



HAL
open science

Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulosiques. Influence de la structure et morphologie du substrat

Marie Chauve

► **To cite this version:**

Marie Chauve. Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulosiques. Influence de la structure et morphologie du substrat. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV066 . tel-00680091

HAL Id: tel-00680091

<https://theses.hal.science/tel-00680091>

Submitted on 17 Mar 2012

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marie CHAUVÉ

Thèse dirigée par **Serge PÉREZ** et
codirigée par **Dénilson da SILVA PÉREZ**

préparée au sein de IFP Énergies nouvelles
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulosesiques

Thèse soutenue publiquement le **17 Octobre 2011**
devant le jury composé de :

Mme, Christelle, BRETON

Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble, Examinatrice

M., Pierre, MONSAN

Professeur à l'INSA, Toulouse, Rapporteur

M., Jean-Claude, SIGOILLOT

Professeur à l'ESIL / INRA, Marseille, Rapporteur

M., Serge, PÉREZ

Directeur scientifique à l'ESRF, Grenoble, Examineur

M., Dénilson, da SILVA PÉREZ

Ingénieur de recherche à FCBA, Grenoble, Examineur

Mme, Dominique, DECOTTIGNIES

Ingénieur de Recherche à IFPEN, Solaize, Examinatrice

M., Nicolas, LOPES FERREIRA

Ingénieur de Recherche à IFPEN, Rueil-Malmaison, Examineur



Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu Serge Pérez, mon directeur de thèse, Dénilson da Silva Perez, mon codirecteur de thèse pour la confiance qu'ils m'ont accordée lors de ses trois ans de thèse. Les discussions intéressantes lors des réunions de suivi m'ont toujours permis d'avancer et je vous en remercie.

Je voudrais remercier Dominique Decottingnies et Nicolas Lopes Ferreira, mes encadrants IFPEN pour leur suivi au jour le jour, pour leurs conseils et leur écoute.

Je remercie Pierre Monsan et Jean-Claude Sigoillot d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse et de l'intérêt qu'ils ont y ont porté. Je remercie également Christelle Breton d'avoir accepté de joindre le jury de thèse.

Je remercie l'ADEME pour son soutien financier et, Léonard Boniface et Alba Departe pour leur suivi.

Pour reprendre un ordre plus chronologique, j'ai passé la première année de ma thèse au sein du département Biotechnologies et je voudrais d'abord remercier Frédéric Monot pour ses précieux conseils, son expertise avisée et son soutien dans toutes les phases de la thèse, notamment lors de ma première présentation en congrès.

Je voudrais remercier Nicolas Lopes Ferreira qui m'a mise sur les rails de la thèse durant cette première année sans jamais avoir laissé le train filé. Les discussions scientifiques, parfois agitées m'ont toujours permis d'avancer et je te remercie encore pour la disponibilité (de visu ou au téléphone). Notre passion commune pour le volley et le chocolat Côte d'or nous a permis de construire une bonne équipe !

Je voudrais remercier Hugues Mathis pour toute l'aide qu'il m'a apportée au niveau technique durant toute la thèse. Merci d'avoir supporté d'écouter de la musique française et le « papotage » durant les longues journées devant l'appareil PCR et d'avoir toujours répondu présent pour m'aider.

Je voudrais remercier Céline Cohen et Anne Morisset pour m'avoir sauvé la vie et celles de mes échantillons chromatés, entre autres. Merci pour votre aide, votre amitié et les bons moments passés ensemble. J'aurais un remerciement spécial pour Céline et ses talents de réalisatrice qui ont su me faire verser des larmes (mais pas en public...) et pour m'avoir accompagné à M... (vive les rogatons !). Je te souhaite bon courage avec ton futur bébé.

Je voudrais remercier Sandra Menir pour ses précieux conseils et son aide sur cette fameuse chromato !

Je ne pourrais pas ne pas remercier Françoise le Roux et Yves Benoit, mes collègues de bureau mais aussi mes « parents » de Rueil ! Merci pour l'ambiance qu vous mettez dans le bureau, pour les craquottes du vendredi et n'oubliez pas de boire de l'eau pendant les canicules ! Même si la vie veut m'y contraindre, ne vous inquiétez pas, je ne changerai pas !

Je voudrais remercier Antoine Margeot et Fadhel Ben Chaabane pour leur aide. Merci Antoine pour toutes nos discussions scientifiques, ton aide sur la première publi et pour tous les bons moments passés autour d'une bière. Merci Fadhel de m'avoir supporté le jour de la conférence à Seattle et pour avoir partagé le cheese cake du soulagement. Je n'oublierai pas ton coaching pour ma recherche d'emplois !

Cette année n'aurait pas été la même sans Thomas et Anaïs. Merci pour tous les bons moments passé ensemble autour d'un verre à papoter, sur un terrain de volley ou sur le dance floor !

Je remercie toutes les autres personnes du département, Benjamin pour ta passion du fromage et du fondant au chocolat du vendredi (nature bien sur), Françoise FG pour son absence d'intérêt pour les verts (quelle honte !), Rémi et Marcel pour me tenir informer de toutes les défaites de l'ASSE, Florent pour ses talents de photographe, Etienne, Nassim, Véro, Senta. Je remercie également les différentes stagiaires Delphine (et son aide pour la purification de la beta-glu), Hélène, Magali...

Enfin, je voudrais remercier la section Volley de l'ASIP et plus particulièrement André, Vincent et Xavier.

Puis j'ai quitté Rueil pour Solaize et je voudrais remercier Jean-François Joly pour son accueil au sein du département Réactions et Modélisation de réacteur. Je le remercie pour son écoute et sa disponibilité et de m'avoir fait confiance pour mener à bien cette thèse.

Je voudrais remercier Dominique Decottignies pour son encadrement durant les deux années passées à Solaize. Merci pour ta confiance et ton aide précieuse particulièrement pour la rédaction.

Je voudrais remercier Damien Hudebine pour son expertise pour toute la partie modélisation, pour son aide précieuse dans les derniers moments de la thèse pour la rédaction et lors de la soutenance. Merci d'avoir été aussi disponible !

Je voudrais dire un immense Merci à Serge Boivineau pour son investissement quotidien au sein du labo et pour sa disponibilité pour venir régler avec une efficacité exemplaire tous les problèmes ! J'en profite pour remercier le gang d'Elbaïte, Pauline, Amandine, Michel, Mustapha pour la bonne ambiance qui règne dans le labo !

Je voudrais remercier Hugues Dulot et Denis Guillaume pour leur aide lors du développement du code Fortran, leur expertise en Excel et Word et pour les friandises toujours disponibles en cas de baisse de moral.

Je voudrais remercier Nathalie Dupassieux pour son précieux coaching pour mes différentes présentations en congrès et soutenance. Merci d'avoir su me mettre en confiance, me motiver et d'avoir toujours la porte de ton bureau ouverte pour le SOS thésard !

Je remercie également Gilles Ferschneider et Romain Rousset pour leur discussion sur l'hydrolyse enzymatique.

Je voudrais remercier Alexia Marcuccilli qui a été ma toute première stagiaire et qui a su faire un travail remarquable. Bonne chance pour la suite de tes études !

Je voudrais remercier Joana, Hélène, Tiago, Victor, Martin pour les bons moments passés ensembles, les conversations toujours passionnées lors du repas de midi et pour l'humour portugais qui je n'arrive pas toujours à comprendre encore aujourd'hui...

Je voudrais remercier les thésards R12, Alberto et Jean Christophe qui ont été mes collègues de bureau pas forcément dans les moments les plus faciles, Nuno et Nadège pour leur bureau toujours accueillant, Marc, Mahdi, Luis, Caro, Rim et Maria. Merci pour la bonne ambiance et le soutiens qu'il existe entre thésard.

J'aurais un remerciement spécial pour Caro pour avoir toujours été un fort soutien lors de ses deux ans à l'IFPEN. Merci d'avoir écouté mes plaintes et d'avoir toujours trouvé les mots pour me remotiver. Les pauses café en beryl resteront des moments clés de cette thèse. J'en profite pour associer Isa et Marion à ces remerciements qui ont été présentes dans les derniers moments de la thèse et qui ont magnifiquement gérées avec Caro l'organisation du pot de thèse.

Je voudrais également remercier Noémie Dos Santos, qui m'a permis de mettre un premier pied au sein d'IFPEN lors de mon stage de fin d'étude qui m'a initié aux joies de la recherche.

Ces trois années passées à IFPEN m'ont permis d'avoir la chance de collaborer avec de nombreuses personnes.

Je voudrais remercier Loïc Barré et Jalel M'Hamdi pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur la diffusion des neutrons. Je retiendrais de cette collaboration leur investissement et leur maîtrise technique qu'ils ont parfaitement su me communiquer avec beaucoup de patience.

Je voudrais remercier Nadège Charon, Jérémie Barbier, Séverine Humbert, Cristèle Legens, Pierre Paul et Isabelle Cléménçon de la division Physique et Analyse pour leur aide et les discussions intéressantes sur l'analyse de la biomasse que nous avons partagées. J'en profite également pour remercier Naïma, Hanane et Romain pour leur aide pour les analyses chromatographiques.

J'ai également la chance d'avoir pu collaborer avec différents laboratoires extérieurs à IFPEN. Je voudrais remercier Dénilson da Silva Perez, Sandra Tapin-Lingua, Valérie Meyer, Arthur, Audrey et les autres personnes du FCBA / CTP avec qui j'ai pu collaborer pour leur accueil et leur aide lors de mes différentes venues à Grenoble. J'associerai Jean-Luc Puteau d'avoir accepté de passer mes échantillons en DRX.

J'en profite pour remercier Katia Ruel et Jean-Paul Joseleau pour le suivi et les conseils avisés qu'ils ont su me donner au cours de la thèse. Merci d'avoir répondu présent lors des réunions de suivi de thèse.

Je voudrais remercier l'ADIFP qui m'a permis de rencontrer de nombreux thésards à Rueil comme à Solaize. Les voyages d'études, sorties et repas à la cantine reste des moments importants qui montrent une réelle solidarité entre thésard.

Mes pensées vont à la bande des thésards de Rueil, Céline, Hoël, Samir, Zyed, Monsef, Amine ; Joëlle, Cindy... et aux thésards de Solaize, Vincent, Christophe, Charly, Nicoco, Laure, Julie, Vincent, Léa, Cécile, Jérémie....

Je voudrais également remercier le CE et toutes les personnes que j'ai pu y rencontrer qui m'a permis de décompresser avec son programme très alléchant à base d'escalade, de spéléo, de skis et skis de rando.....

Enfin, je voudrais remercier ma famille et mes amis qui ont toujours été là pour me soutenir. Merci à mes parents et mes deux frères Thomas et Fabien pour m'avoir fait confiance quels que soient mes choix et d'avoir toujours su m'écouter. J'ai une pensée pour Tiphaine, Nico, Amélie, Perrine, Charlotte, Matthieu, Mélanie, Aurélie, Andréa, Laura et beaucoup d'autres...merci pour votre amitié et votre présence. Un remerciement spécial à Aurélie et Matthieu pour leur contribution à la correction orthographique du manuscrit.

Sommaire

INTRODUCTION	1
CONTEXTE	3
1. LES ENJEUX DES BIOCARBURANTS	3
1.1. LE CONTEXTE ENERGETIQUE ACTUEL	3
1.2. LA FILIERE 'BIOCARBURANT'	3
1.3. L'ETHANOL, LE PREMIER 'BIOCARBURANT' AU MONDE	4
2. LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE	5
3. PROCEDES DE PRODUCTION D'ETHANOL DEUXIEME GENERATION	5
3.1. LE PROCEDE SHF	5
3.2. UNE ALTERNATIVE: LE PROCEDE SSF	6
3.3. UN DES VERROUS MAJEURS DU PROCEDE: L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	6
CHAPITRE 1: ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES	7
1.1. LES CELLOBIOHYDROLASES (CBHs)	8
1.1.1. <i>Mode d'action des enzymes CBHs</i>	8
1.1.2. <i>Importance de l'adsorption des enzymes CBHs</i>	10
1.1.3. <i>Activité des cellobiohydrolases sur substrat soluble</i>	11
1.1.4. <i>Inhibition des cellobiohydrolases par leur produit de réaction</i>	12
1.2. LES ENDOGLUCANASES (EGs)	12
1.2.1. <i>Mode d'action des enzymes EGs</i>	13
1.2.2. <i>Adsorption des enzymes EGs</i>	13
1.2.3. <i>Activité des endoglucanases sur substrat soluble</i>	14
1.2.4. <i>Inhibition des endoglucanases</i>	14
1.3. COMPARAISON ENTRE LES CELLOBIOHYDROLASES ET LES ENDOGLUCANASES	14
1.4. LA B-GLUCOSIDASE (BGL)	16
1.5. LA SYNERGIE ENTRE LES ENZYMES	16
1.6. PARAMETRES INFLUENÇANT L'ACTIVITE DES ENZYMES	17
CONCLUSION SUR LES ENZYMES	18
2. LE SUBSTRAT CELLULOSIQUE	19
2.1. LA CELLULOSE A DIFFERENTES ECHELLES	19
2.2. PARAMETRES STRUCTURAUX CARACTERISTIQUES DES SUBSTRATS CELLULOSIQUES	21
2.2.1. <i>Le degré de polymérisation</i>	21
2.2.2. <i>La cristallinité</i>	22
2.2.3. <i>La surface spécifique</i>	23
2.2.4. <i>Le degré de gonflement</i>	23
2.2.5. <i>La taille des particules</i>	23
2.3. INFLUENCE DES PARAMETRES STRUCTURAUX SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	24
2.4. ÉVOLUTION DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES ET STRUCTURAUX AU COURS DE L'HYDROLYSE	25
2.4.1. <i>A l'échelle moléculaire</i>	25
2.4.2. <i>A l'échelle nanométrique</i>	25
2.4.3. <i>A l'échelle micrométrique</i>	26
CONCLUSION SUR LE SUBSTRAT CELLULOSIQUE:	26
3. PHENOMENES LIMITANT L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	27
3.1. INFLUENCE DES FACTEURS LIES AUX ENZYMES	27
3.2. INFLUENCE DES FACTEURS LIES AU SUBSTRAT	28
CONCLUSION SUR LES PHENOMENES LIMITANT L'HYDROLYSE	28

4.	MODELISATION CINETIQUE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	29
4.1.	GENERALITE SUR LES MODELES CINETIQUES	29
4.2.	CINETIQUE EN PHASE HOMOGENE	30
4.2.1.	<i>Modèle de Michaelis-Menten</i>	30
4.2.2.	<i>Modélisation de l'action de la β-glucosidase</i>	32
4.3.	CINETIQUE EN PHASE HETEROGENE	33
4.3.1.	<i>Le modèle de Michaelis- Menten</i>	33
4.3.2.	<i>Modèle cinétique de type "Langmuir"</i>	34
4.4.	MODELES GLOBAUX DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CELLULOSE	37
4.4.1.	<i>Modèles mécanistiques</i>	37
4.4.2.	<i>Modèles prenant en compte la structure du substrat</i>	38
	CONCLUSIONS SUR LA MODELISATION CINETIQUE	40
	CONCLUSION DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET SITUATION DU SUJET DE RECHERCHE	41

CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES **43**

1. LES ENZYMES **43**

1.1.	LES ENZYMES ETUDIEES	43
1.2.	METHODE DE PURIFICATION DES ENZYMES	44
1.2.1.	<i>Purification des EGs et des CBHs</i>	44
1.2.2.	<i>Purification des β-glucosidases</i>	44
1.3.	METHODES DE DOSAGE DES ENZYMES	44
1.3.1.	<i>Méthode de Lowry</i>	44
1.3.2.	<i>Méthode de dosage par fluorescence UV</i>	45

2. LES SUBSTRATS **46**

2.1.	LES SUBSTRATS ETUDIES	46
2.2.	METHODE DE CARACTERISATION DES SUBSTRATS	47
2.2.1.	<i>Teneur en matière sèche</i>	47
2.2.2.	<i>Analyse compositionnelle par hydrolyse acide</i>	47
2.2.3.	<i>Degré de polymérisation moyen par mesure de la viscosité intrinsèque</i>	48
2.2.4.	<i>Indice de cristallinité par WAXS et RMN du ^{13}C</i>	48
2.2.5.	<i>Caractérisation de la nanostructure par SAXS / SANS</i>	49
2.2.6.	<i>Microscopie électronique à balayage</i>	52
2.2.7.	<i>Taille de particules</i>	52

3. METHODE DE DOSAGES DES SUCRES **54**

3.1.	GLUCOSTAT	54
3.2.	CHROMATOGRAPHIE IONIQUE (HPLIC)	54
3.2.1.	<i>Généralité sur la chromatographie ionique</i>	54
3.2.2.	<i>Méthode 1: Dosage du glucose, xylose et cellobiose</i>	55
3.2.3.	<i>Méthode 2: Dosage des oligomères (DP 1 à 6)</i>	55

4. PREPARATION DES SUBSTRATS PRE-HYDROLYSES **56**

5. REACTION ENZYMATIQUE **57**

5.1.	TAMPON	57
5.2.	MESURES DES CINETIQUES INITIALES DES B-GLUCOSIDASES	57
5.3.	MESURE DES CINETIQUES INITIALES DES CBHs, EGs ET DU COCKTAIL COMPLET	58
5.4.	TEST DE CINETIQUE LONGUE DUREE	59

6. TRAITEMENT DES DONNEES CINETIQUES **60**

6.1.	DETERMINATION DES VITESSES INITIALES APPARENTES	60
6.2.	DETERMINATION DU RENDEMENT GLUCOSE ET DE LA VITESSE APPARENTE D'HYDROLYSE	61

CHAPITRE 3: ÉTUDE DE LA CINETIQUE INITIALE DES ENZYMES PURES **63**

1. LES CELLOBIOHYDROLASES **63**

1.1.	ENZYMES ET SUBSTRAT D'ETUDE	63
1.2.	ADSORPTION DES ENZYMES	64
1.3.	ÉTUDE CINÉTIQUE	65
1.3.1.	<i>Suivi des tests de cinétique initiale</i>	65
1.3.2.	<i>Influence de la concentration en enzymes</i>	69
1.3.3.	<i>Étude de l'inhibition par les produits de la réaction</i>	70
1.3.4.	<i>Influence de la température</i>	72
1.4.	INTEGRATION DU MODE D'ACTION DES CELLOBIOHYDROLASES DANS LE MODELE.	73
2.	LES ENDOGLUCANASES	73
2.1.	ENZYMES ET SUBSTRAT D'ETUDE	73
2.2.	ÉTUDE CINÉTIQUE	75
2.2.1.	<i>Suivi des tests de cinétique initiale</i>	75
2.2.2.	<i>Influence de la concentration en enzyme</i>	75
2.3.	INTEGRATION DU MODE D'ACTION DES ENDOGLUCANASES DANS LE MODELE.	76
3.	COMPARAISON ENDOGLUCANASE - CELLOBIOHYDROLASES	77
3.1.	ISOTHERME D'ADSORPTION	77
3.2.	CINÉTIQUE D'HYDROLYSE	77
4.	LA B-GLUCOSIDASE	78
4.1.	ENZYMES ET SUBSTRATS D'ETUDE	78
4.2.	ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA B-GLUCOSIDASE D' <i>A. NIGER</i> SUR LE CELLOBIOSE	79
4.3.	ÉTUDE DE LA B-GLUCOSIDASE D' <i>A. NIGER</i> SUR PNPG	81
4.4.	COMPARAISON DES B-GLUCOSIDASES D' <i>A. NIGER</i> ET DE <i>T. REESEI</i>	82
4.5.	CONCLUSION SUR L'ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA B-GLUCOSIDASE	83
5.	ÉTUDE DE LA SYNERGIE ENTRE LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES	84
5.1.	SYNERGIE CBHI / CBHII	85
5.2.	SYNERGIE CBHS / EG	87
5.3.	SYNERGIE CBHS ET EGs / BGL	89
6.	VALIDATION DU COCKTAIL ENZYMATIQUE RECONSTITUE	90
	CONCLUSION	95
CHAPITRE 4:	INFLUENCE DE LA MORPHOLOGIE DU SUBSTRAT SUR L'HYDROLYSE	97
1.	COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES GLOBALES DES SUBSTRATS D'ETUDE.	98
2.	PREPARATION DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSES	100
3.	ÉVOLUTION DE LA STRUCTURE ET MORPHOLOGIE DU SUBSTRAT AU COURS DE L'HYDROLYSE	101
3.1.	A L'ECHELLE MOLECULAIRE	101
3.2.	A L'ECHELLE NANOMETRIQUE	102
3.2.1.	<i>Cristallinité</i>	102
3.2.2.	<i>Surface spécifique</i>	104
3.3.	A L'ECHELLE MICROMETRIQUE	106
3.3.1.	<i>Morphologie des particules par Microscopie Electronique à Balayage</i>	106
3.3.2.	<i>Mesure de la taille des particules avec le MorFi</i>	108
3.3.3.	<i>Mesure de la taille des particules par FPIA</i>	110
3.3.4.	<i>Comparaison FPIA / SANS</i>	112
	CONCLUSION	113
4.	ÉTUDE DE L'EVOLUTION DE LA REACTIVITE DU SUBSTRAT	114
4.1.	REACTIVITE INITIALE	114
4.2.	REACTIVITE GLOBALE (TEST SUR 72H)	116
4.3.	LIEN AVEC LA DIMINUTION DE LA VITESSE D'HYDROLYSE AU COURS DE LA REACTION	119
5.	LIEN REACTIVITE / STRUCTURE	122

CONCLUSION	125
CHAPITRE 5: MODELISATION CINETIQUE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	127
1. PRESENTATION DU MODELE CINETIQUE	127
1.1. ABREVIATIONS UTILISEES	127
1.2. SCHEMAS REACTIONNELS PROPOSES	128
1.2.1. <i>Actions des cellobiohydrolases et des endoglucanases</i>	128
1.2.2. <i>Action des β-glucosidases</i>	130
1.2.3. <i>Synergies entre les enzymes</i>	130
1.3. HYPOTHESES ET SIMPLIFICATIONS UTILISEES	131
1.4. ÉQUATIONS CINETIQUES DU MODELE	132
1.4.1. <i>Cellobiohydrolases et Endoglucanases</i>	132
1.4.2. <i>β-glucosidases</i>	134
1.4.3. <i>Synergies</i>	134
1.4.4. <i>Bilan des équations cinétiques</i>	135
1.4.5. <i>Méthode de calcul des vitesses de réaction</i>	135
2. OPTIMISATION DES PARAMETRES	138
3. RESULTATS DU MODELE CINETIQUE APRES OPTIMISATION	139
3.1. PARAMETRES OBTENUS APRES OPTIMISATION	139
3.2. CINETIQUE DES ENZYMES PURES	141
3.2.1. <i>Les β-glucosidases</i>	141
3.2.2. <i>Les Cellobiohydrolases</i>	143
3.2.3. <i>Les endoglucanases</i>	145
3.3. RESULTATS DE LA SYNERGIE ENTRE LES ENZYMES	148
3.3.1. <i>La synergie CBHI / CBHII</i>	148
3.3.2. <i>La synergie CBHs / EG</i>	149
3.3.3. <i>La synergie CBHs et EG / BGL</i>	151
4. DISCUSSION SUR LE MODELE	153
4.1. ÉTUDE DU COMPORTEMENT DU MODELE EN CINETIQUE GLOBALE	153
4.2. INTRODUCTION DU PHENOMENE DE PERTE DE REACTIVITE DU SUBSTRAT	153
4.3. INTRODUCTION DU PHENOMENE DE DESACTIVATION DES ENZYMES	155
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	156
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	159
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161

Publications

Articles:

Chauve M, Mathis H, Huc D, Casanave D, Monot F, Lopes Ferreira N: **Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases.** *Biotechnology for Biofuels* 2010, **3:3**

Chauve M, Lopes Ferreira N, Casanave D, da Silva Perez D, Perez S: **Kinetic modeling of pure cellulases involved in enzymatic hydrolysis of cellulose.** *18th European Biomass Conference and Exhibition, 3-7 May 2010, Lyon, France, Proceedings* 2010,1380-1387.

Chauve M, Barre L., Tapin-lingua S. da Silva Perez D, Casanave D, Perez S, Lopes Ferreira N. **Influence of cellulose architecture for it's enzymatic hydrolysis by fungal cellulases.**(À soumettre)

Communications orales:

Chauve M, Lopes Ferreira N, Casanave D, da Silva Perez D, Perez S. *18th European Biomass Conference and Exhibition, 3-7 May 2010, Lyon, France.* **Kinetic modeling of pure cellulases involved in enzymatic hydrolysis of cellulose.**

Chauve M, Lopes Ferreira N, Casanave D, da Silva Perez D, Barré L, Tapin-Lingua S, Perez S. *33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemical, 2-5 May 2011, Seattle, USA.* **Evolution of cellulosic substrate during enzymatic hydrolysis: impact of substrate morphology and reactivity.**

Posters:

Chauve M, Lopes Ferreira N, Casanave D, Monot F. *CODEGEPR, 15 Septembre 2009, Lyon, France.* **Modèle cinétique de l'activité de la β -glucosidase d' *Aspergillus niger*.**

Chauve M, Lopes Ferreira N, Casanave D, Monot F, Perez S. *École Énergie Recherche, 28 Mars – 2 Avril 2011, Roscoff, France.* **Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique de substrat cellulosique.**

Liste des abréviations

BGL: β -glucosidase

BLC: Biomasse LignoCellulosique

CBD: Cellulose Binding Domain

CBH: Cellobiohydrolase

CBHI: Cellobiohydrolases I

CBHII: Cellobiohydrolases II

CD: Catalytic Domain

DP: Degré de Polymérisation

DS: Degré de synergie

EG: Endoglucanase

EGI: Endoglucanase I

FPIA: Analyseur de taille de particules (Flow Particles Image analyser)

HPLiC : Chromatographie liquide hautes performances (ionique)

ICr: Indice de cristallinité

pNPG: p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside

SANS: Diffusion des neutrons aux petits angles (Small Angles Neutron Scattering)

SAXS: Diffraction des rayons X aux petits angles (Small Angles X-ray Scattering)

SHF: Separate Hydrolysis and Fermentation

SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation

WAXS: Diffraction des rayons X aux grands angles (Wide Angles X-ray Scattering)

Table des Figures

FIGURE 0-1: SCHEMA DU PROCEDE DE PRODUCTION D'ETHANOL 2G (VERSION SHF).....	6
FIGURE 1-1: SCHEMA EXPLICATIF DE L'ACTION DES ENZYMES CELLULOLYTIQUES	8
FIGURE 1-2: MODE D'ACTION DE CBHI SUR LA CELLULOSE, D'APRES BECKHAM ET AL [19]	10
FIGURE 1-3: REPRESENTATION D'UNE CELLOBIOHYDROLASE (A) ET D'UNE ENDOGLUCANASES (B).	13
FIGURE 1-4: STRUCTURE CHIMIQUE DE LA CELLULOSE [56]	19
FIGURE 1-5: LES DIFFERENTS ALLOMORPHE DE LA CELLULOSE ET, LES POSSIBILITES D'INTERCONVERSION	20
FIGURE 1-6 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES NIVEAUX ORGANISATIONNELS DE LA CELLULOSE	21
FIGURE 1-7: EXEMPLE DE SPECTRE DE DIFFRACTION ET CALCUL DE L'INDICE DE CRISTALLINITE	22
FIGURE 2-1: SCHEMA DE PRINCIPE DU SPECTROPHOTOMETRE UV/VISIBLE MONO FAISCEAU	45
FIGURE 2-2: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE EXPERIENCE DE DIFFUSION AUX PETITS ANGLES, D'APRES GRILLO [116]	50
FIGURE 2-3: STANDARD (10 G.L ⁻¹) ET GRADIENT UTILISE DANS LA METHODE 1	55
FIGURE 2-4: STANDARD (10 G.L ⁻¹) ET GRADIENT UTILISE DANS LA METHODE 2.....	56
FIGURE 2-5: PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR L'ETUDE DE LA B-GLUCOSIDASE.....	58
FIGURE 2-6: PROTOCOLE EXPERIMENTALE DES TESTS REALISES POUR L'ETUDE DES CELLOBIOHYDROLASES	59
FIGURE 2-7: EXEMPLE DE DETERMINATION DE VITESSE INITIALE AVEC LE TABLEAU DES STATISTIQUES RENVOYE PAR EXCEL	60
FIGURE 3-1: ISOTHERME D'ADSORPTION DES ENZYMES CBHI ET CBHII (T=4°C).....	65
FIGURE 3-2: COMPARAISON ENTRE LA CINETIQUE D'ADSORPTION ET DE SACCHARIFICATION POUR CBHI ET CBHII.....	66
FIGURE 3-3: COMPARAISON DES ISOTHERMES D'ADSORPTION A 4°C ET 50°C (PENDANT LA REACTION).....	67
FIGURE 3-4: CINETIQUE DE SACCHARIFICATION DE LA CELLULOSE AVICEL PAR CBHI	68
FIGURE 3-5: CINETIQUE DE SACCHARIFICATION DE LA CELLULOSE AVICEL PAR CBHII.....	69
FIGURE 3-6: ÉVOLUTION DE LA VITESSE DE PRODUCTION DE CELLOBIOSE EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ENZYMES ADSORBEES	70
FIGURE 3-7: IMPACT DE LA PRESENCE DE GLUCOSE SUR L'ACTIVITE (A) ET LA FIXATION (B) DE CBHI SUR AVICEL.....	72
FIGURE 3-8: LINEARISATION DE LA LOI D'ARRHENIUS POUR LA DETERMINATION DE L'ENERGIE D'ACTIVATION DES ENZYMES CBHI ET CBHII	73
FIGURE 3-9: ISOTHERME D'ADSORPTION DE EGI A 50°C (EN CINETIQUE)	75
FIGURE 3-10: ÉVOLUTION DE LA QUANTITE DE CELLOBIOSE PRODUIT EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ENZYMES EGI ADSORBEES (T=50°C-CELLULOSE AVICEL A 1%).....	76
FIGURE 3-11: COMPARAISON DES ISOTHERMES D'ADSORPTION A 50°C DE CBHI, CBHII ET EGI	77
FIGURE 3-12: VITESSE DE PRODUCTION DE CELLOBIOSE EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ENZYMES ADSORBEES POUR CBHI, CBHII, ET EGI (T=50°C- CELLULOSE AVICEL 1% - CINETIQUE 30 MINUTES)	78
FIGURE 3-13: LINEARISATION DE LINEWEAVER ET BURK POUR LA B-GLUCOSIDASE DE <i>A. NIGER</i> SUR LE CELLOBIOSE	80
FIGURE 3-14: COMPARAISON DE L'ACTIVITE MESUREE ET PREDITE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PNP (POINTS: DONNEES EXPERIMENTALES – COURBES: PREDICTION DU MODELE)	83
FIGURE 3-15: INFLUENCE DE LA SYNERGIE CBHI.CBHII SUR LA VITESSE DE CONVERSION DE LA CELLULOSE EN CELLOBIOSE	86
FIGURE 3-16: ÉTUDE DE LA SYNERGIE CBHS / EGI SUR LA CINETIQUE DE PRODUCTION DE CELLOBIOSE A PARTIR DE CELLULOSE, T=50°C, 1% CELLULOSE AVICEL, [CBHI]=17,3 MG.L ⁻¹ , [CBHII]=10,7 MG.L ⁻¹ , [EGI]= 0 OU 4,1 MG.L ⁻¹	88
FIGURE 3-17: ÉTUDE DE LA SYNERGIE CBHS / EGI / AU COURS DE LA CONVERSION DE LA CELLULOSE.	90
FIGURE 3-18: ÉVOLUTION DE LA VITESSE INITIALE APPARENTE DE SUCRES TOTAUX EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ENZYMES INITIALES	91
FIGURE 3-19: COMPARAISON DES PERFORMANCES DES COCKTAILS RECONSTITUE ET REEL POUR L'HYDROLYSE DE LA CELLULOSE.....	93
FIGURE 3-20: COMPARAISON DES TESTS DE CINETIQUES INITIALES ET GLOBALES	94
FIGURE 3-21: COMPARAISON DES COCKTAILS RECONSTITUE ET REEL CONSIDERANT QUE SEUL 80% DES ENZYMES DU COCKTAIL REEL SONT ACTIVES.....	95
FIGURE 4-1: SPECTRE DE DIFFRACTION DE L'AVICEL ET DE LA PCBB	99

FIGURE 4-2: SPECTRE DE DIFFRACTION DES RAYONS X (WAXS) DES TROIS SERIES DE SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSEES	103
FIGURE 4-3: SPECTRE TRAITÉ DE SANS POUR LES ÉCHANTILLONS PRÉPARÉ À PARTIR DE LA CELLULOSE AVICEL... ..	104
FIGURE 4-4: IMAGES DE MEB DES CELLULOSES PARTIELLEMENT HYDROLYSÉES À PARTIR D'AVICEL ET DE PCBB	107
FIGURE 4-5: ÉVOLUTION DE LA LONGUEUR DES FINES POUR LES CELLULOSES PARTIELLEMENT HYDROLYSÉES PRÉPARÉES À PARTIR DE CELLULOSE AVICEL	108
FIGURE 4-6: ÉVOLUTION DE LA LONGUEUR DES FIBRES ET DES FINES POUR LES CELLULOSES PARTIELLEMENT HYDROLYSÉES PRÉPARÉES À PARTIR DE CELLULOSE PCBB	109
FIGURE 4-7: RÉPARTITION DE LA LONGUEUR ET DU DIAMÈTRE DES FIBRES POUR LES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSÉS DE CELLULOSE AVICEL	111
FIGURE 4-8: ÉVOLUTION DU RATIO (S/V) NORME DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSÉS "AVICEL" SELON LA MÉTHODE ANALYTIQUE UTILISÉE	113
FIGURE 4-9: ÉVOLUTION DE LA REACTIVITÉ DU SUBSTRAT EN FONCTION DU TAUX DE CONVERSION.....	115
FIGURE 4-10: IMPACT DE L'HYDROLYSE PARTIELLE DU SUBSTRAT SUR LE RENDEMENT GLUCOSE	117
FIGURE 4-11: ÉVOLUTION DE LA VITESSE APPARENTE D'HYDROLYSE AU COURS DU TEMPS POUR DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSÉS	118
FIGURE 4-12: ÉVOLUTION DE LA CINÉTIQUE LORS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU SUBSTRAT AVICEL "CONTROLE" (BA).....	119
FIGURE 4-13: ÉVOLUTION DE LA PERTE DE REACTIVITÉ GLOBALE ET DU SUBSTRAT EN FONCTION DE LA CONVERSION	121
FIGURE 4-14: ÉVOLUTION DU VOLUME MOYEN DES PARTICULES EN FONCTION DU TAUX DE CONVERSION DU SUBSTRAT PARTIELLEMENT HYDROLYSÉ	123
FIGURE 4-15: ÉVOLUTION DE LA VITESSE INITIALE APPARENTE EN FONCTION DU TAUX DE CONVERSION DU SUBSTRAT PARTIELLEMENT HYDROLYSÉ	124
FIGURE 5-1: MODÈLE DESCRIPTIF DE L'ACTION DES CELLOBIOHYDROLASES ET DES ENDOGLUCANASES	129
FIGURE 5-2: MODÈLE DE MICHAELIS-MENTEN AVEC INHIBITION COMPÉTITIVE PAR LE GLUCOSE.....	130
FIGURE 5-3: DIAGRAMME DE PARITÉ DE LA CONCENTRATION DE GLUCOSE LIBRE POUR LA B-GLUCOSIDASE DE A. NIGER (MODÈLE VS. EXPÉRIMENTATION).....	142
FIGURE 5-4: DIAGRAMME DE PARITÉ DE LA CONCENTRATION DE GLUCOSE LIBRE POUR LA B-GLUCOSIDASE DE T. REESEI (MODÈLE VS. EXPÉRIMENTATION)	142
FIGURE 5-5: DIAGRAMME DE PARITÉ POUR CBHI DE T. REESEI (MODÈLE VS. EXPÉRIMENTATION)	144
FIGURE 5-6: DIAGRAMME DE PARITÉ POUR CBHII DE T. REESEI (MODÈLE VS. EXPÉRIMENTATION)	145
FIGURE 5-7: DIAGRAMME DE PARITÉ POUR EGI DE T. REESEI (MODÈLE VS. EXPÉRIMENTATION)	147
FIGURE 5-8: DIAGRAMME DE PARITÉ DE LA CONCENTRATION EN CELLOBIOSE LIBRE POUR LA SYNERGIE CBHI/CBHII (MODÈLE VS. EXPÉRIMENTATION)	148
FIGURE 5-9: ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CELLOBIOSE EN FONCTION DU TEMPS	149
FIGURE 5-10: ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CELLOBIOSE LIBRE EN FONCTION DU TEMPS POUR DES MÉLANGES CBHS / EG.....	150
FIGURE 5-11: ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CELLOBIOSE LIBRE (A) ET EN GLUCOSE LIBRE (B) EN FONCTION DU TEMPS	152
FIGURE 5-12: ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE ET CELLOBIOSE LIBRES EN FONCTION DU TEMPS.....	153
FIGURE 5-13: ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN SUCRES EN FONCTION DU TEMPS AVEC PRISE EN COMPTE DE LA PERTE DE REACTIVITÉ DU SUBSTRAT	155
FIGURE 5-14: ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN SUCRES EN FONCTION DU TEMPS AVEC PRISE EN COMPTE DE LA PERTE DE REACTIVITÉ DU SUBSTRAT ET DE LA DESACTIVATION DES ENZYMES.....	156

Table des tableaux

TABLEAU 0-1: ESTIMATION DE LA PRODUCTION DE BIOETHANOL DANS LE MONDE EN 2008 [3]	4
TABLEAU 1-1: COMPARAISON DES PROPRIETES DES CBHS ET EGS DE <i>T. REESEI</i>	15
TABLEAU 1-2: INFLUENCE DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	24
TABLEAU 1-3: CLASSIFICATION DES MODELES CINETIQUES DEVELOPPES DANS LA LITTERATURE	30
TABLEAU 1-4: LINEARISATION POSSIBLE POUR LA DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES DE MICHAELIS- MENTEN	31
TABLEAU 1-5: RECAPITULATIF DES MODELES D'INHIBITION	32
TABLEAU 1-6: TABLEAU RECAPITULATIF DES PARAMETRES CINETIQUES DA LA B-GLUCOSIDASE	33
TABLEAU 1-7: PARAMETRES DE MICHAELIS-MENTEN DETERMINES POUR LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES DE <i>T.</i> <i>REESEI</i>	34
TABLEAU 1-8: MODELE DE LANGMUIR	35
TABLEAU 1-9: PARAMETRES OBTENUS POUR LE MODELE DE LANGMUIR A UN OU DEUX SITES POUR L'ADSORPTION DE CBHS DE <i>T. REESEI</i> SUR AVICEL	36
TABLEAU 1-10: ACTIVITE SPECIFIQUE DES CELLOBIOHYDROLASES	37
TABLEAU 1-11: DETAIL ET COMPARAISON DE DEUX MODELES MECANISTIQUES	38
TABLEAU 2-1: PARAMETRES UTILISES POUR LA DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN ENZYMES PAR SPECTROSCOPIE	46
TABLEAU 2-2: TABLEAU RECAPITULATIF DES MASSES MOLAIRES DES ENZYMES	46
TABLEAU 2-3: CONFIGURATIONS UTILISEES LORS DES MESURES DE SANS	50
TABLEAU 2-4: CONDITIONS UTILISEES POUR LA DETERMINATION DE LA VITESSE INITIALE	60
TABLEAU 3-1: PARAMETRES EXPERIMENTAUX UTILISES POUR LES TESTS D'HYDROLYSE PAR LES CELLOBIOHYDROLASES	64
TABLEAU 3-2: PARAMETRES EXPERIMENTAUX UTILISES POUR LES TESTS D'HYDROLYSE PAR EGI	74
TABLEAU 3-3: CONDITIONS CHOISIES POUR LES TESTS D'HYDROLYSE PAR LA B-GLUCOSIDASE	79
TABLEAU 3-4: RESULTATS OBTENUS LORS DE L'ETUDE CINETIQUE DE LA B-GLUCOSIDASE D' <i>A. NIGER</i> SUR LE CELLOBIOSE [111]	79
TABLEAU 3-5: DESCRIPTION DU MODELE UTILISE POUR DECRIRE L'ACTION DE LA B-GLUCOSIDASE	81
TABLEAU 3-6: PARAMETRES CINETIQUES DE LA B-GLUCOSIDASE D' <i>A. NIGER</i> D'APRES LE MODELE DE MICHAELIS- MENTEN	81
TABLEAU 3-7: COMPARAISON DES PARAMETRES CINETIQUES DES B-GLUCOSIDASES D' <i>A. NIGER</i> ET DE <i>T. REESEI</i>	82
TABLEAU 3-8: TABLEAU DES PROPORTIONS DU COCKTAIL ENZYMATIQUE REEL ET DU COCKTAIL DE REFERENCE	84
TABLEAU 3-9: TABLEAU RECAPITULATIF DES TESTS DE CINETIQUE INITIALE REALISES	85
TABLEAU 3-10: TABLEAU RECAPITULATIF DES DEGRES DE SYNERGIE CBHI/CBHII	86
TABLEAU 3-11: TABLEAU RECAPITULATIF DES DEGRES DE SYNERGIE ENTRE LES CBHS ET EGI	88
TABLEAU 3-12: TESTS REALISES POUR LA COMPARAISON COCKTAIL RECONSTITUE / COCKTAIL REEL	91
TABLEAU 4-1: TABLEAU CARACTERISTIQUES DES PROPRIETES MORPHOLOGIQUE DES SUBSTRATS D'ETUDE	99
TABLEAU 4-2: TABLEAU RECAPITULATIF DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSES PREPARES	100
TABLEAU 4-3: DEGRE DE POLYMERISATION MOYEN DES CELLULOSES PARTIELLEMENT HYDROLYSEES	102
TABLEAU 4-4: INDICE DE CRISTALLINITE DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSES	103
TABLEAU 4-5: TABLEAU RECAPITULATIF DES RAYONS CARACTERISTIQUES DETERMINES PAR SANS	105
TABLEAU 4-6: POURCENTAGE DE FINES DANS LA CELLULOSE	108
TABLEAU 4-7: EVOLUTION DE LA LONGUEUR DES FIBRES AVEC LA CONVERSION POUR LA PATE CELLULOSIQUE PCBB	110
TABLEAU 4-8: LONGUEUR ET LARGEUR MOYENNES DETERMINEES POUR LES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSES	111
TABLEAU 4-9: TABLEAU COMPARATIF DU RATIO S/V DETERMINE PAR SANS OU FPIA POUR LES SUBSTRATS PREPARES A PARTIR DE LA CELLULOSE AVICEL	113
TABLEAU 4-10: PROTOCOLE DE DETERMINATION DELA REACTIVITE DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSES	114
TABLEAU 4-11: VITESSE APPARENTE D'HYDROLYSE DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSES	115
TABLEAU 4-12: VITESSE APPARENTE D'HYDROLYSE DES SUBSTRATS PARTIELLEMENT HYDROLYSES	116

TABLEAU 4-13: EVOLUTION DE LA VITESSE APPARENTE DE PRODUCTION DE GLUCOSE AU COURS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE.....	120
TABLEAU 4-14: IDENTIFICATION DES PHENOMENES ENTRAINANT LA DIMINUTION DE LA VITESSE DE REACTION PENDANT L'HYDROLYSE	122
TABLEAU 5-1: SYMBOLE UTILISE POUR LA DESCRIPTION DES ENZYMES	127
TABLEAU 5-2: SYMBOLE UTILISE POUR LA DESCRIPTION DU SUBSTRAT.....	128
TABLEAU 5-3: PARAMETRES CINETIQUES ET VARIABLES UTILISEES POUR LA MODELISATION DE L'ACTIVITE DES CBHS ET DES EGS	129
TABLEAU 5-4: PARAMETRES CINETIQUES ET VARIABLES UTILISEES POUR LA MODELISATION DES B-GLUCOSIDASE ...	130
TABLEAU 5-5: RECAPITULATIF DU CALCUL DES CONSTANTES D'EQUILIBRE POUR LE SYSTEME REACTIONNEL	132
TABLEAU 5-6: RECAPITULATIF POUR LE CALCUL DU NOMBRE TOTAL DE SITES ACCESSIBLES AUX ENZYMES	133
TABLEAU 5-7: ÉQUATIONS CINETIQUES DE L'HYDROLYSE PAR LES CELLOBIOHYDROLASES	133
TABLEAU 5-8: ÉQUATIONS CINETIQUES DE L'HYDROLYSE PAR LES ENDOGLUCANASES	134
TABLEAU 5-9: ÉQUATION CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU CELLOBIOSE PAR LES B-GLUCOSIDASES.....	134
TABLEAU 5-10: ÉQUATIONS CINETIQUES ASSOCIEES A LA SYNERGIE CBHI/CBHII	135
TABLEAU 5-11: TABLEAU RECAPITULATIF DES EQUATIONS CINETIQUES MISES EN JEU	135
TABLEAU 5-12: PARAMETRES CINETIQUES A OPTIMISER POUR LE MODELE.....	139
TABLEAU 5-13: VALEURS OPTIMISEES DES PARAMETRES POUR LE MODELE CINETIQUE.....	140
TABLEAU 5-14: CONDITIONS DE PRISE EN COMPTE DE LA PERTE DE REACTIVITE DU SUBSTRAT.....	154
TABLEAU 5-15: ESTIMATION DE LA CONSTANTE DE DESACTIVATION LIE AU SUBSTRAT ($K_{SUB} = 0,72$)	154
TABLEAU 5-16: CONDITIONS DE PRISE EN COMPTE DE LA DESACTIVATION DES ENZYMES	155

INTRODUCTION

Dans le contexte énergétique actuel où la demande en carburant ne cesse d'augmenter, l'utilisation de biomasse ligno-cellulosique pour la production d'éthanol représente une perspective pour l'avenir. En effet, ce carburant présente l'avantage d'être issu de la ressource renouvelable la plus abondante au monde et peut être directement utilisé dans les motorisations actuelles après incorporation à l'essence. Cependant, le procédé envisagé a encore besoin d'être amélioré pour devenir rentable. Parmi les différentes étapes, l'hydrolyse enzymatique est l'étape la plus coûteuse mais présente de nombreuses voies d'amélioration: l'augmentation de l'efficacité du cocktail enzymatique et l'optimisation de sa mise en œuvre industrielle. Cette optimisation passe par une meilleure compréhension des mécanismes et par conséquent par le développement d'un modèle cinétique prédictif de la cellulolyse.

Ce travail propose d'étudier la cinétique de la réaction d'hydrolyse enzymatique de substrat cellulosique et de développer le modèle cinétique prédictif associé. La construction de ce modèle passe par une meilleure compréhension des mécanismes d'action des enzymes pures et en mélange et de l'influence de la structure et de la morphologie du substrat.

La première partie de ce document décrit le contexte de la thèse et quelques concepts généraux sur la filière biocarburant et plus particulièrement sur la valorisation de la biomasse lignocellulosique en éthanol par voie biochimique. Les différents procédés envisagés y sont également expliqués.

Une étude bibliographique sur les différents aspects de la réaction d'hydrolyse enzymatique est présentée dans le Chapitre 1. Cette étude vise à décrire d'une part les caractéristiques des enzymes utilisées pour la dégradation de la cellulose et d'autre part l'influence des propriétés morphologiques du substrat sur cette même réaction. Pour finir, les différents modèles cinétiques développés dans la littérature seront détaillés.

Le Chapitre 2 présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser cette étude cinétique. Dans un premier temps, les différentes enzymes étudiées, leurs méthodes de purification et de caractérisation sont explicitées. Puis dans un deuxième temps, les choix des substrats et des différentes méthodes de caractérisation sont détaillés. La méthode de préparation de substrats partiellement hydrolysés est également expliquée. Enfin la dernière partie est consacrée à la description de l'expérimentation réalisée pour mesurer les cinétiques initiales et longues durées de l'hydrolyse enzymatique. Les méthodes de calculs des vitesses de réaction et de rendement sont également précisées.

Le Chapitre 3 décrit l'étude cinétique réalisée sur les enzymes pures, isolées et en mélange. Le but de ce chapitre est de présenter l'influence des conditions opératoires de l'hydrolyse enzymatique sur la cinétique initiale des enzymes et d'identifier les mécanismes réactionnels mis en jeu concernant l'adsorption des enzymes sur le substrat, l'inhibition des enzymes par les produits de réaction ou encore les phénomènes de synergie entre les enzymes. Enfin, la dernière partie de ce chapitre est consacrée à la validation de notre stratégie d'étude, réalisée en comparant les performances d'un cocktail reconstitué contenant quatre enzymes majoritaires dans les proportions du cocktail de *Trichoderma reesei* à celles du cocktail réel.

Le Chapitre 4 est consacré à l'étude de l'évolution de la structure et de la morphologie du substrat au cours de la réaction d'hydrolyse. Des substrats partiellement hydrolysés ont été préparés et caractérisés et leur réactivité évaluée par des tests de cinétique initiale et de cinétique longue durée. Dans un premier temps, les résultats de caractérisation des substrats partiellement hydrolysés sont présentés en distinguant les différents niveaux d'organisation de la cellulose: le niveau moléculaire, nanométrique et micrométrique. La seconde partie de ce chapitre est dédiée à l'étude de l'évolution de la réactivité du substrat, réalisée afin de comprendre la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse au cours de la conversion et d'établir un lien réactivité-structure du substrat.

La modélisation cinétique fait l'objet du dernier chapitre. Le modèle développé prend en compte les propriétés cinétiques intrinsèques de chaque enzyme, les phénomènes de synergie et une description du substrat. Les mécanismes retenus ainsi que les équations cinétiques associées sont détaillées puis les résultats obtenus après optimisation du système sont présentés. Enfin, les différentes perspectives envisagées pour l'amélioration du modèle sont discutées.

CONTEXTE

1. Les enjeux des biocarburants

1.1. Le contexte énergétique actuel

D'ici 2030, la demande mondiale en énergie primaire devrait augmenter de 60 à 75%, principalement à cause de la croissance démographique mondiale et de l'augmentation de la consommation des pays en voie de développement. Parmi les sources primaires d'énergie, le pétrole, utilisé majoritairement dans les transports, restera l'énergie dominante et représentera 35 à 40% de la consommation énergétique mondiale [1].

Cependant, l'utilisation des combustibles fossiles entraîne une émission importante de gaz à effet de serre (GES). Selon un rapport de l'Académie des sciences [2], la quantité de dioxyde de carbone (CO₂) présente dans l'atmosphère est passée de 280 ppm en 1870 à 388 ppm en 2009 et le taux de croissance mesuré depuis 1970 est 50 fois plus élevé que celui observé en moyenne sur les 5000 dernières années. Il précise que la moitié de ces émissions est due à la combustion des combustibles fossiles et qu'elles sont responsables d'un réchauffement global de la température de la terre ainsi que de dérèglements climatiques majeurs. Il y a eu à la fin du 20^{ème} siècle une prise de conscience de cette problématique et les pays industrialisés travaillent aujourd'hui pour réduire leurs émissions de CO₂. Bien qu'il n'y ait pas eu de suite à la hauteur des enjeux environnementaux actuels, la mise en place du protocole de Kyoto (1998) a démontré la volonté [2] de ces pays à trouver des solutions énergétiques nouvelles.

Dans ce contexte, le développement de carburants alternatifs pour les transports représente un enjeu et un effort de la recherche important, le but étant de diminuer la dépendance énergétique au pétrole tout en réduisant les émissions de gaz à effet de serre. La commission européenne a montré l'exemple en fixant pour objectif le remplacement en 2020 de 20% des carburants traditionnels par des produits de substitution dont les biocarburants (2003/30/CE). Elle a également limité la fiscalité en autorisant une exonération totale ou partielle du droit d'accise sur les biocarburants (2003/96/CE).

1.2. La filière 'Biocarburant'

Les biocarburants sont fabriqués à partir de matière première végétale appelée biomasse. Cette ressource présente l'avantage de pouvoir être produite localement, de manière renouvelable et en utilisant pour sa croissance le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère. Elle permet donc d'améliorer le bilan des émissions de GES engendrées par la production et la consommation énergétique.

Il existe actuellement deux filières de production de biocarburants:

- le **biodiesel** constitué d'esters méthyliques d'huiles végétales fabriqués à partir d'huiles végétales (colza, tournesol, soja). Ce carburant est utilisé en mélange dans le gazole.
- l'**éthanol**, issu de la fermentation des sucres contenus dans les plantes sucrières (betteraves, canne à sucre, céréales,...) ou produit à partir de plantes entières par voie biochimique. Il peut être directement incorporé à l'essence ou être transformé en Ethyl *t*-Butyl Ether (ETBE) avant incorporation.

On distingue les carburants de première génération (1G), produits à partir des plantes sucrières (canne à sucre, betterave) et amylicées (maïs, blé...), des carburants de deuxième génération (2G) qui utilisent la plante entière. Les carburants de première génération sont déjà présents sur le marché avec plusieurs unités de productions en France, tandis que ceux de deuxième génération sont au stade de recherche en laboratoire ou au stade pilote.

1.3. L'éthanol, le premier 'biocarburant' au monde

L'éthanol est aujourd'hui le biocarburant le plus produit dans le monde. Il est principalement fabriqué au Brésil à partir de cannes à sucre et aux États-Unis à partir de maïs. Le Tableau 0-1 présente la production de bioéthanol dans le monde en 2008 ainsi que les ressources utilisées.

Tableau 0-1: Estimation de la production de bioéthanol dans le monde en 2008 [3]

Pays	Production (milliards de litres)	Culture
Brésil ¹	24	Canne à sucre
Etats Unis ¹	25	Maïs
Chine ²	4,3	Maïs, manioc, canne à sucre et déchets de pâte à papier
Union européenne ¹	2,3	Bettrave, blé
Inde ²	2,0	Canne à sucre

Sources: ¹: UNICA – www.unica.com.br

²: World's ethanol production forecast – www.marketresearchanalyst.com

Cependant, la production de bioéthanol de première génération reste limitée par la compétition des matières premières avec les usages alimentaires et la disponibilité des surfaces de culture. La filière de production d'éthanol de deuxième génération vise à utiliser comme matière première les éléments structurants et non plus uniquement les éléments de réserves de la plante. Les résidus agricoles et forestiers ou les cultures dédiées représentent en effet une des plus importantes sources de matière première renouvelable sur la planète. Ils peuvent donc être

utilisés et potentiellement mieux valorisés, même s'il reste à mettre au point un procédé compétitif.

2. La biomasse lignocellulosique

La lignocellulose est l'élément central de la biomasse végétale. Elle est constituée de trois composants principaux: la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Ces différentes molécules s'organisent en un enchevêtrement complexe pour former la paroi végétale.

La cellulose est le constituant principal de la biomasse lignocellulosique représentant selon les espèces entre 35 et 50 % de la paroi végétale. Il s'agit d'un homopolymère linéaire d'unité de D-glucose liées entre elles par des liaisons β -1,4 présentant une structure cristalline. C'est à partir de cette fraction de la biomasse qu'est issu le glucose métabolisé au cours de la fermentation éthanolique.

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides complexes, linéaires ou ramifiés de faible Degré de Polymérisation (DP) (entre 150 et 200). Ils sont constitués de pentoses (sucres en C₅ comme le xylose et l'arabinose), d'hexoses (sucres en C₆ comme le glucose, le galactose ou le mannose) et d'acides uroniques (sucres possédant une fonction acide à la place de la fonction alcool primaire). Les hémicelluloses sont très hydrophiles et se dégradent assez facilement par des traitements acides ou alcalins.

La lignine est le constituant essentiel de l'espace intercellulaire et son rôle est de consolider la structure pariétale pour lui conférer une certaine rigidité. C'est une macromolécule fortement réticulée résultante de la condensation de trois alcools aromatiques: l'alcool p-coumarique, l'alcool coniférique et l'alcool sinapylique.

Même si la cellulose reste le constituant majoritaire, la structure et la composition des matériaux lignocellulosiques dépendent des conditions de cultures et de l'espèce végétale considérée.

3. Procédés de production d'éthanol deuxième génération

3.1. Le procédé SHF

Contrairement aux procédés de production d'éthanol première génération, les sucres fermentescibles ne sont pas directement accessibles. Un des procédés permettant d'extraire et fermenter les sucres est le procédé SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) qui comprend quatre étapes. Une première étape de prétraitement est tout d'abord nécessaire pour rendre la cellulose et les hémicelluloses accessibles aux enzymes. La cellulose est ensuite convertie en glucose grâce à l'action combinée d'enzymes cellulolytiques sécrétées, dans le cas du procédé d'éthanol 2G, par une souche fongique nommée *Trichoderma reesei*. Les sucres produits lors de

l'hydrolyse sont ensuite fermentés en éthanol en milieu aqueux et l'éthanol est finalement récupéré après distillation.

Le schéma de base du procédé de production est récapitulé dans la Figure 0-1.

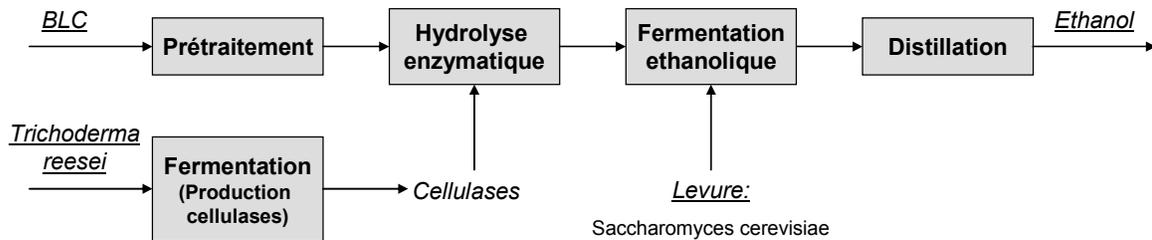


Figure 0-1: Schéma du procédé de production d'éthanol 2G (Version SHF)

3.2. Une alternative: le procédé SSF

En alternative au procédé SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation), le procédé SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) consiste à effectuer l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique en une seule étape [4]. Les principaux avantages sont une diminution des investissements (moins de réacteurs) et une diminution des phénomènes d'inhibition liés à l'accumulation des sucres produits car ils sont directement consommés par les micro-organismes fermentaires. Cependant, l'inconvénient majeur est la diminution de la température de réaction à cause de la présence du microorganisme. Celui-ci impose en effet une température comprise entre 30 et 35°C alors que l'optimum de température est de 50°C pour l'étape d'hydrolyse enzymatique ce qui diminue des performances catalytiques des enzymes.

3.3. Un des verrous majeurs du procédé: l'hydrolyse enzymatique

Quelle que soit l'option procédé choisie, un des verrous majeurs pour l'industrialisation est l'étape d'hydrolyse enzymatique. En effet, le coût élevé est lié à la fois au procédé de production des enzymes et à la quantité excessive d'enzymes nécessaire pour convertir la biomasse [5].

Plusieurs voies d'améliorations sont donc explorées pour améliorer les conditions de production des enzymes et optimiser le cocktail enzymatique produit par la souche industrielle de *T. reesei* [6]. L'optimisation de l'hydrolyse enzymatique nécessite également d'améliorer sa mise en œuvre grâce à une meilleure compréhension des mécanismes régissant la cellulolyse. Ainsi, le développement d'un modèle cinétique prédictif permettant de rendre compte de l'influence des conditions opératoires, de la composition du cocktail et de la nature du substrat lignocellulosique, permettra d'identifier les paramètres clés de l'hydrolyse en vue de son optimisation. Le chapitre suivant montrera, par une analyse bibliographique la complexité des mécanismes mis en jeu dans l'hydrolyse enzymatique.

Chapitre 1: Étude bibliographique

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est le résultat de l'action dans notre cas d'un cocktail d'enzymes d'origine fongique. Le rendement dépend d'une part de l'activité cellulolytique du cocktail et d'autre part du substrat cellulosique, dont la capacité à être hydrolysé est fonction de ses propriétés morphologiques et structurales. Le développement d'un modèle cinétique prédictif nécessite donc une bonne compréhension du mécanisme d'action des différentes enzymes et de la réactivité du substrat. Après une brève description de la réaction d'hydrolyse enzymatique, cette étude bibliographique sera dans un premier temps centrée sur les enzymes, leur mode d'action et leurs caractéristiques biochimiques. Puis, la deuxième partie traitera de la caractérisation de la structure et de la réactivité du substrat. La troisième partie sera consacrée à la description de l'évolution du substrat en cours d'hydrolyse et des phénomènes à l'origine de la forte diminution de la vitesse de réaction observée. Enfin, les différents types de modèles cinétiques déjà décrits dans la littérature seront présentés.

1. Les enzymes cellulolytiques

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose, appelées cellulases ou glycoside hydrolases, sont majoritairement sécrétées par les champignons. Cependant, aucune enzyme seule n'est capable de dégrader entièrement la cellulose et une hydrolyse complète nécessite l'action synergique de trois types de cellulases [7]:

- les *endoglucanases (EGs)* (EC 3.2.1.4) qui coupent aléatoirement les chaînes de cellulose majoritairement au niveau des zones amorphes générant de nouvelles extrémités de chaînes,
- les *cellobiohydrolases (CBHs)* ou exoglucanases (EC 3.2.1.91) qui agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du cellobiose,
- les *β -glucosidases (BGLs)* (EC 3.2.1.21) qui hydrolysent le cellobiose et dans une moindre mesure les cellodextrines solubles, en glucose.

Les endoglucanases et les cellobiohydrolases agissent directement sur le substrat solide après adsorption sur celui-ci tandis que les β -glucosidases agissent en milieu homogène sur substrat soluble. La Figure 1-1 représente schématiquement l'action des enzymes sur la cellulose.

Parmi les microorganismes cellulolytiques, la souche *Trichoderma reesei*, découverte par Mandel et Reese [8,9], est reconnue pour sa capacité à produire une quantité importante d'enzymes. Cette souche est donc capable de produire des sécrétomes très performants pour hydrolyser la cellulose. De par ses caractéristiques, ce champignon est étudié depuis longtemps et il est aujourd'hui majoritairement utilisé pour la production d'enzymes à l'échelle industrielle grâce à la réalisation de souches génétiquement modifiées (*T. reesei* CL847, Rut C30 etc.). Cependant, l'efficacité de ce cocktail est limitée par le manque d'activité β -glucosidase, cette

enzyme ne représentant qu'un très faible pourcentage du cocktail enzymatique [7,10]. Cette limitation peut être levée en utilisant i) une souche génétiquement modifiée de *T. reesei* surexprimant la β -glucosidase [11] ou ii) en supplémentant le cocktail enzymatique avec de la β -glucosidase sécrétée par un autre microorganisme. Dans le second cas, un des lots industriels de β -glucosidase les plus utilisés est produit par une souche d'*Aspergillus niger* (SP188 ; Novozymes).

