

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Thème :

Développement de système enzymatique immobilisé dans des supports à base de polymères naturels pour applications biomédicales

Présenté par

BOUAZZA Boutheina
KAREB Manal

Soutenue publiquement le 26/06/2025 devant le jury composé de :

Mme. M. OUAGUED

MCA/UHB-Chlef

Présidente

Mr. K.OTMANINE

MCB/UHB-Chlef

Examineur

Mme. Kh. ZANOUNE

MCA/UHB-Chlef

Encadrante

Mr. M. DELLALI

MCA/UHB-Chlef

Co-encadrant

Année universitaire : 2024/2025



Remerciements

*EN PREMIER LIEU, NOUS EXPRIMONS NOS PROFONDS REMERCIEMENTS
À " **ALLAH TOUT-PUISSANT**" QUI NOUS A SOUTENUES LE LONG DE
NOTRE TRAVAIL.*

*ENSUITE NOUS TENONS À REMERCIER NOS CHERS PARENTS POUR LEUR
PATIENCE ET ENCOURAGEMENT À FINIR UN CHEMIN COMMENCÉ IL Y'A
SI LONGTEMPS.*

***DR. K. ZANOUNE ET DR. M.DELLALI**, NOUS VOUS REMERCIONS D'AVOIR
ACCEPTÉ DE NOUS GUIDER. IL NE SUFFIRA PAS D'EXPRIMER NOTRE
ENTIÈRE GRATITUDE POUR LA CONFIANCE ET LE SOUTIEN
IMPORTANTS, AINSI QUE LE TEMPS QUE VOUS NOUS AVEZ ACCORDÉ À
CHAQUE FOIS QUE CELA ÉTAIT NÉCESSAIRE, POUR LES CONSEILS
PRÉCIEUX QUE VOUS NOUS AVEZ DONNÉS TOUT AU LONG DE NOTRE
TRAVAIL, ET POUR L'AIDE QUE VOUS NOUS AVEZ FOURNIE.*

*NOUS TENONS À EXPRIMER NOTRE GRATITUDE AUX MEMBRES DU
JURY D'AVOIR ACCEPTÉ DE JUGER CE TRAVAIL.*

*NOUS REMERCIONS ÉGALEMENT LA RESPONSABLE DU LABORATOIRE
DES GÈNES DES PROCÉDÉS POUR SES CONSEILS ET POUR AVOIR
FOURNI TOUT L'ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE DISPONIBLE POUR
ACCOMPLIR CE TRAVAIL.*

*BIEN QUE TOUTES LES PERSONNES QUI ONT CONTRIBUÉS DE PRÈS OU
DE LOIN À LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL TROUVENT ICI MES
SINCÈRES REMERCIEMENTS.*

Graduation

Dédicace :

DIEU merci pour m'avoir donné la force d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens en premier lieu à dédier ce travail à tous ceux qui ont contribué par leur soutien et leurs encouragements tout au long de ce parcours académique.

À mes chères parents **Zahia** et **Ahmed** Pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices et leur soutien constant.

À mes sœurs **Fatima**, **Amina**, **Karima** et mon frère **Toufik** Pour leurs tendresse, leurs compréhension et leurs paroles qui m'ont toujours donné du courage.

Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité À mon grand-père **Djelloul** Pour sa sagesse, ses prières et sa présence inspirante dans ma vie.

À mon oncle maternel **Toufik** Pour ses encouragements et son appui constant.

À mon compagnon de route et partenaire de vie **Hakim** Pour sa patience et sa compréhension sa présence précieuse tout au long de ce parcours et sans oublier toute sa famille.

Une spéciale dédicace à mon cher binôme **Bouazza Boutheina** pour cette belle collaboration, pour notre travail partagé, et les souvenirs inoubliables ainsi qu'à toute sa famille.

A tous ce qui m'a aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Merci à vous tous, du fond du cœur.

MANEL



Graduation

Dédicace :

Je tiens en premier lieu à dédier ce travail à mon père **Mohammed** et ma mère **Houria** qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant toute ma scolarité.

A mes sœurs qui ne m'ont pas mis au monde par ma mère Merci pour chaque minute et chaque seconde que nous avons partagées ensemble. Merci d'avoir été à mes côtés dans mes joies et mes peines. J'espère que tous nos rêves se réaliseront un jour. **Fatma Zohra** et **Wahiba**.

A mes frère **Hicham**, **Slimen**, **Elmahdi** et **Abdellah** pour leur encouragement. J'espère que vos prochaine vie sera meilleure et que vous réaliserez tout ce que vous souhaitez.

A mes adorables neveux et nièces à qui j'ouvre grand mon cœur et mes bras, que Dieu les protège. (**Aridj**, **Qoussai**, **Aicha**, **Zahra**, **Mohammed Yazan**, **Mohammed**, **Idris**).

C'est le hasard qui fait les amis et les amis sont la deuxième famille que l'on choisit mes chéris amis **Messafa Ikram**, **Bouriche Amira**, **Boufades Hind**, **Slimane Djihane**, **Termoul Chahrazed** et **Garacha manel** Je ne peux plus trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection, vous êtes pour moi des sœurs, sur qui je peux compter, Je me souviendrai toujours tous les beaux moments que nous avons passés ensemble Nous sommes restés amis dans les hauts et les bas de nos vies. Merci d'être dans ma vie, merci pour un jour vous étés la raison de mon sourire je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

À ma chère binôme et partenaire dans ce travail, **Manel**, merci pour les beaux moments que nous avons partagés ensemble. J'espère que notre travail sera couronné de succès.

À tous ceux qui ont souhaité pour moi le bien et la réussite.

Et enfin à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, de près ou de loin.

BOUAZZA BOUTHEINA



Résumé

Ce travail s'inscrit dans le développement de systèmes innovants d'immobilisation enzymatique à base de biopolymères naturels. Des microparticules polymériques à base de chitosane (Cs) et d'alginate (ALG) ont été élaborées par gélification ionotropique, en vue de l'immobilisation de la peroxydase extraite de radis rose. Une série de formulations ont été conçues en variant le rapport massique Cs/TPP afin d'optimiser les propriétés structurales et fonctionnelles du système.

Les résultats ont montré un bon rendement de production des microparticules, une capacité d'encapsulation élevée (> 64 %) ainsi qu'une activité enzymatique conservée (jusqu'à 8 %). L'enzyme immobilisée a démontré une bonne stabilité thermique à 60 °C (activité relative > 85 %) et une réutilisabilité sur dix cycles (activité > 70 %). Ces performances confirment la fiabilité du système Cs/ALG comme support d'immobilisation, compatible avec des conditions opératoires modérées.

Le système développé peut être envisagé comme une base technologique prometteuse pour la conception de biocatalyseurs stables, durables et réutilisables, adaptés aux exigences croissantes des domaines pharmaceutique, industriel et environnemental.

Mots-clés :

Immobilisation enzymatique , Microparticules, Chitosane, Alginate, Gélification ionotropique, Peroxydase, Activité enzymatique.

Abstract

This work is part of the development of innovative enzymatic immobilization systems based on natural biopolymers. Polymeric microparticles composed of chitosan (Cs) and alginate (ALG) were prepared by ionotropic gelation, with the aim of immobilizing peroxidase extracted from pink radish. A series of formulations were designed by varying the Cs/TPP mass ratio in order to optimize the structural and functional properties of the system.

The results showed a high production of microparticles yield, a high encapsulation efficiency (> 64%), and a preserved enzymatic activity (up to 8%). The immobilized enzyme demonstrated good thermal stability at 60 °C (relative activity > 85%) and reusability over ten cycles (activity > 70%). These performances confirm the reliability of the Cs/ALG system as an immobilization support, compatible with moderate operating conditions.

The developed system can be considered a promising technological platform for the design of stable, sustainable, and reusable biocatalysts, suited to the growing demands of pharmaceutical, industrial, and environmental applications.

Keywords:

Enzyme immobilization, Microparticles, Chitosan, Alginate, Ionotropic gelation, Peroxidase, Enzymatic activity.

الملخص

يندرج هذا العمل في إطار تطوير أنظمة تثبيت إنزيمية مبتكرة تعتمد على البوليمرات الحيوية الطبيعية، تم تحضير جسيمات دقيقة بوليمرية مكونة من الكيتوزان والألجينات عن طريق التغليف الأيوني بهدف تثبيت البيروكسيدز المستخرج من الفجل الوردي، تم تصميم تركيبات مختلفة بتغيير نسبة كتلة الكيتوزان وثلاثي البوليفوسفات لتحسين الخصائص الهيكلية والوظيفية للنظام البوليميري ، أظهرت النتائج مردود جيد في الحصول على الجسيمات الدقيقة ، وأيضاً نسبة عالية على احتواء الإنزيم مع الحفاظ على النشاط الإنزيمي ، كما أظهر الإنزيم المثبت استقراراً حرارياً جيداً عند درجة حرارة مئوية (60) (نشاط إنزيمي نسبي كبير) وله قابلية وإمكانية إعادة الاستعمال لعشر دورات ، تؤكد هذه المميزات موثوقية نظام الكيتوزان والألجينات كداعم تثبيت، ومتوافق مع الشروط التجريبية المعدلة ، ويمكن اعتبار النظام المتطور بمثابة قاعدة تكنولوجية واعدة لتصميم محفزات حيوية مستقرة ومستدامة وقابلة لإعادة الاستخدام، ومناسبة للمتطلبات المتزايدة في المجالات الدوائية والصناعية والبيئية

الكلمات المفتاحية: التثبيت الإنزيمي، الجسيمات الدقيقة، الكيتوزان، الألجينات، التغليف الأيوني، البيروكسيدز، النشاط الإنزيمي

Table des matières

Liste des abréviations et des symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les enzymes et leur immobilisation

I.1. Introduction 03

I.2. Les enzymes 03

I.2.1. Définition 03

I.2.2. Structure des enzymes 04

I.2.3. Nomenclature et classification 05

I.2.4. Propriétés des enzymes 06

I.3. Enzymes immobilisées 06

I.3.1. Définition 06

I.3.2. Intérêt de l'immobilisation des enzymes 06

I.3.3. Types de supports d'immobilisation 07

I.3.4. Facteurs influençant l'immobilisation enzymatique 8

I.3.5. Techniques d'IE 9

I.3.6. Propriétés des enzymes immobilisées 11

I.4. Peroxydases 12

I.4.1. Généralités 12

I.4.2. Mécanisme d'action de la peroxydase 13

I.4.3. Structure de la peroxydase végétale 14

I.4.4. Applications des matériaux composites polymère/enzyme 15

I.5. Conclusion 16

Chapitre II : Microparticules polymériques pour l'immobilisation enzymatique

II.1. Introduction	17
II.2. Généralités sur les polymères	17
II.2.1. Polymères	17
II.2.2. Biopolymères	18
II.2.3. Propriétés des biopolymères	19
II.2.3.1. Biodégradabilité	19
II.2.3.2. Biocompatibilité	19
II.3. Polysaccharides	20
II.3.1. Généralités	20
II.3.2. Classification des polysaccharides	21
II.3.3. Propriétés des polysaccharides	21
II.3.4. Rôle des polysaccharides dans l'immobilisation enzymatique	22
II.3.5. Chitosane	22
II.3.5.1. Définition, sources et structure chimique	22
II.3.5.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane	24
II.4. Alginate	25
II.4.1. Structure chimique de l'alginate	26
II.5. Micro/nanoparticules polymériques	26
II.5.1. Micro/nanosphères	27
II.5.2. Micro/nanocapsules	27
II.5.3. Techniques de préparation des microparticules	28
II.5.3.1. Gélification Ionotrope	28
II.6. L'utilisation des microparticules de chitosane comme support d'IE	29
II.7. Conclusion	30

Partie expérimentale

Chapitre III: Matériel et méthodes

III.1. Introduction	31
III.2. Matériels	31
III.2.1. Equipements	32
III.2.2. Produits chimiques et réactifs	32
III.2.3. Matériel végétal	34
III.3. Méthodes	35
III.3.1. Extraction et purification partielle de la peroxydase	35
III.3.1.1. Préparation de l'extrait enzymatique brut (EEB)	35
III.3.1.2. Purification partielle de la peroxydase	36
III.3.2. Préparation des microparticules	37
III.3.3. Préparation des solutions polymériques	39
III.3.4. Formation des microparticules Cs/ALG	39
III.3.5. Obtention des microparticules de Cs/ALG/POD	41
III.4. Méthodes de caractérisation physico-chimique	42
III.4.1. Rendement de synthèse des microparticules	43
III.4.2. Aspect macroscopique	43
III.4.3. Aspect microscopique	43
III.4.4. Caractérisation structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	43
III.4.5. Spectrophotométrie UV-visible	44
III.4.6. Étude du pouvoir de gonflement des microparticules	44
III.4.7. Dosage des protéines de la POD libre et immobilisée	46
III.4.8. Efficacité d'immobilisation enzymatique	47
III.4.9. L'activité enzymatique de la peroxydase libre et immobilisé	48

III.4.10. Étude de la stabilité thermique de la peroxydase immobilisée	50
III.4.11. Test de réutilisation des microparticules à peroxydase immobilisée	51
III.5. Conclusion	52

Chapitre IV: Résultats et discussion

IV.1. Introduction	39
IV.2. Obtention des microparticules de Cs/ALG par gélification ionotrope	39
IV.2.1. Structure et mécanisme de formation des microparticules Cs/ALG	39
IV.3. Caractérisation des microparticules	39
IV.3.1. Caractérisation macroscopique et microscopique	40
IV.3.2. Rendement de production des particules de Cs/ALG	42
IV.3.3. Taille des microparticules	44
IV.3.4. Analyse FTIR des microparticules Cs/ALG	44
IV.3.5. Étude de gonflement des microparticules de chitosane	45
IV.4. Obtention des microparticules enzymatiques (CS/ALG/POD)	46
IV.4.1. Caractérisation des microparticules de Cs/ALG/POD	47
IV.4.2. Le rendement et la taille des particules de Cs/ALG/POD	48
IV.4.3. Étude de gonflement des microparticules enzymatiques	48
IV.4.4. Test d'immobilisation de peroxydase	49
IV.5. Évaluation des propriétés enzymatiques	50
IV.5.1. Quantification des protéines dans la POD libre et immobilisée	50
IV.5.2. Efficacité d'immobilisation	51
IV.5.3. Activité enzymatique de la peroxydase libre	52
IV.5.4. L'activité enzymatique de POD immobilisée	52
IV. 6. La stabilité thermique de POD immobilisée	53
V.7. Réutilisation de la peroxydase immobilisée	54
<i>IV. 8. Conclusion</i>	55
<i>Conclusion général et perspectives</i>	56
<i>Références bibliographiques</i>	

Abréviations

Abréviation	Signification
AE	Activité enzymatique
AIG	Alginate
APx	Ascorbate peroxydase
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)
CP	Catalase peroxydase
Cs	Chitosane
DDA	Degré de déacétylation
DO	Densité optique
EEB	Extrait enzymatique brut
EEPP	Extrait enzymatique partiellement purifié
EI	Enzyme immobilisée
EI%	Efficacité d'immobilisation enzymatique
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GRAS	Generally Recognized As Safe
HRP	Horseradish Peroxidase (Peroxydase de raifort)
IE	Immobilisation enzymatique
KBr	Bromure de potassium
LiP	Lignine peroxydase
MnP	Manganèse peroxydase
MPs	Microparticules
MPEs	Microparticules enzymatiques
MW	Poids moléculaire (Molecular Weight)

Abréviation	Signification
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solution tampon phosphate salinée)
PDI	Indice de polydispersité
POD	Peroxydase
Q	Taux de gonflement
RMP	Rendement des microparticules Cs/ALG
RMPCE	Rendement des microparticules Cs/ALG/POD
TPP	Tripolyphosphate de sodium
UICPA	Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC en anglais)
λ	Longueur d'onde

Liste des figures

Figure I.1	Schéma simplifiée de mode d'action d'enzyme	03
Figure I.2	La spécificité de l'enzyme	04
Figure I.3	Inclusion dans un réseau de polymère insoluble	04
Figure I.4	Immobilisation covalente de l'enzyme sur un support	06
Figure I.5	Immobilisation par réticulation	08
Figure I.6	Différentes techniques d'immobilisations des enzymes	08
Figure I.7	Classification simplifiée des peroxydases.	09
Figure I.8	La réaction générale de peroxydase	10
Figure I.9	Structure tridimensionnelle de la peroxydase de raifort	11
Figure I.10	Applications de système polymer /enzyme	12
Figure II.1	Modèle schématique de la synthèse d'un polymère	17
Figure II.2	Les différentes sources de biopolymères	17
Figure II.3	Biomatériaux naturels renouvelables	17
Figure II.4	Formules chimiques de l'amidon, du chitosane et de la cellulose	18
Figure II.5	Différentes sources du chitosane	20
Figure II.6	Structures chimiques de chitine (a) et du chitosane (b)	20
Figure II.7	Protonation/déprotonation du chitosane dépendamment du pH du milieu	23
Figure II.8	Représentation schématique du chitosane sous différentes formes (B)	26
Figure II.9	Structure et composition de l'alginate : (a) monomères d'acides uroniques, (b) Conformation des chaines et © distribution des blocs	26
Figure II.10	A) Microsphère pleine (Liu et al., 2011) et (B) microsphères poreuses (Gao et al., 2013) de polymères synthétiques	27
Figure II.11	A) Microcapsules pleines (Chen et al., 2013); (B) microcapsules poreuses(Lajoinie et al., 2014) de polymères synthétiques observées en microscopie électronique à balayage	28
Figure II.12	Représentation schématique d'une microcapsule et d'une microsphère	29

Figure III.1	Equipements utilisés	31
Figure III.2	Structure chimique du chitosane (CS)	32
Figure III.3	structure chimique de TPP (Na ₅ P ₃ O ₁₀)	36
Figure III.4	Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet rose	40
Figure III.5	Les particules à différents états Protocole expérimentale de purification de la peroxidase	41
Figure III.6	Préparation des solutions de chitosane, d'alginate et de TPP	43
Figure III.7	Préparation des microparticules CS/ALG vides par gélification ionique	44
Figure III.8	Illustration schématique de préparation des microparticules de Cs/ALG/POD par gélification ionotrope	46
Figure III.9	Réaction entre le pyrogallol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase	49
Figure IV.1	Mécanisme réactionnel d'obtention des microparticules de Cs/ALG.	54
Figure IV.2	Observation macroscopique et microscopique des microparticules à base de chitosane/alginate	55
Figure IV.3.	Spectre FTIR des microparticules CS/ALG.	58
Figure IV.4	La cinétique de gonflement des MPs Cs/ALG obtenues à différents rapport massique Cs/Tpp dans une solution aqueux de pH=7,4.	59
Figure IV.5	Degré de gonflement maximum des microsphères de Cs/ALG dans une solution de pH=5,5	60
Figure IV. 6	Photos des MPs de CS/ALG et de Cs/ALG/POD	62
Figure IV.7	Degré de gonflement maximum des microsphères de Cs/ALG/POD dans une solution de pH=7,4	63
Figure IV.8	Test d'immobilisation de la peroxydase	64
Figure IV.9	Courbe d'etalonnage de BSA	65
Figure IV.10	L'efficacité d'immobilisation de peroxydase dans les microparticules	66
Figure IV.11	Activité relative de CsAP1 en fonction du temps d'incubation à 60 °C	68
Figure IV.12	Activité relative de la peroxydase immobilisée dans la formulation CsAP1 en fonction du nombre de cycles de réutilisation	69

Liste des tableaux

Tableau I.1	Classification des supports d'immobilisation	08
Tableau I.1	Différentes techniques d'IE	10
Tableau III.1	Matériel utilisé	32
Tableau III.2	Plan expérimental et codification des particules synthétisés.	42
Tableau III.3	Gamme étalon de BSA	47
Tableau IV.1	Rendement de production des microsphères Cs/ALG	56
Tableau IV.2	Diamètre moyen des microparticules Cs/ALG/TPP	57
Tableau IV.3	Rendement et diamètre moyen des MPs de CS/ALG/POD	62
Tableau IV.4	L'activité enzymatique des microparticules enzymatiques	67

Introduction

générale

Introduction générale

L'exploitation des biopolymères naturels dans les domaines biomédical et pharmaceutique connaît un essor remarquable depuis plusieurs années. Leur biodégradabilité, leur non-toxicité et leur biocompatibilité en font des candidats de choix pour le développement de nouvelles plateformes thérapeutiques respectueuses de l'organisme et de l'environnement (**Wang et al., 2023**). Parmi ces matériaux, le chitosane (Cs) et l'alginate (ALG) se distinguent par leur capacité à former des structures microparticulaires stables, capables de piéger et de protéger des biomolécules sensibles. Ils représentent ainsi une alternative durable et innovante pour la formulation de systèmes d'administration de principes actifs ou pour l'immobilisation enzymatique, en particulier dans les domaines pharmaceutique, diagnostique et thérapeutique.

Les enzymes, catalyseurs biologiques essentiels, sont largement utilisées dans les domaines biomédical et pharmaceutique. Cependant, leur instabilité en solution et la perte rapide de leur activité enzymatique limitent considérablement leurs applications. L'immobilisation enzymatique apparaît alors comme une stratégie efficace pour améliorer leur stabilité, permettre leur réutilisation et faciliter leur intégration dans des dispositifs thérapeutiques (**Zhou et al., 2022; Singh et al., 2021**).

Parmi les enzymes d'intérêt, les peroxydases végétales se distinguent par leur forte activité catalytique, leur accessibilité et leur faible coût. Elles sont particulièrement prometteuses pour des applications médicales impliquant des processus oxydatifs, tels que la neutralisation des radicaux libres, les thérapies anti-inflammatoires ou la détection de biomarqueurs (**Barbosa et al., 2020**). Toutefois, à l'instar de la plupart des enzymes libres, la peroxydase présente une stabilité limitée, ce qui rend nécessaire le développement de systèmes d'immobilisation innovants, adaptés aux exigences du domaine biomédical.

Dans ce contexte, le présent travail vise à développer un système d'immobilisation de la peroxydase extraite de radis rose au sein de microparticules polymériques à base de chitosane et d'alginate, élaborées par gélification ionotropique. L'objectif est d'évaluer la capacité de ce système à préserver l'activité enzymatique et à offrir un support stable, réutilisable et adapté aux applications biomédicales.

Le présent mémoire est structuré en deux grandes parties : une partie théorique et une partie expérimentale, réparties en quatre chapitres.

- Le premier chapitre, de nature bibliographique, présente les bases scientifiques des enzymes, leurs propriétés ainsi que les principales techniques d'immobilisation. Une attention particulière est accordée à la peroxydase, enzyme modèle choisie dans ce travail, ainsi qu'à ses applications potentielles.
- Le deuxième chapitre est consacré aux microparticules polymériques naturelles, avec un focus sur les polysaccharides tels que le chitosane et l'alginate. Leurs propriétés physico-chimiques et leur capacité à former des systèmes d'immobilisation efficaces y sont décrites en détail.
- Le troisième chapitre décrit la méthodologie expérimentale mise en œuvre. Il détaille les matériaux utilisés, les étapes d'extraction de la peroxydase à partir du radis, la préparation des microparticules Cs/ALG par gélification ionotrope, ainsi que les différentes techniques de caractérisation appliquées.
- Le quatrième chapitre présente les résultats expérimentaux, accompagnés de leur interprétation et discussion critique. Les performances du système enzymatique immobilisé sont analysées et comparées à celles rapportées dans la littérature scientifique.

Enfin, le mémoire se termine par une conclusion générale, qui récapitule les principaux résultats obtenus et propose des perspectives de recherche et d'applications futures.

Ce travail, à l'interface entre sciences des matériaux, biochimie enzymatique et biomédecine, vise à proposer une approche originale et efficace pour surmonter les limitations des enzymes libres, et à contribuer activement aux efforts actuels en faveur de systèmes enzymatiques plus robustes, plus sûrs et plus durables dans les applications pharmaceutiques et médicales.

Partie

bibliographique

Chapitre I

I.1. Introduction

Les enzymes sont des biocatalyseurs naturels qui interviennent dans un grand nombre de réactions biochimiques, en assurant des transformations rapides, spécifiques et efficaces dans des conditions douces. Grâce à leur haute spécificité de substrat et leur activité remarquable, elles occupent une place centrale dans de nombreux secteurs, notamment dans le domaine agroalimentaire, biomédical et pharmaceutique, où elles sont utilisées dans le diagnostic, la thérapie, la biocatalyse et la production de médicaments. Toutefois, l'utilisation directe d'enzymes libres présente certaines limitations, telles que leur instabilité, leur sensibilité aux conditions externes et leur non-réutilisabilité, ce qui limite leur application à grande échelle. Pour surmonter ces obstacles, l'immobilisation enzymatique constitue une solution prometteuse. Cette technique consiste à fixer les enzymes sur un support solide ou dans une matrice polymérique, de manière à améliorer leur stabilité, prolonger leur durée d'activité et permettre leur récupération pour des cycles d'utilisation répétés.

Ce chapitre vise à présenter les concepts de base liés aux enzymes et à leur immobilisation, en décrivant les méthodes, les types de supports utilisés, ainsi que les facteurs influençant l'efficacité du processus. Enfin, la dernière partie du chapitre sera consacrée à l'étude de la peroxydase, en insistant sur ses propriétés spécifiques et ses applications potentielles dans les domaines biomédical et pharmaceutique.

I.2. Les enzymes

I.2.1. Définition

Les enzymes sont des macromolécules biologiques, généralement de nature protéique, qui agissent comme des catalyseurs spécifiques dans les réactions biochimiques. Elles augmentent la vitesse des réactions sans être consommées ni modifiées de façon permanente au cours du processus réactionnel (**Berg et al., 2015**). Grâce à leur site actif, les enzymes reconnaissent un substrat spécifique et facilitent sa transformation en produit, en abaissant l'énergie d'activation requise pour la réaction.

La spécificité enzymatique, c'est-à-dire la capacité à agir sur un substrat particulier ou à catalyser une réaction précise, est l'une des caractéristiques les plus remarquables de ces biomolécules. Cette spécificité est dictée par la structure tridimensionnelle de l'enzyme, qui détermine la complémentarité avec son substrat (**Voet & Voet., 2011**).

Il existe également des enzymes non protéiques, ou des complexes protéiques associés à des cofacteurs ou des coenzymes, comme les ribozymes (ARN catalytiques), bien que ceux-ci soient moins courants (Nelson & Cox., 2017).

