République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia Fares de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Laboratoire de Biomatériaux et Phénomènes de Transport

Mémoire de Master

Etudié par : Nadjia SOUALHI & Halima YAHIAOUI

Licences en Bioprocédés: Université Y. F., Médéa.

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème

CONTRIBUTION A LA BIODEGRADATION DU 2-NITROPHENOL PAR LA PEROXYDASE IMMOBILISEE

Dirigé par :

Mr. Ahmed AZIZI	Maitre Assistant (A), UATL	**Rapporteur de mémoire**
Mr. Fouad ZOUAMBIA	Ingénieur D'état, Saidal	**Co-Raporteur de mémoire**

Année universitaire 2014-2015

Remerciements :

Allah merci pour avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

On tient tout d'abord à remercier notre promoteur Monsieur ***Azizi Ahmed****. On l'adresse nos gratitudes pour l'attention, l'encouragement, les conseils, la patience et la gentillesse dont il a fait tout au long de notre travail.*

On exprime notre profonde reconnaissance à Monsieur ***Abousaoud .M,*** *Monsieur* ***Zouambia Fouad****, pour avoir accepté de répondre à nos questions, ainsi que pour ses précieux conseils, sa gentillesse et sourire. Aussi pour le soutien qu'il nous a accordé durant ce travail, pour la pertinence de ses remarques qui nous ont permis de progresser. On vous remercie.*

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres du jury : Mr Abousaoud.M, Madame Yahoume, d'avoir accepté de juger ce travail de recherche.

On voudrait également remercier Othman, madame Bakhti pour leurs encouragements et pour leur sympathie. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus chaleureux.

Enfin, nous remercions très vivement ***nos parents*** *et* ***toutes nos familles*** *pour le soutien moral qui nous ont toujours apporté.*





Dédicace

A l'aide de dieu j'ai pu réaliser

ce travail que je dédie :

A mes parents,

A mes frères,

Aa mes sœurs,

A mes amis,

A toute la promotion bioprocédés

pharmaceutique.

Nadjia



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mon père qui me fait toujours le courage mes études que ALLAH le garde dans sa vaste paradis.

À la ma très chère Mère

À mes chers frères.

À mes très chères sœurs.

À touts les étudiants de Bioprocédés Promotion 2014/2015

إسهام في الإزالة البيولوجية لـ2-نيتروفينول بواسطة إنزيم البيروكسيداز المثبت

الملخص

تختبر هذه الدراسة إمكانية استعمال أنزيم البيروكسيداز في التحويل الحيوي ل2-نترو فينول. حيث تم تقييم بعض العوامل مثل :درجة الحموضة، تركيز H_2O_2، تركيز2-نيتروفينول، من اجل تحديد الشروط المثالية لعمل البيروكسيداز .

كان مردود إزالة 2-نترو فينول المتحصل عليه 55.65 % في ظرف 165دقيقة بواسطة البيروكسيداز.

الكلمات الدالة: البيروكسيداز، 2-نيتروفينول ، إزالة 2-نيتروفينول

CONTRIBUTION A LA BIODEGRADATION DU 2-NITROPHENOL PAR LA PEROXYDASE IMMOBILISEE

RESUME

Cette étude vérifie la faisabilité de l'utilisation de l'enzyme peroxydase du navet blanc dans la biodégradation de 2-nitrophénol en solution aqueuse. Les effets de certains facteurs comme le pH, la concentration d'H2O2, de 2-nitrophénol et de l'enzyme ont été évalués afin de déterminer les conditions optimales pour la performance de la peroxydase.

Un rendement de 55.65% était atteint pour la dégradation de 2-nitrophénol pendant 165 min avec la peroxydase immobilisée.

MOTS CLES : Peroxydase ; 2-Nitrophénol; Biodégradation.

CONTRIBUTION TO THE BIODEGRADATION OF 2-NITROPHENOL BY ENTRAPED PEROXIDASE

ABSTRACT

This study tested the feasibility of using the enzyme horseradish peroxidase in the biodegradation of 2-nitrophenol in aqueous solution. The effects of some factors such as pH, concentration of H_2O_2, 2-nitrophenol and the enzyme were evaluated to determine the optimum condition for the performance of the peroxidase.

A yield of 55.65% was achieved for the degradation of nitrophenol for 165 min with peroxidase.

KEY WORDS: Peroxidase; 2-Nitrophenol; Biodegradation.

TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS, NOMENCLATURES ET INDICES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GÉNÉRALE ……...01

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les nitrophénols…….03
I.1.1 Généralités…….....03
I.1.2. Pollution par les nitrophénol……05
I.1.2.1. Le milieu aquatique……...05
I.1.2.2. L'atmosphére…….....05
I.1.2.3. Les sols……..05
I.2. Le 2-nitrophénol……...…...06
I.2.1. Composition et information…….……06
I.2.2. Propriétés physiques et chimiques…….……..06
I.2.3. Données sur la réactivité……..……06
I.2.4. Informations sur les effets toxicologiques……..……..……07
I.2.5. Informations écologiques 07
I.2.6. Propriétés toxicologiques chez l'homme.....07
I.2.7. Normes.....09
I.3. Méthodes de traitement des nitrophénols …….....10
I.3.1 Les techniques destructives……..……..……...10
I.3.1.1 Les réactions d'oxydation...……..…….....10
I.3.1.2 Les réactions photocatalytique…….....11
I.3.1.3 Le traitement biologique……13
I.3.2.2 L'extraction liquide-liquide……...16
I.3.2.3 La séparation par membranes……16
I.4. Traitement enzymatique……..19
I.4.1. Généralités sur les enzymes.....19

I.4.2. Peroxydases……..19
I.4.2.1. Définition et constitution de la peroxydase.....19
I.4.2.2. Famille des peroxydases.....20
I.4.2.3. Mode d'action de la peroxydase.....20
I.5. Technique d'immobilisation des enzymes.....21
I.5.1. Immobilisation par inclusion (encapsulation).....22
I.5.2. Immobilisation par adserption.....23
I.5.3. Immobilisation par liaison covalente.....23
I.5.4. Immobilisation par réticulation.....24
I.5.5. Choix de la méthode d'immobilisation.....25
I.5.6. L'immobilisation par inclusion des enzymes dans l'alginate 26
I.5.6.1.Définition de l'encapsulation des enzymes.....26
I.5.6.2. procédé d'encapsulation dans l'alginate.....26
I.5.6.3. L'alginate.....27
I.5.6.3.1.Origine.....27
I.5.6.3.2. Structure L'alginate.....27
I.5.6.3.4. Propriétés des alginates.....28
I.5.6.4. Avantage de la méthode d'immobilisation des enzymes.....30
I.5.6.5 Inconvénients de la méthode des enzymes par encapsulation.....31

PARTIE EXPIRIMENTAL

CHAPITRE II : MATERIEL ET Méthodes

II.1 Matériels ……..…….…….…….…….....32
II.1.1 Equipements …..…….…….…….....32
II.2 Produits chimiques utilisés…..…..…….32
II.2.1 Substrats …….……..……..33
II.3 Méthodes ……..…….34
II.3.1 La courbe d'étalonnage de 2-nitrophénol……..…….....34
II.3.2 Extraction et purification de peroxydas de navet blanc …..……...34
II.3.3 Méthode de mesure de l'activité enzymatique de (EEB et EEPP)……..……...37
II.3.4 Méthode d'encapsulation d'enzyme de la peroxydase par l'alginate de calcium…….37
II.3.5 Méthode de dosage des protéines totales par la méthode de Bradford (mg/l)……38
II.3.6 Optimisation du paramètre physico-chimique de la biodégradation du 2-Nitrophénol par la

peroxydase immobilisée…..…….…….....39
II.3.6.1 Effet du pH……..…….……..……..40
II.3.6.2 Effet de concentration du
H_2O_2……...42 II.3.6.3 suivi
de l'activité d'enzyme total …….....43
II.3.6.4 Détermination de l'effet de concentration du 2-Nitrophénol……...…43
II.3.6.5 Suivi de la biodégradation dans les conditions optimales……44
II.3.7 Réutilisation de l'enzyme encapsulé…….…..…44

CHAPITRE III : RÉSULTATE ET DISCUSSION

III.1. Courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol …….....45
III.2. Mesure de l'activité enzymatique de (EEB et EEPP) …….....…..……..46
III.3. Dosage des protéines total par la méthode de bradford (mg/l) de (EEB et EEPP….....46
III.4. Suivi des paramètres opératoires en fonction du rendement et la vitesse de biodégradation du 2-Nitrophénol ……...…….……...……...47
III.4.1. Suivi du PH ……..……..…….47
III.4.2. Suivi de la concentration du H_2O_2 ……..…..……...….48
III.4.3. Effet de l'activité enzymatique totale……...……...51
III.4.4. Suivi de la concentration du 2-Nitrophénol……..…..……..……53
III.4.5. Suivi de la biodégradation dans les conditions optimales ….....……...56
III.4.6. Réutilisation de l'enzyme encapsulé ……..…..……56
CONCLUSION GÉNÉRALE……..58
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES……...59
ANNEXE

LISTES D'ABREVIATION, NOMENCLATURES ET SYMBOLES

LISTE D'ABREVIATION

Abréviation	**Signification**
4-AAP	4- Aminoantipyrine
DO	Densité Optique
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
IARC	International Agency for research on cancer
NOEC	No observed effect concentration
UV	Rayonnement Ultraviolet

LISTE DE NOMENCLATURES ET SYMBOLES

Lecture	**Désignation**	**Unité**
AE	Activité Enzymatique	*(UI/ml)*
AS	Activité Spécifique	*(UI/mg)*
E	Enzyme	*(-)*
R	Rendement de dégradation	*(%)*
R^2	Coefficient de corrélation	*(-)*
S	Substrat	*(-)*
T	Température	*(°C)*
V	Vitesse	*(UI/l)*
λ	Longueur d'onde	*(nm)*
ζ	Coefficient d'extinction molaire	*(L/ mol)*
Km	Constante de Michaelis–Menten	*(unité de concentration)*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1| Les nitrophénols les plus communs; leurs utilisations et leurs origines	1
Tableau I.2| données sur la réactivité	6
Tableau I.3| effets toxicologiques du nitrophénol	7
Tableau I.4| Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation	25
Tableau II.1| liste des équipements chimiques utilisés dans cette étude	32
Tableau II.2| liste des produits chimiques utilisés dans cette étude	33
Tableau II.3| Valeurs des conditions opératoire à utiliser	39
Tableau III.1| Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la peroxydase	46
Tableau III.2| les différentes activités trouvées	50
Tableau III.3| Conditions optimales de la biodégradation du 2-Nitrophénol par la peroxydase immobilisée	56

LISTE DES FIGURES

Figure I.1| Schéma de principe de l'ultrafiltration micellaire.	15
Figure I.2| Structure de l'hémine peroxydase.	18
Figure I.3| Concept clé-serrure proposé par Emil-FISCHER.	19
Figure I.4| Notion de micro- et de macroenvironnement.	20
Figure I.5| Méthodes d'immobilisation.	22
Figure I.6| Structure d'une bille d'alginate.	25
Figure I.7| Représentation de l' Acide β-D-mannuronique Et l' Acide α-L-guluronique.	26
Figure I.8| Structure chimique des Alginates.	27
Figure II.1| Structure du 2-nitrophénol	34
Figure II.2| Navet	35
Figure II.3| Le protocole d'extraction et de purification de la peroxydase.	36
Figure II.4| Immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium.	38
Figure III.1| Courbe d'étalonnage du 2-nitrophénol.	44
Figure III.2| La courbe des DO d'EEB et d'EEPP en fonction Du temps.	45
Figure III.3| Influence du pH du milieu sur le taux d'abattement du nitrophénol.	46
Figure III.4| Influence de la concentration du peroxyde d'hydrogène sur le taux d'abattement du nitrophénol.	47
Figure III.5| Évolution temporelle de la concentration du 2-nitrophénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel.	48

Figure III.6| Représentation graphique Lineweaver-Burk.	49
Figure III.7| Influence de l'activité enzymatique total sur le taux d'abattement du nitrophénol.	50
Figure III.8| Évolution temporelle de la vitesse de biodégradation du 2-nitrophénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel.	50
Figure III.9| Évolution temporelle du rendement de biodégradation du nitrophénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel.	51
Figure III.10| Effet de la concentration initial du nitrophénol sur la vitesse initial et le rendement de biodégradation du 2-nitrophénol.	51
Figure III.11| Représentation graphique Lineweaver-Burk.	53
Figure III.12| Cinétiques de disparition du nitrophénol par la peroxydase encapsulées dans les conditions optimale.	54
Figure III.13| Réutilisation de l'enzyme encapsulé.	54

INTRODUCTION GENERALE

Les composés aromatiques, y compris le nitrophénol, sont parmi les polluants organiques les plus communs dans les effluents provenant des industries du papier, du plastique, du pétrole, des teintures, de résine et du bois. Le nitrophénol est considéré comme un composé toxique, ce qui nécessite le développement d'une technologie efficace pour l'éliminer à partir des eaux usées *(Seetharam, Saville. 2003)*.

Pour cela, diverses méthodes ont été élaborées telles que l'extraction par solvant, la dégradation microbienne, l'adsorption sur charbon actif et l'oxydation chimique. Les méthodes d'extraction sont incomplètes et onéreuses, alors que les traitements par adsorption et d'oxydation sont extrêmement coûteuses pour de faibles concentrations de l'effluent. Les traitements microbiologiques sont alternatifs à ces procédés de traitement mais qui ont aussi leurs limites (instabilité, inhibition…) *(Seetharam, Saville. 2003)*.

Le traitement des eaux usées par les enzymes est une alternative aux méthodes traditionnelles. L'application des enzymes, tels que les peroxydases, la laccase et la tyrosinase pour l'élimination des phénols des eaux usées, a un certain nombre d'avantages par rapport aux traitements biologiques classiques dont : la capacité à traiter une large gamme de concentration de contaminants, de pH, de température, des vitesses de réaction élevées, et une haute spécificité des enzymes pour leur substrats *(Karam; Nicell. 1997).*

Le 2-Nitrophénol en est un exemple. Il pénètre dans l'environnement par les eaux usées et les eaux agricoles. De plus il est soluble, stable dans l'eau donc il peut affecter les sols. Il a un effet nuisible sur la santé publique; il est mutagène et cancérigène et il s'accumule dans la chaine alimentaire. *(Karam; Nicell. 1997).*

Dans la recherche de nouvelles méthodes d'élimination ou de transformation de ces polluants, le traitement enzymatique semblerait être une méthode de choix. La peroxydase est la plus utilisée dans le traitement des effluents toxiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre contribution. Il s'agit d'étudier la cinétique d'élimination du 2-Nitrophénol par la peroxydase immobilisée en étudiant l'effet des différents paramètres sur la dégradation de notre produits toxique (Activité enzymatique, PH, [H_2O_2], [2-Nitrophénol]) pour atteindre le rendement le plus élevé et de déterminer les constantes cinétiques (K_m, V_{max}) dans les conditions optimales.

Pour ce faire, nous avons divisé ce travail en trois chapitres. Le premier est consacré à une synthèse bibliographique sur les nitrophénols et leurs méthodes de traitement. Nous présentons dans le deuxième les matériels et les méthodes. Le troisième chapitre sera dévoué à la discussion des différentes résultats trouvés après les différentes expériences :

- Extraction et purification de la peroxydase du navet, encapsulation de la peroxydase par l'alginate de sodium.
- Détermination du PH optimale pour l'obtention d'un rendement élevé.
- Optimisation de la concentration du premier substrat : H_2O_2.
- Optimisation de l'activité enzymatique de la peroxydase.
- Optimisation de la concentration du deuxième substrat : 2-Nitrophénol
- Suivi de dégradation du 2-nitrophénol dans les conditions optimales
- Réutilisation des billes encapsulées dans l'alginate

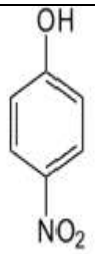
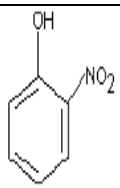
CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

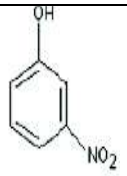
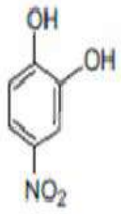
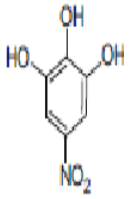
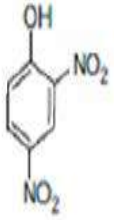
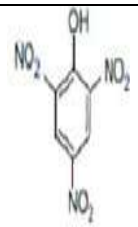
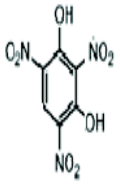
I.1. Les nitrophénols

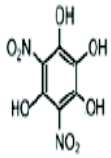
I.1.1. Généralités

Quelques exemples des nitrophénols monocycliques : le tableau I-1 représente les nitrophénols les plus utilisés.