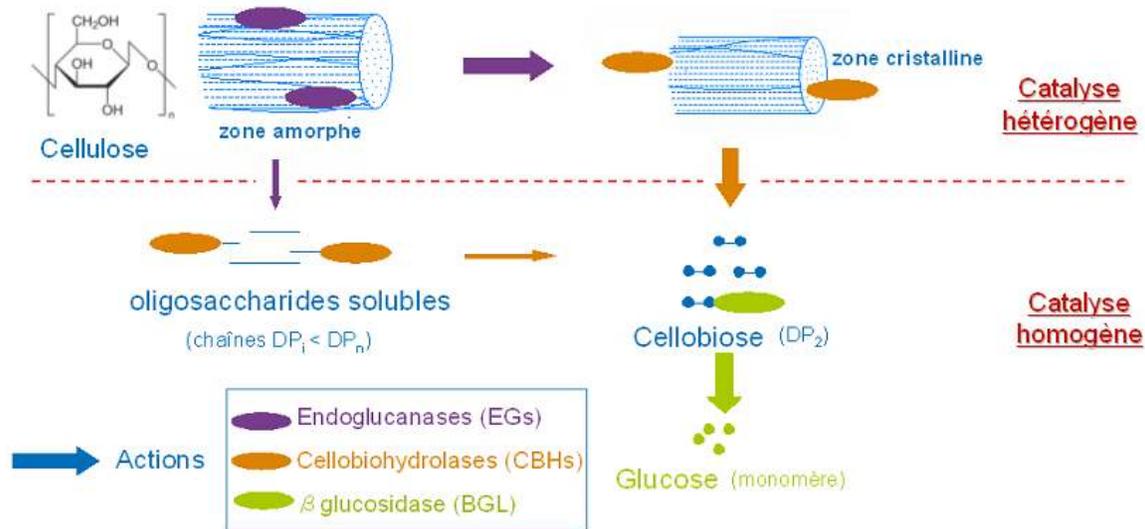


Figure 1-1: Schéma explicatif de l'action des enzymes cellulolytiques

Des données cinétiques relatives aux enzymes seules et en mélange sont donc nécessaires au développement d'un modèle cinétique prédictif de l'hydrolyse enzymatique. Cette première partie présente les différents éléments de la littérature concernant le mode d'action et l'activité d'hydrolyse de chaque type d'enzymes ainsi que des données relatives aux phénomènes de synergie.

1.1. Les cellobiohydrolases (CBHs)

1.1.1. Mode d'action des enzymes CBHs

Les cellobiohydrolases (CBHs) agissent de façon processive à partir des extrémités non réductrices ou réductrices des chaînes de cellulose, libérant des molécules de cellobiose. La souche de *Trichoderma reesei* sécrète deux types de cellobiohydrolases [12]:

- CBHI qui agit sur les bouts de chaînes réducteurs.
- CBHII qui agit sur les bouts de chaînes non réducteurs.

Une propriété importante des enzymes cellulolytiques est leur organisation en domaines (ou modules) ayant des fonctions distinctes. CBHI et CBHII possèdent ainsi deux domaines

fonctionnels: un site catalytique (CD) qui permet la réaction d'hydrolyse et un autre qui permet la liaison au substrat appelé 'Cellulose Binding Domain' (CBD) [12]. Ces deux modules sont reliés par une chaîne peptidique [13] et sont de tailles nettement différentes: 50 kDA pour le CD et 3 kDA pour le CBD [14].

Le rôle du CBD n'est pas totalement compris mais il aurait comme première fonction de permettre l'adsorption des enzymes à la surface de la cellulose et par conséquent d'augmenter la concentration en enzymes liées sur la cellulose. Il permettrait également de libérer l'accès aux chaînes de glucose de la cellulose en disloquant les liaisons hydrogènes entre les chaînes de polymères à la surface des structures de cellulose [13]. Les cellobiohydrolases ayant une action processive, le CBD devrait avoir une vitesse de progression le long de la fibre de cellulose durant l'hydrolyse. Cependant, il semble que cette vitesse ne soit pas un élément limitant dans la progression du domaine catalytique [13,15].

Les structures des domaines catalytiques des cellobiohydrolases ont été résolues et se présentent sous la forme de tunnel [12,16]. Cette organisation modulaire, avec la présence d'un linker peptidique reliant le CD et le CBD, confère aux enzymes la possibilité d'agir de manière processive. Cependant, la structure du domaine catalytique est différente pour CBHI et CBHII et ceci explique leur stéréospécificité. Le site actif de CBH I est entouré de 4 boucles et mesure 50 Å [17] tandis que celui de CBH II ne mesure que 20 Å et comprend uniquement deux boucles [18]. Le site catalytique des deux cellobiohydrolases ne permet d'accueillir qu'une seule chaîne de glucose et les molécules de cellobiose sont le produit de la réaction catalytique.

La Figure 1-2 détaillé par Beckham et al [19] présente le mode d'action envisagé pour l'hydrolyse de la cellulose par CBHI. Elle se ferait en plusieurs étapes: (a) adsorption de l'enzyme à la surface de la cellulose via le CBD, (b) glissement à la surface de la cellulose afin de reconnaître un bout de chaîne réducteur libre, (c) introduction de la chaîne de cellulose dans le tunnel, (d) formation de complexe actif entre la liaison glycosidique et le domaine catalytique, (e) hydrolyse de la liaison glycosidique et formation du cellobiose, (f) expulsion du cellobiose formé et reformation du complexe actif.

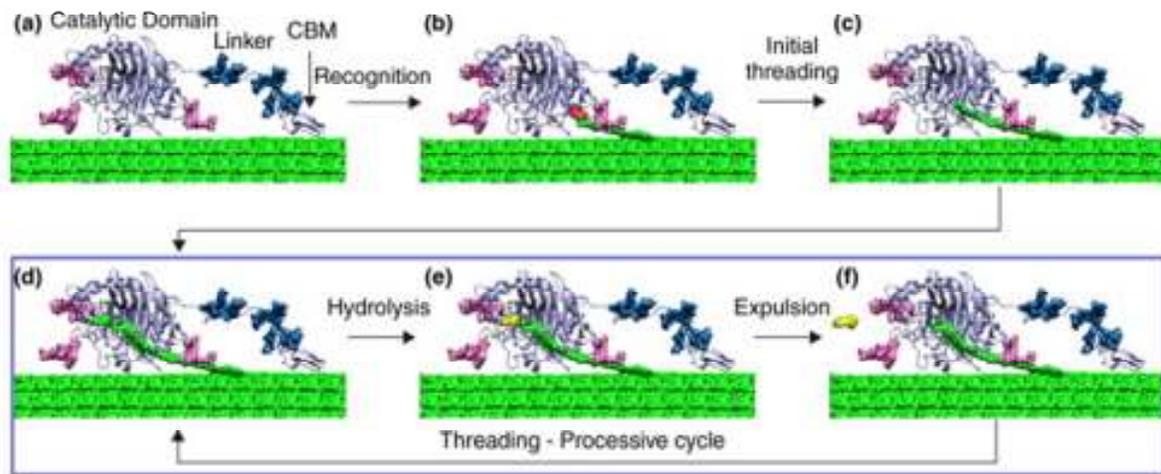


Figure 1-2: Mode d'action de CBHI sur la cellulose, d'après Beckham et al [19]

Il est démontré que les cellobiohydrolases agissent de façon processive libérant majoritairement du cellobiose. Cependant, des traces de glucose et de cellotriose ont été détectées lors de l'hydrolyse de la cellulose par CBHI. Nidetzky et al [20] ont trouvé que l'hydrolyse produit 94% de cellobiose, 5% de glucose et 1% de cellotriose. L'attaque initiale de CBHI entraînerait la libération d'une des trois molécules avant d'être parfaitement processive et de libérer uniquement du cellobiose. Ces résultats sont confirmés par Medve et al [21] qui obtiennent après 48 h d'hydrolyse de l'Avicel par CBH I (*Trichoderma reesei*) des proportions équivalentes à celle trouvées par Nidetzky et al [22] : Cellobiose: 86-89 %, Glucose: 9-13%, Cellotriose: 1-6 %. Cependant, ils observent une plus forte proportion de cellotriose au bout de 2 minutes d'hydrolyse (32%). Ces résultats peuvent être expliqués par le "défaut" lors de "l'attaque initiale", la diminution du pourcentage de cellotriose s'expliquant par son hydrolyse progressive en glucose et cellobiose. De plus, les auteurs évoquent la possibilité d'imperfection dans la processivité de l'action de l'enzyme tout au long de la réaction et pas seulement à l'état initial. Enfin, les cellobiohydrolases sont connues comme étant capables d'hydrolyser un substrat solide, mais elles ont également une activité catalytique sur les oligomères solubles [20,23].

1.1.2. Importance de l'adsorption des enzymes CBHs

L'adsorption des cellobiohydrolases sur la cellulose via le CBD de l'enzyme [24] semble être une étape essentielle pour la réaction d'hydrolyse.

En remplaçant le CBD de l'enzyme CBHI par le CBD de l'enzyme EGI pour les enzymes de *T. reesei*, Srisodsuk et al [25] ont montré que l'adsorption de l'enzyme recombinante correspondait à l'adsorption de l'enzyme EGI, prouvant que l'adsorption était régie par la CBD. Stahlberg et al [24] ont quant à eux clivé le domaine catalytique (CD) du CBD grâce à une

protéolyse partielle de l'enzyme CBHI. Les deux domaines ont ensuite été séparés par chromatographie et les isothermes d'adsorption de l'enzyme intacte et des deux domaines ont pu être comparés. Ils ont montré que le CBD seul s'adsorbe en plus grande quantité et plus rapidement que le CD seul, qui s'adsorbe lui en très faible quantité. De plus, la surface maximale de recouvrement de l'enzyme intacte et du CBD est identique sur Avicel ($19 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) tandis qu'elle est très nettement inférieure pour le CD ($2.5 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$), démontrant que l'adsorption est bien régie par le CBD. Ils ont également montré que le phénomène de désorption n'est pas observable pour l'enzyme intacte (contrairement au CD et au CBD), ce qui prouve que l'enzyme est bien liée au substrat par ces deux domaines. Enfin, Boussaid et Saddler [26] ont étudié l'adsorption d'un cocktail enzymatique commercial de *Trichoderma reesei* (Celluclast) supplémenté par de la β -glucosidase d'*Aspergillus niger*. Ils ont remarqué un relargage des enzymes en solution au cours de l'hydrolyse d'Avicel[®] montrant la réversibilité de l'adsorption. Ce résultat est en accord avec le mécanisme processif de l'enzyme, celle-ci devant se désorber ou s'adsorber plus loin sur la chaîne de cellulose [27].

1.1.3. Activité des cellobiohydrolases sur substrat soluble

L'activité des cellobiohydrolases a également été mesurée sur substrat soluble. Srisodsuk et al [25] ont étudié l'activité de l'enzyme CBHI de *Trichoderma reesei*, naturelle et modifiée par remplacement du CBD par le CBD d'EGI, sur substrats solubles et insolubles. Ils ont montré que l'activité enzymatique était améliorée avec le CBD d'EGI sur substrats insolubles (plus d'adsorption avec le CBD d'EGI pour CBHI) mais que l'activité était inchangée sur substrats solubles. Ils ont pu en déduire qu'il n'y avait pas de phénomène d' "adsorption" sur un substrat soluble.

Nidetzky et al [20] ont étudié l'hydrolyse des oligosaccharides ayant un degré de polymérisation compris entre 2 et 8 par les enzymes CBHI et CBHII produites par la souche *Trichoderma reesei* MCG 77. Aucune activité d'hydrolyse n'a pu être détectée avec le cellobiose comme substrat, tandis que l'activité enzymatique sur cellotriase est très faible (moins de 5% de conversion). L'équation de Michaelis-Menten a pu être utilisée pour modéliser l'action des enzymes CBHI. Une vitesse initiale maximale (déterminée sur 1h de réaction) a été observée pour un degré de polymérisation (DP) de 6, tandis que la constante de Michaelis-Menten diminue jusqu'au DP6 puis reste constante pour des DP compris entre 6 et 8. L'augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le substrat jusqu'à un DP de 6 montre que six unités de glucose peuvent être liées au site actif de CBHI. Un modèle de cinétique de premier ordre a également été utilisé pour décrire l'activité d'hydrolyse des oligosaccharides par CBHII. La comparaison des constantes cinétiques montre que CBHII a une meilleure activité d'hydrolyse que CBHI.

Tuohy et al [23] ont étudié l'action des cellobiohydrolases sécrétées par *Talaromyces emersonii* sur des substrats solubles. Les substrats utilisés pour caractériser CBHI sont des

substrats chromophores caractéristiques d'un degré de polymérisation 3: le pNPG2 (4-nitrophenyl- β -cellobioside) et le CpNPG2 (2-chloro-4-nitrophenyl- β -cellobioside). L'équation de Michaelis-Menten a pu être utilisée pour modéliser cette réaction (en milieu homogène) et les constantes de Michaelis-Menten ont pu être déterminées (K_m (pNPG2) = 2,1 mM, K_m (CpNPG2) = 6,7 mM). Cependant, ces constantes ne sont pas valables sur substrat naturel. Harjunpaa et al [28] ont quant à eux étudié l'hydrolyse des oligosaccharides solubles par les cellobiohydrolases II de *Trichoderma reesei*. A la différence des CBHI, les CBHII sont connues pour attaquer par les bouts de chaînes non réducteurs. Le suivi de l'hydrolyse par des méthodes de RMN du proton a permis d'identifier le mode d'action de ces cellulases. Cependant, la structure du domaine catalytique de ces deux enzymes est connue pour être différente (nombre de boucles), et par conséquent le mode d'action de CBHII ne peut donc pas être généralisé à CBHI.

1.1.4. Inhibition des cellobiohydrolases par leur produit de réaction

Comme toutes réactions enzymatiques, les principaux inhibiteurs de la réaction sont ses propres produits. Il est démontré depuis longtemps que la réaction est inhibée par le cellobiose. Certains auteurs [29-31] affirment que la réaction est également inhibée par le glucose tandis que d'autres [20] ont montré que le glucose n'avait pas d'effet inhibiteur sur l'hydrolyse des oligosaccharides (cellotriose). Cependant, il est reconnu que l'inhibition par le glucose est moins importante que celle par le cellobiose (14 fois moins importante selon Holtzapple et al [30]).

D'autre part, le choix du modèle pour décrire l'inhibition de CBH par le cellobiose reste très discuté entre l'inhibition compétitive [23,32,33] et l'inhibition non compétitive [29,30].

L'inhibition de CBHI par le glucose et le cellobiose a également été étudiée sur substrat soluble. Nidetzky et al [20] ont étudié l'influence du glucose et du cellobiose sur l'hydrolyse du cellotétraose. Aucun effet inhibiteur du glucose n'a pu être détecté. Un modèle d'inhibition compétitive par le cellobiose a été développé et les constantes de Michaelis-Menten déterminées (K_m (cellotétraose) = 7,1 μ M, K_p = 34 μ M).

1.2. Les endoglucanases (EGs)

Le cocktail enzymatique sécrété dans les conditions industrielles de production en fermenteur par *T. reesei* contient huit endoglucanases classés dans six familles de glycosides hydrolases (GH5, 7, 12, 45, 61 et 74) selon la classification Cazy (www.cazy.org). D'un point de vue quantitatif, elles ne représentent cependant que 20% du cocktail enzymatique [7]. Par ailleurs, les rôles exacts de certaines de ces enzymes ne sont pas totalement connus.

Les endoglucanases sont connues pour hydrolyser aléatoirement les liaisons osidiques, principalement dans les zones amorphes. Elles sont responsables de la diminution du degré de polymérisation et permettent de créer de nouveaux bouts de chaînes pour l'attaque par les cellobiohydrolases. Ces enzymes possèdent comme les cellobiohydrolases un CBD (Cellulose

Binding Domain) et un domaine catalytique (CD). Seule la présence d'un CBD chez EGIII (GH12) reste très controversée: Karlsson et al [34] supposent l'absence de CBD tandis que d'autres auteurs affirment son existence [35,36].

Le domaine catalytique des endoglucanases n'est pas en forme de tunnel, comme celui des cellobiohydrolases, mais plutôt en forme de "crevasse" ce qui lui permet d'attaquer les chaînes de cellulose en tout endroit et pas uniquement au niveau des extrémités. La Figure 1-3 présente une comparaison de la structure des cellobiohydrolases et des endoglucanases mettant en évidence leur différence de mode d'action principalement au niveau du domaine catalytique.

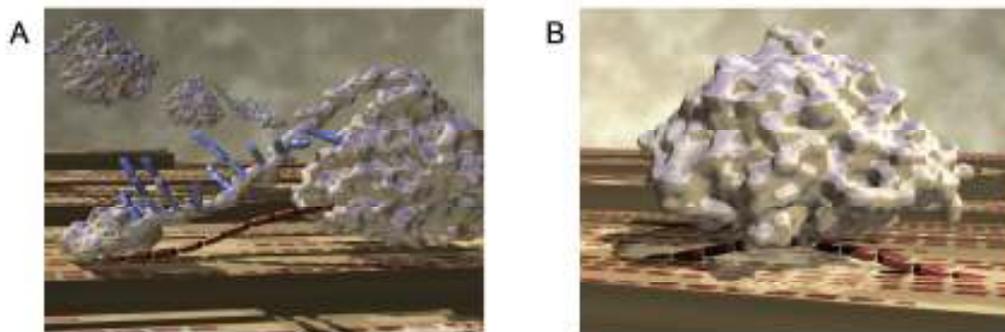


Figure 1-3: Représentation d'une cellobiohydrolase (A) et d'une endoglucanase (B).

Source : NREL et Pixel Kitchen

1.2.1. Mode d'action des enzymes EGs

L'action des endoglucanases sur substrat solide conduit à la libération d'oligomères solubles, avec majoritairement du cellobiose. Des traces de glucose et cellotriose pour EGI (GH7) [37], EGII (GH5) [21] et EGIII [34], et de cellotétraose pour EGV (GH45) [34] ont cependant été observées.

Les endoglucanases entraînent également une diminution du degré de polymérisation de la cellulose en attaquant aléatoirement les chaînes de cellulose. Il est connu que ces attaques ont lieu majoritairement dans les zones présentant des défauts de cristallinité. Karlsson et al [34] ont montré que la cellulose PASC (traitée à l'acide phosphorique pour être rendue plus amorphe) est plus hydrolysable que la cellulose Avicel, très cristalline.

1.2.2. Adsorption des enzymes EGs

Toutes les endoglucanases sont capables de s'adsorber sur la cellulose. En effet, même EGIII qui ne possède vraisemblablement pas de CBD s'adsorbe sur la cellulose bien que son affinité soit nettement inférieure à celle des autres enzymes [34]. Il a également été montré que l'adsorption des enzymes est supérieure sur cellulose PASC par rapport à la cellulose AVICEL.

L'adsorption des endoglucanases sur la cellulose est donc une étape réactionnelle importante et doit être prise en compte lors de l'élaboration d'un modèle cinétique.

1.2.3. **Activité des endoglucanases sur substrat soluble**

Les endoglucanases possèdent également une bonne activité d'hydrolyse sur les oligosaccharides solubles ayant un degré de polymérisation supérieur à 3 mais une très faible activité d'hydrolyse sur le cellobiose [37,38]. En effet, les oligosaccharides sont directement hydrolysés en cellobiose et glucose et ne sont donc pas présents dans les hydrolysats enzymatiques [21]

Cependant, il a également été montré qu'EGI avait une activité de transglycosylation en présence de forte concentration de cellotriose [37,38] tandis qu'EGIII et EGV étaient dépourvues de cette propriété catalytique [34].

1.2.4. **Inhibition des endoglucanases**

Très peu d'études concernant l'inhibition des enzymes par les produits sont disponibles dans la littérature même si, comme la majorité des enzymes, les endoglucanases sont inhibées par les produits de leurs actions. Macarron et al [35] ont trouvé que l'hydrolyse des substrats chromophores n'était pas altérée par la présence de 200 mM de glucose tandis que 50 mM de cellobiose entraîne une diminution de 10 à 50 % de la vitesse d'hydrolyse selon le substrat.

1.3. **Comparaison entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases**

Le Tableau 1-1 récapitule les différentes propriétés de deux cellobiohydrolases (CBHI et CBHII) et des endoglucanases présentes chez *T. reesei*. Il présente les différentes structures et propriétés des deux domaines caractéristiques des enzymes (CD et CBD), leur mode d'action mais également leur activité sur des substrats solubles ainsi que leurs différents inhibiteurs

Tableau 1-1: Comparaison des propriétés des CBHs et EGs de *T. reesei*

	CBHI	CBHII	EGs (I, II, III, IV, V)
Gène	<i>cel7A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel7B, 5A, 12A, 61A, 45A</i>
Structure	CBD + CD + liaison peptidique [12,13]. Pour EGIII: CBD présent [35,36] ou Absent [34]		
CBD	Taille: 3kDa [14] Adsorption de l'enzyme au substrat [24,25] Libère l'accès aux chaînes de cellulose et disloque les liaisons hydrogène entre les chaînes [13]		Adsorption des enzymes sur le substrat
CD	Taille: 50 kDa [14] Forme: tunnel [12,16] Réaction d'hydrolyse [24,39] Élément limitant la progression [15]	Forme: open cleft (Λ) Réaction d'hydrolyse	
Adsorption	Irréversible [24,26,39] ou Réversible [27]		Faible pour EGIII [34]
	40% réversible	100% réversible [22]	-
Mode d'action	Action processive à partir des bouts de chaînes		Action aléatoire surtout sur les régions non cristallines
	Réducteur	Non réducteur [12]	
Produit libéré	Cellobiose, Glucose et Cellotriose [21]		Cellobiose et trace glucose et cellotriose [37] Entraîne une chute du DP
Activité substrat soluble	Régit par le CD car pas d'adsorption Activité quasi nulle sur cellobiose [22]		Activité à partir de DP3 Transglycosylation (cellotriose) [37,38]
	Max d'activité DP6 Activité idem DP 6-7-8 [22]	Mise en évidence processivité [28]	
Inhibiteur	Cellobiose Glucose: + [29-31] et - [22] Cellobiose ≈ 14 Glucose [30] Éthanol [40]		Cellobiose Glucose (?)
Type d'inhibition	Compétitive [23,32,33] Non compétitive [29,30]		-

1.4. La β -glucosidase (BGL)

La β -glucosidase (GH3) est la dernière famille d'enzymes cellulolytiques présente dans le cocktail enzymatique de *T. reesei*. Elle hydrolyse le cellobiose et, dans une moindre mesure, les oligomères solubles du glucose. Cette enzyme joue un rôle clé car elle permet de réduire l'inhibition des cellobiohydrolases et des endoglucanases par le cellobiose. Elle a donc le rôle majeur de régulateur de la vitesse d'hydrolyse.

Cependant, cette enzyme est toujours présente en très faible quantité dans le sécrétome de *T. reesei* et une solution consiste à compléter le cocktail enzymatique par des sources industrielles de β -glucosidase. Comme décrit précédemment, le lot industriel le plus utilisé aujourd'hui est celui produit par une souche industrielle d'*A. niger* [41]. Les enzymes sécrétées par ces deux organismes ont donc été étudiées dans la littérature sur substrats naturels et chromophores.

Comme la majorité des enzymes, la β -glucosidase est inhibée par le produit de la réaction, le glucose. La β -glucosidase d'*A. niger* semble moins sensible à l'inhibition par le glucose que celle de *T. reesei* [7] mais cette conclusion est basée sur des études faites dans des conditions expérimentales différentes.

L'inhibition par le substrat a été observée à plusieurs reprises pour des concentrations en substrat élevées. Ce mécanisme d'inhibition est basé sur la formation d'un complexe inactif Substrat/Enzyme/Substrat. Calsavara et al [42] et Bravo et al [43] l'observent nettement pour une concentration en cellobiose supérieure à 10mM. De même, Grous et al [44] ont étudié l'inhibition par le substrat et ont utilisé deux modèles, l'un pour des faibles concentrations en substrat et l'autre pour les fortes concentrations en substrat, tout en considérant une inhibition compétitive par le glucose.

1.5. La synergie entre les enzymes

La synergie entre les enzymes est un phénomène essentiel lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Elle se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées. On exprime souvent le degré de synergie (DS) comme le ratio de l'activité du mélange d'enzymes sur la somme des activités des enzymes utilisées séparément.

Deux types de synergies ont été mis en évidence dans la littérature: (i) la synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases appelée synergie Exo-Endo, (ii) la synergie entre les deux cellobiohydrolases CBHI et CBHII appelée synergie Exo-Exo.

La synergie Exo-Endo s'explique facilement car l'attaque aléatoire par les endoglucanases conduit à la libération de nouveaux bouts de chaînes de cellulose qui deviennent alors disponibles pour l'attaque par les cellobiohydrolases [21,45].

La synergie Exo-Exo a également été observée mais aucun mécanisme n'a été clairement établi pour expliquer ce phénomène et plusieurs théories sont proposées. Tomme et al [46] ainsi que Kim et al [47] l'expliquent par la formation en solution d'un 'loose complex' (complexe lâche) CBHI/CBHII qui aurait pour les premiers une activité catalytique importante et permettrait pour les seconds d'augmenter l'affinité d'adsorption des enzymes. Enfin, d'autres auteurs évoquent la possibilité d'une activité de type "Endo" pour CBHI [48] ou pour CBHII [49]

Plusieurs paramètres semblent influencer la synergie à savoir :

- la concentration totale en enzymes : plus la saturation du substrat par les enzymes est importante, plus le degré de synergie est faible [45,50,51].
- l'influence du ratio de chaque enzyme : ceci est plus discuté, certains auteurs [45,52] ayant montré que le ratio influence la synergie tandis que Woodward et al [50] ont montré que le degré de synergie était indépendant de ce ratio.
- les propriétés morphologiques du substrat : l'augmentation de la cristallinité du substrat entraînant l'augmentation de la synergie [53]

1.6. Paramètres influençant l'activité des enzymes

La température et le pH sont les deux paramètres principaux influençant l'activité enzymatique.

Les enzymes se dénaturent lorsqu'elles sont chauffées au-delà des températures physiologiques, entraînant une perte de leur activité catalytique. Celles de *T. reesei* semblent être stables jusqu'à 50°C, excepté la β -glucosidase qui est stable jusqu'à 60°C. L'énergie d'activation mesurée pour cette enzyme a été estimée à 52 kJ.mol⁻¹ [41] et 46 kJ.mol⁻¹ [42]. Peu d'études ont été réalisées sur la détermination de l'énergie d'activation de chaque type d'enzymes. Seul Drissen et al [54] ont déterminé que l'énergie d'activation globale du cocktail enzymatique commercial Cellubrix (Novozymes) était de 29.8 kJ.mol⁻¹.

L'hydrolyse enzymatique procède selon un mécanisme acide / base. Son activité est donc dépendante du pH du milieu et le pH pour lequel l'activité des cellulases de *T. reesei* est optimale est compris entre 4 et 5. Grâce à leur méthode basée sur la fluorescence, Boer et Koivula [55] ont montré que l'optimum de stabilité thermique de l'enzyme CBHI de *Trichoderma reesei* est obtenu pour un pH compris entre 3,5 et 5,6. Cette fourchette correspondrait au pH optimum de l'activité enzymatique qui a été défini entre 4 et 5. En mesurant l'activité enzymatique (Avicel, 1h, 50°C) pour des pH compris entre 2,5 et 9,0, Tuohy et al [23] ont montré que le pH optimum de l'activité des deux formes de CBHI isolées de *Talaromyces emersonii* (CBHIA et CBHIB), était respectivement de 3,6 et 4,1.

Conclusion sur les enzymes

La dégradation de la cellulose par voie biochimique requiert l'utilisation d'un cocktail enzymatique complexe contenant trois types d'activité enzymatique différentes. Les mécanismes d'action des différentes enzymes sont assez bien identifiés et l'étude des synergies a montré l'importance de discriminer les trois types d'activité enzymatique pour le développement du modèle cinétique. L'inhibition par les produits de réaction (glucose et cellobiose) reste un phénomène majoritaire qu'il est important de considérer pour développer un modèle prédictif. D'autres paramètres comme la température et le pH semblent moins déterminants. La température optimale des enzymes semble être autour de 50°C mais une étude dans une zone d'intérêt comprise entre 35 et 50°C a été envisagée afin de déterminer les énergies d'activation des différentes enzymes. Les activités enzymatiques pourront quant à elles être déterminées uniquement au pH optimal, soit 4,8. Enfin, les mécanismes de synergies étant mal compris, ils feront l'objet d'une étude expérimentale particulière.

2. Le substrat cellulosique

Le but de cette thèse est de modéliser l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Par conséquent, il est fondamental de bien comprendre la structure de ce substrat. Cette partie a pour but de décrire la structure de la cellulose, d'identifier les méthodes analytiques permettant sa caractérisation et de déterminer les paramètres morphologiques permettant sa description.

2.1. La cellulose à différentes échelles

La cellulose est un homopolymère de glucose de configuration D, connecté par une liaison glycosidique β -(1-4). La Figure 1-4 présente la structure chimique de la cellulose à l'échelle moléculaire. L'unité de base de ce polymère est le cellobiose (dimère de glucose) et le degré de polymérisation (DP) peut varier de 100 à 14000. Les deux extrémités de la chaîne de cellulose ne sont pas chimiquement équivalents, l'un des bouts de chaîne étant réducteur tandis que l'autre ne l'est pas.

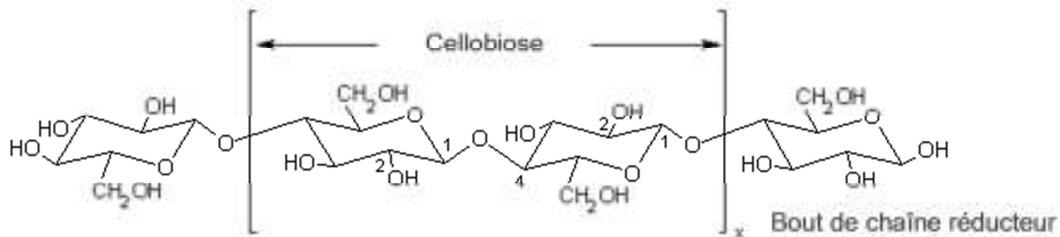


Figure 1-4: Structure chimique de la cellulose [56]

Ces chaînes de celluloses sont liées entre elles par des forces de van der Waals et par des liaisons hydrogènes et forment des fibres élémentaires appelées microfibrilles. Ces microfibrilles contiennent environ 36 chaînes et peuvent mesurer selon leur origine entre 20 et 200 Å de diamètre et jusqu'à quelques microns de longueur [57]. Les chaînes de cellulose sont polaires et sont orientées de manière parallèle au sein des domaines cristallins et amorphes.

Ces fibres élémentaires ou microfibrilles sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes intermoléculaires et forment des fibres ou particules.

La cellulose est souvent décrite comme composée d'une phase cristalline très ordonnée et d'une phase amorphe moins ordonnée. Larsson et al [58] ont étudié l'organisation moléculaire de la cellulose et ont montré que les zones amorphes correspondent aux chaînes localisées à la surface des microfibrilles tandis que les zones cristallines sont associées aux chaînes de cœurs. Des défauts cristallins existent également à la jonction des microfibrilles, et peuvent aussi être interprétés comme des zones "amorphes".

Les différences de structure chimique des deux bouts de chaîne confèrent à la cellulose une polarité et des différences de structures cristallines qui ont pu être identifiées par des

méthodes de diffraction des rayons X. Le réseau cristallin de la cellulose native est appelé cellulose I et consiste en une organisation parallèle des chaînes entre elles. L'analyse détaillée des spectres de RMN du solide a permis de montrer que la cellulose native était composée de deux phases cristallines distinctes appelées I α et I β [59], dont les proportions peuvent varier selon l'origine de la cellulose. Pour ces deux allomorphes, les chaînes de cellulose sont orientées de manière parallèle et ils se différencient par des différences d'orientation des chaînes entre elles [59,60]. Cependant, il existe d'autres structures polymorphiques de la cellulose [61], la plus connue étant la cellulose II obtenue par recristallisation ou par mercerisation (traitement à la soude) [62,63]. La cellulose II, présente une organisation antiparallèle des chaînes entre elles et est connue pour être la forme thermodynamiquement la plus stable. En effet, il n'est pas possible de la reconverter en cellulose I. Deux autres allomorphes de cellulose, III et IV, peuvent être obtenus soit à partir de la cellulose native (I) ou régénérée (II) [64]. A la différence de la conversion entre cellulose I et II, les allomorphes III et IV peuvent revenir à leurs états cristallins initiaux (Figure 1-5).

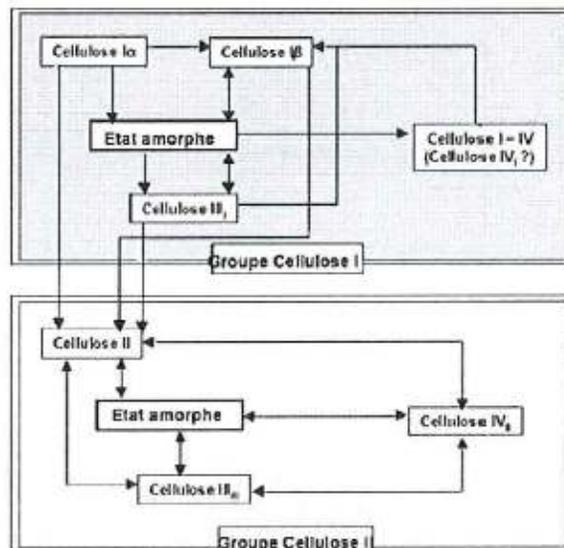


Figure 1-5: Les différents allomorphes de la cellulose et, les possibilités d'interconversion

La cellulose est donc un matériau complexe présentant différents niveaux d'organisation selon l'échelle observée. La Figure 1-6 présente de manière schématique les différents niveaux d'organisation de la cellulose. On retiendra trois niveaux de structure : l'échelle moléculaire qui correspond à la chaîne de cellulose, l'échelle nanométrique qui correspond à l'échelle des microfibrilles et l'échelle macroscopique qui correspond aux particules de cellulose.

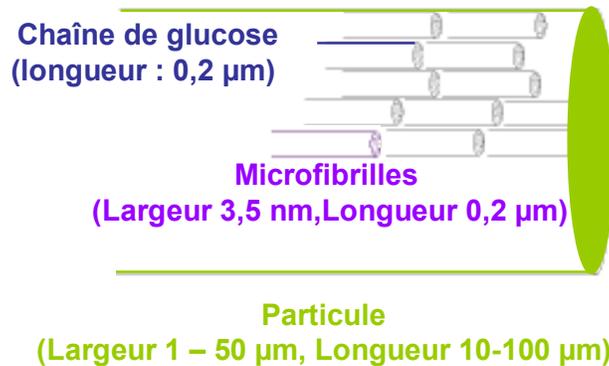


Figure 1-6 Représentation schématique des niveaux organisationnels de la cellulose

La cellulose peut être caractérisée par différents paramètres morphologiques et structuraux qui jouent un rôle dans la réactivité du substrat en l'hydrolyse. Les principaux paramètres sont la cristallinité [65,66], la surface spécifique accessible [66], le degré de gonflement [65,66], le degré de polymérisation et la taille des particules. Ces paramètres ainsi que leurs méthodes de détermination sont présentés dans la partie suivante.

2.2. Paramètres structuraux caractéristiques des substrats cellulosiques

2.2.1. Le degré de polymérisation

Il existe différentes méthodes de détermination du degré de polymérisation de la cellulose:

- la méthode chimique qui permet de calculer le degré de polymérisation à partir du nombre de chaînes de cellulose déterminé par dosage des groupements réducteurs présents en bouts de chaînes grâce à un dosage chimique et de la teneur en cellulose de l'échantillon mesurée par hydrolyse acide,

- la mesure de la viscosité intrinsèque de la cellulose après dissolution de celle-ci dans un solvant organométallique ou en la convertissant dans un dérivé soluble dans un solvant organique (nitrate ou tricarbanilate). La viscosité est ensuite directement corrélée au degré de polymérisation,

- la détermination de la distribution de taille des chaînes de celluloses par chromatographie d'exclusion stérique (GPC). A l'instar de la mesure de la viscosité intrinsèque, cette méthode nécessite la dissolution des chaînes de la cellulose dans un solvant approprié, tel des mélanges LiCl/DMAC ou leur dérivation en cellulose tricarbanilates par réaction avec du phénylisocyanate dans le THF.

La détermination du degré de polymérisation n'est pas facile et une étude approfondie des différentes méthodes disponibles est donc nécessaire afin de vérifier leur pertinence et leur

gamme de validité. Pala et al [67] ont comparé les trois méthodes de détermination du degré de polymérisation. La mesure de la viscosité semble être la méthode la moins sensible pour suivre l'évolution du degré de polymérisation. La méthode chimique semble être plus sensible mais peut être biaisée par des problèmes d'accessibilité des chaînes lors du dosage des groupements réducteurs. Enfin, la méthode par GPC permet d'avoir plus d'informations sur la distribution de taille des chaînes mais l'influence de l'étape de dérivation de la cellulose sur son degré de polymérisation est encore mal connue

2.2.2. La cristallinité

La cristallinité est le plus souvent déterminée par diffraction des rayons X de la cellulose solide sous forme de poudre. Le spectre de diffraction présente deux pics d'intensités différentes, l'un correspondant à la fraction cristalline et l'autre à la fraction amorphe. La Figure 1-7 présente un exemple de spectre de diffraction de la cellulose Avicel PH101 [68] ainsi que l'équation utilisée pour le calcul de l'indice de cristallinité.

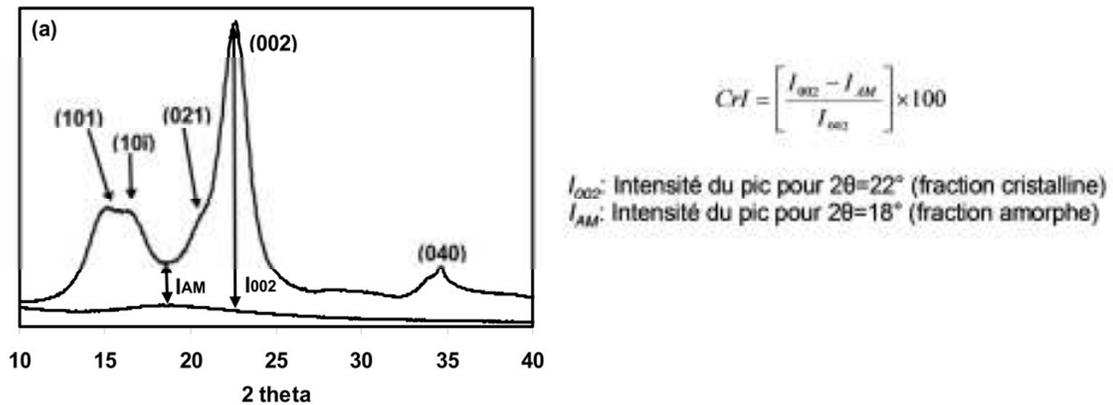


Figure 1-7: Exemple de spectre de diffraction et calcul de l'indice de cristallinité

L'indice de cristallinité peut également être déterminé par RMN du ^{13}C sur de la cellulose solide. Le degré de cristallinité est alors calculé comme le ratio entre l'aire sous la courbe pour des déplacements chimiques (δ) comprise entre 86,0 et 92,0 ppm et l'aire entre 80,0 et 92,0 ppm, la zone entre 86 et 92 ppm étant considérée comme la zone amorphe [69].

Park et al [70] ont comparé les deux méthodes d'analyse et de calcul de l'indice de cristallinité sur douze types de cellulose et ont montré que la valeur de l'indice de cristallinité dépendait de la méthode utilisée, les valeurs déterminées avec la diffraction des rayons X étant systématiquement supérieures à celles déterminées par RMN. Ils ont montré que pour environ 80 publications, l'indice de cristallinité de la cellulose Avicel PH101 était compris entre 50% et 90%.

2.2.3. La surface spécifique

La surface spécifique correspond à la surface disponible par unité de masse et prend en compte la porosité du solide. Elle est souvent mesurée par adsorption de N₂ sur la surface et par application du modèle BET. Cependant, cette méthode est peu exploitable pour identifier l'accessibilité des enzymes à la cellulose, la taille des enzymes étant très supérieure à celle du diazote. De plus cette mesure est réalisée sur cellulose sèche ce qui est peu représentatif de son état dans le milieu réactionnel. Une autre méthode de mesure de la surface spécifique utilise la technique de l'exclusion de soluté [66]. Cette technique semble plus réaliste car la mesure de la surface spécifique est directement faite sur substrat hydraté dans un solvant et les solutés utilisés peuvent avoir une taille plus proche de celle des enzymes mais permet uniquement une détermination semi-quantitative de la porosité.

Des mesures par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont également été réalisées par Penttilä et al [71] afin de caractériser la surface spécifique de la cellulose. En effet, les mesures de SAXS permettent de caractériser l'interface entre deux phases comme par exemple la cellulose et un solvant. Dans le cas d'une surface lisse, la loi de Porod peut être appliquée et il est possible de calculer la surface spécifique du système. Une méthode analogue de diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) a également été utilisée par Kent et al [72] avec pour même objectif la caractérisation de la surface de la cellulose. Ces méthodes de diffusions aux petits angles semblent plus appropriées à la caractérisation de la nanostructure de la cellulose.

2.2.4. Le degré de gonflement

La structure de la cellulose est profondément influencée par la présence d'eau. En effet, les chaînes de celluloses sont liées entre elles par des liaisons hydrogène et l'insertion de molécules d'eau peut changer l'arrangement cristallin de la cellulose. Cette propriété est importante car l'hydrolyse enzymatique est conduite en milieu aqueux. La méthode papetière permettant la mesure de la quantité d'eau retenue par la cellulose (VRE – Norme ISO 23714.2007) peut être utilisée pour évaluer cette propriété. Cette valeur correspond au rapport de la masse d'eau retenue après centrifugation sur la masse sèche de ce même échantillon séché à l'étuve.

2.2.5. La taille des particules

La taille des particules semble être un paramètre critique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose [71,73]. Des méthodes de microscopie électronique ont déjà été utilisées pour évaluer les différences de taille des particules et plusieurs auteurs ont observé une diminution de la taille

des particules au cours de l'hydrolyse [71,74]. Ces méthodes de microscopie électronique nécessitent que les particules soient bien dispersées et qu'il n'y ait pas de problèmes d'agrégation. Peu de données sont disponibles dans la littérature quant au nombre de clichés utilisés pour ses analyses. Park et al [75] utilise le Fiber Quality Analyser (FQA) qui permet de mesurer des particules de quelques dizaines de microns de diamètre et de quelques millimètres de longueur, mais là aussi, aucune donnée statistique n'est disponible concernant le nombre de particules analysées pour déterminer leurs tailles. De plus, cet appareil ne peut être utilisé pour mesurer la taille des particules de la cellulose Avicel car celle-ci sont trop petites. Enfin, Fan et al [66] ont également constaté une diminution de la taille en utilisant un appareillage analogue qui compte pour chaque échantillon entre 36000 et 72000 particules.

Même si la taille des particules est un facteur influençant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, il n'y a pas de méthodes identifiées pour déterminer de manière précise ce paramètre.

2.3. Influence des paramètres structuraux sur l'hydrolyse enzymatique

L'influence de différents paramètres morphologiques et structuraux sur l'hydrolyse enzymatique a déjà été étudiée dans la littérature. Le Tableau 1-2 présente une synthèse des résultats obtenus sur substrat cellulosique.

Tableau 1-2: Influence des paramètres morphologiques sur l'hydrolyse enzymatique

Paramètres	Enzymes	Substrat	Discussion	Ref
Cristallinité	<i>T. reesei</i> QM 9414	Avicel PH101 Avicel PH 105	Cristallinité ↑ → VH ↓	[66]
Aire spécifique		SolkaFloc	Aire spécifique ↑ → VH ↑	
Séchage + réhydratation	<i>T. reesei</i> CBHI (Spezyme CP)	Avicel PH102 Papier Filtre *	Séchage ↑ → VH ↓ (↓ accessibilité)	[65]
Cristallinité		Cellulose DMSO	Cristallinité ↑ → VH ↓ + ADS ↑	
Cristallinité	<i>T. reesei</i> (Celluclast) + β-glucosidase (Sigma G0395)	Avicel PH101 Avicel Acide Avicel Organosolv Avicel Ammoniac	Cristallinité ↑ → VH identique	[76]
Cristallinité	<i>T. reesei</i> + β-glucosidase	Avicel PH101 Avicel H ₃ PO ₄	Cristallinité ↑ → VH initiale ↓ + ADS identique	[77]
Degré de polymérisation	<i>T. reesei</i>	Hydrocellulose Avicel Cotton (DP 2200) Cotton (DP 3200)	DP ↑ → VH ↓	[78]

* Papier filtre: Whatman N°1; VH: Vitesse d'Hydrolyse; ADS: Adsorption; DP: Degré de Polymérisation

2.4. Évolution des paramètres morphologiques et structuraux au cours de l'hydrolyse

Les propriétés morphologiques du substrat influent sur sa réactivité lors de l'hydrolyse enzymatique. Afin de mieux cerner les mécanismes d'action des enzymes sur la cellulose, il est intéressant d'étudier l'évolution des propriétés morphologiques du substrat au cours de la réaction d'hydrolyse. Deux options se présentent: des analyses *in situ* ou des analyses de substrats partiellement hydrolysés. La deuxième option est généralement privilégiée car de nombreuses méthodes d'analyse nécessitent de travailler sur un substrat sec.

2.4.1. A l'échelle moléculaire

A l'échelle moléculaire, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les endoglucanases se traduit par une diminution du degré de polymérisation de la cellulose. Cependant, il n'existe pas de méthode fiable permettant la détermination du degré de polymérisation et les méthodes analytiques disponibles peuvent uniquement être utilisées à titre comparatif.

Plusieurs auteurs [74,79-81] ont montré en utilisant la méthode de dosage chimique des bouts de chaînes que le degré de polymérisation moyen de la cellulose diminuait lors de la conversion du substrat. Cependant, d'autres auteurs [82,83] ont montré que la réduction du degré de polymérisation était très faible pendant l'hydrolyse enzymatique. Ils ont également comparé ces résultats avec des mesures de diminution du degré de polymérisation lors d'une hydrolyse acide et ont prouvé qu'il était peu touché par l'hydrolyse enzymatique. Ces résultats indiquent que lors de l'hydrolyse enzymatique, la réaction de dépolymérisation de la cellulose a lieu à la surface des fibres, d'où le faible impact sur le degré de polymérisation moyen. De plus, contrairement à l'acide, les enzymes ne sont pas capables de pénétrer à l'intérieur des fibres et ne peuvent pas entraîner une diminution drastique de la taille moyenne des chaînes de cellulose.

2.4.2. A l'échelle nanométrique

A l'échelle nanométrique, la cellulose peut être caractérisée par son indice de cristallinité. Il a été montré que la cristallinité avait un fort impact sur la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique. La cellulose est souvent représentée par une structure composée de zone amorphe facilement hydrolysable et une zone cristalline plus réfractaire, l'attaque préférentielle de la zone amorphe devrait donc se traduire par une augmentation de l'indice de cristallinité. Cependant, les variations de l'indice de cristallinité au cours de l'hydrolyse enzymatique ne sont pas clairement établies. En effet, Chen et al [81] ont trouvé une augmentation de 2.6% de l'indice de cristallinité après 18% de conversion et Wang et al [73] ont montré une augmentation de 2% après 6 jours d'hydrolyse de fibres de coton soit 50% de conversion. De plus, d'autres auteurs ont montré que l'indice de cristallinité de la cellulose restait constant au cours de l'hydrolyse [71,77].

Étant donnée la précision de la détermination de l'indice de cristallinité [68], il ne semble pas que des variations notables de la cristallinité aient lieu au cours de la cellulolyse. L'hypothèse de l'attaque préférentielle de la phase amorphe par les enzymes est donc fortement remise en cause et il semblerait que les deux phases soient hydrolysées de manière similaire. De plus en considérant que les zones amorphes sont situées à la surface de microfibrilles [58], et que la réaction d'hydrolyse a lieu à la surface des fibres, la proportion de microfibrilles et par conséquent de zones amorphes doit rester constante ce qui se traduit bien par une conservation de l'indice de cristallinité.

D'autres techniques ont également été utilisées pour évaluer les changements de structures de la cellulose à l'échelle nanométrique. Les méthodes de diffusion des rayons X [71] et des neutrons [72] aux petits angles ont permis de caractériser la surface de la cellulose. Les changements d'intensité diffusée aux petites valeurs du vecteur d'onde (q) ont permis de mettre en évidence une augmentation de la surface spécifique pendant d'hydrolyse enzymatique probablement due à l'érosion des particules ou à la séparation des agglomérats de particules. De plus, l'absence de changement d'intensité diffusée pour des grandes valeurs de vecteur d'onde conforte l'idée que les enzymes agissent uniquement à la surface de la cellulose.

2.4.3. A l'échelle micrométrique

Grâce aux mesures de microscopie électronique, plusieurs auteurs [73,83] ont observé une forte diminution de la taille des particules de cellulose après plusieurs heures d'hydrolyse enzymatique. De même, Park et al [75] ont montré que la longueur des particules passait de 2.5mm à 0.33mm après 240 minutes d'hydrolyse à forte concentration en enzymes. La taille des particules semble donc être un paramètre qui évolue fortement au cours de l'hydrolyse enzymatique.

Conclusion sur le substrat cellulosique:

L'observation de l'évolution des paramètres structuraux du substrat au cours de l'hydrolyse permet d'améliorer la compréhension des mécanismes réactionnels mis en jeu. Les études présentées dans la littérature se limitent généralement à l'observation du substrat à une seule échelle et conduisent à des résultats plus ou moins contradictoires. Aucune étude n'a été menée pour observer l'évolution de la structure de la cellulose de l'échelle moléculaire à l'échelle micrométrique en passant par l'échelle nanométrique: c'est ce que nous nous proposons de réaliser afin de compléter ces résultats.

3. Phénomènes limitant l'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est dépendante de la réactivité des enzymes et du substrat. Quels que soient les enzymes et le substrat utilisés, une forte diminution de la vitesse de réaction est observée au cours de la conversion. Plusieurs facteurs peuvent être responsables de cette diminution et ils sont souvent classés en deux catégories: ceux liés aux enzymes et ceux liés au substrat. Il est cependant très compliqué d'isoler et de quantifier l'impact de chaque facteur.

3.1. Influence des facteurs liés aux enzymes

Plusieurs facteurs liés aux enzymes semblent influencer la vitesse d'hydrolyse. Outre le type d'enzymes et la concentration utilisée, la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse pourrait être due :

- à l'inhibition des enzymes par les produits de réaction
- à la désactivation ou l'adsorption non productive des enzymes

L'inhibition par les produits de réaction est souvent considérée comme un paramètre important. Les enzymes cellulolytiques, principalement les cellobiohydrolases et les endoglucanases, sont connues pour être inhibées par le cellobiose, et dans une moindre mesure, par le glucose. L'effet de l'inhibition par les produits de réaction a déjà été présenté pour chaque enzyme mais des incertitudes restent à être levées concernant le type d'inhibition (compétitive ou non-compétitive). En effet, l'utilisation de fortes concentrations en glucose ou en cellobiose interfère avec les mesures de concentrations en produit de réaction et il est difficile d'obtenir des résultats probants.

La dégradation mécanique [84] ou l'inactivation des enzymes [85] semblent également être des raisons expliquant la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse durant la conversion. Converse et al [85] ont obtenu de bons résultats en développant un modèle cinétique prenant en compte la désactivation des enzymes. Il est cependant extrêmement difficile de mesurer l'impact de la désactivation des enzymes sur la vitesse de réaction car ce phénomène est forcément couplé à d'autres, et plus particulièrement à l'inhibition des enzymes par les produits. D'autres auteurs [86] pensent que l'inactivation des enzymes se fait par une adsorption non productive des enzymes sur le substrat. Ils proposent une méthode de détermination de la proportion d'adsorption productive (enzymes capables d'hydrolyser les liaisons β -glucosidiques) et d'adsorption non productive (enzymes uniquement fixées par le Cellulose Binding Domain qui ne participent pas à la réaction) à l'état initial. Cette méthode, basée sur la dépendance de la vitesse initiale d'hydrolyse à la concentration en cellulases et en cellulose, nécessite cependant de nombreuses manipulations et notamment à fortes concentrations en enzymes afin de saturer le substrat.

3.2. Influence des facteurs liés au substrat

Il a été montré dans les paragraphes précédents que les paramètres morphologiques et structuraux avaient une influence sur la vitesse initiale d'hydrolyse et que certains d'entre eux évoluaient au cours de la conversion. Certains auteurs [87] suggèrent que les parties les plus "accessibles" sont hydrolysées en premier, les enzymes délaissant les parties les plus réfractaires. Arrêter l'hydrolyse enzymatique puis redémarrer la réaction avec des enzymes fraîches peut être une bonne méthode pour évaluer la perte de réactivité du substrat au cours de la conversion. Desai et al [88] ont fait des tests de redémarrage de l'hydrolyse enzymatique sur du bois dur et ont montré que la vitesse de redémarrage était inférieure à la vitesse initiale d'hydrolyse mais supérieure à la vitesse de réaction au moment de l'arrêt de la réaction. Wang et al [73] ont également observé une diminution de plus de 20% de la vitesse d'hydrolyse après arrêt et redémarrage de la réaction sur des fibres de coton. Il semblerait que la réactivité intrinsèque du substrat diminue pendant la réaction et ce phénomène pourrait expliquer une partie de la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse pendant la conversion. Cependant, ces résultats sont à nuancer car il semblerait que la diminution de la réactivité dépende du type de substrat. En effet, Yang et al [89] ont montré que la réactivité de la cellulose Avicel était identique quel que soit le temps d'hydrolyse subi par la cellulose et conclu que la diminution de la vitesse d'hydrolyse ne peut pas être due à une perte de réactivité du substrat.

Certaines propriétés morphologiques du substrat sont clairement altérées par l'hydrolyse enzymatique mais il semble difficile de corréliser ses évolutions avec un changement de réactivité du substrat. Il semblerait, pour certains auteurs, que des parties très réactives soient hydrolysées en premier laissant un substrat plus réfractaire à l'hydrolyse enzymatique tandis que d'autres travaux ont montré que la réactivité du substrat était identique quel que soit le taux de conversion subi par le substrat.

Conclusion sur les phénomènes limitant l'hydrolyse

Les facteurs susceptibles d'entraîner une diminution de la vitesse d'hydrolyse enzymatique pendant la conversion sont nombreux. La difficulté majeure est liée à la capacité d'isoler chaque phénomène afin de quantifier son impact sur l'hydrolyse.

Il est important de noter que les phénomènes responsables de la chute de la vitesse d'hydrolyse sont à la fois liés aux enzymes, et à la fois liés au substrat. Il est donc fondamental de développer un modèle cinétique permettant une bonne description des activités enzymatiques et du substrat.

4. Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique

4.1. Généralité sur les modèles cinétiques

Les publications relatives à la modélisation cinétique sont assez nombreuses comme le décrivent Zhang et Lynd [87] ou plus récemment Bansal et al [90] dans leurs revues. On peut distinguer quatre grands types de modèle cinétique: les modèles empiriques, les modèles basés sur l'équation de Michaelis-Menten, les modèles mécanistiques et les modèles prenant en compte la structure du substrat.

Les modèles empiriques sont basés sur des corrélations. Cependant, l'utilisation de ce type de modèle est souvent limitée aux conditions qui ont permis de le développer et ne permettent pas d'expliquer les mécanismes impliqués dans l'hydrolyse. L'utilisation de ce type de modèle n'ayant pas d'intérêt dans notre cas, ils ne seront pas décrits dans cette partie.

Les modèles basés sur l'équation de Michaelis-Menten sont valables pour décrire des réactions en phase homogène mais ne permettent pas de prendre en compte l'adsorption des enzymes lors de l'hydrolyse de substrats insolubles. Ils peuvent donc être utilisés pour la description de l'activité de la β -glucosidase mais sont peu adaptés pour décrire l'activité des cellobiohydrolases et des endoglucanases.

Des modèles mécanistiques, plus complets, ont donc été développés afin de décrire les phénomènes d'adsorption des enzymes sur le substrat, utilisant majoritairement le modèle de Langmuir. Ce type de modèle permet de prendre en compte à la fois l'adsorption de l'enzyme sur le substrat et la capacité de l'enzyme à hydrolyser le substrat.

Enfin, des modèles prenant en compte la structure du substrat ont également été développés afin de décrire l'influence de la morphologie du substrat sur la réaction d'hydrolyse. En effet, la vitesse d'hydrolyse dépend des paramètres intrinsèques des enzymes mais également de la réactivité du substrat.

Le Tableau 1-3 présente les différents types de modèles développés dans la littérature ainsi que leurs avantages et leurs limitations. Les différents types de modèles utilisés dans la littérature vont être détaillés dans la suite de cette partie. On s'intéressera dans un premier temps à la modélisation de la cinétique en phase homogène à travers le modèle de Michaelis-Menten. Puis, les modèles utilisés pour expliquer la cinétique des cellobiohydrolases et endoglucanases seront décrits. Enfin, les modèles globaux de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose seront explicités.

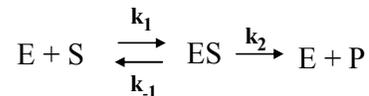
Tableau 1-3: Classification des modèles cinétiques développés dans la littérature

Modèle	Description	Avantages / Limitations
Empirique	Basé sur une approche corrélative	Applicable uniquement dans les conditions développées Ne permet pas la compréhension des mécanismes mis en jeu
Michaelis-Menten	Basé sur la formation d'un complexe enzyme / substrat	Valable uniquement en milieu homogène Ne prend pas en compte l'adsorption des enzymes
Mécanistique	Prise en compte de l'adsorption des enzymes sur le substrat	Permet une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels
	Description de la cinétique	Problème de validation des hypothèses d'adsorption
Basé sur la structure	Prise en compte des paramètres morphologiques du substrat	Compréhension des interactions enzymes / substrat

4.2. Cinétique en phase homogène

4.2.1. Modèle de Michaelis-Menten

Les réactions d'hydrolyse en phase homogène comme l'hydrolyse du cellobiose par la β -glucosidase peuvent être modélisées par l'équation de Michaelis-Menten [91]. Cette équation est basée sur le schéma réactionnel suivant:



Avec:

E: Enzyme libre; **S**: Substrat; **ES**: Complexe Enzyme/Substrat; **P**: Produit

La vitesse réactionnelle est donc proportionnelle à la quantité de complexes Enzyme/Substrat formés:

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (1)$$

En appliquant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire pour le complexe ES, on a:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad \text{d'où} \quad [ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (2)$$

Le bilan de matière sur l'enzyme permet d'obtenir l'équation suivante:

$$[E]^0 = [E] + [ES] \quad (3)$$

La combinaison de l'équation (2) et (3) permet d'obtenir une expression de la concentration en complexe ES:

$$[ES] = \frac{[E]^0[S]}{[S] + K_m} \quad (4)$$

L'équation de la vitesse est donc la suivante (5) et la vitesse initiale est exprimée par l'équation suivante (6):

$$r = \frac{k_2[E]^0[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (5) \rightarrow \quad r_{ini} = \frac{k_2[E]^0[S]^0}{K_m + [S]^0} = \frac{V_m[S]^0}{K_m + [S]^0} \quad (6)$$

Plusieurs linéarisations existent pour représenter cette équation de vitesse et sont présentées dans le Tableau 1-4.

La linéarisation de Hanes utilise le ratio $[S]/r_{ini}$ et permet de refléter fidèlement les erreurs commises sur la détermination de la vitesse initiale et ce sur une large gamme de concentrations en substrat [92]. Cependant, de nombreux auteurs utilisent la linéarisation de Lineweaver et Burk même si les erreurs expérimentales commises sur les petites valeurs de v induisent une forte déviation sur la détermination des paramètres V_m et K_m .

Tableau 1-4: Linéarisation possible pour la détermination des constantes cinétiques de Michaelis-Menten

Linéarisation de Hanes	Linéarisation de Lineweaver et Burk
$\frac{[S]}{r_{ini}} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{1}{V_m} [S]$	$\frac{1}{r_{ini}} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]}$

Enfin, l'équation de Michaelis-Menten présentée ne prend pas en compte l'inhibition par le produit. Plusieurs types de modèle d'inhibition ont été proposés et sont récapitulés dans le Tableau 1-5. L'utilisation de la linéarisation de Lineweaver et Burk permet de discriminer graphiquement le type d'inhibition.

Tableau 1-5: Récapitulatif des modèles d'inhibition

Inhibition Compétitive (C)	Inhibition Non Compétitive (NC)	Inhibition InCompétitive (UC)
$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $E + P \xrightleftharpoons[K_p]{K_p} EP$	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $+P \updownarrow K_p \updownarrow K_p$ $EP + S \xrightleftharpoons[K_m]{K_m} ESP$	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $+P \updownarrow K_p \updownarrow K_p$ ESP
Empêche la liaison E / S	Formation d'un complexe ESP Sites différents sur l'enzyme	Inhibiteur se lie sur le complexe ES
$r_{ini} = \frac{V_m [S]^0}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_m}\right) + [S]^0}$	$r_{ini} = \frac{V_m [S]^0}{\left(1 + \frac{[P]}{K_m}\right) K_m + [S]^0}$	$r_{ini} = \frac{V_m [S]^0}{K_m + [S]^0 \left(1 + \frac{[P]}{K_m}\right)}$
Modification de K_m , Pas de modification de V	Modification de V Pas de modification de K_m	Modification de K_m et V
Point d'intersection sur l'axe des ordonnées (0; 1/V)	Point d'intersection sur l'axe des abscisses (- 1/ K_m ; 0)	Droites parallèles entre elles

4.2.2. Modélisation de l'action de la β -glucosidase

Le modèle de Michaelis-Menten est classiquement utilisé pour modéliser la cinétique de la β -glucosidase et la détermination des paramètres cinétiques de Michaelis-Menten constitue un critère de comparaison des enzymes. Elle a été envisagée sur deux types de substrat:

- le cellobiose qui est le substrat naturel
- le p-nitrophényl- β -D-glucopyranoside (pNPG) qui est constitué d'une molécule de glucose liée à un groupement nitrophényl, en position béta. Lors de l'hydrolyse, il y a libération d'une molécule de p-nitrophenol, facilement quantifiable par spectrophotométrie.