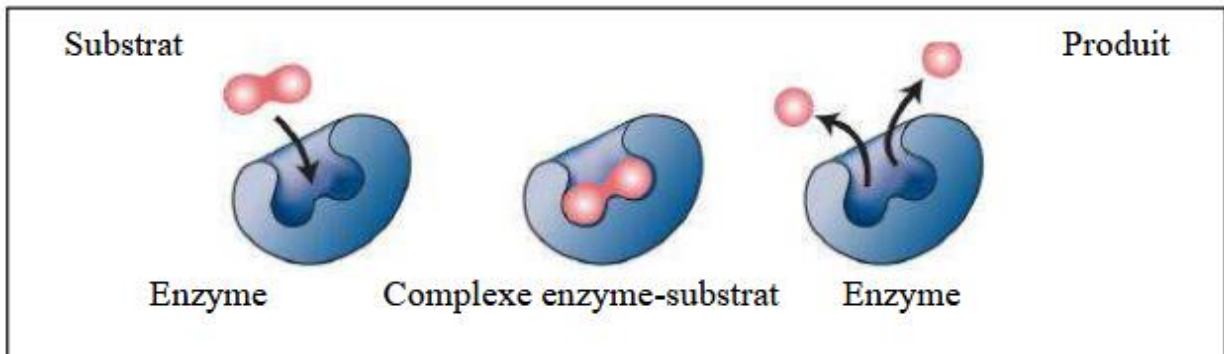


Figure I.1. Schéma simplifiée de mode d'action d'enzyme

I.2.2. Structure des enzymes

Les enzymes possèdent une structure tridimensionnelle complexe qui est essentielle à leur fonction, car elle détermine la formation du site actif, région spécifique où le substrat se lie et où se déroule la transformation chimique. Les enzymes sont constituées de longues chaînes d'acides aminés repliées de manière spécifique pour former une architecture tridimensionnelle stable et fonctionnelle. Leur structure générale repose sur une séquence polypeptidique, dont le repliement détermine la formation du site actif et la spécificité de l'enzyme.

Le site actif comprend généralement deux zones :

- une **zone de fixation**, qui assure une reconnaissance spécifique du substrat ;
- une **zone catalytique**, où la transformation chimique est effectuée.

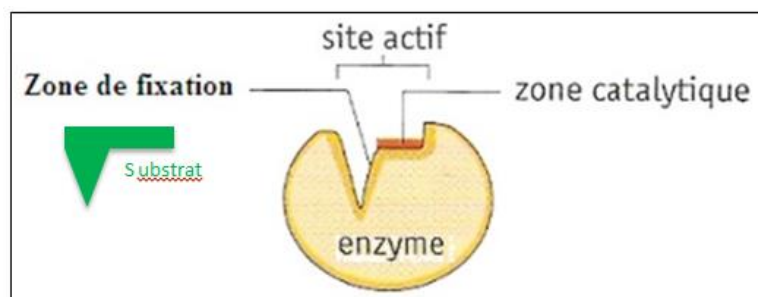


Figure I.2 : La spécificité de l'enzyme

I.2.3. Nomenclature et classification

Le nombre considérable d'enzymes connues a rendu impératif le développement d'une classification et d'une nomenclature. Celles-ci ont été établies dès 1961 par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie. Les enzymes sont classées en fonction de la nature des substrats qu'elles transforment et le type de réaction qu'elles catalysent, en général, en rajoutant le suffixe «-aze» au nom de leur substrat ou à un mot ou une phrase faisant référence à leur activité. Chaque enzyme possède un numéro de code recommandé par la Commission Internationale d'Enzymologie et constitué de l'acronyme E.C. suivi de quatre chiffres, séparés par des points, sous la forme : EC X.X.X.X, où chaque chiffre correspond à une sous-catégorie précise dans la classification.

- Le premier chiffre indique la classe de l'enzyme (type de la réaction catalysée).
- Le deuxième chiffre indique la sous-classe, c'est le mécanisme de la réaction.
- Le troisième chiffre indique la nature des molécules impliquées dans la réaction.

Le quatrième chiffre indique le numéro d'ordre de l'enzyme . (**Marouf et al. , 2009**).

Les classes sont au nombre de six :

- ✓ Classe 1 : oxydoréductases catalysant des réactions d'oxydoréduction, exemple : alcool déshydrogénase.
- ✓ Classe 2 : transférases assurant le transfert de groupement fonctionnel, exemple : Glucose 6-phosphate.
- ✓ Classe 3 : hydrolases catalysant des réactions d'hydrolyse, exemple : b-galactosidase.
- ✓ Classe 4 : lyases ce sont des enzymes qui enlèvent un groupement au substrat en laissant une double liaison ; ou au contraire, fixent un groupement sur une double liaison, exemple : pyruvate décarboxylase.
- ✓ Classe 5 : isomérases catalysant des réactions isomérisation, exemple : maleate (cis- tans) isomérase.
- ✓ Classe 6 : ligases formation de liaison couplée à l'hydrolyse d'ATP, exemple : acétate-coA ligase . (**Lavoinne et al., 2008**).

I.2.4. Propriétés des enzymes

Les enzymes possèdent plusieurs propriétés fondamentales qui justifient leur rôle central dans la catalyse biologique :

- **Catalyse efficace** : les enzymes accélèrent considérablement la vitesse des réactions chimiques en abaissant l'énergie libre d'activation, sans modifier la constante d'équilibre de la réaction (**Bisswanger., 2014**).
- **Origine biologique** : tous les enzymes sont des protéines sauf les ribozymes, qui sont des ARN catalytiques.
- **Spécificité** : les enzymes sont hautement spécifiques, à la fois vis-à-vis du substrat (spécificité de substrat) et du type de réaction catalysée (spécificité d'action). Cette spécificité dépend de la complémentarité entre le site actif de l'enzyme et la structure du substrat.
- **Régulation** : certaines enzymes peuvent ajuster leur activité catalytique en réponse à des signaux métaboliques internes ou externes. Cette régulation permet à la cellule de moduler finement ses voies métaboliques en fonction de ses besoins physiologiques (**Cornish et al., 2012**).

I.3. Enzymes immobilisées

I.3.1. Définition

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide (**Thangaraj et al., 2019**). On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance à diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques, de limitations dans l'accessibilité au site actif ; et à augmenter sa stabilité dans le temps, ce qui est souvent le cas du fait de la structure plus rigide conférée par l'immobilisation aux enzymes. L'immobilisation des enzymes peut alors induire une modification de leur activité et généralement une augmentation de leur stabilité. Cette dernière dépend de la nature intrinsèque de l'enzyme, des conditions d'immobilisation, de la nature du matériau support utilisé et des conditions de réactions.

I.3.2. Intérêt de l'immobilisation des enzymes

L'immobilisation enzymatique représente une stratégie clé pour améliorer l'exploitation des enzymes dans de nombreux domaines d'application. Elle permet de fixer l'enzyme sur un support insoluble sans altérer significativement sa fonction catalytique. Cette technique offre des avantages significatifs tant du point de vue technique qu'économique (**Tadesse & al., 2025**).

Parmi les bénéfices notables, la réutilisabilité des enzymes immobilisées constitue un atout majeur. Contrairement aux enzymes libres, qui ne peuvent être utilisées qu'une seule fois dans la majorité des cas, les enzymes fixées peuvent être récupérées et réutilisées sur plusieurs cycles de réaction, ce qui réduit les coûts d'exploitation (Vaghari *et al.*, 2024). L'immobilisation confère également une meilleure stabilité aux enzymes face à des conditions physico-chimiques parfois extrêmes (température, pH, solvants organiques), leur permettant de conserver leur activité plus longtemps. Un autre avantage important réside dans le contrôle facilité du processus catalytique (Fessner *et al.*, 2024). L'enzyme fixée peut être localisée, retirée ou remplacée aisément, permettant une meilleure maîtrise des paramètres de réaction, une réduction des risques de contamination, ainsi qu'une intégration plus efficace dans des systèmes automatisés ou en continu.

I.3.3. Types de supports d'immobilisation

Le choix du support est une étape déterminante dans le processus d'immobilisation enzymatique, car il influence directement l'activité, la stabilité, la réutilisabilité et la sélectivité de l'enzyme. Un support idéal doit être chimiquement stable, mécaniquement résistant, biologiquement compatible, économiquement viable, et offrir une grande surface spécifique pour l'ancrage de l'enzyme. En fonction de la composition chimique, les supports d'IE peuvent être classés en deux groupes principaux organique et inorganique (Zahirinejad *et al.*, 2021 ; Ashkan *et al.* 2020).

a) Supports inorganiques

Les supports inorganiques sont à base de matériaux inorganiques tels que le verre, le gel de silice, l'alumine, les oxydes métalliques, la zircone et de nombreux autres matériaux à base de silice (Zucca *et al.*, 2014). Ils sont largement utilisés car ils ont une résistance thermique et mécanique. La caractéristique du support inorganique est qu'ils apportent une certaine rigidité et porosité, sont généralement plus stables mais la fixation covalente sur ces supports est difficile à cause de leur faible réactivité.

b) Supports organiques

Une grande variété de polymères naturels ou synthétiques a été utilisée comme matrice de support pour l'immobilisation d'enzymes. Les supports organiques peuvent être chimiquement activés par différentes techniques, ce qui constitue l'un de leurs principaux avantages car ils permettent la fixation d'enzymes par différentes voies. Les polymères naturels comme collagène, chitosane, carraghénanes, alginate, cellulose et l'amidon sont très intéressants pour l'immobilisation d'enzymes, grâce à leurs simples d'utilisation (Bezerra *et al.*, 2015).

c) Supports composites : systèmes hybrides d’encapsulation

Les supports hybrides combinent la souplesse des polymères avec la résistance des matériaux inorganiques, créant des matrices d’encapsulation plus stables et plus performantes. Par exemple, l’enzyme peut être encapsulée dans un gel sol-gel dopé au chitosane, ou dans des nanoparticules magnétiques recouvertes d’un polymère biocompatible, permettant une récupération facile par champ magnétique tout en maintenant l’activité enzymatique (**Sheldon & al., 2013 ; Datta et al., 2013**).

L’encapsulation permet également de limiter l’inactivation enzymatique due à des variations de pH, de température ou à la présence de solvants, en protégeant l’enzyme dans un microenvironnement contrôlé. Elle est donc privilégiée dans des domaines sensibles comme la libération contrôlée de médicaments, les biocapteurs, et la bioremédiation.

Tableau I. 1 : Classification des supports d’immobilisation (Baaziz et al., 2006)

Organique	Les polymères naturels ✓ Polysaccharides : cellulose, dextrine, agar, agarose, la chitine, alginate. ✓ Protéine : collagène, albumine.
	Les polymères synthétiques ✓ Polystyrène ✓ Autre polymères : polyacrylate, polyacrylamide, polyvinyle.
Inorganique	Les minéraux naturels ✓ Bentonite, silice
	Les matériaux traités ✓ Verre, métaux, les oxydes métalliques poreux.

II.3.4. Facteurs influençant l’immobilisation enzymatique

L’immobilisation des enzymes a été largement étudiée par de nombreux chercheurs utilisant divers matériaux supports. (**Sharp et al., 1969**)

a. Force ionique

La force ionique joue un rôle crucial lors de l’immobilisation des enzymes. Les supports plus hydrophobes peuvent altérer la configuration du site actif de l’enzyme, ce qui peut nuire à son activité. Pour obtenir un chargement enzymatique optimal, la force ionique doit favoriser une

adsorption maximale par échange d'ions avant la formation de liaisons covalentes. Cependant, cela peut avoir un effet négatif sur l'activité enzymatique. Cet effet peut être atténué par une étape supplémentaire après l'immobilisation initiale de l'enzyme (**Mateo et al., 2002**).

b. pH et temps de réaction

Outre la force ionique, le pH d'immobilisation est un facteur déterminant. Le pH affecte la charge des groupes réactifs enzymatiques, influençant ainsi leur réactivité. Il est donc crucial de contrôler le pH durant l'immobilisation pour maximiser le rendement. Le temps de réaction est également un paramètre important à considérer pour optimiser l'immobilisation (**Mateo et al., 2003**).

c. Chargement enzymatique

Le rapport enzyme/support est essentiel pour garantir une rétention élevée de l'activité enzymatique. Ce rapport varie en fonction de l'enzyme et du support utilisés. À faible charge enzymatique, les molécules d'enzyme ont tendance à maximiser leur contact avec le support, ce qui peut influencer l'efficacité de l'immobilisation.

d. Nature du support

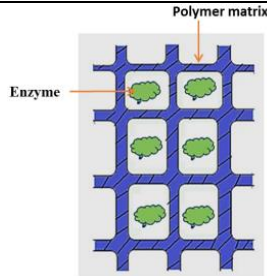
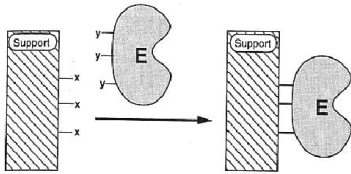
La nature du support utilisé pour l'immobilisation joue un rôle clé dans l'efficacité du processus. Différents supports peuvent avoir un impact significatif sur la rétention et l'activité des enzymes immobilisées. (**Bernal et al., 2012**).

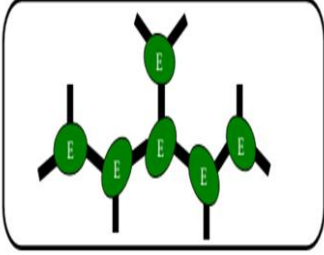
I.3.5. Techniques d'immobilisation enzymatique

L'immobilisation des enzymes s'est imposée comme une technique efficace pour améliorer la stabilité enzymatique. Par immobilisation, on obtient des matériaux composites de tailles et de formes différentes, avec des propriétés et des caractéristiques différentes, avec principal avantage d'augmenter la stabilité du biocatalyseur dans le temps. Les premières études sur l'immobilisation enzymatique ont été réalisées en 1916 par Nelson et Griffin (**Nelson et al., 1916**) qui ont étudié l'immobilisation de l'invertase à l'aide de charbon et d'hydroxyde d'aluminium. Les résultats suggèrent que par immobilisation, l'activité de l'enzyme ne diminue pas considérablement, une conclusion qui ouvre de nouvelles perspectives de recherche dans le domaine de l'immobilisation enzymatique. Par la suite, l'intérêt de la communauté scientifique pour l'immobilisation d'enzymes a augmenté de façon exponentielle, avec un grand nombre de méthodes d'immobilisation en cours de développement, dont beaucoup sont déjà appliquées dans des procédés industriels (**Petrila et al., 2022**).

Il existe différentes techniques d'IE sont actuellement connues pouvant être aussi bien chimiques que physiques. L'immobilisation par voie physique est due à l'attachement de l'enzyme sur la surface du support par plusieurs types d'interactions : électrostatique, hydrophobe/hydrophile, et par les forces de Van der Waals. L'attachement de l'enzyme par voie chimique nécessite un lien covalent ou de coordination entre l'enzyme et le support. L'immobilisation chimique diffère de l'attachement par adsorption, généralement il y a diminution de l'activité de l'enzyme. De plus, le lien covalent ou coordonnant formé entre l'enzyme et le support crée un changement structural de l'enzyme immobilisée, qui peut aussi affecter son site actif et ainsi diminuer l'activité de l'enzyme. On peut notamment citer les principales méthodes dans le tableau I.2.

Tableau I.2: Différentes techniques d'IE

	Définition	Exemple	Figure
Inclusion	Emprisonnement d'enzyme dans une matrice constituée par un réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère insoluble. (Hronska,2009)	Polyacrylamide Alginate, Chitosan (Villeneuve et al.,2000)	 <p>Figure I.3 : Inclusion dans un réseau de polymère insoluble (Thangaraj et al., 2019)</p>
Immobilisation par liaison	La fixation est réalisée en formant des liaisons covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et du support. La fixation nécessite généralement une activation préalable des groupements fonctionnels du support (activation par bromure de cyanogène par exemple) ou l'utilisation d'un agent de condensation.	Carbodiimide Triazine Sel de diazonium. (Alloue et al.,2008)	 <p>Figure I.4 : Immobilisation covalente de l'enzyme sur un support. (Mahsa, 2009)</p>

<p>Réticulation</p>	<p>La réticulation consiste à établir des liens covalents entre molécules d'enzymes ou entre molécules d'enzymes et de protéines inertes par l'intermédiaire d'agents polyfonctionnels, afin d'obtenir des structures de très haute masse molaire. (Filho <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p>Sérumalbumine + glutaraldéhyde Collagène + Glutaraldéhyde</p>	 <p>Figure I.5 : Immobilisation par réticulation.</p>
----------------------------	--	--	---

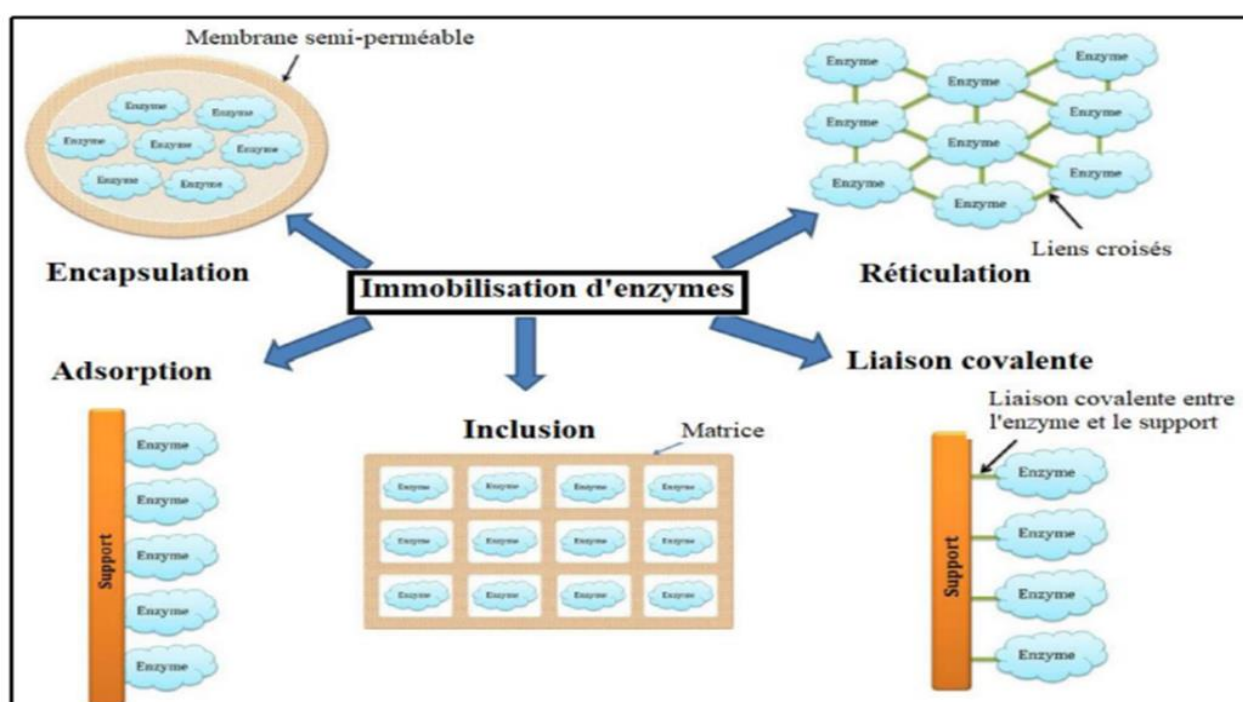


Figure I.3: Différentes techniques d'immobilisations des enzymes (Sirisha *et al.*, 2016).

II.3.6. Propriétés des enzymes immobilisées

L'immobilisation entraîne des modifications notables des propriétés catalytiques et structurales des enzymes. Ces modifications résultent principalement du changement du microenvironnement dans lequel l'enzyme interagit avec son substrat, par rapport à une enzyme libre en solution. Lorsqu'elle est fixée à un support, l'enzyme peut subir des altérations de sa conformation tridimensionnelle, affectant ainsi l'accessibilité du site actif et l'efficacité catalytique (Sharma *et al.*, 2008).

Ces changements structuraux sont généralement moins marqués dans les systèmes d'immobilisation limités (ou peu contraignants), mais peuvent devenir significatifs lorsque de fortes interactions covalentes ou des contraintes stériques sont impliquées. Par ailleurs, la fixation de l'enzyme sur une matrice peut accroître sa **stabilité thermique et opérationnelle**, en réduisant la mobilité moléculaire et en la protégeant des dénaturations. Cette stabilité renforcée est souvent liée à une densité de charge enzymatique plus élevée, à une diffusion contrôlée des substrats et à la formation de liaisons multiples entre l'enzyme et le support (**Fernandez-Lopez et al., 2017**).

De nombreuses études ont mis en évidence que, malgré une légère diminution de l'activité catalytique après immobilisation, la stabilité globale de l'enzyme, notamment vis-à-vis de la température et du pH, est généralement améliorée, ce qui constitue un avantage majeur pour les applications industrielles.

Après avoir examiné les principes généraux de l'immobilisation enzymatique, il est désormais essentiel de se focaliser sur l'enzyme choisie pour notre étude expérimentale : la peroxydase (POD), en raison de ses propriétés catalytiques intéressantes et de ses nombreuses applications.

I.4. Peroxydases

I.4.1. Généralités

La peroxydase (EC 1.11.1.7) est une enzyme hémique appartenant à la classe des oxydoréductases, largement répandue dans les règnes végétal, animal, fongique et bactérien (**Nelson & Cox., 2014; Zia et al., 2011**). Elle catalyse l'oxydation d'un large éventail de substrats organiques et inorganiques en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou d'autres hydroperoxydes comme accepteurs d'électrons (**Adeniyi et al., 2009; Rani & Abdrahman, 2006**). Cette activité repose sur la présence d'un groupement prosthétique de type hème, contenant un atome de fer central, qui joue un rôle clé dans le mécanisme catalytique.

Il existe deux grands types de peroxydases : celles qui contiennent un hème comme groupement prosthétique, et celles qui en sont dépourvues. Bien qu'elles partagent des fonctions similaires, leurs structures et mécanismes catalytiques diffèrent sensiblement.

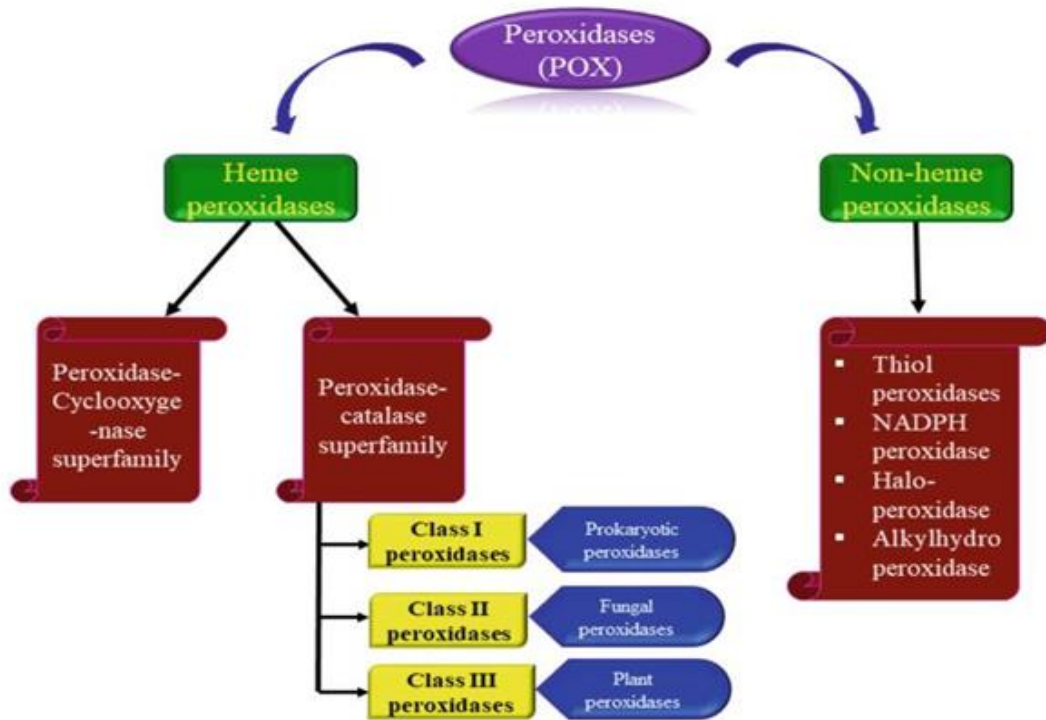


Figure I.4. Classification simplifiée des peroxydases.

En réalité, il n'y a pas une peroxydase mais des peroxydases car ce type d'enzyme existe chez presque tous les êtres vivants : chez les microorganismes, chez les plantes et chez les animaux.

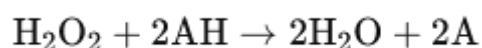
Classes I : contenant la peroxydase des procaryotes tel que : les Catalase Peroxydases (CP), les Ascorbates Peroxydases (APx) et les Cytochrome c Peroxydases (CcP). (Arthur., 2001)

Classes II : uniquement détectées chez les champignons, qui sont capables de dégrader la lignine. On distingue : Lignine peroxydase (LiP), manganèse peroxydase (MnP) les deux sont produites par les champignons de la pourriture blanche.(Bania et alt., 2012)

Classes III : présentes seulement chez les plantes tel que : le raifort (HRP : Horse Radich Peroxydase), pêche (*Prunus Persica*), Pomme de terre (*Alocasia Macrorrhiza*), artichaut (*Cynara Scolymus L*), navet (*Brassica rappa*) , courgette (*Cucurbita Pepo*). (Duarte,Vazquez., 2002)

I.4.2. Mécanisme d'action de la peroxydase

Les peroxydases catalysent des réactions d'oxydoréduction dans lesquelles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) joue le rôle d'oxydant (accepteur d'électrons), permettant l'oxydation de divers substrats organiques ou inorganiques (Rani & al., 2006). La réaction générale peut s'écrire comme suit :



Où **AH** représente un substrat donneur d'électrons (phénol, amine aromatique, etc.), et **A** est le produit oxydé.

Le mécanisme catalytique se déroule en plusieurs étapes, généralement en trois états enzymatiques :

1. **Formation de l'intermédiaire Composé I :**

L'enzyme réagit avec H_2O_2 , générant une forme oxydée très réactive appelée **Composé I** ($Fe^{4+}=O$ + un radical porphyrine).

2. **Oxydation du substrat (AH) :**

Le composé I oxyde le substrat, produisant **Composé II** ($Fe^{4+}=O$) et un radical libre du substrat.

3. **Régénération de l'enzyme native :**

Le composé II oxyde un second substrat, régénérant la peroxydase dans son état ferrique (Fe^{3+}), prête à un nouveau cycle.

