

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY

Université Badji Mokhtar-Annaba



جامعة باجي مختار - عنابة

Année 2011

Faculté des Sciences

Département de Chimie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de **MAGISTER**

**ECOLE DOCTORALE**

*Option : synthèse de molécules bioactives et matériaux organiques.*

Thème :

**Modélisation et optimisation des conditions d'immobilisation de la lipase de  
*Candida rugosa* sur Célite par RSM et réseaux de neurones**

**Par :**

*Mr. BELAFRIEKH Abderahmane*

**Directeur de mémoire :** Mr. Z. DJEGHABA Professeur Université Badji Mokhtar, Annaba

**Devant un jury:**

<b>Président :</b>	Mr. F. FERKOUS	Professeur	Université Badji Mokhtar, Annaba
<b>Examineurs :</b>	Mr. A. BOUKHARI	Professeur	Université Badji Mokhtar, Annaba
	Mr. F. HALAIMIA	M.C.A	Université Badji Mokhtar, Annaba
<b>Membre invitée:</b>	Mme. F. BENAMIA	M.C.B	Université Badji Mokhtar, Annaba



## Résumé

Ce travail est consacré à l'étude de l'effet des conditions d'immobilisation des enzymes sur leur énantiosélectivité.

Cette étude a été menée sur une réaction modèle, l'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle. Les facteurs influençant l'immobilisation de la lipase *Candida rugosa* (CRL) par adsorption sur Célite (temps, température, et rapport enzyme/support) ont été étudiés en utilisant deux méthodes différentes : la méthodologie de surface des réponses et les réseaux de neurones, la réponse étant l'énantiosélectivité de la CRL immobilisée. Les conditions optimales ont été localisées par maximisation de la réponse à l'aide du logiciel MINITAB pour les plans d'expériences et SAS pour les réseaux de neurones.

**Mots clés :** immobilisation, énantiosélectivité, plan d'expérience, réseaux de neurones, CRL.

## Abstract

This work is devoted to study the effect of the conditions of enzymes immobilization on their enantioselectivity.

This study was undertaken on a model reaction, the acylation of the racemic 1-phényléthanol by the vinyl acetate. The factors influencing the immobilization of lipase *Candida rugosa* (CRL) by adsorption on Célite (time, temperature, and enzyme/support ratio) were studied by using two different methods: response surface methodology and neural networks methodology, enantioselectivity of the immobilized CRL was used as response variable. The optimal conditions were located by maximization of the response using software MINITAB for the experimental designs and SAS for the neural networks.

**Key words:** immobilization, enantioselectivity, experimental design, neural networks, CRL.

## Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique Appliquée, groupe « Bioconversion et de Synthèse Organique », sous la direction de Monsieur Z.DJEGHABA Professeur à l'université de Annaba, que Je tiens à le exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir guidé tout au long de ce travail de recherche, pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des enzymes. Je le remercie chaleureusement pour son encadrement et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit.

Je remercie vivement Monsieur F.FERKOUS professeur à l'université de Annaba pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire de magister.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur A. BOUKHARI qui me fait l'honneur d'examiner ce travail et de faire partie du jury de ce mémoire.

Je remercie également Monsieur F. HALAIMIA Maitre de conférences à l'Université de Annaba, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

Je remercie également Madame F.BENAMIA docteur à l'université de Annaba pour sa gentillesse, son aide, sa disponibilité, son suivi quotidien de mes travaux et ses précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement Mr KRAIM Khaireddine et Mr SAIHI Youcef qui m'ont considéré comme leur frère, pour leur sympathie, leur aide, et leurs conseils quotidiens.

Je remercie également Madame S.BENOUIS et Mademoiselle S.BOUGHAGRA pour leur aide et leur encouragement.

Je suis également reconnaissant envers Madame BENI. Je la remercie pour le soutien et sa sympathie.

Je n'oublierai pas de remercier mes collègues du laboratoire Lazhar, Djamel et Saoussen. Je leur souhaite une bonne continuation.

Finalement, un merci chaleureux à mes chers parents qui ont toujours été présents par leur aide et leur encouragement.

## *Dédicace*

*A mes parents,*

*A mes frères,*

*A mes sœurs,*

*A mes amies,*

*A tous ceux qui me chers.*

# ***Sommaire***

# Sommaire

<b>Résumé.....</b>	<b>I</b>
<b>Remerciement.....</b>	<b>IV</b>
<b>Dédicace.....</b>	<b>VI</b>
<b>Sommaire.....</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>XI</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Première partie.....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre1. Les enzymes et leurs immobilisations.....</b>	<b>3</b>
1. Les enzymes.....	3
1.1. Introduction.....	3
1.2. Généralité.....	3
1.3. Principe de catalyse enzymatique.....	4
1.3.1. Diffusion des réactifs dans le milieu.....	4
1.3.2. reconnaissance enzyme substrat.....	4
1.3.3. mécanisme catalytique.....	4
1.3.4. Expulsion des produits.....	5
1.4. Les lipases.....	5
1.4.1. Caractéristiques structurales.....	6
a. Généralité.....	6
b. Sites actifs.....	7
1.4.2. Mécanisme d'action catalytique.....	8
1.5.L'énantiosélectivité.....	10
1.5.1. Détermination de l'énantiosélectivité.....	10
1.5.2. Analyse thermodynamique de l'énantiosélectivité.....	10

2. Immobilisation des enzymes.....	11
2.1. Introduction.....	11
2.2. Technique d'immobilisation.....	11
2.2.1. Immobilisation par liaison covalente.....	12
2.2.2. Immobilisation par réticulation et co-réticulation.....	13
2.2.3. Immobilisation par inclusion ou piégeage.....	14
2.2.4. Immobilisation par adsorption.....	14
2.3. Application des lipases immobilisées.....	15
2.3.1. Réaction d'hydrolyse.....	15
2.3.2. Réaction de synthèse.....	16
a. La transestérification.....	16
b. L'interestérification.....	16
c. La synthèse des esters.....	17
3. Conclusion.....	17
<b>Chapitre2. Les plans d'expériences.....</b>	<b>18</b>
1. Introduction.....	18
2. La démarche de planification expérimentale.....	18
3. Définitions.....	19
3.1. Objectifs.....	19
3.2. Réponse.....	19
3.3. Facteurs.....	19
3.4. Domaine expérimental.....	19
3.5. Matrice d'expérience.....	20
4. Choix du plan d'expérience.....	20
4.1. Les plans factoriels complets à deux niveaux.....	20
4.2. Les plans factoriels fractionnaires.....	22
4.3. Les plans de surface de réponse.....	22
4.3.1. Plans composites centrés.....	23
4.3.2. Plans de Box et Behnken.....	24
4.3.3. Plans hybrides.....	24
5. Analyse des résultats.....	25
5.1. Calcul des effets.....	25
5.2. Analyse des résultats des calculs.....	26

5.2.1. Graphique de comparaison des réponses mesurées et réponses estimées..	27
5.2.2. Résumée de la pertinence du modèle (qualité descriptive).....	27
5.3. La technique d'analyse de variance (ANOVA).....	28
5.3.1. Test de validation 1.....	28
5.3.2. Test de validation 2.....	29
5.4. Analyse graphique des résultats.....	31
5.5. Validation de l'hypothèse et recherche de solution au problème.....	31
6. Acquisition progressive des connaissances.....	32
7. Conclusion.....	33
<b>Chapitre3. Réseaux de neurones.....</b>	<b>34</b>
1. Introduction.....	34
2. Historique.....	34
3. Les réseaux de neurones.....	35
3.1. Les neurones biologiques.....	35
3.2. Principe du neurone artificiel.....	36
3.3. Définition.....	37
3.4. Architecture des réseaux de neurones.....	38
3.4.1. les réseaux de neurones non bouclés.....	39
3.4.2. les réseaux de neurones bouclés.....	39
4. Modélisation a l'aide de réseaux de neurones.....	40
4.1. Modèle « modèle boîte noire ».....	40
4.2. Modèle « modèle boîte grise » ou hybride.....	41
5. Conception d'un réseau de neurones.....	42
5.1. Détermination des entrées/sorties du réseau de neurones.....	42
5.2. Choix et préparation des échantillons.....	43
5.3. Elaborations de la structure du réseau.....	44
5.4. Apprentissage.....	44
5.5. Validation et tests.....	45
6. Conclusion.....	46

<b>Deuxième partie</b> .....	47
<b>Chapitre1. Résultats et discussion</b> .....	47
1. Présentation de l'étude de l'immobilisation de la CRL sur cébite.....	47
1.1. Description de l'étude.....	47
1.2. Objectif de l'étude.....	47
2. La Méthodologie des plans d'expérience.....	47
2.1.Détermination des réponses.....	48
2.2.Détermination des facteurs et domaine d'étude.....	48
2.3.Choix du Plan d'expérience.....	48
2.4.Principe de l'immobilisation et collecte des données.....	49
3. La méthodologie de surface de réponses .....	51
3.1.Traitement et analyse statistique des résultats.....	51
3.2.Equation du modèle mathématique.....	52
3.3.Analyse de la variance pour $E$ .....	52
3.4.Validation du modèle.....	53
3.5.Optimisation.....	54
4. Les réseaux de neurones.....	57
4.1. Choix des entrées/sorties du réseau de neurones.....	57
4.2. Construction de l'architecteur de réseau de neurones.....	58
4.3. Elaboration de la base d'apprentissage et de test.....	59
4.4. Validation du modèle.....	61
4.5. Optimisation.....	62
5. Vérification.....	64
6. Comparaison entre les deux méthodes (RSM et réseaux de neurones).....	64
7. Conclusion d'étude.....	66
<b>Conclusion générale</b> .....	68
<b>Chapitre2. Matériel et méthode</b> .....	70
<b>Bibliographie</b> .....	74

# Liste des figures

## Première partie

### Chapitre I

<b>Figure 1</b> : Structure tertiaire d'une protéine.....	4
<b>Figure 2</b> : Diagramme schématique du repliement des $\alpha/\beta$ hydrolases.....	6
<b>Figure 3</b> : Topologie des sites actifs de <i>C. rugosa</i> (CRL), <i>B. cepacia</i> (PCL) et <i>C. antarctica</i> -B (CALB).....	8
<b>Figure 4</b> : Mécanisme d'action catalytique des lipases.....	9
<b>Figure 5</b> : Diagrammes d'énergies d'une réaction énantiosélective catalysée par une enzyme.....	11
<b>Figure 6</b> : Immobilisation par liaison covalente.....	12
<b>Figure 7</b> : Immobilisation par réticulation.....	13
<b>Figure 8</b> : Immobilisation par co-réticulation.....	13
<b>Figure 9</b> : Immobilisation par Inclusion.....	14
<b>Figure 10</b> : Immobilisation par adsorption.....	15

### Chapitre II

<b>Figure 1</b> : Représentation du domaine d'étude pour un seul facteur.....	20
<b>Figure 2</b> : Répartition des points expérimentaux dans le domaine expérimentale.....	21
<b>Figure 3</b> : Plan composite pour deux facteurs.....	23
<b>Figure 4</b> : Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs.....	24
<b>Figure 5</b> : Illustration de l'effet de facteur 1.....	26
<b>Figure 6</b> : Illustration d'une interaction.....	26
<b>Figure 7</b> : Graphique de comparaison de réponse mesurée et estimée.....	27

<b>Figure 8</b> : Courbe d'iso- réponse et surface de réponses.....	31
---	----

### Chapitre III

<b>Figure 1</b> : Le neurone biologique.....	35
--	----

<b>Figure 2</b> : Neurone artificiel.....	36
---	----

<b>Figure 3</b> : Différents types de fonction de transfert pour le neurone artificiel.....	37
---	----

<b>Figure 4</b> : Réseau de neurones à n entrées, une couche de $N_c$ neurones cachés et $N_0$ neurones de sortie.....	39
--	----

<b>Figure 5</b> : Réseau de neurone bouclé.....	40
---	----

<b>Figure 6</b> : Diagramme schématique d'un modèle neuronal « boîte noire ».....	41
---	----

<b>Figure 7</b> : Diagramme schématique de modèle neuronal hybride d'une réaction chimique...42
---

<b>Figure 8</b> : Organigramme de conception d'un réseau de neurones.....	46
---	----

### Deuxième partie

#### Chapitre I

<b>Figure 1</b> : Représentation graphique des réponses calculées en fonction des réponses mesurées.....	54
--	----

<b>Figure 2</b> : Diagramme de contours présentant les effets des différents facteurs sur l'énantiosélectivité.....	56
---	----

<b>Figure 3</b> : Optimisation par la fonction Désirabilité.....	56
--	----

<b>Figure 4</b> . Modèle neuronal avec 3 entrées, 3 couches cachées et une sortie.....	59
--	----

<b>Figure 5</b> : la représentation graphique des sorties mesurées en fonction des sorties calculés.....	62
--	----

<b>Figure 6</b> : Diagrammes de surface présentant les effets des différentes entrées sur l'énantiosélectivité.....	63
---	----

<b>Figure 7</b> : Optimisation de l'énantiosélectivité par réseaux de neurones.....	64
---	----

## Liste des tableaux

### Première partie

#### Chapitre II

<b>Tableau 1</b> : matrice de réponse du plan factorielle $2^2$ .....	25
<b>Tableau 2</b> : Récapitulatif du test de validation 1.....	29
<b>Tableau 3</b> : Récapitulatif du test de validation 2.....	30

### Deuxième partie

#### Chapitre I

<b>Tableau 1</b> : Facteurs choisis et domaine d'étude.....	48
<b>Tableau 2</b> : Plan d'expérience pour l'étude de l'immobilisation de la CRL sur céélite.....	49
<b>Tableau 3</b> : Résultats du plan d'expérience.....	50
<b>Tableau 4</b> : Coefficients estimés pour $E$ .....	51
<b>Tableau 5</b> : Analyse de variance pour $E$ .....	52
<b>Tableau 6</b> : comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées.....	53
<b>Tableau 7</b> : la matrice d'apprentissage.....	58
<b>Tableau 8</b> : Elaboration de la base d'apprentissage.....	59
<b>Tableau 9</b> : Résultats d'apprentissage.....	60
<b>Tableau 10</b> : Résultats d'ajustement de meilleur modèle.....	60
<b>Tableau 11</b> : comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées.....	61
<b>Tableau 12</b> : Comparaison entre l'énantiosélectivité mesurée et prédite par RSM et ANN.....	65

## Symboles et abréviations :

R, S	Enantiomères <i>Rectus et Sinister</i>
ee	Excès énantiomérique
Rdt	Rendement
C	Conversion
E	Facteur de sélectivité
T°	Température
CALB	<i>Candida antractica</i> lipase B
CCL	<i>Candida cylindracea</i> lipase
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipase
RML	<i>RhizopusMiehi</i> lipase
SM	Somme des carrés
CM	Carrés moyens
F	Coefficient de Fisher
P	Coefficient de Probabilité
R <sup>2</sup>	Coefficient de détermination
RSM	méthodologie de surface de réponse
ANN	méthodologie de réseaux de neurones

# ***Introduction générale***

## Introduction générale

Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC.3.1.1.3), les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface lipide /eau [1]. Ces enzymes, présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides. Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acétyle d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que des amines ou des thiols.[2]

L'immobilisation d'enzymes, et en particulier les lipases, sur des supports solides, est à l'origine d'un grand nombre d'applications dans les domaines biomédical, environnemental et industriel. Lorsqu'elles sont utilisées en tant que biocatalyseurs, par exemple pour la production de molécules chirales (chimie, pharmacie) ou pour la transformation de produits naturels (agroalimentaire), il est indispensable, au plan économique, de prolonger la durée d'utilisation des enzymes. Leur immobilisation sur support solide permet généralement d'augmenter leur stabilité au cours du temps et procure également un moyen efficace pour les opérations de séparation / recyclage, en mode discontinu, ou de rétention dans l'espace réactionnel, pour un réacteur en fonctionnement continu [3].

Différentes méthodes pour immobiliser les enzymes existent : adsorption, inclusion, liaison covalente, réticulation. L'adsorption reste la méthode la plus généralement utilisée en raison de sa facilité et son faible coût. Les lipases ont été déjà immobilisées avec succès sur différents supports adsorbants tels que le Chitosane [4], la Bentonite [5], les résines [6] et la Céélite [7]. Les conditions réactionnelles de l'immobilisation et les différentes liaisons de la protéine avec le support peuvent avoir un impact sur la conformation de la macromolécule et par conséquent sur le fonctionnement de l'enzyme et particulièrement sur son énantiosélectivité [8].

Notre travail concerne l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) par adsorption sur Célite et l'étude de l'influence des conditions expérimentales d'immobilisation, tels que, le temps d'immobilisation, la température et le rapport enzyme/support sur l'énantiosélectivité de la protéine.

Pour mener cette étude, nous avons utilisé une réaction modèle, l'acylation du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle, et nous avons fait appel à deux méthodologies différentes : la méthodologie de surface des réponses et les réseaux de neurones.

Nous avons divisé notre travail en deux parties, la première a été consacrée à une étude bibliographique sur les enzymes et les différentes méthodes de leur immobilisation, la méthodologie des plans d'expériences, et les réseaux de neurones. La deuxième partie sera consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus ainsi qu'à la description des différentes méthodes employées au cours de ce travail.

Le plan de notre travail sera le suivant :

**Première partie :** Etude bibliographique sur les enzymes et leur immobilisation, la méthodologie des plans d'expériences, et les réseaux de neurones.

**Chapitre 1 :** Les enzymes et leur immobilisation.

**Chapitre 2 :** Les plans d'expériences.

**Chapitre 3 :** les réseaux de neurones.

**Deuxième partie :** Etude de l'immobilisation de la CRL sur Célite par les plans d'expérience et les réseaux de neurones.

**Chapitre 1 :** Résultats et discussion.

**Chapitre 2 :** Matériels et méthodes.

# *Première partie*

*Etude bibliographique sur les enzymes et leur immobilisation, la méthodologie des plans d'expériences, et les réseaux de neurones.*

- *Chapitre 1 : Les enzymes et leur immobilisation.*
- *Chapitre 2 : La méthodologie des plans d'expériences.*
- *Chapitre 3 : Les réseaux de neurones.*

***Chapitre 1 :***  
*Les enzymes et leur*  
*immobilisation*

## 1. Les enzymes :

### 1.1 Introduction :

Les enzymes sont des protéines qui allient la capacité de reconnaître très spécifiquement des molécules, au pouvoir de catalyser efficacement leur transformation en composées utiles au métabolisme des organismes vivants.

Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes.

Une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche aussi la présence de réactions secondaires gênantes.

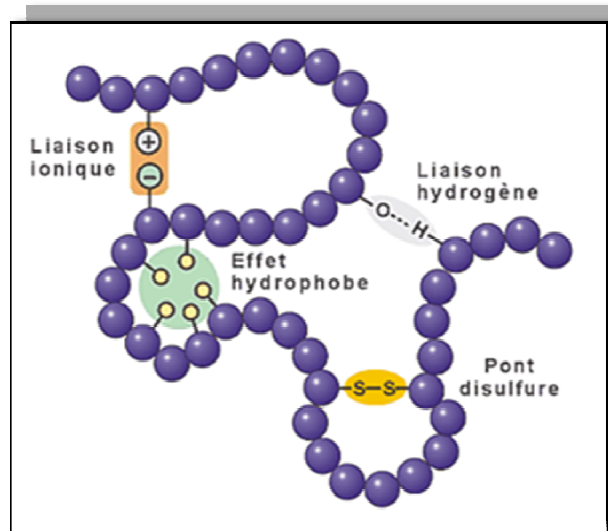
Au cours de ces dernières années, le nombre d'enzymes connues a considérablement augmenté et leurs applications sont multiples, en chimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, dans l'industrie agro-alimentaire et dans le secteur biomédical. [9]

### 1.2. Généralité :

L'enzyme est un biocatalyseur présent dans les organismes vivants. Les enzymes sont de nature protéique, c'est-à-dire résultant de la condensation d'acides  $\alpha$  aminés de la série L avec formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle d'un acide aminé et le groupe amine d'un autre acide aminé. La chaîne polypeptidique obtenue se replie sur elle-même grâce à différents types de liaisons, pour donner un édifice tridimensionnel bien défini (Figure 1). La diffraction des rayons X sur des cristaux d'enzyme permet de décrire cette structure dans laquelle on distingue une cavité où s'effectue la réaction catalysée par l'enzyme. Cette cavité est appelée site actif, lieu de fixation du substrat.

Selon la réaction catalysée, les enzymes sont classées en six grandes catégories : oxydoréductase, transférase, lyase, isomérase, ligase, hydrolase (lipase, estérase, protéase, amidase, acylase, glycosidase). [10]

En ce qui nous concerne nous intéresserons principalement aux lipases car ce sont les enzymes les plus utilisés en synthèse organique. Ce sont des biocatalyseurs peu coûteux, disponibles, faciles à manipuler et à stocker, et leur utilisation ne nécessite pas de cofacteur.



**Figure 1** : Structure tertiaire d'une protéine. [11]

### 1.3. Principe de catalyse enzymatique :

Quelque soit le type de réaction catalysé, un cycle catalytique enzymatique se déroule généralement en quatre étapes. [12]

#### 1.3.1. Diffusion des réactifs dans le milieu :

#### 1.3.2. Reconnaissance enzyme substrat :

Elle est réalisée grâce à la complémentarité structurale entre le substrat et le site actif.

La formation du complexe enzyme-substrat (E-S) peut s'expliquer soit par le modèle de simple complémentarité stérique, soit par celui de l'ajustement induit.

La fixation E-S est réalisée par établissement de liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, et liaisons de Vander Waals. Cette approche du substrat vers l'enzyme, peut induire une modification de la géométrie du site actif pour une meilleure orientation du groupe réactionnel.

#### 1.3.3. Mécanisme catalytique :

L'enzyme et son substrat sont associés par diverses forces d'interaction ils constituent alors un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instable qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction et d'aller vers la formation des produits.

C'est la reconnaissance enzyme substrat qui permet le rapprochement de certains groupes fonctionnels et facilite ainsi la rupture et la formation de certaines liaisons du substrat.