Le substrat chromophore est souvent préféré au substrat naturel afin de simplifier les manipulations, les mesures cinétiques étant effectuées par spectrophotométrie.

Le Tableau 1-6 présente un récapitulatif des paramètres de Michaelis-Menten déterminés dans la littérature. L'enzyme présente une meilleure affinité pour le pNPG que pour le cellobiose (constante de Michaelis-Menten 3 à 12 fois plus faible sur pNPG que sur cellobiose [41,92-94]) et ceci quelle que soit la souche. Cependant, la constante de Michaelis-Menten semble dépendre de la purification subie par l'enzyme. Il n'est pas possible de tirer d'autres conclusions, en particulier sur la comparaison entre l'enzyme sécrétée par *A. niger* et celle par *T. reesei*. Enfin, Himmel et al [95] ont montré qu'il y avait deux β -glucosidases différentes sécrétées par *A. niger*.

Cependant, ils ont prouvé que ces deux formes ne différaient que par le nombre de carbohydrates, et qu'elles avaient des propriétés cinétiques proches.

Tableau 1-6: Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques de la β -glucosidase

Enzyme	T (°C)	Energies		Substrat	Inhibition	K _m (mM)	K _p (mM)	K _m /K _p	Ref
		d'activation (E _a) (kJ.mol ⁻¹)							
<i>A niger</i> Novozym 188	50	-		pNPG	-	0.46 0.36	- -	- -	[95]
<i>A niger</i> Sigma	25	-		pNPG Cellobiose	C	1 2,7	3 -	0.33 -	[93]
<i>A niger</i> Novozym 188	50 20-80	52.5		pNPG Cellobiose	C	1.03 5.63	3.0 -	0.34 -	[41]
Culture <i>A niger</i>	30	-		pNPG	C	0.64	3.4	0.19	[96]
<i>A niger</i> Novozym 188	50	46		Cellobiose	C - UC - NC + S	-	-	-	[42]
<i>A niger</i> Cellobiase 250L	50	-		Cellobiose	C + S	1,66	2,87	0.57	[44]
<i>T reesei</i> Rut-C-30						0.153	0.212	0.72	
<i>T reesei</i> culture	50	-		pNPG Cellobiose	C	0.182 2.10	0.624 -	0.29 -	[92]
<i>T reesei</i> QM9414 culture	40	-		pNPG Cellobiose	C	0.102 1.25	0.7 -	0.14 -	[94]

C – Compétitive, UC – Incompétitive, NC – Non compétitive, S – Inhibition par le substrat

4.3. Cinétique en phase hétérogène

4.3.1. Le modèle de Michaelis- Menten

Même si le modèle de Michaelis-Menten ne permet que de décrire la cinétique en milieu homogène, il reste utilisé par de nombreux auteurs pour décrire la cinétique des enzymes sur substrat solide. Bezerra et al [32] ont étudié huit modèles de Michaelis-Menten modifiés pour caractériser la cinétique de dégradation de l'Avicel par CBHI et ont montré que le modèle d'inhibition compétitive par le cellobiose permettait une bonne description de la cinétique. Le

Tableau 1-7 présente les constantes de Michaelis-Menten publiées dans la littérature pour différentes enzymes de *T. reesei* sur des substrats cellulotiques. L'utilisation de ce modèle reste cependant très controversée car il ne permet pas de décrire l'adsorption des enzymes sur le substrat. Son utilisation est donc limitée et des modèles de type "Langmuir" lui ont souvent été préférés.

Tableau 1-7: Paramètres de Michaelis-Menten déterminés pour les enzymes cellulolytiques de *T. reesei*

Enzymes	Substrat	k_{cat} (h ⁻¹)	K_m (μM)	Inhibition	K_i (μM)	Ref
CBHI + BGL		0,022	4,243			
CBHII + BGL	Whatman	0,026	3,301	-	-	[97]
EGI + BGL		0,0086	0,095			
CBHI	Avicel	1	4400	-	-	[32]
		2	3800	Compétitive	41	

Nidetzky et al [97] propose de modéliser la synergie entre les enzymes en utilisant un modèle de Michaelis-Menten modifié en ajoutant un terme de synergie:

$$r(E_1, E_2) = r(E_1) + r(E_2) + r_{syn}(E_1, E_2)$$

où $r(E_1, E_2)$ représente la vitesse d'hydrolyse en présence des deux enzymes, $r(E_1)$ et $r(E_2)$, les vitesses individuelles d'hydrolyse des enzymes E_1 et E_2 et r_{syn} la vitesse d'hydrolyse due à la synergie. Dans leur cas, les expressions des vitesses sont les suivantes:

$$r(E_i) = V_{max} \frac{[E_i]}{[E_i] + K_{Ei}} \quad \text{et} \quad r_{syn}(E_1, E_2) = V_{syn,max} \frac{[E_1][E_2]}{K_{E1} \cdot K_{E2} + K_{E1} \cdot [E_2] + K_{E2} \cdot [E_1] + [E_1][E_2]}$$

Cependant, cette expression ne fournit pas d'explication mécanistique aux phénomènes de synergie.

4.3.2. Modèle cinétique de type "Langmuir"

L'adsorption des enzymes sur la cellulose a été largement étudiée, le plus souvent en mesurant des isothermes d'adsorption. Pour rappel, l'isotherme d'adsorption est la courbe qui relie la quantité de composé adsorbée sur un solide en fonction de la concentration du composé adsorbable dans le fluide en contact [98]. Plusieurs modèles peuvent être considérés pour décrire l'isotherme, le plus communément utilisé étant l'isotherme de Langmuir à un ou deux sites. Les équations appliquées à ces deux modèles sont décrites dans le Tableau 1-8.

Tableau 1-8: Modèle de Langmuir

Équation du modèle de Langmuir à un site	Équation du modèle de Langmuir à deux sites
$q = \frac{q_{\max}}{1 + \frac{K_d}{[E]}}$	$q = \frac{q_{\max 1}}{1 + \frac{K_{d1}}{[E]}} + \frac{q_{\max 2}}{1 + \frac{K_{d2}}{[E]}}$

Avec: q : Quantité d'enzymes liées ($\text{mol.g}_{\text{avicel}}^{-1}$); q_{\max} : Nombre de sites ($\text{mol.g}_{\text{avicel}}^{-1}$);
 $[E]$: Concentration d'enzymes libres à l'équilibre (M); K_d : Constante de dissociation (M)

L'adsorption de CBHI et CBHII sur la cellulose (Avicel) a aussi été étudiée dans la littérature afin de déterminer les isothermes d'adsorption des enzymes pures. Le tracé de l'isotherme d'adsorption se fait généralement à 4°C [21,46,99] afin de limiter au maximum la réaction d'hydrolyse ou à température ambiante [24,100]. Plusieurs modèles comme Langmuir (à un ou deux sites) ou Freundlich ont été utilisés pour modéliser l'isotherme d'adsorption, le modèle de Langmuir à deux sites donnant les meilleurs résultats. En effet, Igarashi et al [14,101] justifient l'existence de deux types d'interactions enzyme/substrat: la liaison 'productive' où l'enzyme est liée par le Cellulose Binding Domain (CBD) et le domaine catalytique (CD), et la liaison 'non productive' où l'enzyme est uniquement liée au substrat par le CBD. La liaison 'productive' correspondrait au site ayant la plus grande affinité tandis que la liaison 'non productive' correspondrait au site ayant la plus faible affinité. Le Tableau 1-9 présente les paramètres de Langmuir déterminés pour CBHI et CBHII.

Tableau 1-9: Paramètres obtenus pour le modèle de Langmuir à un ou deux sites pour l'adsorption de CBHs de *T. reesei* sur AVICEL

Enzyme	Substrat	T	q_{max1}	q_{max2}	q_{max}	K_{d1}	K_{d2}	K_d	Ref
			$\mu\text{mol.g}^{-1}$			μM			
CBH I	Avicel	20°C	0,21	0,85	1,1	0,052	6,0	3,6	[24]
		4°C	0,40	0,64	1,04	0,11	19,4	0,28	[99]
			-	-	0,74	-	-	1,07	
		4°C	0,24	0,55	0,80	0,04	6,87	0,13	[21]
		5°C	0,047*	0,087*	0,134*	0,005*	0,02*	-	[48]
		5°C	-	-	1,01	-	-	3,5	[47]
		30°C	-	-	0,86	-	-	6,2	
CBHII	Avicel	4°C	0,16	0,41	0,57	0,008	0,53	0,021	[99]
			-	-	0,52	-	-	0,52	
		5°C	0,016*	0,042*	0,058*	0,0013*	0,012*	-	[48]
		5°C	-	-	0,98	-	-	14,9	[47]
		30°C	-	-	0,91	-	-	18,5	

*Résultats calculés avec $M_{CBHI} = 52,2$ kDa et $M_{CBHII} = 47,9$ kDa

La comparaison des résultats obtenus pour CBHI et CBHII dans les mêmes conditions [48,99] montre que la capacité d'adsorption de CBHI est supérieure à CBHII, mais l'adsorption de CBHII est plus forte.

Cependant, l'isotherme représente l'état du système à l'équilibre. Selon les auteurs, le temps de mise à l'équilibre du système est compris entre 30 et 120 min. Ce phénomène est plutôt lent même si on considère que 50% des enzymes sont adsorbées en 3 min [21] et 90% en 10 min [24].

La cinétique des enzymes a ensuite été étudiée mais il est difficile de trouver des paramètres cinétiques facilement comparables. Le Tableau 1-10 présente les activités spécifiques de CBHI et CBHII déterminées dans la littérature sur un substrat de type Avicel. L'activité spécifique semble dépendre des conditions opératoires et de la méthode de purification des enzymes. Cependant, en comparant deux études réalisés par le même auteur, les deux enzymes semblent posséder une activité proche à 30°C [47,48] et il semblerait que CBHII ait une activité d'hydrolyse supérieure à CBHI [39,102].

Tableau 1-10: Activité spécifique des cellobiohydrolases

Enzyme	Substrat	T	Activité spécifique $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	Ref
CBH I	Avicel	30°C	0,0710	[47,48]
		50°C	0,014	[39]
		40°C	0,0175	[102]
CBH II	Avicel	30°C	0,056	[47,48]
		50°C	0,027	[39]
		40°C	0,0391	[102]

4.4. Modèles globaux de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose

4.4.1. Modèles mécanistiques

Okazaki et Moo-Young [103] sont parmi les premiers auteurs à avoir développé un modèle mécanistique pour l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Plus récemment, Zhang et Lynd [78] ont proposé un autre modèle mécanistique prenant en compte plus de paramètres liés aux enzymes et au substrat. Le Tableau 1-11 présente la comparaison de ces deux modèles. Concernant la description du substrat, les deux modèles sont basés sur la diminution du degré de polymérisation. Le modèle de Zhang et Lynd intègre cependant un paramètre supplémentaire pour la modélisation du substrat, le facteur d'accessibilité, mais celui-ci reste constant pendant la réaction d'hydrolyse. Concernant les enzymes, le modèle d'Okazaki et Moo-Young prend en compte les trois activités enzymatiques connues tandis que le second modèle ne prend pas en compte l'activité β -glucosidase. De plus, ce modèle n'intègre pas l'inhibition par les produits de réaction alors que sans β -glucosidase, il y a accumulation de cellobiose qui est connu pour inhiber plus fortement les enzymes que le glucose [29]. La synergie Endo-Exo est prise en compte dans les deux modèles, l'hydrolyse des chaînes par les endoglucanases entraînant la libération de nouveaux bouts de chaînes pour l'attaque par les cellobiohydrolases alors que la synergie Exo-Exo n'est pas prise en compte, même dans le modèle de Zhang et Lynd où ils font la distinction entre les deux formes de cellobiohydrolases. Enfin, le modèle de Okazaki et Moo-Young utilise le modèle de Michaelis-Menten qui reste peu adapté à la description des activités des endoglucanases et des cellobiohydrolases alors que Zhang et Lynd utilise un modèle d'adsorption, plus réaliste pour décrire les mécanismes mis en jeu.

Tableau 1-11: Détail et comparaison de deux modèles mécanistiques

	Okazaki et Moo-Young (1978) [103]	Zhang et Lynd (2006) [78]
Enzymes	- Endoglucanase (E1) - Cellobiohydrolase (E2) - β -glucosidase (E3)	- Endoglucanase (EG) - Cellobiohydrolase I (CBHI) - Cellobiohydrolase II (CBHII)
Modèle	Modèle de Michaelis-Menten + Inhibition non compétitive : - cellobiose (E1 et E2) - glucose (E1, E2 et E3)	Modèle d'adsorption puis réaction + Pas d'inhibition
Substrat	- Degré de polymérisation (DP)	- Degré de Polymérisation (DP) - Facteur d'accessibilité de la cellulose aux cellulases (F_a)
Évolution	- Diminution du DP	- Diminution du DP - Accessibilité (F_a) constante
Points +	<ul style="list-style-type: none"> • 3 activités principales représentées • Prise en compte de l'inhibition • Synergie Endo-Exo 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 paramètres pour la description du substrat • Modèle d'adsorption • Synergie Endo-Exo
Points -	<ul style="list-style-type: none"> • Modèle de Michaelis-Menten peu adapté pour EG et CBH • Pas de distinction CBHI – CBHII • Pas de considération de la synergie Exo-Exo • Un seul paramètre pour la description du substrat 	<ul style="list-style-type: none"> • Manque l'activité β-glucosidase • Pas de prise en compte de l'inhibition • Pas de considération de la synergie Exo-Exo • Pas d'évolution de l'accessibilité pendant la réaction

4.4.2. Modèles prenant en compte la structure du substrat

La majorité des modèles mécanistiques développés dans la littérature sont basés sur la diminution du degré de polymérisation [78,103]. Cependant la cellulose possède une organisation structurale complexe et représenter la cellulose à l'échelle moléculaire comme des chaînes indépendantes ne permet pas de décrire les facteurs principaux qui limitent l'accessibilité du substrat. D'autres paramètres permettant la description du substrat, comme la cristallinité ou la surface spécifique ont été introduits dans des modèles semi-mécanistiques.

Afin de prendre en compte la différence de réactivité au sein de la cellulose, certains auteurs ont développé des modèles qui considèrent une zone amorphe plus réactive et une zone cristalline moins réactive [104]. D'autres auteurs [84] vont même jusqu'à considérer que le substrat contient une zone réactive et une zone inerte.

L'accessibilité des enzymes au substrat est également un paramètre très étudié. L'accessibilité peut être caractérisée en terme d'adsorption des enzymes sur le substrat. Certains auteurs [78] utilisent la capacité d'adsorption maximale des enzymes pour calculer la fraction de liaisons accessibles aux enzymes.

$$F_a = 2\alpha A_{\max} MW_{\text{anhydroglucose}}$$

Où:

F_a : Facteur d'accessibilité de la cellulose

α : Surface de cellulose occupée par une cellulase (mol.mol d'enzyme⁻¹)

A_{\max} : Concentration maximale d'enzyme adsorbée (mol d'enzyme.g_{cellulose}⁻¹)

$MW_{\text{anhydroglucose}}$: Masse molaire d'un glucose anhydre (soit 162 g.mol⁻¹)

L'utilisation de ce paramètre est intéressante car elle permet de prendre en compte que toutes les chaînes de cellulose ne sont pas accessibles, du fait de l'organisation structurale de la cellulose.

Certains auteurs [73,88] ont également montré que la réactivité du substrat diminuait au cours de l'hydrolyse enzymatique. La diminution de la réactivité du substrat a pu être reliée à la conversion à travers un facteur de digestibilité relative [105]:

$$\phi = 1 - X^n$$

Avec: - X: taux de conversion de la cellulose

- n: constante

Des modèles cinétiques à cœur rétrécissant basés sur la taille des particules ont également été développés [106-108]. Ces modèles considèrent la cellulose comme une particule dont le volume diminue au cours de la réaction entraînant une diminution de la surface accessible. De plus, ils considèrent que le nombre de sites accessibles aux enzymes est proportionnel à la surface accessible, et que l'hydrolyse entraîne par conséquent une diminution du nombre de sites accessibles. Ainsi en considérant que la vitesse est proportionnelle au nombre de sites accessibles, la diminution de la vitesse d'hydrolyse au cours du temps peut être modélisée. Ce type de modèle, basé sur la taille des particules, a pour avantage de décrire l'évolution macroscopique du substrat cellulosique mais ne permet pas de séparer l'activité d'hydrolyse de chaque type d'enzymes.

Enfin, Xu et al [109] ont utilisé un modèle fractal pour représenter la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose associé à un modèle prenant en compte le blocage des sites de la cellulose par les enzymes adjacentes. Ce type de modèle permet de prendre en compte

les phénomènes d'encombrement stérique à la surface de la cellulose qui sont dus au fait que les enzymes occupent, par leur taille, plusieurs chaînes de cellulose.

Ces différentes études montrent l'importance de la description du substrat dans la modélisation cinétique. Les principaux paramètres structuraux pris en considération pour expliciter la réactivité de la cellulose sont: (i) le degré de polymérisation, (ii) la cristallinité, (iii) la surface spécifique accessible, (iv) la réactivité du substrat, (v) la taille des particules. Cependant, aucun modèle proposé jusqu'à présent ne permet d'avoir une description complète du substrat de l'échelle moléculaire à l'échelle macroscopique.

Conclusions sur la modélisation cinétique

Le développement d'un modèle cinétique complet de l'hydrolyse enzymatique doit inclure d'une part, par la description de l'activité de chaque type d'enzymes et de leur synergie, et d'autre part, par une bonne description de la structure du substrat aux différents niveaux son organisation structurale. La description d'un modèle aussi complet n'existe pas dans la littérature. D'autres paramètres, comme la désactivation des enzymes ou la perte de réactivité du substrat pourraient également être intégrés afin d'améliorer le modèle cinétique. Cependant, il reste difficile expérimentalement d'évaluer proprement chaque phénomène.

CONCLUSION DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET SITUATION DU SUJET DE RECHERCHE

L'étude bibliographique concernant les enzymes a permis de mettre en évidence qu'il est indispensable de dissocier le mode d'action et de déterminer les activités de chaque type d'enzymes. L'adsorption des cellobiohydrolases et les endoglucanases sur le substrat solide ainsi que l'inhibition de l'ensemble des enzymes par ces produits de réaction (glucose et/ou cellobiose) semblent être les deux phénomènes majoritaires qu'il est nécessaire d'évaluer. L'influence de la température sera également étudiée par la détermination de l'énergie d'activation des enzymes. Cette étude bibliographique a montré des lacunes dans la compréhension des mécanismes de synergie entre les différentes enzymes et plus particulièrement la synergie exo-exo. Un effort doit être fait afin d'identifier les mécanismes mis en jeu en vue de la modélisation.

La caractérisation du substrat a également été identifiée comme un point critique pour le développement du modèle cinétique. Cette étude a montré la nécessité de prendre en compte les différents niveaux d'organisation structurale de la cellulose, pour pouvoir décrire le substrat dans toute sa complexité. La stratégie d'analyse du substrat choisi consistera à étudier le substrat à l'échelle moléculaire par la détermination du degré de polymérisation, à l'échelle nanométrique par l'étude de la cristallinité et la taille des microfibrilles, et à l'échelle micrométrique avec la mesure de la taille des particules. Par ailleurs, il semble également primordial d'étudier l'évolution des paramètres morphologiques du substrat au cours de la réaction pour affiner la compréhension des mécanismes réactionnels. Nous nous proposons pour cela de réaliser des tests d'arrêts et de redémarrage de l'hydrolyse. Ces tests serviront à suivre l'évolution de la structure et de la réactivité du substrat et d'évaluer le changement de réactivité du substrat, qui reste un phénomène controversé dans la littérature.

Plusieurs modèles mécanistiques ont déjà été développés dans la littérature mais aucun ne fait à la fois une bonne description de la réactivité des enzymes et du substrat. Dans le cadre de cette thèse, nous nous proposons de développer un modèle mécanistique détaillé qui décrira l'activité intrinsèque de quatre enzymes (CBHI, CBHII, EGI et BGL) représentant les activités majoritaires du cocktail sécrété par *T. reesei* et les phénomènes de synergie entre les enzymes, incluant la synergie exo-exo. A partir des résultats obtenus concernant la caractérisation du substrat au cours de l'hydrolyse, nous essayerons de proposer un modèle permettant de relier paramètres morphologiques et réactivité du substrat de façon à pouvoir décrire de façon satisfaisante les résultats obtenus en cinétique initiale et tout au long de la réaction.

Chapitre 2: Matériels et Méthodes

L'étude bibliographique a montré que le développement d'un modèle cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose nécessite de déterminer d'une part les paramètres cinétiques intrinsèques des enzymes pures et d'autre part l'évolution de la structure et de la réactivité du substrat au cours de l'hydrolyse. La première partie de ce chapitre sera consacrée à la présentation et la description des enzymes et des substrats choisis pour réaliser l'étude cinétique. Les méthodes de purification et de dosages des enzymes seront décrites ainsi que la stratégie analytique mise en place pour la caractérisation des substrats. Puis, les tests cinétiques effectués et la méthode de préparation de substrat partiellement hydrolysés seront explicités. Enfin, le traitement des données cinétiques sera détaillé.

1. Les enzymes

1.1. Les enzymes étudiées

Actuellement, *Trichoderma reesei* est pressenti pour produire les cellulases du procédé d'éthanol 2G. Cependant, la β -glucosidase représente une faible proportion du cocktail cellulolytique de *T. reesei* et il est souvent supplémenté par de la β -glucosidase sécrétée par *Aspergillus niger*. Les cellulases sélectionnées pour cette étude sont d'une part les enzymes produites par une souche génétiquement modifiée *T. reesei* ibeta [110] d'IFP Energies Nouvelles et d'autre part la β -glucosidase d'*A. niger* produite par la société Novozymes.

Les enzymes de *T. reesei* ont été produites dans un fermenteur de 2,5 L, avec dans un premier temps, une phase de croissance sur glucose et puis dans un second temps, une phase de *fed-batch* avec un mélange glucose, lactose et xylose. Cette fermentation est référencée sous le nom **K616**, nom qui sera utilisé pour désigner le cocktail enzymatique dans la suite de la thèse. Les enzymes présentes dans le cocktail K616 ont tout d'abord été séparées du mycélium par centrifugation avant d'être purifiées (méthodes décrites en 1.2) afin de déterminer les paramètres cinétiques intrinsèques de chaque enzyme. Quatre enzymes ont été choisies pour reconstituer le cocktail réel de *T. reesei*: deux cellobiohydrolases CBHI et CBHII, une endoglucanase EGI et la β -glucosidase BGL_T.

La β -glucosidase d'*A. niger* issue de la préparation commerciale **SP 188** (Novozymes) a également été étudiée et comparée à celle sécrétée par *T. reesei*. La β -glucosidase d'*A. niger* sera noté BGL_A

1.2. Méthode de purification des enzymes

1.2.1. Purification des EGs et des CBHs

Les endoglucanases et les cellobiohydrolases pures ont été fournies par le Département de Biotechnologie. La purification a été réalisée par chromatographie liquide FPLC en deux étapes. La première étape consiste à dessaler le surnageant de culture de *T. reesei* à l'aide d'une colonne Hi-trap® (GE Healthcare, Tampon Imidazole 25 mM pH 7,5). Lors de la seconde étape, cet échantillon protéique est chargé sur une colonne anionique (MonoQ® ; GE Healthcare) pour subir un gradient de pH obtenu à l'aide d'un polybuffer (PB74® ; GE Healthcare).

Ce gradient de pH va entraîner l'élution de l'ensemble des protéines chargées sur la colonne en fonction de leur point isoélectrique (pH pour lequel la charge globale de la protéine est nulle). Il est ainsi possible de séparer les principales enzymes cellulolytiques produites par la souche industrielle de *T. reesei*.

1.2.2. Purification des β -glucosidases

La β -glucosidase commerciale SP188 d'*A.niger* a été dessalée pour éliminer les ingrédients présents dans la formulation industrielle. Une colonne de dessalage (Hi-trap; GE Healthcare) équilibrée avec 25 mM d'imidazole à pH 7,6 a été utilisée pour cette étape.

Étant donnée la faible quantité de β -glucosidase présente dans le cocktail enzymatique de *T. reesei*, une méthode de purification a dû être mise en place pour isoler la β -glucosidase de *T. reesei*. Cette méthode [111] comprend deux étapes principales, une étape de fixation des cellulases ayant un Cellulose Binding Domain (CBD) (comprenant les cellobiohydrolases et les endoglucanases) sur de l'Avicel PH101 et une étape de purification par Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

1.3. Méthodes de dosage des enzymes

1.3.1. Méthode de Lowry

La première méthode retenue pour le dosage des enzymes est la méthode de Lowry [112]. Cette méthode est basée à la fois sur la réaction de Biuret dans laquelle les liens peptidiques des protéines réagissent avec le cuivre dans des conditions alcalines, lequel réagit avec le réactif de Folin. La réaction de Folin-Ciocalteu consiste en une réduction du phosphomolibdotungstène en hétéropolymolybdène (bleu) par oxydation des acides aminés tyrosine, tryptophane, cystéine et histidine, catalysée par le cuivre. La réaction entraîne une coloration bleue foncée qui dépend en partie du contenu en tyrosine et tryptophane et dont l'absorbance est lue à 750 nm.. La méthode

est sensible à 0.01 mg.mL^{-1} et est linéaire dans une gamme de 0.1 à 1 mg.mL^{-1} . Le kit utilisé est de DC Protein Assay (Biorad). Le standard utilisé est la BSA (Biorad).

Expérimentalement, la réaction est directement effectuée dans des cuves de spectrophotomètre. $25 \mu\text{L}$ de chaque échantillon sont ajoutés dans une cuve (de même pour les échantillons de la gamme BSA, le blanc étant fait avec de l'eau). Ensuite $125 \mu\text{L}$ du réactif A sont ajoutés. Après agitation, 1 mL du réactif B est ajouté et après mélange par inversion et développement de la réaction pendant 15 minutes, les absorbances sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (Shimadzu UV 1601) à 750 nm .

1.3.2. Méthode de dosage par fluorescence UV

Une seconde méthode de dosage par fluorescence UV a été développée pour mesurer des concentrations en enzymes pures inférieures à 100 mg.L^{-1} . La fluorescence UV est basée sur la propriété d'une molécule à émettre de la lumière après excitation par une lumière incidente (généralement par absorption d'un photon). Après l'excitation, l'intensité de la fluorescence est récupérée en se plaçant à 90° par rapport à la lumière incidente. Sous certaines conditions, cette intensité peut ensuite être reliée à la concentration de protéines dans la solution. La Figure 2-1 présente le schéma de principe du spectrophotomètre.

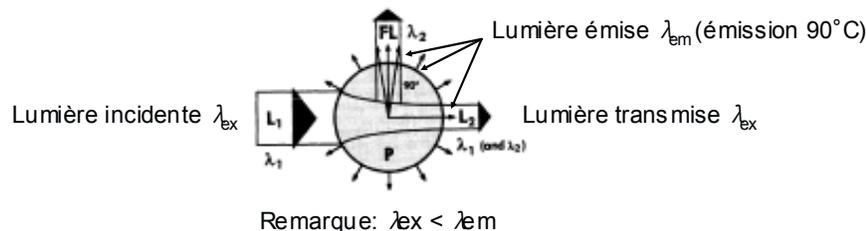


Figure 2-1: Schéma de principe du spectrophotomètre UV/visible mono faisceau

Lors de l'analyse, l'échantillon est posé sur le porte-cuves. Les photons émis par l'échantillon après excitation par une lampe xénon pulsée sont détectés par le photomultiplicateur (PMT) dont la sensibilité dépend de la tension qui lui est appliquée. L'avantage majeur de cette technologie réside dans la sensibilité du photomultiplicateur qui permet de mesurer des concentrations en protéines à très faible teneur.

Pour chaque enzyme purifiée, différentes conditions ont été testées afin de déterminer les conditions optimales (longueurs d'onde, sensibilité du détecteur). Le Tableau 2-1 présente les paramètres déterminés pour la mesure de la concentration en enzymes purifiées pour les quatre

enzymes de *T. reesei*. Dans notre cas, nous avons travaillé avec une longueur d'onde d'excitation fixe et le spectre d'émission était enregistré entre 280 et 500 nm avant d'être intégré entre 290 et 450 nm.

Tableau 2-1: Paramètres utilisés pour la détermination de la concentration en enzymes par spectroscopie

	CBHI	CBHII	EGI	BGL_T
λ excitation	280 nm			
λ émission	Entre 280 et 500 nm			
Intégration	Intégration de la réponse entre 290 et 450 nm			
PMT detector	Sensibilité de 700			
Pente droite étalon	748790	989279	696727	613478
Ordonnée droite étalon	250	250	250	250
Concentration min (mg.L⁻¹)	2,3	1,7	2,5	2,8
Concentration max (mg.L⁻¹)	74	33	45	50

Cette méthode permet donc le dosage des enzymes à très faible teneur, mais présente l'inconvénient de ne pouvoir doser que les enzymes pures. En effet, la quantité de photons émis est fortement dépendante de la structure de l'enzyme (les pentes des droites étalons variant de 610000 à 990000 selon l'enzyme) et cette méthode ne peut donc pas être utilisée pour un cocktail enzymatique. On remarque également que l'ordonnée à l'origine de la droite étalon n'est pas nulle et cette valeur correspond au bruit de fond obtenu lors de l'analyse de l'eau.

Cette méthode permet de doser les enzymes en mg.L⁻¹. Connaissant les masses molaires des enzymes les concentrations en enzyme peuvent ensuite être exprimées en mM. Le Tableau 2-2 rassemble les masses molaires des enzymes étudiées.

Tableau 2-2: Tableau récapitulatif des masses molaires des enzymes

Enzymes	BGL_A	BGL_T*	CBHI*	CBHII*	EGI*
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	117400 [95]	75300	52200	47900	47900

*: obtenu à l'aide du logiciel Protparam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)

2. Les substrats

2.1. Les substrats étudiés

Dans une première phase de la thèse, il a été choisi d'étudier l'activité de chaque enzyme sur son substrat de référence. Ainsi, les substrats cellobiose et pNPG (Sigma) ont été utilisés pour l'étude de l'activité de la β-glucosidase tandis que l'Avicel PH101® (Fluka) a été préférée pour l'étude des cellobiohydrolases et des endoglucanases.

La cellulose Avicel a été choisie comme substrat de référence pour l'étude des CBHs et des EGS, ainsi que pour l'étude du cocktail enzymatique complet. Malgré un degré de cristallinité élevé et un faible degré de polymérisation (environ 300), cette cellulose est l'un des substrats les plus étudiés, ce qui permettra de confronter nos résultats avec ceux de la littérature.

Un second substrat cellulosique a été choisi pour compléter cette étude. Il s'agit d'une pâte cellulosique blanchie produite par la méthode bisulfite (PCBB) qui permet d'attendre des puretés en cellulose nettement supérieures à celles des pâtes Kraft. Cette pâte cellulosique, produite par Tembec Tartas (Tartas, France), est une cellulose moins cristalline qui possède un degré de polymérisation plus élevé que l'Avicel PH101.

2.2. Méthode de caractérisation des substrats

La cellulose est une structure complexe présentant différents niveaux d'organisation. La section suivante présente les différentes méthodes analytiques utilisées pour sa caractérisation.

2.2.1. Teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche est déterminée par gravimétrie en mesurant la perte de poids obtenue après séchage du solide dans une étuve à 105°C pendant au moins 12 heures. La mesure est réalisée en duplicate.

2.2.2. Analyse compositionnelle par hydrolyse acide

L'analyse compositionnelle de la cellulose est déterminée en réalisant une hydrolyse acide en deux étapes selon le protocole opératoire décrit par le NREL [113], sur un échantillon de solide ayant un taux d'humidité inférieur à 10%.

La première étape consiste en une hydrolyse à 30°C en présence d'acide sulfurique à 72%pds pendant 30 minutes. L'acide est ensuite dilué à 4%pds et la deuxième étape d'hydrolyse acide est réalisée en autoclave à 121°C pendant 60 minutes. L'hydrolysate est ensuite centrifugé et le surnageant est analysé par HPLC afin de mesurer les concentrations en sucres (majoritairement glucose et xylose) et de déterminer la teneur en cellulose et hémicellulose. La teneur en lignine est quant à elle déterminée en mesurant d'une part le résidu insoluble après la double hydrolyse, et en y apportant une correction pour les cendres résiduelles et éventuellement les protéines insolubles, et d'autre part, la lignine soluble par spectroscopie UV-visible, en y apportant une correction pour les monosaccharides et protéines présentes. Pour les deux substrats étudiés, étant donné les informations disponibles sur leurs procédés de fabrication respectifs, il nous a paru raisonnable de considérer qu'il ne contenait plus de lignine résiduelle et seules les analyses de composition en monosaccharides après la double hydrolyse ont été réalisées.

2.2.3. Degré de polymérisation moyen par mesure de la viscosité intrinsèque

Le degré de polymérisation moyen de la cellulose est déterminé en mesurant la viscosité intrinsèque de la cellulose après dissolution de celle-ci dans un solvant organo-métallique, la cupri-éthylène-diamine (CED). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un viscosimètre automatique RHEOTEK RPV-1 en suivant la norme ISO 5351-1 (FCBA, Grenoble).

Le degré de polymérisation est alors directement corrélé à la viscosité intrinsèque par la formule suivante [114]:

$$DP^{0,9} = 1,65.[\eta]$$

Avec η , la viscosité intrinsèque exprimée en mL.g⁻¹.

Une correction du DP de la cellulose par rapport à l'éventuelle présence d'hémicelluloses peut être apportée par l'équation suivante, où h et c sont les teneurs en hémicelluloses et cellulose respectivement [115].

$$DP = \left(\frac{1,65.[\eta] - 116.h}{c} \right)^{1,111}$$

2.2.4. Indice de cristallinité par WAXS et RMN du ¹³C

La cristallinité est le plus souvent déterminée par diffraction des rayons X (WAXS) ou par RMN du ¹³C de la cellulose solide sous forme de poudre. Ces méthodes permettent en effet de caractériser le matériau à l'échelle nanométrique et d'identifier son organisation cristalline.

En diffraction des rayons X, le spectre de diffraction présente deux pics d'intensités différentes, l'un correspondant à la fraction cristalline et l'autre à la fraction amorphe [57]. L'indice de cristallinité peut alors être calculé en utilisant de manière simple la méthode de la hauteur des pics et sa valeur est donnée par la formule suivante:

$$CrI = \left[\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right] * 100$$

avec: - I_{002} : Intensité du pic pour $2\theta=22^\circ$ (fraction cristalline)

- I_{am} : Intensité du pic pour $2\theta=18^\circ$ (fraction amorphe)

Les clichés de diffraction de poudre ont été enregistrés au CERMAV à Grenoble au moyen d'un générateur Philips PW 3830 fonctionnant à une tension de 30 kV et une émission de 20 mA (radiation CuK α , $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). De petites pastilles de cellulose ont été préparées en compactant de la poudre dans le trou (diamètre 2 mm, profondeur 1 mm) d'une rondelle en PVC. La rondelle contenant la pastille a ensuite été fixée sur un collimateur de diamètre 0.2 mm et montée de telle sorte que le faisceau de rayons X traverse perpendiculairement la pastille de

cellulose. Pour enregistrer les clichés, nous avons utilisé des "imaging plates" Fujifilm, détecteurs bidimensionnels à dynamique élevée, permettant une analyse quantitative des intensités diffractées. Ces plaques ont été exposées sous vide durant 1-2 heure puis lues par balayage laser au moyen d'un phospho-imageur Fujifilm BAS 1800 II. Les diagrammes de diffraction ont été calibrés au moyen de calcite (anneau de diffraction à $d = 0.3035$ nm). Les profils de diffraction ont été calculés par une moyennisation radiale des clichés 2D.

2.2.5. Caractérisation de la nanostructure par SAXS / SANS

Les méthodes de diffusion aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering (SAXS) et Small Angle Neutron Scattering (SANS)) permettent de caractériser la matière à des échelles comprises entre 1 nm et 1 μ m [116]. La méthode SANS et son utilisation dans le cadre de cette thèse sont présentées ci-dessous.

Interaction rayonnement matière:

Les neutrons interagissent avec le noyau des atomes et pour quantifier cette interaction, la longueur de diffusion \mathbf{b} d'un atome, voire d'un isotope est utilisée à partir de valeurs tabulées. Dans l'approximation des petits angles, la basse résolution (> 1 nm) permet de traiter la matière comme un milieu continu; ainsi, la densité de longueur de diffusion ρ , représentant la somme sur un petit élément de volume v des contributions de chaque atome de \mathbf{b} , permet cette transition d'un milieu atomique discret à un milieu continu. A une phase ou un constituant sera donc associé une valeur de ρ . Dans le cas d'un milieu dispersé 1 dans un milieu continu 2, l'intensité du rayonnement diffusé est proportionnelle à de la différence entre ρ_1 et ρ_2 au carré. Un des intérêts des neutrons est de pouvoir varier à volonté la densité de longueur de diffusion de solvants, et donc le contraste, afin de déterminer les caractéristiques du soluté. Il peut s'agir soit de déterminer expérimentalement $\rho_{\text{soluté}}$ soit de mettre en évidence des hétérogénéités de composition du soluté. Pour varier ρ_{solvant} , la différence de longueur de diffusion entre H et D est souvent mise à profit; en effet, $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ et $\rho_{\text{D}_2\text{O}}$ sont très éloignés (respectivement $0.56 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ et $6.37 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$), et le mélange H₂O /D₂O permet de couvrir cette plage.

Principe de la mesure :

Une expérience de diffusion de neutrons consiste à éclairer un échantillon par un faisceau de neutrons, de longueur d'onde λ , de faible divergence angulaire, puis à mesurer la variation de l'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion 2θ . L'intensité diffusée dans une direction particulière est liée au vecteur d'onde \vec{q} défini par:

$$\vec{q} = \vec{k}_s - \vec{k}_i$$

où \vec{k}_s et \vec{k}_i représentent respectivement les vecteurs d'onde diffusés et incidents, ayant un module $k=2\pi/\lambda$ dans le cas d'une interaction élastique.

Le vecteur de diffusion \vec{q} est le paramètre physique permettant de regrouper, sur une même courbe, les données obtenues pour différents couples $(\lambda, 2\theta)$. Son module vaut $4\pi\sin(\theta)/\lambda$ et il a pour dimension l'inverse d'une longueur. L'évolution de l'intensité en fonction de q permet d'obtenir des informations sur les corrélations de densité de longueur de diffusion aux échelles q^{-1} . La Figure 2-2 présente le schéma de principe d'une expérience de diffusion des neutrons aux petits angles et permet de visualiser le vecteur d'onde dans le plan du détecteur.

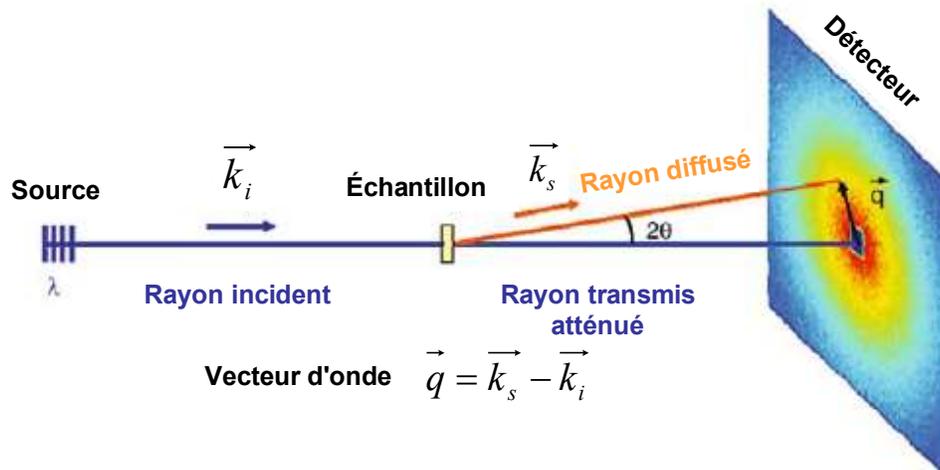


Figure 2-2: Représentation schématique d'une expérience de diffusion aux petits angles, d'après Grillo [116]

Pour une distance échantillon/détecteur et une longueur d'onde donnée, la gamme de q accessible est limitée aux petits angles par le "beam stop" et aux grands angles par le diamètre du détecteur. Dans le cas de nos systèmes, les échelles d'intérêt doivent être étendues pour couvrir à la fois celles des microfibrilles et celles des particules.

Les mesures de SANS ont été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin (LLB – Saclay), sur la ligne PAXE. Les différentes celluloses ont été analysées dans un solvant D_2O pur dans une gamme de q comprise entre $3,1 \cdot 10^{-3}$ et $3,6 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Cependant, expérimentalement, il n'est pas possible de couvrir toute cette gamme de q avec une seule mesure et deux configurations détaillées dans le Tableau 2-3 ont dû être utilisées avec une zone de recouvrement.

Tableau 2-3: Configurations utilisées lors des mesures de SANS

Configuration	Distance Echantillon-Détecteur (m)	Longueur d'onde (\AA)	q_{\min} (\AA^{-1})	q_{\max} (\AA^{-1})
1	2	6	$2,1 \cdot 10^{-2}$	$2,6 \cdot 10^{-1}$
2	5	17	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-2}$

Mise en œuvre des échantillons :

Les échantillons de cellulose sont agités dans un excès de D₂O pendant au minimum une nuit afin d'assurer le "gonflement" de la cellulose puis centrifugés (4000 rpm, 10 min). Le culot est alors récupéré et introduit dans des cuves Hellma en quartz préalablement tarées et de trajet optique 2mm. A la fin des expériences, la teneur en matière sèche (2.2.1) est déterminée afin de pouvoir déterminer la fraction volumique de cellulose présente dans chaque cuve.

Traitement des données :

L'intensité brute mesurée pour chaque échantillon dépend étroitement des conditions de mesure et contient des contributions parasites que l'on doit éliminer pour ne conserver que la diffusion cohérente liée à l'échantillon. Dans un premier temps, un masque est appliqué aux clichés 2D afin d'ignorer les zones du détecteur défectueuses ou cachées. Les intensités sont alors regroupées en moyennant, pour une valeur de 2θ donnée, sur tous les angles azimutaux. Le résultat est une courbe 1D d'intensité brute en fonction de q . Les intensités sont alors normées par l'épaisseur de l'échantillon et sa transmission. La cellule dans laquelle est introduit l'échantillon induit une diffusion supplémentaire. Cette dernière est mesurée de façon indépendante sur une cuve vide et sa contribution est soustraite de celle de l'échantillon. L'efficacité du détecteur peut présenter des variations qui sont corrigées en normant par le spectre d'un diffuseur incohérent de référence (1mm d'H₂O). La mesure du flux incident permet de calculer un facteur de normalisation qui sera appliqué à toutes les mesures afin d'accéder aux valeurs absolues d'intensité diffusées.

Enfin les contributions incohérentes principalement liées aux protons de la cellulose ("structure" et H₂O physisorbée) sont soustraites.

Ce traitement des données a été appliqué aux spectres mesurés pour des grandes valeurs de q . Les données obtenues aux petites valeurs de q ont simplement été normées par rapport aux données obtenues aux grandes valeurs de q .

Intensité diffusée par un système de particules :

L'intensité cohérente diffusée, par unité de volume, par N particules, à symétrie sphérique, monodisperses et homogènes s'écrit

$$I(q) = \Delta\rho^2 N_p V_p^2 F^2(q) S(q)$$

où N_p représente le nombre de particules par unité de volume, $\Delta\rho^2$ est le terme de contraste, V_p le volume d'une particule, $F^2(q)$ représente le facteur de forme des particules et porte l'information

sur la forme et la dimension des particules et $S(q)$ est le facteur de structure résultant des interactions entre particules. La taille importante des particules de cellulose, relativement au domaine de q accessible par l'expérience, ne permet pas de décrire correctement les termes $F^2(q)$ et $S(q)$. Par contre, les échelles de q envisagées ($q^{-1} \ll$ taille caractéristique des particules de cellulose) permettront de décrire à la fois l'interface solide/solvant des particules de cellulose et celle des microfibrilles. Dans ce domaine, dit domaine de "Porod", l'équation précédente se simplifie :

$$I(q) = 2\pi\Delta\rho^2 \frac{S}{V} \frac{1}{q^4}$$

avec:

- $\Delta\rho^2$: la différence de densité de longueur de diffusion au carré
- S/V : le rapport surface sur volume où S désigne la surface développée dans le volume V

En traçant $q^4 I(q)$ en fonction de q il est alors possible de déterminer le pallier et, connaissant le terme de contraste, le rapport S/V . Le rapport s/v d'une particule se déduit alors par:

$$\frac{S}{V} = \Phi \frac{s}{v}$$

2.2.6. Microscopie électronique à balayage

Les microscopies électroniques sont des types de microscopies où un faisceau d'électrons est utilisé pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie. Leur résolution limite est imposée par la longueur d'onde du faisceau qu'elles utilisent mais peuvent cependant agrandir jusqu'à 2 millions de fois.

Parmi les différentes méthodes de microscopie électronique, la microscopie électronique à balayage (MEB) repose sur l'interaction de matériaux massifs avec un faisceau d'électrons focalisés. C'est une technique de caractérisation texturale et chimique locale.

Les images obtenues par MEB sont réalisées à partir d'un balayage à la surface de l'échantillon par un faisceau électronique focalisé ou sonde. En tout point de la surface balayée, chaque signal émis par l'échantillon sous l'impact du faisceau peut être détecté et transformé en signal électrique puis en image.

Les clichés de microscopie électronique à balayage ont été réalisés au Centre Technique du Papier de Grenoble, avec un microscope JEOL 6400.

2.2.7. Taille de particules

Mesures avec l'analyseur MorFi

L'analyse de la taille des fibres a aussi été effectuée en utilisant un analyseur MorFi (TechPap, France) sur l'équivalent de 0.3 g secs d'échantillon de cellulose. Les fibres, en suspension dans l'eau, passent dans une veine de mesure où un système optique composé d'une source de lumière et d'une caméra CDD (CDD : Charge-coupled device) haute résolution permet l'acquisition des images de fibres qui sont immédiatement traitées par un ordinateur (3000 fibres visualisées par analyse de 2 minutes). Les principales caractéristiques morphologiques mesurées par l'appareil MorFi sont : Les longueurs et largeurs des fibres, l'indice de courbure et le taux d'éléments fins. Contrairement au FPIA, cet appareil permet d'analyser des fibres plus grosses, jusqu'à quelques millimètres.

Mesures par FPIA (Flow Particles Image Analyser)

La taille des particules de cellulose a été déterminée en utilisant le Flow Particles Image Analyser (FPIA) à FCBA à Grenoble. Cet appareil permet de déterminer la taille et la forme de particules comprises entre 1 et 300 μm dans une solution de particules très diluée (environ 250 mg.L^{-1}) par analyse d'images. Le système utilise une caméra CCD (Charge Coupled Device) pour enregistrer des images de particules passant dans un capillaire. Grâce à son système d'injection, le système force les particules à présenter leur surface la plus large face à la caméra, ce qui évite une orientation aléatoire. Différents paramètres comme la longueur, la largeur ou le périmètre sont alors calculés pour chaque particule. Lors de nos mesures, nous avons choisi d'enregistrer 10 000 particules par échantillon afin d'avoir un assez grand nombre de mesures pour effectuer des calculs statistiques. Chaque mesure a été réalisée en duplicate.

3. Méthode de dosages des sucres

L'hydrolyse enzymatique entraîne la libération de sucres solubles qu'il est nécessaire de doser pour mesurer les cinétiques réactionnelles. Plusieurs méthodes de dosage ont été utilisées dont une méthode de dosage enzymatique (glucostat) qui permet le dosage de glucose à forte concentration, et des méthodes de chromatographies ioniques qui permettent le dosage des sucres à faibles teneurs.

3.1. Glucostat

Le glucose formé lors de la réaction d'hydrolyse peut être dosé avec le Glucose Analox GM10. Cet appareil mesure, avec une électrode d'argent, la quantité d'oxygène consommée par la réaction d'oxydation du glucose avec l'enzyme appelée glucose oxidase (GOD). Cette consommation d'oxygène est directement proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon (à condition d'opérer dans des conditions pour lesquelles la réaction est totale).

10 μ L d'échantillon à analyser sont injectés en duplicate dans l'analyseur préalablement calibré avec une solution standard de glucose. L'ensemble des analyses ont été réalisées selon les recommandations techniques du fournisseur.

3.2. Chromatographie ionique (HPLiC)

3.2.1. Généralité sur la chromatographie ionique

Le glucose et les oligomères de glucose ont été dosés par chromatographie ionique avec un chromatographe ICS3000-Dionex.

La chromatographie ionique est basée sur l'interaction électrostatique entre les éléments à séparer et la résine de la colonne. Une colonne échangeuse d'anions de type CarboPacTM PA1 (longueur 250 mm; diamètre interne 4 mm; remplissage polystyrene-divinylbenzenzene 10 μ m), couplée avec un détecteur ampérométrique muni d'une électrode de travail en or et d'une électrode de référence Ag/AgCl, ont été utilisés pour la séparation et la quantification du glucose et des oligosaccharides. L'appareil Dionex permet la création d'un gradient d'élution. Le logiciel Chromeleon (Dionex) a été utilisé pour l'acquisition des données, la détermination des temps de rétention et des aires des pics.

Deux méthodes ont été mises en œuvre, une permettant le dosage du glucose et du cellobiose et une seconde permettant le dosage du glucose et de ses oligomères jusqu'au degré de polymérisation 6.

3.2.2. Méthode 1: Dosage du glucose, xylose et cellobiose

Un gradient de soude est utilisé pour la séparation et le dosage du glucose, xylose et du cellobiose. La linéarité a été vérifiée pour les trois sucres entre 1 et 50 mg.L⁻¹ ($r > 0,9997$) et la répétabilité a montré que l'erreur est inférieure à 5%. Le standard utilisé est un standard contenant trois sucres: le glucose, le xylose et le cellobiose à une concentration de 10 mg.L⁻¹. La Figure 2-3 présente un exemple de chromatogramme obtenu pour l'analyse d'un standard à 10mg.L⁻¹ ainsi que le gradient d'éluion utilisé.

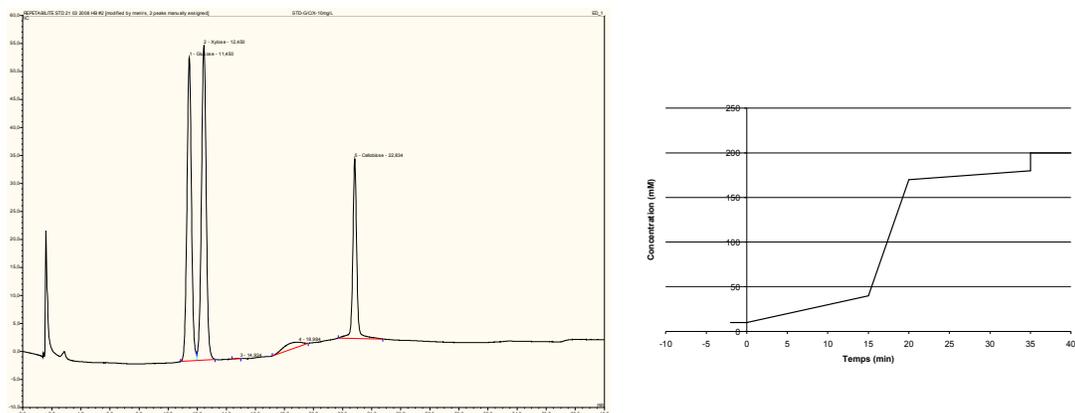


Figure 2-3: Standard (10 g.L⁻¹) et gradient utilisé dans la méthode 1

3.2.3. Méthode 2: Dosage des oligomères (DP 1 à 6)

D'après la bibliographie [117], la séparation des oligosaccharides nécessite l'utilisation d'éluants à base de soude et d'acétate de sodium et la méthode proposée a été mise en place sur notre appareillage. La Figure 2-4 présente le gradient utilisé pour la méthode. La linéarité a été vérifiée pour les 6 sucres entre 0,1 et 20 mg.L⁻¹ ($r > 0,9997$) et la répétabilité a montré que l'erreur est inférieure à 5%. Le standard utilisé est un standard contenant six sucres (DP 1 à 6) à 10 mg.L⁻¹.

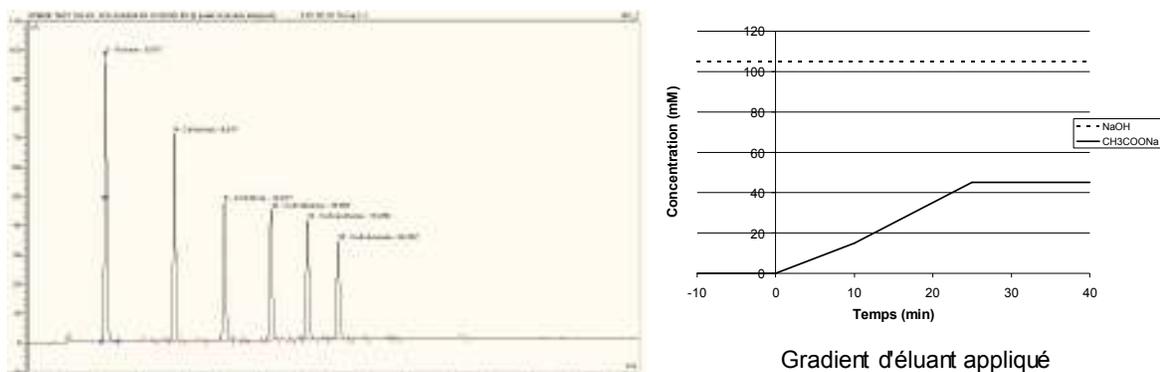


Figure 2-4: Standard (10 g.L⁻¹) et gradient utilisé dans la méthode 2

4. Préparation des substrats pré-hydrolysés

Lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, le substrat est dégradé et ses propriétés morphologiques et structurales évoluent. Des substrats partiellement hydrolysés ont été préparés et caractérisés avec pour objectif d'identifier leurs changements de structure. Afin de préparer des quantités suffisantes de substrats, ils ont été préparés dans un réacteur IKA (LR-2.ST) dans les conditions suivantes:

- Volume réactionnel: 2L
- Agitation mécanique (100 tour.min⁻¹)
- Température: 50°C (réacteur double enveloppe)
- pH 4,8 – Tampon citrate 50mM
- Teneur en matière sèche : 2%
- Protection contamination: Azide de Sodium 1mg.g_{mélange réactionnel}⁻¹

En fin d'hydrolyse, le substrat partiellement hydrolysé est récupéré par centrifugation (10 000 rpm / 8 min). Il est ensuite lavé à pH 10 (ajout de NaOH 2N) puis récupéré par centrifugation. Cette étape permet de désorber les enzymes bloquées sur le substrat en les dénaturant. Puis, le substrat est lavé une seconde fois à l'eau distillée pour éliminer toutes traces de soude. Enfin, afin de récupérer un solide sec, les substrats partiellement hydrolysés ont été lyophilisés (Lyophilisateur Alpha 1-2 ; Christ). L'efficacité de la lyophilisation a été vérifiée en mesurant la teneur en matière sèche résiduelle des différents substrats.

Le surnageant de la réaction a été analysé au glucostat et a permis la détermination du pourcentage d'hydrolyse qui correspond au rendement glucose. Le rendement glucose a été calculé grâce à la formule suivante:

$$Rdt_glucose = \frac{C_{glucose} * M_{hydrolysat}}{M_{substrat} * \frac{C_{cellulose}}{100} * 1.111} * 100$$

où

$C_{glucose}$: concentration en glucose dans l'hydrolysat ($g.kg^{-1}$)

$M_{hydrolysat}$: masse du mélange réactionnel initial (kg)

$C_{cellulose}$: teneur en cellulose du substrat initial ($g.100g^{-1}_{substrat sec}$)

$M_{substrat}$: masse de substrat initial ($g_{matière sèche}$)

Pour chaque méthode et avec chaque substrat, un substrat contrôle a été préparé dans des conditions abiotiques. Ce substrat subit le même traitement (thermique et agitation) et le même post traitement mais il ne subit pas de traitement enzymatique. Il permettra de quantifier l'impact du gonflement et du post-traitement sur la morphologie des substrats.

5. Réaction enzymatique

5.1. Tampon

Les réactions enzymatiques nécessitent des milieux réactionnels à pH contrôlé. Pour la majorité des tests (à l'exception de ceux où l'on étudie l'influence du pH), une solution de tampon citrate à 50mM et à pH 4,8 a été utilisée

5.2. Mesures des cinétiques initiales des β -glucosidases

L'action des β -glucosidases de *T. reesei* et d'*A. niger* ont été comparées sur leur substrat naturel, le cellobiose, et sur un substrat chromophore, le pNPG.

La Figure 2-5 présente la mise en œuvre expérimentale des études réalisées sur substrat naturel et chromophore. Pour les deux substrats, les tests ont été réalisés dans un volume de 100 μ L mais les conditions d'incubation ainsi que la méthode d'analyse changent selon le substrat.

Pour l'étude sur le cellobiose, le glucose formé a été analysé par chromatographie ionique en employant la méthode décrite en 3.2.2.

Pour l'étude sur le pNPG, le p-nitrophénol formé est révélé par ajout de 100 μ L de Na_2CO_3 et l'absorbance est mesurée par lecture au scanner (Multiskan Ascent). La concentration est alors déterminée en utilisant une gamme étalon constituée de p-nitrophénol entre 0 et 0,3 mM. Cette méthode avec le substrat chromophore et les plaques PCR permet une détermination rapide des paramètres cinétiques de l'enzyme et pourrait être utilisée pour le screening des enzymes. Enfin des tests ont été réalisés afin de tester la stabilité thermique des deux β -

glucosidases. Les enzymes ont été incubées 72h à 50°C en absence de substrat, puis leur activité enzymatique a été mesurée sur pNPG, à 50°C (conditions standards).

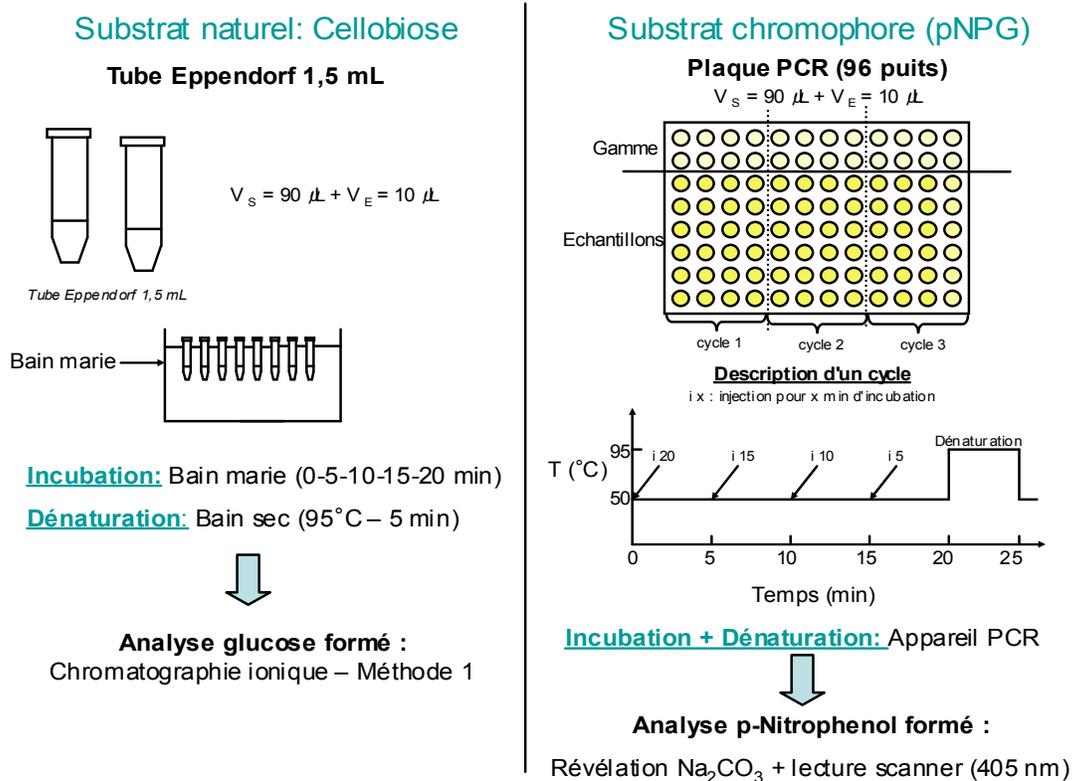


Figure 2-5: Protocole expérimental pour l'étude de la β -glucosidase

5.3. Mesure des cinétiques initiales des CBHs, EGs et du cocktail complet

Afin de limiter la consommation d'enzymes, des tests miniatures ont été mis en oeuvre pour caractériser la cinétique initiale des cellobiohydrolases et des endoglucanases pures. Ceci permet de caractériser à la fois l'adsorption des enzymes et leur activité de dépolymérisation de la cellulose.

Dans un premier temps, des tests d'adsorption sur cellulose décrits sur la Figure 2-6 ont été réalisés à 4°C afin de s'affranchir de la réaction chimique. Puis dans un second temps, des tests de cinétique initiale ont été réalisés sur 30 minutes (Figure 2-6). Pour chaque temps d'incubation, la concentration en sucres formés ainsi que la concentration résiduelle en protéine ont été mesurés. Ainsi, l'adsorption des protéines a pu être suivie en même temps que la cinétique.

