REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DE SCIENCE

Mémoire
Présenté pour obtenir le diplôme de
Master

En chimie

Spécialité: Chimie Pharmaceutique

Par :
Bensalem chaimaa
El MOHRI hadjer

Thème

Élimination d'un polluant organique par la peroxydase des plantes

Devant le jury composé de:

EULDJI .A	MAA	UYFM	Présidente
ARBIA .W	MCB	UYFM	Examinatrice
AHMEDI .A	MCB	UYFM	Encadreur

PROMOTION 2019/2020

الملخص

الهدف من هذا العمل هو التخلص من صبغة الازو التي تسمى الكونغو الأحمر بواسطة البيروكسيداز الحر والمثبت من خلال دراسة تأثير العوامل الفيزيائية و الكيميائية مثل : درجة الحموضة و درجة الحرارة و تركيز الركائز و الإنزيمات على مردود التفكك.

أسفر استخراج وتنقية بيروكسيداز الخيار من الحصول على مستخلص إنزيمي له نشاط 2606.75 وحدة دولية و نشاط محدد12.77 وحدة دولية/ملغ. تم الحصول على مردود التنقية بنسبة 33.82% يعني أن الإنزيم يحتمل أن يكون فعالا في معالجة المحاليل الملونة.

تم إلغاء جزء من إزالة لون الكونغو الأحمر بواسطة البيروكسيداز الحر و المثبت بواسطة وباء كوفيد 19 .

الكلمات المفتاحية : بيروكسيداز ،تنقية ، نشاط الأنزيمي ،إزالة.

Résumé

L'objectif de ce travail, est l'élimination d'un colorant azoïque appelé Rouge Congo par la peroxydase libre et immobilisée en étudiant l'effet des paramètres physico-chimiques tels que : le pH, la température, la concentration des substrats et d'enzymes sur le rendement de dégradation.

L'extraction et la purification de la peroxydase de concombre ont permis d'obtenir un extrait enzymatique ayant une activité de 2606.75 UI et une activité spécifique de 12.77UI/mg. On à trouvé que le rendement de purification de 33.82% ci que signifie que l'enzyme potentiellement efficace dans le traitement des solutions colorées.

La partie de décoloration du Rouge Congo par la peroxydase libre et immobilisée a été annulé par la pandémie du Covid19

Mots clés : peroxydase, purification, activité enzymatique, élimination.

Abstract

The objective of this work is the elimination of an azo dye called Congo red by the free and immobilized peroxidase by studying the effect of physicochemical parameters such as: pH, temperature, concentration of substrates and enzymes on the degradation yield.

Extraction and purification of cucumber peroxidase yielded an enzyme extract with an activity of 2606.75 IU and a specific activity of 12.77 IU / mg. The purification yield of 33.82% was found to mean the enzyme potentially effective in treating colored solutions.

The part of discoloration of Congo red by free and immobilized peroxidase has been canceled by the Covid19 pandemic

Key words: peroxidase, purification, enzymatic activity, elimination.

REMMERCIMENT

Tout d’abord nous remercions ALLAH tout puissant qui nous a donnés le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions très sincèrement les membres de jury de participer à l’évaluation de notre travail. Nous somme certains de pouvoir compter sur leurs vastes connaissances.par leur commentaires et leurs discussion .à mieux comprendre certains problèmes rencontrés au cours de ce travail.

Nous remercions chaleureusement notre promotrice madame AHMEDI.A pour sa disponibilité à toute épreuve, pour sa gentillesse et sa patience, pour ses orientations et ses remarques fructueuses. Tout notre respect et notre gratitude, merci.

Ce travail n’aurait jamais pu se réaliser sans le soutien continu de nos familles surtout nos chers parents, qui sont fiers de nous.

Nous remercions toutes les personnes qui ont eu une influence sur ma vie de tous les jours pendant la durée de ma thèse (Chaimaa et hadjer).

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents pour leur générosité et leurs sacrifices
Ames chers frères et sœurs Pour leurs soutiens
Moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.
A toutes mes amies sans exception,
A toutes les personnes qui m'ont soutenu et encouragé et dont je n'ai pas cité le nom.

Chaimaa

Dédicace

A mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien, et leur encouragement. Aucune dédicace ne pourra exprimer la profondeur de mes sentiments.

A mon cher mari Issam qui à été toujours à mes cotés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourage, et mon cher fils.

Et mes chers mes chers beaux-parents qui ma aidé avec ses prière

A mes chers sœurs Sarah, Soumia et Maria.

A mon cher frère Mohamed.

A mes belles- sœurs et beaux frères et leurs enfants.

A mes cheres amies, Samia et mon binôme Chaimaa

A mes chers professeurs et maitres du primaire jusqu'aux études supérieure.

Hadjer

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction générale	
chapitre I : Pollution par les colorants	
Introduction	03
I.1.La pollution	04
I.2. pollution de l'eau	04
I.3. Sources de pollution de l'eau	04
I.4. types de la pollution	05
I.4.1. Pollution chimique	05
I.4.2. pollution physique	06
I.4.3 Pollution microbiologique	06
I.5.Les colorants	07
I.5.1. l'origine des colorants	07
I.5.2. Définition et structure des colorants	08
I.5.3. Classification des colorants	09
I.5.4. Utilisation et application des colorants	15
I.5.5. Toxicité des colorants	16
I.6 Principale méthodes de décoloration	18
Conclusion	25
Chapitre II: La peroxydase	
Introduction	26
II.1.les enzymes et l'activité enzymatique	26
II.1.1.Définition	26
II.1.2.structure des enzymes	26
II.1.3. Classification des enzymes	26
II.2.PEROXYDASE	28
II .2.1. Définition et constitution de la peroxydase	28
II .2.2. Structure des peroxydases	28
II. 2.3. Classification	29
II.2 .4. Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique	30
II.2. 5. Législation sur l'environnement	32
II.2. 6. Applications biotechnologiques des peroxydases	32
II.3. La cinétique enzymatique Michaéliennes	35
II.3.1 Vitesse (V) de la réaction en fonction de la concentration de substrat (S). Equation de Michaelis-Menten	35

II.3.2. réaction à deux substrats	38
II.4. Cinétique enzymatique	39
II.4.1. Définition des unités enzymatiques	39
II.4. 2. Influence des paramètres physiques sur la cinétique	40
II.5. Immobilisation des enzymes	43
II.5.1. Définition de l'immobilisation	43
II.5.2. Propriétés des enzymes immobilisées	44
II.5.3. Méthodes d'immobilisation des enzymes	44
Conclusion	51
Chapitre III. Matériel et méthodes	
Objectif	53
III. Matériels et Méthodes	54
III.1. Équipement et verreries	54
. III.1.1. Réactifs utilisés	54
III.1.2. Colorant azoïques étudié	55
III.1.3.Solution Tampons	56
III.2.Méthode expérimentales	56
III.2.1.La source végétale de la peroxydase	56
III.2.2.Purification de la peroxydase	57
III.3. Mesure de l'activité enzymatique des extraits avant et après la purification	58
III.4. Dosage des protéines totales	59
III.4.1. Principe	60
III.4.2. Méthode	60
Chapitre IV : Résultats et discussion	
IV.1. Extraction et purification de la peroxydase	63
IV.1.1. Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits	63
IV.1.2. Dosage de la quantité de protéines	64
IV.2 Détermination des paramètres de purification	65
Conclusion générale	67
Référence bibliographique	

LISTE DES FIGURES

Chapitre I. Pollution par les colorants.

Figure I-1 : Domaine d'absorption de la lumière visible……..…8

Figure I -2 : Exemple de colorant Azoïque……10

Figure I-3 : Exemple de colorant anthraquinonique……....10

Figure I-4 : Exemple de colorant indigoïdes……...10

Figure I.5 : Exemple de colorant xanthènes.....11

Figure I-6 : Exemple de colorant Phtalocyanine……....11

Figure I-7 : Exemple de colorant nitré……12

Figure I-8: Exemple de Colorant acide……...….12

Figure I-9: Exemple de Colorant basique……...13

Figure I-10 : Exemple de Colorant de cuve……13

Figure I-11 : Exemple de Colorant directs…….....14

Figure I-12 : Exemple de Colorant à mordants..……14

Figure I-13 : Exemple de Colorant développés……...15

Chapitre II: la peroxydase

Figure II-1 : Structure de Ferriproto-porphyrine IX des peroxydases…….……29

Figure II-2 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase…….……29

Figure II-3: Mécanisme réactionnel de la peroxydas …….....….31

FigureII-4 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale du substrat pour une réaction de Michaelis-Menten……....36

FigureII-5 : Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Line-weaver ….....37

FigureII-6 : Mécanismes séquentiel (à complexe ternaire) aléatoire……..39

FigureII-7 : Mécanisme Ping-pong ……39

FigureII-8 : Représentation graphique de l'effet de température sur l'activité enzymatique.41

FigureII-9 : Représentation graphique de l'effet de pH sur l'activité enzymatique …...……41

FigureII-10 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique……...42

FigureII-11 : Adsorption des enzymes sur un support……....45

FigureII-12 : Les possibilités d'orientation…….…46

Figure II -13 : Inclusion dans un réseau de polymère insoluble……..46

Figure II -14 : Inclusion dans le gel de polyacrilamide……..……47

Figure II -15 : Encapsulation des enzymes……..48

Figure II -16: Immobilisation par liaison covalente sur support. 1ère étape: Activation du support, 2ème étape: fixation de l'enzyme……..50

Figure II-17 : Réticulation et Co-réticulation des enzymes…….51

Chapitre III: matériel et méthodes

Figure III-1 : Structure moléculaire de rouge Congo……..56

Figure III- 2 : Colorant rouge Congo poudre……..56

Figure III-3 : les étapes de broyage et la filtration et purification de l'enzyme……...58

Figure. III-4: Réaction entre le phénol et la peroxydase de d'hydrogène en présence de 4- amino-antipyrine et la peroxydase……..…..59

Figure III-5 : la méthode de Bradford ……...….61

Chapitre IV : Résultats et discussion

Figure IV- 1: Activité enzymatique pour les deux extraits: EBB, EEPP……....63

Figure IV-1: Courbe d'étalonnage de la protéine SAB suivant la méthode de Bradford……64

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I. Pollution par les colorants.

Tableau I-1 : Principaux groupes chromophores et auxochromes classés par intensité croissante……9

Tableau I -2 : Principaux avantages et inconvénients des techniques de traitements des colorants……....21

Chapitre II: la peroxydase.

Tableau II- 1. Les six classes d'enzymes……27

Tableau II-2 : Norme (NT 106.02, 1989) des rejets d'effluents…….32

Tableau II-3 : Facteurs influant l'activité enzymatique……..42

Chapitre III : matériel et méthodes

Tableau III-1 : Verreries et instruments et Appareillages utilisé en expérimentation……....54

Tableau III-2 : propriétés physicochimiques du phénol et 4-Aminoantipyrine……..55

Tableau III- 3. Courbe d'étalonnage de sérum d'albumine(SAB)…….….61

Chapitre IV. Résultats et discussion

Tableau. IV-1:Résultats de purification de la peroxydase de concombre……..….65

Nomenclatures et abréviation

Symbole	Signification
APX	Ascorbates peroxydases
CCP	Cytochromes c peroxydases
CP	Catalases
DBO5	Demande biochimique en oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
EEB	Extraction enzymatique brut
EEPP	Extrait enzymatique partiellement purifié
HRP	Peroxydase de raifort (« horseradish peroxide)
LiP	Lignines peroxydases
MnP	Manganèses peroxydases
PCB	Biphényles polychlorés
POX	Peroxydase
VP	Peroxydases dites «versatiles
THM	Trihalométhanes
HRP	Peroxydase de raifort (« horseradish peroxidase »,
SAB	Sérum d'albumine bovin
S	Substrat
V	Vitesse
P	produit.
E	Enzyme,
ES	Complexe enzyme-substrat,
UV	Ultraviolet
DO	Densité optique

LISTE DES SYMBOLES

Symbole	Unité	Définition
k1,k2,k3		constante de vitesses
Kcat	µmol/s/unité enzymatique	constante catalytique
Km	mol /L ou mg /L	constante de Michaelis
Vmax	Ul/ml ou mg/ (L.min)	vitesse maximale
V0	Ul/ml ou mg/ (L.min**)**	vitesse initiale
λ	nm	Longueur d'onde
ε	$cm^2.mol^{-1}$	Coefficient d'extinction molaire
UI	$\mu mol.min^{-1}$	Unité internationale
DL_{50}	mg/kg	Dose létale provoquant 50٪ de mortalité.
AE	$UI.ml^{-1}$	Activité enzymatique
AS	UI.mg-1	Activité enzymatique spécifique

Introduction générale

Introduction générale

Le plus grand danger pour l'environnement et la dégradation des écosystèmes est la pollution des eaux. Quelle soit accidentelle ou volontaire, cette pollution est le résultat de l'utilisation massive de polluants organiques et minéraux d'origine agricole, urbaine et industrielle. Ainsi, l'industrie textile en particulier, constitue une source importante des effluents liquides chargés de polluants à cause du grand volume d'eau et de substances colorantes et non colorantes utilisées au cours des opérations d'impression, de teinture et de finissage. Les effluents contenant ces colorants sont hautement colorés, ce qui rend la couleur le premier contaminant des effluents [Ali ; 2010].

Les colorants synthétiques employés dans l'industrie textile dont la plus grande partie est constituée de colorants azoïques et anthraquinoniques (65-75% des colorants), représentent ce type de contaminants

Parmi les milliers d'enzyme identifiées et souvent connues dans les moindres détails , les biochimistes sont intéressés à l'une des plus répondues qui soient.les peroxydases ont une grande importance grâce à la diversité de leur aspects quantitatifs et qualitatif fait de ces oxydoréductases des marqueurs potentiels chez plusieurs êtres biologiques et aussi grâce aux applications qu'elles possèdent non seulement au niveau de laboratoire , mais aussi au niveau des industries :Alimentaires, détergents, pharmaceutiques.

Au vue du ce qui possède, on se rend compte que la peroxydes est une enzyme qui mérite d'être connue chez la nouvelle génération des chimistes pour pouvoir en sortir et mettre à profit tous les avantages qu'elle présente.

Une étude catalytique de la peroxydase est un pas pour passer aux études concernant la connaissance de ses caractéristiques, propriétés, rôle et applications. Cette étude nous permet d'identifier toutes les conditions nécessaires et optimales dont elles donnent son point d'activité maximal tout en mettant aussi en évidence l'influence de quelques agents chimiques sur son activité catalytique.

La rétention d'enzyme dans une phase insoluble "immobilisation" a suscité un très grand intérêt vu les avantages qu'elle présente : elle donne une meilleure stabilité à l'enzyme et la mise en œuvre des procédés continus avec un cout moindre pour une production industrielle.

L'objectif du présent travail est d'effectuer une étude catalytique de la peroxydase en déterminant l'influence de la température, pH, concentration en substrats et quelques agents chimique sur l'activité enzymatique de la peroxydase de concombre sous forme libre ou immobilisée. Par ailleurs, une étude comparative de la peroxydase sera menée afin d'étudier l'effet de l'immobilisation, dans un support qui est l'alginate de calcium, sur sa cinétique et sur son activité catalytique en comparaison avec les résultats obtenus pour l'enzyme libre.

La partie de décoloration du Rouge Congo par la peroxydase libre et immobilisée a été annulé par la pandémie du Covid19

Chapitre I :

Introduction

La pollution de l'environnement est l'un des problèmes major dans le monde, les industries constituent la première source de pollution y compris l'industrie textile. Cette dernière génère plus de 28.10^4 tonnes de colorants annuellement dans le milieu naturel [Singh 2015]. L'Algérie est dotée de 39 entreprises dans le secteur de textile, et y consomme 40.12 tonnes de colorants et pigments/an, 16356 t/an de matières auxiliaires et une quantité d'eau dépassant 4.8 millions t/an. Ce qui génère des rejets volumineux et chargés. Cependant, selon les données publiées par la même référence, 30 % des industries correspondant aux sous-secteurs textiles de la teinture, du finissage et de l'impression possèdent des stations d'épuration des eaux résiduaires et 70 % réalisent le rejet sans épuration préalable [l'Industrie textile2002], une quantité plus au moins importante de colorant est dégagée dans les eaux de rejets sans aucun traitement préalable ou par manque d'affinité avec les surfaces à teindre, ce qui nécessite un traitement utilisant une ou des méthodes de dépollution adaptée. D'une part ce traitement permet de réduire les paramètres écologiques : DCO, DBO5, les composés organohalogénés adsorbables, la température, le pH et d'autre part la diminution de la concentration de colorant .D'une manière générale, les colorants doivent être séparés et éliminés des rejets selon des méthodes incluant : les méthodes physiques, les méthodes chimiques et les méthodes biologiques [Carmen 2012].

I.1 .La pollution :

La contamination et la pollution se rapportent toute les deux à la présence des produits chimiques dans l'environnement. La contamination se réfère à la présence d'un ou plusieurs produits chimiques à des concentrations plus hautes que la normale, mais non assez pour causer des dégâts biologiques ou écologiques [Freedman, 2003].

Cependant le verbe Polluer est dérivé du latin polluere: de faute ou de corruption. De ce fait le sens le plus commun est de faire quelque chose d'impropre ou nuisible pour les êtres vivants, en particulier par l'ajout des déchets ou des eaux usées [Cunningham, 2003].

Les polluants peuvent être également caractérisés par leur classes chimiques ou physiques, par leur utilisations, par leur sources industrielles, par la forme ou ils sont susceptibles d'être présents (dans l'air, l'eau, la nourriture ou d'autres médias), par les organes qu'ils attaquent ou leur effets sur la santé , par les lois qui contrôlent leur utilisations et par leur formes de présences causant problème a l'échelle local, régional ou mondial. Tous ces systèmes de catégorisation sont valides mais aucun n'est sans défauts [Goldstein, 2002].

I.2 .Pollution de l'eau

L'eau est la deuxième en importance après l'air pour la vie humaine sur Terre. Notre eau est composée d'eau de surface telle que les rivières, les lacs, les mers et d'eau souterraine. [Jeng, 2007].

La pollution de l'eau décrit généralement l'introduction ou la présence des substances nocives ou inacceptables dans l'ampleur suffisante pour modifier les indices de qualité de l'eau naturelle [Nsikak, 2008]. La pollution de l'eau douce (par exemple par le biais de l'eutrophisation, l'acidification, et la pollution des eaux souterraines) est celle qui diminue sa pureté [Park, 2007].

I.3 .Sources de pollution de l'eau

En général, les eaux souterraines sont moins vulnérables à la pollution que les eaux de surface [Fawell, 2003].

Il existe des sources naturelles de contamination des eaux, tels que les ressorts des poisons, les suintements de pétrole, l'érosion et la sédimentation, mais la plupart des discussions sur la pollution de l'eau se rapportent aux changements d'origine humain qui affectent la qualité de l'eau ou son utilisation [Cunningham, 2003].

La pollution de production peut être considérée sous la rubrique des quatre grands secteurs d'activités humaines: l'industrie, l'énergie, le transport et l'agriculture. Avec l'augmentation marquée de la population et l'industrialisation, un nouvel ensemble des polluants est apparus [Goldstein, 2002].

I.4 Types de la pollution

I.4.1. Pollution chimique

Les industries chimiques continuent à synthétiser des milliers des substances chaque année. Plusieurs de ces produits sont spécifiquement conçus pour être toxiques et persistants [Angel, 2007]. Cependant, les contaminants les plus nuisibles à la santé sont les produits chimiques d'origines naturelles qui se trouvent habituellement dans les eaux souterraines. [Roberts; 2007].

1 - Le groupe des matières inhibitrices englobant :

- L'arsenic provient des pesticides, des produits de conservation du bois et de l'exploitation minière [Roberts; 2007] ;
- Le sélénium: se trouvant surtout au voisinage des mines ;
- L'uranium : se trouve dans les eaux souterraines, associé aux roches granitiques et aux autres dépôts minéraux [Fawell, 2003] ;
- Les métaux lourds, et les solvants, tels que le tri et tétrachloréthane, qui se trouvent parfois dans les eaux souterraines et les hydrocarbures en particulier les huiles de pétrole [In World Heath Organisation. Guidelines for Drinking-Water Quality, 2003].

2- Un autre ensemble qui regroupe : l'azote organique et ammoniacal, le phosphore et les composés organohalogénés ;

3 – les sels minéraux ;

4 - Les hydrocarbures aromatiques a faible poids moléculaires... a des concentrations moins de 30 µg/l [Fawell, 2003] ;

5- Les produits utilisés dans le traitement des eaux potables destinés à éliminer les microorganismes, augmenteront dans de nombreux cas les contaminants chimiques. Néanmoins, le processus peut en lui-même conduire à la formation d'autres contaminants tels que les trihalométhanes et les acides halo-acétiques provient de la réaction chimique des

oxydants naturels avec les matières organiques. Le traitement des eaux, cependant, peut prendre de nombreuses formes et peut utiliser différents produits chimiques y compris : le chlore, les chlora mines, le dioxyde de chlore et l'ozone [Fawell, 2003] ;

6- Le PCB (biphényles polychlorés), autre fois largement utilisé comme lubrifiant et liquide de refroidissement [Angel, 2007].

