UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **:**

Master En Chimie

Spécialité : Chimie Macromoléculaire

Par :
Benali Sarah
Belkhada bilal

Thème :

Formulation de quelques systèmes micro-encapsulés : optimisation et caractérisation

Soutenu publiquement/ le 22 /06 /2022, devant le jury composé de :

ARBIA Wassila	Grade : MCA	UYFM	Présidente
MIMI Nassiba	Grade : MCB	UYFM	Examinatrice
BOUCHERIT Nabila	Grade : MCA	UYFM	Encadreur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Remerciement et Louange à ALLAH, Tout Puissant, Seigneur des Mondes qui nous a accordé la santé, le courage et la force pour la réalisation et la finition de ce travail.

Nous remercions tout particulièrement notre promotrice Mme ***boucherit Nabila****. A pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportées, pour ses remarques et ses conseils avisés, qui nous ont permis de mener à bien ce travail.*

Nous remercions également Mme ARBIA. W et Mme MIMI.N qui nous ont fait honneur de juger ce travail.

A toutes personnes ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apportées leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.

Sarah B et Bilal B

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.

A ma mère :

Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.

Tout ce qui je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte.

En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour le remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.

A mon père :

L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect.

Aucun de dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que dieu vous bénisse et vous accorde un paradis spacieux.

Je dédie aussi ce travail à :

Mon grand-père et ma grand-mère

Mes chers frères

Mes chères sœurs

Mes oncles, mes tantes et leurs familles.

Tous mes coussins et cousines

A mes amies proches

A toutes les personnes qui ont participé a l'élaboration de ce travail à tous mes collègues et tous ceux que j'ai omis de citer.

Sarah B

Dédicaces

Nous remercions tout d'abord, notre allah qui nous a donné la force pour

Terminer ce travail de recherche.

A mes chers parents ma mère et mon père pour leu patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

Je tiens à remercier tout particulièrement

A les ingénieurs du labo SM

A mon binôme

Ma promotrice madame Boucherit N.

A mes frères

A mes ami(e)s et mes camarades et surtout les amis de la spécialité chimie macromoléculaire

Tous les enseignants SM.

Tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin.

Bilal B

Résumé

ملخص

من خلال هذا العمل ، نهدف من ناحية إلى استخراج البيروكسيداز من اللفت الأبيض وتنقيته ، ومن ناحية أخرى، نهدف إلى تحضير ودراسة خصائص الجسيمات الدقيقة لألجينات الصوديوم بطريقة الاستحلاب / التجلط الخارجي ثم بواسطة الهلام المؤثر على التقلص العضلي. تهدف هذه العملية الأخيرة أيضًا إلى تغليف البيروكسيداز من خلال دراسة تأثيرات العوامل التي تعتمد عليها التركيبة ، وهي: تركيز ألجينات الصوديوم ، وتركيز كلوريد الكالسيوم.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها النشاط الأنزيمي للإنزيم الحر والمجمد: 8.72 وحدة دولية / مل و 0.6 وحدة دولية / جم على التوالي. وبالتالي ، فإن تطبيق الإنزيم الحر والمثبت على المحاليل المائية للكلورتتراسيكلين أدى إلى أقصى عائد تحويل: 74.35 و 66.66٪ على التوالي. تحليل FTIR ، لتأكيد تثبيت البيروكسيديز في جزيئات ألجينات الكالسيوم من ناحية والتحول الأنزيمي لجزيئات الكلورتتراسيكلين من ناحية أخرى.

الكلمات المفتاحية: الجينات الصوديوم ، الاستحلاب ، الهلام ، البيروكسيداز ، التثبيت.

Rèsumé

A travers ce travail, nous visons, d'une part, à extraire la peroxydase du navet blanc et à la purifier, et d'autre part, nous visons à préparer et étudier les propriétés des microparticules d'alginate de sodium par la méthode d'émulsification/ gélification externe puis par gélification ionotropique. Ce dernier procédé vise également à encapsuler la peroxydase en étudiant les effets de facteurs dont dépend la composition, à savoir : la concentration d'alginate de sodium, et celle de chlorure de calcium.

Les résultats obtenus montrent des activités enzymatiques de l'enzyme libre et immobilisées : 8.72 UI/ml et 0.6 UI/g respectivement. Ainsi, l'application de l'enzyme libre et immobilisée sur des solutions aqueuses de chlortetracyline, a conduit aux rendement de transformation maximaux de : 74.35 et 66.66 % respectivement. L'analyse FTIR, à confirmer d'une part l'immobilisation de la peroxydase dans les particules d'alginate de calcium et d'autre la transformation enzymatique des molécules de chlortetracycline.

Mots clés : Alginate de sodium, Emulsification, Gélification,Peroxydase, Immobilisation.

Abstract

Through this work, we aim, on the one hand, to extract peroxidase from white turnip and purify it, and on the other hand, we aim to prepare and study the properties of sodium alginate microparticles by the method of emulsification/external gelation then by ionotropic gelation. This latter process also aims to encapsulate the peroxidase by studying the effects of factors on which the composition depends, namely: the concentration of sodium alginate, and that of calcium chloride.

The results obtained show enzymatic activities of the free and immobilized enzyme: 8.72 IU/ml and 0.6 IU/g respectively. Thus, the application of the free and immobilized enzyme on aqueous solutions of chlortetracycline, led to the maximum transformation yield of: 74.35 and 66.66% respectively. FTIR analysis, to confirm on the one hand the immobilization of peroxidase in the calcium alginate particles and on the other the enzymatic transformation of the chlortetracycline molecules.

Keywords: Sodium alginate, emulsification, gelation, peroxidase, immobilization.

Sommaire

Liste de figures		
Liste de tableaux		
Abréviations et nomenclature		
Introduction générale		1
Chapitre I :	**les enzymes**	
I.1	Introduction	3
I.2	Généralités	3
I.2.1	Définition	3
I.2.2	Structure	4
I.2.3	Utilisation industrielles	4
I.3	La peroxydase	6
I.3.1	Définitions	6
I.3.2	Structure moléculaire	6
I.3.3	Cycle catalytique de la peroxydase	7
I.3.4	Sources et classification	8
I.3.5	Application des peroxydases	9
I.3.6	Domaines d'utilisation des peroxydases	9
Chapitre II:	**immobilisation des enzymes**	
II.1	Introduction	11
II.2	Généralités	11
II.3	Techniques d'immobilisation	12
II.4	Immobilisation par inclusion	14
II.5	Supports d'immobilisation	16
II.6	Application d'immobilisation des enzymes	21
II.7	Propriétés des enzymes immobilisées	22
II.7.1	Propriétés physico-chimiques	22
II.7.2	Propriétés cinétiques	22
II.8	Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique	23
II.8.1	Le microenvironnement	23
II.8.2	La Stabilité	23

Chapitre III:	**Matériel et méthodes**	
III.1	Objectifs	25
III.2	Présentation des matières premières	25
III.2.1	Réactifs chimiques	25
III.2.2	Chlorotétracycline	26
III.2.3	Alginate de sodium	26
III.3	Matériel utilisé	27
III.4	Méthodes expérimentales et techniques de caractérisation	28
III.4.1	Préparation des solutions tampons	28
III.4.2	Caractérisations spectrales du chlorotétracycline	28
III.4.3	Extraction purification de la peroxydase de navet blanc	30
III.4.4	Mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase	33
III.4.5	Immobilisation de la peroxydase par gélification	34
III.4.6	Transformation de la CTC par la peroxydase du navet blanc libre et immobilisée	40
Chapitre IV :	**Résultats et discussions**	
IV.1	Introduction	42
IV.2	Détermination de l'activité enzymatique de l'EEPP de navet	42
IV.3	Immobilisation de la peroxydase extraite par émulsification-gélification externe	43
IV.3.1	Emulsification	43
IV.3.2	Gélification	44
IV.4	Gélification ionotropique	45
IV.5	Caractérisation de l'activité enzymatique de la peroxydase immobilisée	46
IV.6	Caractérisation par FTIR des billes obtenues	49
IV.7	Transformation de la CTC par la peroxydase du navet blanc libre et immobilisée	54
IV.7.1	Caractérisations spectrales du CTC	54
IV.7.2	Résultats de rendement de transformation de la CTC par la peroxydase libre et immobilisée	57

IV.7.3	Caractérisation des produits de transformation de la CTC issus du traitement enzymatique	58
IV.7.4	Caractérisation du précipité obtenu après traitement enzymatique par spectrométrie FTIR	60
Conclusion générale		62
Références bibliographiques		

Liste des figures

Liste des figures

Chapitre I : Les enzymes		
Figure I.1	Structure de la peroxydase du HRP	***6***
Figure I.2	Structure de Ferri roto- porphyrine IX des peroxydases	***7***
Figure I.3	Cycle catalytique de la peroxydase	***8***
Chapitre II : Immobilisation des enzymes		
Figure II.1	Différentes techniques d'immobilisations des enzymes	***12***
Figure II.2	Etapes du procédé émulsification/gélification externe	***15***
Figure II.3	Etapes du procédé émulsification/gélification interne,	***16***
Figure II.4	Etapes du procédé d'extrusion, cas s'alginate de sodium	*16*
Figure II.5	Structure des blocs: (1- 4) β-D-mannuronate (M) et(1 - 4) α-L-guluronate (G) d'alginate de sodium	***20***
Figure II.6	Mécanisme de la formation du gel d'alginate de calcium	***20***
Figure II.7	Modification de la conformation et de l'accessibilité du site catalytique de l'enzyme du a son immobilisation	24
Chapitre III : Matériel et méthodes		
Figure III.1	Structure chimique d'alginate de sodium	***26***
Figure III.2	Spectrophotomètre UV visible utilisé.	***29***
Figure III.3	Principaux composants d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier	***30***
Figure III.4	Protocole expérimental d'extraction de la peroxydase de navet.	***31***
Figure III.5	Protocol expérimental de purification de la peroxydase de navet.	***32***
Figure III.6	Produits colorés formés de la réaction colorimétrique pour différentes concentration de peroxyde d'hydrogène.	***34***
Figure III.7	Phase aqueuse : EEPP+Alginate de Na.	***35***

Figure III.8	Phase organique : huile de paraffine + Span 80.	***35***
Figure III.9	Emulsion préparée : eau dans huile.	***35***
Figure III.10	**P**rotocole de gélification de la peroxydase dans les billes d'alginates de Ca.	***39***
Chapitre IV : Résultats et discussions		
Figure IV.1	Cinétique enzymatique de réaction de transformation du phénol par la peroxydase de navet à λmax= 580nm.	***42***
Figure IV.2	Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène, ε =1495 L/mol.cm.	***42***
Figure IV.3	Vues microscopiques des émulsions E/H formulées.	***43***
Figure IV.4	Aspect des microparticules pendant la gélification avec le chlorure de calcium.	***45***
Figure IV.5	Aspect des microparticules qui ont subi la filtration.	***45***
Figure IV.6	Cinétique enzymatique des billes d'alginates de Ca-peroxydase des formulations F3 à F6.	***46***
Figure IV.7	Cinétique enzymatique des filtrats obtenus des formulations F3 à F6.	***47***
Figure IV.8	Spectre FTIR de l'alginate de sodium	***50***
Figure IV.9	Spectre FTIR de la peroxydase	***51***
Figure IV.10	Spectre FTIR des billes l'alginate de Ca-peroxydase pour les formulations F3 et F4	***53***
Figure IV.11	Spectre FTIR des billes l'alginate de Ca-peroxydase pour les formulations F5 et F6.	***53***
Figure IV.12	Spectre d'absorption UV-Vis de la molécule CTC (10 mg/L)	***55***
Figure IV.13	Courbe d'étalonnage de la CTC.	***55***
Figure IV.14	Spectre FTIR de la molécule CTC.	***56***
Figure IV.15	Analyse UV-Vis de la solution du CTC (10mg),avant et après traitement enzymatique.	***58***
Figure IV.16	La solution du CTC enzymatique avant et après la centrifugation.	***59***

Figure IV.17	Spectres FTIR de CTC et son précipité après traitement enzymatique.	***60***

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Chapitre I : Les enzymes		
Tableau.I.1	Applications industrielles de certaines enzymes courantes	5
Chapitre II : Immobilisation des enzymes		
Tableau. II.1	Méthodes d'immobilisation des enzymes et applications	***13***
Tableau. II.2	Matériaux inorganiques, leurs propriétés et les enzymes immobilisées	***18***
Tableau. II.3	Matériaux organiques naturels, leurs propriétés et les enzymes immobilisées	***19***
Tableau. II.4	Domaines d'applications des enzymes immobilisées,	*22*
Chapitre III : Matériel et méthodes		
Tableau. III.1	Réactifs chimiques utilisés et leurs caractéristiques	***25***
Tableau. III.2	Caractéristiques physico-chimiques du Chlorhydrate de chlorotétracycline utilisé	***26***
Tableau. III.3	Caractéristiques physico-chimiques de l'alginate de sodium (Sigma-Aldrich).	***27***
Tableau. III.4	Matériel utilisé.	***27***
Tableau. III.5	Paramètres et niveaux choisis pour la préparation des microsphères de peroxydase	***36***
Tableau. III.6	Combinaisons des différents essais (L9).	***36***
Tableau. III.7	Paramètres et niveaux choisis pour la préparation des particules de peroxydase.	***37***
Tableau. III.8	Compositions des différents essais (L9)	***37***
Tableau. III.9	Paramètres et niveaux choisis pour la préparation des	***41***

	microsphères de Peroxydase.	
Tableau. III.10	Combinaison des différents essais (L9).	***41***
Chapitre IV : Résultats et discussions		
Tableau. IV.1	Equations des courbes d'étalonnage et les coefficients de corrélation correspondant de la peroxydase immobilisée et des filtrats correspondants.	***48***
Tableau. IV.2	Détermination des paramètres : EI,AE_F, AR des billes d'alginate obtenues.	***48***
Tableau. IV.3	Bandes caractéristiques du spectre FTIR d'alginate de sodium	***50***
Tableau. IV.4	Bandes caractéristiques du spectre FTIR de la peroxydase	***52***
Tableau. IV.5	Bandes caractéristiques du spectre FTIR des billes l'alginate De Ca-peroxydase pour les formulations : F3, F4, F5 et F6.	***54***
Tableau. IV.6	Bandes caractéristiques du spectre FTIR de la molécule CTC	***56***
Tableau. IV.7	Résultats des RDT de la CTC par peroxydase libre et immobilisée	***57***
Tableau. IV.8	Bandes caractéristiques du spectre FTIR du précipité de la CTC.	***60***

Liste des abréviations

Et nomenclature

Abréviation	***Signification***	***Unité***
pH	*Potentiel d'hydrogène*	....
FTIR	*Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier*	....
UV-Vis	*Ultra-Violet –Visible*	....
PA	*Principe actif*	....
PH	*Phase Huileuse*	....
E/H	*Emulsion eau dans huile*	....
DO	*Densité optique*	....
Alg Na	*Alginate de sodium*	....
EEB EEPP	*Extrait enzymatique brut*	....
AE	*Extrait enzymatique partiellement purifiè*	....
V_m	*Activité enzymatique*	*UI/ml*
V_e	*Volume de mélange*	*ml*
	Volume enzymatique	*ml*

Symbole	***Signification***	***Unité***
λ	*Longueur d'onde*	*nm*
λmax	*Longueur d'onde correspondante à l'absorption maximale*	*nm*
ε	*Coefficient d'extinction molaire*	*L/mg*

Introduction générale

Introduction Générale

La contamination des ressources en eau, principalement au niveau de la qualité, est un problème qui se pose avec acuité ces vingt dernières années. Les effluents d'origine industrielle, agricole et domestique sont souvent chargés de polluants peu ou non biodégradables. Leur impact sur la faune et la flore est très néfaste. Une sensibilisation des acteurs socio-économiques et du public, accompagnée d'une sévère réglementation en rapport avec les rejets, contribueraient à lutter contre cette dérive et permettraient ainsi de sauvegarder ce qui peut encore l'être [1].

A l'instar des autres pays bien avancés au niveau de la protection de l'environnement,

l'Algérie fait des efforts considérables, en promulguant des lois qui contraindraient les Industriels en fonction de leur activité à s'équiper d'unités de traitement des eaux pour diminuer la charge polluante des effluents avant leur déversement dans les cours d'eau outans la mer via les réseaux d'assainissement [1].

Parmi les industries consommatrices d'eau en grande quantité, on trouve celle du textile avec celle de la tannerie en tête de liste. Les secteurs de teintures, de l'impression ou du finissage du textile y occupent une place de choix. Ces activités génèrent une pollution importante en eaux résiduaires. Ces effluents sont très chargés en colorants acides ou basiques, des sels et des adjuvants [1].

L'utilisation des enzymes est connue depuis longtemps, mais leur emploi a été développé après la mise au point des différentes méthodes d'extraction, de séparation et de purification sans altérer leur fonctionnement. Ceci a permis de les utiliser dans des applications à l'échelle industrielle [2].

Les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une

Large gamme de substrats, en utilisant le peroxyde d'hydrogène, Elles ont plusieurs applications dans divers domaines comme : la dégradation des déchets industriels et des polluants de l'industrie du papier et des détergents. La plante *Brassicarapa*ou navet, est considérée comme une importante source naturelle d'antioxydants. De plus, en médecine traditionnelle, *Brassicarapa* est utilisé pour traiter une variété de maladies comme l'hépatite, ictère, furoncle, et les maux de gorge. Le navet contient de nombreux composés biologiquement actifs, tels que des flavonoïdes [3].

Certains polysaccharides naturellement issus de certaines variétés d'algues marines brunes comme les alginates sont utilisés dans le domaine médical. Grace à ses propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité, l'alginate de sodium est utilisé dans la libération contrôlée des principes actifs encapsulés [4].

Introduction Générale

L'objectif de notre travail, s'oriente vers l'extraction et la purification de peroxydase de navet (*Brassicarapa)* en vue de l'appliquer à l'état libre et à l'état immobilisé sur des solutions synthétiques de la chlorotétracycline. Cette étude est basée sur l'utilisation des plans d'expériences (méthode de Taguchi) en vue de montrer l'effet des paramètres dont dépend la transformation voire l'élimination de ce micropolluant, à savoir : la concentration de chlorotétracycline, la concentration du peroxyde d'hydrogène et le pH.

Pour ce faire, notre manuscrit se décompose en quatre (04) chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous avons présenté d'un aperçu sur le monde enzymatique y compris les peroxydases.
- Dans le deuxième chapitre, nous avons détaillé l'intérêt de l'immobilisation des enzymes dans les différents domaines ainsi qu'un aperçu sur l'alginate de sodium a été rapporté.
- Le troisième chapitre, nous avons énuméré les différents réactifs, équipements ainsi que les méthodes expérimentales appliqués dans notre travail.
- Le quatrième chapitre, détaille les différents résultats obtenus ainsi que les discussions et les interprétations correspondantes

Enfin, notre manuscrit se clôture par une conclusion générale résumant l'essentiel du travail élaboré ainsi que les perspectives pouvant être envisagées à venir.

Chapitre I : Les enzymes

1. Introduction

Par nature, les enzymes sont des protéines possédant dans leur structure une zone particulière permettant la liaison spécifique du substrat et sa transformation chimique en produit, finalement libéré ; on appelle cette zone le site ou centre actif. Nous savons maintenant que certains anticorps peuvent mimer l'action d'enzymes, essentiellement des anticorps monoclonaux dirigés contre le substrat ou un analogue ; on les appelle des abzymes. Plus curieux encore, certains ARN peuvent s'avérer catalytiques (les ribozymes) en formant un site catalytique suite au repliement tridimensionnel de la chaîne poly nucléotidique [5].

Actuellement, les enzymes sont synthétisées, et encore appelées « enzyme mimis » ; les biotechnologies en développement ne sont pas en reste avec par exemple l'emploi d'enzymes immobilisées, les bio-piles enzymatiques et encore dans les nanotechnologies, la nano lithographie enzymatique et les nano moteurs enzymatiques à réaction. Les protéines enzymatiques contiennent un site actif qui provient du repliement de la chaîne polypeptidique, mais c'est parfois l'association de sous-unités polypeptidiques en une structure quaternaire qui fait naître le site actif. Ce dernier résulte du rapprochement dans l'espace de résidus d'acides aminés constitutifs ; les contacts entre ces résidus et le substrat sont de l'ordre des distances interatomiques dans les liaisons chimiques intéressant les atomes du vivant (C, N, O, H...) [5].