### 1.3.4. Expulsion des produits :

Une fois l'étape catalytique proprement dite effectuée, le produit formé reste transitoirement fixé à l'enzyme par des interactions de faible énergie. Il est en suite libéré pour permettre à l'enzyme de retrouver sa conformation native plus stable. Le schéma 1 suivant résume l'ensemble de ces étapes :

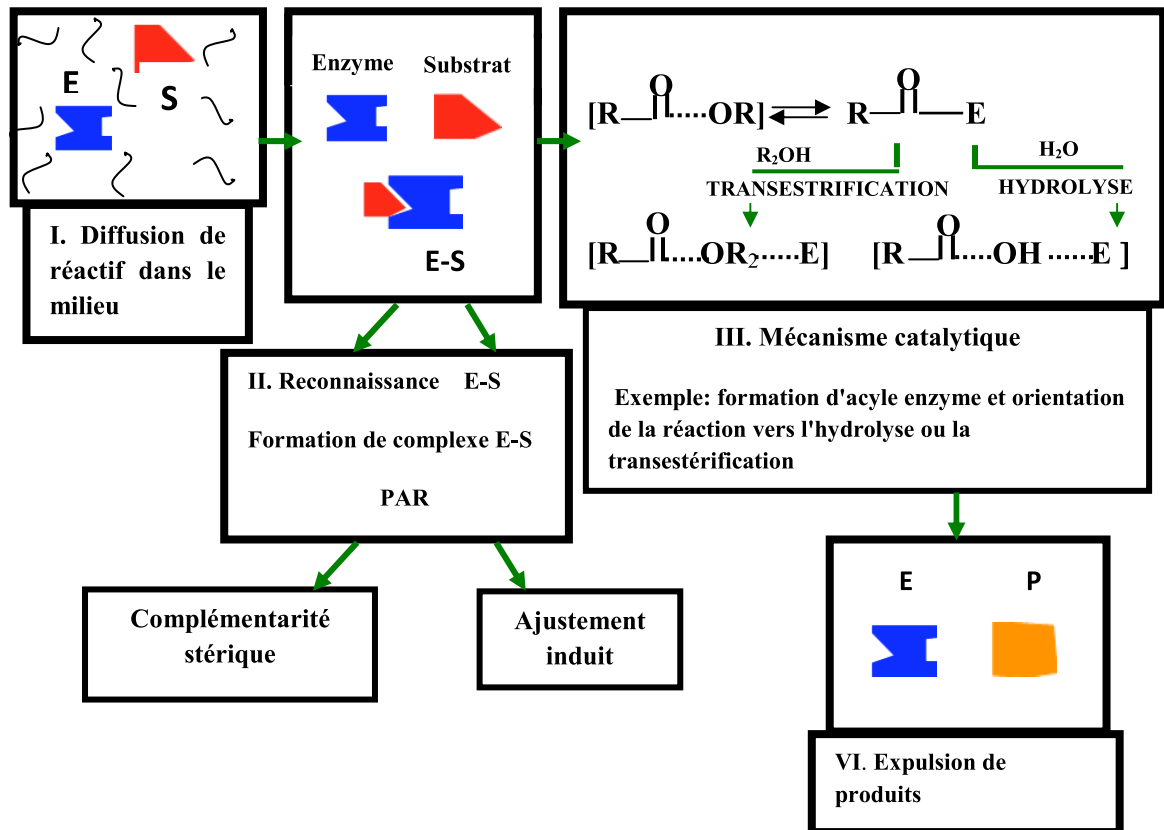


Schéma 1 : Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique.

### 1.4. Les lipases :

Les lipases constituent un groupe d'enzymes très largement utilisées en biotechnologie qui trouve de nombreuses applications dans différents secteurs industriels tels que l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, l'agrochimie (pesticides), l'industrie des détergents, l'industrie des cosmétiques et des parfums, l'industrie du papier, l'industrie du cuir...([13] ; [14] ; [15] ; [16] ; [17] ; [18] ; [19] ; [20])

Elles jouent un rôle important dans le métabolisme des graisses et sont présentes dans la plupart des tissus animaux et végétaux, mais aussi dans de nombreux micro-organismes. ([21] ; [22]) La fonction biologique des lipases est de catalyser l'hydrolyse d'esters comme

les triglycérides. Elles reconnaissent différemment les acides gras selon leur degré d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée. Cependant, elles sont capables d'hydrolyser une très grande variété de substrats naturels et non-naturels et de réaliser en milieu organique des réactions de synthèse.

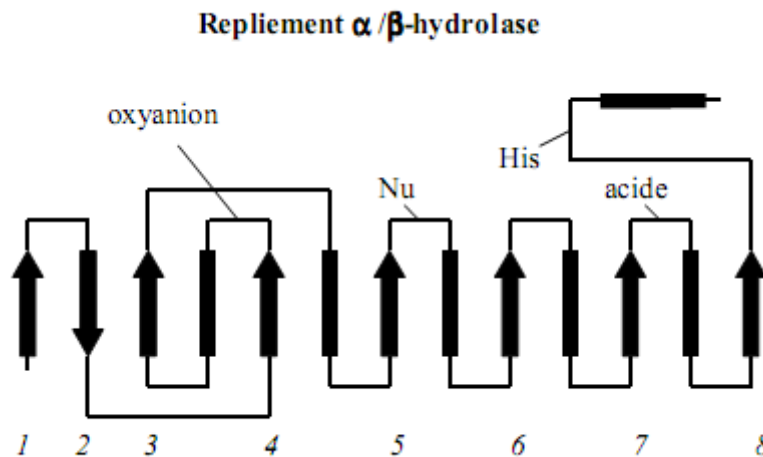
### 1.4.1. Caractéristiques structurales :

#### a. Généralité :

L'étude structurale des lipases, par diffraction aux rayons X, révèle trois caractéristiques principales.

##### (1) Un repliement $\alpha/\beta$ :

Toutes les lipases de structures connues présentent un repliement, nommé repliement  $\alpha/\beta$  constitué d'un corps central de 8 feuillets  $\beta$ , autour duquel se répartissent au moins 6 hélices  $\alpha$  (Figure 2). ([23] ; [24]) La caractéristique la plus importante et la plus conservée des  $\alpha/\beta$  hydrolases est le coude nucléophile appelé " $\gamma$  turn" contenant le résidu catalytique sérine (nucléophile, Nu) positionné entre un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ .



**Figure 2** : Diagramme schématisé du repliement des  $\alpha/\beta$  hydrolases. Oxyanion: résidus stabilisant l'intermédiaire tétraédrique. Triade catalytique des lipases: Asp/Glu (acide), His et Ser (Nu). Flèches: feuillets  $\beta$ ; Rectangles: hélices  $\alpha$ ; Lignes: boucles. [25]

##### (2) Une triade catalytique :

Le site catalytique des lipases est formé de la triade catalytique caractéristique des protéases dites à sérine et du trou "oxyanion". La triade catalytique est constituée de trois acides aminés Sérine-Histidine-Acide Aspartique (ou Acide Glutamique) très conservés. La sérine

catalytique peut être identifiée à partir d'une séquence consensus GX SXG (ou exceptionnellement TX SXG ou AX SXG).

Le "trou oxyanion" est constitué de deux acides aminés dont les groupements amides du squelette protéique stabilisent l'état de transition du substrat en formant avec celui-ci deux liaisons hydrogènes. Le premier de ces deux acides aminés est localisé dans le coude nucléophile au sein de la séquence consensus G-X-S-X-G. L'autre peut être un acide aminé en C-terminal d'une glycine conservée (GX) ou une glycine suivie d'un résidu hydrophobe conservé (GGGX) définissant ainsi deux types de "trou oxyanion". [26] A titre d'exemple, les lipases appartenant aux superfamilles des Cutinases, Champignons filamenteux et *Pseudomonas* sont des lipases de type GX, tandis que celles appartenant aux superfamilles *Candida rugosa* et *Yarrowia lipolytica* sont des lipases de type GGGX. [26] Cette classification en deux types de "trou oxyanion" semble corrélée avec une différence de spécificité de substrat. En effet, les lipases dites de type GGGX sont spécifiques des substrats à chaînes carbonées courtes tandis que les lipases de type GX sont spécifiques des substrats à chaînes carbonées moyennes et longues. [26]

### (3) Un volet amphiphile (la poche enzymatique) :

Le volet amphiphile est un élément mobile formé d'une ou deux hélices  $\alpha$  reliées au squelette de l'enzyme par une structure flexible. L'ouverture de ce volet amphiphile rend le site actif accessible au solvant et au substrat. [27] Lorsque l'enzyme se trouve à l'interface lipide/eau, l'hélice  $\alpha$  couvrant le site actif s'ouvre, rendant accessible le site actif au solvant et au substrat, l'enzyme est sous sa forme ouverte, activée. ([28] ; [29] ; [30])

#### b. Sites actifs :

Les structures des lipases cristallisées en présence et en absence d'analogues d'états de transition ont permis d'identifier la topographie générale du site actif et les sites de fixation de la partie alkyle et acyle des esters (figure 3).

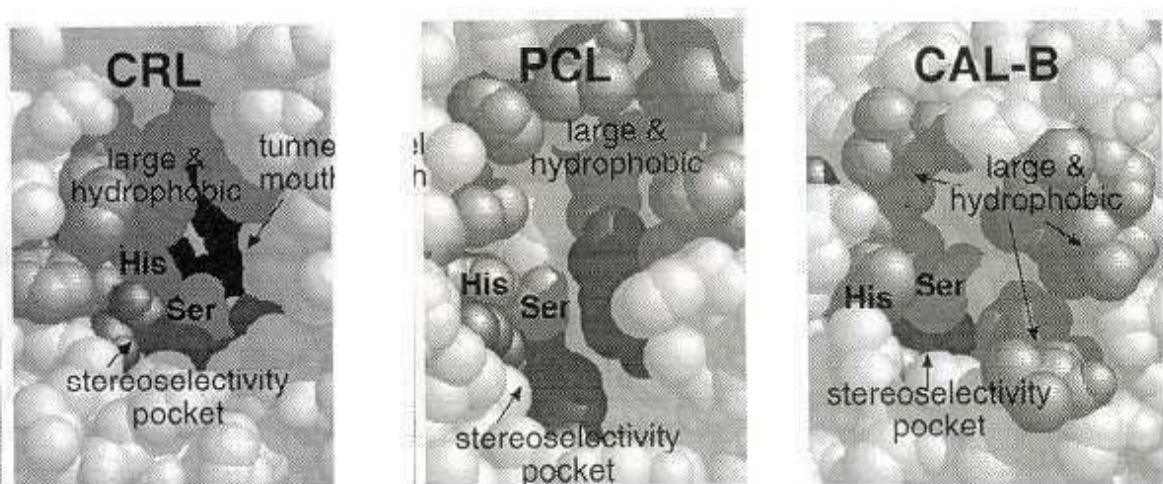
Selon Pleiss et al. (1998), les lipases peuvent être divisées en trois sous-groupes : [31]

- 1- les lipases à site actif hydrophobe localisé près de la surface de la protéine : lipases de *Rhizomucor* et *Rhizopus*,
- 2- les lipases à site actif en forme d'entonnoir : lipases de *Burkholderia cepacia* et *Candida antarctica*,

### 3- les lipases à site actif en forme de tunnel : lipase de *Candida rugosa*.

Le site de fixation de la partie alkyle est similaire dans toutes les lipases. Il s'agit d'une poche contenant deux zones, (i) une large poche hydrophobe en amont de la sérine catalytique et (ii) une, plus petite, en aval de la sérine catalytique qui serait responsable de la stéréo-sélectivité des lipases pour les alcools secondaires. [25] Au contraire, le site de fixation de la partie acyle, varie considérablement selon les lipases.

Dans la lipase de *Candida rugosa*, par exemple, ce site correspond à un long tunnel pouvant accommoder une chaîne carbonée longue d'au moins 18 atomes de carbone, alors que dans la lipase de *Rhizomucor miehei*, il est beaucoup plus court et se situe en surface de la protéine. La lipase de *Burkholderia cepacia* présente, pour sa part, un site est assez long et bien plus large que celui de la lipase de *Candida rugosa*. Le site actif de la lipase de *Candida antarctica* se situe entre celui de la lipase de *Rhizomucor miehei* et celui de la lipase de *Burkholderia cepacia*. [25]



**Figure 3** : Topologie des sites actifs de *C. rugosa* (CRL), *B. cepacia* (PCL) et *C. antarctica-B* (CALB). [25]

#### 1.4.2. Mécanisme d'action catalytique :

Un mécanisme général d'action catalytique des lipases a été proposé par Cygler et *al.* (1994) (Figure 4). Le transfert de proton entre l'acide aspartique (ou acide glutamique), l'histidine et la sérine catalytique, entraîne l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine sur le carbonyle du substrat pour former le premier intermédiaire tétraédrique. Cet intermédiaire est stabilisé par au moins cinq liaisons hydrogène dont au moins deux entre l'oxygène du

substrat chargé négativement et les acides aminés du trou oxyanion. Le retour du doublet de l'oxygène et le transfert d'un proton de l'histidine entraîne la libération du premier produit de la réaction (soit une molécule d'eau soit une molécule d'alcool, en fonction du substrat mis en jeu) et formation de l'acyl-enzyme. Cette première étape d'acylation (formation de l'acyl-enzyme) est suivie d'une étape de déacylation faisant intervenir une attaque nucléophile qui peut être exercée par une molécule d'eau (réaction d'hydrolyse) ou par une molécule d'alcool (réaction de synthèse) sur le carbonyle de l'acyl-enzyme pour former le second intermédiaire tétraédrique. Cette étape de déacylation qui suit un processus analogue à celui de l'étape d'acylation conduit à la formation du second produit de la réaction (acide carboxylique ou ester) avec régénération de l'enzyme native.

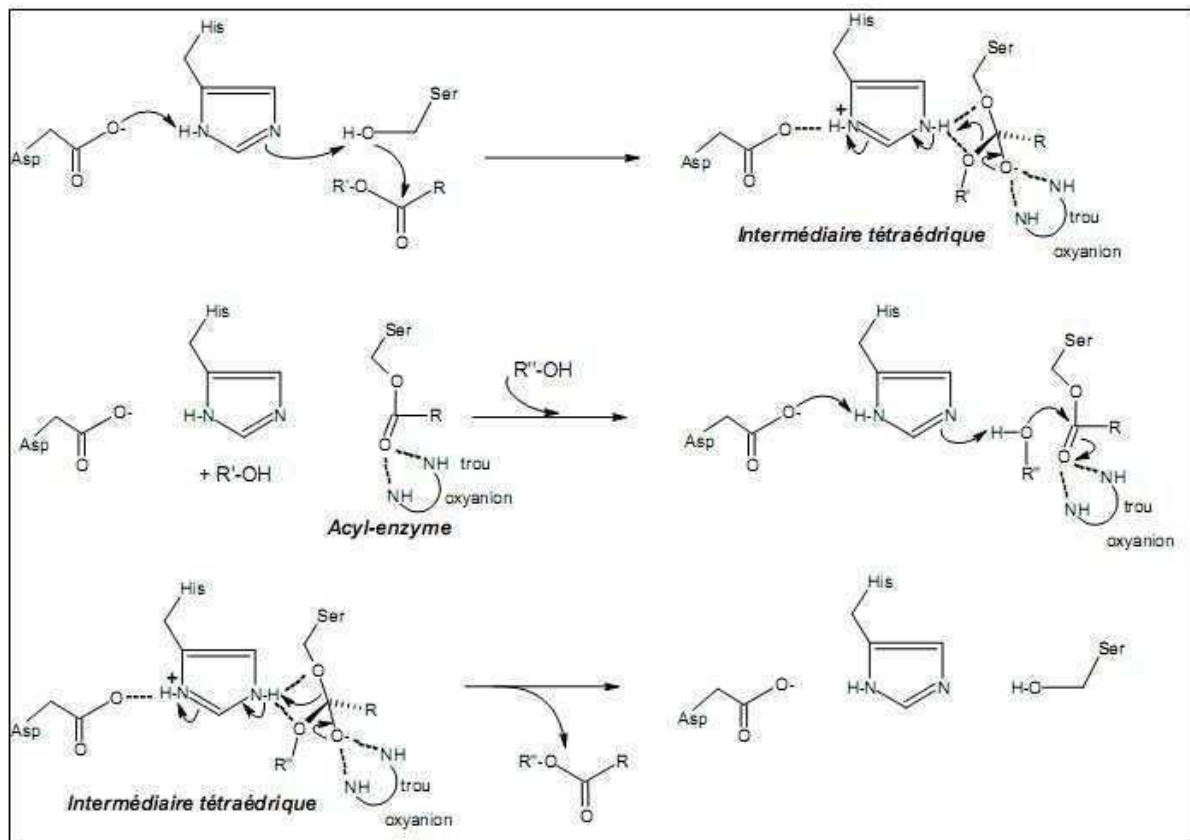


Figure 4 : Mécanisme d'action catalytique des lipases. [32]

## 1.5. L'énantiosélectivité :

### 1.5.1. Détermination de l'énantiosélectivité :

L'évaluation de la réaction de dédoublement cinétique enzymatique est possible grâce à des équations mathématiques décrites par Sih. [33]

Soit (ee) l'excès énantiomérique de deux énantiomères R et S, on a

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \dots\dots\dots eq (1)$$

Soit (C) la conversion chimique de la réaction ( $1 > C > 0$ ), on a :

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \dots\dots\dots eq(2)$$

-Le facteur de sélectivité (*E*): qui caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour un énantiomère donné, il est le rapport des vitesses de formation des deux énantiomères en compétition; soit

$$E = \frac{k_R}{k_S}$$

En tenant compte les équations (1) et (2), le facteur d'énantiosélectivité (*E*) peut alors s'exprimer comme suit :

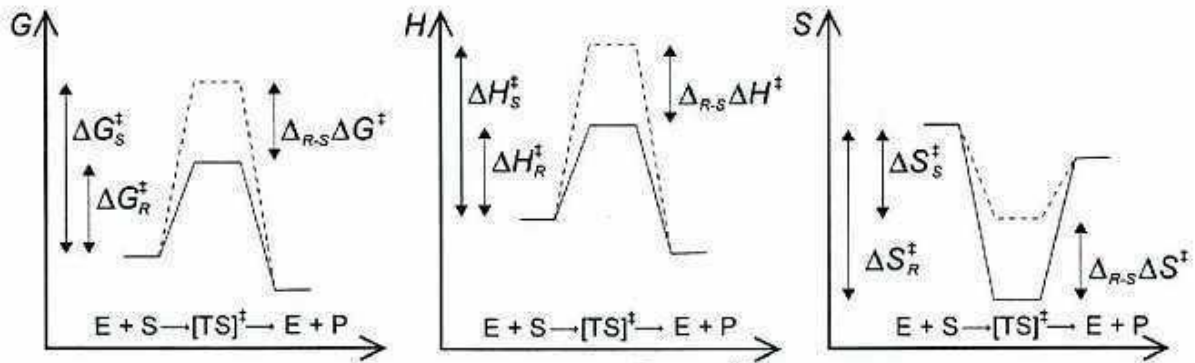
$$E = \frac{\text{Ln} [(1-C)(1+ ee_p)]}{\text{Ln} [(1-C)(1- ee_p)]} \quad \text{Ou} \quad E = \frac{\text{Ln} [(1-C)(1- ee_s)]}{\text{Ln} [(1-C)(1+ ee_s)]}$$

Ces équations sont valables uniquement dans le cas d'une réaction de dédoublement cinétique enzymatique irréversible.

### 1.5.2. Analyse thermodynamique de l'énantiosélectivité :

L'énantiosélectivité d'une enzyme peut être corrélée avec la différence d'énergie libre d'activation ( $\Delta_{R-S}\Delta G$ ) entre deux énantiomères en se basant sur l'hypothèse que l'état de transition de plus faible énergie doit correspondre à l'énantiomère qui est le plus vite transformé par l'enzyme (Figure 5). Cette différence d'énergie libre d'activation est elle-même reliée à la différence entre l'enthalpie d'activation et l'entropie (expression \*).

$$\Delta_{R-S}\Delta G = -RT\ln E = \Delta_{R-S}\Delta H - T\Delta_{R-S}\Delta S \quad \text{Expression *}$$



**Figure 5** : Diagrammes d'énergies d'une réaction énantiosélective catalysée par une enzyme. R et S sont les énantiomères, G=énergie libre de Gibbs, H=enthalpie et S=entropie.

## 2. Immobilisation des enzymes :

### 2.1. Introduction :

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée. Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée, des changements dans l'activité enzymatique, le pH optimum et l'affinité pour le substrat ont été observés. [34]

L'immobilisation d'une enzyme consiste en sa rétention soit par rétention physique, soit par liaison chimique. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme.

## 2.2. Technique d'immobilisation:

Les principales Technique d'immobilisation sont classées en quatre catégories : [35]

- liaison covalente
- réticulation
- inclusion
- Adsorption

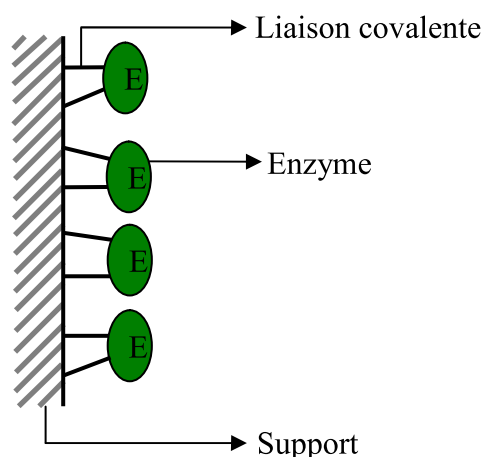
### 2.2.1. Immobilisation par liaison covalente :

L'immobilisation par liaison covalente conduit à la formation des liaisons très solides entre enzyme et support.

Le couplage covalent d'enzyme sur support nécessite la présence d'un groupe fonctionnel sur la surface de celui-ci (Figure 6). Ces groupements sont en général  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , ou  $-\text{SH}$  ; ils sont peu réactifs chimiquement et il convient de les activer pour qu'ils réagissent dans des conditions douces avec des groupements fonctionnels de l'enzyme.

Différents supports tels que la silice [36], Eupergit [37], ont été activés et exploités pour cette technique.

L'immobilisation par liaison covalente est utilisée afin d'augmenter la stabilité et l'activité de l'enzyme. [38]



**Figure 6** : Immobilisation par liaison covalente.

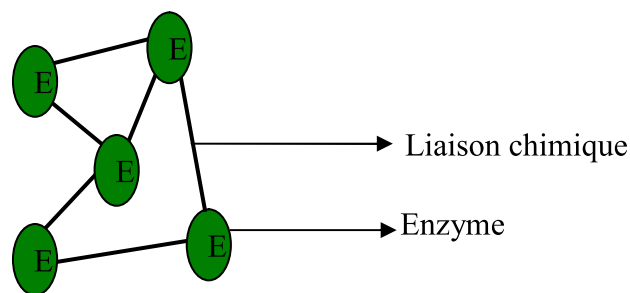
### 2.2.2. Immobilisation par réticulation et co-réticulation :

La réticulation consiste, à l'aide d'un agent réticulant, à créer des liaisons chimiques qui renforcent la cohésion de la membrane, (Figure 7).

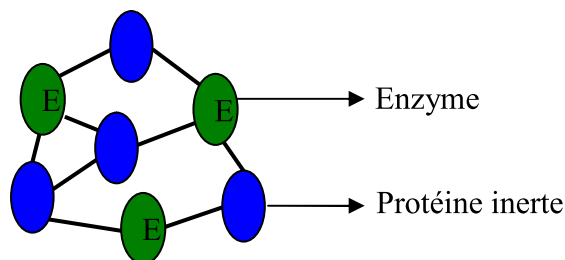
Quant à la co-réticulation, elle est basée sur le même principe que la réticulation en utilisant à la fois un agent réticulant plus souvent en présence du glutaraldéhyde et une protéine inerte pour faciliter ou améliorer la réticulation (Figure 8).

L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues.

Cependant, à cause de la réaction chimique, une perte d'activité enzymatique de la membrane co-réticulée peut être observée pendant les mesures.