Tableau I.1| Les nitrophénols les plus communs; leurs utilisations et leurs origines

Noms des composés	Formule brute	Structure chimique	Origines, Caractéristiques et Utilisations	Références
para-nitrophénol (4-Nitrophénol)	$C_6H_5NO_3$		-Il rentre dans la fabrication des herbicides, fongicides, insecticides, matières explosives, teintures. -Résulte aussi de la dégradation des produits pharmaceutiques et des résines.	*(Sehi et al.2010)*
Orthonitrophénol (2-Nitrophénol)	$C_6H_5NO_3$		-Il rentre dans la synthèse des colorants, des produits photochimiques, des pesticides, des préservatifs de bois, des explosifs et des traitements de cuir.	*(Aktaş, çeçen.2010)*

Métanitrophénol (3-Nitrophénol)	$C_6H_5NO_3$		-Résulte de la dégradation biologique des composés nitroaromatiques.	*(Kulkarni, et al. 2007)*
p-Nitrocatechol 4-Nitrocatechol	$C_6H_5NO_4$		-Produit secondaire de la dégradation des nitrophénols et principalement du p-NP.	*(Zhou et al. 2007)*
5-nitropyrogallol	$C_6H_5NO_5$		-Produit intermédiaire de la dégradation des nitrophénols.	*(Zhou et .2007)*
2,4-dinitrophénol (2,4-DNP)	$C_6H_4N_2O_5$		-Rentre dans la fabrication des pesticides et des teintures. -Le plus dangereux et le plus toxique par rapport aux autres nitrophénols. -Sa teneur permise dans l'eau est de l'ordre de quelques µg/L.	*(Albinet et al.2010, Hirooka et al.2006)*
2,4,6-trinitrophénol (acide picrique)	$C_6H_3N_3O_7$		-Produit intermédiaire de la dégradation des nitrophénols.	*(Paul et al.1991)*
2,4,6-trinitroresorcinol (acide styphnique)	$C_6H_3N_3O_8$		-Produit intermédiaire de la dégradation des nitrophénols.	*(Furniss et al 1978)*

1,2,3,4-tetrahydroxy-4,6-dinitrobenzène	$C_6H_4N_2O_8$		-Résulte de la dégradation du 4,6-odinitrocresol (DNOC).	*(Ye et al) 2009.*

I.1.2. Pollutions par les nitrophénol

Les dérivés phénoliques même décomposés suite à leur dégradation, constituent une source de pollution diffuse touchant l'environnement dans son ensemble. *(Tay et al. 2006)*.

I.1.2.1. Le milieu aquatique

Les dérivés phénoliques sont plus lourds que l'eau et tendent à se déposer. Il se dissolvent lentement et, même dilués, ils continuent à former des solutions toxiques. *(Tay et al. 2006)*.

I.1.2.2. L'atmosphère

Un fort échauffement entraîne la formation de mélanges explosifs qui, étant plus lourds que l'air, rampent à la surface du sol. Pour cette raison, les dérives phénoliques ne peuvent migrer vers les couches supérieures de l'atmosphère et sont généralement lessivés par les précipitations. Ceci peut entraîner une pollution des eaux souterraines à proximité de sources importantes d'émissions. La plupart des dérivés du phénol font l'objet d'une dégradation photochimique. *(Tay et al. 2006)*.

I.1.2.3. Les sols

Dans le sol, les dérivés phénoliques subissent une dégradation microbienne aérobie ou anaérobie, de sorte que l'effet d'accumulation reste limité, ce qui favorise davantage leur diffusion et la pollution en profondeur. Cependant, leur accumulation est possible dans certains sols riches en minéraux argileux, car ils ont une forte affinité pour l'oxyde d'aluminium. *(Tay et al. 2006)*.

I.2. Le 2-nitrophénol

I.2.1. Composition et information *(Tay et al. 2006)*.

- Nom du produit : 2-Nitrophénol
- Synonymes : 2-Nitrophénol, 2-Hydroxynitrobenzène
- Masse molaire : 139.11 g/mol
- Formule : $C_6H_5NO_3$

I.2.2. Propriétés physiques et chimiques *(Tay et al. 2006)*.

- État physique : Solide
- Aspect : poudre ou cristaux jaunes pâles.
- Odeur : aromatique
- Point de fusion/point de congélation : 44 °C
- Point d'ébullition : 214 °C
- Point d'éclair : 102 °C CC (test en vase clos Closed Cup)
- Densité 1.26 g/cm3
- Pression de vapeur : 1,3 hPa à 49,3 °C
- Volatilité : 0% à 21°C

I.2.3. Données sur la réactivité *(Tay et al. 2006)*.

Tableau I.2| données sur la réactivité

Stabilité	Stable. Conditions à éviter: Températures élevées, étincelles, flammes nues et toute autre source d'allumage , contamination.
Incompatibilité	Agents oxydants, acides, bases, agents réducteurs, métaux alcalins. Réagit violemment avec: hydroxyde de potassium, acide chlorodulfurique.
Produits de réaction	Peut exploser lorsque chauffé. Le produit est non polymérisable.

I.2.4. Informations sur les effets toxicologiques *(Tay et al. 2006)*.

- Cancérogénicité IARC: Aucun composant de ce produit présent à des concentrations plus grandes que ou égales à 0,1% n'a été identifié comme cancérogène probable, possible ou reconnu pour l'homme par IARC.
- Valeurs de toxicité des ingrédients dangereux : ORALE: Aiguë: 334 mg/kg (Rat). 1297 mg/kg (Souris). CUTANÉE : Aiguë: >7940 mg/kg (Lapin).

I.2.5. Information écologiques *(Tay et al. 2006)*.

- Toxicité pour le poisson NOEC (Cyprinodon variegatus) : 24 mg/l - 96,0 h, Pimephales promelas (Vairon à grosse tête) : 160 mg/l - 96,0 h
- Toxicité pour la daphnie et les autres invertébrés aquatiques CE50 (Daphnia magna) : 17 mg/l - 48 h .

I.2.6. Propriétés toxicologiques chez l'homme *(Tay et al. 2006)*.

Voies d'absorption :

- Ingestion et inhalation.
- Contact avec les yeux.
- Contact avec la peau.
- Absorption par la peau.

Tableau I.3| effets toxicologiques du 2-nitrophénol

Effets d'une exposition aigue	- Nocif par inhalation, contact avec la peau et par ingestion. - Peut être fatal. Irritant. - Un contact prolongé peut provoquer des brûlures sévère. - Effets aigüs possibles à retardement. - Organes-cibles: sang, système nerveux central, yeux, peau.

Oculaire	- Un contact peut provoquer une irritation sévère ou des brûlures. - Peut causer des dommages permanents. La quantité de tissus endommagés dépend de la durée du contact.
Cutané	- Provoque une irritation sévère ou des graves brûlures. - La quantité de tissus endommagés dépend de la durée du contact. - Un contact prolongé ou un contact sur une grande surface de la peau peut conduire à l'absorption d'une dose potentiellement nocive de produit. Voir ingestion.
Inhalation	- Matériel irritant ou destructif pour les membranes muqueuses et les voies respiratoires. Voir ingestion.
Ingestion	- Très toxique - Provoque une irritation gastro-intestinale. - Peut causer: nausée, vomissement, étourdissements, incoordination, hypotension, convulsions, anémie, et mort possible. - Effets aigüs possibles à retardement. - La surexposition par l'inhalation, l'absorption cutanée ou l'ingestion cause la cyanose due à la formation de la méthémoglobine. - On peut observer une coloration bleutée de la peau, des lèvres, des doigts ou des lobes des oreilles. Avec un accroissement de la déficience en oxygène, les symptômes progressent du mal de tête, à l'assoupissement, la faiblesse, la dyspnée, et dans des cas extrêmes, l'inconscience.

Effets chroniques d'une surexposition	- Le contact répété ou prolongé peut causer une dermatite. Peut causer une dépression du système nerveux central. Peut provoquer des dommages aux reins et au foie. Effets cancérogènes: Non disponible. Effets mutagènes: Non disponible. - Effets tératogènes: Non disponible. Toxicité de ce produit pour le système reproducteur: Non disponible. Au meilleur de nos connaissances, la chimie, la physique, et la toxicité de cette substance n'est pas parfaitement connue.

I.2.7. Normes de rejet de 2-nitrophénol

Les phénols (nitrophénols, phénol, chloronitrophénol…) sont considérés comme des polluants à traiter en priorité à cause de leurs toxicités avérées même à faibles concentrations. A cause de cette toxicité différents phénols ont été classés comme polluants prioritaires par US EPA (United States of Environnemental protection Agency) *(Buscet al 2008, Namane. 2006)*.

De même que l'union européenne a limité la concentration maximale tolérée pour les eaux de consommation à 0,5 µg.L^{-1} (0,5 ppb). (Décret exécutif N0 89-3 du 03/01/89) *(Busc et al.2008 ,Namane. 2006, Les normes européennes. C.I.eau. www.cieau(2005).com*.

L'agence de protection de l'environnement à établie une norme de purification de l'eau de moins de une partie par billion (1 ppb) de phénols dans les eaux de surface *(Busc et al 1978, Romanovskaya et al 2009)*, tandis que les limites des phénols pour les émissions des eaux usées sont de 0,5mg.L^{-1} (0,5 ppm) *(Buscet al.2009)*.

L'Algérie tolère une concentration maximale des phénols de 0,3 mg. L^{-1} pour les rejets industriels (Décret exécutif N0 06-141 du 19/04/2006) *(JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 26. 2006. WWW. JORADP. DZ).*

I.3. Méthodes de traitement de 2-nitrophénol

Nous allons présenter brièvement deux types de techniques :

I.3.1. Les techniques destructives

I.3.1.1. Les réactions d'oxydation.

Dans le cas de l'oxydation du phénol, on recense dans la littérature plusieurs méthodes. Nous pouvons citer, la réaction de Fenton-like *(Matta et al, 2008)*, la réaction photo-Fenton, basée sur l'utilisation simultanée de l'eau oxygénée et de rayonnements UV (H_2O_2/UV), une réaction d'ozonation, l'utilisation de rayons ultraviolets ou d'ultrasons et l'oxydation électrochimique. D'autres auteurs utilisent des faisceaux d'électrons afin d'obtenir des impulsions de taux d'oxydation élevé par génération de radicaux libres (principalement radicaux hydroxyles), pour lutter efficacement contre les polluants organiques.

Nous choisissons de décrire le Procédé Fenton classique qui aboutit à la génération de radicaux hydroxyles pour dégrader le phénol.

La réaction de Fenton (Fenton-like), a fait l'objet de nombreuses recherches au siècle dernier dans le domaine du traitement d'eau *(Kusic et al. 2006; Aguiar et Ferraz. 2007)*. Son avantage est d'utiliser un oxydant non toxique comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, qui est sous forme liquide et bon marché. La réaction a lieu en milieu homogène en présence d'un catalyseur dans le but d'améliorer le processus d'oxydation. Une étude a été réalisée par Matta *(Matta et al. 2008)* en utilisant une solution aqueuse contenant du phénol de concentration 50 mg/L en milieu neutre. Les radicaux hydroxyles HO sont générés par le processus d'oxydation Fenton qui utilise un mélange d'ions ferreux-ferrique pour catalyser la décomposition du

peroxyde d'hydrogène H_2O_2. La catalyse est réalisée en utilisant du chlorure de rouille vert synthétique à des concentrations variant de 5 g/L à 10 g/L. La disparition du phénol est observée lorsque le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 de concentration 155 mmol/L est ajouté. Environ 62% du phénol est minéralisé après 24 heures en présence de ce système. L'analyse par HPLC montre que le phénol est transformé après 1 min principalement en catéchol et en hydroquinone. Cette étude a ainsi montré que le chlorure de rouille vert favorise les réactions Fenton-like.

Les inconvénients de ce procédé sont d'une part la génération de boues ferrugineuses et d'autre part la nécessite de contrôler le pH de manière très stricte pour un bon déroulement de la réaction.

D'autre part la réaction photo-Fenton utilise des rayonnements UV, qui sont en partie absorbes par les polluants organiques de l'eau. La décomposition de H_2O_2 en deux radicaux HO se réalise alors d'une manière lente.

Enfin, le processus de traitement chimique tel que l'oxydation par l'ozone, O_3 produit souvent des sous-produits dangereux et génère de grandes quantités de déchets solides, ce qui conduit a de forts couts d'élimination ou a la mise au point de méthodes de régénération *(Venkatachalam et al. 2007; Zainudin et al. 2010).*

I.3.1.2. Les réactions photocatalytiques

La photocatalyse est une opération destructive du traitement de l'eau. Son principal objectif est d'éliminer les matières en suspension, les matières flottables, de traiter les espèces organiques biodégradables et de détruire tous organismes pathogènes.

Pour la mise en œuvre d'un procédé photocatalytique, il est indispensable d'avoir un photocatalyseur ou un semi-conducteur, une source lumineuse et un système de réacteurs.

La photocatalyse est un cas particulier de la catalyse hétérogène. Au cours des 20 dernières années, elle est devenue une méthode de plus en plus fiable. Elle est utilisée dans la réhabilitation environnementale, car elle est capable d'oxyder complètement des molécules organiques.

L'irradiation UV du dioxyde de titane, TiO_2 sur l'incidence d'un photon avec une énergie équivalente ou supérieure à l'énergie de bande du semi-conducteur de photocatalyse aboutit à la formation d'électrons (e^-) dans la bande de conduction et à des trous positifs (h^+) dans la bande de valence, ainsi qu'à la formation de radicaux HO. Les radicaux libres sont générés quand la position des trous avec des radicaux hydroxyles ou tout autre donneur d'électrons sont adsorbés à la surface du catalyseur.

La photo-dégradation est considérée comme la réduction de l'oxygène par les électrons piégés sur la surface de semi-conducteurs pour produire des espèces réduites en oxygène telles que les ions superoxydes O^{2-} qui sont de puissants oxydants. Ces radicaux hautement réactifs et libres oxydent les composés organiques comme le phénol et ses dérivés.

La plupart des systèmes photocatalytiques traitant les solutions phénolées utilisent du TiO_2 Degussa P-25 commercial en poudre qui possède une surface spécifique relativement importante (55 $m^2.g^{-1}$).

Du TiO_2 standard a néanmoins été employé. Mais il existe des problèmes qui limitent le potentiel du TiO_2 dans le traitement des eaux usées, quand il est sous forme de nano-TiO_2. Selon Haque *(Haque et al. 2005),* la principale limite réside dans la nécessité d'avoir de haute énergie UV pour alimenter la lumière.

De plus, l'irradiation directe de solutions phénolées génère beaucoup de composés organiques toxiques, comme les polychlorobiphényles dibenzo-p-dioxines.

Des oxydes de titane synthétiques possèdent une meilleure efficacité que celle de TiO_2 Degussa P-25 pour la photodégradation du phénol et de ses dérivés.

I.3.1.3. Le traitement biologique

Le traitement biologique des eaux usées utilise de la matière vivante telle que des microorganismes qui existent naturellement dans le milieu, des cellules animales et végétales. Il existe deux types de traitement. Le premier consiste à dégrader les résidus organiques en milieu aérobie, en libérant du gaz carbonique. Le deuxième, en milieu anaérobie conduit à une fermentation, libérant ainsi du gaz carbonique et du méthane.

Lors de la dégradation aérobie du phénol, l'oxygène moléculaire hautement réactif est utilisé pour l'attaque initiale du noyau aromatique.

Plusieurs espèces de bactéries sont connues pour dégrader les phénols. Ce sont *Alcaligenes* sp et *Acromobacter* sp, *Rhodococcus* sp, *erythropolis Rhodococcus*, *Acinetobacter* sp, *Candida tropicalis* et *Candida maltosa*, *Pseudomonas putida*, *thermoleovorans Bacillus*, et des champignons tels que *Fusarium* sp, *Aspergilius* sp, *Penicillium* sp et *Graphium* sp 1 *(Tziotzios et al.2007).*

La dégradation aérobie du phénol par des micro-organismes est principalement basée sur *l'ortho*- et la *méta*-oxydation. Au cours de la première étape de la dégradation du phénol, l'oxygène moléculaire est utilisé par l'enzyme hydroxylase du phénol pour ajouter un deuxième groupe hydroxyle dans la position *ortho*- à celle déjà présente pour produire du catéchol qui peut ensuite être dégradé soit par *l'ortho*- ou la *meta*-oxydation. La plupart de ces études implique des espèces microbiennes qui sont déjà présentes sur le terrain.

L'utilisation de boues activées apparaît comme une solution plus attrayante en raison de ses divers avantages. Ce procédé consiste essentiellement en un traitement aérobie qui oxyde les matières organiques et autres contaminants des eaux usées en dioxyde de carbone, eau et biomasse. L'air est fourni par l'aération par diffusion ou mécanique et les cellules microbiennes forment des boues activées qui sont traitées dans un clarificateur secondaire. Plusieurs types de réacteur existent : les réacteurs de type films suspendus, lit fixe, lit panier. Des problèmes apparaissent lors du traitement de solutions phénolées ayant un taux élevé de charge organique. Le SBR est un réacteur biologique séquentiel. Des études montrent que l'utilisation du SBR pour l'élimination du phénol convient pour des taux de charge modérée. Une étude avec des solutions de phénol, ayant une concentration initiale égale à 120 mg/L, montre qu'un réacteur discontinu séquentiel SBR ensemencé avec une culture de halophile permet d'éliminer 99,5% de phénol. En effet, pour des charges élevées en phénol, les systèmes SBR classiques ont une faible efficacité et conduisent à des problèmes opérationnels, tels que la production de boues en excès.

D'autres études sur la dégradation des phénols ont été réalisées dans des conditions différentes, en utilisant un mélange de cultures. Elles ont montré que ces cultures accéléraient la dégradation du phénol.

Le traitement biologique présente un inconvénient :

- ✓ il n'est souvent pas adapte pour le traitement des eaux usées phénoliques car les phénols présente des effets phyto-toxiques sur les micro-organismes actifs
- ✓ La toxicité des phénols peut provoquer une inhibition des processus de dégradation, une diminution de la décantation.
- ✓ Les phénols sont hautement toxiques et ne sont pas facilement dégradés biologiquement à des concentrations supérieures à 200 mg/L.
- ✓ Les fortes concentrations des phénols dans l'effluent conduisent rapidement a l'absence de croissance des micro-organismes.

Dans le milieu anaérobie, le phénol est dégradé par des organismes méthanogènes, par des bactéries du fer et des bactéries sulfato-réductrices. La voie anaérobie la plus étudiée est une dégradation du phénol par le biais du benzoyl-CoA. L'efficacité des biodégradations anaérobies n'est pas élevée, c'est pourquoi la biodégradation du phénol en milieu aérobie est préférée *(Tay et al. 2006)*.