I.2. Généralités

I.2.1. Définition

Une enzyme est une protéine dotée de propriétés catalytiques. Presque toutes les biomolécules capables de catalyser des réactions chimiques dans les cellules sont des enzymes ; certaines biomolécules catalytiques sont cependant constituées d'ARN et sont donc distinctes des enzymes : ce sont les ribozymes [6].

Une enzyme agit en abaissant l'énergie d'activation d'une réaction chimique, ce qui accroît la vitesse de réaction. L'enzyme n'est pas modifiée au cours de la réaction. Les molécules initiales sont les substrats de l'enzyme, et les molécules formées à partir de ces substrats sont les produits de la réaction. Presque tous les processus métaboliques de la cellule ont besoin d'enzymes pour se dérouler à une vitesse suffisante pour maintenir la vie. Les enzymes catalysent plus de 5 000 réactions chimiques différentes. L'ensemble des enzymes d'une cellule détermine les voies métaboliques possibles dans cette cellule. L'étude des enzymes est appelée enzymologie [6].

Les enzymes permettent à des réactions de se produire des millions de fois plus vite qu'en leur absence. Comme tous les catalyseurs, les enzymes ne sont pas modifiées au cours des réactions qu'elles catalysent, et ne modifient pas l'équilibre chimique entre les substrats et les

produits. Les enzymes diffèrent en revanche de la plupart des autres types de catalyseurs par leur très grande spécificité. Cette spécificité découle de leur structure tridimensionnelle. De plus, l'activité d'une enzyme est modulée par diverses autres molécules telqu un inhibiteur enzymatique : « molécule qui ralentit l'activité d'une enzyme », et qu'un activateur de cette enzyme qui l'accélère. Par ailleurs, l'activité d'une enzyme décroît rapidement en dehors de sa température et de son pH optimums. De plus, une enzyme a la caractéristique d'être réutilisable. [6]

I.2.2. Structure

Les enzymes sont généralement des protéines globulaires qui agissent seules, comme le lysozyme, ou en complexes de plusieurs enzymes ou sous-unités. Comme toutes les protéines, les enzymes sont constituées d'une ou plusieurs chaines polypeptidiques repliées pour former une structure tridimensionnelle correspondant à leur état natif. La séquence en acides aminés de l'enzyme détermine la structure de cette dernière, qui, à son tour, détermine les propriétés catalytiques de l'enzyme. Bien que ce soit la structure d'une enzyme qui détermine sa fonction, il n'est pas encore possible à ce jour de prédire l'activité d'une nouvelle enzyme en ne connaissant que sa structure. La structure des enzymes est altérée lorsqu'elles sont chauffées ou mises en contact avec des dénaturants chimiques, ce qui a généralement pour effet de les inactiver [6].

Seule une petite partie de l'enzyme est directement impliquée dans la catalyse, elle est appelée le site catalytique. Ce dernier est situé à proximité d'un ou plusieurs sites de la liaison, au niveau desquels les substrats sont liés et orientés afin de permettre la catalyse de la réaction chimique. Le site catalytique et les sites de liaison forment le site actif de l'enzyme. Le reste de la protéine sert à maintenir la configuration du site actif et à y générer les conditions optimales pour le déroulement de la réaction.

Dans certains cas, la catalyse ne fait intervenir aucun des résidus d'acides aminés de l'enzyme mais plutôt un cofacteur lié à cette enzyme. La structure des enzymes peut également contenir un site de liaison pour un effecteur allostérique qui provoque un changement conforma-actionnel activant ou inhibant l'activité enzymatique. [6]

I.2.3. Utilisation industrielles

Certaines enzymes sont utilisées dans l'industrie et pour d'autres applications industrielles lorsque des catalyseurs très spécifiques sont nécessaires. Les enzymes naturelles sont cependant assez limitées du point de vue des réactions qu'elles sont capables de catalyser, car il s'agit de réactions spécifiques au métabolisme des êtres vivants, et non de l'industrie chimique en général ; les enzymes sont également actives dans les conditions physico-

chimiques physiologiques des organismes dont elles sont issus, conditions qui diffèrent souvent de celles mises en œuvre dans le cadre de procédés industriels. Par conséquent, le génie protéique (en) est un domaine de recherche actif qui vise à développer de nouvelles enzymes dotées de propriétés innovantes, que ce soit par conception rationnelle ou par évolution *in vitro*. Depuis le début du siècle, des enzymes ont ainsi pu être conçues de manière entièrement artificielle afin de catalyser des réactions chimiques qui ne se produisent pas naturellement [6].

Tableau. I.1. Applications industrielles de certaines enzymes courantes [6]

Application industrielle	Enzymes employées	Utilisations
Industrie des biocarburants	Cellulases	Dégradation de la cellulose en simples qui peuvent être ferments pour produire de l'éthanol cellulosique
	ligninases	Prétraitement de la biomasse pour la production de biocarburants
Lessive biologique	Peptidases, amylases, lipases	Elimine les protéines, l'amidon, les taches de graisse ou d'huile de la vaisselle ou du linge
	b-mannosidases	Homogénéisation des préparations à base de gomme de guar
	Amylase, glucanases, peptidases	Clivage des polysaccharides et des polypeptides du malt
	b-glucanases	Amélioration des propriétés de filtration du mout et de la bière
	Amylase, glucanases, peptidases	Production de bières basse calories et ajustement des caractéristiques de fermentation
	Acétolactate décarboxylase	Amélioration de l'efficacité de la fermentation en réduisant la formation de diacétyle
Cuisson des aliments	Papaïne	Utilisation comme attendrisseur pour favoriser la tendreté de la viande en cuisine
Industrie laitière	Rennine	Hydrolyse des protéines lors de la production de fromage
	lipases	Production des camemberts et des bleus tels que le roquefort
Processus agroalimentaires	amylases	Production de sucres à partir d'amidon, par exemple pour produire du sirop de mais à haute teneur en fructose
	peptidases	Réduction de la teneur en protéines de la farine, par exemple lors de la fabrication de biscuits
	Trypsine	Production de nourriture hypoallergénique pour bébé
	Cellulases, pectinases	Amélioration de la clarté des jus de fruits
Biologie moléculaire	Nucléases, ADN ligase et ADN polymérases	Utilisation d'enzymes de restriction et réaction en chaine par polymérase afin de créer des ADN recombinants
Industrie papetière	Xylanases, hémicellulases et lingnine peroxydases	Elimination de la lignine du papier kraft

I.3. La peroxydase

I.3.1.Définitions

Les peroxydases sont largement présentes dans différents types d'organismes vivants (animaux, plantes et micro-organismes). Ce sont des enzymes intra et extracellulaires avec des rôles importants dans les processus cellulaires. La peroxydase est une Enzyme qui catalyse la réaction d'oxydation du H_2O_2 pour des fins métaboliques, ils catalysent la réaction d'oxydation d'une grande variété de substrats, et participent également à la défense de la cellule contre les peroxydes très toxiques et les radicaux libres, [7].

I.3.2.Structure moléculaire

Les peroxydases (E.C.1.11.1.Z) sont des oxydoréductases, qui utilisent les peroxydes (comme le peroxyde d'hydrogène) comme un co-substrat pour oxyder une variété de composés organiques et/ou inorganiques. Leur présence était identifiée dans les plantes, les animaux et les microorganismes et leurs poid moléculaire varient de 30 à 150 kDa. Selon la nomenclature établie par la commission européenne des enzymes, les peroxydases se classent en 16 familles. Ainsi, leur nomenclature peut être selon la source : HRP : horse radis peroxydase (peroxydase de raifort), ou selon le substrat : cytochrome c peroxydase, lignine peroxydase [7, 8]. La structure tridimensionnelle de la peroxydase d'HRP, est représentée sur la figure I.1. Le site actif des peroxydases est une protoporphine IX associée à un atome de fer ferrique (figure I.2).

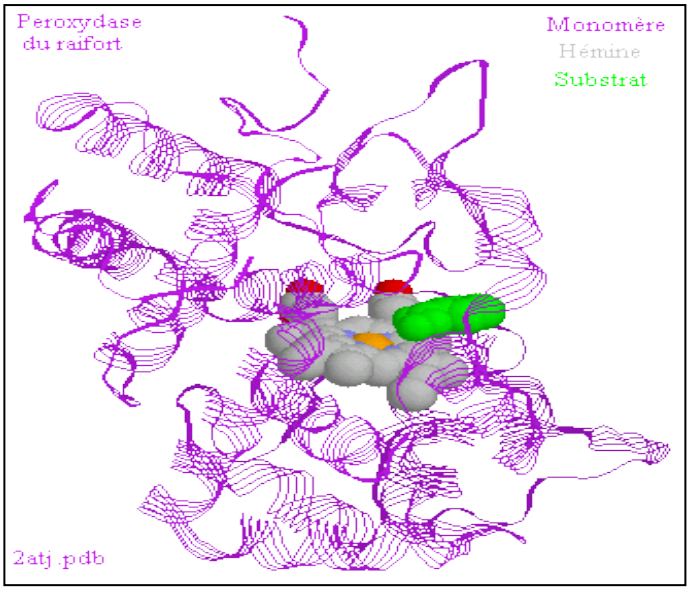


Figure. I.1. Structure de la peroxydase du HRP [9].

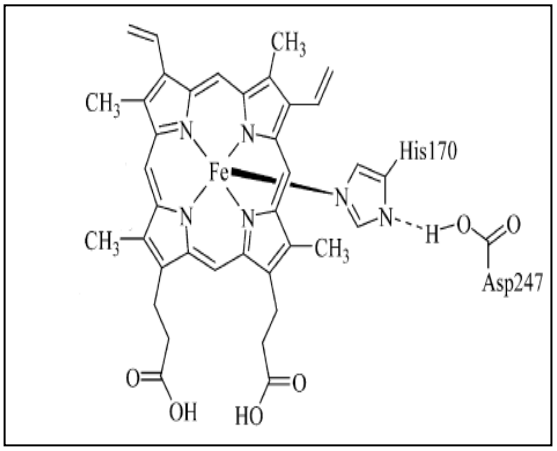


Figure. I.2. Structure de Ferri roto- porphyrine IX des peroxydases [10].

L'ion ferrique est lié à cinq ligands : quatre avec les cycles porphyrine et un avec l'azote du noyau imidazole de l'histidine 170. La sixième liaison de coordination du fer $^{3+}$ sera engagée au cours de la catalyse par le peroxyde d'hydrogène. En effet, avec la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène (comme accepteurs d'électrons) rentre dans les réactions d'oxydation des substrats (phénols, indoles, amines aromatiques, et sulfonâtes), et en fin l'oxydation des substrats aromatiques conduit en leur polymérisation.

I.3.3.Cycle catalytique de la peroxydase, [11]

En général, les réactions catalysées par les peroxydases sont représentées comme suit :

$$\text{Peroxydase} + H_2O_2 \longrightarrow \text{ComposéI} + H_2O \qquad \text{(I.1)}$$

$$\text{ComposéI} + RH_2 \longrightarrow \text{Composé II} + RH^{\bullet} \qquad \text{(I.2)}$$

$$\text{ComposéII} + RH_2 \longrightarrow \text{Peroxydase} + RH^{\bullet} + H_2O \qquad \text{(I.3)}$$

Où le RH_2 est l'électron donneur et $RH^{\bullet}$ est le radical produit de la réaction.

Le cycle catalytique des peroxydases commence par une oxydation de l'enzyme et une réduction de peroxyde d'hydrogène pour produire l'eau et le composé I : transfert de deux électrons du fer $^{3+}$ et du cycle porphyrine. Cette étape incluse le transfert d'un oxygène de peroxyde vers la partie ferrique d'enzyme, (le composé I contient un centre oxyferryle avec un fer sous l'état ferryl ($Fe^{IV} = O$)). D'une part le composé I oxyde le substrat (RH_2) pour donner le radical correspondant ($RH^{\bullet}$), et d'autre part, il réduit pour produire le composé II. Comme dernière étape le composé II est réduit de nouveau à l'état ferrique avec une deuxième molécule de substrat, correspondant à la forme native de l'enzyme. En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure II. 3.

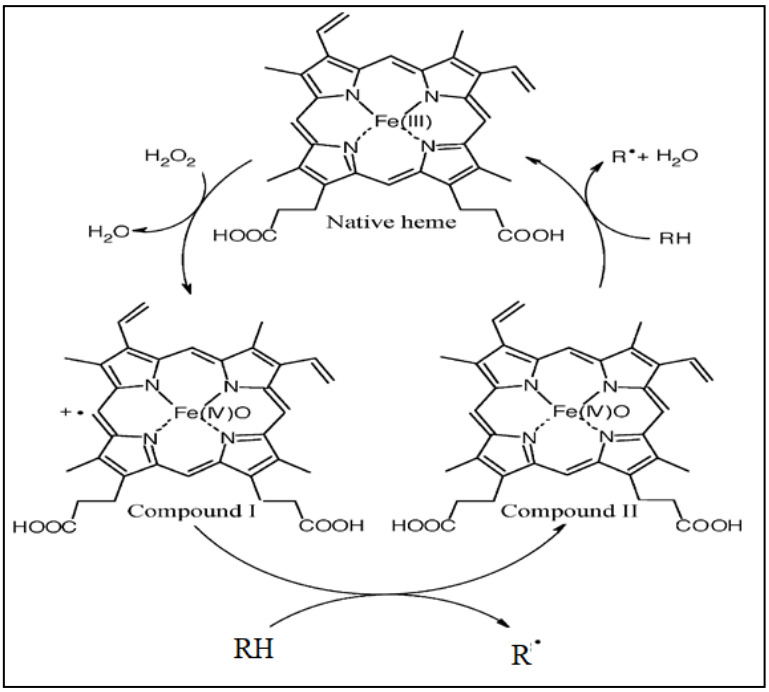


Figure I.3. Cycle catalytique de la peroxydase,[11]

I.3.4. Sources et classification

En réalité, il n'y a pas une peroxydase mais des peroxydases, car ce type d'enzyme existe chez presque Tous les êtres vivants : animaux, végétaux et microorganismes (champignons et bactéries).

Elle ne manque que chez les anaérobies stricts pour lesquels l'oxygène moléculaire est un poison. Plusieurs travaux ont rapporté la purification des peroxydases à partir de plantes, d'algues, de microorganismes et d'animaux.Ellessont classifiées en deux superfamilles selon leur séquence en acides aminés [12].

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

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

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

I.3.5. Application des peroxydases

Grace à leur grande diversité, les peroxydases ont été utilisées pour plusieurs applications industrielles, on site :

- **Décoloration des colorants synthétiques**: A nous jours, plus de 100 000 colorants commerciaux existent dans les marchés internationaux, avec une production de plus de 7.105 tons par an [13]. Ces colorants sont conçus d'une manière qu'ils soient stables et résistant à tout type d'attaque microbienne ou à l'oxydation. En effet, Plusieurs activités industrielles utilisent ces colorants. En parallèle, ils consomment des grandes quantités des eaux ce qui génère un large volume des effluents colorés plus au moins concentrés [14]. Plusieurs auteurs ont montré que la destruction des composés colorés est stimulée de façon significative par des enzymes oxydatives. Récemment, [15], ont montré que la peroxydase de raifort HRP peut être efficaces dans la dégradation et la précipitation des colorants azoïques importants, tels que le Remazol et le rouge Cibacron [15].
- **Traitement des composés phénolique :** les peroxydases sont connues aussi pour polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que le phénol et les phénols substitués (qui sont largement présents avec des concentrations variables dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres industries, y compris les plastiques, textiles, fer, acier et les industries forestières), selon la réaction de polymérisation suivante[15] :

$$H_2O_2 \quad +2AH_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} 2H_2O + \text{polymérise} \qquad \text{(I.4)}$$

- **Biocapteurs à base de la peroxydase :** Un domaine qui offre un grand potentiel pour les applications de la peroxydase comprenant les biocapteurs électrochimiques. Récemment, les électrodes à base de la peroxydase ont eu largement utilisé dans les systèmes d'analyse pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et les hydro peroxydes organiques. Sous l'état immobilisé, avec une enzyme produisant du peroxyde d'hydrogène, ils peuvent être exploités pour la détermination du glucose, des alcools, glutamate et la choline [15].

I.3.6. Domaines d'utilisation des peroxydases

Les peroxydases ont longtemps été considérées comme des enzymes impliquées dans des Réactions réduisant la croissance des cellules végétales, grâce à la destruction de l'auxine et La formation de liaisons covalentes au sein des parois, Les peroxydases jouent de grands rôles dans la croissance, le développement et le système De défense des plantes. Ces enzymes forment une famille multi génique. Ainsi, un Séquençage complet a permis de montrer l'existence de 73 gènes codant dans une Peroxydase de classe III chez Arabinoses Tatiana. La plupart de ces gènes sont exprimé, Soit de façon constitutive, soit à la suite de divers stress,

Les peroxydases exercent des fonctions diversifiées dans les plantes. Elles utilisent l'eau Oxygénée comme accepteur d'électrons provenant de diverses molécules, tels les Précurseurs de la lignine ou des phénols (flavonoïdes ou autres).En plus, elles peuvent Catalyser l'oxydation de quelques molécules en présence d'oxygène. C'est le cas de L'auxine (acide 3-indolylacétique), une des hormones contrôlant la croissance et la Différenciation des plantes [12].

Leur application dans les tests antifongiques peut espérer une systématisation au même Titre que les Kits diagnostics. D'autre part, elles constituent des outils extrêmement utiles Pour le biologiste par leur utilisation dans divers protocoles de laboratoire.

Ont été souvent Utilisées comme marqueurs dans les études physiologiques et génétiques. On cite les Marqueurs de croissance, de stress biotique/abiotique, de résistance ainsi que les marqueurs De sonde d'ADN et d'oligonucléotides [12].

Chapitre II : Immobilisation des Enzymes

II.1.Introduction

La plupart des enzymes sont relativement instables et ont une forte les coûts de production et de séparation, présentant un inconvénient en ce que la récupération d'enzymes actives dans la réaction le mélange après usage est techniquement très difficile [16]. L'immobilisation des enzymes a fait l'objet d'une grande attention de la part de ceux qui souhaitent utiliser la technologie d'immobilisation enzymatique pour des fins médicales et industrielles [17]. Le terme Les « enzymes immobilisées » sont définies comme des « enzymes attaché physiquement à des supports solides spécifiques et donc confiné, et qui peut être utilisé de manière répétée et continue tout en conservant leurs activités catalytiques » [18].

Au cours des dernières années, la productivité enzymatique a augmenté rapidement

Grâce à l'amélioration de la technologie du génie génétique, technologie de culture microbienne et souche de type sauvage technologie de dépistage parallèlement à la compréhension des mécanismes de biosynthèse enzymatique [17,19, 20].

L'utilisation d'enzymes immobilisées en biotechnologie acertains avantages tels que [21,20] :

- **Possibilité de réutilisation :** Un seul lot des enzymes peut être utilisé de manière multiple ou répétitive.
- **Stabilité des enzymes :**les enzymes immobilisées sont généralement plus stables que mobiles enzymes.
- **Possibilité de contrôle des réactions :**la réaction enzymatique pourrait être contrôlée rapidement en éliminant l'enzyme de la solution réactionnelle.
- **Possibilité de récupération des produits à l'état pur :**la séparation facile de l'enzyme du produit permet d'éviter toute contamination.
- **Avoir des réactions multienzymatiques :**l'utilisation d'enzyme immobilisée permet le développement d'un système de réaction multi-enzymatique [22]. L'introduction de catalyseurs enzymatiques immobilisés a grandement amélioré les performances techniques des procédés industriels, accroître la productivité et l'efficacité économique [23].

II.2.Généralités

Les enzymes immobilisées sont définis comme des enzymes physiquement limitée ou localisée dans une région définie de l'espace avec la rétention de leur activité catalytique [24].L'efficacité de l'opération d'immobilisation dépend du choix de la méthode d'immobilisation et de support, qui constitue également un paramètre important. En effet, la diffusion des différents substrats va être fortement modifiée par rapport aux systèmes homogènes mais également en fonction de la méthode d'immobilisation.

Plusieurs méthodes d'immobilisation ont été citées dans la littérature :

- ✓ L'adsorption sur support inerte;
- ✓ La liaison covalente ou ionique entre un porteur et des groupes fonctionnels de l'enzyme.
- ✓ La réticulation avec des réactifs bi ou multivalents ;
- ✓ L'inclusion dans une matrice.

En effet, pour immobiliser l'enzyme, on doit considérer son efficacité, le maintien de l'activité de l'enzyme et le taux d'enzyme dans le support.