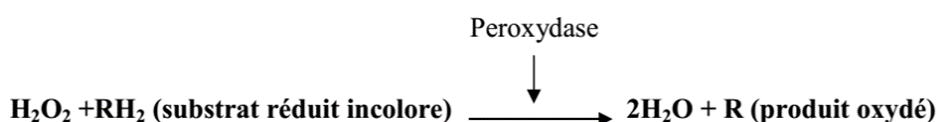


Figure I.5: La réaction générale de peroxydase

I.4.3. Structure de la peroxydase végétale

Les peroxydases végétales sont des protéines glycosylées à hème (hémoglycoprotéines), Elles sont caractérisées par la présence d'un thème central, pris en sandwich entre le domaine distal (extrémité N- terminal) et le domaine proximal (Extrémité C-terminal) de la protéine (Figure I.6). De ce fait, l'hème constitue le groupement prosthétique de l'enzyme et la chaîne polypeptidique est l'apoenzyme. (Étienne *et al.*, 2013)

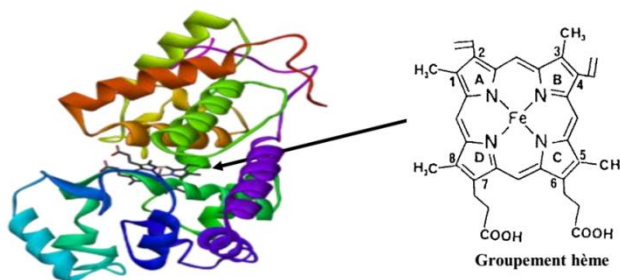


Figure I.6: Structure tridimensionnelle de la peroxydase de raifort (Veitch., 2004)

I.4.4. Applications des matériaux composites polymère/enzyme

Les matériaux composites associant des polymères à des enzymes immobilisées suscitent un intérêt croissant en raison de leurs performances améliorées, combinant la spécificité catalytique des enzymes avec les propriétés mécaniques, chimiques et biologiques des polymères. Ces systèmes hybrides offrent une excellente stabilité, une réutilisabilité accrue et une efficacité catalytique maintenue, ce qui les rend particulièrement attractifs dans divers domaines d'application.

Sur le plan biomédical, ces composites sont utilisés dans la conception de systèmes de délivrance ciblée de médicaments, où l'enzyme immobilisée permet une activation localisée du principe actif, réduisant les effets secondaires systémiques. Ils sont également employés dans la fabrication de biocapteurs enzymatiques destinés au diagnostic de pathologies (glucose, cholestérol, lactate), grâce à leur haute sensibilité et à leur compatibilité avec les dispositifs miniaturisés.

Dans le domaine de la biocatalyse environnementale, ces matériaux composites sont exploités pour la dégradation de composés toxiques (phénols, pesticides, colorants), les enzymes étant protégées par la matrice polymérique contre les conditions extrêmes du milieu réactionnel.

En ingénierie tissulaire, les polymères fonctionnalisés par des enzymes peuvent favoriser la régénération cellulaire ou la dégradation contrôlée des matrices implantables. Par exemple, l'incorporation de peroxydases ou d'hydrolases dans des hydrogels polymériques permet de moduler la réactivité ou la résorption du matériau dans le corps humain.

La versatilité des combinaisons polymère/enzyme ouvre ainsi la voie à des innovations importantes dans la médecine, l'environnement et l'industrie pharmaceutique.

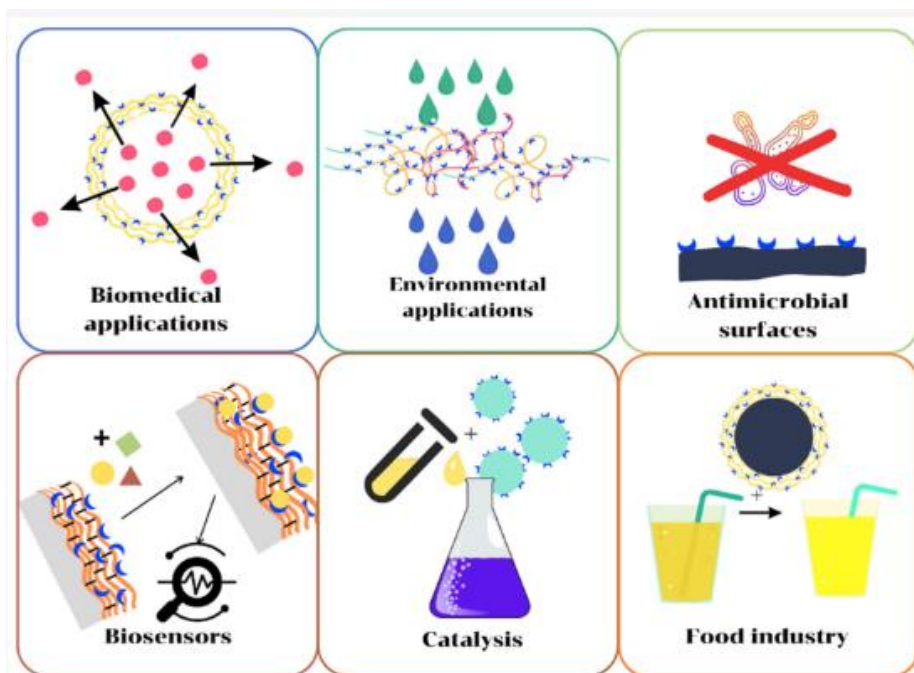


Figure I.7 : Applications de système polymère/enzyme (**Petrila et al., 2022**)

L'utilisation de matériaux polymères/enzymes à l'échelle industrielle commence à se développer ; ces biocatalyseurs sont utilisés avec succès dans des applications telles que la clarification des jus, le blanchiment du papier et la dégradation de certains agents polluants. Les matériaux composites polymère/enzyme trouvent des applications dans des domaines d'intérêt, tels que l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, la synthèse chimique et protection de l'environnement.

I.5. Conclusion

L'immobilisation enzymatique a été présentée comme une approche essentielle permettant d'optimiser la stabilité, la réutilisabilité et l'efficacité catalytique des enzymes dans de nombreuses applications. La peroxydase a été choisie comme enzyme modèle en raison de sa forte activité oxydative et de son large éventail d'applications, notamment dans les domaines biomédical et environnemental.

Ces notions soulignent l'importance cruciale du choix du support d'immobilisation, celui-ci ayant un impact direct sur les performances finales du biocatalyseur. Dans cette perspective, le chapitre suivant sera consacré à l'étude des microparticules polymériques, qui se distinguent par leur biocompatibilité, leur capacité de modification chimique et leur aptitude à assurer une libération contrôlée. Ces caractéristiques en font des supports particulièrement adaptés aux exigences des applications pharmaceutiques modernes.

Chapitre II

II.1. Introduction

Au cours des dernières décennies, les polymères naturels ont suscité un intérêt croissant dans les domaines biomédical, pharmaceutique et biotechnologique, en raison de leurs propriétés uniques telles que la biocompatibilité, la biodégradabilité, la non-toxicité et la possibilité de fonctionnalisation chimique. Parmi ces matériaux, les polysaccharides occupent une place centrale en tant que biopolymères abondants et polyvalents, offrant une diversité structurale propice à une large gamme d'applications.

Dans le contexte de l'immobilisation enzymatique, le choix du support joue un rôle déterminant dans la stabilité, l'activité et la réutilisabilité de l'enzyme. Les polymères naturels, et plus particulièrement les polysaccharides, constituent des matrices idéales pour la conception de supports d'immobilisation grâce à leur affinité pour les biomolécules et leur aptitude à former des structures micro- ou nanométriques. La mise en forme de ces polymères sous forme de microparticules permet d'augmenter la surface de contact et de faciliter l'interaction enzyme support, tout en offrant la possibilité d'un contrôle sur la libération, la protection et la fonctionnalité des enzymes immobilisées.

Ce chapitre a pour objectif de présenter un aperçu général sur des connaissances actuelles de cette classe de polymères naturels, dont l'attrait s'explique par ses propriétés physico-chimiques et biologiques remarquables ainsi que ses utilisations sous différentes formes dans un contexte d'applications potentielles. Une attention spécifique sera portée à deux biopolymères largement exploités : le chitosane et l'alginate, en soulignant leur aptitude à être utilisés sous forme de microparticules adaptées aux applications enzymatiques, notamment dans le domaine biomédical.

II.2. Généralités sur les polymères

II.2.1. Polymères

Le mot polymère vient du grec « polus » plusieurs, et « meros » partie. Un polymère est une macromolécule, organique ou inorganique, constituée de l'enchaînement répété d'un même motif, le monomère (du grec monos: un seul ou une seule, et meros ; partie), reliés les uns aux autres par des liaisons covalentes. Les travaux de Staudinger dans les années 1920 (**Staudinger, 1920**) constituent la base de la science des polymères (Nobel en 1953) ou macromolécules. Le nom des polymères est généralement dérivé de celui du monomère en ajoutant le préfixe "poly". Pour le nom du monomère : il est formé de plusieurs mots, il est mis entre parenthèses et précédé de poly (préfixe).

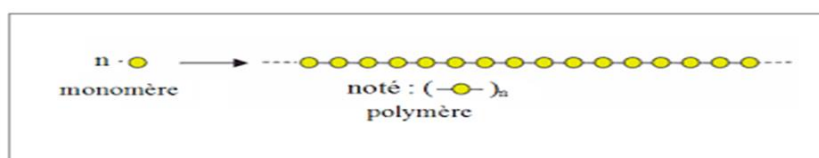


Figure II.1 : Modèle schématique de la synthèse d'un polymère

II.2.2. Biopolymères

Les biopolymères, selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (UIPAC), se définissent comme étant des biomacromolécules synthétisées par des organismes vivants. Selon l'Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME), ce sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables : plantes, algues ou animaux. Ils peuvent être obtenus également par des procédés industriels et/ou de synthèse (polymérisation), à partir de monomères naturels ou identiques aux naturels. Les biopolymères sont des polymères issus d'organismes vivants ou de polymères synthétisés à partir de ressources renouvelables (**Dassanayake., 2019**) (figure II.2).

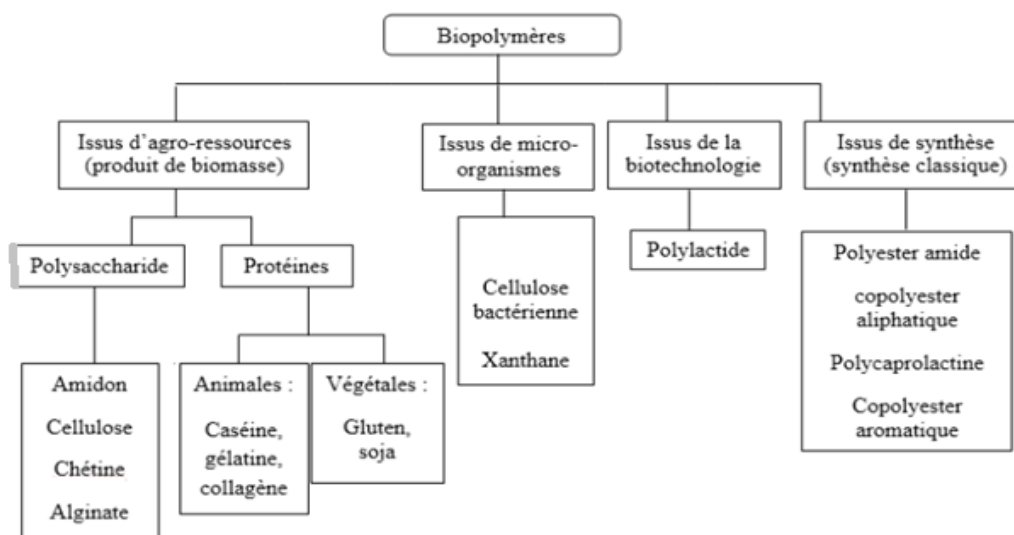


Figure II.2 : Les différentes sources de biopolymères (**Boukhouta., 2019**)

Les polymères naturels, produits par des organismes vivants, sont d'un intérêt particulier dans les domaines biomédical, pharmaceutique et environnemental, en raison de leur biodégradabilité, leur biocompatibilité et leur faible toxicité. Les biopolymères obtenus à partir de sources végétales ou animales auxquels appartiennent toutes les familles de polysaccharides (cellulose, amidon, chitosane...) et de protéines (laine, soie...) sont représentés dans la figure II.3.

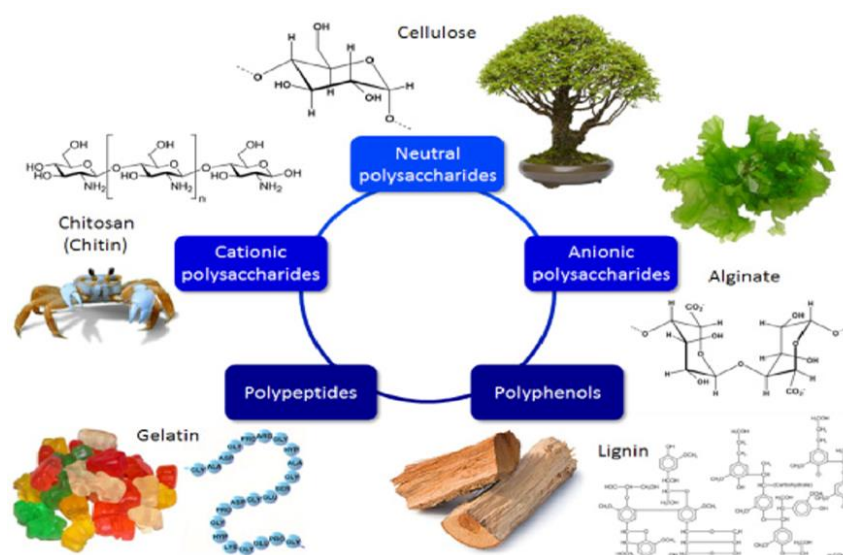


Figure II.3 : Biomatériaux naturels renouvelables

II.2.3. Propriétés des biopolymères

Grâce à leur structure chimique spécifique et à leur comportement en solution, les biopolymères possèdent des propriétés particulières qui les rendent particulièrement adaptés à diverses applications, notamment dans les domaines biomédical, pharmaceutique et environnemental. Parmi ces propriétés, les plus remarquables incluent :

II.2.3.1. Biodégradabilité

La biodégradabilité est un processus naturel par lequel les matériaux organiques sont décomposés en composés simples sous l'action de microorganismes tels que les bactéries, les champignons, les enzymes ou les algues. Cette dégradation est rendue possible par la présence, dans la structure du polymère, de liaisons chimiques facilement hydrolysables, telles que les liaisons esters ou amides. Le processus conduit à la formation de sous-produits simples comme l'eau, le dioxyde de carbone, le méthane, des composés minéraux et de la biomasse (**Sánchez-Cid et al., 2023**). Chez les biopolymères, cette propriété constitue un avantage majeur, notamment dans les domaines biomédical et environnemental, car elle permet une élimination naturelle du matériau après usage, sans impact toxique ou accumulation dans l'environnement.

II.2.3.2. Biocompatibilité

La biocompatibilité désigne la capacité d'un matériau à interagir avec un environnement biologique sans provoquer de réponse immunitaire, inflammatoire ou toxique indésirable. Elle constitue un critère fondamental dans le développement de dispositifs médicaux, de supports d'immobilisation enzymatique ou de systèmes de délivrance de médicaments (**Ghasemi, M., et al., 2023 ; Li, Z et al., 2022**).

Les biopolymères naturels, tels que le chitosane, l'alginate ou l'acide hyaluronique, sont particulièrement appréciés pour leur bonne biocompatibilité. Cela s'explique par leur origine biologique, leur similitude avec les composants naturels de l'organisme et leur capacité à être métabolisés ou résorbés sans effets secondaires. Par leur origine naturelle, les biopolymères remplissent logiquement cette fonction (**Holy et al., 2006**). Cependant, la biocompatibilité dépend également de la pureté du matériau, de sa structure chimique, de sa dégradation in vivo et de la nature des sous-produits générés. Une caractérisation rigoureuse est donc essentielle avant toute application thérapeutique ou diagnostique.

Parmi les différentes classes de biopolymères, les polysaccharides occupent une place de choix en raison de leur abondance, de leur grande diversité structurale et de leur adaptabilité remarquable aux applications biomédicales. Leur potentiel en tant que supports d'immobilisation enzymatique justifie ainsi l'attention particulière qui leur est accordée dans la suite de ce travail.

II.3. Polysaccharides

II.3.1. Généralités

Les polysaccharides sont des macromolécules naturelles constituées de longues chaînes d'unités monosaccharidiques reliées entre elles par des liaisons glycosidiques. Ils peuvent être linéaires ou ramifiés, et se distinguent par leur origine naturelle, leur biodégradabilité, leur biocompatibilité et leur fonctionnalité chimique, des propriétés particulièrement intéressantes dans le domaine biomédical. Ils sont présents dans une grande variété de sources biologiques : végétales (cellulose, pectine, alginate), animales (chitosane, hyaluronate), microbiennes (dextran, pullulane), et algales (carraghénanes, alginate). Leur capacité à interagir avec d'autres biomolécules et à former des réseaux tridimensionnels en fait des candidats de choix pour le développement de microparticules polymériques, notamment pour l'immobilisation enzymatique (**Sanchez et al., 2024 ; Gan et al., 2024**).

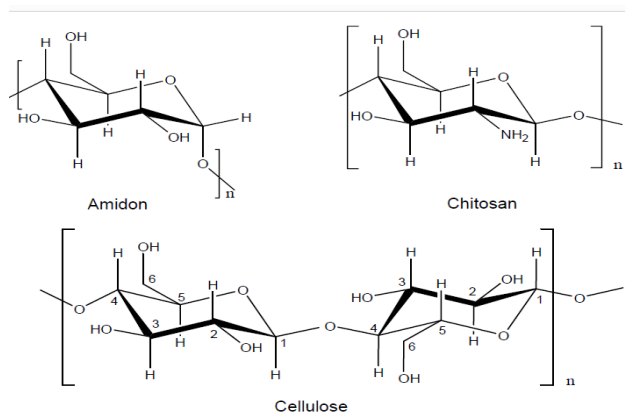


Figure II.4 : Formules chimiques de l'amidon, du chitosane et de la cellulose

n : le degré de polymérisation

II.3.2. Classification des polysaccharides

La très grande variété des systèmes polymères a amené les scientifiques et les industriels à les classer dans différentes catégories en fonction de : leurs structures, leurs natures, leurs charge ou encore de leurs applications.

- **Selon leur charge** : On distingue les polysaccharides anioniques (gomme arabique et pectine) ; les polysaccharides cationiques (chitosane) et les polysaccharides non-ioniques comme la cellulose.
- **Selon leur structure** : Linéaire (amylase, pectine...) et ramifiées à courte chaîne et à longue chaîne.
- **Selon leur origine** : Marine (extrait d'algues) comme l'alginate, lacarragheenan. Animale comme la chitine et le chitosane. Végétale tel que l'amidon et cellulose et microbienne (Bactéries ou champignons): Glycane, pullulane, dextrane, xanthane. **(Rohit et al., 2014)**

II.3.3. Propriétés des polysaccharides

Les polysaccharides sont des macromolécules naturelles presque universelles qui existent dans les organismes vivants où ils effectuent une variété de fonction dont beaucoup ne sont pas entièrement comprises. Néanmoins, il est facilement reconnu qu'ils peuvent agir comme des substances squelettiques dans les parois cellulaires des plantes terrestres supérieures et des algues, qu'ils fournissent des réserves alimentaires dans les plantes, les micro-organismes et les animaux.

Les principales caractéristiques des polysaccharides sont leur capacité à modifier les propriétés ou environnements aqueux **(ASA et al., 2021)**, c'est-à-dire leur capacité à épaissir, émulsionner, stabiliser, encapsuler, flocculer, gonfler et suspendre ou à former des gels, des films et des membranes. Des caractéristiques particulières telles que la biocompatibilité, la biodégradabilité, la bio adhésivité et la non-toxicité, associée à une large disponibilité et des coûts généralement faibles, expliquent leur exploitation croissante dans la formulation de produits pour applications alimentaires, biomédicales et cosmétiques. De par leur structure chimique, les polysaccharides présentent des propriétés particulières et intéressantes pour des applications spécifiques en industrie. La biodégradabilité est la plus importante.

II.3.4. Rôle des polysaccharides dans l'immobilisation enzymatique

➤ Abondance et diversité naturelle

Les polysaccharides naturels, provenant de sources diversifiées (végétales, animales, microbiennes, algales), représentent les matériaux bioderivés les plus abondants sur Terre et constituent des supports privilégiés pour la formulation de microparticules enzymatiques (Navarro et al., 2023).

➤ Capacités de réticulation et fonctionnalité chimique

Grâce à leurs capacités à former des réseaux tridimensionnels (gels ioniques, réticulation chimique via glutaraldéhyde), et à la présence de groupes fonctionnels réactifs, les polysaccharides permettent l'immobilisation covalente ou physique d'enzymes, avec une préservation de l'activité catalytique (Frontiers et al., 2023).

➤ Applications en supports hybrides

L'incorporation de polysaccharides dans des nanocomposites magnétiques (ex. chitosane/Fe₃O₄) améliore la séparation magnétique, la récupération et la stabilité thermique des enzymes immobilisées, tout en réduisant leur lixiviation (Bioprocess & al., 2024)

➤ Évolution récente des technologies d'immobilisation enzymatique

Les systèmes magnétiques hybrides polysaccharidiques constituent le cœur des nanobiocatalyseurs de nouvelle génération, avec des applications concrètes dans la production de biocarburants, la catalyse fine et les procédés pharmaceutiques. (Gan et al., 2024)

Parmi cette large famille de polysaccharides, notre intérêt porte sur le chitosane (Cs) qui feront l'objet de cette étude.

II.3.5. Chitosane

II.3.5.1. Définition, sources et structure chimique

Le chitosane est un polysaccharide dérivé de la chitine, polymère naturel parmi les plus abondants sur la planète avec la cellulose (Kurita et al., 2006 ; Rinaudo et al., 2006). Sa découverte est attribuée à Rouget (1859), qui en chauffant de la chitine en présence de potasse, remarqua que le produit était soluble dans des solutions aqueuses acides (Crini., 2009). Le chitosane est un élément structurel retrouvé dans l'exosquelette des crustacés (comme la crevette, le crabe et le homard) et des insectes ; il est aussi naturellement présent dans la paroi cellulaire des champignons (Venkatesan et al., 2014 ; Vunain et al., 2017) (figure II.5).

L'obtention du chitosane peut se faire à partir de la désacétylation partielle de la chitine de façon chimique ou enzymatique. Cependant, le processus le plus utilisé est la désacétylation chimique en raison de ses faibles coûts et de la facilité de production à l'échelle industrielle (Muxika et al., 2017). Dans ce cas, la chitine est traitée avec l'hydroxyde de sodium concentré pendant une longue période de temps afin d'éliminer le groupe acétyle et en laissant à sa place le groupe amine ($-NH_2$). Ce processus est souvent réalisé sous une atmosphère d'azote afin d'éviter des réactions indésirables.

La structure chimique du chitosane est très semblable à celle de la chitine et de la cellulose. Structurellement, le chitosane (et aussi la chitine) (Figure II.6) est un polysaccharide linéaire, constitué par la succession des deux unités *N*-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine, distribuées de façon aléatoire et dont la proportion en % détermine le degré de désacétylation (DDA) du chitosane. La masse molaire du chitosane varie en fonction des paramètres de l'origine et du traitement.

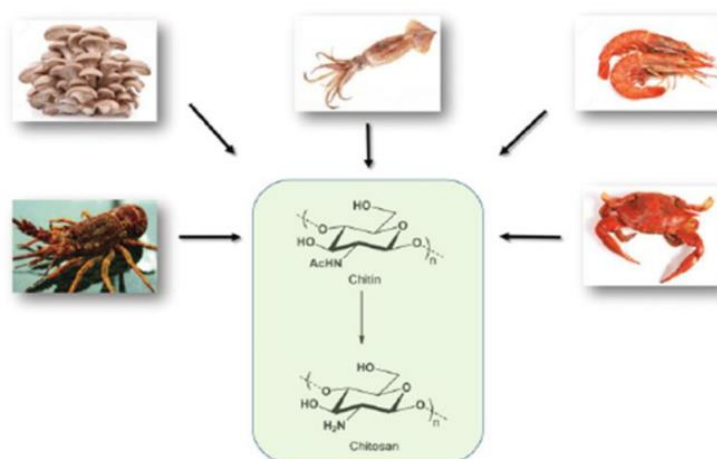


Figure II.5: Différentes sources du chitosane.

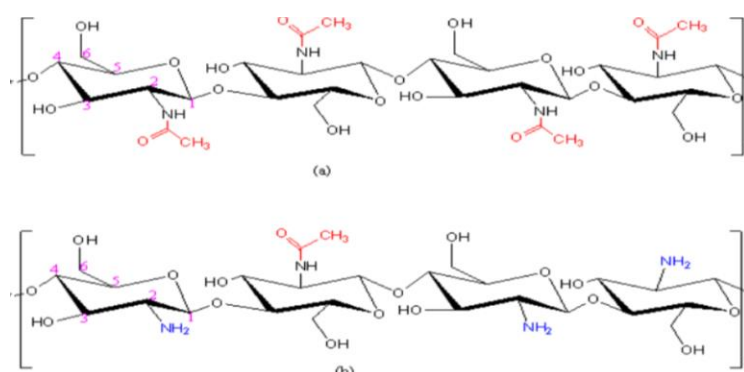


Figure II.6 : Structures chimiques de chitine (a) et du chitosane (b)

(n : le degré de polymérisation)

II.3.5.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane

Le chitosane possède des propriétés chimiques et biologiques particulières en raison de sa structure chimique.

a) Propriétés physico-chimiques

- Le degré de désacétylation : indique la proportion d'unités amine-D-glucosamine dans le nombre total d'unités glycosides (**Chatelet et al., 2001**). Ce paramètre est très important car il affecte directement le comportement de ce polymère en solution.
- Poids moléculaire : Le poids moléculaire (MW) d'un polymère est une autre propriété très importante. Cela dépend essentiellement de la masse de ce monomère et du nombre de monomères qui composent le polymère (**Wang et al., 1994**).
- Viscosité : La viscosité est une propriété importante du chitosane liée à son comportement en solution. Cette propriété est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. La viscosité augmente également avec le DDA car plus le polymère est désacétylé, plus le pourcentage de groupes amines libres est élevé et plus la solubilité est élevée.
- Réactivité : La présence de nombreux groupements hydroxyles confère au polymère un caractère hydrophile intéressant. Ceci est très utile pour les propriétés d'adsorption dans les solutions aqueuses et pour certaines réactions catalytiques.
- Solubilité : La disponibilité des groupements amine ($-NH_2$) dans le chitosane lui confère une meilleure solubilité sous certaines conditions. En effet, ces fonctions deviennent protonées ($-NH_3^+$), sous sa forme polycationique, il est soluble dans les solvants faiblement acides, lorsque le pH du milieu est en deçà de son pKa (6.2-6.5) (**Crini., 2006**). Au-delà, le chitosane perd sa densité de charge positive et de ce fait les répulsions électrostatiques, causant ainsi sa précipitation (figure II.7). Il est donc insoluble dans l'eau, dans les solvants alcalins et la plupart des solvants organiques neutres incluant l'éthanol et l'acétone.

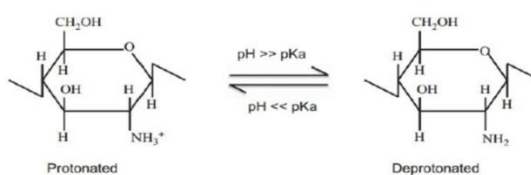


Figure II.7: Protonation/déprotonation du chitosane dépendamment du pH du milieu
(**Wang et al., 2017**)

b) Propriétés biologiques du chitosane

Par ailleurs, la nature cationique du chitosane lui confère des propriétés biologiques particulières comme des propriétés hémostatiques et antimicrobiennes .