I.3.2. Les techniques non destructives

Ces techniques, comme l'adsorption, l'extraction et les procédés membranaires ne modifient pas la nature des espèces.

I.3.2.1. L'adsorption

Au cours de l'adsorption, des interactions entre des molécules de gaz ou de liquides (adsorbats) et une surface solide (adsorbants) ont lieu. Ces interactions permettent la fixation de l'adsorbat sur la surface solide. On distingue deux types d'adsorption : L'adsorption chimique ou chimisorption, met en jeu des énergies de liaison importantes. Elle s'accompagne d'une profonde modification de la réparation des charges électroniques des molécules

adsorbées. L'adsorption physique ou physisorption met en jeu des liaisons et des interactions faibles entre l'adsorbat et l'adsorbant.

Les argiles et les charbons actifs sont considérés comme de bons adsorbants naturels. L'apparition d'argile modifiée a permis d'améliorer l'adsorption des substances organiques contenues dans des solutions aqueuses en raison de son faible cout et d'une meilleure capacité d'adsorption .

Il existe de nombreuses argiles modifiées, telles que les MMT (montmorillonites) piliers organique-inorganique, les complexes Dye.clay *(Borisover et al. 2001)*, MMT (montmorillonites) le tétraméthyle d'ammonium et le tétraméthyle de phosphoniume, l'argile modifiée de poly-ions organiques *(Tombàcz et al. 1998).*

Les travaux menés par Huang portent sur l'étude de l'adsorption du phénol par des rectorites (REC) modifiées par des tensioactifs tels que le chlorure de dodécyle diméthyle benzyle d'ammonium, le bromure d'hexadecyle triméthyle d'ammonium et le bromure d'octadecyle triméthyle d'ammonium. Ces travaux montrent que l'adsorption du phénol contenu dans une solution aqueuse de pH 6 par ces trois adsorbants rectorites est effectuée spontanément à la température ambiante. En effet, la quantité du phénol adsorbée dépend étroitement de la quantité d'absorbant.

L'adsorption sur charbon actif, quant à elle permet une excellente adsorption du phénol. Il possède une grande capacité d'adsorption des polluants organiques, en raison d'une grande surface spécifique, d'une bonne distribution de taille des pores et d'une résistance mécanique élevée. Le charbon actif présente également l'avantage de pouvoir être brûlé ou régénéré par pyrolyse. Il existe de nombreuses études sur la préparation du charbon actif à partir de différentes sources primaires telles les déchets agricoles, les noix, les coquilles de noix et les noyaux des fruits. Lua utilise la vapeur de charbon actif afin d'adsorber les substances phénoliques présentes dans une solution aqueuse .

L'adsorption est un moyen efficace pour traiter des eaux usées contenant de faibles quantités de phénols. Elle ne pose que peu de problèmes. De plus, pour des raisons de coût du charbon actif, cette technique ne peut pas être utilisée pour traiter des eaux résiduaires ou des

rejets industriels, contenant de fortes concentrations de phénol *(Mollah et Robinson, 1996; Halhouli et al.1997; Hebatpuria et al. 1999; Banat et al.2000; Rengaraj et al.2002).*

I.3.2.2 L'extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une technique efficace qui permet la séparation et la purification de plusieurs composés chimiques .Elle est basée sur la séparation des composés en fonction de leur solubilité relative dans deux liquides non miscibles, généralement de l'eau et un solvant organique. Cette technique implique un transfert de matière à travers une phase liquide qui possède les caractéristiques d'un solvant d'extraction.

Les premières industries qui ont développé cette technique, ce sont les industries pharmaceutique et nucléaire dans les années 40-50. Dans les années 55-65, c'est au tour des industries pétrolière et pétrochimique de l'utiliser. Dans les années 60, l'extraction liquide liquide est développée en hydrométallurgie et permet de récupérer les métaux, comme l'uranium, le cuivre, le gallium··· contenus dans des solutions aqueuses.

Elle joue un rôle important dans des secteurs industriels pour la récupération du phénol. Elle présente des avantages par rapport aux autres techniques : elle permet de traiter des eaux usées ayant une concentration en phénol supérieure à 3.10^3 mg/L. Elle devient même rentable quand la concentration en phénols est supérieure à 10^4 mg/L *(Jiang et al, 2003; Li et al, 2004; Palma et al, 2007).*

I.3.2.3. La séparation par membranes

Le principe de la séparation membranaire est de mettre en œuvre des systèmes polyphasés constitués de fluide à traiter, de fluide traite et d'une membrane.

La membrane est une barrière, qui joue le rôle d'interface entre deux phases liquides. Elle permet ou bloque le transfert de certaines espèces entre les deux milieux qu'elle sépare. Son rôle est d'assurer une bonne sélectivité avec une faible résistance au transfert tout en ayant une bonne tenue mécanique.

Les procédés de séparation par membranes sont utilisés pour le traitement des eaux. Ils sont classés en fonction du type de membranes (solide, liquide ou gazeuse) et de la nature de la force motrice.

a) La séparation par ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique baro-membranaire. Elle utilise une membrane microporeuse et élimine ainsi les particules en fonction de la taille des pores. L'ultrafiltration est utilisée pour l'élimination des différents polluants organiques et inorganiques à partir de solutions aqueuses.

Des séparations non-classiques sont développées, notamment l'ultrafiltration micellaire comme indiquée sur la figure I.1. Elle est utilisée pour éliminer des polluants organiques et inorganiques contenus dans des solutions aqueuses. C'est une méthode prometteuse pour l'élimination d'ions de métaux lourds toxiques, de matières organiques, de phénol, et de matières inorganiques *(Baek et al.2003; Baek et Yang.2004).*

Le principe est simple : les monomères de tensioactifs sont introduits dans le milieu, puis les ions métalliques ou les composés organiques dissous ont tendance à se solubiliser à l'intérieur des micelles.

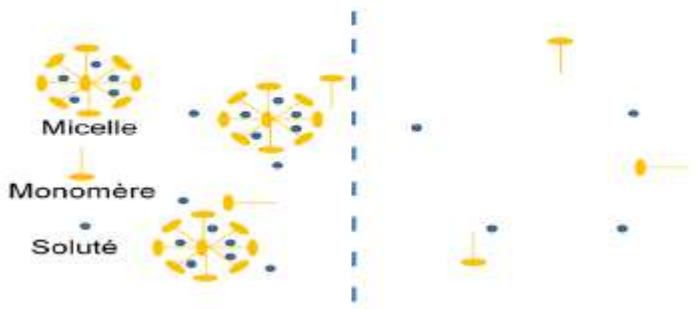


Figure I.1| Schéma de principe de l'ultrafiltration micellaire.

Ces micelles, contenant les contaminants solubilisés, sont ensuite retirées du flux d'alimentation par ultrafiltration. Cette solution traverse la membrane qui a des pores plus petits que les diamètres des micelles. La plupart des contaminants solubilisés constituent le rétentat. Le rétentat contient ainsi les contaminants solubilisés et les agents de surface en concentrations élevées par rapport à la solution d'alimentation. Ainsi le perméat contient une très faible concentration de solutés et de miscelles dissous.

Ce procédé permet d'enlever efficacement la plupart des particules, les microorganismes, et les colloïdes et de produire une eau de bonne qualité pour une consommation énergétique minimale. Son principal inconvénient est que le flux de perméat diminue au cours de l'opération en raison de l'apparition du phénomène de colmatage. Dans ce cas, l'ultrafiltration peut même être bloquée *(Korzystka et al.2003; Tansakul 2009).*

b) La pervaporation

La pervaporation est une méthode de séparation de mélanges liquides, qui utilise une différence de potentiel chimique, à travers une membrane dense. La pervaporation est une technique tout à fait récente puisque la première industrialisation de ce procédé remonte aux années 80.

La pervaporation a suscité un intérêt important pour la récupération du phénol contenu dans les eaux usées. Pour de telles applications, des membranes à base de polymères sont largement utilisées .

La pervaporation présente de nombreux avantages: la consommation d'énergie est minimale, aucune régénération n'est nécessaire et il n'y a pas de contamination secondaire. Son principal inconvénient est l'existence de faibles flux par rapport aux autres procédés de séparation membranaire

Les méthodes détruites présentent toutes des défauts. Les méthodes d'oxydation génèrent des boues. Le traitement biologique ne permet pas de traiter des concentrations du phénol supérieures à 200 $mg.L^{-1}$. L'adsorption ne peut pas être utilisée pour traiter des eaux

résiduaires, contenant de fortes concentrations de phénols. L'ultrafiltration et la pervaporation ne permettent d'obtenir que de faibles flux suite a l'apparition de phénomènes de colmatage et a l'augmentation de la résistance de transfert de matière. Devant les problèmes rencontrés par ces techniques de traitement des solutions phénolées, nous envisageons donc de traiter ce type de solution en utilisant une membrane liquide *(Das et al. 2008).*

I.4. Traitement enzymatique

I.4.1. Généralités sur les enzymes

La variété considérable des réactions biochimiques qui constituent la vie, sont presque toutes sous la dépendance des enzymes. Bien que soumises aux mêmes lois de la nature que les autres substances, les enzymes diffèrent des catalyseurs chimiques classiques sur plusieurs points importants:

- Les enzymes ont un énorme pouvoir catalytique, accélérant la vitesse des réactions jusqu'à 10^{16} fois la vitesse des réactions non catalysées.
- Les réactions catalysées par des enzymes ont lieu dans des conditions de concentrations, de température, de pH et de pression atmosphérique compatibles avec la vie.
- Chaque enzyme a un double spécificité, spécificité de reconnaissance des molécules avec lesquelles il est en interaction, spécificité de type de réaction qu'il catalyse. Les molécules sur lesquelles les enzymes agissent sont traditionnellement appelées des substrats. Il ne propose que la complémentarité stérique entre l'enzyme et son substrat est à l'origine de cette spécificité et que les enzymes et les substrats se reconnaissent comme une clé s'adapte dans une serrure. Le site spécifique sur lequel se lie le substrat et où la catalyse a lieu est appelé le site actif de l'enzyme (FigII.1).Le concept clé-serrure proposé par Emil-FISCHER pour expliquer la spécificité d'action

des enzymes suggérait l'existence d'un complexe enzyme-substrat est mentionné ci-dessous.

I.4.2. Peroxydases

I.4.2.1 Définition et constitution de la peroxydase

La peroxydase est une enzyme oxydoréductase qui a notamment pour fonction de décomposer les peroxydes d'hydrogènes, ce qui lui vaut son nom. Les deuxièmes substrats sont les électrons des composés phénoliques comme les phénols, les colorants et les anilines. Cette fonction des peroxydases a été découverte pour la première fois en 1855 dans l'oxydation du gaïacol par les peroxydases en présence du H_2O_2.

La peroxydase est une protéine héminique c'est-à-dire qu'elle contient une partie non protéique plane l'hème (**Figure I.2**), caractérisée par la présence d'un Fe III au centre d'une porphyrine et qui est en mesure de catalyser une série de réactions oxydatives.

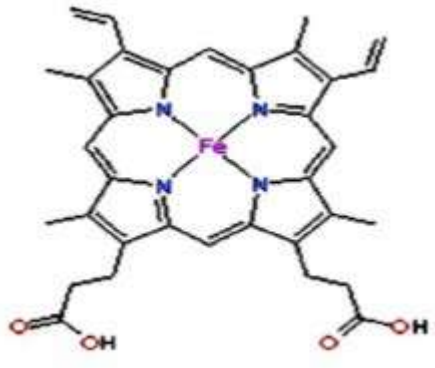


Figure I.2| Structure de l'hémine peroxydase

I.4.2.2. Famille des peroxydases

Les peroxydases sont largement distribuées dans les plantes, les microorganismes et les animaux, leur poids moléculaire varie entre 30 à 150 kDa. Cette citation nous permet de distinguer trois superfamilles des peroxydases en fonction de leur origine: - Peroxydases intracellulaires - Peroxydases microbiennes - Peroxydases des plantes

I.4.2.3. Mode d'action de la peroxydase

La peroxydase agit en présence de deux substrats, très spécifiquement sur le peroxyde d'hydrogène et l'autre substrat c'est un composé de nature phénolique. La réaction d'oxydoréduction globale se déroule :

$$H_2O_2 + 2RH_2 + \text{Peroxydase} \longrightarrow 2RH\bullet + 2H_2OHR\text{-}RH$$

Les composés aromatiques tels que les phénols et ses dérivés sont une classe importante de polluants dans les eaux usées à partir d'un certain nombre d'industries chimiques. En raison de leur toxicité, les phénols doivent être éliminés des eaux usées avant de les rejetées dans l'environnement.

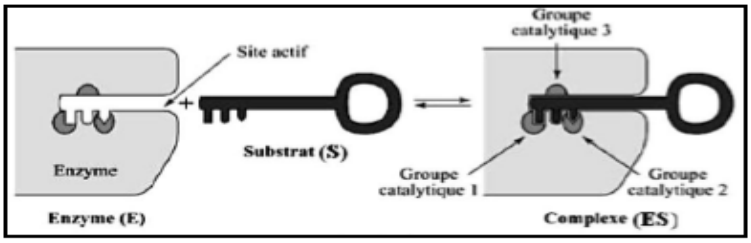


Figure I.3| Concept clé-serrure proposé par Emil-FISCHER

Bien que des enzymes catalysent de telles réactions, ils ne le font qu'en association avec des cofacteurs. Les cofacteurs peuvent être des ions métalliques ou des molécules organiques appelées coenzymes.

Le complexe enzyme-cofacteur catalytiquement actif est appelé un holoenzyme. La partie protéique de l'holoenzyme, enzymatiquement inactive est l'apoenzyme.

I.5. Techniques d'immobilisation des enzymes

Les applications des enzymes libres sont considérablement limitées dans la pratique par le coût élevé des enzymes et leur relative instabilité. En effet, la majorité des enzymes agissent non pas à l'état libre dans le cytoplasme, mais sous formes associées c'est-à-dire macroscopiquement immobilisées, notamment aux constituants membranaires de la cellule ou des organites, c'est-à-dire dans un microenvironnement très sensiblement différent d'une

phase aqueuse homogène (figure I.4). Donc l'immobilisation puisse être une solution qui nous offert un mode d'action plus suffisant, on parle d'une cinétique hétérogène.

La rétention d'enzyme dans une phase insoluble, est plus couramment dénommée immobilisation des enzymes . Donc on peut dire qu'une enzyme est immobilisée lorsque ces molécules sont macroscopiquement confinées pendant un processus catalytique. Une nette stabilisation de l'activité catalytique est constatée après l'immobilisation des enzymes par voie chimique ou physique (suivant que l'enzyme est liée au support de manière covalente ou non) et sur différents supports insolubles résine échangeuse d'ions, polymères synthétiques, charbon actif, verre microporeux, matériaux inorganiques, DEAE cellulose……etc *(Milovanovic ; Bozica and Vujcicb . 2007)*

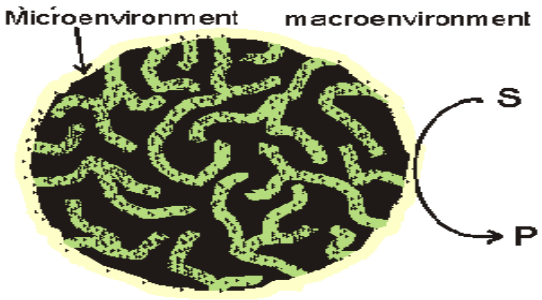


Figure I.4|Notion de micro- et de macroenvironnement *(Chaplin. 2002)*

Les effets d'immobilisation sur l'activité des enzymes résultent de l'interaction de différents facteurs.

- ✓ Modifications de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, sous l'action des contraintes dues à la fixation .
- ✓ Modifications du microenvironnement : pH local, interactions électrostatiques…..etc. ; Phénomènes diffusionnels à l'intérieur du complexe
- ✓ Encombrement stérique.

Cet ensemble de facteurs va jouer un rôle déterminant sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.

Les méthodes d'immobilisation des enzymes, l'intérêt suscité par les enzymes immobilisées a crû parallèlement au développement de méthodes variées d'immobilisation qui ont été mises au point et décrite au cours des récentes années.

Ces méthodes peuvent être regroupées en un tryptique comprenant *(Durand; et Monsan.1982)* :

I.5.1. Immobilisation par inclusion (encapsulation)

Dans le réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère, dans une microcapsule, dans une fibre creuse ou pleine. Cette méthode est basée sur l'inclusion d'une enzyme au sein d'une structure polymère qui permet la diffusion des substrats, mais ne permettre pas l'écoulement hors des protéines. Comme il n'y a aucune formation de liaison entre l'enzyme et la matrice, il n'y a pas de perte d'activité due à l'inactivation ou l'encombrement stérique des sites actifs, comme c'est souvent le cas lorsque l'enzyme est lié de façon covalente à un support *(Marconi. 1989).*

Les avantages de cette technique sont :

- ✓ La simplicité et le faible coût.
- ✓ Possibilité de piéger plus d'une enzyme à n'importe quel niveau de pureté.
- ✓ Une récupération facile et rapide des produits de la réaction.

I.5.2. Immobilisation par adsorption

Par l'intermédiaire d'interaction de type secondaire, sur un support organique ou minérale. Les enzymes peuvent être adsorbées sur des matériaux tels que : des échangeurs d'ions, des polymères organiques, des gels de silice...etc.

