présenté le tableau récapitulatif d'une cinquantaine d'articles proposant des conditions pour l'analyse et l'identification des produits d'oxydation du glycérol.

Colonne	Eluant	Débit (ml/min)	T(°C)	Référence	Détection
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec $5 \cdot 10^{-3}$ mol. $L^{-1}H_2SO_4$	0,6	55	(Roncal, Muñoz, Lorenzo, Maestro, & Díaz de Guereñu, 2012)	UV
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau/acétonitrile (65:35 v/v) avec $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol. $L^{-1} H_2SO_4$	0,5	–	(Jedsukontorn, Meeyoo, Saito, & Hunsom, 2015)	RID-10
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec $8 \cdot 10^{-3}$ mol. $L^{-1}H_2SO_4$	0,6	–	(Simões, Baranton, & Coutanceau, 2011)	RI (Iota2)
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 0,01 mol. $L^{-1} H_2SO_4$	0,6	–	(Royker, Case, & Van Steen, 2012)	RI et UV (210 nm)
Biorad Aminex HPX 87 H ou 87C.	Eau déionisée avec 1 à $10 \cdot 10^{-3}$ mol. $L^{-1} H_2SO_4$ (idéal à $3 \cdot 10^{-3}$ mol. L^{-1})	0,7	30-60	(Beltrán-Prieto, Kolomazník, & Pecha, 2013)	UV 210 nm
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol. $L^{-1} H_2SO_4$ et 65/35% eau/ CH_3CN	0,5	–	(Chen, Fang, & Hu, 2007)	RID
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 0,01 mol. $L^{-1} H_2SO_4$	0,5	60	(Demirel, Lehnert, Lucas, & Claus, 2007)	RI et UV (210 nm)
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 0,005 mol. $L^{-1} H_2SO_4$	0,4	60	(Liebminger, Siebenhofer, & Guebitz, 2009)	RI

Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 0,01 mol. L ⁻¹	0,5	60	(Demirel-Gülen, Lucas, & Claus, 2005)	UV (210 nm) et RI
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 0,025 mol. L ⁻¹ Les échantillons sont additionnés de 10% de la solution de H ₂ SO ₄	0,6	60	(Ning, et al., 2016)	UV(210 nm), RI
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 4,10 ⁻³ mol. L ⁻¹	–	30	(Roquet, Belgsir, Léger, & Lamy, 1994)	–
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 0.005 mol. L ⁻¹ d'acide formique (ou 0,005 mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	0,3	40	(Wang, et al., 2015)	RI, UV
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 3,3. 10 ⁻³ mol. L ⁻¹	0,6	Température ambiante	(Oliveira, et al., 2013) et (Oliveira, et al., 2014)	UV, RI
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 5.10 ⁻³ mol. L ⁻¹	0,6	55	(Xu, et al., 2014)	UV et RI 210 nm
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 0,5.10 ⁻³ mol. L ⁻¹	–	70	(Garcia, Kolb, Van Nierop y Sanchez, Vos, & Birdja, 2016)	RI
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 0,01 mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,5	60	(Wang, Wu, Liu, Zhang, & Lin, 2016)	UV
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 0,01 mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄ Les échantillons sont dissous dans une solution à 0,01 mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,6	60	(Moreira, Bruno, Souza, & Manfro, 2016)	UV, RI
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 5 .10 ⁻³ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,6	60	(Arcanjo, Silva, Rodríguez-Castellón, Infantes-Molina, & Vieira, 2017)	RI
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 5 .10 ⁻³ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,5	–	(Yang, et al., 2016)	RI, UV 210 nm

Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec $5 \cdot 10^{-3}$ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,5	–	(Zope, Davis, & Davis, 2012)	RI, UV
Biorad Aminex HPX 87 H	Eau déionisée avec 0,01 mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,5	323K	(Tsuji, Rao, Nishimura, Takagaki, & Ebitani, 2011)	RI
Aminex 87H	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 0,01N	0,5	40-80	(Pecina, Bonn, Burtscher, & Bobleter, 1984)	RI, UV
Alltech OA-1000 Organic puis Biorad Aminex HPX 87 H	–	0,2	65	(Wang, et al., 2015)	UV RI
Alltech OA-1000 colonne à exclusion ionique	Eau déionisée avec 0,0004 mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	–	70	(Carrettin S. , McMorn, Johnston, Griffin, & Hutchings, 2002)	RI et UV
Alltech OA-1000 (300mmx6,5mm)	Eau déionisée avec 0,1%wt H ₃ PO ₄	–	–	(Vajicek, Štolcová, & Kaszonyi, 2011)	RI, UV (210 nm)
Alltech OA-1000 (300x7,8 mm)	Eau déionisée avec 0,1%wt H ₃ PO ₄	–	–	(Bianchi, Canton, Dimitratos, Porta, & Prati, 2005)	UV et RI
Alltech OA-1000 (300mmx6,5mm)	Eau déionisée avec 0,1%wt H ₃ PO ₄	0,5	–	(Porta & Prati, 2004)	UV 210 nm
Alltech OA-1000 (300mmx7,8mm)	Eau doublement distillée	–	–	(Molinari, Maldotti, Bratovic, & Magnacca, 2013)	UV
Alltech OA-1000	–	–	–	(Garcia, Besson, & Gallezot, 1995)	RI et UV
Alltech IOA 1000	Eau déionisée avec $5 \cdot 10^{-3}$ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,4	25	(Augugliaro, et al., 2010)	UV

Alltech QA-1000	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄ 4.10 ⁻⁴ mol. L ⁻¹	–	70	(Carrettin S. , et al., 2004)	UV et RI
An Alltech OA-1000	Eau déionisée avec 5 .10 ⁻³ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,3	60	(Zhang, et al., 2014)	RI et UV (220 nm)
Alltech OA-1000	Eau déionisée avec H ₂ SO ₄	0,5	80	(Zhang, Wang, Liu, & Ding, 2016)	RI
Alltech OA-10308, 300mm×7.8 mm	Eau déionisée avec H ₃ PO ₄ 0,1% dans l'eau	–	–	(Dimitratos, Messi, Porta, Prati, & Villa, 2006)	UV, RI
Alltech OA-1000 column (300 nm x 6.5 nm)	Eau déionisée avec H ₃ PO ₄ 0,1 wt% Les échantillons sont dilués dans l'éluant	0,5	–	(Dimitratos, Porta, & Prati, 2005)	UV (210 nm), RI
Alltech OA-1000 (300mm×6.5mm ID=9µm)	Eau déionisée avec 4 .10 ⁻³ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	–	80	(Dou, et al., 2016)	(UV) et RI
Alltech OA-1000	Eau déionisée avec 5 .10 ⁻³ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,6	353 K	(Rodriguez, Williams, & Monnier, 2014)	RI et UV
Alltech, OA-1000	Eau déionisée avec 5 .10 ⁻³ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,3		(Qi, et al., 2014)	Ri et UV (220 nm)
Alltech OA-1000 Column (9 mm, 300x 6.5 mm) plus guard column	Eau déionisée avec 0,01 N H ₂ SO ₄	0,5	70	(Sullivan & Burnham, 2015) et (Sullivan & Burnham, 2014)	RI, UV (210 nm)
(Alltech OA-10308, 300–7.8 mm)	Eau déionisée avec H ₃ PO ₄ (0,1 wt%)	–	–	(Chinchilla, et al., 2015)	UV, RI
Zorbax SAX column (4,6mm x250mm)	H ₃ PO ₄ (0,1% w/w) dans H ₂ O/acétonitrile (rapport 1/2 v/v)		25	(Liang, et al., 2011)	RI, UV(210 nm)
Zorbax SAX	–	–	–	(Li & Zaera, 2015)	UV 210 nm for the products and 190 nm for the glycerol
Zorbax SAX column	–	–	–	(Liang, et al., 2009)	RI
Zorbax SAX column (4.6 mm × 250 mm, Agilent)	–	–	–	(Zhang, Shi, Sun, Ning, & Hou, 2015)	RI

Phenomenex 300 mm Rezek ROA	Eau déionisée avec $3 \cdot 10^{-3}$ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0,5	75	(Hong, Chin, Cheng, Sabri, & Chua, 2015)	RI, UV
Rezex ROA-Organic acid H+ column (300mmx7,8mm)	Eau déionisée avec 0,0025 mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	–	–	(Skrzyńska, Zaid, Girardon, Capron, & Dumeignil, 2015)	RI
Rezex ROA-Organic Acid H+ column (300 × 7.8 mm)	H ₂ SO ₄ 0,0024 mol. L ⁻¹ et CH ₃ CN 0,0001 mol. L ⁻¹ dans l'eau	0,48	–	(Skrzyska, et al., 2014)	Ri et UV
Shodex SC1011 et une colonne SH1011	Eau déionisée avec $5 \cdot 10^{-3}$ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	1	respectivement 80 et 60°C	(Habe, et al., 2009)	RI
Hitachi GL-C610-S column 7.8× 300 mm	–	0,45	60	(Hu, Knight, Lowry, & Varma, 2010)	RI, UV 210,8 nm
C-610S column size, 7.8 mm X 300 mm (supercogel™)	Eau déionisée avec	0,5	60	(Kimura, Tsuto, Wakisaka, Yuji, & Inaya, 1993)	RI
Sarasep Car-H	–	–	–	(Fordham, Besson, & Gallezot, 1995)	UV, RI
Colonne anionique à exclusion IC-PAK Ion-Exclusion 50A, 7µm (300 mmx7,8 mm)	Eau déionisée avec $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol. L ⁻¹ H ₂ SO ₄	–	60	(Sproge, et al., 2013)	RI et UV (210 nm)
DOWEX 1-X8 (20 mmx300mm)	Eau déionisée avec 0,5 mol. L ⁻¹ HCl	–	–	(Habe, et al., 2009)	–

Tableau 53 : Tableau comparatif d'un ensemble d'articles traitant de l'analyses des produits d'oxydation du glycérol par chromatographie liquide

5.1.5.1.2 Description de la colonne Aminex HPX 87 H Biorad

L'Aminex 87 H (300 mm x 7,8 mm de diamètre interne) est une colonne à exclusion ionique constituée d'une résine fortement échangeuse de cations. Cette résine est un copolymère de polystyrène et de divinylbenzène sulfoné avec 8% de réticulation (Jupille, Gray, Black, & Gould, 1981). La taille des particules est comprise entre 5 et 8 μm avec une capacité d'échange cationique de 1,7 mequiv/g (Haddad, Jackson, & Greenway, 1990). La colonne est constituée de 3 phases : la phase mobile (éluant), la phase stationnaire constituée par le liquide occlus (retenu) dans les pores (espaces non fonctionnalisés donc moins répulsifs car moins chargés) de la résine, et la résine qui sépare ces deux phases.

La résine agit comme une membrane de Donnan, hémiperméable : les espèces chargées sont exclues par la résine et éluées dans le volume mort. En effet, l'existence de groupements sulfonés chargés négativement sur la résine provoque la répulsion de toutes molécules possédant la même charge. Ainsi, ne pénètrent dans le liquide occlus de la résine que les molécules neutres ou protonées (sous forme COOH au lieu de COO^- par exemple) (Haddad, Jackson, & Greenway, 1990), (Fritz, 1988). Le mécanisme est le suivant : les molécules faiblement chargées vont pouvoir migrer vers les pores et donc atteindre la colonne. Cependant, les autres molécules chargées vont être repoussées, et cela d'autant plus fort que leur densité de charge sera importante. Il y a donc un premier phénomène naturel de séparation (Figure 194).

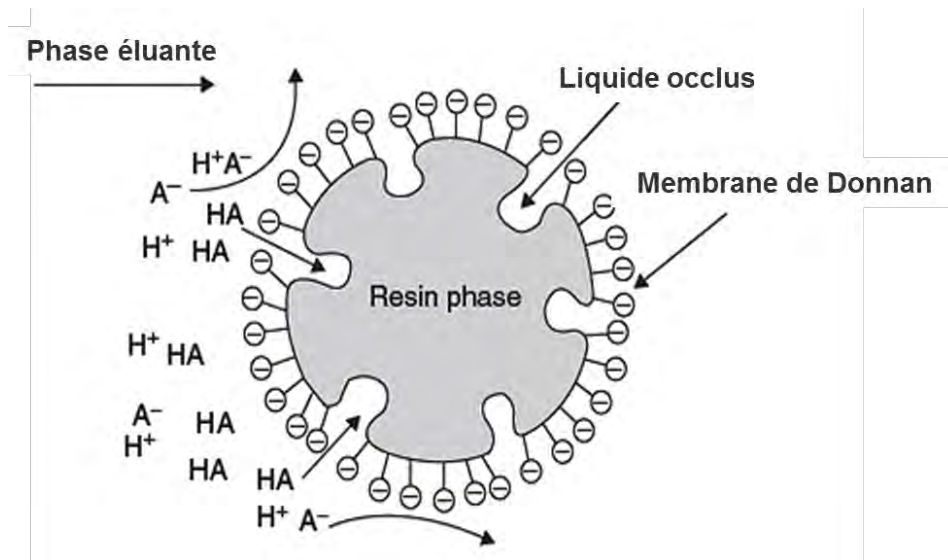


Figure 194 : Mécanisme de séparation des espèces par exclusion ionique (Bhattacharyya & Rohrer, 2012)

5.1.5.1.3 Essai de différentes concentrations en acide sulfurique pour la bonne séparation des produits d'oxydation du glycérol et du CG

Afin de déterminer la concentration en acide sulfurique la plus adaptée, nous réalisons une analyse chromatographique sur des échantillons différents, tous issus du protocole enzymatique CE6, en présence de dioxygène pur ou sous air.

1 ml de chaque solution des fioles jaugées de 50 ml préparées en fin de chaque protocole (CE6, CC33, CC21) est placé dans un vial d'HPLC. 40µL de ce milieu est alors analysé en mode automatique par l'HPLC à un débit de 0,5 ml/min avec 3, 5 ou $10 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique dans l'eau.

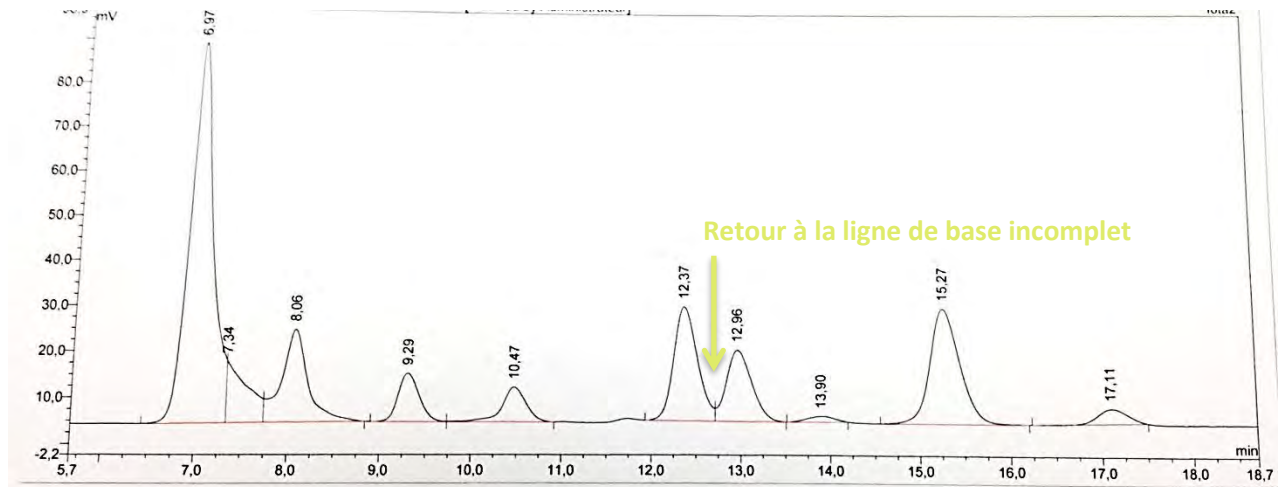


Figure 195 : Chromatogramme de l'échantillon de la réaction d'oxydation du glycérol avec le protocole CE6 sous dioxygène et $10 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique, 60°C

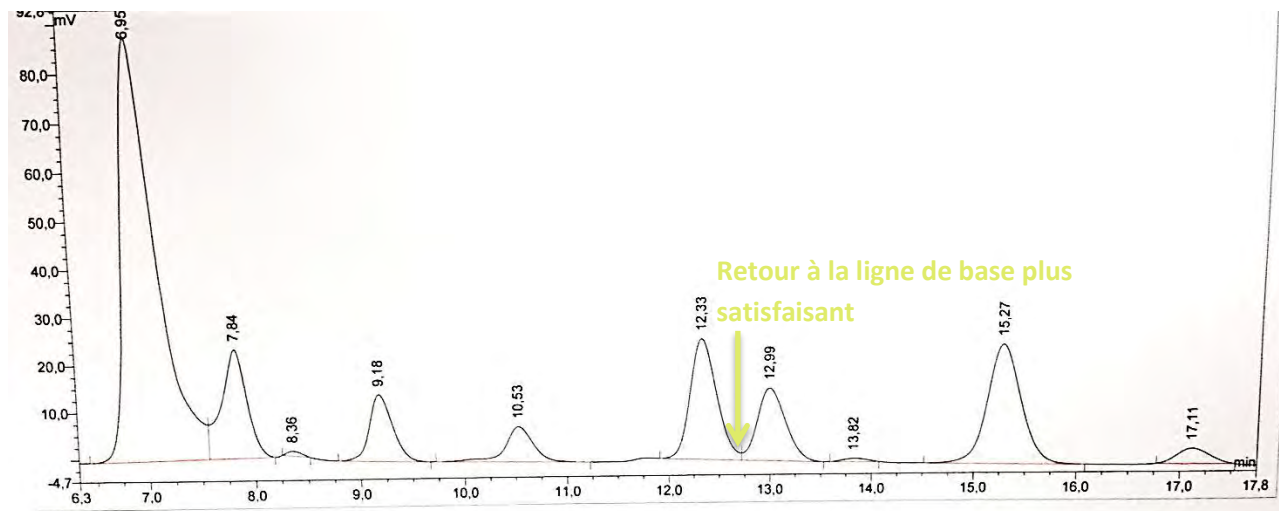


Figure 196 : Chromatogramme de l'échantillon de la réaction d'oxydation glycérol avec le protocole CE6 sous dioxygène et $5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique, 60°C

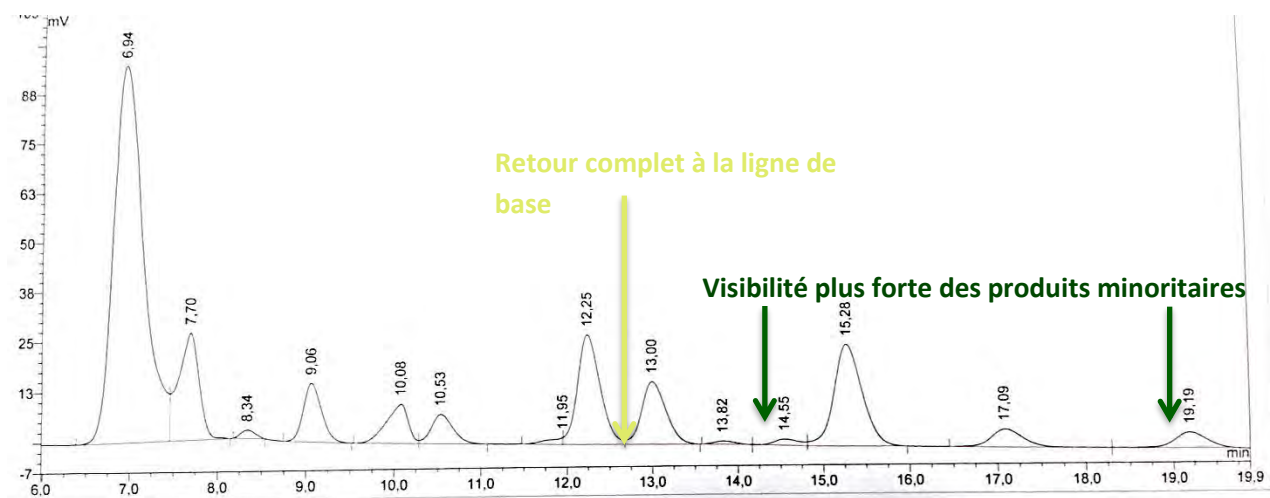


Figure 197 : Chromatogramme de l'échantillon de la réaction d'oxydation glycérol avec le protocole CE6 sous dioxygène et $3 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique, 60°C

Nous constatons que les analyses effectuées avec $10 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique ne permettent pas d'obtenir le plus important retour à la **ligne de base**. D'autre part, **des pics** présents sur le chromatogramme avec $3 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique ne sont pas visibles sur les chromatogrammes avec 10 et $5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique. Par conséquent, nous choisisons la concentration de $3 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique pour nos analyses.

Remarque : Les chromatogrammes et observations sont identiques sur les milieux réactionnels provenant des réactions d'oxydation sur glycérol sans ajout de dioxygène.

Dans le cas du CG, les observations sont les mêmes :

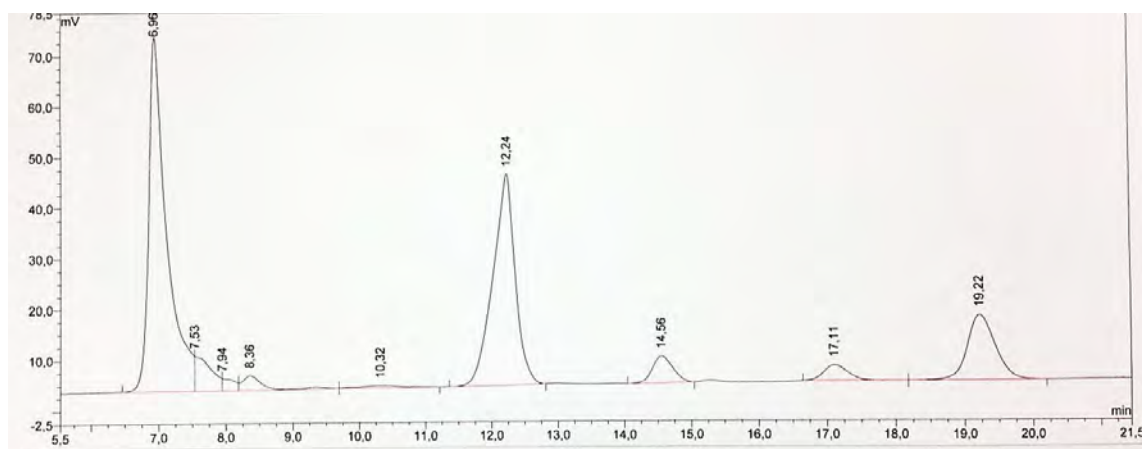


Figure 198 : Chromatogramme issu de l'oxydation du CG avec le protocole enzymatique CE6 en présence de dioxygène, $10 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ d'acide sulfurique, 60°C

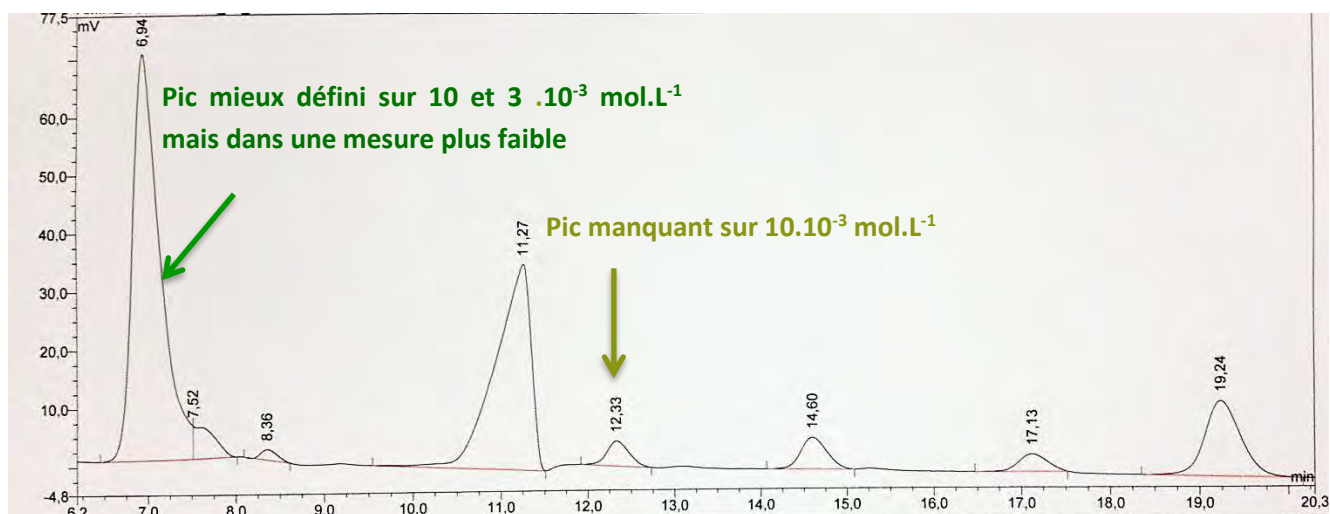


Figure 199 : Chromatogramme issu de l'oxydation du CG avec le protocole enzymatique CE6 en présence de dioxygène, $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ d'acide sulfurique, 60°C

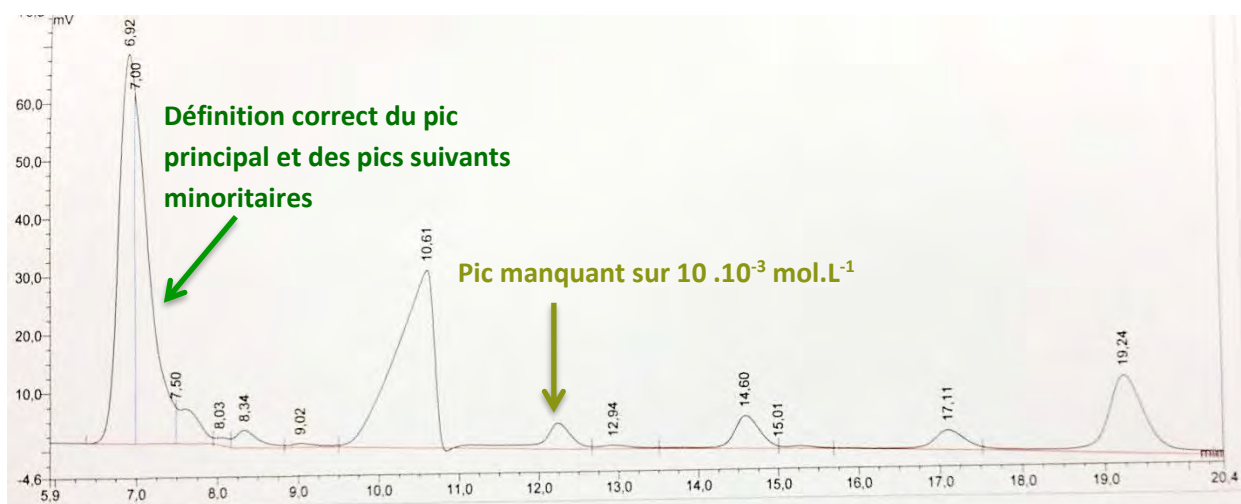


Figure 200 : Chromatogramme issu de l'oxydation du CG avec le protocole enzymatique CE6 en présence de dioxygène, $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ d'acide sulfurique, 60°C

Nous constatons que les profils chromatographiques ne sont pas tous parfaitement identiques. La détection de pic minoritaire (12,33 min) a lieu pour les concentrations en acide sulfurique les plus faibles (3 et $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). Cependant, la détection est de meilleure qualité avec $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ d'acide sulfurique puisque des pics en début de chromatogramme (7 et 8,03 minutes) sont repérés, ce qui n'est pas le cas pour les autres concentrations.

