

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 janvier 2017 (12.01.2017)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/006046 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
C12N 9/00 (2006.01) C12N 11/06 (2006.01)
C12N 11/04 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2016/051701
- (22) Date de dépôt international :
5 juillet 2016 (05.07.2016)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1556358 6 juillet 2015 (06.07.2015) FR
- (71) Déposants : AGRO INNOVATION INTERNATIONAL [FR/FR]; 18 avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147 rue de l'Université, 75007 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER [FR/FR]; 2 place Viala, 34060 Montpellier (FR).
- (72) Inventeurs : LE CADRE, Edith; 12 rue des Coquelicots, 34150 Gignac (FR). TROUILLEFOU, Christophe; 36 rue Buffon, Bâtiment D8-264, 34070 Montpellier (FR). PLASSARD, Claude; 672 avenue du Père Soulas, 34090 Montpellier (FR). BELAMIE, Emmanuel; 415 chemin de Gouyraune, 34680 Saint Georges D'orques (FR).
- (74) Mandataires : MENDELSON, Isabelle et al.; Cabinet Beau de Loménie, 158 rue de l'Université, 75340 Paris Cedex 07 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : BINDING ORGANIC MOLECULES TO A POROUS SILICA MATRIX

(54) Titre : FIXATION DE MOLÉCULES ORGANIQUES SUR UNE MATRICE DE SILICE POREUSE.

(57) Abstract : The invention relates to a method for binding biologically active molecules, especially enzymes, in a silica matrix, in the presence of phospholipids and a small amino acid. The invention is applicable to the field of plant nutrition.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé fixation de molécules biologiquement actives, notamment des enzymes, au sein d'une matrice de silice, en présence de phospholipides et d'une aminé de petite taille. Application dans le domaine de la nutrition des plantes.



WO 2017/006046 A1

FIXATION DE MOLECULES ORGANIQUES SUR UNE MATRICE DE SILICE POREUSE

L'invention concerne un procédé de fixation de molécules organiques biologiquement actives au sein d'une matrice de silice en utilisant l'association de phospholipides et d'une amine, en particulier d'un acide aminé ou de la dicyanodiamide.

La plupart des molécules biologiquement actives sont très sensibles aux conditions environnementales, telles que le pH, la température, la force ionique ou la présence d'inhibiteurs. Il est donc nécessaire de les immobiliser dans des supports solides organo-minéraux afin de préserver leur structure et leur activité, lorsqu'elles sont destinées à être exposées à un milieu naturel soumis à des fortes variations notamment d'ordre environnemental.

Plusieurs moyens ont déjà été mis en œuvre pour immobiliser des enzymes sur des substrats.

La fixation d'une enzyme sur un support minéral peut se faire par liaison covalente à la surface du solide (encore appelée immobilisation par couplage). Elle peut également être effectuée par adsorption de la molécule à l'intérieur des pores du support (par exemple par imprégnation du support avec une solution d'enzyme sous agitation), par encapsulation dans des membranes semi-perméables ou encore par piégeage de la protéine dans une matrice poreuse fabriquée par un procédé sol-gel.

L'avantage de la fixation des enzymes par un procédé sol-gel dans des matrices minérales ou organo-minérales réside dans la faible perte d'enzymes par lixiviation ; cependant les enzymes enfermées dans une telle matrice sont généralement peu accessibles et l'on peut rencontrer des problèmes de diffusion des molécules du substrat vers l'extérieur liés à la structure du matériau, à l'ouverture de son réseau poreux et au diamètre de ses pores.

Les matrices de silice poreuses ou mésoporeuses sont généralement préparées par condensation de silice autour de composés organiques tensio-

actifs, qui sont ensuite éliminés totalement ou partiellement pour générer le volume poreux.

Certains matériaux dits MTS (Mésoporeux aux Tensioactifs Structurants, ou Micelle-Templated Silica) sont obtenus par auto-assemblage de micelles de molécules de tensioactif en solution dans l'eau, autour desquelles se condense la silice.

Les phases organiques tensio-actives mises en œuvre peuvent s'organiser, selon les cas, en structure lamellaire, hexagonale ou cubique.

Au cours de la synthèse de la silice, les ions silicates polymérisent et forment un réseau tridimensionnel autour des agrégats de molécules organiques. La porosité disponible après élimination du structurant peut être plus ou moins élevée et sa forme résulte directement de la structure des phases organiques qui ont été préparées.

Parmi les structures de silice mésoporeuse les plus étudiées, on connaît les structures dites « MCM-41 » (hexagonale), « MCM-48 » (cubique) (Mobil Composition of Matter No. 41 et Mobil Composition of Matter No. 48 du nom de la société qui les a fabriquées pour la première fois en 1992), et la structure cubique 3-D de symétrie Ia3d dite « KIT-6 ».

On sait que la taille et la forme des pores obtenus dépendent étroitement de la nature du tensio-actif et de sa quantité dans le milieu réactionnel. Cependant, en l'état actuel des connaissances, il est très difficile de prévoir le rôle que peut jouer l'agent tensio-actif comme agent structurant et quelle structure il peut générer, car des mécanismes très complexes d'interactions interviennent entre les micelles de tensioactifs et les espèces inorganiques qui pilotent l'auto-assemblage coopératif.

Plusieurs systèmes d'encapsulation ont été décrits dans l'art antérieur.

Par exemple, dans la demande FR 2 879 186, un procédé de préparation utilise l'association de phospholipides et d'une amine grasse comportant une chaîne aliphatique en C₈-C₂₁. Les amines grasses sont généralement utilisées pour catalyser la réaction d'hydrolyse et de polycondensation des précurseurs de silice. La réaction d'hydrolyse/condensation peut ainsi se faire dans des

conditions réactionnelles plus basiques. Il est enseigné dans ce document, que les amines grasses, lorsqu'elles sont utilisées seules pour préparer la phase organique structurée, permettent l'obtention de silices mésoporeuses hexagonales mais que l'activité des enzymes immobilisées est insuffisante.

- 5 Associées à des phospholipides, elles permettent d'obtenir une meilleure activité apparente de l'enzyme immobilisée

Laveille et al. ont proposé la synthèse de matériaux encapsulant une enzyme (glucose oxydase) basée sur la condensation de silice amorphe à partir d'un précurseur alcoxyde, autour d'une phase ordonnée de phospholipides
10 (*Laveille, et al, 2010*). La source de phospholipides (PL) utilisée dans ce document est de la lécithine d'œuf constituée d'au moins 50% de phosphatidylcholine (PC), et notamment de phosphatidylethanolamine (PE). La concentration en lécithine et la nature du milieu solvant sont des paramètres déterminants pour la structure du matériau final. Le solvant utilisé pour la
15 dilution de la lécithine et dans lequel sont réalisées les réactions sol-gel, est un mélange de tampon aqueux d'acétate de sodium (AcNa) et d'éthanol (EtOH) en proportions variables.

Ces matériaux, nommés SMS pour "sponge mesoporous silica" (*Galarneau et al. 2007 et 2010*) ou NPS pour "nanoporous silica capsules" (forme particulière
20 de la phase SMS) (*Laveille et al. 2010*) ont une structure de type éponge avec un réseau poreux 3-D isotrope. Il est à noter que la formation de la mésostructure de type éponge est attribuée à la présence de la dodécylamine, une amine à chaîne aliphatique réputée toxique. Il serait donc intéressant de pouvoir fabriquer des matériaux de structure 3-D sans utilisation de molécule
25 toxique. Par ailleurs, une structure en éponge présente de nombreuses tortuosités ce qui peut causer des problèmes pour la diffusion des substrats et produits de réaction enzymatique. Il serait ainsi intéressant d'obtenir une structure 3-D plus régulière afin de permettre une meilleure diffusion.

- 30 Il a été mis au point dans le cadre de la présente invention une nouvelle méthode de fixation d'enzymes au sein d'une matrice de silice selon un procédé

sol-gel de polycondensation de tétraalcoxysilanes en milieu aqueux en utilisant l'association d'une amine de petite taille en présence de phospholipides. Les enzymes immobilisées d'une matrice obtenue selon ce procédé présentent d'excellentes activités, une bonne résistance aux conditions réactionnelles, sont
5 faciles à récupérer par simple filtration ou par centrifugation et peuvent ainsi être réutilisées un grand nombre de fois. Les biocatalyseurs obtenus résistent en outre très bien à la désorption ou lixiviation des enzymes. De plus les matrices obtenues présentent une structure 3-D mieux définie que celle des SMS ou NPS, bi-continue cubique, comme démontré par les diffractogrammes des rayons X.
10 Enfin, le procédé de formation de ces produits ne nécessite pas l'utilisation de dodécylamine ou autre molécule toxique.

Pour des applications agricoles, le produit de l'invention présente en outre l'avantage d'être biodégradable et basé sur des molécules naturelles respectueuses de l'environnement, non contaminantes pour l'écosystème et
15 l'Homme. En effet, une fois l'enzyme apportée à la plante, la matrice de silice se dissout progressivement dans le sol au contact de l'eau. Au surplus, l'amine de petite taille utilisée dans le cadre de l'invention est une amine naturelle ou ayant reçu une autorisation pour une utilisation en agriculture, présentant donc l'avantage par rapport aux amines de synthèse de ne présenter aucun caractère
20 de toxicité pour l'homme ou son écosystème.

Or dans l'art antérieur il n'a jamais été exemplifié d'utilisation des silices mésoporeuses pour encapsuler des enzymes utilisables en agricultures et directement dans les sols, en particulier comme engrais.

En effet, Hossain, K.-Z. et al. (2008) décrit l'adsorption d'uréase sur une
25 silice mésoporeuse de type PE-MCM-41 et leur utilisation potentielle pour réduire l'hydrolyse de l'urée et donc contrôler la libération d'azote dans les sols. Toutefois ces uréases encapsulées n'ont jamais été testées pour vérifier leur activité, que ce soit en conditions contrôlées ou en en plein champ. En outre l'encapsulation se fait après la formation de la silice mésoporeuse par imbibition
30 dans la porosité libérée par le gabarit organique calciné.

Gogos, A. et al. (2012) décrit l'utilisation de silice mésoporeuse, mais

uniquement pour permettre la délivrance d'insecticide.

Burns et al. (2013) évoquent l'intérêt de protéger l'activité enzymatique des sols à des fins de bioremédiation ou de protection des enzymes avec la matière organique des sols.

5 L'article de Trouillefou et al (2015), décrit une phytase immobilisée dans une silice mésoporeuse utilisable pour la nutrition phosphorée des plantes.

Le matériau obtenu est dénommé KIT-6. Toutefois, le procédé d'incorporation de l'activité enzymatique au sein de la structure poreuse comprend d'abord la synthèse du matériau silicique, sa calcination à haute température pour éliminer
10 l'agent texturant (copolymère) puis finalement l'imprégnation du matériau obtenu à l'aide d'une solution de l'enzyme.

Un tel procédé ne permet donc pas de conserver la composante organique phospholipidique de la matrice silicique à cause de l'étape de calcination. En outre le procédé d'encapsulation n'est pas toujours satisfaisant et les réactifs et
15 les étapes de synthèse du KIT-6 induisent un coût de production assez élevé qui pourrait être très conséquent pour une production à l'échelle industrielle.

L'enzyme n'est en outre pas toujours fixée de façon suffisante à l'intérieur de la matrice.

La présente invention a par conséquent pour objet un procédé de
20 fixation d'une molécule organique biologiquement active au sein d'une matrice de silice, ledit procédé comprenant les étapes suivantes consistant à :

(1) préparer une solution aqueuse (A) contenant une amine choisie parmi les acides aminés, les oligopeptides, les amines comprenant un groupe nitrile, l'urée et leurs mélanges, préparer une solution alcoolique (B) d'au moins
25 un alcool en C₁-C₆ et d'au moins un phospholipide, et préparer une solution aqueuse (C) de la molécule biologiquement active,

(2) incorporer la solution (B) dans la solution (A) sous agitation pour obtenir la formation une mésophase lyotrope,

(3) incorporer la solution (C) dans le mélange obtenu à l'issue de l'étape
30 (2),

(4) ajouter au mélange obtenu à l'issue de l'étape (3), au moins un tétra-alcoxysilane, puis laisser reposer pendant une durée suffisante pour obtenir des particules solides poreuses à base de silice renfermant la molécule biologiquement active.