**Figure 7 :** Immobilisation par réticulation.



**Figure 8 :** Immobilisation par co-réticulation.

### 2.2.3. Immobilisation par inclusion ou piégeage :

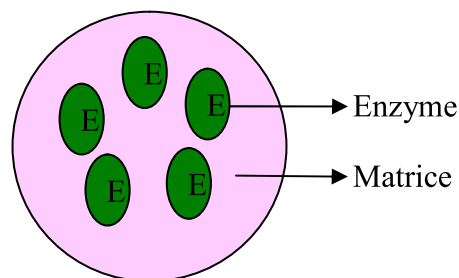
La technique revient à emprisonner l'enzyme dans les mailles du réseau d'une matrice polymérique ou inorganique : gel de polyacrylamide, d'amidon, de gélatine, d'alginate.

Le procédé est très simple et universel, mais les risques de fuite ne sont pas négligeables si les mailles du réseau sont larges.

La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité du gel suffisante (Figure 9).

Toutefois cette technique est parfois limitée par la taille des pores du gel qui favorise le relargage des enzymes de faible poids moléculaire.

L'activité de l'enzyme est dépendante du micro-environnement local de l'enzyme immobilisé (pH, force ionique, diffusion moléculaire, etc.)



**Figure 9** : Immobilisation par Inclusion.

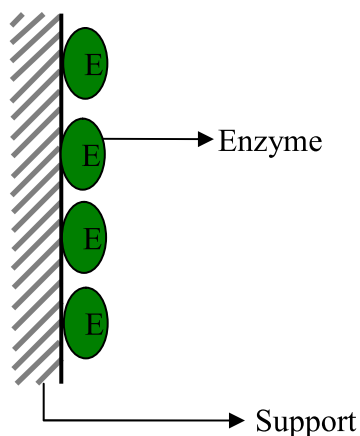
### 2.2.4. Immobilisation par adsorption :

L'adsorption est la méthode la plus économique et la plus simple d'immobilisation des enzymes. [39] Dans ce procédé, l'enzyme est retenu à la surface d'un corps adsorbant, minéral ou organique, grâce à des liaisons de Van der Waals et des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles) (Figure 10).

Les supports adsorbants utilisés sont très variés, tant du point de vue de leur structure chimique que du point de vue de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité, etc.).

Différent support tel que chitosane, [40] kaolin, [41] cérite, [42] carbonate de calcium [43] ont été exploités pour l'immobilisation des enzymes.

Les quantités d'enzyme immobilisé par adsorption sont extrêmement variables et sont évidemment fonction de la nature du support.



**Figure 10** : Immobilisation par adsorption.

## 2.3. Application des lipases immobilisées :

### 2.3.1. Réaction d'hydrolyse :

L'hydrolyse de triglycérides en acides gras et en glycérol constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles, des graisses mais également de la matière grasse du lait. [44] L'hydrolyse permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras ou employés dans des réactions d'estérification ou de transestérification. La lipase de *C. cylindracea* immobilisée par liaison covalente sur les billes de chitosan a été utilisée pour l'hydrolyse du suif de bœuf [45] ; la lipase de *C. rugosa* immobilisée sur du polypropylène microporeux a également été utilisée pour l'hydrolyse du suif de bœuf et pour l'hydrolyse de l'huile de palme mais immobilisée sur les fibres creuses de cuprophane. [46]

Les réactions d'hydrolyse s'effectuent à l'interface entre les substrats hydrophobes et le milieu aqueux, formant ainsi un système réactionnel biphasique. Ce système biphasique résulte de la présence d'une phase organique non miscible à l'eau, cette phase étant constituée soit du substrat seul soit du substrat dissous dans un solvant non miscible à l'eau.



### 2.3.2. Réaction de synthèse :

En plus de leur fonction naturelle d'hydrolyse, les lipases possèdent également la capacité de synthétiser des esters.

#### a. La transestérification :

La transestérification implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse). Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras polyinsaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique [47]. L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final.

- **Alcoolyse** : par échange du groupement alcool



- **Acidolyse** : par échange du groupement acyle



#### b. L'interestérification :

Lors de la réaction d'interestérification, un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras. [48] Certaines huiles végétales, comme par exemple l'huile de palme et l'huile d'amande douce, présentent des limites d'application à cause de leur teneur élevée en acides gras saturés qui sont associés aux maladies cardio-vasculaires. Pour élargir leur utilisation commerciale, ces huiles végétales peuvent être modifiées physiquement (par fractionnement) ou chimiquement, par mélange avec d'autres huiles ou par traitement enzymatique (interestérification). De telles modifications des huiles et des matières grasses permettent également aux industriels de répondre à la demande des consommateurs en produits plus sains.

- **Interestérification** : par échange du groupement acyle et alcool



### c. La synthèse des esters :

Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important des applications des lipases pour la production d'esters dans les domaines agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les lipases immobilisées sont particulièrement intéressantes pour ces utilisations industrielles, puisqu'elles peuvent être facilement manipulées. Une large gamme d'esters d'acide gras est maintenant produite commercialement en utilisant une lipase immobilisée, en présence de solvants non-aqueux. Par exemple, des esters ont été synthétisés à partir d'acides gras à longue chaîne (12-20 atomes de carbone) et d'alcools à courte chaîne, afin de servir dans la confection de produits alimentaires ou cosmétiques, tandis que ceux issus d'acides gras à longue chaîne et d'alcools à longue chaîne sont utilisés dans la fabrication de plastifiants et de lubrifiants.[49] Ainsi la lipase de *C. rugosa* immobilisée sur du nylon a permis la synthèse d'oléyl butyrate à partir d'acide butanoïque et de n-butanol en présence de n-hexane.

### 3. Conclusion :

Les lipases sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse d'esters glycéridiques en milieux aqueux et la synthèse d'esters en milieux non aqueux. Elles sont de ce fait capables de catalyser un grand nombre de réactions d'intérêt industriel. Que ce soit par inclusion, par adsorption ou par liaison covalente, l'immobilisation des lipases vise à leur conférer une bonne stabilité, permettant une réutilisation des enzymes après une réaction et le développement de procédés en continu. Les réactions d'hydrolyse de triglycérides constituent l'application première des lipases immobilisées, mais leur utilisation dans divers types de réactions d'estérification s'est également mise en place : il existe des procédés faisant intervenir des réactions de transestérification, d'interestérification ou de synthèse d'esters. La production de lipides structurés par interestérification en est un exemple. Bien que les conditions réactionnelles diffèrent de celles de l'hydrolyse, les mêmes lipases sont utilisées dans les deux cas. Une lipase spécifiquement adaptée à l'estérification pourrait constituer un outil performant. [50]

## ***Chapitre 2 :***

# *La méthodologie des plans d'expériences*

### **1. Introduction :**

L'étude d'un phénomène peut, le plus souvent, être schématisé de la manière suivante : on s'intéresse à une grandeur,  $Y$  que nous appellerons par la suite réponse qui dépend d'un grand nombre de variables,  $X_1, X_2, \dots, X_n$ , que nous appellerons par la suite facteurs.

La modélisation mathématique consiste à trouver une fonction  $f$  telle que  $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$ . Une méthode classique d'étude consiste en la mesure de la réponse  $Y$  pour plusieurs valeurs de la variable  $X_i$  tout en laissant fixe la valeur des  $(n - 1)$  autres variables. On itère alors cette méthode pour chacune des variables. Ainsi, par exemple, si nous avons 4 variables et si l'on décide de donner 5 valeurs expérimentales à chacune d'elles, nous sommes conduits à effectuer  $5^4 = 625$  expériences. Ce nombre élevé dépasse les limites de faisabilité tant en temps qu'en coût.

Il faut donc réduire le nombre d'expériences à effectuer sans pour autant perdre sur la qualité des résultats recherchés. L'utilisation d'un << plan d'expérience >> donne alors une stratégie dans le choix des méthodes d'expérimentation. Le succès des plans d'expériences dans la recherche et l'industrie est lié au besoin de compétitivité des entreprises: ils permettent une amélioration de la qualité et une réduction des coûts.

### **2. La démarche de planification expérimentale :**

Les plans d'expériences constituent, essentiellement, une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates, de manière efficace et rapide. La méthodologie des plans d'expérience se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira nécessairement à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats. [51]

La démarche de cette méthodologie peut se décomposer en trois étapes :

- 1) choix d'une méthode d'expérimentation.
- 2) l'analyse des résultats.
- 3) l'acquisition progressive des connaissances.

### 3. Définitions :

#### a. Objectifs :

Les deux objectifs visés sont généralement :

- ❖ "Débroussailler" : de faire le tri parmi l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer la réponse.
- ❖ l'ensemble des combinaisons des facteurs, y compris celle non essayées. Ceci est notamment nécessaire si l'on souhaite optimiser le système étudié. [52]

#### b. Réponse :

Une réponse doit être représentative, quantifiable, et la moins dispersée possible pour des facteurs maîtrisés et constants.

Une réponse mal adaptée conduira à des conclusions sans intérêt. [53]

#### c. Facteurs :

On appelle facteurs, les paramètres supposés influencer la réponse qui caractérise le comportement du phénomène étudié. Il est important de pouvoir attribuer à chacun des facteurs deux niveaux, l'un sera qualifié de << niveau bas >> l'autre de << niveau haut >>.

#### d. Domaine expérimental :

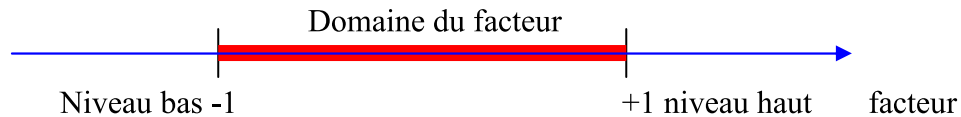
Les facteurs sont des grandeurs supposées influencer sur les variations des réponses qui peuvent être [54] :

- continue : comme la température, volume, etc.
- qualitatif : comme un état, une couleur, etc.

Les facteurs continus sont pleinement caractérisés par les valeurs suivantes :

- borne inférieure ( $b_{\text{inf}}$ ) : limite basse (ou niveau bas) des valeurs que le facteur peut prendre
- borne supérieure ( $b_{\text{sup}}$ ) : limite haute (ou niveau haut) des valeurs que le facteur peut prendre (Figure 1).

Le domaine du facteur ne doit être trop petit ni trop large, pour que les conclusions aient une certaine généralité.



**Figure 1 :** Représentation du domaine d'étude pour un seul facteur. [55]

#### **e. Matrice d'expérience :**

La matrice d'expérience est un objet mathématique qui représente, sous forme codée ou non codée, l'ensemble des expériences à réaliser. C'est un tableau constitué de  $n$  lignes correspondant aux  $n$  expériences à réaliser et de  $k$  colonnes, correspondant aux  $k$  variables étudiées. L'élément  $X_{ij}$  de la matrice ainsi formé correspond à la valeur des niveaux que prend la  $j^{\text{ième}}$  variable à la  $i^{\text{ième}}$  expérience. [56]

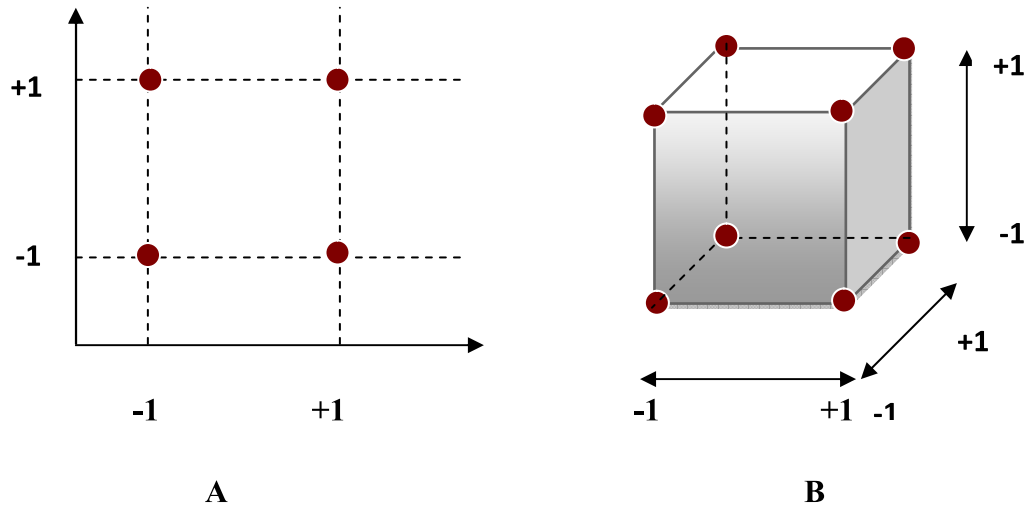
#### **4. Choix du plan d'expérience :**

Le choix du plan sera guidé par l'analyse de tous les points précédents. On distingue plusieurs types de plans :

##### **4.1. Les plans factoriels complets à deux niveaux :**

Pour ces plans le nombre de niveaux de chaque facteur est restreint à deux et le nombre des essais réalisés est égal à  $2^n$  ( $n$  représente le nombre de facteurs). Toutes les combinaisons de niveau sont effectuées au cours de l'expérimentation, chaque combinaison représente les conditions dans lesquelles les réponses sont mesurées.

Les diagrammes ci-dessous montrent un plan à deux (Figure 2. A), et à trois facteurs (Figure 2. B), où les points représentent une combinaison unique de niveau de facteurs.



A : plan factorielle à deux facteurs

B : plan factorielle à trois facteurs

**Figure 2:** Répartition des points expérimentaux dans le domaine expérimentale.

Le modèle mathématique postulé relatif à ce plan est le suivant :

$$y = b_0 + \sum b_i x_{ik} + \sum \sum b_{ij} x_{ik} x_{jk} + \xi_k$$

y : réponse  $x_i, x_j$  : niveau attribuer au facteur i, j

$b_0$  : valeur de réponse au centre du domaine d'étude

$b_i$  : l'effet du facteur i

$b_{ij}$  : l'interaction entre i et j

$\varepsilon_k$  : résidu (écart)

Dans une expérience factorielle complète les réponses sont mesurées pour toutes les combinaisons de niveaux de facteur, ce qui peut se traduire par un nombre d'essais très élevé (exemple : 9 facteurs requiert 512 essais) ;

Pour minimiser le temps et le coût on peut exclure certaines combinaisons, et aboutir à des plans appelés factoriels fractionnaires.

#### 4.2. Les plans factoriels fractionnaires :

Les plans factoriels fractionnaires sont des plans factoriels permettant d'étudier tous les facteurs avec un nombre d'essais réduits par rapport aux plans factoriels complets dont le nombre d'essais augmente exponentiellement avec celui des facteurs.

Par exemple, 64 essais sont nécessaires pour étudier 6 facteurs, et pour 7 facteurs on passe à 128 essais. Les plans fractionnaires sont alors indispensables pour réduire le nombre d'essais. Ils sont basés sur la théorie des aliases que nous allons présenter ci-dessous à partir d'un exemple simple de 3 facteurs.

Le modèle mathématique de la réponse d'un plan factoriel à 3 facteurs comporte 8 coefficients :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{123}x_1x_2x_3$$

Si on effectue 4 essais, on obtient un système de quatre équations à 8 inconnues. On ne sait pas résoudre le système. Comme y n'a que 4 essais, on ne peut calculer que 4 inconnues. On adopte le modèle :

$$y = l_0 + l_1x_1 + l_2x_2 + l_3x_3$$

$$\text{Avec: } l_0 = a_0 + a_{123}, l_1 = a_1 + a_{23}, l_2 = a_2 + a_{13}, l_3 = a_3 + a_{12}$$

On dit que les coefficients sont aliésés dans les contrastes. Et les interprétations de ces plans sont basées essentiellement sur différentes hypothèses. [53]

#### 4.3. Les plans de surface de réponse :

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponse permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. [57] Ils sont utilisés pour les variables continues. Pour k facteurs, on a :

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_{ij} + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{\substack{m=2 \\ m>j}}^k b_{jm} X_{ij} X_{im} + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_{ij}^2$$

Avec  $i$  numéro de l'expérience, variant de 1 à N,

$X_{ij}$  niveau du facteur j à la  $i^{\circ}$  expérience,

$y_i$  valeur de la réponse calculée à la  $i^{\circ}$  expérience,

$b_0, b_j, b_{jm}, b_{jj}$  coefficients du modèle

Il existe plusieurs types de plans du second degré dont les principaux vont être décrits.

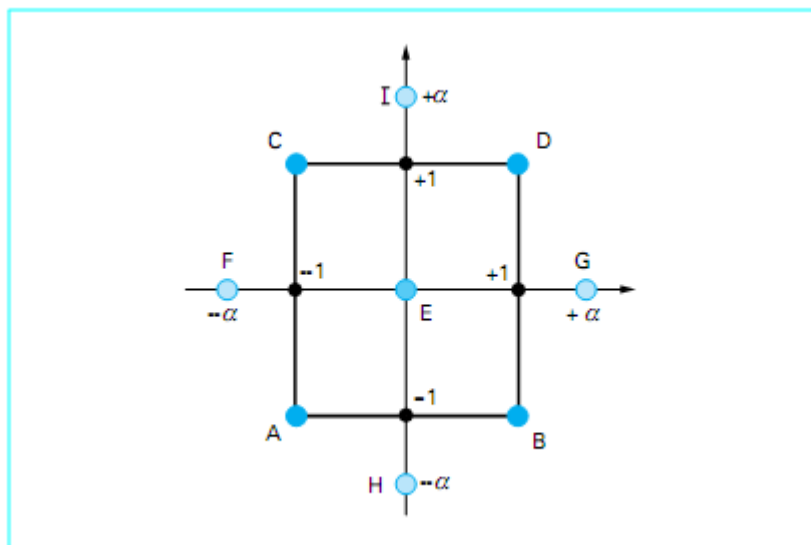
**a. Plans composites centrés :**

Un plan composite est constitué de trois parties :

- un plan factoriel dont les facteurs prennent deux niveaux ;
- au moins, un point expérimental situé au centre du domaine d'étude
- des points axiaux ; ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs.

La figure 3 représente un plan composite pour deux facteurs :

- les points A, B, C et D sont les points expérimentaux d'un plan factoriel  $2^2$  ;



**Figure 3 :** Plan composite pour deux facteurs. [58]

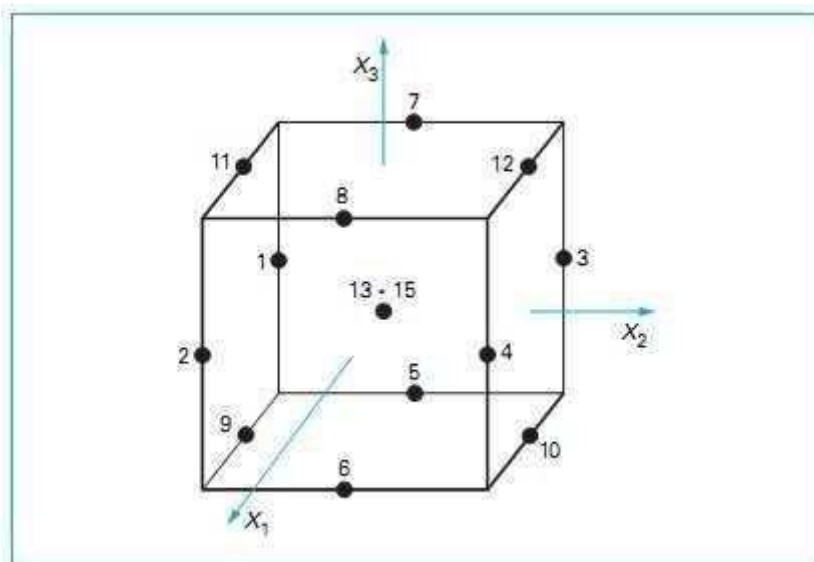
- le point E est le point central. Ce point peut avoir été répliqué une ou plusieurs fois ;
- les points F, G, H et I sont les points axiaux. Ces quatre derniers points forment ce que l'on appelle le plan en étoile.

On réalise 9 essais et 6 coefficients doivent être déterminés. Il faut donc résoudre un système de 9 équations à 6 inconnues.

Les plans composites prennent facilement la suite d'un premier plan factoriel dont les résultats sont inexplicables par un modèle du premier degré. Il suffit d'effectuer les expériences correspondant aux points en étoile et de faire les calculs sur l'ensemble de toutes les expériences. Les plans composites sont parfaitement adaptés à l'acquisition progressive des résultats.

**b. Plans de Box et Behnken :**

Les plans de Box et Behnken [59] sont de mise en œuvre aisée car tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1 (en variables codées). La matrice d'expériences correspondant à un plan à trois facteurs comporte douze expériences, complétées par une ou plusieurs expériences au centre du domaine d'étude. Le lieu géométrique des points expérimentaux est représenté sur la figure 4.



**Figure 4 :** Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs. [57]

**c. Plans hybrides :**

Ce sont des structures très particulières qui ont pour intérêt principal leur faible nombre d'essais par rapport aux deux catégories précédentes. Mais ces plans sont peu robustes au non-respect du niveau de facteur.

## 5. Analyse des résultats :

De nombreux logiciels commerciaux sont spécialement conçus pour les plans d'expérience (JMP [60], Minitab [61], Statisca [62], Statgraphics [63], Unscrambler [64], Pirouette [65], Modde [66]). Ils permettent dans un premier temps, de définir la matrice d'expérience et dans un deuxième temps le traitement des données expérimentales obtenues.