II.3.Techniques d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique, (Figure. II.1), comme on peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme [25,26]. Ces techniques peuvent être classé selon plusieurs modes de voies. Dans une approche d'immobilisation les méthodes sont classées en deux grandes catégories : irréversibles et méthodes réversibles. En dehors de cette classification, les méthodes d'immobilisation ont également été classées sur la base du type de réaction chimique utilisée pour la liaison comme support méthodes de liaison et de piégeage.

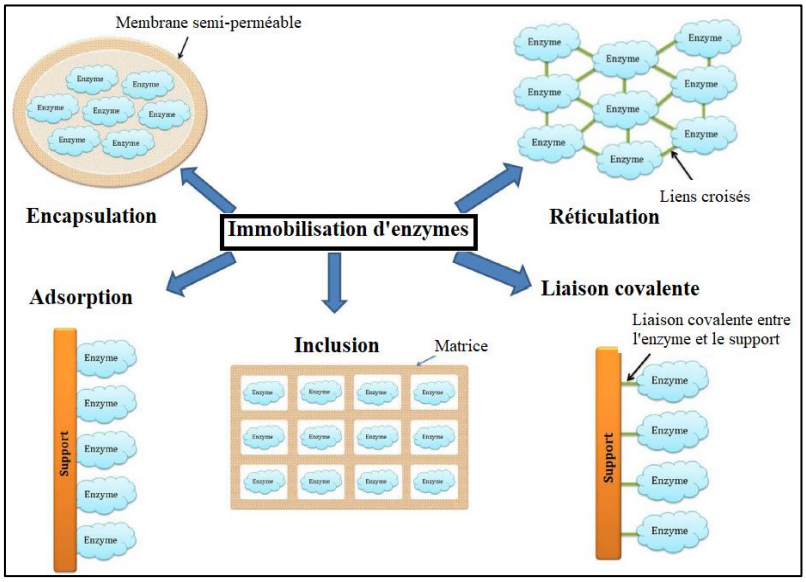


Figure. II.1. Différentes techniques d'immobilisations des enzymes [27].

Le tableau II.1. Résume les techniques d'immobilisation d'enzymes montrant leur avantage, inconvénients et diverses applications.

Tableau II.1. Méthodes d'immobilisation des enzymes et applications, [27,28,29]

Méthode d'immobilisation	Principe	Avantage	Inconvénient	Applications
Adsorption	Interactions physiques : Liaisons hydrogène, Van Der Waals, homophiles…	- AE maximale - Simple - Economique	- Non spécifique - Désorption d'enzyme - Contamination	Adsorption de la lipaseCandida rugosa adsorbed sur le Poly-(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-adsorption en phase liquide suivie d'une élution par modification du pH - Adsorption en phase liquide sur un charbon actif suivie d'une régénération externe dans un four
Couplage covalent	Formation liaisons covalentes entre les groupements : NH_2, OH…d'enzyme et les groupements fonctionnels de support en présence ou en absence d'un agent de greffage.	- Efficacité d'immobilisation élevée. - Meilleur activité spécifique. - Haute stabilité.	- Dénaturation d'enzyme. - Couteuse. - Immobilisation non uniforme.	- Immobilisation : enzyme-nanoparticules magnétique : Applicationsen pharmaceutique. - Immobilisation del'alcool déshydrogénase sur les nano-fibres desilicate de magnésium hydraté :
Réticulation	Formation des liaisons covalentes entre les molécules d'enzymes (voir figure.II.5)	- Forte concentration d'enzyme. - Non couteuse - Protection maximale d'enzyme	- Dénaturation par les agents liants. - Non valable pour toutes les enzymes.	Producteurs, Plasturgie, Matière plastique, Plastique renforcé de fibres, Nanocomposite de polymère, Biopolymère, Bioplastique

II. 4. Immobilisation par inclusion

La méthode d'inclusion est basée sur la mise en cage de l'enzyme dans un réseau polymérique synthétique ou naturel par des liaisons covalentes ou non covalentes qui permettent le passage du substrat et les produits mais conservent l'enzyme. Dans cette méthode l'enzyme n'est pas liée à la matrice support .La mise en cage de l'enzyme peut être réalisée par l'une des stratégies suivantes : (1) par inclusion de l'enzyme dans une matrice polymérique, (2) par dissolution enzymatique dans une phase non aqueuse, ou (3) par séparer l'enzyme d'une solution en vrac en utilisant une microcapsule semi-perméable. Il existe différentes méthodes de piégeage des enzymes comme [30]:

✓ Gel de polymère (organiques, inorganiques ou hybrides) où la technique est appelée inclusion dans *g*el.

✓ Compartiments membranaires (microcapsule ou fibre) où elle est appelée micro encapsulation.

Deux techniques peuvent être utilisées pour la formation des billes de gel qui sont : l'extrusion (l'extrusion de gouttelettes dans un bain de durcissement) ou l'émulsion (système à deux phases)

A. Technique d'émulsification : Un petit volume de solution ou de suspension aqueuse formé de la matière active-polymère (principe actif, enzyme, hormone, bactérie-alginate de sodium), est dispersé dans un grand volume d'huile, le mélange est agité et homogénéisée pour former une émulsion d'eau dans huile stable. Le polymère soluble dans l'eau est alors dé solubilisé pour former de petites particules de gel dans la phase huileuse. Le choix de la méthode de dé olubilisation dépend du type de matériel d'inclusion utilisé (la solution d'Alginate de sodium est réticulée avec une solution de saline à base de cation bivalent, calcium ou magnésium, etc.). La dimension des particules obtenue est proportionnelle à la taille des gouttelettes de la phase interne de l'émulsion. Dans ce cas on distingue deux procédés : l'émulsification-gélification externe et l'émulsification-gélification interne, (Figures II.2 et II.3) [31, 32].

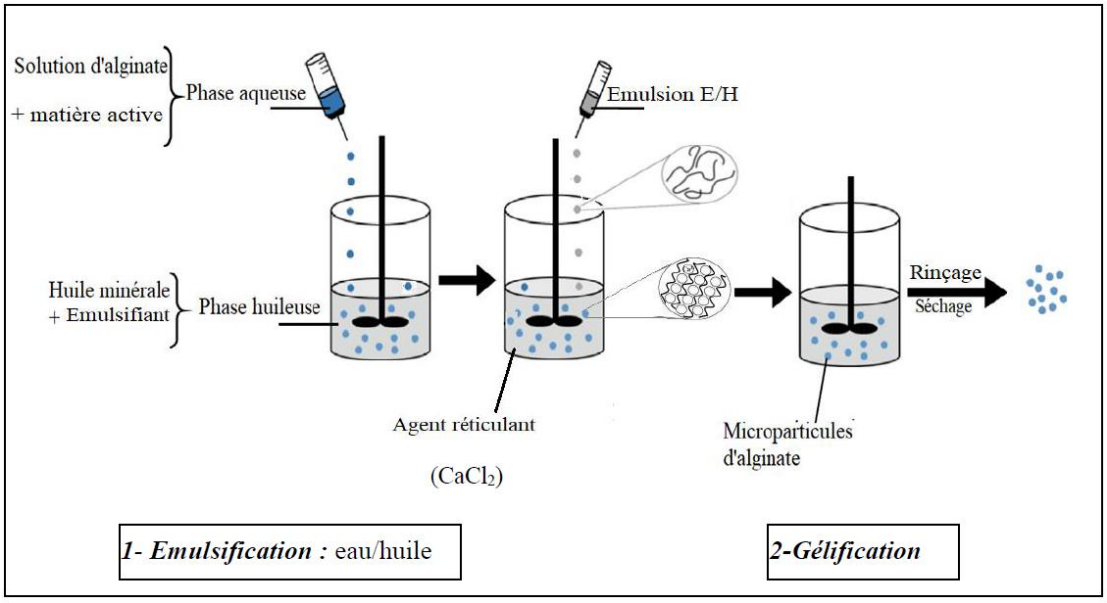


Figure II.2. Etapes du procédé émulsification/gélification externe. [31,32]

B. Technique d'extrusion : ou l'inclusion est la technique la plus ancienne et la plus couramment utilisée dans l'immobilisation de biomolécules et de cellules bactérienne par inclusion et par encapsulation dans des hydrocoloïdes. Cette méthode nécessite la préparation d'une solution d'hydrocoloïdes (alginate de sodium), dans laquelle on incorpore les matières actives (bioactives). La suspension (ou la solution) est par la suite extrudée à travers un orifice (seringue, burette, etc.) sous forme de gouttelettes qui tombent librement (en chute libre) dans un bain de durcissement (poly électrolyte faible de charge opposée par exemple du chlorure de calcium). La dimension et la forme des gouttes dépendent du diamètre de l'orifice de l'extrusion, de la viscosité du gel ainsi que de la distance de chute libre sont contrôlés par les lois de la mécanique des fluides et de l'hydrodynamisme [33].

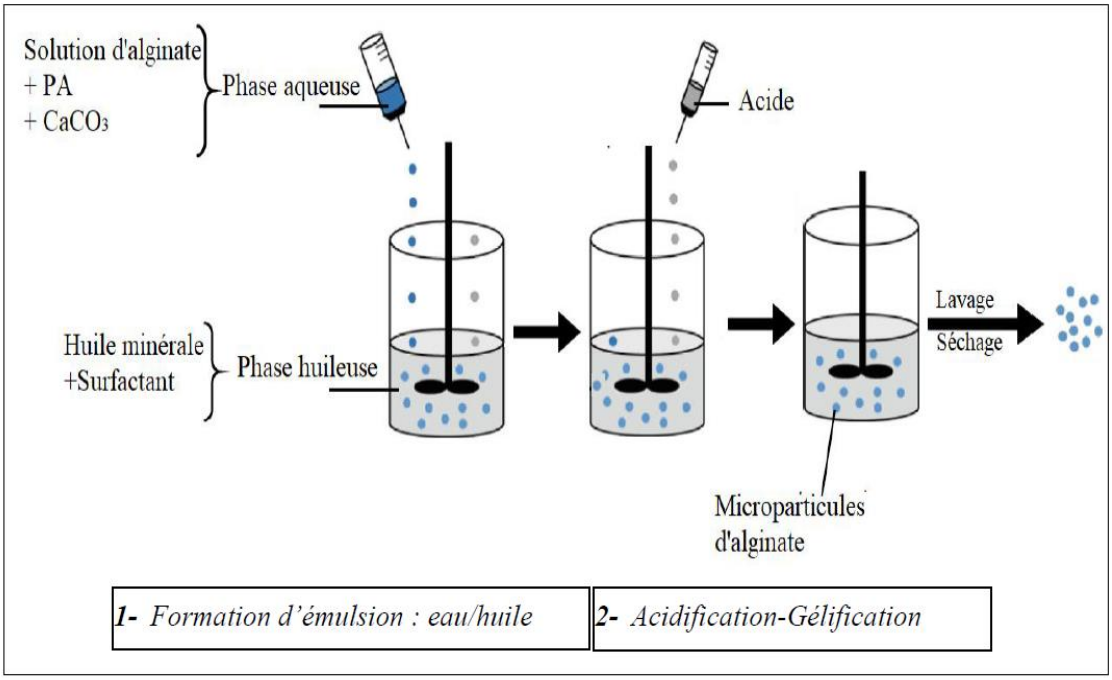


Figure II.3. Etapes du procédé émulsification/gélification interne, [31,32]

Le schéma de la figure II.4, résume la mise en œuvre la technique d'extrusion.

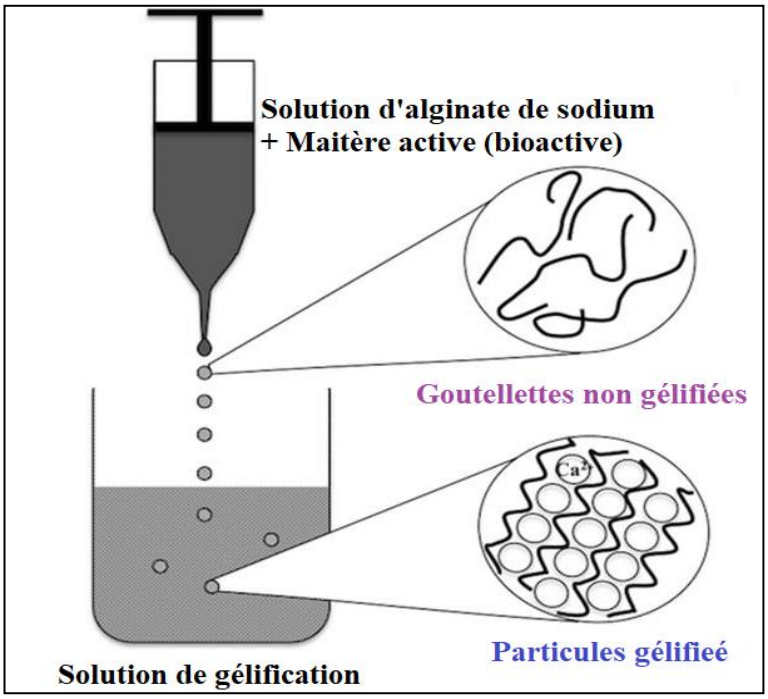


Figure II.4. Etapes du procédé d'extrusion, cas s'alginate de sodium, [33].

II.5. Supports d'immobilisation

Les propriétés des préparations enzymatiques immobilisées sont régies par les propriétés de l'enzyme et du Matériel transporteur. L'interaction entre les deux conduits en une enzyme immobilisée avec des propriétés chimiques, biochimiques, mécaniques et cinétiques

particulière. Le support (porteur) peut-être un polymère organique synthétique, un bio polymère ou un solide inorganique. Cependant, les matériaux proposés dans de nombreux recherches ne conviennent pas pour processus de transformation industrielle en raison de leur faible force mécanique [27].

Le matériaux d'immobilisation doit être caractérisé par certaines propriétés [27]:

(i) Il doit être peu coûteux et non toxique pour l'environnement.

(ii) Il doit être totalement inerte après immobilisation et ne pas bloquer la réaction souhaitée.

(iii) Il doit avoir une résistance thermique et mécanique, permettant à l'enzyme immobilisée à être utilisée dans diverses conditions opératoires.

(iv) Il doit être très stable.

(v) Il doit avoir une capacité de régénération élevée après une durée de vie utile de l'enzyme immobilisée.

(vi) Il devrait améliorer la spécificité enzymatique.

(vii) Il doit pouvoir emballer une grande quantité d'enzyme.

Sur la base de leur composition chimique, les matrices de support sont classées en deux catégories principales, à savoir : (A) matériaux support inorganique et (B) matériaux supports organiques [27, 34].

A. Supports inorganiques

Ils comprennent le verre, le gel de silice, l'alumine, les oxydes métalliques, la zircone et de nombreux autres matériaux à base de silice, ils sont largement utilisés car ils ont une résistance thermique et mécanique. La caractéristique du support inorganique est qu'ils apportent une certaine rigidité et porosité [A, I]. Les différents supports inorganiques, leurs propriétés et les enzymes immobilisées sont répertoriés dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Matériaux inorganiques, leurs propriétés et les enzymes immobilisées [27, 34, 35].

Matériaux	**Propriétés**	**Enzyme immobilisée**
Zéolite	Grande surface spécifique	Glucose oxydase, lysozyme
Céramiques	Micro et macropores efficace	Lipase
Silica	Grande surface spécifique Grande stabilité chimique et mécanique	Lignine peroxydase, peroxydase de raifort α-amylase
Charbon actif	Grande surface spécifique Nombreux sites actifs	Protéase acide Acidique lipase

B. Supports organiques synthétiques

Les polymères synthétiques sont des résines échangeuses d'ions qui ont une surface poreuse et sont de nature insoluble. Ces polymères, du fait de leur structure poreuse ,peuvent immobiliser très fortement l'enzyme. Ils sont inertes aux attaques microbiennes. Ils comprennent le polystyrène, le chlorure de polyvinyle (PVC), le polyacrylate, le polyamide, polypropylène, diéthyl-amino-éthyl cellulose (DEAE-cellulose) [29]

C. Supports organiques naturels

Une grande variété de polymères naturels, principalement des polysaccharides insolubles dans l'eau comme le collagène, le chitosane, les carraghénanes, l'alginate, la cellulose, l'amidon, l'agarose etc, ont été utilisés comme matrice de support pour l'immobilisation d'enzymes. La caractéristique de ces polymères qui en font un bon système de support d'inclusion, leur capacité à former des gels inertes, est dûà leur structure chimique qui peut être activé facilement, comme ils peuvent se lier aux protéines et aux enzymes de manière réversibles de manière irréversible, ils sont disponibles en grande quantité, peu coûteux, et ils présentent une haute résistance thermique et mécanique par réticulation avec réactifs bi fonctionnels [27, 31, 32]. Les différents supports organiques et leurs immobilisations les enzymes sont listées dans le tableau II.3.

Tableau II.3. Matériaux organiques naturels, leurs propriétés et les enzymes immobilisées [27, 31, 32].

Matériaux	**Propriétés**	**Enzyme immobilisée**
Chitosane et chitine	Absorbable avec possibilité de contrôle de libération de matières actives-bioactives. Existence des interactions ioniques avec l'enzyme.	D-Hydantoinase Peroxydase de raifort Laccase
Collagène	Rétention importante de l'activité enzymatique après de nombreux cycles de réutilisation	Tannase, catalase
Carraghénane (polysaccharide linéair sulfaté)	Améliore la stabilité, Pas cher, résistant, Meilleure capacité de piégeage	Lipase, α-galactosidase
Cellulose	Capacité de stockage plus long Meilleure flexibilité	Fungi laccase, penicilline G acylase, glucoamylase, α amylase, tyrosinase, lipase, β-galactosidase
Pectine	Utilisé avec le glycérol commeplastifiant à réduire la fragilitéde soutien. La pectine-chitine et pectine–alginate de calcium améliorent les propriétés catalytiques.	Papaine
Amidon	Stable	Peroxydase de courgette

D. Alginate de sodium

D.1. Structure chimique

L'alginate est un polysaccharide linéaire à longues chaînes moléculaire présentant des propriétés gélifiantes lorsqu'elle est complexée avec des ions. L'alginate qui est un copolymère anionique naturel, est un acide polyuronique constitué par l'enchaînement alternant de l'acide β-D-mannuronique et de l'acide α-Lguluronique liés entre eux en (1→4) par des liaisons glycosidiques, de proportion et d'arrangement séquentiel variable. Les supports d'alginate sont habituellement faits en réticulant, par liaisons physiques, le groupe carboxylique de l'acide α - L-guluronique avec un ligand cationique, [36] (Figure II.5).

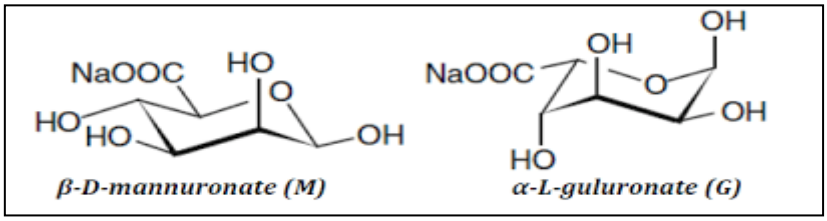


Figure II.5. Structure des blocs: (1- 4) β-D-mannuronate (M) et(1 - 4) α-L-guluronate (G) d'alginate de sodium [32].

La résistance mécanique du gel, les propriétés chimiques et physique de la molécule d'alginate dépend des proportions des blocs présents et suit l'ordre croissant suivant MG < MM < GG, et donc elle dépend de la proportion en bloc G, [30].

Les alginates mono valent sont parfaitement solubles dans l'eau car les groupements carboxyliques présents dans les molécules d'alginate sont ionisés, par contre L'addition de cations divalents (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}) provoque la formation d'un gel élastique, où cations sont retenus dans une cage et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles, [37] (figure II.6).

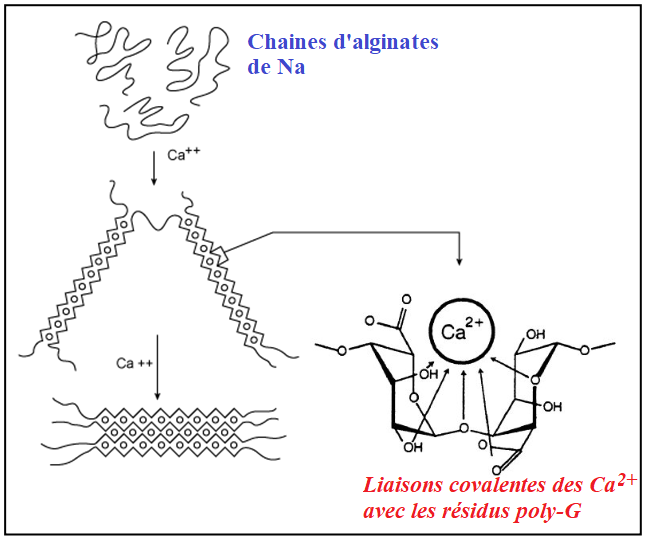


Figure II.6. Mécanisme de la formation du gel d'alginate de calcium, [37, 38].