Les deux types de tests ont été effectués pour les enzymes pures CBHI, CBHII et EGI dans un volume réactionnel de 1 mL avec une agitation magnétique (400 rotations par minute) et à pH 4,8 (tampon citrate 50 mM). Seuls les tests cinétiques ont été réalisés pour l'étude des

mélange d'enzymes et du cocktail réel. Ces tests ont également été utilisés pour tester la réactivité initiale des substrats partiellement hydrolysés.

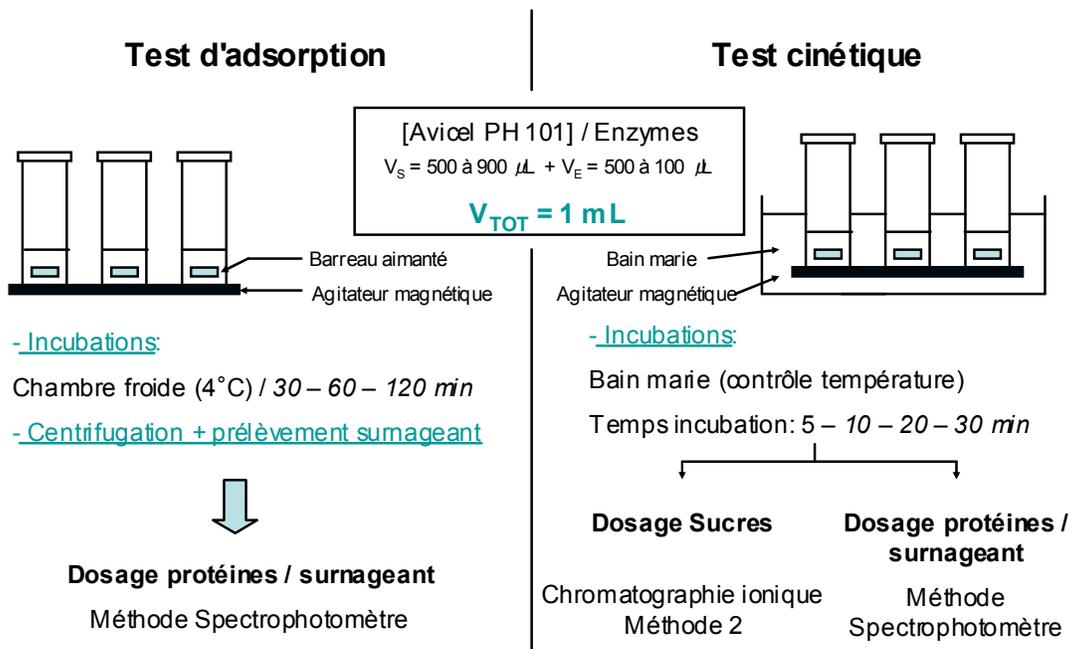


Figure 2-6: Protocole expérimentale des tests réalisés pour l'étude des cellobiohydrolases

5.4. Test de cinétique longue durée

Le test de cinétique longue durée a pour but de caractériser la réactivité complète et non plus initiale du matériau cellulosique. Les conditions opératoires retenues pour avoir une bonne reproductibilité des tests sont les suivantes:

- Volume réactionnel: 70mL
- Agitation magnétique à 400 rpm
- Température: 50°C (incubation bain sec)
- pH 4,8 – Tampon citrate 50mM
- Teneur en matière sèche : 1%
- Protection contamination: Azide de Sodium $1\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{mélange réactionnel}}^{-1}$
- Teneur en K616: $20\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{cellulose}}^{-1}$

Des prélèvements de 1 mL du milieu réactionnel à 1, 2, 4, 6, 24, 48 et 72h ont été effectués afin de suivre la quantité de sucre libéré au glucostat. Un excès d'enzymes est ajouté à 72h afin de mesurer le potentiel enzymatique du substrat après 144h de réaction.

Afin d'assurer une bonne reproductibilité, chaque test a été réalisé en duplicate.

6. Traitement des données cinétiques

6.1. Détermination des vitesses initiales apparentes

Lors des tests de cinétique initiale, les vitesses initiales apparentes sont déterminées par régression linéaire de la courbe présentant la concentration en produit formé en fonction du temps.

La fonction DROITEREG d'Excel permet de déterminer la pente d'une droite et retourne une série de valeur statistique de la droite (erreur-type correspondant à la pente, coefficient de régression...).

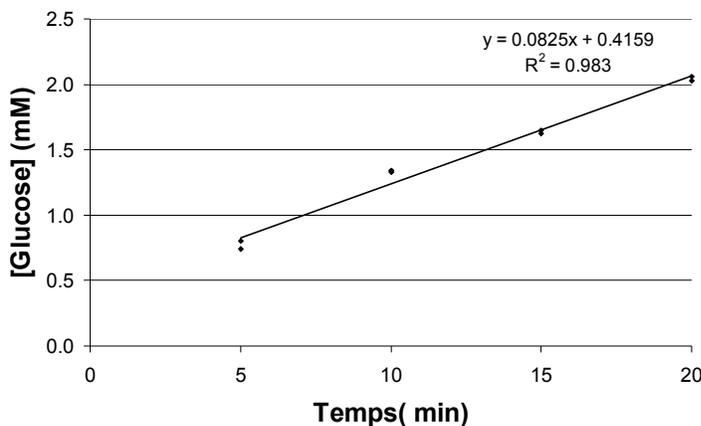
L'erreur sur la pente est déterminée en utilisant la loi de Student inverse. Cette loi renvoie une valeur aléatoire suivant la loi de t de Student en fonction de la probabilité et du degré de liberté (nombre de points expérimentaux -1). L'erreur est alors définie comme le produit du nombre renvoyé par la loi de Student par l'erreur expérimentale définie par:

$$erreur\ exp = \frac{Ecartype\ exp}{\sqrt{nombre\ de\ points}} * valeur\ de\ la\ pente$$

Exemple: La vitesse initiale a été déterminée pour les conditions présentées dans le Tableau 2-4 (β -glucosidase de *T. reesei* sur cellobiose). La Figure 2-7 présente l'évolution de la concentration en glucose formée en fonction du temps et la matrice renvoyée par Excel lors de l'utilisation du programme DROITEREG. On remarque que la courbe ne passe pas par l'origine. Pour chaque enzyme, seule la vitesse entre 5 et 20 minutes a pu être mesurée.

Tableau 2-4: Conditions utilisées pour la détermination de la vitesse initiale

	[S] ⁰ (mM)	[E] ⁰ (mM)	T (°C)	pH	[P] ⁰ (mM)	Analyse
Tests	16,2	4,3.10 ⁻³	50	4,8	0	DIONEX



m	0.0825	0.4159	b
sem	0.0044	0.0606	seb
r²	0.9830	0.0700	sey
F	346.9034	6	df
ssreg	1.7008	0.0294	ssres

Avec **m**: pente, **sem**: erreur type correspondant à la pente, **r²**: coefficient de régression, **F**: Statistique F, **ssreg**: somme de régression des carrés, **b**: ordonnée à l'origine, **seb**: erreur type correspondant à b, **sey**: erreur type pour y estimé, **df**: degré de liberté, **ssres**: résiduelle des carrés

Figure 2-7: Exemple de détermination de vitesse initiale avec le tableau des statistiques renvoyé par Excel

6.2. Détermination du rendement glucose et de la vitesse apparente d'hydrolyse

Lors des tests de cinétique globale, le rendement en glucose sera déterminé afin de comparer les cinétiques de réaction. Le calcul du rendement glucose est effectué en utilisant l'équation suivante:

$$Rdt_glucose = \frac{C_{glucose} * M_{hydrolysat}}{M_{substrat} * glucose_potentiel / 100} * 100 = \frac{C_{glucose} * M_{hydrolysat}}{M_{substrat} * C_{cellulose} / 100 * 1.111} * 100$$

- où
- $C_{glucose}$: concentration en glucose de l'hydrolysat (en g/kg)
 - $M_{hydrolysat}$: masse du mélange réactionnel initial (en kg)
 - $M_{substrat}$: masse de substrat initial (en g matière sèche)
 - $glucose_potentiel$: quantité de glucose libéré par hydrolyse acide (en g/100g de substrat matière sèche)
 - $C_{cellulose}$: teneur en cellulose du substrat initial (en g/100 g de substrat matière sèche)

Dans le but de calculer les vitesses apparentes d'hydrolyse à différents temps de la réaction, la courbe représentant la quantité de glucose formé en fonction de la durée de l'hydrolyse sera modélisée par l'expression ci dessous:

$$[Glucose]_{formé} = [Glucose]_{max} * (1 - \exp(-k.t))^n$$

avec trois paramètres: $[Glucose]_{max}$, k et n .

Cette équation, dépendant de trois paramètres permet de bien modéliser les données expérimentales. De plus, la vitesse apparente d'hydrolyse pourra alors être déterminée en calculant la valeur de la dérivée au temps voulu en utilisant la formule suivante:

$$\frac{d[Glucose]_{formé}}{dt} = [Glucose]_{max} * k.n * \exp(-k.t) * (1 - \exp(-k.t))^{(n-1)}$$

Chapitre 3: Étude de la cinétique initiale des enzymes pures

*Ce chapitre est consacré à l'étude de la cinétique initiale des enzymes sur leur substrat de référence. Les paramètres cinétiques intrinsèques de chaque enzyme seront tout d'abord déterminés puis la synergie entre les différents types d'enzymes sera étudiée afin de construire un cocktail enzymatique reconstitué contenant quatre enzymes. Les performances de ce cocktail seront comparées à celle du cocktail réel sécrété par *T. reesei* afin de valider la stratégie de construction du modèle cinétique.*

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose permet de convertir la cellulose en glucose par l'action synergique de trois types d'enzymes fongiques : (i) les endoglucanases (EC 3.2.1.4) qui hydrolysent aléatoirement les chaînes de cellulose, plus particulièrement au niveau des zones dites "amorphes", (ii) les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) qui agissent de façon processive à partir des extrémités libres des chaînes de cellulose, libérant du cellobiose, (iii) les β -glucosidases (EC 3.2.1.21) qui hydrolysent le cellobiose en glucose en milieu homogène. Le développement d'un modèle cinétique complet nécessite de déterminer dans un premier temps les paramètres cinétiques relatifs aux enzymes.

Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps les activités initiales de chaque type d'enzymes séparément: l'activité des β -glucosidases (BGL_T) a été mesurée sur cellobiose et pNPG tandis que la cellulose Avicel a été choisie pour la détermination des paramètres cinétiques de CBHI, CBHII et EGI. Une étude complémentaire a également été menée sur la β -glucosidase d'*A. niger* (BGL_A) contenu dans une préparation industrielle (SP188 ; Novozymes) car cette enzyme est couramment utilisée pour compléter ce cocktail de *T. reesei*. Dans une deuxième phase, l'étude de la synergie entre les enzymes a été entreprise en vue de quantifier et d'améliorer notre compréhension des phénomènes de coopération entre les différentes familles d'enzymes. Enfin, les performances du cocktail reconstitué en mélangeant les quatre types d'enzymes, dans les proportions du cocktail réel, ont été comparées à celle du cocktail réel afin de valider notre stratégie de modélisation. L'ensemble de cette étude a été réalisée en cinétique initiale afin de s'affranchir des évolutions du substrat cellulosique ayant lieu au cours de la réaction

1. Les cellobiohydrolases

1.1. Enzymes et substrat d'étude

Le cocktail enzymatique de *T. reesei* contient deux cellobiohydrolases ayant des modes d'action complémentaire: (i) CBHI, attaquant les bouts de chaînes réducteurs de la cellulose, (ii) CBHII attaquant les bouts de chaînes non-réducteur de la cellulose. Les cellobiohydrolases sont connues pour avoir une activité d'hydrolyse sur des substrats cristallins. La cellulose Avicel, bien décrite et très utilisée dans la littérature pour la mesure d'activité enzymatique, a été choisie pour

la détermination des paramètres cinétiques de ces deux enzymes. Des tests de cinétiques initiales (Chapitre 2, 5.3) ont été effectués pour étudier l'influence de la concentration en enzyme, de la température et de l'inhibition par le glucose. Le Tableau 3-1 récapitule les conditions expérimentales utilisées.

Tableau 3-1: Paramètres expérimentaux utilisés pour les tests d'hydrolyse par les cellobiohydrolases

	Substrat	Enzyme	[S]	[E]	T	[Glucose]
		g.L⁻¹	g.L⁻¹	mg.g_{cell}⁻¹	°C	g.L⁻¹
Tests d'adsorption						
Enzymes pures	Cellulose	CBHI	10	1,6 à 13,2	4	-
	Avicel	CBHII	10	2,6 à 20,8	4	-
Tests cinétiques						
Enzymes pures	Cellulose	CBHI	10	1,5 à 16,0	50	-
				3,3	30 à 55	-
	Avicel	CBHII	10	3,3	50	0 à 120
				1,1 à 14,7	50	-
				5,1	30 à 55	-
			5,1	50	0 à 120	

1.2. Adsorption des enzymes

Comme décrit en introduction, les cellobiohydrolases sont des enzymes contenant un domaine catalytique (CD) lié par une chaîne peptidique à un domaine qui permet la liaison du substrat à l'enzyme appelé "Cellulose Binding Domain" (CBD). Les enzymes s'adsorbent par l'intermédiaire de leur CBD sur le substrat avant de commencer leur action d'hydrolyse. La cinétique d'adsorption des enzymes sur le substrat a été étudiée à 4°C afin de limiter la réaction d'hydrolyse. Il a été montré que 50% des enzymes sont adsorbées en 3 min [21] et 90% en 10 min [24]. L'équilibre d'adsorption des enzymes est donc rapide par rapport à la réaction et le temps de mise à l'équilibre a été évalué à 30 minutes.

Les isothermes d'adsorption représentant la quantité d'enzymes adsorbées par gramme de cellulose en fonction de la quantité d'enzymes libres à l'équilibre ont été tracées pour CBHI et CBHII, pour une concentration en cellulose de 10 g.L⁻¹.

Les isothermes présentées sur la Figure 3-1 représentent l'équilibre d'adsorption des enzymes à 4°C. Il est important de noter que, pour toutes les concentrations en enzymes, il y a entre 79 et 90% d'enzymes adsorbées. Les comportements des deux enzymes sont assez proches à 4°C. La forme de l'isotherme obtenue pourra être modélisée en utilisant un modèle de type "Langmuir".

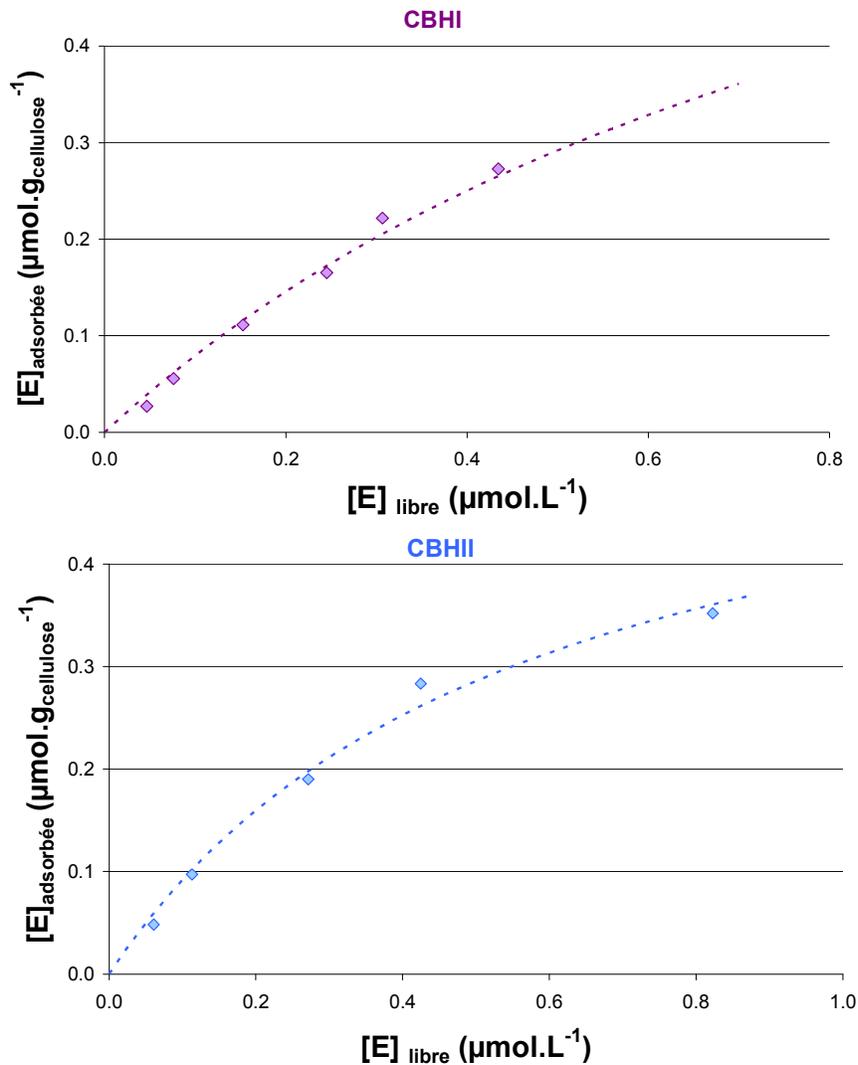


Figure 3-1: Isotherme d'adsorption des enzymes CBHI et CBHII (T=4°C)

1.3. Étude cinétique

1.3.1. Suivi des tests de cinétique initiale

Les tests de cinétique initiale ont été réalisés en suivant l'évolution de la quantité d'enzymes libres et de la concentration en sucres produits pour une durée d'hydrolyse de 30 minutes.

La quantification des enzymes libres a permis tout d'abord de vérifier que la réaction d'adsorption était rapide devant l'hydrolyse enzymatique. Elle permet également d'accéder aux isothermes d'adsorption à 50°C, à partir des résultats obtenus aux différentes concentrations en enzymes choisies.

La Figure 3-2 présente l'évolution de la concentration en cellobiose formé ainsi que la quantité d'enzymes adsorbées en fonction du temps pour CBHI et CBHII. L'équilibre

d'adsorption est atteint rapidement et on remarque que 90% des enzymes adsorbées à 30 minutes le sont déjà à 5 minutes. Il est donc possible de considérer que l'étape d'adsorption des enzymes sur le substrat est rapide par rapport à la saccharification.

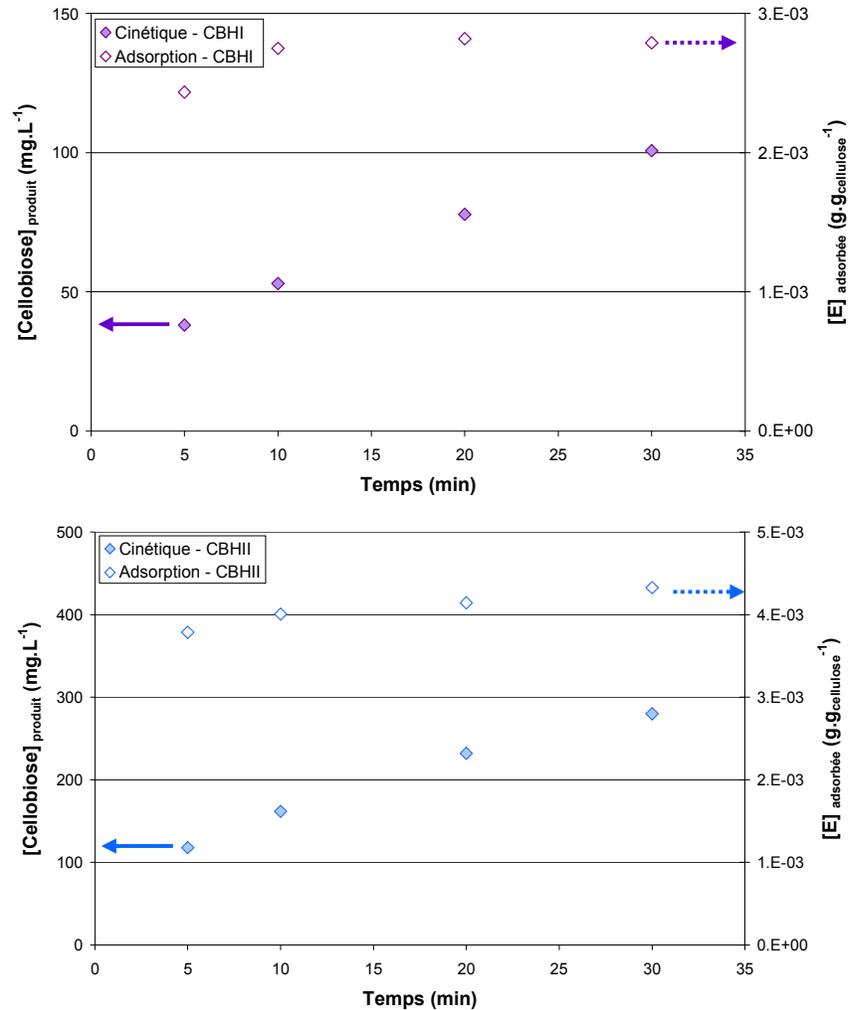


Figure 3-2: Comparaison entre la cinétique d'adsorption et de saccharification pour CBHI et CBHII

Légende: 1% de cellulose, T=50°C, [CBHI] = 3,3 mg.cellulose⁻¹ et [CBHII] = 5,2 mg.cellulose⁻¹

Des isothermes d'adsorption pendant la cinétique ont ainsi pu être tracées et comparées aux isothermes tracées à 4°C (Figure 3-3). Pour les deux enzymes, l'adsorption est plus importante à 4°C qu'à 50°C, confirmant que la désorption des enzymes est facilitée par l'augmentation de la température. De plus, les isothermes montrent que la quantité maximale de CBHI adsorbable à 50°C est supérieure à celle de CBHII, ce qui est conforme aux données de la littérature [48,99]

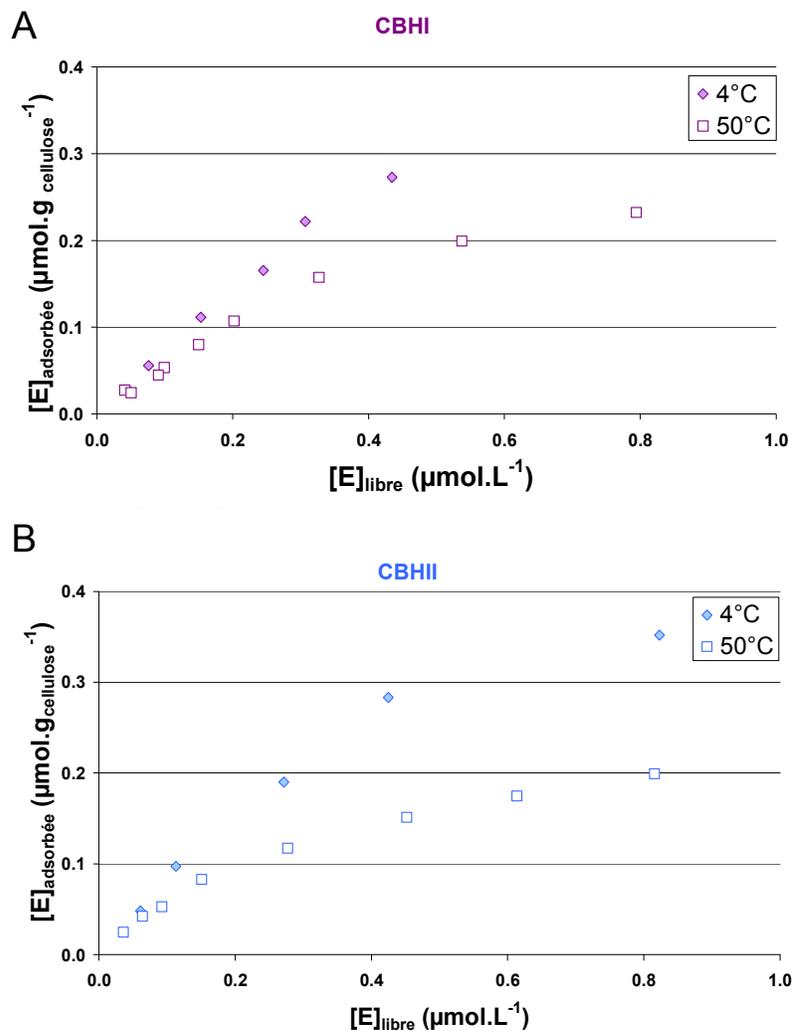


Figure 3-3: Comparaison des isothermes d'adsorption à 4°C et 50°C (pendant la réaction)

Légende: A:1% de cellulose, [CBHI] variables, B:1% de cellulose, [CBHII] variables

Les sucres libérés ont été analysés par chromatographie ionique en utilisant la méthode décrite dans le paragraphe 2.2.3 qui permet de doser le glucose et ses oligomères (Degré de Polymérisation : 2 à 6). Comme attendu, le cellobiose est le sucre majoritairement libéré, mais des traces de glucose et de cellotriose sont également détectées.

La Figure 3-4 présente les proportions moyennes des différents sucres obtenues lors de l'hydrolyse de la cellulose Avicel PH101 (1%) par CBHI à différentes concentrations. Même si le profil de sucres libérés semble relativement constant lors de l'hydrolyse, on observe une légère augmentation de la proportion de glucose et de cellobiose et une diminution du cellotriose au cours de la réaction. Le deuxième graphique représente l'évolution de la concentration des trois sucres en fonction du temps pour une concentration en CBHI de 66 mg.L⁻¹ avec 1% de substrat.

On remarque une stabilisation de la quantité de cellotriose et une légère augmentation de la quantité de glucose.

- Plusieurs hypothèses sont envisageables. D'une part, la présence de glucose et de cellotriose serait expliquée par un défaut lors de 'l'attaque initiale' des enzymes sur le substrat d'où une stabilisation de la concentration en cellotriose [21]. D'autre part, la légère augmentation de glucose pourrait signifier un phénomène de désorption / adsorption des enzymes qui entraînerait une production continue d'une faible quantité de glucose. La concentration en cellotriose serait constante car une part du cellotriose serait hydrolysée en glucose et cellobiose. Etant donné les faibles proportions de glucose et de cellotriose libérées au cours de l'hydrolyse de la cellulose par les cellobiohydrolases, la formation de ces produits ne sera pas modélisée.

Des résultats semblables ont été trouvés concernant CBHII et ils sont présentés dans la Figure 3-5.

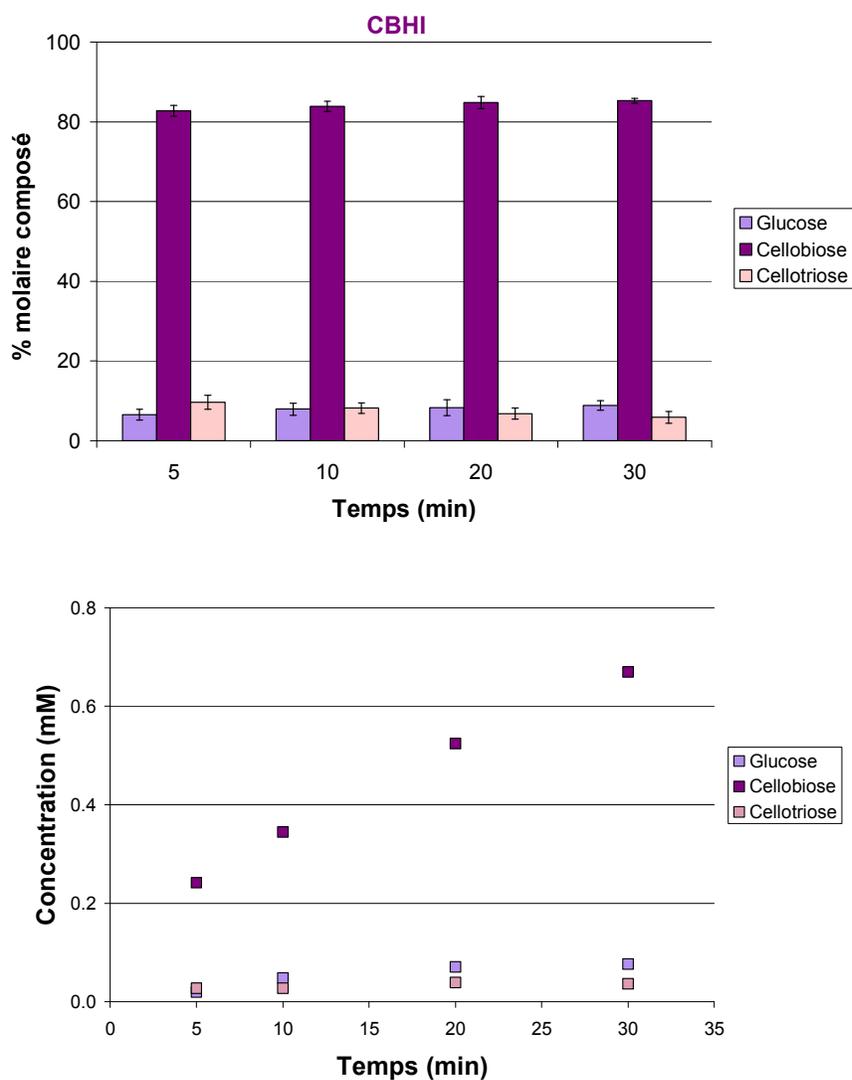


Figure 3-4: Cinétique de saccharification de la cellulose Avicel par CBHI .

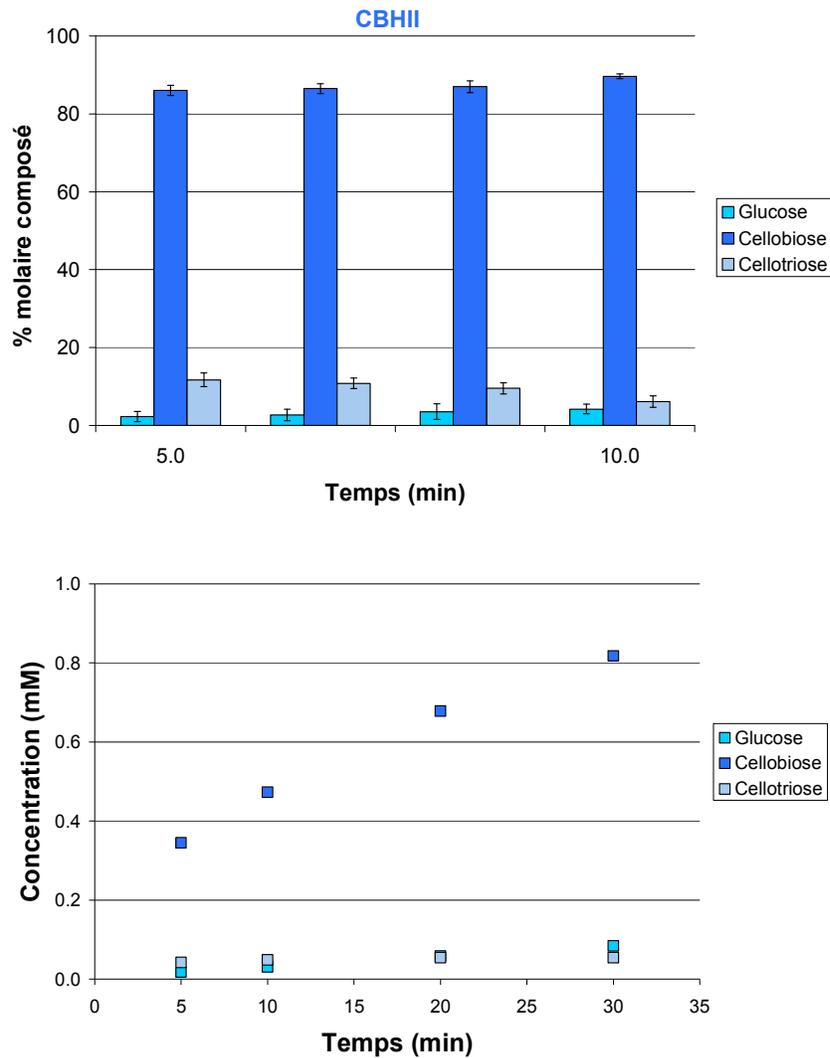


Figure 3-5: Cinétique de saccharification de la cellulose Avicel par CBHII

1.3.2. Influence de la concentration en enzymes

Les vitesses initiales de formation de cellobiose et de sucres totaux ont été déterminées en fonction de la quantité d'enzymes adsorbées sur 1% de cellulose (Figure 3-6). Nous avons pu observer une linéarité entre la vitesse initiale et la quantité d'enzymes CBHI adsorbées. En revanche, la droite de régression concernant CBHII ne passe pas par l'origine. Ce résultat est comparable à celui de Nidetzky et al [45] qui ont montré que la vitesse initiale apparente est linéaire par rapport à la concentration en complexe enzyme / substrat pour CBHI tandis que pour CBHII la droite présentant la variation de la vitesse initiale apparente en fonction de la concentration en complexe enzyme / substrat ne passe pas par l'origine.

Une des hypothèses retenues pour expliquer ce phénomène est que cette vitesse correspondrait à la vitesse de libération des premiers sucres lors de la fixation des enzymes et non à la phase d'action processive de l'enzyme.

En comparant l'activité des deux enzymes, il apparaît clairement que CBHII a une meilleure activité d'hydrolyse que CBHI. Pour paramétrer le modèle d'hydrolyse de la cellulose, il est donc important de caractériser les deux enzymes séparément. On pourra ainsi modéliser des cocktails enzymatiques ayant des proportions CBHI/CBHII variables.

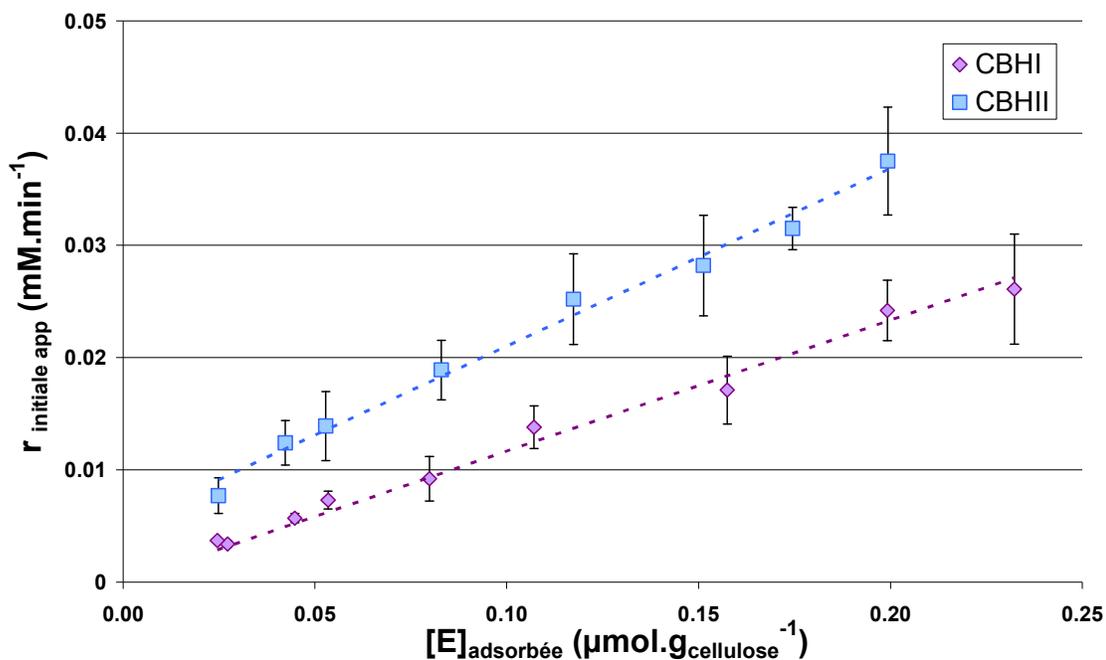


Figure 3-6: Évolution de la vitesse de production de cellobiose en fonction de la quantité d'enzymes adsorbées

1.3.3. Étude de l'inhibition par les produits de la réaction

Comme la majorité des enzymes, les cellobiohydrolases sont inhibées par leurs produits de réaction. Dans la littérature, l'inhibition par le cellobiose est bien établie tandis que l'inhibition par le glucose fait encore débat [29,31]

Une étude de l'influence de la présence d'inhibiteur sur la vitesse initiale a été réalisée pour le glucose. Cette étude n'a en revanche pas pu être réalisée pour le cellobiose compte-tenu des difficultés d'analyses. Il est en effet impossible de différencier le cellobiose ajouté dans la réaction pour étudier son inhibition, du cellobiose issu de la conversion enzymatique. De plus, l'inhibition par le cellobiose reste faible car dans le cocktail réel, la présence de la β -glucosidase limite la quantité de cellobiose présent dans le milieu réactionnel.

La Figure 3-7 présente les cinétiques d'hydrolyse et d'adsorption sur Avicel des enzymes CBHI et CBHII en fonction de la quantité de glucose ajoutée à l'état initial. Il apparaît clairement

que CBHI est très peu affectée par la présence de glucose tandis que l'activité de CBHII est fortement diminuée en présence de glucose. Cette figure présente également l'évolution de la quantité d'enzymes adsorbées en fonction de la quantité de glucose ajoutée à l'état initial, 100% représentant la quantité d'enzymes adsorbées en absence de glucose. On peut voir que dans les deux cas, la présence de glucose ne modifie pas l'adsorption des enzymes sur le substrat sauf en présence d'une forte quantité de glucose (120g.L^{-1}). Cependant, pour CBHII, la légère diminution de l'adsorption des enzymes sur le substrat ne peut expliquer à elle seule la forte diminution de l'activité d'hydrolyse. Il est possible qu'après adsorption sur le substrat, la progression de l'enzyme soit bloquée par la présence de molécules de glucose.

Plusieurs modèles d'inhibitions ont été testés (compétitif, non compétitif et incompétitif) et le modèle de l'inhibition non compétitive par les produits de réaction semble le plus adapté pour traduire les phénomènes observés. En effet, dans ce modèle, la présence d'un inhibiteur a peu d'effet sur la quantité d'enzymes adsorbées et l'inhibition est majoritairement due à la formation d'un complexe enzyme / substrat / produit. Enfin, cette étude montre une nouvelle fois qu'il est important de différencier l'activité des deux enzymes, car elle présente un comportement différent en présence de glucose.

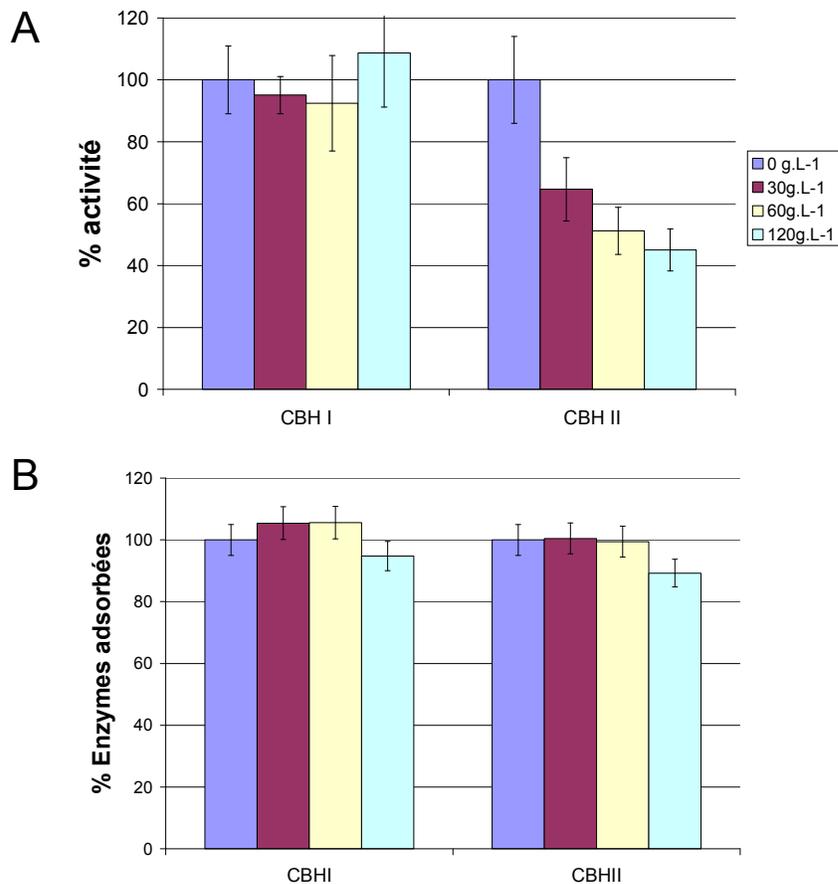


Figure 3-7: Impact de la présence de glucose sur l'activité (A) et la fixation (B) de CBHI sur Avicel.

La barre 100% correspond respectivement à l'activité l'activité de l'enzyme (A) et la quantité d'enzyme fixée (B) sans ajout initial de glucose.

1.3.4. Influence de la température

L'influence de la température sur les enzymes CBHI et CBHII a été évaluée sur les deux enzymes entre 30 et 55°C et l'énergie d'activation de chacune des enzymes a pu être déterminée en utilisant la linéarisation de l'équation d'Arrhenius (Figure 3-8). L'énergie d'activation de CBHI a été approximée à 38,8 kJ.mol⁻¹ et celle de CBHII à 30,5 kJ.mol⁻¹. Il n'y a pas de valeurs d'énergies d'activation pour les cellobiohydrolases disponibles dans la littérature mais les valeurs obtenues restent caractéristiques des réactions enzymatiques.

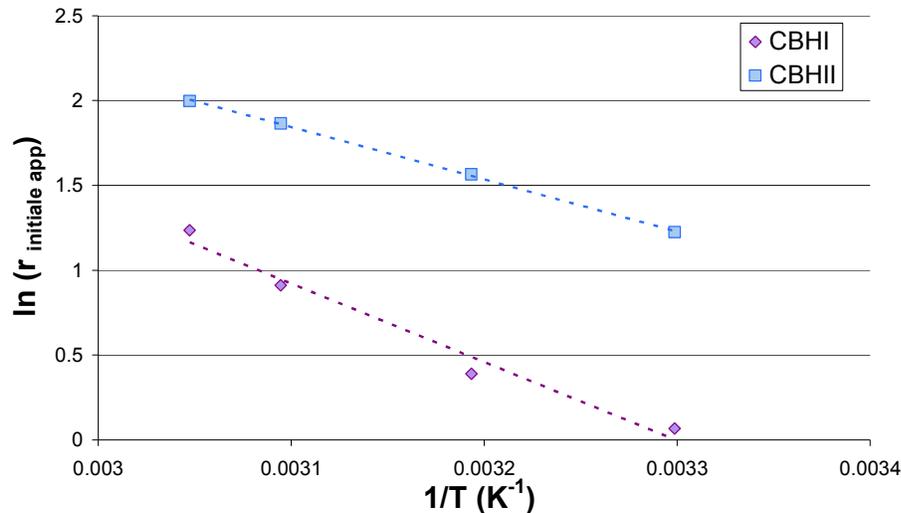


Figure 3-8: Linéarisation de la loi d'Arrhenius pour la détermination de l'énergie d'activation des enzymes CBHI et CBHII

1.4. Intégration du mode d'action des cellobiohydrolases dans le modèle.

L'étude cinétique présentée montre l'importance de considérer l'adsorption des enzymes sur le substrat. En effet, dans la gamme de conditions opératoires étudiées, la quantité d'enzyme adsorbée n'est pas proportionnelle à la quantité d'enzyme introduite mais pourra être décrite par un modèle de type Langmuir. De plus, la vitesse apparente d'hydrolyse est proportionnelle à la quantité d'enzymes adsorbées, grandeur qu'il sera nécessaire de bien décrire dans le modèle.

L'étude de l'inhibition par le glucose montre que la présence de ce dernier a peu d'impact sur l'adsorption des enzymes, mais qu'il a plus d'influence sur l'activité enzymatique de CBHII. Le modèle d'inhibition non compétitive par les produits de réaction sera utilisé pour décrire ce phénomène. Enfin, l'impact de la température sera pris en compte par l'introduction d'une énergie d'activation suivant la loi d'Arrhenius. Le mécanisme réactionnel ainsi que les équations cinétiques seront décrites de manière précise dans le Chapitre 5.

2. Les endoglucanases

2.1. Enzymes et substrat d'étude

A l'heure actuelle, sept endoglucanases ont été identifiées dans le génome et détectées dans le cocktail enzymatique sécrété par *T. reesei*. EGI est l'endoglucanase majoritaire et représente environ 50% des endoglucanases présentes dans le cocktail [10]. Par souci de simplification du système en vue de la création d'un modèle cinétique, seule EGI a été étudiée. L'endoglucanase est connue pour être une enzyme qui hydrolyse aléatoirement les chaînes de cellulose, principalement au niveau des zones amorphes.

Il a été envisagé dans un premier temps d'étudier la cinétique de la réaction sur un substrat modèle amorphe. Pour l'obtenir, deux types de méthodes sont décrits dans la littérature pour préparer ce type de substrat: (i) des méthodes chimiques par dissolution / recristallisation de la cellulose ou par traitement acide, (ii) un traitement mécanique par "ball milling". Les méthodes chimiques consistent à solubiliser la cellulose dans différents solvants organiques comme les mélanges SO₂/DMSO/DEA [118] ou DMSO/PF [119], avant de la régénérer ensuite dans de l'eau ou du méthanol. Un traitement à l'acide phosphorique (H₃PO₄) avec régénération dans l'eau [120,121] semble également rendre la cellulose amorphe. Les celluloses produites par ces méthodes chimiques présentent après analyse par diffraction des rayons X un caractère amorphe. Cependant, le phénomène de dissolution / recristallisation semble aussi entraîner la formation de cellulose II [62,63], ce qui change complètement sa structure. La méthode mécanique est une autre méthode de préparation de la cellulose amorphe qui permet de s'affranchir du phénomène de mercerisation. Cette méthode appelée 'ball milling' consiste à broyer la cellulose avec des boulets afin de "casser" la structure cristalline de la cellulose et de la rendre plus amorphe [120]. Cette méthode entraîne cependant en plus de la baisse de cristallinité, une forte diminution du degré de polymérisation ce qui rend difficile la comparaison des cinétiques d'hydrolyse entre la cellulose initiale et celle ayant subi ce traitement. Compte tenu de ces difficultés, les paramètres cinétiques de EGI ont finalement été déterminés sur la cellulose de référence Avicel.

Comme l'action des endoglucanases est aléatoire sur le polymère de cellulose, on peut suivre la réaction d'hydrolyse par l'évolution du nombre de bout de chaîne aux cours de la cinétique. Cependant, la méthode classique de suivi du nombre de bouts de chaînes par dosage avec du DNS ou la mesure de la viscosité intrinsèque permettant de déterminer le degré de polymérisation moyen ne sont pas assez sensibles. La principale raison est que l'attaque par les endoglucanases a lieu uniquement à la surface de la cellulose et que seule une faible proportion de chaînes est concernée par cette action. Seul le suivi de la formation des oligomères solubles a pu être réalisé par chromatographie ionique (Méthode 2 décrite dans la section 3.2.3).

Étant donnée les faibles quantités d'enzymes EGI purifiées disponibles et des difficultés de suivi de la réaction, seule l'influence de la concentration en enzyme a été étudiée sur l'adsorption et sur la cinétique à 50°C.

Tableau 3-2: Paramètres expérimentaux utilisés pour les tests d'hydrolyse par EGI

	Substrat	Enzyme	[S]	[E]	T	[Glucose]
		g.L⁻¹	g.L⁻¹	mg.g_{cell}⁻¹	°C	g.L⁻¹
Tests cinétiques						
Enzymes pures	Cellulose Avicel	EGI	10	0,46 à 37,0	50	-

2.2. Étude cinétique

2.2.1. Suivi des tests de cinétique initiale

Le suivi de la quantité d'enzymes EGI adsorbées pendant la réaction d'hydrolyse a permis d'une part de constater que l'équilibre d'adsorption était rapidement atteint (90% des enzymes adsorbées à 30 minutes le sont après seulement 5 minutes et d'autre part de tracer l'isotherme d'adsorption (Figure 3-9). Comme pour les cellobiohydrolases, un modèle d'adsorption de type Langmuir pourra être utilisé pour décrire l'adsorption des endoglucanases sur la cellulose.

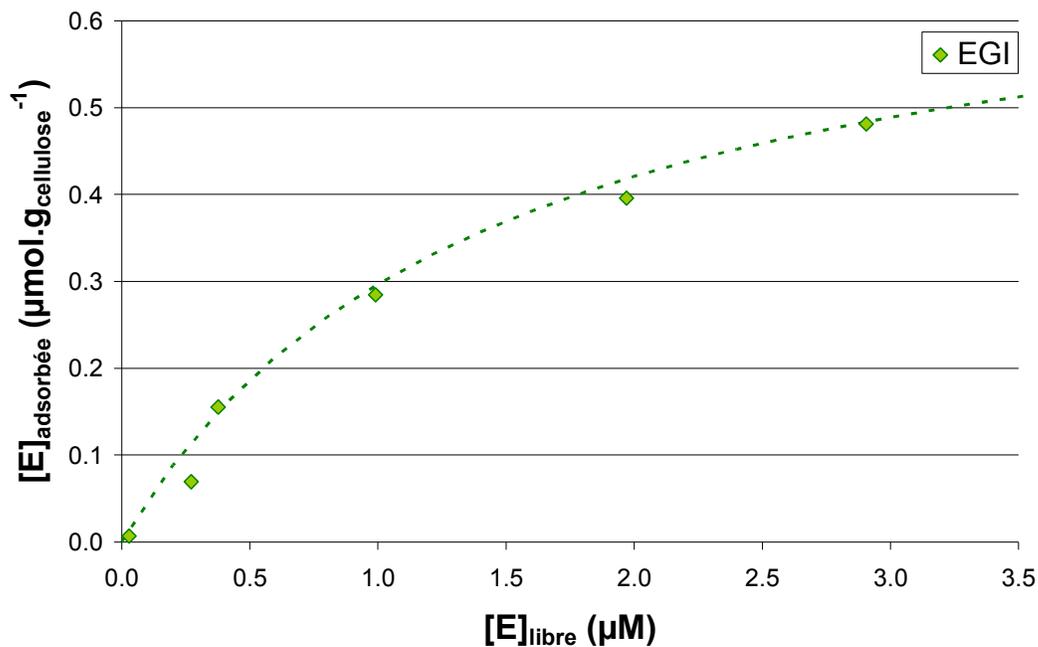


Figure 3-9: Isotherme d'adsorption de EGI à 50°C (en cinétique)

Le produit soluble majoritaire libéré lors de la réaction d'hydrolyse de la cellulose par EGI est le cellobiose. Des traces de glucose ont également été détectées mais seule la teneur en cellobiose libérée a pu être quantifiée. Aucun oligomère au delà du cellobiose n'a été détecté dans le milieu, EGI est donc très active en milieu soluble et hydrolyse tous les oligosaccharides libérés en cellobiose, son principal produit final d'hydrolyse.

2.2.2. Influence de la concentration en enzyme

Étant donné que seule la production de cellobiose a pu être suivie, la Figure 3-10 présente l'évolution de la quantité de cellobiose produit en fonction de la quantité d'EGI adsorbée sur la cellulose. La vitesse semble relativement proportionnelle à la quantité d'enzyme adsorbée, ce qui est similaire aux observations faites lors de l'étude des cellobiohydrolases. Cependant, étant

donnée la faible quantité de cellobiose produite, la précision sur les vitesses déterminées reste faible.

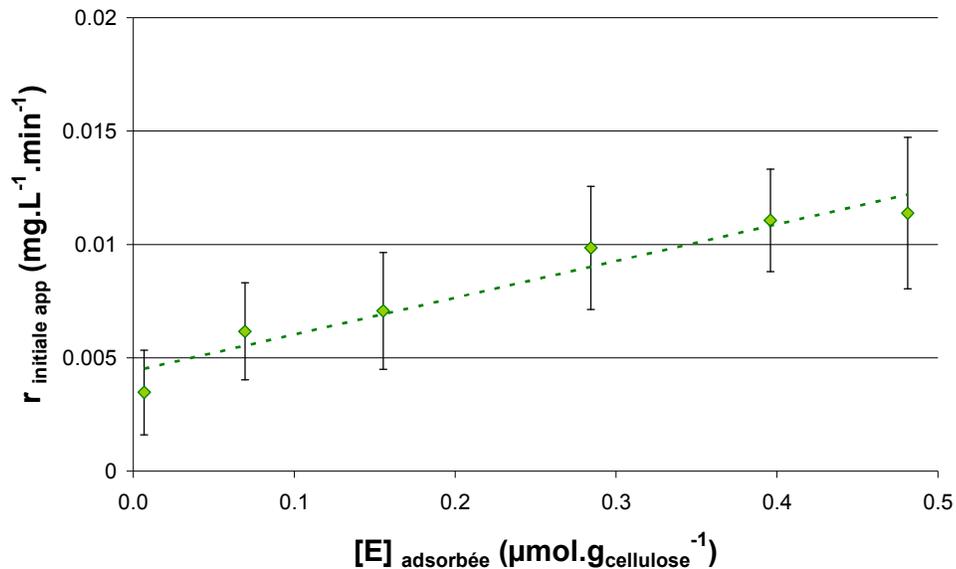


Figure 3-10: Évolution de la quantité de cellobiose produit en fonction de la quantité d'enzymes EG1 adsorbées (T=50°C-Cellulose Avicel à 1%)

2.3. Intégration du mode d'action des endoglucanases dans le modèle.

Peu de tests ont pu être faits pour l'étude cinétique des endoglucanases et l'enzyme EGI qui a servi de modèle ne reflète pas complètement le mode d'action de ces enzymes. Il a cependant été démontré que l'adsorption des enzymes suivait un modèle de type 'Langmuir' ce qui est cohérent avec les quelques données de la littérature.

Le cellobiose est l'espèce soluble majoritairement produite et la quantité de cellobiose libérée est proportionnelle à la quantité d'enzymes adsorbées. L'activité d'hydrolyse par EGI semble donc être reliée à la quantité d'enzymes adsorbées et ainsi le modèle de type "Langmuir" avec une inhibition non compétitive par le glucose et le cellobiose choisi pour la description de l'action des cellobiohydrolases pourra également être utilisé pour la description de l'endoglucanase EGI.

3. Comparaison endoglucanase - cellobiohydrolases

Les endoglucanases et les cellobiohydrolases sont les deux types d'enzymes qui agissent directement sur le substrat solide. Il est intéressant, même si leur mode d'action reste complètement différent, de comparer leur capacité d'adsorption et leur cinétique de production de cellobiose.

3.1. Isotherme d'adsorption

L'adsorption des trois enzymes CBHI, CBHII et EGI a pu être comparée en cours d'hydrolyse à 50°C. La Figure 3-11 représente l'ensemble des isothermes d'adsorption, étudiés sur une gamme de concentrations en enzymes plus large dans le cas d'EGI. Le comportement de ces trois enzymes semble proche même s'il serait intéressant de comparer l'adsorption des cellobiohydrolases pour des concentrations en enzymes supérieures pour avoir plus de certitudes.

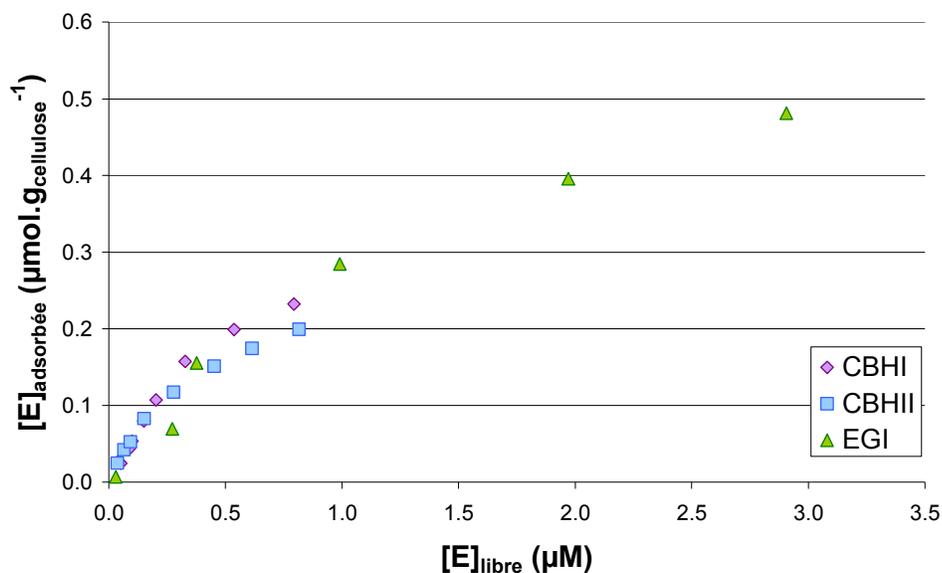


Figure 3-11: Comparaison des isothermes d'adsorption à 50°C de CBHI, CBHII et EGI

3.2. Cinétique d'hydrolyse

La Figure 3-12 présente l'évolution des vitesses initiales apparentes de formation de cellobiose en fonction de la quantité d'enzymes adsorbées pour les trois enzymes. Pour chaque enzyme, il existe une relation de proportionnalité entre la quantité d'enzymes adsorbées et la vitesse initiale apparente de production de cellobiose. Cette vitesse est cependant très faible pour EGI, ce qui confirme l'avantage d'une action processive des enzymes pour convertir la cellulose en cellobiose.

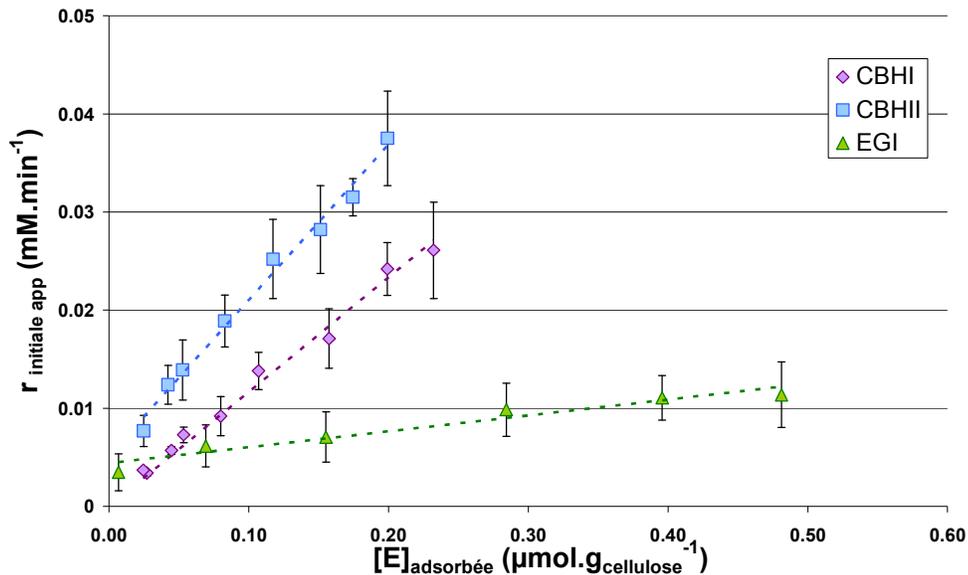


Figure 3-12: Vitesse de production de cellobiose en fonction de la quantité d'enzymes adsorbées pour CBHI, CBHII, et EGI (T=50°C- Cellulose Avicel 1% - Cinétique 30 minutes)

4. La β -glucosidase

4.1. Enzymes et substrats d'étude

La β -glucosidase est l'enzyme qui permet d'hydrolyser le cellobiose, libéré par l'action commune des endoglucanases et des cellobiohydrolases, en glucose. Cette réaction est la seule qui a lieu en milieu homogène. Le substrat de référence choisi pour l'étude cinétique de cette enzyme a naturellement été le cellobiose. Cependant, des substrats chromophores comme le pNPG (para Nitrophenyl β -D-Glucopyrannose) comprenant une molécule de glucose liée en β -1,4 à un groupement phénol, permettent une détermination spécifique de son activité par mesure spectrophotométrique.

Deux β -glucosidases ont été étudiées: (i) la β -glucosidase de *T. reesei* (BGL_T), naturellement présente dans le cocktail sécrété par *T. reesei*, (ii) la β -glucosidase d'*A. niger* (BGL_A) produit industriellement et couramment utilisée pour compléter le cocktail de *T. reesei*.

Le Tableau 3-3 présente les différents paramètres testés et les conditions opératoires associées qui ont été choisies pour cette étude. Les influences des concentrations en substrat, en enzymes et en inhibiteur (glucose) sur la cinétique initiale des β -glucosidases ont été étudiées ainsi que l'influence du pH et de la température.

Tableau 3-3: Conditions choisies pour les tests d'hydrolyse par la β -glucosidase

Cellobiose – β -glucosidase d' <i>A.niger</i>						
Paramètres testés	Paramètres modifiés	[S] ⁰	[E] ⁰	T	pH	[P] ⁰
		mM	mM	°C	-	mM
Substrat		0,23 à 16,2 (0,1 à 5,5 g.L ⁻¹)	4,3.10 ⁻⁵	50	4,8	-
Enzyme		16,2	2,2.10 ⁻⁵ à 8,5.10 ⁻⁵ (2,55 à 10 mg.L ⁻¹)	50	4,8	-
Température		16,2	4,3 . 10 ⁻⁵	30 à 70	4,8	-
pH		16,2	4,3 . 10 ⁻⁵	50	4,0 à 5,5	-
Glucose		2 à 10	4,3 . 10 ⁻⁵	50	4,8	0 à 5,5 (0 à 1 g.L ⁻¹)
Cellobiose - β -glucosidase de <i>T. Reesei</i>						
Substrat		0,25 à 16	4,2. 10 ⁻⁵	50	4,8	-
pNPG – β -glucosidase d' <i>A. Niger</i>						
Substrat / Glucose		0,15 à 5	2.10 ⁻⁵	50	4,8	0 à 333 (0 à 60 g.L ⁻¹)
pNPG – β -glucosidase de <i>T. Reesei</i>						
Substrat / Glucose		0,15 à 5	1.10 ⁻⁶	50	4,8	0 à 166,5 (0 à 30 g.L ⁻¹)

4.2. Étude cinétique de la β -glucosidase d'*A. niger* sur le cellobiose

L'étude cinétique de la β -glucosidase d'*A. niger* a tout d'abord été réalisée sur le cellobiose. Les influences de la concentration en enzyme, en substrat, en inhibiteur, ainsi que des paramètres opératoires (température, pH) ont été étudiées (Tableau 3-4)

Tableau 3-4: Résultats obtenus lors de l'étude cinétique de la β -glucosidase d'*A. niger* sur le cellobiose [111]

Propriétés	Gamme d'étude	Résultats
[Enzyme]	2,2.10 ⁻⁵ à 8,5.10 ⁻⁵ mM	Vitesse d'hydrolyse proportionnelle à la [Enzymes] Linéarisation de Hanes
[Substrat]	0,23 à 16,2 mM	Détermination des paramètres de M-M: K_m^{app} = 0,87 mM et V^{app} = 0,083 mM.min⁻¹
[Substrat] +	2 à 10 mM	Linéarisation Lineweaver & Burk Point d'intersection sur l'axe des ordonnées:
[Produit] (glucose)	0 à 5,7 mM	Modèle M-M avec inhibition compétitive par le glucose K_p^{app} = 3,1 mM
Température	30 à 70 °C	Maximum d'activité à 60°C Énergie d'activation (loi d'Arrhenius): E_a^{app} = 53,2 kJ.mol⁻¹ Littérature: 52.5 kJ.mol⁻¹ [41] et 46 kJ.mol⁻¹ [42]
Stabilité thermique	50°C 0 à 72h	Pas de perte d'activité d'hydrolyse – Enzyme stable à 50°C
pH	4,0 à 5,6	Maximum d'activité entre pH 4,5 et 4,8

La réaction de dégradation du cellobiose en glucose par la β -glucosidase est une réaction enzymatique classique qui, contrairement aux réactions impliquant les cellobiohydrolases et les endoglucanases, se déroule en milieu homogène. Le modèle cinétique de Michaelis-Menten permet donc de décrire ce type de réaction.