I.4.2. Pollution physique

La pollution physique est due essentiellement aux substances en suspension (matières solides) [Boyd, 1970].Bien que sa forme commune est la pollution thermale [Nsikak. 2008]. Elle peut englober également plusieurs autres aspects : couleur, transparence, pH dont on peut citer :

- Les matières en suspension désignent toutes les matières minérales ou organiques qui ne se solubilisent pas dans l'eau et la troublent ;
- Les déchets solides divers (objets d'origines variés) posent des problèmes d'esthétiques ;
- Les matières colorantes modifiant la transparence du milieu ;
- La pollution thermique due au rejet des eaux utilisées pour le refroidissement des installations industrielles diverses ;
- Les acides et les alcalins déchargés par l'industrie chimique et d'autres installations industrielles [Koller, 2004] ;
- Les risques nucléaires résultent des accidents divers ou des rejets des centrales nucléaires, ou dans le pire des cas, à partir d'une explosion nucléaire. Ces polluants sont notamment une série d'éléments et des composés radioactifs y compris les éléments dérivés de l'uranium, le plutonium, le césium, et l'iode [Bridgman, 2001].

I.4.3. Pollution microbiologique

Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. L'ensemble de ces organismes peut être classé en quatre grands groupes, par ordre croissant de taille : les virus, les bactéries, les protozoaires et les helminthes [Baumont, 2004].

A. Les virus : Ce sont des organismes infectieux de très petite taille (10 à 350 nm) qui se reproduisent en infectant un organisme hôte. Les virus ne sont pas naturellement présents

dans l'intestin, contrairement aux bactéries. Ils sont présents soit intentionnellement (après une vaccination contre la poliomyélite, par exemple), soit chez un individu infecté accidentellement. L'infection se produit par l'ingestion dans la majorité des cas, sauf pour le coronavirus où elle peut aussi avoir lieu par inhalation [Cshpf, 1995].

On estime leur concentration dans les eaux usées urbaines comprise entre 10^3 et 10^4 particules par litre. Leur isolement et leur dénombrement dans les eaux usées sont difficiles, ce qui conduit vraisemblablement à une sous-estimation de leur nombre réel.

Les virus entériques sont ceux qui se multiplient dans le trajet intestinal ; parmi les virus entériques humains les plus importants, il faut citer les entérovirus (exemple : polio), les rotavirus, les rétrovirus, les adénovirus et le virus de l'Hépatite A [Asano, 1998].

B. Les bactéries : Les bactéries sont des organismes unicellulaires simples et sans noyau. Leur taille est comprise entre 0,1 et 10 µm. La quantité moyenne de bactéries dans les fèces est d'environ 10^{12} bactéries/g [Asano, 1998]. Les eaux usées urbaines contiennent environ 10^6 à 10^7 bactéries/100 ml dont 10^5 proteus et entérobactéries, 10^3 à 10^4 streptocoques et 10^2 à 10^3 *clostridiums.* Parmi les plus communément rencontrées, on trouve les salmonelles dont on connaît plusieurs centaines de sérotypes différents, dont ceux responsables de la typhoïde, des paratyphoïdes et des troubles intestinaux. Des germes témoins de contamination fécale sont communément utilisés pour contrôler la qualité relative d'une eau ce sont les *coliformes thermo tolérants* [Faby, 1997].

C. Les protozoaires: Les protozoaires sont des organismes unicellulaires munis d'un noyau, plus complexes et plus gros que les bactéries. La plupart des protozoaires pathogènes sont des organismes parasites, c'est-à-dire qu'ils se développent aux dépens de leur hôte. Certains protozoaires adoptent au cours de leur cycle de vie une forme de résistance, appelée kyste. Cette forme peut résister généralement aux procédés de traitements des eaux usées [Baumont, 2004].

I.5 .Les colorants

I.5.1. L'origine des colorants :

Depuis le début de l'humanité, les colorants ont été appliqués dans pratiquement toutes les sphères de notre vie quotidienne pour la peinture et la teinture du papier, de la peau et des vêtements, etc. Jusqu'à la moitié du 19ème siècle, les colorants appliqués étaient d'origine naturelle. Des pigments inorganiques tels que l'oxyde de manganèse, l'hématite et l'ancre

étaient utilisés. Par ailleurs, des colorants naturels organiques ont été appliqués, surtout dans l'industrie de textile. Ces colorants sont tous des composés aromatiques qui proviennent essentiellement des plantes, tel que l'alizarine et l'indigo. L'industrie des colorants synthétiques est née en 1856 quand le chimiste anglais W. H. Perkin, dans une tentative de synthèse de la quinine artificielle pour soigner la malaria a obtenu la première matière colorante synthétique qu'il appela « mauve » (aniline, colorant basique). Perkin a breveté son invention et a installé une chaîne de production, qui serait bientôt suivie par d'autres. De nouveaux colorants synthétiques commencent à paraître sur le marché. Ce processus a été stimulé par la découverte de la structure moléculaire du benzène en 1865 par Kekulé. En conséquence, au début du 20ème siècle, les colorants synthétiques ont presque complètement supplantés les colorants naturels [Welham, 2000].

I.5.2. Définition et structure des colorants :

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 380 à 750 nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés chromophores.

La molécule colorante étant le chromogène (Figure 1). Plus la facilité du groupe chromophore à donner un électron est grande, plus la couleur sera intense (groupes chromophores classés par intensité croissante dans le tableau 1). D'autres groupes d'atomes du chromogène peuvent intensifier ou changer la couleur dû au chromophore : ce sont les groupes auxochromes. Les chromophores sont des groupes aromatiques (électrons π délocalisés), conjugués (liaisons π), comportant des doublets non liants (électrons n) ou des complexes de métaux de transition. Les colorants diffèrent les uns des autres par des combinaisons d'orbitales moléculaires. La coloration correspond aux transitions possibles après absorption du rayonnement lumineux entre ces niveaux d'énergie propres à chaque molécule (Capon; 1999).

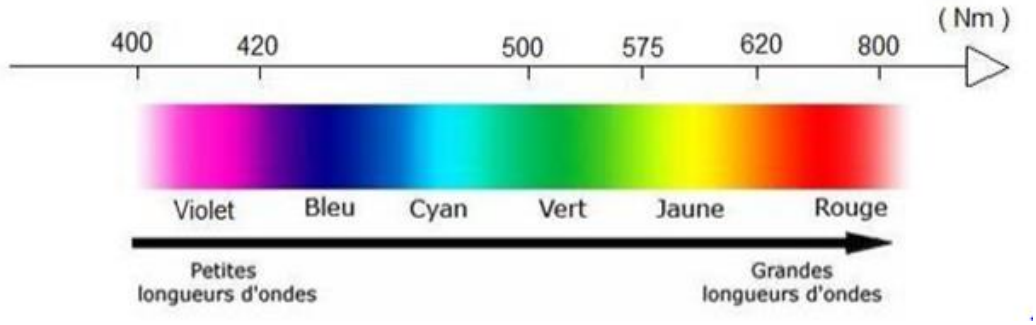


Figure I-1 : Domaine d'absorption de la lumière visible.

De manière générale, les colorants consistent en un assemblage de groupes chromophores, auxochromes et de structures aromatiques conjuguées (cycles benzéniques, anthracène, pérylène, etc.). Lorsque le nombre de noyaux aromatiques augmente, la conjugaison des doubles liaisons s'accroît et le système conjugué s'élargit. L'énergie des liaisons π diminue tandis que l'activité des électrons π ou n augmente et produit un déplacement vers les grandes longueurs d'onde. De même, lorsqu'un groupe auxochromes donneur d'électrons (Amino, hydroxy, Alkoxy, etc.) est placée sur un système aromatique conjugué, ce groupe se joint à la conjugaison du système π, la molécule absorbe dans les grandes longueurs d'onde et donne des couleurs plus foncées (Christe, 2001).

Tableau I-1 : Principaux groupes chromophores et auxochromes classés par intensité croissante.

Groupes chromophores	**Groupes auxochromes**
Azo (-N=N-)	Amino ($-NH_2$)
Nitroso (-N=O)	Méthylamino ($-NHCH_3$)
Carbonyle (>C=O)	Diméthylamino ($-N(CH_3)_2$)
Vinyle ($-C=CH_2$) ou méthine (>C=)	Hydroxyle (-OH)
Nitro ($–NO_2$) Thiocarbonyle (>C=S)	Alkoxy (-OR)

I.5.3. Classification des colorants :

Les colorants sont des molécules organiques insaturées qui possèdent une affinité pour les fibres sur lesquels sont appliquées. Ces interactions peuvent être de nature physique ou chimique. Les matières colorantes peuvent être classées selon plusieurs voies, dont en application textiles deux sont utilisées : d'après leur structure chimique ou selon leur méthode d'application (classes tinctoriales) [Hunger, 2003].

I.5.3.1.Classification chimique :

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupement chromophore.

Les colorants azoïques

Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence au sein de la molécule d'un groupement azoïque (-N=N-) reliant deux noyaux benzéniques. Cette catégorie de colorant est actuellement la plus répandue sur le plan de l'application, puisqu'ils représentent plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes. [Abdessemed, 2009].

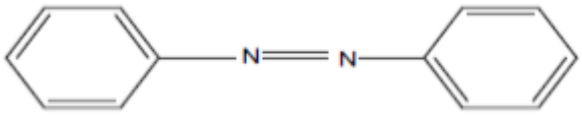


Figure I -2 : Exemple de colorant Azoïque.

Les colorants anthraquinoniques

Ces colorants sont du point de vue commercial, les plus importants, après les colorants azoïques. Leur formule générale, dérivée de l'anthracène montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou Amino [Abdessemed, 2009].

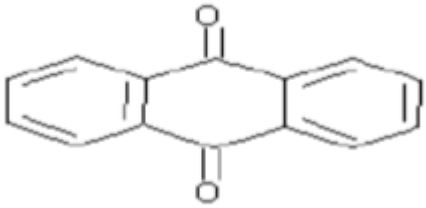


Figure I-3 : Exemple de colorant anthraquinonique.

Les Colorants indigoïdes

Ils tirent leur appellation de l'indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues séléniés, soufrés et oxygénés du bleu indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise [Abdessemed, 2009].

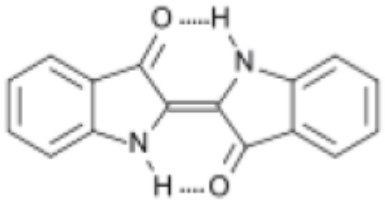


Figure I-4 : Exemple de colorant indigoïdes.

Les colorants xanthènes

Le composé le plus connu est la fluorescéine. Ils sont dotés d'une intense fluorescence. Peu utilisés en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accidents maritimes ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie [Abdessemed, 2009].

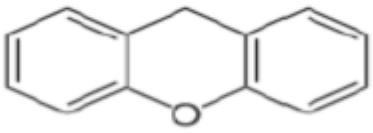


Figure I-5 : Exemple de colorant xanthènes**.**

Les colorants Phtalocyanines

Ces colorants Ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzéne en présence d'un halogénure métallique (Cu, Pt, etc.) [Abdessemed, 2009].

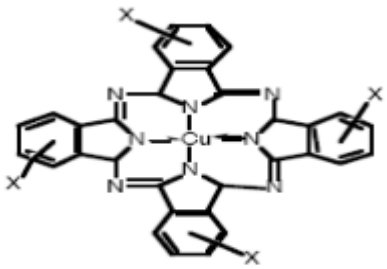


Figure I-6 : Exemple de colorant Phtalocyanine.

Les colorants nitrés et nitrosés

Ces colorants forment une classe de colorants très limitée en nombre et relativement ancienne. Ils sont actuellement encore utilisés, du fait de leur prix très modéré lié à la simplicité de leur structure moléculaire caractérisée par la présence d'un groupe nitro (-NO2

en position ortho d'un groupement électro-donneur (hydroxyle ou groupes aminés) [Abdessemed, 2009].

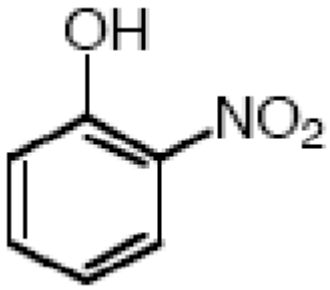


Figure I-7 : Exemple de colorant nitré.

I.5.3.2.Classification tinctoriale :

Si la classification chimique présente un intérêt pour le fabricant de matières colorantes, le teinturier préfère le classement par domaines d'application. Ainsi, il est renseigné sur la solubilité du colorant dans le bain de teinture, son affinité pour les diverses fibres et sur la nature de la fixation. Celle-ci est de force variable selon que la liaison colorant/substrat est du type ionique, hydrogène, de Van der Waals ou covalente. On distingue différentes catégories tinctoriales définies cette fois par les auxochromes [Abdessemed, 2009].

Les colorants acides ou anioniques

Ils sont solubles dans l'eau, grâce à leurs groupements sulfonâtes ou carboxylates, ils sont ainsi dénommés parce qu'ils permettent de teindre les fibres animales (laine et soie) et quelques fibres acryliques modifiées (nylon, polyamide) en bain légèrement acide. L'affinité colorant-fibre est le résultat de liaisons ioniques entre la partie acide sulfonique du colorant et les groupements Amino des fibres textiles [Abdessemed, 2009].

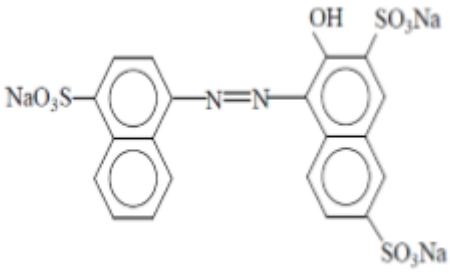


Figure I-8: Exemple de Colorant acide.

Les colorants basiques ou cationiques

Ils sont des sels d'amines organiques, donc ayant une bonne solubilité dans l'eau. Les liaisons se font entre les sites cationiques des colorants et les sites anioniques des fibres. En phase de disparaître dans la teinture de la laine et de la soie, ces colorants ont bénéficié d'un regain d'intérêt avec l'apparition des fibres acryliques, sur lesquelles ils permettent des nuances très vives et résistantes [Abdessemed, 2009].

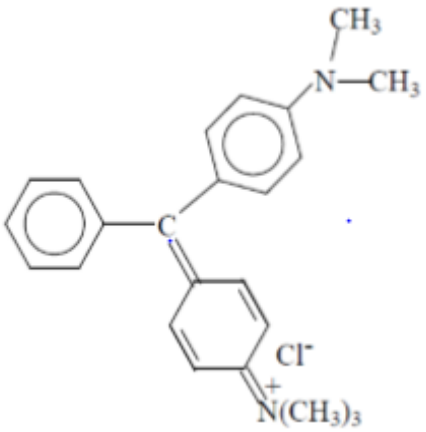


Figure I-9: Exemple de Colorant basique.

Les colorants de cuve

Ils sont insolubles et doivent être transformés en leucodérivés par réduction alcaline. La teinture se termine par la réoxydation in situ du colorant sous sa forme insoluble initiale. Réputés pour leur bonne résistance aux agents de dégradation, les colorants de cuve sont encore utilisés à l'image de l'indigo, pour la teinture des articles jean [Abdessemed, 2009].

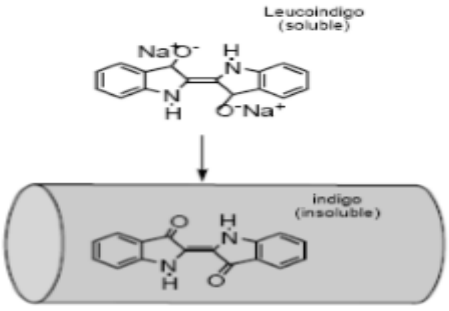


Figure I-10 : Exemple de Colorant de cuve.

Les colorants directs

Ils sont capables de former des charges positives ou négatives électrostatiquement attirées par les charges des fibres. Ils se distinguent par leur affinité pour les fibres sans application de mordant, liée à la structure plane de leur molécule [Abdessemed, 2009].

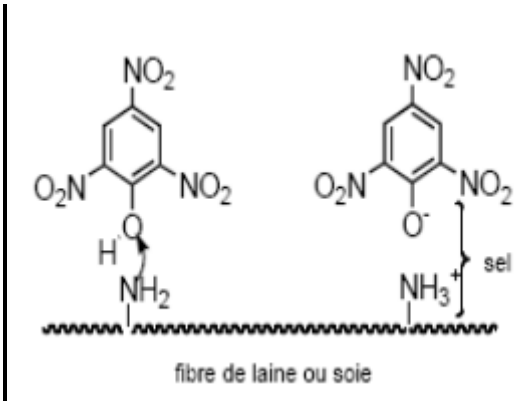


Figure I-11 : Exemple de Colorant directs.

Les colorants à mordants

Ils contiennent généralement un ligand fonctionnel capable de réagir fortement avec un sel d'aluminium, de chrome, de cobalt, de cuivre, de nickel ou de fer pour donner différents complexes colorés avec le textile [Abdessemed, 2009].

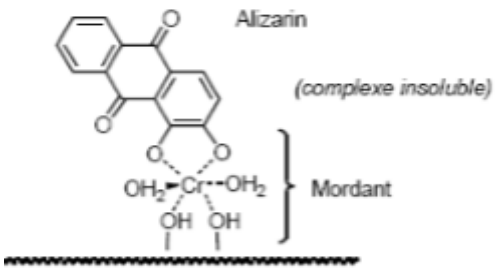


Figure I-12 : Exemple de Colorant à mordants.

Les colorants réactifs

Ces colorants contiennent des groupes chromophores issus essentiellement des familles azoïques, anthraquinoniques et Phtalocyanines. Leur appellation est liée à la présence d'une fonction chimique réactive, de type triazinique ou vinylsulfone assurant la formation d'une liaison covalente forte avec les fibres.

Ils sont Solubles dans l'eau et entrent de plus en plus fréquemment dans la teinture du coton et éventuellement dans celle de la laine et des polyamides [Abdessemed, 2009].

Les colorants développés ou azoïques insolubles

Ces colorants sont formés directement sur la fibre. Au cours d'une première étape, le support textile est imprégné d'une solution de naphtol ou copulant. Les précurseurs de la molécule, suffisamment petits pour diffuser dans les pores et les fibres, sont ensuite traités avec une solution de sel de diazonium qui par réaction de copulation, entraîne le développement immédiat du colorant azoïque [Abdessemed, 2009].

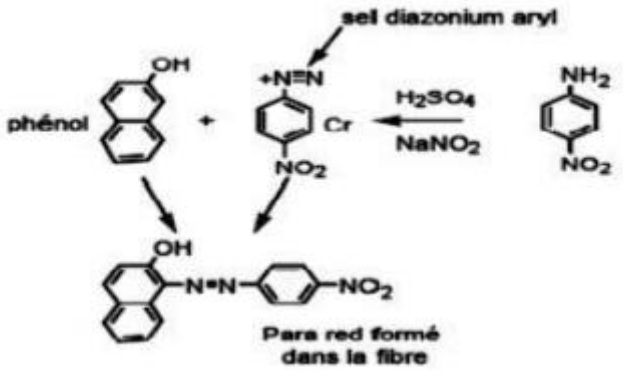


Figure I-13 : Exemple de Colorant développés.

Les colorants dispersés

Ces colorants sont très peu solubles dans l'eau et sont appliqués sous forme d'une fine poudre dispersée dans le bain de teinture. Ils sont en mesure, lors d'une teinture à haute température, de se diffuser dans les fibres synthétiques et de s'y fixer [Abdessemed, 2009].

I.5.4. Utilisation et application des colorants

Les grands domaines d'application des colorants sont les suivants [Crepy, 2004] :

- l'industrie textile ;
- l'industrie de matières plastiques (pigments) ;
- l'industrie du bâtiment : peintures (pigments) ;
- l'industrie pharmaceutique (colorants) ;
- l'industrie des cosmétiques ;
- l'industrie agroalimentaire (colorants alimentaires) ;
- Dans l'imprimerie (encre, papier).

I.5.5.Toxicité des colorants

I.5.5.1.Dangers évidents

a) Eutrophisation

Sous l'action des microorganismes, les colorants libèrent des nitrates et des phosphates dans le milieu naturel. Ces ions minéraux introduits en quantité trop importante peuvent devenir toxiques pour la vie piscicole et altérer la production d'eau potable. Leur consommation par les plantes aquatiques accélère leur prolifération anarchique et conduit à l'appauvrissement en oxygène par inhibition de la photosynthèse dans les strates les plus profondes des cours d'eau et des eaux stagnantes [Crepy, 2004].

b) Sous-oxygénation

Lorsque des charges importantes de matière organique sont apportées au milieu aqueux via des rejets ponctuels, les processus naturels de régulation ne peuvent plus compenser la consommation bactérienne d'oxygène. La dégradation de 7 à 8 mg de matière organique, par des micro-organismes, suffit pour consommer l'oxygène contenu dans un litre d'eau.

[Manahan ,1994].

c) Couleur, turbidité, odeur

L'accumulation des matières organiques dans les cours d'eau induit l'apparition de mauvais goûts, prolifération bactérienne, odeurs pestilentielles et des colorations anormales sachant qu'une coloration pouvait être perçue par l'œil humain à partir de 5×10-6 g/L. En dehors de l'aspect inesthétique, les agents colorants ont la capacité d'interférer avec la transmission de la lumière dans l'eau, bloquant ainsi la photosynthèse des plantes aquatiques. [Willmott, 1998].