5

L'invention a également pour objet les produits susceptibles d'être obtenus par un tel procédé. Ainsi la présente invention concerne une molécule organique biologiquement active fixée au sein d'une matrice de silice susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention. Cette molécule fixée au sein de la matrice de silice a donc avantageusement la forme d'une particule solide poreuse à base de silice, en particulier d'une particule de silice mésoporeuse, au sein de laquelle se trouve incorporée la molécule active comme décrit ci-après dans le paragraphe sur l'étape (4).

L'invention a également pour objet l'utilisation des produits selon l'invention dans différents domaines, notamment l'agriculture, en particulier pour la nutrition des végétaux.

De tels produits, lorsqu'ils sont à base de phosphatases, pourront par exemple être épandus sur les cultures afin de transformer *in situ* les sources de phosphore organique non assimilable par la plante, en ions orthophosphates.

D'autres enzymes capable de minéraliser la matière organique des sols peuvent être encapsulées et utilisées comme biocatalyseur supporté lorsqu'épandues sur les cultures et permettre ainsi un recyclage des éléments nutritifs azotés, potassiques voire des oligo-éléments. Par exemple, les amylases, les uréases, les cellulases entrent dans la décomposition de matières organiques et permettent la libération de formes d'azotes assimilables par les végétaux.

La matrice de silice obtenue selon le procédé de l'invention est une silice mésoporeuse. On entend par « silice mésoporeuse » au sens de la présente invention, une silice ayant des pores d'une taille moyenne comprise entre 2 et 50 nm (norme IUPAC).

30

Etape (1) : préparation des solutions (A), (B) et (C)**Solution aqueuse (A)**

Cette solution aqueuse comprend (avantageusement est constituée par) de l'eau et une amine choisie parmi les acides aminés, les oligopeptides, les amines comprenant un groupe nitrile, l'urée et leurs mélanges.

L'amine est donc choisie parmi les acides aminés, les oligopeptides, les amines comprenant un groupe nitrile, l'urée et leurs mélanges, plus avantageusement parmi les acides aminés et les amines comprenant un groupe nitrile. Parmi les acides aminés, on préfère les acides aminés naturels et en particulier les acides aminés apolaires, tels que par exemple valine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, glycine, alanine et proline, en particulier les isomères L de ces acides aminés car il s'agit d'acides aminés naturels.

Dans un mode de mise en œuvre de l'invention, on préfère l'alanine, en particulier la DL-alanine qui est moins coûteuse.

Parmi les oligopeptides, on pourra citer les dipeptides comme par exemple la glycyl-glycine.

Les amines comprenant un groupe nitrile sont des amines primaires, des amines secondaires ou des amines tertiaires, en particulier l'amine est un dérivé de guanidine et/ou de cyanamide tel que la 2-cyanoguanidine (dicyanodiamide).

La dicyanodiamide est couramment utilisé en agriculture comme inhibiteur de l'activité des bactéries nitrifiantes. C'est une molécule aminée ne contenant pas de chaîne aliphatique.

Ainsi avantageusement l'amine de la solution aqueuse (A) selon l'invention est choisie parmi l'alanine et la 2-cyanoguanidine.

Selon un mode de mise en œuvre, la solution aqueuse (A) est dépourvue d'oligosaccharide tels que des mono- ou di-saccharides, par exemple le bêta-D-lactose ou le glucose ; de glycérol, de sorbitol, ou encore de polymères synthétiques polyhydroxylés tels que le poly(alcool vinylique) ou de polymères d'acides carboxyliques insaturés.

Le pH de la solution aqueuse (A) est avantageusement compris entre 4,5 et 7, en particulier entre 5 et 7, plus particulièrement entre 5,5 et 6,5. Il peut

en particulier être choisi entre 5 et 6 et avantageusement être de 5,5 ou être choisi entre 6 et 7 et avantageusement être de 6,5. En particulier la solution aqueuse A est tamponnée, par exemple à l'aide d'un tampon acétate de sodium.

5 **Solution alcoolique (B)**

Cette solution comprend (avantageusement est constituée par) au moins un alcool en C₁-C₆ et au moins un phospholipide.

 Au sens de la présente invention on entend par « alcool en C₁-C₆ », tout groupe alkyle en C₁-C₆ linéaire ou ramifié substitué par un ou plusieurs groupes
10 -OH, avantageusement par un seul groupe -OH.

 Le terme « phospholipides » au sens de la présente invention englobe les diglycérides phosphatés comportant de préférence un groupe azoté cationique lié au groupe phosphate. On peut citer à titre d'exemple de tels phospholipides, la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine et la
15 phosphatidyléthanolamine. Ces phospholipides sont généralement utilisés sous forme de mélanges obtenus à partir de diverses sources naturelles telles que les lécithines, par exemple la lécithine extraite du jaune d'œuf ou la lécithine extraite du soja.

 Selon un mode de réalisation, on utilise, à titre de phospholipide, une
20 lécithine contenant au moins 50% de l-alpha-phosphatidylcholine. On peut également utiliser une lécithine contenant au moins 95% en poids de phosphatidylcholine.

 La concentration du phospholipide dans la solution alcoolique (B) est de préférence comprise entre 20 et 100 mg/ml, de préférence comprise entre 30 et
25 80 mg/ml, en particulier comprise entre 34 et 77 mg/ml.

 L'alcool en C₁-C₆ pourra être par exemple du méthanol ou de l'éthanol, en particulier de l'éthanol, plus particulièrement de l'éthanol à au moins 96% et avantageusement de l'éthanol à 99%.

 La solution alcoolique (B) peut en outre comprendre une amine choisie
30 parmi les acides aminés, les oligopeptides, les amines comprenant un groupe nitrile, l'urée et leurs mélanges.

Avantageusement, le rapport massique entre le phospholipide et l'amine dans la solution (B), lorsque la solution (B) comprend une amine, est compris entre 10/1 et 60/1, de préférence de l'ordre de 47/1.

La concentration totale de phospholipides dans le mélange final
5 (A+B+C) doit être suffisante pour observer la formation de la phase tridimensionnelle.

Le ratio entre les phospholipides et l'amine a par ailleurs une influence sur la taille des micelles et, par conséquent, la taille des pores de la silice mésoporeuse. La Demanderesse a obtenu des porosités satisfaisantes lorsque le
10 rapport massique entre le phospholipide et l'amine dans le mélange final (A + B + C) est compris entre 1/1 et 20/1, de préférence compris entre 2/1 et 10/1.

Par ailleurs, il peut être intéressant que le ratio massique entre l'alcool en C₁-C₆ et l'eau soit compris entre 57/48 et 55/45 dans le mélange final (A+B+C).

15

Solution (C)

Dans l'étape (1) du procédé selon l'invention, on prépare une solution aqueuse (C) : la molécule biologiquement active est dissoute dans une quantité appropriée d'eau.

20 Selon un mode de mise en œuvre, la solution aqueuse (C) est dépourvue d'hydrate de carbone, en particulier d'oligosaccharide tels que des mono- ou di-saccharides, par exemple le bêta-D-lactose ou le glucose, de glycérol, de sorbitol, ou encore de polymères synthétiques polyhydroxylés tels que le poly(alcool vinylique) ou de polymères d'acides carboxyliques insaturés.

25 Les quantités respectives des différents composants entrant dans la composition de la solution réactionnelle des étapes du procédé de la présente invention peuvent être définies plus particulièrement par rapport à la quantité totale de précurseur de silice utilisée.

30 Ainsi, pour une mole de tétra-alcoxysilane, on utilise de préférence de 14 à 112 moles de H₂O, de 10⁻⁷ à 10⁻³ moles d'au moins une molécule biologiquement active, de 0,05 à 0, 20 moles d'au moins un phospholipide, de

0,04 à 0,16 moles d'au moins une amine et de 8,5 à 34 moles d'au moins un alcool en C₁-C₆.

Le pH de la solution aqueuse (A) et le pH de la solution aqueuse (C) sont de préférence identiques et choisis de manière à stabiliser la molécule biologiquement active si besoin, en particulier compris entre 4,5 et 7, plus particulièrement entre 5 et 7, encore plus particulièrement entre 5,5 et 6,5. Il peut en particulier être choisi entre 5 et 6 et avantageusement être de 5,5 ou être choisi entre 6 et 7 et avantageusement être de 6,.

10 **Etape (2) : formation de la mésophase lyotrope**

Au sens de la présente invention, on entend par « mésophase lyotrope » la phase cristal-liquide dont la formation est liée à la concentration des molécules mésogènes. La caractérisation de ces phases est classiquement réalisée par microscopie optique en lumière polarisée et diffraction des rayons X aux petits angles.

Pour obtenir cette mésophase, la solution (B) est ajoutée dans la solution (A) sous agitation. Le sens de cet ajout est très important. En effet, si on ajoutait la solution (A) dans la solution (B), on n'obtiendrait pas la formation de cette mésophase.

20 Avantageusement, la solution (B) est ajoutée goutte à goutte dans la solution (A).

En particulier l'agitation est effectuée à l'aide d'un barreau aimanté à une vitesse de rotation comprise entre 300 et 1000 tours par minute pour une durée comprise entre 5 et 15 minutes.

25 Le mélange (A+B) est avantageusement maintenu sous agitation, en particulier à 900 tours par minute, pendant 10 minutes, c'est-à-dire jusqu'à la formation de la mésophase lyotrope.

Etape (3) : Ajout de la solution (C) dans le mélange (A+B)

30 La solution (C) est ajoutée dans la solution (A+B) sous agitation, avantageusement avec un barreau aimanté, en particulier à une vitesse de

rotation comprise entre 700 et 900 tours par minute, pour une durée comprise entre 10 et 20 minutes. Le sens de cet ajout est très important. En effet, si on ajoutait la solution (A+B) dans la solution (C), on n'obtiendrait pas le produit désiré.

- 5 Avantageusement, la solution (C) est ajoutée goutte à goutte dans la solution (A+B).

La solution obtenue est le mélange (A+B+C), dont l'analyse par diffraction des rayons X donne un diagramme présentant une mésophase tridimensionnelle (Figure 2) c'est-à-dire un réseau de pores orientés dans les
10 trois directions de l'espace. La caractérisation de ces phases est classiquement réalisée par microscopie optique en lumière polarisée et diffraction des rayons X aux petits angles.

La solution (A+B+C) est avantageusement maintenue sous vive agitation (par exemple 900 tours par minute) pendant 10 minutes
15 supplémentaires.

Etape (4) : silice

Le tétra-alcoxysilane, précurseur de la matrice silicique, peut être choisi parmi les tétra-alcoxysilanes de formule $\text{Si}(\text{O-R1})_4$, les tétra-alcoxysilanes de
20 formule $\text{Si}(\text{R2})_n(\text{O-R2})_4$ et leurs mélanges, chaque R1 et R2 représentant indépendamment un radical alkyle linéaire ou ramifié en $\text{C}_1\text{-C}_4$, de préférence en $\text{C}_1\text{-C}_2$, et n valant 1, 2 ou 3. Le tétra-éthoxysilane (TEOS) est le précurseur de silice particulièrement préféré.