En conclusion, avec l'éluant à la concentration de $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ d'acide sulfurique, les pics possèdent une définition suffisante et sont tous présents, contrairement avec $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ d'acide sulfurique où la définition des pics est souvent inférieure, et à $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ d'acide sulfurique où certains pics sont probablement coélus du fait de la force éluante plus importante (concentration en acide sulfurique importante).

Ainsi, nous utiliserons les mêmes conditions pour les analyses en HPLC, quel que soit le substrat étudié ou le protocole d'oxydation impliqué.

5.1.5.2 Analyse par HPIC

Notre protocole utilise la colonne AS 11-HC (250 mm x 2 mm Dionex) et le supprimeur ASRS-300, l'HPIC est une ICS 2000 de chez Thermo Fisher. 1 ml de chaque solution des fioles jaugées de 50 ml préparées en fin de chaque protocole (CE6, CC33, CC21, CC29) est analysé.

La méthode établie fait appel à un gradient de potasse dans de l'eau milliQ. Ce gradient a pour but de permettre la bonne séparation des produits au cours de l'analyse, la formation d'un signal fin pour chaque molécule et l'élimination de toutes les substances « restées sur la colonne » en fin d'analyse afin de ne pas laisser de traces qui pourraient fausser les résultats de l'échantillon suivant. Ainsi, plusieurs gradients de KOH ont été testés, mais en respectant toujours certaines conditions :

- Un débit de 1 ml/min (optimal pour le fonctionnement de la colonne)
- $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$
- Acquisition de 40 minutes
- Volume d'injection 25 μL
- Pour chaque gradient, les standards commerciaux et les produits de l'oxydation du glycérol sont testés et comparés

Gradient employé :

Programme utilisé de façon standard : « anion org ac »	
Temps (min)	Concentration KOH qui passe dans la colonne ($\cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$)
0	1
0	1
8	1
30	30
31	60
35	80
36	1
40	1

Tableau 54 : Programme anion org ac

5.1.5.3 Analyse en spectrométrie de masse

Le matériel utilisé est un appareil QTRAP 2000 AB Sciex. L'éluant utilisé est de l'acide formique à 0,1% dans de l'eau milliQ, à 56°C. La colonne est l'Aminex HPX 87 H et le débit est de 0,5 ml/min. L'acquisition est de 30 minutes. L'ensemble des standards ont été analysés en électrospray (ESI) négatif. Le volume d'injection est de 20 μL , les échantillons sont à une concentration de 0,1 mg/ml.

5.1.6 Extraction de fraction

Le module de préparative Ultimate 3000 fraction collector (Dionex) est utilisé afin d'extraire le liquide sortant de la colonne aux temps de rétention indiqués, pendant une durée de 0,15 minutes et associé à la détection RI. L'éluant utilisé est de l'acide formique à 0,1% dans de l'eau milliQ, à 56°C. La colonne est l'Aminex HPX 87 H et le débit est de 0,5 ml/min. L'acquisition est de 25 minutes. Les échantillons ont une concentration de 20 mg/ml. Le volume injecté pour chaque collecte est de 20 à 40 µL (en fonction de la qualité des chromatogrammes correspondants). Entre 300 et 1000 injections sont nécessaires pour récupérer entre 5 et 10 mg de produit attribué à chaque pic collecté (soit entre deux et quatre semaines).

Le liquide prélevé par le collecteur est récupéré dans des béchers. En fin de journée, ce liquide est placé à 4°C pour prévenir toute éventuelle dégradation des molécules. En fin de collecte, nous récupérons entre 100 et 250 ml de liquide. Nous évaporons tout l'éluant par évaporation successive. Nous ajoutons alors 0,5 ml d'eau deutérée au produit final pour les analyses RMN qui doivent être effectuées en suivant.

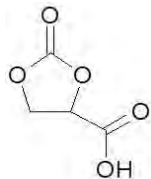
5.1.6.1 Analyse en Résonance Magnétique Nucléaire

L'instrumentation employée est un Bruker Avance 500 MHz. La fréquence de résonance est du proton ^1H est de 500,11 MHz et celle du carbone ^{13}C de 125,77 MHz. Les analyses sont effectuées à 298K dans de l'eau deutérée. Les échantillons sont à une concentration de 10 mg/ml soit 5 mg dans 0,5 ml de solvant. Dans le cas des analyses des fractions issues de l'oxydation du glycérol par le protocole enzymatique CE6, les standards utilisés pour identifier les produits ont été préparés de la façon suivante :

5 mg de standard ont été dissouts dans 4 à 5 ml d'eau milliQ à 0,1% d'acide formique. L'ensemble a ensuite été évaporé à l'évaporateur rotatif puis dilué à nouveau dans 0,5 ml de D_2O . L'objectif était de placer les standards et les molécules des fractions dans le même état d'ionisation afin de faciliter la comparaison des spectres RMN. De l'acide sulfurique deutéré (DCI) peut aussi être ajouté pour produire le même effet.

La description des signaux des molécules issues de l'oxydation du CG sous air par voie enzymatique (CE6) est la suivante :

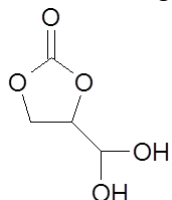
Carbonate de glycérol oxydé



RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$; 125,77 MHz, D_2O , 298 K : δ 172,61 (s, CH-COOH) 156,83 (s, O=C-(O)_2) 74,00 (s, $\text{CH}_2-\text{CH-COOH}$) 68,31 (s, $-\text{O-CH}_2-\text{CH}$)

RMN ^1H ; 500,11MHz, D_2O , 298 K : δ 4,52 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 1H, $-\text{O-CH}_2-\text{CH}$) 4,75 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 9,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 1H, $-\text{O-CH}_2-\text{CH}$) 5,18 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 9,5$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH-COOH}$)

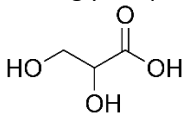
Carbonate de glycérol hémiacétal



RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$; 125,77 MHz, D_2O , 298 K : δ 157,43(s, O=C-(O)_2) 88,105 (s, HO-CH-OH) 77,88 (s, $-\text{O-CH-CH}_2$) 66,28 (s, $\text{O-CH}_2-\text{CH}$)

RMN ^1H ; 500,11MHz, D_2O , 298 K : δ 4,44 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, 1H, $-\text{O-CH}_2-\text{CH}$) 4,57 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 1H, $-\text{O-CH}_2-\text{CH}$) 4,73 (m, 1H, $-\text{O-CH-CH}_2$) 5,14 (d, $^3J_{\text{HH}} = 3,5$ Hz, 1H, $-\text{CH-CH(OH)}_2$)

Acide glycérique

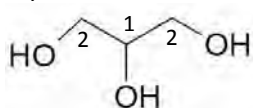


RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$; 125,77 MHz, D_2O , 298 K : δ 175,64 (s, $-\text{HOCH-COOH}$) 71,34 (s, $-\text{HOCH-COOH}$) 63,21 (s, HO-CH-CHOH-COOH)

RMN ^1H ; 500,11MHz, D_2O , 298 K : δ 4,29 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4,0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH-COOH}$) 3,77 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4,0$ Hz, 2H, $\text{HO-CH}_2-\text{CH}$)

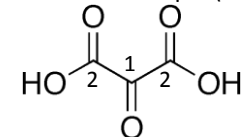
La description des signaux des molécules issues de l'oxydation du glycérol (enrichie en ^{13}C) sous dioxygène par voie enzymatique (CE6) est la suivante :

Glycérol



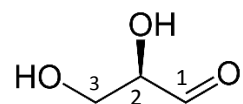
RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$;125,77 MHz, D_2O , 298 K : δ 72,01 (Ψ dd, $^1J_{\text{C1-C2}} = 40,6$ Hz, $^1J_{\text{C1-C2}} = 41,1$ Hz, 1C, $\text{HOH}_2\text{C}_2-\text{C}_1\text{H-C}_2\text{H}_2\text{OH}$) 62,4 (d, $^1J_{\text{C1-C2}} = 41,1$ Hz, 2C, $\text{HO-C}_2\text{H}_2-\text{C}_1\text{H-}$)

Acide mésoxalique (observée sous forme hydraté au niveau du carbone 1)



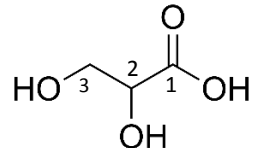
RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$;125,77 MHz, D_2O , 298 K : δ 172,4 (d, $^1J_{\text{C1-C2}} = 67,2$ Hz, 2C, ${}_2(\text{HO})\text{C}_1-\text{C}_2\text{OOH}$) 91,8 (t, $^1J_{\text{C1-C2}} = 67,2$ Hz, 1C, $\text{HOOC}_2-\text{C}_1-\text{C}_2\text{OOH}$)

Glycéraldéhyde



RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$;125,77 MHz, D_2O , 298 K : δ 89,7 (dd, $^1J_{\text{C1-C2}} = 48,8$ Hz, $^2J_{\text{C1-C3}} = 2,6$ Hz, 1C, $-\text{C}_1=\text{O}$) 74,0 (dd, $^1J_{\text{C1-C2}} = 48,7$ Hz, $^1J_{\text{C2-C3}} = 41,4$ Hz, 1C, $-\text{HOC}_2\text{H-C}_1=\text{O}$) 61,9 (dd, $^1J_{\text{C2-C3}} = 41,6$ Hz, $^2J_{\text{C1-C3}} = 2,6$ Hz, 1C, $\text{HC}_3\text{OH-HC}_2\text{OH}$)

Acide glycérique



RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$;125,77 MHz, D_2O , 298 K : δ 176,0 (d, $^1J_{\text{C1-C2}} = 58,1$ Hz, 1C, C_1OOH) 71,6 (dd, $^1J_{\text{C1-C2}} = 58,2$ Hz, $^1J_{\text{C2-C3}} = 39,2$ Hz, 1C, $-\text{HOC}_2\text{H-C}_1\text{OOH}$) 63,3(d, $^1J_{\text{C2-C3}} = 39,2$ Hz, 1C, $-\text{HC}_3\text{OH}$)

5.1.6.2 Analyse par spectrométrie de masse de haute résolution LC HRMS

Les séparations chromatographiques ont été réalisées sur une chaîne HPLC U3000 (ThermoFisher), constituée d'une pompe DGP-3600SD, d'un injecteur automatique thermostaté WPS-3000TSL, d'une enceinte thermostatée TCC-3000SD et d'un détecteur UV-Visible RSLC VWD-3400RS. La séparation des molécules sera réalisée en mode gradient, sur une colonne de type pentafluorophényl PFP de chez Phenomenex nommée Luna PFP 2, 150 x 2mm, 3µm et sur la colonne P2 Trinity de chez ThermoFisher.

Les analyses en masses HRMS seront réalisées en mode positif et négatif sur un spectromètre de masse de type Exactive provenant de la société ThermoFisher. Ce spectromètre comprend une source électrospray (ESI), une cellule de collision HCD et un analyseur Orbitrap à transformer de Fourier.

Les acquisitions MS seront réalisées en mode Haute Résolution (100 000 à la masse m/z 200) pour faciliter la détermination des formules brutes (distinction des pics isotopiques de même masse nominale).

La détection des composés est réalisée à une longueur d'onde de 210 nm pour ceux visibles dans l'UV.

Les paramètres principaux étaient :

- Tension du cône : 3,00 KV (mode positif) ; - 3,00 KV (mode négatif)
- Température du capillaire d'entrée : 350°C
- Débit du gaz principal de désolvatation : 50 (unités arbitraires)
- Débit du gaz auxiliaire de désolvatation : 20 (unités arbitraires)
- Gamme de masses : 50 à 600 m/z
- Résolution : 100 000 (à la masse m/z 200)
- Fréquence d'acquisition : 1 Hz
- Temps de remplissage maximum de la trappe : 100 ms
- Nombre maximum d'ions dans la trappe : $3 \cdot 10^6$ ions

Les spectres de masses ont été acquis et traités (prédiction des formules brutes) à l'aide du logiciel Xcalibur (version 2.0, Thermo Fisher) et du logiciel MetAlign (version 041011, Arjen Lommen) pour l'élimination du bruit et l'extraction des ions. Après la filtration et la conservation des signaux significatifs, tous les pics d'ions quasi-moléculaires seront traités afin de prédire des formules brutes à l'aide du programme Qual Browser. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus lors du screening ciblé.

Conditions pour la P2 Trinity

La colonne est une hybride échangeuse de cations et d'anions. Les conditions sont une température de 40°C, un débit de 200µLmin et le gradient acide formique 0,1%/CH₃CN est :

Etapes	Durée des paliers	Conditions du palier
1	0 à 15 min	100% acide formique 0,1%
2	15 à 20 min	100% CH ₃ CN
3	0,2 min	100% CH ₃ CN
4 : Reconditionnement de la colonne	20,2 à 30 min	100% acide formique 0,1%

Tableau 55 : Gradient pour l'analyse avec la Trinity P2

Conditions pour la PFP

Cette colonne a été très utilisée pour analyser les produits issus du cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique), d'où notre idée de traiter nos échantillons avec celle-ci puisque nos molécules sont principalement des acides carboxyliques. Elle contient des groupements phénylperfluorés.

Etapes	Durée des paliers	Conditions du palier
1	0 à 5 min	100% acide formique 0,1%
2	5 à 15 min	50% CH ₃ CN
3	0,2 min	100% CH ₃ CN
4 : Reconditionnement de la colonne	15,2 à 35 min	100% acide formique 0,1%

Tableau 56 : Gradient pour l'analyse avec la PFP

Conditions pour l'analyse des fractions avec la colonne PFP

Les conditions d'analyses sont les mêmes que précédemment énoncé, mais avec les données suivantes supplémentaires pour la séparation :

- Température : 40°C
- La phase mobile, délivrée à 200µl/min, consiste en un mélange d'eau (0,1% v/v d'acide formique) (éluant A) et d'acétonitrile (éluant B) selon le gradient suivant :

Période	Gradient
0-5 min	0% de B
5-15 min	50% de B
15-15,2 min	0% de B
15,2-20 min	0% de B

5.2 Réalisation des plans d'expériences

5.2.1 Mesure de la viscosité des solutions de glycérol

Nos solutions ne présentant pas une viscosité forte nous choisissons d'utiliser un viscosimètre de 75 de diamètre. Les mesures se font aux alentours de la température de réaction de CE6 soit 23°C.

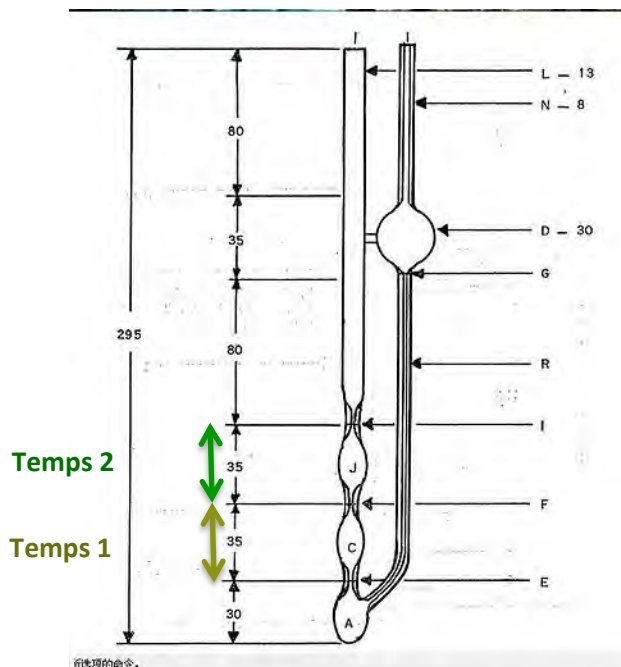


Figure 201 : Distance parcourue par la solution associée au temps 1 et 2

Nous mesurons la durée que met la solution à parcourir la boule 1 délimitée par 2 traits de jauge, puis le temps que met le liquide à passer de la boule 1 à la 2. Nous nommons respectivement ces temps : temps 1 et temps 2 (Figure 201).

Pour avoir la viscosité il faut multiplier le temps 1 et le temps 2 par deux coefficients nommés C et D. C et D permettent de convertir les temps de mesure en viscosité. Comme nous sommes à 23°C, C et D sont égaux aux valeurs estimées par le guide du viscosimètre pour 23°C (T° room). Donc $C = C_0$ et D est donné en suivant.

Ainsi, pour nous : $C = C_0 = 0,007756$ et $D = 0,007242$

Nom solution	Masse théorique de glycérol	Masse pesée de glycérol
V1	0.18418 g	0.2004 g
V2	1.8418 g	1.8584 g
V3	9.209 g	9.2092 g
V4	0.9209g	0.9274g
V5	3.6836g	3.6918g

Tableau 57 : Quantité de glycérol dans les solutions de 20 ml testées

Les temps doivent être donnés en secondes. Unité de viscosité = mm²/secondes (surface parcourue par seconde).

Solutions	Essai 1	Essai 2
V1	2'0.5''	4'27''
V2	2'28''	5'05''
V3	6'58''	14'31''
V4	2'20''	4'50''
V5	3'12''	6'41''

Tableau 58 : Temps 1 et 2 en minutes pour les solutions testées

Solution	Viscosité avec C	Viscosité avec D
V1 (solution de référence)	125*0,007756 = 0,9695 mm ² /sec	142*0,007242 = 1,028364 mm ² /sec
V2	148*0,007756 = 1,147888 mm ² /sec	157*0,007242 = 1,136994 mm ² /sec
V3	418*0,007756 = 3,242 mm ² /sec	569*0,007242 = 4,120618 mm ² /sec
V4	140*0,007756 = 1,08584 mm ² /sec	150*0,007242 = 1,0863 mm ² /sec
V5	192*0,007756 = 1.489152 mm ² /sec	209*0,007242 = 1,513578 mm ² /sec

Tableau 59 : Viscosités calculées pour les solutions testées

Le fait d'avoir deux temps et deux constantes (C et D Tableau 59) permet de comparer les valeurs entre elles et de savoir si elles se superposent. En effet, C et D permettent de fournir une fourchette de viscosité pour chaque solution testée. Si les fourchettes des différentes solutions ne se superposent pas alors les valeurs sont significativement différentes. Ainsi, **v référence = [0,9695 - 1,028364] mm²/sec.**

⇒ V2 constitue donc la limite haute acceptée de la viscosité.

5.2.2 Réalisation du plan d'expériences dans le cas du glycérol

Le Tableau 25 présente les domaines expérimentaux, le pas et le centre utilisés pour la détermination de la matrice des essais du PEX sur glycérol Tableau 61.

	Quantité de substrat (mg)	Quantité de TEMPO (mg)	Débit en dioxygène (ml/min) <u>donné en débit d'air</u>
-1	427	62,64466102	0,25
1	1600	133,3553382	0,45
centre	1013,5	97,99999964	0,35
pas	586,5	35,35533861	0,1

Tableau 60 : Domaines expérimentaux pour les expériences du PEX

n° ex.	Quantité de substrat (mg)	Quantité de TEMPO (mg)	Débit en dioxygène (L/min) <u>donné en débit d'air</u>
1	427	63	0,25
2	1600	63	0,25
3	427	133	0,25
4	1600	133	0,25
5	427	63	0,45
6	1600	63	0,45
7	427	133	0,45
8	1600	133	0,45
9	184	98	0,35
10	1843	98	0,35
11	1014	48	0,35
12	1014	148	0,35
13	1014	98	0,21
14	1014	98	0,49
15	1014	98	0,35
16	1014	98	0,35
17	1014	98	0,35
18	1014	98	0,35

Tableau 61 : Conditions expérimentales testées au cours du PEX sur glycérol en valeurs réelles

La conversion des données d'entrée Tableau 61, en valeur codées Tableau 62, permet par la suite, de construire un modèle descriptif de l'évolution des quantités de produits formées en fonction des conditions de départ. Le calcul pour coder les valeurs est le suivant :

$$U_i = X_i * \text{pas} + \text{centre}$$

- Avec U_i = la variable en valeur réelle (ici Quantité de substrat, la Quantité de TEMPO et le Débit de dioxygène),
- X_i = la variable en valeur codée (normalisée),
- Le débit de dioxygène nommé X_1
- La quantité de TEMPO nommée X_2
- la quantité de substrat nommée X_3

Débit en dioxygène	Quantité de TEMPO (mg)	Quantité de substrat (mg)	X1	X2	X3
0,25	63,11	428,4	-1	-0,98683823	-0,997612958
0,25	63,25	1603,02	-1	-0,98287843	1,00514919
0,25	133,23	428,28	-1	0,9964549	-0,997817562
0,25	133,21	1603,56	-1	0,99588921	1,006069906
0,45	63,06	428,76	1	-0,98825244	-0,996999147
0,45	63	1601,55	1	-0,9899495	1,002642796
0,45	133,19	427,59	1	0,99532353	-0,998994032
0,45	133,35	1603,76	1	0,99984901	1,006410912
0,35	98,01	184,71	0	0,00028285	-1,413111679
0,35	97,9	1843,64	0	-0,00282842	1,41541347
0,35	48,34	1017,68	0	-1,40459692	0,007127025
0,35	148,15	1016,08	0	1,41845623	0,004398977
0,208579	98,24	1014,23	-1,41421356	0,00678824	0,001244672
0,491421	98,14	1014,52	1,41421356	0,00395981	0,00173913
0,35	98,17	1014,54	0	0,00480834	0,001773231
0,35	97,91	1014,95	0	-0,00254557	0,002472293
0,35	98,29	1013,52	0	0,00820245	3,41006E-05
0,35	98,44	1020,02	0	0,01244509	0,011116795

Tableau 62: Données d'entrée en valeurs réelles à gauche et en valeurs codées à droite (en rouge)

Le montage pour les essais du PEX sur glycérol est présenté Figure 202. Quatre ballons identiques, en verre, sont placés ensemble dans un grand bain marie à 22°C. Quatre réfrigérant identiques sont alors positionnés sur les sorties hautes des ballons pour retenir au maximum les vapeurs formées. Chaque ballon possède une entrée pour introduire la bougie frittée de porosité zéro amenant le dioxygène et dont le débit est régulé par un débitmètre. Un ensemble de joints sur chaque ballon permet de maintenir une bonne étanchéité au niveau de l'arrivée du gaz. Enfin, un thermomètre est positionné dans un septum sur le premier ballon afin de vérifier et de contrôler que la température n'évolue pas au cours de la réaction. L'ensemble des sorties non utilisées des ballons tricolores sont bouchées par des septums.