La linéarisation de Lineweaver et Burk, déterminant les constantes de l'enzyme K_m et V_{max} par la représentation des inverses a été réalisée pour différentes concentrations en glucose (inhibiteur). Ceci nous permet de discriminer le type d'inhibition mis en jeu: compétitive, non compétitive ou incompétitive. Le point d'intersection des trois droites ayant une iso-concentration en glucose se trouve au niveau de l'axe des ordonnées, confirmant une inhibition compétitive par le glucose. Le modèle choisi pour décrire cette réaction est donc un modèle de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le glucose. Il est présenté dans le Tableau 3-5 et dans la suite de l'étude, les paramètres cinétiques seront déterminés afin de comparer les deux β -glucosidases (*A. niger* et *T. reesei*) sur les deux substrats (cellobiose et pNPG).

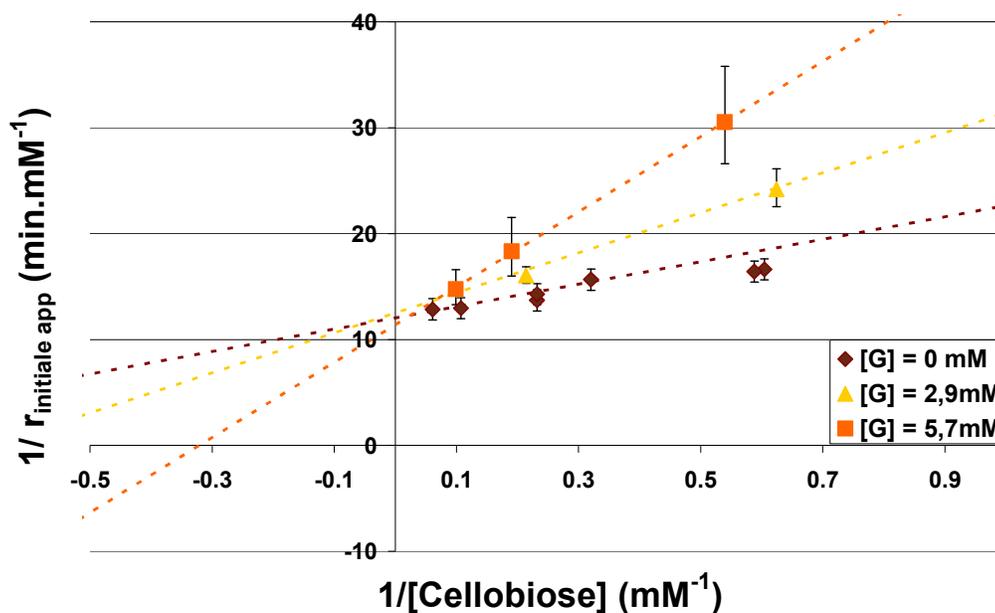


Figure 3-13: Linéarisation de Lineweaver et Burk pour la β -glucosidase de *A. niger* sur le cellobiose

Tableau 3-5: Description du modèle utilisé pour décrire l'action de la β -glucosidase

Paramètres variables	Concentration en substrat	$[S]$	mM
	Concentration en enzyme	$[E]$	mM
	Concentration en produit	$[P]$	mM
Constantes	Énergie d'activation apparente	E_a^{app}	kJ.mol^{-1}
	Facteur pré exponentiel apparent	A^{app}	min^{-1}
	Constante de Michaelis-Menten apparente	K_m^{app}	mM
	Constante d'inhibition apparente (glucose)	K_p^{app}	min^{-1}
Modèle de Michaelis –Menten (<i>inhibition compétitive</i>)	$v_{ini} = \frac{V^{app} [S]^0}{K_m^{app} \left(1 + \frac{[P]^0}{K_p^{app}} \right) + [S]^0} = \frac{A^{app} \cdot \exp\left(\frac{-E_a^{app}}{RT}\right) [E]^0 [S]^0}{K_m^{app} \left(1 + \frac{[P]^0}{K_p^{app}} \right) + [S]^0}$		

4.3. Étude de la β -glucosidase d'*A. niger* sur pNPG

L'étude cinétique de la β -glucosidase d'*A. niger* (BGL_A) sur pNPG a été effectuée afin de valider ce substrat pour la caractérisation cinétique de ces enzymes. Après avoir vérifié la linéarité en fonction de la concentration en enzymes, l'influence de la concentration en substrat et en inhibiteur a été évaluée. L'ensemble des tests sont réalisés sur plaque 96 puits permettant de tester six conditions différentes en triplicat en moins de trois heures. Ainsi, il est possible de déterminer rapidement la constante de Michaelis-Menten d'une enzyme. L'étude de l'inhibition est également facilitée car l'inhibiteur et le produit formé (*p*-nitrophenol) sont différents. Il est ainsi possible d'étudier la cinétique en présence de fortes concentrations en glucose, ce qui n'est pas réalisable sur substrat naturel.

Après vérification du mécanisme d'inhibition compétitive (linéarisation de Lineweaver Burk), les constantes de Michaelis-Menten et d'inhibition de la β -glucosidase d'*A. niger* ont été déterminées en utilisant des concentrations en glucose comprises entre 0 et 60 g.L^{-1} . Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3-6.

Tableau 3-6: Paramètres cinétiques de la β -glucosidase d'*A. niger* d'après le modèle de Michaelis-Menten

Propriétés	Cellobiose	pNPG
K_m^{app} (mM)	0.88	0.57
K_p^{app} inhibition compétitive (mM)	3.40	2.70
K_m^{app}/K_p^{app}	0.26	0.21

On remarque d'une part que la constante K_m^{app} est inférieure pour le pNPG traduisant une meilleure affinité de la β -glucosidase pour le substrat chromophore ce qui est cohérent avec les résultats de Seidle [93] et Dekker [41]. On remarque d'autre part que le ratio K_m^{app}/K_p^{app} est proche pour les deux substrats. L'inhibition étant compétitive, le produit (ici le glucose) se lie à l'enzyme pour former un complexe inactif et cet équilibre ne dépend pas de la nature du substrat. Il est donc logique que le glucose oriente de façon identique la réaction et ceci quel que soit le substrat. La conservation du ratio K_m^{app}/K_p^{app} confirme à nouveau l'hypothèse d'une inhibition de type compétitive.

4.4. Comparaison des β -glucosidases d'*A. niger* et de *T. reesei*

Une étude comparative des β -glucosidases d'*A. niger* et de *T. reesei* a été effectuée afin d'évaluer l'activité de l'enzyme utilisée pour compléter le cocktail de *T. reesei* (BGL_A) et de l'enzyme naturellement présente dans le cocktail enzymatique (BGL_T)

Pour l'étude de la β -glucosidase de *T. reesei* (BGL_T), la constante de Michaelis-Menten a été déterminée sur substrat naturel et chromophore tandis que la constante d'inhibition a uniquement été déterminée sur le substrat chromophore. Les valeurs des constantes cinétiques sont présentées dans le Tableau 3-7.

Les constantes cinétiques (k_{cat}) de la β -glucosidase de *T. reesei* sont supérieures à celles d'*A. niger* pour les deux substrats d'étude démontrant une meilleure activité de l'enzyme de *T. reesei*. De plus, le ratio K_m^{app}/K_p^{app} est inférieur pour le β -glucosidase de *T. reesei*, ce qui indique une meilleure tolérance au glucose. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Grous [44] et montrent l'importance de déterminer des constantes cinétiques à l'aide d'enzymes purifiées.

Tableau 3-7: Comparaison des paramètres cinétiques des β -glucosidases d'*A. niger* et de *T. reesei*

Propriétés	<i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i>
Substrat	pNPG		Cellobiose	
k_{cat} (min ⁻¹)	1582 ± 79	5276 ± 264	1897 ± 95	2445 ± 107
K_m^{app} (mM)	0,57	0,38	0,88	1,83
K_p^{app} inhibition compétitive (mM)	2,70	3,25	3,40	-
K_m^{app}/K_p^{app}	0,21	0,12	0,26	-
k_{cat}/K_m^{app}	2775	13884	2155	1336

Pour les deux enzymes, les paramètres cinétiques ont été déterminés en utilisant des concentrations en glucose allant jusqu'à 30 g.L⁻¹. Les activités mesurées expérimentalement et celles prédites par le modèle sont présentées sur la Figure 3-14. Cette figure permet d'une part de montrer l'importance de l'inhibition par le glucose, les deux β -glucosidases perdant environ 85 % de leurs activités en présence de 30 g. L⁻¹ de glucose, et de valider d'autre part le modèle développé.

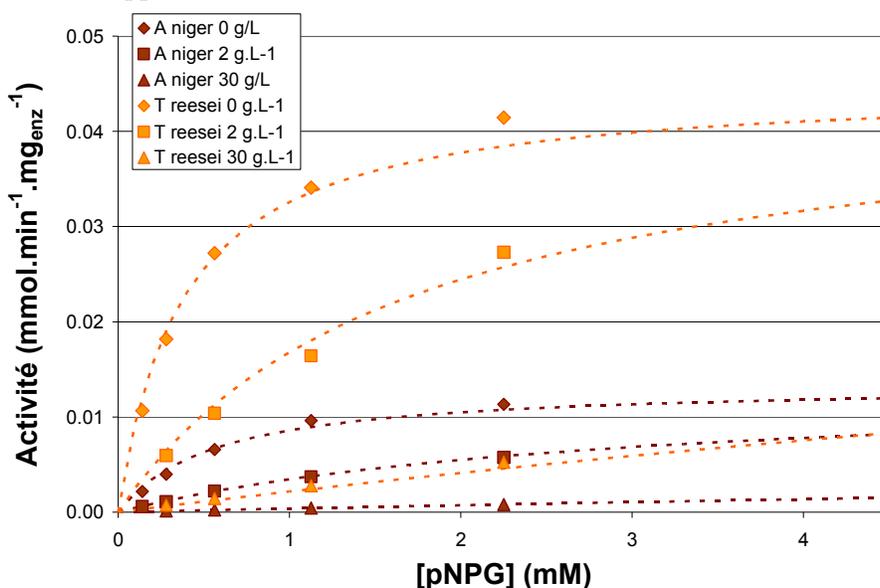


Figure 3-14: Comparaison de l'activité mesurée et prédite en fonction de la concentration en pNPG (Points: Données expérimentales – Courbes: Prédiction du modèle)

4.5. Conclusion sur l'étude de l'activité de la β -glucosidase

Cette étude a permis de déterminer les paramètres cinétiques des β -glucosidase *d'A. niger* (BGL_A) et de *T. reesei* (BGL_T) en utilisant le modèle de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le glucose. La comparaison de l'activité de ces deux enzymes, sur substrats naturel et chromophore, a permis de mettre en évidence plusieurs points:

- le mécanisme d'inhibition est de type compétitif pour les deux enzymes
- l'affinité de la β -glucosidase est plus élevée pour le pNPG
- l'activité globale d'hydrolyse est meilleure pour la β -glucosidase de *T. reesei*
- la β -glucosidase de *T. reesei* est moins sensible à l'inhibition par le glucose

5. Étude de la synergie entre les enzymes cellulolytiques

Le phénomène de synergie existant entre les différentes enzymes cellulolytiques a déjà été clairement mis en évidence [49,52]. Plusieurs types de synergies ont été identifiées: (i) la synergie CBHI / CBHII, (ii) la synergie CBHs / EG et (iii) la synergie CBHs et EG / BGL. Les mécanismes réactionnels expliquant ces phénomènes semblent assez clairs pour les deux dernières synergies mais de grosses incompréhensions persistent pour l'explication de la synergie CBHI / CBHII. La synergie semble dépendre de plusieurs facteurs dont le ratio entre les différentes enzymes ou la concentration totale en enzyme.

L'étude de la synergie a été réalisée pour quatre enzymes (EGI, CBHI, CBHII et BGL), dans les proportions du cocktail enzymatique sécrété par *T. reesei* lors de la fermentation. Un cocktail reconstitué contenant quatre enzymes purifiées de *T. reesei* (CBHI, CBHII, EGI, BGL_T), a donc été défini pour cette étude en fonction des proportions massiques de chaque enzyme présente dans le cocktail réel. Le Tableau 3-8 présente la composition du cocktail réel [10], celle du cocktail reconstitué. Le cocktail réel contient d'autres enzymes en très faibles proportions: environ 3,3% d'endoglucanases secondaires (EGIII, EGIV et EGV), 0,7% d'arabinofuranosidases, 0,3% de mananases et 0,4% de xylanases, le reste des enzymes n'étant pas identifiées.

Dans notre cocktail reconstitué, le mélange EGI – EGII sera représenté par l'enzyme EGI.

Tableau 3-8: Tableau des proportions du cocktail enzymatique réel et du cocktail de référence

Enzymes réelles	% massique réel	Enzymes pures associées	% massique reconstitué
CBHI	42	CBHI	52,5
CBHII	26	CBHII	32,5
EGI + EGII	10	EGI	12,5
BGL_T	2	BGL_T	2,5
Autres	20	-	0
TOTAL CBHs+EGs+BGL	80		100

Pour cette étude des synergies, chaque enzyme a été étudiée seule, puis en binôme, en trinôme et enfin en cocktail complet. Une étude plus approfondie de la synergie CBHI / CBHII a été réalisée en faisant varier les concentrations des deux enzymes afin d'essayer d'identifier les mécanismes réactionnels impliqués dans cette synergie. L'ensemble des tests de cinétique initiale effectués est récapitulé dans le Tableau 3-9.

Tableau 3-9: Tableau récapitulatif des tests de cinétique initiale réalisés

Substrat		Enzyme	[S]	[E]	T	
		g.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mg.g _{cell} ⁻¹	°C	
Tests cinétiques						
Synergie	Cellulose Avicel	CBHI-CBHII	10	I: 0 à 6,6 II: 0 à 10,4	50	
		CBHI-EGI		Proportion cocktail:		
		CBHII-EGI				
		CBHI-BGL_T				
		CBHII-BGL_T				
		EGI-BGL_T	10		CBHI: 1,73 CBHII: 1,07	50
		CBHI-CBHII-EGI			EGI: 0,41	
		CBHI-EGI-BGL_T			BGL: 0,21	
		CBHII-EGI-BGL_T			Etot : 3.4	
		CBHI-CBHII-EGI-BGL_T				

5.1. Synergie CBHI / CBHII

La synergie CBHI / CBHII a été longuement décrite dans la littérature [46-48,50] Cette synergie semble dépendre du ratio entre les enzymes et de la concentration en CBHI et en CBHII. Cependant, les mécanismes réactionnels expliquant cette synergie n'ont pas été identifiés, les deux enzymes étant censées avoir deux mécanismes indépendants, l'une attaquant les bouts de chaînes réducteurs et l'autre les non-réducteurs. Dans un premier temps, la synergie a uniquement été étudiée dans les proportions du cocktail reconstitué (Tableau 3-8) mais il a paru intéressant d'étudier différents ratios et différentes concentrations en protéines pour construire le modèle. La Figure 3-15 présente l'évolution de la vitesse initiale apparente de production du cellobiose en fonction de différents ratios CBHI / CBHII. La vitesse initiale apparente semble proportionnelle à la fois à la concentration en CBHI et CBHII.

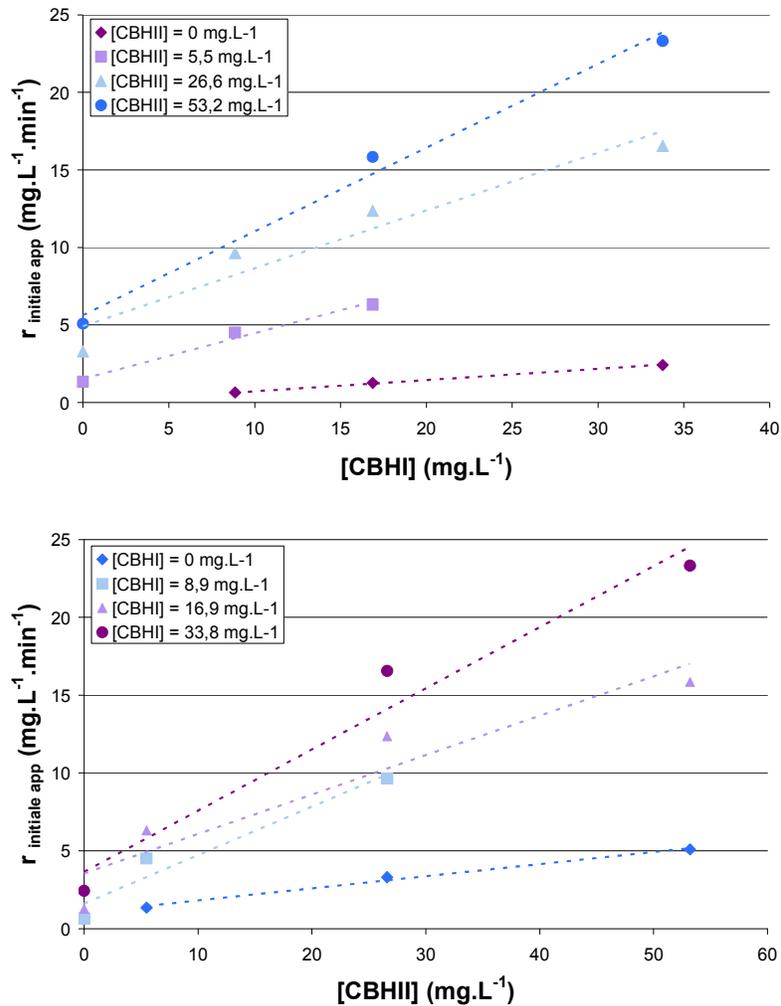


Figure 3-15: Influence de la synergie CBHI.CBHII sur la vitesse de conversion de la cellulose en cellobiose

Le degré de synergie est défini comme le ratio entre la vitesse obtenue si les deux enzymes réagissent ensemble sur la somme des vitesses obtenues lorsqu'elles agissent séparément. Le Tableau 3-10 présente les degrés de synergie obtenus en fonction des concentrations en CBHI et CBHII introduites. Le degré de synergie augmente lorsqu'on augmente la quantité d'enzymes dans le système et il est différent pour un même ratio CBHI/CBHII.

Tableau 3-10: Tableau récapitulatif des degrés de synergie CBHI/CBHII

		[CBHII] (mg.L ⁻¹)		
		5,5	26,6	53,2
[CBHI] (mg.L ⁻¹)	8,9	2,26	2,44	-
	16,9	2,41	2,70	2,49
	33,8	-	2,89	3,10

Les résultats du Tableau 3-10 démontrent que la synergie dépend du ratio CBHI/CBHII et de la concentration totale en enzyme et que la vitesse initiale apparente est proportionnelle au produit des concentrations en CBHI et CBHII. Ces résultats ne permettent pas de donner une explication claire quant au mécanisme même de synergie. Cependant, pour la modélisation cinétique, un terme de synergie sera introduit et il sera dépendant du produit des concentrations en CBHI et CBHII adsorbées.

5.2. Synergie CBHs / EG

Les cellobiohydrolases et les endoglucanases agissent également en synergie. La Figure 3-16 présente les cinétiques de production de cellobiose en fonction du temps pour CBHI, CBHII et le mélange CBHI-CBHII avec ou sans EGI. Dans les trois cas, la présence de EGI permet d'augmenter de manière significative la production de cellobiose. Ces résultats sont en accord avec les mécanismes proposés dans la littérature. Les endoglucanases coupent de manière aléatoire les chaînes de cellulose, libérant des nouveaux bouts de chaînes réducteurs et non réducteurs pour l'attaque des cellobiohydrolases. D'autre part, l'effet de l'ajout de EGI sur la cinétique de réaction semble plus important pour CBHI que pour CBHII (cf Tableau 3-11 présentant les degrés de synergie mesurés). Or Lantz et al [122] et Zou et al [123] ont montré que CBHII pouvait avoir une activité "endoglucanase", ce qui pourrait expliquer la plus faible synergie entre ces deux enzymes. La possible activité "endoglucanase" de CBHII pourrait également expliquer la meilleure activité de dégradation de CBHII. La synergie entre cellobiohydrolases et endoglucanases pourra être décrite dans notre modèle en tenant compte de l'augmentation, avec l'attaque des endoglucanases, du nombre de sites disponibles pour l'attaque par les cellobiohydrolases. Dans le cadre de ma thèse, l'activité "endoglucanase" de CBHII ne sera pas prise en compte dans le modèle cinétique: les différences de synergie observées entre CBHI et CBHII ne pourront donc pas être décrites.

- Chapitre 3: Étude de la cinétique initiale des enzymes pures -

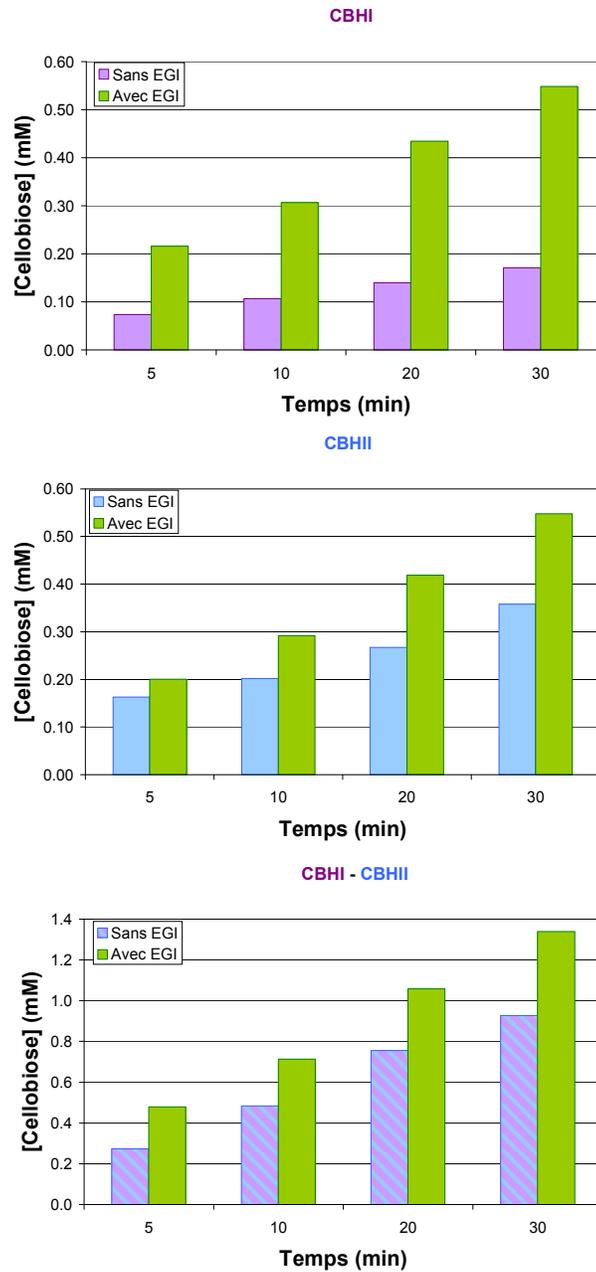


Figure 3-16: Étude de la synergie CBHs / EGI sur la cinétique de production de cellobiose à partir de cellulose, T=50°C, 1% Cellulose Avicel, [CBHI]=17,3 mg.L⁻¹, [CBHII]=10,7 mg.L⁻¹, [EGI]= 0 ou 4,1 mg.L⁻¹.

Tableau 3-11: Tableau récapitulatif des degrés de synergie entre les CBHs et EGI

		CBHI	CBHII	CBHI - CBHII
		17,6 mg.L ⁻¹	10,7 mg.L ⁻¹	17,6 + 10,7 mg.L ⁻¹
[EGI]	4,1 mg.L ⁻¹	1,90	1,25	4,65

5.3. Synergie CBHs et EGs / BGL

Les cellobiohydrolases et les endoglucanases agissent directement sur le substrat solide après adsorption sur le substrat et entraînent la libération de cellobiose. Ces trois enzymes agissent en synergie avec la β -glucosidase. La Figure 3-17 présente l'évolution de la concentration de glucose et cellobiose libérée lors de la réaction, exprimée en équivalent glucose, en fonction du temps, pour les réactions d'hydrolyse de la cellulose par CBHI, CBHII et les mélanges entre CBHI, CBHII et EGI en absence et en présence de β -glucosidase (*T. reesei*). Pour tous les tests, sauf pour le mélange CBHI / EGI, la quantité de sucres libérés est accrue par l'ajout de β -glucosidase. Les cellobiohydrolases sont fortement inhibées par le cellobiose, leur produit de réaction. Or la présence de β -glucosidase permet l'hydrolyse du cellobiose en glucose et limite ainsi l'inhibition des cellobiohydrolases par le cellobiose. De plus, il semblerait que l'effet de la β -glucosidase soit légèrement supérieur pour CBHI par rapport à CBHII car on observe une augmentation de 46,5% de la production de sucres à 30 minutes pour CBHI contre 31,6% pour CBHII. L'étude cinétique des cellobiohydrolases a montré que l'action de CBHII était fortement influencée par la présence de glucose. La réaction d'hydrolyse de la cellulose par CBHII serait alors impactée par le glucose formé, ce qui diminuerait l'effet de l'ajout de la β -glucosidase.

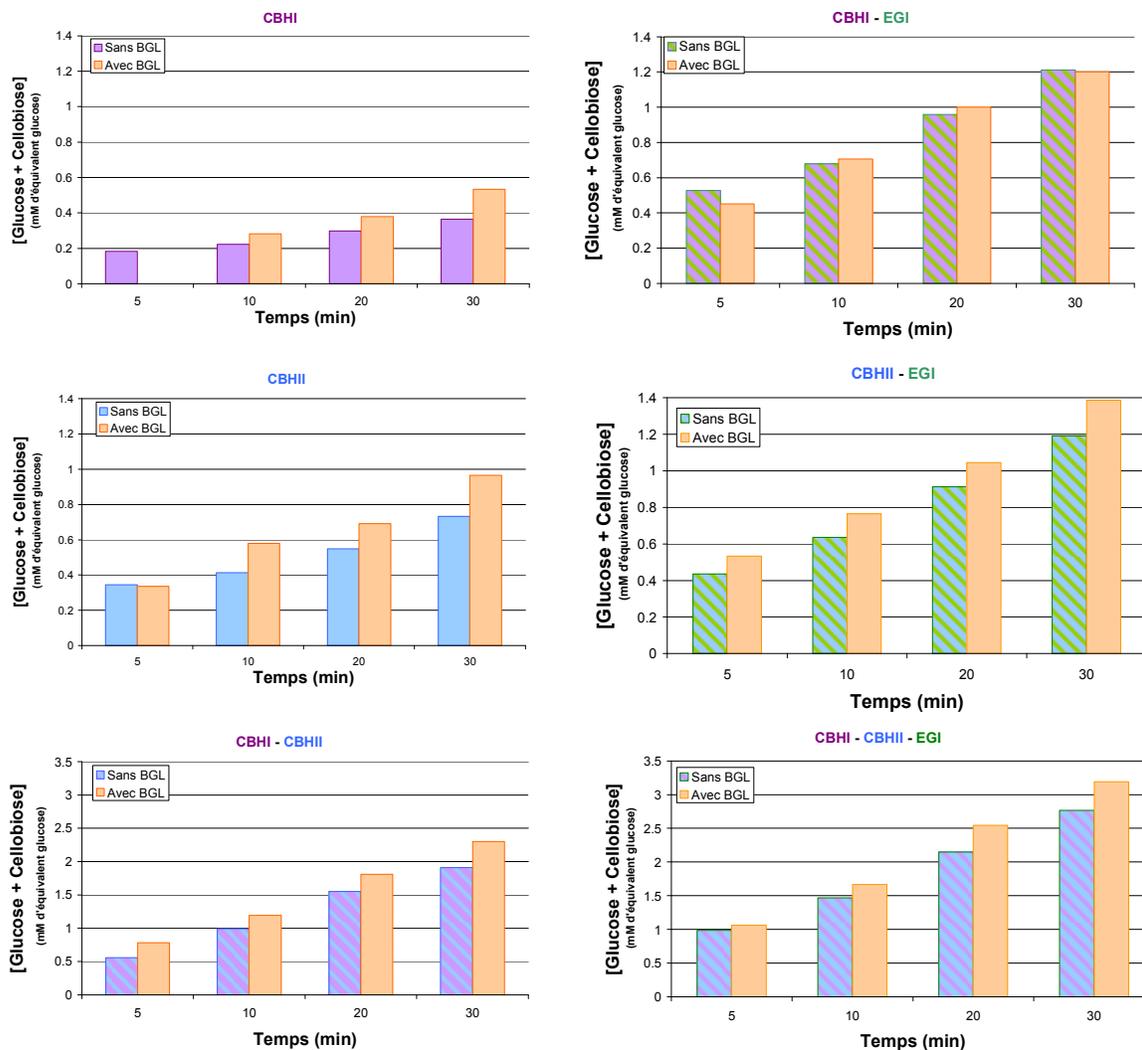


Figure 3-17: Étude de la synergie CBHs / EGI / au cours de la conversion de la cellulose.

Cinétique de production de cellobiose à $T=50^{\circ}\text{C}$, 1% Cellulose Avicel, $[\text{CBHI}]=17,3 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{CBHII}]=10,7 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{EGI}]= 4,1 \text{ mg.L}^{-1}$ et $[\text{BGL}_T]=2,1 \text{ mg.L}^{-1}$

6. Validation du cocktail enzymatique reconstitué

Le cocktail réel sécrété par *T. reesei* contient trois familles d'enzymes: les endoglucanases, les cellobiohydrolases et la β -glucosidase. La première partie de cette étude a été consacrée à l'étude des enzymes seules et en synergie afin de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu lors de l'hydrolyse enzymatique. Nous avons choisi de représenter le cocktail réel par quatre enzymes (EGI, CBHI, CBHII et BGL) et il était important de comparer les performances du cocktail reconstitué par rapport à un cocktail réel afin de valider notre stratégie.

La comparaison des activités des deux cocktails a été effectuée via des tests de cinétique initiale (Chapitre 2, 5.3) et des tests de cinétique globale (Chapitre 2, 5.4). Afin de pouvoir

valider la cohérence des résultats obtenus entre ces deux types de tests, le prélèvement à 1h du test de cinétique globale a été remplacé par un prélèvement à 30 minutes. Les conditions opératoires retenues pour ces essais sont précisées dans le Tableau 3-12

Tableau 3-12: Tests réalisés pour la comparaison cocktail reconstitué / cocktail réel

	Substrat	Enzyme	[S]	[E]	T
		g.L^{-1}	g.L^{-1}	$\text{mg.g}_{\text{cell}}^{-1}$	$^{\circ}\text{C}$
Test cinétique					
Cinétique initiale	Cellulose	Cocktail reconstitué	10	3,4	50
		Cocktail réel		3,4 – 6,8 – 13 5	
Cinétique globale	Avicel	Cocktail reconstitué	10	3,4	50
		Cocktail réel			

Dans un premier temps, l'influence de la concentration en enzymes a été testée pour le cocktail réel. La Figure 3-18 présente l'évolution de la vitesse initiale apparente de production de sucres totaux en fonction de la concentration en enzymes introduites et montre qu'il y a bien une relation de proportionnalité entre ces deux paramètres.

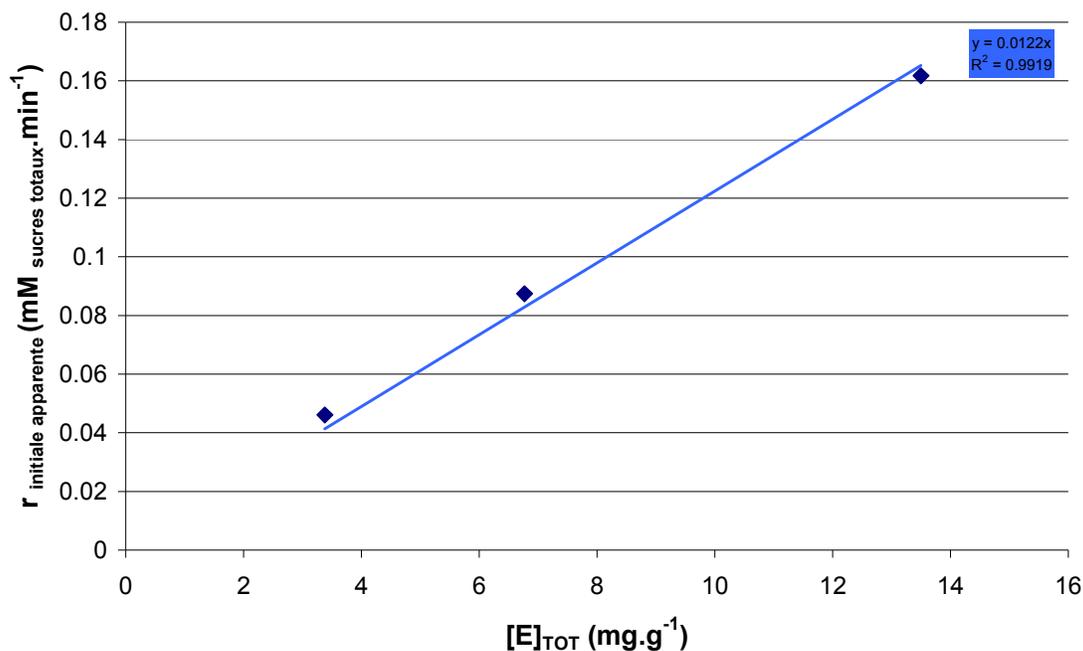


Figure 3-18: Évolution de la vitesse initiale apparente de sucres totaux en fonction de la concentration en enzymes initiales

Les deux premiers graphiques de la Figure 3-19 comparent l'évolution de la concentration en sucres libérés par les cocktails reconstitué et réel et ce en cinétique initiale ou globale.

Pour les tests de cinétique initiale comme pour les tests de cinétique globale, la comparaison de la production globale de sucres (glucose et cellobiose) des deux cocktails

enzymatiques montre que le cocktail reconstitué a une activité d'hydrolyse supérieure au cocktail réel.

Ces tests ont été réalisés avec la même concentration en enzymes alors que la composition des 2 cocktails est différente: les 4 enzymes majoritaires (CBHI-CBHII-EGI et BGL) représentent 80% poids du cocktail réel, tandis qu'elles représentent 100% du cocktail reconstitué. Il est donc normal d'observer une activité plus forte avec le cocktail reconstitué.

De plus, pour les deux types de tests cinétiques, le cocktail reconstitué reproduit bien la production de glucose mais de gros écarts sont observés sur la quantité de cellobiose libéré. En effet, la quantité de glucose formée avec le cocktail réel représente entre 80 et 90% du glucose formé sur cocktail reconstitué tandis que le cocktail reconstitué produit environ deux fois plus de cellobiose que le cocktail réel.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats:

- (i) il y a un défaut d'activité β -glucosidase observé sur le cocktail reconstitué et par conséquent une accumulation de cellobiose
- (ii) il y a une surestimation de l'activité endoglucanases dans le cocktail reconstitué menant à une surproduction de cellobiose.

Dans le premier cas, le défaut d'activité β -glucosidase peut s'expliquer par:

- i) Une sous estimation de la concentration en β -glucosidase dans le cocktail réel
- ii) Une baisse de l'activité β -glucosidase due à la purification de l'enzyme
- iii) Une activité β -glucosidase qui peut être présente dans les 20% d'enzymes non majoritaires du cocktail réel

Dans le second cas, la surestimation de l'activité endoglucanase serait due au fait que le cocktail réel comprend 5% d'EGI et 5% d'EGII alors que seul EGI est représenté dans le cocktail reconstitué. EGI a une activité d'hydrolyse supérieure à EGII, la production de cellobiose peut potentiellement être surestimée dans le cocktail reconstitué.

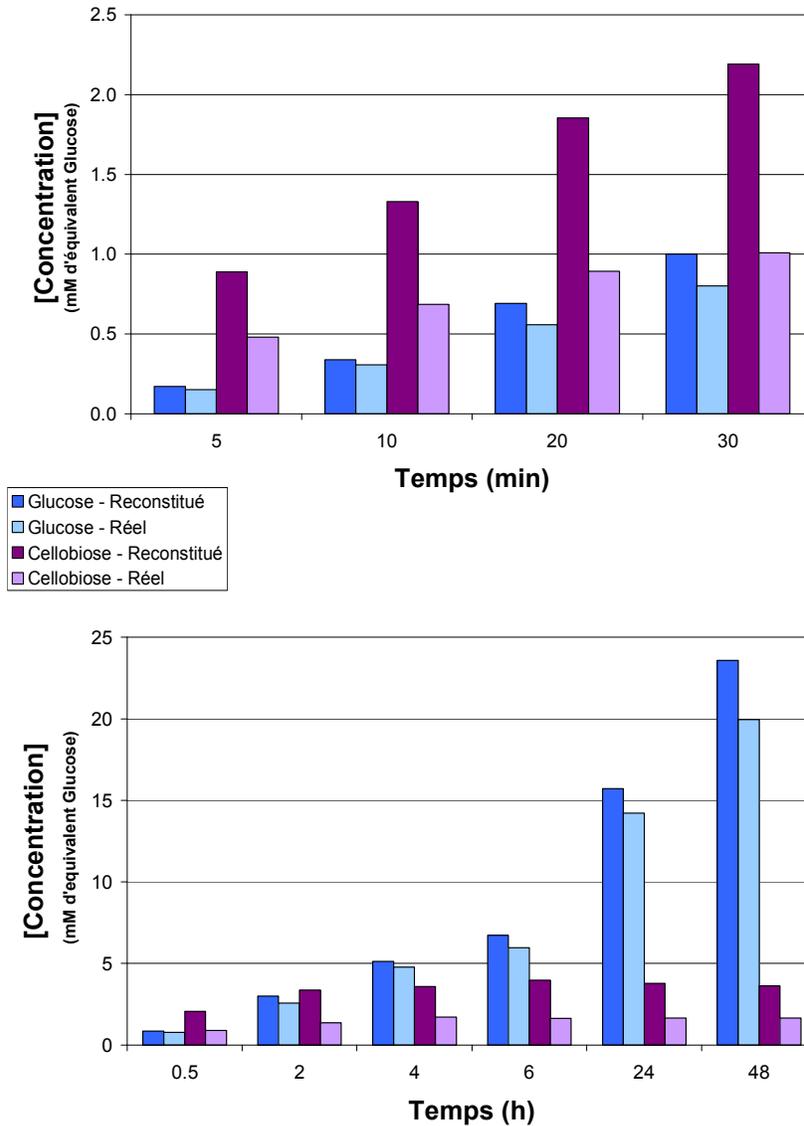


Figure 3-19: Comparaison des performances des cocktails Reconstitué et Réel pour l'hydrolyse de la cellulose.

La Figure 3-20 présente la concentration en sucres (Glucose, Cellobiose, et Sucres Totaux) libérée après 30 minutes de réaction pour les tests de cinétiques initiales et globales. Ce graphique montre que même si la quantité de sucres libérés est toujours supérieure pour le test de cinétique initiale et ceci pour les deux cocktails enzymatiques, la différence reste faible et le cocktail reconstitué est donc bien représentatif du cocktail réel.

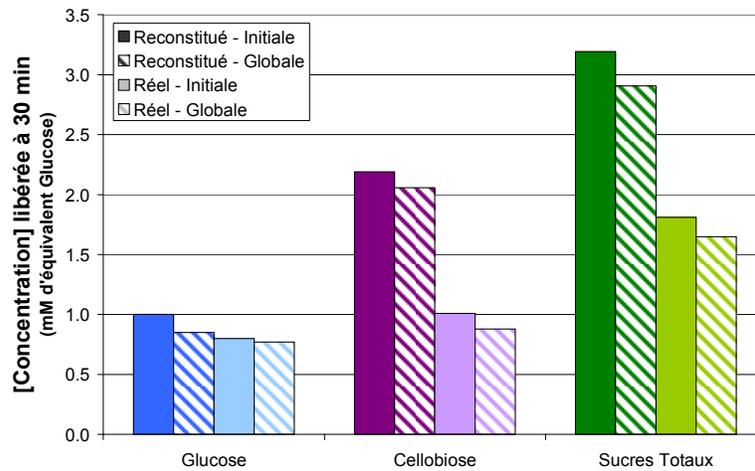


Figure 3-20: Comparaison des tests de cinétiques initiales et globales

D'après la composition du cocktail réel, il y a 20% des enzymes qui ne sont pas des enzymes majoritaires (EGI, CBHI, CBHII et BGL). La Figure 3-21 présente la concentration en sucres libérés en fonction du temps pour le cocktail réel et le cocktail reconstitué, où les performances du cocktail reconstitué ont été diminuées de 20% pour se ramener à une concentration en enzymes actives identique.

Les concentrations en sucres totaux libérés lors des tests de cinétiques globaux semblent alors plus cohérentes pour les deux cocktails. Cependant, le cocktail réel libère plus de cellobiose que le cocktail reconstitué, ce qui peut être dû à une sous-estimation de la quantité de β -glucosidase dans le cocktail reconstitué. On peut donc considérer qu'en se ramenant à la concentration réelle en enzymes actives, le cocktail reconstitué permet une assez bonne description de la cinétique sur des temps d'hydrolyse longs.

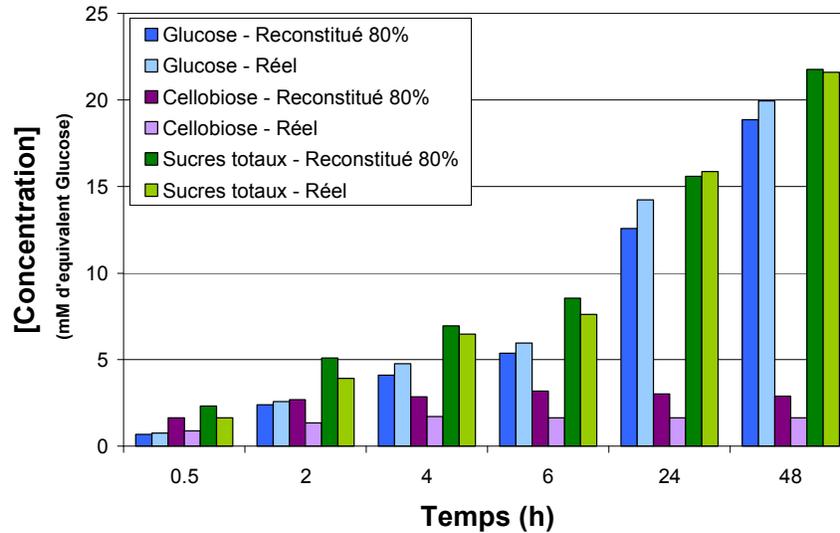


Figure 3-21: Comparaison des cocktails Reconstitué et Réel considérant que seul 80% des enzymes du cocktail réel sont actives

CONCLUSION

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose requiert l'utilisation d'un cocktail enzymatique complexe contenant trois familles d'enzymes: les endoglucanases, les cellobiohydrolases et la β -glucosidase. L'étude cinétique réalisée sur quatre enzymes pures (EGI, CBHI, CBHII et BGL) sélectionnée pour représenter le cocktail enzymatique réel a mis en évidence plusieurs points.

Concernant les enzymes seules, il est important de différencier les enzymes qui attaquent le substrat solide (EG et CBHs), de la β -glucosidase qui agit en milieu homogène. Ainsi pour les endoglucanases et les cellobiohydrolases, il est indispensable de prendre en compte l'adsorption de l'enzyme sur le substrat avant la réaction: un modèle de type Langmuir avec une inhibition non compétitive par les produits de réaction doit être utilisé pour leur description. L'action de la β -glucosidase pourra quant à elle être décrite par un modèle classique de Michaelis-Menten avec une inhibition compétitive par le glucose.

L'étude du phénomène de synergie entre les enzymes a montré l'importance de le paramétrer dans le modèle. Les mécanismes régissant la synergie entre CBHs et EG et entre CBHs / EGs et la β -glucosidase étaient déjà bien compris et sont facilement incorporables au modèle cinétique. Une étude plus poussée a été nécessaire pour améliorer la compréhension de la synergie CBHI / CBHII. Les résultats montrent que la synergie est proportionnelle au produit des concentrations en CBHI et CBHII, mais aucun mécanisme réactionnel expliquant cette synergie n'a pu être identifié. Une des hypothèses est que CBHII possède également une activité "endoglucanase". Cependant, dans un premier temps, cette activité ne sera pas prise en compte par le modèle.

Enfin, le cocktail reconstitué a été comparé au cocktail réel. Il a alors été montré qu'en normalisant l'activité du cocktail par rapport à la concentration en enzymes actives, le cocktail reconstitué est capable de décrire l'activité du cocktail réel sur des cinétiques globales. L'ensemble de cette étude permettra donc de déterminer correctement les paramètres des enzymes au sein du modèle cinétique. Le chapitre suivant s'attachera donc à comprendre l'évolution de la morphologie et de la réactivité du substrat au cours de la conversion. Pour cette étude, les tests de cinétique initiale seront effectués avec le cocktail réel.

Chapitre 4: Influence de la morphologie du substrat sur l'hydrolyse

*Le chapitre 3 a été consacré à la caractérisation cinétique des principales cellulases du sécrétome de *Trichoderma reesei* et de la β -glucosidase d'*Aspergillus niger*. La détermination des paramètres cinétiques des enzymes pures, associée à l'étude des synergies présentes au cours du processus d'hydrolyse, a permis de construire un cocktail reconstitué représentatif du cocktail réel. Néanmoins, la description de la cinétique des enzymes n'a été réalisée que sur un substrat modèle (la cellulose Avicel PH101). Or l'activité des cellulases dépend fortement des propriétés physico-chimiques du substrat cellulosique qui d'une part sont fonction de l'origine de la cellulose et qui d'autre part évoluent au cours de l'hydrolyse. Ce chapitre est donc dédié à l'étude de l'influence de la structure et morphologie du substrat sur la cinétique de l'hydrolyse enzymatique, et les objectifs sont les suivants:*

- (i) déterminer les paramètres morphologiques évoluant au cours de la réaction afin de pouvoir introduire une description fine du substrat dans le modèle cinétique;*
- (ii) évaluer l'évolution de la réactivité du substrat au cours de la conversion et d'établir un éventuel lien avec ses changements de structure.*

Lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, les enzymes attaquent directement le substrat cellulosique solide. Il a été montré dans la littérature que la réactivité initiale de la cellulose dépendait de ses propriétés morphologiques et structurales, et que certaines propriétés évoluaient au cours de la réaction. Comme décrit en introduction, la cellulose possède plusieurs niveaux d'organisation qui peuvent être remodelés pendant l'hydrolyse enzymatique. L'étude de ces éventuels changements nous aide à mieux cerner l'action des enzymes. Or, peu de modèles cinétiques développés dans la littérature présentent une description détaillée du substrat et, une meilleure définition de celui-ci permettrait d'améliorer les capacités de prédiction des modèles.

La première partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude de l'évolution de la structure de la cellulose au cours de l'hydrolyse enzymatique. Pour cette étude, des résidus d'hydrolyses partielles ont été préparés à partir de deux substrats cellulosiques: la cellulose Avicel et une pâte cellulosique (PCBB) issue d'un procédé d'extraction papetier permettant de conserver des caractéristiques plus proches d'un substrat lignocellulosique en matière de degré de polymérisation et de cristallinité.

Après une caractérisation détaillée de la structure et de la morphologie des substrats initiaux à l'échelle moléculaire, nanométrique et micrométrique, nous avons étudié les substrats partiellement hydrolysés pour lesquels structure et réactivité ont été à leur tour caractérisées. Enfin, nous avons tenté d'établir un lien entre la structure et la réactivité du substrat.

1. Comparaison des caractéristiques globales des substrats d'étude.

Deux substrats cellulose ayant des propriétés morphologiques et structurales différentes ont été sélectionnés pour cette étude: la cellulose Avicel PH101 et une pâte cellulosique bisulfite blanchie (PCBB) produite par Tembec Tartas. Dans le but de s'assurer de l'absence d'autres composés chimiques dans le matériau, la pureté en cellulose a tout d'abord été déterminée pour les deux substrats par hydrolyse acide. Le Tableau 4-1 présente la teneur en matière sèche et l'analyse compositionnelle des deux substrats. Les résultats montrent une très haute pureté en cellulose ainsi qu'une faible quantité résiduelle d'hémicellulose. Les substrats ayant été blanchis, il n'y a pas de lignine résiduelle.

A l'échelle moléculaire, les degrés de polymérisation moyens des deux celluloses ont été déterminés en mesurant la viscosité intrinsèque de la cellulose dissoute dans un solvant organométallique, la cupriéthylènediamine (CED). Comme attendu, les données présentées dans le Tableau 4-1 montrent que les degrés de polymérisation moyens sont très différents, la cellulose Avicel étant constituée de chaînes beaucoup plus courtes. Les méthodes de production de ces deux substrats cellulose sont à l'origine de ces différences : la cellulose Avicel est produite par l'hydrolyse acide d'une pâte cellulosique blanchie, ce qui a pour conséquence une élimination des hémicelluloses hydrolysées, ainsi qu'une réduction du DP des chaînes de cellulose. La PCBB est quant à elle produite par une cuisson bisulfite en milieu acide suivi d'étapes de blanchiment (à base d'oxygène et de dioxyde de chlore) et d'extraction alcaline. La succession de ces différents traitements permet l'obtention d'un substrat assez pur en cellulose mais conservant un degré de polymérisation élevé (Tableau 4-1). Le degré de polymérisation obtenu pour la cellulose se rapproche donc bien de celui d'un substrat lignocellulosique qui présente des degrés de polymérisation moyens pouvant aller de quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers [59].

A l'échelle nanométrique, la cristallinité des deux substrats a été évaluée par diffraction des rayons X. Les spectres de diffraction des deux celluloses sont présentés sur la Figure 4-1. Les indices de cristallinité ont été déterminés par la méthode de la hauteur des pics, qui n'est valable qu'à titre comparatif [68]. Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau 4-1 et les différences de cristallinité observées se traduisent par un indice de cristallinité plus élevé pour la cellulose Avicel que pour la PCBB. Une nouvelle fois, les modes de préparation de ces deux substrats sont à l'origine de ces différences: les conditions opératoires d'hydrolyse acide appliquées pour obtenir la cellulose Avicel conduisent à l'hydrolyse partielle de la cellulose, qui se fait préférentiellement sur les zones amorphes plus réactives, ce qui a pour conséquence une augmentation de l'indice de cristallinité de la cellulose résiduelle.

Tableau 4-1: Tableau caractéristiques des propriétés morphologique des substrats d'étude

Substrat	Avicel	PCBB
MS (%)	97,3	95,5
Pureté en cellulose (%)	96,1	93,9
Xylan ou hemicellulose (%)	2,4	3,1
Mannane (%)	1,5	3,0
DP _w moy	333 ± 17	2025 ± 101
ICr (%)	67,2	45,4

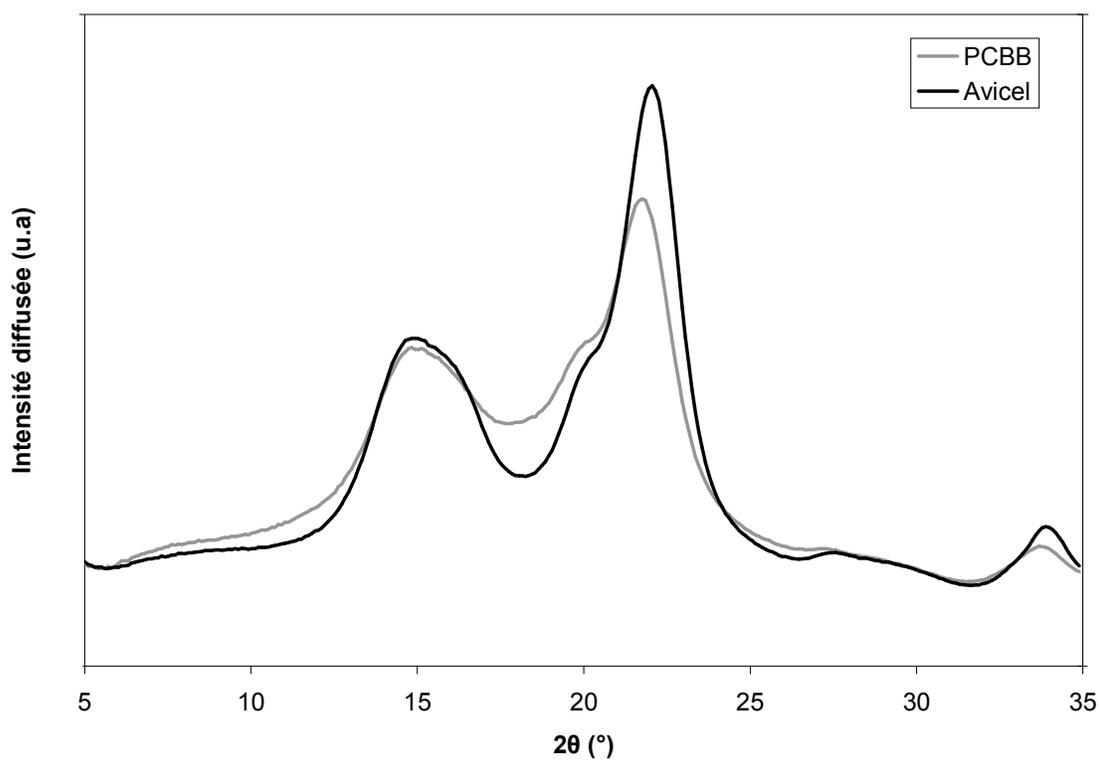


Figure 4-1: Spectre de diffraction de l'Avicel et de la PCBB

2. Préparation des substrats partiellement hydrolysés

Des substrats partiellement hydrolysés ont été préparés à partir des deux substrats de départ (cellulose Avicel et PCBB). Pour chacun des deux substrats, 3 taux d'avancement de la réaction d'hydrolyse ont été visés: 10, 30 et 70%. Pour rappel, les substrats partiellement hydrolysés ont été récupérés après lavages et lyophilisation. Pour contrôler l'influence de ces étapes de lavages et de lyophilisation sur la structure et la réactivité de la cellulose, un substrat "contrôle" sans traitement enzymatique a été préparé pour les deux types de cellulose (BA et BPCCB).

Le Tableau 4-2 présente les principaux paramètres opératoires utilisés pour la préparation des substrats, ainsi que le taux d'avancement réel de la réaction d'hydrolyse et la teneur en matière sèche (MS) finale de chaque substrat préparé. Le taux d'hydrolyse est exprimé sous la forme d'un rendement massique en glucose produit.

Tableau 4-2: Tableau récapitulatif des substrats partiellement hydrolysés préparés

Substrat	Avicel				PCBB			
	BA	A10	A30	A70	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
NOM								
Rdt glucan visé (% pds)	0	10	30	70	0	10	30	70
Cellulase [K616] (mg.g_{MS}⁻¹)	0	1,7	8,4	8,4	0	5,0	5,0	8,4
β-glucosidase [SP188] (g.L⁻¹)	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1
Temps d'hydrolyse (h)	15,5	7,0	7,5	72,0	16,0	5,0	7,5	67,0
Rdt glucan réel (% pds)	0	10,0	27,2	76,3	0	20,1	32,0	71,1
Matière sèche (%)	99,0	99,2	98,8	99,0	99,6	99,5	99,6	99,9

3. Évolution de la structure et morphologie du substrat au cours de l'hydrolyse

Afin de comprendre l'origine de la forte diminution de la vitesse lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, il est intéressant de caractériser l'évolution de la structure et de la morphologie du substrat au cours de sa conversion. Cette partie présente les résultats de la caractérisation des substrats partiellement hydrolysés aux différents niveaux de structures du polymère i. e. à l'échelle moléculaire, nanométrique et micrométrique.

3.1. A l'échelle moléculaire

Les degrés de polymérisation moyens des substrats partiellement hydrolysés ont été déterminés par mesure de la viscosité intrinsèque. La viscosité intrinsèque est mesurée après dissolution de la cellulose dans de la cupriéthylènediamine, et converties en degrés de polymérisation moyens comme décrit dans 2.2.3.

Les résultats présentés dans le Tableau 4-3 montrent que le protocole de préparation des substrats n'a pas d'impact sur le degré de polymérisation moyen, les deux substrats de départ Avicel et PCBB ayant des degrés de polymérisation très proches de leur substrat "contrôle". D'autre part, les résultats montrent très clairement que la valeur du degré de polymérisation moyen ne varie pas de manière significative au cours de l'hydrolyse enzymatique, pour la cellulose Avicel comme pour la pâte cellulosique. Ce niveau de structure ne semble donc pas altéré par la réaction, ce qui peut paraître surprenant pour une réaction de conversion de la cellulose en glucose. Ce premier résultat est en faveur d'une action des glycosides hydrolases à la surface du substrat. En effet, on peut considérer que seules les chaînes de surfaces sont attaquées par les enzymes et qu'il faut entièrement hydrolyser ces chaînes pour avoir accès à la couche suivante. La valeur du degré de polymérisation de la cellulose étant une valeur moyenne, elle reste donc constante au cours de la réaction. Les chaînes de surfaces ne représentent qu'un faible pourcentage des chaînes de cellulose présentes dans le milieu, et une diminution de la taille de ces chaînes n'a donc que peu d'impact sur le degré de polymérisation moyen car les enzymes ne sont pas capables de pénétrer dans la structure de la cellulose. Ces résultats sont en accord avec ceux de Walseth et al [82] et de Philipp et al [83] qui ont montré que le degré de polymérisation était peu altéré par l'hydrolyse enzymatique tandis qu'il diminuait fortement pendant l'hydrolyse acide, l'acide pouvant contrairement aux enzymes pénétrer dans la structure de la cellulose. L'étude comparative des celluloses Avicel et PCBB a permis de montrer que l'évolution observée est la même quelle que soit la longueur des microfibrilles. Vérifier ce point était également important dans l'optique de proposer un modèle cinétique pouvant être applicable à des structures cellulosiques représentatives de biomasses lignocellulosiques.

Tableau 4-3: Degré de polymérisation moyen des celluloses partiellement hydrolysées

Avicel	Avicel	BA	A10	A30	A70
DP_v moyen	333 ± 17	347 ± 17	359 ± 18	382 ± 19	369 ± 18
PCBB	PCBB	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
DP_v moyen	2025 ± 101	1916 ± 96	1884 ± 94	1869 ± 93	2108 ± 105

3.2. A l'échelle nanométrique

3.2.1. Cristallinité

De nombreux auteurs [65,66,76] ont mis en évidence l'importance de la cristallinité sur la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique. Les endoglucanases sont connues pour attaquer préférentiellement les zones amorphes de la cellulose ce qui entraînerait une diminution de la proportion de zones amorphes au cours de la réaction et par conséquent, une augmentation de l'indice de cristallinité. Cependant, ce résultat reste très controversé [71,73,77,81], avec pour la majorité des études, l'observation d'une cristallinité soit constante, soit faiblement croissante au cours de conversion du substrat.

Les indices de cristallinité des substrats partiellement hydrolysés ont été déterminés par la méthode de diffraction des rayons X. La Figure 4-2 présente les spectres de diffraction des rayons X obtenus pour les deux séries de substrats. Aucune différence n'est visible entre les substrats initiaux et les substrats partiellement hydrolysés. Les valeurs d'indice de cristallinité présentées dans le Tableau 4-4 ont été calculées par la méthode de la hauteur des pics. Comme Park et al [68] l'ont montré dans leurs travaux, le calcul de l'indice de cristallinité dépend beaucoup de la méthode analytique (DRX ou RMN du carbone 13) et de la méthode d'intégration des pics. Les valeurs présentées sont uniquement données dans un but de comparaison et ne représentent pas une valeur absolue de l'indice de cristallinité.

Les degrés de cristallinité des celluloses Avicel et PCBB et de leurs substrats "contrôle" sont très proches. Ceci permet de confirmer que le protocole de préparation des substrats partiellement hydrolysés n'a pas d'influence sur la cristallinité.

Pour la cellulose Avicel, les indices de cristallinité mesurés sont constants quelque soit le taux de conversion du solide (64%). Pour la pâte de Tartas, une plus grande dispersion des valeurs est observée (ICr compris entre 56 et 62%) mais cette dispersion est plus liée à la précision de la mesure qu'à une évolution liée à la conversion du substrat. Les résultats obtenus permettent donc de confirmer qu'il n'y a pas de changement de cristallinité au cours de l'hydrolyse. Si l'on considère que les zones amorphes sont principalement situées en surface des

microfibrilles, ces résultats viennent une nouvelle fois confirmer l'attaque en surface des enzymes. Même si la cristallinité semble être un facteur important pour déterminer la vitesse initiale de l'hydrolyse, ce paramètre n'est donc pas modifié pendant la conversion du substrat.