I.5.1.2.Dangers à long terme :

a) Persistance

Les colorants organiques synthétiques sont des composés impossibles à épurer par dégradations biologiques naturelles. [Pagga, 1986] Cette persistance est en étroite relation avec leur réactivité chimique. Ainsi:

- Les composés insaturés sont moins persistants que les saturés ;
- Les alcanes sont moins persistants que les aromatiques,
- La persistance des aromatiques augmente avec le nombre de substituant ;
- Les substituants halogènes augmentent la persistance des colorants plus que les groupements alkyles.

b) Bioaccumulation

Si un organisme ne dispose pas de mécanismes spécifiques, soit pour empêcher la résorption d'une substance, soit pour l'éliminer une fois qu'elle est absorbée, alors cette substance s'accumule. Les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, se retrouvent exposées à des teneurs en substances toxiques pouvant être jusqu'à mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau. [Zawlotzki, 2004].

c) Cancer

Si la plupart des colorants ne sont pas toxiques directement, une portion significative de leurs métabolites l'est. Leurs effets mutagènes, tératogène ou cancérigène apparaissent après dégradation de la molécule initiale en sous-produits d'oxydation : amine cancérigène pour les azoïques, leucodérivés pour les triphénylméthanes [Abdessemed ,2009].

d) Sous-produits de chloration

Le chlore utilisé pour éliminer les microorganismes pathogènes réagit avec la matière organique pour former des trihalométhanes (THM) pouvant atteindre plusieurs centaines de mg/L. Les sous-produits de chloration sont responsables du développement de cancer du foie, des poumons, des reins et de la peau chez l'homme. [Zawlotzki, 2004].

I.5.1.3.Mutagénicité / Carcinogénicité

Une étude, effectuée sur le recoupement des DL_{50} avec les classifications chimiques et tinctoriales des colorants, démontre que les colorants synthétiques organiques les plus toxiques sont les colorants diazo et cationiques **[**Zollinger, 1987**]**. Le caractère électro-

attracteur des groupes azo génère des déficiences électroniques, ce qui rend les azoïques peu disposés au catabolisme oxydatif dans des conditions environnementales aérobies **[**Depa, 2000**]**.

La toxicité des azoïques due à l'exposition aux colorants et à leurs métabolites n'est pas un fait nouveau. Dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques **[**Rehn, 1895**]**. Depuis, les travaux effectués sur ces colorants azoïques ont démontré que ces composés chimiques présentaient des effets cancérigènes pour l'homme et l'animal.

Si la plupart des colorants ne sont pas toxiques directement, une portion significative de leurs métabolites l'est. Leurs effets mutagènes, tératogènes ou cancérigènes apparaissent après dégradation de la molécule initiale en sous-produits d'oxydation. Les effets cancérigènes des composés azoïques s'expriment alors, dans certains cas, indirectement par leurs dérivés aminés **[**Brown, 1993**]**.

I.6 .Principaux méthodes de décoloration

I.6.1. Méthodes physiques

a) Filtration sur membrane

La filtration sur membrane pilotée par pression hydraulique se décline en microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration et osmose inverse. L'effluent passe à travers une membrane semi-perméable qui retient en amont les contaminants de taille supérieure au diamètre des pores, pour produire un permet purifié et un concentré qui reçoit les impuretés organiques [Robinson ,2001]. Parmi les quatre types de procédés, la nanofiltration et l'osmose inverse sont les plus adaptés à la rétention partielle de la couleur et des petites molécules organiques et l'osmose inverse reste la plus répandue [Calabro, 1990].

La nanofiltration s'applique surtout au traitement des bains de teinture de colorants réactifs en agissant comme un filtre moléculaire tandis que la microfiltration retient les matériaux colloïdaux tels que les colorants dispersés ou de cuve grâce à une « membrane écran » . L'ultrafiltration ne s'applique qu'à la réduction de DCO et des solides en suspension [Anselme ,1996] et ne se montre réellement efficace qu'en combinaison avec la coagulation/floculation.

Ces procédés, limités dans leurs applications, nécessitent des investissements importants [Bruggen ,2003] et le retraitement du concentré est jusqu'à six fois plus cher que celui de l'effluent originel.

b) **Adsorption**

Lors de l'adsorption, le colorant est transféré de la phase liquide vers la phase solide. Le charbon activé est le plus communément utilisé pour réduire la couleur, mais cette technique n'est efficace que sur certaines catégories de colorants cationiques, à mordant, dispersés, de cuve et réactifs [Hao, 2000]. De plus, ces techniques non destructives requièrent des opérations postérieures de régénération et de post-traitement des déchets solides onéreuses. Dans la plupart des cas, les résidus solides sont répandus en décharges et des dispositions particulières doivent être prises à l'égard des composés organiques qui peuvent lixivier avec le temps.

c) Méthode physico-chimique de coagulation – floculation

Sous le terme de coagulation - floculation, on entend tous les processus physico-chimiques par lesquels des particules colloïdales ou des solides en suspension fines sont transformés par des floculant chimiques en espèces plus visibles et séparables (les flocs). Les flocs formés sont séparés par décantation et filtration puis évacués. Les coagulants inorganiques tels que l'alun sont les plus satisfaisants pour la décoloration des effluents textiles contenant des colorants de cuve et au soufre, mais sont totalement inefficaces pour les colorants réactifs, azoïques, acides et basiques [Hao, 2000] Par ailleurs, la coagulation - floculation ne peut pas être utilisée pour les colorants fortement solubles dans l'eau. Enfin, d'importantes quantités de boue sont formées avec ce procédé : leur réutilisation reste la seule issue mais demande des investissements supplémentaires pour les régénérer.

I.6.2. Méthodes chimiques

Les techniques d'oxydation chimique sont généralement appliquées quand les procédés biologiques sont inefficaces. Elles peuvent être ainsi utilisées en étape de prétraitement pour les procédés biologiques. L'oxydation chimique est souvent appliquée pour le traitement des eaux usées contenant des polluants non biodégradables et /ou toxiques et de fortes concentrations que les autres procédés ne peuvent pas traiter ou transformer en produits biodégradables et/ou non toxiques. Ainsi, l'oxydation chimique se révèle un procédé efficace de traitement des eaux usées. On distingue:

- les procédés classiques d'oxydation chimique ;
- les procédés d'oxydation avancée. Les procédés classiques d'oxydation chimique sont basés sur l'ajout d'un agent oxydant dans la solution à traiter. Les principaux agents oxydants sont:
    - Cl_2: représente un oxydant moyennement fort et est utilisé pour le traitement des eaux usées ou plutôt pour la désinfection comme l'ozone. En revanche, ils présentent l'inconvénient de produire des sous produits halogénés cancérigènes pour l'homme;
    - O_2: il est considéré comme un oxydant modéré, le coût tolérable de ce procédé le rend fréquemment choisi;
    - H_2O_2: il est considéré parmi les oxydants les plus appropriés et les plus recommandés pour une grande variété de procédé, utilisé avec ou sans catalyseur. Toutefois, l'utilisation de cet oxydant seul n'est pas efficace pour la plupart des produits organiques;
    - O_3: c'est un oxydant très fort qui a presque le même avantage que l'oxygène ou le peroxyde d'hydrogène. Le problème majeur lié à l'utilisation de cet oxydant est son instabilité, d'où la nécessité de production sur le site.

Il a été observé que l'oxydation chimique avec l'un de ces oxydants n'est pas toujours efficace pour le traitement des polluants organiques persistants. Dans ce cas, on fait appel aux procédés d'oxydation avancée.

I.6.3. Méthode électrochimique

L'électrolyse est une réaction électrochimique base sur le passage du courant ente deux électrodes (anode et cathode) .dans le cas d'effluents issus d'industries textile .le courant électrique créé entre les deux électrodes permet de fragmenter les molécules des colorant qui perdent alors leur couleur .l'utilisation de cette méthode d'oxydation n'est pas applicable que pour des effluent qui présentant une conductivité suffisante et une concentration en sel assez importante [Kim, 2002].

I.6.4. Comparaison entre les procédés physique et chimique

Après un bref aperçu des principes de fonctionnement et le type d'application des procédés de dépollution des rejets textiles.

Tableau I .1 : Principaux avantages et inconvénients des techniques de traitements des colorants [Zawlotski, 2004].

Technologie	Exemples	Avantages	Inconvénients
Coagulation / Floculation	Chaux, FeCl3, Poly électrolytes.	-Équipement simple -Décoloration relativement Rapide. -Réduction significative de la DCO	-Formation de boues -Fonctionnement onéreux -Coagulants non réutilisables -Réduction spécifique de la couleur
Filtration sur membranes	Osmose inverse, Nanofiltration, Microfiltration, Ultrafiltration.	-Utilisation simple et rapide -Pas d'addition de produits chimiques -Faible consommation Energétique	-Investissement important -Sélectif -Encrassement rapide des membranes
Adsorption	Charbone actif, Silice,	-Réduction efficace de la couleur -Technologie simple -Faible coût d'utilisation pour certains adsorbants	- Investissement et coûts de fonctionnement élevés -Lent et limité en volume -Sélectif -Formation de boue
Oxydation Chimique	Ozone Réactif de Fenton Chloration	-Traitement de gros Volumes -Diminution nette de la coloration -Décoloration rapide et efficace -Opération simple	-Efficacité limitée pour certains Colorants -Produits d'oxydation inconnus -Formation de sous produits de chloration.

I.6.5. Méthodes biologique

Par épuration biologique des eaux .on entende la décomposition des polluants organique dans l'eau par les microorganismes. Les procédés biologiques se partagent en deux catégories : Les traitements aérobies en présence d'oxygène et anaérobies sans oxygène.

a. Traitement aérobie

Dans une unité biologique constituée d'un bassin de boue activée. Les polluants sont décomposés par des bactéries aérobies et autres microorganismes en une boue qui sédiments Dans le cas idéal. Les polluants organique sont oxydés jusqu'au dioxyde de carbone. Après épuration. La boue est sédimenté dans un décanteur. Une partie est recyclée et le surplus est évacué après pressage ou centrifugation.

Si ces techniques sont adaptées à un grand nombre de polluants organiques. Elles ne sont pas suffisamment efficaces pour les rejets textiles. De nombreuse classes de colorants telles que les azoïques. Les colorants acides (à cause des groupes sulfonés) et les colorants réactifs y sont récalcitrants [Pagg, 1994].seuls les colorants de structure chimique simple et de faible poids moléculaire ont des taux de décoloration importants [Sani, 1999].

b. Traitement anaérobie

A l'inverse de la biodégradation aérobie. La digestion anaérobie des composés organique s'effectue en l'absence d'oxygène et présente sous forme du dioxyde de carbone. Du méthane et de l'eau. Les conditions de réduction dans la digestion anaérobie sont adaptées à la décoloration des colorants azoïque par le clivage de la liaison azo entrainant une destruction subséquente du groupe chromophore, mais une minéralisation complète est impossible dans ce type de procédé [Pagg ,1994]. La dégradation des molécules initiales entraine souvent la formation d'amines plus toxiques que la molécule initiale, qui finissent dans les sédimentations aquifères peu profondes et les eaux souterraines [Weber, 1987].

Les méthodes de bio-traitement conventionnelles sont sans effet sur la plupart des colorants synthétiques à cause de leur structure polymathique complexe et leur nature réfractaire. [Venceslau, 1994]. Ont estimé à seulement 10-20 ٪ la réduction de coloration par les procédés biologiques.

L'inconvénient majeur de la méthode biologie est du à la biodégradation incomplète, voire inefficace dans le cas de certains colorants azoïque récalcitrants. Les couts d'investissements et de fonctionnement élevé qui demandent des installations et des aménagements, nécessite d'oxygéner les cultures et de maintenir des conditions optimales .Les méthodes microbiologiques demandent des opérations en amant (stérilisation du réacteur, préparation de milieu de culture) et en aval (séparation de la biomasse et de sous-produits). La dégradation

des colorants s'effectue dans un bioréacteur contrôlé chargé par un milieu de culture [Kankare, 1995].

Tableau I .2 : Principaux avantages et inconvénients des techniques de traitements des colorants [Zawlotski, 2004].

Technique	Exemple	Avantages	Inconvénients
Procédés Biologiques	Aérobie Anaérobie	-Approprié pour les colorants insolubles -Décolore la plupart des Colorants.	-Spécifique à certains colorants -Décoloration variable -Grandes quantités de boue générées -Besoins énergétiques importants -Beaucoup de produits toxiques non dégradés.

I.6.6. Procédés alternatifs : Procédés enzymatiques

Les procédés classiques utilisés par les stations de traitement des eaux usées sont mal et parfois pas du tout adaptés à l'élimination des colorants. La majorité de ces procédés sont trop sélectifs sur les catégories de colorants à traiter et ne font que déplacer la pollution plutôt que de la supprimer. Cependant, la technique de traitement adaptée doit être choisie afin de dégrader les molécules en évitant la formation de sous-produits plus dangereux que les composés initiaux.

Ces procédés sont classés entre les procédés chimiques et biologiques [Husain, 2012]. La variété des transformations catalysées par les enzymes a fait ces derniers une cible principale pour l'exploitation des industries biotechnologiques. Cependant, des recherches récentes ont été entrepris pour une optimisation des procédés d'isolement et de purification des enzymes menues de capacité de transformation voire de détoxification des polluants persistants et récalcitrants des effluents industriels [Forgacs, 2004]. Ainsi, les avantages du traitement enzymatique par rapport aux traitements conventionnels peuvent être résumés comme suit [Husain ,2006]:

- Inhibition par les substances toxiques est très faible ;

- Application aux polluants récalcitrants, couvrant un large intervalle de concentrations en polluants, de pH, de température et de salinité ;
- Facilité et simplicité du processus ;
- Absence de biomasse, et réduction de volume de réacteur ;
- Action catalytique efficace, sélective et très rapide ;
- Transformation de divers composés aromatiques.

Les enzymes isolées catalysent la détoxication/décoloration des colorants rapidement, (des minutes à quelques d'heures) par rapport aux algues et aux mycètes qui prennent plusieurs jours ou même mois pour fournir les mêmes résultats [Sumathi, 2000].

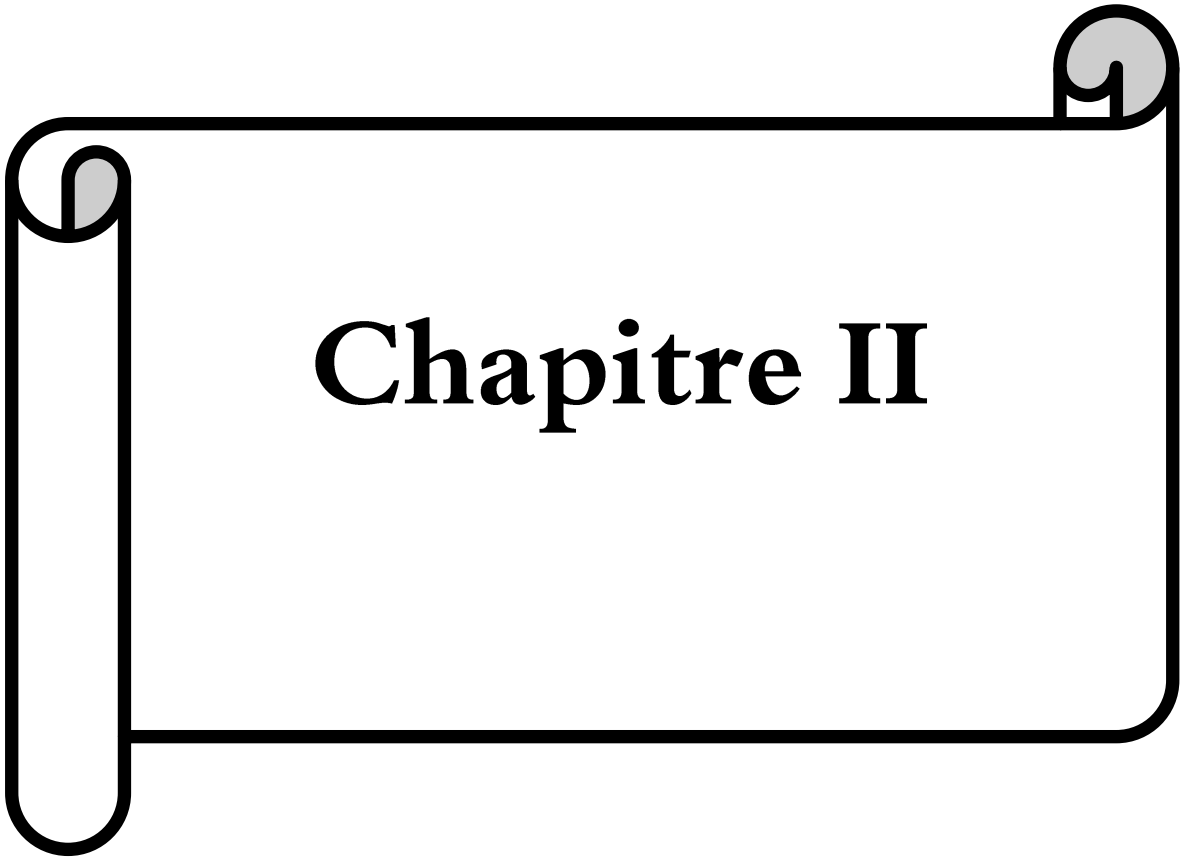
Les enzymes oxydoréductase : peroxydases, laccases et les oxydases de polyphénol ont montré leur potentiel dans la décoloration et la transformation des polluants aromatiques tels que les phénols, les amines aromatiques, les diphényles, les diphénols et les colorants (anthraquinoniques, azoïques, nitro et nitroso) en composés insolubles moins toxiques, qui pourraient être facilement enlevé de la solution [Torres, 2010].

I.6.7. Résumé comparatif des procédés et analyse critique

Bien que les méthodes physiques, chimiques soient très rapides, Elles se sont avérées très coûteuses et peu efficaces compte tenu des normes exigées. En effet, Plusieurs études ont montré que ces méthodes sont, d'une part, efficaces contre certaines des molécules colorantes et pas sur d'autres et, d'autre part, qu'elles chargent le milieu naturel avec des polluants organiques parfois plus toxiques que les molécules d'origines [Dos, 2001]. Il est à noter aussi que ces méthodes sont très coûteuses et nécessitent un équipement bien sophistiqué [Hao, 2001]. Ce constat a permis aux chercheurs et aux industriels de s'orienter vers la recherche d'autres méthodes qui soient plus efficaces et moins coûteuses : ce sont les procédés enzymatiques.

Conclusion

Cette étude bibliographique montre que les colorants sont des composés utilisés dans de nombreux secteurs industriels, notamment dans le domaine textile, chimique et alimentaire. La plupart de ces industries utilisent l'eau dans leurs fabrications et rejettent les effluents directement vers les cours d'eau sans traitement préalable. Les rejets chargés de colorants posent deux problèmes majeurs, l'un esthétique et l'autre lié à la santé humaine. Des études ont montrés que lorsque ces polluants ne sont pas directement mis en cause, Ce sont leurs Métabolites qui induisent des maladies comme le cancer. Par conséquent, Il est nécessaire de Traiter les eaux résiduaires chargées de colorants jusqu' à leur minéralisation totale.



Chapitre II

Introduction

Presque toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans les systèmes biologiques sont catalysées par des enzymes qui constituent la classe de protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée. Ils représentent l'instrument primaire direct de l'expression de l'action du gène puisqu'ils catalysent les milliers de réactions chimiques qui constituent le métabolisme intermédiaire des cellules. Dans ce chapitre introductif, nous aborderons uniquement les paramètres cinétiques des mécanismes enzymatiques les plus simples.

II.1.Les enzymes et l'activité enzymatique

II.1.1. Définition

Les enzymes sont des protéines globulaires. Elles ont un effet catalyseur, c'est-à-dire qu'elles accélèrent les réactions chimiques sans pour autant être modifiées durant le processus. En fait, une enzyme peut catalyser tellement rapidement, qu'une seule molécule d'enzyme transforme habituellement un millier de molécules de substrat par seconde. Il faut bien sûr tenir compte de certains facteurs physiques et chimiques comme la température, le pH et la concentration d'enzyme qui peuvent modifier la vitesse et l'efficacité de la réaction. La plupart des organismes peuvent décomposer certaines substances toxiques, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit par différentes réactions métaboliques du corps. On compte au moins deux enzymes pouvant répondre à cette fonction : la peroxydase, que l'on trouve chez les plantes, et la catalase, qu'on retrouve dans les tissus des animaux ainsi que chez les protistes [Tournier, 1983].

II.1.2. Structure des enzymes

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique et chirale. Elles sont constituées de plusieurs acides α-aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa. L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des enzymes.

II.1.3.Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (tableau 1). Chaque classe est divisée en sous-classe et chaque sous-classe en sous-sous-classe. Un "numéro" de classification est associé à chaque enzyme et est appelé "EC number". Il se présente de la manière suivante : EC [numéro de la classe]. [Numéro de la sous-classe]. [Numéro de la sous-sous-classe]. [Numéro individuel de série dans les sous-sous classe] (Bergmeyer, 1979).

1. Oxydoréductases : Transfert d'électrons ;
2. Transférases : Transfert de groupes chimiques d'un composé à un autre ;
3. Hydrolases : Coupure de liaisons grâce à l'apport d'eau ;
4. Lyases ou Synthases : Addition de groupes sur une double liaison ou formation d'une double liaison par soustraction d'un groupe ;
5. Isomérases ; Transfert de groupe à l'intérieur d'une molécule pour former un isomère ;
6. Ligases ou Synthétases : Formation de liaisons C-C, C-S, C-O ou C-N utilisant l'énergie fournie par la rupture d'une liaison pyrophosphate d'un triphosphonucléotide (tel l'ATP) [Goldberg ; 2003].

Tableau II- 1. Les six classes d'enzymes [Rao, 1998].