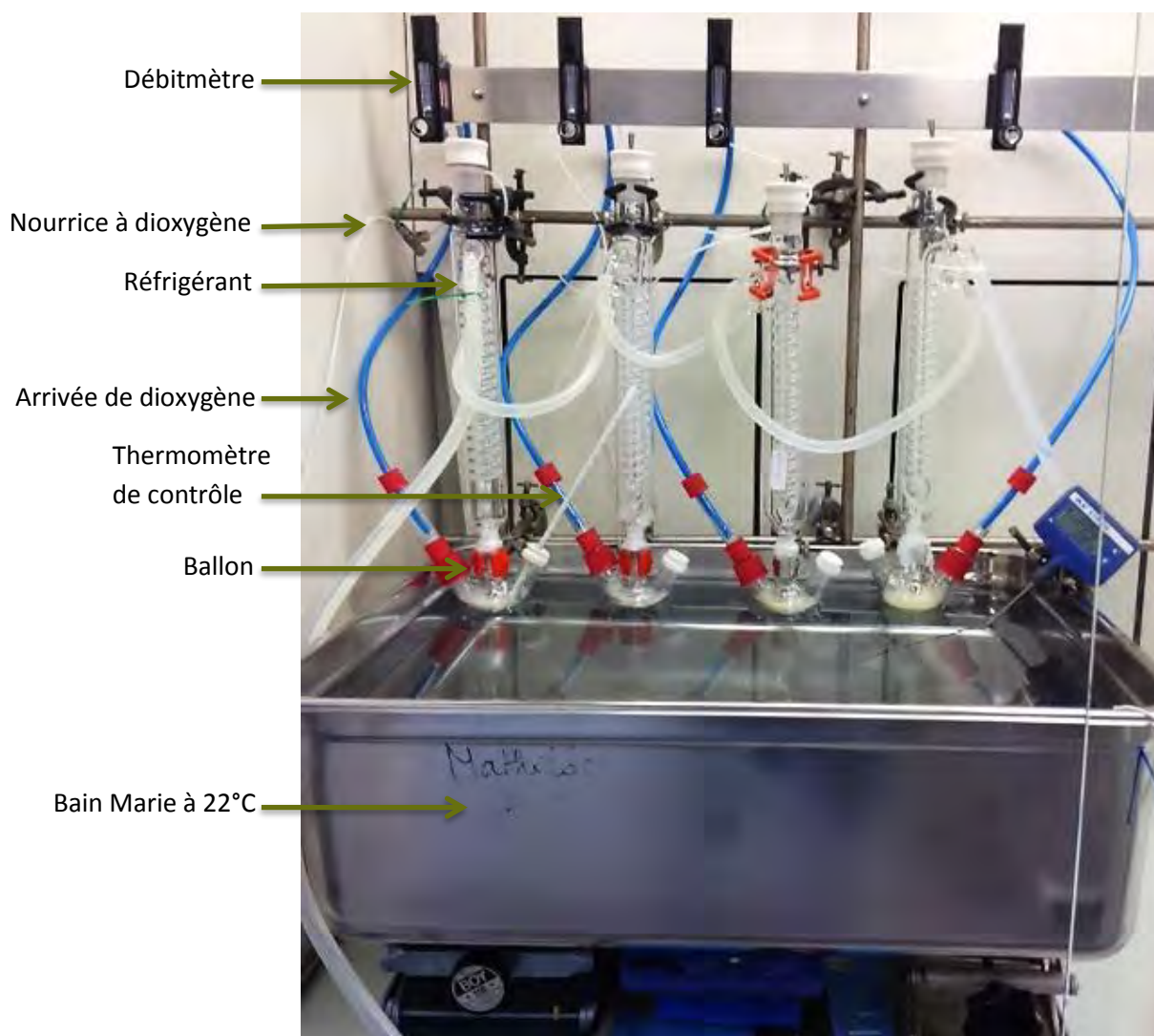


Figure 202 : Montage du PEX avec 4 montages en série pour 4 réactions réalisées simultanément

Une fois transformées, les variables sont intégrées dans un polynôme de second degré :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

- Y = la réponse, le résultat du modèle (1) qui représente l'aire relative des pics d'acide glycerique formée

Nous associons ensuite aux trois colonnes de droites du Tableau 62 les valeurs de la réponse que nous souhaitons décrire à l'aide du modèle (1), ce qui donne le Tableau 63 :

X1	X2	X3	Y
-1	-0,98683823	-0,997612958	8,33
-1	-0,98287843	1,00514919	1,97
-1	0,9964549	-0,997817562	14,52
-1	0,99588921	1,006069906	7,25
1	-0,98825244	-0,996999147	6,79
1	-0,9899495	1,002642796	0,55
1	0,99532353	-0,998994032	11,31
1	0,99984901	1,006410912	3,05
0	0,00028285	-1,413111679	12,27
0	-0,00282842	1,41541347	5,1
0	-1,40459692	0,007127025	0,45
0	1,41845623	0,004398977	8,63
-1,41421356	0,00678824	0,001244672	8,76
1,41421356	0,00395981	0,00173913	3,98
0	0,00480834	0,001773231	4,55
0	-0,00254557	0,002472293	5,1
0	0,00820245	3,41006E-05	5,23
0	0,01244509	0,011116795	4,69

Tableau 63 : Matrice associant les valeurs des variables codées à celles de la variable de sortie (les aires des pics de l'acide glycérique formé)

Nous calculons ensuite la matrice du modèle (X) grâce au Tableau 63 :

1	X1	X2	X3	X1 ²	X2 ²	X3 ²	X1*X2	X1*X3	X2*X3
1	-1	-0,98683823 226	-0,997612958 958	1,0	0,973849684	0,995231614	0,986838226	0,997612958	0,984482602
1	-1	-0,98287843 428	1,00514919 19	1,0	0,966050004	1,010324894	0,982878428	-1,00514919	-0,987939456
1	-1	0,9964549 899	-0,997817562 562	1,0	0,992922366	0,995639887	-0,996454899	0,997817562	-0,994280198
1	-1	0,99588921 214	1,006069906 906	1,0	0,991795326	1,012176656	-0,995889214	-1,006069906	1,001934168
1	1	-0,98825244 44	-0,996999147 147	1,0	0,976642884	0,9940073	-0,98825244	-0,996999147	0,98528684
1	1	-0,9899495 496	1,002642796 796	1,0	0,980000004	1,005292577	-0,989949496	1,002642796	-0,992565731

1	1	0,995323 528	- 0,998994 032	1,0	0,990668 926	0,997989 077	0,995323 528	- 0,998994 032	- 0,994322 265
1	1	0,999849 012	1,006410 912	1,0	0,999698 046	1,012862 924	0,999849 012	1,006410 912	1,006258 956
1	0	0,000282 853	- 1,413111 679	0,0	8,00058E- 08	1,996884 619	0	0	- 0,000399 703
1	0	- 0,002828 417	1,415413 47	0,0	7,99994E- 06	2,003395 29	0	0	- 0,004003 379
1	0	- 1,404596 918	0,007127 025	0,0	1,972892 501	5,07945E- 05	0	0	- 0,010010 597
1	0	1,418456 231	0,004398 977	0,0	2,012018 08	1,9351E- 05	0	0	0,006239 756
1	- 1,414213 562	0,006788 236	0,001244 672	2,0	4,60801E- 05	1,54921E- 06	- 0,009600 015	- 0,001760 232	8,44913E- 06
1	1,414213 562	0,003959 808	0,001739 13	2,0	1,56801E- 05	3,02457E- 06	0,005600 015	0,002459 502	6,88662E- 06
1	0	0,004808 336	0,001773 231	0,0	2,31201E- 05	3,14435E- 06	0	0	8,52629E- 06
1	0	- 0,002545 574	0,002472 293	0,0	6,47995E- 06	6,11223E- 06	0	0	- 6,29341E- 06
1	0	0,008202 449	3,41006E- 05	0,0	6,72802E- 05	1,16285E- 09	0	0	2,79708E- 07
1	0	0,012445 09	0,011116 795	0,0	0,000154 88	0,000123 583	0	0	0,000138 35

Tableau 64 : Matrice X des coefficients du polynôme

Ce qui nous permet de calculer les estimations de chaque coefficient du polynôme selon la méthode des moindres carrés : $\hat{a} = ({}^tX \cdot X)^{-1} \cdot {}^tX \cdot Y$:

Coefficient de (1)	Valeurs calculées
a0	5,032300007
a1	-1,421625251
a2	2,52410419
a3	-3,195338368
a11	0,521611132
a22	-0,387063452
a33	1,684535922
a12	-0,566425487
a13	-0,106209797
a23	-0,368706778

Tableau 65 : Valeurs obtenues pour les coefficients du polynôme (matrice â)

5.2.3 Réalisation du plan d'expériences dans le cas du CG

Le Tableau 66 présente les domaines expérimentaux, le pas et le centre utilisés pour la détermination de la matrice des essais du PEX sur le CG, Tableau 67

	Quantité de substrat (mg)	Quantité de TEMPO (mg)
Valeur minimale	547,6	62,6
Valeur maximale	2044,1	133,3
centre	1295,8	97,9
pas	748,3	35,3

Tableau 66 : Domaines expérimentaux, centre et pas

Le Tableau 67 présente les conditions des essais effectués pour le PEX sur CG.

n° ex.	Masse de substrat (mg)	Masse de TEMPO (mg)	Masse de substrat réellement mise (mg)	Masse de TEMPO réellement mise (mg)
1	548	63	547	63,4
2	2044	63	2044	63,3
3	548	133	547	133,3
4	2044	133	2044	134,2
5	238	98	242	99,4
6	2354	98	2355	97,8
7	1296	48	1297	48,1
8	1296	148	1297	148,6
9	1296	98	1297	99,7
10	1296	98	1297	97,8
11	1296	98	1311	98,7
12	1296	98	1297	98,5
13	1296	98	1297	98,1
14	1296	98	1297	98,9
15	1296	98	1311	99,0
16	1296	98	1311	98,2

Tableau 67 : Conditions des essais du PEX sur CG

En valeurs codées, la matrice d'essais du PEX est la suivante :

Quantité de substrat (mg)	Quantité de TEMPO (mg)	Quantité de substrat (mg)	Quantité de TEMPO (mg)	X1	X2
548	63	547,6	63,4	-1	-0,97976716
2044	63	2044,1	63,3	1	-0,9820299
548	133	547,6	133,3	-1	0,997303427
2044	133	2044,1	134,2	1	1,024739171
238	98	242,2	99,4	-1,40818	0,039597991
2354	98	2355,2	97,8	1,415777	-0,00480832
1296	48	1297,8	48,1	0,002544	-1,41025377
1296	148	1297,8	148,6	0,002544	1,431466996
1296	98	1297,8	99,7	0,002544	0,0489318
1296	98	1297,8	97,8	0,002544	-0,00622253
1296	98	1311,1	98,7	0,020318	0,020364686
1296	98	1297,8	98,5	0,002544	0,014142146
1296	98	1297,8	98,1	0,002544	0,002828437
1296	98	1297,8	98,9	0,002544	0,025455855
1296	98	1311,1	99,0	0,020385	0,028284282
1296	98	1311,1	98,2	0,020385	0,005656865

Tableau 68 : Conversion des valeurs réelles (deux colonnes de gauche), en valeurs codées (deux colonnes de droite)

Le montage est le suivant :

Les essais sont réalisés dans un autoclave en inox de 200 ml.



Figure 203 : Structure de l'autoclave utilisé pour des essais en conditions étanches

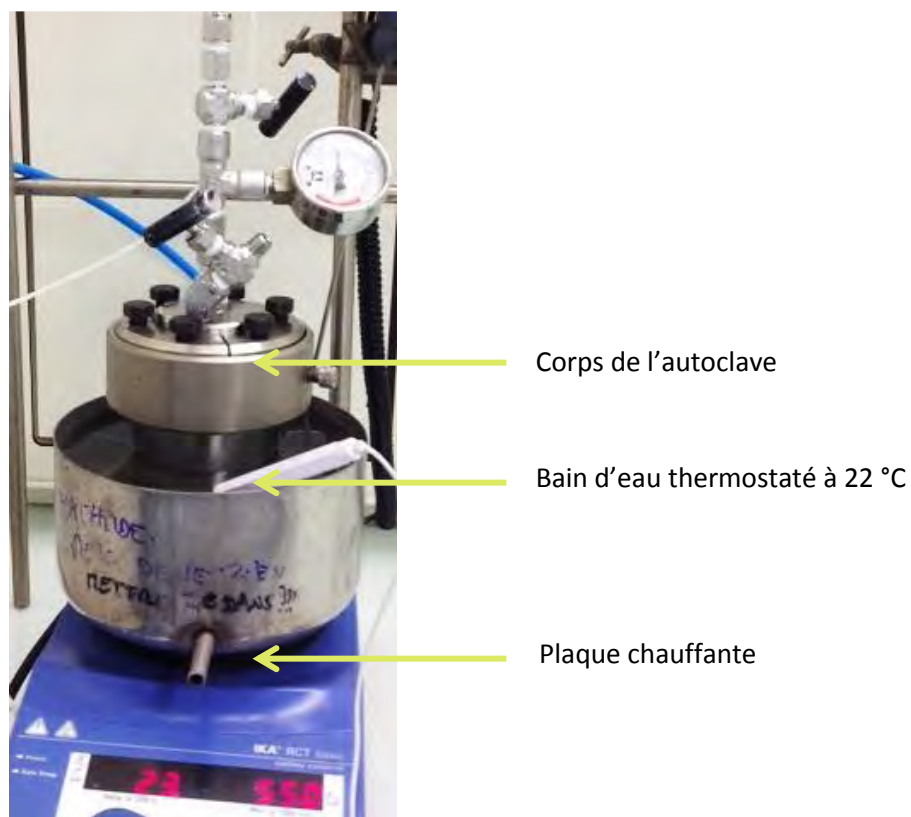


Figure 204 : Autoclave en cours de réaction

5.2.3.1 Modélisation de la formation du CG oxydé

Nous choisisons comme réponse : Y = aire relative de CG oxydée. Nous allons associer au Tableau 68 les valeurs de la réponse que nous souhaitons décrire à l'aide d'un modèle polynômial ($Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12} X_1X_2$). Il en résulte le Tableau 69.

X1	X2	Y pic CGoxydé
-1	-0,97976716	24,25
1	-0,9820299	8,42
-1	0,997303427	36,85
1	1,024739171	10,97
-1,40818	0,039597991	45,58
1,415777	-0,00480832	8,55
0,002544	-1,41025377	11,7
0,002544	1,431466996	18,64
0,002544	0,0489318	17,26
0,002544	-0,00622253	16,04
0,020318	0,020364686	11,66
0,002544	0,014142146	17,26
0,002544	0,002828437	16,04
0,002544	0,025455855	11,66
0,020385	0,028284282	17,26
0,020385	0,005656865	16,04

Tableau 69 : Matrice associant les valeurs des variables codées à celles de la variable de sortie, ici les aires de CG oxydée obtenue

Nous calculons ensuite la matrice X :

1	X ₁	X ₂	X ₁ X ₂	X ₁ ²	X ₂ ²
1	-1	-0,97976716	0,979767158	1	0,959943684
1	1	-0,9820299	-0,9820299	1	0,964382724
1	-1	0,997303427	-0,99730343	1	0,994614126
1	1	1,024739171	1,024739171	1	1,050090368
1	-1,40817743	0,039597991	-0,055761	1,982963679	0,001568001
1	1,415776574	-0,00480832	-0,0068075	2,004423308	2,31199E-05
1	0,002544357	-1,41025377	-0,00358819	6,47375E-06	1,988815701
1	0,002544357	1,431466996	0,003642164	6,47375E-06	2,049097762
1	0,002544357	0,0489318	0,0001245	6,47375E-06	0,002394321
1	0,002544357	-0,00622253	-1,5832E-05	6,47375E-06	3,87199E-05
1	0,02031783	0,020364686	0,000413766	0,000412814	0,00041472
1	0,002544357	0,0489318	0,0001245	6,47375E-06	0,002394321
1	0,002544357	-0,00622253	-1,5832E-05	6,47375E-06	3,87199E-05
1	0,02031783	0,020364686	0,000413766	0,000412814	0,00041472
1	0,002544357	0,0489318	0,0001245	6,47375E-06	0,002394321
1	0,002544357	-0,00622253	-1,5832E-05	6,47375E-06	3,87199E-05

Tableau 70 : Matrice X

A l'aide des Tableau 69 et Tableau 70, nous calculons les estimations de chaque coefficient du polynôme $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12}X_1X_2$:

	â en valeurs codées
a0	15,41179437
a1	-11,7453786
a2	3,164485135
a12	-2,55314668
a11	5,53900434
a22	-0,35485275

Tableau 71 : Valeurs des coefficients du polynôme obtenues

Nous établissons ainsi le modèle $Y = 15,41179437 - 11,7453786 X_1 + 3,164485135 X_2 - 2,55314668 X_1X_2 + 5,53900434 X_1^2 - 0,35485275 X_2^2$. Il est nécessaire de le valider par une approche statistique. Nous réalisons alors une comparaison entre les valeurs obtenues par ce modèle et les données expérimentales Tableau 72 :

Y réel	Y prédit	Différence (%)	Y moyen
24,25	26,7535908	-10%	24,25
8,42	8,26285356	2%	8,42
36,85	38,0454496	-3%	36,85
10,97	9,45925508	14%	10,97
45,58	43,2021328	5%	45,58
8,55	9,88762834	-16%	8,55
11,7	10,2226431	13%	11,7
18,64	19,1753749	-3%	18,64
17,26	15,5356222	10%	14,98666667
16,01	15,3622814	4%	14,98666667
11,66	15,2386805	-31%	14,98666667
17,26	15,5356222	10%	14,98666667
16,04	15,3622814	4%	14,98666667
12,9	15,2386805	-26%	14,98666667
17,35	15,5356222	10%	14,98666667
15,9	15,3622814	3%	14,98666667

Valeurs de la moyenne des répétitions

Tableau 72 : Calcul de Y moyen et de la différence entre Y prédit par le modèle et Y réel

Nous constatons que les écarts entre ces valeurs sont raisonnables, à l'exception de **deux points**, mais seule l'analyse de variances (test de Fischer) est un critère statistique valable. A l'aide du Tableau 72 nous calculons les différentes grandeurs qui nous permettront d'évaluer l'écart entre le modèle polynômial et le modèle réel afin d'éprouver la validité de l'équation établie. Il faut donc calculer σ_e , σ_a et σ_r ainsi que les degrés de liberté nécessaires :

Degré de liberté de l'ajustement	3
Degré de liberté de l'expérimentale	7
Degré de liberté des résidus (dofr)	10
Ajustement de la variance	7,123720499
Variance expérimentale	5,852298413
Variance résiduelle	5,582907575
Fisher calculé	1,217251752
F correspondant dans la table de Fisher	4,3468314

Nous constatons que notre coefficient de Fisher est bien inférieur à la valeur de la table. Notre modèle est donc validé sur ce point.

D'autre part, il est nécessaire de calculer l'incertitude des coefficients :

A0	A1	A2	A12	A11	A22
0,13	0,00	0,00	0,00	-0,06	-0,06
0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
-0,06	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00
-0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12

Tableau 73 : Matrice des incertitudes sur les coefficients du polynôme

L'intervalle de confiance de chaque coefficient se calcule comme $t\sigma$. La valeur de t-student utilisée correspond à *dofr* (10) degrés de liberté et 99% de probabilité : $t = 2,228138852$. Si la valeur absolue du coefficient considéré est supérieure à son intervalle de confiance, le coefficient est significatif à 95% de probabilité. Les coefficients non significatifs peuvent être exclus du modèle polynomial sans que cela apporte un changement majeur à l'estimation.

Test de Student					
Valeur de la diagonale de la matrice	$\sigma = \sqrt{(\sigma^2_r * \text{diag})}$	$t\sigma$	\hat{a}	Coefficient significatif ?	
0,13	0,83578991	1,862256	15,4118	a0	non applicable
0,13	0,836249288	1,8632795	-11,745	a1	oui
0,12	0,835026673	1,8605554	3,16449	a2	oui
0,25	1,186233723	2,6430934	-2,5531	a12	non significatif
0,13	0,837489304	1,8660425	5,539	a11	oui
0,12	0,831490184	1,8526756	-0,3549	a22	non significatif

Tableau 74 : Validation des coefficients a_i , de la matrice \hat{a} , par un test de Student

Nous obtenons ainsi le modèle final.

5.2.3.2 Validation statistique de la modélisation de la formation de CG hémiacétal

Le modèle établi pour décrire l'aire du CG hémiacétal formé est : $Y = 6,55 - 2,11 X_1 + -0,49 X_2 + 1,11 X_1 X_2 - 1,499 X_1^2 - 0,19 X_2^2$. Nous réalisons une comparaison entre les valeurs obtenues par le modèle et les données expérimentales Tableau 75 :

Y réel	Y calculé	%Différence	Y moyen
4,24	4,32847584	-2%	4,24
6,49	6,38273291	2%	6,49
0,16	1,13815537	-611%	0,16
6,86	7,59534658	-11%	6,86
1,1	0,51738983	53%	1,1
6,81	6,54087515	4%	6,81
6,68	6,87220902	-3%	6,68
6,48	5,45095179	16%	6,48
6,61	6,53455791	1%	6,713333333
6,83	6,56237324	4%	6,713333333
6,7	6,58653503	2%	6,713333333
6,5	6,53455791	-1%	6,713333333
6,6	6,56237324	1%	6,713333333
6,4	6,58653503	-3%	6,713333333
6,2	6,53455791	-5%	6,713333333
6,63	6,56237324	1%	6,713333333

Tableau 75 : Calcul de la différence entre Y réel et Y calculé à partir du modèle établi. En rose, les valeurs sortant de la zone de tolérance.

Nous constatons que les écarts entre ces valeurs sont raisonnables, à l'exception de deux points mais seule l'analyse de variances (test de Fischer) est un critère statistique valable.

Nous calculons ensuite les différentes grandeurs qui nous permettront d'évaluer l'écart entre le modèle polynômial et le modèle réel afin d'éprouver la validité de l'équation établie Tableau 76 :

Degré de liberté de l'ajustement (dofa)	3
Degré de liberté de l'expérimentale (dofe)	7
Degré de liberté des résidus (dofr)	10
Ajustement de la variance : σ_a	1,073669497
Variance expérimentale : σ_e	0,064493651
Variance résiduelle : σ_r	0,326870167
Fisher calculé avec	16,64767746
F correspondant dans la table de Fisher	4,3468314

Tableau 76 : Calculs des grandeurs nécessaires à la validation du modèle

Nous constatons que le test de Fisher ne valide pas notre modèle car la valeur du F calculé est très supérieure à celle du F de la table.

5.3 Détermination de la quantité d'enzyme nécessaire à la catalyse par le calcul de l'activité enzymatique

5.3.1 Matériel et méthode

La laccase que nous utilisons pour les réactions provient de chez Sigma-Aldrich. Elle est produite au sein d'organismes qu'il faut par la suite détruire pour la récupérer. Par conséquent, la laccase est mélangée à un ensemble d'autres protéines issues de l'altération du champignon qui la fabrique. Son extraction spécifique est donc complexe. En effet, de par sa composition très similaire aux autres polypeptides, elle est souvent récoltée avec une pureté variable. Les produits du fournisseur contiennent donc plus ou moins de protéines annexes sans propriété catalytique et leur proportion n'est pas constante. Par conséquent, il est nécessaire de doser l'activité de chaque lot reçu afin de mettre dans le réacteur une quantité de produit assurant une activité catalytique toujours identique.

L'activité d'une enzyme correspond à une quantité de moles de substrat transformée par minutes et par mg d'enzyme.

Le protocole utilisé pour déterminer l'activité de la laccase est inspiré des travaux de (Niku-Paavola, Raaska, & Itävaara, 1990) :

Nous choisissons de catalyser l'oxydation de l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique acide) (Figure 205) car celui-ci, sous l'action de la laccase, passe du vert au bleu foncé. La détection des changements d'absorbance (A) par spectrophotométrie U.V permet un suivi facile de la réaction.

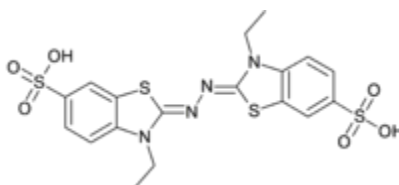


Figure 205: ABTS

- Afin d'observer l'activité totale de l'échantillon d'enzyme, une solution saturée en substrat est nécessaire afin que l'ABTS ne soit pas réactif limitant,
- L'ensemble des solutions préparées sont à base d'un tampon succinate à 0,025 mol.L⁻¹ et pH 4,5,
- Les cuves de spectrophotométrie utilisées sont en quartz,
- La solution de référence contient 1ml de la solution d'enzyme et 2 ml d'eau milliQ,
- La longueur d'ondes pour la détection est de 436 nm,
- La durée d'analyse est de 180 secondes avec une mesure toute les 0,5 secondes,
- Les concentrations en enzymes testées sont :

$$C_{m4} = 0,4 \cdot 10^{-6} / 1 \cdot 10^{-3} = 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$$

$$C_{m2} \text{ dans 1 ml de } 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$$

$$C_{m3} \text{ dans 1 ml de } 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$$

$$\text{Avec } C_{m3} = 3x C_{m2} \text{ et } C_{m3} = 9x C_{m4}$$

Le but d'expérimenter trois concentrations différentes a pour objectif de valider la qualité des mesures. Si celles-ci sont correctes, les coefficients directeurs de la droite $A = f(\text{temps})$ tracée pour chaque concentration testée, doivent être proportionnels. Donc, si a_4 , a_2 et a_3 sont respectivement les coefficients directeurs des droites pour C_{m4} , C_{m2} et C_{m3} , nous devons retrouver $a_3 = 3x a_2$ et $a_3 = 9x a_4$.