L'addition du précurseur de silice se fait de préférence sous agitation
25 pour assurer une bonne homogénéisation des différents ingrédients. L'agitation est généralement maintenue pendant quelques minutes, de préférence pendant 5 à 120 minutes, en particulier pendant 90 à 120 minutes. Au cours de l'ajout du précurseur de silice, en particulier du TEOS, on observe un virage de la coloration du mélange qui s'assombrit ainsi que de sa texture qui s'épaissit en même
30 temps. On observe au cours du temps la précipitation de fines particules de silice en suspension. Les quantités précurseur de silice, en particulier du TEOS (en

particulier de qualité « réactif »), comprises entre 0,4 et 0,8 mL sont préférées pour effectuer les synthèses.

On laisse ensuite la solution réactionnelle reposer pendant plusieurs heures, de préférence pendant 2 à 48 heures, en particulier pendant 4 à 30 heures, plus avantageusement pendant 20 à 30 heures, au cours desquelles se déroule la réaction de polycondensation des tétra-alcoxysilanes. Avantageusement cette maturation se fait à une température comprise entre 20 et 35°C, en particulier d'environ 33°C. La température ne doit pas être trop élevée pour éviter la dégradation de la molécule active. Les fines particules de silice observées sédimentent et la turbidité du mélange diminue. A la fin de la maturation, deux phases sont présentes dans le mélange: l'une solide et l'autre composée d'un mélange aqueux jaunâtre.

Ces particules peuvent être séparées du milieu réactionnel par simple filtration, par exemple sur du verre fritté, ou par centrifugation. Elles sont ensuite de préférence lavées avec un solvant ou mélange de solvants permettant de préserver l'activité des molécules biologiques. On préfère en particulier le lavage des particules avec une solution tampon en particulier acétate de sodium à un pH compris entre 4 et 7, en particulier entre 5 et 7, plus particulièrement entre 5,5 et 6,5. Il peut en particulier être choisi entre 5 et 6 et avantageusement être de 5,5 ou être choisi entre 6 et 7 et avantageusement être de 6,5.

Elles sont ensuite de préférence séchées sous vide ou lyophilisées pour faciliter l'utilisation ultérieure et protéger les molécules biologiques. On préfère en particulier le séchage sous vide pour une durée comprise entre 24 et 48 heures.

Les particules de silice selon l'invention, ainsi obtenues par le procédé selon l'invention, ont généralement une taille moyenne en volume, avantageusement un diamètre moyen en volume (D50), comprise entre 10 et 25 µm, en particulier entre 10 et 20 µm, mesuré par granulométrie laser avec le Mastersizer 2000 de Malvern Instruments dans un tampon acétate comme illustré à la figure 3 et une forme sphérique, comme illustré à la figure 4.

Leur volume poreux obtenu après calcination à une température comprise entre 450°C et 650°C pendant 6-10 heures sous air est déterminé à partir des isothermes d'adsorption d'azote à 77 K, et est généralement compris entre 0,09 et 0,11 ml/g, de préférence il est de 0,10 ml/g (comme par exemple
5 illustré à la figure 5).

La taille moyenne des pores, déterminée par la méthode Derjaguin-Broekhoff-de Boer (DBdB) à partir des isothermes de désorption d'azote à 77 K, est comprise entre 3,5 et 4,5 nm.

La surface spécifique des particules de silice, mesurée par la méthode
10 Brunauer, Emmett and Teller (BET) à partir des isothermes d'adsorption-désorption d'azote à 77 K, est généralement comprise entre 30 et 50 m²/g, de préférence il est de 40 m²/g.

En particulier, afin de ne pas risquer de polluer les sols avec des composés chimiques, le choix du phospholipide et de l'amine (aussi dénommés
15 agent texturants) a porté sur des réactifs non toxiques, et le biocatalyseur enzymatique supporté obtenu a été baptisé du nom de TMC signifiant « Tridimensional Mesoporous Capsule ». L'ensemble des composants entrant dans la synthèse du TMC sont : l'agent structurant servant de gabarit organique (phospholipide, en particulier lécithine avec 50% de l- α -phosphatidylcholine,
20 Sigma-Aldrich), un co-structurant (amine, en particulier acide aminé ou dicyanodiamide DCD 99,5%), de l'éthanol absolu, en particulier à 99%, pour dissoudre les phospholipides et former les bicouches, de l'eau, un sel (acétate de sodium) et un précurseur de silice (TEOS, Fluka).

Ratios molaires de la synthèse du TMC avec le DCD (1) ou l'acide aminé
25 (2) :

(1) : 1 TEOS/1,33 Acétate Na/146 H₂O/68 Ethanol/0,62 DCD/0,2
Lécithine

(2) : 1 TEOS/1,33 Acétate Na/146 H₂O/68 Ethanol/0,15 Acide aminé/0,2
Lécithine

Molécule organique biologiquement active

Le procédé de la présente invention peut servir à immobiliser dans une matrice solide poreuse n'importe quelle molécule biologiquement active, c'est-à-dire n'importe quelle molécule capable de réagir avec les organismes vivants et
5 donc jouant un rôle spécifique dans le métabolisme. Ce type de molécule peut être d'origine naturelle ou synthétique, telle qu'une hormone, une enzyme ou la substance active d'un médicament ou d'un produit phytopharmaceutique. En particulier il s'agit d'une enzyme par exemple les amylases, les uréases, les cellulases et les phosphatases telles que les phytases. Avantageusement cette
10 molécule est soluble dans l'eau.

La molécule biologiquement active est de préférence une protéine dont le diamètre moyen est compris entre 4 et 25 nm, en particulier entre 5 et 25nm, de préférence compris entre 5 et 14 nm, selon la méthode de mesure divulguée dans Oakley AJ et al. (2010) pour *Aspergillus niger* phytase phyA ou
15 selon la Protein Data Bank <http://www.rcsb.org>.

On peut citer à titre d'exemples de telles protéines les phosphatases, et en particulier une phytase.

Enzymes naturelles, les phytases jouent un rôle essentiel dans le cycle du phosphore en hydrolysant les phytates ou les acides phytiques contenus dans
20 les végétaux.

On distingue quatre catégories distinctes de phytases: phosphatases acides histidine (HAP), beta-hélice phytases (BPP), des phosphatases acides pourpres (PAP) et la cystéine phosphatase (CP).

La plupart des phytases montrent une large spécificité de substrat. Elles
25 ont la capacité d'hydrolyser de nombreux composés phosphorylés, comme l'ADP, l'ATP, le phényle phosphate, le fructose 1,6-biphosphate, le glucose-6-phosphate, le glycérophosphate et la 3-phosphoglycérate. Seuls quelques phytases sont spécifiques de l'acide phytique, notamment les BPP.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les phytases sont
30 choisies parmi les phosphatases acides capables d'effectuer l'hydrolyse de cinq des six groupements phosphates du phytate, notamment la 6-phytase appelée

myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase (numéro de classification EC 3.1.3.26). On peut également utiliser la 4-phytase (EC 3.1.3.26), et la 5-phytase (EC 3.1.3.72).

En particulier, la phytase utilisée est une phytase recombinante (EC 3.1.3.26) à partir d'un extrait concentré de l'enzyme dont la concentration est de 80 mg/ml. L'extrait phytasique a été obtenu par surexpression du gène phyA de *Aspergillus niger* par la levure *Pichia pastoris* (Boze, H., et al., 2004).

Dans un autre mode de réalisation avantageux, les phytases sont choisies parmi les beta-hélice phytases (BPP).

Il peut ainsi avantageusement s'agir d'une phytase recombinante (EC 3.1.3.8) issue de *Bacillus subtilis* dont la concentration est égale à 0,114 mg/ml. La levure *P. pastoris* surexprimant le gène PhyC de la phytase alcaline de *Bacillus subtilis* a été obtenue comme décrit par Guerrero-Olazarán et al. (2010). Puis l'extrait phytasique peut être préparé selon le protocole décrit par Boze, H., et al. (2004).

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux, les phytases sont un mélange de phytases, en particulier un mélange entre la phytase recombinante (EC 3.1.3.8) issue de *Bacillus subtilis* et la 6-phytase recombinante (EC 3.1.3.26) obtenue par surexpression du gène phyA de *Aspergillus niger* par la levure *Pichia pastoris*.

On pourra utiliser dans le cadre de la présente invention, toute molécule biologiquement active dont le diamètre moyen en volume, mesurée par exemple par granulométrie laser en particulier avec un granulomètre Malvern, est compris entre 4 et 25nm, en particulier entre 5 et 25 nm, de préférence compris entre 5 et 14 nm, et en particulier soluble dans l'eau.

Les enzymes immobilisées à l'intérieur d'une matrice obtenue selon ce procédé présentent d'excellentes activités spécifiques, une bonne résistance aux conditions réactionnelles, sont faciles à récupérer par simple filtration ou par centrifugation, peuvent ainsi être réutilisées un grand nombre de fois et sont peu coûteuses à produire.

Les biocatalyseurs obtenus résistent en outre très bien à la désorption ou lixiviation des enzymes (< 200 µg phytase désorbables pour 300 mg de phytases effectivement immobilisées).

Pour des applications agricoles, le produit de l'invention présente en
5 outre l'avantage d'être biodégradable et basé sur des molécules naturelles respectueuses de l'environnement, non contaminantes pour l'écosystème et l'Homme. La silice peut se dissoudre progressivement dans le sol au contact de l'eau du sol.

La présente invention concerne donc également une molécule organique
10 biologiquement active fixée au sein d'une matrice de silice susceptible d'être obtenue par le procédé selon la présente invention.

En particulier la molécule organique biologiquement active qui va être fixée sur la matrice silice est telle que décrite ci-dessus.

La molécule organique biologiquement active fixée au sein d'une matrice
15 de silice selon l'invention a donc la forme d'une particules de silice obtenue par le procédé selon l'invention et peut donc avoir les caractéristiques indiquées ci-dessus à la fin de l'étape (4).

En particulier, la molécule organique biologiquement active fixée au sein d'une matrice de silice présente une structure 3-D bi-continue cubique, comme
20 démontré par les diffractogrammes des rayons X (figure 7) et est donc mieux définie que celle des structures éponges SMS ou NPS de l'art antérieur : présence de pics de diffraction additionnels (comparaison entre le diffractogramme de la figure 7 selon l'invention et la figure 5 de Galarneau et al de 2007, la figure 9 de Galarneau et al. de 2010 et la figure 6 de LAVEILLE et al. de 2010). En outre la
25 matrice silice sur laquelle est fixée la molécule organique est non toxique, en particulier grâce à l'utilisation d'un agent structurant non toxique, plus particulièrement vis-à-vis de l'environnement et plus généralement de la culture des plantes et des organismes du sol.

Enfin la matrice silice conserve sa composante organique
30 phospholipidique, ce qui n'est pas le cas par exemple des produits obtenus à l'aide du procédé décrit dans Trouillefou et al (2015) à cause de l'étape de

calcination du matériau silicique. De plus, le pourcentage d'immobilisation de la molécule organique dans la matrice silice est plus élevé que celui du matériau de Trouillefou et al (2015).

5 La présente invention a également pour objet une composition, en particulier phytopharmaceutique ou une composition d'engrais, comprenant la molécule fixée au sein d'une matrice silice selon l'invention et un excipient, en particulier phytopharmaceutiquement acceptable.

10 Au sens de la présente invention, on en entend par « phytopharmaceutiquement acceptable », qui est acceptable pour l'utilisation sur les plantes ou le sol, c'est-à-dire non polluant pour l'environnement et non toxique pour les hommes (utilisateurs).

Cette composition peut en particulier consister en un engrais telle qu'une solution nutritive, et peut être avantageusement sous forme liquide ou solide.

15 La présente invention a en outre pour objet l'utilisation du produit (molécule fixée au sein d'une matrice silice) obtenu par le procédé décrit précédemment ou de la composition le comprenant comme engrais de cultures végétales.

20 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description des figures et des exemples qui suivent qui sont donnés à titre informatif non limitatif.

La figure 1 représente le schéma des étapes du procédé de l'invention.