### 5.1. Calcul des effets :

Pour illustrer notre propos, nous donnons ci-dessous, un exemple d'un plan complet à deux facteurs  $x_1$ ,  $x_2$  et une réponse  $y$ . La matrice d'expériences correspondante est la suivante :

**Tableau 1** : matrice de réponse du plan factorielle  $2^2$

	Moyenne	Facteur $x_1$	Facteur $x_2$	Interaction $x_1 \cdot x_2$	Réponse $y$
<b>1</b>	1	-1	-1	+1	$y_1$
<b>2</b>	1	+1	-1	-1	$y_2$
<b>3</b>	1	-1	+1	-1	$y_3$
<b>4</b>	1	+1	+1	+1	$y_4$

Les formules générales donnant les effets et les interactions d'un plan factoriel complet  $2^2$  sont les suivantes :

$$A_0 = 1/4 (y_1 + y_2 + y_3 + y_4)$$

$$A_1 = 1/4 (-y_1 + y_2 - y_3 + y_4)$$

$$A_2 = 1/4 (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4)$$

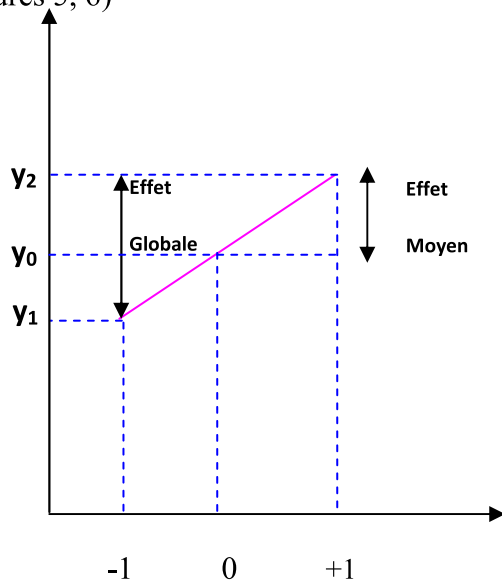
$$A_{1 \cdot 2} = 1/4 (y_1 - y_2 - y_3 + y_4)$$

De façon générale ;

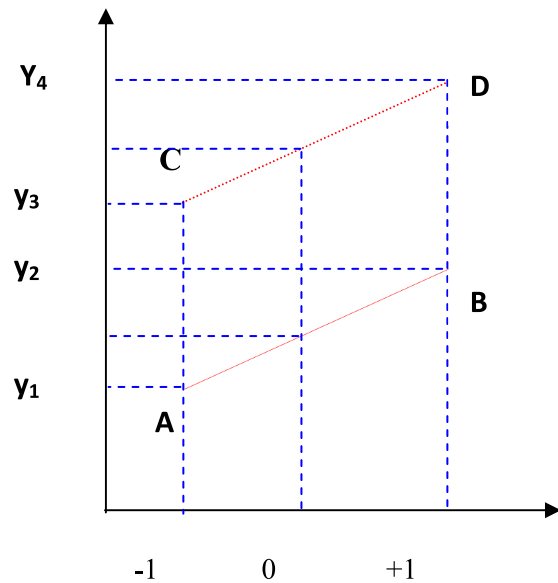
$$A_0 = 1/N \sum y_i$$

$$A_{ij} = 1/N \sum x_{ij} y_{ij}$$

Le calcul des différents effets précédents permet de déterminer l'effet de chaque facteur (Figures 5, 6)



**Figure 5:** Illustration de l'effet de facteur 1



**Figure 6:** Illustration d'une interaction [67]

- L'effet du facteur 1 est la variation de la réponse entre le centre du domaine d'étude et le niveau haut de facteur 1
- l'interaction apparaît comme la demi-différence entre l'effet du facteur 1 au niveau bas du facteur 2. Elle traduit une variation de l'effet d'un facteur en fonction du niveau d'un autre facteur

L'effet moyen du facteur est défini comme étant la moitié de l'effet globale ; on distingue :

- L'effet global  $y_2 - y_1$
- L'effet moyen  $y_2 - y_1 / 2$

S'il n'a pas d'interaction entre deux facteurs, les pentes des droites AB et CD sont identiques (AB \parallel CD)

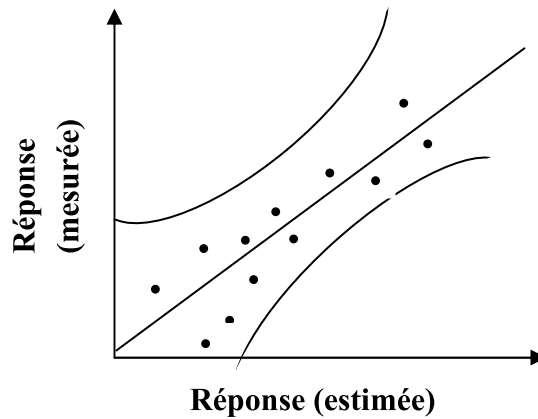
S'il n'y pas d'interaction entre deux facteurs, les pentes des deux droites précédentes sont différentes.

### 5.2. Analyse des résultats des calculs :

De nombreuses rubriques existent dans les logiciels traitant des plans d'expériences (sommaire d'ajustement, analyse de variance, etc.) qui donnent les informations nécessaires à une bonne appréciation des résultats (modèles obtenus).

### 5.2.1. Graphique de comparaison des réponses mesurées et réponses estimées :

Plus les points du graphique sont proche de la première bissectrice, plus le modèle rend assez bien compte des réponses, et vice-versa (Figure 7)



**Figure 7 :** Graphique de comparaison de réponse mesurée et estimée.

### 5.2.2. Résumée de la pertinence du modèle (qualité descriptive) :

La pertinence de modèle est généralement vérifiée par le coefficient de détermination. Il est défini comme le rapport de la variance expliquée par le modèle à la variance totale qu'il faut expliquer. Ce coefficient varie entre 0 et 1, plus il est proche de 1 plus les réponses calculées seront fortement corrélées avec les réponses expérimentales. [58]

$$R^2 = \frac{\sum (y_i'' - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} = \frac{SCM}{SCT}$$

Où ;

$y$  : la matrice de réponse mesurée

$y''$  : la matrice de réponse calculée par le modèle

$\bar{y}$  : la matrice de la moyenne de réponse

SCM : la somme des carrés moyen

SCT : la somme des carrés totale

### 5.3. La technique d'analyse de variance (ANOVA) :

L'analyse de variance (ANOVA) permet de comparer les variances des valeurs calculées par le modèle et les résidus. Cette analyse constitue un test statistique (test de Fisher-Snedecor) et elle fournit les réponses aux questions suivantes [51] :

- Est-ce que le modèle nous apporte quelque chose ? la régression est elle significative ? explique-t-elle en grande partie les variations observées de  $y_i$  ?

C'est le test de signification globale de la régression que nous appellerons le **test de validation 1**.

- Est que le modèle représente bien le phénomène ? si oui, le modèle introduit un biais acceptable. Si non, il convient d'en chercher un autre. la première validation concerne donc l'analyse de des résidus du modèle. nous appellerons cette étape, le **test de validation 2**.

#### 5.3.1. Test de validation 1 :

Le test de Fisher-Snedecor ( $F_1$ ) va nous dire si le modèle nous apporte quelque chose, si l'équation établit bien une relation entre la variation des facteurs et de la réponse, ou si c'est du à un changement aléatoire de la réponse dans le domaine expérimentale.

$$\text{Soit : } F_1 = \frac{\text{SCM} / (p-1)}{\text{SCRES} / (N-1)}$$

$$\text{SCT} = \text{SCM} + \text{SCRES} \text{ et } \text{SCRES} = \sum \varepsilon_i^2$$

SCRES : la somme des carrés des résidus

Pour qu'il existe le moins de résidu possible, il faut que le rapport  $F_1$  le plus grand possible.

Dans ce cas on pourra dire que le modèle apporte de l'information.

En d'autre terme,  $F_1$  nous renseigne sur la probabilité **Prob $f_1$**  de rejeter l'hypothèse nulle. Donc dans ce cas, nous voulons obtenir la plus petite valeur possible de cette probabilité. On dira qu'au dessous de 5%, nous n'avons pas de raison de rejeter le modèle.

Le tableau 2 résume les différents calculs et notation de ce test.

**Tableau 2.** Récapitulatif du test de validation 1

Source	Somme de carrées	ddl	Test F	Probabilité
<b>Modèle</b>	SCM	P-1	$\frac{SCM}{p-1}$	
<b>Ecart</b>	SCRES	N-P	$\frac{SCRES}{N-P}$	
<b>Total</b>	SCT	N-1		

Toutes ces informations sont données par les logiciels cités dans un tableau d'analyse de régression.

### 5.3.2. Test de validation 2 :

Bien que les écarts entre les valeurs observées et les valeurs calculées par le modèle aient été minimisés par le choix de la méthode des moindres carrés, il faut s'assurer que localement, les résidus ne soient pas anormalement importants. Tout d'abord on calcule à partir de l'équation du modèle les différents  $y_i$  on obtient alors la valeur de résidus :

$$\varepsilon_i = y_i - \hat{y}_i$$

On calcule ensuite la somme des carrés des résidus notés SCRES

$$SCRES = SCE_1 + SCE_2$$

**SCE<sub>1</sub>** : l'erreur due au manque d'ajustement du modèle appelé aussi le biais ou encore le **Lack of Fit**

**SCE<sub>2</sub>** : l'erreur pure ou naturelle appelé **Pure Error**.

Pour estimer si ce que l'on obtient est acceptable, on procède à un test de **Fischer-snedecor** loi de **F**. la loi de **F** dépend du nombre de degré de liberté de chacune des deux populations donc :

$$F_2 = \frac{SCE_1 / ddl_{SCE1}}{SCE_2 / ddl_{SCE2}}$$

**ddl** : le degré de liberté représente le nombre de coefficients indépendants que la régression permettra d'estimer. [68]

$$\text{On a donc : } \text{ddl}_{\text{SCRES}} = \text{ddl}_{\text{SCE}} + \text{ddl}_{\text{SCE}_2} = \text{N} - \text{P}$$

**N** : représente le nombre d'essai ; **P** : représente le nombre de coefficient

Le test F ( $F_2$ ) va être calculé en posant une hypothèse nulle ( $H_0$ : hypothèse nulle que le rapport soit égale à 1. c'est à dire si les résidus liée au modèle sont du même ordre de grandeur que l'erreur naturelle, on teste si le modèle est juste et fidèle). on obtiendra la probabilité ( $\text{prob}F_2$ ) de trouver un rapport égale à 1. On dira qu'au dessus de 5%, Nous n'avons pas de raison de rejeter le modèle.

Ce test n'est faisable qu'en présence de répétition ce qui permet de connaître  $\text{SCE}_2$

Le tableau 3 résume les différents calculs et notation de ce test

**Tableau 3.** Récapitulatif du test de validation 2

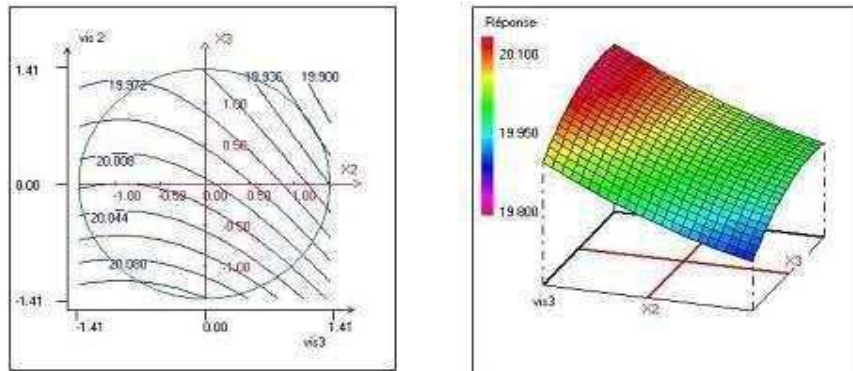
Source	Somme de carrées	ddl	Test F	Probabilité
<b>Lack of fit</b>	$\text{SCE}_1$	$\text{ddl}_{\text{SCE}_1}$		
<b>Pure error</b>	$\text{SCE}_2$	$\text{ddl}_{\text{SCE}_2}$	$\frac{\text{SCE}_1 / \text{ddl}_{\text{SCE}_1}}{\text{SCE}_2 / \text{ddl}_{\text{SCE}_2}}$	$\text{Prob}F_2$
<b>Résidus</b>	SCRES	$\text{ddl}_{\text{SCRES}}$		

Meilleur ajustement du modèle si :

- $R^2$  proche à 1
- $\text{Prob}F_1 < 5\%$   $F_2$  le plus petit possible
- $\text{Prob}F_2 > 5\%$   $F_1$  le plus grand possible

#### 5.4. Analyse graphique des résultats :

Un des grands avantages des plans d'expériences est la présentation des résultats sous forme graphique qui constitue une projection de la surface de réponse dans le plan horizontale (Figure 8)



**Figure 8 :** Courbe d'iso- réponse et surface de réponses. [51]

Les graphiques sont avant tout un outil d'aide à l'interprétation des résultats mais, ils permettent également de manière plus communicative lors d'une réunion de tirer plus rapidement des conclusions et ainsi d'orienter la poursuite d'une étude.

#### 5.5. Validation de l'hypothèse et recherche de solution au problème :

L'analyse de résultats d'essais permet d'identifier une combinaison optimale des facteurs qui n'a pas forcément fait l'objet d'un essai dans le plan. Il faudra alors tester la combinaison optimale, qui n'a pas été faite dans le plan d'expérience, ce qui arrive fréquemment. Avec cet essai final, on rejettera ou pas le modèle proposé.

De plus, quand on arrive à l'étape de l'analyse finale, il faut vérifier le résultat obtenu par l'analyse est plausible ou non.

Dans l'essai de validation, soit l'essai confirme les informations :

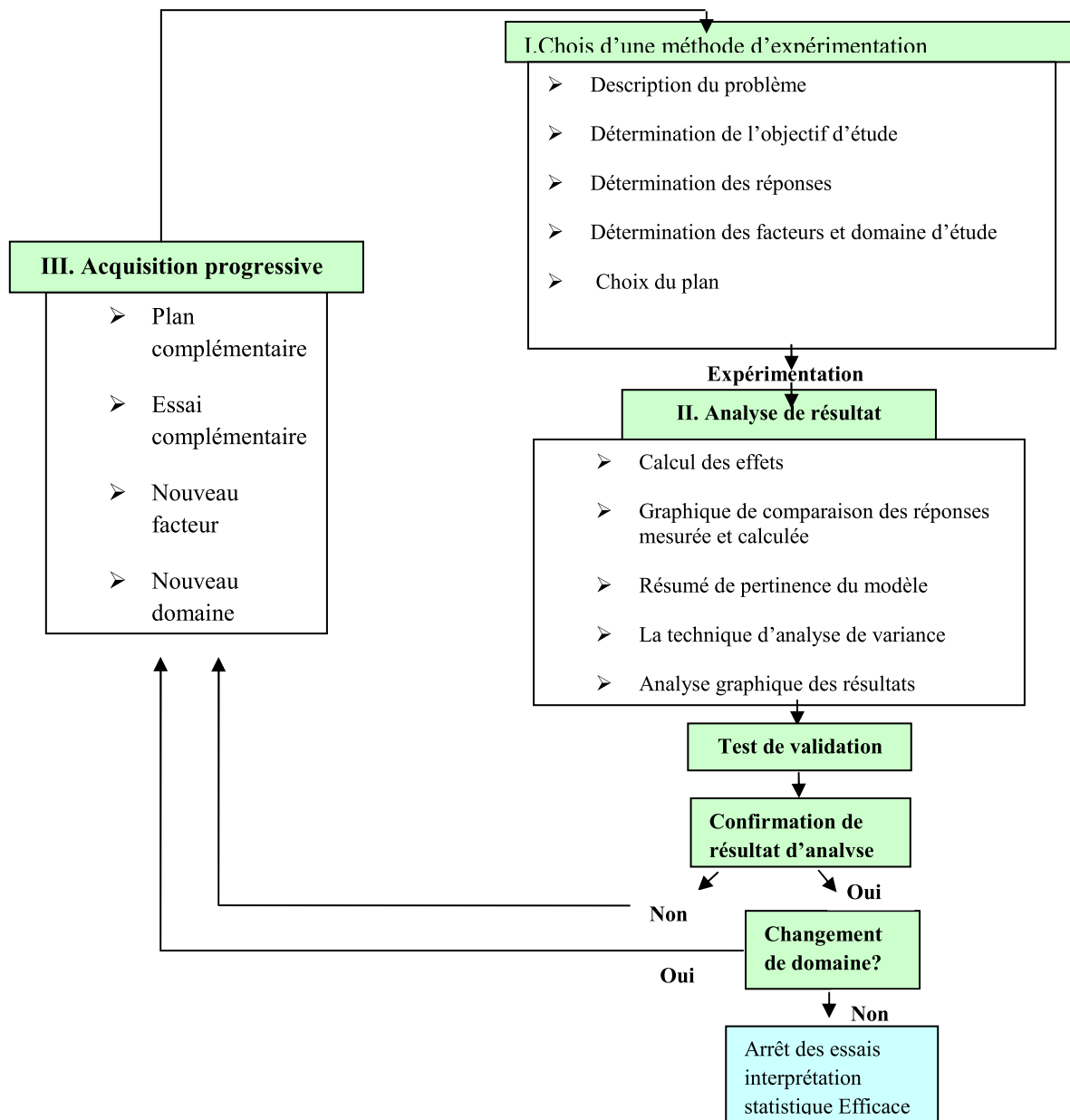
- Si oui, le plan d'expériences aura joué son rôle et permis de mettre en évidence les facteurs influents et/ou d'optimiser et la réponse, c'est-à-dire trouver les valeurs des facteurs qui donnent la réponse optimale.
- Si non, il faudra alors examiner les conditions dans lesquelles a été oublié ou s'il ne se cache pas un effet d'interaction entre deux facteurs ou encore d'autres choses.

## 6. Acquisition progressive des connaissances :

A ce stade, l'expérimentateur désire de l'information supplémentaire et en fonction de l'analyse du premier résultat obtenu ; il choisira sa stratégie

- Plan complémentaire : pour désaliaser les effets principaux et les interactions qui pouvaient présenter des ambiguïtés
- Essai complémentaire
- Niveaux de facteur : lorsque les facteurs préfixées deviennent actifs
- Nouveau domaine : le choix d'un nouveau domaine d'étude peut provenir de plus raison le domaine initial était trop grand ou il était trop petit, le domaine initial ne contient pas des résultats intéressants,

La démarche de la méthodologie de plan d'expérience est résumée dans le schéma général suivant. [69]



**Schéma 1:** la démarche de la méthodologie de plan d'expérience. [69]

## 7. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons présenté la méthodologie des plans d'expériences, leurs utilisations et leurs intérêts permettant la recherche d'un optimum dans un domaine d'étude. Ce que nous permis par la suite, l'application de cette méthodologie dans l'étude de l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* dans le but :

1. Connaître l'influence des différents paramètres réactionnels sur le fonctionnement de l'enzyme.
2. Comparer cette méthode avec une autre qui les réseaux de neurones.

***Chapitre 3 :***  
*Les réseaux de neurones*

## 1. Introduction :

Les réseaux de neurones connaissent depuis quelques années un succès croissant dans divers domaines des sciences, celui de la chimie n'échappe pas à cette règle. Dans ce chapitre, nous nous intéressons à l'application des réseaux de neurones à la chimie.

Dans un premier temps, nous rappellerons les définitions et notations de base relatives aux réseaux de neurones. Nous poursuivrons en exposant les types et la méthodologie d'apprentissage.

Nous présenterons aussi, d'une manière générale, les étapes de conception d'un réseau de neurones : le choix des entrées sorties, l'élaboration de la base des données, de la structure de réseau etc.....

A la fin de ce chapitre, nous terminerons par établir les différentes méthodes de validation.

## 2. Historique :

Les premiers travaux sur les neurones artificiels ont débuté au début des années 1940 et ont été menés par McCulloch et Pitts. Ils ont donné une présentation d'un modèle simplifié de neurone biologique communément appelé neurone formel. Ils montrèrent également théoriquement que des réseaux de neurones formels simples peuvent réaliser des fonctions logiques. [70]

Dix années plus tard, le premier modèle réel d'un réseau de neurones a été constitué.

En 1958, F. Rosenblatt développe le modèle du perceptron. C'est un réseau de neurone inspiré du système visuel. Il possède deux couches de neurones : une couche de perception (sert à recueillir les entrées) et une couche de décision. C'est le premier modèle pour lequel un processus d'apprentissage a pu être défini.

En 1969, les recherches sur les réseaux de neurones ont été pratiquement abandonnées lorsque M. Minsky et S. Papert ont publié leur livre « perceptrons » et démontré les limites théoriques du perceptron, en particulier, l'impossibilité de traiter les problèmes non linéaires par ce modèle.

La disponibilité croissante des minis et microordinateurs, vers la fin des années 1970, a permis aux réseaux de neurones de prendre un nouveau départ.

Une révolution survient alors dans le domaine des réseaux de neurones artificiels : une nouvelle génération de réseaux de neurones, capables de traiter avec succès des phénomènes non-linéaires : le perceptron multicouche ne possède pas les défauts mis en évidence par Minsky. Proposé pour la première fois par Werbos, le perceptron Multi-Couche apparaît en 1986 introduit par Rumelhart, et, simultanément, sous une appellation voisine. [71]

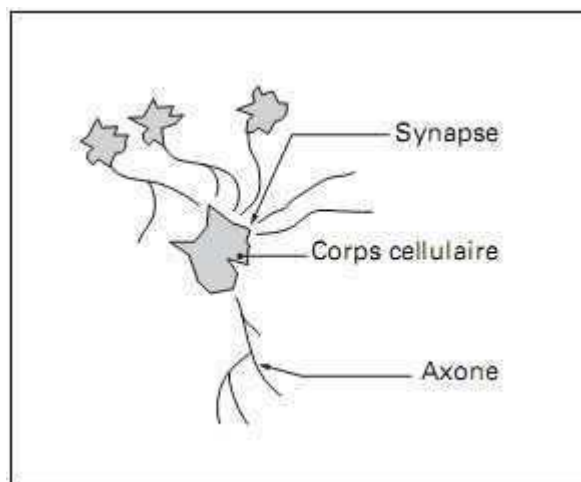
De nos jours, l'utilisation des réseaux dans divers domaines ne cesse de croître. Les applications en sont multiples et variées.

### 3. les réseaux de neurones :

#### 3.1. Les neurones biologiques :

Le neurone biologique (Figure 1) est une cellule vivante spécialisée dans le traitement des signaux électriques.

Les neurones sont reliés entre eux par des liaisons appelées axones. Ces axones vont eux-mêmes jouer un rôle important dans le comportement logique de l'ensemble. Ils conduisent les signaux électriques de la sortie d'un neurone vers l'entrée (synapse) d'un autre neurone. Les neurones font une sommation des signaux reçus en entrée et en fonction du résultat obtenu vont fournir un courant en sortie.



**Figure 1** : Le neurone biologique.

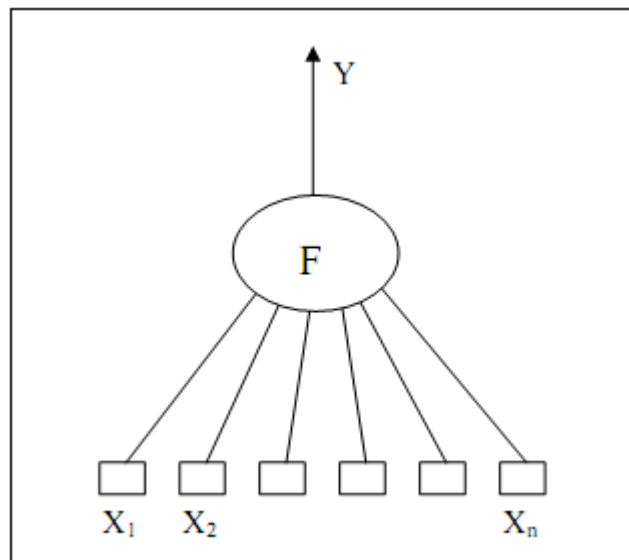
### 3.2. Principe du neurone artificiel :

Le neurone artificiel est un processeur élémentaire. Il reçoit un nombre variable d'entrées en provenance de neurones appartenant à un niveau situé en amont. À chacune de ces entrées est associé un poids ( $w$ ) représentatif de la force de la connexion.

Chaque processeur élémentaire (neurone) est doté d'une sortie unique, qui se ramifie pour alimenter un nombre variable de neurones appartenant à un niveau situé en aval. À chaque connexion d'entrée est associé un poids.

Il est commode de représenter graphiquement un neurone comme indiqué sur la figure 2.