- Pour chaque mesure, nous mélangeons 2 ml d'une solution d'ABTS à 4,125 g.L⁻¹ et 1 ml d'une solution d'enzyme à C_{m2} C_{m3} ou C_{m4} dans la cuve de mesure.

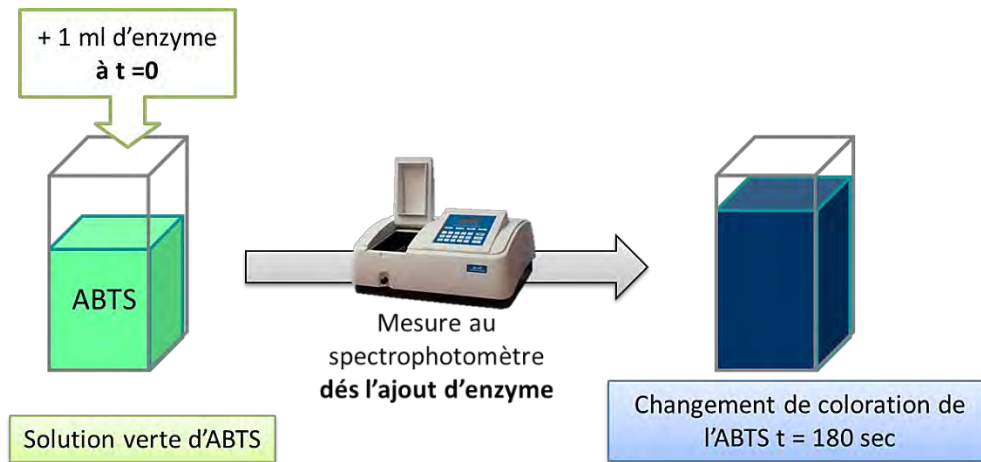


Figure 206 : Manipulation au cours de la mesure au spectrophotomètre

- La mesure est effectuée deux fois pour chaque concentration avec un mélange frais enzyme/ABTS,
- Les mesures sont effectuées immédiatement après ajout de l'enzyme dans la cuve contenant l'ABTS, mais aussi après cinq minutes d'attente après ajout de la solution de catalyseur. Les données acquises sont utilisées pour les calculs finaux de l'activité de l'enzyme.

5.3.2 Résultats des mesures

5.3.2.1 Vérification de la qualité des mesures

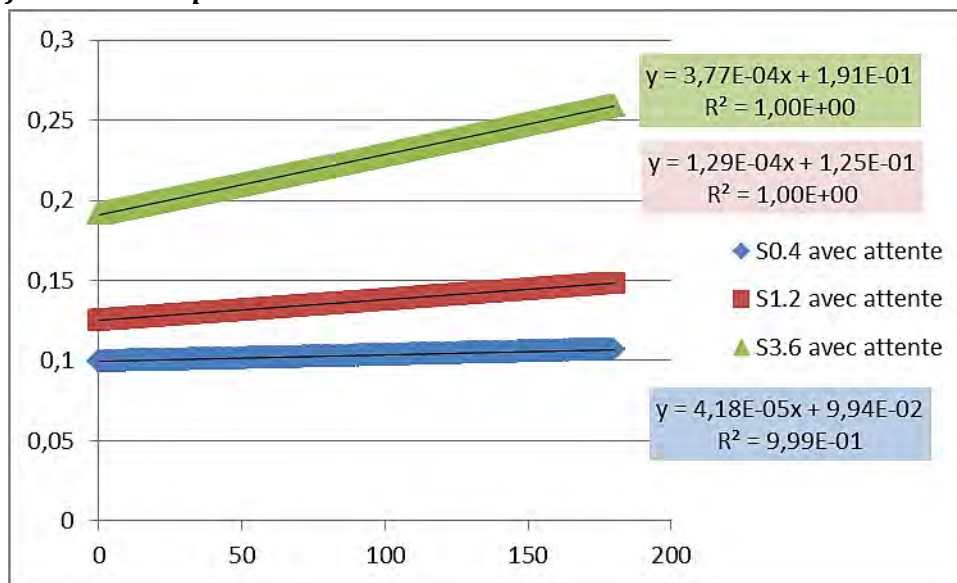


Figure 207 : A = f(temps) C_{m4} = S 0.4, C_{m3} = S 3.6 et C_{m2} = S 1.2

Nous validons les relations théoriques par les rapports : $a_3 = 3 \times a_2$ et $a_3 = 9 \times a_4$ entre les coefficients directeurs puisque $0,000377/0,000129 = 2,9$ soit presque 3 et $0,000377/0,0000418 = 9$, avec $a_3 = 0,000377$ et $a_4 = 0,0000418$ et $a_2 = 0,000129$.

5.3.2.2 Calcul de l'activité

Afin de déterminer la quantité d'ABTS oxydée par quantité d'enzyme et par unité de temps, nous devons calculer la quantité d'ABTS qui a été transformée pendant une durée précise. Nous choisissons d'étudier l'évolution de l'absorbance sur 180 secondes afin d'avoir le maximum d'écart entre les deux valeurs pour A. Nous nommons A0 l'absorbance à t=0 et A180 l'absorbance à t=180 sec. C'est la différence entre ces deux absorbances qui permet de déterminer la quantité d'ABTS transformée.

Solution	C réelle (mg/ml)	mg d'enzyme dans 1ml de solution ajoutée
C _{m3}	0,00371	3,70861.10 ⁻⁶
C _{m2}	0,00122	1,22054.10 ⁻⁶
C _{m4}	0,00038	3,81183.10 ⁻⁷

Tableau 77 : Concentration réelle des solutions permettant le calcul de l'absorbance

Cependant, A0 et A180 ne donne pas directement la quantité d'ABTS transformée. Il faut passer par la loi de Beer-Lambert pour « convertir » la différence d'absorbance noté ΔA en concentration molaire d'ABTS puis en quantité de matière.

Le calcul de l'activité enzymatique est donc basé sur la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \times l \times C$

Avec : $\epsilon = 29300 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

L = longueur de la cuve = 1 cm

C = concentration en ABTS qui à réagit avec l'enzyme au moment de la mesure en mol.cm^{-3} (à déterminer)

A : sans unité et connue

Ainsi, le calcul général pour obtenir la quantité d'ABTS transformée en 3 minutes est:

$$\begin{aligned} A_0 - A_{180} &= l\epsilon C_0 - l\epsilon C_{180} \\ &= l\epsilon (C_0 - C_{180}) \\ \frac{A_0 - A_{180}}{l\epsilon} &= (C_0 - C_{180}) \end{aligned}$$

$$\left(\frac{A_0 - A_{180}}{l\epsilon} \right) V_{\text{total}} = (C_0 - C_{180}) V_{\text{total}}$$

Avec V_{total} = « volume moyen final = volume (solution d'ABTS + solution d'enzyme dans la cuve de mesure) = 3 ml

Nous obtenons le tableau suivant :

	S3,6	S1,2	S 0,4
A (t=180)	0,25925	0,14875	0,10695
A(t=0)	0,1914	0,1255	0,0995
$\Delta A = A (t=180) - A(t=0)$	0,06785	0,02325	0,00745
$\Delta A / (l\epsilon)$ avec $l\epsilon = 29300$	$2,3157 \cdot 10^{-6}$	$7,9352 \cdot 10^{-7}$	$2,5427 \cdot 10^{-7}$
$(\Delta A / (l\epsilon)) \cdot \text{Volume total de solution dans la cuve} = \text{Quantité d'ABTS consommées en 180 sec (en moles)}$	$6,9471 \cdot 10^{-9}$	$2,3805 \cdot 10^{-9}$	$7,628 \cdot 10^{-10}$
en 1 minute : moles d'ABTS consommées	$2,3157 \cdot 10^{-9}$	$7,9352 \cdot 10^{-10}$	$2,5427 \cdot 10^{-10}$
moles d'ABTS consommées/min/mg d'enzymes	0,00062441	0,00065014	0,00066704

Tableau 78 : Calcul de l'activité enzymatique

Le calcul pour les trois concentrations nous permet de constater que les activités enzymatiques obtenues sont sensiblement les mêmes. Cette détermination expérimentale et cette méthode de calcul seront utilisées pour toute détermination d'activité enzymatique au cours des travaux de thèse.

5.4 Oxydation des substrats en catalyse hétérogène

5.4.1 Calcul de la quantité de TEMPO immobilisé introduite pour l'oxydation des substrats glycérol et CG avec le protocole CE6

Le produit Siliacat-TEMPO® propose un catalyseur dont la molécule active (le TEMPO) est fixée sur silice avec une charge en azote de $0,7 \cdot 10^{-3}$ moles de « N/g » (« N/g » signifie moles d'azote par gramme, indication du fabricant). Il est nommé T2.

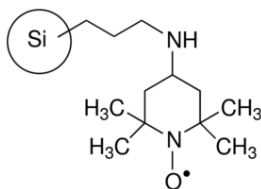


Figure 208 : Siliacat TEMPO® référence Sigma 709859

Comme nous pouvons le constater sur la Figure 140, la molécule possède deux atomes d'azote. Par conséquent dans la charge de $0,7 \cdot 10^{-3}$ moles de N/g de produit commercial, seulement 50% de cette quantité représente l'azote utilisée pour la fixation du co-catalyseur sur son support.

Dans le protocole opératoire de CE6, la quantité souhaitée de TEMPO est de 93,75 mg, équivalente à $n = m/M = 0,09375/156,25 = 6 \cdot 10^{-4}$ moles. Ainsi, il sera nécessaire d'utiliser $2 \times 6 \cdot 10^{-4} = 12 \cdot 10^{-4}$ moles d'azote pour avoir l'équivalent catalytique nécessaire de TEMPO avec le produit Silicycle. Ainsi il faudra : $12 \cdot 10^{-4} / 0,7 \cdot 10^{-3} = 1,714$ g de catalyseur sur support.

Avec le support méthacrylate produit Sigma Aldrich de référence 566098 (T1) : sa concentration est de $1,0 \cdot 10^{-3}$ mole de TEMPO/g de polymère. Il faut donc $6,0 \cdot 10^{-4} / 1,0 \cdot 10^{-3} = 0,6$ g de T1 pour une réaction d'oxydation avec CE6.

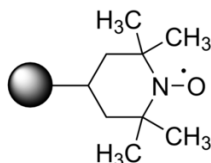


Figure 209 : T1, TEMPO sur méthacrylate schématisé (Sigma Aldrich)

Pour effectuer CE6, les autres conditions resteront inchangées. Seul le TEMPO sera utilisé sous ses formes supportées. Les tests sont effectués sur glycérol, en présence de dioxygène car nous connaissons beaucoup plus de molécules issues de l'oxydation de celui-ci. Les échantillons en fin de réaction sont cependant traités différemment pour le protocole CE6 en catalyse homogène (filtration simple en fin de réaction). Les catalyseurs étant solides, ceux-ci doivent être séparés du milieu après la réaction. Cependant, étant trop fin pour une filtration sur Büchner, une centrifugation à 5000g pendant 5 minutes à 20°C est nécessaire afin d'assurer la récupération des poudres. Le surnageant est ensuite récupéré puis filtré à 0,45 et 0,22 μm . Quant au solide, il est mélangé à de l'eau milliQ et de nouveau centrifugé afin de récupérer le liquide et les réactifs qui seraient restés piégés dans le catalyseur. Cette opération est répétée deux fois. Les liquides récupérés sont ajustés à 50 ml en fiole jaugée et analysés en HPLC dans les conditions déjà décrites.

5.4.2 Protocole de fixation de la laccase en billes d'alginate

Le protocole utilisé est inspiré de celui de Brandi, D'Annibale, Galli, & Gentili (Brandi, D'Annibale, Galli, & Gentili, 2006). Un litre de tampon acétate à $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ est fabriqué à l'aide d'une solution de soude à $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ afin d'obtenir le pH final de 5. Dans ce tampon, nous ajoutons 0,15 moles de sulfate de cuivre : CuSO_4 .

Nous fabriquons une solution d'alginate de sodium à environ 3% massique. Celui-ci est d'origine alimentaire, semblable à une poudre blanche. Ainsi, 0,3051 g d'alginate est mélangé à 10,0484 g d'eau milliQ. L'ensemble est ensuite placé 20 minutes aux ultrasons sans chauffer. Une fois la solution homogène et l'alginate bien dissout (gel translucide sans grumeaux), nous disposons 3,5 ml de solution dans une seringue bouchée de 5 ml. Nous y ajoutons alors 2,052 g de laccase.

Nous mélangeons ensuite les réactifs dans le corps de la seringue (sans le poussoir) afin d'obtenir une solution homogène. La seringue est ensuite retournée, nous y ajoutons le poussoir et nous laissons les bulles d'air bloquées dans l'alginate remonter et être libérées en surface afin d'éviter l'explosion de la seringue au cours de l'étape suivante.

Nous plaçons alors en sortie de seringue une aiguille Gauge 18 de chez Sigma en inox. La seringue est ensuite insérée dans un poussoir automatique NORM-JECT. Le diamètre de la seringue est paramétré dans la machine à 13 mm et le débit à 1 ml/min (Figure 210).



Figure 210 : Poussoir automatique avec la seringue contenant la solution d'alginate dont la sortie est située au-dessus de la solution de coagulation du gel

Les gouttes de solution sortant de l'aiguille tombent dans la solution de sulfate de cuivre fabriquée. Au moment du contact entre la goutte et le sulfate de cuivre, des billes se forment. Nous les laissons reposer à température ambiante pendant une heure dans la solution de fabrication. Elles sont alors mises à 4°C dans de la solution fraîche de sulfate de cuivre toute la nuit (Figure 211).

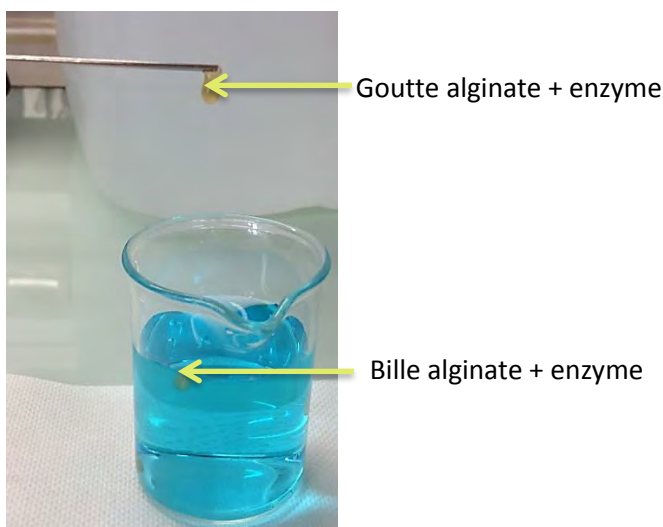


Figure 211 : Différence d'état entre le liquide sortant de l'aiguille, et celui plongé dans la solution de précipitation en cours de gélification

Nous remarquons que la solution de sulfate de cuivre retirée a pris une couleur légèrement jaune indiquant que des enzymes ont probablement diffusé depuis la bille vers l'extérieur. Il en est de même pour la solution dans laquelle les enzymes ont reposé toute la nuit. Nous rinçons ensuite les billes à l'eau milliQ trois fois sur du papier filtre. Elles sont stockées avec 1 ml d'eau dans un contenant à 4°C (Figure 147).

En fin de synthèse, nous avons formé 103 billes. Sachant qu'il y a 2052 mg d'enzyme dans l'ensemble des billes, cela fait $2052/103 = 19,92$ mg d'enzyme par billes soit les 20 mg par billes.

L'activité des enzymes utilisées renvoie que 333 mg de celles-ci sont nécessaires pour fournir les 200 U demandées pour la réaction du protocole CE6 (0,0006 mol ABTS/min/mg d'enzyme). Il faut donc $333/20 = 17$ billes pour une réaction d'oxydation avec le système laccase/TEMPO de CE6. Des billes sans enzymes sont également fabriquées selon le même processus, à l'exception de l'ajout de protéine dans la seringue à l'aide de 0,2997 g d'alginate dans 10,6885g d'eau milliQ. Elles seront dites « vides » (Figure 147).



Figure 212 : Billes d'alginate avec enzymes (à gauche) et bille d'alginate vides (à droite)

La différence de forme des billes s'explique par la dissemblance de la viscosité des solutions d'alginate utilisées. Dans le cas où des enzymes sont ajoutées, la solution étant très visqueuse, le liquide est extrudé lentement et donne donc naissance à une goutte déformée qui va rester légèrement accrochée.

5.4.3 Détermination de la quantité de protéines dans les milieux réactionnels par électrophorèse

Le protocole d'électrophorèse issu des travaux de Van Der Rest, Sanchez, Regad, Frasse, & Charton (Van Der Rest, Sanchez, Regad, Frasse, & Charton, 2010).

L'échantillon doit contenir entre 0,2 et 0,5 d'azote mg/ml afin d'être observé. Une fois les échantillons prêts, nous effectuons un mélange de 500µL de celui-ci avec 500µL d'une solution de dénaturation ((6) dénaturante puis stabilisante) dans un Eppendorf, vortexé par la suite. Nous prélevons 500 µL de cet ensemble et y ajoutons 500µL d'une solution de DTT (2). Nous vortexons par la suite l'ensemble. Nous recouvrons de parafilm le bouchon de l'Eppendorf puis le plaçons dans un bain-marie dès que l'eau bout et laissons les échantillons 5 minutes maximum. Cette étape permet de dénaturer les protéines et fait bleuir la solution de dénaturation.

L'échantillon revenu à température ambiante, nous le vortexons et en injectons alors 20µL dans un puits de migration d'un gel BIORAD préalablement placé dans l'appareil de migration et baignant dans le tampon de migration (4). Tout échantillon est déposé deux fois dans deux puits différents afin de s'assurer de la répétabilité de l'expérience. Ces étapes sont réalisées pour tous les échantillons que nous souhaitons analyser. La migration a lieu à 200 Volts.

Une fois la migration terminée, le gel est sorti de son cadre de fixation, puis placé dans la solution de coloration BIORAD pendant 2 heures et agité doucement. Le gel est alors extrait de la solution de coloration et placé dans celle de décoloration (5). Celle-ci est changée régulièrement.

Les compositions des solutions sont :

- Solution de DTT (2): 7,71 mg de DTT dans 1 ml de milliQ
- Solution de dénaturation (6) : 50µL de (2) et 950µL de solution de Laemmli
- Tampon de Migration (4) (conserver à 4°C) : 1L d'eau milliQ et 14,4 de glycine (à 4°C), 3g de TRIS et 10 ml d'une solution de SDS à 10 % (10 g de SDS dans 90g d'eau)
- Solution de décoloration (5) : 20% méthanol, 10% acide acétique, 10% glycérol, 60 % d'eau milliQ

5.4.4 Analyse des billes au microscope électronique à balayage

Les billes sont observées au MEB (MEB FEG FEI Quanta 250). Elles ont été préalablement plongées dans différents bains de concentrations croissantes en éthanol afin d'échanger l'eau du gel par l'alcool, puis elles sont placées en CO₂ supercritique afin de retirer tout le solvant. Nous obtenons ainsi des aérogels. Cette procédure est décrite par les travaux de Renzo, et al., (Renzo, et al., 2005). Les billes ont ensuite été recouvertes d'un film de platine (5 nm) afin d'améliorer la qualité des observations.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le CMEAB (plateforme GenoToul Imagerie) de Toulouse et en particulier avec M. Payre.

VII. Conclusion

Le choix d'une catalyse basée sur le biomimétisme, avec des enzymes, nous a permis de produire de potentiels agents de chélation dont la fabrication est similaire au vivant (22°C, à pression atmosphérique dans l'eau). Ces possibles agents de vectorisation sont ainsi très proches des transporteurs de la plante, des constituants de ses barrières (cires, parois, membrane), et de ses intermédiaires métaboliques, comme l'acide glycérique ou encore le glycéraldéhyde.

L'objectif de ces travaux, de passer d'une usine cellulaire à une usine chimique qui lui est proche, est donc rempli. Les composés toxiques nécessaires à l'oxydation ont ainsi été en grande partie évités ainsi que l'utilisation de catalyseurs non renouvelables comme l'or ou le platine. Enfin, l'ensemble des produits que nous proposons est valorisable dès leur formation ou comme synthon de base.

La laccase, en tant qu'enzyme, est un catalyseur renouvelable, bien connue et aujourd'hui produite à une échelle industrielle. Son coût réduit rend donc nos choix attractifs. Le TEMPO reste le seul réactif plus compliqué à acheter car plus cher mais l'utilisation d'une membrane de filtration permettrait son recyclage et donc la diminution de sa consommation. En outre, le glycérol est un produit abondant sur le marché et totalement compatible avec les plantes puisqu'il se trouve à la base des molécules qui les composent. Le CG en tant que dérivé du glycérol en conserve les avantages comme la biodégradabilité et la présence d'un caractère polaire intéressant pour les applications agronomiques.

Son oxydation par voie enzymatique a permis la production de CG oxydé dans des conditions suivant les principes de la chimie verte. Cet HA se trouve en outre actuellement aux croisements de nombreuses synthèses, en remplacement de produits toxiques mais aussi comme nouvel additif agronomique. En effet, sous forme estérifiée, il permet d'obtenir des molécules proches des cires de la plante et de la membrane plasmique cellulaire. Enfin, l'oxydation du CG a permis la formation d'une molécule nouvelle, le CG hémiacétal dont la formation n'est pas encore expliquée mais avec un potentiel très important. Des diesters, et des polymères peuvent facilement être obtenus grâce à lui.

Les optimisations réalisées dans le but d'obtenir une plus grande quantité de CG oxydé (52% du milieu réactionnel) et d'acide glycérique (20%) nous ont permis de pouvoir envisager le passage de leur synthèse à l'échelle pré-pilote. Notamment avec la fixation sur support alginate de la laccase qui permet une meilleure conservation de la protéine et qui facilite sa récupération et son recyclage par la suite.

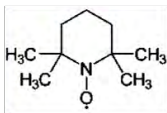
Nous proposons ci-dessous une vision schématique de ces travaux et de leurs perspectives d'applications.