25 La figure 2 représente le diagramme de diffraction des rayons X de la solution A+B+C utilisée pour la fabrication de l'exemple 1a selon l'invention illustrant la préexistence d'une mésophase lyotrope formée à partir des bicouches de phospholipides.

30 La figure 3 représente la distribution granulométrique en volume des particules (TMC) obtenues par le procédé de l'exemple 1a selon l'invention fraîchement synthétisés (ligne continue) et des TMC de l'exemple 1a après 3

mois dans une solution tampon AcNa 0,5 M (ligne pointillée) par granulométrie laser.

La figure 4 représente un cliché de microscopie électronique à balayage du TMC séché sous vide obtenu dans l'exemple 1a.

5 La figure 5 représente les isothermes d'adsorption désorption d'azote du TMC séché sous vide obtenu selon l'exemple 1a

La figure 6 représente les clichés de microscopie électronique à transmission des TMC synthétisés avec les molécules aminées (a) alanine et (b) DCD (exemples 1a et 1b respectivement).

10 La figure 7 représente (a) le diagramme de DRX du TMC-alanine de exemple 1a, (b) le diagramme de DRX du TMC-DCD de exemple 1b et (c) le modèle de résolution de la phase $pn\bar{3}m$ à partir de l'indexation des pics.

La figure 8 représente la comparaison des deux biocatalyseurs supportés KIT-6 10X et TMC selon l'exemple 1b pour (a) les quantités de Pi désorbées des résines échangeuses d'anions et (b) les quantités de Pi présentes dans la solution de sol selon l'exemple 3.

15 La figure 9 représente la quantité totale de phosphore accumulé dans les parties racinaires et les parties aériennes de plants de *M. truncatula* après 30 jours de culture en conditions stériles avec du phytate comme seule source de P selon l'exemple 4.

La figure 10 représente le taux d'incorporation en % de la phytase de *Aspergillus niger* dans les TMC synthétisé soit à partir d'alanine (TMC – Alanine) : 1a ou de DCD (TMC-DCD) : 1b selon l'exemple 1.

25 La figure 11 représente l'activité des enzymes associées dans le matériau TMC obtenu selon l'exemple 6.

Exemple 1: Fixation d'une phytase au sein de la matrice de silice par le procédé de l'invention

30 Cet exemple illustre la méthode de l'invention appliquée à une phytase recombinante. Deux matériaux fonctionnels ont été préparés: l'un avec de l'alanine et l'autre avec du dicyanodiamide (DCD).

On a utilisé une phytase recombinante à partir d'un extrait concentré de l'enzyme dont l'activité spécifique était égale à 5400 UI/ml et la concentration égale à 80 mg/ml. L'extrait phytasique a été obtenu par surexpression du gène phyA de *Aspergillus niger* par la levure *Pichia pastoris* (Boze, H., et al., 2004).

- 5 Trois solutions (A), (B) et (C) ont été préparées à température ambiante avant d'être mélangées selon le protocole suivant:

Matériau 1 (exemple 1a)

La solution (A) contient 26 mg d'alanine dissous sous agitation rapide dans 7 ml de solution tampon acétate de sodium 0,5 M à pH 5,5.

- 10 La solution (B) contient 300 mg de lécithine (avec 50% de l-alpha-phosphatidylcholine Sigma-Aldrich) diluée dans 9 ml d'éthanol absolu 99% dans lequel on dissout 6,5 mg d'alanine.

Matériau 2 (exemple 1b)

- 15 La solution (A) contient 117,7 mg de DCD dissous sous agitation rapide dans 7 ml de solution tampon acétate de sodium 0,5 M à pH 5,5.

La solution (B) contient 300 mg de lécithine (avec 50% de l-alpha-phosphatidylcholine Sigma-Aldrich) diluée dans 9 ml d'éthanol absolu 99%.

- 20 La solution (C) pour les deux matériaux (exemples 1a et 1b) contient 1,35 ml de l'extrait enzymatique, donc chacun des matériaux a reçu 108 mg de phytase.

Ratios molaires de la synthèse du TMC avec le DCD (2) ou aniline (1) :

(1) : 1 TEOS/1,33 Acétate Na/146 H₂O/68 Ethanol/0,15 aniline/0,2 Lécithine

(2) : 1 TEOS/1,33 Acétate Na/146 H₂O/68 Ethanol/0,62 DCD/0,2 Lécithine

- 25 Les étapes de la synthèse se sont déroulées de façon identique pour les deux matériaux. La solution (B) a été ajoutée lentement à la solution (A) sous agitation. Le mélange A+B a été maintenu sous vive agitation (500 tours par minutes) pendant 10 minutes, puis la solution (C) a été ajoutée au mélange A+B. La solution A+ B + C a été maintenue sous vive agitation (900 tours par minutes) pendant 10 minutes supplémentaires avant l'addition de 0,4 ml
- 30 d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS, Fluka). Après l'ajout de TEOS, on a laissé la

préparation sous agitation pendant 90 minutes. Ensuite la solution a été mise à maturation à 33°C pendant 24 heures.

Le lendemain, la préparation a été centrifugée afin de récupérer le précipité. Deux lavages successifs ont été effectués avec la solution tampon
5 utilisée précédemment. L'échantillon a ensuite été séché sous vide pendant 48h.

Les clichés réalisés à partir de la microscopie électronique à transmission ont permis d'observer une organisation des pores suivant des plans bien définis (figure 6).

La poudre obtenue est caractérisée par diffraction des rayons X aux
10 petits angles et présente un profil de diagramme caractéristique d'une structure cubique Ia-3d. La détermination structurale de la mésophase du matériau séché a été effectuée à partir de l'indexation des pics du diagramme de rayons X et suggère une phase $pn\bar{3}m$ (Figure 7).

Le taux d'encapsulation en % de la phytase de *Aspergillus niger* dans les
15 TMC synthétisés soit à partir d'alanine (TMC – Alanine : ex 1a) ou de DCD (TMC-DCD : ex 1b) est présenté dans la figure 10. Ce taux est de quasiment de 100% pour l'exemple 1b). Ce taux est mesuré après séparation par centrifugation. A la fin de la centrifugation, les matériaux sont séparés d'un surnageant qui contient toutes les enzymes non encapsulées. Une analyse de la teneur en protéines
20 totales à l'aide du kit de dosage protéique Thermo Scientific Pierce Micro BCA est effectuée sur le surnageant et la quantité incorporée est déduite connaissant la quantité totale initiale apportée.

Ce matériau fonctionnel peut être directement utilisé pour effectuer des réactions de catalyse enzymatique qui donnent une activité spécifique de 10000
25 UI/g de matériau (UI : micromoles de substrat transformé par minute).

Le matériau synthétisé dans l'exemple 1a présente une certaine porosité caractérisée par sorption d'azote à 77K (Tristar 3000, Micromeritics). Les trois isothermes de sorption d'azote présentés dans la figure 5 sont caractéristiques d'un matériau présentant une mésoporosité.

30 Le premier (ronds pleins) obtenu avec le matériau de l'exemple 1a simplement séché à l'air est de type IV avec une boucle d'hystérèse de type II qui indique

des pores de type cage interconnectés. Dans ce cas, le volume poreux est assez faible, de l'ordre de 0,15 ml/g, ce qui est cohérent avec la présence des phospholipides dont la mésophase cubique a servi de support pour la condensation du réseau de silice. Malgré cela, après séchage, une certaine

5 porosité est libérée, dont le diamètre moyen est de l'ordre de 4 à 5 nm selon le mode de calcul, respectivement DBdB (détermination graphique à l'aide d'un abaque) ou BJH (modèle de traitement des données).

Après séchage en conditions CO₂ supercritique du matériau de l'exemple 1a (ronds vides), l'isotherme garde la même allure générale mais on observe une

10 augmentation considérable du volume poreux (~0,75 ml/g) et du diamètre des pores : 5,1 (DBdB) à 6,5 nm (BJH). Il est à noter que la méthode de séchage en conditions CO₂ supercritique est connue pour préserver les structures tridimensionnelles des matériaux car l'élimination du solvant se produit sans interface (donc pas de stress capillaire), contrairement au séchage simple

15 (interface liquide/gaz) ou même à la lyophilisation (interface solide/gaz). Par ailleurs, certaines étapes d'échange de solvant, en particulier avec l'éthanol peuvent conduire à un "lessivage" au moins partiel des phospholipides, ce qui libère de la porosité en laissant essentiellement le réseau de silice. Mais dans ce cas, le matériau caractérisé n'est plus représentatif du matériau actif car il n'y

20 plus ni les phospholipides, ni probablement l'enzyme. Mais cela permet d'avoir une idée de l'organisation du réseau silicique.

Enfin, le même matériau de l'exemple 1a calciné (carrés vides) pour éliminer la partie organique présente une porosité plus faible que les deux autres échantillons, sans doute parce que le réseau silice est assez fragile et que la

25 calcination à haute température induit son effondrement en grande partie. Ainsi, de la porosité est libérée par la calcination de la partie organique (phospholipides + enzyme), mais l'effondrement partiel du réseau silicique conduit à un volume poreux relativement faible, de l'ordre de 0,1 ml/g et des diamètres de pores de l'ordre de 5,5 nm. Mais là aussi, comme pour le séchage supercritique, les

30 caractéristiques poreuses sont celles du réseau de silice seulement et ne reflètent donc pas complètement les propriétés du matériau fonctionnel.

Exemple 2 : Comparaison de l'activité enzymatique de la phytase fixée au sein de la matrice de silice selon le procédé de l'invention et un procédé de l'art antérieur

On a comparé les activités

- 5 - d'une phytase immobilisée selon le procédé de l'exemple 1a (TMC), et
 - d'une phytase immobilisée par imprégnation dans du KIT-6 selon le procédé décrit dans l'article de Trouillefou, et al., 2015.

10 L'essai catalytique choisi pour comparer leur activité est l'hydrolyse du phytase. En particulier, les essais enzymatiques sont réalisés de la manière suivante:

La mesure de l'activité enzymatique des enzymes libres ou immobilisées consiste à doser le phosphate (Pi) libéré à partir du substrat spécifique de la phytase, le phytate. Les concentrations en Pi sont mesurées par la méthode au vert de Malachite (*Ohno, T., et al., 1991*).

- 15 La détermination de l'activité enzymatique nécessite d'utiliser une paire de tubes à centrifuger de 1,5 ml. Dans l'un la réaction s'effectue pendant 5 minutes (t5) et l'autre sert de témoin ou point zéro (t0) dans lequel la réaction n'a pas lieu. Le mode opératoire pour réaliser la réaction enzymatique consiste à préparer les tubes t0 et t5 avec 100 µl d'extrait de phytase immobilisée et 300 µl de solution
20 tampon d'acétate de sodium 0,5 M pH 5,5. Puis, on ajoute 500 µl d'acide trichloroacétique 1 N dans le tube t0 pour empêcher la réaction enzymatique de se produire. Ensuite, on thermalise à 37°C les tubes ainsi que le substrat qu'est la solution de phytate de sodium 5 mM pH 5,5 préparée dans le tampon acétate de sodium 0,5 M pH 5,5. On ajoute alors 100 µl de solution du substrat, le
25 phytate de sodium, à 5 mM pH 5,5 dans les tubes t0 et t5. Après 5 minutes, 500 µl d'acide trichloroacétique sont ajoutés dans le tube t5 pour stopper la réaction enzymatique. Enfin, les tubes sont aussitôt centrifugés et placés au réfrigérateur à 4°C en attendant d'effectuer le dosage du phosphore inorganique produit au
30 cours de la réaction par la méthode au vert de Malachite. L'activité enzymatique de chaque réaction est obtenue en divisant par 5 minutes la différence entre la concentration en Pi du t5 et du t0. Elle est exprimée en unité enzymatique (U),

soit 1 μmol de produit (Pi) formé par min = 1 Unité Enzymatique (U). L'activité spécifique des biocatalyseurs supportés est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ mésoporeux noté U/mg.