Tableau 4-4: Indice de cristallinité des substrats partiellement hydrolysés

Avicel	Avicel	BA	A10	A30	A70
ICr (%)	67	64	-	64	63
PCBB	PCBB	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
ICr (%)	46	56	-	62	60

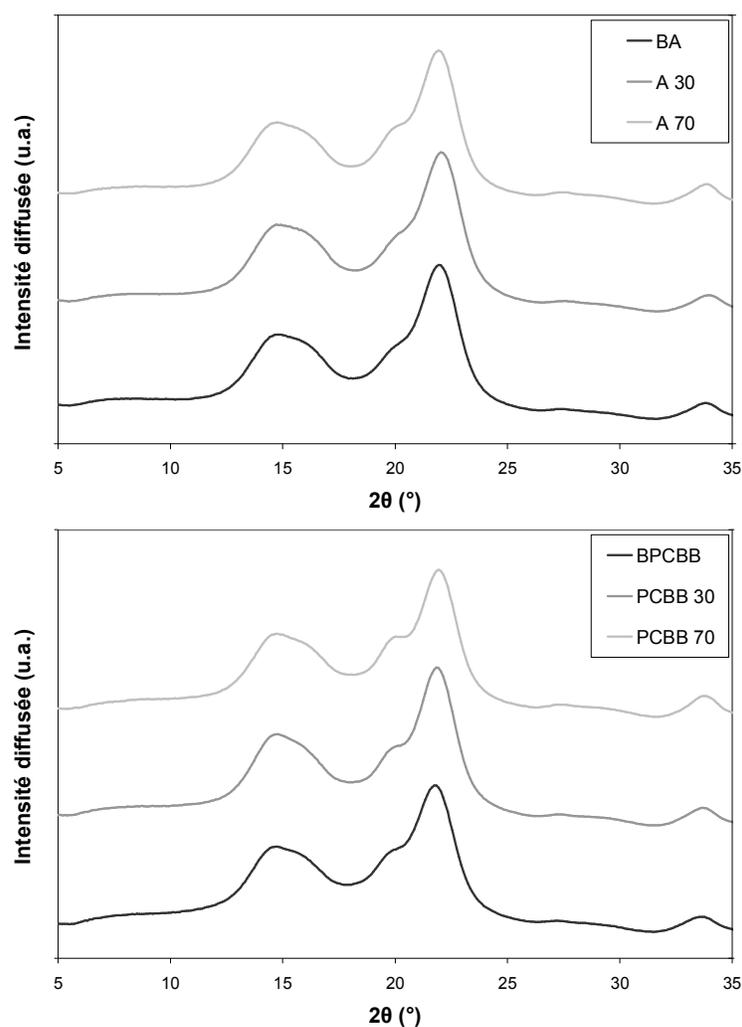


Figure 4-2: Spectre de diffraction des rayons X (WAXS) des trois séries de substrats partiellement hydrolysés

3.2.2. Surface spécifique

La surface spécifique de la cellulose a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) selon le protocole décrit dans le Chapitre 2 (2.2.5). Cette méthode permet de caractériser la surface spécifique accessible au solvant choisi qui est le D₂O.

Les spectres de SANS obtenus pour l'échantillon "contrôle" et les échantillons partiellement hydrolysés préparés à partir de la cellulose Avicel sont présentés sur la Figure 4-3. Ces figures présentent l'évolution de l'intensité diffusée I pour une gamme de q comprise entre $3,1 \cdot 10^{-3}$ et $3,6 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$

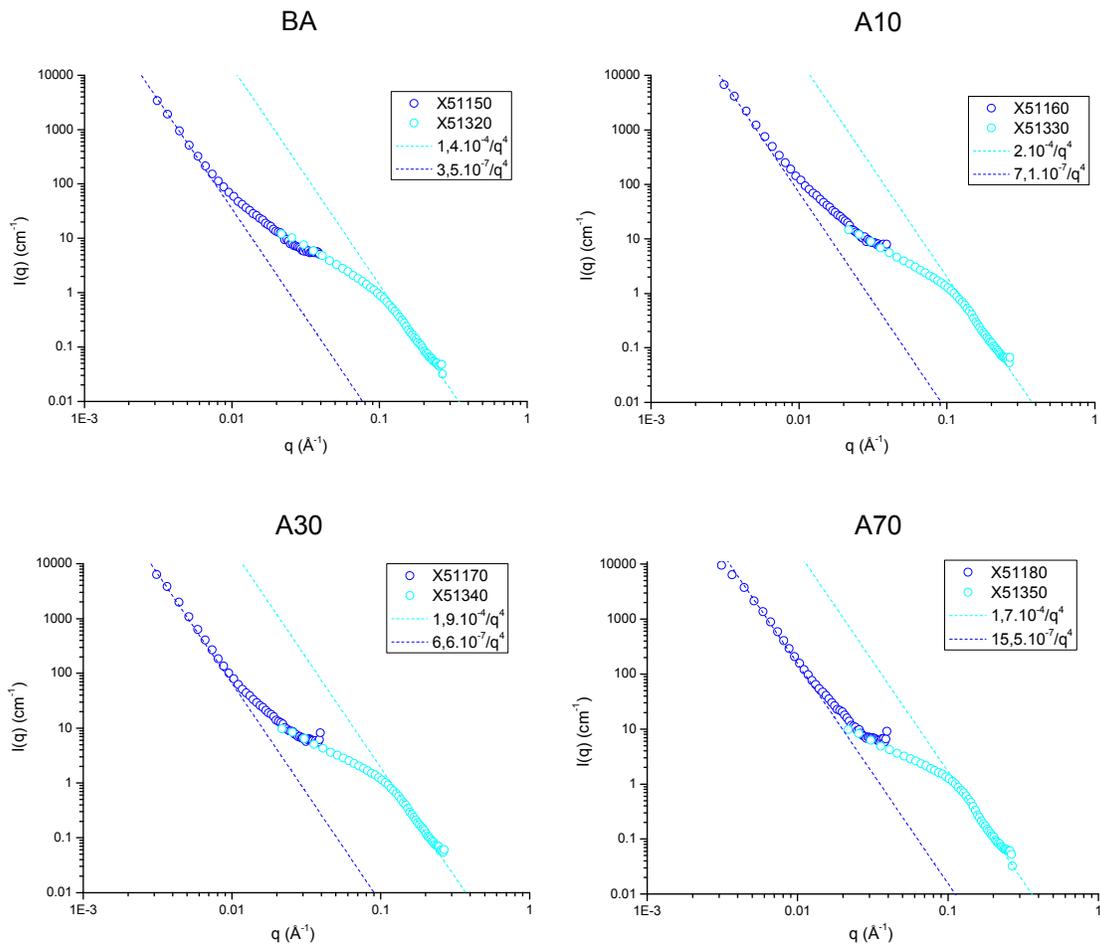


Figure 4-3: Spectre traité de SANS pour les échantillons préparé à partir de la cellulose AVICEL

Pour chaque spectre, deux domaines de Porod peuvent être identifiés. Pour rappel, un domaine de Porod est un domaine où l'intensité diffusée est proportionnelle à q^{-4} et l'intensité diffusée.

Il est alors possible d'utiliser la loi de Porod et en considérant que les particules ont une géométrie de cylindre infini, on peut calculer un rayon moyen caractéristique de l'interface observée:

$$\frac{s}{v} = \frac{2\pi r}{\pi r^2} = \frac{2}{r} \quad \text{donc} \quad r = \frac{4\pi\Delta\rho^2\Phi}{K}$$

Les deux domaines de Porod identifiés correspondent à deux niveaux d'observation de l'interface entre la cellulose et le solvant (D₂O). Le premier domaine, correspondant aux plus petites valeurs de q est caractéristique de l'interface entre l'ensemble de la particule et le solvant tandis que le deuxième domaine, correspondant aux plus grandes valeurs de q, est caractéristique de l'interface entre les microfibrilles et le solvant. Les valeurs des rayons des fibres et des microfibrilles obtenues pour les deux séries de substrats étudiés sont présentées dans le Tableau 4-5. L'incertitude de la mesure a été évaluée à plus ou moins 12%.

Concernant l'étude de l'interface entre les microfibrilles et le solvant, il n'y a pas de variations significatives du rayon des microfibrilles pour les deux types de cellulose. Même si les valeurs obtenues pour la pâte cellulosique sont plus dispersées, elles restent dans l'incertitude de la mesure. Ces résultats sont en accord avec la conservation de l'indice de cristallinité au cours de la réaction et corroborent le fait qu'on ne voit pas de changements de structure à l'échelle nanométrique.

Concernant l'étude de l'interface entre les particules et le solvant, on observe une diminution du rayon des particules qui est directement reliée à l'augmentation du ratio entre la surface et le volume des particules. La diminution du rayon des particules au cours de la réaction d'hydrolyse traduit un mécanisme d'érosion des particules et ces résultats confirment les observations faites lors de l'étude de l'évolution du degré de polymérisation moyen des substrats partiellement hydrolysés.

Tableau 4-5: Tableau récapitulatif des rayons caractéristiques déterminés par SANS

Avicel	BA	A10	A30	A70
Rayon microfibrilles (nm)	3,4 ± 0,41	3,4 ± 0,41	3,6 ± 0,43	3,0 ± 0,36
Rayon particules (µm)	1,2 ± 0,14	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,04
Pâte de Tartas	BPT	PT10	PT30	PT70
Rayon microfibrilles (nm)	3,8 ± 0,5	6,1 ± 0,7	5,2 ± 0,6	4,0 ± 0,5
Rayon particules (µm)	1,2 ± 0,14	1,4 ± 0,17	1,0 ± 0,14	0,5 ± 0,06

Les expériences de diffusion des neutrons aux petits angles permettent donc de caractériser l'interface entre la cellulose et le solvant à deux niveaux d'échelle: (i) à l'échelle nanométrique avec l'interface microfibrilles / solvant, (ii) à l'échelle macroscopique avec directement la caractérisation de l'interface particules / solvant. L'étude de l'évolution des rayons des microfibrilles et des particules a permis de mettre en évidence que la nanostructure de la cellulose ne changeait pas au cours de l'hydrolyse tandis que la taille des particules diminuait fortement.

3.3. A l'échelle micrométrique

3.3.1. Morphologie des particules par Microscopie Electronique à Balayage

Des clichés obtenus par microscopie électronique à balayage ont été enregistrés sur les différents substrats partiellement hydrolysés préparés dans cette étude. La Figure 4-4 présente les images de microscopie électronique à balayage (MEB) obtenues pour les différentes celluloses partiellement hydrolysées préparées à partir de cellulose Avicel et PCBB. Le grossissement utilisé pour ces clichés est de 100 et permet d'observer la cellulose à l'échelle micrométrique, correspondant à l'échelle de la taille des particules.

En comparant tout d'abord la structure des deux substrats "contrôles" Avicel et PCBB, n'ayant pas subi de traitement enzymatique, on remarque que les fibres de PCBB sont nettement plus larges et longues que les fibres de cellulose Avicel. Il est donc clair sur ces images que les deux celluloses ont des propriétés morphologiques différentes.

Maintenant, si l'on compare les clichés obtenus pour les substrats partiellement hydrolysés préparés à partir des deux types de cellulose, on observe une certaine diminution de la largeur des fibres. Il est néanmoins impossible d'obtenir des données quantitatives à partir de ces images et la détermination de la taille des particules s'avère nécessaire afin de pouvoir mesurer l'impact de l'hydrolyse enzymatique sur la taille des particules.

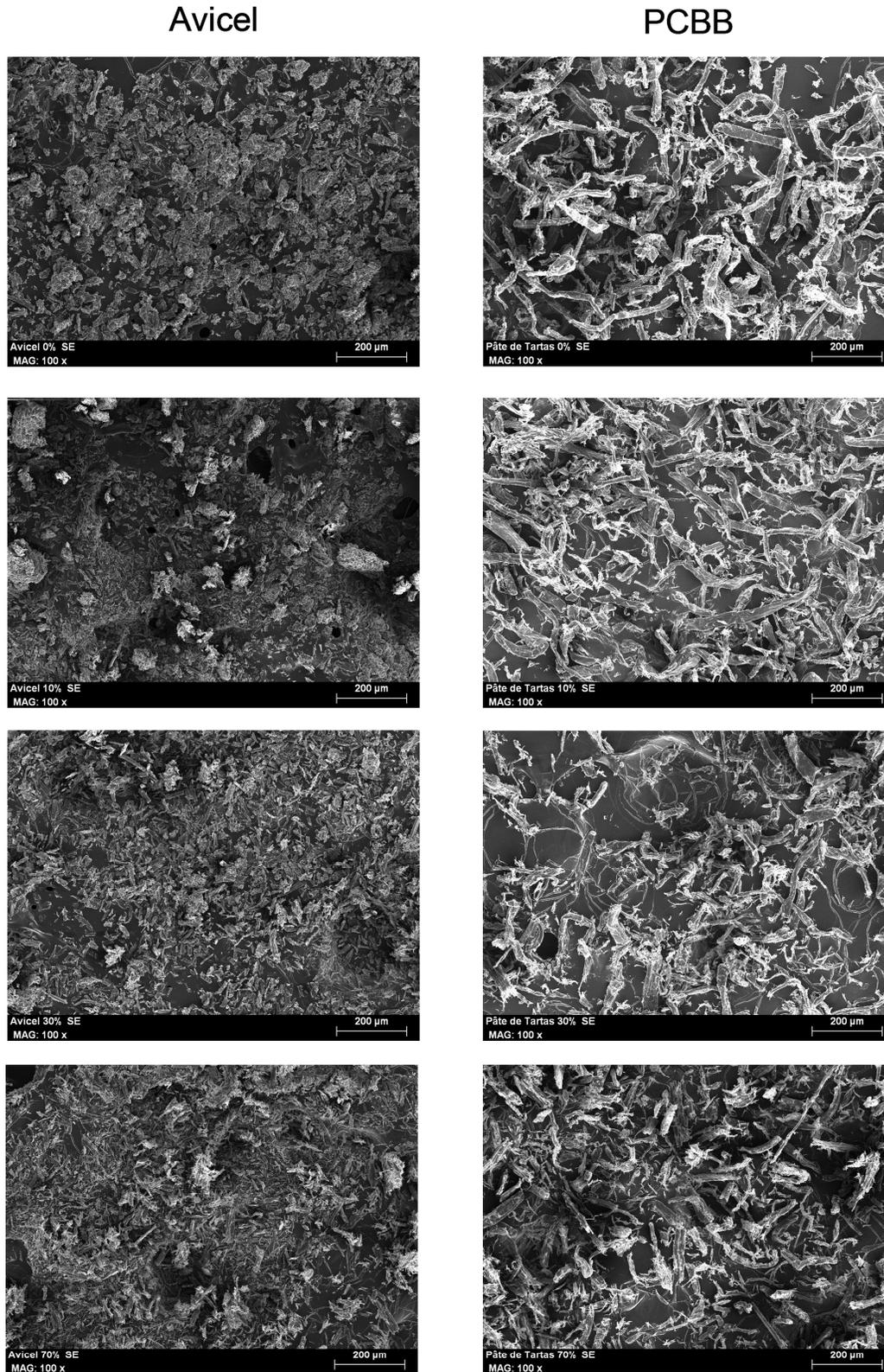


Figure 4-4: Images de MEB des celluloses partiellement hydrolysées à partir d'Avicel et de PCBB

3.3.2. Mesure de la taille des particules avec le MorFi

Dans un premier temps, l'analyse de la taille des particules a été effectuée en utilisant l'analyseur MorFi. Cet analyseur distingue les fibres ayant une longueur supérieure à 80 μm , de celles de longueur inférieure. Le Tableau 4-6 présente le pourcentage de fines présent dans les échantillons pour les différents substrats partiellement hydrolysés. Comme attendu en regardant les clichés de microscopie, la cellulose Avicel est presque en totalité constituée de particules ayant une longueur inférieure à 80 μm . En ce qui concerne les substrats partiellement hydrolysés préparés à partir de PCBB, on observe une augmentation du pourcentage de fines avec la conversion, traduisant en cela une diminution de la longueur des fibres.

Tableau 4-6: Pourcentage de fines dans la cellulose

Avicel	BA	A10	A30	A70
Fines (%)	98,5	96,9	98,1	99,3
PCBB	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
Fines (%)	59,3	62,5	.	92,0

La Figure 4-5 présente la répartition de la taille des fines pour les substrats partiellement hydrolysés préparés à partir de cellulose Avicel. Les résultats montrent une légère diminution de la longueur des fines. La taille des particules d'Avicel sera étudiée plus en détail en utilisant le FPIA qui permet la mesure de tailles de particules plus petites que le MorFi.

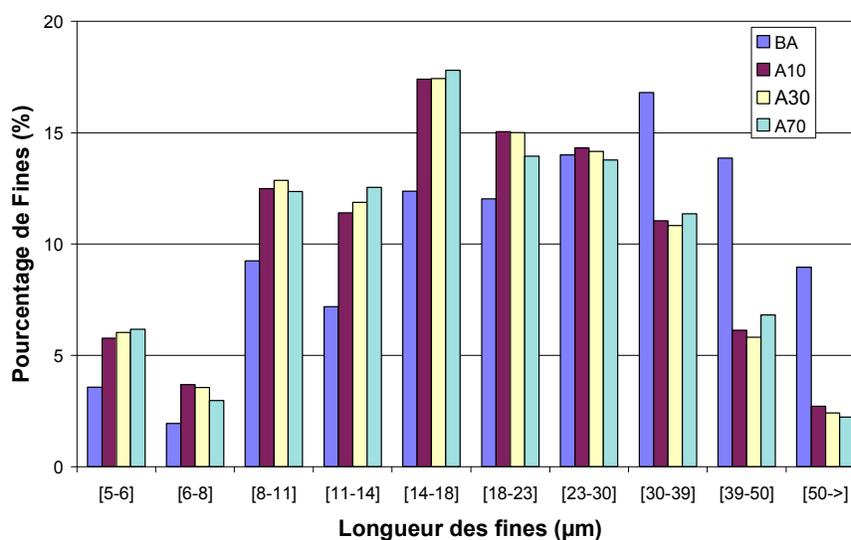


Figure 4-5: Évolution de la longueur des fines pour les celluloses partiellement hydrolysées préparées à partir de cellulose Avicel

La Figure 4-6 présente la répartition de la taille des fibres et des fines pour les substrats partiellement hydrolysés préparés à partir de cellulose PCBB. Il a déjà été mis en évidence que le pourcentage de fines augmentait au cours de la conversion. De plus, les résultats montrent clairement que la longueur des fibres diminue également. On observe également, dans une moindre mesure, une diminution de la longueur des fines.

Le Tableau 4-7 présente l'évolution de la longueur moyenne des fibres de pâte cellulosique pour les différents substrats partiellement hydrolysés; ces résultats confirment les observations précédentes. Cependant, compte tenue de la mesure effectuée, il n'est pas possible de calculer une longueur moyenne globale (fibres et fines) des particules.

La diminution de la longueur des fibres permet de mettre en évidence un mécanisme de "coupures" des fibres au cours de la réaction d'hydrolyse. Il est possible que ces "coupures" aient lieu dans des zones où la cellulose a été fragilisée.

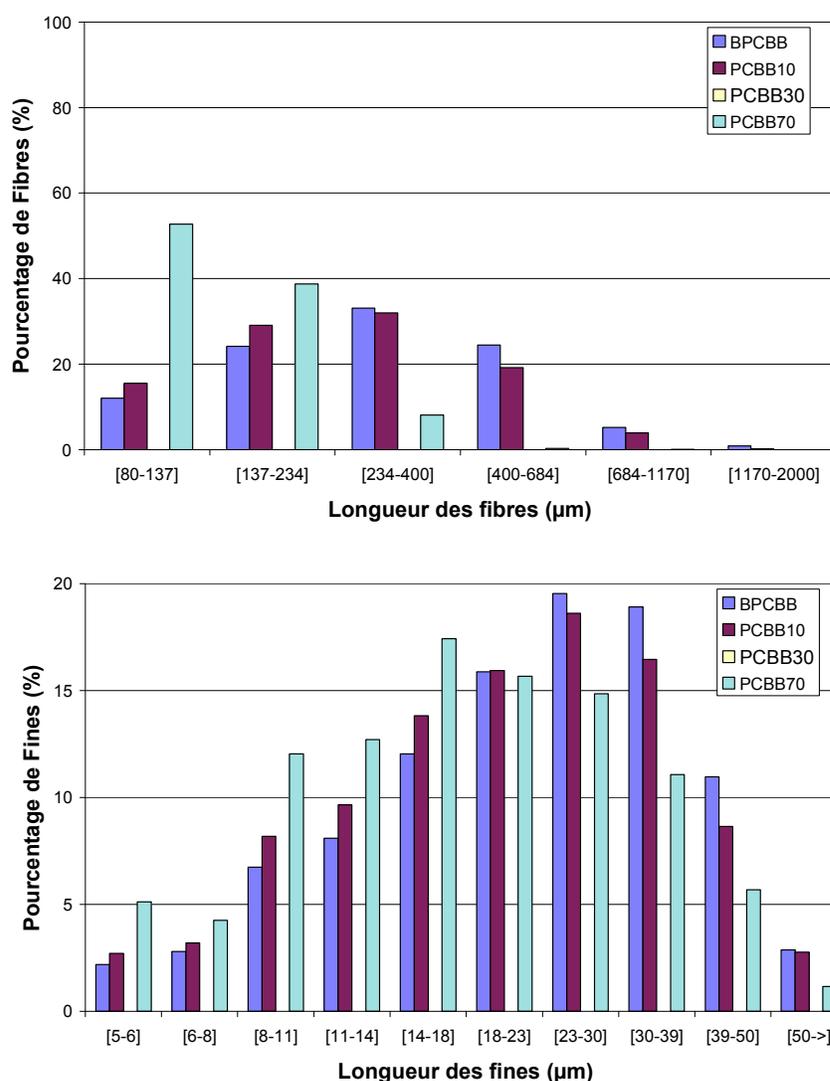


Figure 4-6: Évolution de la longueur des fibres et des fines pour les celluloses partiellement hydrolysées préparées à partir de cellulose PCBB

Tableau 4-7: Evolution de la longueur des fibres avec la conversion pour la pâte cellulosique PCBB

PCBB	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
Longueur fibres (µm)	230	208	-	123

Les mesures de tailles de particules effectuées avec l'analyseur MorFi ne sont pas bien adaptées à la cellulose Avicel, car la quasi-totalité des fibres sont considérées comme des fines. Des mesures plus précises seront réalisées en utilisant le FPIA permettant de caractériser avec précision des particules ayant une longueur inférieure comprise entre 1 et 100µm.

Les mesures réalisées sur les substrats partiellement hydrolysés préparés à partir de pâte cellulosique ont permis de montrer une forte diminution de la longueur des particules au cours de l'hydrolyse enzymatique et de mettre en évidence un mécanisme de "coupure" des fibres de cellulose au cours de l'hydrolyse.

3.3.3. Mesure de la taille des particules par FPIA

En complément des mesures effectuées avec l'analyseur MorFi, la taille des particules des substrats issus de la cellulose Avicel a également été caractérisée par Flow Particles Images Analyser. Cette méthode est en effet plus adaptée aux substrats ayant des particules de longueur inférieure à 100µm.

Pour chaque analyse, les images de 10 000 particules ont été enregistrées ce qui a permis d'évaluer divers paramètres morphologiques. Les longueur, largeur ou facteur de circularité ont été déterminés pour chaque particule. Des analyses statistiques sont ensuite effectuées afin de déterminer la longueur et le diamètre moyens des particules, en les considérant comme cylindriques.

Dans cette étude, la longueur et le diamètre moyens en nombre ont été calculés en utilisant les formules suivantes:

$$\bar{L} = \frac{\sum N_i \cdot L_i}{\sum N_i} \quad \text{et} \quad \bar{d} = \frac{\sum N_i \cdot d_i}{\sum N_i}$$

Avec N_i le nombre de particules de longueur L_i ou diamètre d_i

Le Tableau 4-8 présente les résultats obtenus pour les longueurs et diamètres moyens des particules déterminés pour les substrats issus de la cellulose Avicel.

La diminution de la taille des particules au cours de l'hydrolyse enzymatique est clairement visible pour la cellulose Avicel. Il est également intéressant de noter que la diminution du diamètre de la fibre est importante alors que la variation de la longueur des fibres est assez faible.

Tableau 4-8: Longueur et largeur moyennes déterminées pour les substrats partiellement hydrolysés

Avicel	BA	A10	A30	A70
Longueur (µm)	11,6	10,7	10,4	11,0
Diamètre (µm)	7,2	5,4	4,9	3,9

La Figure 4-7 présente la répartition des tailles de particules en longueur et diamètre pour les différents substrats partiellement hydrolysés préparés à partir de la cellulose Avicel. Cette figure montre bien que la diminution de la taille des particules est majoritairement due à une diminution du diamètre des fibres.

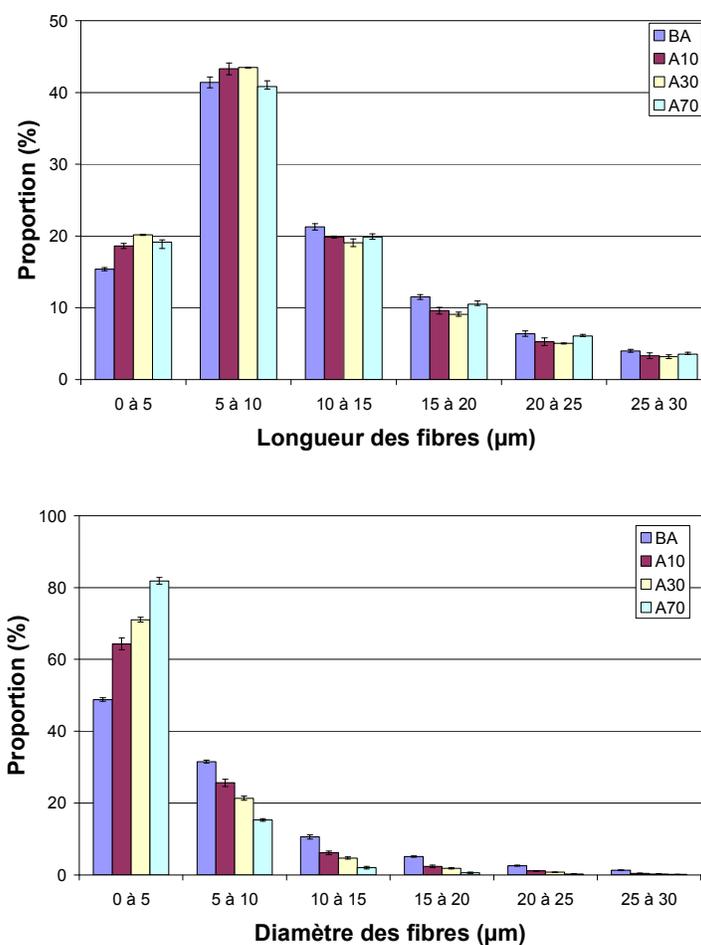


Figure 4-7: Répartition de la longueur et du diamètre des fibres pour les substrats partiellement hydrolysés de cellulose Avicel

L'étude de l'évolution de la taille des particules au cours de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose met en évidence une diminution de la taille des particules pendant la conversion et majoritairement dans le sens du diamètre de la fibre. Le mécanisme d'action des enzymes sur la cellulose Avicel semble donc correspondre à un modèle d'érosion à la surface des fibres, ce qui entraîne (en considérant les fibres comme des cylindres) une diminution du rayon.

Les mécanismes d'action des enzymes sur Avicel et sur PCBB semblent donc être différents. Dans le cas d'une cellulose moins traitée ayant des particules plus grosse, on observe une diminution de la longueur des fibres traduisant un mécanisme de "coupure" des fibres tandis que dans le cas d'une cellulose déjà très traitée, on observe un mécanisme d'érosion des particules.

3.3.4. Comparaison FPIA / SANS

L'évolution de la taille des particules au cours de la conversion du substrat a été étudiée par différentes méthodes analytiques et il est important de comparer les résultats obtenus. Le Tableau 4-9 présente le ratio surface sur volume moyen calculé en utilisant les deux types d'analyses. Dans le cas du FPIA, le ratio a été calculé en utilisant l'expression suivante:

$$\frac{s}{v} = \frac{2 \times \pi r^2 + 2\pi rL}{\pi r^2 L} = \frac{2}{rL}(r + L) \quad \text{avec} \quad r = \frac{d}{2}$$

Pour les deux types d'analyse, le ratio surface sur volume augmente avec le taux de conversion du substrat. Cependant, on remarque que même si les valeurs obtenues par les deux méthodes sont du même ordre de grandeur, celles déterminées par diffusion des neutrons sont plus élevées que celles obtenues par FPIA.

La Figure 4-8 présente l'évolution du ratio s/v normé (100% représentant le ratio du substrat non hydrolysé) en fonction du taux de conversion du substrat partiellement hydrolysé, selon la méthode d'analyse utilisée. On remarque que le ratio s/v augmente d'avantage si on le détermine par mesure de diffusion et que la différence devient très importante pour le substrat partiellement hydrolysé à 70%.

Il est, d'une part, possible que le FPIA ne détecte pas les très petites particules (inférieures à 1µm) et que, par conséquent, il sous-estime la valeur moyenne du ratio s/v. De plus, le FPIA utilise un modèle de particules cylindrique, ce qui peut générer des erreurs sur le calcul du rapport surface sur volume. D'autre part, les calculs de SANS considèrent une densité de longueur de diffusion identique pour les microfibrilles et les particules alors que pour la particule, il serait judicieux de corriger cette valeur, à cause du phénomène de "gonflement" de la cellulose.

Les valeurs obtenues par ces deux méthodes sont du même ordre de grandeur et la tendance observée, à savoir l'augmentation du rapport surface sur volume, est vérifiée pour les deux méthodes.

Tableau 4-9: Tableau comparatif du ratio s/v déterminé par SANS ou FPIA pour les substrats préparés à partir de la cellulose Avicel

Avicel	BA	A10	A30	A70
(s/v) SANS (μm^{-1})	1,7	2,6	2,5	6,5
(s/v) FPIA (μm^{-1})	0,7	0,9	1,0	1,2

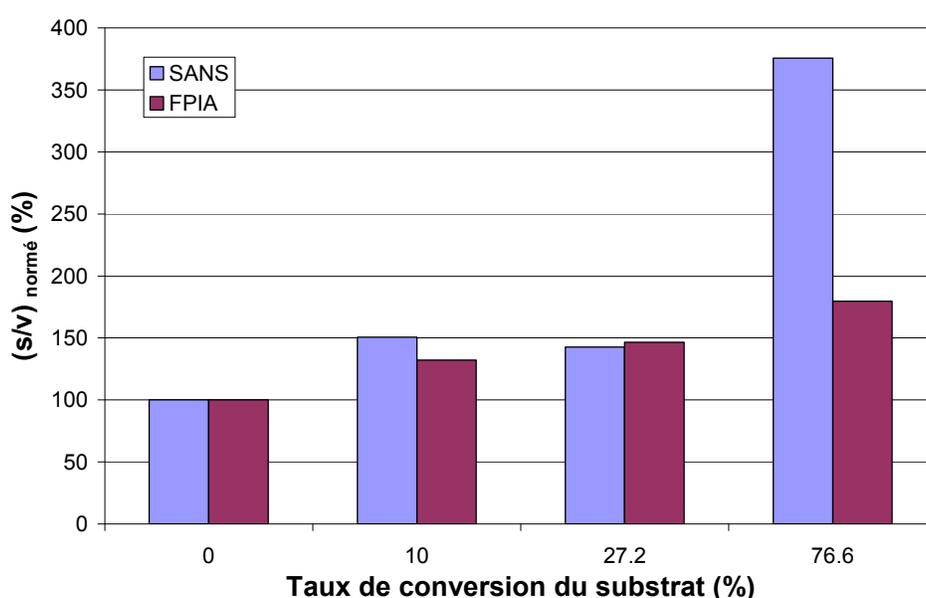


Figure 4-8: Evolution du ratio (s/v) normé des substrats partiellement hydrolysés "Avicel" selon la méthode analytique utilisée

Conclusion

L'évolution du substrat au cours de l'hydrolyse enzymatique a été étudiée à trois niveaux d'organisation structurale:

- (i) à l'échelle moléculaire par la mesure du degré de polymérisation moyen;
- (ii) à l'échelle nanométrique par la détermination de l'indice de cristallinité et de la surface spécifique de l'interface entre les microfibrilles et le solvant
- (iii) à l'échelle micrométrique par la détermination de la surface spécifique de l'interface entre les fibres et le solvant et par la mesure de la taille des particules.

Il a été démontré que l'hydrolyse enzymatique n'avait pas d'impact significatif sur les propriétés de la cellulose à l'échelle moléculaire et nanométrique alors que ses propriétés à

l'échelle micrométrique évoluaient. Grâce aux mesures des surfaces spécifiques et de taille des particules, la diminution de la taille des particules a pu être mise en évidence.

Dans la suite de cette étude, il est maintenant important, d'étudier l'évolution de la réactivité de la cellulose en fonction de son taux d'hydrolyse afin de faire le lien entre les propriétés de la cellulose et sa réactivité.

4. Étude de l'évolution de la réactivité du substrat

Après avoir étudié l'évolution des propriétés morphologiques du substrat pendant la conversion, la deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'étude de l'évolution de la réactivité du substrat. Des tests de cinétique initiale ainsi que des tests de cinétique globale ont été réalisés sur les substrats partiellement hydrolysés afin de déterminer d'éventuels changements de réactivité. Ces tests ont été réalisés en utilisant le cocktail d'enzyme réel, qui a été préalablement validé dans le chapitre 3.

Le Tableau 4-10 présente des conditions expérimentales utilisées, en cinétique initiale (Chapitre 2 5.3) et en cinétique globale (Chapitre 2, 5.4).

Tableau 4-10: Protocole de détermination de la réactivité des substrats partiellement hydrolysés

	Substrat	Enzyme	[S]	[E]	T	[Glucose]
		g.L⁻¹	g.L⁻¹	mg.g_{cell}⁻¹	°C	g.L⁻¹
Test cinétique						
Cinétique initiale	Avicel			3,4		
	PCBB			6,8	50	-
	A-PH	K616	10	13,5		
Cinétique globale	PCBB-PH			20		

PCBB : Pâte cellulosique bisulfite blanchie ; A-PH: Avicel Partiellement Hydrolysée, PCBB-PH: PCBB Partiellement Hydrolysée

4.1. Réactivité initiale

Les tests de cinétique initiale réalisés sur les substrats partiellement hydrolysés ont permis la détermination de la vitesse initiale apparente de production de glucose, qui a été calculée en considérant que la réaction suit une cinétique d'ordre 1 (Chapitre 2, 6.1.2).

Le Tableau 4-11 récapitule les valeurs de vitesses déterminées pour les deux séries de substrats Avicel et PCBB partiellement hydrolysés. La réactivité initiale de la cellulose Avicel est 25% supérieure à celle de la PCBB. Ce résultat confirme celui de Zhang et al [78] qui avaient montré que plus le degré de polymérisation était élevé, plus la vitesse initiale d'hydrolyse était faible. On observe également, pour les deux types de substrats, que plus le substrat a subi une hydrolyse partielle sévère, plus sa réactivité diminue.

Tableau 4-11: Vitesse apparente d'hydrolyse des substrats partiellement hydrolysés

Substrat	BA	A10	A30	A70
Vitesse initiale apparente d'hydrolyse ($\text{g}_{\text{glucose}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{enzyme}}^{-1}$)	12,0	10,8	11,6	9,4
Substrat	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
Vitesse initiale apparente d'hydrolyse ($\text{g}_{\text{glucose}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{enzyme}}^{-1}$)	9,7	8,1	6,8	6,5

La Figure 4-9 présente l'évolution de la réactivité relative des substrats ayant subi une hydrolyse partielle, 100% représentant la réactivité du substrat "Contrôle" n'ayant pas subi de traitement enzymatique. Les résultats montrent que la réactivité intrinsèque du substrat diminue avec le taux d'hydrolyse du substrat.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Desai et al [88] qui avaient montré une diminution de la réactivité du substrat lors de tests de redémarrage de l'hydrolyse sur du bois dur. Ils sont en contradiction avec les résultats annoncés par Yang et al [89] qui n'observent pas de changement de réactivité de la cellulose Avicel pendant l'hydrolyse.

Ce graphique permet de mettre en évidence que la réactivité du substrat diminue au cours de l'hydrolyse et que ce facteur pourrait en partie expliquer la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse au cours du temps.

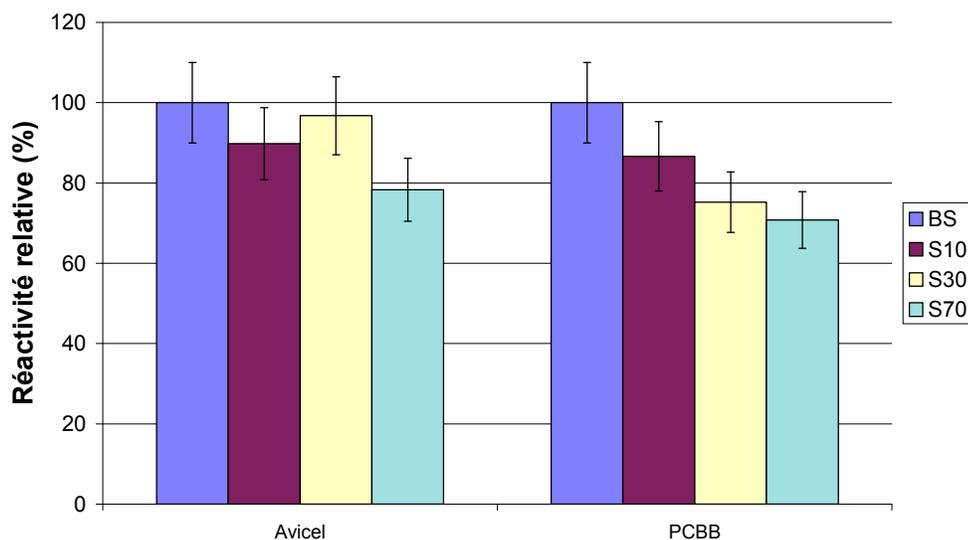


Figure 4-9: Évolution de la réactivité du substrat en fonction du taux de conversion

Légende: BS: Blanc Substrat, Sx: Substrat partiellement hydrolysé à x%

4.2. Réactivité globale (test sur 72h)

Afin de comparer la réactivité du substrat dans sa globalité, des tests de cinétique longue durée ont été effectués sur les substrats partiellement hydrolysés. Ces tests ont été faits avec une concentration de $20 \text{ mg.g}_{\text{cellulose}}^{-1}$ en enzyme et de 10 g.L^{-1} en substrat.

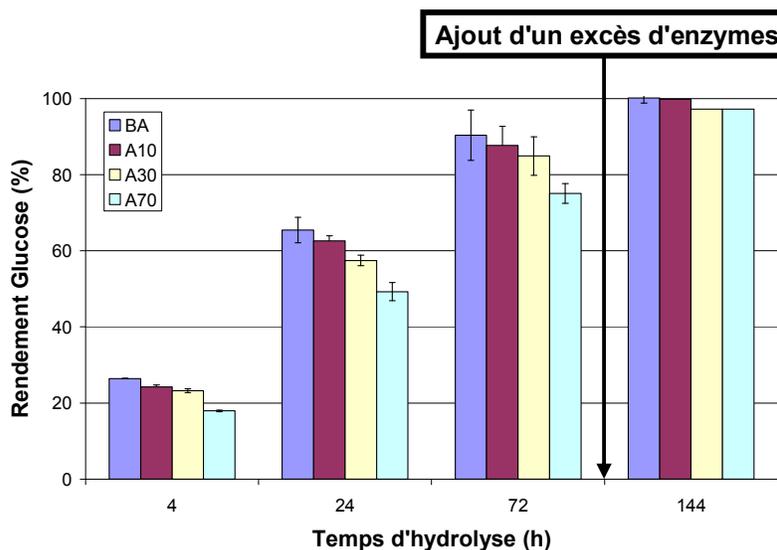
La Figure 4-10 présente l'impact de l'évolution du rendement d'hydrolyse pour les différents substrats partiellement hydrolysés préparé à partir des celluloses Avicel et PCBB. L'impact de l'hydrolyse partielle est clairement visible: elle entraîne pour chacune des deux celluloses une diminution de la conversion pour un temps d'hydrolyse donné. Le phénomène semble accentué pour des temps d'hydrolyse longs (24h et 72h). Après 72h, un excès d'enzyme a été ajouté au mélange réactionnel afin de déterminer le taux de conversion maximale. Pour chaque type de substrat, les rendements maximaux obtenus sont identiques pour la cellulose "contrôle" et pour les trois celluloses partiellement hydrolysées. Concernant la cellulose Avicel, le rendement maximal est proche de 100% indiquant que la cellulose Avicel est totalement hydrolysable dans nos conditions tandis que le rendement de la PCBB n'est que de 90%, signifiant qu'une fraction de ce substrat n'est pas hydrolysable. Les différences de rendement glucose observées précédemment sont donc bien dues à un changement de réactivité du substrat pendant la conversion.

Le Tableau 4-12 présente l'évolution des vitesses apparentes d'hydrolyse calculées en utilisant les tests cinétiques longue durée. Les valeurs des vitesses initiales déterminées sont plus faibles que les valeurs mesurées en cinétique initiale car le premier point est mesuré après 1h de réaction et la vitesse de réaction a déjà sensiblement diminué.

Tableau 4-12: Vitesse apparente d'hydrolyse des substrats partiellement hydrolysés

Substrat	BA	A10	A30	A70
Vitesse initiale apparente d'hydrolyse ($\text{g}_{\text{glucose}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{enzyme}}^{-1}$)	3,9	3,6	3,4	2,7
Perte de réactivité du substrat (%)	0	8	13	31
Substrat	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
Vitesse initiale apparente d'hydrolyse ($\text{g}_{\text{glucose}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{enzyme}}^{-1}$)	3.0	2,5	2,25	2,05
Perte de réactivité du substrat (%)	0	17	25	32

Avicel



PCBB

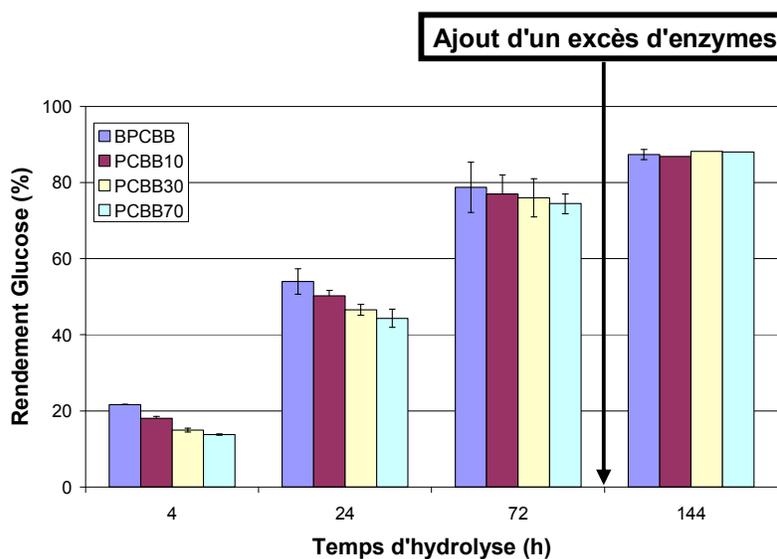


Figure 4-10: Impact de l'hydrolyse partielle du substrat sur le rendement glucose

Légende: BA: Blanc Avicel, Ax: Avicel partiellement hydrolysé à x%,
BPCBB: Blanc BCBB, Bx: PCBB partiellement hydrolysé à x%

La vitesse apparente d'hydrolyse a également été calculée pour différents temps d'hydrolyse (Chapitre 2, 6.2). La Figure 4-11 présente l'évolution de cette vitesse en fonction de la durée d'hydrolyse pour les substrats partiellement hydrolysés à partir de la cellulose Avicel et PCBB. Pour un temps d'hydrolyse donné, la vitesse apparente d'hydrolyse est d'autant plus faible

que le taux de conversion du substrat partiellement hydrolysé est important. De plus, la différence de vitesses d'hydrolyse est beaucoup plus marquée en début de réaction (1 et 4h) qu'en fin de réaction (24 et 72 h). En début de réaction, les enzymes sont "neuves" et il y a peu de produits de réaction donc peu d'inhibiteurs dans le milieu. La réactivité des enzymes est donc maximale et les différences de vitesses apparentes d'hydrolyse doivent être dues aux différences de réactivité du substrat. En revanche, en fin de réaction, les enzymes sont fortement inhibées par les produits de réaction et les phénomènes de désactivation des enzymes peuvent être présents ce qui ne nous permet plus d'évaluer l'impact de la réactivité du substrat.

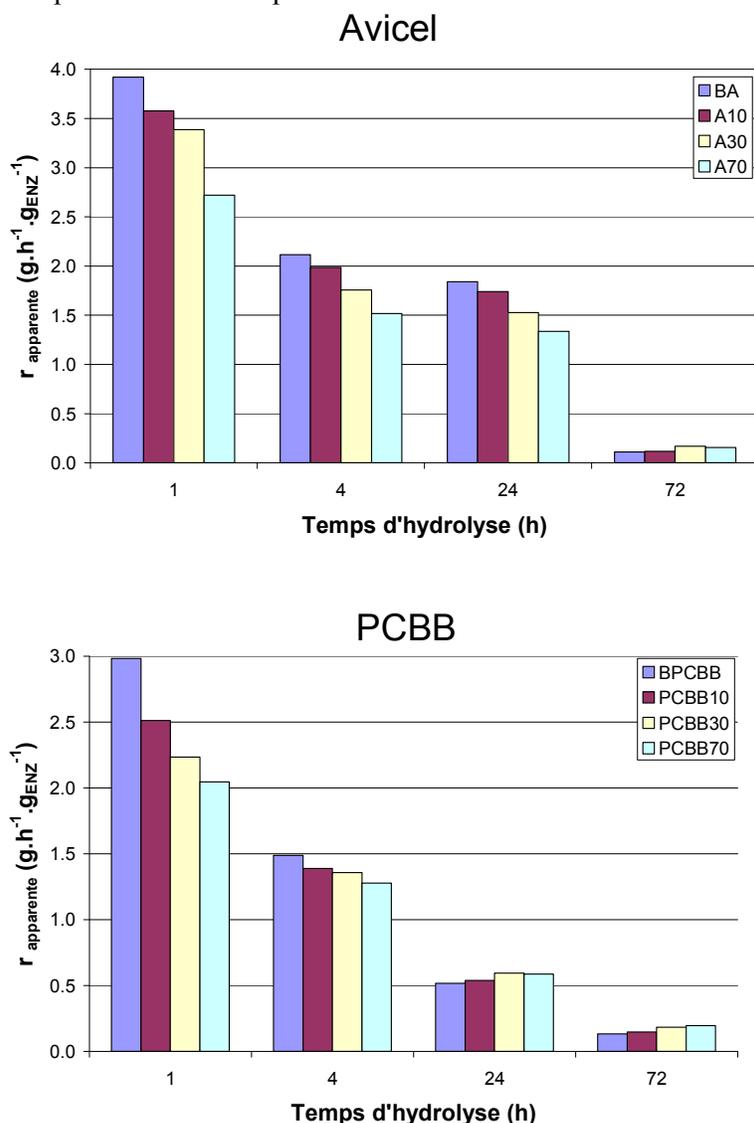


Figure 4-11: Evolution de la vitesse apparente d'hydrolyse au cours du temps pour des substrats partiellement hydrolysés.

Légende: BA: Blanc Avicel, Ax: Avicel partiellement hydrolysé à x%,
BPCBB: Blanc BCBB, Bx: PCBB partiellement hydrolysé à x%

4.3. Lien avec la diminution de la vitesse d'hydrolyse au cours de la réaction

Au cours de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, on observe une nette diminution de la vitesse apparente d'hydrolyse. Cette forte diminution est souvent expliquée par différents facteurs :(i) l'inhibition des enzymes par les produits de réaction, (ii) la désactivation des enzymes ou (ii) la diminution de la réactivité du substrat. Il est probable qu'une combinaison de ces trois facteurs explique la diminution de la vitesse de réaction mais il est important d'essayer de quantifier la contribution de chaque paramètre.

La Figure 4-12 présente l'évolution du rendement glucose et de la vitesse apparente d'hydrolyse en fonction du temps pour la cellulose Avicel "Contrôle". Les courbes montrent une forte diminution de la vitesse d'hydrolyse dans les premières heures de la réaction (-75% après 10h).

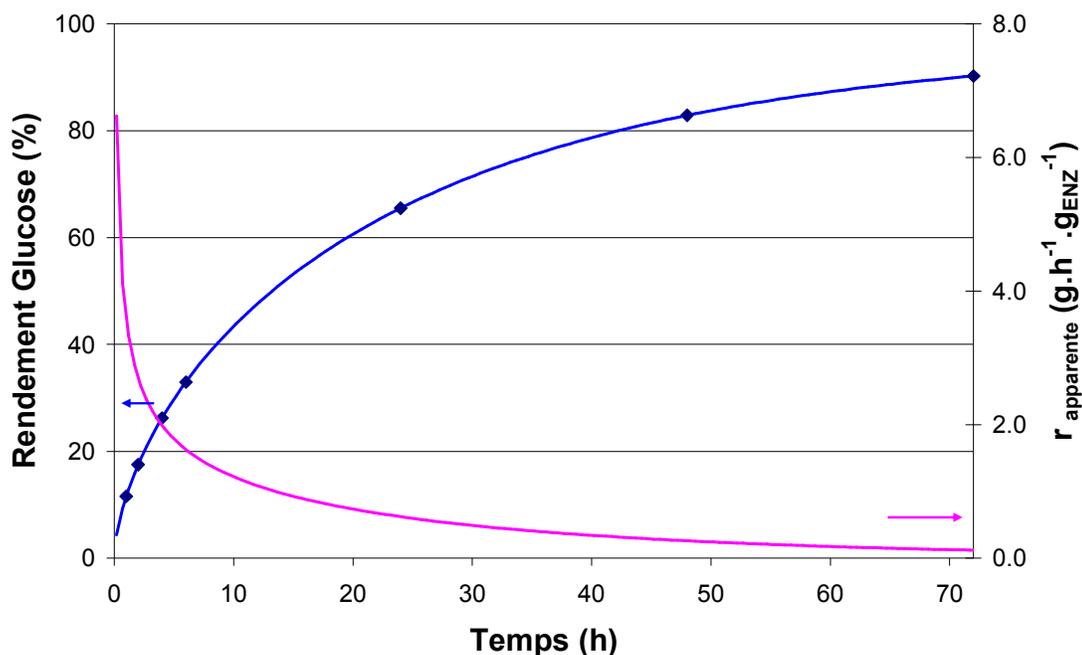


Figure 4-12:Évolution de la cinétique lors de l'hydrolyse enzymatique du substrat Avicel "contrôle" (BA)

Pour mieux comprendre les raisons de ce phénomène, nous avons cherché à estimer l'influence de la diminution de la réactivité du substrat sur la réduction de la vitesse d'hydrolyse. Dans un premier temps, nous avons estimé la perte globale de la réactivité pendant la conversion en comparant la vitesse initiale apparente d'hydrolyse avec la vitesse apparente à une conversion donnée. Les calculs ont été effectués pour les valeurs de conversion obtenues lors de la préparation des substrats partiellement hydrolysés et les valeurs de vitesse apparente déterminées sont présentées dans le Tableau 4-13.

Tableau 4-13: Evolution de la vitesse apparente de production de glucose au cours de l'hydrolyse enzymatique

Avicel	BA	A10	A30	A70
Taux de conversion (%)	0	10	27,2	76,3
r_{apparente} (g.h⁻¹.g_{ENZ}⁻¹)	3,9	3,05	1,85	0,35
Perte de réactivité globale (%)	0	22	53	91

PCBB	BPCBB	PCBB10	PCBB30	PCBB70
Taux de conversion (%)	0	20,1	32	71,1
r_{apparente} (g.h⁻¹.g_{ENZ}⁻¹)	3	1,5	1,0	0,25
Perte de réactivité globale(%)	0	50	67	92

Puis, les pertes de réactivité dues aux changements de réactivité du substrat ont été calculées en comparant la vitesse initiale apparente d'hydrolyse du substrat "Contrôle" et aux vitesses initiales apparentes des substrats partiellement hydrolysés (Tableau 4-11).

La Figure 4-14 présente l'évolution de la perte de réactivité globale et de la perte de réactivité liée au substrat pour les celluloses partiellement hydrolysées préparées à partir de l'Avicel et de la PCBB. La diminution de réactivité du substrat n'est pas le phénomène majeur permettant d'expliquer la diminution de la vitesse d'hydrolyse pendant la conversion mais elle représente néanmoins environ un tiers de la perte globale. Il est donc important de considérer ce facteur lors du développement du modèle cinétique.

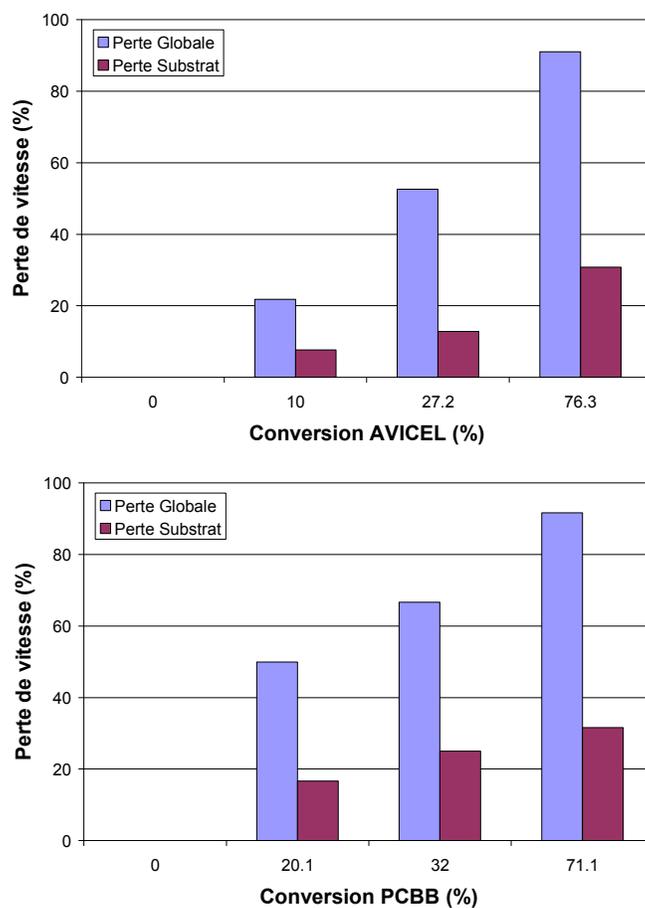


Figure 4-13: Évolution de la perte de réactivité globale et du substrat en fonction de la conversion

Un test complémentaire a ensuite été réalisé afin de déterminer l'influence de l'inhibition par le glucose sur la perte globale d'activité. La réactivité du substrat partiellement hydrolysé à 27,2% a été comparée avec la réactivité du substrat en présence d'une quantité de glucose équivalente à 27,2% de conversion du substrat soit environ 3g.L⁻¹ (test longue durée - Chapitre 2, 5.4). La diminution de vitesse d'hydrolyse due à l'inhibition par le glucose a pu être estimée à 41,5%

Le Tableau 4-14 présente l'ensemble des résultats détaillés.

Tableau 4-14: Identification des phénomènes entraînant la diminution de la vitesse de réaction pendant l'hydrolyse

Avicel	BA	BA	Perte totale
Taux de conversion	0%	27,2%	
r_{apparente} (g.h⁻¹.g_{ENZ}⁻¹)	3,9	1,85	53 %
Avicel	BA	A30	Perte substrat
r_{apparente} (g.h⁻¹.g_{ENZ}⁻¹)	3,9	3,4	13%
Avicel	Avicel "A30"	Avicel "A30"	Perte liée au glucose
Inhibiteur	-	Glucose (3 g.L⁻¹)	
r_{apparente} (g.h⁻¹.g_{ENZ}⁻¹)	3,4	2,0	41%

Cette première approche avait pour but d'identifier les phénomènes responsables de la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse pendant la conversion. L'exemple traité a cherché plus particulièrement à identifier les raisons de cette diminution entre 0 et 30% de conversion. Il a été montré que même si l'inhibition par le glucose restait le facteur majoritaire pour expliquer la diminution de la vitesse, la perte de réactivité du substrat a un impact significatif sur la vitesse d'hydrolyse. Dans le cas d'étude, ces deux facteurs (inhibition et substrat) permettent d'expliquer la perte globale de vitesse. Il est également important de mentionner que 30% de conversion du substrat sont atteints après 4,5h de réaction et qu'il est donc peu probable que les enzymes soient déjà désactivées. Cependant, ces phénomènes ont déjà été montrés dans la littérature [85] et pourraient expliquer une partie de la diminution de la vitesse de réaction après des temps de réaction plus longs.

Une étude complémentaire semble nécessaire afin d'identifier l'évolution de chaque facteur selon la conversion. Ces résultats sont néanmoins suffisants pour montrer l'importance de décrire le changement de réactivité du substrat au cours de la conversion dans le modèle cinétique.

5. Lien Réactivité / Structure

La première partie de ce chapitre a permis de mettre en évidence que la surface spécifique accessible et que la taille des particules étaient les deux facteurs qui évoluaient significativement au cours de la réaction. Il a été montré que la surface accessible à l'hydrolyse augmentait au cours de la réaction. Cependant, cette augmentation de la surface accessible ne va pas dans le sens d'une augmentation de la réactivité du substrat. En effet, les tests cinétiques réalisés à iso-concentrations en solide et en enzyme montrent une diminution de la réactivité du substrat. La réactivité du substrat n'est donc pas uniquement dépendante de la surface spécifique accessible.

La Figure 4-14 présente l'évolution du volume moyen relatif des particules d'Avicel et de PCBB (100% correspondant au volume du substrat n'ayant pas subi d'hydrolyse enzymatique) en fonction du taux de conversion du substrat pour les deux méthodes analytiques utilisées (SANS et FPIA). La droite représente le volume théorique si l'on considère que l'on a une perte uniforme de volume avec la conversion. Le graphe met en évidence que la perte de volume due à l'hydrolyse enzymatique est nettement plus importante dans les premiers temps de l'hydrolyse. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. D'une part, il est possible que les fibres forment des agrégats à l'état initial et que ces agrégats soient disloqués pendant les premiers temps de l'hydrolyse entraînant une forte diminution de la taille et par conséquent du volume des particules. D'autre part, ce résultat peut s'expliquer par une différence de densité de microfibrilles entre le cœur de la particule et sa surface. Ainsi, la périphérie des fibres moins dense, serait préférentiellement hydrolysée dans les premières phases de l'hydrolyse entraînant une forte diminution du volume des particules. Il resterait ensuite le noyau des particules plus dense et la perte de volume deviendrait ainsi beaucoup plus lente. De plus, l'augmentation de la densité au cœur des fibres de cellulose pourrait expliquer la diminution de la réactivité du substrat observé, l'action des enzymes étant plus difficile sur un substrat dense. Ces résultats sont cependant à nuancer car il est difficile d'avoir accès à ce type d'information avec les méthodes analytiques utilisées. Le développement de nouvelles méthodes pourrait permettre la validation des différentes hypothèses proposées.

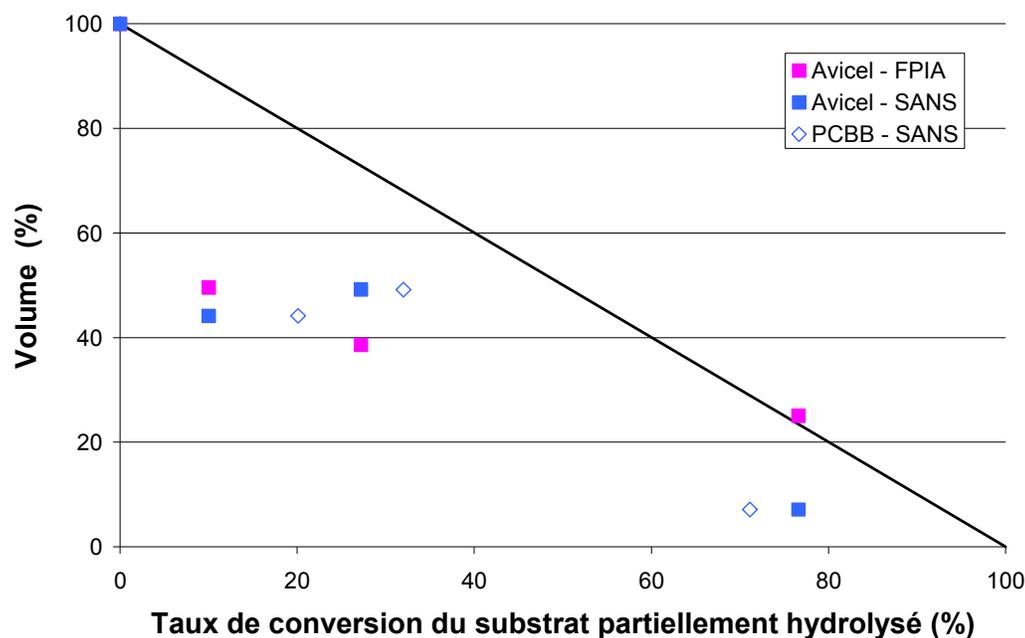


Figure 4-14: Évolution du volume moyen des particules en fonction du taux de conversion du substrat partiellement hydrolysé

La Figure 4-15 présente l'évolution de la vitesse initiale apparente d'hydrolyse en fonction du taux de conversion du substrat partiellement hydrolysé. Pour les deux substrats, Avicel et PCBB, les vitesses apparentes présentées ont été déterminées grâce aux tests de cinétique initiale et globale. Même si on observe une assez grande variabilité des mesures due aux incertitudes sur la détermination de la vitesse initiale, on peut considérer que la réactivité du substrat diminue linéairement avec la conversion et cette décroissance sera considérée dans notre modèle cinétique.