D.2. Paramètres infuençant les propriétés physico-chimiques

Le comportement de l'alginate diffère suivant qu'elle est confrontée à des agents physiques chimiques ou biologiques, les paramètres influençants ses propriétés sont[30]:

• ***Température :*** La viscosité décroît avec la croissance de la température. Cependant, si la solution d'alginate est maintenue à une température supérieure à 50°C pour plusieurs heures, une dépolymérisation peut se produire. La solution d'alginate peut être gelée puis dégelée

sans que cela ne provoque un changement dans la viscosité initiale, aussi longtemps que le calcium est absent (moins de 0,5 %); par contre si le calcium est présent, la viscosité va augmenter et le gel peut prendre formes et ce changement est irréversible.

• ***pH :*** La viscosité d'une solution d'alginate n'est pas affectée dans l'intervalle de pH variant entre 5-11, mais pour un pH allant de 3 à 4, un gel se formera systématiquement, cependant si la solution d'alginate contient des résidus de calcium, la gélification se fera à un pH de 5. Si le pH diminue rapidement de 6 à 2, une précipitation gélatineuse d'acide alginique se formera. À un pH 11, une petite dépolymérisation se produit dans la solution d'alginate, provoquant une chute de la viscosité.

• ***Suspension bactérienne :*** Les microorganismes peuvent croître aisément dans des solutions commerciales, cette croissance peut toutefois causer une dépolymérisation et une perte de la viscosité de la solution d'alginate.

• ***Produits chimiques :*** La présence de sucre, d'amidon, les sels monovalents comme le chlorure de sodium dans l'eau, réduit la vitesse d'hydratation et dissolution de l'alginate. L'alginate de sodium est difficilement soluble dans une eau dure ou le lait car ces substances contiennent des ions de calcium.

II.6. Application d'immobilisation des enzymes

Les enzymes immobilisées aident à leur réutilisation économique et aussi à la transformation de divers produits. Les enzymes immobilisées ont des applications biotechnologiques, biomédicales et industrielles. De plus, l'enzyme l'immobilisation a progressé dans divers domaines pour étudier l'environnement, clinique, et échantillons industriels. Le tableau II.4, récapitule les principales applications des enzymes immobilisées ainsi que les utilisations correspondantes.

Tableau II.4. Domaines d'applications des enzymes immobilisées, [37, 39,40- 41]

Domaine d'application	**Utilisations**	**Enzyme immobilisée**
Biotechnologie	*Biocapteurs :*Diagnostic médical, détection de toxines dans les aliments et l'eau, les produits pharmaceutiques, surveillance de l'environnement, et l'alimentation et l'agriculture. *Production d'antibiotiques :* les β-lactamines.	Acetylcholinesterase, Urease, Penicilline acylase, Butyrylcholinesterase.
Biomédical	*Biosenseur :* Détection, diagnostique et traitement de nombreuses maladie, analyse des antigènes et des anticorps	Urease, Cholesterol oxidase, Penicillinase, Aldolase.
Agroalimentaire	Préparation des confitures, gelées jus, sirops, et du lait sans lactose.	Glucose isomérase, Lactase, β-Galactosidase, Pectinases.
Environnement	Transformation des polluants phénoliques, colorants, polluants organiques persistants	Peroxydase, laccase, azoréductase, polyphéno-oxydase,
Industrie	Production de biodiesel Utilisés comme détergent Captage du dioxyde de carbone	Lipase, Amylase, Cellulase, Proteases, anhydrase carbonique.

II.7.Propriétés des enzymes immobilisées

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

II.7.1.Propriétés physico-chimiques

Une des propriétés importantes est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support, [42].

II.7.2.Propriétés cinétiques

L'immobilisation des enzymes affecte beaucoup leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale et de la constante de Michae lis de l'enzyme, cette dernière peut avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier

lorsque la réaction enzymatique et en jeu une libération ou une consommation de protons [42].

II.8. Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique

Avant de choisir la technique d'immobilisation à employer, il est d'abord important de comprendre les modifications des propriétés physiques et chimiques qu'une enzyme peut subir lors de l'immobilisation. Les changements de stabilité et les propriétés cinétiques des enzymes immobilisées est en raison du microenvironnement imposé sur elles par le support et également par les produits de leurs l'action [43]**.**

II.8.1.Le microenvironnement

Les Interactions ioniques et hydrophobes, ou autres entre l'enzyme et le support (effets microenvironnement) peuvent avoir comme conséquence des changements dans les valeurs des propriétés de la vitesse enzymatique.

Ces effets sont normalement provoqués par des variations dans l'équilibre de dissociation des groupes chargés du site actif de l'enzyme. Une fois une enzyme est immobilisée, elle se trouve dans un microenvironnement qui peut être rigoureusement différent de celui à l'état libre. Le nouveau microenvironnement peut être un résultat de phénomène physique et chimique du support seulement, ou il peut résulter des interactions de support avec les substrats ou les produits impliqués dans la réaction enzymatique [43, 44]**.**

II.8.2. La Stabilité

Les auteurs qui ont mené des études sur l'immobilisation des enzymes confirment l'amélioration de la stabilité de l'enzyme, si l'immobilisation est correctement faite. L'immobilisation de l'enzyme dans une structure poreuse protégera l'enzyme contre l'interaction avec d'autres molécules enzymatiques. Les molécules d'enzymes peuvent également être protégées contre les bulles d'air qui proviennent d'une forte agitation qui peuvent entraîner leurs inactivations [43, 45]**.**

D'autre part, la stabilité est le résultat d'un compromis entre deux facteurs : la flexibilité, pour la fonction catalytique de l'enzyme, et la rigidité, pour la stabilité de conformation. L'enzyme immobilisé est plus rigide que l'enzyme libre. Cette rigidité la protège contre le déploiement et préserve leur structure catalytique ment active. Par conséquent, l'immobilisation permet à l'enzyme d'être active d'une façon optimale dans des conditions de dénaturation (par exemple, les températures plus élevées) [25].

II.8.3. Inactivation

Dans le cas où les techniques d'immobilisation exigent des conditions extrêmes de réaction (pH élevé ou présence d'oxydant), certaines molécules d'enzymes immobilisées peuvent être désactivées. En outre, l'enzyme peut s'attacher au support par le site actif, de se fait le substrat ne peut pas accéder au site actif qui est bloqué (figure II.7). Ainsi, la valeur de l'activité de l'enzyme immobilisée est habituellement moindre que celle de l'enzyme libre [43].

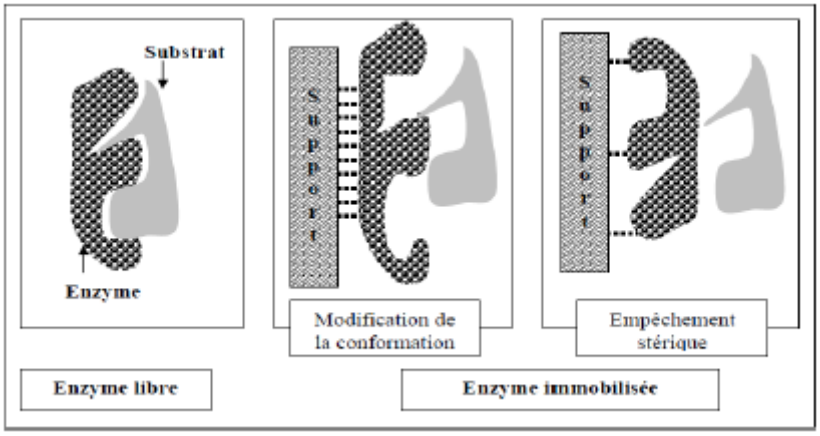


Figure II.7. Modification de la conformation et de l'accessibilité du site catalytique de l'enzyme du a son immobilisation [43].

Chapitre III :
Matériel et méthodes

III.1. Objectifs

Toute notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de la faculté des sciences de l'université de Médéa.

Cependant, l'objectif de la présente étude s'oriente vers la réalisation des étapes suivantes :

1. Extraction et purification de la peroxydase de navet ;
2. Immobilisation de la peroxydase de navet ;
3. Traitement d'un AB utilisé en industrie pharmaceutique algérienne : « chlortétracycline» par la peroxydase de navet à l'état libre et à l'état immobilisé;

Pour ce faire nous avons utilisé le matériel et nous avons appliqué les méthodes suivantes :

III.2. Présentation des matières premières

III.2.1. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont listés dans le tableau III.1.

Tableau III.1.Réactifs chimiques utilisés et leurs caractéristiques

Nom chimique	Formule	Masse	Pureté	Fournisseur
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	34	34%	SIGMA-ALDRICH
Acétone	C_3H_6O	58.07	99.5%	SIGMA-ALDRICH
4-amino-antypyrine	$C_{11}H_{13}N_3O$	203	99%	BIOCHEM CHEMOPHARMA
Phénol	C_6H_6O	94.1	99.5%	RIEDEL-DE
Chlorure de potassium	KCl	74.55	99.5%	RIEDEL-DE
Acide chlorhydrique	HCL	36.46	33%	SIGMA
Biphtalate de potassium	$C_8H_5KO_4$	204.22		SIGMA-ALDRICH
Hydroxyde de sodium	NaOH	40	98.5%	BIOPERFECT ALGER
Phosphate de potassium mono basique	KH_2PO_4	174.18	99%	BIOCHEM CHEMOPHARMA
Huile de paraffine	/////	//////	///	SIGMA-ALDRICH
Span 80	$C_{24}H_{44}O_6$	428.602	99%	SIGMA-ALDRICH

III.2.2. Chlorotétracycline

Les caractéristiques de la Chlorotétracycline utilisée sont résumées dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Caractéristiques physico-chimiques du Chlorhydrate de chlorotétracycline utilisé.

Caractéristique	**Description ou valeur**
Formule chimique	$C_{22}H_{24}Cl_2N_2O_8$
Nom chimique	2-amino hydroxy methylidene-7-chloro-4-dimethylamino-6,10,11,12a-tetrahydroxy-6-methyl-4,4a,5,5a-tetrahydrotetracene-1,3,12-trione hydrochloride, 2-azanyl oxidanyl methylidene-7-chloranyl-4-dimethylamino-6-methyl-6,10,11,12a-tetrakis oxidanyl-4,4a,5,5a-tetrahydrotetracene-1,3,12-trione hydrochloride
Masse molaire	515.3g/mol
Aspect	Poudre jaune cristalline, inodore
Point de fusion (°C)	210-215
Solubilité	Peu soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pour cent. Soluble dans les solutions d'hydroxydes et de carbonates alcalins.
Pureté (%)	98
Formes pharmaceutiques	Comprimé, pommade

III.2.3. Alginate de sodium

L'alginate est un polysaccharide naturel relativement abondant puisqu'il constitue le composant structurel des algues brunes marines (*Phaeophyceae*), représentant plus de 40% en masse sèche. Néanmoins, les alginates commerciaux utilisés pour des applications industrielles sont la plupart du temps issus d'algues marines brunes. Elles sont souvent liées à ses propriétés de rétention d'eau, son pouvoir viscosifiant, gélifiant ou encore stabilisant [46 La molécule d'alginate est constituée d'unités d'acide β-d-mannuronique (M) et d'acide α-l-guluronique (G) (FigureIII.1.)dont la séquence et le nombre varie selon la source.

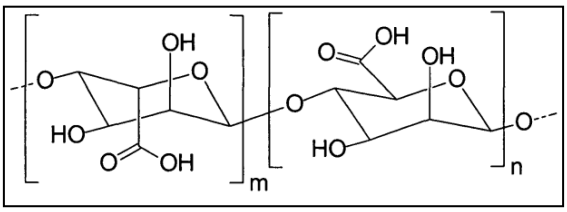


Figure III.1. Structure chimique d'alginate de sodium, [46].

Les caractéristiques de l'alginate de sodium utilisé dans cette étude sont présentées dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Caractéristiques physico-chimiques de l'alginate de sodium (Sigma-Aldrich).

Caractéristique	**Unité**	**Description ou valeur**
Aspect	---	Poudre blanche-jaunâtre.
Odeur	---	Sans
Gout	---	Sans
Solubilité		- Insoluble : Ethanol, éther, chloroforme, solvants organiques, solutions aqueuses (pH < 3). - Solution colloïdale : dans l'eau
Point de Fusion	°C	**> 300**
Viscosité (1g/l)	Cp	15-25

III.3. Matériel utilisé

Les manipulations réalisées ont nécessité d'utiliser le matériel détaillé dans le tableau III.4.

Tableau III.4. Matériel utilisé.

Matériel	**Marque**
Agitateur magnétique avec plaque chauffante	AGIMATIC - N
Balance électrique	AKERN
Bain Marie	AGIBAT
Centrifugeuse	HETTICH
Étuve	MEMMERT
Mixeur domestique	BESCH
pH-mètre	OAKTON
Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	SHIMADZU
Spectrophotomètre UV visible	OPTIMA

III.4. Méthodes expérimentales et techniques de caractérisation

III.4.1. Préparation des solutions tampons [47]

Tampon pH 3: à partir d'une solution de biphtalate de potassium [$KHC_6H_4(COO)_2$] (0,2 mol/l), on a prélevé(pour chaque pH) : 5 ml, puis on a ajusté au pH désiré avec HCl(0.2 mol/l).Enfin, on a complété jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.

Tampon pH 5 : à partir d'une solution debiphtalate de potassium [$KHC_6H_4(COO)_2$] (0.2 mol/l), on a prélevé : 5 ml, puis on a ajusté au pH 5 avec NaOH 0,2 mol/l. Enfin, on a complété jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.

Tampon pH 7 : à partir d'une solution de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) (0.2 mol/l), on a prélevé 5 ml, puis on a ajusté au pH désiré avec NaOH (0.2 mol/l).Enfin, on a complété jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.

III.4.2. Caractérisations spectrales du chlorotétracycline

Cette partie consiste à caractériser la CTC par UV-vis et FTIR.

- **Spectrométrie UV-Vis**

  - ***Principe***

La spectrophotométrie UV-Visible est basée sur l'interaction des radiations lumineuses et de la matière dans le domaine du proche ultraviolet (UV) au trèsproche infrarouge (IR), soit entre 180 et 1100 nm. Cette partie du spectre apporte peu d'informations structurelles, mais a beaucoup d'importance en analyse quantitative. Les calculs d'absorbance des composés dans le proche UV et le visible par application de la loi de Béer-Lambert constituent la base de la méthode connue sous le terme général de colorimétrie pourtout spectre enregistré dans le visible **[48].**

Lorsqu'un faisceau de rayonnement est monochromatique incident d'intensité I_0traverse une substance colorée. On observe une absorption d'énergie de sorte que l'intensité du faisceau émergent I est plus faible. Cette absorption monochromatique répond à la loi de Béer-Lambert qui s'exprime sous la forme **[48]** :

$$DO = \text{Log}\,(I_0 / I) = \varepsilon . C . l \qquad \text{(III.1)}$$

Avec:

DO : Absorbance

I : Intensité du faisceau émergent

I_0 : Intensité du faisceau incident

ε : Coefficient d'extinction massique (L/cm.mg)

C : Concentration massique du composé dosé (mg/L)

l : Épaisseur de la cuve (cm)

L'analyse de nos échantillons a été effectuée avec un spectrophotomètre UV/Visible de la figure III.2.



Figure III.2. Spectrophotomètre UV visible utilisé.

- ***Mode opératoire***

Il se résume dans la détermination de la longueur d'onde et dans l'établissement de la courbe d'étalonnage.

En premier lieu le balayage a été effectué pour des solutions aqueuses d'AB de concentration de 20 mg/l. La courbe obtenue permet d'identifier la valeur de λ_{max} des molécules d'AB.

En second lieu, et à la longueur d'onde maximale identifiée (λ_{max},), on mesure les DO pour une série de solutions aqueuses de concentrations allant de 0 à 40 mg/l. Les courbes d'étalonnage obtenues s'expriment par la variation de la DO en fonction de la concentration d'AB.

➢ **Caractérisation par FTIR**

- ***Principe***

Le principe de Transformation de Fourier (TF) se base sur le fait que chaque fonction peut être décomposée en une somme de fonctions sinusoïdales, chaque fonction sinusoïdale étant définie par deux valeurs : sa fréquence (longueur d'ondes) et son amplitude (intensité). Un spectromètre FT-IR comporte essentiellement cinq parties (FigureIII.3): une source lumineuse, un dispositif permettant de générer les interférences, un compartiment échantillon (porte échantillon), un détecteur ou capteur photosensible et un convertisseur analogique numérique qui transforme le signal analogique en un signal numérique manipulable par le système informatique **[48].**

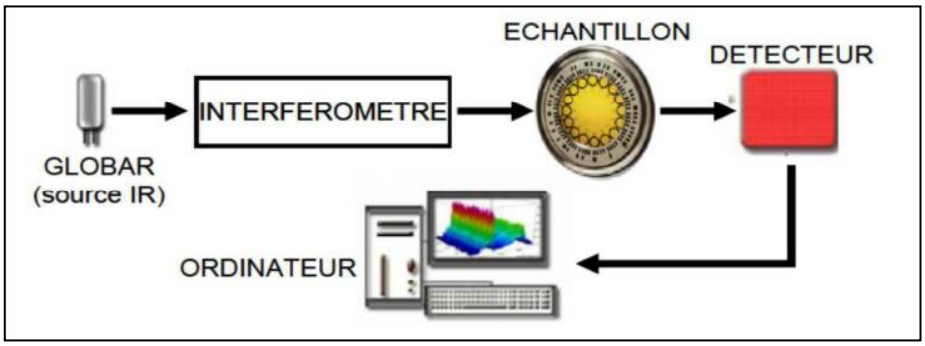


Figure III.3. Principaux composants d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier, **[48].**

- ***Mode opératoire***

Les spectres FTIR ont été obtenus par préparation des pastilles de CTC/KBr et de DXC/KBr avec une proportion de 1 %. Tous les échantillons ont été préalablement séchés à l'étuve à 50°C pendant 6 h.

La préparation des pastilles a été réalisée par broyage de la substance à analyser en présence du KBr, le mélange est ensuite comprimé sous une pusse (presse). En fin, les pastilles ont été mises pour analyse FTIR où les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 400 et 4000 cm^{-1}.

III.4.3.Extraction purification de la peroxydase de navet blanc

➢ **Extraction de la peroxydase de navet**

100g de navet blanc bien rincée avec l'eau distillée et coupée en morceaux a été homogénéisé avec 100 ml d'eau distillée dans un mixeur pendant 5 minutes. Le mélange est ensuite filtré sur multicouches pliés d'une gaze (on évite les pertes à la cour de la filtration). L'extrait récupéré est l'EEB (Figure III.4).