E.C (Classe)	**Classification**	**Type de réaction catalysée**
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférase	Transfert de groupeme nts fonctionnel
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	lyases	Elimination de groupment et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolysede l'ATP

II.1 Peroxydase

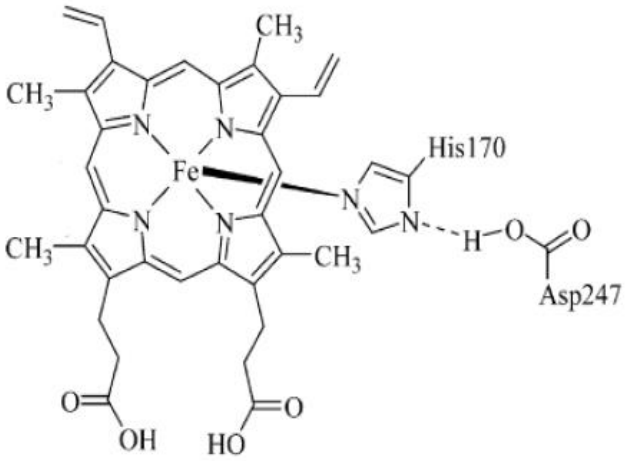
Avant même que la notion d'enzyme eut été formulée .tel faisant de la prose sans le savoir .planche constatait en 1810 que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc recolorer la teinture de gaïac (incolore à l'état réduit) en présence d'eau oxygénée.

II.2.1. Définition et constitution de la peroxydase

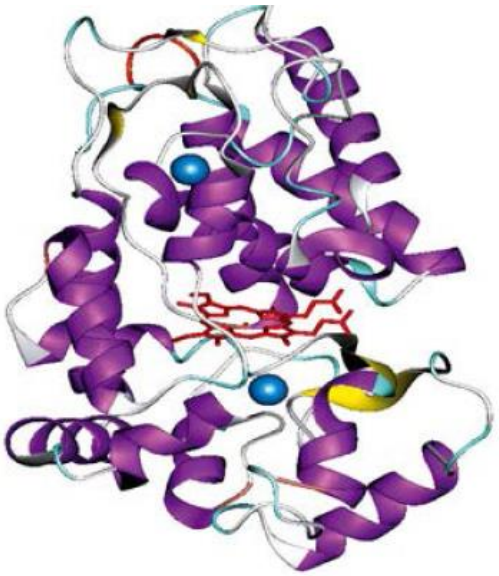
La peroxydase est une enzyme oxydoréductase qui a notamment pour fonction de décomposer les peroxydases d'hydrogène. Ce qui lui vaut son nom. La peroxydase est une protéine héminique c'est-à-dire qu'elle contient une partie non protéique plane l'héme. Caractérisée par la présence d'un (Fe^{3+}) (donc en réalité héme et non héme) au centre d'une porphyrine et qui est en mesure de catalyse une série de réaction Oxydatives en déléguant la peroxydase d'hydrogène comme accepteur d'électron. En réalité. Il n'y a pas une peroxydase mais des peroxydases car ce type d'enzymes existe chez presque tous les être vivants : chez les microorganismes. Chez les plants et chez les animaux. Elle ne manque que chez anaérobies stricts pour lesquels l'oxygène moléculaire est un poison. Ce pourrait donc être une molécule très ancienne. Peut être aussi vieille au la présence d'oxygène gazeux dans l'atmosphère qui s'y est accumulé entre -2 et -1 milliards d'années [Dunford, 1999].

II.2.2.Structure des peroxydases

Les peroxydases sont des hémoglycoprotéines. Elles sont caractérisées par la Présence d'un hème central de type-b, pris en sandwich entre le domaine distal (Extrémité N- terminal) et le domaine proximal (Extrémité C-terminal) de la protéine. De ce fait, l'hème constitue le groupement prosthétique de l'enzyme et la chaîne Polypeptidique est l'apoenzyme (Fe^{3+}) [Henriksen; 1998]. Il y a trois genres d'hème Biologiquement importants (a, b et c) mais le plus commun dans les peroxydases est L'hème b. La liaison entre la protéine et l'hème n'est pas covalente et l'état d'oxydation du fer III (Fe^{3+}) [Dunford, 1999].Les peroxydases ont aussi deux sites de liaison pour les ions Ca^{2+}. Le calcium est supposé stabiliser la protéine et n'intervient pas au niveau du site catalytique, même si sa présence influence fortement l'activité de l'enzyme.



(1)



(2)

Figure II-1. Structure de Ferriproto-porphyrine IX des peroxydases [Veitch, 2004].

Figure II-2. Structure tridimensionnelle de la peroxydase [Veitch, 2004].

II.2.3.Classification

Les peroxydases (numéro EC 1.11.1.X) regroupent une grande famille d'enzymes. Elles appartiennent à la famille des oxydoréductases, en accord avec la nomenclature officielle. Ce sont des enzymes ubiquitaires retrouvées dans les plantes, les animaux et les microorganismes [Colonna; 1999]. Les peroxydases de plantes ont été regroupées avec les peroxydases des bactéries et des champignons en une seule superfamille [Welinder, 1992]. Dans cette superfamille, toutes les peroxydases sont composées de protéines qui présentent toutes une structure tridimensionnelle similaire [Smulevich, 2006]. Elles réduisent toutes l'eau oxygénée (H_2O_2) en H_2O, mais oxydent des substrats très différents. La superfamille est subdivisée en trois classes distinctes, qui diffèrent principalement par leur séquence peptidique primaire, le nombre d'ions calcium et de leurs origines :

La classe I : comprend trois types de peroxydases. Elles sont intracellulaires et comprennent :

• Les ascorbates peroxydases (APX) se trouvent dans les cellules Chloroplastiques de plantes, et utilisent principalement l'ascorbates pour éliminer l'excès de H_2O_2 produit lors de la photosynthèse [Asada, 1992].

• Les cytochromes c peroxydases (CCP) sont liées aux mitochondries et Servent aussi à réduire l'eau oxygénée (produite par la respiration) en oxydant Le cytochrome C [Erman ,2002]

• Les catalases peroxydases (CP), elles ont principalement le rôle de catalases [Obinger, 1999] et se retrouvent chez de nombreuses bactéries et quelques champignons.

Les peroxydases de classe II : jouent un rôle essentiel dans la dégradation des déchets organiques du sol. Elles sont capables d'oxyder des substrats à très haut potentiel redox, en particulier la lignine [Gold, 1993]. On trouve dans cette classe les lignines peroxydases(LiP), les manganèses peroxydases(MnP), et les versatiles peroxydases. Les lignines peroxydases oxydent directement leurs substrats [Poulos, 1993] alors que les manganèses peroxydases relâchent des ions Mn^{3+} (sous forme de chélates organiques) qui, à leur tour, oxydent des molécules à hauts potentiels redox [Gold, 1993]. Enfin, les peroxydases dites «versatiles » (VP) peuvent effectuer les deux types de mécanismes [Ruiz-Dueñas, 2001].

Les peroxydases de classe III : Sont typiques des plantes vertes. Elles sont encore Appelées peroxydases sécrétées (Penel; 2004). Contrairement aux Peroxydases des deux classes précédentes, les peroxydases de classe III forment des familles multi géniques de plusieurs dizaines de gènes. Une des conséquences Majeures du nombre important d'isoformes est la difficulté de pouvoir déterminer un rôle précis pour chacune de ces peroxydases dans les plantes. En plus du nombre élevé d'isoformes, les peroxydases de classe III ne présentent pas d'affinité particulière pour une molécule in vitro. De ce fait, elles peuvent oxyder efficacement un nombre incalculable de substrats aromatiques. Malgré cette diversité dans la transformation des substrats, on sait maintenant que les peroxydases ont de très nombreuses fonctions in vivo, telles que la construction de la paroi cellulaire, la synthèse de la lignine, l'hydroxylation des dérivés aromatiques, la croissance par élongation, la défense contre les pathogènes ou la sénescence [Hiraga ; 2001], etc.

II.2.4.Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique

Les peroxydases [donneur : H_2O_2 oxydoréductase, EC. 1.11.1.7] sont des enzymes non michaéliennes [Dunford, 1999]. L'action de ces enzymes nécessite la présence à la Fois d'un composé phénolique et de l'eau oxygénée (H_2O_2). Cependant cette dernière peut être générée par les peroxydases par oxydation des acides carboxyliques. La catalyse déclenchée par l'H_2O_2 permet la formation d'enzymes transitoires (composés I, II). En réagissant avec un

donneur d'hydrogène (AH), les composés I et II donnent naissance à des radicaux libres (A°) qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux.

k1: POX + H_2O_2 ----------> Composé-I + H_2O

k2: Composé-I + AH ----------> A° + Composé -II

k3: Composé-II + AH ----------> A° + POX + H_2O

POX BILAN: H_2O_2 + 2 AH ----------> 2 A° + H_2O + POX

Ces radicaux A° subissent des réactions de polymérisation non enzymatiques pour donner des polymères insolubles dans l'eau.

nA° ----------> n/2 A-A ----------> An (Polymères insolubles)

Les constantes k1, k2, k3 sont respectivement des constantes cinétiques de la formation des composés-I, composés-II, et de la régénération de l'enzyme. AH est un composé phénolique A° son radical correspondant. POX= peroxydase native.

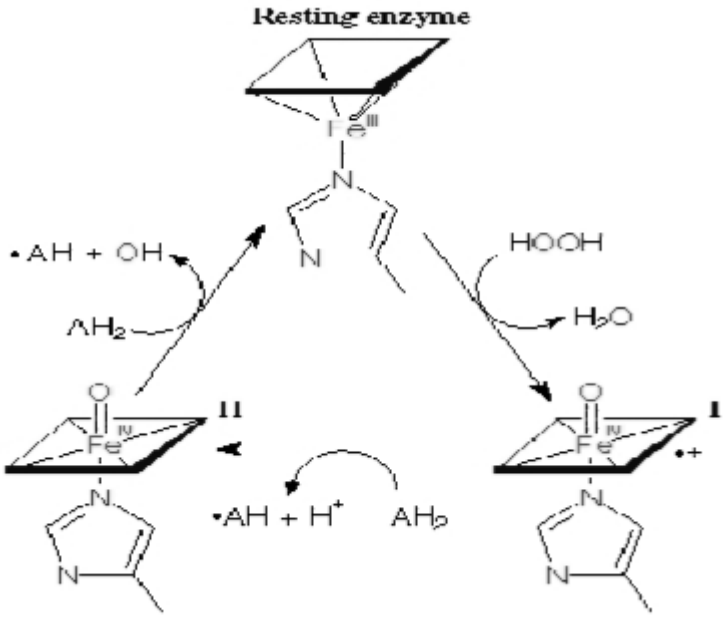


Figure II-3:Mécanisme réactionnel développé. AH : donneur d'hydrogène [Castagnetto, 1999].

II.2.5.Législation sur l'environnement

La législation sur les rejets d'eaux résiduaires devient de plus en plus stricte. Est dotée d'une réglementation (NT 106.02, 1989) sur les rejets d'effluents dans le milieu hydrique. Le tableau II-2 précise les limites réglementaires de ces rejets.

Tableau II-2 : Norme (NT 106.02, 1989) des rejets d'effluents.

Paramètres	Unité	Valeurs limites	Tolérance aux valeurs limites anciennes installations
pH	-	6,5-8,5	6,5-9,
DCO	-	250	300
DBO5	mg/L	150	200
Matière décantable	-	0,4	0,5
Matière non dissoute	-	30	40
Oxydabilité	-	100	120

Face à ce problème de pollution, des pratiques environnementales courantes dans les entreprises du secteur textile ont été implantés visant la prévention de la pollution : 10% des entreprises réutilisent les bains de finissage, 5% possèdent des laboratoires automatiques de couleurs, 40% appliquent des systèmes de prévention de la génération des produits périmés et 50% pratiquent un entretien préventif de leurs installations. [Singh, 2015].

II.2.6.Applications biotechnologiques des peroxydases

La peroxydase de raifort (« horseradish peroxidase », HRP) est l'enzyme la plus couramment utilisée pour les applications analytiques. Toutefois, les peroxydases provenant d'autres sources semblent être une bonne alternative en tant que substituts pour HRP.

II .2.6.1.Peroxydase dans le génie de l'environnement

Les peroxydases sont employées comme catalyseurs dans la bioremédiation des composés phénoliques à savoir le traitement des eaux usées contenant des composés phénoliques et des amines aromatiques [Wagner, 2001]. Les composés aromatiques tels que les phénols et ses dérivés sont une classe importante de polluants dans les eaux usées [Nicell, 1993]. Ces composés sont connus pour leur toxicité et leur cancérogénicité et peuvent s'accumuler dans

la chaîne alimentaire. En raison de leur toxicité, les composés phénoliques sont fortement réglementés dans de nombreux pays, et doivent être retirés des eaux usées avant leur rejet dans l'environnement [Karam, 1997]. Les composés phénoliques peuvent être polymérisés par les peroxydases en présence de H_2O_2. Les polymères insolubles ainsi formés peuvent alors être éliminés en utilisant une simple sédimentation ou une filtration [Klibanov, 1983]. La majorité des travaux sur la désintoxication des eaux usées contaminées par des phénols, des crésols, et les phénols chlorés, ont été faits avec HRP Récemment, la peroxydase provenant d'autres sources telles que le soja, ont été proposées comme alternatives au navet, le concombre et les radis … .

II.2.6.2. Peroxydase dans la biochimie médicale

En raison de la capacité des peroxydases à donner des produits chromogènes et de leur bonne stabilité, elles sont bien adaptées pour la préparation d'enzyme conjuguée à l'anticorps et à l'application dans les kits de diagnostic. [Agostini, 2002] ont développé un kit de diagnostic pour l'identification de l'acide urique. Chez les humains, une augmentation ainsi qu'une diminution des niveaux de cholestérol sérique, est associée à certaines maladies [Hirany, 1997] et donc, il y a un besoin pour sa quantification. Une méthode enzymatique colorimétrique a été développée pour la détermination du cholestérol total, montrant l'exactitude, la précision, la sélectivité et la rapidité de l'essai [Ragland, 2000]. Cette méthode emploie la cholestérol-oxydase, la cholestérol-estérase et la peroxydase, mais la stabilité des enzymes et leurs coûts élevés limitent l'application. La peroxydase du radis (HRP) a également été utilisée dans plusieurs applications de diagnostiques en médecine telles que la détection de la 8-hydroxy-déoxyguanosine et ses analogues dans l'urine pour identifier les risques de cancer de la prostate (Chiou, 2003). Elles sont également utilisées comme bio détecteurs dans des kits d'identification et de diagnostic pour la quantification des sucres dans le sang et dans les urines et également pour la quantification d'autres composés tels que l'alcool, la choline, etc. D'autre test ELISA utilisant la peroxydase pour le marquage d'anticorps dirigés contre les mycotoxines ont été développés [Kawamura, 1989]. Les mycotoxines sont hépatotoxiques, néphrotoxiques, tératogènes et mutagènes sur une grande variété de mammifères [Clarke, 1993]. Elles sont fréquemment trouvées dans les céréales, et leur détection est indispensable pour éviter les risques d'intoxication [Ramakrishna, 1990].

II.2.6.3. Peroxydase dans l'industrie alimentaire

Les peroxydases peuvent être employées dans la détermination de la peroxydation des lipides dans la membrane cellulaire et dans les produits alimentaires comme la viande [Kanner, 1994]. Les peroxydases principalement celles des plantes sont utilisées pour produire des colorants à partir de phénols naturels. Ces colorants produits sont utilisés pour renforcer la couleur des jus, des vins et des thés mais aussi des arômes [Egorov, 1995]. Elles sont également utilisées comme indicateurs dans le blanchiment des légumes [Regalado, 2004]. Les peroxydases sont utilisées dans l'industrie alimentaire et de la boulangerie de pain et d'autres. Il peut être utilisé comme inhibiteur de production de gaz dans l'industrie du fromage.

II.2.6.4. Peroxydase dans l'industrie du textile

Elles sont utilisées pour contrôler la coloration des vêtements [Egorov, 1995]. Elles peuvent également être utilisées dans l'élimination des colorants après le blanchiment du coton.

II.2.6.5. Peroxydase en biologie moléculaire

Les peroxydases trouvent leur application dans la fabrication des sondes d'ADN et d'ARN. De plus, l'activité des peroxydases peut être utilisée comme marqueur de croissance et de différenciation des tissus. De même, elles peuvent servir de marqueurs dans divers stress biotiques et abiotiques car la plupart des gènes sont exprimés soit de façon constitutive soit de façon inductive [Dicko, 2005].

II.2.6.6. Peroxydase dans la production de polymères

Ces dernières années, il y a un intérêt immense pour la production de polymères conducteurs. La polyaniline est un polymère qui peut être synthétisée par la peroxydase en présence du peroxyde d'hydrogène et de polystyrène sulfonâtes et d'acide polyvinylphosphonique comme matrice [Egorov, 1995]. Elle est l'un des polymères conducteurs le plus utilisé en raison de sa stabilité environnementale élevée et ses prometteuses propriétés électroniques. Cependant elle est synthétisée par oxydation d'aniline dans des conditions fortement acides et à basse température en utilisant le persulfate

d'ammonium en tant qu'initiateur de polymérisation radicalaire [Rannou, 1998]. Cette méthode chimique de synthèse de polyaniline a des inconvénients. D'abord la réaction est une polymérisation radicalaire, et par conséquent, n'est pas cinétiquement contrôlée et deuxièmement, la réaction n'est pas favorable à l'environnement car elle est réalisée à pH très bas. Pour ces raisons, la polymérisation enzymatique de l'aniline est une alternative intéressante de la synthèse de la polyaniline. La lignine est le deuxième biopolymère le plus abondant sur terre après la cellulose. En présence de H_2O_2, la peroxydase catalyse l'oxydation de phénols pour donner des polymères de poids moléculaires élevés [Nicell, 1997]. Cette caractéristique peut être utilisée comme alternative attrayante à la méthode conventionnelle utilisant le formaldéhyde pour la production de résines phénoliques tel que la lignine. [Liu, 1999], ont obtenu de la lignine par polymérisation du crésol catalysée par la peroxydase.

II.2.7. Peroxydase dans l'industrie du papier

Les peroxydases sont employées pour le blanchiment de la pulpe à papier et la biodégradation de la lignine [Wagner, 2001]. Cette grande diversité d'application des peroxydases est liée d'une part à leur acceptabilité pour un grand nombre de substrats et d'autre part à leur stabilité thermique et chimique [Wright, 1999].

II .3. La cinétique enzymatique Michaéliennes

II.3.1. Vitesse (V) de la réaction en fonction de la concentration de substrat (S). Equation de Michaelis-Menten

Ainsi, les enzymes (E) catalysent les réactions en formant un complexe avec leur substrat (S) au niveau de leur site actif. La façon la plus schématique et la plus simple de représenter la réaction catalysée par un enzyme est la suivante :



Où E = enzyme, S = substrat, ES = complexe enzyme-substrat, P = produit. La première étape consiste en la liaison rapide et réversible entre l'enzyme et le substrat pour former le complexe enzyme-substrat (ES). Les constantes de vitesse de cette réaction réversible sont k1 et k-1. Des changements chimiques s'ensuivent au sein du site actif, avec des ruptures et des

formations de liaisons pour aboutir au produit de la réaction (P). La constante de cette réaction est k2. Cette réaction est réversible, mais l'on se place dans des conditions où la constante k-2 est négligeable. K2 est encore appelée la constante catalytique (kcat). Des arguments en faveur de ce modèle de réaction enzymatique peuvent être obtenus en mesurant la vitesse globale de formation du produit (ou de disparition du substrat, ce qui est évidemment la même chose). [Debru, 1991].

Si l'on mesure cette vitesse en présence d'une quantité constante d'enzyme et des quantités variables de substrat, toutes choses égales par ailleurs (notamment la température et le pH étant maintenus constants), on obtient une courbe. La vitesse augmente jusqu'à un certain point au-delà duquel elle reste constante: c'est la vitesse maximum de la réaction ou Vmax. L'enzyme est alors saturé par le substrat, et chaque molécule d'enzyme catalyse la réaction au niveau le plus élevé possible dans les conditions de l'expérience. Cette courbe est une hyperbole rectangulaire dont l'équation générale est de la forme: **y = a.x/ (b + x)**, où **a** et **b** sont des constantes. Soit la vitesse (V) en fonction de la concentration en substrat [S], **V = f ([S]) = a. [S]/ (b + [S])** Une analyse cinétique réalisée la première fois par Michaelis et Menten permet de démontrer que, pour une réaction catalysée par un enzyme, a est égal à Vmax; la constante b est appelée constante de Michaelis, Km. L'équation de Michaelis Menten s'écrit :

$$\boldsymbol{V0 = \frac{Vmax[S]0}{Km + [S]0}}$$

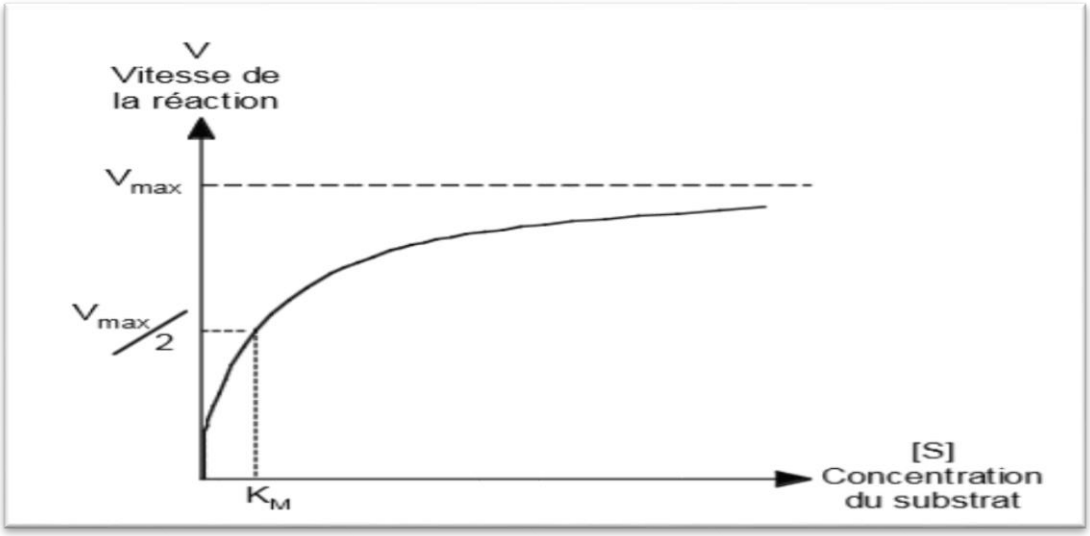


Figure II-4 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale du substrat pour une réaction de Michaelis-Menten [Debru, 1991].