Le Tableau 1 permet de comparer les caractéristiques du TMC de l'exemple 1a selon l'invention et d'un KIT-6 imprégné contenant la même quantité de phytase immobilisée par imprégnation, noté KIT-6 10X comme décrit dans l'article (Trouillefou et al. 2014). Sont présentées, les quantités de phytase immobilisées dans les deux matériaux mésoporeux (exprimées en μg de protéine/mg de matériau), l'activité spécifique du biocatalyseur supporté (en U/mg) ainsi que l'activité spécifique relative (%) des phytases immobilisées.

Tableau 1 : taux d'encapsulation, activités, stabilité et production des TMC et des KIT-6 10X

	KIT-6 10X	TMC
Taux Immobilisation (%)	60%	> 80%
Concentration Enzyme ($\mu\text{g}/\text{mg}$ meso)	40	80
Activité Apparente (%)	10%	11%
Activité Spécifique (U/mg)	8	12
Stabilité Température	Stable à 55°C	Stable à 45°C
pH Optimal	5,5	5,5
Température Optimale	55°C	45°C
Temps Production (jours)	7 jours	3 jours
Temps Manipulation (heures)	3 h	0,8 h
Coût (€/g)	4,65	0,0064
Energie	Très forte	Très basse

Ces résultats montrent que le procédé de fixation d'enzyme selon l'invention permet d'obtenir des biocatalyseurs présentant une meilleure activité spécifique que la même enzyme fixée selon le procédé de l'art antérieur mettant en œuvre une imprégnation de la phytase dans une silice mésoporeuse à structure tridimensionnelle $ia\bar{3}d$ nommée KIT-6.

Exemple 3 : Comparaison à l'aide de résine échangeuses d'anions de la disponibilité en Pi issu de l'hydrolyse du phytate par la phytase fixée par imprégnation dans KIT-6 10X et par encapsulation dans TMC obtenu dans l'exemple 1b

- 5 Une solution de sol contenant du phytate de sodium 0,49 mM dans un sol artificiel constitué de 99 g de sable fin (Sigma-Aldrich, 50-70 mesh, ref. 14808-60-7), 30 mg de goethite de synthèse (*Cornell, R. M., et al., 2006.*), de 617 mg de kaolinite (Clay Mineral Society, KGa2) et un volume total d'eau ajouté dans le sol de 33 ml à pH 5,5 sont mis à incuber pendant 3 jours avec une
- 10 quantité d'enzyme équivalente à 0,50 mg de phytase, ladite phytase se trouvant soit sous une forme non immobilisée, soit sous une forme immobilisée selon le procédé de l'exemple 1b (TMC), soit sous une forme immobilisée par imprégnation dans du KIT-6 selon le procédé décrit dans l'article de Trouillefou, et al., 2014.
- 15 Puis, des résines échangeuses d'anions (BDH 55164, VWR) sont mises en contact pendant 24 heures avec ce sol artificiel. Le Pi adsorbé par les résines échangeuses est désorbé à l'aide de bains successifs (*Q Qian, P., et al. 2002.*) avec une solution de KCl 0,02 M. Les quantités de Pi désorbées et présentes dans la solution de sol sont ensuite dosées au vert de Malachite (Figure 8).
- 20 Les résultats de la Figure 8a indiquent clairement que les quantités de Pi résine sont supérieures pour le TMC de l'exemple 1b selon l'invention par rapport à KIT-6 10X après 24 heures d'exposition. De plus, la Figure 8b montre que les quantités de Pi disponibles dans la solution de sol sont identiques.

25 **Exemple 4 : Activité du matériau dans un sol sableux pour la nutrition de la plante modèle *Medicago truncatula***

- Les plantules croissent dans des boîtes de Pétri (12x12 cm) scellées pour conserver la stérilité du milieu de culture. Les plantules sont disposées aux 4 coins de la boîte et un trou sur le dessus de chaque boîte, bouché avec un
- 30 adhésif stérile, permet d'effectuer l'arrosage des plantes au fil de l'expérience. Toutes les boîtes sont remplies avec 99 g de sable stérilisé, 16,5 ml de tampon

MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) à pH 5,5 et trois solutions nutritives décrites dans le Tableau 2. En plus de ce mélange de base dans les boîtes de Pétri, sont ajoutés 1 ml d'un extrait de TMC (matériau de l'exemple 1a selon l'invention) 1 mg/ml et 5 ml d'une solution de phytate de sodium 15 mM.

5 Tableau 2 : composition des solutions nutritives utilisées pour la culture de *M. truncatula*.

Solution Nutritive	Volume de solution source (ml)	Composition élémentaire de la solution nutritive	Concentration de la solution source (mM)	Concentration dans le sol de culture (mM)
Sol. Nut. 1	8	KNO ₃	100	24,24
		CaCl ₂	70	16,97
		FeEDDHA	0,14	0,03
Sol. Nut. 2	1,6	MgSO ₄	1000	48,48
Sol. Nut. 3	2	H ₃ BO ₃	45	2,73
		(NH ₄) ₆ MoO ₇ O ₂₄	0,3	0,02
		ZnSO ₄	15	0,91
		MnSO ₄	18	1,09
		CuSO ₄	4	0,24

Après 30 jours de culture, les plants sont récoltés pour être minéralisés individuellement. Leurs parties aériennes (PA) et racinaires (PR) sont toutefois séparées pour effectuer l'analyse de phosphore absorbé. Leur minéralisation est réalisée dans des tubes scellés en présence de 10 ml de HCl (6 N) à 110°C pendant 16 h (*Ali M. A. et al., 2009*). Le dosage du Pi dans le minéralisât est effectué au vert de Malachite.

Le matériau fonctionnel TMC selon l'invention a permis d'observer une accumulation significative de P dans les plantes cultivées (Figure 9). La quantité de phosphore accumulé par les plantes en présence de TMC représente 2,5 celle du témoin, et les différences sont significatives pour les parties aériennes et racinaires.

Exemple 5: Fixation d'une phytase recombinante de *Bacillus subtilis* au sein de la matrice de silice par le procédé de l'invention

Cet exemple illustre la méthode de l'invention appliquée à une phytase recombinante issue de *Bacillus subtilis*. Le matériau fonctionnel a été préparé
5 avec du dicyanodiamide (DCD).

On a utilisé une phytase recombinante produite par la levure *Pichia pastoris* à partir d'un extrait concentré de l'enzyme dont l'activité spécifique était égale à 5,5 UI/ml et la concentration égale à 0,114 mg/ml. La levure *P. pastoris* surexprimant le gène PhyC de la phytase alcaline de *Bacillus subtilis* a été
10 obtenue comme décrit par Guerrero-Olazaran et al. (2010). Puis l'extrait phytasique a été préparé selon le protocole décrit par Boze, H., et al. (2004).

Trois solutions (A), (B) et (C) ont été préparées à température ambiante avant d'être mélangées selon le protocole suivant:

La solution (A) contient 117,7 mg de DCD dissous sous agitation rapide
15 dans 7 ml de solution tampon acétate de sodium 0,5 M à pH 6,5.

La solution (B) contient 300 mg de lécithine (avec 50% de l-alpha-phosphatidylcholine Sigma-Aldrich) diluée dans 9 ml d'éthanol absolu 99%.

La solution (C) contient 0,75 ml de l'extrait enzymatique, donc le matériau a reçu 85,5 µg de phytase de *Bacillus subtilis*.

20 Ratios molaires de la synthèse du TMC avec le DCD :

1 TEOS/1,33 Acétate Na/146 H₂O/68 Ethanol/0,62 DCD/0,2 Lécithine

La solution (B) a été ajoutée lentement à la solution (A) sous agitation. Le mélange A+B a été maintenu sous vive agitation (500 tours par minutes) pendant 10 minutes, puis la solution (C) a été ajoutée au mélange A+B.

25 La solution A+ B + C a été maintenue sous vive agitation (900 tours par minutes) pendant 10 minutes supplémentaires avant l'addition de 0,4 ml d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS, Fluka). Après l'ajout de TEOS, on a laissé la préparation sous agitation pendant 90 minutes. Ensuite la solution a été mise à maturation à 33°C pendant 24 heures.

Le lendemain, la préparation a été centrifugée afin de récupérer le précipité. Deux lavages successifs ont été effectués avec la solution tampon utilisée précédemment. L'échantillon a ensuite été séché sous vide pendant 48h.

5 **Exemple 6: Fixation d'une phytase recombinante issue de *Bacillus subtilis* et *Aspergillus niger* au sein de la matrice de silice par le procédé de l'invention en présence de DCD**

Cet exemple illustre la méthode de l'invention appliquée à l'encapsulation simultanée de deux phytases recombinantes, dont l'une est une
10 phytase acide (Ac, issue de la surexpression du gène phyA de *Aspergillus niger*) et l'autre est alcaline (Alc, issu de la surexpression du gène PhyC de *Bacillus subtilis*).

Les deux extraits phytasiques Ac et Alc ont été obtenus par surexpression du gène phyA de *Aspergillus niger* ou du gène PhyC de *Bacillus*
15 *subtilis*, par la levure *Pichia pastoris* (Boze, H., et al., 2004).

On a utilisé un extrait concentré Ac dont l'activité spécifique était égale à 5400 UI/ml et la concentration protéique égale à 80 mg/ml et un extrait concentré Al dont l'activité spécifique était égale à 5,5 UI/ml et la concentration protéique égale à 0,114 mg/ml.

20 Trois solutions (A), (B) et (C) ont été préparées à température ambiante avant d'être mélangées selon le protocole suivant:

La solution (A) contient 117,7 mg de DCD dissous sous agitation rapide dans 7 ml de solution tampon acétate de sodium 0,5 M à pH 5,5.

La solution (B) contient 300 mg de lécithine (avec 50% de l-alpha-phosphatidylcholine Sigma-Aldrich) diluée dans 9 ml d'éthanol absolu 99%.
25

La solution (C) contient un mélange de 0,75 ml de l'extrait enzymatique Ac et de 0,75 ml de l'extrait enzymatique Alc, donc le matériau a reçu 60 mg de phytases acides Ac et 85,5 µg de phytases alcalines Alc simultanément.

Ratios molaires de la synthèse du TMC avec le DCD :

30 1 TEOS/1,33 Acétate Na/146 H₂O/68 Ethanol/0,62 DCD/0,2 Lécithine

La solution (B) a été ajoutée lentement à la solution (A) sous agitation. Le mélange A+B a été maintenu sous vive agitation (500 tours par minutes) pendant 10 minutes, puis la solution (C) a été ajoutée au mélange A+B.

La solution A + B + C a été maintenue sous vive agitation (900 tours
5 par minutes) pendant 10 minutes supplémentaires avant l'addition de 0,4 ml d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS, Fluka). Après l'ajout de TEOS, on a laissé la préparation sous agitation pendant 90 minutes. Ensuite la solution a été mise à maturation à 33°C pendant 24 heures.

Le lendemain, la préparation a été centrifugée afin de récupérer le
10 précipité. Deux lavages successifs ont été effectués avec la solution tampon utilisée précédemment. L'échantillon a ensuite été séché sous vide pendant 48h.

L'activité des enzymes associées présentes dans le matériau obtenu est présentée dans la figure 11 et est mesurée à l'aide du protocole suivant :

Dans un tube à centrifuger de 1,5 ml :
15 Tampon MES pH7 0,5M = 100 µl
CaCl₂ 2mM = 25µl
PhytateNa 10mM = 25 µl
Extrait du produit selon l'invention avec BS 1mg/ml = 50 µl
Acide Tri chlore acétique (TCA) 1N = 200µl
20 5 minutes de réaction à 37°C
Le phosphore est mesuré à l'aide de la méthode de Ohno T et al. (1991).