Le chitosane est biocompatible, sa présence in vivo provoque une réponse inflammatoire et un rejet très limité (propriétés immunologiques) (Agullo et al., 2003). Sa biocompatibilité se caractérise par sa non-toxicité, son hémocompatibilité et sa biodégradabilité.

La biodégradabilité du chitosane est assurée par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Chez l'homme et les mammifères, ce rôle est principalement joué par le lysozyme, qui décompose la liaison glycosidique (1-4) de la N-acétylglucosamine et de la fraction glucosamine et est métabolisé dans le corps (Konovalova et al., 2004).

Le chitosane possède des propriétés antitumorales et antibactérienne. En effet, les monomères de N-acétylglucosamine et glucosamine permettent d'augmenter le potentiel des cellules du système immunitaire qui jouent un rôle dans la destruction des cellules tumorales et de certains agents pathogènes (Dellali et al., 2020).

Les propriétés physicochimiques du chitosane lui permettent d'être mis sous différentes formes comme : des micro/nanoparticules, d'hydrogels, de nanofibres, ou d'éponges (figure II.8).

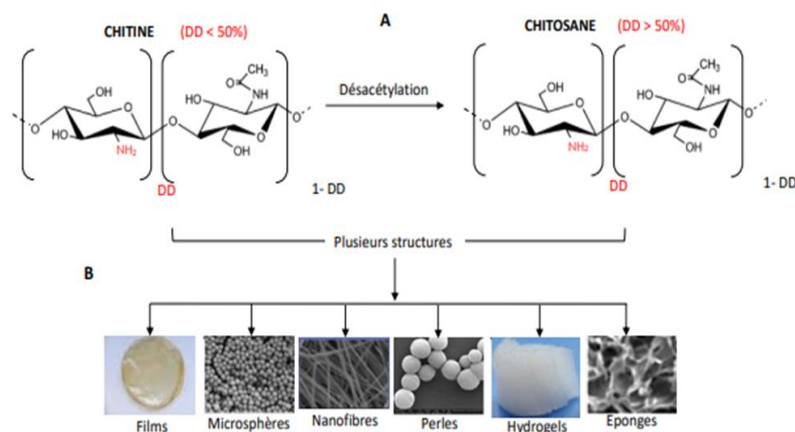


Figure II.8: Représentation schématique du chitosane sous différentes formes (B) (Ahmed et al., 2018; Deepthi et al., 2016).

II.4. Alginate

L'alginate est un polysaccharide produit par les algues brunes et les bactéries. L'acide alginique a été découvert, extrait et fait breveter la première fois par Stanford (1881). Le polysaccharide a été identifié comme composant structural des algues brunes marines, où il constitue jusqu'à 40% de la matière sèche et se produit principalement dans le mucilage intercellulaire. L'extraction de l'alginate des algues repose sur la solubilité dans l'eau de ce

polymère : l'acide alginique est insoluble dans l'eau, mais il est dans les sels de cations monovalents tels que le sodium Na^+ ou le potassium K^+ . Ainsi, des changements de pH permettent sa purification et sa séparation des autres composants (**Rocher et al., 2008**).

II.4.1. Structure chimique de l'alginate

Les alginates appartiennent aux exopolysaccharides. Les alginates sont des copolymères binaires linéaires dont les monomères l'acide β -D-mannuronique (noté M) et l'acide α -L-guluronique (noté G), sont liés par des liaisons glycosidiques β -(1-4) et α -(1-4). Les motifs M et G sont organisés en blocs, formant ainsi des séquences répétitives donnant leurs propriétés aux chaînes d'alginate (**Huang et al., 2014**). Comme présenté sur la figure II.9, ces blocs forment des régions homopolymériques de motif M (appelés blocs M), de motif G (appelés blocs G) ou des régions de structure alternée (blocs MG). Une hydrolyse partielle suivie d'un fractionnement peut permettre séparer ces blocs (**Huang et al., 2014**).

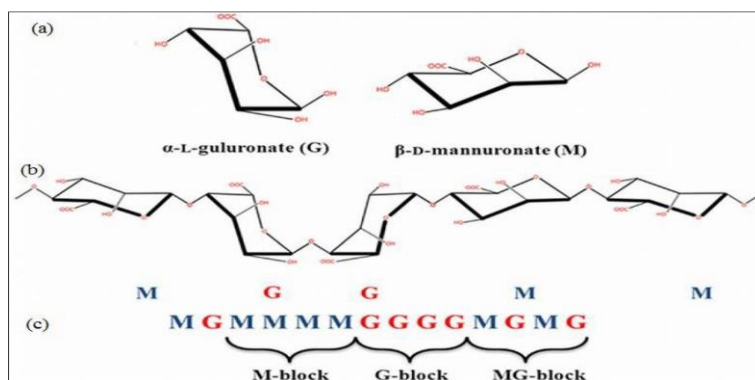


Figure II. 9 : Structure et composition de l'alginate : (a) monomères d'acides uroniques, (b) Conformation des chaînes et © distribution des blocs.

II.5. Micro/nanoparticules polymériques

Les micro/nanoparticules polymères sont à l'heure actuelle les plus étudiées pour leurs nombreux avantages : biocompatibilité, biodégradabilité, versatilité chimique pour l'altération de leurs propriétés physicochimiques. De manière générale, on définit les micro/nanoparticules polymères comme étant des objets colloïdaux préparées à partir de polymères, sont globalement sphériques et de taille submicronique, c'est-à-dire de dimension inférieure à $1\ \mu\text{m}$ pour les nanoparticules et de taille inférieure à $1\ \text{mm}$ pour les microparticules. Selon leur microstructure, les particules présentent deux types de morphologies les microsphères et les microcapsules.

Les enzymes peuvent être immobilisées sur différents supports et par différentes méthodes. Pour des raisons pratiques, les microparticules dont la taille se situe dans la plage du millimètre sont principalement utilisées. Cependant, de plus en plus de résultats sont rapportés

sur l'immobilisation d'enzymes sur des microparticules possédant une surface spécifique élevée et de nombreux sites actifs disponibles pour les molécules enzymatiques à fixer.

II.5.1. Micro/nanosphères

Les micro/nanosphères sont des particules polymériques colloïdales matricielles, c'est-à-dire dont la structure est entièrement solide. Elles peuvent être pleines ou poreuses (Figure II.10). Les sphères pleines sont des structures micrométriques compactes. La molécule à encapsuler doit être incorporée à l'intérieur de la structure polymérique pendant la fabrication de la nanoparticule et est souvent de nature hydrophobe. Contrairement aux nanosphères pleines, les nanosphères poreuses ont une structure de mailles plus ou moins serrées dont l'architecture est également formée d'une matrice polymérique. Dans ce cas, la molécule d'intérêt peut être insérée dans les structures poreuses

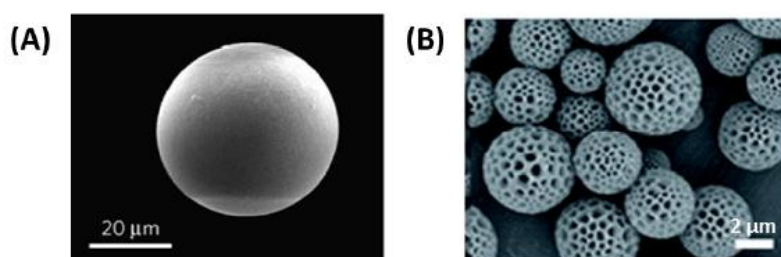


Figure II.10 : (A) Microsphère pleine (Liu et al., 2011) et (B) microsphères poreuses (Gao et al., 2013) de polymères synthétiques

II.5.2. Micro/nanocapsules

Les micro/nanocapsules sont des particules colloïdales constituées d'un réservoir liquide ou semi-liquide à température ambiante, contenu à l'intérieur d'une enveloppe solide de nature polymérique. Dans les systèmes capsulaires, les molécules sont généralement incorporées dans le réservoir, mais elles peuvent aussi être associées de façon covalente ou non à la paroi polymérique, permettant l'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes. Le réservoir des capsules peut être un cœur aqueux ou huileux. Le type de polymère et les propriétés de surface influencent: la stabilité de la nanocapsule, le type de molécule transportable et la pharmacocinétique de la formulation. La coque de polymères des micro/nanocapsules peut être pleine ou bien poreuse (Figure II.11) (Lajoinie et al., 2014 ; Chen et al., 2013).

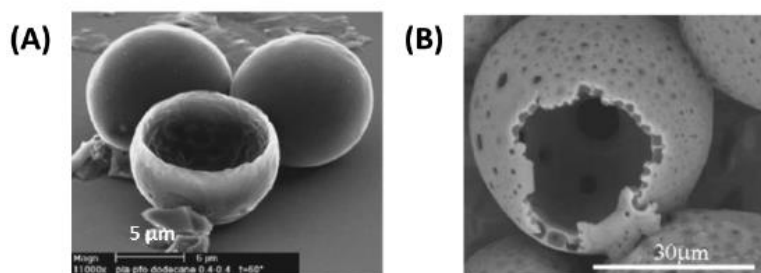


Figure II.11 : (A) Microcapsules pleines (Chen et al., 2013); (B) microcapsules poreuses(Lajoinie et al., 2014) de polymères synthétiques observées en microscopie électronique à balayage

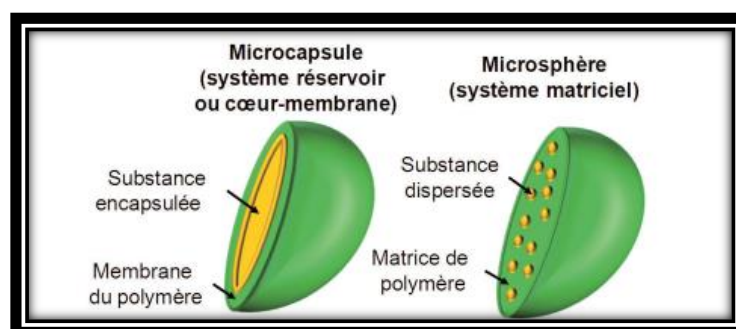


Figure II.12 : Représentation schématique d’une microcapsule et d’une microsphère. (Pinot et al., 2011)

II.5.3. Techniques de préparation des microparticules

Différentes méthodes ont été utilisées pour préparer des systèmes particuliers comme : la gélification ionotropique, la microémulsion, l’émulsion suivi d’une évaporation de solvant et l’auto-assemblage, polymérisation interfaciale (Pulingam et al., 2022). Le choix d’une méthodologie de synthèse particulière dépend de nombreux facteurs, tels que les exigences de taille, la stabilité thermique et chimique, la nature de l’agent actif à encapsuler, la stabilité et la toxicité résiduelle du produit final. La méthode qui nous intéresse est la gélification ionotropique.

II.5.3.1. Gélification Ionotropique

La gélation ionique est un phénomène physicochimique qui consiste à élaborer des gels sur la base d’interactions électrostatiques entre molécules chargées de signes opposés. Lorsque ces molécules se trouvent en présence en solution, elles s’arrangent spontanément sous forme d’agrégats supramoléculaires. Le chitosane est un polymère qui possède la particularité de gélifier au contact d’anions, ce qui permet l’obtention de gels, voire de particules dans des conditions bien précises (Liu et al., 2016; Sukhadeorao.,2019 ; Kołodziejska et al., 2021).

➤ **Avantages de gélification ionotropique:** Les avantages que peut apporter ce procédé sont les suivant :

- Cette technique est la plus simple et la plus largement utilisée dans la fabrication de microparticules (**Gadziński et al., 2022 ; Sacco et al., 2021**).
- L'utilisation de polymères biocompatibles naturels et biodégradables confère à la formulation une muco-adhésion et d'autres propriétés biologiques pertinentes.
- La procédure gélification ionique ne nécessite pas d'équipement coûteux ou de réactifs coûteux, et la technique est relativement bon marché et rapide (peut être réalisée en moins de 10h)
- La possibilité d'obtenir une distribution granulométrique des particules très étroite.

➤ **Inconvénient de Gélification Ionotropique**

- D'autres techniques d'encapsulation, comme l'électrospraying, sont connues pour obtenir une distribution granulométrique étroite (**Asadi et al., 2017**), ce n'est pas toujours le cas avec la gélification ionotropique.
- Les indices de poly dispersion (PDI) sont généralement supérieurs à 0,1, atteignant des valeurs allant jusqu'à 0,5 (**Masarudin et al., 2015 ; Cánepa et al., 2017**). Cela indique une hétérogénéité de la taille des particules qui pourrait également limiter l'interaction de la formulation avec les structures biologiques.

II.6. L'utilisation des microparticules de chitosane comme support d'IE

Les propriétés des biocatalyseurs immobilisés sont influencées par les caractéristiques de l'enzyme, du matériau de support et de la méthode d'immobilisation. Un support approprié doit avoir une affinité élevée pour les protéines, les groupes fonctionnels réactifs, l'hydrophilie, la stabilité mécanique et la rigidité. Le chitosane est un polyaminosaccharide naturel qui offre toutes les caractéristiques, il est donc souvent utilisé pour l'immobilisation d'enzymes. Le chitosane est connu comme un matériau de support idéal pour l'immobilisation d'enzymes en raison de ses nombreuses caractéristiques. Il est l'une des matrices d'immobilisation les plus prometteuses en raison de sa structure chimique facilement modifiable ainsi que d'excellentes propriétés telles que la disponibilité facile, la biodégradabilité, la non-toxicité, les propriétés fongistatiques et bactériostatiques, la résistance mécanique élevée, l'hydrophilie et la stabilité améliorée (**Pandey et al., 2017**), la résistance à la dégradation chimique, l'évitement de la perturbation des ions métalliques par l'enzyme et la propriété antibactérienne (**Biró et al., 2008 ; Yadav., 2009**). Grace à ces nombreuses caractéristiques, le chitosane est connu comme un matériau de support idéal pour l'immobilisation d'enzymes.

Des particules de support de chitosane de différentes tailles peuvent être formées par plusieurs procédés, par ex. précipitation, réticulation en émulsion, séchage par pulvérisation, gélification ionotrope, coalescence émulsion-gouttelettes et méthode micellaire inverse. Ses groupements amino et hydroxyle primaires améliore l'interaction entre le biopolymère et les enzymes, ce qui permet une IE simple, par adsorption ou liaison covalente (**Sulej et al., 2023 ; Ribeiro et al., 2021**). La liaison covalente de l'enzyme avec le support est généralement plus forte et minimise sa lixiviation dans le milieu aqueux; il peut également améliorer la stabilité du biocatalyseur et modifier ses propriétés catalytiques (**Hanefeld et al., 2009**).

La préparation des micro et nanoparticules à base de chitosane pour l'immobilisation d'enzymes a été rapportée récemment dans plusieurs publications (**Wang et al., 2019 ; Naghdi et al., 2019 ; Leonida et al., 2019 ; Inanan,2019 ; Kadri et al., 2018**).

II.7. Conclusion

L'immobilisation enzymatique sur des supports polymériques représente une stratégie efficace pour améliorer la stabilité, la réutilisabilité et la performance catalytique des enzymes. Parmi les différents types de supports, les microparticules à base de polysaccharides naturels, tels que le chitosane et l'alginate, offrent des avantages considérables en raison de leur biocompatibilité, leur capacité à former des structures tridimensionnelles, et leurs interactions spécifiques avec les biomolécules.

Ce chapitre est une synthèse bibliographique consacrée à un rappel sur les principaux polysaccharides décrits à ce jour et particulièrement le chitosane, à leur classification ainsi qu'à leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Ces notions sont essentielles pour comprendre les paramètres influençant les performances des systèmes développés.

La partie expérimentale qui suit vise à mettre en œuvre ces concepts à travers la préparation de microparticules polymériques à base de chitosane et l'alginate, et leur utilisation pour l'immobilisation d'une enzyme modèle, en vue d'applications biomédicales et pharmaceutiques.

Partie

expérimentale

Chapitre III

III.1. Introduction

Après avoir présenté les fondements théoriques relatifs aux polysaccharides, aux microparticules polymériques et aux différentes techniques d'immobilisation enzymatique, cette partie du mémoire se consacre à la démarche expérimentale adoptée pour atteindre les objectifs de l'étude.

L'objectif principal de ce travail est de développer un système d'immobilisation enzymatique performant en utilisant des microparticules à base de polymères naturels, notamment le chitosane et l'alginate. Ces biopolymères ont été sélectionnés pour leurs propriétés biocompatibles, biodégradables et leur aptitude à interagir avec les biomolécules.

Plus spécifiquement, l'étude vise à concevoir, synthétiser et caractériser des microsystemes à base de chitosane/alginate capables d'encapsuler un principe actif d'origine biologique, en l'occurrence l'enzyme peroxydase extraite du radis rose (*Raphanus sativus*). Pour ce faire, plusieurs étapes clés ont été entreprises :

1. L'extraction et la purification partielle de la peroxydase à partir du radis rose frais ;
2. La préparation des microparticules à base de chitosane, par la technique de gélification ionotrope, en faisant varier certains paramètres expérimentaux ;
3. L'immobilisation de la peroxydase au sein des microparticules de chitosane/alginate ;
4. L'évaluation des caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des particules obtenues, incluant le diamètre moyen, le taux de gonflement, l'activité enzymatique résiduelle et le rendement d'immobilisation.

L'ensemble de ces démarches expérimentales s'inscrit dans une perspective de valorisation des polymères naturels pour le développement de supports enzymatiques durables, en lien avec des applications dans le domaine pharmaceutique et biomédical.

Ce chapitre détaille les matériaux utilisés ainsi que l'ensemble des protocoles expérimentaux mis en œuvre pour la réalisation de ces différentes étapes.

III.2. Matériels

Dans le cadre de cette étude expérimentale, différents produits chimiques, matériaux biologiques et équipements ont été mobilisés pour la préparation des solutions, l'extraction enzymatique, la formulation des microparticules et l'évaluation de leurs propriétés. Cette section présente les principaux outils et dispositifs utilisés au cours des travaux.

III.2.1. Equipements

Les équipements utilisés pour la réalisation des différentes étapes expérimentales sont répertoriés dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Matériel utilisé

Equipements	Marque
Agitateur magnétique	IKA C-MAG HS10
Balance électronique de précision 0,001g	Item PA213
Mixeur	Bosch
Micropipettes	PI240683
Centrifugeuse	5417R
pH-mètre	Ph 211
Spectrophotomètre UV visible	4251/50



Figure III.1 : Equipements utilisés

III.2.2. Produits chimiques et réactifs

- **Le chitosane (Cs)**

Le chitosane est insoluble dans l'eau, mais la présence de groupes amino le rend soluble dans des solutions acides d'un pH inférieur à 6,5 (**Krajewska., 2004**). Le chitosane utilisé pour la préparation des microparticules est de faible poids moléculaire (50,000-190,000

Da) et ayant un degré de désacétylation de 91% (Merck). La structure chimique de chitosane est présentée dans la figure III.2.

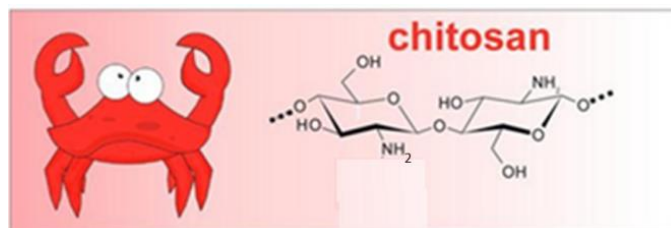
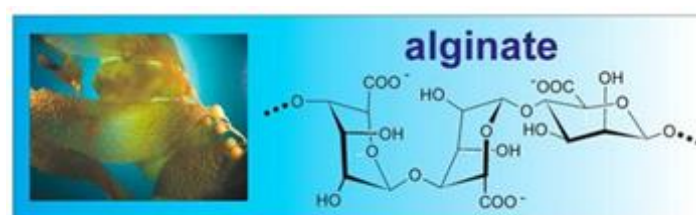


Figure III.2: Structure chimique du chitosane (Cs).

▪ **L'alginate (ALG)**



Un réticulant ionique: Tripolyphosphate de sodium (TPP) : $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (CAS 7758-29-4, $M = 367.86 \text{ g/mol}$), fourni par Sigma Aldrich, sa structure est présentée dans la figure III.3.

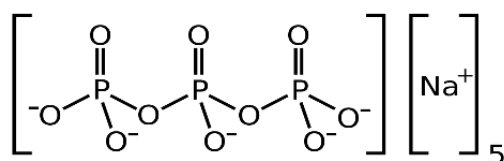
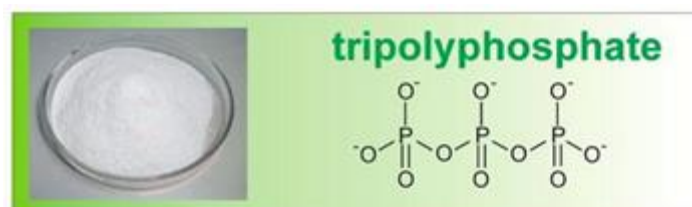


Figure III.3 : structure chimique de TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$).

❖ **Les réactifs**

- ✓ Acide acétique (n° CE: 200-580-7), $M = 60,05 \text{ g/mol}$, Sigma-Aldrich.
- ✓ Acétone (n° CE: 200-662-2), $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ $M = 58,0791 \text{ g/mol}$, Sigma-Aldrich.
- ✓ Hydroxyde de sodium (NaOH $M=39.997\text{g/mol}$), Sigma-Aldrich.
- ✓ Chlorure d'hydrogène (HCl $M=36.461\text{g/mol}$), Merk
- ✓ Peroxyde d'hydrogène (n° CE :231-765-0, H_2O_2 $M=34,0147 \text{ g/mol}$)

- ✓ Pyrogallol (n° CE:201-762-9, $C_6H_6O_3$ M=126.11g/ mol)
- ✓ Dibasic Na_2HPO_4 , M=177,99g/mol
- ✓ monobasic phosphate NaH_2PO_4 , M=119,98g/mol
- ✓ Acide chlorhydrique chlorure d'hydrogène (CE: 231-595-7 Hcl M =36,461g/mol)
- ✓ Glycérol (10- 20%)
- ✓ Carbonate de sodium ($Na_2 CO_3$)
- ✓ Sulfate de cuivre penta hydraté ($CuSO_4. 5H_2O$)
- ✓ Tartrate de sodium et de potassium
- ✓ Réactif de Folin-Ciocalteu
- ✓ Bovin Sérum Albumine (BSA)

III.2.3. Matériel végétal

La peroxydase (POD) utilisée dans cette étude a été extraite à partir de racines de radis rose (*Raphanus sativus*). Les plantes ont été achetées en mars 2025 auprès d'un agriculteur local pratiquant l'agriculture biologique, sur un marché de la ville de Chlef (Algérie).

Les racines fraîches ont été sélectionnées comme partie végétale d'intérêt, en raison de leur richesse en peroxydase. Avant l'extraction, les racines ont été soigneusement lavées à l'eau courante afin d'éliminer les impuretés, les résidus de sol et toute contamination externe éventuelle.

Le choix de la peroxydase comme enzyme modèle pour cette étude repose sur plusieurs critères :

- **Disponibilité** : Il s'agit d'une enzyme végétale facilement accessible à partir de sources naturelles locales ;
- **Polyvalence** : Elle est largement utilisée dans diverses applications industrielles, environnementales et bioanalytiques ;
- **Facilité de dosage** : Des substrats spécifiques permettent une évaluation rapide et précise de son activité enzymatique par spectrophotométrie UV-visible, notamment via l'oxydation du guaïacol en présence de peroxyde d'hydrogène.

III.3. Méthodes

III.3.1. Extraction et purification partielle de la peroxydase

III.3.1.1. Préparation de l'extrait enzymatique brut (EEB)

L'extraction de la peroxydase à partir de radis rose (*Raphanus sativus*) a été réalisée en suivant la méthode proposée par Wang et al. (Wang et al., 2023), avec quelques adaptations des conditions expérimentales. Cette plante est connue pour sa richesse en enzymes oxydatives, notamment les peroxydases. Afin de préserver l'activité enzymatique, toutes les verreries, les radis, ainsi que la solution tampon phosphate (pH 7), ont été préalablement refroidis au congélateur avant utilisation.

Une masse de 100 g de radis frais a été soigneusement lavée à l'eau distillée, épluchée, puis découpée en petits morceaux. Le broyage a été effectué à froid à l'aide d'un mixeur, en présence de 300 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,0), pendant 5 minutes, jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

Le broyat obtenu a été filtré à travers un papier filtre afin d'éliminer les résidus solides, puis le filtrat a été centrifugé à 5000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant ainsi récupéré constitue l'extrait enzymatique brut (EEB) contenant la peroxydase. Cet extrait a été immédiatement conservé au réfrigérateur à 4 °C en vue des étapes ultérieures, notamment la purification partielle et l'immobilisation de l'enzyme.

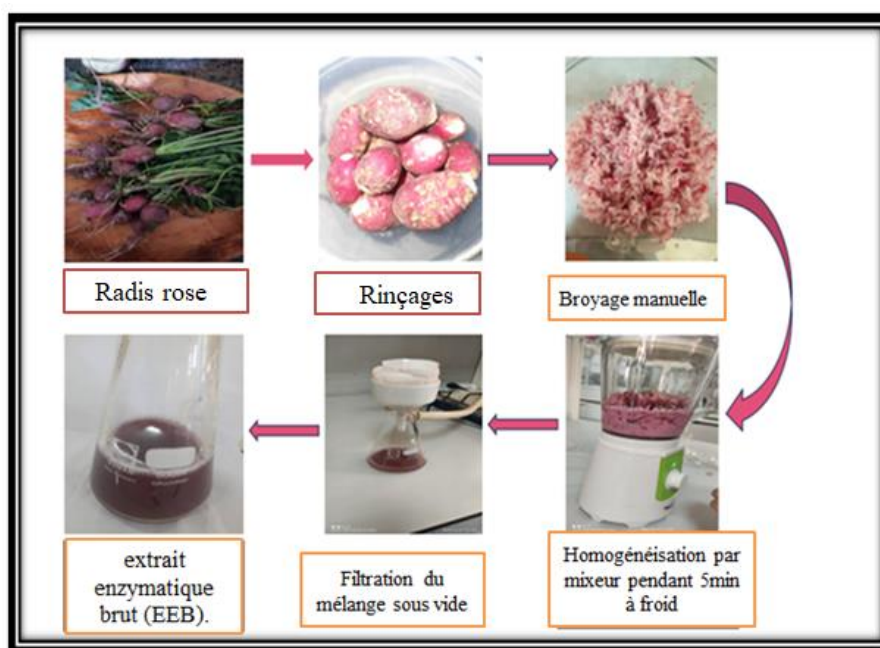


Figure III.4 : Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du radis rose

III.3.1.2. Purification partielle de la peroxydase

La purification partielle de l'extrait enzymatique brut (EEB) de peroxydase a été réalisée par précipitation à l'acétone froide, une méthode classique permettant de concentrer l'enzyme tout en éliminant certaines impuretés solubles. Le protocole adopté s'inspire des méthodes de précipitation par solvants organiques, avec quelques adaptations spécifiques aux conditions expérimentales de ce travail.