Origine biologique : *Trametes versicolor*

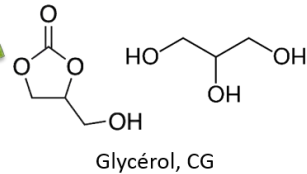


Laccase



TEMPO

Origine biologique : substrats biosourçés

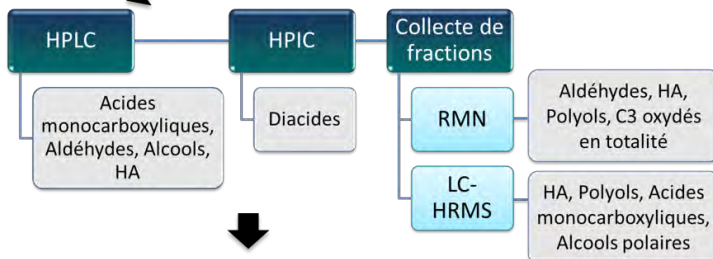


Glycérol, CG

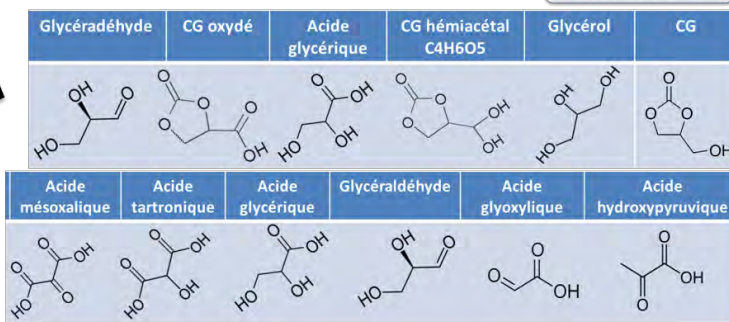
Biomimétime : oxydation fondée sur une catalyse à base de dioxygène ou de l'air ambiant, basée sur une réaction enzymatique

Identification des produits d'oxydation à l'aide du processus des travaux de thèse

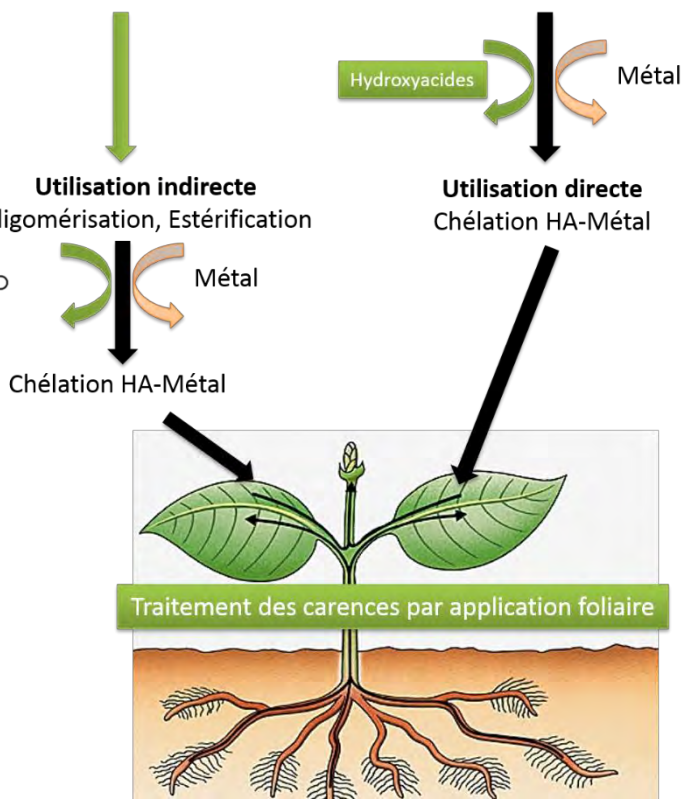
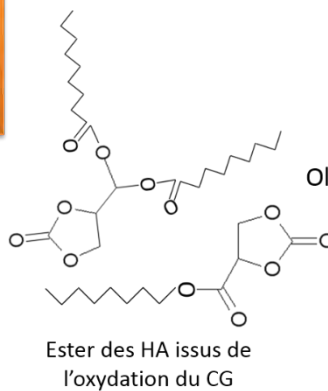
Hydroxyacides fabriqués



Hydroxyacides caractérisés



Utilisation directe ou indirecte, des HA inspirés de ceux des plantes, pour le remplacement des agents de chélation toxiques



VIII. Bibliographie

The Chemours Company. (s.d.). *Chemours (TM) glycolic acid*. Consulté le 9 2015, sur Chemours: https://www.chemours.com/Glycolic_Acid/en_US/uses_apps/industrial/ind_pgs/metal_chelation.html

Albarrán, G., & Collins, C. H. (1989). Separations using ion-moderated partition chromatography. Comparisons of efficiency and resolution with several different columns. *Journal of High Resolution Chromatography*, 12(7), pp. 486-488. doi:10.1002/jhrc.1240120718

Anderson, R., Griffin, K., Johnston, P., & Alsters, P. (2003). Selective Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds and Carboxylic Acids with Platinum Group Metal Catalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(4), pp. 517-523. doi:10.1002/adsc.200390060

Arcanjo, M. A., Silva, I. J., Rodríguez-Castellón, E., Infantes-Molina, A., & Vieira, R. S. (2017). Conversion of glycerol into lactic acid using Pd or Pt supported on carbon as catalyst. *Catalysis Today*, 279, pp. 317-326. doi:10.1016/j.cattod.2016.02.015

Arechederra, R. L., & Minter, S. D. (2009). Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell. *Fuel Cells*, 9(1), pp. 63-69. doi:10.1002/fuce.200800029

Arends, I. W., Li, Y.-X., Ausan, R., & Sheldon, R. A. (2006, 7). Comparison of TEMPO and its derivatives as mediators in laccase catalysed oxidation of alcohols. *Tetrahedron*, 62(28). doi:10.1016/j.tet.2005.12.076

Augugliaro, V., El Nazer, H. H., Loddo, V., Mele, A., Palmisano, G., Palmisano, L., & Yurdakal, S. (2010). Partial photocatalytic oxidation of glycerol in TiO₂ water suspensions. *Catalysis Today*, 151(1-2), pp. 21-28. doi:10.1016/j.cattod.2010.01.022

Augustine, A. J., Kragh, M. E., Sarangi, R., Fujii, S., Liboiron, B. D., Stoj, C. S., Kosman, D. J., Hodgson, K. O., Hedman, B., Solomon, E. I. (2008). Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. *Biochemistry*, 47(7), pp. 2036-2045. doi:10.1021/bi7020052

Balassa, L. L., & Lane, C. (1964, 5 28). *Etats-Unis Brevet n° 3,131,048*.

Baldrian, P. (2006). Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), pp. 215-242. doi:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x

Baminger, U., Ludwig, R., Galhaup, C., Leitner, C., Kulbe, K. D., & Haltrich, D. (2001). Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), pp. 541-550. doi:10.1016/S1381-1177(00)00034-5

Bautista, L. F., Morales, G., & Sanz, R. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase from *Trametes versicolor* covalently immobilized on amino-functionalized SBA-15. *Chemosphere*, 136, pp. 273-280. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.071

- Behr, A., Eilting, J., Irawadi, K., Leschinski, J., & Lindner, F. (2008). Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. *Green Chem*, 10(1), pp. 13-30. doi:10.1039/B710561D
- Beltrán-Prieto, J. C., Kolomazník, K., & Pecha, J. (2013). A Review of Catalytic Systems for Glycerol Oxidation: Alternatives for Waste Valorization. *Australian Journal of Chemistry*, 66(5), 511-521.
- Beltran-Prieto, J. C., Pecha, J., Kasparkova, V., & Kolomaznik, K. (2013). Development of an hplc method for the determination of glycerol oxidation products. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Taylor & Francis*, 36(19), pp. 2758-2773. doi:10.1080/10826076.2012.725695
- Ben-Daniel, R., & Neumann, R. (2003). Activation of nitrous oxide and sélective oxidation of alcohols and alkylarenes catalysed by the [PV2Mo10O40]5- polyoxometalate ion. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(1), pp. 92-95. doi:10.1002/anie.200390062
- Ben-Daniel, R., Alsters, P., & Neumann, R. (2001). Selective aerobic oxidation of alcohol with a combination of a polyoxometalate and nitroxyl radical as catalysts. *The Journal of Organic Chemistry*, 66(25), pp. 8650-8653. doi:10.1021/jo0105843
- Bertherat-Dentone, Z., & Nova, S. (s.d.). *La sphérification basique*. Consulté le 2017, sur La cuisine moléculaire: <http://images.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fta-spherification-basique-tpe.e-monsite.com%2Fmedias%2Fimages%2F2-etape-de-la-reaction-entre-l-alginate-de-sodium-et-le-lactate-de-calcium.png&imgrefurl=http%3A%2F%2Fta-spherification-basique-tpe.e-monsit>
- Bhattacharyya, L., & Rohrer, J. S. (2012). *Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products*. (I. John Wiley & Sons, Éd.) Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/9781118147009
- Bianchi, C. L., Canton, P., Dimitratos, N., Porta, F., & Prati, L. (2005). Selective oxidation of glycerol with oxygen using mono and bimetallic catalysts based on Au, Pd and Pt metals. *Catalysis Today*, 102–103, 203–212. doi:10.1016/j.cattod.2005.02.003
- Bio by Deloitte- RITMO. (2014). *Produit de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes- Etude des connaissances disponibles et recommandations stratégiques*.
- Biswas, B., Al-Hunaiti, A., Räisänen, M. T., Ansalone, S., Leskelä, M., Repo, T., Chen, Y-T., Tsai, H-L., Naik, A. D., Railliet, A.P., Garcia, Y., Ghosh, R., Kole, N. (2012, 10). Efficient and Selective Oxidation of Primary and Secondary Alcohols Using an Iron(III)/Phenanthroline Complex: Structural Studies and Catalytic Activity. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012(28), pp. 4479-4485.
- Bolm, C., & Fey, T. (1999). TEMPO oxidations with a silica-supported catalyst. *Chemical Communications*(18), pp. 1795-1796. doi:10.1039/a905683a
- Brandi, P., D'Annibale, A., Galli, C., & Gentili, P. (2006). In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(1-2), pp. 61-69. doi:10.1016/j.molcatb.2006.04.012

- Brignon, J. M., & Gouzy, A. (2011). *INERIS, Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : EDTA et ses sels*. INERIS – DRC-10-112065-12979A.
- Brink, G.-J. t., Arends, I. W., & Sheldon, R. A. (2000). Green, Catalytic Oxidation of Alcohols in Water. *Science*, 5458(287), pp. 1636-1639. doi:10.1126/science.287.5458.1636
- Brunel, D., Fajula, F., Nagy, J., Deroide, B., Verhoef, M., Veumd, L., Peters, J.A, Van Bekkum, H. (2001). Comparison of two MCM-41 grafted TEMPO catalysts in selective alcohol oxidation. *Applied Catalysis A : General*, 213(1), pp. 73-82. doi:10.1016/S0926-860X(00)00886-3
- Callahan, D. L., Baker, A. J., Kolev, S. D., & Wedd, A. G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(1), pp. 2-12. doi:10.1007/s00775-005-0056-7
- Cannan, R. K., & André, K. (1938). Complex Formation between Carboxylic Acids and Divalent Metal Cations. *Journal of the American Chemical Society*, 60(10), pp. 2314-2320. doi:10.1021/ja01277a012
- Carlsberg, G. (2016). *Méthode de Kjeldahl*. Consulté le 12 2016, sur Wikipédia: https://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9thode_de_Kjeldahl#Principe
- Carrettin, S., McMorn, P., Johnston, P., Griffin, K., & Hutchings, G. J. (2002). Selective oxidation of glycerol to glyceric acid using a gold catalyst in aqueous sodium hydroxide. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 696–697. doi:10.1039/B201112N
- Carrettin, S., McMorn, P., Johnston, P., Griffin, K., Kiely, C. J., Attard, G. A., & Hutchings, G. J. (2004). Oxidation of Glycerol Using Supported Gold Catalyst. *Topics in Catalysis*, 27(1-4), pp. 131-136. doi:10.1023/B:TOCA.0000013547.35106.0d
- Cecchetto, A., Fontana, F., Minisci, F., & Recupero, F. (2001). Efficient Mn–Cu and Mn–Co–TEMPO catalysed oxidation of alcohols into aldehydes and ketones by oxygen under mild conditions. *Tetrahedron Letters*, 42(38), 6651–6653. doi:10.1016/S0040-4039(01)01245-X
- Champagne, P.-P., & Ramsay, J. (2007). Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), pp. 819-823. doi:10.1007/s00253-007-1208-1
- Chen, H., Fang, B., & Hu, Z. (2007). Simultaneous HPLC Determination of Four Key Metabolites in the Metabolic Pathway for Production of 1,3-Propanediol from Glycerol. *Chromatographia*, 65(9-10), pp. 629-632. doi:10.1365/s10337-007-0193-y
- Chinchilla, L. E., Olmos, C. M., Villa, A., Carlsson, A., Prati, L., Chen, X., Blanco, G., Calvino, J., Hungría, A. B. (2015). Ru-modified Au catalysts supported on ceria–zirconia for the selective oxidation of glycerol. *Catalysis Today*, 253, pp. 178-189. doi:10.1016/j.cattod.2015.02.030
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1-2), pp. 93-96. doi:10.1016/j.micron.2003.10.029

- Collet, P. (2017). *Actu-environnement.com*. Consulté le Janvier 19, 2017, sur 2003 - 2017 COGITERRA - CNIL N°845317 - ISSN N°2107-6677: <http://www.actu-environnement.com/ae/news/nouveau-plan-ecophyto-report-objectif-cepp-financement-fermes-dephy-23770.php4>
- Commission Européenne. (2004). RAR-Risk Assessment Report-tetrasodium EDTA, EUR 21315 EN., 51.
- Corma, A., Iborra, S., & Velty, A. (2007). Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals. *Chemical Reviews*, 107(6), pp. 2411-2502. doi:10.1021/cr050989d
- Crestini, C., Perazzini, R., & Saladino, R. (2010). Oxidative functionalisation of lignin by layer-by-layer immobilised laccases and laccase microcapsules. *Applied Catalysis A: General*, 372(2), pp. 115-123. doi:10.1016/j.apcata.2009.10.012
- Davis, S. E., Ide, M. S., & Davis, R. J. (2013). Selective oxidation of alcohols and aldehydes over supported metal nanoparticles. *Green Chemistry*(15), pp. 17-45. doi:10.1039/C2GC36441G
- Demirel, S., Lehnert, K., Lucas, M., & Claus, P. (2007). Use of renewables for the production of chemicals: Glycerol oxidation over carbon supported gold catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 70(1-4), pp. 637-643. doi:10.1016/j.apcatb.2005.11.036
- Demirel-Gülen, Lucas, M., & Claus, P. (2005). Liquid phase oxidation of glycerol over carbon supported gold catalysts. *Catalysis Today*, 102-103, pp. 166-172. doi:10.1016/j.cattod.2005.02.033
- Di Renzo, F., Valentin, R., Boissiere, M., Tournette, A., Giuseppe Sparapano, K. M., Devoisselle, J.-M., Gerardin, C., Quignard, F. (2005). Hierarchical Macroporosity Induced by Constrained Syneresis in Core-Shell Polysaccharide Composites. *Chemistry of Materials*, 17(18), pp. 4693-4699. doi:10.1021/cm0503477
- Dijksman, A., Arends, I. W., & Sheldon, R. A. (2001). A Comparison of the Activity of Polymer Immobilised TEMPO (PIPO) with MCM-41 and Silica Supported TEMPO as Heterogeneous Catalysts for the Oxidation of Alcohols. *Synlett*, 1, pp. 102-104.
- Dimitratos, Messi, Porta, Prati, & Villa. (2006). Investigation on the behaviour of Pt(0)/carbon and Pt(0),Au(0)/carbon catalysts employed in the oxidation of glycerol with molecular oxygen in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 256(1-2), pp. 21-28. doi:10.1016/j.molcata.2006.04.019
- Dimitratos, N., Porta, F., & Prati, L. (2005). Au, Pd (mono and bimetallic) catalysts supported on graphite using the immobilisation method Synthesis and catalytic testing for liquid phase oxidation of glycerol. *Applied Catalysis A*, 291(1-2), pp. 210-214. doi:10.1016/j.apcata.2005.01.044
- Do Nascimento, C. W., Amarasiriwardena, D., & Baoshan, X. (2006, 3). Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *environmental pollution*, 140(1), pp. 114-123. doi:10.1016/j.envpol.2005.06.017
- Dodor, D. E., Hwang, H.-M., & Ekunwe, S. I. (2004). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), pp. 210-217. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.04.007

- Dou, J., Zhang, B., Liu, H., Hong, J., Yin, S., Huang, Y., & Xu, R. (2016). Carbon supported Pt₉Sn₁ nanoparticles as an efficient nanocatalyst for glycerol oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*, *180*, pp. 78-85. doi:10.1016/j.apcatb.2015.06.007
- EBIC Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable. (s.d.). Consulté le Janvier 2017, sur <http://www.biostimulants.eu/>
- Evangelou, M. W., Ebel, M., & Schaeffer, A. (2006). Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere*, *63*(6), pp. 996-1004. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.08.042
- Fabbrini, M., Galli, C., & Gentili, P. (2002). Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *16*(5-6), pp. 231-240. doi:10.1016/S1381-1177(01)00067-4
- Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P., & Macchitella, D. (2001, 10). An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. *Tetrahedron Letters*, *42*(43), pp. 7551-7553. doi:10.1016/S0040-4039(01)01463-0
- Fall, A., Sene, M., Gaye, M., Gómez, G., & Fall, Y. (2010). Ionic liquid-supported TEMPO as catalyst in the oxidation of alcohols to aldehydes and ketones. *Tetrahedron Letters*, *51*(34), pp. 4501-4504. doi:10.1016/j.tetlet.2010.06.086
- Ferreira, P., Phillips, E., Rippon, D., & Tsang, S. C. (2005). Catalytic oxidation of alcohols using molecular oxygen mediated by poly(ethylene glycol)-supported nitroxyl radicals. *Applied Catalysis B: Environmental*, *61*(3-4), pp. 206–211. doi:doi:10.1016/j.apcatb.2005.05.006
- Ferreira, P., Phillips, E., Rippon, D., Tsang, S. C., & Hayes, W. (2004). Poly(ethylene glycol)-Supported Nitroxyls: Branched Catalysts for the Selective Oxidation of Alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, *69*(20), pp. 6851-6859. doi:10.1021/jo0490494
- Fey, T., Fischer, H., Bachmann, S., Albert, K., & Bolm, C. (2001). Silica-Supported TEMPO Catalysts: Synthesis and Application in the Anelli Oxidation of Alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, *66*(24), pp. 8154-8159. doi:10.1021/jo010535q
- Fordham, P., Besson, M., & Gallezot, P. (1995). Selective catalytic oxidation of glyceric acid to tartronic and hydroxypyruvic acids. *Applied Catalysis A: General*, *133*(2), pp. 179-184. doi:10.1016/0926-860X(95)00254-5
- Foy, Chaney, R. L., & White. (1978, 06). The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, *29*, pp. 511-566.
- Francesco Di Renzo, R. V.-M. (2005). Hierarchical Macroporosity Induced by Constrained Syneresis in Core–Shell Polysaccharide Composites. *Chemistry of Materials*, *17*(18), pp. 4693-4699.
- Franssen, M. C., Steunenberg, P., Scott, E. L., Zuilhof, H., & Sanders, J. P. (2013). Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews*, *42*(15), p. 6491. doi:10.1039/C3CS00004D

- Frassoldati, A. (2011). Oxydation par l'oxygène moléculaire d'alcools en phase liquide en synthons carbonyles. *Thèse*. Université Claude Bernard Lyon 1, France.
- Fritz, J. S. (1988, 5). A look at contemporary ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 439(1), pp. 3-11. doi:10.1016/S0021-9673(01)81670-8
- Furia, T. E. (1990). *CRC Handbook of Food Additives* (Vol. Chapitre 6 : Sequestrants in Foods).
- Galai, S., P. de los Rios, A., Hernandez-Fernandez, F. J., Haj Kacem, S., & Tomas-Alonzo, F. (2015). Over-activity and stability of laccase using ionic liquids: screening and application in dye decolorization. *RSC Adv.*, 5(21), pp. 16173-16189. doi:10.1039/C4RA07351G
- Galli, C., & Gentili, P. (2004). Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 17(11), pp. 973-977. doi:10.1002/poc.812
- Gamez, P., Arends, I., Reedijk, J., & Sheldon, R. (2003). Copper(II)-catalysed aerobic oxidation of primary alcohols to aldehydes. *Chemical Communications (Cambridge, England)*(19), pp. 2414-2415.
- Garcia, A. C., Kolb, M. J., Van Nierop y Sanchez, C., Vos, J., & Birdja, Y. Y. (2016). Strong Impact of Platinum Surface Structure on Primary and Secondary Alcohol Oxidation during Electro-Oxidation of Glycerol. *ACS Catalysis*, 6(7), pp. 4491-4500. doi:10.1021/acscatal.6b00709
- Garcia, R., Besson, M., & Gallezot, P. (1995). Chemoselective catalytic oxidation of glycerol with air on platinum metals. *Applied Catalysis A: General*, 127, pp. 165-176. doi:10.1016/0926-860X(95)00048-8
- Gerstenbruch, S., Wulf, H., Mußmann, N., O'Connell, T., Maurer, K.-H., & Bornscheuer, U. T. (2012). Asymmetric synthesis of d-glyceric acid by an alditol oxidase and directed evolution for enhanced oxidative activity towards glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5), pp. 1243-1252. doi:10.1007/s00253-012-3885-7
- Gheorghe, A., Matsuno, A., & Reiser, O. (2006). Expedient Immobilization of TEMPO by Copper-Catalyzed Azide-Alkyne [3+2]-Cycloaddition onto Polystyrene Resin. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(9), pp. 1016-1020. doi:10.1002/adsc.200606043
- Gilhespy, M., Loka, M., & Baucherel, X. (2005). Polymer-supported nitroxyl radical catalyst for selective aerobic oxidation of primary alcohols to aldehydes. *Chemical Communications*(8), p. 1085. doi:10.1039/b415902k
- Godbold, Horst, Collins, Thurman, & Marschner. (1984). Accumulation of zinc and Organic Acids in Roots of Zinc Tolerant and Non-tolerant Ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *Journal of Plant Physiology*, 116(1), pp. 59-69. doi:10.1016/S0176-1617(84)80084-X
- González, J. C., Ascencio, A. P., González-Williamson, C. A., & Osma, J. F. (2013). *Laccase Alginate Encapsulation: Comparison between Assisted and Non-assisted Extrusion for Large-scale Production* (Vol. 39). Université de los Andes. Bogotá D.C., Colombie.

- Grillet, L., Ouerdane, L., Flis, P., Hoanga, M. T., Isaure, M.-P., Lobinski, R., Curie, C., Mari, S. (2014). Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(5), pp. 2515-2525. doi:10.1074/jbc.M113.514828
- Guazzaroni, M., Bozzini, T., & Saladino, R. (2012). Synthesis of Aldehydes by Layer-by-Layer Immobilized Laccases in the Presence of Redox Mediators. *ChemCatChem*, 4(12), pp. 1987-1996. doi:10.1002/cctc.201200330
- Guerrant, G., Lambert, M. A., & Moss, C. W. (1982). Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(2), pp. 355-360.
- Habe, H., Shimada, Y., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Itagaki, M., Watanabe, K., Yangishita, H., Sakaki, K. (2009, 8). Production of Glyceric Acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 Using Raw Glycerol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(8), pp. 1799-1805. doi:10.1271/bbb.90163
- Habe, H., Shimada, Y., Yakushi, T., Hattori, H., Ano, Y., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Itagaki, M., Watanabe, K., Yanagishita, H., Matsushita, K., Sakaki, K. (2009). Microbial Production of Glyceric Acid, an Organic Acid That Can Be Mass Produced from Glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), pp. 7760-7766.
- Haddad, P. R., Jackson, P. E., & Greenway, G. M. (1990). *Ion chromatography: principles and applications* (Vol. 46). (Elsevier, Éd.)
- Hajós, P., & Nagy, L. (1998). Retention behaviours and separation of carboxylic acids by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 717(1-2), pp. 27-38. doi:10.1016/S0378-4347(98)00247-3
- Harmens, H., Koevoets, P. L., Verkleij, J. A., & Ernst, W. H. (1994). The role of low molecular weight organic acids in the mechanism of increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytologist*, 126(4), pp. 615-621. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb02956.x
- Heeres, A., Van Doren, H. A., Gotlieb, K. F., & Bleeker, I. P. (1997). Synthesis of α - and β -d-glucopyranuronate 1-phosphate and α -d-glucopyranuronate 1-fluoride: Intermediates in the synthesis of d-glucuronic acid from starch. *Carbohydrate Research*, 299(4), pp. 221-227. doi:10.1016/S0008-6215(97)00030-X
- Heimo, W., Burkhard, W., & Putzien, S. (2014). *Brevet n° WO2014118268A1*.
- Hoekenga, Maron, Piñeros, Cançado, Shaff, Kobayashi, Ryan, Dong, Delhaize, Sasaki, Matsumoto, Yamamoto, Koyama, Kochian (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), pp. 9738-9743. doi:10.1073/pnas.0602868103
- Hong, C. S., Chin, S. Y., Cheng, C. K., Sabri, M. M., & Chua, G. K. (2015). Enzymatic conversion of glycerol to glyceric acid with immobilised laccase in Na-alginate matrix. *Procedia Chemistry*, 16, pp. 632-639. doi:10.1016/j.proche.2015.12.102

- Hoover, J. M., Bradford, L. R., & Stahl, S. S. (2013). Mechanism of Copper(I)/TEMPO-Catalyzed Aerobic Alcohol Oxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 135(6), p. 2357–2367. doi:10.1021/ja3117203
- Hopkins, W. G., & Évrard, C.-M. (2003). *Physiologie végétale*. Bruxelles: De Boeck.
- Hu, W., Knight, D., Lowry, B., & Varma, A. (2010, 11). Selective Oxidation of Glycerol to Dihydroxyacetone over Pt–Bi/C Catalyst: Optimization of Catalyst and Reaction Conditions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(21), pp. 10876-10882. doi:10.1021/ie1005096
- Isaiah, A. (2011). *development of an anisotropic copper capillary alginate scaffold with oriented tube like pores for pheochromacytoma-12 cell guidance*. TRIVANDRUM- 695011,, INDIA: Sree chitra tirunal institute for medical sciences and technology.
- Jacob, V. (2010, 8). La Chromatographie Liquide haute Performance (HPLC), Salle de TP de Génie Analytique. *Présentation Théorique de la HPLC(5)*, 57. Grenoble: IUT de Chimie de Grenoble.
- Jallet, V., Guillemot, G., Lai, J., Bauduin, P., Nardello-Rataj, V., & Proust, A. (2014). Covalent amphiphilic polyoxometalates for the design of biphasic microemulsion systems. *Chem. Commun.*, 50(50), pp. 6610-6612. doi:10.1039/C4CC02695K
- Jedsukontorn, T., Meeyoo, V., Saito, N., & Hunsom, M. (2015). Route of glycerol conversion and product generation via TiO₂-induced photocatalytic oxidation in the presence of H₂O₂. *Chemical Engineering Journal*, 281, pp. 252-264. doi:10.1016/j.cej.2015.06.078
- Jolival, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougine, C., & Pontié, M. (2000). Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *Journal of Membrane Science*, 180(1), pp. 103-113. doi:10.1016/S0376-7388(00)00522-6
- Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(15), pp. 869-883. doi:10.1007/s00018-014-1826-6
- Jupille, T., Gray, M., Black, B., & Gould, M. (1981). Ion mediated Partition HPLC. pp. 80-86.
- Karimi, B., & Badreh, E. (2011). SBA-15-functionalized TEMPO confined ionic liquid: an efficient catalyst system for transition-metal-free aerobic oxidation of alcohols with improved selectivity. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(11), 4194. doi:10.1039/c1ob05178d
- Karimi, B., & Farhangi, E. (2011). A Highly Recyclable Magnetic Core-Shell Nanoparticle-Supported TEMPO catalyst for Efficient Metal- and Halogen-Free Aerobic Oxidation of Alcohols in Water. *Chemistry - A European Journal*, 17(22), 6056-6060. doi:10.1002/chem.201100047
- Karimi, B., Biglari, A., Clark, J. H., & Budarin, V. (2007). Green, Transition-Metal-Free Aerobic Oxidation of Alcohols Using a Highly Durable Supported Organocatalyst. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(38), 7210–7213. doi:10.1002/anie.200701918