Cette représentation est à l'origine de la première vague d'intérêt pour les neurones formels, dans les années 1940 à 1970. [72]

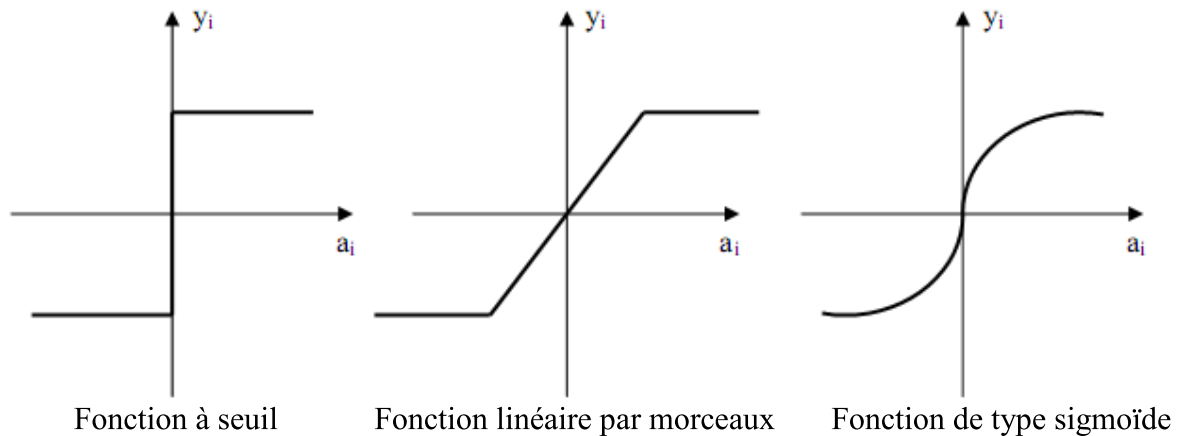


**Figure 2 :** Neurone artificiel.

Le neurone réalise alors trois opérations sur ses entrées :

- pondération : multiplication de chaque entrée par un paramètre appelé poids de connexion,
- Sommation : une sommation des entrées pondérées est effectuée
- Activation : passage de cette somme dans une fonction, appelée fonction d'activation.

La valeur calculée est la sortie du neurone qui est transmise aux neurones suivants.



**Figure 3 :** Différents types de fonction de transfert pour le neurone artificiel.

La fonction  $f$  est appelée fonction d'activation (Figure 3). Elle peut être une fonction à seuil, une fonction linéaire ou non linéaire. La fonction sigmoïde se présente comme une approximation continûment dérivable de la fonction d'activation linéaire par morceaux ou de la fonction seuil. Elle présente l'avantage d'être régulière, monotone, continûment dérivable, et bornée entre 0 et 1 :

$$f(x) = \frac{1}{1 + \exp(-x)}$$

La fonction  $f$  peut être paramétrée de manière quelconque. Deux types de paramétrages sont fréquemment utilisés :

.Les paramètres sont attachés aux entrées du neurone : la sortie du neurone est une fonction non linéaire d'une combinaison des entrées  $\{x_i\}$  pondérées par les paramètres  $\{w_i\}$ , qui sont alors souvent désignés sous le nom de poids.

$$y = \text{th} \left[ w_0 + \sum_{i=1}^{n-1} w_i x_i \right]$$

Les paramètres sont attachés à la non-linéarité du neurone : ils interviennent directement dans la fonction  $f$  ;

### 3.3. Définition :

Un réseau de neurones peut être considéré comme un modèle mathématique de traitement réparti, composé de plusieurs éléments de calcul non linéaire (neurones), opérant en parallèle et connectés entre eux par des poids.

Les réseaux de neurones artificiels sont des réseaux fortement connectés de processeurs élémentaires fonctionnant en parallèle. Chaque processeur élémentaire calcule une sortie unique sur la base des informations qu'il reçoit.

Les neurones artificiels sont souvent utilisés sous forme de réseaux qui diffèrent selon le type de connections entre les neurones, une cinquantaine de types peut être dénombrée. En guise d'exemples nous citons : le perceptron de Rosembat, les réseaux de Hopfield etc.....

Ces derniers sont les plus utilisés dans le domaine de la modélisation et de la commande des procédés. Ils sont constitués d'un nombre fini de neurones qui sont arrangés sous forme de couches. Les neurones de deux couches adjacentes sont interconnectés par des poids. L'information dans le réseau se propage d'une couche à l'autre, on dit qu'ils sont de type « feed-forward ». Nous distinguons trois types de couches :

Couche d'entrée : les neurones de cette couche reçoivent les valeurs d'entrée du réseau et les transmettent aux neurones cachés. Chaque neurone reçoit une valeur, il ne fait pas donc de sommation.

Couches cachées : chaque neurone de cette couche reçoit l'information de plusieurs couches précédentes, effectue la sommation pondérée par les poids, puis la transforme selon sa fonction d'activation qui est en général une fonction sigmoïde. Par la suite, il envoie cette réponse aux neurones de la couche suivante.

Couche de sortie : elle joue le même rôle que les couches cachées, la seule différence entre ces deux types de couches est que la sortie des neurones de la couche de sortie n'est liée à aucun autre neurone.

### **3.4. Architecture des réseaux de neurones :**

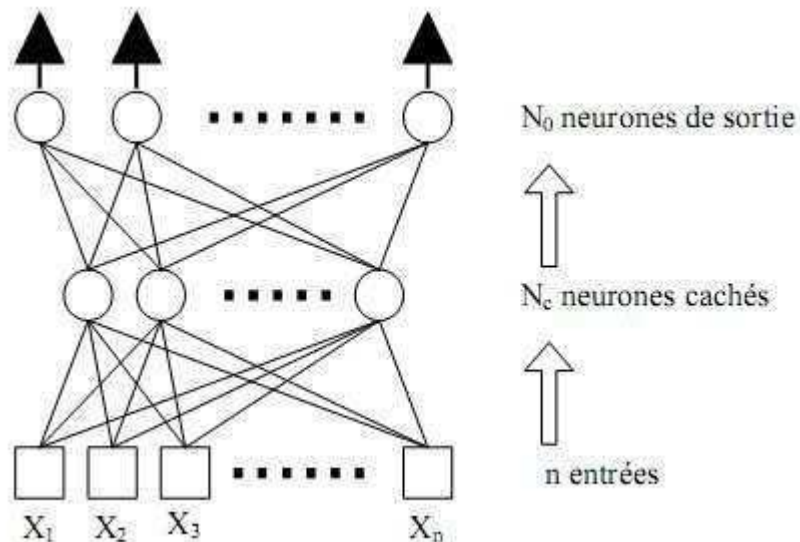
On distingue deux structures de réseau, en fonction du graphe de leurs connexions, c'est-à-dire du graphe dont les nœuds sont les neurones et les arêtes les «connexions» entre ceux-ci :

- Les réseaux de neurones statiques (ou acycliques, ou non bouclés).
- Les réseaux de neurones dynamiques (ou récurrents, ou bouclés).

### 3.4.1. Les réseaux de neurones non bouclés :

Un réseau de neurones non bouclé réalise une (ou plusieurs) fonction algébrique de ses entrées par composition des fonctions réalisées par chacun de ses neurones. Dans un tel réseau (Figure 4), le flux d'information circule des entrées vers les sorties sans retour en arrière. Si l'on représente le réseau comme un graphe dont les nœuds sont les neurones et les arêtes les « connexions » entre ceux-ci, le graphe d'un réseau non bouclé est acyclique. Tout neurone dont la sortie est une sortie du réseau est appelé « neurone de sortie ». Les autres, qui effectuent des calculs intermédiaires, sont des « neurones cachés ».

Il existe deux types de réseaux de neurones : les réseaux complètement connectés et les réseaux à couche. Le réseau de neurones à une couche cachée et une sortie linéaire est un cas particulier de ce dernier type.



**Figure 4 :** Réseau de neurones à  $n$  entrées, une couche de  $N_c$  neurones cachés et  $N_0$  neurones de sortie.

### 3.4.2. Les réseaux de neurones bouclés :

L'architecture la plus générale pour un réseau de neurones est le « réseau bouclé », dont le graphe des connexions est cyclique : lorsqu'on se déplace dans le réseau en suivant le sens des connexions, il est possible de trouver au moins un chemin qui revient à son point de départ (un tel chemin est désigné sous le terme de « cycle »). La sortie d'un neurone du réseau peut donc être fonction d'elle-même; cela n'est évidemment concevable que si la notion de temps est explicitement prise en considération.

Ainsi, à chaque connexion d'un réseau de neurones bouclé (ou à chaque arête de son graphe) est attaché, outre un poids comme pour les réseaux non bouclés, un retard, multiple entier (éventuellement nul) de l'unité de temps choisie. Une grandeur, à un instant donné, ne pouvant pas être fonction de sa propre valeur au même instant, tout cycle du graphe du réseau doit avoir un retard non nul.

Les connexions récurrentes ramènent l'information en arrière par rapport au sens de propagation défini dans un réseau multicouche. Ces connexions sont le plus souvent locales. Pour éliminer le problème de la détermination de l'état du réseau par bouclage, on introduit sur chaque connexion « en retour » un retard qui permet de conserver le mode de fonctionnement séquentiel du réseau (Figure 5).

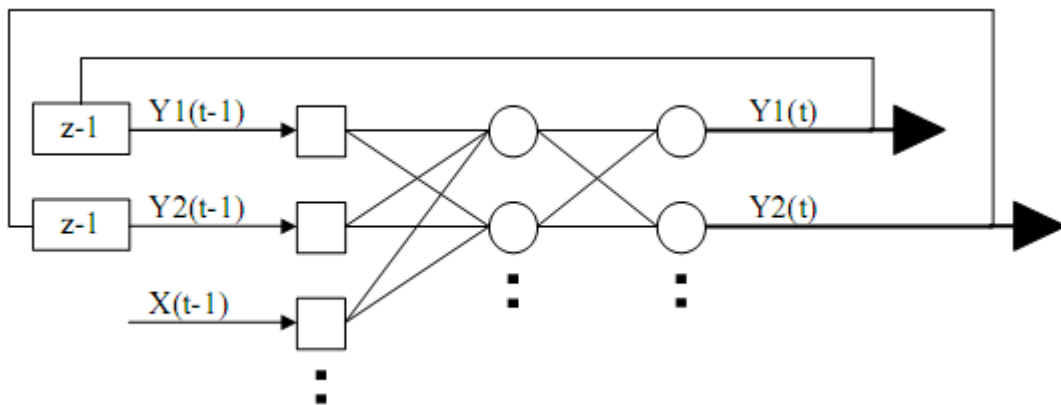


Figure 5 : Réseau de neurone bouclé.

#### 4. Modélisation à l'aide de réseaux de neurones :

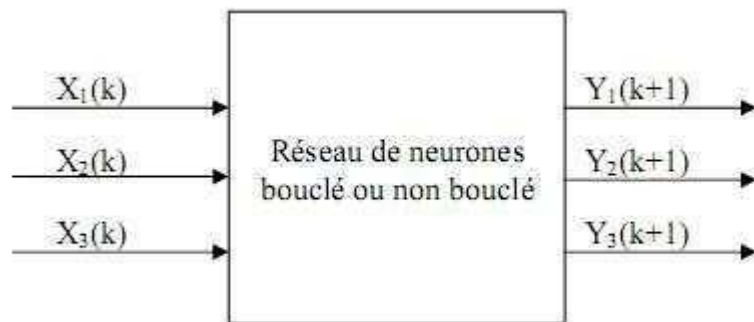
Deux principales stratégies de modélisation qui emploient des réseaux de neurones peuvent être distinguées: la première appelée l'approche par boîte noire, quand le processus entier est représenté avec réseau neuronal approprié, et l'approche hybride qui est une combinaison de la modélisation traditionnelle du processus avec un réseau neuronal qui représente les phénomènes moins connus du processus.

##### 4.1. Modèle « boîte noire » :

Le terme de « boîte noire » s'oppose aux termes de « modèle de connaissance » ou « modèle de comportement interne » qui désignent un modèle mathématique établi à partir d'une analyse physique ( ou chimique, physico-chimique, économique, etc.) du processus que l'on étudie. Ce modèle peut contenir un nombre limité de paramètres ajustables, qui possèdent

une signification physique. Nous verrons par la suite que les réseaux de neurones peuvent être utilisés pour l'élaboration de modèle « boîte grise », intermédiaire entre les modèles « boîtes noires » et les modèles de connaissance.

Le modèle « boîte noire » (Figure 6) constitue la forme la plus primitive de modèle mathématique : il est réalisé uniquement à partir de données expérimentales ou d'observations; il peut avoir une valeur prédictive, dans un certain domaine de validité, mais il n'a aucune valeur explicative. Ainsi, le modèle de l'univers selon Ptolémée était un modèle « boîte noire » : il ne donnait aucune explication de la marche des astres, mais il permettait de la prédire avec toute la précision souhaitable au regard des instruments de mesure disponibles à l'époque.

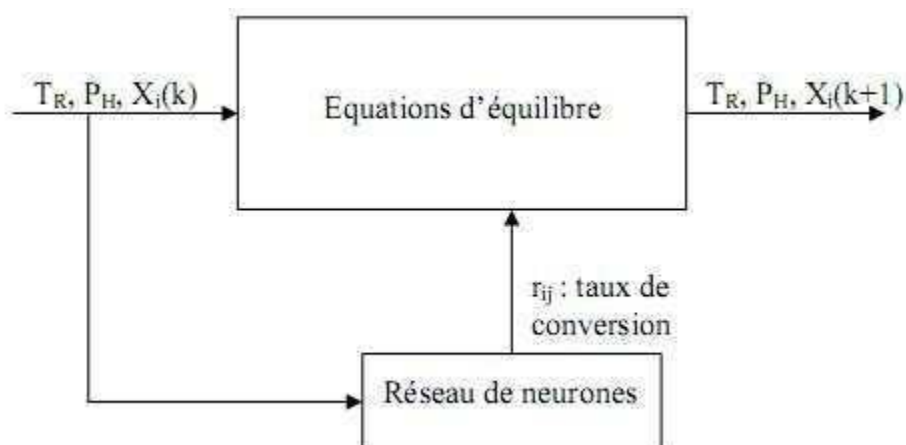


**Figure 6 :** Diagramme schématisant d'un modèle neuronal « boîte noire ».

Entre la boîte noire et le modèle de connaissance se situe le modèle semi-physique, ou modèle « boîte grise » (appelé aussi modèle hybride), qui contient à la fois des équations résultant d'une théorie, et des équations purement empiriques, résultant d'une modélisation de type « boîte noire ». [73]

#### 4.2. modèle « boîte grise » ou hybride :

Lorsque des connaissances, exprimables sous forme d'équations, sont disponibles, mais insuffisantes pour concevoir un modèle de connaissance satisfaisant, on peut avoir recours à une modélisation "boîte grise" (ou modélisation semi-physique) qui prend en considération à la fois les connaissances et les mesures. Une telle démarche peut concilier les avantages de l'intelligibilité d'un modèle de connaissance avec la souplesse d'un modèle comportant des paramètres ajustables.



**Figure 7 :** Diagramme schématisé de modèle neuronal hybride d'une réaction chimique.

La conception d'un modèle hybride exige que l'on dispose d'un modèle de connaissance, qui se présente habituellement sous la forme d'un ensemble d'équations algébriques, différentielles, et aux dérivées partielles, non linéaires couplées. Par la suite, on doit procéder à l'apprentissage de ce modèle (ou une partie de celui-ci) à partir de données obtenues par intégration numérique du modèle de connaissance, et de données expérimentales. [74]

### 5. Conception d'un réseau de neurones :

Les réseaux de neurones réalisent des fonctions non linéaires paramétrées. Leurs mises en œuvre nécessitent :

- La détermination des entrées et des sorties pertinentes, c'est à dire les grandeurs qui ont une influence significative sur le phénomène que l'on cherche à modéliser.
- La collecte des données nécessaires à l'apprentissage et à l'évaluation des performances du réseau de neurones.
- La détermination du nombre de neurones cachés nécessaires pour obtenir une approximation satisfaisante.
- La réalisation de l'apprentissage.
- L'évaluation des performances du réseau de neurones à l'issue de l'apprentissage.

#### 5.1. Détermination des entrées/sorties du réseau de neurones :

Pour toute conception de modèle, la sélection des entrées doit prendre en compte deux points essentiels :

Premièrement, la dimension intrinsèque du vecteur des entrées doit être aussi petite que possible, en d'autre terme, la représentation des entrées doit être la plus compacte possible,

tout en conservant pour l'essentiel la même quantité d'information, et en gardant à l'esprit que les différentes entrées doivent être indépendantes.

En second lieu, toutes les informations présentées dans les entrées doivent être pertinentes pour la grandeur que l'on cherche à modéliser : elles doivent donc avoir une influence réelle sur la valeur de la sortie.

## **5.2. Choix et préparation des échantillons :**

Le processus d'élaboration d'un réseau de neurones commence toujours par le choix et la préparation des échantillons de données. La façon dont se présente l'échantillon conditionne le type de réseau, le nombre de cellules d'entrée, le nombre de cellules de sortie et la façon dont il faudra mener l'apprentissage, les tests et la validation [75]. Il faut donc déterminer les grandeurs qui ont une influence significative sur le phénomène que l'on cherche à modéliser.

Lorsque la grandeur que l'on veut modéliser dépend de nombreux facteurs, c'est-à-dire lorsque le modèle possède de nombreuses entrées, il n'est pas possible de réaliser un « pavage » régulier dans tout le domaine de variation des entrées : il faut donc trouver une méthode permettant de réaliser uniquement des expériences qui apportent une information significative pour l'apprentissage du modèle. Cet objectif peut être obtenu en mettant en œuvre un plan d'expériences. Pour les modèles linéaires, l'élaboration de plans d'expériences est bien maîtrisée, par ailleurs, ce n'est pas le cas pour les modèles non linéaires.

Afin de développer une application à base de réseaux de neurones, il est nécessaire de disposer de deux bases de données, une pour effectuer l'apprentissage et l'autre pour tester le réseau obtenu et déterminer ses performances.

Notons qu'il n'y a pas de règle pour déterminer ce partage d'une manière quantitative, néanmoins chaque base doit satisfaire aux contraintes de représentativité de chaque classe de données et doit généralement refléter la distribution réelle, c'est à dire la probabilité d'occurrence des diverses classes.

### 5.3. Elaboration de la structure du réseau :

La structure du réseau dépend étroitement du type des échantillons. Il faut d'abord choisir le type de réseau : un perceptron standard, un réseau de Hopfield, un réseau à décalage temporel (TDNN), un réseau de Kohonen, un ARTMAP etc...

Par exemple, dans le cas du perceptron multicouches, il faudra aussi bien choisir le nombre de couches cachées que le nombre de neurones dans cette couche.

#### Nombre de couches cachées :

Mis à part les couches d'entrée et de sortie, il faut décider du nombre de couches intermédiaires ou cachées. Sans couche cachée, le réseau n'offre que de faibles possibilités d'adaptation. Néanmoins, il a été démontré qu'un Perceptron Multicouches avec une seule couche cachée pourvue d'un nombre suffisant de neurones, peut approximer n'importe quelle fonction avec la précision souhaitée. [76]

Chaque neurone peut prendre en compte des profils spécifiques de neurones d'entrée. Un nombre plus important permet donc de mieux "coller" aux données présentées mais diminue la capacité de généralisation du réseau. Il faut alors trouver le nombre adéquat de neurones cachés nécessaire pour obtenir une approximation satisfaisante.

### 5.4. Apprentissage :

L'apprentissage est un problème numérique d'optimisation. Il consiste à calculer les pondérations optimales des différentes liaisons, en utilisant un échantillon. La méthode la plus utilisée est la rétropropagation, qui est généralement plus économe que les autres en termes de nombres d'opérations arithmétiques à effectuer pour évaluer le gradient.

Pour rendre l'optimisation plus performante, on peut utiliser des méthodes de second ordre. Le calcul est très efficace, mais lourd. Elles ont de nombreuses limitations, quant aux conditions de convergence, sur les dérivées secondes. Des corrections sont proposées pour éviter ce problème, et sont prises en compte par les méthodes dites de Quasi-Newton ou de Newton modifiée.

Il a été observé que les poids calculés par la méthode de rétropropagation sont plus faibles que ceux obtenus par la technique de Quasi-Newton, ce qui semblerait montrer que la recherche d'un minimum par rétropropagation est restreinte à un voisinage immédiat des

poids initiaux, d'où une dépendance plus forte de cette méthode par rapport à l'initialisation [77]. C'est pour ces raisons que l'optimisation par une méthode Quasi-Newton a été largement utilisée dans certains travaux récents de modélisation de procédés de génie chimique [78], et a été choisie également dans la suite de nos travaux.

### **5.5. Validation et tests :**

Alors que les tests concernent la vérification des performances d'un réseau de neurones hors échantillon et sa capacité de généralisation, la validation est parfois utilisée lors de l'apprentissage. Une fois le réseau de neurones développé, des tests s'imposent afin de vérifier la qualité des prévisions du modèle neuronal.

Cette dernière étape doit permettre d'estimer la qualité du réseau obtenu en lui présentant des exemples qui ne font pas partie de l'ensemble d'apprentissage. Une validation rigoureuse du modèle développé se traduit par une proportion importante de prédictions exactes sur l'ensemble de la validation.

Si les performances du réseau ne sont pas satisfaisantes, il faudra, soit modifier l'architecture du réseau, soit modifier la base d'apprentissage.

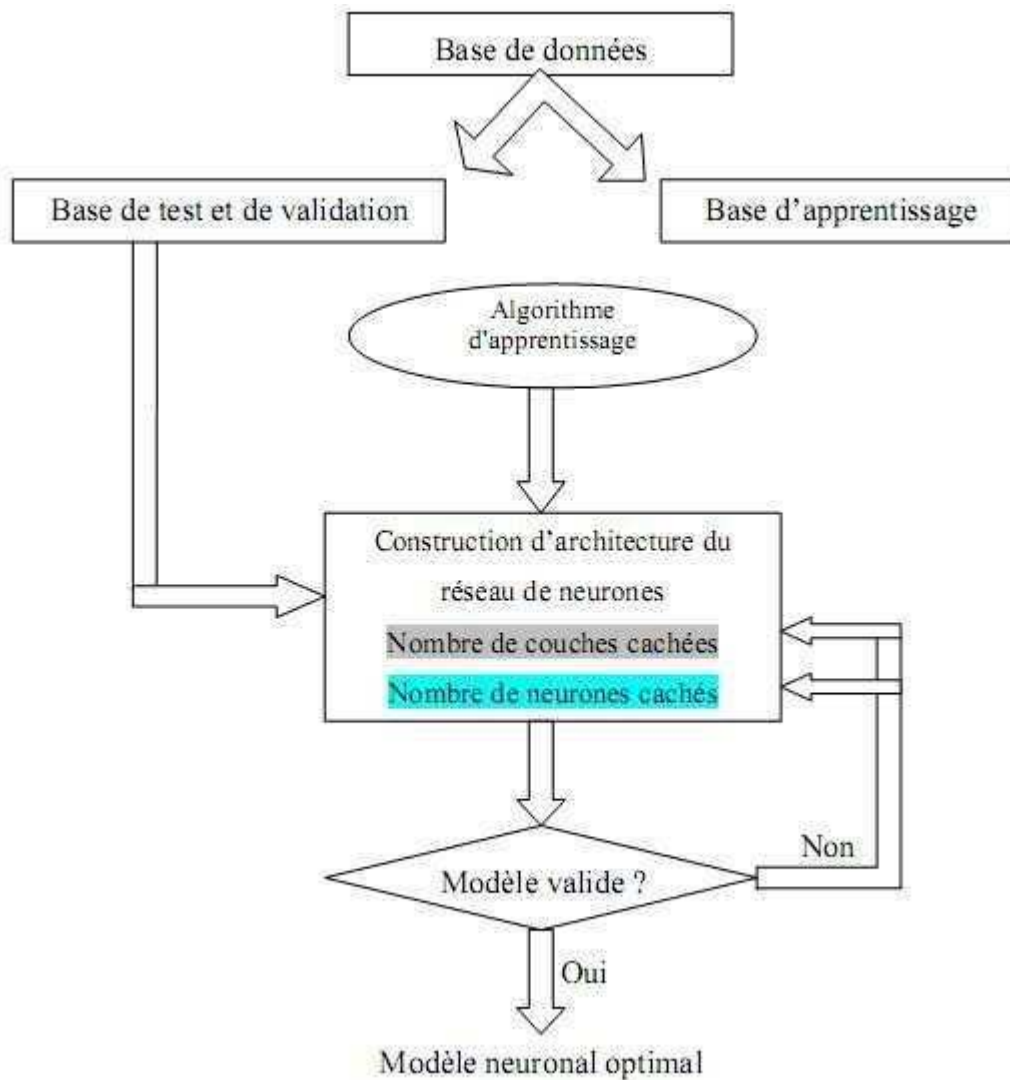


Figure 8 : Organigramme de conception d'un réseau de neurones.