Cette méthode a l'avantage

- ✓ D'être simple et peu coûteuse.
- ✓ L'immobilisation par adsorption est préférable lorsque l'enzyme est sensible à des modifications chimiques ou encore lorsqu'elle est inactivée par des liaisons covalentes *(Marconi. 1989).*

I.5.3. Immobilisation par liaison covalente

Soit directement entre un groupe chimique de l'enzyme et un groupe réactif d'un support, soit par réticulation à l'aide d'agents polyfonctionnels (éventuellement après inclusion ou adsorption). L'immobilisation par liaison covalente des polymères activés ou matrices est la méthode d'immobilisation la plus utilisée au laboratoire.

Cette méthode a l'avantage de lie solidement l'enzyme à un support polymérique, par l'intermédiaire de liaisons chimiques stables par apport aux changements de la température, pH, force ionique et concentration du substrat *(Marconi. 1989).*

I.5.4. Immobilisation par réticulation avec des agents bi- ou multi fonctionnels

Une large variété des agents de réticulations ont été proposées pour l'immobilisation des enzymes, mais seulement le glutaraldéhyde est intensivement employé. Les méthodes pour l'immobilisation d'enzymes près ces réactifs peuvent être divisés en deux types : Immobilisation, ou plutôt insolubilisation, réalisée par la formation des réticulations intermoléculaires entre les molécules d'enzymes. Adsorption de l'enzyme sur un support (polymères naturelles et synthétiques) suivi de la réticulation de l'enzyme adsorbée . Malgré cette division claire, le procédé utilisé dans beaucoup de cas exige une combinaison de deux méthodes ou plus telles que l'adsorption de l'enzyme sur un support approprié suivi de la réticulation intermoléculaire .

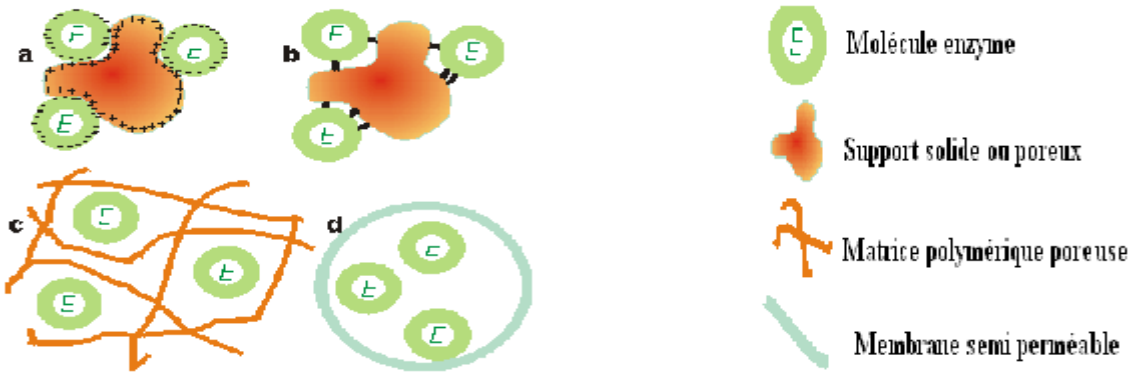


Figure I.5| Méthodes d'immobilisation. (a) enzyme non-covalent adsorbée à une particule insoluble ; (b) enzyme en covalence attachée à une particule insoluble ; (c) enzyme enfermée

dans une particule insoluble par un polymère réticulé ; (d) enzyme confinée dans une membrane semi-perméable *(Chaplin. 2002. Enzyme technology).*

I.5.5. Choix de la méthode d'immobilisation

Le tableau suivant représente une brève comparaison entre les techniques d'immobilisation :

Tableau I.5|Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation.

Caractéristiques	Adsorption	Liaisons covalentes	Réticulation	Encapsulation
Réalisation	Facile	Difficile	Difficile	Facile
Cout	Faible	Elevé	Moyen	Elevé
Energie de liaison	Variable	Forte	Faible	Forte
Fuite d'enzyme	Oui	Non	Oui	Non
Utilisation	Large	Sélectif	Large	très large
Problème d'exécution	Elevés	Faibles	Elevés	Elevés
Effets de matrice	Oui	Oui	Oui	Non
Importantes barrières diffusionnelles	Non	Non	Oui	Oui
Protection microbienne	Non	Non	Oui	Oui

D'après ce tableau, nous pouvons opter pour l'utilisation d'une méthode d'immobilisation ou une autre, et cela suivant les caractéristiques techniques et économiques qui nous intéressent.

Beaucoup de facteurs doivent être pris en considération dans le choix de la méthode d'immobilisation. Parmi ceux-ci, on peut citer :

- ✓ La nature chimique de la réaction catalysée.
- ✓ Le coût et la stabilité des réactifs et du biocatalyseur mis en jeu.
- ✓ L'influence des traitements nécessaires à l'immobilisation sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.
- ✓ Le rendement et le degré de pureté voulus. Donc, il faut trouver un compromis entre toutes ces contraintes. Nous pouvons dire que l'immobilisation par inclusion apparaît comme une solution convenable par son coût, sa stabilité ainsi que sa facilité de réalisation c'est ce qui fait qu'elle est communément utilisée.

I.5.6. L'immobilisation par inclusion des enzymes dans l'alginate de calcium

I.5.6.1. Définition de l'encapsulation des enzymes

Il s'agit de la méthode la plus utilisée aujourd'hui. Cette méthode consiste à retenir physiquement une enzyme enfermée à l'intérieur d'une matrice (gel, fibre ou microcapsule) d'une manière purement physique ; l'enzyme est répartie dans une solution du monomère ou dans une émulsion. La polymérisation du monomère ou sa prise en masse conduit à la formation d'un réseau au sein du quel l'enzyme est emprisonnée. Généralement, les gels d'alginates et carraghénates sont les produits les couramment employés pour l'immobilisation des enzymes par inclusion.

L'alginate est le copolymère le plus utilisé car c'est un polymère anionique, léger et non toxique *(Wong; Luh; and Whitaker, 1971, An. 1999, Chaplin, 2002).*

I.5.6.2. Procédé d'encapsulation dans l'alginate

La solution enzymatique est mélangée à une solution d'alginate de sodium, l'enzyme solubilisée est ensuite polymérisée en présence d'un ou plusieurs agents de réticulation. Le

mélange est dispersée à travers un orifice (seringue) goute à goute dans une solution saline telle que le chlorure de calcium ($CaCl_2$) (dispersion par extrusion) afin d'obtenir des billes de gel présentant de bonnes propriétés mécaniques et dans les quelles l'enzyme est retenue (figureI.6). Le diamètre des gouttes formées par extrusion simple par gravité est toujours supérieur au millimètre même avec des aiguilles très fines dont la taille s'échelonne entre 2 et 4000 µm. La taille des mailles du réseau dépend du pourcentage d'alginate. Le gel est néanmoins fragile car un complexant (EDTA) ou même la présence d'ions phosphates suffit pour le dissocier *(Pelmont, J. 1993).*

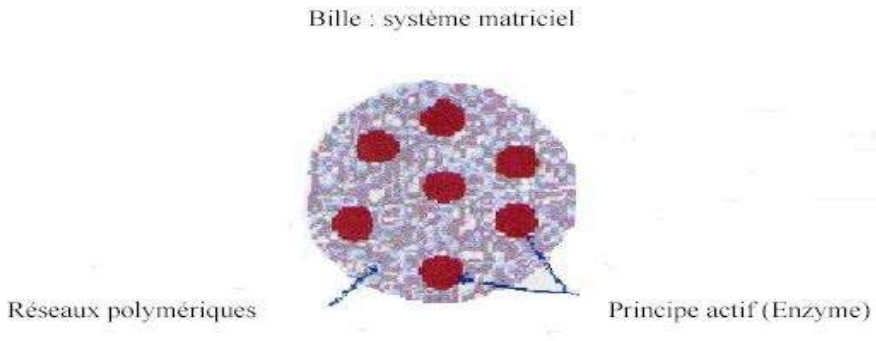


Figure I.6| Structure d'une bille d'alginate *(Brusk; Breford ; and Vorlop, 1998)*. Réseaux polymériques Principe actif (Enzyme) Bille : système matriciel

I.5.6.3. L'alginate

I.5.6.3.1. Origine

L'alginate a été obtenu pour la première fois au Royaume-Uni par Stanford en 1880. Grâce à une extraction alcaline à partir des algues brunes. Les algues constituent toujours la matière première pour l'obtention de l'alginate aujourd'hui ; il s'agit surtout des espèces suivantes : Laminaria digitata ; Fucus serratus *(Brusk; Breford; and Vorlop. 1998 ; Linden, ; et Lorient. 1994).*

I.5.6.3.2. Structure L'alginate

L'alginate est un polysaccharide linéaire fortement anionique *(Pelmont. 1993)* ; C'est également un polyuronide, constitué d'un enchaînement de deux acides uroniques : l'acide β-Dmannuronique et l'acide α-L-guluronique (Figure I.7); la liaison entre les monomères est de type : β-(1 4). Il existe trois types d'enchaînements différents (figure I.8) :

- ✓ L'enchaînement G-G-G (blocs homogènes d'acides guluroniques)
- ✓ L'enchaînement M-M-M (blocs homogènes d'acides mannuroniques) ;
- ✓ L'enchaînement M-G-M (blocs hétérogènes des deux acides) ; Acide β-D-mannuronique (M) Acide α-L-guluronique (G)



Figure I.7| Représentation de l' Acide β-D-mannuronique (M) Et l' Acide α-L-guluronique (G) *(Doumèche (2002)*

I.5.6.3.3. Obtention de l'alginate

On obtient l'alginate par la transformation d'algues brunes. Ces dernières subissent quatre étapes *(Brusk; Breford; and Vorlop. 1998):*

- ✓ Déminéralisation.
- ✓ Extraction de l'alginate.
- ✓ Coagulation du colloïde.
- ✓ Neutralisation.

I.5.6.3.4. Propriétés des alginates

Les alginates des métaux alcalins sont solubles dans l'eau. Ils sont essentiellement utilisés comme viscosifiants ou comme gélifiants dans l'industrie alimentaire. Il est possible d'obtenir des solutions d'alginate plus ou moins visqueuses en jouant sur le degré de polymérisation et la composition en acides uroniques. Les alginates riches en blocs gluroniques conduisent à des gels rigides et cassants, tandis que les alginates riches en blocs mannuroniques conduisent à des gels de texture souple .

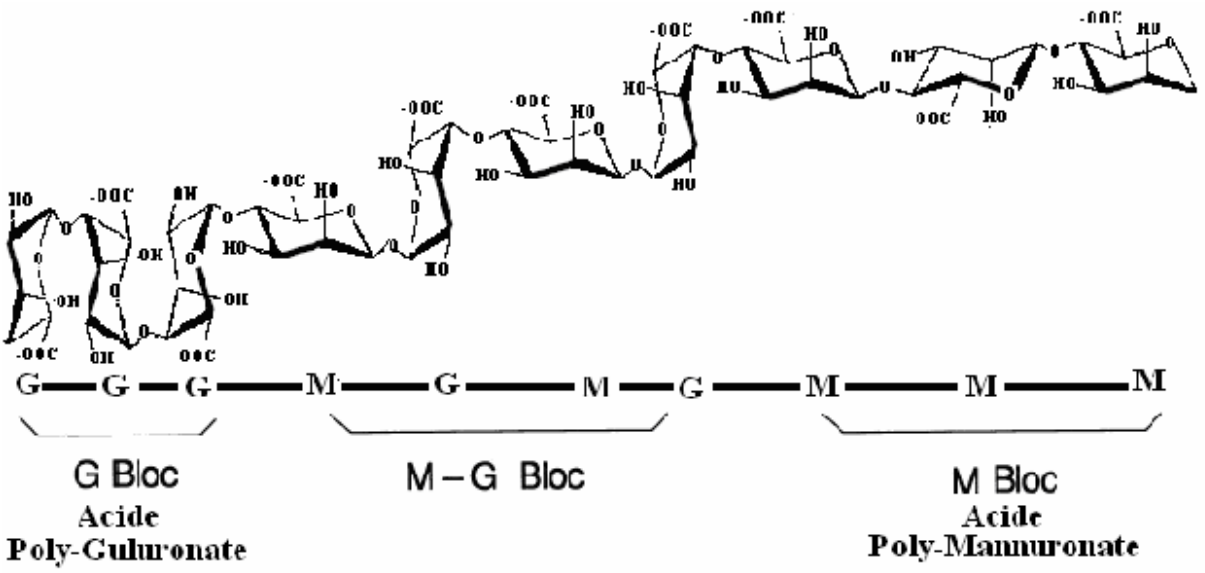


Figure I.8| Structure chimique des Alginates : Conformations du poly G-Blocs (à gauche), poly M-Blocs (à droite) et blocs mixtes MG (au centre) *(Doumèche .2002)*

L'addition progressive et limitée d'ions Ca^{2+} (calcium) et H^+ à une solution d'alginate alcaline permet d'obtenir des gels non thermosibles. L'alginate a une forte affinité pour les cations divalents comme le calcium.Cette propriété augmente quand la proportion en acide guluronique augmente : les segments guluroniques à conformation plissée retiennent par coordination les ions calcium, en coopération avec une chaîne parallèle, il se forme un réseau tridimentionnel.

Le processus de gélification est simplement l'échange des ions sodium par les ions calcium dans les conditions relativement douces *(Wang.1996)* ; après 10 mn de l'ajout de l'alginate de sodium à la solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$) :

2 Na (alginate) + Ca_2 ⟶ Ca (alginate) 2 + 2 Na^+

I.5.6.4. Avantages de la méthode d'immobilisation des enzymes par encapsulation

En général l'immobilisation des enzymes à plusieurs avantages :

- ✓ Protection des enzymes contre les conditions physiques et chimiques extérieurs comme (le pH, la température, ou la concentration ionique).
- ✓ Des enzymes immobilisées peuvent plus facilement être séparées des substrats et des produits de réaction et être employées à plusieurs reprises et sans interruption ; de ce fait simplifiant la manœuvre et empêchant la contamination de protéine de produit finale.
- ✓ La réduction de l'usage des enzymes, car une fois l'enzyme est immobilisée, elle peut être utilisée pour une période plus longue que pour l'enzyme libre ;
- ✓ L'enzyme immobilisée peut conduire à des processus en continu à lit fixé ou bien à lit fluidisé ; Il est possible d'utiliser des doses d'enzyme plus élevées par un volume de réacteur que pour un processus d'enzyme libre, cela contribue à des taux de réaction élevés et par conséquent des réacteurs de tailles plus petites ; Ces avantages techniques permettent une réduction des coûts de processus, lorsque la demi-vie de l'enzyme immobilisée est suffisamment longue .
- ✓ En particulier, l'inclusion de l'enzyme dans une matrice est généralement avantageuse parce que l'immobilisation ne met pas en jeu des liaisons covalentes entre la matrice et l'enzyme *(Ohmri; Kurokawa. 1994).*
- ✓ Les réactions de polymérisation et de gélification sont bien maîtrisées et leurs mécanismes sont connus.
- ✓ La réaction chimique avec l'enzyme est limitée. L'inclusion dans le gel naturel est applicable à toutes les enzymes et permet l'obtention de supports de formes adaptables (films, billes, fibres).
- ✓ Il est également possible d'immobiliser simultanément plusieurs enzymes dans la même matrice
- ✓ L'inclusion permet d'immobiliser en une seule étape la totalité de la masse d'enzyme *(Durand; et Monsan. 1982).*

I.5.6.5 Inconvénients de la méthode des enzymes par encapsulation

- ✓ Le réseau formé est presque toujours trop lâche pour retenir complètement l'enzyme.
- ✓ Il y a des problèmes de transfert de masse (inaccessibilité de certains substrats) et des risques de fuite d'enzymes *(Scriban. 1993).*
- ✓ L'enzyme peut migrer vers l'extérieur du gel si les pores sont trop grands.
- ✓ Certaines polymérisations font appel à des agents dénaturants ou à des radicaux Il y a une résistance diffusionnelle imposée au substrat lors de son passage dans les pores du support
- ✓ Aux phénomènes diffusionnels, viennent s'ajouter également les problèmes d'encombrement stérique, limitant l'efficacité de la catalyse
- ✓ Les propriétés mécaniques des gels sont souvent mauvaises, du moins insuffisantes pour envisager une utilisation en réacteur à lit fixe de taille importante *(Durand; et Monsan. 1982).*

CHAPITRE II. MATTERIELS & METHODES

Nous allons présenter dans ce chapitre les matériels, les réactifs et les méthodes utilisés dans notre étude pratique.

II.1. Matériels

II.1.1. Equipements

Les équipements utilisés dans cette étude sont citée dans le tableau II.1:

Tableau II.1 liste des équipements chimiques

Equipements	**Marques**
Spectrophotomètre UV-Vis	PERKIN-ELMER 550 A
Agitateur	Hanna instrument
pH-mètre	HANNA instrument
Bain-marie	Memmert
Balance	COMBIMAG
Chronomètre	de type SWAN
Hotte chimique	chambrée 2000
Seringue	de type 20 G
Mixeur	Moulinex
Centrifugeuse	HANNA instrument

II.1.2. Verreries

- les verreries classiques sont utilisées dans notre étude.