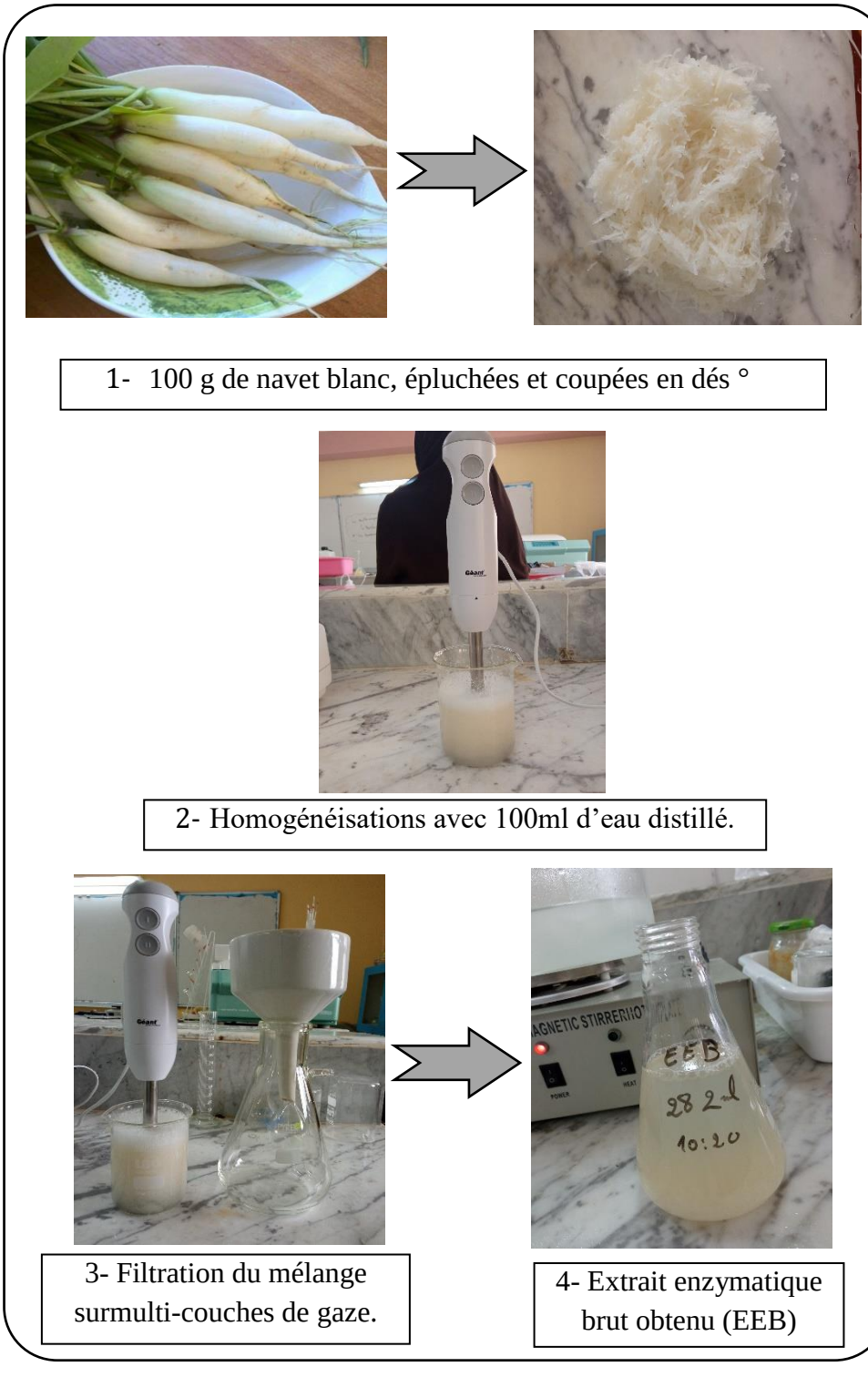


Figure III.4. Protocole expérimental d'extraction de la peroxydase de navet.

➢ ***Purification de la peroxydase extraite***

L'extrait enzymatique brut a subit ensuite une purification à l'acétone (les différentes étapes sont énumérées sur la figure III.5). La méthode est basée sur l'addition de 50 ml d'acétone pré-refroidi à 50 ml d'EEB sous agitation à 0°C. La solution est ensuite centrifugée à 4000 tr/min pendant 10 min. Ensuite, le précipité est dissout dans 50 ml d'eau distillée), c'est l'extrait partiellement purifiée (EEPP).

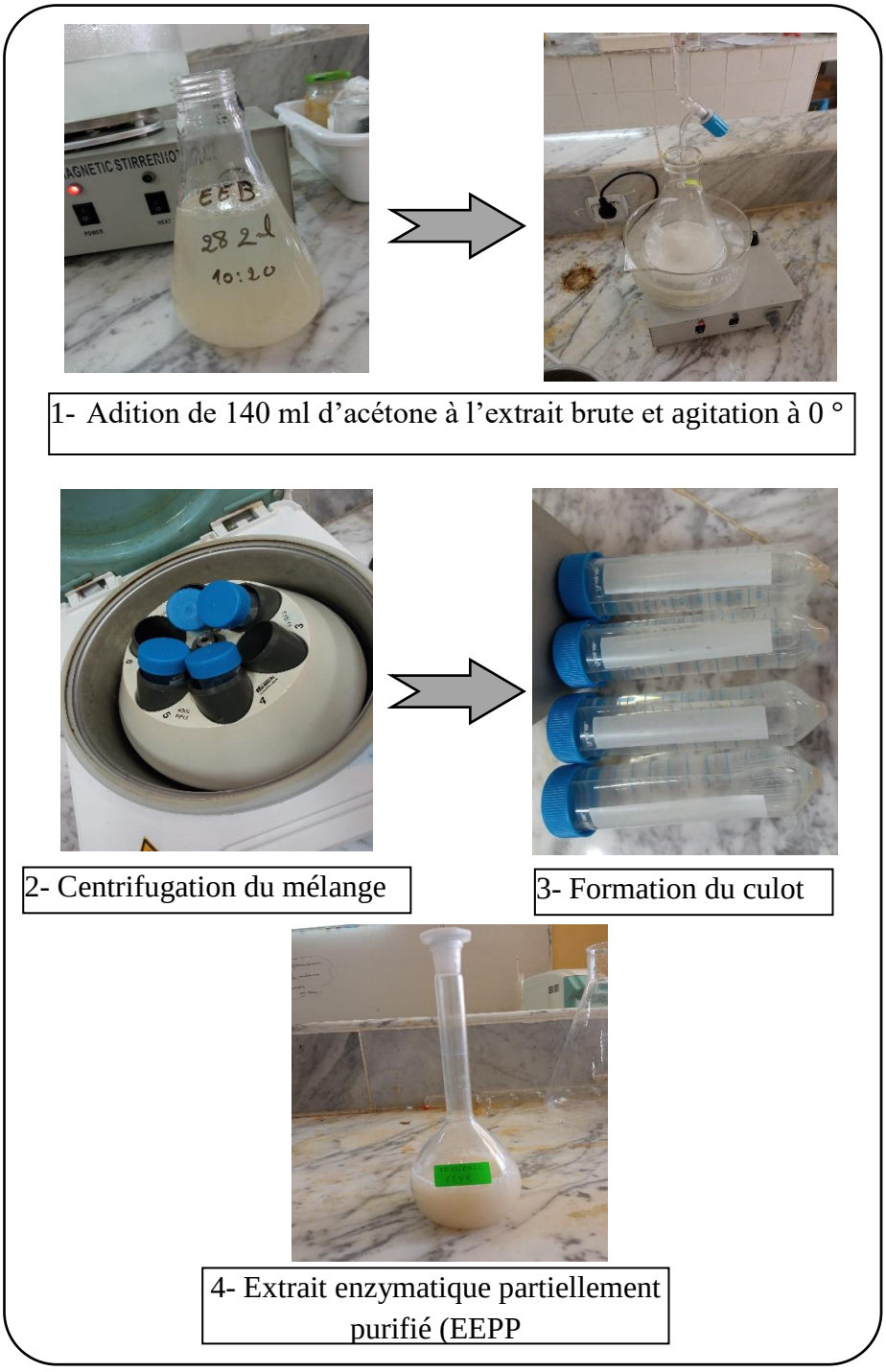
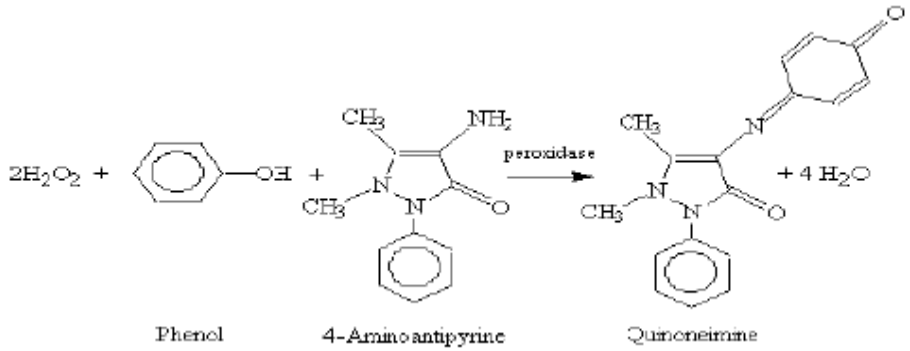


Figure III.5. Protocole expérimental de purification de la peroxydase de navet.

III.4.4.Mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase

L'activité enzymatique des extraits a été dosée en se basant sur la réaction entre le phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de 4-amino-antipyrine et la peroxydase, le produit formé au cours de cette réaction est un chromogène de quinone-imine [49].



(III.2)

L'apparition de quinone-imine produit est colorée en rose, absorbe dans la gamme visible à une longueur d'onde maximale (entre 500 et 517 nm) ce qui permet de mettre en œuvre une technique de mesure d'activité enzymatique en continu.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité de la peroxydase qui transfère 1µmol du peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C. Cette activité est calculée à partir des relations suivantes (III.3 et III.4) :

$$AE=\frac{\left(\frac{dC}{dt}\right)\times Volumedemélangeréactionnel}{volumed'enzymeinjectée} \quad \text{(III.3)}$$

$$AE = \frac{\Delta DO}{\Delta t}.\frac{V_m}{V_e.\varepsilon}.10^3 \quad \text{(III.4)}$$

Avec :

AE : l'activité enzymatique (UI/ml)

Vm : Volume du mélange réactionnel (ml)

Δt : intervalle de temps (min)

Ve : Volume de l'extrait enzymatique (ml)

ε : Coefficient d'extinction molaire (l/mol.cm)

L'évaluation de l'AE de l'EEPP est basée sur l'identification de la longueur d'onde maximale et la détermination du coefficient d'extinction molaire du de quinone-imine établi à partir de la courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène exprimé par :

$DO = f(H_2O_2) = \varepsilon . [H_2O_2]$ (III.5)

Les produits colorés de la réaction de dosage de l'activité peroxydasique pour les différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène sont donnés sur la figure III.6.

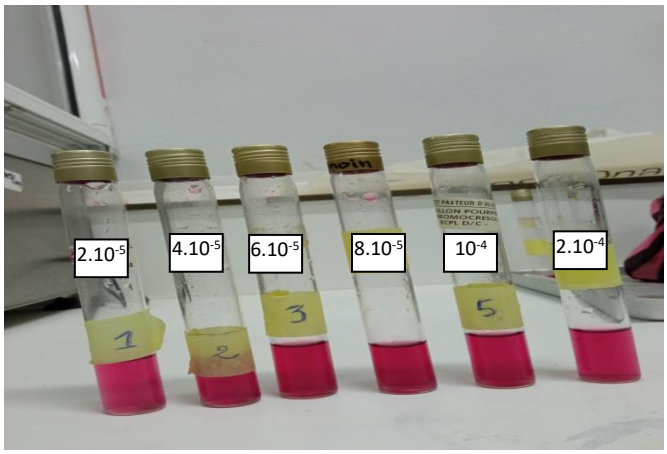


Figure III.6. Produits colorés formés de la réaction colorimétrique pour différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène.

III.4.5. Immobilisation de la peroxydase par gélification

B.1. Emulsification-Gélification externe

Dans une première étape nous avons tenté d'immobiliser la peroxydase dans des microparticules par la technique d'émulsification-gélification externe. Pour ce faire nous avons procédé aux étapes suivantes.

- **Emulisification**

✓ **Principe du procédé d'émulsifcation**

Une émulsion est un mélange hétérogène de deux liquides ou phases peu ou pas miscibles. Ce mélange correspond à une dispersion de gouttelettes de l'une des phases dans l'autre. On distingue donc une phase dispersée et une phase continue.

✓ **Mode opératoire**

1. Préparation de la phase aqueuse

Différentes solutions aqueuses (contenant la peroxydase ayant une AE déterminée) d'alginate de sodium aux différentes concentrations sont préparées : la dissolution d'alginate se fait sous agitation magnétique (Figure III.7).

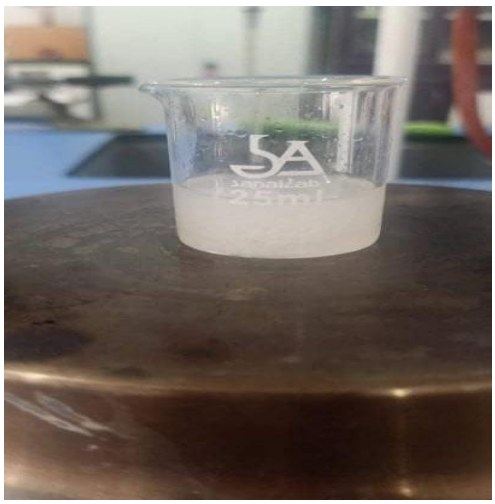


Figure III.7. Phase aqueuse : EEPP+Alginate de Na.

2. Préparation de la phase organique

Le span 80 est dispersé à une concentration bien déterminée dans l'huile de paraffine. Le mélange est porté sous agitation magnétique (Figure III.8).

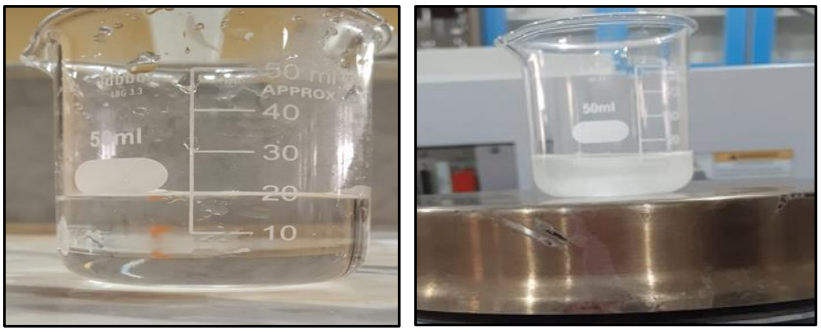


Figure III.8. Phase organique : huile de paraffine + Span 80.

3. Préparation de l'émulsion E/H

Un volume de la phase aqueuse est ajouté à l'aide d'une seringue dans la phase huileuse. Le mélange est homogénéisé à une vitesse bien déterminée pendant 5 min (Figure III.9).



Figure III.9. Emulsion préparée : eau dans huile.

Pour obtenir la meilleure émulsion, on désire optimiser les paramètres dont dépend la formulation. Pour ce faire, nous allons appliquer la méthode de TAGUCHI, dont nous allons cibler trois paramètres à savoir : la concentration d'alginate de sodium et la proportion de la phase aqueuse et la concentration de $CaCl_2$, ces paramètres sont pris à trois niveaux. De ce fait, le nombre d'expériences est égale à : 16 essais (tableaux III.5 et III.6).

Tableau.III.5. Paramètres et niveaux choisis pour la préparation des microsphères de peroxydase.

Matières / ***Niveau***	**Alginate, Na (%) (g/100ml)**	**Huile de paraffine** (%, v/v)	**$CaCl_2$(mol/L)**
1	1.5	50	2
2	2.25	65	2.5
3	3	80	3

Tableau III.6. Combinaisons des différents essais (L9).

Essais	**Alginate, Na**	**Phase huileuse**	**$CaCl_2$**
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

4. Caractérisation des formulations

Les émulsions préparées ont été caractérisée par :

- Microscopie optique.

- Mesure de la conductivité électrique: elle est réalisée afin de déterminer le sens de l'émulsion.

5. Micro-encapsulation par gélification

Les étapes de gélification se résument comme suit :

- L'émulsion E/H est ajoutée à l'aide d'une seringue à une solution de $CaCl_2$ portée sous agitation à 200 tr/min.
- Le mélange : émulsion-$CaCl_2$ est filtré à l'aide d'un papier filtre. Les microsphères récupérées sont lavées avec une solution $CaCl_2$ (1mM) contenant 1% de tween 80, puis à l'eau distillée.
- Les microsphères obtenues sont séchées à la température (25 °C) pendant 48h puis conservées dans un dessiccateur.

B.2. Gélification ionotropique

Cette partie est basée sur l'immobilisation de la peroxydase de navet extraite et purifiée dans un réseau polymérique d'alginate de calcium. Cette opération consiste en une optimisation des concentrations de polymère (alginate de Na), de l'agent de réticulation ($CaCl_2$) en utilisant la méthode de TAGUCHI (tableau III.7 et tableau III.8).

Tableau.III.7. Paramètres et niveaux choisis pour la préparation des particules de peroxydase.

Matières / ***Niveau***	**Alginate de Na (%) (g/100ml)**	**$CaCl_2$(mol/L)**
1	1	0.5
2	1.5	1
3	2	1.5

Tableau III.8. Compositions des différents essais (L9)

Essais	**Alginate de Na,**	**$CaCl_2$**
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4	2	1
5	2	2
6	2	3
7	3	1
8	3	2
9	3	3

- **Préparation de la solution d'alginate de sodium**

Cette opération consiste à dissoudre une masse d'alginate de sodium dans l'extrait enzymatique partiellement purifié sous agitation magnétique (à une vitesse de 200 tr/min) jusqu'à dissolution complète, afin d'obtenir une concentration donnée (tableau III.7).

- **Préparation de la solution de chlorure de calcium**

La solution de chlorure de calcium est préparée par dissolution d'une quantité déterminée de $CaCl_2$ dans un volume d'eau distillée pour obtenir une concentration fixée (tableau III.7).

- **Gélification**

Pour gélifier la peroxydase, les gouttelettes d'alginate-peroxydase, le protocole expérimental passe par les étapes suivantes (figure III.10):

- Un volume de la solution d'alginate-peroxydase est ajouté goutte à goutte (la distante entre la seringue le niveau du liquide est de 5 cm) à une solution de $CaCl_2$ portée sous agitation magnétique (200 tr/min).
- Le mélange obtenu est laissé sous agitation pendant 1heure.
- Les particules gélifiées sont filtrées à l'aide d'un papier filtre.
- La DO et le volume du filtrat ont été mesurés.
- Les microsphères obtenues sont séchées à l'air ambiant et conservées dans un dessiccateur.

- **Caractéristiques des particules obtenues**

A. Aspect macroscopique

Pour les différents essais de formulation réalisés, l'aspect macroscopique des microparticules (billes) obtenues est observé visuellement pour vérifier la taille, la masse, la forme, l'état de surface et la couleur des échantillons préparés. Elles sont analysées à l'état humide et après séchage.

B. Caractérisation de l'activité enzymatique de la peroxydase immobilisée

La détermination de l'AE de la peroxydase immobilisée (AEI) et celle du filtrat (AE_F) permet de calculer l'efficacité d'immobilisation et de l'activité retenue selon les expréssions suivantes :

$$EI(\%) = \left(\frac{AE_0.V_0 - AE_F.V_F}{AE_0.V_0}\right).100 \qquad \text{(III.5)}$$

$$AR(\%) = \left(\frac{AEI.V_{imm}}{AE_0.V_0 - AE_F.V_F}\right).100 \qquad \text{(III.6)}$$

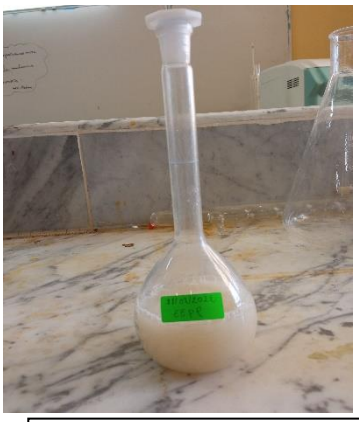
Avec :

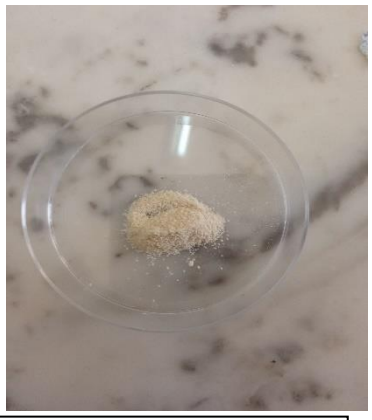
AE_0 : AE de l'EEPP libre (UI/ml).

V_0 : volume de l'enzyme à immobiliser (ml);

V_F : Volume du filtrat (ml) ;

V_{imm} : volume d'enzyme immobilisée (ml).





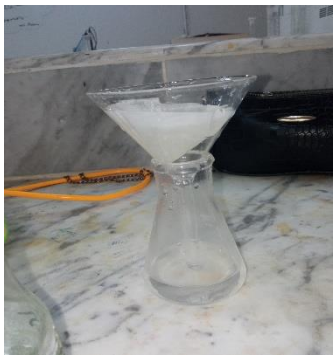
1- 10ml d'EEPP+0.5 g de l'alginate de Na



2- Dissolution de l'alginate de Na



3- Gélification de l'alginate de Na



4- Filtration du mélange : particules d'alginates de Ca-peroxydase



5- Récupération des particules d'alginates de Ca-peroxydase

Figure III.10. Protocole de gélification de la peroxydase dans les billes d'alginates de Ca.