## 6. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons introduit les définitions essentielles relatives aux réseaux de neurones. Nous avons aussi mis l'accent sur l'utilisation des réseaux de neurones comme outils de modélisation par apprentissage. Nous avons présenté les concepts fondamentaux de la modélisation à l'aide de réseaux de neurones et une méthodologie complète de conception et de mise en œuvre de modèles neuronaux.

# *Deuxième partie*

## *Etude de l'immobilisation de la CRL sur Célite par les plans d'expérience et les réseaux de neurones.*

- *Chapitre 1 : Résultats et discussion.*
- *Chapitre 2 : Matériels & Méthodes.*

***Chapitre 1 :***  
***Résultats et discussion***

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'influence des conditions d'immobilisation sur l'énantiosélectivité de la lipase de *Candida rugosa*. Dans ce cas nous avons effectué l'optimisation des conditions expérimentales de l'immobilisation. Pour cela nous avons fait appel à la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) pour l'analyse et le traitement des données expérimentales obtenues et à la méthodologie des réseaux de neurones (ANN) comme méthode comparative.

## **1. Présentation de l'étude de l'immobilisation de la CRL sur Célite**

### **1.1. Description de l'étude**

L'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* par adsorption sur Célite, est réalisée par la rétention de la lipase dans la Célite grâce à des liaisons de Van der Waals et des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles). Cette immobilisation est effectuée en variant les conditions expérimentales telles que le temps, la température, et la quantité enzyme/support.

### **1.2. Objectif de l'étude**

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence des conditions expérimentales de l'immobilisation de l'enzyme (temps, température et le rapport enzyme/support) sur l'énantiosélectivité de la CRL et les optimiser afin d'aboutir des meilleurs énantiomères. Pour optimiser les conditions expérimentales de l'immobilisation nous avons fait appel à la méthode des plans d'expériences.

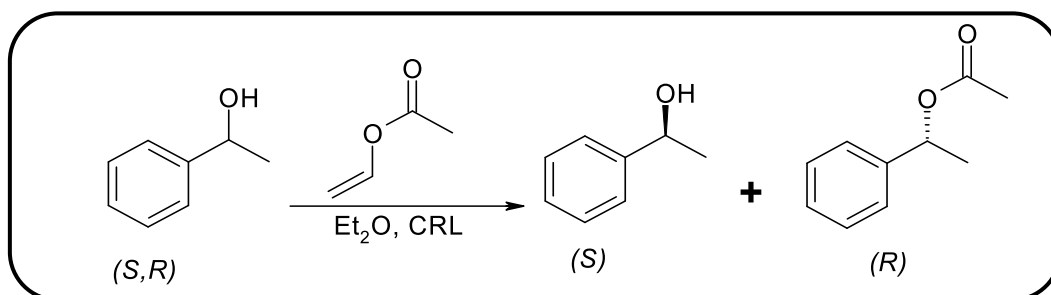
## **2. La Méthodologie des plans d'expérience**

La méthodologie des plans d'expérience se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira nécessairement à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats. La démarche de cette méthodologie peut se décomposer en trois étapes :

- 1) choix d'une méthode d'expérimentation,
- 2) l'analyse des résultats,
- 3) l'acquisition progressive des connaissances.

## 2.1. Détermination des réponses

La réponse choisie dans cette étude est l'énantiosélectivité « *E* » mesurée lors de la réaction transestérification du 1-phényléthanol racémique par l'acétate de vinyle. Cette réaction modèle est souvent utilisée pour évaluer l'activité et l'énantiosélectivité des lipases. [79]



**Schéma 1.** Acylation du (*R,S*)-1-phényléthanol par l'acétate de vinyle

## 2.2. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Le choix des facteurs explicatives, qui construiront le modèle exprimant l'équation mathématique de la réponse *y* qui représente l'énantiosélectivité « *E* », a été fait à partir de la bibliographie [80]. Le domaine d'étude du plan d'expérience est représenté ci-dessous.

**Tableau 1 :** Facteurs choisis et domaine d'étude.

Facteurs	Niveau bas	Niveau haut
Temps (minutes) ( $X_1$ )	30	90
Température (°C) ( $X_2$ )	0	20
Rapport enzyme/support (g/1g) ( $X_3$ )	0,3	0,5

## 2.3. Choix du Plan d'expérience

Parmi les nombreux plans d'expériences du second degré, nous avons choisi le plan de Box-Behnken qui ne nécessite pas un grand nombre d'essais. Il est facile à mettre en œuvre et déjà décrit dans des études similaires [81], [82]. Le plan de Box-Behnken comporte donc 15 essais (Tableau 2).

**Tableau 2.** Matrice d'expériences effectuée par le plan Box-Behnken dans l'étude de l'immobilisation de la CRL sur céliste.

Essais	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	90	20	0,4
2	90	0	0,4
3	30	20	0,4
4	30	0	0,4
5	90	10	0,5
6	90	10	0,3
7	30	10	0,5
8	30	10	0,3
9	60	20	0,5
10	60	20	0,3
11	60	0	0,5
12	60	0	0,3
13	60	10	0,4
14	60	10	0,4
15	60	10	0,4

#### 2.4. Principe de l'immobilisation et collecte des données

Les essais ont été réalisés conformément à la matrice des expériences (**Tableau 2**). L'immobilisation est réalisée comme suit : on dissout (0,3-0,5) g de CRL dans 4ml de solution tampon phosphate (pH 7), puis on ajoute 1g de support et on laisse agiter pendant (30-90 minutes) à température (0-20°C). L'enzyme immobilisée est filtrée puis lavée avec 20ml de solution tampon puis séchée à pression réduite dans le dessiccateur, jusqu'à ce que sa masse devienne constante. On récupère l'enzyme immobilisée, et on l'utilise dans la réaction de transestérification.

Les réactions ont été suivies par CPG chirale. L'attribution des configurations absolues R et S de l'ester formé et de l'alcool résiduel, a été établie selon des travaux rapportés dans la littérature. [79]

Pour chaque essai, on mesure le rendement d'immobilisation, l'excès énantiomérique, la conversion, et le facteur d'énantiosélectivité de la lipase immobilisée correspondante.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Résultats du plan d'expérience.

<b>Essai</b>	<b>Rendement d'immobilisation (%)</b>	<b>ee<sub>s</sub>%</b>	<b>ee<sub>p</sub>%</b>	<b>C (%)</b>	<b><i>E</i></b>
<b>1</b>	54,05	13,08	53,03	19,79	3,35
<b>2</b>	57,19	10,39	48,02	17,79	3,02
<b>3</b>	45,12	06,05	54,59	9,98	3,48
<b>4</b>	48,24	0,52	53,45	0,97	3,39
<b>5</b>	67,43	0,28	56,68	0,49	3,61
<b>6</b>	46,89	51,98	48,00	52,1	1,04
<b>7</b>	39,37	4,13	55,86	6,89	2,80
<b>8</b>	26,94	4,13	53,75	7,14	3,40
<b>9</b>	49,02	83,07	55,92	59,76	5,27
<b>10</b>	35,47	50,08	93,22	25,90	3,35
<b>11</b>	52,56	19,98	60,50	24,83	4,26
<b>12</b>	33,28	4,13	62,90	6,17	4,29
<b>13</b>	51,87	7,68	56,26	12,01	3,59
<b>14</b>	53,10	4,13	27,19	13,20	2,23
<b>15</b>	49,81	4,13	50,36	7,59	2,98

### 3. la méthodologie de surface de réponses (RSM)

#### 3.1. Analyse et traitement des données expérimentales

Le traitement statistique et l'analyse des données expérimentales obtenues ont été effectués à l'aide du logiciel Minitab. Le traitement statistique des données du tableau 3, permet d'estimer les coefficients du modèle (tableau 4).

**Tableau 4.** Coefficients estimés pour  $E$ .

Terme	Coefficient	Probabilité ( $P < \alpha = 0.05$ )
<b>constante</b>	14,5469	0,023*
<b>Temps (<math>X_1</math>)</b>	-0,0358	0,469
<b>Température (<math>X_2</math>)</b>	-0,3968	0,019*
<b>E/S (<math>X_3</math>)</b>	-46,4444	0,069
<b>Temps * temps (<math>X_1^2</math>)</b>	-0,0007	0,05*
<b>Température * Température (<math>X_2^2</math>)</b>	<b>0,0098</b>	<b>0,01*</b>
<b>E/S * E/S (<math>X_3^2</math>)</b>	38,1535	0,176
<b>Temps * Température (<math>X_1 * X_2</math>)</b>	0,0002	0,802
<b>Temps * E/S (<math>X_1 * X_3</math>)</b>	0,2642	0,019*
<b>Température * E/S (<math>X_2 * X_3</math>)</b>	0,4882	0,029*

\*: corrélation significative au niveau de confiance de 95% ( $P < 0,05$ ).

$R^2 = 91,4\%$ ,  $R^2_{aj.} = 76\%$ .

Ces résultats, montrent que parmi tous les facteurs étudiés, seul la température ( $X_2$ ) qui a une influence significative sur la réponse au niveau de confiance choisi ( $\alpha = 0,05$ ). On constate aussi que cet effet est négatif. Il existe d'autres termes significatifs, niveau de confiance 95 % ( $P \leq 0,05$ ), qui sont: le carré du temps ( $X_1^2$ ), celui de la température ( $X_2^2$ ) et les interactions ( $X_1 * X_3$ ) et ( $X_2 * X_3$ ).

### 3.2. Equation du modèle mathématique

L'analyse des résultats expérimentaux obtenus, effectuée à l'aide du logiciel Minitab, a permis de calculer un modèle mathématique qui exprime l'énantiosélectivité en fonction des différents facteurs expérimentaux (Eq. 1).

$$y = 14,5469 - 0,3968 x_2 - 0,0007 x_1^2 + 0,0098 x_2^2 + 0,2642 x_1 * x_3 + 0,4882 x_2 * x_3 \quad (\text{Eq.1})$$

### 3.3. Analyse de la variance pour *E* (ANOVA)

Nous constatons à travers l'analyse du tableau 4 et celle de l'ANOVA (tableau 5), que malgré l'effet significatif de la température ( $X_2$ ) le modèle linéaire est insuffisant pour expliquer le phénomène étudié et ceci est exprimé par la valeur  $p = 0,055 > \alpha = 0,05$ . Tandis que les effets quadratiques sont significatifs, de même pour les effets des interactions.

**Tableau 5** : Analyse de variance pour *E* (ANOVA).

Source	DL	SCT	SCM	F	P
<b>régression</b>	9	11,5931	1,28812	5,96	0,032
<b>linéaire</b>	3	2,4108	1,10627	5,12	0,055
<b>carré</b>	3	5,7002	1,90008	8,79	0,019
<b>interaction</b>	3	3,4821	1,1607	5,37	0,050
<b>erreur résiduelle</b>	5	1,081	0,2162	0,2162	
<b>Inadéquation de l'ajustement</b>	3	0,1507	0,05024	0,11	0,948
<b>erreur pure</b>	2	0,9303	0,46515	0,46515	
<b>totale</b>	14	12,6741			

On constate aussi que le test de courbure est non significatif ( $P= 0,948 > 0,05$ ), ce qui signifie un meilleur ajustement du modèle quadratique et que le phénomène étudié peut être expliqué par ce modèle.

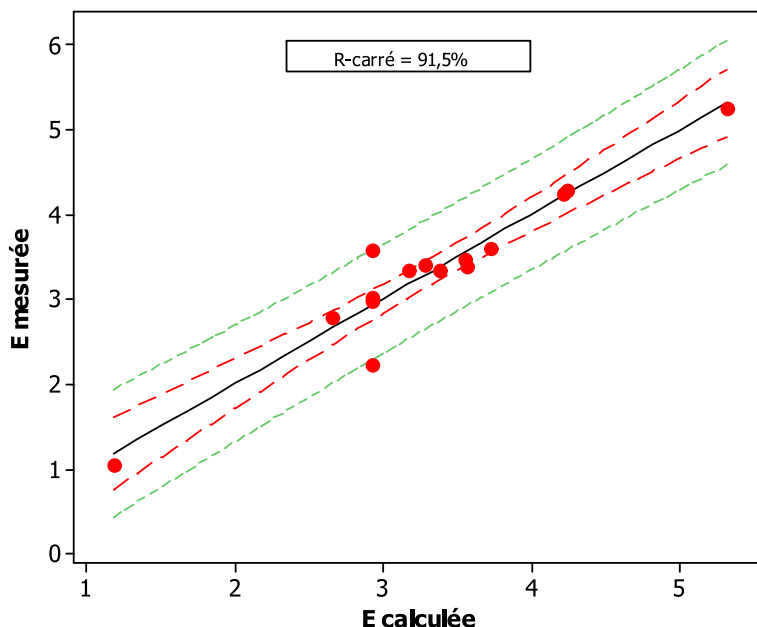
### 3.4. Validation du modèle

Pour la validation du modèle obtenu nous tracé la courbe de linéarité (figure 1) entre les valeurs expérimentales de  $E$  et celles estimées par le modèles. Ces valeurs sont représentées dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Les valeurs expérimentales et les valeurs estimées par le modèle.

<b>essai</b>	<b>E mesurée</b>	<b>E calculée</b>
<b>1</b>	3,3932	3,5664
<b>2</b>	3,0165	2,9300
<b>3</b>	3,4771	3,5636
<b>4</b>	3,3464	3,1732
<b>5</b>	3,4020	3,2816
<b>6</b>	1,0434	1,1827
<b>7</b>	2,7984	2,6591
<b>8</b>	3,6107	3,7311
<b>9</b>	4,2929	4,2401
<b>10</b>	3,3500	3,3839
<b>11</b>	4,2607	4,2267
<b>12</b>	5,2705	5,3233
<b>13</b>	3,5932	2,9358
<b>14</b>	2,2316	2,9358
<b>15</b>	2,9824	2,9358

La comparaison entre ces deux résultats montre qu'on a une très bonne estimation du modèle comme le montre le graphe de la courbe d'ajustement ci-dessous (**Figure 1**) :



**Figure 1** : Représentation graphique des réponses mesurées en fonction des réponses calculées.

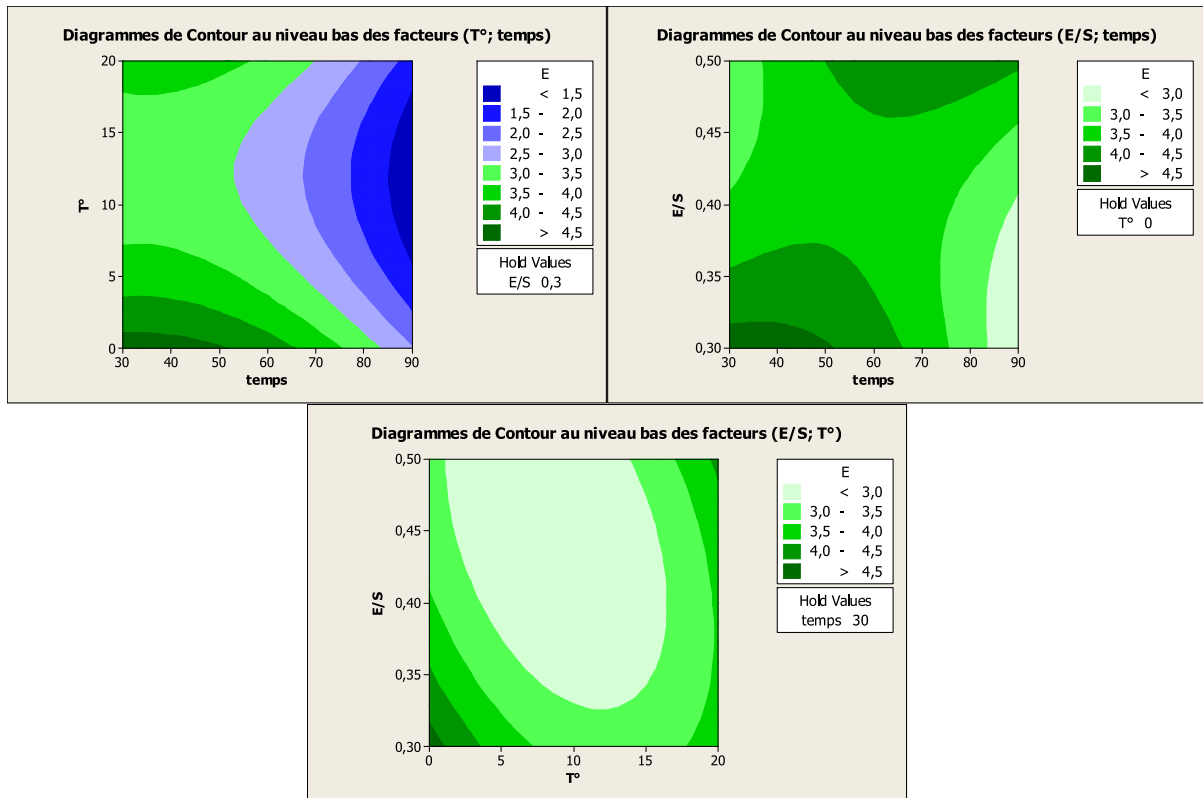
### 3.5. Optimisation

Elle consiste à trouver les valeurs des facteurs qui donnent la meilleure énantiosélectivité. Elle est faite par l'analyse des diagrammes de contour (**Figure 2**), qui sont les projections des courbes tridimensionnelles des surfaces de réponse. Ces derniers nous permettent d'évaluer la relation entre l'énantiosélectivité et les différents facteurs et leurs interactions.

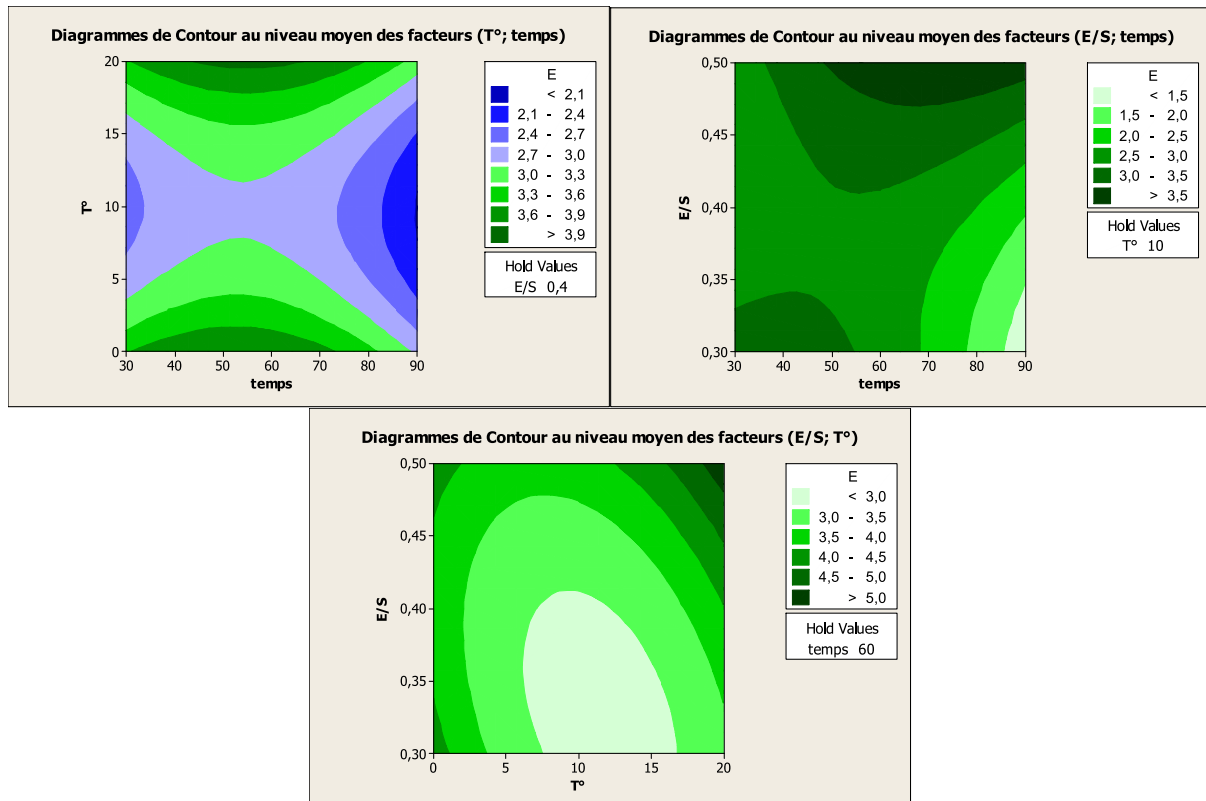
Ils sont générés par le logiciel Minitab par la combinaison des 3 facteurs. A chaque fois un des facteurs est fixé aux 3 niveaux, haut, bas et moyen, et la réponse (axe z) est évaluée par rapport aux deux autres (x et y).

D'après les diagrammes de contour obtenus, il apparaît clairement que les plus fortes valeurs du coefficient d'énantiosélectivité  $E$ , sont obtenues lorsque les facteurs sont fixés au niveau max du domaine d'étude où la valeur de  $E > 5$ .