La constante de Michaelis Km est une caractéristique fondamentale très utile d'un couple enzyme-substrat. Km est égal à la concentration de substrat à laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum Vmax. En d'autres termes, quand **V = Vmax/2**, alors **[S] = Km**. Selon le mécanisme précis de la réaction, Km est une fonction complexe des constantes **k1**, **k-1** et **k2**. **Km** peut-être considéré comme un index exprimant la facilité avec laquelle l'enzyme peut être saturé par le substrat (c'est-à-dire l'affinité de l'enzyme pour le substrat). Plus la valeur de Km est basse, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est élevée. L'extrapolation d'une hyperbole à partir de quelques points n'est pas facile: il est malaisé de tracer une courbe telle que celle qui est représentée ci-dessus à partir des mesures des vitesses réellement faites au cours d'expériences avec différentes concentrations de substrat. On peut prendre les inverses des deux membres de l'équation de Michaelis-Menten, et en effectuant quelques opérations mathématiques simples, l'équation devient celle d'une fonction linéaire de type **y = ax + b**. Dans cette transformation due à Linewaever et Burk, l'inverse de la vitesse est exprimé en fonction de l'inverse de la concentration du substrat et de Km et Vmax. Le graphe représentant cette fonction linéaire est appelé graphe en double inverse puisque les deux variables sont respectivement les inverses des variables de l'hyperbole précédente. Une telle droite (Figure II.5) est facile à tracer à partir des mesures expérimentales [Fenton ,2010].

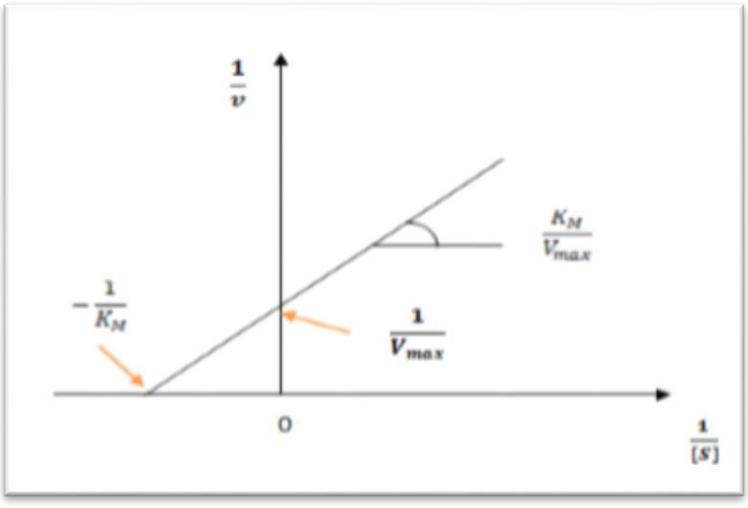


Figure II-5 : Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Lineweaver et Burck [Aron, 2008].

Son équation est la suivante :

$$\frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{V}} = \frac{\boldsymbol{km}}{\boldsymbol{Vmax}[\mathbf{S}]\mathbf{0}} + \frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{Vmax}}$$

L'étude de cette fonction montre que l'ordonnée à l'origine est égale à l'inverse de la Vmax, la pente vaut Km/V max, et, si l'on prolonge la droite, son intersection avec l'axe des **x (1/[S])** est égale à **-1/Km**. Cette représentation permet de déterminer graphiquement les valeurs de Km et Vmax [Fenton, 2010].

II.3.2. réaction à deux substrats :

Réactions catalysées par oxydoréductases, transférase, ligases

- Analyse cinétique basée sur des réactions à un substrat

Il y a deux grandes catégories en ce qui concerne des réactions à deux substrats :

A) Réactions enzymatique impliquant des complexes ternaires (complexe contenant l'enzyme et deux substrats)

La réaction E+A+B= E+P+Q Procède par la formation des complexes ternaires de type EAB et EPQ de sorte que :
E+A+B= EAB = EPQ = E+P+Q

- Cette catégorie de réaction se sous divise en deux classes.

  A.1) Réaction dans lesquelles le complexe ternaire se forme d'une façon ordonnée ou obligatoire.

  Les deux substrats B se lie après le premier substrat A est lié.

  E+A = EA et EA +B = EAB (mais pas E+B = EB)

  A.2) Réaction dans lesquelles le complexe ternaire se forme d'une façon séquentielles au hasarde

  E+A =EA = EA+B = EAB ou E+B = EB = EB +A = EAB

B) Réaction impliquant la formation des complexes binaire mais pas ternaires

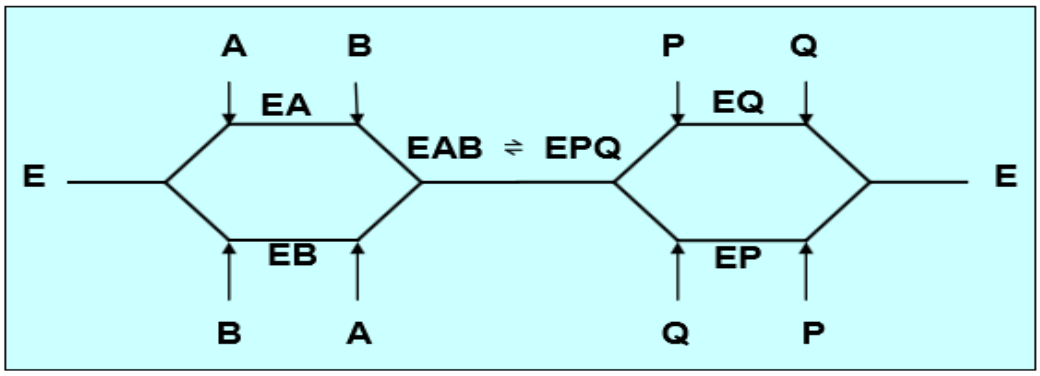
   B.1) la catégorie la plus importante comprend le mécanisme (Ping Pong) ou enzyme substitué

Une forme modifiée de l'enzyme est créée pendant son intégration avec le premier substrat et avant que le deuxième substrat ne soit lié donc :

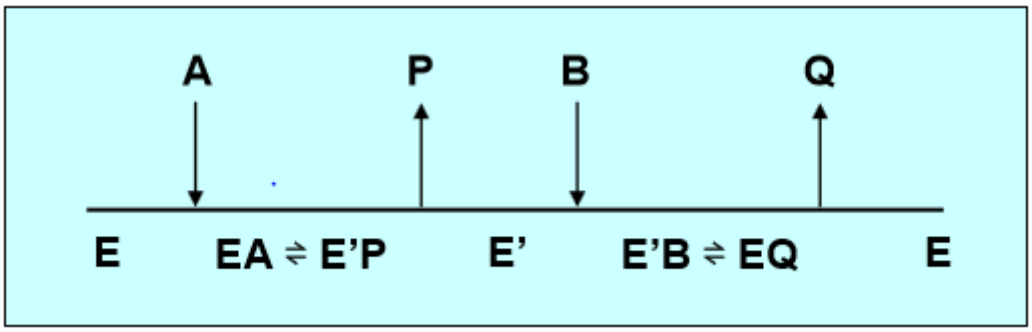
$$E+A = E' +P$$

$$E'+ B = E+Q$$

B.2) Une deuxième catégorie d'enzyme opère par un mécanisme de type Theorell-Chance (nommée d'après les deux investigateurs) dans lequel un complexe ternaire se forme mais sa décomposition afin de libérer le premier produit est si rapide que la concentration du complexe ternaire est cinétiquement négligeable [Leskovac, 2003].



FigureII-6 : Mécanismes séquentiel (à complexe ternaire) aléatoire [Leskovac, 2003].



. **FigureII-7 :** Mécanisme Ping-pong (à enzyme modifié) [Leskovac ,2003].

II.2 .Cinétique enzymatique

II.4.1.Définition des unités enzymatiques

Il est difficile de mesurer la quantité d'enzyme en unités de masse ou de concentration molaire;

1- Unité internationale:

Quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat par min, dans des conditions optimales de mesure [Fenton ,2008]

UI= µ mol/min

Activité enzymatique= V max

UI/ unité de volume

2- Katal: Quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde

3- Activité spécifique:

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par milligramme d'enzyme

$$\frac{\mu mol/min}{mg de prot\acute{e}ine} = \frac{UI}{mg de prot\acute{e}ine}$$

4-Activité spécifique moléculaire:

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par molécule d'enzyme

$$\frac{\mu mol/min}{\mu mol de prot\acute{e}ine} = \frac{UI}{\mu mol de prot\acute{e}ine}$$

II.4.2. Influence des paramètres physiques sur l'activité enzymatique

II.4. 2.1. Influence de la température

Deux effets sur la réaction enzymatique:

- Elle accélère la réaction en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.
- Une température élevée fragilise les liaisons et rend la structure tertiaire instable, pour dénaturer la protéine.

Il y aura diminution de l'activité catalytique.

A .Température basse

La température augmente la vitesse enzymatique puisque l'interaction entre l'enzyme et son substrat devient plus importante à forte température.

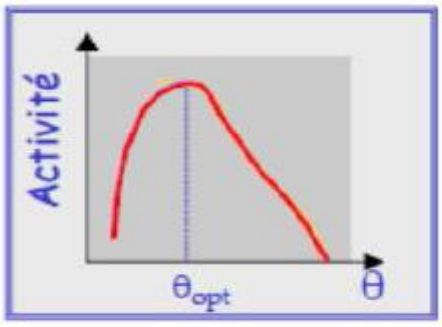
b. Température élevée

A fortes températures la protéine se dénature et perd donc son activité enzymatique.

L'activité enzymatique augmente jusqu'à une température optimale puis diminue pour atteindre une activité nulle à de grandes températures.

A la température optimale l'activité enzymatique est la plus importante.

Cette température optimale varie d'une enzyme à un autre [Holme, 1998].



FigureII-8 : Représentation graphique de l'effet de température sur l'activité enzymatique [Holme, 1998].

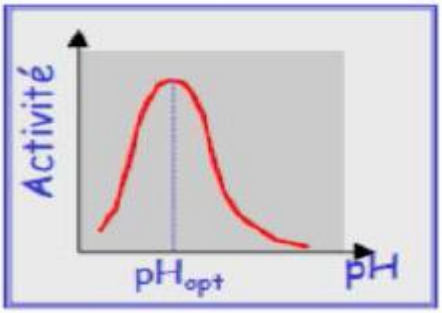
II.4.2.2. Effet du pH

Les enzymes sont très sensibles auxvariations du pH et fonctionnent bien sur une gamme limitée du pH.

Les mesures de nombreuses activités enzymatiques en fonction du pH donnent des courbes qui passent par un maximum, montrant ainsi l'existence d'un pH optimum.

Le pH peut agir sur plusieurs facteurs [Holme, 1998] :

- l'ionisation des résidus de l'enzyme et du substrat et/ou du produit ;
- la structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme ;
- la liaison du substrat à l'enzyme ;
- l'activité catalytique de l'enzyme.



FigureII-9 : Représentation graphique de l'effet de pH sur l'activité enzymatique [Holme, 1998]

II.4.3.Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique

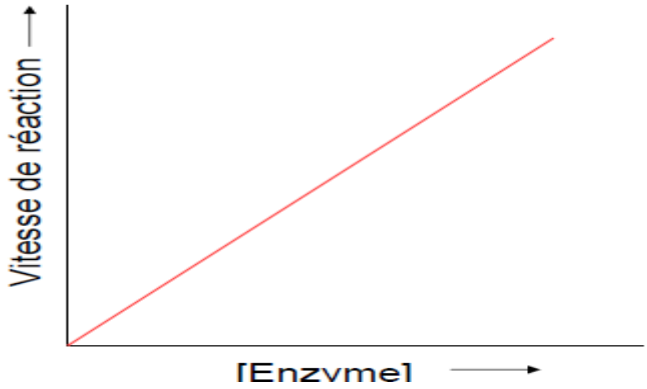
Pour une quantité fixe d'enzyme:

- À faible concentration du substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat.

- À des concentrations de substrat élevées, la vitesse de réaction est indépendante de la concentration du substrat et tend vers une valeur constante (vitesse maximale).

Le choix de la concentration du substrat est une considération importante dans le développement des essais enzymatiques [Holme, 1998].

- Lorsque [enzyme] << [substrat], la vitesse de la réaction est directement proportionnelle à la concentration de l'enzyme.
- La vitesse de réaction augmente lorsque [enzyme] augmente. Ceci est v
- raie pour n'importe quel catalyseur [Tinoco, 2002].



FigureII-10 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique

[Tinoco, 2002].

Tableau II- 3 : Facteurs influant l'activité enzymatique [Breslow ,2005].

Facteurs	**Effets**
température	• Basse : Manque de mouvement moléculaire • Haute : Dénaturation du site actif
pH	• Acide : H+ déforme site actif • Base : OH- déforme site actif
Concentration	• Selon le Km, donc l'affinité

II.3 .Immobilisation des enzymes

II.5.1 .Définition de l'immobilisation

Les enzymes étant solubles dans l'eau, leur purification après usage ne peut généralement, être envisagée favorablement, particulièrement à l'échelle industrielle .Le prix élevé ou la rareté des enzymes a poussé les chercheurs à mettre au point des méthodes permettant leur réutilisation bien que la stabilisation des enzymes multimeriques demeure un travail fastidieux.

Bien que les enzymes présentent des avantages, il existe des problèmes pratiques dans leur utilisation .ceci est du au prix de revient de l'isolation et de la purification des enzymes, et l'instabilité de leur structure suit à leur isolement de leur environnement naturel .De plus les enzymes sont très sensibles aux conditions d'utilisation (température, pH, substrat).

Beaucoup de méthodes d'immobilisation ont été réalisées pour éviter ces inconvénients [Bullok, 1999] Les enzymes sont immobilisées soit par formation de liaisons covalentes soit par l'adsorption.

Les enzymes immobilisées sont plus résistantes aux changements du milieu environnemental. Les avantages de l'immobilisation sont :

- La récupération du produit et de l'enzyme ;
- Plusieurs utilisations de l'enzyme ;
- Procédés en continu de l'action enzymatique ;
- Une grande variété de conception de bioréacteur.

II.5.2.Propriétés des enzymes immobilisées

L'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés physiques, chimiques et cinétiques.

II.5.2.1. Propriétés physico-chimiques

Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépond beaucoup du microenvironnement imposé par le support.

Ainsi, les enzymes fixées par la liaison sulfonamide sont moins stables que celles fixées par liaison azo [Breslow, 2005].

II.5.2.2. Propriétés cinétiques

L'immobilisation des enzymes affecte leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de la réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion l'accès du substrat au niveau du site actif. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale VM et de la constante de Michaelis KM de l'enzyme ; cette dernière constante pouvant avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons. [Breslow ,2005].

II.5.3.Méthodes d'immobilisation des enzymes

Les enzymes présentent un fort intérêt dans le domaine de la biocatalyse. Cependant, leur coût et leur stabilité limitée dans le temps sont des facteurs limitant leur utilisation industrielle. Afin de palier ces inconvénients, une stratégie fut proposée : l'immobilisation des enzymes qui permet de stabiliser celles-ci au cours de leur utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique. En 1916, Nelson et Griffin seront les premiers à démontrer qu'une enzyme, en l'occurrence l'invertase, conserve son, activité catalytique et ce même après avoir été immobilisée par adsorption sur du charbon actif. Cette technique connaîtra un véritable essor à partir des années 1950 avec les premières applications dans divers domaines. Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien chimiques que physiques. Ces méthodes, couramment utilisées, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients [Leskovac (2003)].

II.5.3.1. Immobilisation par microencapsulation

L'enzyme en solution aqueuse est enfermé dans des microcapsules sphériques, dont la paroi est une membrane semi-perméable qui peut être liquide ou solide. Cette membrane retient l'enzyme, mais laisse passer le substrat S et le produit P. Les microcapsules, dont le diamètre moyen est de 50 µm, peuvent être réalisées par polymérisation interfaciale. Une extension de la méthode d'immobilisation par microencapsulation consiste à enfermer une solution aqueuse d'enzyme dans les cavités d'une fibre de triacétate de cellulose, par exemple.

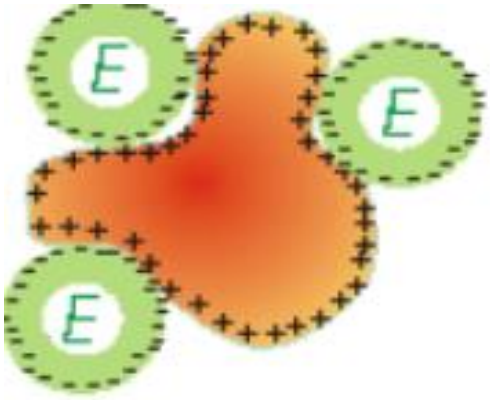
1. Avantages

- Réaction chimiques avec l'enzyme limitée (inclusion dans des gels naturels) ;
- Réaction de polymérisation et de gélification bien connues ;
- Application à toutes les enzymes (utilisation de mélanges) ;
- Obtention de supports de forma adaptables (films, billes, fibre…) ;
- Elle permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de l'enzyme ;
- Elle ne met pas en jeu les groupements actifs de l'enzyme [Colowick, 1976].

II.5.3.2. Immobilisation par adsorption

C'est la méthode la plus simple et la plus rentable. Il s'agit de retenir l'enzyme à la surface d'un support insoluble, par interaction faible (intermédiaire ou secondaire) entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support (figure 10). L'interaction enzyme-support pourrait impliquer l'ensemble des liaisons non covalentes ou secondaires de bas niveau énergétique talque les liaisons de Vander Waals, les liaisons hydrogène,.... Les matières utilisées sont organiques ou minérales [Colowick ,1976].

- **Supports organiques:** les polyosides comme l'acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate et les polymères comme le polystyrène et le polyéthylène.
- **Supports inorganiques ou minéraux:** sont généralement plus stables et résistent aux agents chimiques et aux bactéries. Les matériaux actifs peuvent être des argiles, Verre poreux ou silice poreuse.
- **Autres supports :** nylon, oxyde céramique, collagène et charbon actif.



FigureII-11 : Adsorption des enzymes sur un support [Rotticci, 2000].

1. Avantages

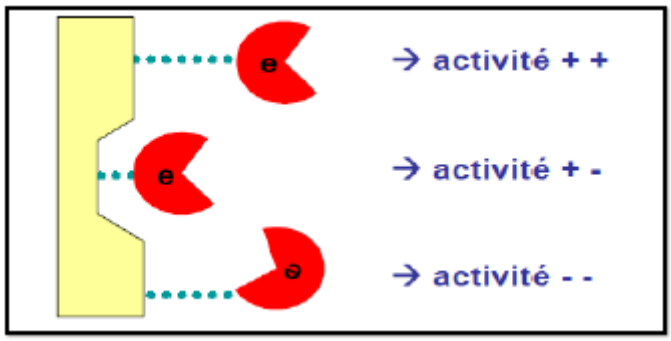
1. C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données ;

2. Méthode économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme [Ngo, 1980].

2. Inconvénients

1. La fragilité de la fixation (les enzymes peuvent facilement se désorber sous l'action de variation de pH, température…

2. L'orientation de l'enzyme et mauvaise accessibilité au site actif [Ngo ,1980].



FigureII-12 : Les possibilités d'orientation [Ngo, 1980].

II.5.3.3. Immobilisation par inclusion

Les molécules d'enzyme sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau « réseau tridimensionnel d'une matrice », ou emprisonnées dans des microcapsules délimité par une membrane semi perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules du substrat ou des produits de la réaction (figure13) [Ngo, 1980].

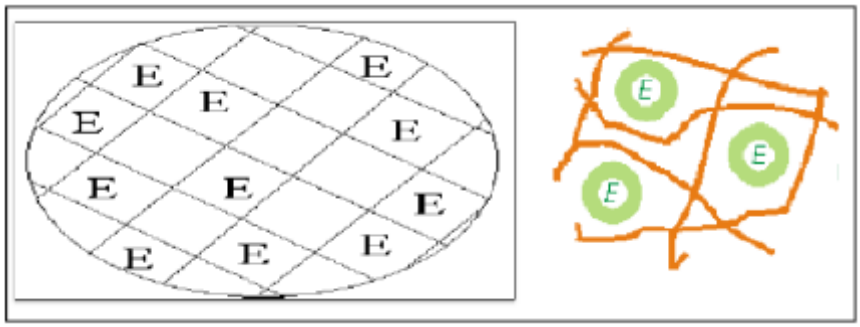


Figure II -13 : Inclusion dans un réseau de polymère insoluble [Ngo 1980].