Un erlenmeyer contenant 100 mL de l'extrait enzymatique brut (EEB) a été placé au congélateur pendant 15 minutes, puis immergé dans un cristallisateur contenant de l'eau glacée (0 °C) sous agitation magnétique. L'acétone, pré-refroidie à -20 °C, a ensuite été ajoutée lentement goutte à goutte à l'aide d'une burette, selon un rapport volumique 1:1 (acétone : EEB). Le mélange a été conservé au réfrigérateur pendant deux heures afin de favoriser la précipitation complète des protéines enzymatiques. Un précipité blanchâtre s'est formé au fond du récipient ; il a été récupéré par centrifugation à 5000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot obtenu a été ensuite lavé et ressuspendu dans un mélange d'acétone et de tampon phosphate (pH 7), suivi d'une étape de clarification par une seconde centrifugation (5000 tr/min, 10 minutes, 4 °C).

Enfin, le précipité final a été remis en suspension dans environ 20 mL de solution tampon phosphate froide. La solution obtenue représente l'extrait enzymatique partiellement purifié (EEPP) de peroxydase. Afin de préserver l'activité enzymatique au cours du stockage, une petite quantité de glycérol (10 à 20 %) a été ajoutée en tant qu'agent stabilisant. L'EEPP a été conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation pour les étapes ultérieures d'immobilisation. Les différentes étapes de la purification sont illustrées dans la figure III.5 ci-dessous.

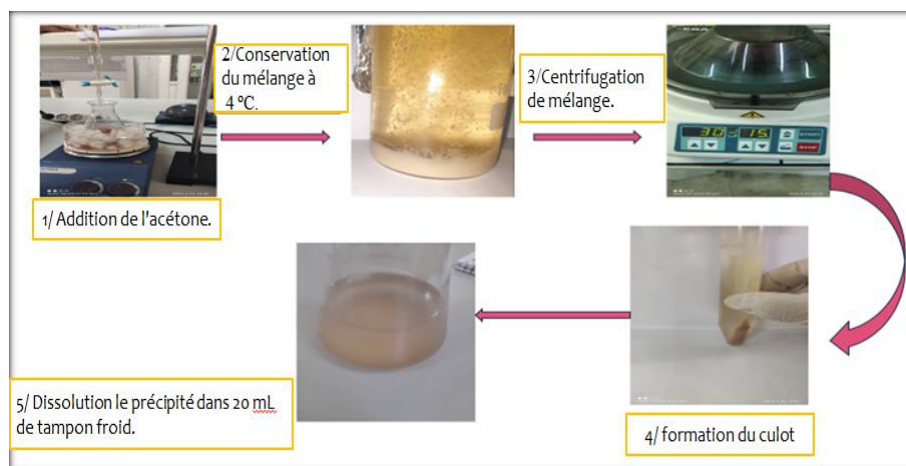


Figure III.5: Protocole expérimentale de purification de la peroxydase

III.3.2. Préparation des microparticules

La préparation de microparticules à base de chitosane peut être réalisée par différentes techniques, telles que l'évaporation de solvant par émulsification, le séchage par pulvérisation ou encore la gélification ionotropique. Le choix de la méthode dépend de plusieurs paramètres, notamment la taille souhaitée des particules, la stabilité thermique et chimique du système, ainsi que la toxicité potentielle des résidus.

Dans ce travail, la gélification ionotropique a été retenue comme méthode de préparation. Ce procédé doux et simple à mettre en œuvre en conditions de laboratoire permet la formation de micro/nanoparticules polymériques par interaction électrostatique entre un polymère cationique (le chitosane) et un polymère anionique (comme l'alginate), en présence d'un agent réticulant tel que le tripolyphosphate de sodium (TPP). Ce choix a été motivé par sa faisabilité expérimentale. Cette technique présente également l'avantage d'être adaptée à l'encapsulation de substances thermosensibles, telles que les enzymes, tout en conservant leur activité biologique. L'obtention des microparticules de chitosane généralement effectué par l'ajout d'un réticulant chimique comme glutaraldéhyde (réticulation covalente) qui est toxique. Pour résoudre ce problème, TPP est largement utilisé comme polyanion non toxique qui peut interagir avec le chitosane via des forces électrostatiques. Ainsi, le TPP est classé par la Food and Drug Administration (FDA) comme une substance généralement reconnue comme sûre (GRAS) (Generally Recognized As Safe) utilisé dans un vaste domaine d'applications (**Hassani et al., 2015**).

Dans ce contexte, deux types de microparticules ont été préparés par la méthode de gélification ionotropique, utilisant le chitosane (Cs) et l'alginate de sodium (ALG) comme polymères naturels. Ce procédé, basé sur la réticulation ionique par le tripolyphosphate de sodium (TPP), est couramment utilisé pour l'obtention de particules biocompatibles et biodégradables.

- Une première série de microparticules Cs/ALG a été préparée sans enzyme, en variant différents paramètres expérimentaux, afin d'identifier la formulation optimale pour une future immobilisation enzymatique.
- Une seconde série de microparticules (Cs/ALG/POD) a ensuite été élaborée en présence de la peroxydase.

Les étapes de formulation, incluant la préparation des solutions polymériques, les conditions d'encapsulation, ainsi que le protocole de réticulation, sont détaillées ci-après.

III.3.3. Préparation des solutions polymériques

❖ Solution de chitosane

La solution aqueuse de chitosane a été préparée en dissolvant une quantité précise de Cs (selon les concentrations souhaitées, tableau II.2) dans un volume déterminé d'acide acétique à 1 % (v/v). La dissolution a été effectuée sous agitation magnétique continue à 60 °C jusqu'à obtention d'une solution homogène, sans bulles d'air ni particules en suspension. La solution obtenue a ensuite été filtrée, puis laissée à reposer à température ambiante avant utilisation.

❖ Solution d'alginate

Une solution d'alginate de sodium a été préparée à une concentration massique de 1,5 % (m/v), en dissolvant la quantité appropriée de polymère dans de l'eau distillée sous agitation magnétique à température ambiante pendant environ deux heures, jusqu'à obtention d'une solution homogène et visqueuse. Afin d'assurer une hydratation complète des chaînes polysaccharidiques et éviter la formation de grumeaux, la solution a été maintenue sous agitation douce jusqu'à son utilisation.

❖ La solution de tripolyphosphate

D'un autre côté, la solution de réticulant ionique (TPP) est préparée par dissolution d'une quantité précise de TPP dans un volume d'eau distillée pour obtenir la concentration précédemment fixé.

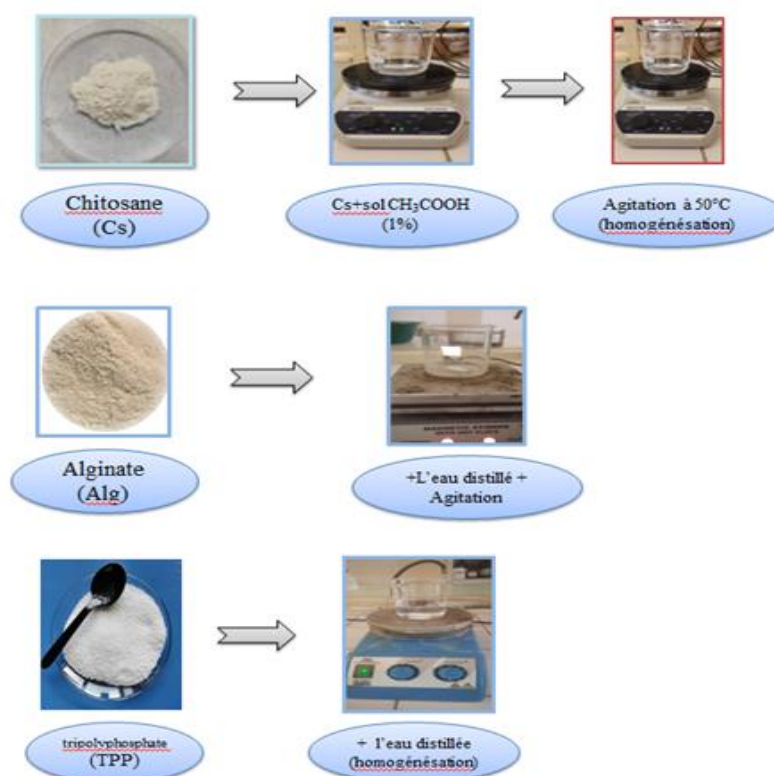


Figure III.6. Préparation des solutions de chitosane, d'alginate et de TPP

III.3.4. Formation des microparticules Cs/AlG

La formation des microparticules a été réalisée selon une méthode de gélification ionotrope en deux étapes. Dans un premier temps, la solution d'alginate a été ajoutée goutte à goutte à la solution de TPP, sous agitation douce pendant un temps déterminé (10 min), afin d'assurer une homogénéisation complète du mélange. Par la suite, la solution de chitosane a été transférée dans une seringue munie d'une aiguille de diamètre intérieur de 800 μm . L'ajout de la solution de chitosane s'est effectué goutte à goutte dans le bain de réticulation contenant le mélange TPP/alginate, sous agitation magnétique modérée (environ 100 rpm). La formation des microparticules s'est produite instantanément.

Les microparticules formées ont été récupérées par filtration, puis soigneusement lavées à plusieurs reprises avec de l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de TPP et les polymères non réticulés. Enfin, elles ont été séchées à température ambiante.

Les principaux paramètres expérimentaux étudiés dans ce protocole sont la concentration de chitosane et le rapport massique CS/TPP, deux facteurs clés influençant la taille et la stabilité colloïdale des microparticules formées.

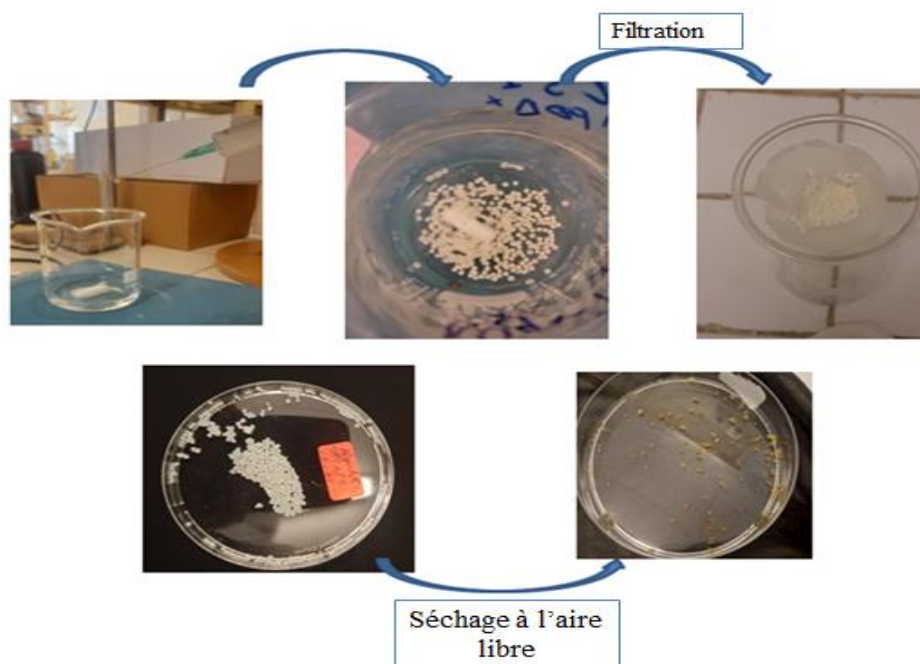


Figure III.7 : Préparation des microparticules Cs/ALG vides par gélification ionique.

III.3.5. Obtention des microparticules de Cs/ALG/POD

L'immobilisation de la peroxydase dans les microparticules de chitosane/alginate a été réalisée par un procédé de gélification ionotropique. Les microparticules Cs/ALG les plus stables et de meilleure qualité (en termes de diamètre, de sphéricité, etc.), obtenues précédemment, ont été sélectionnées pour l'immobilisation de l'enzyme.

Le protocole expérimental de préparation est similaire à celui décrit précédemment, avec quelques modifications, comme illustré dans la figure III.8. Un volume précis (2 mL) de la solution enzymatique de peroxydase a été ajouté initialement à la solution de chitosane sous agitation magnétique. Le mélange obtenu a ensuite été versé goutte à goutte dans un bain de réticulant TPP/alginate, puis laissé sous agitation pendant 30 minutes. La formation et la gélification des particules se produisent instantanément dans le bain de réticulation ionique. Après le temps d'immobilisation, la suspension a été filtrée, les particules ont été lavées, puis séchées à température ambiante.

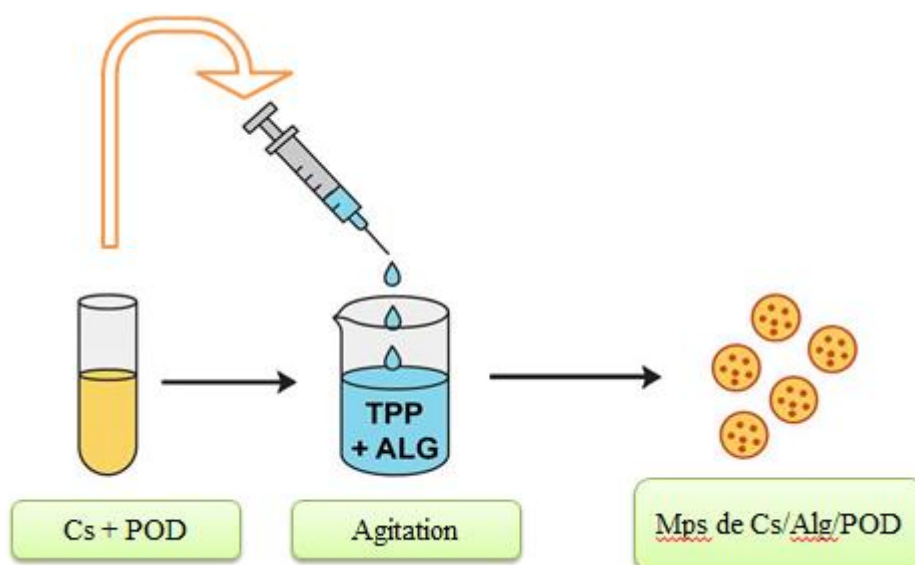


Figure III.8 : Illustration schématique de préparation des microparticules de Cs/ALG/POD par gélification ionotrope.

Dans cette partie, plusieurs essais ont été réalisés en s'appuyant sur des études antérieures. Divers paramètres ont été modifiés afin d'obtenir des perles les plus sphériques possible, et de préférence de taille micrométrique. L'influence de chaque paramètre a été étudiée en maintenant les autres constantes. Les essais préliminaires ont permis de définir une zone d'expérimentation qui servira de base à l'optimisation de la formulation.

Les microsphères de chitosane/alginate obtenues sont désignées par le code "MPs", tandis que les particules chargées en enzyme (Cs/ALG/POD) sont codées "MPE". Les conditions expérimentales retenues pour cette étude sont présentées dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Le plan expérimental utilisé pour la préparation des microparticules

Code	CS (%) (w/v)	Rapport massique Cs/TPP	ALG (%)	POD (mL)
CsA1	1	1 :1	1.5	//
CsA2		1 :1.5		
CsA3		1 :2		
CsA4	1.5	1.5 :1		
CsA5		1.5 :1.5		
CsA6		1.5 :2		
CsAP1	1.5	1.5 :1		2
CsAP2		1.5 :1.5		
CsAP3		1.5 :2		

Avec :

CsA : Microparticules CS/ALG;

CsAP : Microparticules CS/ALG/POD.

III.4. Méthodes de caractérisation physico-chimique

À la suite de l'extraction de la peroxydase à partir du radis rose et de la préparation des microparticules polymériques, une série d'analyses physico-chimiques a été effectuée afin de caractériser l'enzyme à l'état libre et après immobilisation. Une caractérisation physico-chimique des microparticules a également été réalisée, incluant notamment l'analyse FTIR, l'étude du taux de gonflement, ainsi que les tests de stabilité et de réutilisabilité de la peroxydase immobilisée.

III.4.1. Rendement de synthèse des microparticules

Le rendement de synthèse représente l'efficacité de la formation des microparticules à partir des matériaux initiaux. Il est calculé en comparant la masse de microparticules sèches obtenues après la synthèse, à la masse totale des polymères initialement utilisés (chitosane et alginate). Après la récupération des particules par filtration et leur séchage à température ambiante jusqu'à l'obtention d'un poids constant, le rendement de la synthèse des microparticules est calculé selon les équations suivante (équations III.1 ; III.2):

$$R_{MP} (\%) = \frac{\text{quantité de microparticules de Cs/ALG obtenues}}{\text{quantité totale de polymère utilisé}} \dots\dots\dots (III.1)$$

$$R_{MPE} (\%) = \frac{\text{quantité de microparticules de Cs/ALG/POD obtenues}}{\text{quantité totale de polymère+quantité de l'enzyme}} \dots\dots\dots (III.2)$$

Où : R_{MP} : Rendement de synthèse de microparticules de Cs/ALG.

R_{MPE} : Rendement de synthèse de microparticules Cs/ALG/POD.

III.4.2. Aspect macroscopique :

L'aspect macroscopique des microparticules (billes) obtenues est une observation visuelle; une caractéristique importante pour vérifier la taille, la forme, l'état de surface et la couleur des échantillons préparés (opaque ou transparent). Les particules préparées sont analysées à l'état humide et après séchage.

III.4.3. Aspect microscopique

Un nombre de 40 à 50 microparticules est observé au microscope optique à caméra, afin de mesurer leurs diamètres respectifs et calculer leur diamètre moyen. Après avoir étalé les microparticules soigneusement sur une lame de verre, nous les avons observées directement au microscope optique binoculaire après séchage.

III.4.4. Caractérisation structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La caractérisation structurale des microparticules a été réalisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Les échantillons analysés comprennent les matières premières (chitosane, alginate, TPP) ainsi que les microparticules vides (CS/Alg).

Les échantillons solides ont été préparés sous forme de pastilles de bromure de potassium (KBr), puis analysés à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR (Shimadzu

Corporation, Kyoto, Japon). Les spectres ont été enregistrés dans la gamme de 4000 à 400 cm^{-1} , avec une résolution de 4,0 cm^{-1} . L'analyse spectrale a permis d'identifier les bandes d'absorption caractéristiques des groupements fonctionnels présents dans chaque composant. La comparaison des spectres FTIR des microparticules avec ceux des polymères natifs a permis de mettre en évidence d'éventuelles interactions moléculaires, telles que les liaisons hydrogène ou les interactions électrostatiques, entre le chitosane, l'alginate, le TPP et l'enzyme. Ces variations spectrales confirment la formation de microparticules par gélification ionotrope et suggèrent le succès de l'immobilisation enzymatique.

III.4.5. Spectrophotométrie UV-visible

La technique de spectrophotométrie est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible qui correspondent aux transitions électroniques. Un spectromètre est un appareil qui permet d'effectuer une mesure spectrométrique de l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution à condition de se placer à la longueur d'onde (λ_{max}) à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux. C'est pourquoi la longueur d'onde est réglée en fonction de la substance dont on veut connaître la concentration. La spectrophotométrie UV-Visible a été utilisée comme méthode analytique pour le suivi de l'activité enzymatique de la peroxydase libre et immobilisée. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un lecteur de microplaques de type ELISA, permettant l'enregistrement rapide et précis de l'absorbance dans des puits de microplaque à 96 alvéoles. Cette technique permet : la réalisation des courbes d'étalonnage, le dosage des protéines et la mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase (libre et immobilisée).

III.4.6. Étude du pouvoir de gonflement des microparticules

Le gonflement est l'une des caractéristiques les plus importantes des particules polymériques. Il peut être expliqué par la pénétration graduelle de l'eau dans la matrice polymère. L'étude de gonflement de systèmes particulière dans des solutions aqueuses a été imposée en raison de leur utilisation potentielle comme supports. Il est bien connu que la capacité de chargement et de libération d'un principe biologiquement actif est influencée par le degré de gonflement. La méthode utilisée pour déterminer le taux de gonflement (Q) est la méthode gravimétrique (pesée). L'étude de gonflement a été réalisée en milieu aqueux

légèrement basique (PBS, pH = 7,4), qui simule les conditions physiologiques et en milieu légèrement acide de pH=5,5; selon le protocole expérimental suivant :

Une quantité spécifique (30 mg) de particules synthétisées a été pesée et immergée dans un tube contenant la solution aqueuse (pH=7,4 ou pH=5,5). La suspension formée a été maintenue sous légère agitation magnétique pendant 24 heures. A des intervalles de temps précis, la suspension a été centrifugée, le surnageant a été retiré, l'excès de liquide et les traces d'eau sur les parois du tube ont été éliminés par tamponnage soigneusement avec du papier filtre et l'échantillon gonflé a été pesés. Le processus de gonflement a été surveillé à différents intervalles jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Les microparticules séchées et gonflées ont été pesées avec une précision de $\pm 0,0001\text{g}$ sur une microbalance électronique. Le pourcentage de taux de gonflement (Q%) a été exprimé comme le rapport de la différence de masse de l'échantillon à l'état gonflé et sa masse à l'état sec sur la masse de l'échantillon à l'état sec selon l'équation suivante:

$$Q (\%) = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots(\text{III.3})$$

Où: m_0 : la masse initiale de l'échantillon séché (mg);

m_1 : la masse de l'échantillon gonflé (mg).

Cette étude a permis d'identifier les formulations de microparticules présentant une bonne capacité de gonflement, gage d'une porosité et d'une accessibilité favorables à l'immobilisation enzymatique. Ainsi, les particules affichant le meilleur profil de gonflement dans les deux milieux testés ont été retenues pour la suite du travail, à savoir l'immobilisation de la peroxydase.

Préparation des solutions tampons: Les solutions tampons à différents pH sont préparées dans laboratoire à partir de mélanges d'acide faible et basique.

- **Tampon phosphate : pH=7,4**

Pour préparer la solution aqueuse de pH=7,4, on mélange 0,8g de NaCl , 0,2g KCl, 63g Na_2HPO_4 et 0,24g K_2PO_4 dans 800ml l'eau distillée sous agitation magnétique jusqu'à homogénéisation et on ajuste le pH à l'aide d'un pH mètre pour une valeur de pH = 7,4.

- **Tampon acétate : pH=5,5** Préparer une solution de di-hydrogénophosphate de sodium (soit 9,08 g de NaH_2PO_4 par litre) et une solution de di-sodium hydrogénophosphate (9,47 g de Na_2HPO_4 par litre). 10 ml de Na_2HPO_4 mélangé avec 190 ml de NaH_2PO_4 et on ajuste le pH à 5,5.

III.4.7. Dosage des protéines de la POD libre et immobilisée

La concentration en protéines totales, dans les extraits enzymatiques libres et dans les microparticules contenant la peroxydase immobilisée, a été déterminée selon la méthode de Lowry (**Lowry et al., 1951**), une méthode colorimétrique de référence basée sur la réaction des acides aminés aromatiques avec un complexe cuivrique et le réactif de Folin-Ciocalteu.

Principe de la méthode de Lowry

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la méthode de Lowry, qui repose sur deux réactions successives. Dans un premier temps, les protéines réagissent avec un complexe cuivrique en milieu alcalin (réaction de Biuret), formant un complexe cuivre-protéine. Ensuite, l'ajout du réactif de Folin-Ciocalteu (composé de tungstate et de molybdate en milieu acide) induit une réduction par les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane), entraînant la formation d'un complexe coloré bleu foncé. L'intensité de cette coloration, proportionnelle à la concentration en protéines, est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm (**Lowry et al., 1951**).

➤ Préparation des réactifs

- **Réactif A** : 2 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3) et 0,4 g de soude (NaOH) dissous dans 100 mL d'eau distillée.
- **Réactif B** : mélange de 2 mL de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, à 0,5 % p/v) et 2 mL de tartrate double de sodium et potassium (2 % p/v).
- **Réactif C** : solution de travail obtenue en ajoutant 2 mL de réactif B à 50 mL de réactif A (réactif de Lowry).
- **Réactif D** : solution de Folin-Ciocalteu (2N) diluée au 1:1 avec de l'eau distillée juste avant utilisation.

➤ Préparation de la gamme étalon

Pour l'établissement de la courbe standard permettant le dosage des protéines par la méthode de Lowry, une solution mère de BSA (albumine sérique bovine), à une concentration de 1 mg/mL, a été utilisée comme protéine standard. Des dilutions successives ont été réalisées à partir de cette solution mère, en utilisant un tampon phosphate (Ph 7) comme solvant de dilution. Cette méthode repose sur la relation $C_1=1/2C_0$, ce qui permet d'obtenir une série de concentrations décroissantes, utiles pour tracer une courbe d'étalonnage linéaire. Les différentes concentrations de la gamme obtenue sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau III.4: Gamme étalon de BSA

Tube	BSA (μL)	Tampon (μL)	[BSA] finale (mg/mL)
0	0	500	0
1	500	500	0.5
2	500(du tube 1)	500	0.25
3	500(du tube2)	500	0.125
4	500(du tube3)	500	0.0625
5	500(du tube 4)	500	0,03125
6	500(du tube 5)	500	0,015625

Pour le dosage des protéines de la peroxydase libre et immobilisée, les étapes suivantes ont été réalisées :

1. Prélever 300 μL de l'échantillon enzymatique.
2. Ajouter 2,1 mL du réactif C (réactif de Lowry), homogénéiser, puis laisser reposer pendant 10 minutes à température ambiante.
3. Ajouter ensuite 600 μL du réactif D (Folin-Ciocalteu dilué), mélanger immédiatement.
4. Incuber les tubes pendant 30 minutes à l'obscurité.
5. Après incubation, homogénéiser à nouveau rapidement, puis mesurer l'absorbance à 750 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

La concentration en protéines totales a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec la gamme standard de BSA.

III.4.8. Efficacité d'immobilisation enzymatique

L'efficacité de l'immobilisation enzymatique représente la proportion de l'enzyme initialement introduite qui a été retenue dans la matrice polymérique. Dans notre étude, la quantité de peroxydase immobilisée dans les microparticules a été déterminée par une méthode indirecte, fondée sur la différence entre la quantité initiale de protéines et la quantité restante dans le surnageant après encapsulation. Cette méthode repose également sur le dosage colorimétrique selon Lowry, déjà décrit dans la section précédente.

a) Protocole de dosage indirect

1. Après l'étape d'immobilisation, les microparticules ont été séparées du milieu réactionnel par filtration.

2. Le surnageant recueilli a été analysé pour déterminer la concentration en protéines non immobilisées (libres dans la solution).
3. L'échantillon a été traité selon le protocole de Lowry :
 - 300 µL du surnageant ont été mélangés à 2,1 mL du réactif C (Lowry),
 - Incubation 10 minutes à température ambiante,
 - Ajout de 600 µL du réactif Folin-Ciocalteu dilué (réactif D),
 - Incubation 30 minutes à l'obscurité,
 - Lecture de l'absorbance à 750 nm.