- Khenkin, A. M., & Neumann, R. (2006). Molecular oxygen and oxidation catalysis by phosphovanadomolybdates. *Chemical Communications*(24), pp. 2529–2538. doi:10.1039/b600711m
- Kimura, H., Tsuto, K., Wakisaka, T., Yuji, K., & Inaya, Y. (1993). Selective oxidation of glycerol on a platinum-bismuth catalyst. *Applied Catalysis A: General*, 96(2), pp. 217-228. doi:10.1016/0926-860X(90)80011-3
- Klibanov, A. M., Alberti, B. N., & Marletta, M. A. (1982). Stereospecific oxidation of aliphatic alcohols catalyzed by galactose oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108(2), pp. 804-808.
- Kolodziej, A., Ahn, S. D., Carta, M., Malpass-Evans, R., McKeown, N. B., Chapman, R. S., Bull, S. D., Marken, F. (2015). Electrocatalytic Carbohydrate Oxidation with 4-Benzoyloxy-TEMPO Heterogenised in a Polymer of Intrinsic Microporosity. *Electrochimica Acta*, 160, pp. 195-201. doi:10.1016/j.electacta.2015.01.106
- Kondamudi, N., Misra, M., Banerjee, S., Mohapatra, S., & Mohapatra, S. (2012). Simultaneous production of glyceric acid and hydrogen from the photooxidation of crude glycerol using TiSi₂. *Applied Catalysis B: Environmental*, 126, pp. 180-185. doi:10.1016/j.apcatb.2012.05.006
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., & Faber, K. (2004). Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 346(23), pp. 125-142. doi:DOI: 10.1002/adsc.200303177
- Lahtinen, P., Ahmada, J. U., Lankinen, E., Pihko, P., Leskelä, M., & Repo, T. (2007). Organocatalyzed oxidation of alcohols to aldehydes with molecular oxygen. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 275(1-2), 228–232. doi:10.1016/j.molcata.2007.06.001
- Lalaoui, N. (2016). Thèse : Réduction bioelectrocatalytique du dioxygène par des enzymes a cuivres connectées sur des électrodes nanostructurées et fonctionnalisées : intégration aux biopiles enzymatiques. Université Grenoble Alpes.
- Lange, O., Nobel, P., Osmond, C., & Ziegler, H. (1983). *Physiological Plant Ecology III Responses to the Chemical and Biological Environment*.
- Leclercq, L., Mouret, A., Proust, A., Schmitt, V., Bauduin, P., Aubry, J.-M., & Nardello-Rataj, V. (2012). Pickering Emulsion Stabilized by Catalytic Polyoxometalate Nanoparticles : A New Effective Medium for Oxidation Reactions. *Chemistry - A European Journal*, 18(45), pp. 14352 – 14358. doi:10.1002/chem.201201799
- Leonowicz, A., Sarkar, J. M., & Bollag, J.-M. (1988). Improvement in stability of an immobilized fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(2-3), pp. 129-135. doi:10.1007/BF01982891
- Li, Y., & Zaera, F. (2015). Sensitivity of the glycerol oxidation reaction to the size and shape of the platinum nanoparticles in Pt/SiO₂ catalysts. *Journal of Catalysis*, 326, pp. 116-126. doi:10.1016/j.jcat.2015.04.009

- Liang, D., Gao, J., Sun, H., Chen, P., Hou, Z., & Zheng, X. (2011). Selective oxidation of glycerol with oxygen in a base-free aqueous solution over MWNTs supported Pt catalysts. *Catalysis B: Environmental*, *106*(3-4), 423–432. doi:10.1016/j.apcatb.2011.05.050
- Liang, D., Gao, J., Wang, J., Chen, P., Hou, Z., & Zheng, X. (2009). Selective oxidation of glycerol in a base-free aqueous solution over different sized Pt catalysts. *Catalysis Communications*, *10*(12), 1586–1590. doi:10.1016/j.catcom.2009.04.023
- Liebmingner, S., Siebenhofer, M., & Guebitz, G. (2009). Oxidation of glycerol by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in the presence of laccase. *Bioresource Technology*, *100*(20), pp. 4541–4545. doi:10.1016/j.biortech.2009.04.051
- Lin, E. C., & Magasanik, B. (1960). The activation of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by monovalent cations. *The Journal of Biological Chemistry*, *235*, pp. 1820-1823. doi:0021-9258
- Lin, S., Chiou, C. M., & Tsai, Y. C. (1996). Purification and characterization of a glycerol oxidase from *Penicillium* sp. TS-622. *Enzyme and Microbial Technology*, *18*(5), pp. 383-387.
- Lu, L., Zhao, M., & Wang, Y. (2007). Immobilization of Laccase by Alginate–Chitosan Microcapsules and its Use in Dye Decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(2), pp. 159-166. doi:10.1007/s11274-006-9205-6
- Lui, L., Ji, L.-Y., & Wei, Y.-Y. (2008). Aerobic selective oxidation of alcohols to aldehydes or ketones catalyzed by ionic liquid immobilized TEMPO under solvent-free conditions. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, *139*(8), pp. 901-903. doi:10.1007/s00706-008-0861-0
- Maayan, G., Ganchegui, B., Leitner, W., & Neumann, R. (2006). Selective aerobic oxidation in supercritical carbon dioxide catalyzed by the H5PV2Mo10O40 polyoxometalate. *Chemical Communications*(21), pp. 2230–2232. doi:10.1039/b603148j
- Machado, A., Casimiro, M., Ferreira, L., Castanheiro, J., Ramos, A., Fonseca, I., & Vital, J. (2015). New method for the immobilization of nitroxyl radical on mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, *203*, pp. 63-72. doi:10.1016/j.micromeso.2014.10.019
- Makas, Y. G., Kalkana, N. A., Aksoy, S., Altinok, H., & Hasirci, N. (2010). Immobilization of laccase in κ-carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks. *Journal of Biotechnology*, *148*(4), pp. 216-220. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.05.011
- Marko, I. E., Giles, P. R., Tsukazaki, M., Chelle-Regnaut, I., Gautier, A., Brown, S. M., & Urch, C. J. (1999). Efficient, Ecologically Benign, Aerobic Oxidation of Alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, *64*(7), 2433-2439. doi:10.1021/jo982239s
- Marti, M., Zille, A., Cavaco-Paulo, A., Parra, J. L., & Cordech, L. (2012). Laccases stabilization with phosphatidylcholine liposomes. *Journal of biophysical chemistry*, *3*(1), pp. 81-87. doi:10.4236/jbpc.2012.31010
- Mateo, S. (2001). *Propriétés physico-chimiques et réactivité du carbonate de glycerol : faisabilité de l'obtention des α-monoethers de glycerol et propriétés solvantes*. Toulouse, INPT.

- Matijošytė, I., Arends, I. W., de Vries, S., & Sheldon, R. A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(2), pp. 142-148. doi:10.1016/j.molcatb.2009.09.019
- Mayer, A., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), pp. 551-565. doi:10.1016/S0031-9422(02)00171-1
- Mecfel-Marczewski, J., Burkhard, W., Mezger, J., Kierat, R., & Staudhame, R. (2011). *Brevet n° US20110313177A1*.
- Mecfel-Marczewski, J., Matthias, K., Diana, F., Matthias, B., Rainer, B., Diana, M. P., & Sophie, P. (2016). *Brevet n° WO2016071331 A1*.
- Mecfel-Marczewski, J., Walther, B., Mezger, J., Kierat, R., & Staudhamer, R. (2011). *Brevet n° WO2011157551 A1*.
- Mecfel-Marczewski, J., Walther, B., Mezger, J., Radoslaw, K., & Staudhamer, R. (2014). *Brevet n° US8742137*.
- Mestdagh, N. M., & Velings, M. M. (1995). Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks*, 3(3), pp. 311-330. doi:10.1016/0966-7822(94)00043-7
- Michaud Annie, G. G. (2007). SiliaCatTEMPO: An Effective and Useful Oxidizing Catalyst. *Organic Process Research & Development*, 11(4), 766-768.
- Molinari, A., Maldotti, A., Bratovic, A., & Magnacca, G. (2013). Photocatalytic properties of sodium decatungstate supported on sol-gel silica in the oxidation of glycerol. *Catalysis Today*, 206, 46-52. doi:10.1016/j.cattod.2011.11.033
- Moreira, A. B., Bruno, A. M., Souza, M. M., & Manfro, R. L. (2016). Continuous production of lactic acid from glycerol in alkaline medium using supported copper catalysts. *Fuel Processing Technology*, 144, pp. 170-180. doi:10.1016/j.fuproc.2015.12.025
- Mouloungui, Z. (2008). *Synthèse/ Réactivité du carbonate de glycérol*. Consulté le 2014, sur http://www.cnrs.fr/inc/recherche/programmes/docs/rdr1_13_03_08/mouloungui.pdf
- Mouloungui, Z., & Pelet, S. (2001). Study of the acyl transfer reaction: Structure and properties of glycerol carbonate esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(4), pp. 216-222. doi:10.1002/1438-9312(200104)103:4<216::AID-EJLT216>3.0.CO;2-J
- Mouret, A. (2014, janvier 17). Nouveaux milieu catalytiques oxydants à base de nanoparticules amphiphiles de polyoxométallates : des émulsions de pickering aux solvants verts. *Thèse*. Lille, Université Lille Nord de France.
- Mousty, C., Vieille, L., & Cosnier, S. (2007). Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), pp. 1733-1738. doi:10.1016/j.bios.2006.08.020
- Mueninghoff, J. C., & Garst, R. H. (1999). *Brevet n° WO 1999029170 A1*.

- Neumann, R., & Levin, M. (1991). Selective Aerobic Oxidative Dehydrogenation of Alcohols and Amines Catalyzed by a Supported Molybdenum-Vanadium Heteropolyanion Salt Na₆PMo₂V₂O₁₀. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(19), pp. 5707-5710. doi:10.1021/jo00019a047
- Niku-Paavola, M. L., Raaska, L., & Itävaara, M. (1990). Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. *Mycological Research*, 94(1), 27-31. doi:10.1016/S0953-7562(09)81260-4
- Ning, X., Li, Y., Yu, H., Peng, F., Wang, H., & Yang, Y. (2016). Promoting role of bismuth and antimony on Pt catalysts for the selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone. *Journal of Catalysis*, 335, pp. 95–104. doi:10.1016/j.jcat.2015.12.020
- Nohra, B., Candy, L., Blanco, J.-F., Guerin, C., Raoul, Y., & Mouloungui, Z. (2013). From Petrochemical Polyurethanes to Biobased Polyhydroxyurethanes. 46(10), pp. 3771-3792. doi:10.1021/ma400197c
- Noreen, S., Asgher, M., Hussain, F., & Iqbal, A. (2016). Performance improvement of Ca-Alginate bead cross-linked laccase from *Trametes Versicolor* IBL-04. *Bioresources*, 11(1), pp. 558-572.
- Ochoa-Gómez, J. R., Gómez-Jiménez-Aberasturi, O., Ramírez-López, C., & Belsué, M. (2012). A Brief Review on Industrial Alternatives for the Manufacturing of Glycerol Carbonate, a Green Chemical. *Organic Process Research & Development*, 16(3), pp. 389-399. doi:10.1021/op200369v
- Oliveira, Morais, Servat, Napporn, Tremiliosi-Filha, & Kokoh. (2013). Glycerol oxidation on nickel based nanocatalysts in alkaline medium – Identification of the reaction products. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 703, pp. 56-62. doi:10.1016/j.jelechem.2013.05.021
- Oliveira, Morais, Servat, Napporn, Tremiliosi-Filho, & Kokoh. (2014). Studies of the reaction products resulted from glycerol electrooxidation on Ni-based materials in alkaline medium. *Electrochimica Acta*, 117, pp. 255-262. doi:10.1016/j.electacta.2013.11.127
- Ouwerxa, C., Velingsa, N., Mestdagha, M., & Axelosb, M. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*, 6(5), pp. 393-408. doi:10.1016/S0966-7822(98)00035-5
- Pagliari, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Ross, M., & Pina, C. D. (2007). From Glycerol to Value-Added Products. *Angewandte Chemie International Edition*, pp. 4434-4440. doi:10.1002/anie.200604694
- Palmieri, G., Giardina, P., & Sannia, G. (2005). Laccase-Mediated Remazol Brilliant Blue R Decolorization in a Fixed-Bed Bioreactor. *Biotechnology Progress*, 21(5), pp. 1436-1441. doi:10.1021/bp050140i
- Palmieri, G., Giardina, P., Desiderio, B., Marzullo, L., Giamberini, M., & Sannia, G. (1994). A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(2), pp. 151-158. doi:10.1016/0141-0229(94)90078-7
- Parzuchowski, P. G., Kiźlińska, M., & Rokicki, G. (2007). New hyperbranched polyether containing cyclic carbonate groups as a toughening agent for epoxy resin. *Polymer*, 48(7), pp. 1857-1865. doi:10.1016/j.polymer.2007.02.021

- Pecina, R., Bonn, G., Burtscher, E., & Bobleter, O. (1984). High-performance liquid chromatographic elution behaviour of alcohols, aldehydes, ketones, organic acids and carbohydrates on a strong cation-exchange. *Journal of Chromatography A*, 287, pp. 245-258. doi:10.1016/S0021-9673(01)87701-3
- Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E. R., Moraes, S. G., Rosa, M. A., Minussi, R. C., & Durán, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental*, 42(2), pp. 131-144. doi:10.1016/S0926-3373(02)00220-5
- Piera, J., & Bäckvall, J.-E. (2008). Catalytic Oxidation of Organic Substrates by Molecular Oxygen and Hydrogen Peroxide by Multistep Electron Transfer—A Biomimetic Approach. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(19), pp. 3506-3523. doi:10.1002/anie.200700604
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), pp. 37663-37669. doi:10.1074/jbc.M204571200
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, 13(5), pp. 236-246. doi:10.1016/j.tplants.2008.03.003
- Polyakov, K. M., Fedorova, T. V., Stepanova, E. V., Cherkashin, E. A., Kurzeev, S. A., Strokopytov, B. V., . . . Koroleva, O. V. (2009). Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 65(6), 611–617. doi:10.1107/S0907444909011950
- Porta, F., & Prati, L. (2004). Selective oxidation of glycerol to sodium glycerate with gold-on-carbon catalyst: an insight into reaction selectivity. *Journal of Catalysis*, 224(2), 397–403. doi:doi:10.1016/j.jcat.2004.03.009
- Prema, P., & Niladevi, K. N. (2008). Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), pp. 1215-1222. doi:10.1007/s11274-007-9598-x
- Qi, J., Xin, L., Chadderdon, D. J., Qiu, Y., Jiang, Y., Benipal, N., Liang, C., Li, W. (2014). Electrocatalytic selective oxidation of glycerol to tartronate on Au/C anode catalysts in anion exchange membrane fuel cells with electricity cogeneration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 154-155, pp. 360-368. doi:10.1016/j.apcatb.2014.02.040
- Qian, W., Jin, E., Bao, W., & Zhang, Y. (2006). Clean and selective oxidation of alcohols catalyzed by ion-supported TEMPO in water. *Tetrahedron*, 62(4), pp. 556-562. doi:10.1016/j.tet.2005.10.022
- Quignard, F., Valentin, R., & Di Renzo, F. (2008). Aerogel materials from marine polysaccharides. *New Journal of Chemistry*, 32(8), p. 1300. doi:10.1039/b808218a
- Quispe, C. A., Coronado, C. J., & Carvalho, J. A. (2013). Glycerol : Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, pp. 475-493.

- Rajakylä, E. (1981). Separation and determination of some organic acids and their sodium salts by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 218, pp. 695-701. doi:10.1016/S0021-9673(00)82095-6
- Di Renzo, F., Valentin, R., Boissiere, M., Tourrette, A., Giuseppe Sparapano, K. M., Devoisselle, J.-M., Geraldin, C., Quignard, F. (2005). Hierarchical Macroporosity Induced by Constrained Syneresis in Core-Shell Polysaccharide Composites. *Chemistry of Materials*, 17(18).
- Ringeval, B., Hinsinger, P., & Pellerin, S. (2015). *Le phosphore : une ressource limitée et un enjeu planétaire pour l'agriculture du 21ème siècle*. Récupéré sur INRA science et impact: <http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Systemes-agricoles/Toutes-les-actualites/Le-phosphore-une-ressource-limitee-et-un-enjeu-planetaire-pour-l-agriculture-du-21eme-siecle>
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 219-226. doi:10.1016/j.tibtech.2006.03.006
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), pp. 500-513. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.04.003
- Rodriguez, A. A., Williams, C. T., & Monnier, J. R. (2014). Selective liquid-phase oxidation of glycerol over Au-Pd/C bimetallic catalysts prepared by electroless deposition. 475, pp. 161-168. doi:10.1016/j.apcata.2014.01.011
- Rohit, H. I., Kala Raj, N., & Manikandan, P. (2007). [SbW9O33]-based polyoxometalate combined with a phase transfer catalyst: A highly effective catalyst system for selective oxidation of alcohols with H₂O₂, and spectroscopic investigation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 262(1-2), pp. 52-58. doi:10.1016/j.molcata.2006.08.050
- Roncal, T., Muñoz, C., Lorenzo, L., Maestro, B., & Díaz de Guereñu, M. d. (2012). Two-step oxidation of glycerol to glyceric acid catalyzed by the Phanerochaete chrysosporium glyoxal oxidase. *Enzyme and microbial technology*, 50(2), pp. 143-150. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.11.007
- Roquet, Belgsir, Léger, & Lamy. (1994). Kinetics and mechanisms of the electrocatalytic oxidation of glycerol as investigated by chromatographic analysis of the reaction products: Potential and pH effects. *Electrochimica Acta*, 39(16), pp. 2387-2394. doi:10.1016/0013-4686(94)E0190-Y
- Royker, M., Case, J., & Van Steen, E. (2012). Platinum promotion of Au/Al₂O₃ catalysts for glycerol oxidation: activity, selectivity and deactivation. *Journal for the Southern African Institute of Mining and Metallurgy*, 112, pp. 577-581.
- Royker, M., Case, J., & Van Steen, E. (2012). Platinum promotion of Au/Al₂O₃ catalysts for glycerol oxidation: activity, selectivity and deactivation. *The Journal of The Southern African Institute of Mining and Metallurgy*, 112, pp. 577-581.
- Ruggiero, P., Sarkar, J. M., & Bollag, J.-M. (1989). Detoxification of 2,4-dichlorométhane by a laccase immobilized on soil or clay. *Soil Science*, 147(5), pp. 361-370.

- Schmidt, C. K., Fleig, M., Sacher, F., & Brauch, H. (2004). Occurrence of aminopoly-carboxylates in the aquatic environment of Germany. *Environmental Pollution*, 1(131), pp. 107-224.
- Schoevaart, R., & Kieboom, T. (2002). Combined catalytic conversion involving an enzyme, a homogeneous and a heterogeneous catalyst: one-pot preparation of 4-deoxy-d-glucose derivatives from d-galactose. *Tetrahedron Letters*, 43(18), pp. 3399-3400. doi:10.1016/S0040-4039(02)00479-3
- Schoevaart, W. R., Van Langen, L. M., van den Dool, R. T., & Boumans, J. W. (2008). *Brevet n° US 2008/0296231 A1*.
- Semmelhack, M. F., Schmid, C. R., Cortes, D. A., & Chou, C. S. (1984). Oxidation of alcohols to aldehydes with oxygen and cupric ion, mediated by nitrosonium ion. *Journal of the American Chemical Society*, 106(11), pp. 3374-3376. doi:10.1021/ja00323a064
- Sheldon, R. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), pp. 1583-1587. doi:10.1042/BST0351583
- Sheldon, R. A., & Arends, I. W. (2006). Catalytic oxidations mediated by metal ions and nitroxyl radicals. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 251(1-2), pp. 200-214. doi:10.1016/j.molcata.2006.02.016
- Siebum, A., van Wijk, A., Schoevaart, R., & Kieboom, T. (2006). Galactose oxidase and alcohol oxidase: Scope and limitations for the enzymatic synthesis of aldehydes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(3-4), pp. 141-145. doi:10.1016/j.molcatb.2006.04.003
- Simões, M., Baranton, S., & Coutanceau, C. (2011). Enhancement of catalytic properties for glycerol electrooxidation on Pt and Pd nanoparticles induced by Bi surface modification. *Applied Catalysis B: Environmental*, 110, pp. 40-49. doi:10.1016/j.apcatb.2011.08.020
- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R. D., & Pleiss, J. (2011, 4 15). *The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases*.
- Skrzyńska, E., Zaid, S., Girardon, J.-S., Capron, M., & Dumeignil, F. (2015). Catalytic behaviour of four different supported noble metals in the crude glycerol oxidation. *Applied Catalysis A: General*, 499, pp. 89-100. doi:10.1016/j.apcata.2015.04.008
- Skrzyska, E., Ftouni, J., Mamede, A.-S., Addad, A., Trentesaux, M., Girardon, J.-S., Capron, M., Dumeignil, F. (2014). Glycerol oxidation over gold supported catalysts –“Two faces” of sulphur based anchoring agent. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 382, pp. 71-78. doi:10.1016/j.molcata.2013.11.007
- Sloboda-Rozner, D., Alsters, P. L., & Neumann, R. (2003). A Water-Soluble and “Self-Assembled” Polyoxometalate as a Recyclable Catalyst for Oxidation of Alcohols in Water with Hydrogen Peroxide. *Journal of the American Chemical Society*, 125(18), pp. 5280-5281. doi:10.1021/ja0344821
- Smith, R. M., & A.Martell, E. (1998). *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*.

- Sobczak, I., Jagodzinska, K., & Ziolek, M. (2010). Glycerol oxidation on gold catalysts supported on group five metal oxides—A comparative study with other metal oxides and carbon based catalysts. *Catalysis Today*, *158*(1-2), pp. 121-129. doi:10.1016/j.cattod.2010.04.022
- Song, Y.-F., & Tsunashima, R. (2012). Recent advances on polyoxometalate-based molecular and composite materials. *Chemical Society Reviews*, *41*(22), pp. 7325–7648. doi:10.1039/C2CS35143A
- Sonnati, M. O., Amigoni, S., Taffin de Givenchy, E. P., Darmanin, T., Choulet, O., & Guittard, F. (2013). Glycerol carbonate as a versatile building block for tomorrow: synthesis, reactivity, properties and applications. *Green Chem*, *15*(2), 283-306. doi:DOI: 10.1039/c2gc36525a
- Spinelli, D., Fatarella, E., Di Michele, A., & Pogni, R. (2013). Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. *Process Biochemistry*, *48*(2), pp. 218-223. doi:10.1016/j.procbio.2012.12.005
- Sproge, E., Chornaja, S., Dubencovs, K., Zhzhkun, S., Kampars, V., Serga, V., Lidija, K., Palcevskis, E. (2013). Selective liquid phase oxidation of glycerol to glyceric acid over novel supported Pt catalysts. *Journal of the Serbian Chemical Society*, *78*(9), pp. 1359-1372. doi:10.2298/JSC121203037S
- Stahl, J., Hoover, J., & Shannon, S. (2011). Highly Practical Copper(I)/TEMPO Catalyst System for Chemoselective Aerobic Oxidation of Primary Alcohols. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(42), 16901–16910. doi:10.1021/ja206230h
- Subhani, M. A., Beigi, M., & Eilbracht, P. (2008). Polyurethane- and Polystyrene-Supported 2,2,6,6-Tetramethyl- piperidine-1-oxyl (TEMPO); Facile Preparation, Catalytic Oxidation and Application in a Membrane Reactor. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *350*(18), pp. 2903-2909. doi:10.1002/adsc.200800369
- Sullivan, J. A., & Burnham, S. (2014). The selective oxidation of glycerol over model Au/TiO₂ catalysts : The influence of glycerol purity on conversion and product selectivity. *Catalysis Communications*, *56*, pp. 72-75. doi:10.1016/j.catcom.2014.06.026
- Sullivan, J., & Burnham, S. (2015). The use of alkaline earth oxides as pH modifiers for selective glycerol oxidation over supported Au catalysts. *Renewable Energy*, *78*, pp. 89-92. doi:10.1016/j.renene.2014.12.068
- Taarning, E., Madsen, A. T., Marchetti, J. M., Egeblad, K., & Christensen, C. H. (2008). Oxidation of glycerol and propanediols in methanol over heterogeneous gold catalysts. *Green Chemistry*, *10*(4), pp. 408–414. doi:10.1039/b714292g
- Tanyeli, C., & Gümüş, A. (2003). Synthesis of polymer-supported TEMPO catalysts and their application in the oxidation of various alcohols. *Tetrahedron Letters*, *44*(8), pp. 1639-1642. doi:10.1016/S0040-4039(03)00003-0
- Terada, O., Uwajima, T., Mihara, A., Kazuo, A., Akita, H., Nagai, T., & Shimizu, Y. (1981, Mai 5). *Japon Brevet n° US4266023 A*.