II.2. Produits chimiques utilisés

Les produits chimiques utilisés durant cette étude sont de qualité analytique. Ils ont été manipulés sans purification préalable. Les solutions ont été préparées avec de l'eau

distillée ou avec les solutions tampon. Les principaux produits chimiques utilisés dans cette étude citée dans le tableau II.2 :

Tableau II.2| liste des produits chimiques utilisés

Nom des produits	La masse molaire (g/mol)
Acétone C_3H_6O	58, 0791 g/mol 100%
4aminoantypiryne $C_{11}H_{13}N_3O$	203,27g/mol 99 %
Chlorure de calcium $CaCl_2$	110,984 g/mol 99,5 %
Alginate de sodium	198,1059 g/mol 99%
Ferricyanure de potassium(K_3 [$Fe(CN)_6$]	329,244g/mol 99%
Solutions tampons de pH 2 à 10	

II.2.1. substrats

a) Peroxyde d'hydrogène :

- ✓ **Formule :** H2O2.
- ✓ **Masse molaire :** 34.01g/mol.
- ✓ **Densité à 20°C :** 1.11.
- ✓ **Pureté** : 30%.
- ✓ **Point de fusion** :-33°C.
- ✓ **Point d'ébullition** : 108°C.

b) 2-nitrophénol :

- ✓ **Formule brute:** $C_6H_5NO_3$.
- ✓ **La masse molaire :** 139.10 ± 0,0055 g/mol
- ✓ **T° fusion** : 43 °C
- ✓ **T° ébullition** : 550 °C
- ✓ **Solubilité à 20°C** : 100 g/mL d'eau
- ✓ **Masse volumique** : 1,79 g·cm-3.
- ✓ **Densité à 68°C :** 1.49.
- ✓ **Vapeur sous pression à 25°C :** 0. 113 mm Hg.
- ✓ **La formule développée**

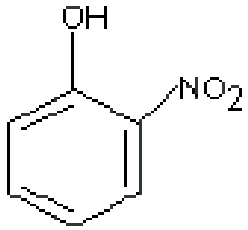


Figure II.1| structure du 2-nitrophénol

II.3. Méthodes

II.3.1. Courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol

Pour étudier la cinétique de dégradation du nitrophénol par la peroxydase immobilisée on doit trouver une relation qui permet de convertir les valeurs des densités optiques en concentration de nitrophénol .

- Détermination de la longueur d'onde maximal du nitrophénol.
- Préparer des solutions en 2-Nitrophenol à concentration [20 – 140] mg/l avec un pas de 20 mg/l.
- Prendre 2 ,4 ml du solution de 2-nitrophénol de concentration [20-140] mg/l, + 0 ,3 ml de ferricyanure de potassium (83,4 mM) + 0,3 ml de 4-AAP (20,8 mM)+ (Volume de dilution en 25 ml de solution tampon (PH 7).
- La méthode d'analyse utilisée est la spectrophotométrie UV-visible à une langueur d'onde égale à une longueur d'onde égale à 409nm.

Note : Blanc : 2,4 ml de tampon (pH7) + 0,3 ml de ferricyanure de potassium (83,4 mM) + 0,3 ml de 4-AAP (20,8 mM) + volume de dilution 25 ml à déterminer de solution tampon (PH 7).*(Azizi et all.2014)*

II.3.2. Extraction et purification de peroxydase de navet blanc

On peut préparer la peroxydase à partir des divers fruits et légumes (radis, raifort, navet, pomme de terre, pomme, champignons…etc.). Mais pour l'étudier, il faut choisir des organes à chair claire pour faciliter la visualisation de la réaction colorée, dans ce cas on choisie le radis car sa peroxydase présente le meilleur rapport entre la facilité de préparation et de conservation et la variété des applications possibles.

On fait cette expérience pour montrer l'effet de la peroxydase du navet dan la biodégradation du nitrophénol :



Figure II.2| Navet.

La procédure d'extraction et de la purification de la peroxydase de navet est comme suit :

- Mettre 400 g de radis dans un mixeur après l'avoir éplucher avec 200 ml de l'eau distillée. Filtrer avec la gaze, on obtient un extrait brut extrêmement efficace qui peut être dilué avant utilisation.
- Placer un bécher contenant 200 ml de l'extrait brut et un bécher contenant 400 ml de l'acétone au congélateur. Préparer de la glace pilée dans un cristallisoir.
- Après 15 min au congélateur, faire sortir l'extrait brut et le disposer sous l'agitation dans la glace pilée puis verser de l'acétone sortie du congélateur dans l'extrait brut, goutte à goutte.
- Laisser le mélange (extrait brut-acétone) dans le frigo (4 °C) pendant 2 heures; il se forme un précipité pour le récupérer, centrifuger à 3000 rpm pendant 15 min.
- Dissoudre le culot dans 25 ml de tampon de phosphate (pH 7), la solution obtenue est de la peroxydase partiellement purifiée (EEPP). *(Azizi et all.2014)*

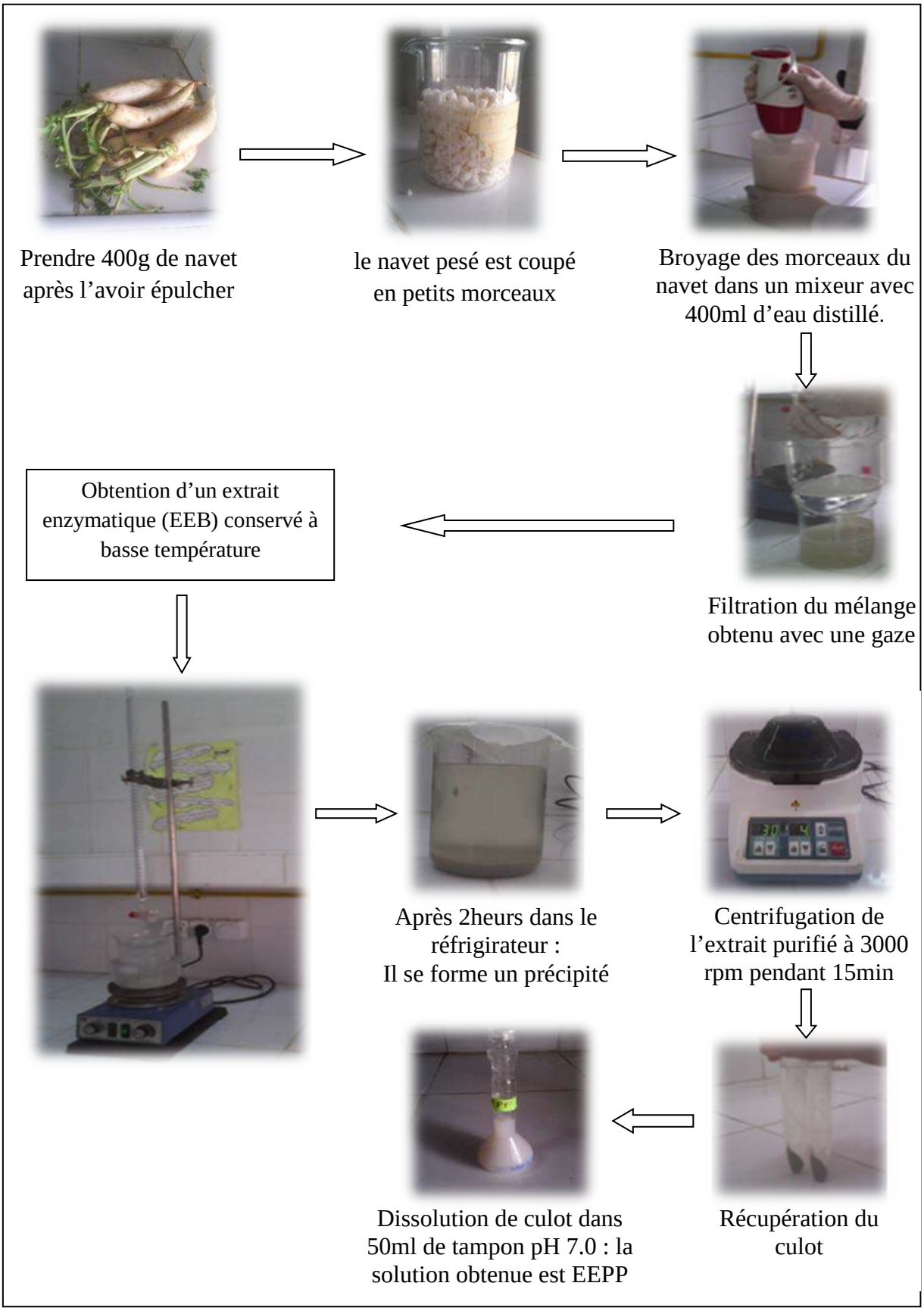


Figure II.3| Le protocole d'extraction et de purification de la peroxydase

II.3.3. Méthode de mesure de l'activité enzymatique de (EEB et EEPP)

Le mélange réactionnel est préparé comme suit:

- Introduire dans une fiole de 50 ml:
    - 1 ml de phénol (0.1 M). 1 ml d' H_2O_2 (0.1 M).
    - 1 ml de 4- aminoantiperine (0.01 M).
    - compléter le volume jusqu'à trait de jauger par une solution tampon pH 7 (phosphate monopotassique, 0,01 M).
- Placer 3ml de mélange réactionnel préparé précédemment dans des tubes à essai.
- Ajouter 0.15ml d'EEB/EEPP; agiter.
- Placer rapidement le mélange réactionnel dans la cuve de spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde est égale 517nm.
- Lancer la cinétique, par la mesure de densité optique avec un pas de 10 secondes.

II.3.4. Méthode d'encapsulation d'enzyme de la peroxydase par l'alginate de calcium

- Dans un bécher, dissoudre 0.15g d'alginate de sodium dans 10ml de la peroxydase partialement purifié sous forme libre.
- Laisser le mélange peroxydase/alginate de sodium sous l'agitation pendant (1-1,5 heures) jusqu'à l'obtention d'un mélange visqueux homogène
- Laisser le mélange repose 20min pour éviter les bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$ (0.05 M), (Garder la solution de $CaCl_2$ dans le réfrigérateur avant faire l'encapsulation de l'EEPP par l'alginate de sodium).
- Préparer les billes de la peroxydase immobilisée, en faisant verser le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue (20 G), dans un 50ml de solution $CaCl_2$ de concentration de 0.05M sous l'agitation.
- Laisser les billes sous l'agitation dans la solution de $CaCl_2$ pendant 1 heure.
- Rincer les billes avec l'eau distillée et les conserver dans une solution tampon de pH 7 dans un réfrigérateur sous une température de 4°C. *(Azizi et all.2014)*

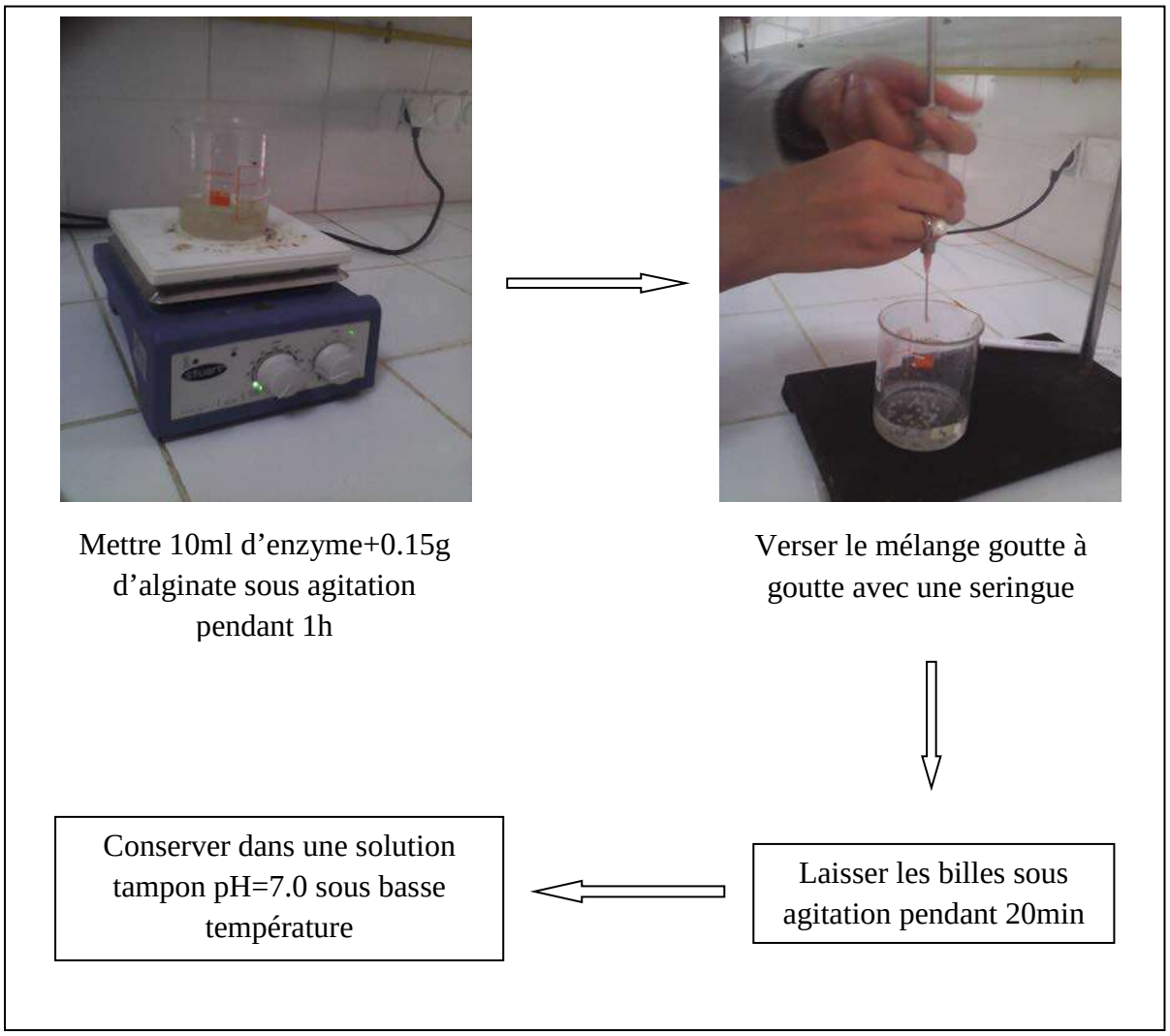


Figure II.4| Immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de calcium.

II.3.5. Méthode de dosage des protéines totales par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 590 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

Cette méthode articule sur la loi de Beer-Lamber pour déterminer une concentration inconnue d'une solution protéique (EEPP).

On trace la courbe d'étalonnage A= f ([Protéine]) comme suit :

Prendre 5 tubes à essaies, y introduire :

- 0,1ml de peroxydase à différentes concentrations [0-100] (mg/l) avec un pas de 25mg/l.
- 0,25ml NaOH (1M).
- 5ml du réactif de Bradford.
- Agiter puis laisser les tubes 10 min pour développer la coloration.
- Chaque concentration correspond à une absorbance. A la afin, on trace la courbe A=f ([Albumine]). *(Azizi et all.2014)*

II.3.6. Optimisation des paramètres physico-chimiques de la biodégradation de 2-nitrophénol par la peroxydase immobilisée

La méthode d'optimisation du procédé d'élimination du nitrophénol consiste à varier un seul paramètre opératoire dans une expérience. Les paramètres à optimiser sont : le *pH,* les concentrations initiales : du phénol, d' H_2O_2 et l'activité enzymatique ainsi que les temps de contact. Le choix du paramètre optimum est basé sur deux paramètres intrinsèques : la vitesse initial (et/ou) le rendement de traitement.

Les intervalles des concentrations ainsi les volumes opérés dans ce travail sont regroupés dans le tableau II.3 ci-dessous :

Tableau II.3| Valeurs des conditions opératoire à utiliser.

	Paramètres	**Intervalles**	**Volumes (ml)**
aqueuse	pH	2-10	---
	Solutions tampon	0.01M	2,8
	Nitrophénol	[20-140] mg/l	1
	H_2O_2	[1-15.4] mM	1
Enzyme	AE_t	[2-11] U/ml	--

II.3.6.1. Effet de pH

Le pH est un paramètre essentiel à prendre en compte dans les processus de la biodégradation du phénol par la peroxydase. Ce paramètre agit à la fois sur l'enzyme et sur l'état d'ionisation du nitrophénol.

II.3.6.2. Méthode de préparation des solutions tampons

Les solutions tampon sont été préparées par dissolution des réactifs appropriés dans l'eau distillée sous agitation magnétique.

Les différentes solutions tampons utilisées sont :

- Solution tampon pH 2,0 préparée par chlorure de potassium à 0,01 M
- Solution tampon pH 3,0 ; 4,0 et 5,0 préparée par biphthalate de potassium à 0,01 M.
- Solution tampon pH 6,0 ; 7,0 préparée par phosphate monopotassique à 0,01 M
- Solution tampon pH 8,0 ; 9,0 ; 10,0 préparée par chlorure de potassium à 0,01 M et l'acide borique à 0,01 M.
- En ajustant le pH des solutions en utilisant les solutions de NaOH (0,2 N) et HCl (0,2 N),

Le pH des solutions a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre de type « HANNA instrument » équipé d'une électrode de verre combiné. Le pH-mètre a été étalonné avec des solutions tampons standard (pH = 4-7 ou 10). *(Azizi et all.2014)*



Figure II.5| pH mètre

La méthode expérimentale est comme suit :

- préparation du blanc à différentes pH [2-10].
    - Prendre 9 tubes à essai, et introduire dans chacun :
        - 2.8 ml de solution tampon à différentes pH [2-10] + 2 ml H_2O_d, et mélanger bien.
    - Prendre 9 fioles jaugées (25 ml), et introduire dans chacun :
        - Prendre 2.4 ml (mélange précédant), ajouter 0.3 ml de ferricyanure de potassium (83.4Mm) et 0.3 ml de 4-AAP (20.8Mm).
        - Diluer ce mélange par une solution tampon pH (2-10).
- préparation des témoins à différents pH (2-10).
    - Prendre 9 tubes à essai, et introduire dans chacun :
        - 2.8 ml de solution tampon à différentes pH (2-10) + 1 ml H_2O_2 +1 ml 2-nitrophénol, et mélanger bien
    - Prendre 9 fioles jaugées (25 ml), et introduire dans chacun :
        - Prendre 2.4 ml (mélange précédant), ajouter 0.3 ml de ferricyanure de potassium (83.4Mm) et 0.3 ml de 4-AAP (20.8Mm).
        - Diluer ce mélange par une solution tampon pH (2-10).
- préparation du teste à différents pH (2-10).