C. Caractérisation spectrale

Les particules d'alginate de Ca contenant la peroxydase de navet, l'alginate de sodium ainsi que la peroxydase seront caractérisées par spectroscopie FTIR, après séchage à l'étuve.

III.4.6.Transformation de la CTC par la peroxydase du navet blanc libre et immobilisée

Dans le but de mettre en évidence les conditions optimales de la transformation de la CTC par la peroxydase libre et immobilisée. Pour ce faire, nous avons construit un plan d'expérience constitué de trois paramètres pris à trois niveaux, d'où nous avons réalisé 9 essais, (tableaux III.9 et III.10). Les paramètres dont dépend la transformation la réaction enzymatique des molécules de CTC, sont :

- La concentration de l'AB
- La concentration de H_2O_2
- Le pH.

Les mélanges réactionnels sont préparés dans des tubes à essais, bien nettoyés, ils contiennent :

- 3ml de solution tampon d'un pH donné
- 1ml de CTC
- 1ml d'H_2O_2

La réaction est initiée par l'ajout de 0.2 ml d'extrait enzymatique partiellement purifié (ou une masse équivalente des billes préparées), on laisse la réaction se déroulé pendant un temps déterminé ensuite les réactions sont arrêtées et les mélanges sont centrifugés pendant 15 minutes avec une vitesse de 4000 tour/min. L'analyse des mélanges avant et après la centrifugation est effectuée par un spectrophotomètre UV-visible (à λ_{max}du CTC) afin de déterminer la concentration résiduelle du CTC, au cours de son élimination par la peroxydase.

Enfin, l'efficacité de transformation est caractérisée par la détermination du rendement de transformation (RT%) donné par :

$$\mathrm{RTD}(\%) = \left[\frac{\mathrm{DO_{initiale}} - \mathrm{DO_{finale}}}{\mathrm{DO_{initiale}}}\right] \mathrm{x}\ 100 \qquad \text{(III.7)}$$

Tableau.III.9. Paramètres et niveaux choisis pour la préparation des microsphères de Peroxydase.

Matières / ***Niveau***	**C_{CTC} (mg/L)**	**C_{H2O2} (mM)**	**pH**
1	10	0.4	3
2	25	2.2	5
3	40	4	7

Tableau III.10. Combinaison des différents essais (L9).

Essais	**C_{CTC} (mg/L)**	**C_{H2O2} (mM)**	**pH**
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

Chapitre IV :
Résultats et discussion

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter les différents résultats obtenus ainsi que les discussions correspondantes. Cependant, les sections suivantes détaillent ces résultats sous formes des illustrations graphiques et des tableaux.

IV.2. Détermination de l'activité enzymatique de l'EEPP de navet

L'expérience réalisée nous a permis de déterminer la cinétique de réaction de transformation du phénol en produit coloré (réaction III.2) assurée par la peroxydase. L'allure est représentée par la figure IV.1. Ainsi, la courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène : co-substrat de la peroxydase est illustré sur la figure IV.2.

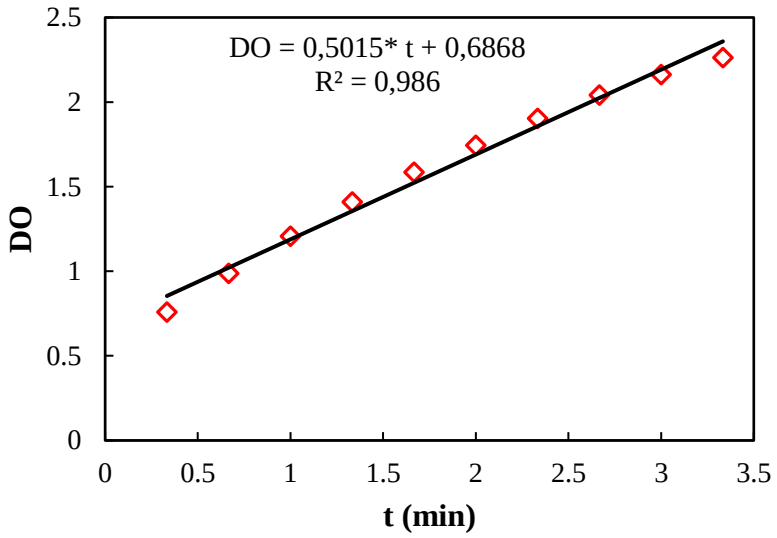


Figure IV.1. Cinétique enzymatique de réaction de transformation du phénol par la peroxydase de navet à λmax= 580nm.

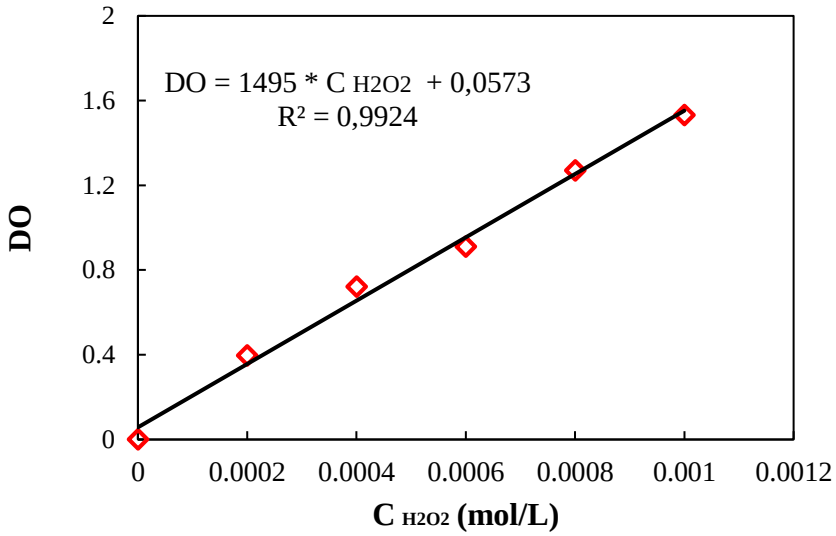


Figure IV.2. Courbe d'étalonnage de H_2O_2, ε =1495 L/mol.cm.

Des résultats des figures IV.1 et IV.2, la valeur de l'activité enzymatique de l'EEPP du navet est égale à 8.72 UI/ml.

IV.3. Immobilisation de la peroxydase extraite par émulsification-gélification externe

IV.3.1.Emulsification

Les vues microscopiques des 07 émulsions E/H préparées sont présentées sur la figure IV.3.

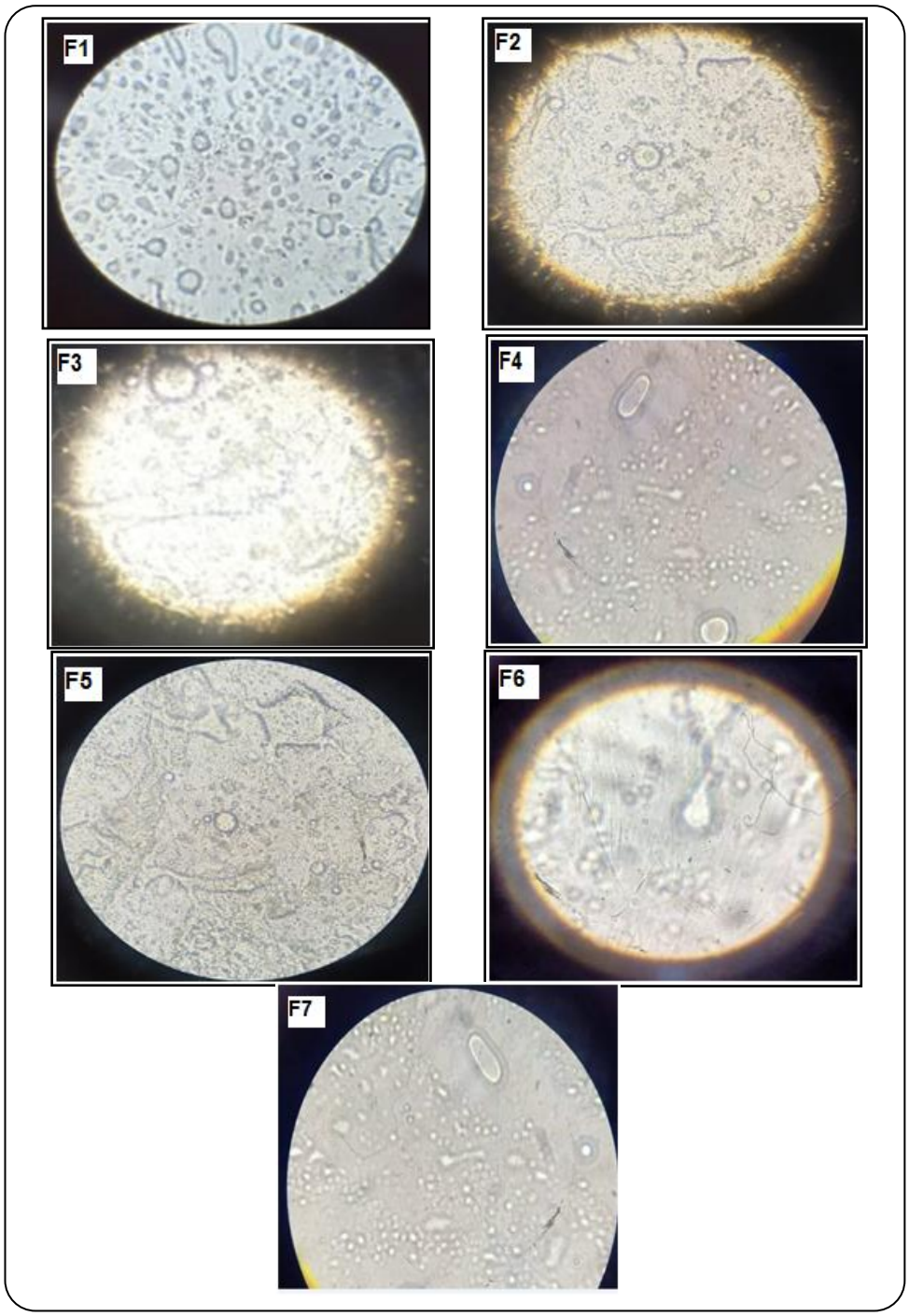


Figure IV.3. Vues microscopiques des émulsions E/H formulées.

Discussion :

- *Pour la formulation N°1 :* la concentration d'alginate est de 1.5 % et 50 % de la phase huileuse, on remarque une bonne dispersion de la phase aqueuse, et les gouttelettes sont de petites tailles.
- *Pour la formulation N°2* : la concentration d'alginate est de 1.5 % et 65% de la phase huileuse, dans ce cas, on observe une mauvaise dispersion de la phase aqueuse où les gouttelettes de cette dernière ont une très petite taille et ne sont pas nombreuses.
- *Pour la formulation N°3* : dans ce cas, la concentration d'alginate est de 1.5 %, et la proportion de la phase organique est 80%, la dispersion de la phase aqueuse est presque absente avec une distribution non-uniforme des tailles des gouttelettes.
- *Pour la formulation N°4 :* la concentration d'alginate est de 2.25 % et une proportion de la phase organique est de 50%, on remarque une bonne dispersion de la phase aqueuse, mais la distribution de cette phase n'est pas régulière.
- *Pour cette formulation N°5 :* pour cette formulation, la concentration d'alginate est de 2.25 % et celle de la phase huileuse est de 65%, il s'agit de la même proportion de la phase huileuse comme celle de la formulation N°2, alors qu'un résultat identique a été observé que celui de cette dernière formulation.
- *Pour la formulation N°6:*de même, malgré l'augmentation de concentration d'alginate, on constate clairement que l'aspect de l'émulsion obtenue est similaire à celui de la formulation N°3, il s'agit de la même proportion de la phase huileuse.
- *Pour la formulation N°7 :* la concentration d'alginate est 3 %, on note qu'elle est similaire à la formulation N° 4 en terme de dispersion de la phase aqueuse et de gouttes de la phase huileuse.

IV.3.2.Gélification

Après avoir préparé les émulsions, nous avons passé à l'étape de gélification, où nous avons utilisé différentes solutions de chlorure de calcium. Dans cette étape, concernant les formulations F1, F2 et F3, les microparticules, ont subi une dissolution spontanée (figure IV.4), alors pour les formulations F4 et F5 et F6, malgré que les particules ont été bien gélifiées, mais à l'étape de filtration il y avait une dissolution complète, (figure IV.5).

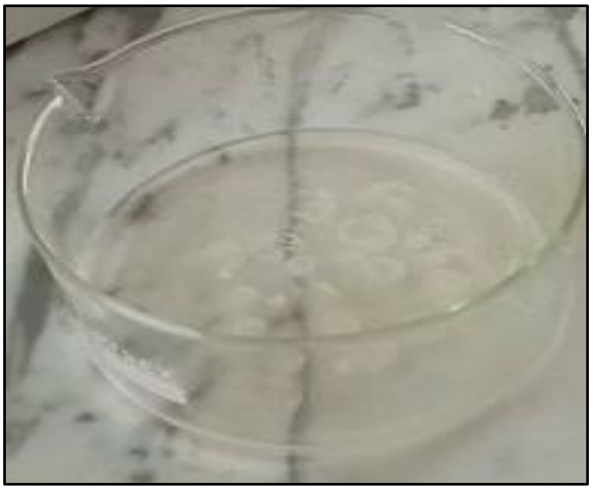


Figure IV.4. Aspect des microparticules pendant la gélification avec le chlorure de calcium.



Figure IV.5. Aspect des microparticules qui ont subi la filtration.

Vue que la méthode d'immobilisation de la peroxydase extraite par émulsification-gélification externe n'a pas été achevée, parce que toutes les microsphères obtenues ont subi une dissolution : soit au moment de la gélification externe ou bien au moment de la filtration, alors nous allons passer à la méthode d'immobilisation par gélification par extrusion de gouttes.

IV.4. Gélification ionotropique

Dans cette étape, nous avons réalisé neuf (09) formulations selon la concentration d'alginate de sodium et celle de chlorure de calcium (tableau III.7), où nous allons étudier l'effet de ces deux facteurs sur la qualité des particules en terme de l'activité de peroxydase immobilisée, de l'efficacité d'immobilisation et de l'activité retenue.

IV.5. Caractérisation de l'activité enzymatique de la peroxydase immobilisée

Seules les formulations (F3, F4, F5 et F6) ont été conservées pour le reste de l'étude, les autres formulations (F1, F2, F7, F8 et F9) ne contiennent pas de peroxydase, ce resultat a été confirmé par un test d'AE, où aucune coloration rose n'est apparue.

Afin de déterminer l'efficacilté d'immobilisation et l'activité retenue, nous avons déterminé les AE de la peroxydase immobilisée dans les formulations ($AE_{F3\ à\ F6}$) ainsi que celles des des filtra tscorrespondants. Les différents graphes de la cinétique enzymatique sont illustrés sur les figures (IV.6 et IV.7).

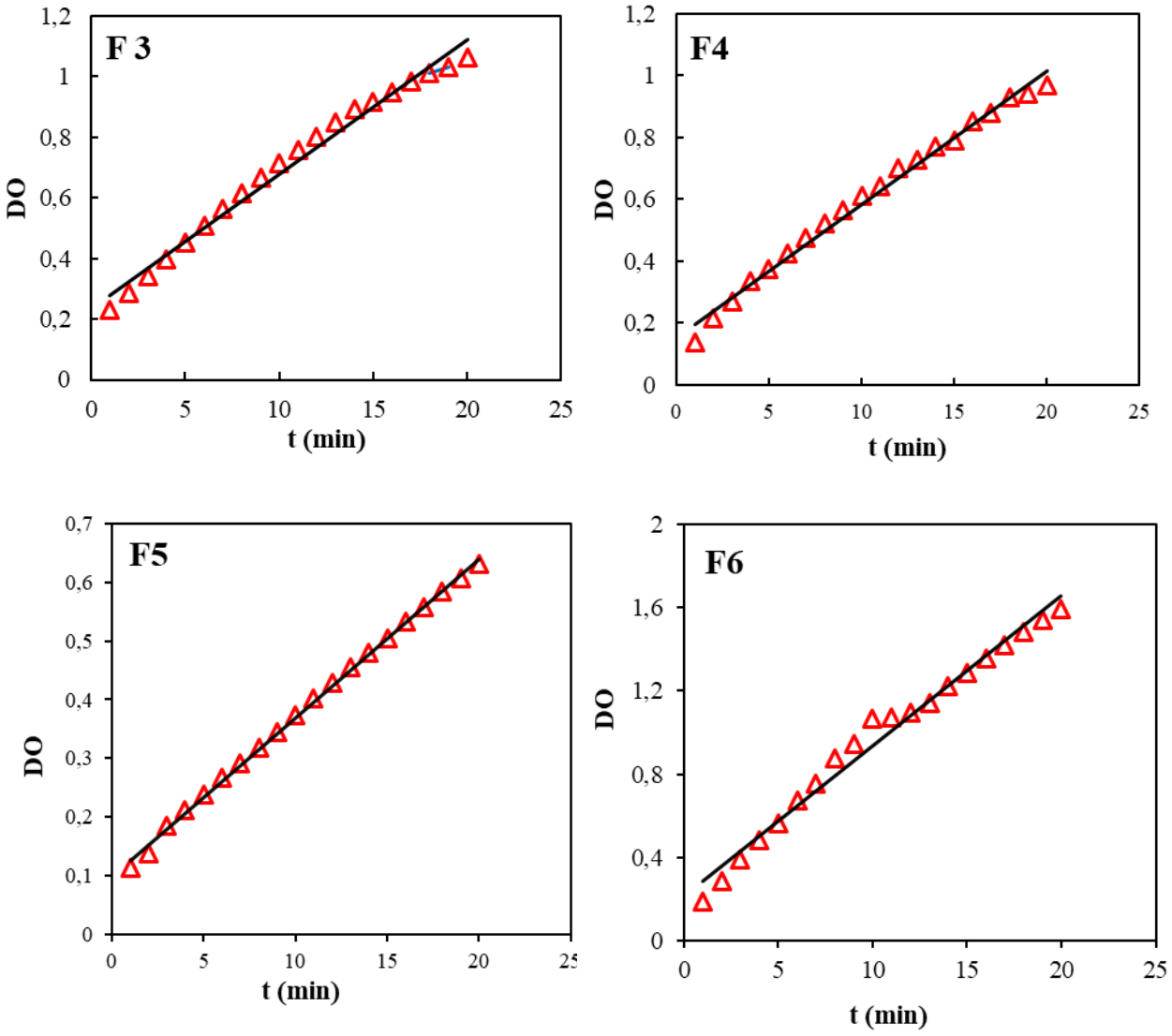


Figure IV.6. Cinétique enzymatique des billes d'alginates de Ca-peroxydase des formulations F3 à F6.

Figure IV.7. Cinétique enzymatique des filtrats obtenus des formulations F3 à F6.