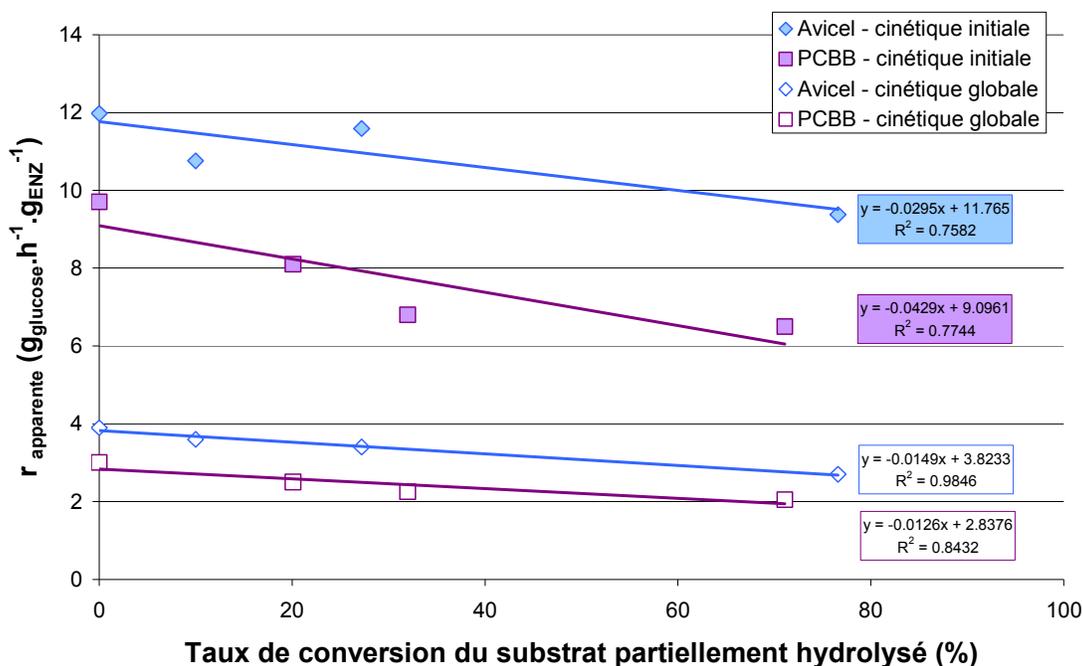


Figure 4-15: Évolution de la vitesse initiale apparente en fonction du taux de conversion du substrat partiellement hydrolysé

Il est donc difficile d'établir un lien clair entre la structure et la réactivité du substrat au cours de l'hydrolyse enzymatique. La réactivité du substrat diminue linéairement avec la conversion et ce malgré une augmentation de la surface spécifique disponible à iso poids pour l'attaque des enzymes. De plus, la perte de volume due à l'hydrolyse enzymatique est nettement supérieure à la perte théorique de volume. Plusieurs hypothèses, qu'il sera nécessaire de confirmer, ont été proposées pour expliquer ce phénomène, mais avec les données actuelles, il n'est pas possible de conclure.

CONCLUSION

Ce chapitre avait pour but d'étudier l'évolution de la structure et de la réactivité du substrat au cours de la réaction d'hydrolyse.

Dans un premier temps, l'analyse détaillée aux différents niveaux de structure de la cellulose de substrats partiellement hydrolysés a permis de mettre en évidence que les propriétés morphologiques à l'échelle moléculaire et nanométrique ne variaient pas de manière significatives au cours de l'hydrolyse alors que les propriétés macroscopiques du substrat évoluaient fortement. Il a été montré, grâce aux analyses de diffusion des neutrons aux petits angles et aux mesures de taille de particules que le volume moyen des particules diminuait pendant la réaction et que le ratio surface sur volume augmentait. De plus, deux types de mécanismes ont pu être mis en évidence selon la taille initiale des particules:

- (i) Pour les grosses particules, on observe une forte diminution de la longueur des particules traduisant un phénomène de "coupure" des particules dans le sens de la largeur.
- (ii) Pour les petites particules ($<100\mu\text{m}$), on observe une action érosive des enzymes à la surface de la cellulose entraînant une diminution du diamètre des particules sans modification majeure de la longueur des chaînes de glucose.

Pour faire le lien entre les deux mécanismes observés, il aurait été intéressant de vérifier que l'on observe bien un mécanisme d'érosion des particules lors d'une seconde hydrolyse du substrat partiellement hydrolysé à 70% préparé à partir de cellulose PCBB. En effet ce substrat contient 92% de fines (Tableau 4-6) et la taille de ses particules est proche de celle de la cellulose Avicel initiale.

Les tests cinétiques réalisés dans la deuxième partie ont permis de mettre en évidence que la réactivité du substrat diminue au cours de la réaction. Une étude plus poussée sur l'impact de la réactivité du substrat sur la diminution de la vitesse apparente d'hydrolyse a montré que la perte de réactivité du substrat était responsable d'environ un tiers de la diminution globale de la vitesse d'hydrolyse. La réactivité du substrat est donc un paramètre important qu'il est nécessaire de décrire dans le modèle cinétique.

Enfin la dernière partie était consacrée à l'établissement d'un lien entre la structure et la réactivité du substrat. Il a été montré que la diminution de la réactivité du substrat est en contradiction avec l'augmentation de la surface accessible à l'attaque enzymatique. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène mais aucune n'a pu être validée. Les résultats ont permis de mettre en évidence que la perte de réactivité du substrat évoluait linéairement par rapport à la conversion et ce résultat sera utilisé dans la modélisation cinétique.

Chapitre 5: Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique

Les deux chapitres précédents ont été consacrés d'une part, à la détermination des paramètres cinétiques intrinsèques des enzymes pures isolées et à l'étude des phénomènes de synergie avec un cocktail d'enzymes reconstitué, et d'autre part, à l'étude de l'évolution de la structure et de la réactivité du substrat au cours de la conversion. Ce chapitre est consacré au développement d'un modèle cinétique prédictif de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Les différentes hypothèses utilisées dans ce travail de modélisation seront tout d'abord détaillées avant d'expliquer les schémas réactionnels proposés et les équations cinétiques associées. Puis, le simulateur utilisé sera présenté et les résultats obtenus seront détaillés. Enfin, différentes perspectives d'amélioration du modèle développé seront proposées.

1. Présentation du modèle cinétique

1.1. Abréviations utilisées

Afin d'alléger les écritures dans la suite de ce chapitre, les abréviations et symboles suivants seront utilisés pour la description du modèle cinétique.

Le modèle cinétique prend en compte l'action de cinq enzymes : EGI, CBHI, CBHII, la β -glucosidase de *T. reesei* (BT) et celle de *A. niger* (BA). Les symboles utilisés pour leur description sont présentés dans le Tableau 5-1. Dans toutes les équations suivantes, la concentration en enzymes est exprimée en mM (mmol/L).

Tableau 5-1: Symbole utilisé pour la description des enzymes

<i>E</i>	: Enzymes (CBHI, CBHII ou EGI)
<i>E1</i>	: Endoglucanases I (EGI)
<i>C</i>	: Cellobiohydrolases (CBHI et/ou CBHII)
<i>C1</i>	: Cellobiohydrolase I (CBHI)
<i>C2</i>	: Cellobiohydrolase II (CBHII)
<i>B</i>	: β -glucosidases (BT ou BA)
<i>BT</i>	: β -glucosidase de <i>T. reesei</i>
<i>BA</i>	: β -glucosidase de <i>A. niger</i>

Le modèle cinétique développé durant cette thèse traduit l'hydrolyse enzymatique d'un substrat cellulosique. Ce substrat est caractérisé par son degré de polymérisation moyen (DP), noté n . Pendant l'hydrolyse, le substrat est partiellement converti en de nouvelles molécules de cellulose de DP plus faible. La formule chimique d'une chaîne de cellulose ayant i monomères de glucose, notée G_i est: $C_{6i}H_{10i+2}O_{5i+1}$. La masse molaire associée est donc :

$MM_{G_i} = 162,15 * i + 18$. Le Tableau 5-2 présente les symboles utilisés pour la description du substrat. Dans toutes les équations suivantes, les concentrations en substrat sont exprimées en mM.

Tableau 5-2: Symbole utilisé pour la description du substrat

G_n	: Cellulose initiale
G_i	: Chaîne de cellulose contenant i monomères
G_2	: Cellobiose (dimère de glucose)
G_1	: Glucose

1.2. Schémas réactionnels proposés

1.2.1. Actions des cellobiohydrolases et des endoglucanases

Les cellobiohydrolases agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du cellobiose. Ces enzymes hydrolysent la cellulose après adsorption sur celle-ci et la réaction est donc hétérogène. La réaction d'hydrolyse d'une chaîne contenant i monomères entraîne la libération d'une molécule de cellobiose et la formation d'une chaîne contenant i-2 monomères.

Les endoglucanases s'adsorbent aléatoirement sur les chaînes de cellulose, principalement au niveau des zones amorphes et hydrolysent la cellulose après adsorption sur celle-ci. On est, comme pour les cellobiohydrolases, dans le cas d'une réaction hétérogène. La réaction d'hydrolyse d'une chaîne contenant i monomères entraîne la formation de deux chaînes, une de taille j et une de taille i-j.

Dans les deux cas, il a été choisi de modéliser l'inhibition de la réaction par le glucose et le cellobiose par un mécanisme d'inhibition non compétitif [30,124].

La Figure 5-1 présente la description du modèle cinétique choisi pour caractériser l'action des cellobiohydrolases et des endoglucanases sur le substrat d'étude. Dans ce schéma, "E" représente CBHI, CBHII ou EGI. Les mécanismes d'adsorption et d'inhibition non compétitif sont les mêmes pour les deux familles d'enzymes CBH et EG et seuls les produits de réaction sont différents. L'adsorption des enzymes sur le substrat dépend alors de deux paramètres, la constante d'adsorption et du facteur d'accessibilité des enzymes à la cellulose, qui seront estimés à partir des tests d'adsorption.

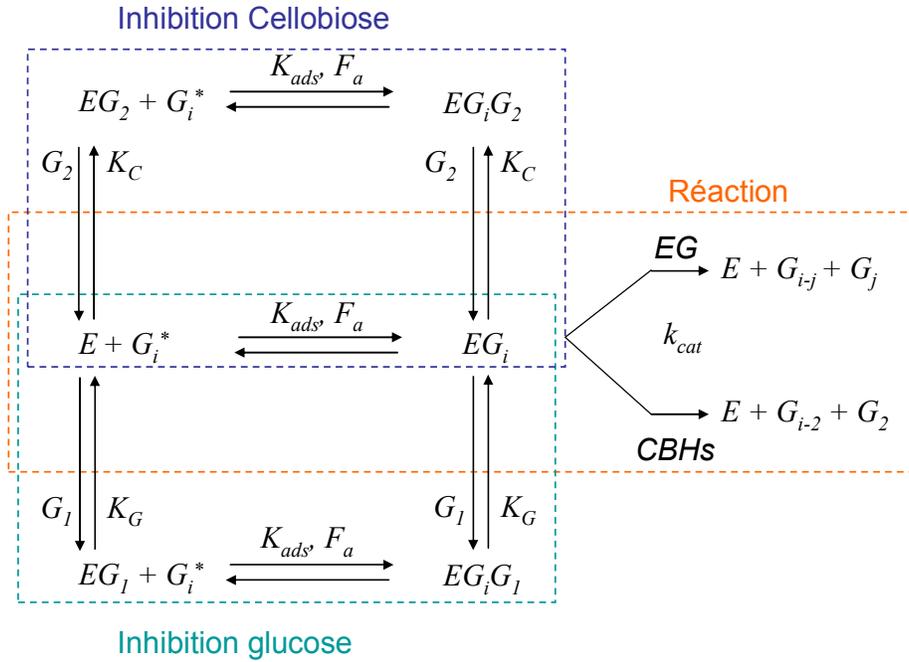


Figure 5-1: Modèle descriptif de l'action des cellobiohydrolases et des endoglucanases

Le Tableau 5-3 présente les paramètres cinétiques et les variables utilisées pour la modélisation cinétique de l'activité des cellobiohydrolases.

Tableau 5-3: Paramètres cinétiques et variables utilisées pour la modélisation de l'activité des CBHs et des EGs

Variables	Concentration en cellulose accessible	$[G_i^*]$	mM
	Concentration en enzymes libres (CBHI, CBHII, EGI)	$[E]$	mM
	Concentration en enzymes adsorbées	$[EG_i]$	mM
	Concentration en produits (Glucose et Cellobiose)	$[G_1], [G_2]$	mM
	Concentration en complexe enzymes/produit	$[EG_1], [EG_2]$	mM
	Concentration en complexe enzymes/substrat/produit	$[EG_iG_1], [EG_iG_2]$	mM
Paramètres cinétiques	Constante d'adsorption	K_{ads}	L.mmol ⁻¹
	Constante d'inhibition par le glucose	K_G	mM
	Constante d'inhibition par le cellobiose	K_C	mM
	Facteur d'accessibilité	F_a	-
	Constante cinétique d'ordre 1	k_{cat}	min ⁻¹
	Énergie d'activation	E_a	kJ.mol ⁻¹

1.2.2. Action des β -glucosidases

La β -glucosidase est l'enzyme qui hydrolyse le cellobiose en présence de glucose. Cette réaction a lieu en milieu homogène et il a été montré dans le Chapitre 3 qu'elle pouvait être décrite par un modèle de Michaelis-Menten avec une inhibition compétitive par le glucose. La Figure 5-2 présente le modèle choisi.

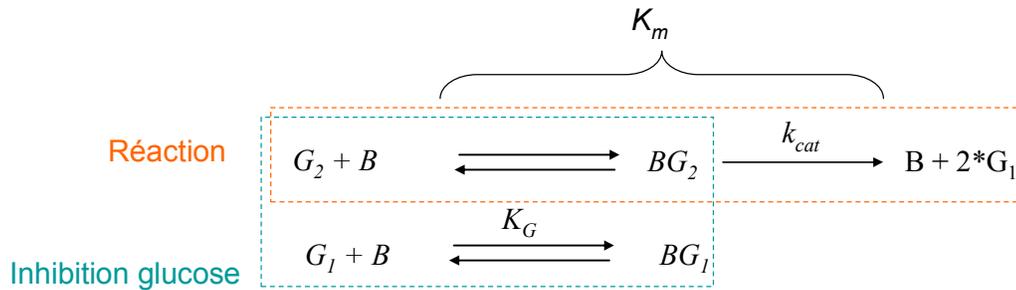


Figure 5-2: Modèle de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le glucose

Le Tableau 5-4 présente des paramètres cinétiques et les variables utilisées pour la modélisation de la β -glucosidase.

Tableau 5-4: Paramètres cinétiques et variables utilisées pour la modélisation des β -glucosidase

Variables	Concentration en cellobiose	$[G_2]$	mM
	Concentration en glucose	$[G_1]$	mM
	Concentration en enzymes	$[B]$	mM
Paramètres cinétiques	Énergie d'activation	E_a	kJ.mol^{-1}
	Constante cinétique	k_{cat}	min^{-1}
	Constante de Michaelis-Menten	K_m	mM
	Constante d'inhibition (glucose)	K_G	mM

1.2.3. Synergies entre les enzymes

Dans le chapitre 3, plusieurs types de synergies ont pu être mis en évidence.

La synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases peut s'expliquer par le fait qu'en clivant des chaînes de cellulose, les endoglucanases augmentent le nombre de sites accessibles pour les cellobiohydrolases. Cette synergie est donc automatiquement prise en compte dans le modèle, les endoglucanases libérant de nouveaux bouts de chaînes accessibles aux cellobiohydrolases.

La synergie entre CBHI et CBHII a clairement été mise en évidence expérimentalement mais aucun mécanisme n'a pu être identifié pour expliquer ce phénomène. Les expérimentations ont néanmoins montré que la synergie était proportionnelle au produit des concentrations des deux enzymes. C'est pourquoi, une constante de synergie arbitraire (k_{syn} exprimée en $\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) a été introduite dans le modèle cinétique pour tenir compte de cette observation.

1.3. Hypothèses et simplifications utilisées

Le modèle cinétique développé s'appuie sur les hypothèses suivantes :

H1: Le réacteur est un réacteur parfaitement agité et isotherme.

H2: A l'état initial, toutes les chaînes de cellulose contiennent le même nombre d'unités monomères qui correspond au degré de polymérisation moyen initial de la cellulose. Toutes les concentrations initiales des G_i sont donc nulles sauf la concentration en G_n qui est égale à la concentration initiale en solide.

$$\forall i \in [0, n-1] \quad [G_i] = 0 \quad \text{et} \quad [G_n] = [S]^0$$

H3: Le glucose (G1) et le cellobiose (G2) sont considérés comme solubles dans la phase liquide et toutes les autres chaînes de cellulose sont considérées comme insolubles et comme appartenant à la fraction solide. En réalité, les chaînes ayant un degré de polymérisation inférieur à 6 sont des oligomères solubles. Il a été décidé de les considérer comme insolubles dans le modèle car cela permet d'éviter d'ajouter des paramètres de Michaelis-Menten supplémentaires pour traduire la réactivité des oligomères solubles. Compte tenu des faibles quantités d'oligomères solubles mesurées, cette hypothèse n'induit pas de biais au modèle.

H4: La vitesse d'adsorption des enzymes sur le substrat est très rapide par rapport à la vitesse d'hydrolyse et on fait par conséquent l'hypothèse que l'équilibre d'adsorption est atteint instantanément. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement dans le Chapitre 3.

H5: On considère que le système est à l'équilibre pour l'inhibition par le glucose et le cellobiose.

H6: On considère que la vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité d'enzymes adsorbées ce qui signifie que l'on néglige tout phénomène d'adsorption non productive des enzymes sur le substrat.

H7: Dans un premier temps le modèle a été développé uniquement en cinétique initiale ce qui permet de ne pas considérer de désactivation des enzymes et de perte de réactivité du substrat au cours de la conversion.

H8: Seule une fraction des chaînes de cellulose est accessible aux enzymes. Fa_E représente la fraction des chaînes G_i accessibles à l'hydrolyse par l'enzyme E. Ce facteur pourrait, par la suite, être directement relié à la surface de la cellulose accessible.

H9: On considère qu'il n'y a qu'un seul site disponible par chaîne de cellulose pour l'attaque par les cellobiohydrolases (attaque en bout de chaîne) tandis qu'il y a $(i-1)$ sites disponibles par chaîne contenant i monomères pour l'attaque par les endoglucanases. De plus, on ne considère pas de compétition d'adsorption pour les deux cellobiohydrolases car elles s'adsorbent sur des bouts de chaînes différents (réducteurs et non-réducteurs).

H10: On considère que la fraction de site accessible aux enzymes CBHI et CBHII augmente avec le temps d'hydrolyse proportionnellement à la quantité de chaînes de glucose créé par l'action des endoglucanases. Cette hypothèse permet de rendre compte de l'effet de synergie entre CBHI/CBHII et EGI.

1.4. Équations cinétiques du modèle

Dans cette partie, les équations utilisées dans le modèle cinétique vont être explicitées pour chaque type d'enzymes.

1.4.1. Cellobiohydrolases et Endoglucanases

Équilibres :

Le système réactionnel choisi présente de nombreux équilibres. Le Tableau 5-5 présente le calcul des différentes constantes d'équilibre.

Tableau 5-5: Récapitulatif du calcul des constantes d'équilibre pour le système réactionnel

Adsorption Enzyme/Substrat	Pour $i \geq 3$: $K_{ADS} = \frac{[EG_i]}{[E][G_i^*]}$
Inhibition par le Glucose	Pour $i \geq 3$: $K_G = \frac{[E][G_1]}{[EG_1]} = \frac{[EG_i][G_1]}{[EG_iG_1]}$
Inhibition par le Cellobiose	Pour $i \geq 3$: $K_C = \frac{[E][G_2]}{[EG_2]} = \frac{[EG_i][G_2]}{[EG_iG_2]}$

Facteurs d'accessibilité des sites aux enzymes

Le nombre de sites disponibles dépend du type d'enzymes concernées. Pour les cellobiohydrolases, l'attaque a lieu en bout de chaîne et il n'y a qu'un seul site disponible par chaîne de cellulose tandis que pour les endoglucanases, il y a autant de sites disponibles que de liaisons glucosidiques, à savoir (i-1) sites pour une chaîne contenant i monomères.

L'ensemble des chaînes de cellulose ne sont pas accessibles aux enzymes: seules les chaînes situées à la surface des particules de cellulose peuvent être hydrolysées, tandis que les chaînes de cœur sont inaccessibles aux enzymes. Pour tenir compte de ce phénomène, des facteurs d'accessibilité sont définis pour chaque enzyme. Ils correspondent à la fraction de sites accessibles aux enzymes par rapport au nombre total de sites présents. Ces facteurs d'accessibilité sont estimés à partir des tests d'adsorption réalisés avec les enzymes pures. Les nombres totaux de sites accessibles aux enzymes sont alors calculés à partir des formules présentées dans le Tableau 5-6. Pour prendre en compte le fait que les sites créés par EGI sont directement accessibles à l'attaque par CBHI et CBHII, on corrige les facteurs d'accessibilité des cellobiohydrolases en fonction du temps en introduisant un facteur multiplicatif $\frac{[G_i^*]_{Ci,t}}{[G_i^*]_{Ci,t=0}}$.

Tableau 5-6: Récapitulatif pour le calcul du nombre total de sites accessibles aux enzymes

Cellobiohydrolases (k = 1 ou 2)	$[G_i^*]_{Ck}^{TOT} = F_{a,Ck} \times \frac{[G_i^*]_{Ci,t}}{[G_i^*]_{Ci,t=0}} \times \sum_{i=3}^n [G_i]$
Endoglucanases	$[G_i^*]_{E1}^{TOT} = F_{a,E1} \times \sum_{i=3}^n (i-1)[G_i]$

Vitesse de réaction :

L'hydrolyse de la cellulose par les cellobiohydrolases entraîne la formation d'une molécule de cellobiose. Les équations cinétiques associées sont présentées dans le Tableau 5-7.

Tableau 5-7: Équations cinétiques de l'hydrolyse par les cellobiohydrolases

$i = 2$	$r_c(2) = \left(\frac{d[G_2]}{dt} \right)_C = k_{cat,C1} \cdot \sum_{i=3}^n [C1G_i] + k_{cat,C2} \cdot \sum_{i=3}^n [C2G_i]$
$3 \leq i \leq n-2$	$r_c(i) = \left(\frac{d[G_i]}{dt} \right)_C = k_{cat,C1} \cdot ([C1G_{i+2}] - [C1G_i]) + k_{cat,C2} \cdot ([C2G_{i+2}] - [C2G_i])$
$i = n-1 \text{ et } n$	$r_c(i) = \left(\frac{d[G_i]}{dt} \right)_C = -k_{cat,C1} \cdot [C1G_i] - k_{cat,C2} \cdot [C2G_i]$

L'hydrolyse de la cellulose par les endoglucanases entraîne, à partir d'une chaîne de i monomères, la formation d'une chaîne de j monomères et une chaîne de $(i-j)$ monomères. Le Tableau 5-8 présente les équations cinétiques de la réaction d'hydrolyse par les endoglucanases issus du modèle développé par Fan et Lee [78]

Tableau 5-8: Équations cinétiques de l'hydrolyse par les endoglucanases

$2 \leq i \leq n-1$	$r_{E1}(i) = \left(\frac{d[G_i]}{dt} \right)_{E1} = 2 \cdot k_{cat,E1} \cdot \sum_{j=i+1}^n [E1G_j] - k_{cat,E1} \cdot [E1G_i]$
$i=n$	$r_{E1}(n) = \left(\frac{d[G_n]}{dt} \right)_{E1} = -k_{cat} [E1G_n]$

1.4.2. β -glucosidases

Le modèle de Michaelis-Menten avec une inhibition compétitive par le glucose a été choisi pour décrire l'activité des β -glucosidases. Les équations des vitesses de production de glucose et de disparition du cellobiose sont données dans le Tableau 5-9.

Tableau 5-9: Équation cinétique de l'hydrolyse du cellobiose par les β -glucosidases

$i=1$	$r_B(1) = \frac{2 \cdot k_{BT} \cdot [G_2] \cdot [BT]}{K_{mBT} \cdot \left(1 + \frac{[G_1]}{K_{GBT}} \right) + [G_2]} + \frac{2 \cdot k_{BA} \cdot [G_2] \cdot [BA]}{K_{mBA} \cdot \left(1 + \frac{[G_1]}{K_{GBA}} \right) + [G_2]}$
$i=2$	$r_B(2) = - \frac{k_{BT} \cdot [G_2] \cdot [BT]}{K_{mBT} \cdot \left(1 + \frac{[G_1]}{K_{GBT}} \right) + [G_2]} - \frac{k_{BA} \cdot [G_2] \cdot [BA]}{K_{mBA} \cdot \left(1 + \frac{[G_1]}{K_{GBA}} \right) + [G_2]} = - \frac{1}{2} \cdot r_B(1)$

Dans notre modèle, nous ferons la distinction entre la β -glucosidase de *T.reesei* (BT) et celle de *A.niger* (BA), ayant montré expérimentalement qu'elles ont des propriétés cinétiques différentes.

1.4.3. Synergies

La synergie CBHI/CBHII est prise en compte par l'introduction d'une constante cinétique arbitraire et les équations de vitesse de réaction sont récapitulées dans le Tableau 5-10.

Tableau 5-10: Équations cinétiques associées à la synergie CBHI/CBHII

$i = 2$	$r_{syn}(2) = k_{syn} \cdot \sum_{i=3}^n [C1G_i] \times \sum_{i=3}^n [C2G_i]$
$3 \leq i \leq n-2$	$r_{syn}(i) = k_{syn} \cdot \left(\sum_{i=3}^n [C2G_i] \times ([C1G_{i+2}] - [C1G_i]) + \sum_{i=3}^n [C1G_i] \times ([C2G_{i+2}] - [C2G_i]) \right)$
$i = n-1 \text{ et } i = n$	$r_{syn}(i) = -k_{syn} \cdot [C1G_i] \times [C2G_i]$

1.4.4. Bilan des équations cinétiques

L'ensemble des équations cinétiques à intégrer dans notre réseau réactionnel est présenté dans le Tableau 5-11

Tableau 5-11: Tableau récapitulatif des équations cinétiques mises en jeu

$i = 1$	$r(1) = r_B(1)$
$i = 2$	$r(2) = r_C(2) + r_{syn}(2) + r_{E1}(2) - \frac{1}{2} \cdot r_B(1)$
$3 \leq i \leq n-2$	$r(i) = r_C(i) + r_{syn}(i) + r_{EG}(i)$
$i = n-1 \text{ et } i = n$	$r(i) = r_C(i) + r_{syn}(i) + r_{EG}(i)$

1.4.5. Méthode de calcul des vitesses de réaction

Afin de pouvoir calculer les vitesses de réaction r_C et r_{E1} , il est nécessaire de déterminer, dans un premier temps, la concentration en enzymes libres ainsi que les différentes concentrations en enzymes adsorbées $[EG_i]$. Un bilan sur les enzymes et sur les sites accessibles aux enzymes permet de résoudre le système.

Bilan sur les enzymes

$$[E_{tot}] = [E] + [EG_1] + [EG_2] + \sum_{i=3}^n [EG_i] + \sum_{i=3}^n [EG_i G_1] + \sum_{i=3}^n [EG_i G_2]$$

$$[E_{tot}] = [E] + \frac{[E][G_1]}{K_G} + \frac{[E][G_2]}{K_C} + K_{ADS} \cdot [E] \sum_{i=3}^n [G_i^*] + \frac{K_{ADS} \cdot [E][G_1]}{K_G} \sum_{i=3}^n [G_i^*] + \frac{K_{ADS} \cdot [E][G_2]}{K_C} \sum_{i=3}^n [G_i^*]$$

$$\boxed{[E_{tot}] = [E] \left(1 + \frac{[G_1]}{K_G} + \frac{[G_2]}{K_C} \right) \left(1 + K_{ADS} \cdot \sum_{i=3}^{nsp} [G_i^*] \right)} \quad (1)$$

Bilan sur les sites

$$[G_i^*]^{TOT} = \sum_{i=3}^n [G_i^*] + \sum_{i=3}^n [EG_i] + \sum_{i=3}^n [EG_iG_1] + \sum_{i=3}^n [EG_iG_2]$$

$$[G_i^*]^{TOT} = \sum_{i=3}^n [G_i^*] + K_{ADS} \cdot [E] \sum_{i=3}^n [G_i^*] + \frac{K_{ADS} \cdot [E][G_1]}{K_G} \sum_{i=3}^n [G_i^*] + \frac{K_{ADS} \cdot [E][G_2]}{K_C} \sum_{i=3}^n [G_i^*]$$

$$\boxed{[G_i^*]^{TOT} = \left(1 + K_{ADS} \cdot [E] \left(1 + \frac{[G_1]}{K_G} + \frac{[G_2]}{K_C} \right) \right) \left(\sum_{i=3}^n [G_i^*] \right)} \quad (2)$$

Le bilan sur les enzymes et sur les sites permet d'obtenir un système de deux équations à deux inconnus, qu'il est ensuite possible de résoudre comme une équation du second degré. Les différentes étapes de la résolution de ce système sont explicitées ci-dessous :

Étape 1: Calcul de la concentration en enzymes libres [E] – résolution d'une équation du second degré

En introduisant l'équation (2) dans l'équation (1), on obtient l'équation suivante qui peut être mise sous la forme d'une équation du second degré ($Ax^2+Bx+C=0$) :

$$[E]^2 \cdot \left(K_{ADS} \cdot \left(1 + \frac{[G_1]}{K_G} + \frac{[G_2]}{K_C} \right)^2 \right) + [E] \cdot \left(1 + \frac{[G_1]}{K_G} + \frac{[G_2]}{K_C} \right) \cdot \left(1 + K_{ADS} \cdot \left([G_i^*]^{TOT} - [E_{tot}] \right) \right) - [E_{tot}] = 0$$

Avec:

$$A = \left(K_{ADS} \cdot \left(1 + \frac{[G_1]}{K_G} + \frac{[G_2]}{K_C} \right)^2 \right); \quad B = \left(1 + \frac{[G_1]}{K_G} + \frac{[G_2]}{K_C} \right) \cdot \left(1 + K_{ADS} \cdot \left([G_i^*]^{TOT} - [E_{tot}] \right) \right); \quad C = -[E_{tot}]$$

En calculant le discriminant de l'équation, on obtient deux solutions et on retient uniquement la solution positive qui est la seule à avoir un sens physique:

$$\Delta = B^2 - A \cdot C \quad \rightarrow [E] = \frac{-B + \sqrt{\Delta}}{2 \cdot A}$$

Étape 2: Calcul des concentrations $[G_i^*]$

Connaissant la concentration en enzymes libres [E] déterminée dans l'étape 1, on peut calculer les concentrations en sites disponibles par la formule suivante :

$$\text{Pour } 3 \leq i \leq n_{esp} \quad [G_i^*] = \frac{F_{a,E} \cdot [G_i]}{1 + K_{ADS} \cdot [E] \left(1 + \frac{[G_1]}{K_G} + \frac{[G_2]}{K_C} \right)}$$

Étape 3: Calcul des concentrations $[EG_i^*]$

Enfin, dans une dernière étape, il est possible de calculer les concentrations en enzymes adsorbées sur chaque chaîne G_i , concentrations qui seront utilisées pour calculer les différentes vitesses de réaction :

$$\text{Pour } 3 \leq i \leq n_{esp} \quad [EG_i] = K_{ADS} \cdot [E] \cdot [G_i^*]$$

2. Optimisation des paramètres

L'optimisation des paramètres du modèle cinétique a pour objectif d'ajuster les valeurs des différents paramètres (constantes cinétiques, constantes d'adsorption, constantes d'inhibition, facteur d'accessibilité...) afin d'obtenir la meilleure prédiction possible des expériences tout en gardant une description correcte des mécanismes réactionnels mis en jeu.

La fonction objectif χ^2 à minimiser lors de cette opération a été définie comme la somme des carrés des écarts expérience-modèle pondérés de la manière suivante :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (a_j \cdot (y_{ij,\text{exp}} - y_{ij,\text{modèle}})^2)$$

où χ^2 est la fonction objectif

n est le nombre de points expérimentaux

m est le nombre d'observables par point expérimental

$y_{ij,\text{exp}}$ est la valeur de la grandeur expérimentale

$y_{ij,\text{modèle}}$ est la valeur de la grandeur calculée par le modèle

a_j est un poids associé à chaque type d'observables

Dans notre cas, le nombre de points expérimentaux est de 365 et le nombre d'observables par point est de 3 (concentration en glucose, en cellobiose et en enzymes libres). Ainsi, le nombre total d'observables est égal à 1095.

Les paramètres du modèle à optimiser sont regroupés dans le Tableau 5-12

L'intégration du système d'équations différentielles a été réalisée à l'aide du solveur DDEBDF de SLATEC (algorithme de Gear) et l'optimisation des paramètres a été effectuée à l'aide du code DN2FB fourni par la bibliothèque PORT Library (Levenberg Marquardt bornée). Le programme principal qui gère l'ensemble des étapes d'intégration et d'optimisation de paramètres est adapté d'un modèle plus générique, SIMULESTIME, développé par IFP Énergies nouvelles.

Tableau 5-12: Paramètres cinétiques à optimiser pour le modèle

k_{EI}	Constante cinétique de la réaction d'hydrolyse par EGI	min^{-1}
k_{CI}	Constante cinétique de la réaction d'hydrolyse par CBHI	min^{-1}
k_{C2}	Constante cinétique de la réaction d'hydrolyse par CBHII	min^{-1}
k_{BT}	Constante cinétique de la réaction d'hydrolyse par la BGL de <i>T. reesei</i>	min^{-1}
k_{BA}	Constante cinétique de la réaction d'hydrolyse par la BGL de <i>A. niger</i>	min^{-1}
k_{syn}	Constante cinétique de synergie CBHI / CBHII	$\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
E_{aEI}	Énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse par EGI	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
E_{aCI}	Énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse par CBHI	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
E_{aC2}	Énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse par CBHII	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
E_{aBT}	Énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse par BGL de <i>T. reesei</i>	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
E_{aBA}	Énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse par BGL de <i>A. niger</i>	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
$K_{ADS EI}$	Constante d'adsorption de EGI sur la cellulose	mM^{-1}
$K_{ADS CI}$	Constante d'adsorption de CBHI sur la cellulose	mM^{-1}
$K_{ADS C2}$	Constante d'adsorption de CBHII sur la cellulose	mM^{-1}
F_{aEI}	Facteur d'accessibilité de EGI	-
F_{aCI}	Facteur d'accessibilité de CBHI	-
F_{aC2}	Facteur d'accessibilité de CBHII	-
$K_m BT$	Constante de Michaelis-Menten de la BGL de <i>T. reesei</i>	mM
$K_m BA$	Constante de Michaelis-Menten de la BGL de <i>A. niger</i>	mM
K_{GEI}	Constante d'inhibition de EGI par le glucose	mM
K_{GCI}	Constante d'inhibition de CBHI par le glucose	mM
K_{GC2}	Constante d'inhibition de CBHII par le glucose	mM
K_{GBT}	Constante d'inhibition de BGL de <i>T. reesei</i> par le glucose	mM
K_{GBA}	Constante d'inhibition de EGI de <i>A. niger</i> par le glucose	mM
K_{CEI}	Constante d'inhibition de EGI par le cellobiose	mM
K_{CCI}	Constante d'inhibition de CBHI par le cellobiose	mM
K_{CC2}	Constante d'inhibition de CBHII par le cellobiose	mM

3. Résultats du modèle cinétique après optimisation

3.1. Paramètres obtenus après optimisation

Le meilleur jeu de paramètres obtenus pour le modèle cinétique est présenté dans le Tableau 5-13. Seuls trois paramètres ($E_{a,EI}$, $E_{a,BT}$ et $K_{G,EI}$) n'ont pas pu être estimés avec les expérimentations réalisées et leur détermination nécessiterait des tests complémentaires. Dans un

souci de simplicité, l'énergie d'activation de EGI a été fixée à 30000 J.mol⁻¹ ce qui représente une énergie d'activation moyenne pour une réaction biochimique. L'énergie d'activation de la β -glucosidase d'*A. niger* a quant à elle été fixée comme étant égale à celle de la β -glucosidase de *T.reesei*. Enfin la constante d'inhibition de EGI est considérée comme infinie, traduisant ainsi une absence d'inhibition de cette enzyme par le glucose.

Tableau 5-13: Valeurs optimisées des paramètres pour le modèle cinétique

k_{EI}	38,1	min ⁻¹
k_{CI}	52,3	min ⁻¹
k_{C2}	140,0	min ⁻¹
k_{BT}	946,0	min ⁻¹
k_{BA}	928,2	min ⁻¹
k_{syn}	5,2.10⁶	mM ⁻¹ .min ⁻¹
E_{aEI}	30000	J.mol ⁻¹
E_{aCI}	38475	J.mol ⁻¹
E_{aC2}	30546	J.mol ⁻¹
E_{aBT}	51060	J.mol ⁻¹
E_{aBA}	51060	J.mol ⁻¹
K_{ADSEI}	700,2	mM ⁻¹
K_{ADSCI}	2000	mM ⁻¹
K_{ADSC2}	2222	mM ⁻¹
F_{aEI}	1,22.10⁻⁴	-
F_{aCI}	0,0185	-
F_{aC2}	0,0155	-
K_{mBT}	1,9	mM
K_{mBA}	1,06	mM
K_{GEI}	1.10 ⁸	mM
K_{GCI}	1.10⁸	mM
K_{GC2}	400	mM
K_{GBT}	13,7	mM
K_{GBA}	8,53	mM
K_{CEI}	0,008	mM
K_{CCI}	0,13	mM
K_{CC2}	0,13	mM

3.2. Cinétique des enzymes pures

L'étude de la cinétique des 5 enzymes pures prises séparément a tout d'abord été menée.

3.2.1. Les β -glucosidases

Dans un premier temps, l'activité des β -glucosidases a été évaluée sur le cellobiose. La Figure 5-3 et la Figure 5-4 présentent, respectivement pour la β -glucosidase de *T. reesei* et pour la β -glucosidase de *A. niger*, le diagramme de parité qui permet de comparer la concentration simulée et la concentration expérimentale en glucose libéré. Pour les deux enzymes, la prédiction de la concentration en glucose libéré est bonne puisque la majorité des points sont compris dans une marge d'erreur de +/-10%. Les paramètres cinétiques déterminés dans le Chapitre 3 ont été légèrement modifiés car dans le modèle cinétique tous les points de la cinétique sont intégrés et pas uniquement les valeurs de vitesses initiales. Pour les 2 familles de β -glucosidases, on observe les mêmes tendances que dans le chapitre 3 même si quelques différences apparaissent :

- la constante cinétique et la constante de Michaelis-Menten de la β -glucosidase de *T. reesei* sont supérieures à celles de *A. niger*
- l'impact du glucose sur l'activité des deux enzymes est assez proche (même ratio K_m/K_G).

Il serait cependant intéressant de confirmer ces résultats pour la β -glucosidase de *T. reesei* en testant l'impact du glucose par ajout d'une quantité de glucose à l'état initial.

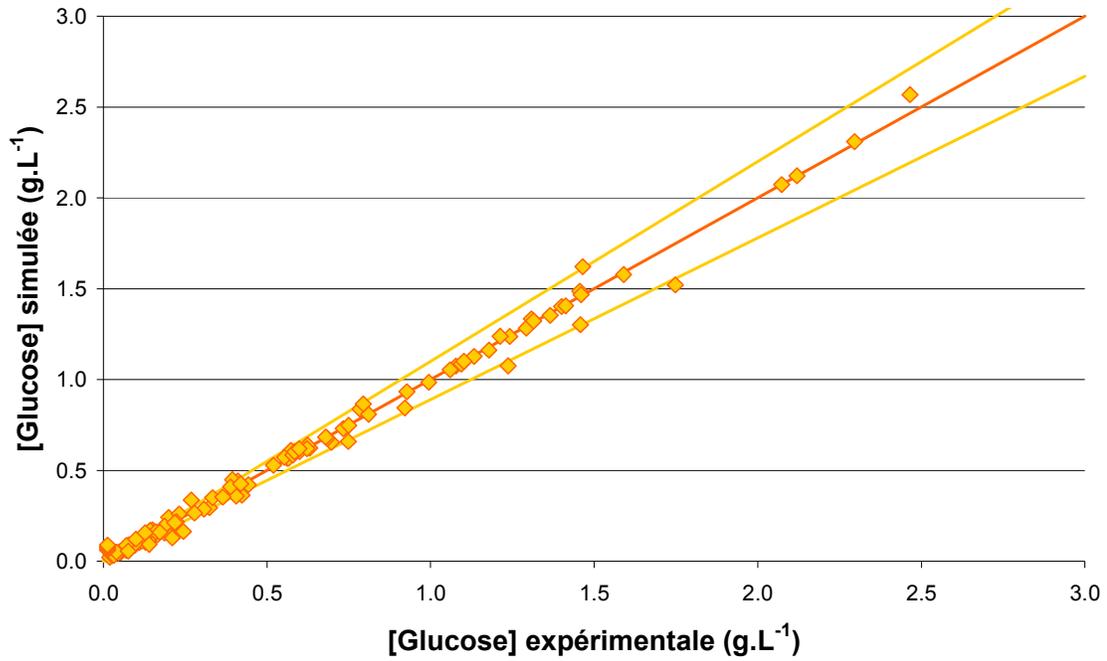


Figure 5-3: Diagramme de parité de la concentration de glucose libéré pour la β -glucosidase de *A. niger* (modèle vs. expérimentation)

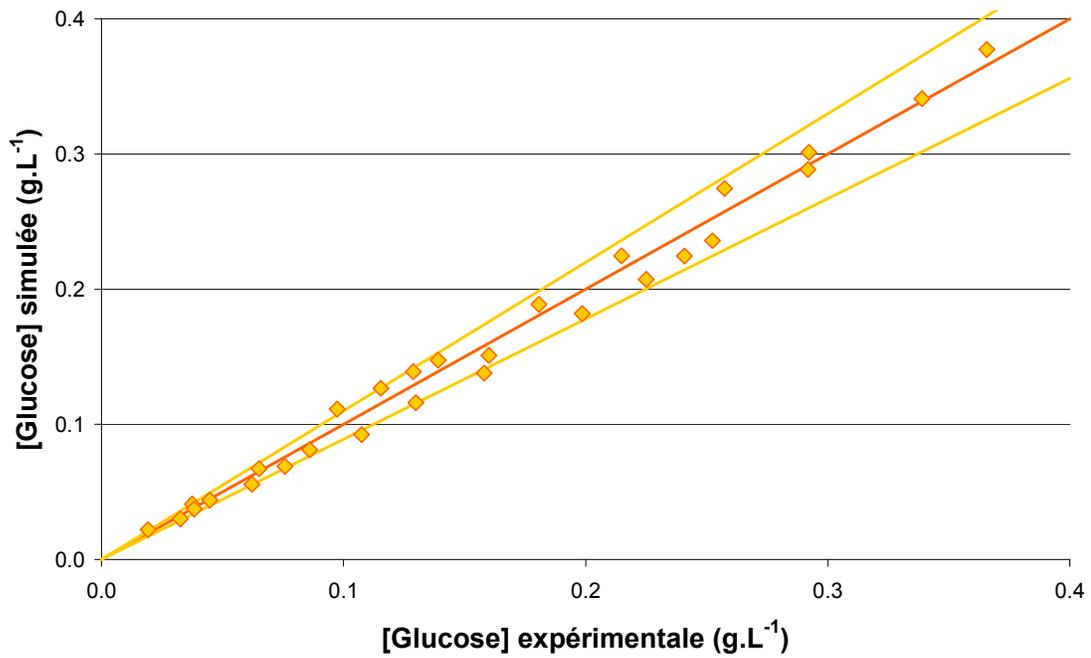


Figure 5-4: Diagramme de parité de la concentration de glucose libéré pour la β -glucosidase de *T. reesei* (modèle vs. expérimentation)

3.2.2. Les Cellobiohydrolases

L'activité des cellobiohydrolases a été ensuite évaluée sur la cellulose Avicel. Les Figure 5-5 et Figure 5-6 présentent les diagrammes de parité de la concentration en enzymes libres et de la quantité de cellobiose libéré. La marge d'erreur représentée est de +/-10%. Pour rappel, les influences de la concentration en enzymes, de la température et de l'inhibition par le glucose ont été étudiées lors de ces expérimentations avec les cellobiohydrolases pures, que cela soit CBH1 ou CBH2.

D'une part, les diagrammes de parité présentant la concentration en enzymes libres montrent que l'adsorption des enzymes sur le substrat est bien prise en compte dans le modèle. D'autre part, les diagrammes de parité présentant la concentration en cellobiose libéré au cours de la réaction montrent que les données cinétiques déterminées permettent bien de prédire la réaction d'hydrolyse de la cellulose pour les cellobiohydrolases pures.

D'après les résultats présentés dans le Chapitre 2, l'inhibition par le glucose était différente pour les deux enzymes: CBHII était sensible à la présence de glucose tandis que CBHI n'était pas impactée. Le modèle d'inhibition non-compétitif par le glucose permet une bonne prédiction de l'inhibition pour CBHII. Dans le cas de CBHI où l'absence d'inhibition a été mise en évidence expérimentalement, la constante d'inhibition a été considérée comme très grande (1.10^8), ce qui correspond à une absence d'inhibition. Cependant, un biais est observé sur la prédiction de la concentration en cellobiose libéré et il peut s'expliquer par des incertitudes sur les données expérimentales.

En comparant les paramètres d'adsorption et les paramètres cinétiques déterminés pour CBHI et CBHII, on observe que :

- la capacité d'adsorption de CBHI, qui est directement reliée au facteur d'accessibilité, est légèrement supérieure à celle de CBHII ($F_{a,C1} > F_{a,C2}$), ce qui avait déjà été montré dans la littérature [48,99]
- l'adsorption de CBHII est plus forte que celle de CBHI, ce qui se traduit par une constante d'adsorption plus élevée. Medve et al [99] avaient déjà observé le même phénomène et avaient montré que la constante de dissociation de CBHI était supérieure à celle de CBHII.
- l'activité hydrolytique de CBHII est supérieure à celle de CBHI ce qui se traduit par une constante cinétique plus élevée (presque trois fois supérieure). Ces résultats sont en accord avec ceux de Tomme et al [39] et de van Tilbeurgh et al [102] qui avaient observé que CBHII avait une activité spécifique supérieure à CBHI.
- la constante d'inhibition par le cellobiose déterminée pour les deux enzymes est identique. La valeur de cette constante a été estimée en prenant en compte l'influence du cellobiose libéré au cours de la réaction mais il n'a pas été possible de réaliser des

expériences en ajoutant une quantité connue de cellobiose à l'état initial. Il serait intéressant de réaliser des tests complémentaires pour améliorer l'estimation de ces paramètres.

Ces résultats révèlent que les deux cellobiohydrolases ont bien des modes d'action et des propriétés cinétiques différentes. L'étude de ces deux enzymes est donc à faire de manière séparée pour permettre d'estimer correctement l'impact de chaque enzyme sur la réaction d'hydrolyse.

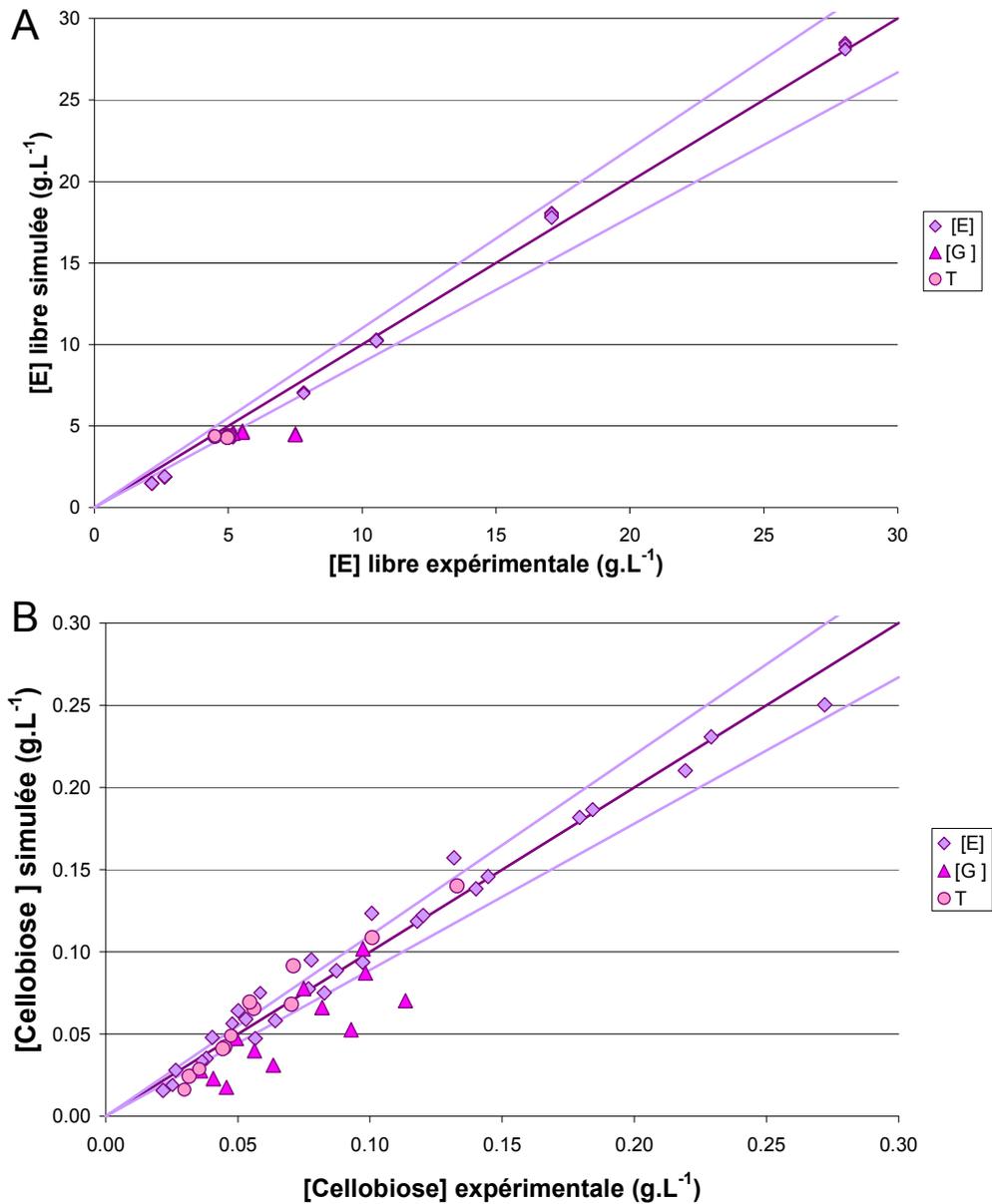


Figure 5-5: Diagramme de parité pour CBHI de *T. reesei* (modèle vs. expérimentation)

(A): Concentration en enzymes libres, (B) Concentration en cellobiose libéré

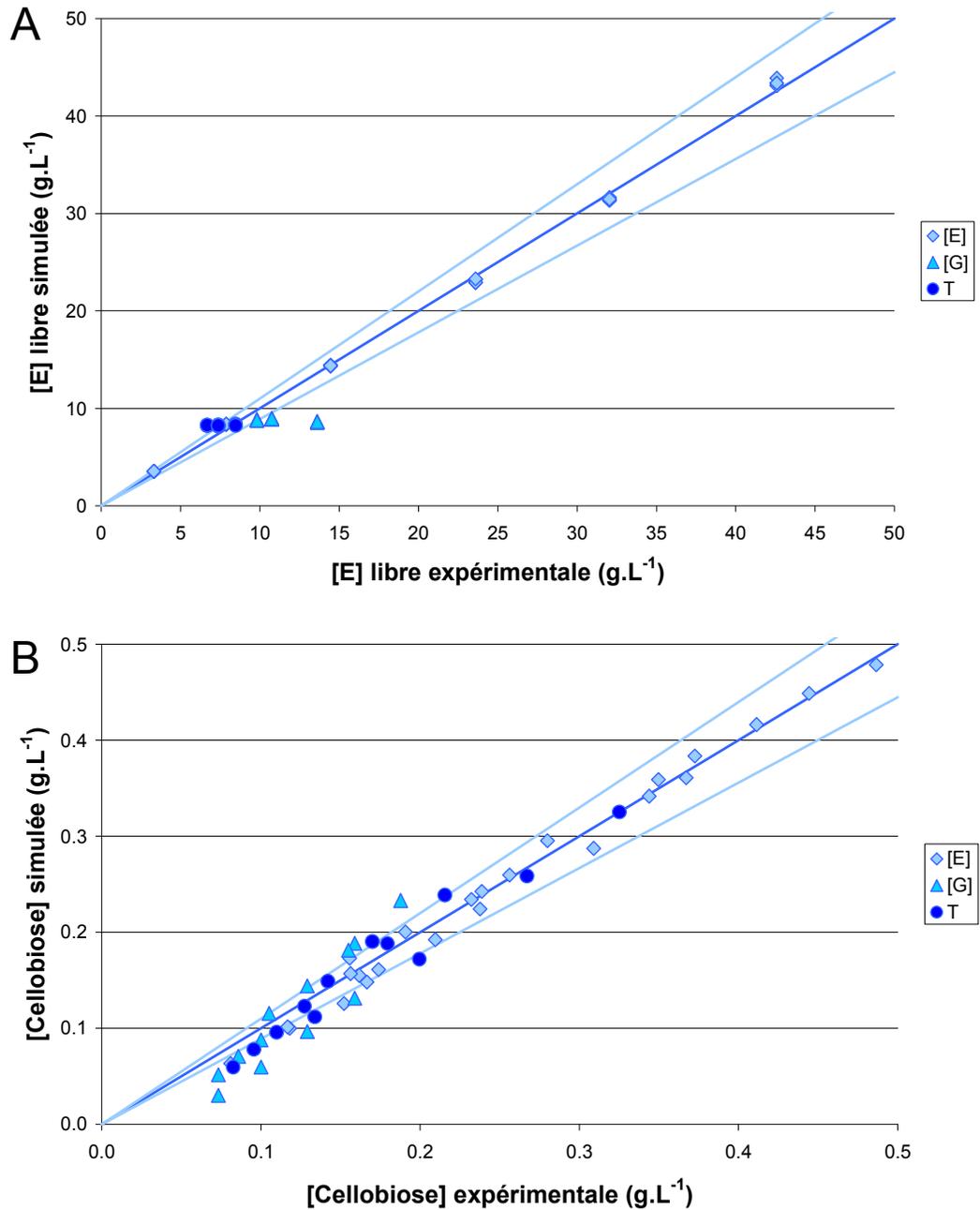


Figure 5-6: Diagramme de parité pour CBHII de *T.reesei* (modèle vs. expérimentation)

(A): Concentration en enzymes libres, (B) Concentration en cellobiose libéré

3.2.3. Les endoglucanases

L'activité des endoglucanases a été enfin modélisée. Lors du suivi de la réaction d'hydrolyse de la cellulose par EGI, seul le suivi de la quantité de cellobiose libéré a pu être effectué, n'ayant pas de méthodes analytiques suffisamment sensibles pour suivre l'évolution du

nombre de bouts de chaînes. Étant donné le peu d'informations disponibles sur l'activité hydrolytique de EGI, les paramètres d'adsorption ont été optimisés en utilisant uniquement les tests cinétiques réalisés avec l'enzyme pure tandis que les paramètres cinétiques (constante cinétique et constant d'inhibition par le glucose) ont été déterminés en utilisant uniquement les tests réalisés avec des mélanges d'enzymes. La constante d'inhibition par le glucose n'a pas pu être évaluée et, par conséquent, sa valeur a été arbitrairement fixée à l'infini, traduisant ainsi une absence d'inhibition. La Figure 5-7 présente le diagramme de parité de la concentration en enzymes libres et de la quantité de cellobiose libéré. La marge d'erreur représentée est de +/-10%. La prédiction de la concentration d'enzymes libres, qui est directement liée au phénomène d'adsorption des enzymes sur le substrat est correctement prédite tandis que la quantité de cellobiose mesurée expérimentalement est clairement sous-estimée par le modèle. Les endoglucanases sont connues pour avoir une forte activité sur les substrats solubles [37,38] et les oligosaccharides ne semblent pas présents dans l'hydrolysats car ils sont directement hydrolysés en glucose et cellobiose [21]. Or, le modèle considère que toutes les chaînes ayant un degré de polymérisation supérieur ou égal à 3 sont solides et il est par conséquent possible que la quantité de cellobiose produite soit sous-estimée car on ne considère pas la très forte réactivité des oligomères solubles.

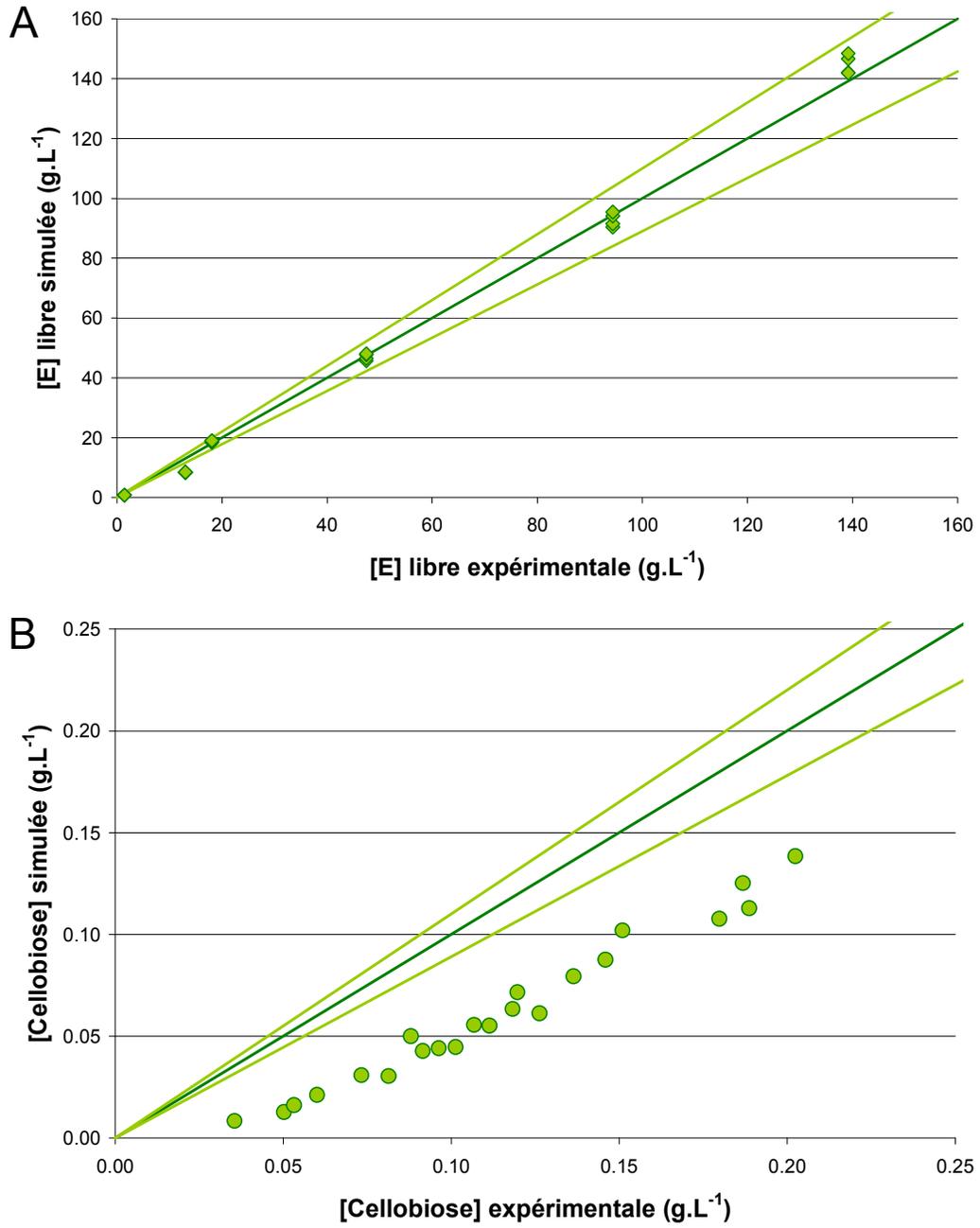


Figure 5-7: Diagramme de parité pour EGI de *T.reesei* (modèle vs. expérimentation)

(A): Concentration en enzymes libres, (B) Concentration en cellobiose libéré

3.3. Résultats de la synergie entre les enzymes

L'étude expérimentale de la synergie, présentée dans le Chapitre 3, a été réalisée pour quatre enzymes (EGI, CBHI, CBHII et BGL), dans les proportions du cocktail enzymatique sécrété par *T. reesei* (Tableau 3-8). Une étude complémentaire a également été menée sur la synergie CBHI/CBHII en faisant varier les concentrations des deux enzymes.

3.3.1. La synergie CBHI / CBHII

Le phénomène de synergie entre les deux cellobiohydrolases présentes dans le cocktail sécrété par *T. reesei* est un des moins bien compris dans le domaine de l'hydrolyse enzymatique. L'étude menée dans le Chapitre 3 a permis de mettre en évidence que la vitesse de synergie était proportionnelle au produit des concentrations en CBHI et CBHII. L'introduction d'un facteur de synergie a été jugée nécessaire pour décrire ce phénomène et les équations cinétiques associées à cette synergie ont été présentées dans la partie 1.4.3. La Figure 5-8 présente le diagramme de parité de la concentration en cellobiose libéré pour les tests réalisés avec des concentrations en CBHI et CBHII variables. La prédiction représente correctement la tendance expérimentale et le modèle utilisé pour décrire la synergie peut être validé. Ce modèle prend en compte une interaction entre les deux types d'enzymes adsorbées mais ne permet pas, malheureusement, d'identifier un mécanisme réactionnel pour cette synergie.