- The European commission. (2014). *Arcadia, A legal framework for Plant biostimulants and agronomic fertilizer additives in the EU*.
- Trembl, H., & Kohler, H.-H. (2000). Coupling of diffusion and reaction in the process of capillary formation in alginate gel. *Chemical Physics*, 252(1-2), pp. 199-208. doi:10.1016/S0301-0104(99)00361-4
- Trembl, H., Woelki, S., & Kohler, H.-H. (2003). Theory of capillary formation in alginate gels. *Chemical Physics*, 293(3), pp. 341-353.
- Tsubokawa, N., Kimoto, T., & Endo, T. (1995). Oxidation of alcohols with copper(II) salts mediated by nitroxyl radicals immobilized on ultrafine silica and ferrite surface. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 101(1), pp. 45-50. doi:10.1016/1381-1169(95)00060-7
- Tsuji, A., Rao, K. T., Nishimura, S., Takagaki, A., & Ebitani, K. (2011). Selective Oxidation of Glycerol by Using a Hydrotalcite-Supported Platinum Catalyst under Atmospheric Oxygen Pressure in Water. *ChemSusChem*, 4(4), pp. 542-548. doi:10.1002/cssc.201000359
- Tucker-Schwartz, A. K., & Garrell, R. L. (2010). Simple Preparation and Application of TEMPO-Coated Fe₃O₄ Superparamagnetic Nanoparticles for Selective Oxidation of Alcohols. *Chemistry - A European Journal*, 16(42), pp. 12718-12726. doi:10.1002/chem.200903527
- Uwajima, T., Shimizu, Y., & Terada, O. (1984). Glycerol oxidase, a novel copper hemoprotein from *Aspergillus japonicus*. Molecular and catalytic properties of the enzyme and its application to the analysis of serum triglycerides. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(5), pp. 2748-2753. doi:0021-9258
- Vaca-Garcia, C. (2015, 01). *Experimental Methodology*, (p. 40).
- Vajicek, S., Štolcová, M., & Kaszonyi, A. (2011). *Effect of supports on oxidation of bioglycerol over palladium- bismuth catalysts*. 5 th International Petroleum Conference, Bratislava.
- Valentin, R., Alignan, M., Giacinti, G., Renaud, F. N., Raymond, B., & Mouloungui, Z. (2012). Pure short-chain glycerol fatty acid esters and glyceric cyclocarbonic fatty acid esters as surface active and antimicrobial coagels protecting surfaces by promoting superhydrophilicity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 365(1), pp. 280-288. doi:10.1016/j.jcis.2011.09.010
- Van Der Rest, B., Sanchez, P., Regad, F., Frasse, P., & Charton, M. (2010). Electrophorèse de protéines SDS page. UMR 990- LGBF INRA/INP-ENSAT Site INRA Auzeville.
- van Hellemond, E., Vermote, L., Koolen, W., Sonke, T., Zandvoort, E., Heuts, D. P., Janssen, D., Fraaije, M. W. (2009). Exploring the Biocatalytic Scope of Alditol Oxidase from *Streptomyces coelicolor*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351(10), pp. 1523-1530. doi:10.1002/adsc.200900176
- Van Velthoven, J. L., Gootjes, L., van Es, D. S., Noordover, B. A., & Meuldijk, J. (2015). Poly(hydroxy urethane)s based on renewable diglycerol dicarbonate. *European Polymer Journal*, 70, pp. 125-135. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.07.011

- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), pp. 249-259.
- Velusamy, S., Srinivasan, A., & Punniyamurthy, T. (2006). Copper(II) catalyzed selective oxidation of primary alcohols to aldehydes with atmospheric oxygen. *Tetrahedron Letters*, 47(6), pp. 923-926. doi:10.1016/j.tetlet.2005.11.149
- Vieville, Yoo, Pelet, & Mouloungui. (1998). Synthesis of glycerol carbonate by direct carbonatation of glycerol in supercritical CO₂ in the presence of zeolites and ion exchange resins. *Catalysis Letters*, 56(4), pp. 245–247.
- Wang, F.-F., Shao, S., Liu, C.-L., Xu, C.-L., Yang, R.-Z., & Dong, W.-S. (2015). Selective oxidation of glycerol over Pt supported on mesoporous carbon nitride in base-free aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 264, pp. 336-343. doi:10.1016/j.cej.2014.11.115
- Wang, H., Thia, L., Li, N., Ge, X., Liu, Z., & Wang, X. (2015). Selective electro-oxidation of glycerol over Au supported on extended poly(4-vinylpyridine) functionalized graphene. *Applied Catalysis B: Environmental*, 166-167, pp. 25-31. doi:10.1016/j.apcatb.2014.11.009
- Wang, J., Yan, L., Li, G., Wang, X., Ding, Y., & Suo, J. (2005). Mono-substituted Keggin-polyoxometalate complexes as effective and recyclable catalyst for the oxidation of alcohols with hydrogen peroxide in biphasic system. *Tetrahedron Letters*, 46(41), pp. 7023–7027. doi:10.1016/j.tetlet.2005.08.040
- Wang, N., Liu, R., Chen, J., & Liang, X. (2005). NaNO₂-activated, iron–TEMPO catalyst system for aerobic alcohol oxidation under mild conditions. *Chemical Communications*(42), pp. 5322-5324. doi:10.1039/b509167e
- Wang, Q., Peng, L., Li, G., Zhang, P., Li, D., Huang, F., & Wei, Q. (2013). Activity of Laccase Immobilized on TiO₂-Montmorillonite Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp. 12520-12532. doi:10.3390/ijms140612520
- Wang, X., Wu, G., Liu, X., Zhang, C., & Lin, Q. (2016). Selective Oxidation of Glycerol with O₂ Catalyzed by LDH Hosted Transition Metal Complexes. *Catalysis Letters*, 146(3), pp. 620-628.
- Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., Manheim, A., Elliot, D., Lasure, L, Jones, S., Gerber, M., Ibsen, K., Lumberg, L., Kelley, S. (2004). *Top Value Added Chemicals From Biomass, Volume 1 : Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas* (Vol. 1). National Renewable Energy Laboratory. Récupéré sur <http://www.osti.gov/bridge>
- Witayakran, S., & Ragauskas, A. (2009). Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351(9), pp. 1187-1209. doi:10.1002/adsc.200800775
- Wöelfle, H., Walther, B., & Putzien, S. (2014). *Brevet n° EP 2951166 A1*.
- Wolf, H. J. (1982). *Brevet n° US4353987 A*.

- Worz, Brandner, & Claus. (2010, 1). Platinum–Bismuth-Catalyzed Oxidation of Glycerol: Kinetics and the Origin of Selective Deactivation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(2), pp. 1164-1172. doi:10.1021/jp909412h
- Wu, X.-E., Ma, L., Ding, M.-X., & Gao, L.-X. (2005). TEMPO-Derived Task-Specific Ionic Liquids for Oxidation of Alcohols. *Synlett*(4), 607-610. doi:10.1055/s-2005-862396
- Xu, J., Zhao, Y., Xu, H., Zhang, H., Yu, B., Hao, L., & Liu, Z. (2014). Selective oxidation of glycerol to formic acid catalyzed by Ru(OH)₄/r-GO in the presence of FeCl₃. *Applied Catalysis B: Environmental*, 154-155, pp. 267-273. doi:10.1016/j.apcatb.2014.02.034
- Yamak, O., Kalkan, N. A., Aksoy, S., Altinok, H., & Hasirci, N. (2009). Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization. *Process Biochemistry*, 44(4), 440-445. doi:10.1016/j.procbio.2008.12.008
- Yang, G.-Y., Ke, Y.-H., Ren, H.-F., Liu, C.-L., Yang, R.-Z., & Dong, W.-S. (2016). The conversion of glycerol to lactic acid catalyzed by ZrO₂-supported CuO catalysts. *Chemical Engineering Journal*, 283, pp. 759-767. doi:10.1016/j.cej.2015.08.027
- Yaropolov, Skorobogat'ko, Vartanov, & Varfolomeyev. (1994). Laccase, Properties, Catalytic, Mechanism, and Applicability. *Biochemistry and Biotechnology*, 49(3), 257-280. doi:10.1007/BF02783061
- Yoo, J.-W., & Mouloungui, Z. (2003). Catalytic carbonylation of glycerin by urea in the presence of zinc mesoporous system for the synthesis of glycerol carbonate. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 146, pp. 757-760. doi:DOI: 10.1016/S0167-2991(03)80494-9
- Yu, Y., Gao, B., & Li, Y. (2013). Immobilized 2,2,6,6-tetramethyl-piperidiny-1-oxyl catalyst on polymer microspheres and its catalytic oxidation of benzyl alcohol with molecular oxygen. *Chinese Journal of Catalysis*, 34(9), pp. 1776-1786. doi:10.1016/S1872-2067(12)60651-2
- Zhang, B., Yin, P., Haso, F., Hu, L., & Liu, T. (2013). Soft Matter Approaches for Enhancing the Catalytic Capabilities of Polyoxometalate Clusters. *Journal of Cluster Science*, 25(3), pp. 695-710. doi:10.1007/s10876-013-0643-7
- Zhang, C., Hu, C., Zhao, Y., Möller, M., Yan, K., & Zhu, X. (2013). Encapsulation of laccase in silica colloidosomes for catalysis in organic media. *Langmuir*, 29, pp. 15457-15462. doi:10.1021/la404087w
- Zhang, C., Wang, T., Liu, X., & Ding, Y. (2016). Selective oxidation of glycerol to lactic acid over activated carbon supported Pt catalyst in alkaline solution. *Chinese Journal of Catalysis*, 37(4), pp. 502-509. doi:10.1016/S1872-2067(15)61055-5
- Zhang, M., Shi, J., Sun, Y., Ning, W., & Hou, Z. (2015). Selective oxidation of glycerol over nitrogen-doped carbon nanotubes supported platinum catalyst in base-free solution. *Catalysis Communications*, 70, pp. 72-76. doi:10.1016/j.catcom.2015.08.002
- Zhang, Z., Xin, L., Qi, J., Chadderdon, D. J., Sun, K., Warsko, K. M., & Li, W. (2014). Selective electro-oxidation of glycerol to tartronate or mesoxalate on Au nanoparticle catalyst via electrode potential tuning

in anion-exchange membrane electro-catalytic flow reactor. *Applied Catalysis B: Environmental*, 147, pp. 871-878. doi:10.1016/j.apcatb.2013.10.018

Zhou, C.-H., Beltramini, J. N., Lin, C. X., Xu, Z.-P., Lu, G. (.), & Tanksale, A. (2011). Selective oxidation of biorenewable glycerol with molecular oxygen over Cu-containing layered double hydroxide-based catalysts. *Catalysis Science & Technology*, 1(1), 111–122. doi:DOI: 10.1039/c0cy00018c

Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage, T., & van Pée, K.-H. (2007). Immobilization of *Trametes versicolor* Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres. *Chemistry of Materials*, 19(26), pp. 6408-6413. doi:10.1021/cm071265g

Zope, B. N., Davis, S. E., & Davis, R. J. (2012). Influence of Reaction Conditions on Diacid Formation During Au-Catalyzed Oxidation of Glycerol and Hydroxymethylfurfural. *Topics in Catalysis*, 55(1-2), pp. 24-32. doi:10.1007/s11244-012-9777-3

IX. Annexes

Annexe 1 : Liste des acides aminés

Alanine	Ala
Arginine	Arg
Aspartic acid	Asp
Asparagine	Asn
Cysteine	Cys
Glutamic acid	Glu
Glutamine	Gln
Glycine	Gly
Histidine	His
Isoleucine	Ile
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Methionine	Met
Phenylalanine	Phe
Proline	Pro
Serine	Ser
Threonine	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosine	Tyr
Valine	Val

Annexe 2 : Origine des réactifs

Produits	Nom, fournisseur
Glycérol ¹³C	99% Glycerol- ¹³ C ₃ , Sigma Aldrich 1,2,3-Propanetriol- ¹³ C ₃ , ¹³ C Labeled glycerol
Glycérol	99%, propane-1,2,3-triol, Sigma Aldrich
Glycérique acide	95%, sels de sodium de l'acide 2,3-Dihydroxypropanoïque, Sigma Aldrich
Glycolique acide	99%, acide 2-hydroxyethanoïque, Sigma Aldrich
Glyoxylique acide monohydrate	98%, acide Oxoéthanoïque, Sigma Aldrich
Glyceraldéhyde	90% 2,3 dihydroxypropanal, Sigma Aldrich
Acide Tartronique	97%, acide 2-hydroxypropandioïque, Sigma Aldrich
Dihydroxyacétone	1,3 dihydroxypropan-2-one, VWR
Acide Oxalique	99%, acide éthanedioïque, Sigma Aldrich
Laccase	Laccase from Trametes versicolor Green Alternative powder, light brown, ≥0.5 U/mg Sigma Aldrich
TEMPO	TEMPO purified by sublimation, 99% Sigma Aldrich
Acide acétique	Acide acétique reagent grade, ≥99%, Sigma Aldrich
Acide hydroxypyruvique	β-Hydroxypyruvic acid ≥95.0% (dry substance, T) acide 3-Hydroxy-2-oxopropanoïque
Alginate	Alginate de sodium Sigma Aldrich OU Kalys
Mn(NO₃)₂	Manganèse(II) nitrate tétrahydrate, purum p.a., ≥97.0% Sigma Aldrich
Cu(NO₃)₂	Cuivre(II)nitrate hydrate, 99.999% Sigma Aldrich
NaOH (hydroxyde de sodium)	Sigma Aldrich ≥ 98% Bioextra anhydrous pellets
Na₂CO₃ (carbonate de sodium)	Sigma Aldrich ≥ 99% (deux pots différents un à 99 et l'autre à 99.5%) ACS reagent
MgCl₂, 6H₂O (magnésium chloride hexahydrate)	Sigma Aldrich 99-101% et ≤ 0.0001% Al
Al(Cl)₃, 6 H₂O (Aluminium chloride hexahydrate)	Sigma Aldrich 99% reagent plus ®
Cu(NO₃)₂, 3 H₂O (Copper (II) nitrate trihydrate)	Sigma Aldrich 99-104%

Annexe 3 : RMN 1D et 2D complémentaires

i. Fraction 6 à 9 issues de la réaction d'oxydation de CE6 sans O₂ sur CG

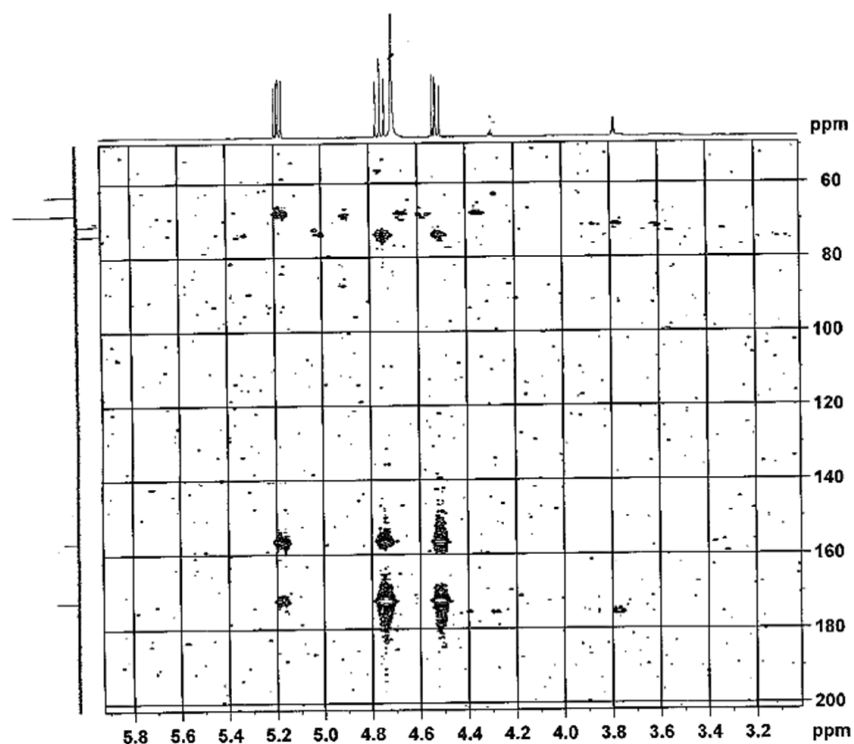


Figure 213 : Spectre RMN 2D HMBC ¹³C/¹H de la fraction F6 dans D₂O à 298 K (125,77 MHz)

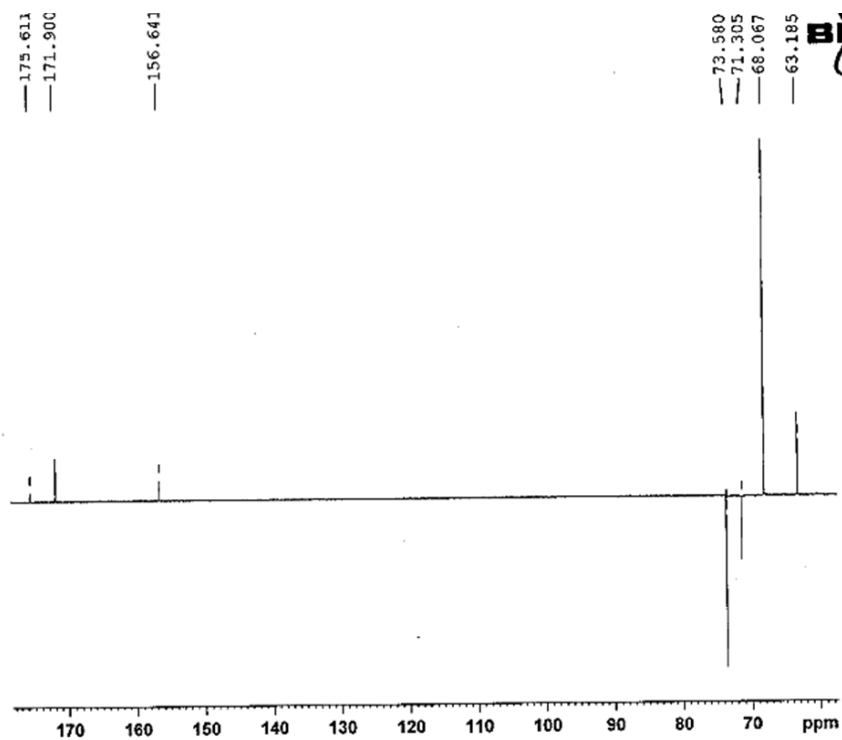


Figure 214 : Spectre RMN ¹³C{¹H} de la fraction F7 dans D₂O à 298 K (125,77 MHz)

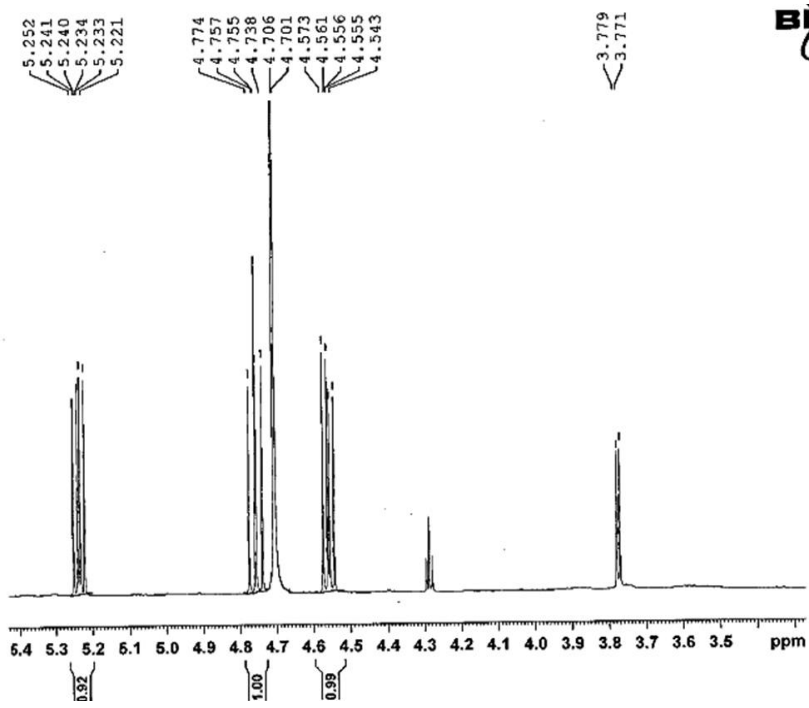


Figure 215 : Spectre RMN ¹H de la fraction F7 dans D₂O à 298 K (500,11 MHz)

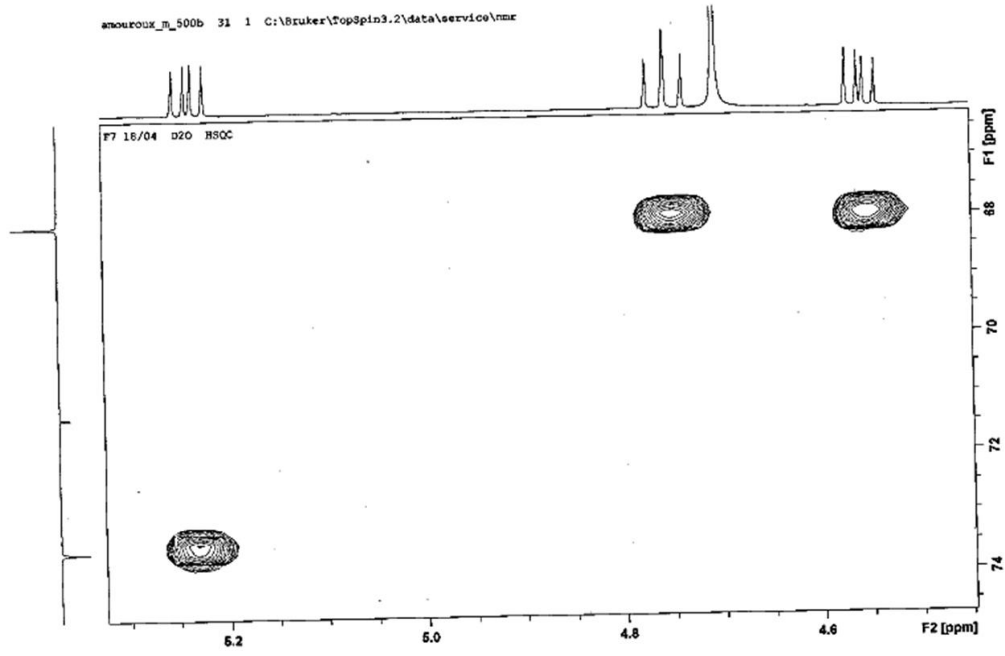


Figure 216 : Spectre RMN 2D HSQC ¹³C/¹H de la fraction F7

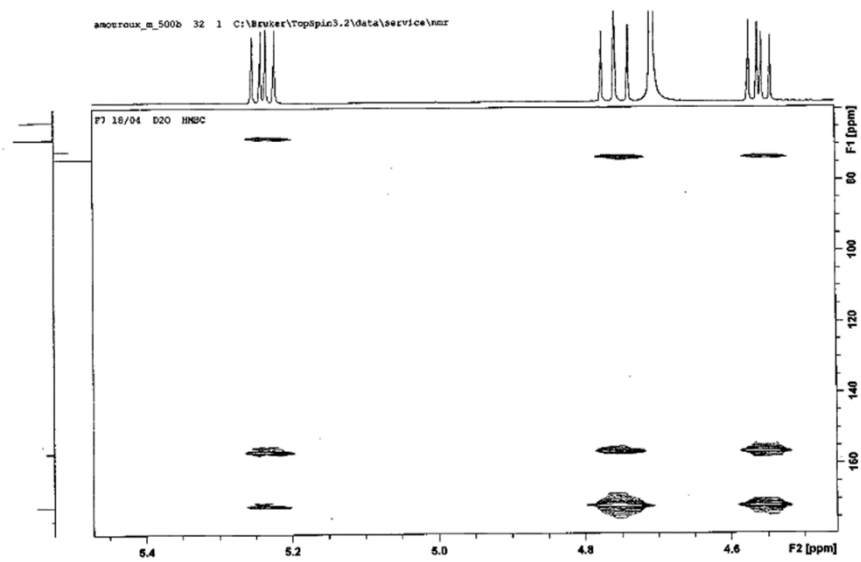


Figure 217 : Spectre RMN 2D HMBC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ de la fraction F7