La concentration en protéines non immobilisées a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage de la BSA (albumine sérique bovine).

b) Calcul de l'efficacité d'immobilisation

L'efficacité d'immobilisation enzymatique (EI) est ensuite calculée selon l'équation suivante :

$$EI (\%) = \frac{C_i - C_s}{C_i} \dots\dots\dots (III.4)$$

Où :

- C_i : la concentration initiale en protéines (mg/mL),
- C_s : la concentration en protéines dans le surnageant après immobilisation.

Cette méthode permet d'estimer avec fiabilité l'efficacité de rétention de l'enzyme par les microparticules, un paramètre crucial pour évaluer la performance du système d'immobilisation.

III.4.9. L'activité enzymatique de la peroxydase libre et immobilisé

L'activité enzymatique de peroxydase (POD), sous forme libre et immobilisée a été mesurée par la méthode colorimétrique en utilisant le protocole décrit par (**ponce et al., 2004**) en prenant le pyrogallol comme substrat et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme donneur d'hydrogène en présence de peroxydase de radis rose qui catalyse la réaction ; selon la réaction illustrée dans la figure III.9. Le suivi direct de la formation de purpurogallin à partir des substrats par spectrophotométrie est la méthode la plus utilisée pour mesurer l'activité de la POD.

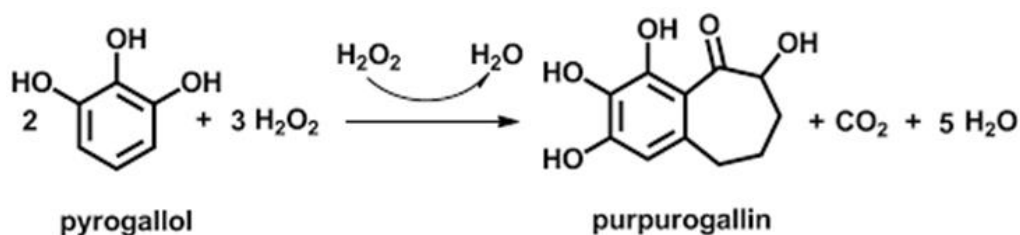


Figure III.9 : Réaction entre le pyrogallol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase

Le mélange réactionnel est préparé dans une cuve spectrophotométrique selon la composition suivante :

- 2,4 mL de tampon phosphate (pH 7,0)
- 250 μ L de solution de H_2O_2
- 250 μ L de solution de pyrogallol
- 100 μ L de solution enzymatique (POD libre)

Pour la **POD immobilisée**, le mélange réactionnel (1,5 mL) comprend :

- 1,2 mL de tampon phosphate (pH 7,0),
- 125 μ L de H_2O_2 ,
- 125 μ L de pyrogallol,
- 30 mg de microparticules contenant l'enzyme immobilisée.

La réaction est initiée par l'ajout de l'enzyme (libre ou sous forme de microparticules)

La réaction enzymatique est initiée par l'ajout de l'enzyme (libre ou immobilisée sous forme de microparticules) au mélange réactionnel. L'évolution de l'absorbance est ensuite suivie à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, avec des mesures enregistrées toutes les 30 secondes pendant une durée totale de 3 minutes. L'activité enzymatique est déterminée à partir de la pente de la courbe représentant l'absorbance en fonction du temps ($Abs = f(t)$), en se basant sur la portion linéaire de cette courbe.

➤ Calcul de l'activité enzymatique

La vitesse initiale est déterminée à partir de la pente de la portion linéaire initiale de la courbe obtenue. Ce principe a été utilisé pour l'évaluation de l'activité enzymatique (AE), permettant ainsi d'estimer l'activité peroxydasique des solutions enzymatiques.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité de peroxydase capable de transformer 1 μmol de peroxyde d'hydrogène par minute. Cette activité est calculée à partir de la relation suivante :

$$AE = \frac{\frac{dc}{dt} \times \text{volume de mélange réactionnel}}{\text{volume d'enzyme injectée}} \dots\dots\dots(III.5)$$

$$AE = \frac{(\Delta DO / \Delta t) \times V_m}{\epsilon \times V_e} \times 1000$$

Avec :

AE : l'activité enzymatique (U/mg)

ΔDO/Δt : pente de la courbe d'absorbance (abs/min),

Δt : intervalle de temps (min)

V_m: volume du mélange réactionnel (mL)

V_e : volume d'extrait enzymatique (mL)

ε : coefficient d'extinction molaire du produit oxydé (5440 L/ mol .cm)

1000 : facteur de conversion (L en mL).

III.4.10. Étude de la stabilité thermique de la peroxydase immobilisée

L'évaluation de la stabilité thermique constitue une étape essentielle dans la caractérisation d'un système enzymatique immobilisé. La capacité de l'enzyme à conserver son activité à des températures élevées est en effet un critère déterminant pour son utilisation dans des conditions opérationnelles contraignantes, notamment dans les domaines biomédical, pharmaceutique ou industriel. L'immobilisation enzymatique peut, selon la nature du support et les interactions enzyme/matrice, conférer une meilleure résistance thermique en limitant les phénomènes de dénaturation.

Dans ce contexte, la stabilité thermique de la peroxydase immobilisée a été évaluée en exposant les microparticules de la formulation CsAP1 à une température constante de 60 °C pendant différentes durées d'incubation (15, 30, 45 et 60 minutes). Pour ce faire, une masse fixe de microparticules contenant l'enzyme a été suspendue dans un volume défini de solution tampon (pH 7), puis incubée à 60 °C.

À chaque intervalle de temps, les microparticules ont été récupérées, lavées brièvement à l'eau distillée, puis soumises à un test d'activité enzymatique. L'activité résiduelle a été déterminée par mesure de l'absorbance à 420 nm après réaction avec le pyrogallol, dans les mêmes conditions que celles appliquées pour l'évaluation de l'activité initiale.

III.4.11. Test de réutilisation des microparticules à peroxydase immobilisée

La réutilisation des microparticules enzymatiques constitue un critère essentiel pour évaluer la durabilité et la rentabilité du système d'immobilisation, notamment dans les applications de biocatalyse ou de délivrance contrôlée. Elle permet d'estimer la stabilité opérationnelle de l'enzyme immobilisée au fil des cycles d'utilisation successifs.

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité des microparticules de chitosane/alginate, contenant la peroxydase immobilisée, à être réutilisées sur plusieurs cycles sans perte significative d'activité.

- Une masse de 30 mg de microparticules contenant la peroxydase immobilisée est incubée dans un mélange réactionnel composé de :
 - 1,2 mL de tampon phosphate (pH 7),
 - 125 µL de pyrogallol,
 - 125 µL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 5 minutes. À la fin de la réaction, les microparticules sont séparées du mélange réactionnel par filtration ou centrifugation, puis l'absorbance du surnageant est mesurée à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Ensuite, les microparticules sont soigneusement rincées à l'aide d'une solution tampon phosphate (pH 7) afin d'éliminer les résidus de substrats ou de produits.
- Le cycle est répété en réintroduisant les mêmes microparticules dans un nouveau mélange réactionnel frais. Ce protocole est appliqué sur 10 à 12 cycles consécutifs.
- L'activité résiduelle après chaque cycle est exprimée en pourcentage de l'activité initiale mesurée au premier cycle, ce qui permet d'apprécier la capacité de réutilisation et la stabilité de l'enzyme immobilisée.

III.5. Conclusion

Ce chapitre a présenté de manière détaillée l'ensemble des protocoles expérimentaux mis en œuvre dans le cadre de ce travail de recherche. Il a tout d'abord décrit les matériaux utilisés, ainsi que les différentes étapes liées à l'extraction et à la purification de la peroxydase à partir du radis rose. Ensuite, la préparation des microparticules polymériques à base de chitosane et d'alginate par gélification ionotropique a été expliquée, avec une attention particulière portée aux conditions de formulation et aux paramètres variables influençant leur structure.

L'ensemble des techniques de caractérisation physico-chimiques et fonctionnelles a été également exposé. Ces méthodes ont permis d'évaluer le rendement de synthèse, le taux de gonflement, la structure chimique (par FTIR), ainsi que les performances biologiques du système, notamment à travers le dosage des protéines, la détermination de l'activité enzymatique, et l'étude de l'effet du pH et de la température sur l'enzyme immobilisée. Enfin, des essais de réutilisation ont été réalisés pour estimer la stabilité et la robustesse des supports enzymatiques au fil des cycles.

Les protocoles présentés dans ce chapitre constituent la base expérimentale du travail et permettront, dans le chapitre suivant, d'analyser et de discuter les résultats obtenus en fonction des objectifs fixés.

Chapitre IV

IV.1. Introduction

Ce chapitre présente et discute les principaux résultats expérimentaux obtenus lors de l'élaboration des microparticules polymériques utilisées comme support d'immobilisation enzymatique. L'analyse porte sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des particules formulées, telles que le rendement de synthèse, le diamètre moyen, le comportement de gonflement, ainsi que la structure chimique étudiée..

La performance du système est également évaluée à travers l'étude de l'efficacité d'immobilisation de la peroxydase extraite du radis rose, comparée à son activité enzymatique à l'état libre. L'effet de l'immobilisation sur le comportement de l'enzyme, en fonction du pH, de la température et de la réutilisabilité, est aussi examiné.

L'interprétation détaillée de ces résultats permettra de juger la fiabilité et le potentiel du système développé pour des applications biotechnologiques.

IV.2. Obtention des microparticules de Cs/ALG par gélification ionotropique

Dans cette étude, des microparticules polymériques à base de chitosane et d'alginate ont été préparées selon la méthode de gélification ionotropique, une technique très simple, légère, utilisée couramment pour la préparation de particules de chitosane réticulées et un procédé doux et adapté à l'encapsulation de molécules bioactives sensibles telles que les enzymes. Les micro/nanoparticules obtenues par cette méthode sont synthétisées en milieu totalement aqueux ; c'est l'une des rares méthodes n'employant pas de solvant organique (**Correa et al., 2021**).

IV.2.1. Structure et mécanisme de formation des microparticules Cs/ALG

La structure des microparticules obtenues repose sur les propriétés réactives du chitosane (Cs), qui possède de nombreux groupements amine (-NH₂) et hydroxyle (-OH) le long de sa chaîne macromoléculaire. En milieu légèrement acide, les groupements amines du chitosane sont protonés en NH₃⁺, ce qui permet leur interaction électrostatique avec les anions des agents réticulants. Dans notre système, le Cs est gélifié dans un mélange contenant l'alginate (ALG) et le tripolyphosphate de sodium (TPP). Ce dernier, chargé négativement, interagit avec les charges positives du Cs pour former un réseau réticulé de microparticules (**Melo et al., 2020**). La gélification ionotropique induite par cette interaction permet la formation spontanée de microparticules, sans recours à des solvants organiques ou à des surfactants (**George et al., 2006**). L'alginate, lui aussi porteur de groupes carboxylates négatifs, peut renforcer la structure du réseau via des interactions électrostatiques complémentaires avec le chitosane, améliorant la

stabilité des particules (Goycoolea et al., 2009). Le mécanisme global de réticulation ionique est illustré dans la Figure IV.1.

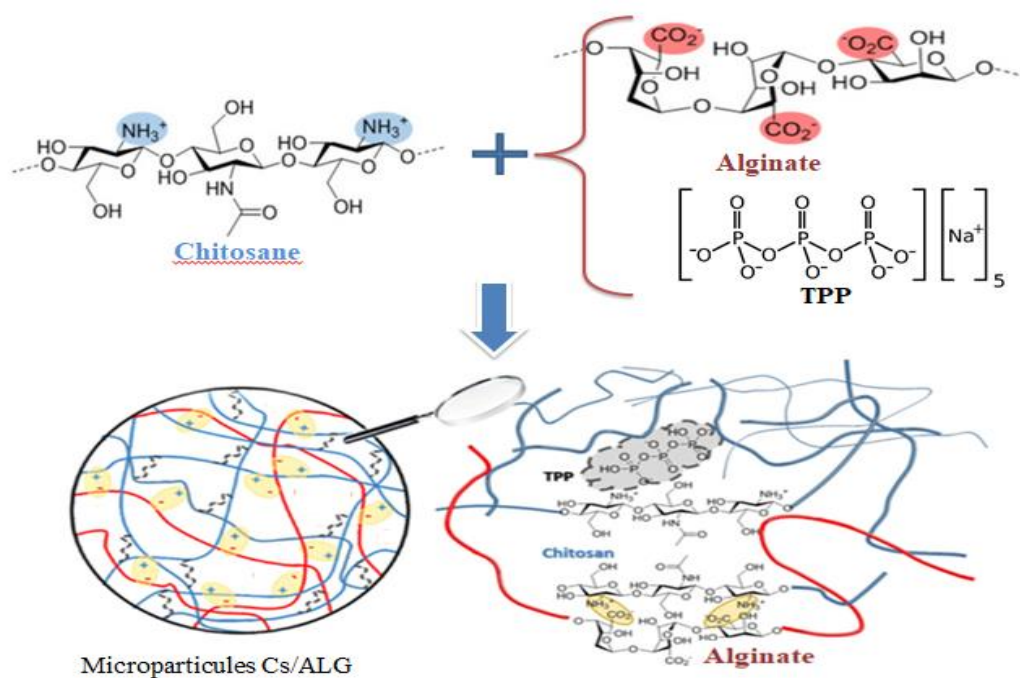


Figure IV.1 : Mécanisme réactionnel d'obtention des microparticules de Cs/ALG.

IV.3. Caractérisation des microparticules

IV.3.1. Caractérisation macroscopique et microscopique

Les microparticules obtenues ont été caractérisées d'un point de vue macroscopique et microscopique afin d'évaluer leur morphologie globale, leur régularité, ainsi que leur taille. L'observation visuelle a permis de juger de la couleur, de l'aspect sphérique et de l'homogénéité des particules, tandis que l'analyse au microscope optique a permis une estimation plus précise de leur taille moyenne.

Ces observations ont permis de sélectionner une plage de concentrations optimales des composants (chitosane, alginate et TPP), en se basant sur des critères prédéfinis tels que la forme sphérique régulière, la dispersion homogène, et la taille micrométrique des particules. Cette étape est cruciale pour déterminer le domaine expérimental dans lequel les formulations peuvent être affinées, dans l'objectif d'obtenir un système d'immobilisation enzymatique performant.

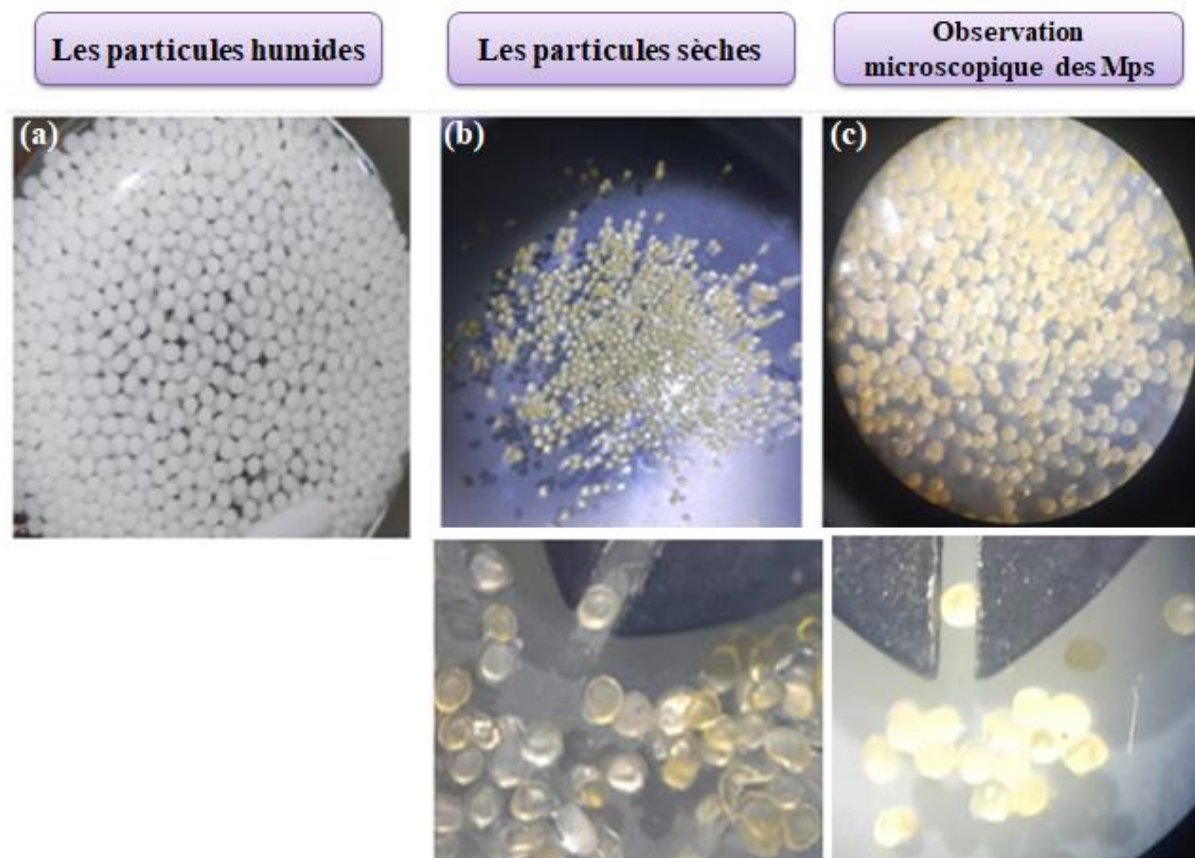


Figure IV.2 : Observation macroscopique et microscopique des microparticules à base de chitosane/alginate

L'observation macroscopique et microscopique des microparticules obtenues permet une première évaluation de la réussite du procédé de synthèse. La Figure IV.2 illustre les microparticules observées à différents états : hydraté, sec et au microscope optique.

L'image (a), correspondant aux particules humides juste après leur récupération, on observe une morphologie sphérique bien définie, avec une surface lisse et homogène. Leur gonflement indique une bonne hydratation de la matrice polymérique, traduisant une interaction efficace entre le chitosane, l'alginate et le TPP. Ces observations suggèrent la réussite du procédé de réticulation ionotropique.

Après séchage (b), les particules montrent une diminution notable de leur diamètre, accompagnée d'un léger jaunissement et d'un aspect brillant. Ces modifications sont caractéristiques d'un rétrécissement du réseau polymérique suite à la perte d'eau, et confirment le comportement typique des biopolymères hydrogels.

L'image microscopique (c) met en évidence une population de particules bien sphériques, non agglomérées, à la surface lisse et à la taille relativement homogène. Leur transparence partielle témoigne de la bonne dispersion des composants dans la matrice et confirme la qualité morphologique des microparticules obtenues.

IV.3.2. Rendement de production des particules de Cs/ALG

Le rendement de production constitue un paramètre fondamental pour évaluer l'efficacité du procédé de formulation des microparticules. Il correspond à la masse de particules sèches obtenues par rapport à la masse totale de biopolymères utilisés, exprimée en pourcentage. Ce paramètre reflète à la fois la stabilité du système, l'efficacité de la réticulation et la reproductibilité de la méthode.

Tableau IV.1 : Rendement de production des microsphères Cs/ALG

Échantillons	CsA1	CsA2	CsA3	CsA4	CsA5	CsA6
Rendement (%)	60	64	61	88	85	80

Dans notre étude, les rendements obtenus varient entre 60 % et 88 %, en fonction des concentrations relatives des polymères et du réticulant. Les formulations ayant un ratio Cs/TPP équilibré ont montré les rendements les plus élevés, suggérant une réticulation efficace et une meilleure récupération des particules. En revanche, les rendements les plus faibles peuvent être attribués à une réticulation incomplète, à des pertes lors du lavage ou du séchage, ou à la formation de particules fragiles ou agglomérées. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature, notamment celles rapportées par Melo et al (**Melo et al., 2020**), qui ont montré que le rendement dépend fortement du rapport entre le chitosane et l'agent réticulant, ainsi que des conditions de préparation (agitation, pH, temps de réaction).

IV.3.3. Taille des microparticules

La taille des microparticules constitue un paramètre fondamental influençant les propriétés physico-chimiques et la diffusion des molécules actives. Le diamètre moyen des microparticules obtenues a été mesuré par microscopie optique pour différentes formulations de chitosane et de TPP, en présence d'alginate à 1,5 %. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV.2. Diamètre moyen des microparticules Cs/ALG/TPP

Échantillons	ACs1	ACs 2	ACs 3	ACs 4	ACs 5	ACs 6
Diamètre moyen (μm)	380	350	300	550	510	470

Les diamètres mesurés varient entre 300 μm et 550 μm , en fonction des concentrations en chitosane (CS) et en agent réticulant (TPP). Plus précisément :

- Les particules préparées avec une faible concentration de chitosane (1%) présentent les plus petits diamètres ($\sim 300 \mu\text{m}$).
- Pour la concentration de Cs de 1,5%, le diamètre moyen des particules croît progressivement pour atteindre environ 550 μm . Cette augmentation est attribuée à la plus grande disponibilité de chaînes polymériques, ce qui favorise la formation de structures plus volumineuses.

En revanche, pour une concentration constante de chitosane, l'augmentation du pourcentage de TPP entraîne une réduction du diamètre des particules. Cela s'explique par une réticulation plus dense due à l'augmentation du nombre de liaisons ioniques entre les groupements NH_3^+ du chitosane et les groupements phosphate du TPP, ce qui compresse davantage la structure et donne lieu à des particules plus compactes et de plus petit diamètre.

Ces observations sont en accord avec les données rapportées par **Melo et al., (2020)** ; **Maestrelli et al., (2008)**, qui ont montré que la taille des particules de chitosane dépend fortement des paramètres de formulation, en particulier des rapports massiques Cs/TPP.

D'un autre côté, les valeurs de diamètre obtenues sont comparables à celles rapportées dans d'autres travaux utilisant le même procédé de gélification ionique pour la préparation de microparticules à base de chitosane et d'alginate. Par exemple, **Khoshnevisan et al., (2016)** ont obtenu des particules de taille comprise entre 300 et 600 μm , tandis que **Patil et al., (2012)** ont rapporté des dimensions similaires pour des formulations à base de Cs/ALG.

IV.3.4. Analyse FTIR des microparticules Cs/ALG

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée pour évaluer les interactions entre les différents composants du système microparticulaire. Le spectre du chitosane présente des bandes caractéristiques autour de 3400 cm^{-1} (vibrations d'élongation O–H et N–H), 2870 cm^{-1} (liaisons C–H), 1650 cm^{-1} (bande d'amide I) et 1590 cm^{-1} (bande d'amide II), correspondant aux vibrations de déformation du groupement amine.

L'alginate montre des bandes typiques à environ 1605 cm^{-1} et 1420 cm^{-1} , attribuées respectivement aux vibrations asymétriques et symétriques des groupements carboxylates ($-\text{COO}^-$).

Dans le spectre des microparticules Cs/ALG, aucun nouveau pic majeur n'apparaît, ce qui est cohérent avec la nature non covalente de la réticulation ionique. Cependant, des déplacements significatifs des bandes d'absorption des groupements amines (du chitosane) et carboxylates (de l'alginate) sont observés, ce qui traduit la formation d'interactions électrostatiques entre $-\text{NH}_3^+$ et $-\text{COO}^-$. De plus, des modifications d'intensité sont relevées dans la région $1250\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, associées aux groupements phosphates ($\text{P}=\text{O}$, $\text{P}-\text{O}$) du TPP, indiquant son implication dans la réticulation ionique du réseau polymérique. Ces résultats sont cohérents avec ceux de **Melo et al. (2020)** et **Rinaudo (2006)**, qui ont décrit des déplacements similaires dans des formulations réticulées par le TPP. Ces résultats confirment la réussite de la réticulation ionique entre les trois composants.

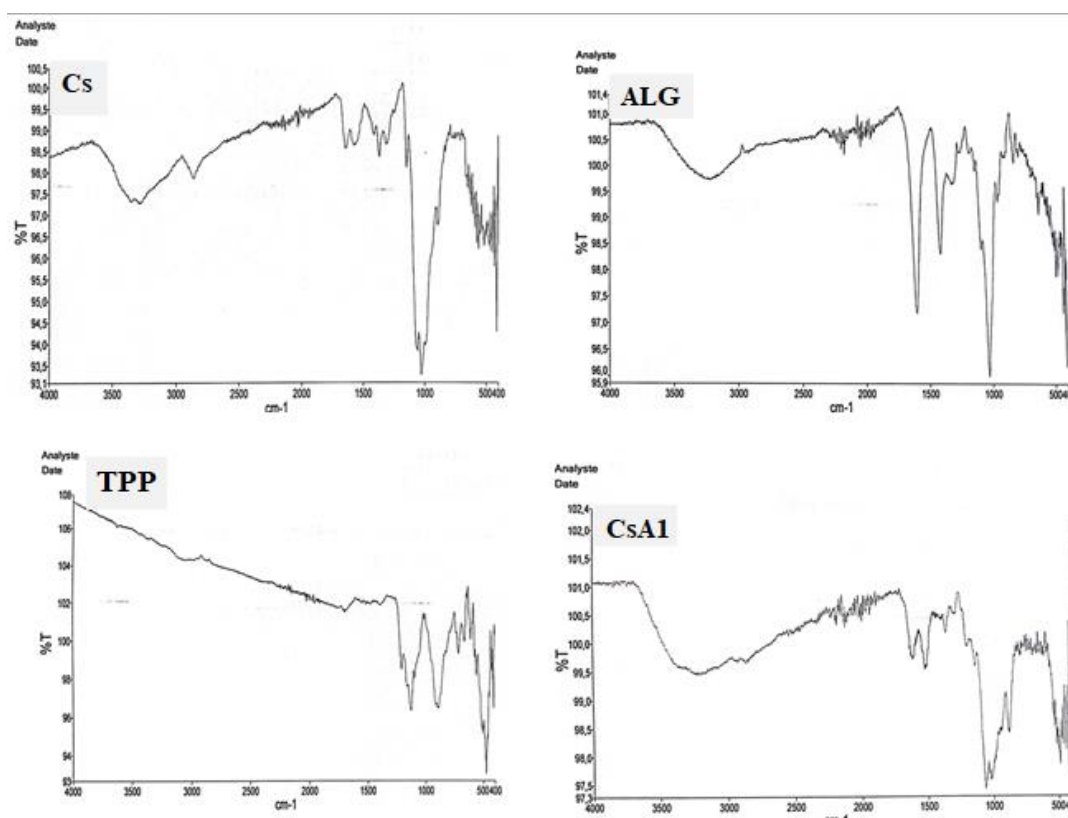


Figure IV.3. Spectre FTIR des microparticules CS/ALG.