- Prendre 9 tubes à essai, et introduire dans chacun :
  - 2.8 ml de solution tampon à différentes pH (2-10) + 1 ml [H_2O_2] (2.2 Mm), +1 ml [2-nitrophénol] (45 mg/l) +20 bille, pour tous les tubes et laisser la réaction se dérouler dans le Bain-marie à T= 40°C pendant 2 heurs.
  - Centrifugés à 3000 rpm pendants 3 min pour récupérer le surnageant.
- Prendre 9 fioles jaugées (25 ml), et introduire dans chacun
  - Prendre 2.4 ml de surnageant, ajouter 0.3 ml de ferricyanure de potassium (83.4Mm) et 0.3 ml de 4-AAP (20.8Mm) .
  - Diluer ce mélange par une solution tampon pH (2-10).
- Noter les absorbances pour chaque pH à différentes longueur d'onde. *(Azizi et all.2014)*

II.3.6.2. Effet de concentration de H_2O_2

Nous avons déterminé la concentration d'optimal en H_2O_2, les concentrations de peroxyde d'hydrogène sont entre 1 et 15.4mM avec un pas de 1.2mM, à partir des valeurs des absorbances trouvées à 409 nm. La détermination de la concentration optimale du H_2O_2 obtenue par la détermination du rendement de chaque concentration du peroxyde d'hydrogène.

La méthode expérimentale est comme suit :

- Prendre 13 tubes à essai, et introduire dans chacun :
  - 2.8 ml de solution tampon à pH=7 + 1 ml H_2O_2 (1-15.4) +1 ml 2-nitrophénol (45 mg/l), +20 bille, pour tous les tubes et laisser la réaction se dérouler dans le Bain-marie à T= 40°C.
  - Centrifugés à 3000 rpm pendants 3 min pour récupérer le surnageant.
- Prendre 13 fioles jaugées (25 ml), et introduire dans chacun :
  - Prendre 2.4 ml de surnageant à différents temps (5-180) min avec un pas de 15 min, ajouter 0.3 ml de ferricyanure de potassium (83.4Mm) et 0.3 ml de 4-AAP (20.8Mm).
  - Diluer ce mélange par une solution tampon pH 7.
- Noter les absorbances pour chaque concentration à 409 nm. *(Azizi et all.2014)*

II.3.6.3. Suivi de l'activité d'enzyme total

Pour atteindre un rendement maximal de la dégradation par notre enzyme on doit savoir l'activité optimale de l'enzyme.

Le méthode expérimentale :

Première partie :

- Prendre (2à10ml) avec un pas de 1ml de solution d'EEPP ayant une activité de 12,68 UI/ml.
- Diluer dans 10ml de solution tampon pH=7.0.
- Mesurer l'activité enzymatique de chaque EEPP.
- Immobiliser les différentes solutions d'EEPP par l'alginate de calcium.
- Conserver dans des solution tampons pH=7.0.

Deuxième partie :

- prendre 10 tubes à essai :
  - Mettre 2.8 ml du solution tampon pH=7.0+1ml d'eau distillé + 1ml de solution du 2-nitrophénol (45mg/l) + 20 billes de différentes activité.
  - Mettre les tubes dans un bain marie à T=40°C pendant 2 heurs.
- Centrifuger le mélange à 3000rpm pendant 3min.
- Prendre 2.4ml du mélange précédent + 0 ,3 ml de ferricyanure de potassium (83,4 mM) + 0,3 ml de 4-AAP (20,8 mM)

Mesurer les DO des différentes solutions à une longueur d'onde 409nm. *(Azizi et all.2014)*

II.3.6.4. Détermination de l'effet de concentration du 2-nitrophénol

Nous avons déterminé la cinétique de dégradation des différentes concentrations de 2-nitrophénol (20-140) mg/l à partir des valeurs des absorbance trouvées à 409 nm. (Détermination des rendements de chaque concentration du 2-nitrophénol).

La méthode de travail est la suivante :

Le même protocole est maintenu sous les condition (pH=7, T=40°C, [H_2O_2] =2.2 mM, Nombre des bille =20 bille, t=[5-180min] avec un pas de 15min, AE=7 UI/ml), en variant la concentration du 2-nitrophénol [20 – 140] mg/l avec un pas de 20 mg/l. *(Azizi et all.2014)*

II.3.6.5. Suivi de la biodégradation du 2-nitrophénol dans les conditions optimales

Les conditions optimales déterminées précédemment ont été appliquées pour l'élimination de 2-nitrophénol,

Répéter la même procédure effectuée précédemment et on garde les même conditions optimales précédentes (pH=7 , T=40°C , [H_2O_2]=10.6 mM, AE=7 UI/ml avec nombre des billes =20 billes, [2-nitrophénol]=45 mM, et le temps de contacte égale à 180 min). *(Azizi et all.2014)*

II.3.7. Réutilisation de l'enzyme encapsulé

Le test de reproductibilité de l'enzyme encapsulé a été réalisé en appliquant La même procédure précédente sous les conditions optimales et après 165 min les milieux sont centrifugés mais cette fois les billes aussi sont récupéré et laver avec de l'eau distillé puis on les conserve dans une solution tampon pH=7 pour les utilisés plusieurs fois. *(Azizi et all.2014)*

CHAPITRE III. RESULTATS & DESCUSSIONS

Ce chapitre présente les résultats qu'on a obtenu et leur interprétations .

III.1. Courbe d'étalonnage du 2-nitrophénol

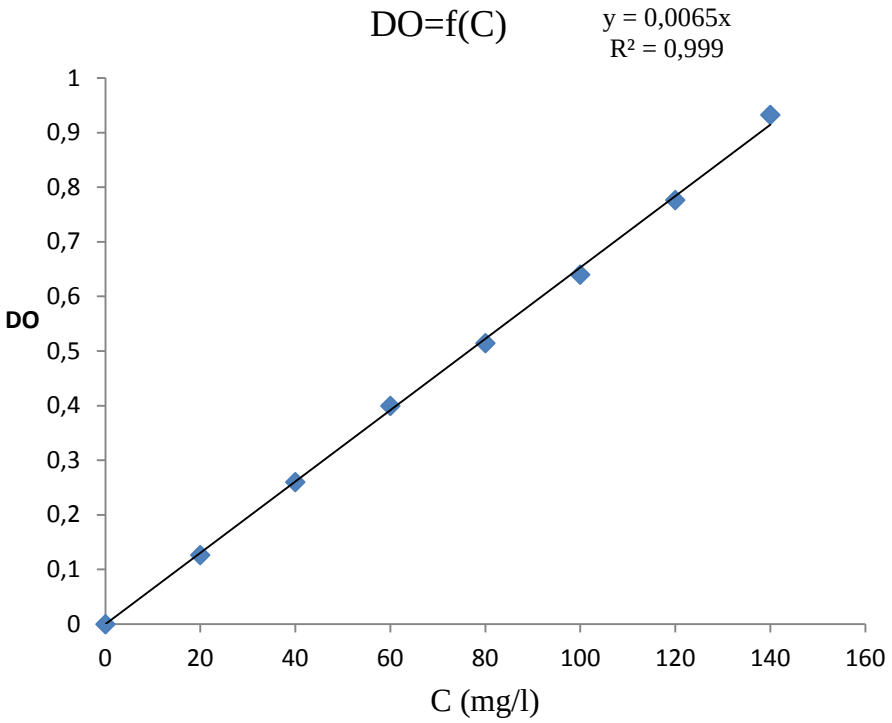


Fig III.1. Courbe d'étalonnage du 2-nitrophénol

Le coefficient d'extinction molaire du 2-nitrophénol est : ε=0.0065 l/mg.

III.2. Mesure de l'activité enzymatique de (EEB et EEPP).

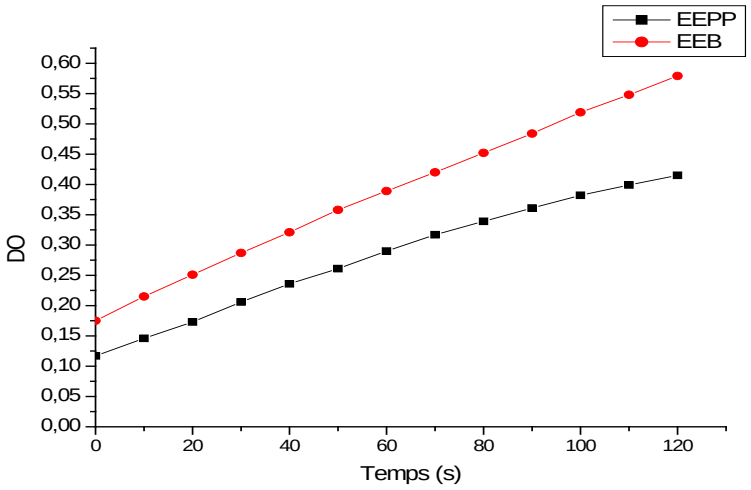


Figure III.2| La courbe des DO d'EEB et d'EEB en fonction Du temps

L'activité enzymatique est calculée par la méthode suivante :

$$AE\ (UI/ml) = \frac{\Delta Abs}{\frac{\Delta t}{60}(\min)} \frac{1}{\varepsilon(\frac{ml}{\mu mole})} \frac{v_{R(ml)}}{v_E(ml)} 10^{+3} \quad \text{.....(Eq III.1)}$$

Avec : ξ=7425l/mmol, V_R=4.2 ml , V_E=0,2 ml.

Avec ξ : coefficient d'extinction molaire de H_2O_2, V_R : volume du mélange réactionnel V_E : volume d'enzyme .

III.2. Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford de (EEB et EEPP)

La représentation graphique de DO en fonction de concentration d'albumine est illustrée sur la courbe suivante :

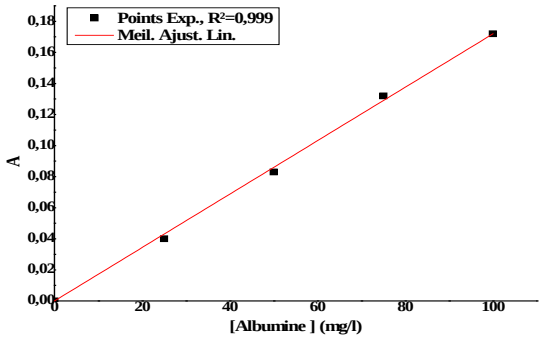


Figure III.3| Courbe d'étalonnage de l'albumine, λ=590 nm, avec une pente égal=0,001.

Caractéristique des d'EEB et d'EEPP :

Tableau III.1| Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la peroxydase

Étape	Protéines totales (mg/ml)	Activité (UI/ml)	Activité spécifique (UI/mg)	Facteur de purification	R%
EEB	64	6.30	0.0984	---	100
EEPP	34	4.26	0.1252	1.2723	67.619

Le tableau de la purification sert à montrer le rôle et l'efficacité de processus de purification en utilisant l'acétone. Il fait appel à des notions et à des termes précis. On exprime la pureté d'une préparation de protéines en parlant de son activité spécifique.

L'activité spécifique est l'activité enzymatique par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités enzymatiques par poids de protéines totales. Plus l'activité spécifique est élevée, plus l'enzyme est pure.

Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique, cette valeur est plus élevée par rapport à la première étape, dans notre cas la purification de l'EEB par fractionnement avec l'acétone permet d'augmenter deux fois l'activité spécifique de l'EEPP.

Le rendement de la purification est la proportion, en pourcentage (%), de l'activité de l'enzyme purifiée par rapport à la concentration en protéine initiale, puisqu'il est inévitable qu'on ait des pertes de matériel, et par conséquent la perte d'activité enzymatique. Le rendement diminue de 100 % à 67.61 % après la purification avec l'acétone.

La purification consiste donc en un "compromis" entre l'obtention d'une enzyme (Protéines) pure (facteur de purification élevé) et une activité maximale (pouvoircatalytique spécifique élevé).

III.4. Suivi des paramètres opératoires en fonction du rendement et la vitesse de biodégradation du nitrophénol

III.4.1 Suivi du pH

Le pH joue un rôle important sur l'activité enzymatique en particulier sur la capacité de dégradation du nitrophénol comme le montre la (figure III.4)

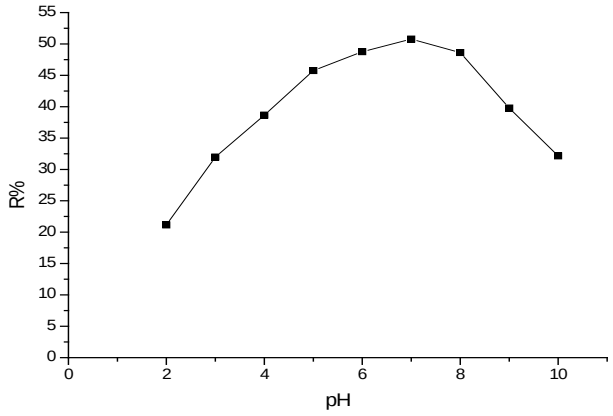


Figure III.4| Influence du pH du milieu sur le taux d'abattement du 2-nitrophénol, *[nitrophénol]=40 mg/l, [H_2O_2]=2.2 mM, T= 40°C, AE_t=4.22UI/ml, Nombre des billes=20, pH=2-10.*

On constate globalement qu'une augmentation du pH (de pH=2 à pH=7) accélère de manière notable la disparition du nitrophénol qui atteint un taux de 47,61 %.

Dans l'intervalle du pH allé de 8 à 10, le rendement chute et le procédé enzymatique est inhibé. Donc, nous choisissons de travailler avec une phase aqueuse de pH égal à 7.

Donc on peut dire que le pH est un effecteur très important car il agit directement sur plusieurs facteurs tel que :

- La liaison entre les substrats (H_2O_2 et nitrophénol).
- L'activité catalytique de la peroxydase : certains résidus d'acide aminé doivent se trouver dans un état d'ionisation spécifique pour l'activité de l'enzyme.
- La variation de la structure des protéines.

III.4.2. Suivi de la concentration du peroxyde d'hydrogène

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure III.5 :

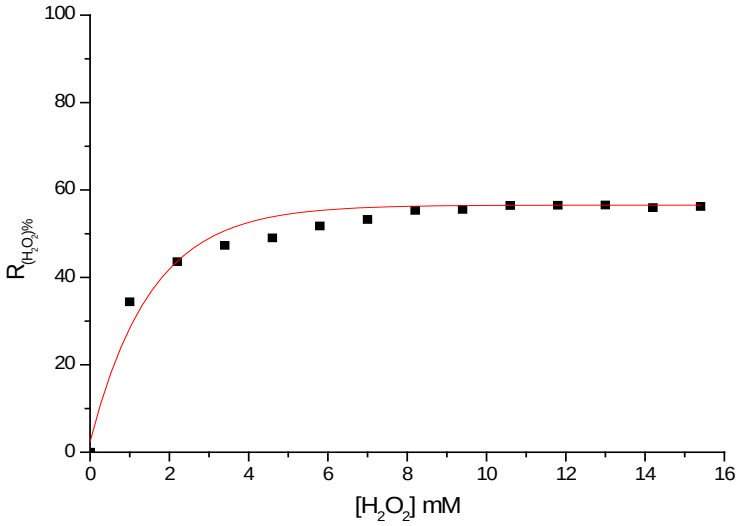


Figure III.5| Influence de la concentration du peroxyde d'hydrogène sur le taux d'abattement du nitrophénol, *[2-nitrophénol]=45 mg/l, pH=7, T= 40 °C, AE_t=4.22 UI/ml, Nombre des billes=20 billes,$[H_2O_2]$=1-15,4 mM.*

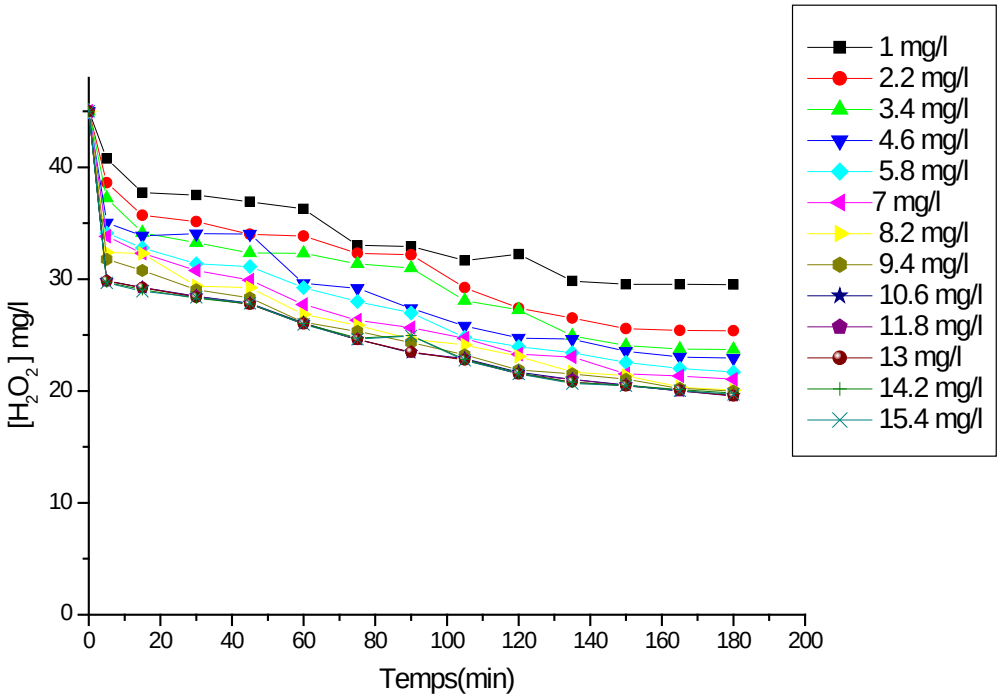


Figure III.6| Évolution temporelle de la concentration du 2-nitrophénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel, *[2-nitrohénol]=45 mg/l, $[H_2O_2]$=1-15.4 mM, AE_t=4.26 UI/ml, temps= 180 minute, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20 billes.*

D'après les résultats illustrés dans la figure III.5, nous constatons que le rendement de biodégradation augmente brusquement avec la concentration en peroxyde d'hydrogène jusqu'à l'obtention d'un palier. Le meilleur taux d'abattement est obtenu pour une concentration en peroxyde d'hydrogène de *10.6 mM* soit *56.44 %*.