Bibliographie

- 25 - FR 2 879 186 ;
- Laveille, P., et al. (2010). "Oxidation reactions using air as oxidant thanks to silica nanoreactors containing GOx/peroxidases bienzymatic systems", Catalysis Today, 157, 94-100;
- Galarneau et al (2007). "Understanding the stability in water of mesoporous
30 SBA-15 and MCM-41." Journal of Physical Chemistry C 111(23): 8268-8277;

- Hossain, K.-Z., et al. (2008). "Adsorption of urease on PE-MCM-41 and its catalytic effect on hydrolysis of urea." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **62**(1): 42-50 ;
- Gogos, A., et al. (2012). "Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization:
5 Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(39): 9781-9792 ;
- Burns et al , (2013). ; Soil Biology & Biochemistry 58 (2013) pp 216-234 ;
- Oakley AJ et al. (2010). "The structure of *Aspergillus niger* phytase phyA in complex with a phytate mimetic." Biochem Biophys Res Commun **397**(4):745–
10 749 ;
- Boze, H., Laborde, C. et al. (2004). "Overexpression of ovine leptin in *Pichia pastoris*: physiological yeast response to leptin production and characterization of the recombinant hormone" Yeast, **21**(3): 249-263 ;
- Trouillefou, Christophe Marcel, Edith Le Cadre, Thomas Cacciaguerra,
15 Frédérique Cunin, Claude Plassard, et Emmanuel Belamie. (2015). "Protected activity of a phytase immobilized in mesoporous silica benefits to plant phosphorus nutrition". Journal of Sol-Gel Science and Technology, **74**(1) : 55-65;
- Ohno, T., et L. M. Zibilske. (1991). "Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using Malachite green". Soil Science Society of America Journal **55** (juin): 892-95 ;
20
- Cornell, R. M., et U. Schwertmann. (2006). "The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses". Wiley ;
- Q Qian, P., et J. J. Schoenau. (2002). "Practical Applications of Ion Exchange Resins in Agricultural and Environmental Soil Research". Can. J. Soil Sci. **82**
25 (février): 9-21. ;
- Ali, M. A., et al. (2009). "*Pinus pinaster* seedlings and their fungal symbionts show high plasticity in phosphorus acquisition in acidic soils", Tree Physiology, **29**, 1587-1597.
- Guerrero-Olazarán, M, Rodríguez-Blanco L, Gerardo Carreón-Treviño J,
30 Gallegos-López J A, and Viader-Salvado J M. (2010). "Expression of a *Bacillus*

Phytase C Gene in *Pichia Pastoris* and Properties of the Recombinant Enzyme”
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 76 (16): 5601–8.

- GALARNEAU Anne et al. (2010). "Sponge Mesoporous Silica Formation Using
Disordered Phospholipid Bilayers as Template", J. Phys. Chem., B2010, 114,
5 2140-2152.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fixation d'une molécule organique biologiquement active au sein d'une matrice de silice, ledit procédé comprenant les étapes suivantes
5 consistant à :

(1) préparer une solution aqueuse (A) contenant une amine choisie parmi les acides aminés, les oligopeptides, les amines comprenant un groupe nitrile, l'urée et leurs mélanges, préparer une solution alcoolique (B) d'au moins un alcool en C₁-C₆ et d'au moins un phospholipide, et préparer une solution
10 aqueuse (C) de la molécule biologiquement active,

(2) incorporer la solution (B) dans la solution (A) sous agitation pour obtenir la formation une mésophase lyotrope,

(3) incorporer la solution (C) dans le mélange (A+B) obtenu à l'issue de l'étape (2),

15 (4) ajouter au mélange obtenu à l'issue de l'étape (3), au moins un tétra-alcoxysilane, puis laisser reposer pendant une durée suffisante pour obtenir des particules solides poreuses à base de silice renfermant la molécule biologiquement active.

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'amine est choisie parmi les acides aminés apolaires en particulier parmi la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la glycine, l'alanine, et la proline, en particulier il s'agit de l'alanine.

25 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'amine est choisie parmi les oligopeptides, en particulier choisie parmi les dipeptides tel que la glycyl-glycine.

30 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'amine est la 2-cyanoguanidine.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la solution alcoolique (B) contient une amine choisie parmi les acides aminés, les oligopeptides, les amines comprenant un groupe nitrile, l'urée et leurs mélanges.

5

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la solution alcoolique (B) et la solution aqueuse (A) contiennent la même amine.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la solution alcoolique (B) est ajoutée goutte à goutte dans la solution aqueuse (A).

10

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on utilise, à titre de phospholipide, une lécithine contenant au moins 95% en poids de phosphatidylcholine.

15

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse (A) et le pH de la solution aqueuse (C) sont identiques et choisis de manière à stabiliser la molécule biologiquement active si besoin, en particulier compris entre 4,5 et 6.

20

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le ratio massique entre l'alcool en C₁-C₆ et l'eau est compris entre 57/48 et 55/45 dans le mélange final (A+B+C).

25

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisé en ce que le rapport massique entre le phospholipide et l'amine dans la solution (B), est compris entre 10/1 et 60/1, de préférence de l'ordre de 47/1.

30

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le tétra-alcoxysilane est choisi parmi les tétra-alcoxysilanes

de formule $\text{Si}(\text{O}-\text{R1})_4$, les tétra-alcoxysilanes de formule $\text{Si}(\text{R2})_n(\text{O}-\text{R2})_4$ et leurs mélanges, chaque R1 et R2 représentant indépendamment un radical alkyle linéaire ou ramifié en C_1-C_4 , de préférence en C_1-C_2 , et n valant 1, 2 ou 3.

5 **13.** Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la molécule biologiquement active est une protéine dont le diamètre moyen est compris entre 5 et 25 nm, de préférence compris entre 7 et 14 nm.

10 **14.** Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé par le fait que la molécule biologiquement active est une enzyme, de préférence une phosphatase, notamment une phytase.

15 **15.** Molécule organique biologiquement active fixée au sein d'une matrice de silice susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

20 **16.** Composition, en particulier d'engrais, comprenant la molécule fixée au sein d'une matrice de silice selon la revendication 15 et un excipient.

25 **17.** Utilisation d'une phosphatase fixée au sein d'une matrice de silice susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou d'une composition la comprenant pour la nutrition phosphatée des végétaux.