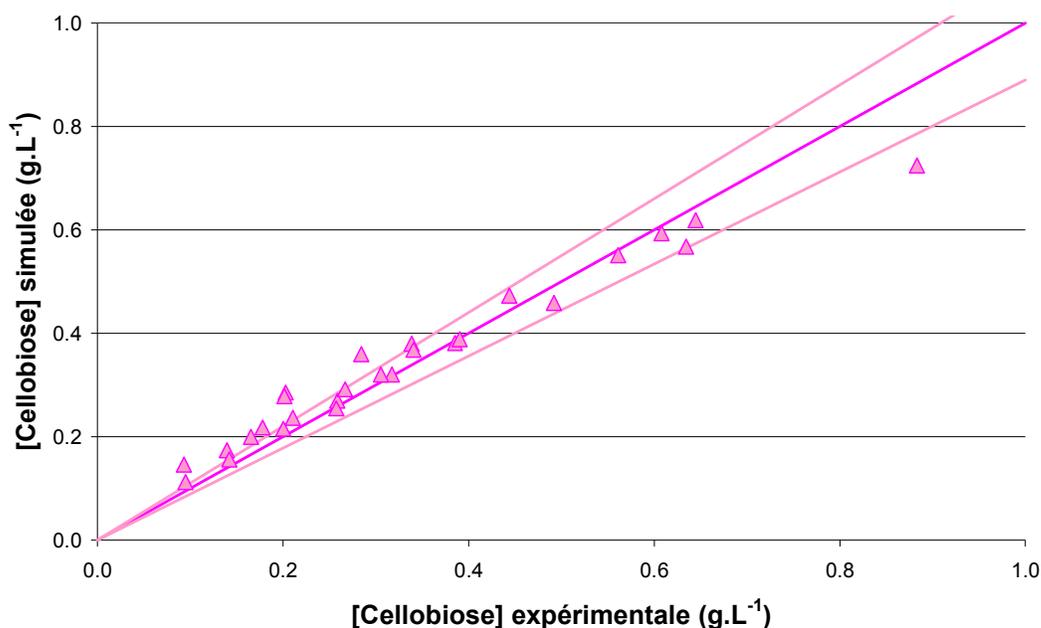


Figure 5-8: Diagramme de parité de la concentration en cellobiose libéré pour la synergie CBHI/CBHII (modèle vs. expérimentation)

Dans la suite de l'étude sur les synergies, seuls les résultats obtenus dans les proportions du cocktail seront décrits. La Figure 5-9 présente l'évolution de la concentration en cellobiose formé en fonction du temps pour les deux cellobiohydrolases seules et mélangées dans les proportions du cocktail. La production de cellobiose est bien prédite et ce graphe montre également l'importance de la prise en compte du phénomène de synergie.

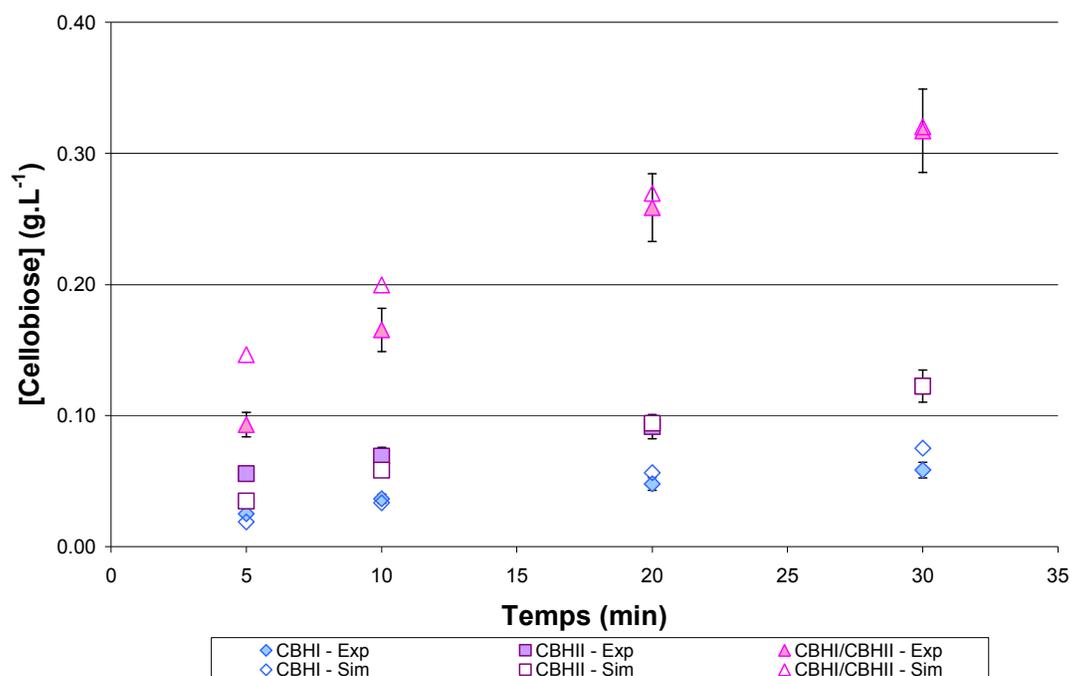


Figure 5-9: Évolution de la concentration en cellobiose en fonction du temps

3.3.2. La synergie CBHs / EG

Le phénomène de synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases est plus facilement expliqué dans la littérature, l'action des endoglucanases libérant de nouveaux bouts de chaînes pour les cellobiohydrolases. Ainsi la présence d'endoglucanases permet d'améliorer de manière significative la production de cellobiose. Les résultats exposés dans le Chapitre 4 ont permis de mettre en évidence que l'action d'hydrolyse des enzymes avait lieu à la surface des particules. Les endoglucanases libèrent donc des sites en surfaces et, étant donné qu'il n'y a pas de prise en compte des géométries de particules dans le modèle, un facteur a été ajouté permettant d'assurer l'accès obligatoire des sites créés par les endoglucanases aux cellobiohydrolases.

La Figure 5-10 présente l'évolution de la concentration en cellobiose libéré en fonction du temps pour des mélanges contenant des CBHI/EG1, des CBH2/EG1 et des CBH1/CBH2/EG1 dans les proportions du cocktail reconstitué. Le modèle développé permet de bien prendre en compte la synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases. Une légère surestimation de la synergie CBHII / EGI peut être toutefois observée. Une explication possible à la

surestimation de cette synergie serait que CBHII soit également doté d'une activité de type endoglucanase. Dans ce cas, l'ajout d'endoglucanases aurait moins d'effets sur l'activité d'hydrolyse de la cellobiohydrolase, ce qui est observé. Cette hypothèse doit néanmoins être validée et nécessite de mettre en œuvre une méthode analytique adaptée au suivi de l'action enzymatique des endoglucanases.

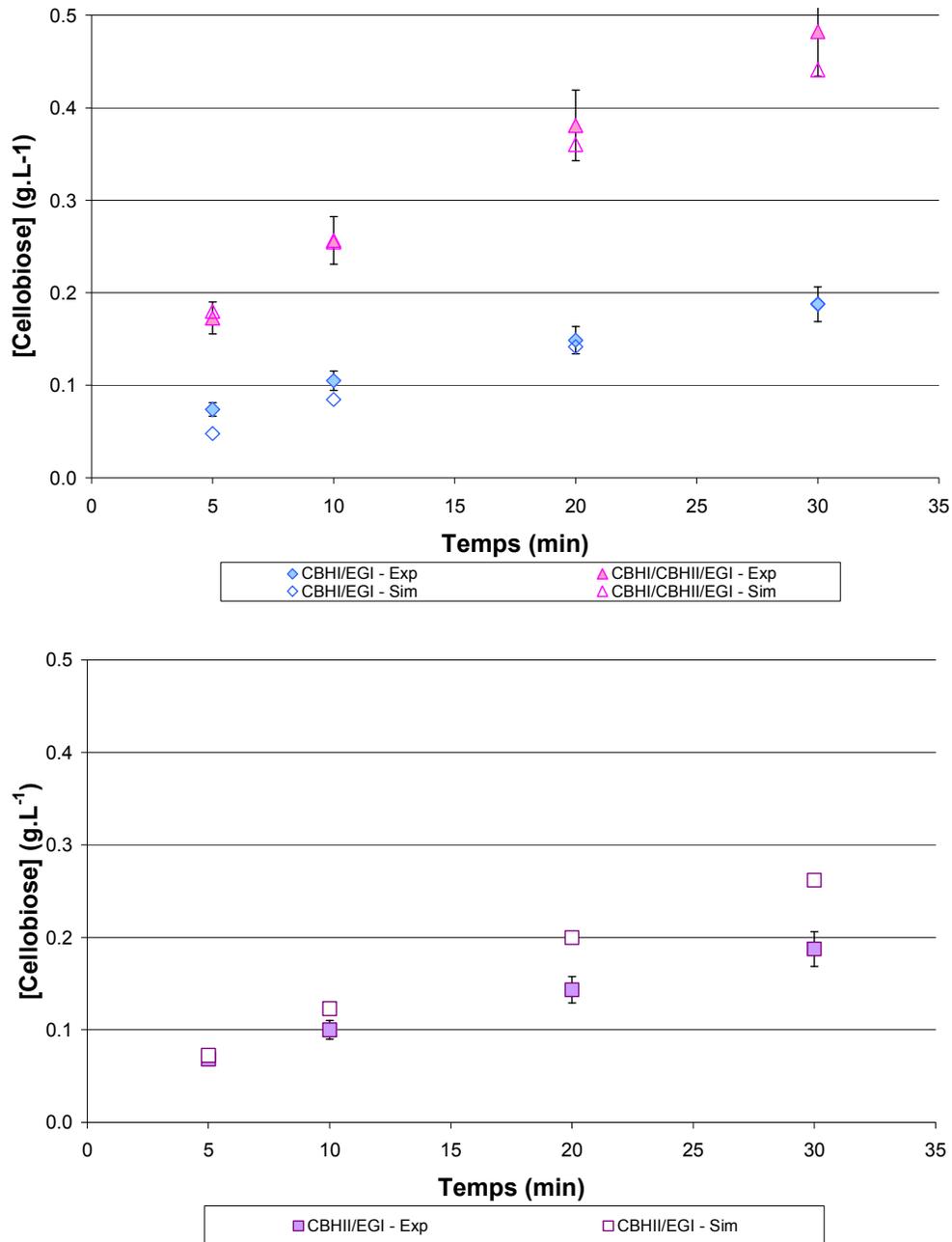


Figure 5-10: Évolution de la concentration en cellobiose libéré en fonction du temps pour des mélanges CBHs / EG

3.3.3. La synergie CBHs et EG / BGL

Le dernier phénomène de synergie observé est l'interaction entre les enzymes agissant sur le substrat solide et libérant du cellobiose et la β -glucosidase. En effet, la β -glucosidase hydrolyse le cellobiose libéré en glucose permettant de limiter l'inhibition des cellobiohydrolases et des endoglucanases par le cellobiose.

La Figure 5-11 présente l'évolution de la concentration en cellobiose et en glucose libéré en fonction du temps pour les différents mélanges contenant CBHI, CBHII et EGI en présence de β -glucosidase dans les proportions du cocktail reconstitué. Le cocktail complet reconstitué est par conséquent représenté dans ce graphe (rond vert).

La prédiction de la production de cellobiose est correctement estimée, voire légèrement surestimée, alors que la production de glucose est largement sous-estimée. On observe donc un biais dû à un problème sur la prédiction de l'activité des β -glucosidases, la sous-estimation de cette activité entraînant la légère surestimation de la production de cellobiose. En cinétique initiale, les concentrations de cellobiose sont faibles et par conséquent, selon le modèle de Michaelis-Menten, la vitesse de réaction est très sensible à la concentration en cellobiose. Il est donc possible que la détermination de la constante cinétique soit entachée d'erreur. De plus, cette constante ayant été déterminée avec des teneurs en enzymes faibles, une erreur sur la quantité d'enzymes introduites peut entraîner une erreur importante sur la détermination de la valeur de la constante cinétique. Afin d'évaluer l'impact de la concentration en enzyme, une simulation a été réalisée en doublant la concentration en β -glucosidase introduite et a permis d'obtenir des résultats proches des résultats expérimentaux. Il serait important de confirmer la valeur de la constante cinétique de la β -glucosidase en effectuant des expériences complémentaires.

Le modèle développé en cinétique initiale permet donc de prédire correctement l'activité des enzymes seules et les différentes synergies, avec néanmoins une légère sous-estimation de l'activité β -glucosidase. Les paramètres cinétiques déterminés sont pour la plupart en accord avec les observations faites dans la littérature ce qui permet de valider les hypothèses utilisées.

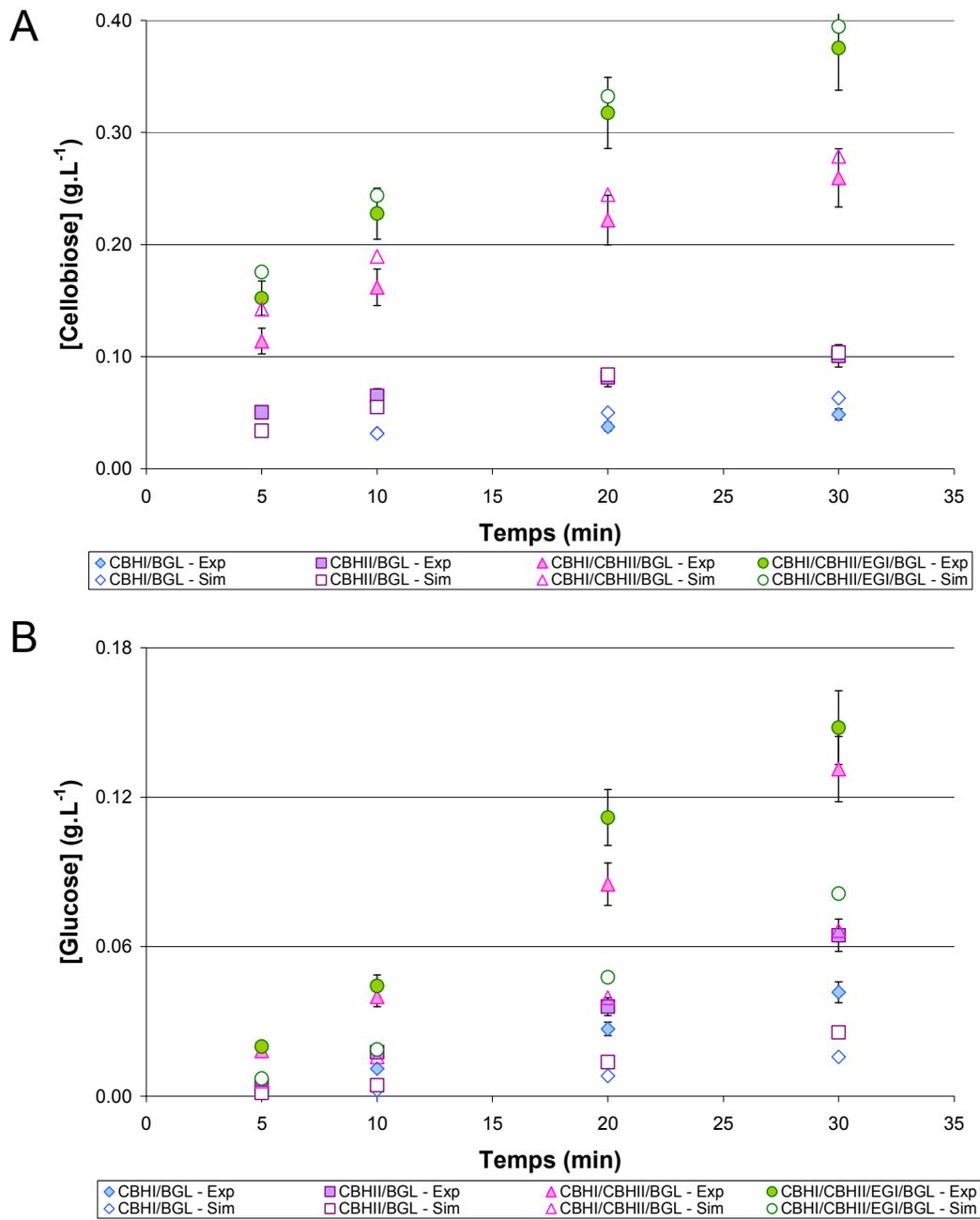


Figure 5-11: Évolution de la concentration en cellobiose libéré (A) et en glucose libéré (B) en fonction du temps

4. Discussion sur le modèle

4.1. Étude du comportement du modèle en cinétique globale

Le modèle développé ayant été validé en cinétique initiale, il est maintenant intéressant d'étudier son comportement pour des temps de réaction longs afin de vérifier si la bonne prédiction de l'activité initiale suffit à prédire la cinétique globale de dégradation de la cellulose.

La Figure 5-12 présente l'évolution de la concentration en glucose et cellobiose libérés en fonction du temps, pour des temps de réaction allant jusqu'à 72h. Le modèle de cinétique initiale développé surestime la production de glucose. Plusieurs phénomènes, mis en avant dans la littérature, n'ont pas été pris en compte et peuvent expliquer cette tendance: (i) la diminution de la réactivité du substrat et (ii) la désactivation des enzymes. Ces différents phénomènes vont donc être intégrés au modèle afin d'améliorer sa prédiction pour des temps d'hydrolyse longs.

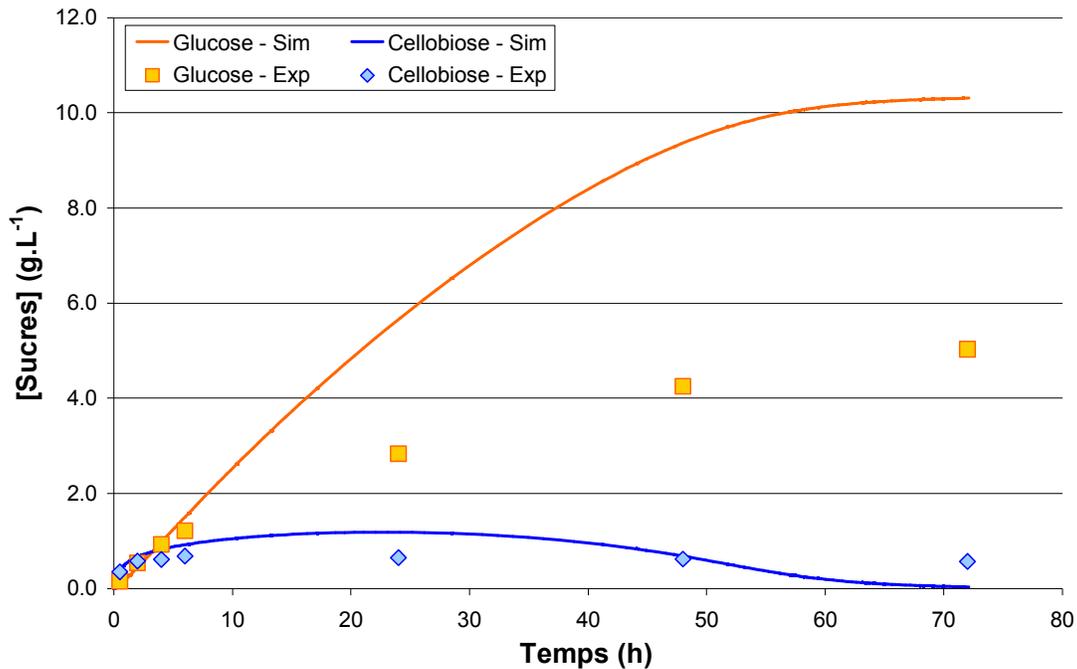


Figure 5-12: Évolution de la concentration en glucose et cellobiose libérés en fonction du temps

4.2. Introduction du phénomène de perte de réactivité du substrat

Les résultats sur l'étude de la réactivité des substrats partiellement hydrolysés, présentés dans le Chapitre 4, ont permis de mettre en évidence que la réactivité du substrat diminuait avec la conversion. Cependant, cette perte de réactivité n'a pas pu être corrélée à l'évolution des paramètres morphologiques du substrat. Afin de prendre en compte ce phénomène, un paramètre de désactivation a été introduit pour corriger la valeur de certaines constantes cinétiques.

Le Tableau 5-14 présente le calcul du paramètre de désactivation due à la diminution de la réactivité du substrat. Ce paramètre est un facteur correctif de la constante cinétique et il sera appliqué uniquement sur les enzymes qui agissent sur le substrat solide (CBHS et EGs). Il ne s'applique pas à la β -glucosidase car son activité ne dépend pas de la réactivité du substrat.

Tableau 5-14: Conditions de prise en compte de la perte de réactivité du substrat

K_{SUB}	Constante de désactivation lié au substrat	0,72
TPH	Taux d'hydrolyse partielle du substrat TPH = 0 pour un substrat vierge	-
$C_{s,ini}$	Concentration initiale en solide	$g.L^{-1}$
C_s	Concentration en solide	$g.L^{-1}$
DES_sub	Facteur de désactivation du à la perte de réactivité du substrat	-
$DES_sub = \left(1 - K_{SUB} \times \left(\frac{C_{s,ini} - C_s \times (1 - TPH)}{C_{s,ini}} \right) \right)$		

Ce paramètre a pu être évalué grâce aux données de cinétiques initiales obtenues sur les substrats partiellement hydrolysés. La réactivité initiale présentée dans le Tableau 4-10 permet de calculer une réactivité relative par rapport au substrat non hydrolysé et le paramètre de désactivation lié au substrat a été estimé en comparant la vitesse initiale relative des substrats partiellement hydrolysés à la réactivité relative mesurée expérimentalement. La constante de désactivation liée au substrat a été estimée à 0,72 et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5-15. L'introduction de la constante de désactivation liée au substrat permet ainsi de bien prendre en compte la diminution de la réactivité initiale des substrats partiellement hydrolysés.

Tableau 5-15: Estimation de la constante de désactivation lié au substrat ($K_{SUB} = 0,72$)

Substrat	BA	A10	A30	A70
Vitesse initiale apparente d'hydrolyse ($g_{glucose} \cdot h^{-1} \cdot g_{enzyme}^{-1}$)	12,0	10,8	11,6	9,4
Réactivité relative	1	0,90	0,97	0,78
Vitesse initiale d'hydrolyse simulée ($g_{glucose} \cdot h^{-1} \cdot g_{enzyme}^{-1}$)	9,4	9,1	8,9	7,3
Vitesse initiale relative	1	0,98	0,94	0,78

La Figure 5-13 présente l'évolution des concentrations en glucose et en cellobiose simulées avec ou sans prise en compte de la perte de réactivité du substrat en fonction du temps

ainsi que les données expérimentales. Même si le modèle qui prend en compte la diminution de la réactivité du substrat est meilleur, la prédiction reste toujours très optimiste et la diminution de la réactivité du substrat a seulement un faible impact sur la vitesse d'hydrolyse.

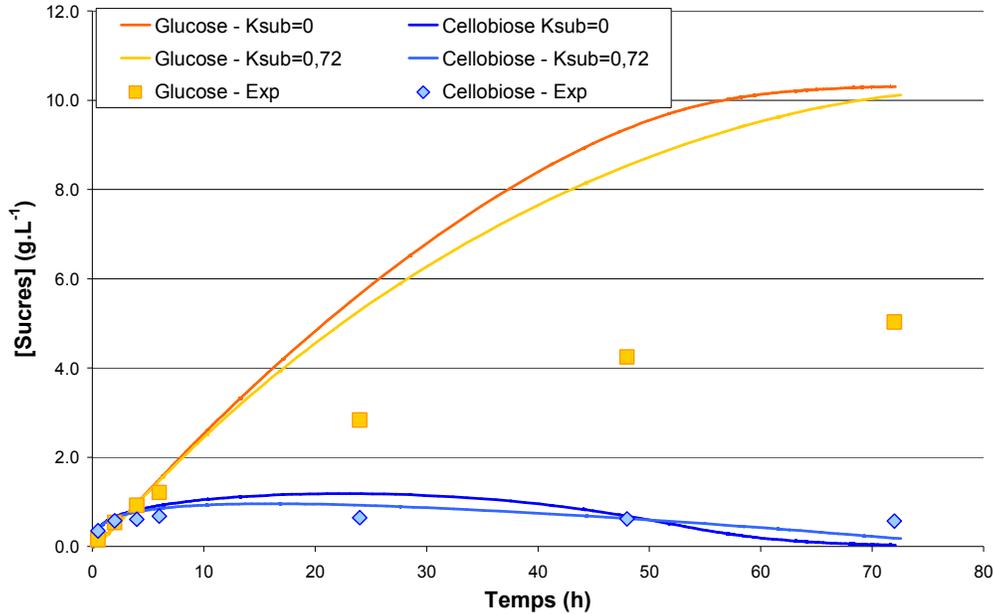


Figure 5-13: Évolution de la concentration en sucres en fonction du temps avec prise en compte de la perte de réactivité du substrat

4.3. Introduction du phénomène de désactivation des enzymes

En vue d'améliorer encore les prédictions du modèle pour des temps d'hydrolyse longs, le phénomène de désactivation des enzymes a donc été introduit.

L'inactivation des enzymes est souvent considérée comme un phénomène qui suit une cinétique du premier ordre [90], soit une décroissance exponentielle au cours du temps. Le Tableau 5-16 présente l'équation utilisée et donne la valeur optimisée du facteur de désactivation due à l'inactivation des enzymes. Ce paramètre est un facteur correctif qu'il convient de multiplier aux constantes cinétiques de toutes les enzymes, y compris les β -glucosidases car il prend en compte une désactivation globale des enzymes (thermique, mécanique...).

Tableau 5-16: Conditions de prise en compte de la désactivation des enzymes

K_{ENZ}	Constante de désactivation des enzymes	0,00075 min ⁻¹
DES_enz	Facteur de désactivation due à l'inactivation des enzymes	-
$DES_enz = \exp(-K_{ENZ} \times t)$		

La Figure 5-14 présente les profils de concentration en glucose et cellobiose obtenus pour les différentes simulations en fonction du temps. Le modèle prenant en compte la perte de réactivité du substrat et la désactivation des enzymes permet de représenter correctement les résultats expérimentaux obtenus. Ce modèle montre que le phénomène de désactivation des enzymes est beaucoup plus important que la perte de réactivité du substrat. En effet, environ 66% des enzymes sont désactivées après seulement 24h et 88% le sont après 48h. Il est donc important de considérer ce paramètre et de chercher à identifier les causes de cette désactivation.

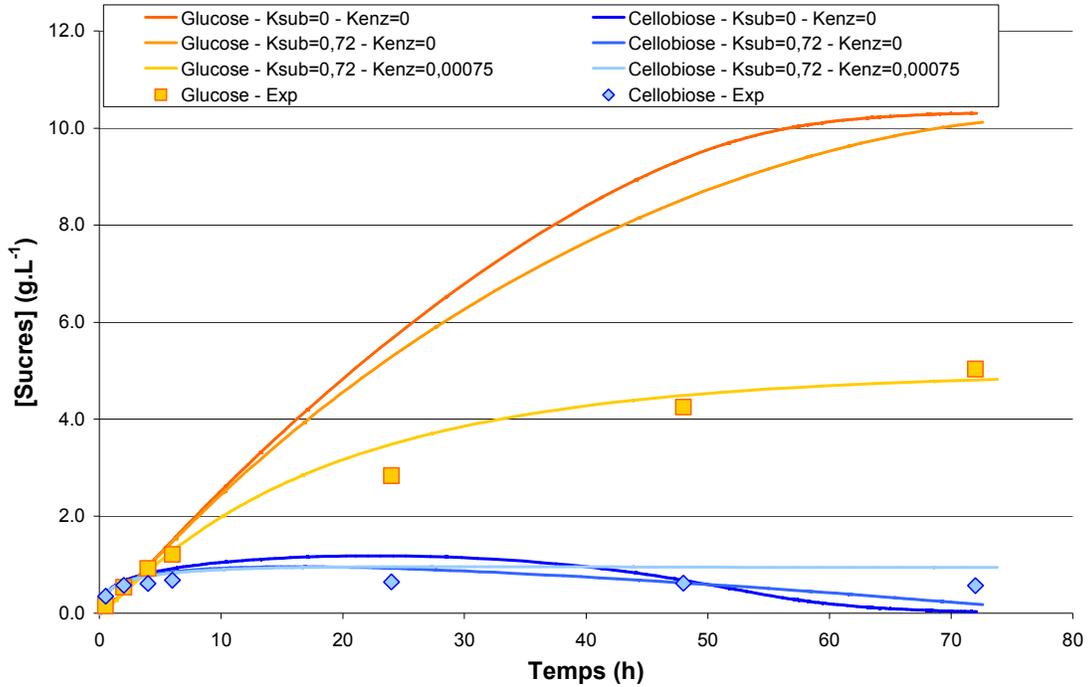


Figure 5-14: Évolution de la concentration en sucres en fonction du temps avec prise en compte de la perte de réactivité du substrat et de la désactivation des enzymes

5. Conclusions et perspectives

Au cours de ce chapitre, les différents schémas réactionnels de chaque type de réaction enzymatique ont été présentés ainsi que les équations cinétiques associées. Ils permettent de prendre en compte les propriétés intrinsèques de chaque type d'enzyme et les phénomènes de synergie associés. Les différents paramètres ont été estimés grâce au programme SIMULESTIME sur la base des expérimentations présentées dans le Chapitre 3.

Les diagrammes de parité et les courbes présentant la production de glucose et de cellobiose en fonction du temps ont permis de confronter la modélisation effectuée à l'expérimentation. Le modèle offre une bonne description des résultats expérimentaux avec cependant une sous-estimation de l'activité β -glucosidase. Des tests complémentaires sont donc nécessaires pour lever cette ambiguïté.

Le modèle de cinétique initiale a été testé pour des temps de réaction longs afin de voir si la description de l'activité initiale suffisait à prédire la cinétique globale de dégradation de la cellulose. Les résultats ont montré que le modèle était trop "optimiste" et il a été corrigé en introduisant les phénomènes de perte d'activité du substrat au cours de la réaction et de désactivation des enzymes. La constante de désactivation due à la diminution de la réactivité du substrat a pu être estimée grâce aux expériences réalisées sur les substrats partiellement hydrolysés (Chapitre 4) et la constante de désactivation des enzymes a été déterminée grâce au test en cinétique globale.

Le modèle ainsi élaboré offre une bonne prédiction de l'activité d'hydrolyse du cocktail enzymatique de *T. reesei* mais des validations et des améliorations sont encore nécessaires.

En ce qui concerne les enzymes, il serait intéressant de valider le modèle pour différentes concentrations en enzymes et dans des proportions différentes de celle du cocktail de *T. reesei*. Une fois validé, le modèle pourrait être utilisé pour identifier les activités dominantes et pour prédire la composition du cocktail ayant une capacité d'hydrolyse de la cellulose optimale.

En ce qui concerne le substrat, plusieurs voies d'amélioration sont aussi envisageables :

- Il serait fondamental d'améliorer la description du substrat dans le modèle. A l'heure actuelle, le substrat est décrit comme des chaînes indépendantes de tailles variables dont l'accessibilité est liée à un facteur d'accessibilité qui a été estimé grâce aux données expérimentales et qui est constant quel que soit le taux d'hydrolyse. Or les expérimentations présentées dans le Chapitre 4 ont permis de mettre en évidence que l'hydrolyse de la cellulose avait lieu à la surface des particules suivant un mécanisme d'érosion. L'introduction d'un sous-modèle permettant de suivre l'évolution de la taille des particules pourrait permettre de rendre plus réaliste le suivi des propriétés du substrat. De plus, la taille des particules semble jouer un rôle important sur l'accessibilité et il serait intéressant d'évaluer son impact sur la réactivité. Un début d'amélioration a consisté à réaliser un essai de tamisage à sec de la cellulose mais les mesures de taille de particule en milieu aqueux ont montré que le fractionnement n'avait pas été efficace.
- Le modèle a pour l'instant été testé uniquement sur la cellulose Avicel et mérite d'être validé en utilisant d'autres substrats cellulosiques. Des expériences complémentaires pourraient être réalisées sur la cellulose PCBB qui présente notamment des propriétés morphologiques différentes de la cellulose Avicel en matière de degré de polymérisation.
- Il a été développé pour des teneurs faibles en matière sèche afin de s'affranchir des phénomènes de diffusion (1% de matière sèche). Or le procédé industriel envisage de travailler avec des teneurs élevées en matière sèche et l'influence de cette dernière doit

donc être évaluée. Cette étude permettra de prendre en compte les limitations diffusionnelles et d'améliorer la pertinence du modèle en vue du dimensionnement des réacteurs.

- Enfin, le modèle est validé pour des substrats celluloses purs. Or le procédé industriel utilisera des biomasses lignocellulosiques réels et le modèle devra tenir compte de la présence éventuelle d'hémicelluloses et de lignine. L'influence de la présence de ces deux fractions ainsi que l'influence du type de prétraitement subi sont également des améliorations à envisager pour le modèle.

Enfin, l'étude du comportement du modèle sur des temps de réaction longs a montré que le modèle développé était trop "optimiste". La correction apportée par rapport à la problématique de diminution de la réactivité du substrat n'est pas suffisante pour traduire la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse au cours de la réaction et une correction supplémentaire liée à la désactivation des enzymes a dû être introduite. Ce facteur correctif englobe tous les phénomènes de désactivation, à savoir l'adsorption non-productive des enzymes, la dénaturation thermique ou mécanique, etc... Une étude plus approfondie semble donc là encore nécessaire afin d'identifier les mécanismes de désactivation mis en jeu et l'origine exacte de la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse au cours de la réaction.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Afin de répondre à la demande mondiale croissante en carburant automobile et de limiter les émissions de gaz à effet de serre, le développement de carburant alternatif devient un enjeu important pour la recherche tant sur un plan technologique que sociétal. La production d'éthanol 2G par voie biochimique, en utilisant la ressource lignocellulosique entière et pas uniquement les éléments de réserve de la plante, est une des solutions envisagées. A l'heure actuelle, il est clairement avéré que l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose reste l'un des points fondamentaux à améliorer en vue de développer ce type de procédé.

Ce travail s'est proposé de construire un modèle cinétique prédictif de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose prenant en compte les paramètres intrinsèques des enzymes et l'influence des paramètres structuraux du substrat. Pour cela, une étude bibliographique a été menée afin d'identifier les principaux facteurs gouvernant la réaction d'hydrolyse enzymatique, au niveau des enzymes et du substrat, et de présenter une synthèse des principaux modèles cinétiques existants dans la littérature. Cet état de l'art a montré qu'il n'existait pas à l'heure actuelle de modèle basé sur des expériences qui prenaient en compte les propriétés intrinsèques des enzymes et une description détaillée du substrat. Une étude expérimentale a donc été menée afin d'acquérir des données cinétiques permettant la caractérisation des enzymes pures et en mélange dans les proportions du cocktail enzymatique sécrété par *T. reesei*. Puis l'évolution des propriétés morphologiques du substrat et de sa réactivité au cours de l'hydrolyse enzymatique ont été déterminées en caractérisant des substrats ayant au préalable subi une hydrolyse partielle à différents taux de conversion. Plusieurs méthodes analytiques ont été développées afin de caractériser les différents niveaux de structure de la cellulose. Enfin, un modèle de cinétique initiale, prenant en compte les propriétés cinétiques intrinsèques des enzymes, les phénomènes de synergie et une description de substrat cellulosique a été développé et traduit en terme logiciel dans le langage Fortran.

L'étude cinétique des cellulases pures sur leur substrat de référence a permis de mettre en évidence deux types de mécanismes réactionnels: (i) un mécanisme d'adsorption de l'enzyme sur le substrat avant la réaction d'hydrolyse pour les enzymes attaquant directement le substrat solide (cellobiohydrolases et endoglucanases), (ii) un mécanisme classique de réaction enzymatique en milieu homogène avec formation d'un complexe enzyme-substrat dans le cas de la β -glucosidase. Dans les deux cas, l'importance de la prise en compte des phénomènes d'inhibition par les produits a été prouvée.

L'étude de la cinétique d'hydrolyse avec des mélanges d'enzymes dans les proportions du cocktail enzymatique sécrété par *T. reesei* a permis de mettre en évidence des phénomènes de synergie. Outre le mécanisme de synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases clairement identifié dans la littérature, le mécanisme lié à la synergie entre CBHI et CBHII n'est

toujours pas totalement élucidé et une étude complémentaire a été réalisée afin de paramétrer au mieux ce phénomène.

La comparaison de la réactivité de notre cocktail reconstitué contenant quatre types d'enzymes (EGI, CBHI, CBHII et BGL) dans les proportions du cocktail sécrété par *T. reesei* avec le cocktail réel a permis de valider notre stratégie de modélisation, ce cocktail permettant de reproduire correctement l'activité du cocktail réel.

L'analyse détaillée de la morphologie de substrats ayant été partiellement hydrolysés a permis de comprendre l'évolution de la structure du substrat au cours de la réaction d'hydrolyse. Alors que les propriétés morphologiques à l'échelle moléculaire et nanométrique ne varient pas au cours de la conversion tandis que la taille des particules évolue, traduisant en cela un mécanisme d'érosion de la cellulose sans pénétration des enzymes au cœur de l'architecture cristalline. La diminution de la réactivité intrinsèque de la cellulose au cours de la conversion a également été mise en évidence et ce malgré une augmentation de la surface spécifique accessible. Cette diminution n'a pas cependant pas être corrélée à un changement de morphologie du substrat mais reste un paramètre important à prendre en compte dans la modélisation de la réaction d'hydrolyse.

Le modèle cinétique développé est basé d'une part, sur un modèle de type "Langmuir" avec inhibition non-compétitive par le glucose et le cellobiose pour les cellobiohydrolases et les endoglucanases, et d'autre part, sur le modèle de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le glucose pour la β -glucosidase. La cellulose est quant à elle décrite par des chaînes indépendantes de tailles variables dont l'accessibilité est régie par un facteur d'accessibilité. Le modèle cinétique développé permet une bonne description de la cinétique initiale de dégradation de la cellulose mais ne suffit pas à la description de la cinétique globale. L'introduction d'un facteur correctif permettant de prendre en compte la diminution de la réactivité du substrat mais surtout d'un facteur lié à la désactivation des enzymes a permis d'améliorer cette prédiction et a montré l'importance de considérer la perte de réactivité des enzymes.

Il reste cependant quelques points à valider dans le modèle et de nombreuses pistes d'amélioration ont été proposées. Au niveau des enzymes, la validation du modèle dans des proportions différentes de celle du cocktail actuel de *T. reesei* pourrait conduire au design d'un cocktail optimum. Au niveau du substrat, il serait intéressant de développer un modèle d'érosion des particules et de le valider en utilisant un autre substrat cellulosique présentant des propriétés morphologiques différentes. De plus, d'autres facteurs comme l'influence de la teneur en matière sèche ou la présence d'hémicellulose ou de lignine doivent être pris en compte pour se rapprocher des conditions industrielles. Enfin, il serait intéressant de compléter cette étude afin d'identifier les mécanismes de désactivation des enzymes ayant lieu au cours de l'hydrolyse enzymatique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ballerini D.. **LES BIOCARBURANTS Etat des lieux, perspectives et enjeux du développement.** *Chapitre 1: La place des biocarburants dans le contexte énergétique mondial.* 5-10. 2006. Edition TECHNIP.
2. Pugnet J-L, Blanchet R, Salençon J, Carpentier A: *Le changement climatique - Institut de France - Académie des Sciences.* 2010.
3. Coelho S.T., Goldemberg J., Guardabassi P., Lora B.A.: **L'état de l'art des biocarburants au monde.** *19 November 8 A.D.*
4. Olofsson K, Bertilsson M, Liden G: **A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks.** *Biotechnology for Biofuels* 2008, **1**:7.
5. Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD: **Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production.** *Science* 2007, **315**:804-807.
6. Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F: **New improvements for lignocellulosic ethanol.** *Current Opinion in Biotechnology* 2009, **20**:372-380.
7. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS: **Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002, **66**:506-560.
8. Mandels M, Reese E.T.: **Induction of cellulose in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals.** *J Bact* 1957, **73**:269-278.
9. Reese E.T.& Mandels M: **Enzymatic degradation.** In *Cellulose and cellulose derivatives.* Edited by Edited by In N.M.Bikales and L.Segal. Wiley Interscience, New York, N.Y.; 1971:1079-1094.
10. Herpoel-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Molle D, Lignon S, Mathis H, Sigoillot JC, Monot F, Asther M: **Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains.** *Biotechnology for Biofuels* 2008, **1**:18.
11. Ayrinhac C, Margeot A, Ferreira NL, Chaabane FB, Monot F, Ravot G, Sonet JM, Fourage L: **Improved Saccharification of Wheat Straw for Biofuel Production Using an Engineered Secretome of *Trichoderma reesei*.** *Organic Process Research & Development* 2010, **15**:275-278.
12. Teeri TT, Koivula A, Linder M, Wohlfahrt G, Divne C, Jones TA: ***Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?** *Biochemical Society Transactions* 1998, **26**:173-178.
13. Ting CL, Makarov DE, Wang ZG: **A Kinetic Model for the Enzymatic Action of Cellulase.** *Journal of Physical Chemistry B* 2009, **113**:4970-4977.

14. Igarashi K, Wada M, Hori R, Samejima M: **Surface density of cellobiohydrolase on crystalline celluloses - A critical parameter to evaluate enzymatic kinetics at a solid-liquid interface.** *Febs Journal* 2006, **273**:2869-2878.
15. Linder M, Salovuori I, Ruohonen L, Teeri TT: **Characterization of a double cellulose-binding domain - Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**:21268-21272.
16. Teeri TT: **Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases.** *Trends in Biotechnology* 1997, **15**:160-167.
17. Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JK, Teeri TT, Jones TA: **The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*.** *Science* 1994, **265**:524-528.
18. Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T, Knowles JK, Jones TA: **Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*.** *Science* 1990, **249**:380-386.
19. Beckham GT, Bomble YJ, Bayer EA, Himmel ME, Crowley MF: **Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose.** *Curr Opin Biotechnol* 2011, **22**:231-238.
20. Nidetzky B, Zachariae W, Gercken G, Hayn M, Steiner W: **Hydrolysis of Cellooligosaccharides by *Trichoderma-Reesei* Cellobiohydrolases - Experimental-Data and Kinetic Modeling.** *Enzyme and Microbial Technology* 1994, **16**:43-52.
21. Medve J, Karlsson J, Lee D, Tjerneld F: **Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes.** *Biotechnology and Bioengineering* 1998, **59**:621-634.
22. Nidetzky B, Zachariae W, Gercken G, Hayn M, Steiner W: **Hydrolysis of Cellooligosaccharides by *Trichoderma-Reesei* Cellobiohydrolases - Experimental-Data and Kinetic Modeling.** *Enzyme and Microbial Technology* 1994, **16**:43-52.
23. Tuohy MG, Walsh DJ, Murray PG, Claeysens M, Cuffe MM, Savage AV, Coughlan MP: **Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*.** *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 2002, **1596**:366-380.
24. Stahlberg J, Johansson G, Pettersson G: **A New Model for Enzymatic-Hydrolysis of Cellulose Based on the 2-Domain Structure of Cellobiohydrolase-I.** *Bio-Technology* 1991, **9**:286-290.
25. Srisodsuk M, Lehtio J, Linder M, MargollesClark E, Reinikainen T, Teeri TT: ***Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose.** *Journal of Biotechnology* 1997, **57**:49-57.
26. Boussaid A, Saddler JN: **Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps.** *Enzyme and Microbial Technology* 1999, **24**:138-143.

27. Linder M, Teeri TT: **The roles and function of cellulose-binding domains.** *Journal of Biotechnology* 1997, **57**:15-28.
28. Harjunpaa V, Teleman A, Koivula A, Ruohonen L, Teeri TT, Teleman O, Drakenberg T: **Cello-oligosaccharide hydrolysis by cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* - Association and rate constants derived from an analysis of progress curves.** *European Journal of Biochemistry* 1996, **240**:584-591.
29. Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, Hendrickson C: **Inhibition of *Trichoderma-Reesei* Cellulase by Sugars and Solvents.** *Biotechnology and Bioengineering* 1990, **36**:275-287.
30. Holtzapple MT, Caram HS, Humphrey AE: **Determining the Inhibition Constants in the Hch-1 Model of Cellulose Hydrolysis.** *Biotechnology and Bioengineering* 1984, **26**:753-757.
31. Xiao ZZ, Zhang X, Gregg DJ, Saddler JN: **Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004, **113-16**:1115-1126.
32. Bezerra RMF, Dias AA: **Discrimination among eight modified Michaelis-Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004, **112**:173-184.
33. Gruno M, Valjamae P, Pettersson G, Johansson G: **Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **86**:503-511.
34. Karlsson J, Siika-aho M, Tenkanen M, Tjerneld F: **Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*.** *Journal of Biotechnology* 2002, **99**:63-78.
35. Macarron R, Acebal C, Castillon MP, Dominguez JM, Delamata I, Pettersson G, Tomme P, Claeyssens M: **Mode of Action of Endoglucanase-Iii from *Trichoderma-Reesei*.** *Biochemical Journal* 1993, **289**:867-873.
36. Stahlberg J, Johansson G, Pettersson G: ***Trichoderma-Reesei* Has No True Exo-Cellulase - All Intact and Truncated Cellulases Produce New Reducing End Groups on Cellulose.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1993, **1157**:107-113.
37. Claeyssens M, Vantilbeurgh H, Kamerling JP, Berg J, Vrsanska M, Biely P: **Studies of the Cellulolytic System of the Filamentous Fungus *Trichoderma-Reesei* Qm-9414 - Substrate-Specificity and Transfer Activity of Endoglucanase-I.** *Biochemical Journal* 1990, **270**:251-256.
38. Biely P, Vrsanska M, Claeyssens M: **The Endo-1,4-Beta-Glucanase-I from *Trichoderma-Reesei* - Action on Beta-1,4-Oligomers and Polymers Derived from D-Glucose and D-Xylose.** *European Journal of Biochemistry* 1991, **200**:157-163.
39. Tomme P, Vantilbeurgh H, Pettersson G, Vandamme J, Vandekerckhove J, Knowles J, Teeri T, Claeyssens M: **Studies of the Cellulolytic System of *Trichoderma-Reesei* Qm-**

- 9414 - Analysis of Domain Function in 2 Cellobiohydrolases by Limited Proteolysis.** *European Journal of Biochemistry* 1988, **170**:575-581.
40. Bezerra RMF, Dias AA: **Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis - Inhibition by ethanol and cellobiose.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2005, **126**:49-59.
 41. Dekker RFH: **Kinetic, Inhibition, and Stability Properties of A Commercial Beta-D-Glucosidase (Cellobiase) Preparation from Aspergillus-Niger and Its Suitability in the Hydrolysis of Lignocellulose.** *Biotechnology and Bioengineering* 1986, **28**:1438-1442.
 42. Calsavara LPV, De Moraes FF, Zanin GM: **Modeling cellobiose hydrolysis with integrated kinetic models.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1999, **77-9**:789-806.
 43. Bravo V, Paez MP, Aoulad M, Reyes A: **The influence of temperature upon the hydrolysis of cellobiose by beta-1,4-glucosidases from Aspergillus niger.** *Enzyme and Microbial Technology* 2000, **26**:614-620.
 44. Grous W, Converse A, Grethlein H, Lynd L: **Kinetics of Cellobiose Hydrolysis Using Cellobiase Composites from Trichoderma-Reesei and Aspergillus-Niger.** *Biotechnology and Bioengineering* 1985, **27**:463-470.
 45. Nidetzky B, Steiner W, Claeysens M: **Cellulose Hydrolysis by the Cellulases from Trichoderma-Reesei - Adsorptions of 2 Cellobiohydrolases, 2 Endocellulases and Their Core Proteins on Filter-Paper and Their Relation to Hydrolysis.** *Biochemical Journal* 1994, **303**:817-823.
 46. Tomme P, Heriban V, Claeysens M: **Adsorption of 2 Cellobiohydrolases from Trichoderma-Reesei to Avicel - Evidence for Exo-Exo Synergism and Possible Loose Complex-Formation.** *Biotechnology Letters* 1990, **12**:525-530.
 47. Kim DW, Jang YH, Jeong YK: **Adsorption kinetics and behaviour of two cellobiohydrolases from Trichoderma reesei on microcrystalline cellulose.** *Biotechnol Appl Biochem* 1998, **27**:97-102.
 48. Kim D, Hong Y: **Description of cellobiohydrolases Ce16A and Ce17A from Trichoderma reesei using Langmuir-type models.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2001, **6**:89-94.
 49. Woodward J: **Synergism in Cellulase Systems.** *Bioresource Technology* 1991, **36**:67-75.
 50. Woodward J, Lima M, Lee NE: **The Role of Cellulase Concentration in Determining the Degree of Synergism in the Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose.** *Biochemical Journal* 1988, **255**:895-899.
 51. Woodward J, Hayes MK, Lee NE: **Hydrolysis of Cellulose by Saturating and Non-Saturating Concentrations of Cellulase - Implications for Synergism.** *Bio-Technology* 1988, **6**:301-304.

52. Henrissat B, Driguez H, Viet C, Schulein M: **Synergism of Cellulases from *Trichoderma-Reesei* in the Degradation of Cellulose.** *Bio-Technology* 1985, **3**:722-726.
53. Hoshino E., Shiroishi M., Amano Y., Nomura M., Kanda T.: **Synergistic Actions of Exo-Type Cellulases in the Hydrolysis of Cellulose with Different Crystallinities.** *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1997, **84**:300-306.
54. Drissen RET, Maas RHW, Van Der Maarel MJEC, Kabel MA, Schols HA, Tramper J, Beeftink HH: **A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex.** *Biocatal Biotransformation* 2007, **25**:419-429.
55. Boer H, Koivula A: **The relationship between thermal stability and pH optimum studied with wild-type and mutant *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A.** *European Journal of Biochemistry* 2003, **270**:841-848.
56. Ballerini D.. **LES BIOCARBURANTS Etat des lieux, perspectives et enjeux du développement.** Chapitre 6: La transformation de la biomasse lignocellulosique par voie biochimique, 261-262. 2006. Edition TECHNIP.
57. Pérez S, Samain D: **Structure and Engineering of Celluloses.** In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Volume 64 edition. Edited by Edited by Derek H. Academic Press; 2010:25-116.
58. Larsson PT, Wickholm K, Iversen T: **A CP/MAS13C NMR investigation of molecular ordering in celluloses.** *Carbohydrate Research* 1997, **302**:19-25.
59. Pérez S., Camélia Stinga N., Samain D.. **Structure et ingénierie du matériau cellulose.** In « Génie des procédés verts et durables : outils et méthodes »Martine POUX, Christophe GOURDON, Patrick COGNET, Eds. 2010. Dunod.
60. Sarko A, Muggli R: **Packing Analysis of Carbohydrates and Polysaccharides. III. Valonia Cellulose and Cellulose II.** *Macromolecules* 1974, **7**:486-494.
61. Stipanovic AJ, Sarko A: **Packing Analysis of Carbohydrates and Polysaccharides. 6. Molecular and Crystal Structure of Regenerated Cellulose II.** *Macromolecules* 1976, **9**:851-857.
62. Stipanovic AJ, Sarko A: **Packing Analysis of Carbohydrates and Polysaccharides. 6. Molecular and Crystal Structure of Regenerated Cellulose II.** *Macromolecules* 1976, **9**:851-857.
63. Mansikkamaki P, Lahtinen M, Rissanen K: **Structural changes of cellulose crystallites induced by mercerisation in different solvent systems; determined by powder X-ray diffraction method.** *Cellulose* 2005, **12**:233-242.
64. Isogai A: **Cellulosic Polymers, Blends and Composites, Allomorphs of cellulose and other polysaccharides.** Edited by Edited by Ed Gilbert RD. Vienna: Carl Hanser Publishers; 1994:1-24.

65. Jeoh T, Ishizawa CI, Davis MF, Himmel ME, Adney WS, Johnson DK: **Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility.** *Biotechnology and Bioengineering* 2007, **98**:112-122.
66. Fan LT, Lee YH, Beardmore DH: **Mechanism of the Enzymatic-Hydrolysis of Cellulose - Effects of Major Structural Features of Cellulose on Enzymatic-Hydrolysis.** *Biotechnology and Bioengineering* 1980, **22**:177-199.
67. Pala H, Mota M, Gama FM: **Enzymatic depolymerisation of cellulose.** *Carbohydrate Polymers* 2007, **68**:101-108.
68. Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA, Johnson DK: **Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance.** *Biotechnology for Biofuels* 2010, **3**.
69. Pu YQ, Ziemer C, Ragauskas AJ: **CP/MAS C-13 NMR analysis of cellulase treated bleached softwood kraft pulp.** *Carbohydrate Research* 2006, **341**:591-597.
70. Park S, Johnson DK, Ishizawa CI, Parilla PA, Davis MF: **Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state C-13 nuclear magnetic resonance.** *Cellulose* 2009, **16**:641-647.
71. Penttila PA, Varnai A, Leppanen K, Peura M, Kallonen A, Jaaskelainen P, Lucenius J, Ruokolainen J, Siika-aho M, Viikari L et al.: **Changes in Submicrometer Structure of Enzymatically Hydrolyzed Microcrystalline Cellulose.** *Biomacromolecules* 2010, **11**:1111-1117.
72. Kent MS, Cheng G, Murton JK, Carles EL, Dibble DC, Zendejas F, Rodriguez MA, Tran H, Holmes B, Simmons BA et al.: **Study of Enzymatic Digestion of Cellulose by Small Angle Neutron Scattering.** *Biomacromolecules* 2010, **11**:357-368.
73. Wang LS, Zhang YZ, Gao PJ, Shi DX, Liu HW, Gao HJ: **Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis.** *Biotechnology and Bioengineering* 2006, **93**:443-456.
74. Reese ET, Segal L, Tripp VW: **The Effect of Cellulase on the Degree of Polymerization of Cellulose and Hydrocellulose.** *Textile Research Journal* 1957, **27**:626-632.
75. Park S, Venditti RA, Abrecht DG, Jameel H, Pawlak JJ, Lee JM: **Surface and pore structure modification of cellulose fibers through cellulase treatment.** *J Appl Polym Sci* 2007, **103**:3833-3839.
76. Bommarius AS, Katona A, Cheben SE, Patel AS, Ragauskas AJ, Knudson K, Pu Y: **Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment.** *Metabolic Engineering* 2008, **10**:370-381.
77. Hall M, Bansal P, Lee JH, Realff MJ, Bommarius AS: **Cellulose crystallinity - a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate.** *FEBS J* 2010.
78. Zhang YHP, Lynd LR: **A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase.** *BIOTECHNOL BIOENG* 2006, **94**:888-898.

79. Gupta R, Lee YY. **Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates.** *Biotechnology and Bioengineering* x, 1-12. 2008.
80. Sinitsyn AP, Mitkevich OV, Gusakov AV, Klyosov AA: **Decrease in reactivity and change of physico-chemical parameters of cellulose in the course of enzymatic hydrolysis.** *Carbohydrate Polymers* 1989, **10**:1-14.
81. Chen Y, Stipanovic AJ, Winter WT, Wilson DB, Kim YJ: **Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses.** *Cellulose* 2007, **14**:283-293.
82. Walseth CS: **The Influence of the Fine Structure of Cellulose on the Action of Cellulases.** *TAPPI* 1957, **35**:233-238.
83. Philipp B, Dan CD, Fink FH-P: **Acid and enzymatic hydrolysis of cellulose in relation to its physical structure.** *In: Proceedings International Symposium on Wood and Pulping chemistry* 1981, **4**:79-83.
84. Gan Q, Allen SJ, Taylor G: **Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling.** *Process Biochemistry* 2003, **38**:1003-1018.
85. Converse AO, Matsuno R, Tanaka M, Taniguchi M: **A Model of Enzyme Adsorption and Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose with Slow Deactivation of the Adsorbed Enzyme.** *Biotechnology and Bioengineering* 1988, **32**:38-45.
86. Ding H, Xu F. **Productive cellulase adsorption on cellulose.** American chemical society Chapitre 9, 154-169. 2004.
87. Zhang YHP, Lynd LR: **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **88**:797-824.
88. Desai SG, Converse AO: **Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose.** *Biotechnol Bioeng* 1997, **56**:650-655.
89. Yang B, Willies DM, Wyman CE: **Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **94**:1122-1128.
90. Bansal P, Hall M, Realf MJ, Lee JH, Bommarius AS: **Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates.** *Biotechnology Advances* 2009, **27**:833-848.
91. Cornish-Bowden A, Jamin M, Saks V. **Cinétique enzymatique.** 2005.
92. Chen HZ, Hayn M, Esterbauer H: **Purification and Characterization of 2 Extracellular Beta-Glucosidases from Trichoderma-Reesei.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1992, **1121**:54-60.
93. Seidle HF, Marten I, Shoseyov O, Huber RE: **Physical and kinetic properties of the family 3 beta-glucosidase from Aspergillus niger which is important for cellulose breakdown.** *Protein Journal* 2004, **23**:11-23.

94. Chirico WJ, Brown RD: **Purification and Characterization of A Beta-Glucosidase from Trichoderma-Reesei.** *European Journal of Biochemistry* 1987, **165**:333-341.
95. Himmel ME, Adney WS, Fox JW, Mitchell DJ, Baker JO: **Isolation and Characterization of 2 Forms of Beta-D-Glucosidase from Aspergillus-Niger.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1993, **39**:213-225.
96. Decker CH, Visser J, Schreier P: **beta-glucosidases from five black Aspergillus species: Study of their physico-chemical and biocatalytic properties.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, **48**:4929-4936.
97. Nidetzky B, Steiner W, Hayn M, Claeysens M: **Cellulose hydrolysis by the cellulases from Trichoderma reesei: a new model for synergistic interaction.** *Biochem J* 1994, **298 Pt 3**:705-710.
98. Scacchi G., Bouchy M., Foucaut J-F, Zahra O.. **Cinétique et catalyse.** 2004. Tec et Doc. Cinétique et catalyse. Scacchi G., Bouchy M., Foucaut J-F, and Zahra O.
99. Medve J, Stahlberg J, Tjerneld F: **Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from Trichoderma reesei on microcrystalline cellulose.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1997, **66**:39-56.
100. Ding H, Xu F. **Productive cellulase adsorption on cellulose.** Chapter 9. 2004. American chemical society.
101. Igarashi K, Wada M, Samejima M: **Kinetic Analysis of Cellobiohydrolase: Quantification of Enzymatic Reaction at a Solid/Liquid Interface Applying the Concept of Surface Density.** *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 2009, **21**:13-22.
102. van Tilbeurgh H, Bhikhabhai R, G-ran Pettersson L, Claeysens M: **Separation of endo- and exo-type cellulases using a new affinity chromatography method.** *FEBS Letters* 1984, **169**:215-218.
103. Okazaki M, Mooyoung M: **Kinetics of Enzymatic-Hydrolysis of Cellulose - Analytical Description of A Mechanistic Model.** *Biotechnology and Bioengineering* 1978, **20**:637-663.
104. Nidetzky B, Steiner W: **A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose.** *Biotechnol Bioeng* 1993, **42**:469-479.
105. Lee YH, Fan LT: **Kinetic-Studies of Enzymatic-Hydrolysis of Insoluble Cellulose .2. Analysis of Extended Hydrolysis Times.** *Biotechnology and Bioengineering* 1983, **25**:939-966.
106. Movagarnejad K, Sohrabi M, Kaghazchi T, Vahabzadeh F: **A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems.** *Biochemical Engineering Journal* 2000, **4**:197-206.
107. Levine SE, Fox JM, Blanch HW, Clark DS: **A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Biotechnol Bioeng* 2010, **107**:37-51.

108. Movagharnejad K: **Modified shrinking particle model for the rate of enzymatic hydrolysis of impure cellulosic waste materials with enzyme reuse by the substrate replacement.** *Biochemical Engineering Journal* 2005, **24**:217-223.
109. Xu F, Ding HS: **A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: Contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects.** *Applied Catalysis A-General* 2007, **317**:70-81.
110. Bergès T, Barreau C, Peberdy JF, Boddy LM: **Cloning of an *Aspergillus niger* invertase gene by expression in *Trichoderma reesei*.** *Current Genetics* 1993, **24**:53-59.
111. Chauve M, Mathis H, Huc D, Casanave D, Monot F, Lopes Ferreira N: **Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases.** *Biotechnology for Biofuels* 2010, **3**:3.
112. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT.** *Journal of Biological Chemistry* 1951, **193**:265-275.
113. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D: *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass - Technical Report NREL/TP-510-42618.* 2010.
114. Evans R, Wallis AFA: **Cellulose Molecular-Weights Determined by Viscometry.** *J Appl Polym Sci* 1989, **37**:2331-2340.
115. da Silva perez D, van Heiningen ARP: **Determination of Cellulose Degree of Polymerization in Chemical Pulps by Viscosimetry.** *7th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Proceedings, 4pp, August 26-29, 2002, Turku, Finland* 2002.
116. Grillo I., Borsali R, Pecora R: **SANS and Applications in Soft Condensed Matter.** In *Soft Matter Characterization.* Eds Springer edition. Edited by Edited by Eds Springer. 2011:Grillo I. SANS and Applications in Soft Condensed Matter. In *Soft Matter Characterization*; Borsali, R.; Pecora, R., Eds.; Springer, 2008; Chapter 13, p 723.
117. Van Nifterik L, Xu J, Laurent JL, Mathieu J, Rakoto C: **Analysis of cellulose and kraft pulp ozonolysis products by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.** *Journal of Chromatography A* 1993, **640**:335-343.
118. Isogai A, Atalla RH: **Amorphous Celluloses Stable in Aqueous-Media - Regeneration from So₂-Amine Solvent Systems.** *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* 1991, **29**:113-119.
119. Schroeder LR, Gentile VM, Atalla RH: **Nondegradative Preparation of Amorphous Cellulose.** *Journal of Wood Chemistry and Technology* 1986, **6**:1-14.
120. Wood TM: **Preparation of Crystalline, Amorphous, and Dyed Cellulase Substrates.** *Methods in Enzymology* 1988, **160**:19-25.
121. Schulein M: **Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*.** *Journal of Biotechnology* 1997, **57**:71-81.

- Références bibliographiques-

122. Lantz S, Goedegebuur F, Hommes R, Kaper T, Kelemen B, Mitchinson C, Wallace L, Stahlberg J, Larenas E: **Hypocrea jecorina CEL6A protein engineering.** *Biotechnology for Biofuels* 2010, **3**:20.
123. Zou J, Kleywegt GJ, Stahlberg J, Driguez H, Nerinckx W, Claeysens M, Koivula A, Teeri TT, Jones TA: **Crystallographic evidence for substrate ring distortion and protein conformational changes during catalysis in cellobiohydrolase Ce16A from trichoderma reesei.** *Structure* 1999, **7**:1035-1045.
124. Holtzapple MT, Caram HS, Humphrey AE: **The Hch-1 Model of Enzymatic Cellulose Hydrolysis.** *Biotechnology and Bioengineering* 1984, **26**:775-780.