Les valeurs des DO initiales et finales sont utilisées pour calculer le rendement de dégradation de2-nitrophénol selon la relation suivante:

$$R\ (\%) = (DO_{initial} - DO_{final}) / DO_{initial} * 100$$

Les figures (III.7et III.8) indiquent l'évolution temporelle de la concentration du phénol présent et leurs rendements d'éliminations respectivement dans le surnageant du milieu réactionnel. La concentration optimale à dégrader par ce procédé enzymatique a été effectué par le suivre de l'évolution des vitesses initiales de la réaction et les rendements correspondants en fonction des concentrations du phénol. Pour chaque cinétique, on trace une tangente, à partir de t = 0, correspondant à la plus grande portion "linéaire" (cette estimation visuelle dépend de l'expérimentateur). La pente de la tangente à l'origine de la cinétique (d[2-nitrophénol] /dt) s'appelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique, $\mathbf{V_0}$.

- **Représentation de lineweaver burk**

Pour améliorer la précision de la détermination graphique des constantes de la cinétique enzymatique, il existe des représentations graphiques qui linéarisant les résultats. Permettant des extrapolations plus précises. La méthode la plus connue est celle de Lineweaver et Burck dans laquelle on représente (1/V0) en fonction de$1/[H_2O_2]$.

Cette représentation permet donc à partir des mêmes données que précédemment de déterminer graphiquement les valeurs de $1/ V_{max}$ et de K_M qui corresponds à l'ordonnée à l'origine et au rapport(K_M/pente de la droite) respectivement .

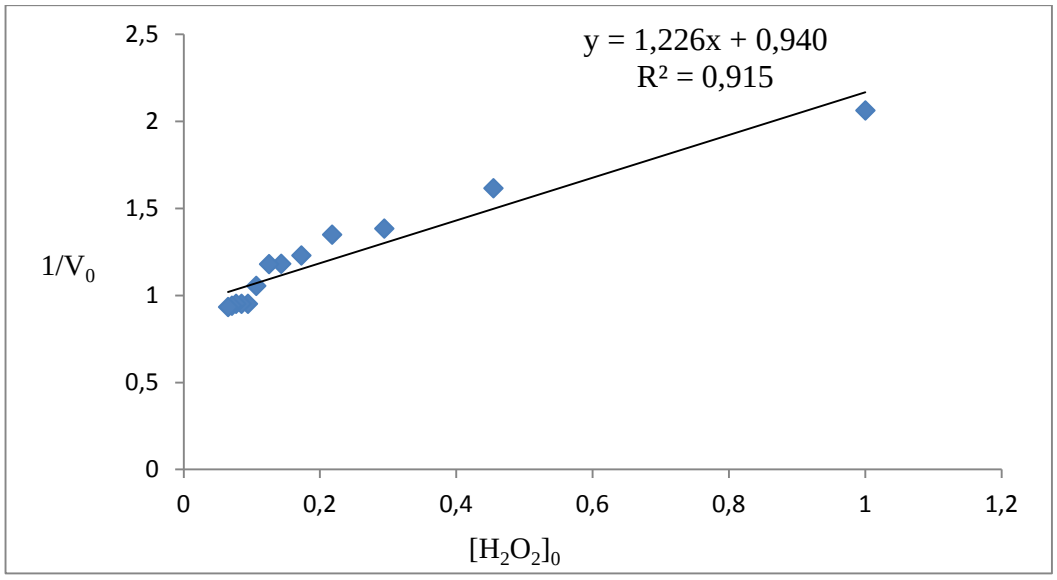


Figure III.7| Représentation graphique Lineweaver-Burk, *[H_2O_2]=1-15.4 mM [2-nitrophénol]=45 mg/l, temps= 180 minutes, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20 billes.*

Grâce à un ajustement par l'origine, nous avons obtenu pour la loi étudiée des droites avec un coefficient de corrélation satisfaisant (R^2=0,915). Les constantes de Lineweaver-Burk sont déterminés à partir de la linéarisation de l'équation III.2 comme :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[H_2O_2]_0} + \frac{[H_2O_2]_0}{V_{max}[H_2O_2]_0} \quad \text{.....(Eq.III.2)}$$

L'équation III.3.2 devient :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{6.27.10^{-6}}{7.10^{-6}[H_2O_2]_0} + \frac{[H_2O_2 l]_0}{7.10^{-6}[H_2O_2]_0} \quad \text{.....(Eq.III.3)}$$

Avec V_{max} =7.10^{-6} mM/min, K_m =6.27.10^{-6} mM

III.3.3. Effet de l'activité enzymatique totale

Calcul des activités des différentes concentrations d'EEPP

Tableau III.2: les différentes activités trouvées

Volume de dilution (ml)	2	3	4	5	6	7	8	9
AE (UI/ml)	2,138	3,32	5,51	6,7	7,32	8,06	9,79	11,31

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure III.8

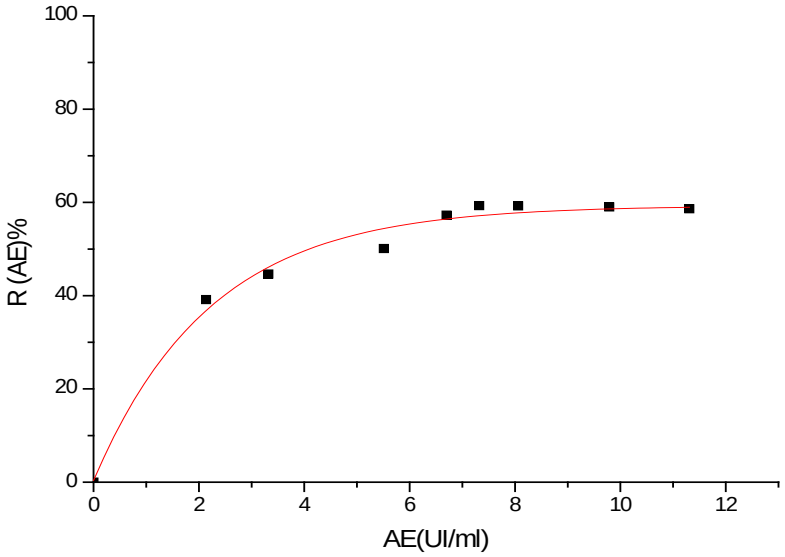


Figure III.8| Influence de l'activité enzymatique total sur le taux d'abattement du nitrophénol, *[2-nitrophénol]=45 mg/l, [H_2O_2]=10.6 mM, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20 billes, AE_t=2-11 UI/ml.*

D'après les résultats consignés dans la figure III.8, nous remarquons que le rendement de biodégradation du nitrophénol augmente de manière significative pour une faible activité enzymatique jusqu'à atteindre une valeur de *59.31 %* pour une *AE_t= 7.32 UI/ml*. Au-delà de cette valeur, cette augmentation devient très faible.

Le meilleur taux d'abattement est obtenu pour une activité enzymatique de *7.32 UI/ml* soit *59.31 %*. L'activité enzymatique optimale est de *7.32 UI/ml*.

III.3.4. Suivi de la concentration du nitrophénol

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures III.9 et III.10

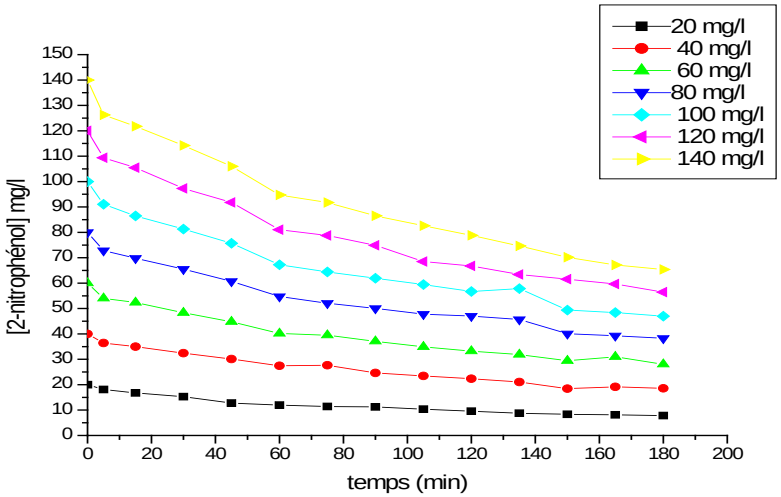


Figure III.9|Évolution temporelle de la vitesse de biodégradation du nitrophénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel, *[2-nitrohénol]=20-140 mg/l, [H_2O_2]=2.2 mM, AE_t=7.32 UI/ml, temps= 180 minute, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20 billes.*

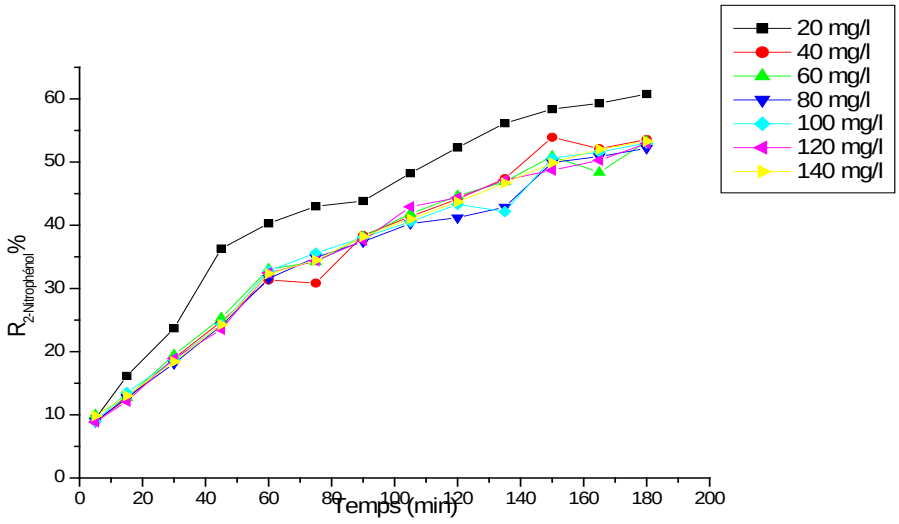


Figure III.10| Évolution temporelle du rendement de biodégradation du nitrophénol présent dans le surnageant du milieu réactionnel, *[2-nitrophénol]=[20-140] mg/l, [H_2O_2]=2.2 mM, AE_t=7.32 UI/ml, temps= 180 minute, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20 billes.*

Dans le but de déterminer la concentration du 2-nitrophénol optimal à éliminer par la peroxydase encapsulée, nous avons suivi la même méthode précédente.

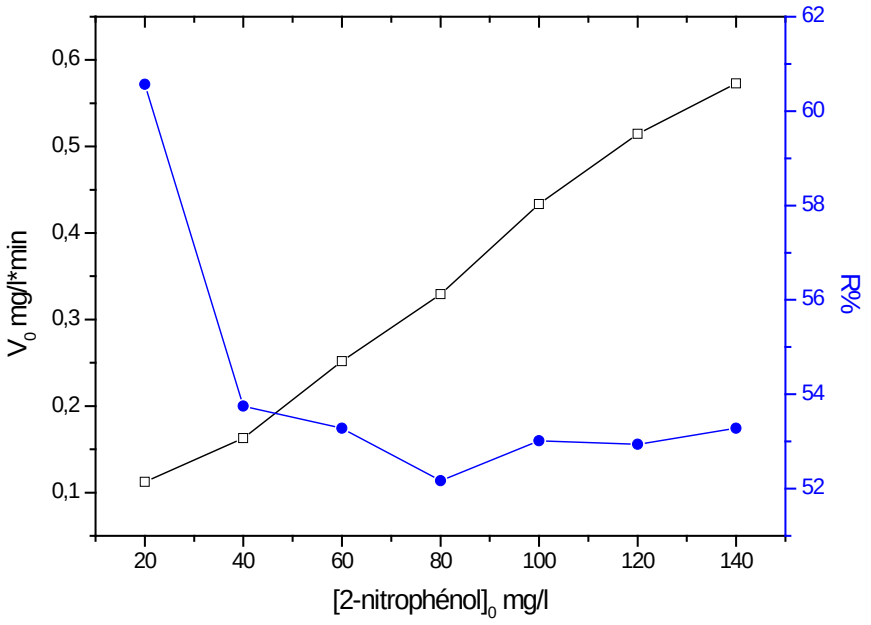


Figure III.11|Effet de la concentration initial du nitrophénol sur la vitesse initial et le rendement de biodégradation du 2-nitrophénol, *[2-nitrophénol]=45 mg/l, [H_2O_2]=2.2 mM, AE_t=7.32 UI/ml, temps= 180heures, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20 billes.*

D'après les résultats consignés sur la figure III.11, nous remarquons que l'évolution de la vitesse initiale est inversement proportionnelle avec l'évolution du rendement. Tel que les deux courbe *V_0= f([2-nitrophénol]) et R= f([2-nitrophénol])* sont coïncide dans le point de cordonnées *(V_0, R, [2-nitrophénol]$_0$)=(0,18.53,54.**45**)*. Ce point peut être considéré comme un point optimal.

- **Représentation de Lineweaver-Burk**

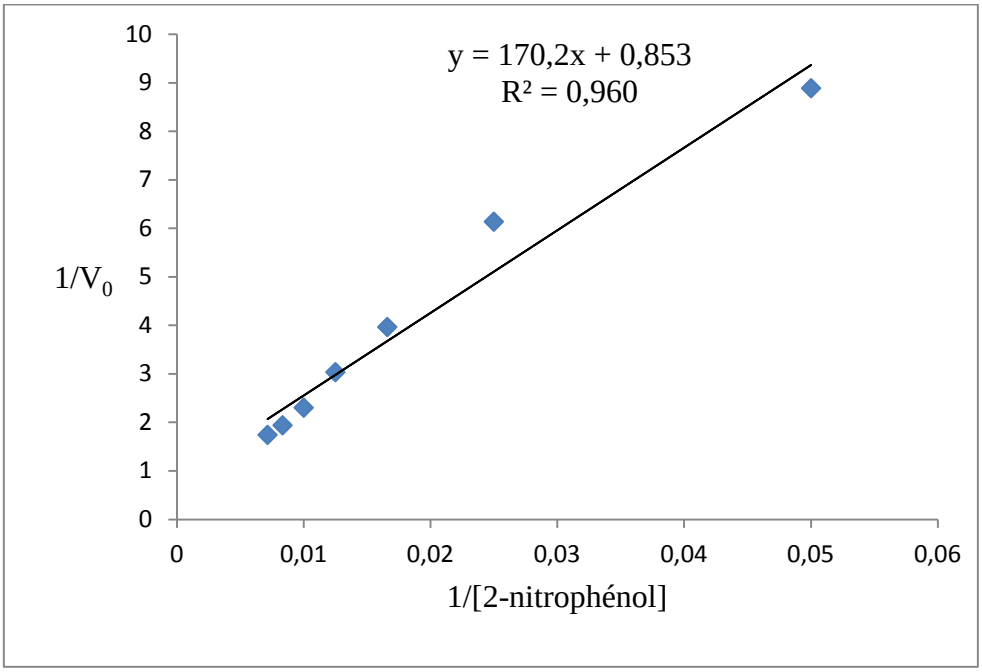


Figure III.12| Représentation graphique Lineweaver-Burk, *[2-nitrophénol]=(20-140) mg/l, [H_2O_2]=2.2 mM , temps= 180 minutes, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20 billes.*

Grâce à un ajustement par l'origine, nous avons obtenu pour la loi étudiée des droites avec un coefficient de corrélation satisfaisant (R^2=0,96). Les constantes de Lineweaver-Burk sont déterminés à partir de la linéarisation de l'équation III.12 comme :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[2-nitrophénol]_0} + \frac{[2-nitrophénol]_0}{V_{max}[2-nitrophénol]_0} \quad \text{.....(Eq.III.4)}$$

L'équation III.3.2 devient :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{4{,}94.10^{-5}}{8;4.10^{-6}[2-nitrophénol]_0} + \frac{[2-nitrophénol]_0}{4{,}94.10^{-5}[2-nitrophénol]_0} \quad \text{.....(Eq.III.5)}$$

Avec : V_{max} =8,42.10^{-6} mM/mn et K_m=4,94.10 $^{-5}$ mM.