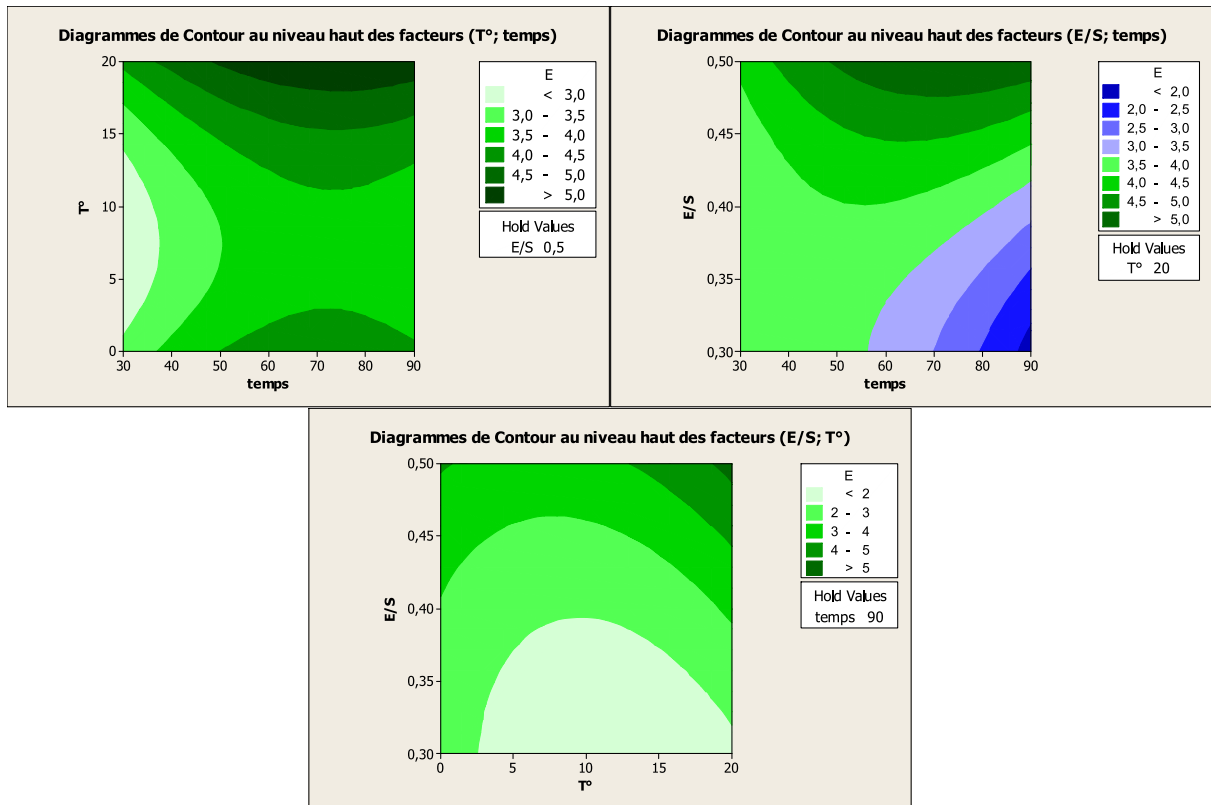
### 1. Diagrammes de Contour au niveau bas des facteurs :



### 2. Diagrammes de Contour au niveau moyen des facteurs :



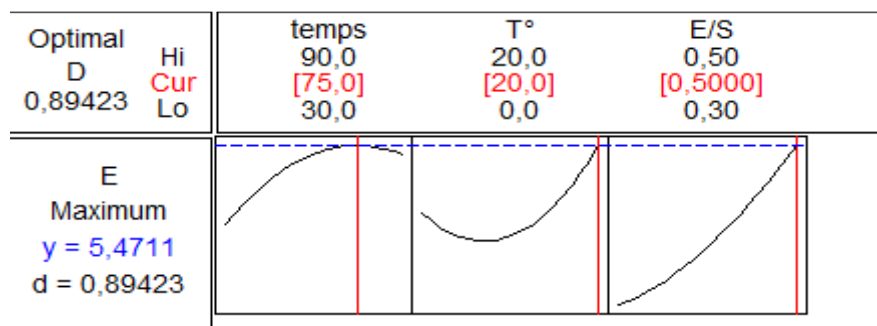
### 3. Diagrammes de Contour au niveau haut des facteurs :



**Figure 2 :** Diagrammes des contours représentant les effets des différents facteurs sur l'énantiosélectivité  $E$ .

Après avoir évalué l'optimum du domaine expérimental qui donne les meilleures valeurs de la réponse, nous avons cherché à optimiser théoriquement l'énantiosélectivité  $E$ .

La valeur précise de l'optimum théorique, correspondant à la valeur maximale de  $E$ , ainsi que les valeurs des facteurs permettant de l'atteindre ont été déterminées à l'aide de la fonction « désirabilité » du logiciel (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Optimisation par la fonction Désirabilité de la valeur théorique de  $E$ .

Comme le montre la figure 3, la valeur du coefficient d'énantiosélectivité  $E$  maximale est estimée théoriquement à  $E = 5,5$  avec une désirabilité acceptable ( $d = 0.89$  proche de 1). Cette valeur correspond niveau max du domaine d'étude pour les facteurs : température et quantité enzyme/support, tandis que le temps a été optimisé théoriquement à 75mn.

Avant de procéder à une validation expérimentale nous avons fait une étude comparative en utilisant une autre méthode de traitement et d'analyse c'est la méthodologie des réseaux de neurones (ANN), afin de voir si on ne peut pas améliorer le modèle calculé par la RSM.

#### **4. La méthodologie des réseaux de neurones (ANN)**

Un réseau de neurones peut être considéré comme un modèle mathématique de traitement réparti et composé de plusieurs éléments de calcul non linéaire (neurone). De nombreux procédés ont pu être modélisés par des réseaux neurones avec des résultats satisfaisants dans le but de mettre en place des stratégies de conduite optimale. [83]

##### **4.1. Choix des entrées/sorties du réseau de neurones**

Comme dans le cas la méthodologie des surfaces de réponses, nous allons modéliser l'énantiosélectivité  $E$  en fonction des conditions d'immobilisation :

- Les entrées seront : le temps d'immobilisation avec une dimension de 30 à 90 minutes, la température avec une dimension de 0 à 20°C et le rapport enzyme/support avec une dimension de 0,3 à 0,5.
- La sortie sera : le facteur de l'énantiosélectivité  $E$  de l'enzyme immobilisée.

Les données nécessaires à l'apprentissage et à l'évaluation des performances du réseau de neurones sont dans le tableau suivant.

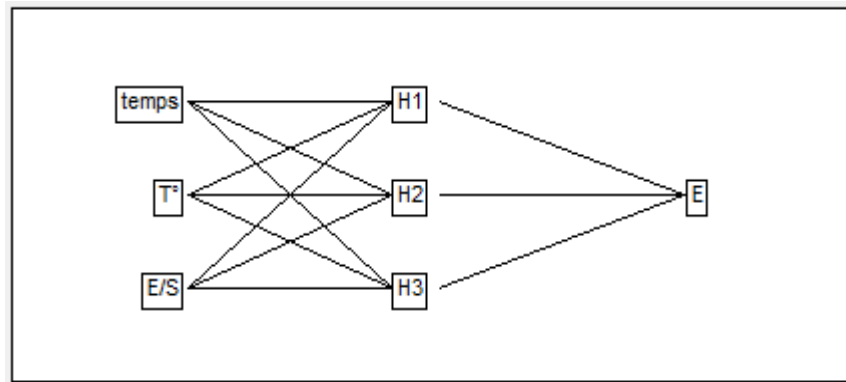
**Tableau 7** : la matrice d'apprentissage

<b>Essai</b>	<b>Temps</b>	<b>T°</b>	<b>E/S</b>	<b><i>E</i></b>
<b>1</b>	30	0	0,4	3,3932
<b>2</b>	90	0	0,4	3,0165
<b>3</b>	30	20	0,4	3,4771
<b>4</b>	90	20	0,4	3,3464
<b>5</b>	30	10	0,3	3,4020
<b>6</b>	90	10	0,3	1,0434
<b>7</b>	30	10	0,5	2,7984
<b>8</b>	90	10	0,5	3,6107
<b>9</b>	60	0	0,3	4,2929
<b>10</b>	60	20	0,3	3,3500
<b>11</b>	60	0	0,5	4,2607
<b>12</b>	60	20	0,5	5,2705
<b>13</b>	60	10	0,4	3,5932
<b>14</b>	60	10	0,4	2,2316
<b>15</b>	60	10	0,4	2,9824

#### **4.2. Construction de l'architecteur de réseau de neurones**

Nous avons choisis un modèle de boîte « noire » (modèle de connaissance) de caractéristiques suivantes :

- Une couche d'entrée avec trois neurones.
- Une couche cachée avec trois neurones.
- Une couche de sortie avec un neurone.
- Une base d'apprentissage et de test contenant 15 essais à partir d'un plan d'expériences.



**Figure 4.** Modèle neuronal avec 3 entrées, 3 couches cachées et une sortie.

### 4.3. Elaboration de la base d'apprentissage et de test

A l'aide du logiciel SAS, nous avons défini la base d'apprentissage suivante (tableau 8)

**Tableau 8 :** Elaboration de la base d'apprentissage.

Paramètres de la base	
Nœuds caché	3
Pénalités	0,001
Nombre de Tours	16
Max Itérations	500
Convergence	0,00001

Nous avons ensuite réalisés l'apprentissage à l'aide de logiciel SAS, les résultats obtenus sont dans le tableau 9.

**Tableau 9** : Résultats d'apprentissage.

Modèle	Nœuds	Pénalité	R <sup>2</sup> %
1	3	0,001	92,56
2	2	0,001	84,05
3	2	0,002	83,42
4	2	0,004	82,49
5	3	0,001	92,56
6	3	0,002	92,57
7	3	0,004	92,17
8	3	0,001	92,64

On remarque que le meilleur résultat obtenu est celui du modèle 8, avec 3 nœuds cachés, une pénalité égale à 0,001 et un coefficient de détermination  $R^2 = 92,64$ . Les résultats d'ajustement de ce modèle sont résumés dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Résultats d'ajustement de meilleur modèle:

Terme	Valeurs
SSE	1,038919
Pénalité	0,5637905
Totale	1,6027096
N	15
R <sup>2</sup>	92,26%

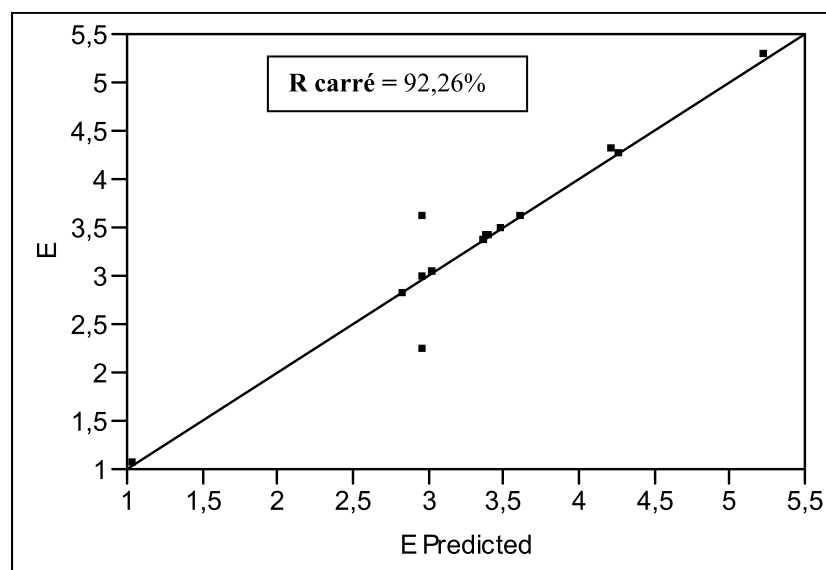
#### 4.4. Validation du modèle

Dans cette étape nous avons décidés de prendre un test de validation qui consiste à comparer les entrées expérimentales à celles prédites par le modèle, les résultats obtenus sont dans le tableau ci-dessous:

**Tableau 11** : comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées.

<b>Essai</b>	<b><i>E</i> expérimentale</b>	<b><i>E</i> prédite</b>
<b>1</b>	3,3932	3,3797
<b>2</b>	3,0165	3,0157
<b>3</b>	3,4771	3,4789
<b>4</b>	3,3464	3,3671
<b>5</b>	3,4020	3,4034
<b>6</b>	1,0434	1,0374
<b>7</b>	2,7984	2,8197
<b>8</b>	3,6107	3,6155
<b>9</b>	4,2929	4,2198
<b>10</b>	3,3500	3,3568
<b>11</b>	4,2607	4,2640
<b>12</b>	5,2705	5,2279
<b>13</b>	3,5932	2,9608
<b>14</b>	2,2316	2,9608
<b>15</b>	2,9824	2,9608

De même que dans la validation de la RSM, nous avons tracé la courbe d'ajustement entre les valeurs expérimentales et celles prédites et les résultats montrent une bonne estimation de modèle (**Figure 5**).

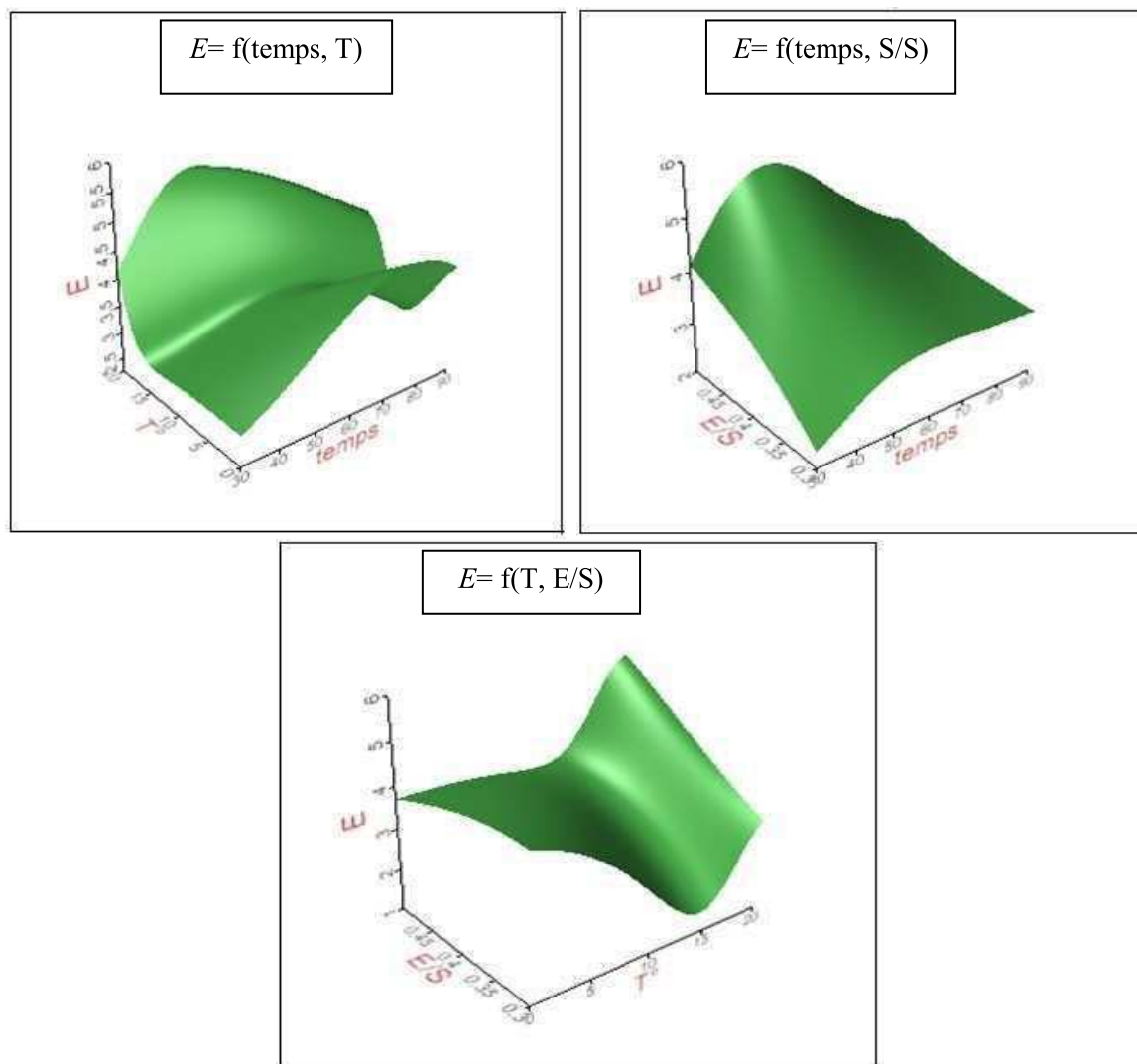


**Figure 5** : la représentation graphique des sorties mesurées en fonction des sorties calculés.

#### 4.5. Optimisation

Après avoir validé notre modèle, nous avons ensuite déterminé les valeurs des entrées (X) qui donnent la meilleur énantiosélectivité  $E$ . Cette dernière se fait par l'interprétation des diagrammes de surface de réponse, qui sont des projections tridimensionnelles des surfaces de sortie (Y). Ils sont générés par le logiciel SAS par la combinaison des 3 entrées. A chaque fois une des entrées est fixée, et la sortie est évaluée par rapport aux deux autres (**Figure 6**).

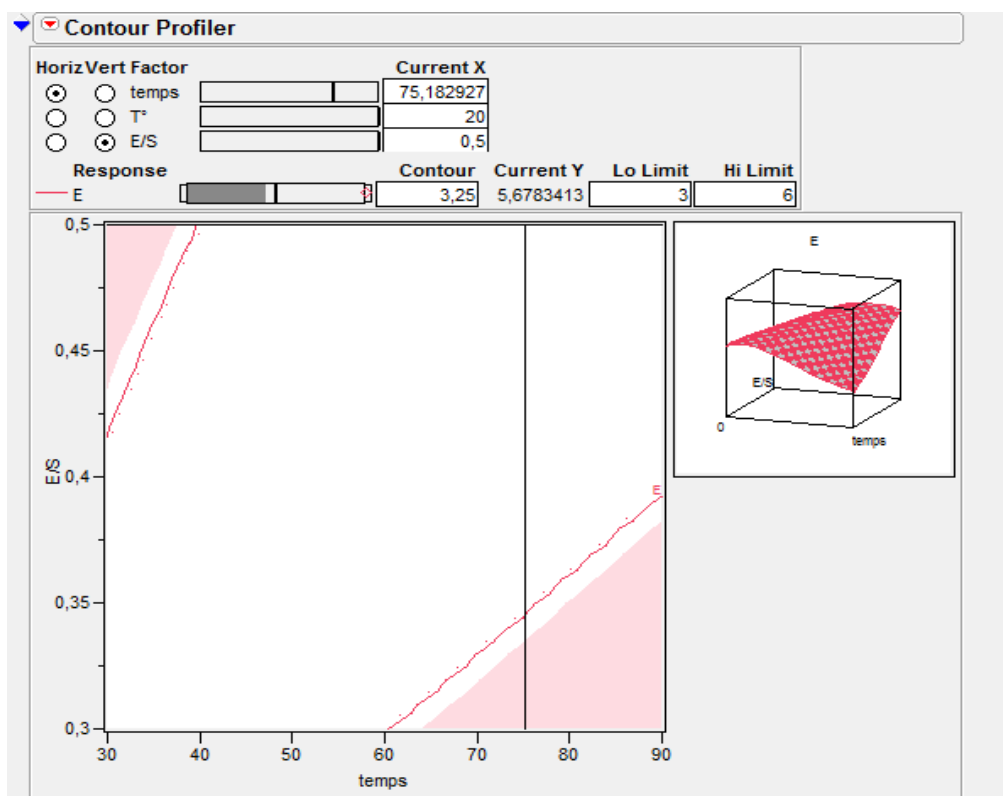
D'après les diagrammes de surface obtenus, il apparaît clairement que la plus forte valeur d'énantiosélectivité  $E$  atteinte est supérieure à 5,6. On remarque alors que l'énantiosélectivité a augmenté avec l'augmentation de température et le rapport enzyme/support, aussi avec l'augmentation de temps d'immobilisation jusqu'à 75 minutes, elle commence à diminuer.



**Figure 6 :** Diagrammes de surface présentant les effets des différentes entrées sur l'énantioselectivité  $E$ .

Nous avons ensuite cherché à localiser le point correspondant à la valeur maximale de l'énantioselectivité  $E$  de l'enzyme immobilisée.

Les niveaux optimaux des entrées examinées ont été obtenus par maximisation de la réponse  $E$ . Les conditions optimales obtenues sont : temps d'immobilisation = 75,18mn, température = 20°C et rapport enzyme / support = 0,5. L'énantioselectivité calculée  $y = 5,7$  une valeur supérieur a celle obtenue par la RSM (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Optimisation de l'énantiosélectivité  $E$  par la méthode des réseaux de neurones.

## 5. Vérification

Les conditions réactionnelles optimales d'immobilisation, obtenus par les deux méthodes, ont été par la suite appliquées expérimentalement. La valeur du facteur d'énantiosélectivité obtenue ( $E = 6,5$ ) est, aux erreurs expérimentales près, proche des valeurs théoriques, particulièrement celle donnée par la méthode des réseaux de neurones. Ce résultat valide donc les modèles obtenus.

## 6. Comparaison entre les deux méthodes (RSM et ANN)

Une comparaison a été effectuée entre l'énantiosélectivité  $E$  mesurée expérimentalement et celle prédite par le modèle obtenu par la méthode RSM et la méthode des réseaux de neurones. Les résultats de cette comparaison sont dans le tableau 12.

**Tableau 12** : Comparaison entre l'énantiosélectivité mesurée et prédite par RSM et ANN.

Numéro d'expérience	L'énantiosélectivité (E)		Erreur (SSE)		
	Mesurée	Prédite par la méthode		Prédite par la méthode	
		RSM	ANN	RSM	ANN
1	3,3932	3,5664	3,3797	-0,1732	0,0134
2	3,0165	2,9300	3,0157	0,0865	0,0007
3	3,4771	3,5636	3,4789	-0,0865	-0,0018
4	3,3464	3,1732	3,3671	0,1732	-0,0207
5	3,4020	3,2816	3,4034	0,1204	-0,0013
6	1,0434	1,1827	1,0374	-0,1393	0,0059
7	2,7984	2,6591	2,8197	0,1393	-0,0212
8	3,6107	3,7311	3,6155	-0,1204	-0,0048
9	4,2929	4,2401	4,2198	0,0527	0,0730
10	3,3500	3,3839	3,3568	-0,0339	-0,0068
11	4,2607	4,2267	4,2640	0,0339	-0,0033
12	5,2705	5,3233	5,2279	-0,0527	0,0425
13	3,5932	2,9358	2,9608	0,6574	0,6323
14	2,2316	2,9358	2,9608	-0,7041	-0,7292
15	2,9824	2,9358	2,9608	0,0466	0,0215

L'analyse du tableau 12 montre que le modèle obtenu par la méthode des réseaux de neurones est de qualité proche à celui calculé par la méthode des surfaces de réponse. Cette conclusion est confirmée par les coefficients de détermination  $R^2 = 91,5\%$  pour RSM et  $R^2 = 92,26\%$  pour ANN.

## 6. Conclusion

L'optimisation des conditions expérimentales de l'immobilisation sur l'énantiosélectivité  $E$ , a été réalisée par la méthodologie des plans d'expériences. Pour cela nous avons choisi comme plan d'optimisation celui de Box-Behnken et comme moyen d'analyse et traitement des données expérimentales deux méthodes différentes, la RSM et l'ANN. Les résultats obtenus pour l'analyse statistique des données pour les deux méthodes ont fourni de bons modèles exprimant l'énantiosélectivité de la CRL immobilisée en fonction de temps d'immobilisation, la température et le rapport enzyme/support avec des coefficients de détermination  $R^2$  égales à  $91,5\%$  pour RSM et  $92,26\%$  pour l'ANN.