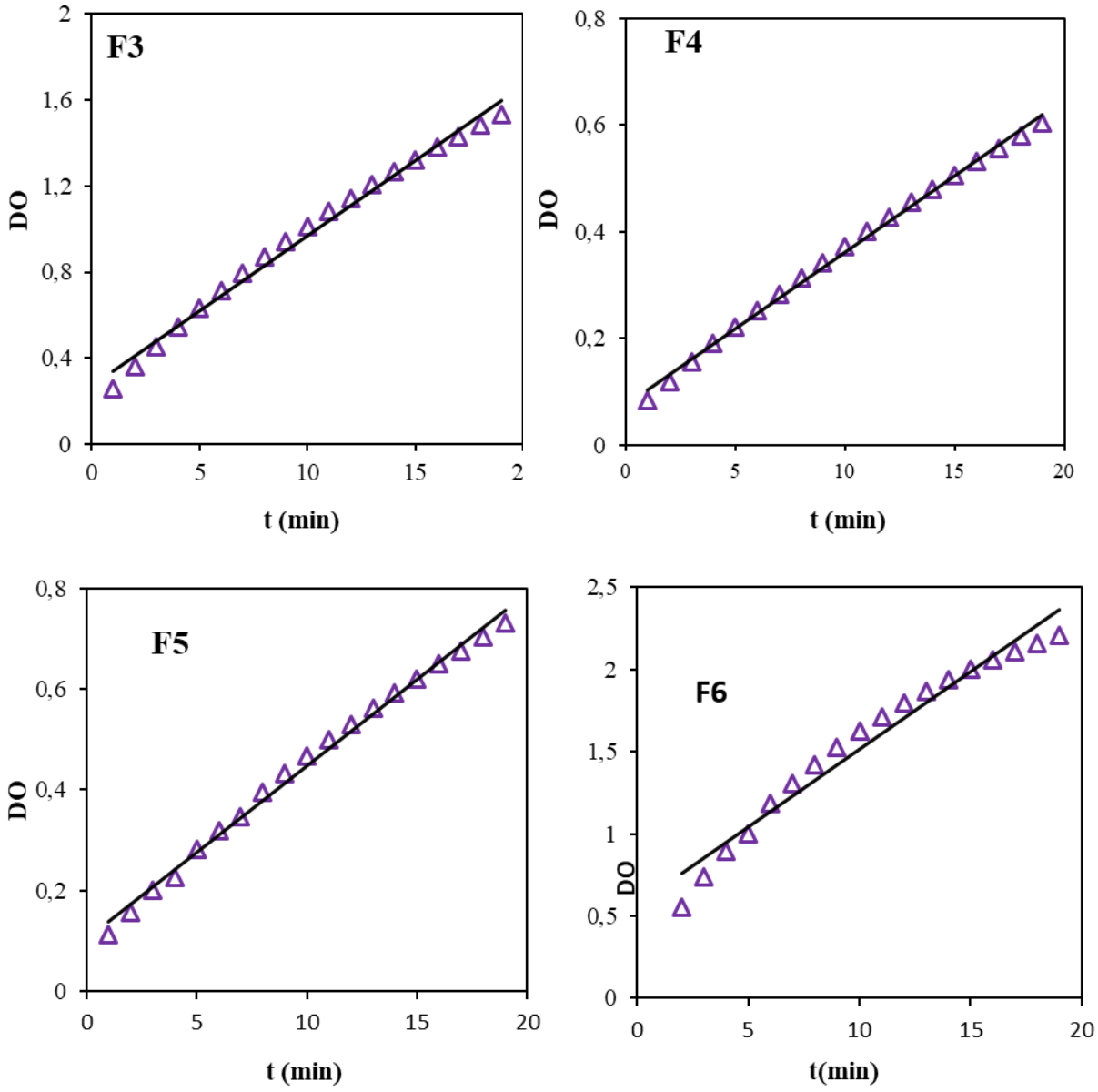


Tableau IV.1, récapitule les différents paramètres des courbes d'étalonnage obtenus y compris les équations et les coefficients de corrélations correspondant.

Tableau. IV.1. Equations des courbes d'étalonnage et les coefficients de corrélation correspondant de la peroxydase immobilisée et des filtrats correspondants.

N° Formulation	Equation de la courbe d'étalonnage	Coefficient de corrélation
Billes d'alginate de Ca		
F3	DO = 0,0445*t + 0,234	0,9855
F4	DO = 0,043*t + 0,153	0,990
F5	DO = 0,027*t + 0,099	0,998
F6	DO = 0,072*t + 0,214	0,982
Filtrat		
F3	DO = 0,069*t + 0,271	0,989
F4	DO = 0,028*t + 0,074	0,996
F5	DO = 0,034x*t+ 0,103	0,993
F6	DO = 0,094*t + 0,567	0,962

Les résultats des paramètres d'immobilisation sont rassemblés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2.Détermination des paramètres : EI, AE_F, AR des billes d'alginate obtenues.

	F3	**F4**	**F5**	**F6**
AEI (UI/g)	0.774	0.600	0. 469	1.252
AE_F(UI/ml)	1.214	0.500	0.596	1.649
EI (%)	25.75	69.41	63.55	0.194
AR (%)	12.870	4.471	3.874	////

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, nous pouvons dire :

- *Pour la formulation N°3* : on note que l'AR (qui exprime le pourcentage de l'activité enzymatique de la peroxydase réellement immobilisée par rapport à celle à immobiliser) a une

valeur de 12.87%, cette valeur est atteinte pour une concentration d'alginate de Na de 1% et une concentration de $CaCl_2$ de 1.5mol/L. Ainsi, l'AE du filtrat est de 1.214 UI/ml et l'EI est de 25.75%, ces deux valeurs indiquent que la quantité d'alginate de Na est insuffisante pour immobiliser toutes les molécules d'enzymes présentes dans la solution.

- *Pour la formulation N°4 :* on note que l'AR est de 4.471% qui correspond aux AE de l'enzyme immobilisée et celle du filtrat de 0.6 et 0.5 UI/ml respectivement, tandis que l'EI atteint une valeur maximale de 69.41% (résultats obtenus pour une concentration d'alginate de Na de 1.5% et celle de $CaCl_2$ de 0.5%), nous pouvons dire dans ce cas que la quantité d'alginate de Na est suffisantes et celle de Ca2+ sont suffisantes pour immobiliser les molécules de peroxydase présentes dans la solution initiale.

- *Pour la formulation N°5 :* dans ce cas, l'AR est de 3.874%, l'AEI et l'AE_F ont des valeurs de 0.469 et 0.596UI/ml respectivement. En revanche, l'EI a une valeur de 63.55% (ces résultats ont obtenu pour des concentrations d'alginate de Na et de $CaCl_2$ de 1.5% et de 1mol/L).Ici, la quantité d'alginate et celle de $CaCl_2$sont suffisante pour piéger le maximum de la quantité de peroxydase.

- *Pour la formulation N°6 :* pour cette formulation, les concentrations d'alginate de Na et de CaCl2 sont 1.5% est 1.5 mol/L respectivement, où l'AR avait une valeur négative (résultat non présenté), parce que malgré que l'AEI est élevée mais l'AE du filtrat est aussi élevée, ceci est dû au fait que les cations Ca^{2+}, ont réticulé la majorité des groupements carboxylates des deux monomères constituant les chaines d'alginate de Na.

De ces résultats, nous allons retenir les formulations F4 et F5 dans la suite de l'étude.

IV.6. Caractérisation par FTIR des billes obtenues

Les spectres FTIR de l'alginate de sodium de la peroxydase, et des quatre (04) formulations de billes d'alginate de Ca chargées en peroxydase, sont présentés sur les figures IV.8 à IV.11, et les nombres d'ondes des groupements fonctionnels correspondants sont présentés sur les tableaux : IV.3 à IV.5.

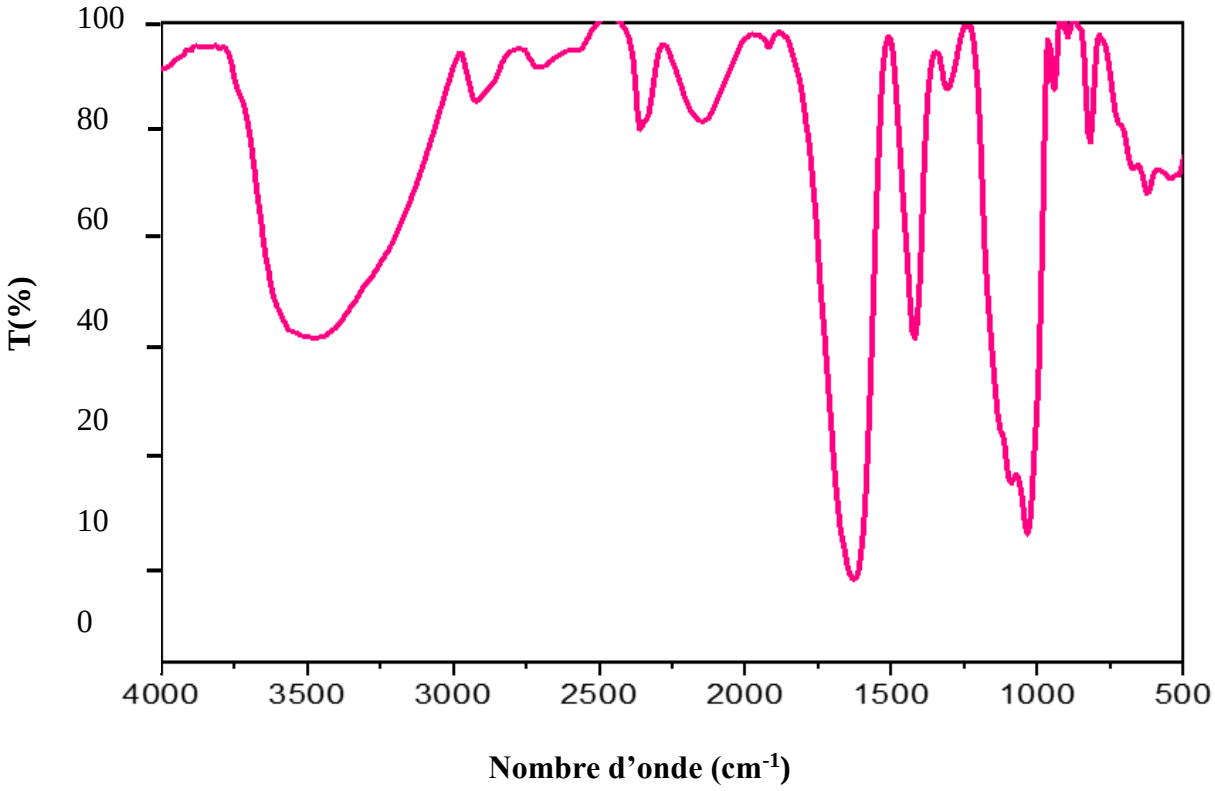


Figure. IV.8. Spectre FTIR de l'alginate de sodium

Tableaux IV.3 : Bandes caractéristiques du spectre FTIR d'alginate de sodium

Nombre d'onde (cm^{-1})	**Liaison**
3441.12	Bande large : ν $(O-H)_{alcool}$
2931.90	ν $(C-H$ et $CH_2)_{alcane}$
1620.26	ν (C=O)
1419.66	ν $(C-O)_{alcool}$
1319.35	ν $(C-O)_{acide}$
1095.6	ν asymétrique $(C-O-C)_{Etheroxyde}$
1033.88	ν asymétrique $(C-O-C)$ Etheroxyde

- ***Pour l'alginate de sodium*** *:*

Le spectre FTIR de l'alginate de sodium, montre des bandes d'absorption très importantes, tels que les groupements fonctionnels hydroxyles, éther et les carboxylates :

✓ Une bande d'absorption large, qui apparait à 3441,12 cm^{-1}, elle est attribuée au mode de vibration de valence de la liaison O-H des groupements hydroxyles caractéristiques des Polysaccharides naturels.

✓ Une bande d'absorption apparait à 2931.90 cm^{-1}, elle correspond à la vibration d'élongation de la liaison CH des alcanes.

✓ Les bandes à 1620,26 cm^{-1}, correspond à la vibration d'élongation de la liaison (C=O) des acides carboxyliques.

✓ les bandes d'absorption aux nombres d'onde : 1419,66 et 1319.35 cm_{-1} sont attribuées respectivement aux élongations (C-O) des alcools et des acides.

✓ Les bandes d'absorption aux nombres d'onde : 1095.6 et 1033.88 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux élongations asymétriques et symétriques du groupement (C-O-C).

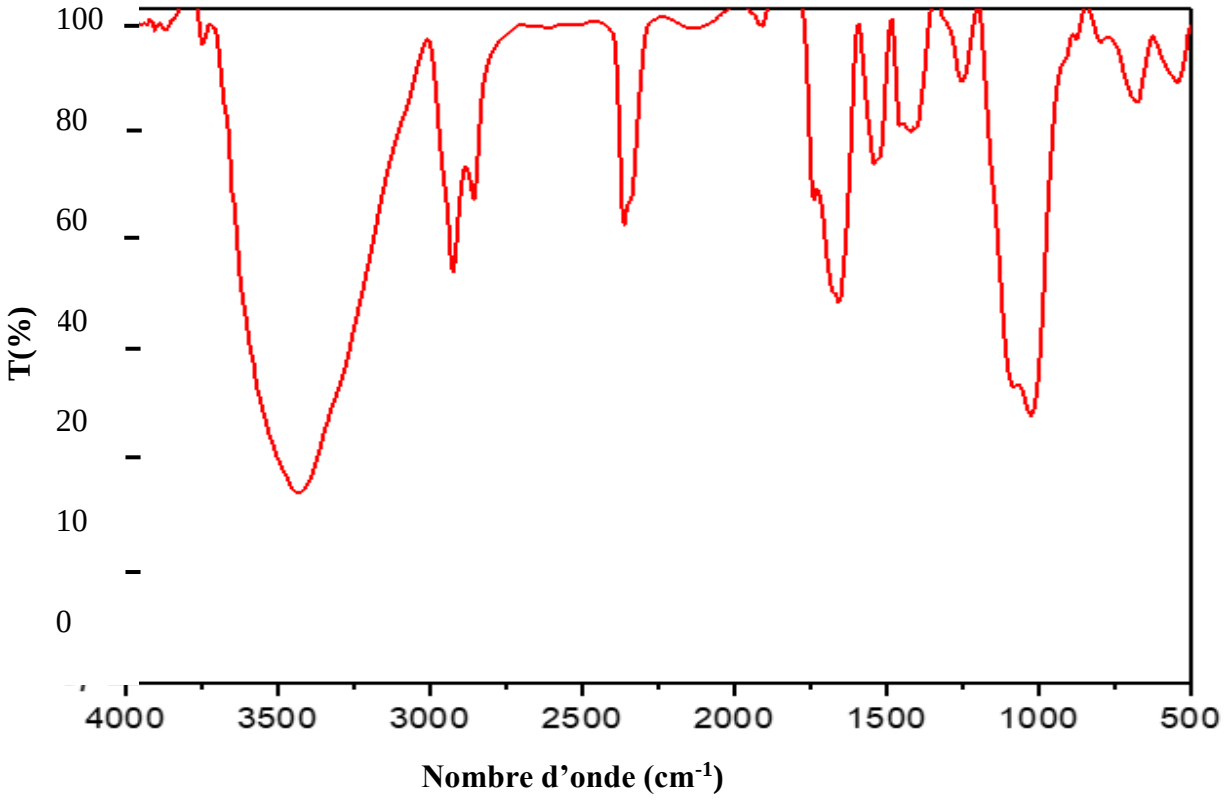


Figure. IV.9. Spectre FTIR de la peroxydase

Tableaux IV.4 : Bandes caractéristiques du spectre FTIR de la peroxydase

Nombre d'onde (cm^{-1})	Groupement fonctionnel
3425.69	ν (O-H)
2850 et 2924.18	$\nu_{asymétrique}$ $\nu_{symétrique}$ $(C-H)_{alcane}$
2300	ν (S-H)
1651.12	ν (C=O) amide
1543.1	ν $(N-H)_{amide}$
1490 et 1975	ν $(C=C)_{aromatique}$
1257.63	ν (C-N) amide
1095.60	ν (C(=O)-C)

- ***Pour la peroxydase :***

L'analyse de la figure IV.9, nous renseigne sur les bandes d'absorption caractéristiques de base de la peroxydase. Les principaux pics distinctifs sont apparents à :

✓ Au nombre d'onde de 3425.69cm^{-1}, il correspond à la vibration d'élongation de la liaison OH des acides carboxyliques. Cette fonction acide confirme la présence d'un résidu de l'acide aspartique dans la structure de la peroxydase [50].

✓ La bande d'absorption au nombre d'onde ayant une valeur de 2850 et 2924.18cm^{-1}, correspond à l'élongation (C-H) asymétrique et symétrique respectivement des alcanes.

✓ La bande d'absorption apparaissant à 230 cm^{-1}, correspond à la vibration d'élongation de la liaison (S-H), ce qui correspond probablement à l'existence d'un résidu de la cystéine, [51]

✓ La bande d'absorption apparaissant à 1651.12cm^{-1}, est spécifique à la vibration d'élongation du groupement (C=O)des amides.

✓ Les deux bandes d'absorption sortant à 1543.1 et 1257.63cm^{-1}, correspondent respectivement aux vibrations de valence des liaisons (N-H) et (C-N) des amides.

✓ Les deux bands à 1573.97 et 1481.38 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation de la liaison (C=C) des cycles aromatiques.

✓ Les deux bands apparaissant aux nombres d'onde : 1490 et 1975 cm^{-1}, correspondent aux vibrations d'élongation de la liaison :(C=C) des aromatiques, cette fonction correspond probablement à l'existence du résidu de la phénylalanine [52].

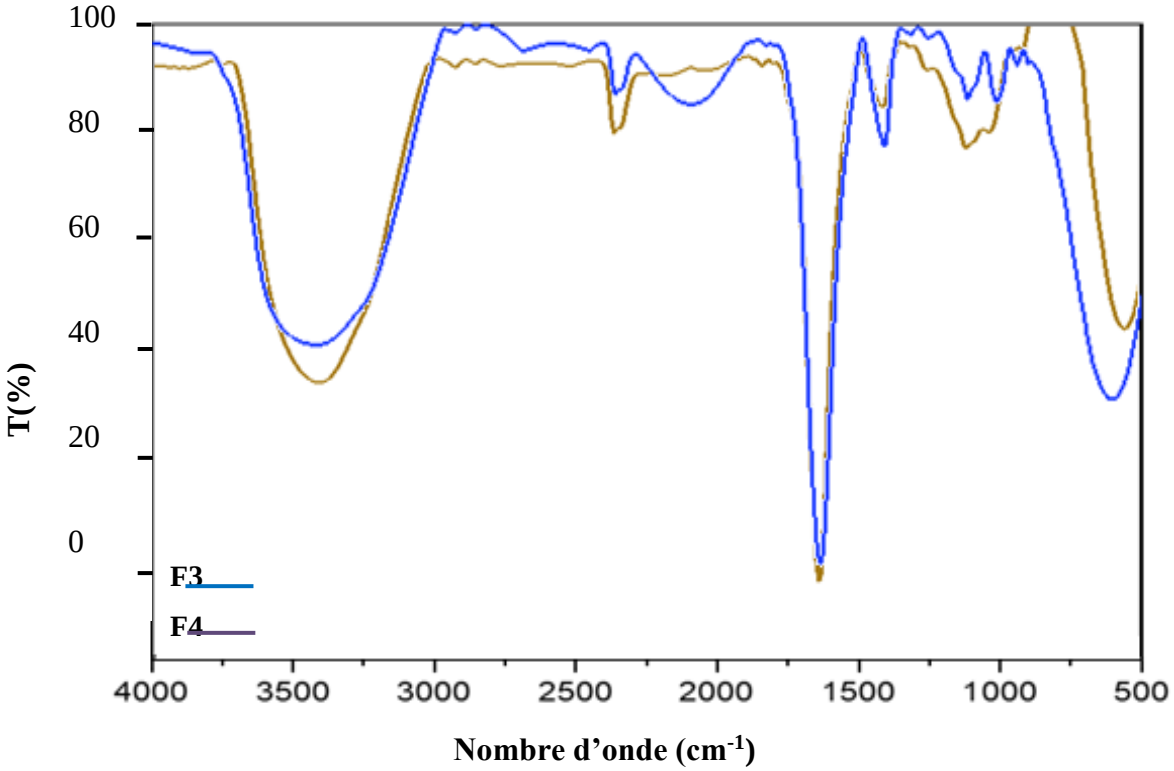


Figure. IV.10. Spectre FTIR des billes l'alginate de Ca-peroxydase pour les formulations F3 et F4.