IV.3.5. Étude de gonflement des microparticules de chitosane

L'étude de la capacité de gonflement des particules en milieu aqueux a été réalisée par la méthode gravimétrique. La capacité de rétention de l'eau dans les microparticules apparaît en principe à la présence des groupements hydrophiles, dans notre cas les groupements amine et

hydroxyl, des chaînes de polymères (Gulrez *et al.*, 2011). L'étude du comportement de gonflement des microparticules est essentielle pour évaluer leur stabilité structurale et leur aptitude à immobiliser des enzymes dans différents environnements. Dans notre cas, les particules Cs/ALG sont destinées à l'immobilisation de la peroxydase, une enzyme active dans des conditions physiologiques modérées. Deux milieux de pH ont été choisis : pH 5.5 (milieu acide simulé) et pH 7.4 (milieu physiologique). La cinétique de gonflement a été étudiée sur une période de 24 heures (temps d'équilibre) pour tous les échantillons.

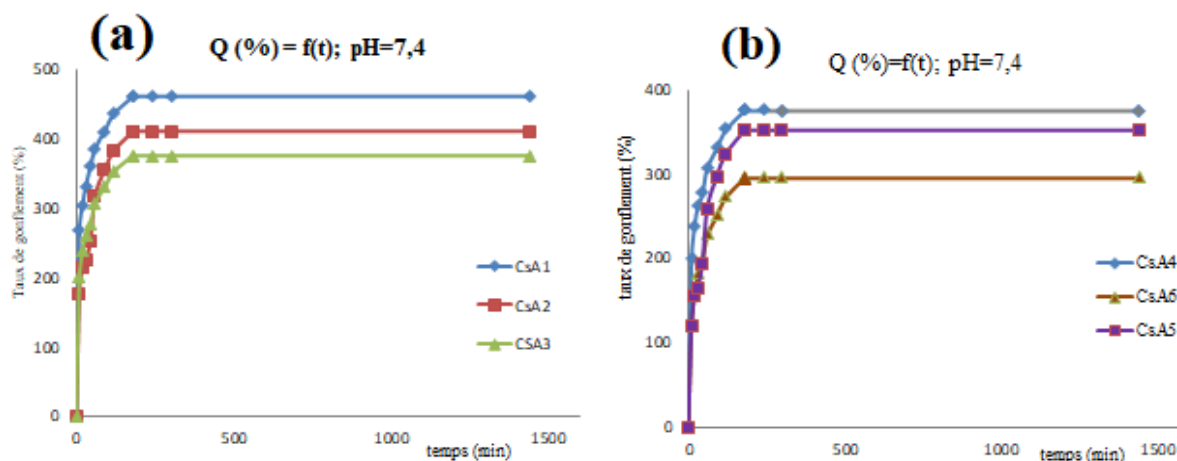


Figure IV.4 : La cinétique de gonflement des MPs Cs/ALG obtenues à différents rapport massique Cs/Tpp dans une solution aqueux de pH=7,4.

(a) Pour une concentration de Cs : 1% (b). Pour une concentration de Cs : 1,5%

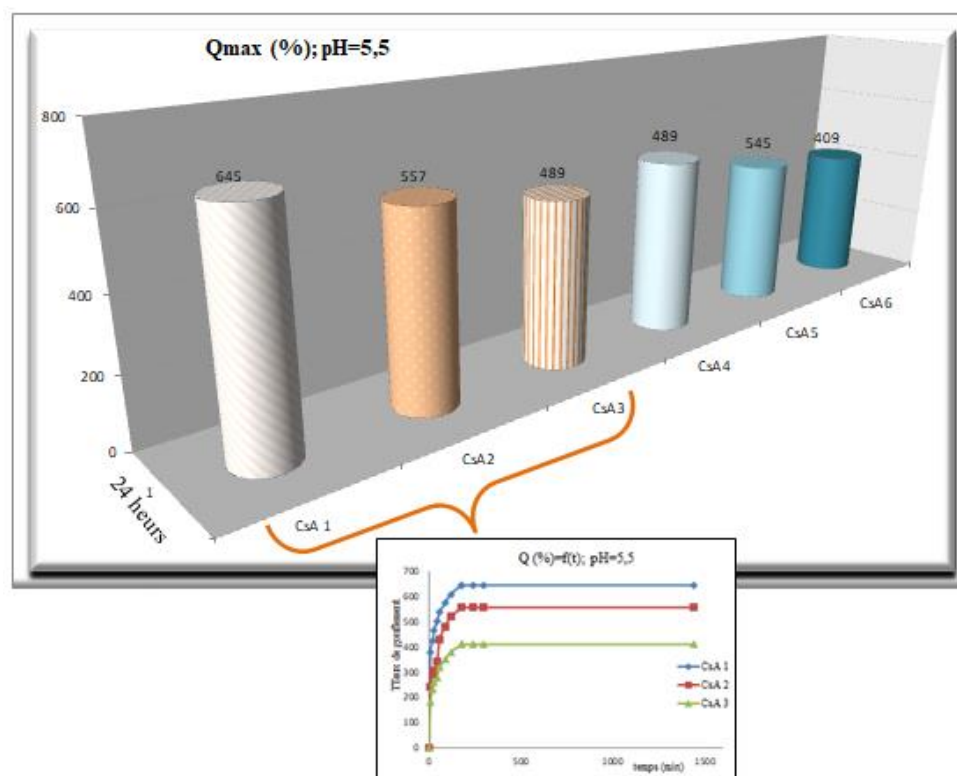


Figure IV.5 : Degré de gonflement maximum des microsphères de Cs/ALG dans une solution de pH=5,5

Les courbes cinétiques obtenues lors de l'étude de gonflement des microsphères de chitosane ont montré un profil identique comme présenté dans la figure IV.4 et la figure IV.5.

L'analyse des résultats illustrés dans ces figures, montre que les microsphères gonflent rapidement dans les premières minutes en raison de leur structure morphologique, suivie d'une augmentation lente durant environ 2 heures à 4 heures, puis un équilibre s'instaure, de sorte que le maximum est atteint au bout de 24 heures. Pour toutes les particules, la valeur maximale du taux de gonflement étant atteinte après deux heures environ, cela dû au caractère fortement hydrophile du chitosane.

Les résultats obtenus montrent que le taux de gonflement des microparticules à base de chitosane/alginate dépend fortement du pH du milieu et des conditions de formulation. À pH 5,5, le taux de gonflement varie entre 450 % et 650 %, tandis qu'à pH 7,4, il est plus faible, compris entre 350 % et 460 %. Cette différence s'explique par la nature polyélectrolytique du chitosane et de l'alginate, dont les charges ioniques réagissent différemment selon le pH.

À pH 5,5, proche du pKa du chitosane, les groupements amines ($-NH_2$) sont fortement protonés en $-NH_3^+$, ce qui augmente la répulsion électrostatique entre les chaînes de polymères et favorise l'absorption d'eau, conduisant à un gonflement plus important. De plus, l'alginate,

comportant des groupements carboxylates, reste partiellement ionisé à ce pH, contribuant également à l'extension du réseau polymérique.

En revanche, à pH 7,4, la déprotonation des amines du chitosane réduit les interactions hydrophiles et la répulsion électrostatique, ce qui diminue la capacité du réseau à absorber l'eau, limitant ainsi le gonflement.

Par ailleurs, le taux de gonflement est fortement influencé par les concentrations respectives de chitosane et de TPP. Une augmentation de la concentration en chitosane conduit à un réseau plus dense, réduisant la porosité et donc la capacité de gonflement. De même, un rapport massique élevé de CS/TPP (c'est-à-dire une augmentation de TPP) renforce la réticulation ionique, limitant davantage l'expansion du réseau polymérique. Ainsi, la densité de réticulation est un facteur déterminant dans la modulation du gonflement des microparticules. Le même comportement a été constaté par d'autres auteurs (**Moise *et al.*, 2012 ; Angadi *et al.*, 2010**).

Compte tenu des résultats de caractérisation, la concentration en chitosane de 1,5 % a été choisie pour l'immobilisation de la peroxydase. Cette formulation a montré un bon équilibre entre gonflement, stabilité et homogénéité des particules. Par rapport à une concentration de 1 %, les microparticules à 1,5 % sont mécaniquement plus solides, limitant ainsi les risques de dégradation ou de désagrégation lors des étapes de manipulation ou d'utilisation, ce qui est essentiel pour une immobilisation enzymatique efficace.

IV.4. Obtention des microparticules enzymatiques (CS/ALG/POD)

Les microparticules contenant la peroxydase ont été préparées par gélification ionotropique, selon le même protocole que pour les formulations précédentes. L'enzyme a été incorporée dans la solution de chitosane (1,5 %) avant réticulation dans le mélange alginate/TPP. Trois formulations de microparticules enzymatiques à base de chitosane/alginate/péroxydase ont été synthétisées en maintenant constante la concentration en chitosane (1,5 %), tout en faisant varier le rapport massique Cs/TPP. Ce procédé a permis d'obtenir des microparticules chargées en enzyme, destinées à l'étude de l'immobilisation.

Afin d'évaluer l'efficacité du système d'immobilisation, les microparticules CS/ALG/POD ont été soumises à différentes caractérisations, notamment le rendement de production, l'efficacité d'encapsulation de la peroxydase, ainsi que l'activité enzymatique après immobilisation.

IV.4.1. Caractérisation des microparticules de Cs/ALG/POD

Une première caractérisation manuelle (photo) des microparticules chargées par l'enzyme est illustrée dans la figure IV.6.

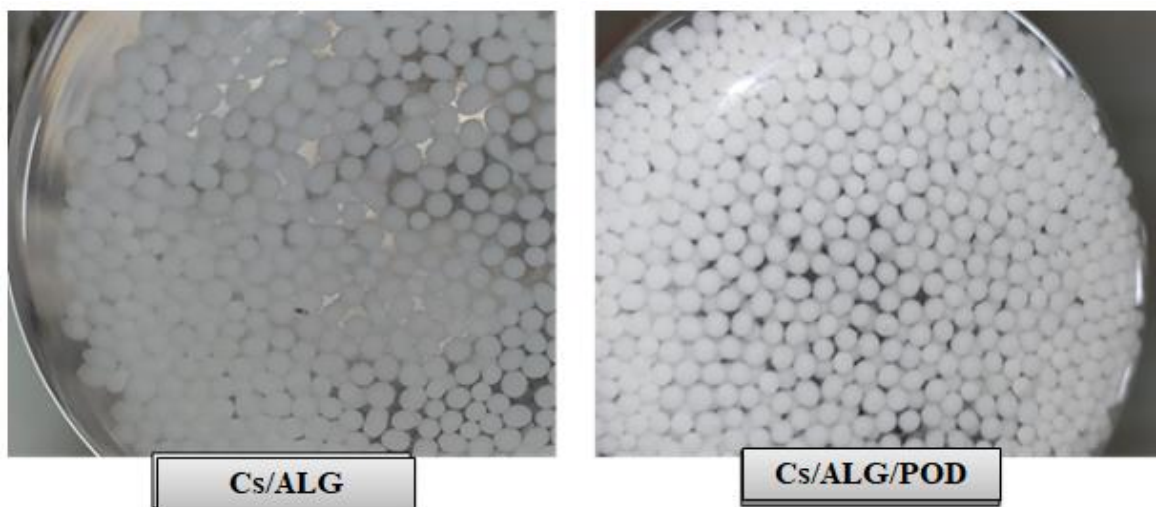


Figure IV. 6 : Photos des MPs de CS/ALG et de Cs/ALG/POD

Les observations visuelles ont montré que les microparticules contenant la peroxydase (CS/ALG/POD) présentaient une forme plus sphérique, une couleur plus blanche et un aspect plus solide par rapport aux particules sans enzyme. Ces caractéristiques suggèrent une meilleure cohésion de la matrice polymérique suite à l'incorporation de la peroxydase.

IV.4.2. Le rendement et la taille des particules de Cs/ALG/POD

La taille des microparticules, mesurée au microscope optique, est également influencée par le rapport Cs/TPP. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Rendement et diamètre moyen des MPs de CS/ALG/POD

Formulation	PCsA1	PCsA2	PCsA3
Rendement (%)	87	90	88
Diamètre moyen (μm)	600	570	500

Le rendement de préparation a été calculé pour chaque formulation. Il est resté élevé, entre 87 % et 90 %, témoignant de l'efficacité du procédé. Le diamètre moyen des microparticules, mesuré par microscopie optique, a montré une diminution progressive avec

l'augmentation de la concentration en TPP, ce qui peut s'expliquer par une réticulation plus dense limitant l'expansion de la structure polymérique.

Ces résultats indiquent que l'augmentation du taux de réticulation favorise la compaction de la structure, tout en conservant un bon rendement de synthèse.

IV.4.3. Étude de gonflement des microparticules enzymatiques

L'étude du gonflement des microparticules Cs/ALG/POD contenant la peroxydase (POD) a été réalisée à pH 7,4. Les résultats ont montré une très légère augmentation du taux de gonflement par rapport aux microparticules sans enzyme. Cette variation, bien que présente, n'est pas significative, ce qui indique que l'incorporation de la POD n'a pas modifié de manière notable la structure du réseau polymérique. Le gonflement reste principalement gouverné par la matrice formée entre le chitosane, l'alginate et le TPP. Cette légère hausse observée pourrait être due à une faible perturbation du réseau par l'enzyme, mais ne justifie pas une étude plus poussée à pH 5,5.

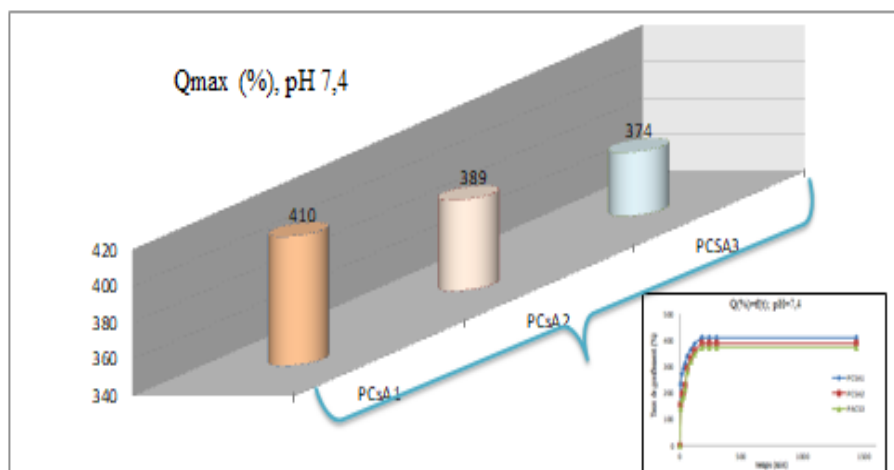


Figure IV.7. : Degré de gonflement maximum des microsphères de Cs/ALG/POD dans une solution de pH=7,4

La littérature confirme que l'ajout d'une enzyme (lipase, β -galactosidase) dans des matrices Cs/ALG n'a pas d'impact majeur sur la capacité de gonflement du support (**Alsarra et al (2002)** ; **Çevik et al., (2010)**). Ce constat est compatible avec nos observations : l'intégration de la peroxydase dans nos microparticules Cs/ALG provoque une légère augmentation du gonflement, mais ne remet pas en cause la structure du réseau polymérique et confirme la bonne compatibilité enzyme/support.

IV.4.4. Test d'immobilisation de peroxydase

L'immobilisation de la peroxydase a été vérifiée expérimentalement pour l'ensemble des échantillons de microparticules contenant l'enzyme, en les comparant à un témoin constitué de particules préparées sans enzyme. L'observation visuelle des résultats est illustrée à la Figure IV.8.

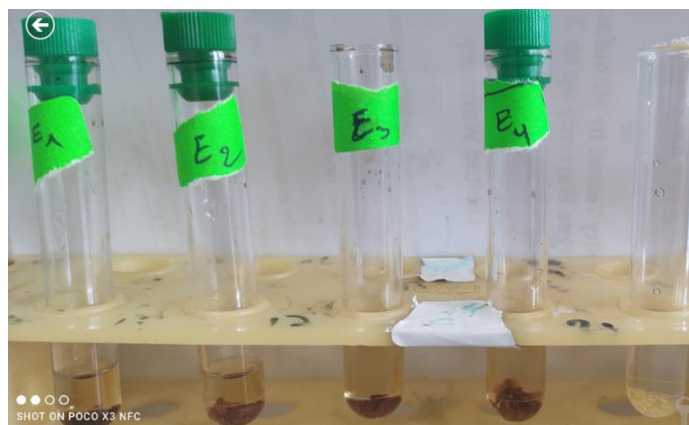


Figure IV.8 : Test d'immobilisation de la peroxydase

La photographie a été prise après 15 minutes de contact entre les microparticules et le mélange réactionnel (tampon, pyrogallol et peroxyde d'hydrogène). Aucun changement de couleur n'a été observé dans le tube témoin contenant des microparticules sans peroxydase, ce qui confirme l'absence d'activité enzymatique.

En revanche, un changement de couleur net a été observé dans les tubes contenant les microparticules Cs/ALG/POD, traduisant l'activité catalytique de la peroxydase immobilisée. Cette coloration témoigne de la présence effective de l'enzyme et du bon fonctionnement du système enzymatique incorporé dans la matrice polymérique à base de chitosane et d'alginate.

IV.5. Évaluation des propriétés enzymatiques

IV.5.1. Quantification des protéines dans la POD libre et immobilisée

La teneur en protéines totales a été déterminée aussi bien dans l'extrait de peroxydase libre que dans les microparticules enzymatiques, à l'aide de la méthode de Lowry. Cette analyse permet d'estimer indirectement la quantité de protéines effectivement retenue dans les microparticules après l'étape d'immobilisation, par comparaison avec la concentration initiale de l'extrait enzymatique.

La courbe d'étalonnage a été établie à partir de concentrations croissantes de sérum bovin albumine (SBA), utilisé comme protéine de référence. Une relation linéaire a été obtenue entre l'absorbance mesurée à 750 nm et la concentration en protéines, dans l'intervalle étudié. L'équation de régression obtenue est la suivante

$$\text{Abs}=0,5705C ; R^2= 0,9723$$

Où C représente la concentration en protéines exprimée en mg/mL. Cette équation a été utilisée pour déterminer la concentration des protéines dans les différents échantillons.

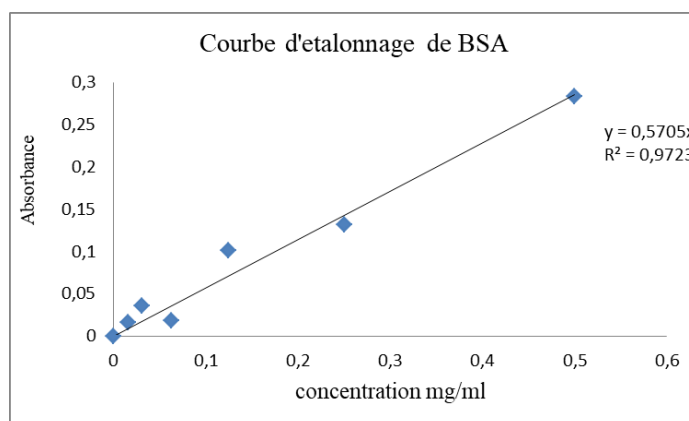


Figure IV.9 : Courbe d'étalonnage de BSA

La concentration en protéines de POD libre = 0,506 mg/ml, elle sera utilisée comme valeur de référence pour le calcul du rendement d'immobilisation après encapsulation dans les microparticules Cs/ALG.

IV.5.2. Efficacité d'immobilisation enzymatique

Le rendement d'immobilisation enzymatique a été évalué en comparant la concentration initiale en protéines (dans l'extrait de peroxydase) à la quantité de protéines non immobilisées, retrouvées dans le surnageant après encapsulation. En utilisant l'équation d'étalonnage mentionnée précédemment (BSA) pour déterminer la concentration de la protéine. L'efficacité d'immobilisation a été déterminée en appliquant la formule III.4 présentée dans le chapitre III

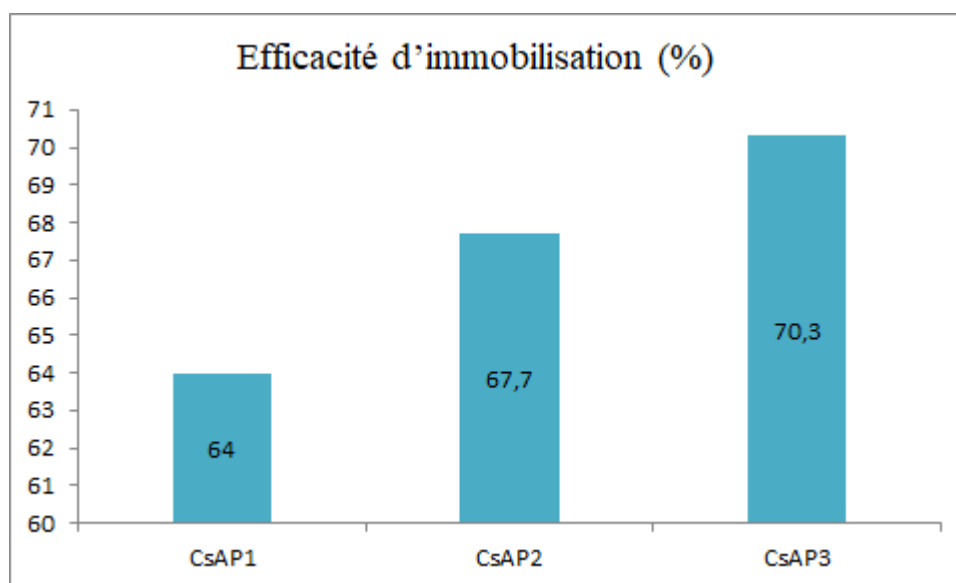


Figure IV. 10 : L'efficacité d'immobilisation de peroxydase dans les microparticules

Les résultats obtenus montrent une amélioration progressive de l'efficacité d'immobilisation enzymatique avec l'augmentation de la concentration en TPP utilisée lors de la formation des microparticules Cs/ALG. Cette évolution croissante du rendement est directement corrélée à l'augmentation de la concentration en TPP (tripolyphosphate de sodium) utilisée lors de la réticulation des microparticules de Cs/ALG. Le TPP joue un rôle crucial en tant qu'agent réticulant, en établissant des interactions électrostatiques entre ses groupements phosphates (chargés négativement) et les amines protonées ($-\text{NH}_3^+$) du chitosane. Une concentration plus élevée en TPP conduit à une réticulation plus dense du réseau polymérique, limitant les pertes d'enzyme par diffusion et améliorant ainsi le rendement d'immobilisation.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature, où des rendements compris entre 60 % et 80 % ont été observés pour des systèmes similaires à base de chitosane et TPP. Par exemple, Ma et al ont mis en évidence une amélioration significative de l'efficacité d'encapsulation enzymatique avec l'augmentation de la concentration en TPP, tout en soulignant qu'un excès peut réduire l'activité enzymatique immobilisée en raison d'un excès de rigidité de la matrice (Ma et al., 2021). Dans notre étude, les rendements obtenus restent dans une plage optimale, suggérant un bon équilibre entre la densité de réticulation et la préservation de l'enzyme.

IV.5.3. Activité enzymatique de la peroxydase libre

L'activité enzymatique de la peroxydase libre (POD) a été déterminée selon la procédure décrite dans le chapitre précédent (section III.4.9), en suivant la cinétique d'oxydation du

pyrogallol en présence de peroxyde d'hydrogène. L'activité a été calculée à partir de la pente initiale ($\Delta A/\text{min}$) et de l'équation (III.5).

$$AE_0 = 2,05 \text{ U/ml}$$

AE_0 : activité enzymatique de POD libre

Cette activité est en accord avec les données rapportées dans la littérature pour des extraits végétaux bruts ou partiellement purifiés de peroxydases. Par exemple, Ali et al ont obtenu une activité de 2,0 à 2,3 U/mL pour une peroxydase extraite de radis (Ali et al., 2020). D'autres études ont rapporté des activités comprises entre 1,5 et 2,2 U/mL pour des peroxydases extraites de radis blanc ou rose et purifiées par précipitation à l'acétone Bansal et al., 2018 ; Amin et al., 2020). Ces résultats confirment que notre extrait enzymatique est suffisamment actif pour être utilisée dans les étapes ultérieures d'immobilisation.

IV.5.4. L'activité enzymatique de POD immobilisée

Après avoir déterminé l'activité enzymatique de la peroxydase libre (POD), utilisée comme référence, l'évaluation a été étendue aux enzymes immobilisées dans les microparticules Cs/ALG (CsAP1, CsAP2 et CsAP3), afin d'apprécier l'effet de la réticulation ionique sur la conservation de l'activité enzymatique. Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'enzyme libre, permettant ainsi une comparaison directe de l'efficacité entre les différentes formes.

Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus pour chaque échantillon. L'activité enzymatique a été mesurée par spectrophotométrie à 420 nm en utilisant le pyrogallol comme substrat, à pH optimal. L'activité relative indique le pourcentage d'activité conservée après immobilisation, par rapport à l'enzyme libre.

Tableau IV.4 : L'activité enzymatique des microparticules enzymatiques

	POD	CsAP1	CsAP2	CsAP3
Activité (U/mL)	2,05	0,145	0,121	0,102
Activité relative (%)	100	8,06	6,72	5,67

Les résultats révèlent une diminution significative de l'activité enzymatique après immobilisation de la peroxydase dans les microparticules Cs/ALG. Alors que l'enzyme libre affiche une activité de 2,05 U/mL et les valeurs mesurées pour CsAP1, CsAP2 et CsAP3 sont

respectivement de 0,145, 0,121 et 0,102 U/mL. Cette perte d'activité est couramment observée dans les procédés d'immobilisation enzymatique, en raison de divers facteurs tels que la diffusion limitée du substrat, des changements de conformation de l'enzyme, ou encore des interactions électrostatiques entre l'enzyme et la matrice polymérique.

L'analyse de l'activité relative met en évidence une tendance décroissante allant de 8,06 % pour CsAP1 à 5,67 % pour CsAP3. Cela suggère que l'augmentation des concentrations de réticulant pourrait renforcer la densité du réseau matriciel, réduisant l'accessibilité du substrat au site actif de l'enzyme. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Amin et al. (2020)** et **Selim et al. (2022)**, qui ont montré que des matrices trop compactes réduisent l'efficacité des enzymes immobilisées. La formulation CsAP1 apparaît ainsi comme la plus performante en termes d'activité.

L'ensemble des données met en évidence la nécessité de trouver un compromis entre la stabilité du support et la préservation de l'activité enzymatique dans le cadre de l'immobilisation.

IV. 6. La stabilité thermique de POD immobilisée

La stabilité thermique de la peroxydase immobilisée dans la formulation CsAP1 a été évaluée à 60 °C en suivant l'évolution de l'absorbance à 420 nm à différents temps d'incubation. L'absorbance mesurée à 30 minutes (0,134) a été prise comme valeur de référence, correspondant à 100 % d'activité relative. La figure ci-dessous présente les données obtenues.