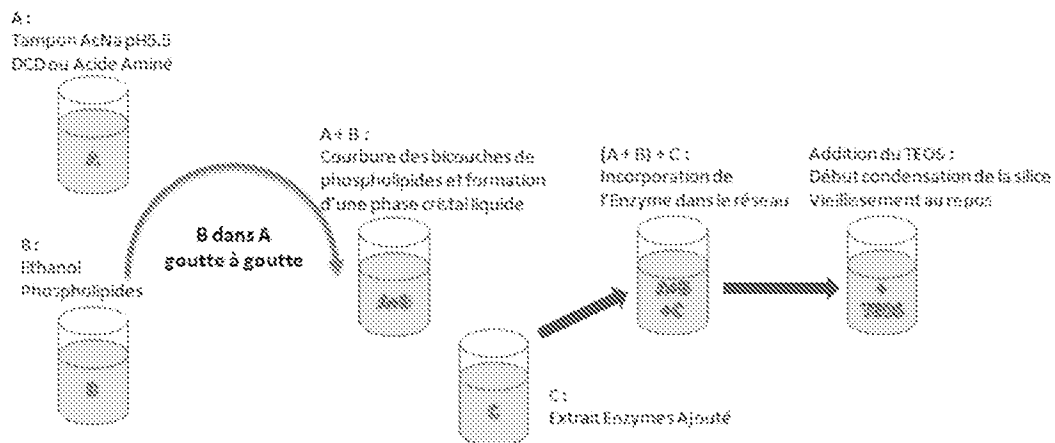


FIG 1

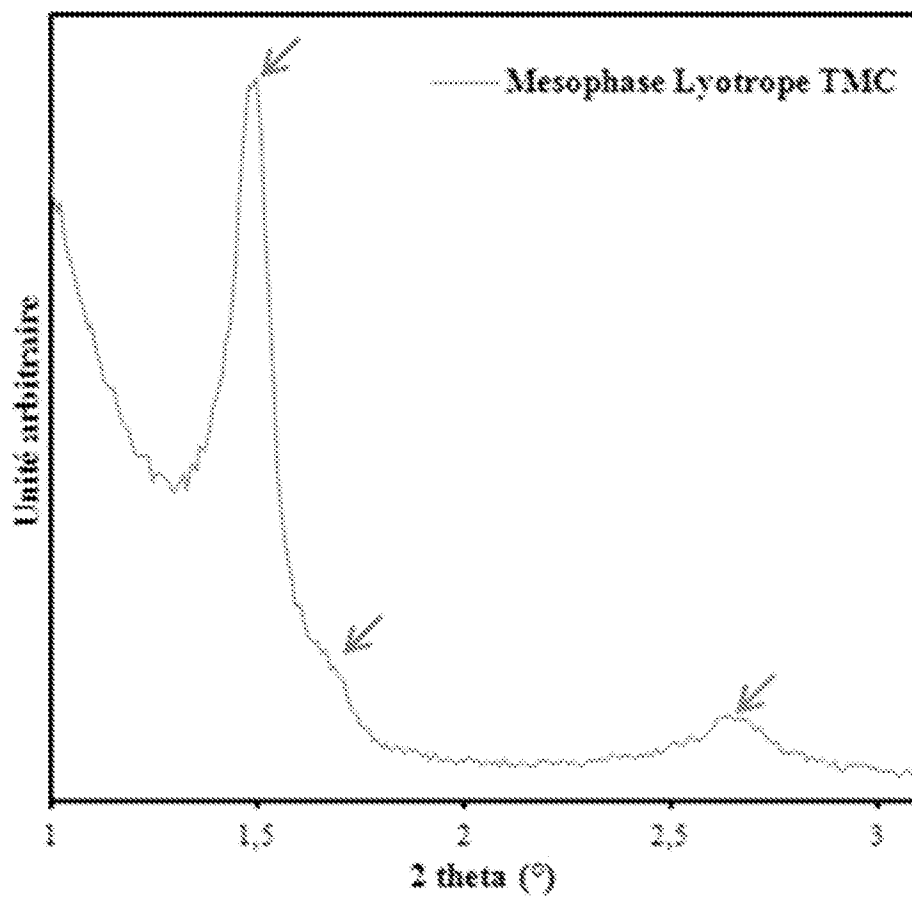


FIG 2

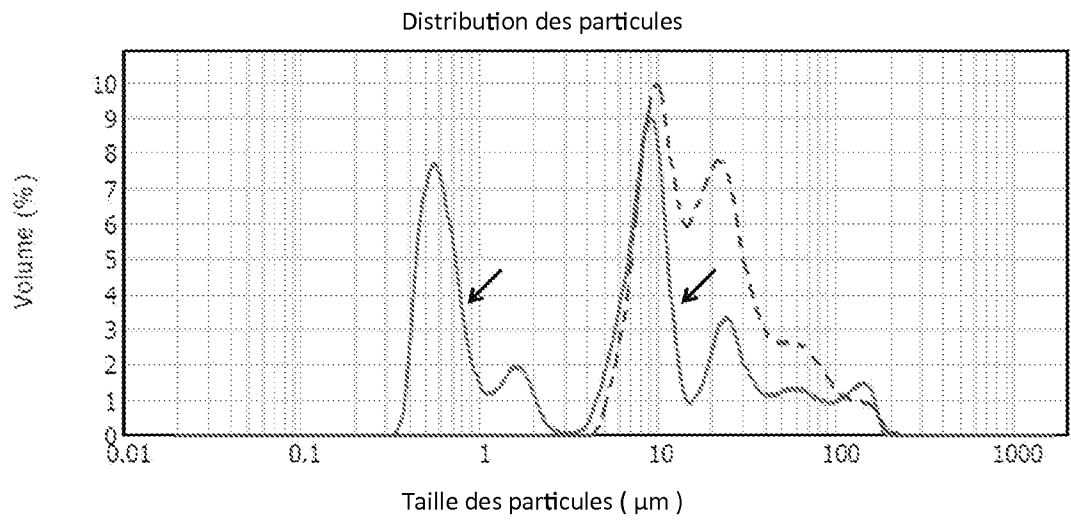


FIG 3

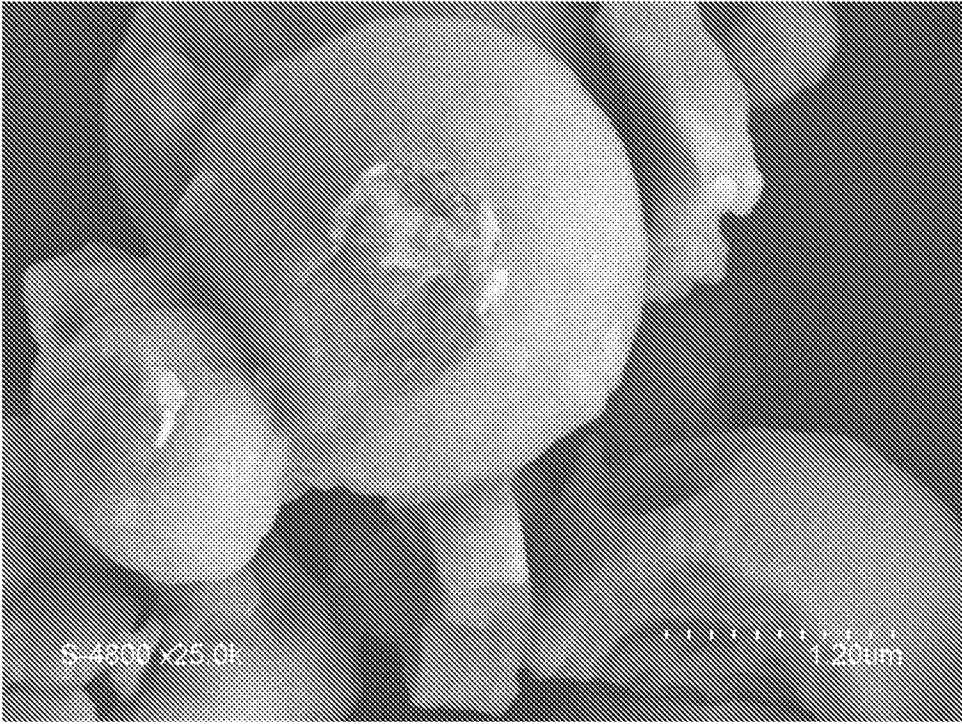


FIG 4

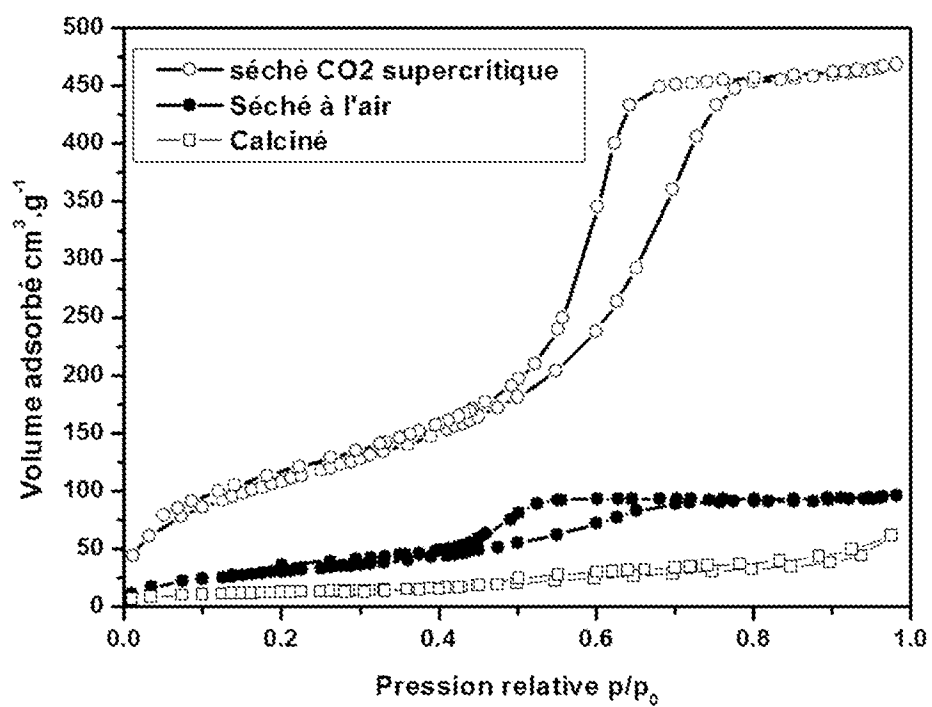
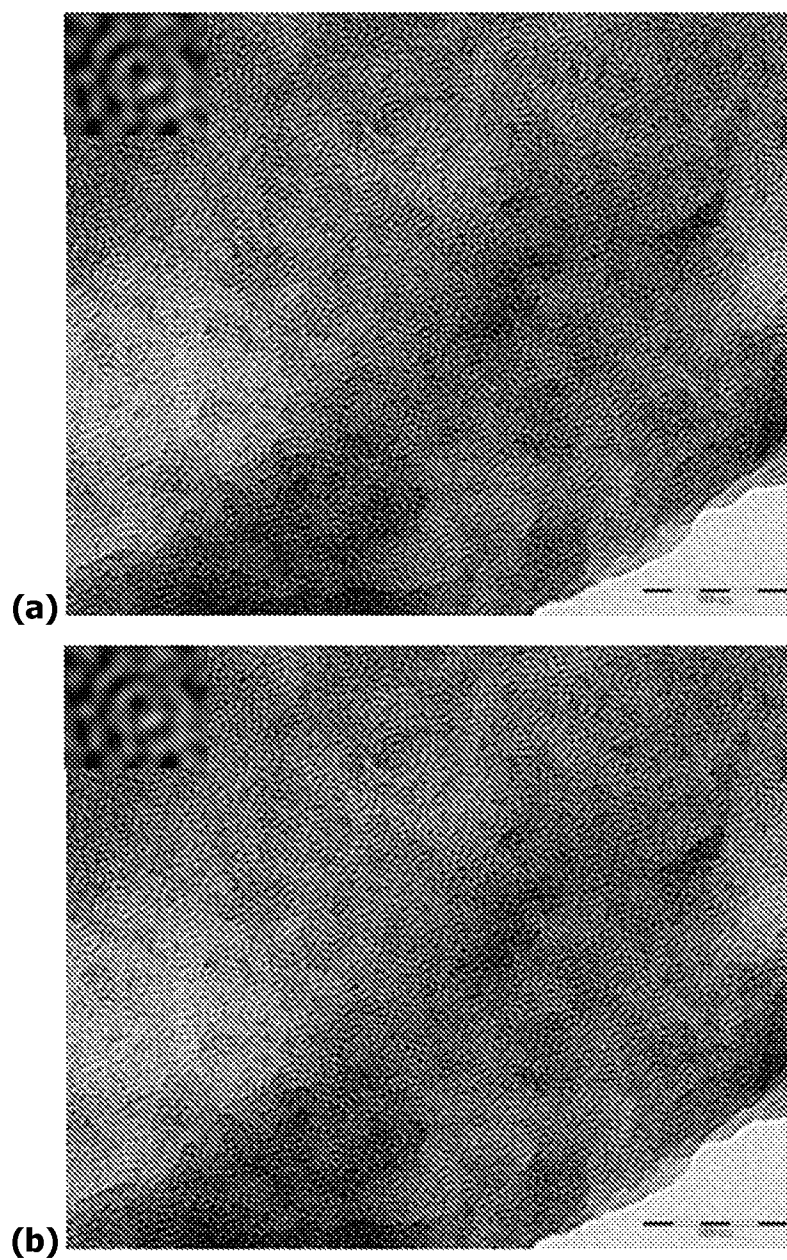
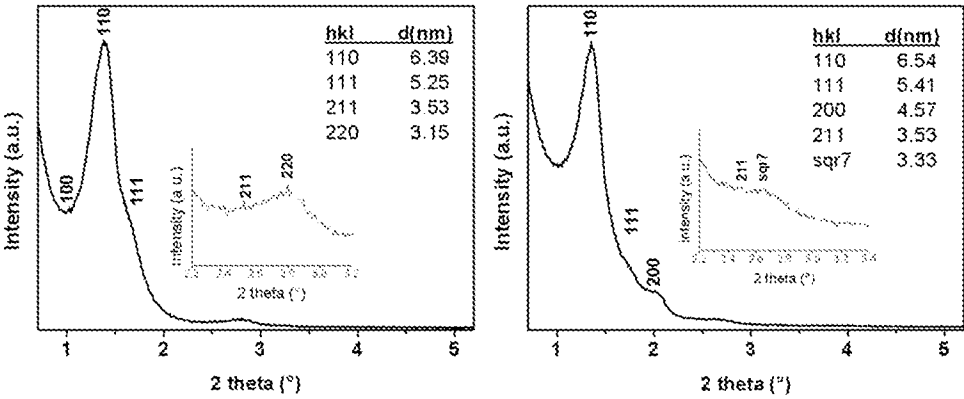


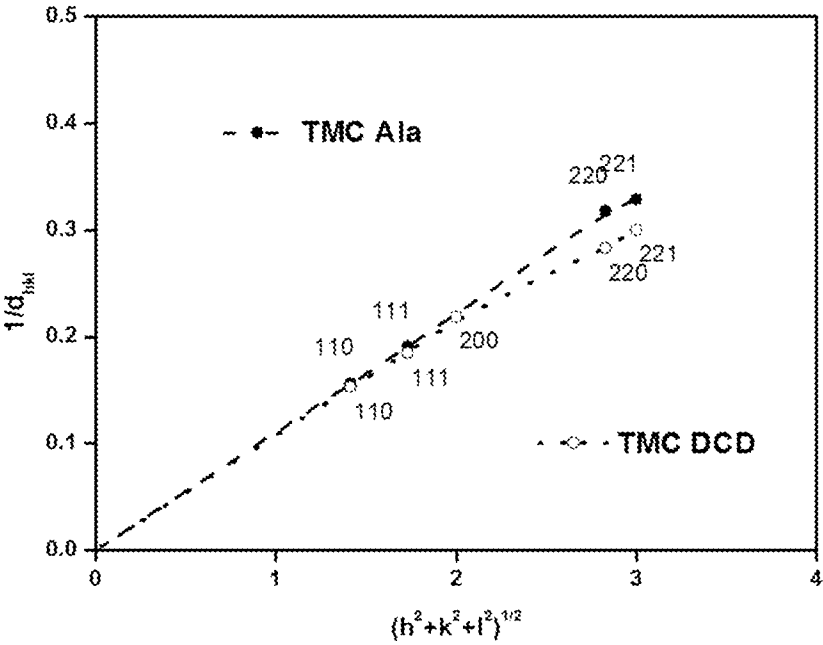
FIG 5

**FIG 6**



(a)

(b)



(c)