1. Inclusion dans un gel

L'enzyme est incorporée dans un gel insoluble. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique (polymère) ou inorganique. L'enzyme est retenu à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice.

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. Les matières les plus utilisées sont les gels: de polyacrylamide, d'alginates, d'amidon et les fibres de polyacétate de cellulose [Rotticci, 2000].

Le choix du type de polymères va être dépend de:

- Propriétés mécaniques du gel: compression, forces de cisaillement ;
- Propriétés chimiques: toxicité, condition de stabilité en fonction de pH ;
- Propriétés physiques: perméabilité du gel (figure14).

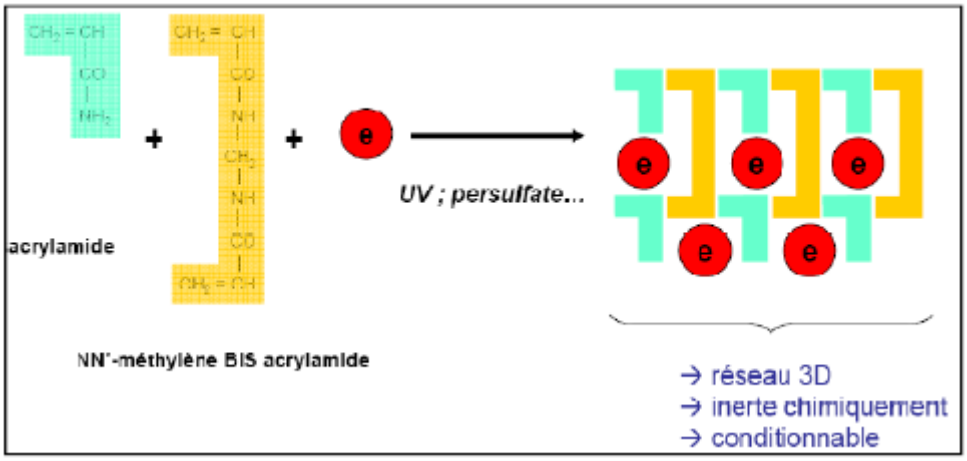


Figure II -14 : Inclusion dans le gel de polyacrilamide [Rotticci, 2000].

2. Encapsulation

La méthode consiste à inclure l'enzyme à l'intérieur de la membrane semi-perméable. Le diamètre des microcapsules peut varier de quelques microns à une centaine de microns. Les membranes semi-perméables Assurent la rétention des molécules d'enzyme dans un volume déterminé en vue d'une utilisation continue (les hydrolases). Elles sont utilisées dans la dégradation des macromolécules (amidon, protéine). Les produits obtenus après hydrolyse peuvent franchir les membranes, ce que permet de les récupérer dans l'effluent. L'immobilisation dans ce cas se fait de manière physique et pas de manière chimique contrairement au greffage covalent. La membrane doit permettre la diffusion des petites molécules seulement afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper. Ces membranes peuvent être inorganiques (gels de silice), organiques (nafion), polymères (polyacrylamide, polyuréthanes) ou composites (pâte de carbone) [. Poulsen ,2007].

A. Avantages

1. Réaction de polymérisation et de gélification bien connues ;
2. Réaction chimiques avec l'enzyme limitée (inclusion dans des gels naturels) ;
3. Application à toutes les enzymes (utilisation de mélanges) ;
4. Obtention de supports de forma adaptables (films, billes, fibre…) ;
5. Elle permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de l'enzyme ;
6. Elle ne présente aucun caractère de spécificité et est applicable à n'importe quelle enzyme ;
7. Elle ne met pas en jeu les groupements actifs de l'enzyme [Rotticci, 2000].

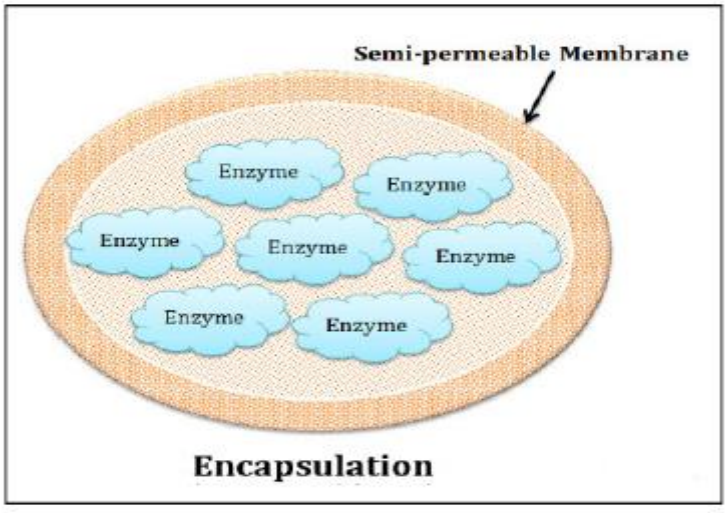


Figure II -15 : Encapsulation des enzymes [Rotticci, 2000].

b. Inconvénients

1. La localisation de l'enzyme à l'intérieur du polymère pose des problèmes stériques (efficacité limitée par accès délicat du substrat vers l'enzyme et du produit en dehors du polymère) ;
2. Les conditions de polymérisation (ex: pH élevé) peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme ;
3. Certaines polymérisations font appel à des agents dénaturants ou à des radicaux.

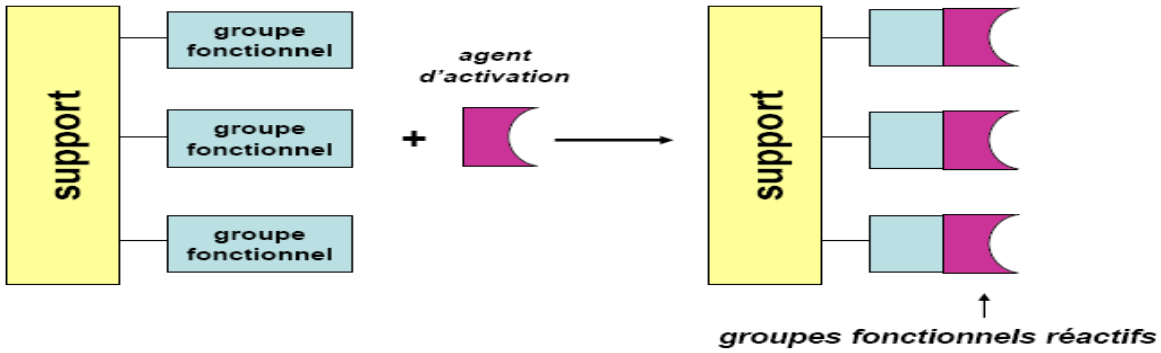
II.5.4 Immobilisation par liaison covalente

Le principe de cette méthode d'immobilisation est de faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme avec un groupement fonctionnel du réactif. En général, les groupements fonctionnels du réactif sont des fonctions carboxyliques, thiols, hydroxyles ou encore amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme, n'intervenant pas dans la catalyse enzymatique, dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule [Basso, 2007]. On peut diviser les méthodes d'immobilisation d'enzymes par liaison covalente en deux groupes:

A. Immobilisation par liaisons covalentes sur support

Elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support. Ces groupes, en général insuffisamment réactif, nécessiteront une activation préalable. Apriori, il faut activer soit l'enzyme, soit le support. L'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme peut conduire à la dénaturation de l'enzyme (figure 16) [Basso, 2007].

– 1ère étape :



– 2ème étape :

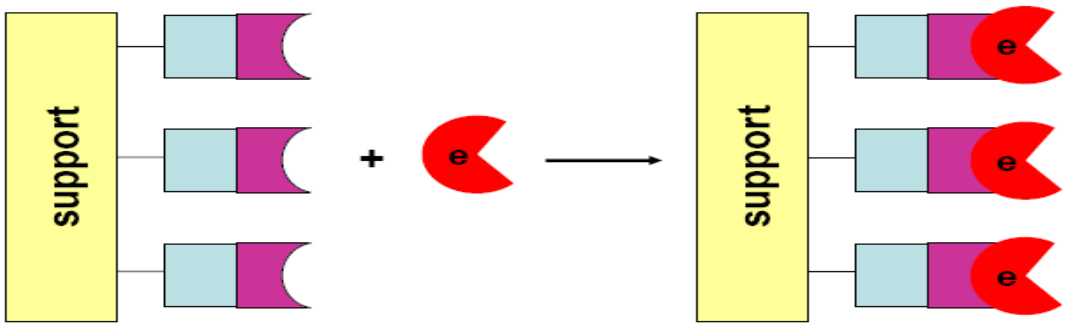


Figure II -16 : Immobilisation par liaison covalente sur support. 1ère étape: Activation du support, 2ème étape: fixation de l'enzyme [Basso, 2007].

B. Immobilisation par réticulation

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulant qui va permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques. Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation, on parle alors de Co-réticulation (figure 17). Les enzymes, après avoir été adsorbées sur un support, sont mises en contact avec un agent réticulant afin de donner un réseau enzymatique tridimensionnel et qui contrairement à l'enzyme seule est insoluble [Sine ,2010].

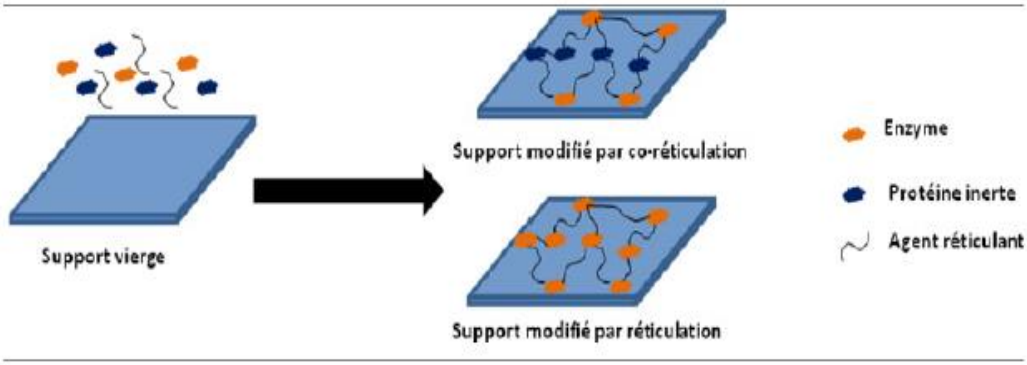


Figure II-17 : Réticulation et Co-réticulation des enzymes [Sine ,2010].

Avantages

1. Stabilité accrue à cause de la liaison covalente ;
2. Grand choix de méthodes différentes ;
3. Grande variété de support minéraux (verre, silice, céramique…) et organiques (cellulose, polymère synthétiques…) [Sine 2010] ;
4. Possibilité d'effectuer l'immobilisation en présence de substrat pour éviter l'inactivation (protection du site actif) ;
5. Solidité de la liaison enzyme-substrat.

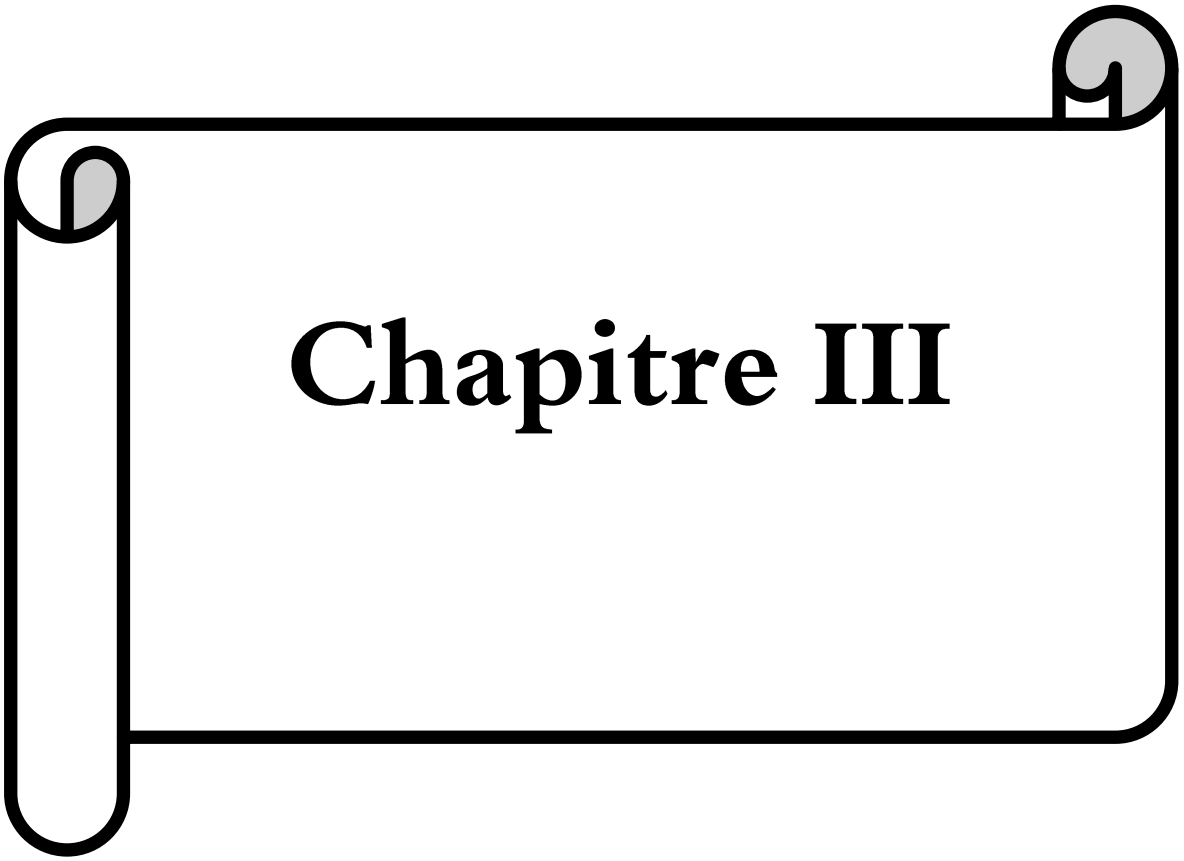
Inconvénients

1. Mise en œuvre de réactions chimiques souvent complexes ;
2. Longueur des expériences (étape de l'activation du support) ;
3. Risques de modifications chimiques de l'enzyme (perte d'activité) ;
4. Nécessité de purifier l'enzyme préalablement ;
5. Immobilisation plus complexe à réaliser (choix des groupements à activer...) ;
6. Les quantités d'enzymes immobilisées sont inferieures par rapport aux deux précédentes méthodes. Rendements de fixation inferieurs à 100% [Sine, 2010].

Conclusion :

L'utilisation des enzymes dans divers domaines industriels présente donc un fort intérêt et explique les efforts faits ces dernières années par la communauté scientifique dans ce sens. Cependant, elles restent des entités faisant partie du domaine du vivant et leur emploi nécessite de prendre certaines précautions notamment afin de conserver leur propriétés

catalytiques. De plus chaque enzyme présente des particularités, il n'existe pas de solution universelle applicable à l'ensemble de cette classe de protéines. [Voet ,1998].



Chapitre III

Objectif

L'étude de la cinétique enzymatique est une étape primordiale dans la conception et de la réalisation d'un procédé enzymatique. Il est nécessaire de connaître le comportement de l'enzyme du point de vue cinétique (activité enzymatique) et la méthode de l'extraction et la purification de l'enzyme.

L'objectif de ce travail est de donc d'étudier la méthode d'extraction et de purification de la peroxydase de concombre. La deuxième étape de l'étude consiste à testé l'activité de l'enzyme par la méthode de Bradford.

La partie de décoloration du Rouge Congo par la peroxydase libre et immobilisée a été annulé par la pandémie du Covid19.

III. Matériel et Méthodes

III.1. Équipement et verreries

Tableau III.1 : Verreries et instruments et Appareillages utilisé en expérimentation.

Verreries et instruments	Appareillages
• Tubes à essai. • Pipette graduée. • pro- pipette. • Béchers de (50, 100, 250 ,1000 ml). • Eprouvettes (50, 100, 500ml). • Fiole jaugée de (100, 250,1000 ml). • Pissette. • Entonnoir., Creusets. • Barreau magnétique. • Spatule., Chronomètre.	• Etuve • La balance analytique • Plaque chauffante • Agitateur mécanique • pH-mètre • Thermomètre. • Spectrophotomètre UV visible

III.1.1.Réactifs utilisés

Substrat principal de la peroxydase : peroxyde d'hydrogène (ou l'eau oxygénée H_2O_2)

- Masse molaire : 34,02g/mol
- Densité à 25 °C : 1,03
- Point de fusion : 43°C
- Point d'ébullition ; 108°C
- Pureté : 30٪P/V ,100 volumes.

Réactifs utilisés dans le test standard de mesure de l'activité enzymatique

Tableau III.2 : propriétés physicochimiques du phénol et 4-Aminoantipyrine.

Réactifs / Renseignements	Phénol (substrat)	4-Aminoantipyrine (4-AAP)
Formule	C6H6O	C11H13N3O
Masse molaire	94.11g/mol	203.29g /mol
Solubilité dans l'eau	98g /l	55.90mol/l
Densité à 20°C	1.073	--
Point de fusion	-33°C	--
Point d'ébullition	182°C	--

III.1.2.Colorant azoïques étudiés

Rouge Congo

Le rouge Congo a été découvert en 1884 par un chimiste allemand, BÖTTIGER, et il n'a guère rencontré de succès dans l'industrie car il bleuissait dans les solutions acides de l'époque, utilisées pour la coloration des textiles. La firme AGFA s'y intéressa après avoir découvert que dans une solution neutre, il colorait directement le coton, sans traitement intermédiaire ni préparatoire[Libby;1982].c'est le premier colorant découvert des azoïques directs qui a été utilisé surtout dans l'industrie textile, puisque il contient des groupes acides sulfonique qui lui confèrent une hydrosolubilité appropriée et qui permettent à la molécule du colorant de se lier uniquement aux site chargés du canevas polymérique du tissu est un colorant acide, c'est à dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il colore particulièrement bien les parois des cellules de champignons ; c'est pour cela qu'il est un des colorants les plus utilisés en mycologie générale [Lecomte, 2004].Le rouge Congo est une molécule diazoïque, parce qu'il possède deux chromophores (région de la molécule qui est principalement responsable de la teinte).

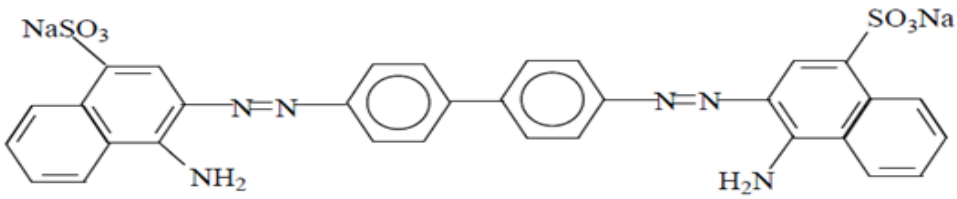


Figure III.1 : Structure moléculaire de rouge Congo.



Figure III. 2 : Colorant rouge Congo poudre.

III.1.3.Solution Tampons

- Solution tampon PH 6,0 préparé par chlorure de potassium à 0,01M et l'acide borique à 0,01M.

En ajustant le pH des solutions en utilisant les solutions de NaOH (0,2N), pour les différentes valeurs de pH 6.

III.2. Méthode expérimentales

III.2.1.La source végétale de la peroxydase

La source de peroxydase qui sera mené sur une variété de sources végétales commercialement disponibles (navet, radis, la pomme de terre, concombre, grain de soja, chou…), Le choix des sources végétales et en particulier les légumes est justifié par plusieurs raison : La disponibilité de ces dernier et La facilité de préparation de la solution enzymatique par un simple broyage et la chair qui facilité la visualisation de la réaction colorée.