La deuxième étape de notre étude a consisté à valider le modèle mathématique exprimant l'influence des facteurs  $X_i$  sur l'énantiosélectivité  $E$  qui est la variable à expliquer. Le modèle calculé est quadratique ce qui implique que l'effet des facteurs expérimentaux de l'immobilisation ne peuvent expliquer l'évolution de l'énantiosélectivité de la CRL d'une manière linéaire et que le carré de ces facteurs ( $X_i^2$ ) ainsi que l'effet des interactions entre ces facteurs ( $X_iX_j$ ) ne peuvent pas être ignorés.

Pour la validation du modèle, nous avons utilisé la méthode d'ajustement entre les valeurs expérimentales et celles prédites par le modèle, exprimée par une droite d'ajustement entre les deux réponses ( $y_{\text{exp}}$  et  $y_{\text{pred}}$ ). Les résultats de la validation ont montré un bon ajustement ce qui valide le modèle.

Nous avons ensuite suivis les effets des facteurs d'immobilisation sur l'énantiosélectivité par les diagrammes de contours dans le cas de la RSM et de surfaces de réponses dans le cas de l'ANN, afin de localiser l'optimum de la réponse et définir les conditions expérimentales optimales de l'immobilisation de la CRL sur Céliste.

Les conditions opératoires optimales de l'immobilisation ont été localisées dans un intervalle compris entre 70-75minutes pour le facteur temps ( $X_1$ ), la valeur optimale de la réponse est obtenue quand la température ( $X_2$ ) est à  $20^\circ\text{C}$  et la quantité enzyme est égale à  $0,5\text{g}/1\text{g}$  de

support ( $X_3$ ). Dans ces conditions la valeur optimale estimée théoriquement de l'énantiosélectivité est  $E = 5,5$  pour RSM et  $E = 5,7$  pour ANN. On peut donc remarquer que l'optimum évalué théoriquement par les deux méthodes est quasiment le même.

Par la suite, les conditions optimales trouvées théoriquement ont été vérifiées expérimentalement. La valeur de  $E$  mesurée permet donc de valider les résultats théoriques.

# ***Conclusion générale***

## Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons réussi à immobiliser la lipase de *Candida rugosa* sur Célite par adsorption, avec un bon rendement d'immobilisation. Pour mener notre étude, nous avons fait appel à la méthodologie des plans d'expériences qui nous a permis d'aboutir aux résultats recherchés de manière efficace.

La première partie de ce mémoire a été consacrée à une étude bibliographique montrant l'intérêt des enzymes, l'avantage de leur immobilisation et les différentes méthodes d'immobilisation utilisées, ainsi que les différents types de réactions organiques catalysés par les enzymes immobilisées. Ensuite, nous avons présenté la bibliographie nécessaire à la compréhension de la méthodologie des plans d'expériences et les réseaux de neurones, que nous allons utiliser par la suite, comme moyen d'analyse de nos données expérimentales.

La deuxième partie, a été consacrée à l'étude de l'influence des conditions expérimentales d'immobilisation qui sont : le temps, la température et le rapport enzyme/support, sur l'énantiosélectivité de l'enzyme immobilisée, ainsi que leurs interactions éventuelles.

Pour mener notre étude, nous avons fait appel, dans un premier temps la méthodologie des plans d'expériences. Nous avons utilisé un plan de Box-Behnken qui est basé sur un modèle de second degré. Nous avons pu ainsi modéliser l'énantiosélectivité en fonction des paramètres exprimant les conditions d'immobilisation par RSM. Les valeurs des réponses estimées par le modèle sont corrélées à 91,5 % avec les valeurs expérimentales. Par la suite la recherche des conditions optimales, effectuée par la méthode des surfaces de réponse, a permis de localiser la valeur optimale du facteur d'énantiosélectivité  $E = 5,5$ . Celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs : temps d'immobilisation à 75 minutes, température à 20°C et le rapport enzyme/support à 0,5 g/g. La modélisation et l'optimisation par cette méthodologie ont été effectuées par le logiciel MINITAB.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la méthodologie des réseaux de neurones dont nous voulions comparer les résultats à ceux obtenus avec la méthodologie RSM. Le modèle obtenu dans ce cas est équivalent à celui de la RSM bien que la valeur du coefficient de détermination ( $R^2=92,3\%$ ) obtenu en comparant les valeurs prédites avec les valeurs expérimentales soit légèrement supérieur. Ce modèle a permis également de localiser la valeur

optimale du facteur d'énantiosélectivité ( $E = 5,7$ ), ainsi que les conditions optimales de cette immobilisation : temps d'immobilisation à 75,18 minutes, température à 20°C et le rapport enzyme/support à 0,5 g/1g.

Ces résultats théoriques ont été validés par l'expérience. La valeur du facteur  $E$  trouvée expérimentalement dans les conditions optimales, est proche de celle estimée par les deux modèles par RSM et ANN.

Nous avons ensuite effectué une comparaison entre les deux méthodes RSM et ANN. Les modèles trouvés sont équivalents et donnent les mêmes résultats en termes d'optimisation des conditions d'immobilisation pour maximiser l'énantiosélectivité. Cependant, une légère différence au niveau des erreurs prédites est notée à l'avantage de la méthode ANN.

En conclusion, l'immobilisation des enzymes est un facteur important non seulement pour leur stabilité, mais également pour l'impact que peut avoir la nature du support sur une qualité primordiale des enzymes qui est l'énantiosélectivité. La recherche de nouveaux supports d'immobilisation est par conséquent très importante.

***Chapitre 2 :***  
***Matériels & Méthodes***

## 1. Matériels

### 1.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Nous avons employé cette technique d'analyse afin d'identifier les produits, vérifier leur pureté, suivre la cinétique des réactions, et calculer les paramètres d'énantiosélectivité des composés chiraux. L'appareil utilisé est un SHIMADZU GC- 17. Colonne capillaire chirale Beta-dex 325 (30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m) ; détecteur FID ; température maximale 300°C). Injecteur en mode Split.

**1.2. Les dosages colorimétriques** ont été effectués à l'aide d'un spectromètre UV/VISIBLE JENWAY AY 6405.

### 1.3. Produits chimiques

- La lipase de *Candida rugosa* (CRL type VII; 700 unité mg<sup>-1</sup>) provient de la société Sigma Aldrich.
- Le bleu brillant de coomassie G250 et le sérum de l'albumine bovine proviennent de la société Fluka.
- Phényléthanol un alcool secondaire à chiralité centrale provient de Sigma- Aldrich.
- Acétate de vinyle un agent acylant provient de Sigma- Aldrich.
- La Célite (Hyfflo supercell).
- Ether diéthylique provient de Sigma- Aldrich.

## 2. Méthodes

### a. Préparation des solutions tampons

En générale, une solution tampon est une solution aqueuse dont le pH très peu sensible à l'ajout de petite quantité d'acide ou de base et à la dilution. Une solution tampon phosphatée (pH=7) à concentration 20mmol/l est préparée à partir des quantités de di-hydrogénophosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et de di-sodium hydrogénophosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) dont les concentrations sont calculées à partir des relations suivantes :

$$\text{pH} = \text{pka} + \log C_b/C_a$$

$$C_a + C_b = C_t$$

Avec:

$C_a$  : la concentration de di-hydrogénophosphate de potassium ( $KH_2PO_4$ ).

$C_b$  : la concentration de di-sodium hydrogénophosphate ( $Na_2HPO_4$ ).

$C_t$  : la concentration de la solution tampon.

### **b. Dosage de protéine par la méthode de Bradford :**

Dans la méthode de Bradford, le bleu de Coomassie (G250) forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorbance à 595 nm.

#### **Préparation du réactif de Bradford**

Dans une fiole jaugée 1 litre, on dissout :

- Bleu de coomassie G250.....100mg
- Ethanol 95 %.....50ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

- Acide orthophosphorique 85%.....100ml
- $H_2O$  distillée q.s.p.....1000ml

#### **Préparation de la gamme d'étalonnage**

La gamme d'étalonnage indiquée dans le tableau 1, a été réalisée à partir d'une solution mère contenant 0.1mg/ml de sérum albumine bovine (SBA).

**Tableau 1** : gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (S.A.B)

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>SAB (<math>\mu</math>l)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Eau distillée <math>\mu</math>l</b>	100	80	60	40	20	0
<b>Réactif (ml)</b>	4	4	4	4	4	4

### Détermination de la concentration en protéines

Dans un tube, on ajoute 4ml de réactif de Bradford a 100 µl de la solution enzymatique, on mélange, après 5 minutes on mesure l'absorbance à 595 nm sur le spectrophotomètre.

Pour déterminer la quantité des protéines présente dans les échantillons à doser, on effectue ce qui suit :

- On trace la courbe d'étalonnage absorbances en fonction de la quantité de SAB en µg.
- On détermine à partir de cette courbe d'étalonnage la quantité de protéine correspondante aux absorbance trouvées pour chaque échantillon de la solution enzymatique à doser (µg).

### Calcul le rendement d'immobilisation

Le degré de l'immobilisation est exprimé par le rapport en pourcentage suivant :

$$DI = (P_T - P_L) / P_T * 100$$

Où

- $P_T$ : représente la quantité totale de protéine utilisée.
- $P_L$ : représente la quantité de protéine dans l'eau de lavage.

### c. Immobilisation de la lipase *Candida rugosa* sur Célite

On dissout (0.3- 0.5g) de lipase dans 4 ml de solution tampon phosphate 0,2M (pH 7) pendant 30 min, on ajoute 1g de support, puis on rajoute 15 ml de l'acétone froid goutte à goutte.

Le mélange est agité (700 rpm) à la température désirée (0°C-20°C) pendant (30-90 min). La lipase immobilisée est collectée par filtration sous vide et lavée avec 20ml de solution tampon phosphate.

Le produit extrait, est séché sous vide dans un dessiccateur, en présence de silica gel, jusqu'à stabilisation de sa masse.

#### **d. La réaction de transestérification**

Dans un flacon fermant hermétiquement une solution de (*R,S*)-1-phényléthanol (10mmol) et l'acétate de vinyle (20mmol) est agitée dans 7 ml d'éther diéthylique en présence de la 1g CRL immobilisée sur célite. Le mélange réactionnel est ensuite porté en agitation à 35 C°.

La cinétique de la réaction est suivie par chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU GC- 17A à Colonne capillaire chirale  $\beta$ -Dex 325), par injection à intervalle régulier de prélèvements de 1 $\mu$ l du mélange réactionnel.

Les conditions d'analyse GC utilisées pour identifier le produit (*R,S*)-Acétate de phényléthanol et séparer ces énantiomères S et R ainsi que ceux des deux énantiomères alcools sont :

- température initiale : 120°C
- temps initiale : 12 min
- température finale : 200°C
- temps finale : 30 min
- vitesse : 6°C/min

Les temps de rétention pour les deux énantiomères de l'ester racémique (*R,S*)-Acétate de phényléthanol et la séparation de ces énantiomères S et R ainsi que ceux des deux énantiomères alcools, ont été déduites par rapport à des référence optiquement pures :

(*S*)-Acétate de phényléthanol,  $t_R = 11,40$  min // (*R*)-Acétate de phényléthanol,  $t_R = 11,64$  min  
(*S*)-1-phényléthanol,  $t_R = 10,31$  min // (*R*)-1-phényléthanol,  $t_R = 10,15$  min.

# ***Bibliographie***

## **Bibliographie :**

- [1] : Mats M.; Karl H., *Kinetics of triglyceride lipase*. In: Wooley P.; Petersen S.B., eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press. **1994**, 159-180.
- [2] : Blecker C., Bull. Rech. Agron. Gembloux. **1993**, 28, 51-85.
- [3] : Mahsa G., *Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma*, thèse de doctorat. École Nationale Supérieure de Chimie de Paris. **2007**.
- [4] : Pereira E.B.; Zanin G.M.; Castro H.F., Brazilian Journal of Chemical Engineering. **2003**, 20, (04), 343-355.
- [5] : Yeşiloğlu Y., Process Biochemistry. **2005**, 40, 2155-2159.
- [6] : Yu H.; Wu J.; Ching., C. B. Biotechnology Letters. **2004**, 26, 629-633.
- [7] : Şekeroğlu, G.; Fadıloğlu, S.; Göğüs, F., Eur Food Res Technol. **2006**, 224, 55-60.
- [8] : Cao L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim. **2005**.
- [9] : Tran-Minh C., les biocapteurs. *Principes, construction et applications*. Paris, Masson, **1991**.
- [10] : Brown E.; Biellmann J. F., Techniques de l'Ingénieur. *Traité Génie des procédés*. J 1240.
- [11] : Robert A., Copeland Enzymes: *A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. **2000** by Wiley.
- [12] : Djeghaba Z., *Document d'appui au cours sur la biocatalyse en chimie organique*. **2008**, 16-18, Université Badji Mokhtare Annaba.
- [13] : Jaeger K.E.; Reetz M.T., Trends Biotechnol. **1998**, 16, 396-403.
- [14] : Schmid R.D., Verger R. Angew. Chem. Int. Ed. **1998**, 37, 1608-1633.
- [15] : Jaeger K.E.; Dijkstra B.W.; Reetz M.T., Annu. Rev. Microbiol. **1999**, 53, 315-351.
- [16] : Jaeger K.E.; Eggert T., Curr. Opin. Biotechnol. **2002**, 13, 390-397.

- [17] : Houde A.; Kademi A.; Leblanc D., Appl. Biochem. Biotechnol. **2004**, 118, 155-170.
- [18] : Gotor-Fernandez V.; Brieva R.; Gotor V., J. Mol. Catal. B: Enz. **2006**, 40, 111-120.
- [19] : Hasan F.; Shah A.A.; Hameed A., Enz. Microb. Technol. **2006**, 39, 235-251.
- [20] : Ghanem A., Tetrahedron. **2007**, 63, 1721-1754.
- [21] : Pandey A.; Benjamin S.; Soccol C.R.; Nigam P.; Krieger N.; Soccol U.T., Biotechnol. Appl. Biochem. **1999**, 29, 119-131.
- [22] : Gupta R.; Gupta N.; Rathi P., Appl. Microbiol. Biotechnol. **2004**, 64, 763-781.
- [23] : Ollis D.L.; Cheah E.; Cygler M.; Dijkstra B.; Frolow F.; Franken S.M.; Harel M.; Remington S.J.; Silman I.; Schrag J.; Sussman J.L.; Verschueren K.H.G.; Goldman A., Protein Eng. **1992**, 5, 197-211.
- [24] : Nardini M.; Dijkstra B.W., Curr. Opin. Struct. Biol. **1999**, 9, 732-737.
- [25] : Bornscheuer U.T.; Kaslauskas R.J., *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformation*. Eds. WILEY-VCH Verlag GmbH. **1999**.
- [26] : Pleiss J.; Fischer M.; Peiker M.; Thiele C.; Schmid R.D., J. Mol. Catal. B: Enz. **2000**, 10, 491-508.
- [27] : Derewenda U.; Brzozowski A.M.; Lawson D.M.; Derewenda Z.S., Biochemistry. **1992**, 31, 1532-1541.
- [28] : Brzozowski A.M.; Derewenda U.; Derewenda Z.S.; Dodson G.G.; Lawson D.M.; Turkenburg J.P.; Bjorkling F.; Hugel-Jensen B.; Patkar S.A.; Thim L., Nature. **1991**, 351, 491-494.
- [29] : Derewenda U.; Swenson L.; Wei R.; Green R.; Kobos P.M.; Joerger R.; Haas M.J.; Derewenda Z.S., J. Lipid. Res. **1994**, 35, 524-534.
- [30] : Benedetti F.; Berti F.; Linda P.; Miertus S.; Sabot A., Med. Chem. Lett. **1996**, 6 (7), 839-844.
- [31] : Pleiss J.; Fisher M.; Schmid R.D., Chem. Phys. Lipid. **1998**, 93, 67-80.

- [32] : Cygler M.; Grochulski P.; Kazlauskas R.J.; Schrag J.D.; Bouthillier F.; Rubin B.; Serreqi A.N.; Gupta A.K., J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 3180-3186.
- [33] : Chen C. S.; Fujimoto Y.; Sih C.J., AM. J.chem.SOC. **1982**, 104, 7294-7299.
- [34] : Balcão V.M.; Paiva A.L.; Malcata X.F., Enzyme Microb. Technol. **1996**, 18, 392-416.
- [35] : Worsfold P., J. Enzymes,Pure &Appl.Chem. **1995**, 67 (4), 597-600.
- [36] : Bai, Y.X.; Li Y.F.; Yong Y.; Liu-Xiang Yi., Journal of biotechnology. **2006**, 125, 574-582.
- [37] : Knezevic Z.; Milosavic N.; Bezbradica D.; Jakovljevic Z.; Prodanovic R., Biochemical Engineering Journal. **2006**, 30, 269-278.
- [38] : Vermue M. H.; Tramper J., pure and Appl.Chemistry. **1995**, 67 (2), 345-373.
- [39] : Khare S.K.; Nakajima M., Food chemistry. **2000**, 68, 153-157.
- [40] : Foresti M.L.; Ferreira M.L., Enzyme and Microbial Technology. **2007**, 40 (4), 769-777.
- [41] : AbdulRahman M.B.; Tajudin S.M.; Hussein M.Z.; Raja Nor Zaliha Raja Abdul Rahman,; Salleh A. B.; Basri., M. Applied Clay Science. **2005**, 29, 111-116.
- [42] : Kaewthong W.; sirisaneeyakul S.; Prasertsan P.; Kittikun H., process Biochemistry. **2005**, 40, 1525-1530.
- [43] : Gargouri Y.; Ghamgui H.; Miled N.; Karra-chaâbouni., M. Biochemical Engineering Journal. **2007**, 37, 34-41.
- [44] : *Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by Mucor javanicus lipase: changes in the pool of fatty acid residues.* Enzyme Microb. Technol., **22**, 511-519.
- [45] : Sakakibara M.; Okada F.; Takahashi K.; Tokiwa T., Nippon Kagakukai. **1993**, 11, 1292-1294.
- [46] : Knezevic Z.; et al., Process Biochem. **2004**, 39(11), 1377-1385.
- [47] : Lancelot W.K.; Luke M.; John S.R.; Ignatious N., Ind. Crops Prod. **2002**, 16, 237-244.
- [48] : Jaeger K.E.; et al., FEMS Microbiol. Rev. **1994**, 15, 29-63.

- [49] : Gandhi N.N.; Sawant S.B.; Jyeshtharaj J.B.; Mukesh D., *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17(4), 373-380.
- [50] : Wazé A.; Mario A.; Jacqueline D.; Ghalfi H.; Christophe B.; Wathélet J.; Philippe T., *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008**,12 (1), 57-68.
- [51] : Sandrine K., *Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt*, thèse de Doctorat, école doctorale science – technologie – santé, université de Limoges. **2004**.
- [52] : Goupy J., *Modélisation par les plans d'expériences*, Techniques de l'ingénieur, traité mesures et contrôle. R 275, 1-23.
- [53] : Sad G.; Sado M.C., *Les plans d'expériences de l'expérimentation à l'assurance qualité*, Collection AFNOR. **1991**.
- [54] : Vivier S., *Stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis*, thèse de doctorat, école centrale de Lille, université des sciences et technologies, Lille. **2002**.
- [55] : Goupy J., *Les plans d'expériences revues Modulad*, n°34. **2006**.
- [56] : Rousselle J.J., *Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale*, thèse de doctorat, université François Robelais. **2003**.
- [57] : GOUPY J., *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*. Dunod. Paris. 409 pages, **1999**.
- [58] : GOUPY J.; CREIGHTON L., *Introduction aux plans d'expériences avec applications*. Collection *l'usine nouvelle*, 4ème édition Dunod, Paris. **2009**.
- [59] : SARABIA L.A.; ORTIZ M.C., *Response surface methodology. Chapitre1.12. Comprehensive Chemometrics : Chemical and biochemical data analysis*, Brown S, Tauler R et Walczak B, éditeurs scientifiques. Ed. Elsevier, Amsterdam. **2009**.
- [60]: Sall J.; Fung K.; HRRIS J.G.; Ariely D.; Reich P., *Statistical discovery*. **2010**, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.jmpdiscovery.com>.
- [61] : M. Tanguy, *Le logiciel d'analyse statistique des données Minitab*. mai **2008**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.minitab.fr>.

- [62]: Statistical Plots in Mathematica. **29-12-2008**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.intesoft.com/produits/tech/statistica>.
- [63] : Copyright©,2006-Web libre, [en ligne], Adresse URL:C<http://www.sigmaplus.fr>.
- [64] : Multivariate Data Analysis, Camo Software AS. **2010**, [en ligne], Adresse URL:<http://www.camo.no>.
- [65]: Last Updated: Wed. **25-11-2009**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.infometrix.com>.
- [66]: Windows Install Command Line (NO MST). **10-22-2008**, [en ligne], Adresse URL: <http://www.umetrics.com>.
- [67] : Goupy J., *Pratiquer les plans d'expériences*, édition DUNOD. **2005**.
- [68] : Benois D.; Tourbier Y., S.Germain-Tourbier, *Plans d'expériences construction et analyse, technique documentation –Lavoisier*, Ed. Paris. **1994**.
- [69] : Goupy J., *la méthode du plan d'expérience, Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats*.
- [70]: Mc Culloch W.S.; Pitts W., Bulletin of Math. Biophysics. **1943**, vol.5, pp. 115-133.
- [71]: Ackley D.; Hinton G.; Sejnowski T., "A learning algorithm for Boltzmann machines,"Cognitive Science 9. **1985**, pp. 147-169.
- [72]: Minsky M.; Papert S., *Perceptrons: an introduction to computational geometry*, MIT Press, expanded edition. **1988**.
- [73]: Rivals I.; Personnaz L.; Dreyfus G.; Ploix J.L., J.P. Corriou éd., Lavoisier Tec et Doc. **1995**.
- [74]: Dreyfus G.; Ploix J.L., *Early Fault Detection in a Distillation Column: an Industrial Application of Knowledge-based Neural Modelling*, in *Best Neural Network Practice in Europe*, World Scientific. **1998**.
- [75] : Bishop C., *Neural networks for pattern recognition*, Oxford University Press. **1995**.
- [76]: Hornik K., *Approximation capabilities of multilayerfeedforward networks*, *Neural Networks*. **1991**, vol. 4, pp. 251-257.

- [77] : Psychogios D.C.; Ungar L.H., *Ind. Eng. Chem. Res.* **1991**, 30 pp. 2564-2573.
- [78] : Fakhr-Eddine K.; Cabassud M.; Le Lann M.V., *Chemical Engineering Journal.* **1999**, 72, pp. 171-182.
- [79] : Chenevert R.; Pelchat N.; Morin P., *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, **2009**, 1191-1196.
- [80] : Chang S.F.; Chang S.W.; Yen Y.H.; Shieh C.J., *Applied Clay Science*, 37, **2007**, 67-73.
- [81] : Zhou X.; Chen C.F.; Hang H.F.; Zhuang Y.P.; Zhang S.L., *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 24, **2010**, 95-100
- [82] : Chang S.F.; Chang S.W.; Yen Y.H.; Shieh C.J., *Applied Clay Science* 37, **2007**, 67-73.
- [83] : Chouai A.; Cabassud M.; Lann M.V.; Gourdon C.; Casamatta G., *Chemical Engineering and Processing*, **2000**, 39, pp. 171-180.