FIG 7

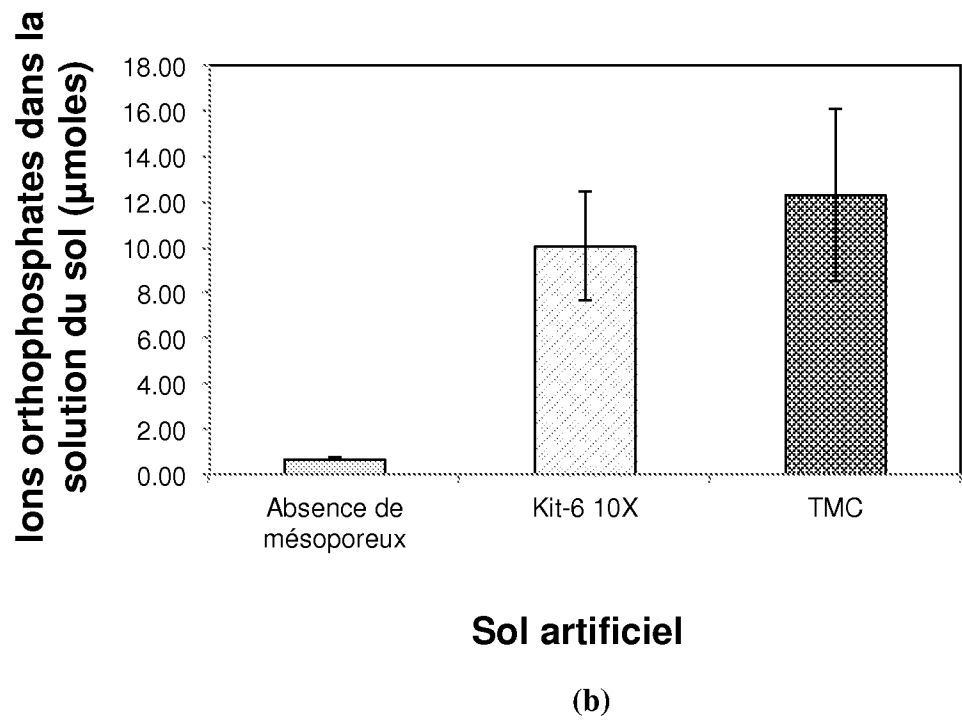
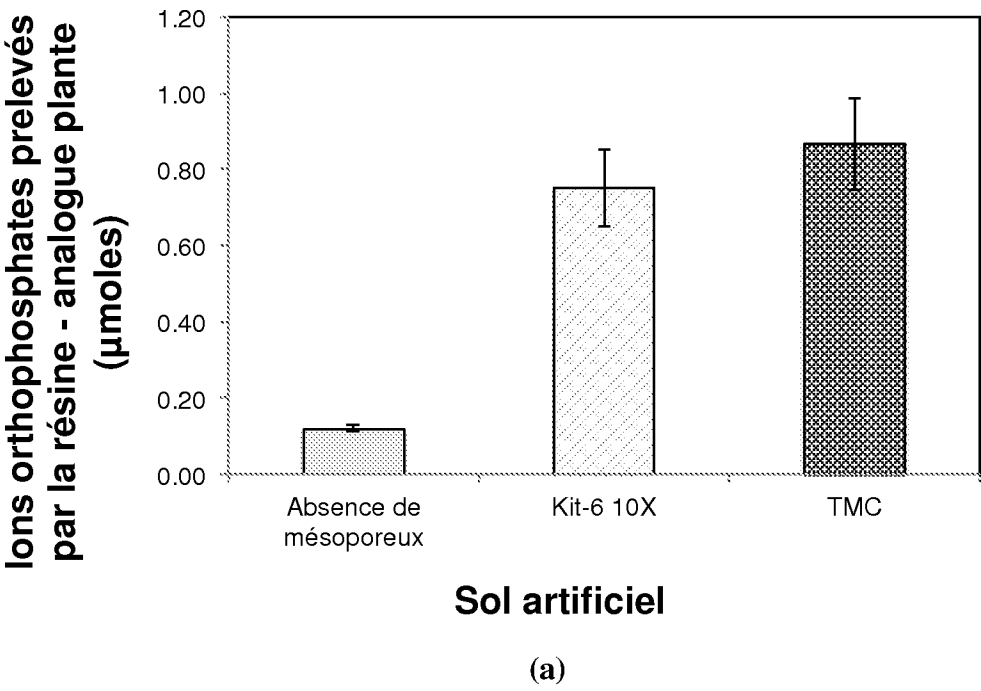


FIG 8

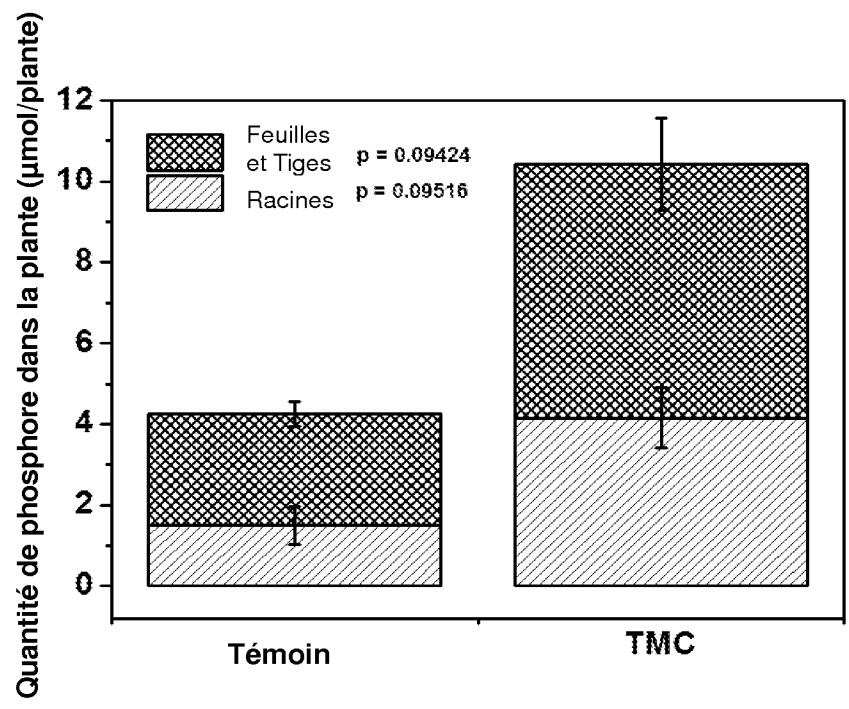


FIG 9

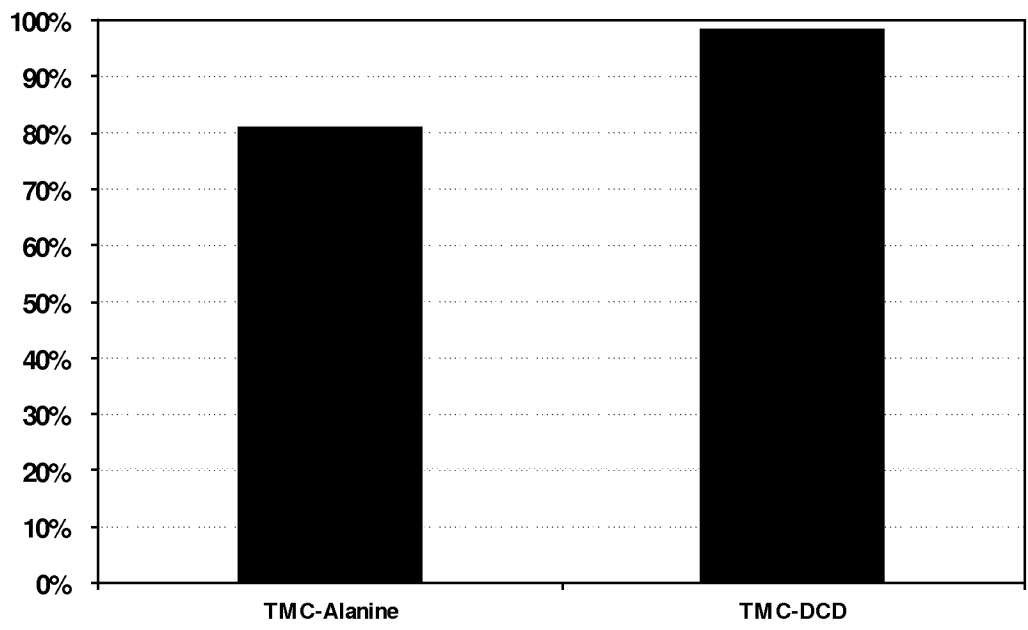


FIG 10

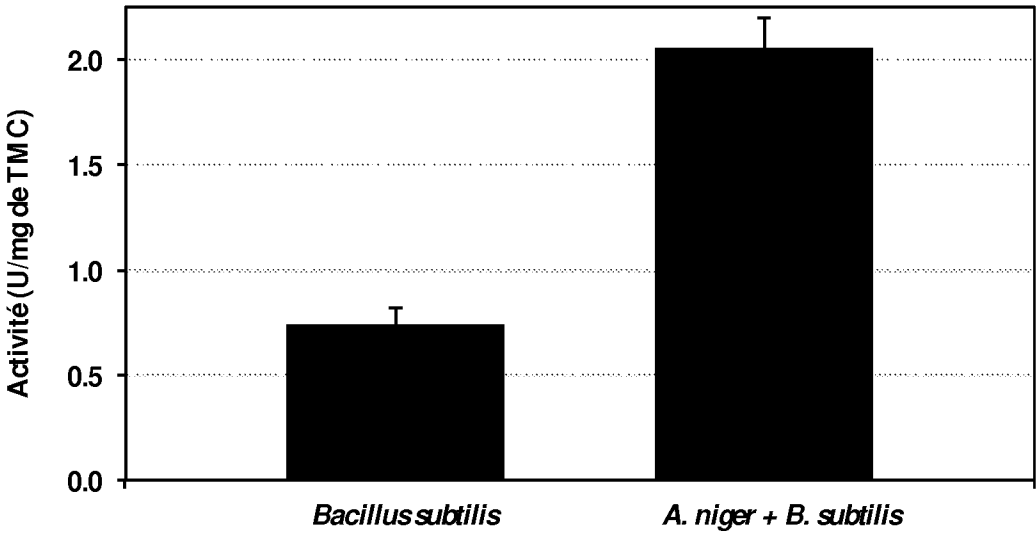


FIG 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/051701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/00 C12N11/04 C12N11/06
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A GALARNEAU ET AL.: "Sponge mesoporous silica formation using disordered phospholipid bilayers as template", JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, vol. 114, no. 1, 2010, pages 2140-2152, XP002751610, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, OH ISSN: 1520-5207 the whole document ----- -/--	15,16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2016

Date of mailing of the international search report

27/10/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, Pietro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/051701

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P LAVEILLE ET AL.: "Oxidation reactions using air as an oxidant thanks to silica nanoreactors containing GOx/peroxidases bienzymatic systems", CATALYSIS TODAY, vol. 157, no. 1, 2010, pages 94-100, XP027443980, Elsevier ISSN: 0920-5861 the whole document	15,16
X	----- C M TROUILLEFOU ET AL.: "Protected activity of a phytase immobilized in mesoporous silica with benefits to plant phosphorus nutrition", JOURNAL OF SOL-GEL SCIENCE AND TECHNOLOGY., vol. 74, no. 1, April 2015 (2015-04), pages 55-65, XP035473655, SPRINGER, NEW YORK, NY. ISSN: 0928-0707 the whole document -----	15-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2016/051701

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N9/00 C12N11/04 C12N11/06 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	A GALARNEAU ET AL.: "Sponge mesoporous silica formation using disordered phospholipid bilayers as template", JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, vol. 114, no. 1, 2010, pages 2140-2152, XP002751610, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, OH ISSN: 1520-5207 le document en entier ----- -/-	15,16
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
19 octobre 2016	27/10/2016	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Masturzo, Pietro

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	P LAVEILLE ET AL.: "Oxidation reactions using air as an oxidant thanks to silica nanoreactors containing GOx/peroxidases bienzymatic systems", CATALYSIS TODAY, vol. 157, no. 1, 2010, pages 94-100, XP027443980, Elsevier ISSN: 0920-5861 le document en entier -----	15,16
X	C M TROUILLEFOU ET AL.: "Protected activity of a phytase immobilized in mesoporous silica with benefits to plant phosphorus nutrition", JOURNAL OF SOL-GEL SCIENCE AND TECHNOLOGY., vol. 74, no. 1, avril 2015 (2015-04), pages 55-65, XP035473655, SPRINGER, NEW YORK, NY. ISSN: 0928-0707 le document en entier -----	15-17