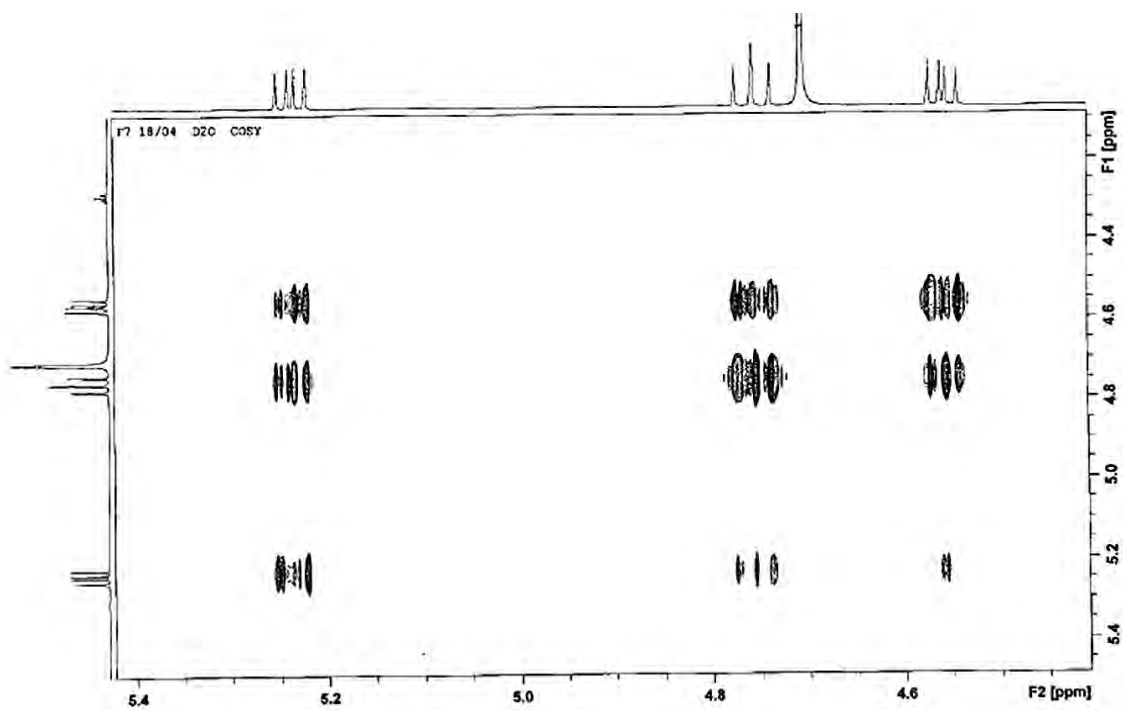


Figure 218 : Spectre RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de la fraction F7 dans D_2O , 298K

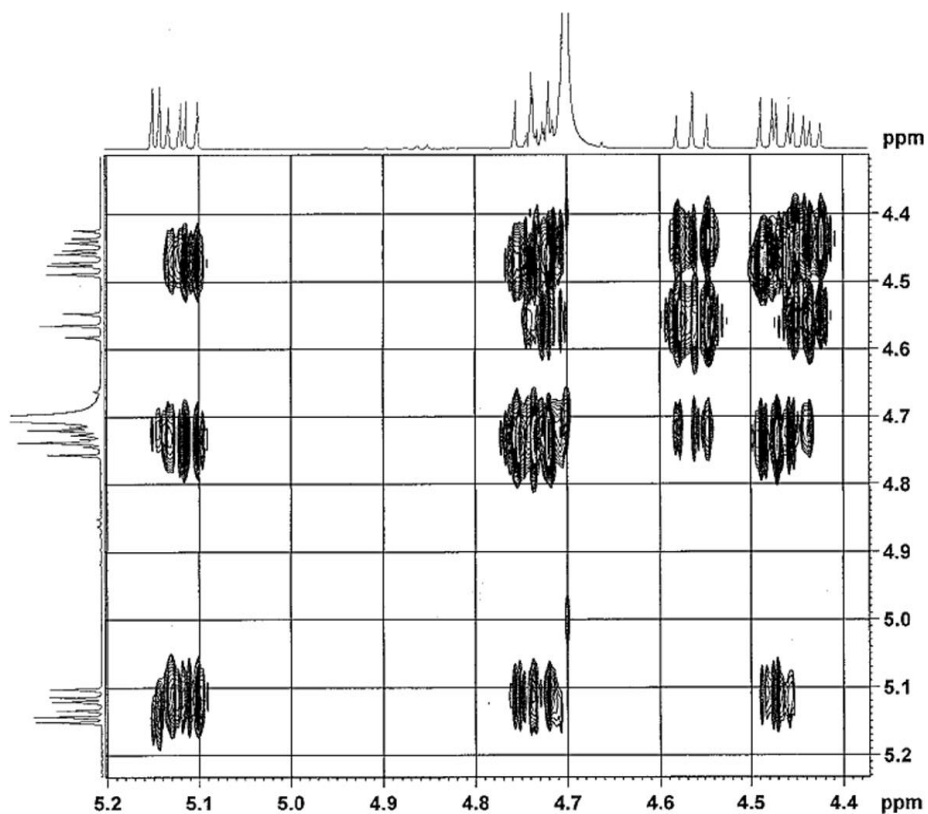


Figure 219 : Spectre RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de la fraction F8 dans D_2O , 298K

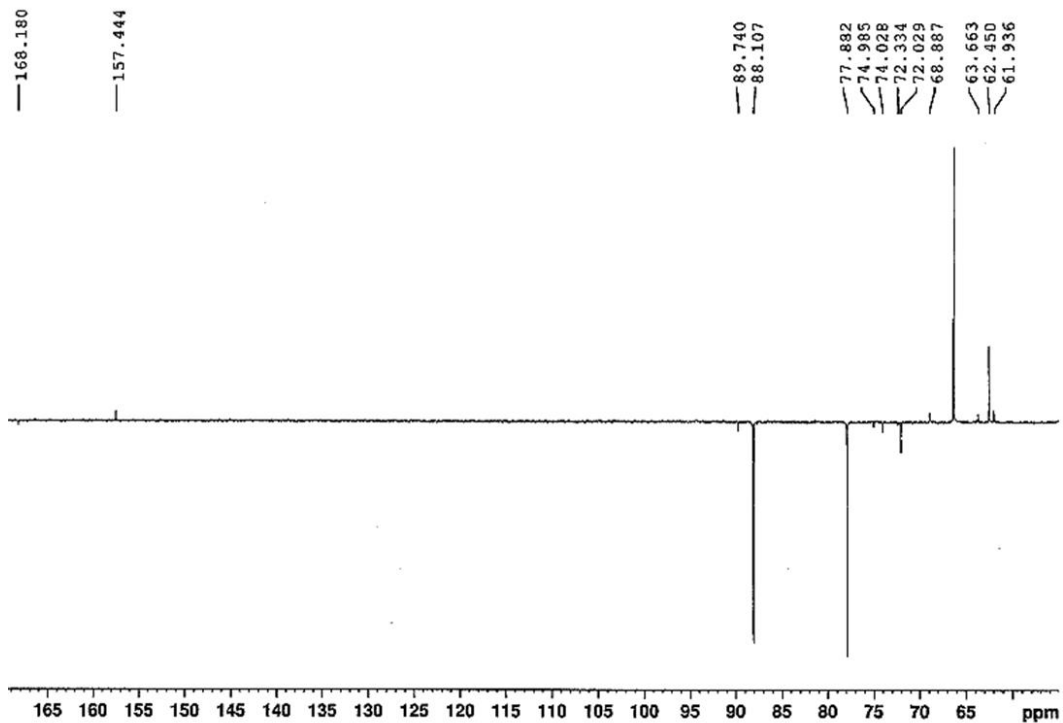


Figure 220 : Spectre $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de la fraction F9 dans D_2O à 298 K (125,77 MHz)

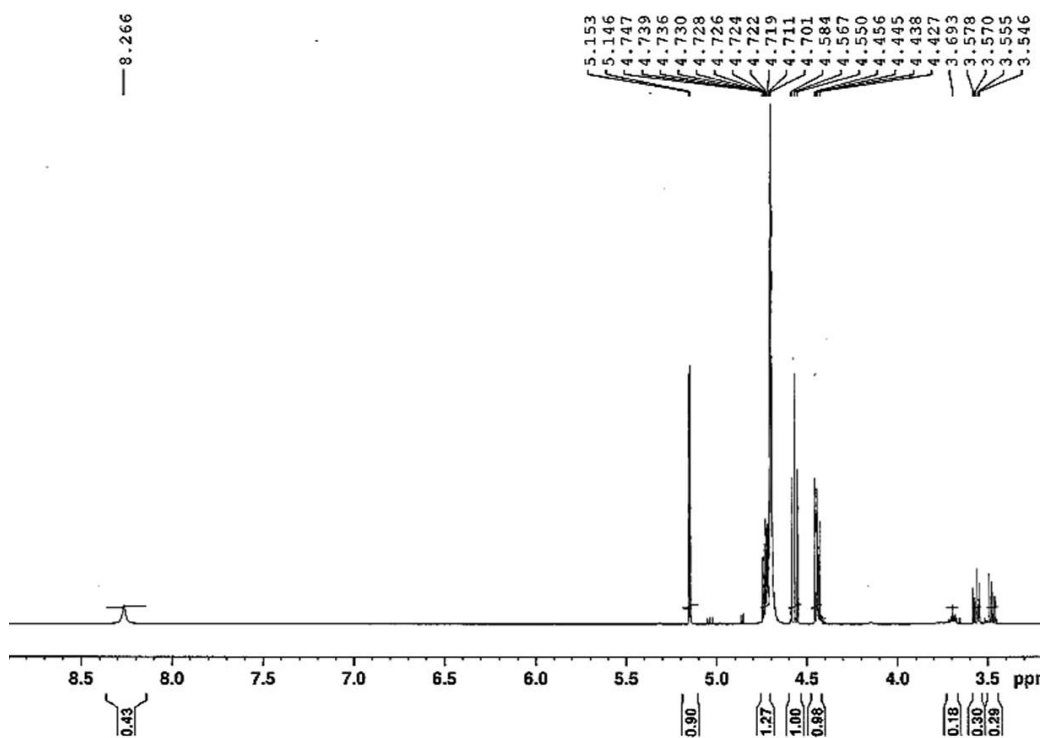


Figure 221 : Spectre RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de la fraction F9 dans D_2O , 298K

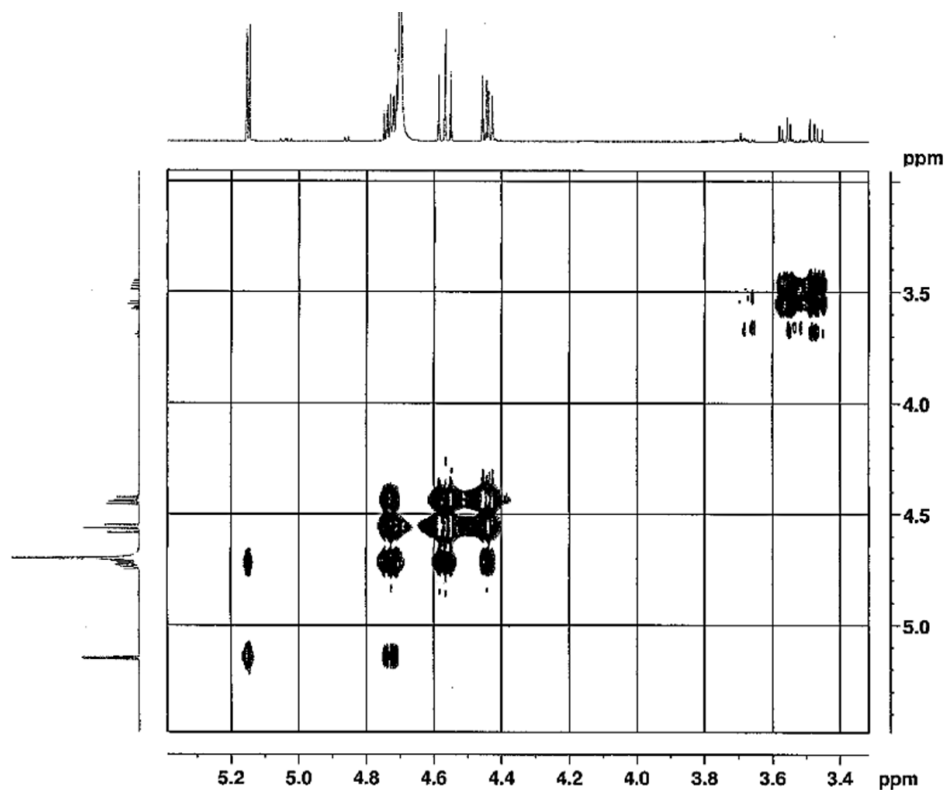


Figure 222 : Spectre RMN 2D COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de la fraction F9 dans D_2O , 298K

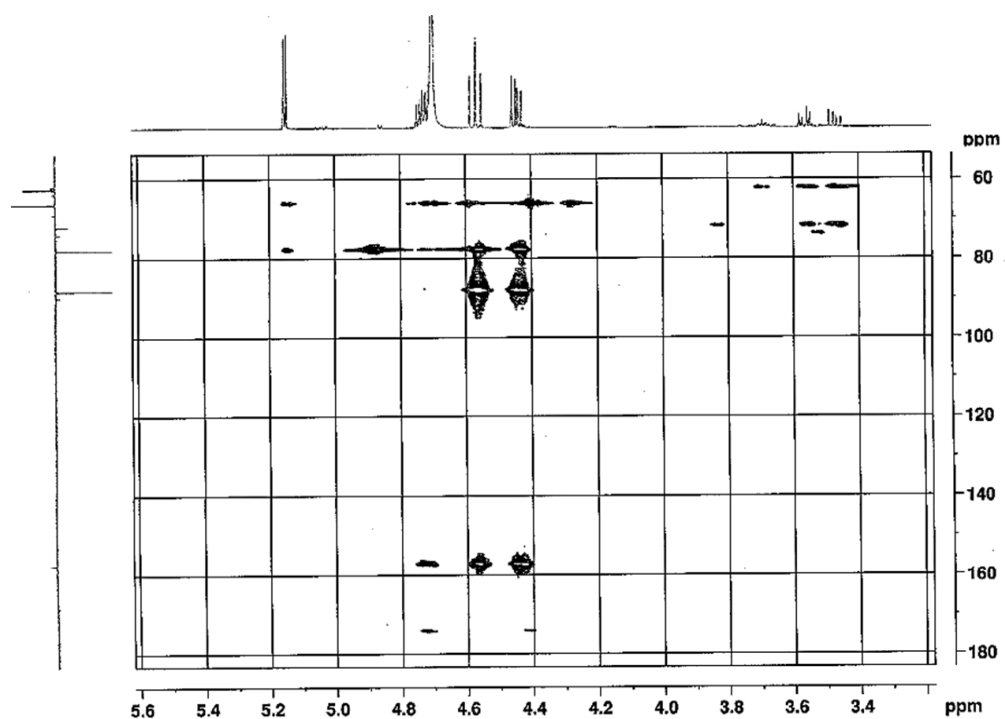


Figure 223 : Spectre RMN 2D HMBC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ de la fraction F9 dans D2O

ii. RMN 2D issues des fractions de l'oxydation du glycérol enrichi en ^{13}C

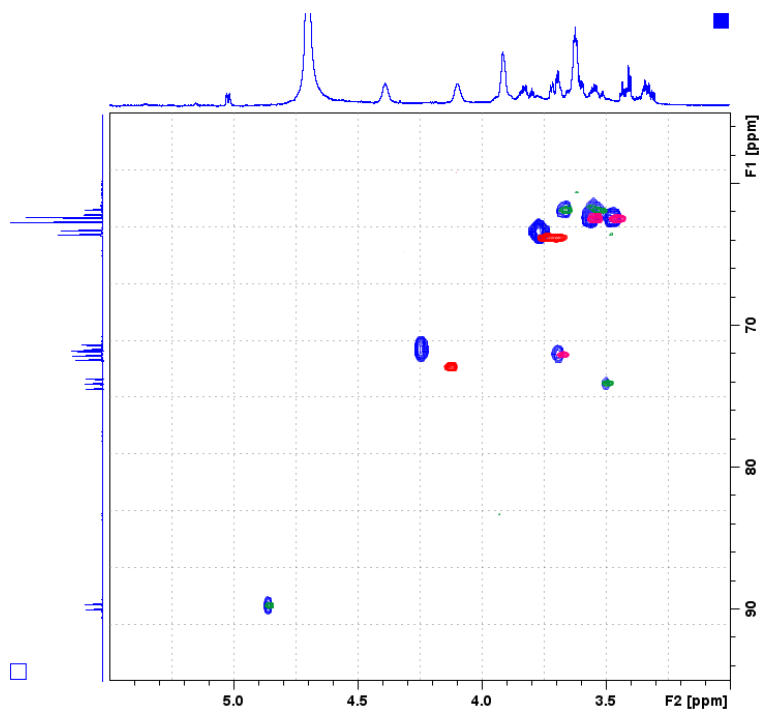


Figure 224 : Superposition des expériences HSQC pratiquées sur la fraction F8 (en bleu) enrichi en ^{13}C , du standard de l'acide glycérique (en rouge), du glycéraldéhyde (en vert) et du glycérol (en rose)

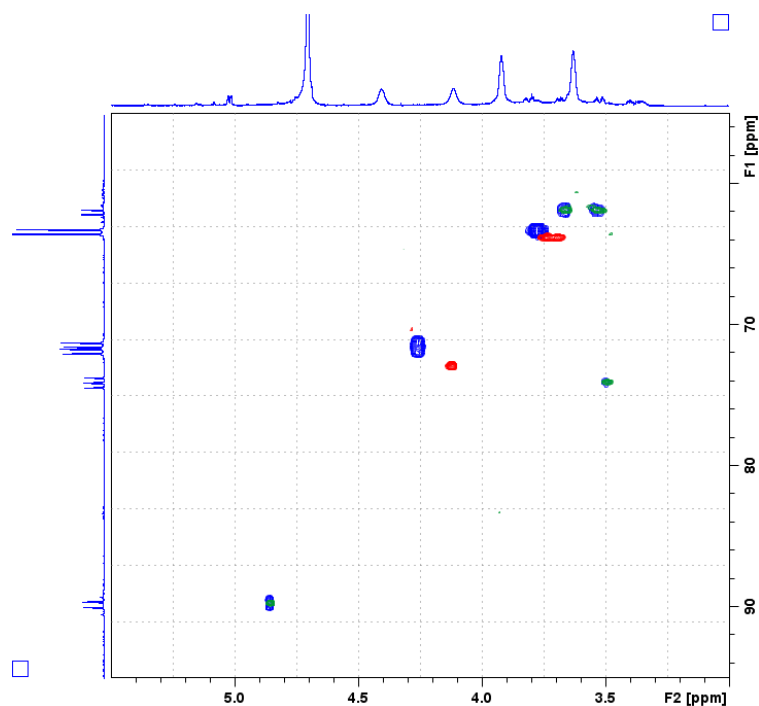


Figure 225 : Superposition des expériences HSQC pratiquées sur la fraction F7 (en bleu) enrichi en ^{13}C , du standard de l'acide glycérique (en rouge) et du glycéraldéhyde (en vert)

Annexe 4 : Comparaison entre les brevets de fabrication du CG oxydé actuels et la synthèse mise au point au cours des travaux de thèse

Synthèse				Conditions				Sélectivité	Référence	Remarques
Réactifs	Précurseurs	Produits	Rendement en CG oxydé	Pression	Durée	T°				
CO ₂ , 80 g Na ₂ CO ₃ , 400 ml à 7% NaOCl puis CO ₂ dans 200 ml d'eau, 58g de méthylacrylate, tert-butyle méthyle éther, tetrabutylammoniumbromide	méthyle époxypropionate	CG oxydé	50 à 60% sur le produit 1 nommé méthyl époxypropionate (1) et 97% sur la réaction qui passe de (1) au CG oxydé	20 bars de CO ₂	4 jours	10°C puis 30°C, refroidissement à 0°C	94% sur la deuxième réaction	EP 2 762 471 A1 et US20110313177 WO2011157551 A1, WO2011157551 A1, WO2013092011 A1, WO2014118268 A1, EP2397474A1, US8742137,	2 étapes de synthèse avec la molécule suivante comme intermédiaire (1). Réaction 2 : 20 g de méthyl-époxypropionate mélangé avec 20 g de tert-butyl méthyl éther et 1 g de tetrabutylammoniumbromide. Le mélange homogène est transféré dans un réacteur présursé de 100 ml. La réaction dure 4 jours à 40°C et sous une pression de CO ₂ de 20 bars	
20g méthyle-époxypropionate, 20g acétonitrile et 1,5g benzyltriméthylammonium chlorure et 1,5g ZnBr ₂ , CO ₂	-	CG oxydé	65%	30 bars	6 jours	25°C	72%	EP 2 762 471 A1 WO2011157551 A1,	Purification avec Al ₂ O ₃ , 100g d'acétonitrile	
940 ml of a 7%NaOCl dans l'eau et dans un ballon tricole avec 58,5 g méthyle-acrylate . 600 ml dichlorométhane	Méthyle-époxypropionate est obtenu entre 70 et 80 %	CG oxydé	80% en Méthyle-époxypropionate	20 bars de CO ₂	4 jours	La solution est refroidi à 0°C dans un bain de glace salé, puis chauffer à 70°C		EP 2 762 471 A1, WO2014118268 A1, EP2397474A1, CA2802266A1		
20 g de méthyle époxypropionate, 20 g de tert-butyle méthyle éther, 1.5 g tetrabutylammonium bromide, 1.5 g potassium iodide, CO ₂	-	CG oxydé	79%	30 bars	6 jours	50°C	83%	EP 2 762 471 A1		

Tableau 79 : Protocole travaillant à partir de l'acrylate et du CO₂ comme substrats

	Synthèse				Conditions			Sélectivité	Référence
	Réactifs	Précurseurs	Produits	Rendement en CG oxydé	Pression	Durée	T°		
	5g NaBr, 1,5 g TEMPO, 168 g NaHCO ₃ , H ₂ O, 1,5L acétone, 118,1g de CG, 18 g d'acide trichloroisocyanurique et 18 g d'eau		CG oxydé	97%	-	12 heures	0°C		EP 2 762 471 A1, WO2013092011 A1, EP2397474A1
	11,81g de CG et 0,58g Co(NO ₃) ₂ et 0,5g Mn(NO ₃) ₂ , 1,88g TEMPO, acide acétique, dioxygène dissous dans 100 ml d'acide acétique		CG oxydé	75%	sous dioxygène avec un ballon d'alimentation	72 heures	Température ambiante		EP 2 762 471 A1, WO2014118268 A1, WO2013092011 A1
	1 L d'acétate d'éthyle, 118 g de CG et 16,3 g of N-hydroxyphthalimide, 7,8 g d'acide m-chlorobenzoïque et 1,3 g de cobalt(II) acétylacétonate, 300ml d'acide acétique glacial		CG oxydé	15%	Saturation de l'atmosphère en oxygène	6 heures sous atmosphère de dioxygène	Chauffage		EP 2 762 471 A1, WO2013092011 A1
Glycérol laccase libre milieu ouvert	87mg de laccase (Trametes versicolor), 99mg TEMPO, 236 mg de glycérol, 12 mg d'acétate de sodium à 20 ml d'eau		acide glycérique, glycéraldéhyde, glycérol, acide mésoxalique	acide glycérique (20%), glycéraldéhyde (15,5%), glycérol (31%), acide mésoxalique (3%) acide tartronique, acide oxalique	Dioxygène avec un débit de 0,2ml/min	9 heures	22°C-25°C		réacteur ouvert verre, travaux de thèse
Laccase libre, milieu fermé, CG	87 mg laccase (Trametes versicolor), 99mg TEMPO, 242 mg CG, 2 mg d'acétate de sodium dans 20 ml d'eau		CG oxydé, acide glycérique, CG à double fonction OH, acide acétique,	En aire relative : 45% soit 93 mg de CG oxydé, CG hémiacétal (1 à 6%), acide glycérique (0,7%), 14% de CG, 17 % d'acide acétique (tampon), glycérol 0,5% et 21% de produit issus de l'enzyme	Sous air, à pression atmosphérique	9 heures	22°C-25°C	57% si on ne considère que les molécules formées (CG et acide acétique exclu puisque nous ne considérons que les produits formés)	réacteur étanche, travaux de thèse
laccase supportée milieu ouvert, CG	PAS d'optimisation, 87mg de laccase (Trametes versicolor) immobilisées en billes d'alginate de sodium (17 billes de 2mm de diamètre) , 99mg TEMPO, 236 mg CG, 12 mg acétate de sodium dans 20 ml d'eau		33 mg CG oxydé et 9mg CG hémiacétal	En aire relative et optimisation non réalisée 28% de CG oxydé formé , 3,8% de CG hémiacétal, (25% d'acide acétique et 40 % de CG), 2% de produit issus de l'enzyme	Sous air, à pression atmosphérique	9 heures	22°C-25°C	85% avec que les produits formés (CG et acide acétique exclu puisque nous ne considérons que les produits formés)	réacteur ouvert en verre, travaux de thèse
Glycérol laccase supportée milieu ouvert	PAS d'optimisation 87mg de laccase (Trametes versicolor) en billes d'alginate de sodium (17 billes de 2mm de diamètre) , 99mg TEMPO, 236 mg glycérol, 12 mg acétate de sodium dans 20 ml d'eau		acide glycérique, glycéraldéhyde, glycérol, acide mésoxalique	En aire relative et optimisation non réalisée : acide glycérique (3%), glycéraldéhyde (16%), glycérol (44%), acide mésoxalique (2,7%)	Sous air, à pression atmosphérique	9 heures	22°C-25°C		réacteur ouvert en verre, travaux de thèse

Tableau 80 : Protocoles travaillant à partir du CG comme substrat et à l'aide du TEMPO