III.3.5. Suivi de la biodégradation du 2-nitrophénol dans les conditions optimales

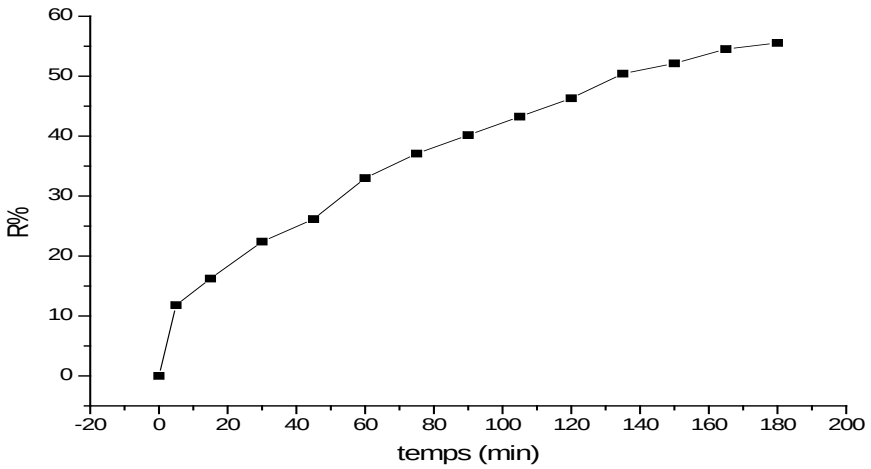


Figure III.13|Cinétiques de disparition du nitrophénol par la peroxydase encapsulées, *[2-nitrophénol]=45 mg/l, [H_2O_2]=10.6 mM, pH=7, T= 40 °C, Nombre des billes=20, AE_t= 7.32 UI/ml,*

Le taux d'abattement du nitrophénol atteint *55.56 %* au bout de *165* minutes de traitement. Ceci montre que l'oxydation est presque totale.

III.3.6.Réutilisation de l'enzyme encapsulé

Les résultats sont présentés sur la figure

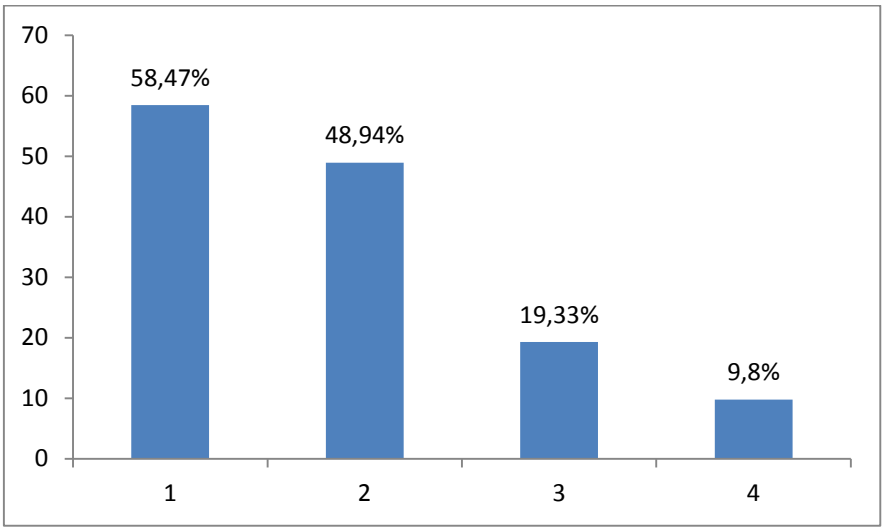


Figure III.14| Réutilisation de l'enzyme encapsulé, *[2-nitrophénol]=45 mg/l, [H_2O_2]=10.6 mM, pH=8, T= 40 °C, Nombre des billes=50, AE_t= 7.32 UI/ml, temps du contact=165 mn.*

Le rendement diminue brusquement dès la troisième réutilisation, où il passe de 58.47% à 19.33% et atteint 9.80% après la quatrième réutilisation .Cela est dû à l'accumulation de la matière polymérisée par la réaction enzymatique à l'intérieur des billes, qui se gonflent et changent leurs couleurs. (Ce phénomène gène la diffusion du produit vers l'extérieur et du nitrophénol vers l'intérieur des billes

III.4. Conclusion

Tableau III.3|Conditions optimales de la biodégradation du 2-Nitrophénol par la peroxydase immobilisée .

Paramètres	**Peroxydase immobilisée**
pH	7
T(°C)	40
$\mathbf{V_0}$(mM/s)	0,19
$\mathbf{[nitrophénol]_0}$(mg/l)	45
$\mathbf{[H_2O_2]_0}$(mM)	10.6
$\mathbf{AE_t}$(UI/ml)	7.32
Nombres des billes de peroxydase	20
Temps de traitement (mn)	165
R(%)	55.56
$\mathbf{[nitrophénol]_f}$(mg/l)	19.99

Le tableau III.4 montre que le procédé de la biodégradation du nitrophénol par l'enzyme immobilisé est un bon procédé pour le traitement des eaux usées.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude avait pour objectif l'étude de faisabilité de la méthode enzymatique pour le traitement de la pollution par les composes phénoliques. Il a été montré que la peroxydase est une enzyme appropriée pour le traitement des eaux usées contenant les composes phénoliques.

La peroxydase était obtenue à partir d'une source peu coûteuse et très disponible. Sa purification par l'acétone permet de conserver l'extrait enzymatique pour une durée qui dépasse deux mois. La stratégie expérimentale adoptée avait pour but l'optimisation des différents paramètres qui peuvent influencer l'activité de la peroxydase et le rendement de dégradation du 2-nitrophénol par la peroxydase.

Au cours de l'étude de réaction de dégradation de nitrophénol en présence de la peroxydase, on a trouvé que le pH optimal de dégradation de phénol est un pH neutre (pH=7).

La variation de température de mélange réactionnel a montré l'existence d'un domaine de stabilité thermique pour la peroxydase entre 20 et 40°C et le rendement de dégradation de phénol atteint sa valeur maximale au 40 °C.

L'étude de l'effet de concentration de H2O2 et de phénol sur la vitesse et le rendement de dégradation montre que la réaction suit une cinétique typiquement Michaëlienne. Les constantes cinétiques K_M et V_{max} ont étaient déterminées. Après l'optimisation de tous les facteurs, un rendement de dégradation de55.65% était atteint pour le 2-nitrophénol à une concentration de 45mg/l avec une concentration d'H_2O_2 de 10.6mM et d'EEPP de 7.32UI/ml pendant 165mn .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Albinet. A, C. Minero, D. Vione**, UVA irradiation induces direct phototransformation of 2,4-dinitrophenol in surface water samples, Chemosphere 80 (2010) 759-763.
2. An improved UV/Fe3+ process by combination with electrocatalysis for p-nitrophenol degradation, Chemosphere 63(2006)1032-1040
3. **Baek, K., Kim, B-K, et Yang, J.W**. "Application of micellar enhanced ultrafiltration for nutrients removal." Desalination 156(1-3): 137-144, (2003).
4. **Banat, F. A., Al-Bashir, B., Al-Asheh, S, et Hayajneh**, O. "Adsorption of phenol by bentonite." Environmental Pollution 107(3): 391-398, (2000).
5. **Borisover, M., Graber, E. R., Bercovich, F, et Gerstl, Z**. "Suitability of dye-clay complexes for removal of non-ionic organic compounds from aqueous solutions." Chemosphere 44(5): 1033-1040, (2001).
6. **Brusk, F; Breford, J; and Vorlop, K-D**. 1998. Bioencapsulation, alginate et extrusion par coupure de jet.
7. **Brusk, F; Breford, J; and Vorlop, K-D.** 1998. Bioencapsulation, alginate et extrusion par coupure de jet.
8. **Busc, G; Berardinelli, S ; Resini, C ; Arrighi**, L. 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. Journal of Hazardous Materials 160, 265-288.
9. **Chaplin, M**. 2002. Enzyme technology
10. **Das, S., Banthia, A. K, et Adhikari, B**. "Porous polyurethane urea membranes for pervaporation separation of phenol and chlorophenols from water." Chemical Engineering Journal 138(1-3): 215-223, (2008).
11. **Doumèche. B**(2002). Fundamental phenomenological description and experimental Optimisation of gel-stabilized biocatalysts in a two-phase system. These de doctorat. RWTHAachen, Allemagne.
12. **Durand, G; et Monsan, P**. 1982. Biochimie appliqué: Les enzymes production et utilisation industrielle: Bordas, Paris.
13. **Edward, L; Baker, M.D; Philip, J; Landrigan, M.D**. 1978. Phenol Poisoning Due to Contaminated Drinking Water
14. **Furniss. B.S, A. J.Hannaford, V. Rogers, P. W. G. Smith, A. R. Tatchell, Vogel'S**.4ème edition, The English Language Book Society and Longman, 1978.
15. Gamma radiation-induced degradation of p-nitrophenol (PNP) in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) in aqueous solution, Journal of Hazardous.
16. **Halhouli, K. A., Darwish, N. A, et Al-Jahmany, Y**. "Effect of temperature and inorganic salts on the adsorption of phenol from multicomponent system on a decolorizing carbon."Separation Science and Technology 32: 3027-3036, (1997).
17. **Hebatpuria, V. M., Arafat, H. A., Rho, H. S., Bishop, P. L., Pinto, N. G, et Buchanan, C**. "Immobilization of phenol in cement-based solidified/stabilized hazardous wastes using regenerated activated carbon: leaching studies." Journal of Hazardous Materials 70(3): 117-138, (1999).
18. **Huang, J., Wang, X., Jin, Q., Liu, Y, et Wang, Y**. "Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite." Journal of Environmental Management 84(2): 229-236, (2007).

19. **Jiang, H., Fang, Y., Fu, Y, et Guo, Q-X**. "Studies on the extraction of phenol in wastewater." Journal of Hazardous Materials 101(2): 179-190, (2003).
20. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 26. 2006. WWW. JORADP. DZ.
21. **Korzystka, B., Adamczak, H., Sobczynska, A, et Szymanowski, J.** "Ultrafiltration characteristics of colloid solutions containing oxyethylated methyl dodecanoate, hexadecyltrimethylammonium bromide and selected phenols as pollutants." Colloids and Surfaces A 212: 175-183, (2003).
22. **Kusic. H, Koprivanac, N., Bozic, A. L, et Selanec**, I. "Photo-assisted Fenton type processes for the degradation of phenol: A kinetic study." Journal of Hazardous Materials 136(3): 632-644, (2006).
23. Les normes européennes. C.I.eau. www.cieau(2005).com.
24. **Li, N. N.** "Separation of hydrocarbons by liquid membrane permeation." Industrial and Engineering Chemistry 10: 215, (1971).
25. **Linden, G; et Lorient, D.** 1994. Biochimie agroindustrielle : Valorisation alimentaire de la production agricole : Masson; Paris.
26. **Kulkarni. M, A. Chaudhari,** Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview, Journal of Environmental Management 85 (2007) 496-512.
27. **An. M,** 1999. Domestic Wastwater Treatment Using Immobilized Sludge Process. Thèse de Magistère. University of British Columbia.
28. **Marconi, W**. 1989. Immobilized enzymes: Their catalytic behaviour and their industial and analytical applications. Reactive Polymers, 11, 1-19.
29. **Matta, R., Hanna, K, et Chiron, S**. "Oxidation of phenol by green rust and hydrogen peroxide at neutral pH." Separation and Purification Technology 61(3): 442-446, (2008).
30. **Milovanovic A; Bozica N.and Vujcicb Z**. 2007. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads, Food chemistry 104, 81-86.
31. **Mollah, A. H, et and Robinson, C. W**. "Pentachlorophenol adsorption and desorption characteristics of granular activated carbon--I. Isotherms." Water Research 30(12): 2901-2906, (1996).
32. **Namane. A.** 2006. Adsorption- biodégradation du phénol par Pseudomonas aeruginosa immobilise sur du charbon actif en grains. Thèse de Doctorat, ENP El Harrach, Alger
33. **Aktas. Ö ¸ F. çeçen**, Adsorption and cometabolic bioregeneration in activated carbon treatment of 2-nitrophenol, Journal of Hazardous Materials 177 (2010) 956-961
34. **Ohmri, Y; Kurokawa, Y**. 1994. Preparation of fibre-entrapped enzyme using cellulose acetate-titanium-iso-propoxide composite as gel matrix: Elsevier Science B.V. 205-208.
35. **Ye .P, A. T. Lemley**, Adsorption effect on the degradation of 4,6-o-dinitrocresol and p-nitrophenol, Water Research 43 (2009) 1303-1312.
36. **Palma, M. S. A., Paiva, J. L., Zilli, M, et Converti, A**. "Batch phenol removal from methyl isobutyl ketone by liquid-liquid extraction with chemical reaction." Chemical Engineering and Processing 46(8): 764-768, (2007).
37. **Pan, G, et Kurumada, K-I**. "Hybrid gel reinforced with coating layer for removal of phenol from aqueous solution." Chemical Engineering Journal 138(1-3): 194-199, (2008).
38. **Paul Arnaud**, Chimie organique, Exercices résolus, 3ème édition refondue et augmentée, 6ème tirage Dunod,Paris, 1991.

39. **Pelmont, J.** 1993. Enzymes: Office des publications universitaires; Alger. 24-27.
40. **Rengaraj, S., Moon S-H., Sivabalan, R., Arabindoo, B, et Murugesan, V**. "Removal of phenol from aqueous solution and resin manufacturing industry wastewater using an agricultural waste: rubber seed coat." Journal of Hazardous Materials 89(2-3): 185- 196, (2002).
41. **Romanovskaya, I.I; Shesterenko, Y.A; and Sevast'yanov,** O.V. 2009. Elimination of Phenol with the Use of Tyrosinase of Fungi. Journal of Water Chemistry and Technology, 31, 135-138.
42. **Salehi.Z, H. Yoshikawa, R. Mineta, Y.Kawase**, Aerobic biodegradation of p-nitrophenol Process Biochemistry 46 (2011) 284-289.
43. **Scriban, R**. 1993 Biotechnologie; Edition : Lavoisier; Paris.
44. **Hirooka .T, H. Nagase, K. Hirata, K.Miyamoto**, Degradation of 2,4-dinitrophenol by a mixed culture of photoautotrophic microorganisms, Biochemical Engineering Journal 29 (2006) 157-162
45. **Tansakul, C**. "Procédés hybrides à membranes pour le prétraitement d'eau de mer avant dessalement par osmose inverse." Thèse, Université de Toulouse, (2009).
46. **Tay, J-H., Tay, S., Liu, Y., Show, K. Y, et Ivanov, V**. "Biogranulation technologies for wastewater treatment." Livre, 1er edition, UK, (ELSEVIER): 180-208, (2006).
47. **Tombàcz, E., Szekeres, M., Baranyi, L, et Michéli, E**. "Surface modification of clay minerals by organic polyions." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 141(3): 379-384, (1998).
48. **Tziotzios, G., Economou, C. N., Lyberatos, G, et Vayenas, D. V**. "Effect of the specific surface area and operating mode on biological phenol removal using packed bed reactors." Desalination 211(1-3): 128-137, (2007).
49. **Venkatachalam, N., Palanichamy, M., et Murugesan, V**. "Sol-gel preparation and characterization of alkaline earth metal doped nano TiO2: Efficient photocatalytic degradation of 4-chlorophenol." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 273(1- 2): 177-185, (2007).
50. **Wang.N.S**. 1996. Experiment N.O. 7B Enzyme immobilization protocol entrapment in alginate gel.
51. **Wong, T.C; Luh, B.S; and Whitaker,** J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. Plant Physiol. 48, 19-23.

ANNEXES

A.1. la détermination de la longueur d'onde du 2-Nitrophénol

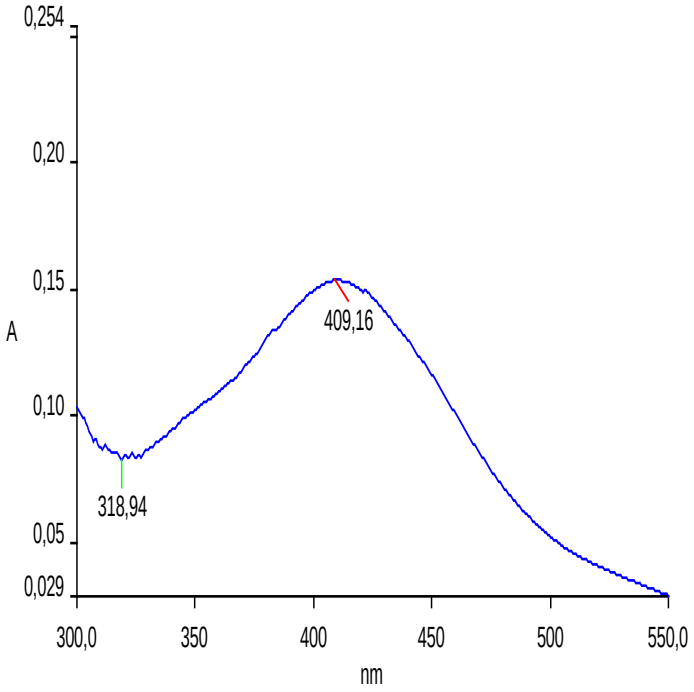


Figure A.1. Spectre d'absorption dans le domaine visible de 2-nitrophénol

A.2 Méthode de dosage des protéines totales par la méthode de Bradford (mg/l) de (EEB et EEPP).

Les résultats sont donnés sur le tableau **(A.3)** :

Extraits	**DO**	**C (mg/l)**
Brut (EEB)	0.064	94
Purifie (EEPP)	0.034	83

Tableau A.3| Dosage de la quantité des protéines.

A.3 Dosage de l'activité enzymatique des billes encapsulées

L'activité enzymatique en (UI/ml) de l'enzyme piégé dans l'alginate de calcium a été calculée par la relation suivante:

$$AE_i = \frac{AE_l \times V_l - \left[AE_r \times V_r + AE_{CaCl2} \times V_{CaCl2} + AE_{sc} \times V_{sc}\right]}{N} \quad \text{.....(Eq..A.4)}$$

Avec :

AE_i : Activité enzymatique de l'enzyme immobilisée, *UI/ml*.

AE_l et V_l: Activité enzymatique *(UI/ml)* et volume de l'enzyme libre *(ml)* respectivement.

AE_{sc} et V_{sc} : Activité enzymatique *(UI/ml)* et volume de la solution de conservation*(ml)* respectivement.

AE_{Cacl2} et V_{Cacl2} : Activité enzymatique *(UI/ml)* et volume de la solution de Chlorure de calcium *(ml)* respectivement.