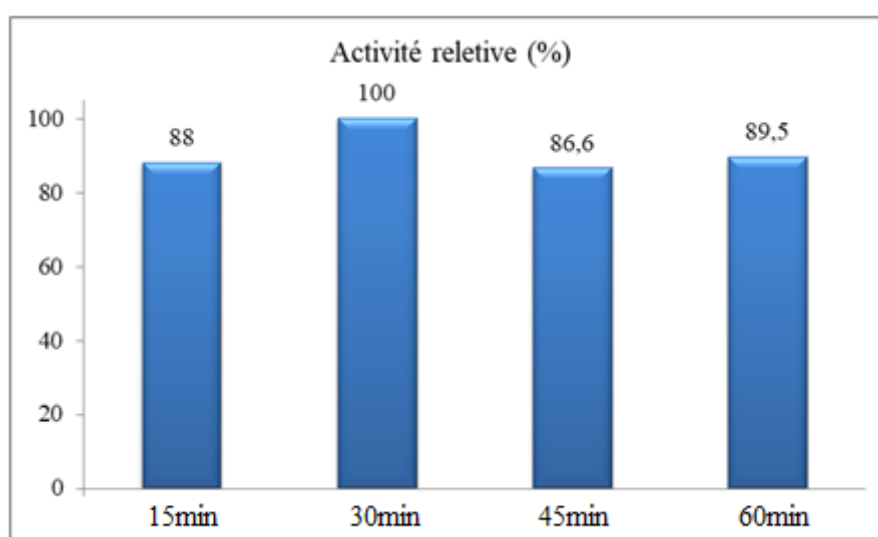


Figure IV.11. Activité relative de CsAP1 en fonction du temps d'incubation à 60 °C

Les résultats indiquent que l'enzyme conserve plus de 85 % de son activité catalytique tout au long de l'incubation thermique, sans signe de dénaturation significative. Cette stabilité témoigne du rôle protecteur de la matrice Cs/ALG, qui semble maintenir l'intégrité structurale de l'enzyme à 60 °C pendant une heure. Ce comportement est cohérent avec plusieurs études antérieures, notamment celles de Zdarta et al. (2018) et Wang et al. (2012), qui ont montré que l'immobilisation de la peroxydase dans des matrices à base de chitosane et d'alginate améliore considérablement sa stabilité thermique. Il est également bien établi que les enzymes libres, notamment les peroxydases, présentent une stabilité thermique limitée, ce qui constitue un frein majeur à leur utilisation dans des conditions de température modérément élevées.

La stabilité obtenue dans ce travail suggère que le système de microparticules Cs/ALG contenant la peroxydase (POD) présente un bon potentiel pour des applications futures en industrie pharmaceutique nécessitant des conditions thermiques modérées.

IV.7. Réutilisation de la peroxydase immobilisée

La réutilisation des enzymes immobilisées est un critère important pour évaluer la stabilité et l'efficacité du système. Dans ce travail, l'activité de la peroxydase immobilisée dans les microparticules Cs/ALG a été testée sur dix cycles d'utilisation successifs. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité relative, en comparant chaque cycle au cycle où l'activité était la plus élevée (cycle 2 = 100 %).

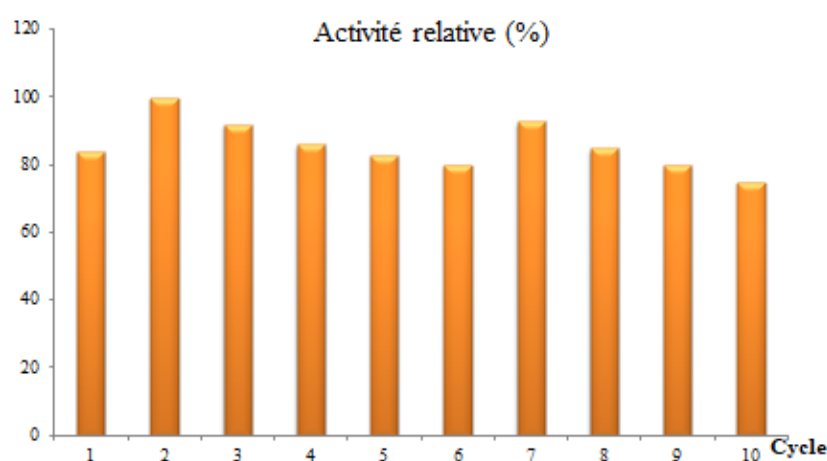


Figure IV.12 : Activité relative de la peroxydase immobilisée dans la formulation CsAP1 en fonction du nombre de cycles de réutilisation

Les résultats montrent que l'enzyme conserve une activité catalytique satisfaisante sur plusieurs cycles d'utilisation. Jusqu'au 7^e cycle, l'activité reste relativement stable, entre 80 et 90 %. Une diminution est observée à partir du 8^e cycle, mais l'activité reste supérieure à 70 %

jusqu'au 10^e cycle. Ces performances traduisent la fiabilité du système Cs/ALG, permettant la réutilisation de la peroxydase sans perte importante d'efficacité. Des études récentes confirment ces observations, notamment dans des systèmes similaires où l'immobilisation d'enzymes comme la catalase sur des matrices à base de chitosane ou de chitine a permis de conserver plus de 79 % d'activité après plusieurs cycles (**Weber et al., 2023**). Ces résultats sont encourageants pour des applications futures, en particulier dans le domaine pharmaceutique, où la stabilité et la réutilisabilité des biocatalyseurs sont des critères essentiels.

IV. 8. Conclusion

Ce chapitre a été consacré à l'application pratique du système d'immobilisation enzymatique développé à base de chitosane et d'alginate. Après avoir préparé et caractérisé différentes formulations de microparticules, l'immobilisation de la peroxydase extraite de radis rose a été réalisée avec succès. L'incorporation de l'enzyme dans la matrice polymérique a été confirmée par des tests d'activité enzymatique, mettant en évidence la rétention partielle de l'activité catalytique après encapsulation.

La réussite de cette étape confirme la faisabilité de l'utilisation du système Cs/ALG pour l'immobilisation enzymatique, ouvrant la voie à des perspectives d'applications dans les domaines biotechnologiques et pharmaceutiques.

Conclusions générales

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de recherche a permis de concevoir, de caractériser et d'évaluer un système innovant d'immobilisation enzymatique, élaboré à partir de microparticules polymériques à base de biopolymères naturels : le chitosane (CS) et l'alginate (ALG). Ces matériaux ont été choisis pour leurs propriétés remarquables de biocompatibilité, de biodégradabilité et de non-toxicité, qui les rendent particulièrement adaptés aux applications biomédicales.

Les microparticules ont été obtenues par gélification ionotropique douce à l'aide du tripolyphosphate (TPP), un réticulant non toxique, permettant d'encapsuler efficacement la peroxydase extraite de radis rose, choisie comme enzyme modèle. Deux séries de particules ont été développées : les microsphères vides (Cs/ALG) et celles chargées en enzyme (Cs/ALG/POD), qui ont fait l'objet d'une caractérisation approfondie.

Les résultats ont montré que :

- Les microparticules présentent une morphologie sphérique, régulière, avec des tailles micrométriques contrôlées selon les rapports Cs/TPP.
- Le gonflement dépend du pH et du degré de réticulation ; il est plus important en milieu acide (pH 5,5) et diminue avec l'augmentation du taux de TPP, ce qui influence la porosité et la stabilité.
- L'immobilisation enzymatique a été efficace, avec des rendements d'encapsulation compris entre 64% et 70%, confirmant la compatibilité du support avec la peroxydase.

C'est surtout l'analyse fonctionnelle du système enzymatique qui a confirmé sa fiabilité et son potentiel biotechnologique.

- L'activité enzymatique de la peroxydase encapsulée a été partiellement conservée, atteignant 8 % d'activité relative pour la formulation optimale (CsAP1), ce qui témoigne d'une bonne accessibilité du substrat au site actif.
- La stabilité thermique a été significativement améliorée : plus de 85 % de l'activité est conservée après 1 heure à 60 °C, démontrant le rôle protecteur du réseau polymérique.

➤ La réutilisabilité a révélé une activité stable sur au moins 7 cycles consécutifs, et supérieure à 70 % après 10 cycles, ce qui confirme la robustesse du système pour un usage prolongé.

Le système développé peut être envisagé comme une base technologique fiable pour surmonter plusieurs limites classiquement associées à l'utilisation des enzymes libres, notamment leur instabilité, leur faible réutilisabilité et leur sensibilité aux conditions opératoires. Il constitue ainsi une plateforme prometteuse pour le développement futur de biocatalyseurs performants, adaptés aux exigences croissantes des domaines pharmaceutique, industriel et environnemental.

Perspectives

Ce travail ouvre plusieurs voies de recherche prometteuses. Il serait intéressant de :

- ✓ Tester l'immobilisation d'autres enzymes pour valider la polyvalence du support Cs/ALG ;
- ✓ Étendre l'encapsulation à d'autres biomolécules actives (peptides, hormones, cellules) ;
- ✓ Développer des supports hybrides (organique/inorganique) sous forme de gels, films ou nanoparticules ;
- ✓ Intégrer ces systèmes dans des dispositifs fonctionnels comme des biocapteurs ou réacteurs enzymatiques ;
- ✓ Étudier plus en profondeur la cinétique, la stabilité à long terme et l'efficacité en conditions réelles.

Ces perspectives renforcent le potentiel du système comme plateforme pour des applications biotechnologiques avancées.

Références

bibliographiques

A

Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., & Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 521-530.

Ahmed, S., Annu, Ali, A., & Sheikh, J. (2018). A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 849-862.

Ali, M., et al. (2020). Radish peroxidase: Extraction, characterization and immobilization on biopolymers for dye degradation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101528.

Alloue Wazé, A. M., Aguedo, M., Destain, J., Ghalfi, H., Blecker, C., Wathelet, J.-P., & Thonart, P. (2008). Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société ET Environnement*, 12(1), 57-68

Alsarra, I. A., Hamed, A. Y., Alanazi, F. K., & Neau, S. H. (2002). Preparation and evaluation of chitosan beads for the sustained release of metronidazole. *AAPS PharmSciTech*, 3(1), 1-7.

Amin, M., et al. (2020). Purification and biochemical characterization of peroxidase from *Raphanus sativus L.* *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(6), 68-74.

Arthur, D. B. (2001). *Basic Principles of Textile Coloration.* Society of Dyers and Colourists.

Asadi, J., Ferguson, S., Raja, H., Hacker, C., Marius, P., & Ward, R. (2017). Structural analysis of microtubules under stress conditions. *Micron*, 99, 40-48.

A.S.A, Mohammed, Naveed, M., & Jost, N. (2021). Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (A review of current applications and upcoming potentialities). *Journal of Polymers and the Environment*, 29(8), 2359-2371.

Adeniyi, Rani D N., Abdrahman T,E .(2006).Kinetic study of a purified anionic peroxydase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel aplicationas time temperature indicator for food materials.*Journal of Food engineering*.

B

Baaziz, M., Qacif, N., Bendiab, K., & Aoud, A. (2006). Les peroxydases des plantes : Aspect théorique et application pratique. Communication présentée au Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc.

Bania, I. L. A., & Mahant, R. (2012). Evaluation of peroxidases from various plant sources. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(7), 1-3.

Bansal, P., et al. (2018). Isolation and partial purification of peroxidase from *Raphanus sativus* and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 2257-2263.

Barbosa, G. S. d. S., Oliveira, M. E. P. S., dos Santos, A. B. S., et al. (2020). Immobilization of low-cost alternative vegetable peroxidase (*Raphanus sativus L.* peroxidase): Choice of support/technique and characterization. *Molecules*, 25(16), 3668.

Benyahia, A., & Zouak, K. (2016). Étude comparative et caractérisation de quelques peroxydases: standard et extraites de plantes (p. 34). Université de Médéa.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2015). *Biochemistry (8th ed.).* W. H. Freeman and Company.

Bezerra, C. S., De Farias Lemos, C. M. G., De Sousa, M., & Gonçalves, L. R. B. (2015). Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes : Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(26), app.42125.

Bernal, C., Sierra, L., & Mesa, M. (2012). Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 84, 166-172.

Boukhouta, I. (2019). *Élaboration de microparticules chargées d'amoxicilline et de théophylline à partir de polymères biodégradables : Étude cinétique de leur libération [Thèse de doctorat, Université Djillali Liabès de Sidi Bel-Abbès].*

Biró, E., Németh, Á. S., Sisak, C., Feczko, T., Gyenis, J., & Bélafi-Bakó, K. (2008). Enzyme immobilization in membrane reactors: Possibilities and limits. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47(7), 1169–1174.

Bisswanger, H. (2014). *Enzyme kinetics: Principles and methods (3rd ed.). Wiley-VCH.*

C

Cánepa, C., Imperiale, J. C., Berini, C. A., Lewicki, M., Sosnik, A., & Biglione, M. M. (2017). Development of a drug delivery system based on chitosan nanoparticles for oral administration of interferon- α . *Biomacromolecules*, 18(10), 3302–3309.

Chatelet, C., Damour, O., & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22(3), 261–268.

Çevik, E., Dinçer, A., & Telefoncu, A. (2010). Immobilization of β -galactosidase on chitosan–alginate complex beads. *Food Chemistry*, 121(4), 1170–1174.

Chen, S., Gao, F., Wang, Q., Su, Z., & Ma, G. (2013). Double emulsion-templated microspheres with flow-through pores at micrometer scale. *Colloid and Polymer Science*, 291(1), 117–126.

Crini, G., Badot, P.-M., & Guibal, E. (2009). *Chitine et chitosane: Du biopolymère à l'application. Presses Universitaires de Franche-Comté.*

Cornish-Bowden, A. (2012). *Fundamentals of enzyme kinetics (4th ed.). Wiley-Blackwell.*

D

Deepthi, S., Venkatesan, J., Kim, S.-K., Bumgardner, J. D., & Jayakumar, R. (2016). An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1338–1353.

Dellali, K. Z., Rata, D. M., Popa, M., Djennad, M., Ouagued, A., & Gherghel, D. (2020). Antitumoral drug-loaded hybrid nanocapsules based on chitosan with potential effects in breast cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5659.

Duarte, M. A., Vázquez, M. A., Ortega-Tovar, B. E., García-Almendárez, B. E., & Regalado, C. (2002). Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L. var. purple top white globe) peroxidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(5), 489–496.

Dassanayake, S. R., Acharya, S., & Abidi, N. (2019). Biopolymer-based materials from polysaccharides: Properties, processing, characterization and sorption applications. In *Biopolymer-based materials from polysaccharides (Chapter)*. IntechOpen.

E

Étienne Delannoy., Philippe Marmey., Claude Penel & Michel Nicole.(2013). *Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Genève, Quai Ernest-Ansermet 30, CH-121, Genève 4* Published online: 27 Apr. 2013.

F

F. a. D. A. (FDA). (2013). U.S. Food and Drug Administration. GRAS notice – Shrimp-derived chitosan (GRN No. 443).

Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S. G., Lopez-Carrobles, N., Gorines, B. C., Virgen-Ortíz, J. J., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 18–25.

Fessner, W.-D., & Arroyo, M. (2024). Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective. *Chemical Engineering Journal*. Advance online publication.

Filho, M., Pessela, B. C. C., Mateo, C., Carrascosa, A. V., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2008). Immobilization–stabilization of a β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), 265–271

Frontiers in Environmental Engineering (2023). Immobilized cold-active enzymes onto magnetic chitosan microparticles as a highly stable and reusable carrier for *p*-xylene biodegradation in soil. *Frontiers in Environmental Engineering*, x(x), Article 1341816.

G

Gao, J., Wong, J. S. P., Hu, M., Li, W., & Li, R. K. Y. (2014). Facile preparation of hierarchically porous polymer microspheres for superhydrophobic coating. *Nanoscale*, 6(2), 1056–1063.

Gan, J., Iqbal, H. M. N., Show, P. L., & Bilal, M. (2024). Upgrading recalcitrant lignocellulosic biomass hydrolysis by immobilized cellulolytic enzyme-based nanobiocatalytic systems: A review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, 4485–4509.

Gan, J. S., Bagheri, A. R., Aramesh, N., & [co-authors]. (2024). Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials. *RSC Advances*, 14, 17 946–17 988.

Gadziński, P., Froelich, A., Jadach, B., Wojtyłko, M., Tatarek, A., Bialek, A., Kryzstofiak, J., Gackowski, M., Otto, F., & Osmałek, T. (2022). Iontropic gelation and chemical cross-linking as methods for **fabrication of modified-release gellan-gum-based drug delivery systems**. *Pharmaceutics*, 15(1), Article 108.

George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1–14.

Goycoolea, F. M., Lollo, G., Remuñán-López, C., & Quaglia, F. (2009). Chitosan–alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules*, 10(7), 1736–1743.

H

Hanfelfeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453–468.

Holy, N. R., Michel, P., & Dubois, P. (2006). Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 10(3), 185–196.

Hronská, H., Grosová, Z., & Rosenberg, M. (2009). Hydrolysis of lactose in milk by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized in polyvinyl alcohol gel. *Journal of Food and Nutrition Research*, 48, 87–91.

Huang, R., Cao, M., Guo, H., Qi, W., Su, R., & He, Z. (2014). Enhanced ethanol production from pomelo peel waste by integrated hydrothermal treatment, multi-enzyme formulation, and fed-batch operation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4643–4651.

Hassani, S., Laouini, A., Fessi, H., & Charcosset, C. (2015). Preparation of chitosan–TPP nanoparticles using microengineered membranes: Effect of parameters and encapsulation of tacrine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, 34–43.

I

Inanan, T. (2019). Chitosan co-polymeric nanostructures for catalase immobilization. *Reactive and Functional Polymers*, 135, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.12.004>

K

Kadri, T., Cuprys, A., Rouissi, T., Brar, S. K., Daghrrir, R., & Lauzon, J.-M. (2018). Nanoencapsulation and release study of enzymes from *Alcanivorax borkumensis* in chitosan-tripolyphosphate formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 1–10.

Khoshnevisan, K., et al. (2016). Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications in tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 146, 292–307.

Kołodziejka, M., Jankowska, K., Klak, M., & Wszola, M. (2021). Chitosan as an underrated polymer in modern tissue engineering. *Nanomaterials (Basel)*, 11(11), 3019.

Konovalova, I. N., Novikov, V. Y., Stepanova, N. V., & Reut, K. V. (2004). Recovery of lipids from aqueous dispersions with chitosan solutions. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 77, 254–259.

Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139.

Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8, 203–226.

L

Lajoinie, G., Gelderblom, E., Chlon, C., Böhmer, M., Steenbergen, W., de Jong, N., Manohar, S., & Versluis, M. (2014). Ultrafast vapourization dynamics of laser-activated polymeric microcapsules. *Nature Communications*, 5, Article 3671

Lavoinnie, A., & Bekri, S. (2008). Aide-mémoire de biochimie et biologie moléculaire (6e éd.). Flammarion Médecine-Sciences.

Leonida, M., Belbekhouche, S. F., Adams, F., Bijja, U. K., Choudhary, I., & Kumar, N. (2019). Enzyme nanovehicles: Histaminase and catalase delivered in nanoparticulate chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 557, 145–153.

Liu, X., Jin, X., & Ma, P. X. (2011). Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair. *Nature Materials*, 10, 398–406.

Liu, L., Gao, Q., Lu, X., & Zhou, H. (2016). In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(6), 673–683.

Li, Z., Zhang, Y., & Wang, Y. (2022). Recent progress on natural polymer-based biomaterials for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 409–424.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

M

Mahsa Ghasemi, (2009) .Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma [Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI].

Marouf, A., & Tremblin, G. (2009). *Abrégé de biochimie appliquée*. EDP Sciences.

Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2002). Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, 18(3), 629–634.

Masarudin, M. J., Cutts, S. M., Evison, B. J., Phillips, D. R., & Pigram, P. J. (2015). Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: Application to the passive encapsulation of [¹⁴C]-doxorubicin. *Nanotechnology Science and Applications*, 8, 67–80.

Ma, X., Zhang, Y., Wang, Z., & Liu, D. (2021). Enzyme immobilization in chitosan-based hydrogels: Influence of cross-linking density on activity and stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 623–630.

Melo, E. A., et al. (2020). Chitosan-based microparticles for drug delivery: A review on preparation techniques and drug release mechanisms. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116866.

Melo, E., et al. (2020). Development and characterization of chitosan/TPP microparticles for controlled release of bioactive compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 682–691.

Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358–1368.

N

Naghdī, M., Taheran, M., Brar, S. K., Kermanshahi-Pour, A., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2019). Fabrication of nanobiocatalyst using encapsulated laccase onto chitosan-nanobiochar composite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 530–536.

Navarro-López, D. E., Bautista-Ayala, A. R., Rosales-De la Cruz, M. F., Martínez-Beltrán, S., Rojas-Torres, D. E., Sánchez-Martínez, A., Ceballos-Sánchez, O., Jáuregui-Jáuregui, J. A., Lozano, L. M., Sepúlveda-Villegas, M., Tiwari, N., & López-Mena, E. R. (2023). Nanocatalytic performance of pectinase immobilized over in situ prepared magnetic nanoparticles. *Heliyon*, 9(8), e19021.

Nelson, J. M., & Griffin, E. G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38, 1109–1115.

P

Pandey, V. P., Rani, J., Jaiswal, N., Singh, S., Awasthi, M., Shasany, A. K., ... Dwivedi, U. N. (2017). Chitosan immobilized novel peroxidase from *Azadirachta indica*: Characterization and application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1713–1720.

Patil, S. B., et al. (2012). Alginate–chitosan beads for controlled release of bisphosphonate drugs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 635–642.

Petrila, L.-M., Grădinaru, V. R., Bucatariu, F., & Mihai, M. (2022). Polymer/Enzyme Composite Materials—Versatile Catalysts with Multiple Applications. *Chemistry*, 4(4), 1312–1338.

Pinot, F., & Hamounic, B. (2011, mai). La microencapsulation : Une technologie de choix pour la formulation d'actifs. *L'Actualité Chimique*, (352), 39–40. Société Chimique de France.

Ponce, A. G., del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2004). Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *LWT – Food Science and Technology*, 37(2), 199–204.

Pulingam, T., Foroozandeh, P., Chuah, J. A., & Sudesh, K. (2022). Exploring various techniques for the chemical and biological synthesis of polymeric nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*, 12(3), Article 576. <https://doi.org/10.3390/nano12030576>

R

Rani, D. N., & Abdrahman, T. E. (2006). Kinetic study of a purified anionic peroxidase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as time–temperature indicator for food materials. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 594–600.

Ribeiro de Farias, E. S., Silva de Farias, B. S., Cadaval Junior, T. R. S. A. C., de Almeida Pinto, L. A., & Diaz, P. S. (2021). Chitosan–based nanofibers for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1959–1970.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632.

Rohit, R. B., Riyaz, A. M., & Osmani, A. M. (2014). Review on natural polysaccharide-based particulate drug delivery systems: An inimitable tactic in novel drug delivery systems. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 5(4), 138–155.

Rocher, V (2008) : Synthèse et caractérisation de billes d'alginate magnétiques pour l'élimination de polluants organiques dans les effluents par séparation magnétique. Thèse de doctorat, université de Pierre et Marie Curie. France

Rouget, C. (1859). Des substances amylacées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine). *Comptes Rendus*, 48, 792

S

Sánchez-Cid, P., Moreno, A., & Díaz-Curiel, J. (2023). Recent advances in the biodegradability of natural polymers and their biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, Article 125132

Sacco, P., Pedroso-Santana, S., Kumar, Y., Joly, N., Martin, P., & Bocchetta, P. (2021). Ionotropic gelation of chitosan flat structures and potential applications. *Molecules*, 26(3), 660.

Sanchez Ramirez, J., Punia, P., Singh, L., Raj, A., & Singh, D. (2024). Evaluation of free and immobilized cellulase on chitosan-modified magnetic nanoparticles for saccharification of sorghum residue. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 47(5), 737–751.

Sharma, M., Kumar, V., & Pundir, C. S. (2008). Immobilization of onion peroxidase on silica-coated magnetic nanoparticles and its application in phenol determination. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 328–332.

Sharp, A. K., Kay, G., & Lilly, M. D. (1969). Kinetics of β -galactosidase attached to porous cellulose sheets. *Biotechnology and Bioengineering*, 11, 363–380.

Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*, 79, 1–27.

Staudinger, H. (1920). Über Polymerisation. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 53, 1073–1085.

Sulej, J., Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., Olszewska, A., Belcarz, A., & Piątek-Golda, W. (2023). Chitosan as a promising support of a CDH activity preservation system for biomedical and industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4535.

T

Thangaraj, B., & Solomon, P. R. (2019). Immobilization of lipases – A review. Part I: Enzyme immobilization. *ChemBioEng Reviews*, 6(2), 60–75.

Tadesse, M., & Liu, Y. (2025). Recent advances in enzyme immobilization: The role of artificial intelligence, novel nanomaterials, and dynamic carrier systems. *Catalysts*, 15(6), Article 571.

V

Vaghari, H., Gan, J. S., Bagheri, A. R., Aramesh, N., & co-auteurs. (2024). Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials. *RSC Advances*, 14, Article D4RA02939.

Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259.

Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2014). Chitosan for bone repair and regeneration. In M. E. G. Lyons (Ed.), *Bone substitute biomaterials* (pp. 244–260). Elsevier.

Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., & Haas, M. J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9(4–6), 113–148.

Vunain, E., Mishra, A. K., & Mamba, B. B. (2017). Fundamentals of chitosan for biomedical applications. In M. R. Aguilar & J. San Román (Eds.), *Chitosan based biomaterials Volume 1: Fundamentals* (pp. 3–30). Elsevier.

W

Wang, D., & Jiang, W. (2019). Preparation of chitosan-based nanoparticles for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1125–1132.

Wang, W., & Xu, D. (1994). Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(3), 149–152.

Wang, X. (2016). Emulsifying properties of chitosan and chitosan/gelatin complexes [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. Polytechnique Montréal Institutional Repository.

Wang, W. (2017). Recent advances in chemical modifications of chitosan and its derivatives: A review. *Carbohydrate Polymers*, 174, 979–998.

Wang, Y., Li, H., Zhang, X., & Chen, J. (2023). Extraction and characterization of peroxidase from *Raphanus sativus* for potential biotechnological applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(5), 1234–1243.

Weber, A. C., da Silva, B. E., Cordeiro, S. G., Henn, G. S., Costa, B., Dos Santos, J. S. H., Corbellini, V. A., Ethur, E. M., & Höhne, L. (2023). Immobilization of commercial horseradish peroxidase in calcium alginate–starch hybrid support and its application in the biodegradation of phenol red dye. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125723.

Y

Yin, Y., Chen, H., & Wang, Y. (2006). Preparation and characterization of macroporous chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 75A(4), 735–741.

Z

Zahirinejad, S., Hemmati, R., Homaei, A., Dinari, A., Hosseinkhani, S., Mohammadi, S., & Vianello, F. (2021). Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111774.

Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139–14194.