Dans ce travaille on utilise le concombre comme une source de peroxydase, une masse de 100mg des tranches de concombre est broyée dans un mixeur, cette homogénéisation se fait

dans une solution de 200 ml de l'eau distillée, le mélange est ensuite filtré sur une gaze pliées en multicouches, pour éliminer les grosses particules. L'extrait obtenu est considéré comme une source de la peroxydase brute (EEB). Cet extrait subit ensuite une purification à l'acétone. Les étapes de broyage et la filtration de l'enzyme sont présentes sur la figure III.3 :

III.2.2.Purification de la peroxydase

- **Purification par précipitation avec l'acétone**

Avant d'entamer l'utilisation de peroxydase dans la dégradation des colorants azoïque, il faut tout d'abord la purification. Il existe plusieurs techniques de purification on utilise des agents précipitant tels que les sels et les solvants polaires, la précipitation à l'acétone est la plus utilisée car plus simple et plus efficace. La purification de l'extrait brut est réalisée selon cette procède comme suite :

Un volume d'acétone glacial est versé goutte à goutte dans le même volume de l'extrait brut de la source végétale disposé sous l'agitation dans un bain de glace pilée .Une fois l'acétone est versée totalement, le mélange est laissé dans le réfrigérateur à 4°C pendant 2 heures .Il se forme alors un précipité blanc. Sa récupération se fait par centrifugation à 3000 tr/min pendant 10min. Le culot riche en peroxydase est dissous dans un volume minimale de tampon pH 6,0.La solution obtenu est de l'extrait enzymatique partiellement purifiée (EEPP) .La peroxydase semi purifiée est souvent stable et doit être généralement conservée dans des conditions protégeant la dégradation chimique et biologique .La conservation à basse température de 4°C est de rigueur .pour comparer entre les deux extrait (EEB ,EEPP) , un dosage de protéines par la méthode de Bradford et un test d'activité enzymatique sont fait ,les étapes de purification sont représente sur la figure III.3

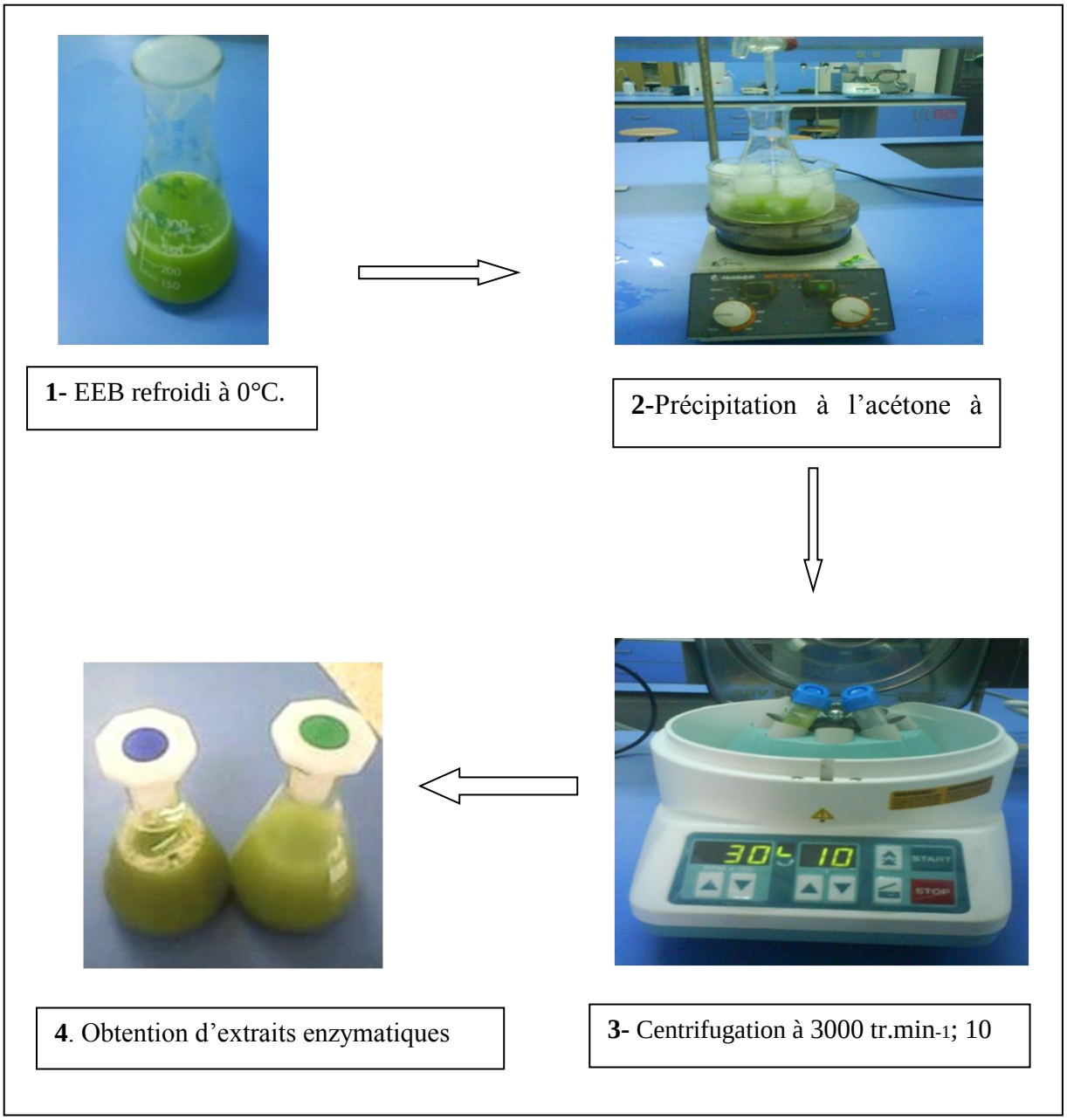


Figure III-3 : Etapes de la purification de l'enzyme par l'acétone.

III.3. Mesure de l'activité enzymatique des extraits avant et après la purification

La réaction utilisée pour mesurer l'activité enzymatique dans notre étude inclue le peroxyde d'hydrogène qui réagit rapidement avec le phénol et le 4-amino antipyrine en présence de peroxydase du concombre selon la réaction suivante. [Lui, 1999] :

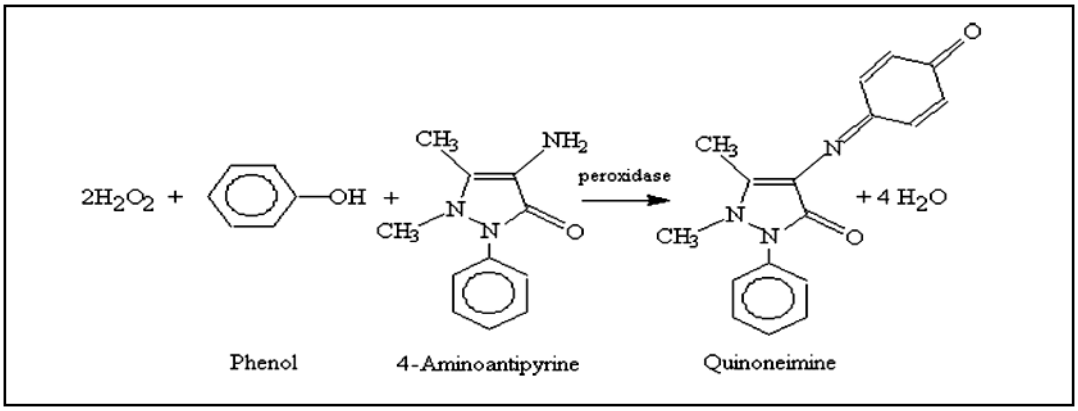


Figure III-4: Réaction entre le phénol et la peroxydase de d'hydrogène en présence de 4- amino-antipyrine et la peroxydase.

La peroxydase consomme deux molécules de peroxyde d'hydrogène pour oxyder une molécule de phénol en présence de 4-amino-antipyrine qui joue le rôle d'une substance donneur d'hydrogène. Le produit obtenu est un chromogène de Quinoneimine qui possède une couleur rose absorbe la lumière visible à une longueur d'onde maximale de 517 nm.).

Le mélange réactionnel utilisé pour doser cette activité est préparé dans une fiole de 50 ml, contient les produits suivants :

- 1 ml de H_2O_2 à 0.1M.
- 1 ml de phénol à 0.1M.
- 1 ml de 4-amino-antipyrine à 0.01M.
- Compléter par la solution tampon pH 6 jusqu'à 50 ml.

La réaction est déclenchée en ajoutant 0.2 ml d'extrait enzymatique à 4 ml de mélange préparé précédemment, et on suit rapidement le développement du couleur sous une langueur d'onde de 517 nm. L'intensité de la couleur est convertie en concentration en utilisant un coefficient d'extinction de 6.572 mL.cm /µmol

III.4. Dosage des protéines totales

La quantité des protéines totales de chaque extrait est réalisée selon la méthode de Bradford [M.M, 1976]. Cette méthode est basée sur le changement de la couleur de bleu de Coomassie en fonction de la concentration des protéines.

La concentration des protéines est donc déterminée à l'aide d'un courbe étalon de sérum albumine bovin, en ajoutant 0.1 ml de sérum de différentes concentrations à 5 ml du réactif de bleu de Coomassie. La densité optique de chaque échantillon sera observée en mesurant l'absorbance à 595 nm. Les échantillons des extraits enzymatiques de C-peroxydase sont analysés de la même manière que les solutions des protéines.

III.4.1.Principe

La technique de Bradford utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines. Ce colorant existe sous 3 formes : une forme anionique colorée en bleu (λ_{max} =595 nm), une forme cationique rouge (λ_{max} = 470 nm) et une forme neutre verte (λ_{max} = 650 nm). C'est la forme anionique qui se fixerait préférentiellement aux protéines grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des protéines (plus particulièrement les groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques).

III.4.2.Méthode

La quantité des protéines totale de chaque extrait enzymatique (brut, partiellement purifié) est dosée selon la méthode de Bradford. La concentration est déterminée à l'aide d'un courbe étalon de sérum d'albumine bovin SAB ,en ajoutant 0.1 ml de sérum à différentes concentration au 5 ml de réactif de Coomassie et 0,25ml de Hydroxyde de sodium (NaOH) de concentration 1 M .La densité optique de chaque échantillon sera observé en mesurant l'absorbance à 595 nm.

Les réactifs de utilisées ont les compositions chimiques suivants :

• Réactifs(1) : Réactifs de Bradford contient :

1. Bleu de Coomassie (100 mg. L^{-1}).
2. Ethanol 95% (50 ml).
3. H_3PO_4 85% (100 ml).
4. Après dissolution, on complète avec l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.

Le mélange est conservé 24h sous agitation à l'obscurité puis on réalise une filtration.

• Réactifs(2) : Hydroxyde de sodium à1M.

• Réactifs(3) : Etalon de SAB.

La détermination de la courbe d'étalonnage de sérum d'albumine bovin (SAB) est résumée dans le tableau Suivant :

Tableau III. 3. Courbe d'étalonnage de sérum d'albumine(SAB)

Tube N° (C ($g.L^{-1}$))	0 (0 $mg.L^{-1}$)	1 (25 $mg.L^{-1}$)	2(50 $mg.L^{-1}$)	3 (75 $mg.L^{-1}$)	4(100 $mg.L^{-1}$)	X
V_{Etalon}	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
$V_{NaOH\ (1M)}$	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl
$V_{réactif\ de\ Bradford}$	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml

- Agiter les solutions puis laisser la coloration se développer 10min.

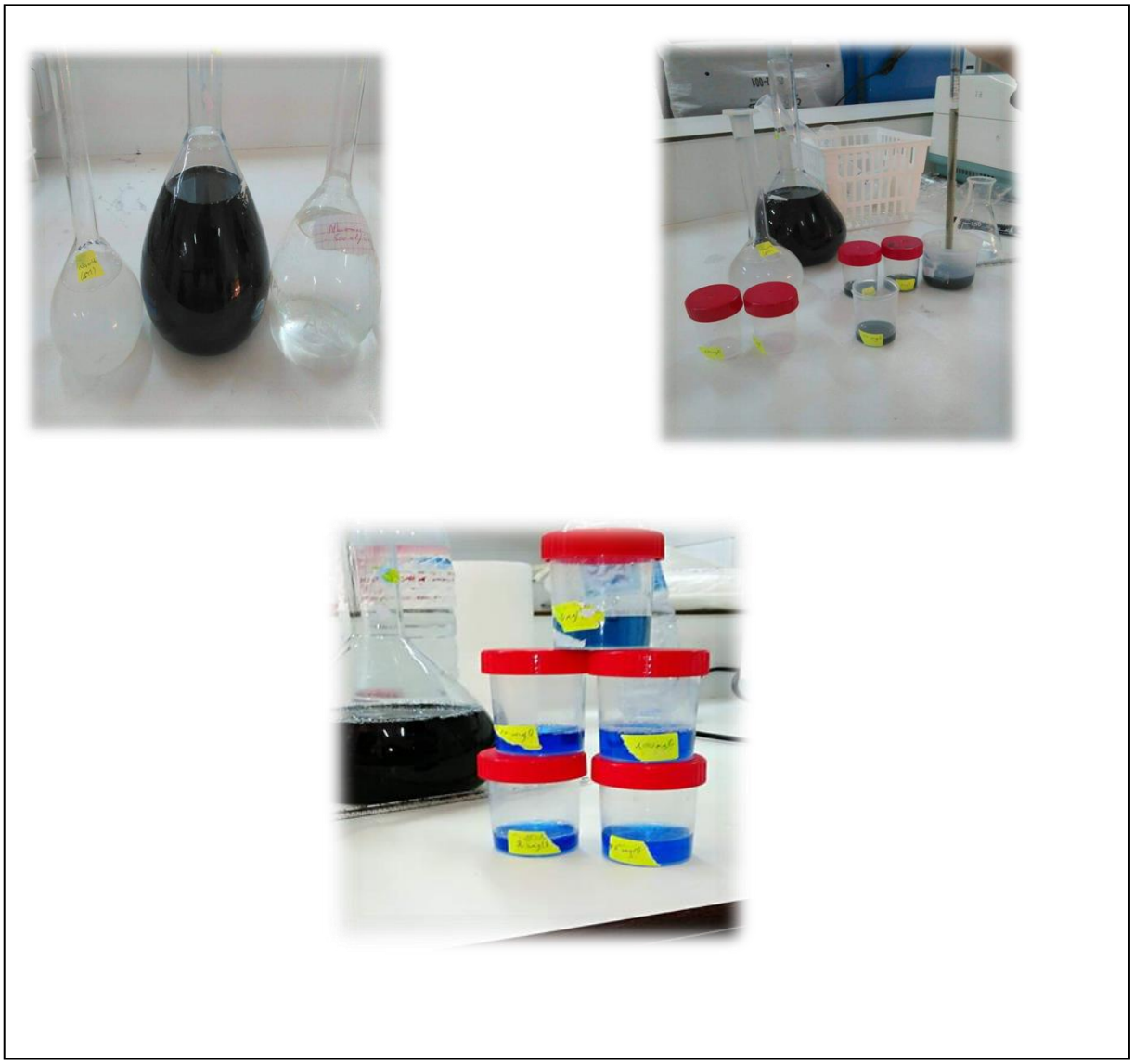


Figure III-5 : Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Chapitre IV

IV. Résultats et discussion

IV.1. Extraction et purification de la peroxydase

Pour comparer les deux extraits enzymatiques obtenus avant et après la purification, il est nécessaire de déterminer la quantité de protéines et doser l'activité enzymatique de la peroxydase présente dans l'extrait du concombre brut et semi purifié.

IV.1.1. Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits

L'avancement de la réaction est déterminé par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 517 nm, qui indique l'évolution d'une couleur rose résultant de la décomposition du H_2O_2 et le phénol pour former le Quinoneimine.

Les valeurs des vitesses initiales ainsi obtenus en ΔDO/min sont converties en concentrations de substrats H_2O_2 transformé à l'aide de la courbe d'étalonnage .Le tracé de l'évolution de la concentration de chromogène Quinoneimine produit au cours du dosage de l'activité des deux extraits (EEB, EEPP) en fonction du temps donne les allures représentées sur la figure suivante (Figure. IV.1) :

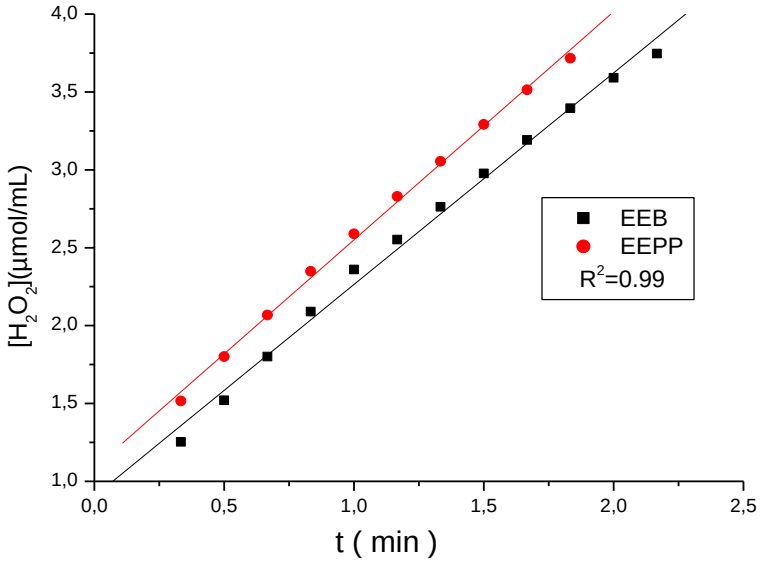


Figure IV- 1: Activité enzymatique pour les deux extraits: EBB, EEPP.

IV.1.2. Dosage de la quantité de protéines

Le dosage de la quantité de protéine est nécessaire, il nous permet de calculer l'activité spécifique et par conséquent, de déterminer le facteur de purification de l'enzyme peroxydase. La méthode utilisée dans notre cas est la méthode de Bradford **.**Tout d'abord, on trace la courbe d'étalonnage, qui représente la densité optique (ou absorbance) relative au maximum d'absorption, en fonction de la concentration C de la protéine standard (SAB), obéissant à la loi de Beer-Lambert. La représentation graphique de DO en fonction de concentration d'albumine est illustrée dans la figure suivante **:**

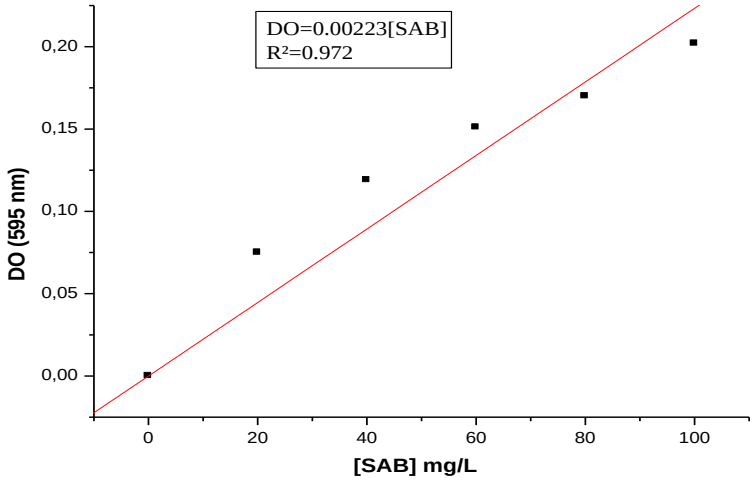


Figure IV-2: Courbe d'étalonnage de la protéine SAB suivant la méthode de Bradford.

La quantité de protéines des deux extraits enzymatiques bruts et semi purifié est déterminée en utilisant cette équation. Les valeurs obtenues sont présentés dans le tableau (Tableau. IV.1) :

Tableau IV-1: Résultats de purification de la peroxydase de concombre.

Extrait	Protéine totale (mg)	Activité totale(UI)	Activité spécifique (UI/mg protéine)	Facteur de purification	Rendement de purification(%)
EEB	1108.57	7707.57	6.95	1	100
EEPP	212.32	2606.75	12.77	1.83	33.82

Comparaison entre les deux extraits EEB, EEPP :

Les résultats de l'activité enzymatique et la quantité des protéines totale contenant dans les extraits ne sont pas suffisantes. On fait appel, alors à des notions et à des termes précis : l'activité spécifique, le facteur et le rendement de la purification.

- **Activité spécifique** : est l'activité par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités internationale (UI) par poids de protéines totales.
- **Rendement de purification** : est la proportion en % de la quantité de la protéine purifié qui reste par rapport à quantité initiale.
- **Le degré de la purification** : est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique par rapport à la première étape.

On résume les résultats obtenus dans le tableau sous dessous.

IV.2. Détermination des paramètres de purification

La procédure de purification de la peroxydase par l'acétone est évaluée par la détermination des paramètres donnés dans le tableau IV.1. Elle conduit à un facteur de purification proche de celui calculé après la purification de peroxydase par l'acétone. Dans les travaux réalisés on trouve un rendement de purification et un facteur de purification de 33.82 % et de 1.83 ont été atteints, respectivement, après la purification de la peroxydase de concombre par précipitation à l'acétone.

Après les résultats donnés, il est clair que l'AE et la quantité des protéines diminuent tandis que le Rendement et le Facteur de Purification accroissent dans le cas d'une purification à l'acétone. L'étape de purification paraît donc nécessaire afin d'obtenir une enzyme potentiellement efficace dans le traitement des solutions colorées.

Conclusion générale

Conclusion Générale

L'utilisation des enzymes dans des applications industrielles et plus particulièrement pour le traitement des effluants nécessite une purification partielle à fin d'obtenir une activité élevé, une spécificité convenable et une stabilité afin de garantir son utilisation rationnel dans un procédé industriel. Cependant, l'utilisation des techniques spécifiques de purification, en général coûteux et complexe pour la purification des enzymes destiné au traitement des effluents est déconseille vu que cela pourra avoir un impact négatif sur le coût globale de fonctionnement des procédés sans autant obtenir une amélioration significative de rendement de traitement.

Le pouvoir catalytique de la peroxydase dans le traitement des effluant chargé par les colorants nécessite de produire cet enzyme en grande quantité avec un cout modéré. Pour cela, La méthode de précipitation à l'acétone sera la méthode de choix pour toute l'étude. Elle à déjà été rapporté que les peroxydases peuvent être utilisées pour la désintoxication et l'élimination de divers colorant contient dans les eaux pollués. La disponibilité de la peroxydase les plus stables et les plus actives dans une source peut coûteuse peut être aller un long chemin vers le développement d'un système catalytique avec des applications commerciales et environnementales à large spectre.

La partie de décoloration du Rouge Congo par la peroxydase libre et immobilisée a été annulé par la pandémie du Covid19.

.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques :

1. **Abdessemed A.** Etude de l'élimination de l'éthyle violet par adsorption sur la kaolinite et le charbon actif et par des méthodes photochimiques en milieu aqueux, Magister, université Mentouri, Constantine, (2009).
2. **Agostini E., Hernández-Ruiz J., Arnao M.B., Milrad S.R., Tigier H.A. et Acosta M ; Alemzadeh I ; Nejati S.** Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. Journal of Hazardous Materials. 166: 1082–1086 (2009).
3. **Ali H.** Biodegradation of Synthetic Dye, A Review, Water, Air and Soil Pollution, 213 251–273 (2010).
4. **Alvares A.B.C; Dlaper C; Pars S.** .Partial oxidation by ozone to remove recalcitrance from wastewaters – a review. Environ. Technol. 22 :409-427 (2001).
5. **Anselme C; et Jacobs E.P**. Water treatment membrane processes. McGraw Hill Mallevialle, New York, NY, USA, pp. 401-1087.B1, T-2 toxin and ochratoxin-A in barley. Journal of the Association of Official, (1996).
6. **Aron W.** Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life', (2008).
7. **Asada K**. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in Plants. Physiology Plant 85: 235-241 (1992).
8. **Asano T**, **(**1998). Wastewater reclamation and reuse. Water quality management library,
9. **Ashraf H; and Husain Q.** Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (Raphanus sativus) peroxidase for the removal of alpha-naphthol in batch and continuous process. International biodeterioration and biodegradation 64:27-31(2010).
10. **Assamoi A.A ; Destain J ; Thonart P.** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-β-1,4-xylanases de moisissures : le cas de Penicillium canescens. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., **13**(2); 281–294 (2009).
11. **Basso, A. ; Braiuca, P ; Cantone, S ; Ebert C ; Linda P ; Spizzo P ; Caimi P., Hanefeld U ; Degrassi, G ; Gardossi L**. "In Silico Analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilization of CalB and PGA on Sepabeads", Adv. Synth. Catal., vol. 349 (2007) 877- 886.
12. **-Baumont S ; Camard J-P ; Lefranc A ; Franconie A**. Réutilisation des eaux usées:Biotechnol. Applied Biochemistry 35: 1-7.Biotechnological applications of peroxidases. Phytochemistry Rev. 3:243-256.Biotechnology 2: 82–87 (2004),

13. **Benite z F.J; Acer J.L; Real F.J; Leal A.I.** The role of hydroxyl radicals for the decomposition of p-hydroxy phenylacateic acid in aqueous solutions. Water Res., 35, 1338-1343 (2001).
14. **Bergmeyer H.U ; Gawekn K ; et al ;** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.Bortman, Peter Brimblecombe, Mary Ann Cunningham, William P. Cunningham (1979).
15. **Bisswanger H .**Enzyme Kinetics. Wiley-VCH Verlag, Weinheim. (2008).
16. **Boer C.G, Obici L. , Peralta L.** Purification and some properties of Mnperoxidase from Lentinulaedodes, Process Biochemistry 41 1203–1207(2006).
17. **Boyd C.E;** Chemecal analyse of some vascular aquaic plants. P.50 (1970).
18. **Breslow R**. Artificial enzymes. Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2005).
19. **Bridgman Howard A;** Encyclopedia of Global Change: Pollution. Ed. Andrew S. Goudie. Oxford University Press (2001).
20. **Brown M.A. ET Devit S.C.** Predicting azo dye toxicity. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 12, 405-414 (1993).
21. **Bullock C.** (Immobilised enzymes), Sci progress ; 78 :119-34 (1995).
22. **Buxton G.V ; Grennstock C.L ; Helman W.P ; Ross A.B.** Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH^-/O_2) in aqueous solution, J. Phys. Chem. Ref. Data 17 513-886 (1988)
23. **C. Debru; Victor HENRI.** Dans Dictionary of Scientific Biography Supplement II, vol. 1 : 410-413 (1991)
24. **Calabr o V ; Pantan G ; Kang R ; Molinari R et Dri E .**Experimental study on integrated membrane processes in the treatment of solutions simulating textile effluents. Energy and exergy analysis. Desalination, 78, 257-277 (1990).
25. **-Carliell, C.M; Barclay, S, J; Naido, N.** Microbial, decoloration of a reactive azo dys Under anaerobic condition .Water SA, 21 (1) ,61.69 (1995).
26. **Chiou C.C; Chang P.Y; Chan E.C; Wu T.L ; Tsao K.C. and Wu J.T.** Urinary-dydroxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: Catalase peroxidases in cyanobacteria-similarities and differences to ascorbate peroxidases. Free Radical Research 31: 243-249 (2003).
27. **Chung KT; Ful k et Andrews A.Y.** Mutagenicity testing of some commonly used dyes. Appl. Environ. Microbiol., 42, 641-648 (1981).
28. **Clarke J.R ; Marquardt R.R ; Oosterveld A ; Frohlich A.A ; Madrid F.J.Et Dawod M**. Development of a quantitative and sensitive enzyme linked immunosorbent

assay for ochratoxin-A using antibodies from the yolk of the laying hen. Journal of Agricultural Food Chemistry 41: 1784-1789 (1993).

29. **Colonna S; Gaggero N. ; Richelmi C ; Pasta P.** Recent biotechnological developments in the use of peroxidise. TIBTECH. 17:163-168 (1999).
30. **Colowick S.P; Kaplan O.** Methods in enzymology. Vol. 44: Immobilized enzymes. 999 p., bibl. Academic Press (1976).
31. **Crepy** ; **M.N** "Dermatoses professionnelles aux colorants", Fiche d'allergologie dermatologie professionnelle hôpital Cochin, (2004).
32. **Cshapf f** .Recommandations sanitaires relatives à la désinfection des eaux usées (1995).
33. **Cunningham William P.** Environmental Encyclopedia. Eds. Marci .DEPA (Danish Environmental Protection Agency). Survey of azo-colorants in Denmar, Toxicity and fate of azo dyes Development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. Clinica Chimica Acta 334: 87-94 (2000).
34. **Dicko M.H.** Endogenous phenolics and starch modifying enzymes as determinants of sorghum for food use in Burkina Faso. Thèse de doctorat PhD, Université de Wageningen. Pays-Bas. 174 pages (2005).
35. **Dunford H.B**. Heme peroxidases. Wiley-VCH (H: Brian Dunford Ed.) (1999).
36. **Egorov A.M.** Peroxidase biotechnology and application. International Embedded in polyacrylamide nanoparticles enables optical detection of reactive (1995).
37. **Engasser J .M .**Factors influencing the performance of enzymic reactors .In enzymic and non enzymic catalysis (dunnil P, Wiseman A, Blakebrough N, Ed), 174-202, Ellis horwood Environmental Protection 4:345 – 349.Enzymologie et Métabolisme 166-169 (1980).
38. **Erman J.E. and Vitello L.B.** Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. Biochimica and Biophysica Acta 1597: 193 (2002).
39. **Faby J.A., Brissaud F**, **(**1997). L'utilisation des eaux usées épurées en irrigation. Office Fawell John et Nieuwenhuijsen, Impact of environmental pollution on health: balancing risk: Contaminants in drinking water. British Medical Bulletin. . **68**:199–208 **(**1997).
40. **Fenton H.J.H.** Oxidation of tartaric acid in the presence of ion. J. Chem. Soc., 65, 899-910 (1894).
41. **Fenton S.** Reaction of the enzyme catalase with hydrogen peroxide consulté le10 février 2000.

42. **Freedman Bill.** Environmental Encyclopedia, Eds. Marci, Bortman., Peter, Brimblecombe. , Mary Ann, Cunningham. , William P, Cunningham. , William, Freedman, **1**:131-134 (2003).
43. **Ganesh R.** Fate of azo dye in sludges. Thèse de doctorat, Chimie, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA, 193 p (1992).
44. **Gold M.H; Alic M.** Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete. Phanerochaete chrysosporium. Microbiology Reviews 57 (1993).
45. **Goldstein Bernard D**.Encyclopedia of Public Health. Ed. Lester Breslow. New York, Macmillan Reference USA, 4:936 – 941 (2002).
46. **Guerrero F.Q ; Duarte-Vazquez M.A.**Regalado, Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase, Bioresource Technology, 99 8605–8611(2008).
47. **Hao O.J; H. Kim ET P.C. Chiang .**Decolorization of wastewater. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 30, 449505 (2000).
48. **Henriksen A; Welinder K.G; Gajhede M.** Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-A resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. Journal of Biological Chemistry 273: 2241-2248 (1998).
49. **Hernande z, R ; Zappi M ; Colucci J ; Jones R.** Comparing the performance of various advanced oxidation processes for treatment of acetone contaminated water. J. Hazard Mater., 92, 33 50 (2002).
50. **Hiraga S; Sasaki K; Ito H ; Ohashi Y ; Matsui H.** A large family of class (2001).
51. **Hirany S; Li D; Jialal I.** A more valid measurement of lowdensity lipoprotein cholesterol in diabetic patients. American Journal of Medicine 102: 48–53 (1997).
52. **Holme D.J ; Peck H.** Analytical Biochemistry, 3è éd., 1998)
53. **Hong, A; Zappi M.H; Hill D.O.**Modelling the kinetics of illuminated and dark advanced oxidation processes. ASCE J. Environ. Eng., 122, 1, 5862. Shu H.Y. et C.R. Huang (1995). Degradation of commercial azo dyes in water using ozonation and UV enhanced ozonation process. Chemosphere, 31, 3813-3825 (1996).
54. **Ince N.H; G. Tezcanli.**Reactive dyestuff degradation by combined sonolysis and ozonation. Dyes Pigments, 49, 145-153.Inorganic Biochemistry 100: 568-585 (2001).
55. **Jeng H.** Encyclopedia of Cancer and Society. Ed. Graham Colditz. , Los Angeles: Sage Publications Inc. **2**: 695-697Journal of Biochemistry **11**: 459-465 (2007).
56. **Kankare P; Sarnaik S .**Microbial process for treatment .Sci Eng Toxic Hazard Substance Control A, 31 :1035-1041 (1995).

57. **Kanner J.** Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. Meat Science 36:169-189 (1994).
58. **Karam J; Nicell J.A.**Potential applications of enzymes in wastewater treatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 69:141–153 (1997).
59. **Kennedy K; Alemany K; Warith M.** Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2, 4-dichlorophenol. Water SA 28: 149–158 (2002).
60. **Kim T.H ; Park C ; Lee J ; Shin E.B ; Kim S .**Pilot scale tretment of textile wastewater by combined processes (fluidized biofilm process-chemical coagulation – electrochemical oxidation) .Water Res. 36 ; 3979-3988 (2002).
61. **Kim Y.H ; An E.S ; Song B.K ; Kim D.S ; Chelikani R.** Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. Biotechnology Letters 25: 1521–1524 (2003).
62. **Kinsley C; Nicell J. A.** Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. Bioresource Technology 73: 139 146 (2000).
63. **Klibanov A.M; Tu T.M; Scott K.P.**Peroxidase-catalyzed oxidation of phenols from coal-conversion. Water Science 221: 259–261(1983).
64. **Koller LD.** Cadmium. Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals. p 41–61 (1998).
65. **Kond M.M; Marc T; Grassi M.T.** Dissolved organic carbon determination using FIA and photo-fenton reaction. Brazil. Arch. Biol. Technol., 45, 81- 87 (2002).
66. **Ku o W.G.** Decolorization dye wastewater with feteon's reagent. Water Res. 26, 881-886 (1992).
67. **Leskovac V.** Comprehensive Enzyme Kinetics. Kluwer Academic/Plenum(2003).
68. **Libby R .D; Thomas J.A; Kaiser L.W; Hager L .**Chloroperoxidase halogination reaction. Chemical versus enzymic halogenation intermediates .J Biol Chem 257 :5030 (1982).
69. **Lide D.R.** Hanbook of chemistry and physics. Solubility of selected gases in water. 79e Ed., Cleveland (OH), Chemical Rubber Co (1999).
70. **Liu J-Z., WangT- L, EnhancedL-N** dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41 81–86(2006).
71. **Liu J; Weiping Y; Lo T.** Copolymerization of lignin with cresol catalyzed by peroxidase in reversed micellar systems (1999).

72. **-M.M.** Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72(1-2) 248–254 (1976).
73. **Marcel L.** (Cercle Mycologique de Namur & Cercle des M.L.B.) Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay of aflatoxin Marrakech. Maroc, (3-6 mai 2004).
74. **-N. Barka ;** l'élimination des colorants de synthèse par adsorption sur un Phosphate naturel et par dégradation photocatalytique sur TiO2 supporté, thèse de Doctorat, université Ibn Zohr- Agadir, (2008).
75. **N.C. Veitch;** Molecules of interest: Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, Phytochemistry, 65:249–259 (2004).
76. **-N.J. Willmott; J.T. Guthrie; G. Nelson.** The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. JSDC, 114, 38-41 (1998).
77. **Neamtu M; Yediler A; Siminicanu I; Mac M. Kettrup A .**Decolorization of disperse red 354 azo dye in water by several oxidation processes – a comparative study. Dyes Pigment, 60, 61-68 (2004).
78. **Nicell J.A; Bewtra J.K; Biswas N ; Taylor E.** Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. Water Research 27: 1629-1639 (1993).
79. **Nicell J.A; Wright H.** A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. Enzyme and Microbial Technology 21: 302–310 (1997)
80. **Nsikak B** .Encyclopedia of Global Warming and Climate Change. Ed. S.Philander. Vol 3. Thousand Oaks. CA: Sage Publications Inc .**3** :813-817 (2008).
81. **Obinger C ; Regelsberger G ; Furtmuller P. G ; Jakopitsch C ; Ruker F.** (1999).
82. **Omura t .**Desing of cholorine –faste reactive dyes –parte 4.Degradation of amino contining azo dyes by soduim hydrochlorite Dyes Pigments 26 : 33-38 .Oxygen species. Analytical Biochemistry **366**: 29-36 (1994).
83. **Pagga, U; Taeger, K.**Devlopment of a methode for adsorption of dyestuffs on activated sludge. Par procédé électrochimique d'oxydation avancée "Electro-Fenton". Application à la minéralisation des colorants synthétiques, Thèse de Doctorat, Université de Marne-La- Vallée, 28(5) ,105-1057 (1994).
84. **Park Chris.** A Dictionary of Environment and Conservation: water pollution. Oxford University Press, Oxford Reference Online (2007).

85. **Penel C ; Valério L ; Passardi F ; Dobias J ; Perez M ; Dunand C**. Aspects moléculaires, biochimiques et physiologiques des peroxydases des plantes (2004).
86. **Poulos T.L; Edwards S.L; Wariishi H. ; Gold M.H.** Crystallographic refinement of lignin peroxidise at 2 A. Journal of Biological Chemistry 268:Publishers, New York (1993).
87. **Poulsen A.K; Scharff-Poulsen A.M; Olsen L.F**. Horseradish peroxidase, (2007).
88. **Poulsen A.K; Scharff-Poulsen A.M.; Olsen L.F.** Horseradish peroxidase (2007).
89. **Rafii F; Hall J.D; Cernigalia C.E.** Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics, before and after reduction by Clostridium species from the human intestinal tract. Food Chem. Toxicol., 35, 897-901 (1997).
90. **Raghavachar ya C.** Colour removal from industrial effluents – a comparative review of available technologies. Chem. Eng. World, 32, 53-54 (1997).
91. **Ragland B.D ; Konrad R.J ; Chaffin C ; Robinson C.A. Et Hardy R.W.** (2000).
92. **Ramakrishna N; Lacey J; Candish A.A.G; Smith J.E.Et Goodbrand I.A.** (1990).
93. **Rannou P ; Gawlicka A ; Berner D. ; Pron A. Et Nechtsschein M.** (1998).
94. **Rao M.B; Tanksale A.M; Ghatge M.S; Deshpande V.V.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**; 597–635 (1998).
95. **Regalado C; Garcia-Almendárez B.E.** (2004).
96. **Rehn L.** Blasengeschwulste bei Fuschin arbeiten. Arch. Klin Chir., 50, 588 (1895).
97. **Riba J.P .**Récteurs enzymatiques et fermenteurs .Techniques de l'ingénieur, traité de génie de procédés, F3600-1.Risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France. Rapport ORS, 220p.
98. **Robins on T; McMullan G; Marchant R ET Nigam P** .Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresour. Technol., 77, 247-255 (2001).
99. **Rotticci, D; Norin, T; Hult, K;** "Mass transport limitations reduce the effective stereospecificity in enzyme- catalyzed kinetic resolution", Org. Lett., vol. 1373- 1376 (2000).
100. **Ruiz-Dueñas F.J ; Camarero S ; Perez-Boada M ; Martinez M.**J.
101. **S.E. Manahan.** Environmental chemistry, 6e Ed, U.S.A.: Lewis publisher (1994).
102. **Sani, R; Banerjee, U .C** .Decolorization of triphenylmethene dyes and textile and dye-stuff effluent by kurthia sp .enzyme and microbial Tech; 24,433-437 (1999).
103. **Sine J.P.** (2010). Enzymologie et application. Ellipses, Paris (2010).

104. **Sine J.P.** Enzymologie et application. Ellipses, Paris (2010).

105. **Singh R.L ; Singh P.K ; Singh R.P. ; L. Pereira, M. Alves; S.N. Singh, S. Mishra, N. Jauhari**. (2015).

106. **Slokar Y.M. ET A.M**. Le Marechal .Methods of decoloration of textile wastwaters. Dyes Pigments, 37,335-356 (1998).

107. **Smulevich G; Jakopitsch C; Droghetti E ; Obinger C.** Probing the structure and bifunctionality of Catalase-peroxidase (KatG) (2006).

108. **Solozhen ko E.G; Soboleva N.M; Goncharu k V.V** .Decolorization of azo dye solutions by Fenton's oxidation. Water Res., 29, 2206-2210 (1995).

109. **Stanisavljević M; Nedić L.** Removal of phenol from industrial wastewaters by horseradish (cochlearia armoracia l) peroxidase. Working and Living (2004).

110. **Szpyrkowic z L; Juzzolin C; Kaul S.N**. A comparative study on oxidation of disperses dyes by electrochemical process, ozone, and hydrochlorite and Fenton reagent. Water Res., 35, 2129-2136 (2001).

111. **Ngo T.T...**Bioanalytical applications of immobilized enzymes. International (1980).

112. **Taylor J.S; E.P. Jac.** Water treatment membrane processes. McGRAW HILL (Éditeur), New- York, NY, 238 p (1996).

113. **Tinoco ; Sauer ; Wang ; Puglisi,** Physical Chemistry: Principles & Applications In Biological Sciences, 4e éd (2002).

114. **Tischer Wet Wedekind F**: (Immobilised enzymes: methods and application); Topics in current Chemistry; 209:95-126 (1999).

115. **Tournier M ; Servant M .**Les équilibres et cinétique chimiques, Centre éducatif et culturel inc., Montréal, p.192.Transactions 29: 116-122.Trends Biochemical Sciences, 33(9): 420–425 (1983).

116. **Tzit zi M; Vaye D.V; Lyberat G** .Pretreatment of textile industry wastewaters with ozone. Water Sci. Technol., 28, 151-160 (1994).

117. **U. Pagga, D. brown,** the degradation of dyestuffs part II: behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. Chemosphere, 15, 4, 479-491, (1986).

118. **Van der Bruggen B; L. Lej L; Vandecasteelen C.** Reuse, treatment and discharge of the concentrate of pressure-driven membrane processes. Environ. Sci. Technol., 37, 3733-3738 (2003).

119. **Vencelan, M.C; Tom, S; Simon. J.J.** Characterization of textile wastwater –a review, Environ Technol; 15, 929 (1994).

120. **Vendevivere P.C; R. Bianchi; W. Verstraete .**Treatement and creuse from the textile wetprocessing industry: review of emerging technologies. J.Chem. Technol. Biotechnol., 72, 289-302 (1998).

121. **Voet D ; J. G. Voet.** Biochimie, De Boeck Université, Bruxelles (1998).

122. **Wagner M; Nicell J.A.** Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. Water Research 36: 4041– 4052 (2002).

123. **Wagner M; Nicell J.A.** Treatment of a foul condensate from Kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. Water Research (2001b).

124. **Wagner M; Nicell J.A.** Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater, Water Science and Technology. 43: 253–260 (2001a).

125. **Wang J ; B. Guo ; Zhang X ; Zhang Z ; Han J et J. Wu.** Sonocatalytic degradation of methyl orange in the presence of TiO2 catalysts and catalytic activity comparison of rutile and anatase. Ultrason. Sonochem., 12, 331–337 (2005).

126. **Weber E.** (Kinetics studies of aromatic azo compounds in anaérobie sediment /Water systems Environ Toxicol .Chem, 6, 911-920 (1987).

127. **Welham A.** The theory of dyeing (and the secret of life). J. Soc. Dyers Colour, Vol 116, p140-143 (2000).

128. **Welinder K.G.** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Current Opinion in Structural Biology 2: 388-393 (1992).

129. **Wright H; Nicell J.A.**Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. Bioresource Technology 70: 69–79 (1999).

130. **Xialing C; Lin M.** Horseradish peroxidase catalyzed free radical cannot free move in reaction solution. Journal of Biochemical Technology 1:92-95York. 507page (2009).

131. **Zaborsky O.R**.Immobilized enzymes. 175 p., bibl. (482 réf.). Chemical Rubber Co (1974).

132. **Zawlotski G V.** Traitement des polluants organiques en milieu aqueux(2004).

133. **Zawlotzki G.** Traitement des polluants organiques en milieu aqueux par procédé électrichimique d'oxydation avancée, electro-fenton, application à la minéralisation des colorants synthétiques, thèse de Doctorat, Université de Marne- La- Vallée, (2004).

134. **Zhang F; Yeldiler A; Liang X; Kettrup A.** Effects of dye additives on the ozonation process and oxidation by-products: a comparative study using hydroxylzed C.I. Reactive Red 120. Dyes Pigments, 60, 1-7.1475p.220.35: 485–495.4429-4440.605. 622. Analytical Chemists 73: 71–76.And William Freedman. Vol 2. 3rd ed Farmington Hills. MI: Gale. **2** :1480-1482 (2004).

135. **Zollinger H.** Colour chemistry-synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. VCH Publishers Inc., New York, NY, USA (1987).