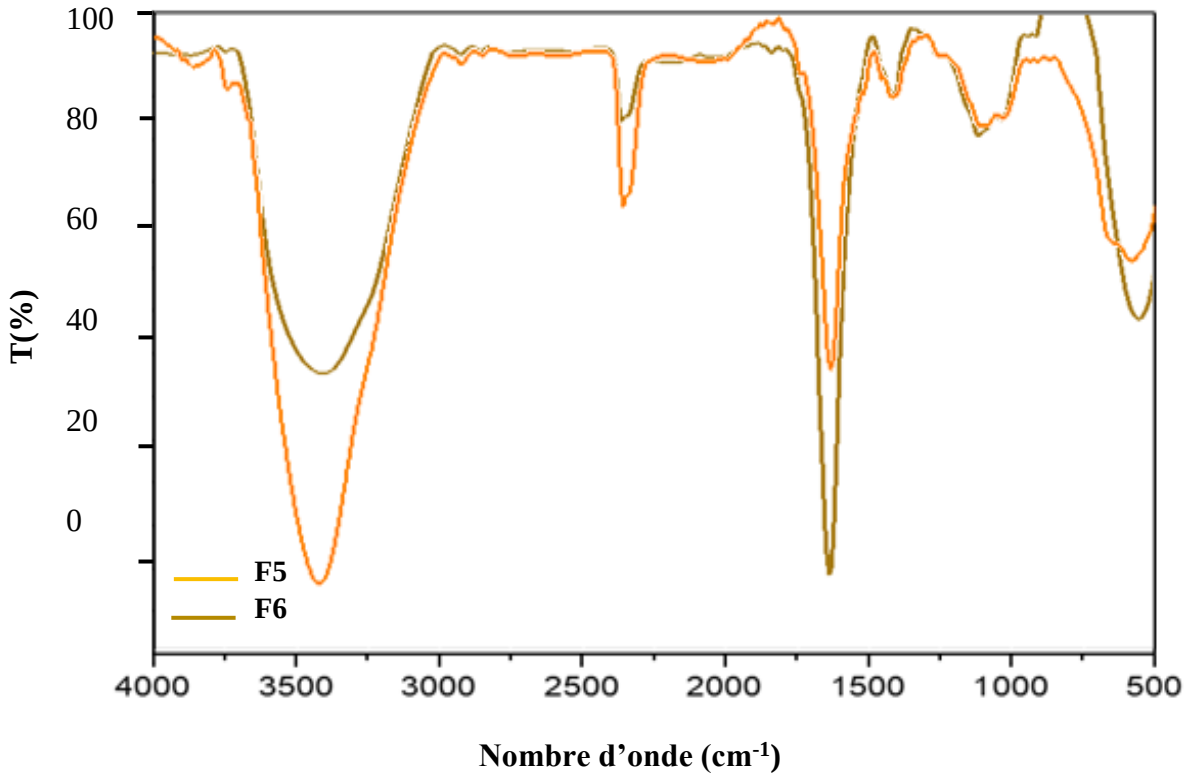


Figure. IV.11. Spectre FTIR des billes l'alginate de Ca-peroxydase pour les formulations F5 et F6.

Tableaux IV.5 : Bandes caractéristiques du spectre FTIR des billes l'alginate De Ca-peroxydase pour les formulations : F3, F4, F5 et F6.

Nombre d'onde (cm^{-1})	Groupement fonctionnel
3410.26	ν (O-H)
2850 et 2924.18	$\nu_{asymétrique}$ $\nu_{symétrique}$ $(C-H)_{alcane}$
2370	ν (S-H)
1635.69	ν (C=O)
1411.69	$\nu(C-O)_{acide}$
1300.50	$\nu(C-O)_{alcool}$
1250.30	ν $(C-N)_{amide}$
1118.75	ν $_{symétrique}$ $(C-O-C)_{Etheroxyde}$
1020.78	ν $_{asymétrique}$ $(C-O-C)_{Etheroxyde}$

- ***Pour les billes d'alginate de Ca:***

Pour les quatre spectres des billes d'alginate de Ca contenant l'enzyme, ils apparaissent tous identiques :

✓Une comparaison entre le spectre de l'enzyme et le spectre des billes d'alginate contenant l'enzyme, on note que les bandes d'absorption ayant des nombres d'onde : 1300.50, 1118.75 et 1020.78 cm^{-1}, apparaissent dans les deux spectres.

✓Ainsi, les bande d'absorption ayant des nombres d'onde : 2370, 1411.69 et 1250.30 cm^{-1} correspondent aux mêmes bandes d'absorption sortant dans le spectre de la peroxydase.

IV.7. Transformation de la CTC par la peroxydase du navet blanc libre et immobilisée

IV.7.1. Caractérisations spectrales du CTC

- **Par UV-Vis**

Les spectres UV-Vis de la CTC présentés par les figures IV.12. Indiquent de longueurs d'onde maximales molécules aux valeurs : 381 nm.

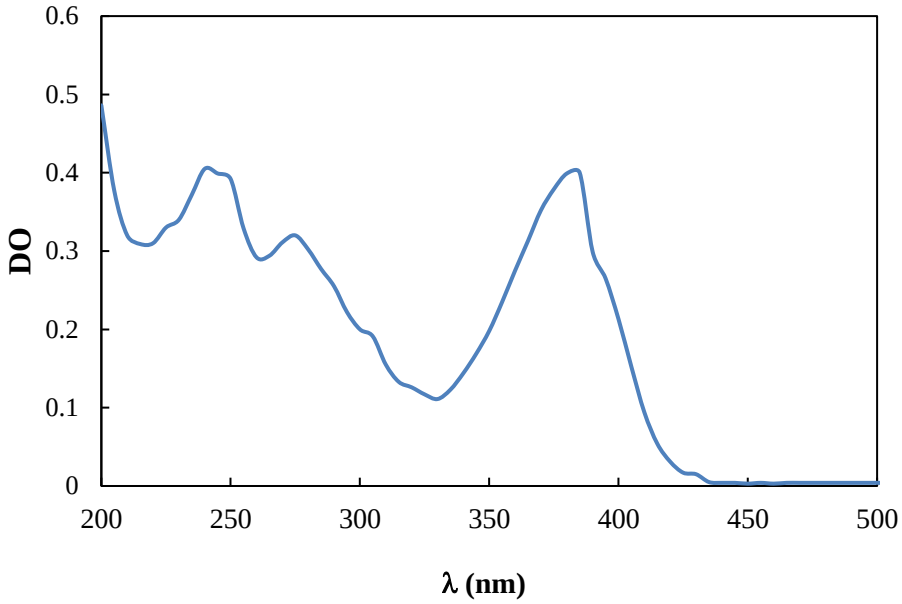


Figure IV.12. Spectre d'absorption UV-Vis de la molécule CTC (10 mg/L)

Ainsi, la courbe d'étalonnage de la CTC est illustrée par la figure IV.13.

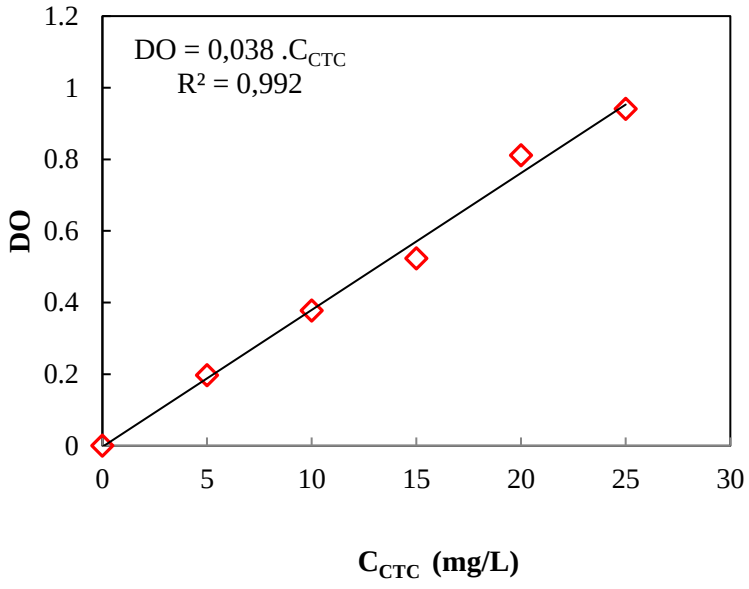


Figure IV.13. Courbe d'étalonnage de la CTC.

- **Par FTIR**

Les spectres FTIR de la molécule CTC est illustré sur la figure IV.14, et le tableau d'identification des groupements fonctionnels correspondant est présenté par le tableau : IV.6.

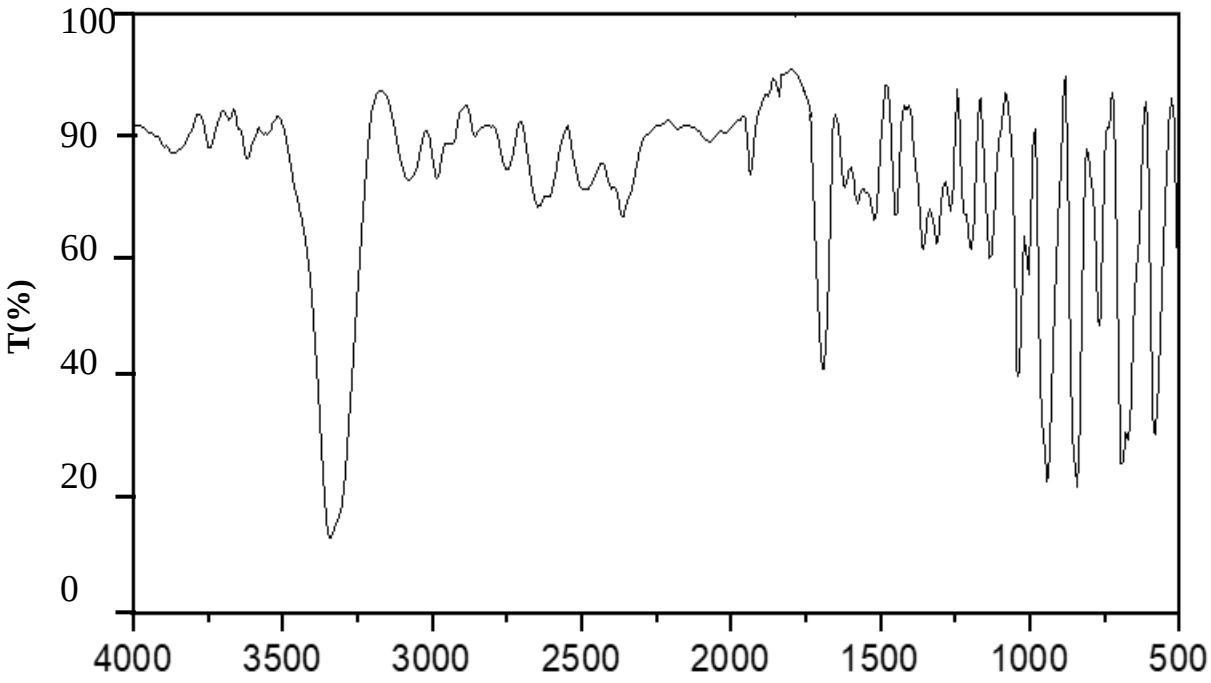


Figure IV.14. Spectre FTIR de la molécule CTC.

Tableaux IV.6. Bandes caractéristiques du spectre FTIR de la molécule CTC

Nombre d'onde (cm^{-1})	Groupement fonctionnel
3750 et 3600	$\nu_{asymetrique}$ et $\nu_{symetrique}$ (N-H)amine primaire
3350	ν (O-H)alcool
3050	ν (C-H) aromatique
2950	ν (C-H) alcane
1680	ν (C=O) cétone
1615 et 1520	ν (C=C) aromatique
1200	ν (C-N)amine primaire
1100	ν (C-O)alcool secondaire
900 et 820	δ (C-H) aromatique
750	ν(C-Cl)

IV.7.2. Résultats de rendement de transformation de la CTC par la peroxydase libre et immobilisée

La quantification de transformation de CTC a été réalisée par la détermination des RDT. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau IV.7.

Tableau IV.7. Résultats des RDT de la CTC par peroxydase libre et immobilisée

Essais	RDT_{libre} , (%)	$RDT_{immobilisée}$ (F4), (%)	$RDT_{immobilisée}$ (F5), (%)
1	60	40	**66.66**
2	21.27	17.02	57.44
3	**74.35**	30.76	58.97
4	19.80	58.41	20.79
5	56.55	22.95	45.08
6	25	33.33	11.11
7	59.22	**63.59**	61.16
8	28.8	32.80	14.4
9	46.23	29.03	50.53

De ces résultats, nous constatons que :

- ✓ *Pour l'enzyme libre*, une élimination maximale de 74.5 % est atteinte à pH =7, pour une concentration de CTC de10 mg/L et de H_2O_2 de4 mmol/L.
- ✓ *Pour l'enzyme immobilisée (F4)*, une élimination maximale (RDT de 63.59%), correspond aux valeurs de pH = 7,et des concentrations de CTC de 40 mg/L et de H_2O_2 de 0.4 mmol/L.
- ✓ *Pour l'enzyme immobilisée (F5)*, une élimination maximale (RDT de 66.66%), correspond aux valeurs de pH = 3, pour, une concentration de CTC de10 mg/L et une concentration de H_2O_2de 0.4 mmol/L.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Yi.Leng et al. [53], qui ont étudié la transformation de la molécule de tétracycline (TC) par la peroxydase de raifort, où un maximum de RDT a été obtenu (81.84%) pour des concentrations de TC de 112.5 µmol/L, H_2O_2(0.1 mmol/L et d'une AE de 0.6 UI/mL et à pH 8. Cependant, des études ont été réalisées sur la transformation enzymatique (par la peroxydase de courgette et de soja) des

composés phénoliques, ils ont montré que le pH optimal est celui de la neutralité (5 à 7). A cet intervalle de pH, les composés se trouvent à l'état protoné où ils peuvent douer d'être donneurs de protons pour la réaction du cycle catalytique de la peroxydase (enzyme oxydo-réductase où le co-substrat est oxydant : le peroxyde d'hydrogène). En effet, le pka de la CTC est de 7.5 (molécule comportant un groupement phénolique), où la forme déprotonée des tétracyclines (TCs) prédomine dans la gamme de pH de 7,5 à 10, où elles possèdent une densité électronique plus élevée ce qui favorise l'attaque des molécules actives. De plus, des études antérieures ont indiqué que la peroxydase de raifort est stable aux pH neutres ou alcalines, et se trouve inactive rapidement dans des pH acides, [54]. Ceci est dû au fait que le pH modifie l'état d'ionisation des groupements constituant le site actif de la peroxydase provoquant ainsi une désactivation du site actif, [55].

IV.7.3. Caractérisation des produits de transformation de la CTC issus du traitement enzymatique

- **Caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis**

La figure IV.15, illustre les spectres de la solution de TCT (10 mg/L) avant et après traitement par la peroxydase libre (Essai N°3).

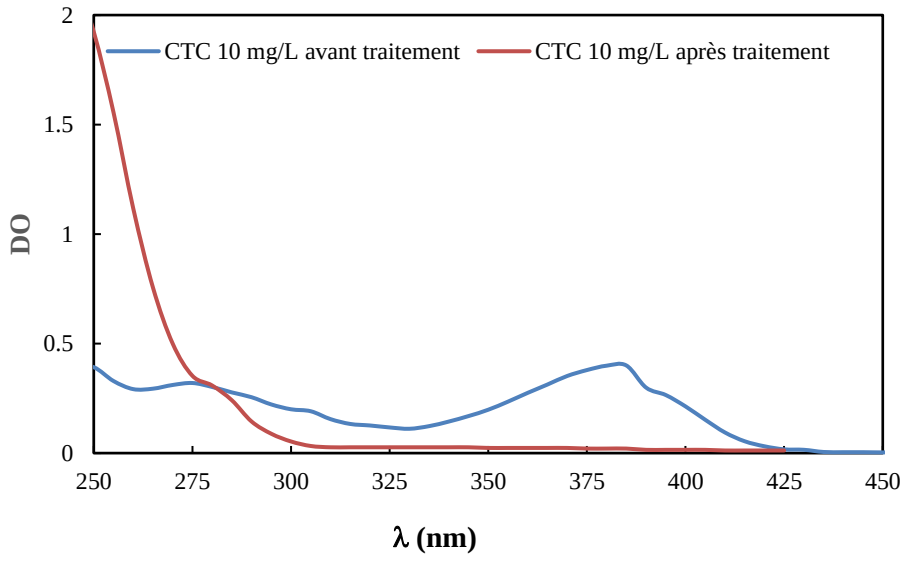
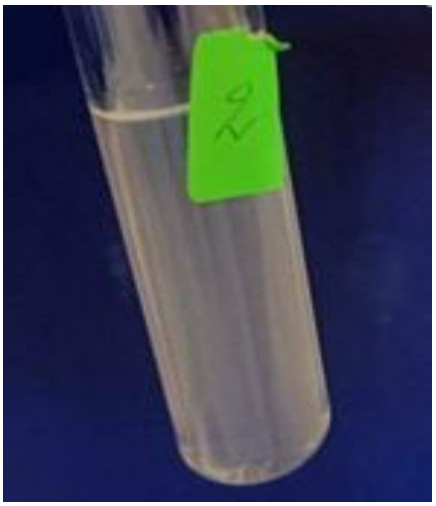


Figure IV.15. Analyse UV-Vis de la solution du CTC (10mg), avant et après traitement enzymatique.

L'aspect de la solution CTC avant et après traitement avec la peroxydase est illustrée à la figure IV.16.



Solution de CTC (10mg/L) avant traitement



Solution de CTC (10mg/L) après traitement

Figure IV.16. La solution du CTC enzymatique avant et après la centrifugation.

Selon les spectres obtenus, on constate clairement que pour les conditions optimales de concentration de CTC, de H_2O_2 et de pH (7), la peroxydase a transformé les molécules de CTC présentes dans le milieu réactionnel, du fait de la disparition des bandes d'absorption maximale de cette molécule (λmax = 381 nm) dans les spectres des surnageant. Cette bande d'absorption correspond au groupement chromophore, dû à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du cycle aromatique qui a subi un effet bath chrome dû au groupement chloro et au groupement hydroxyle.

D'après la bibliographie, plusieurs études sur la transformation enzymatique par les peroxydases des plantes sur les contaminants organiques tels que les colorants [56] et composés aromatiques [57], ont été réalisées. Cependant, très peu de travaux ont été publiés sur le traitement des antibiotiques par la peroxydase des plantes, [55]. Cependant, une proposition de transformation de la molécule de tétracycline (TC) par la peroxydase de raifort, a été établi par Y.Leng et al. [55], où la réaction d'oxydation ne conduit pas à la transformation complète de la molécule de TC.

IV.7.4. Caractérisation du précipité obtenu après traitement enzymatique par spectrométrie FTIR

Le spectre FTIR du précipité de CTC récupéré après traitement enzymatique, est représenté sur la figure IV.17.

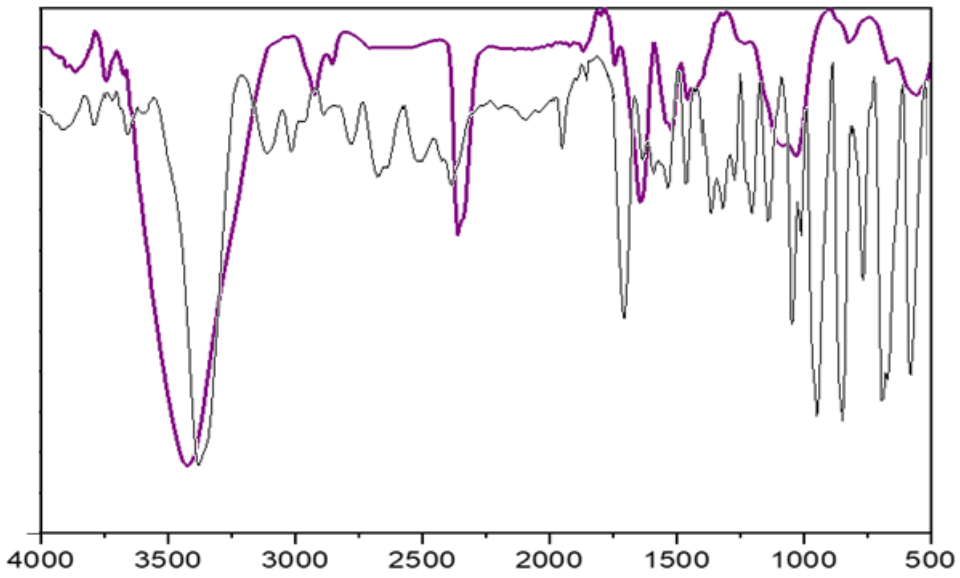


Figure IV.17. Spectres FTIR de CTC et son précipité après traitement enzymatique.

Les différents nombres d'onde des groupements fonctionnels du précipité sont récapitulés sur le tableau IV.8.

Tableaux IV.8 : Bandes caractéristiques du spectre FTIR du précipité de la CTC.

Nombre d'onde (cm^{-1})	**Groupement fonctionnel**
3425.69	ν (O-H)
2960.35 et 2870	$\nu_{asymétrique}$ et $\nu_{symétrique}$(C-H)
1643.41	ν symétrique (C=O)
1520 et 1480	ν (C=C) $_{aromatique}$
1111.03	ν (C-O)

D’après ces résultats, nous constatons que le spectre de CTC comporte plus de bandes d’absorption que celui de son précipité. Par conséquent les molécules de CTC ont été transformées par la peroxydase.

Conclusion générale

Au cours de cette étude, l'enzyme peroxydase a été extraite du navet blanc et encapsulée à l'intérieur des particules d'alginate de sodium en utilisant la méthode de gélification.

A travers l'étude qui a été menée, nous avons également appliqué la méthode TAGOCHI, qui nous a permis de cibler l'ordre d'influence des paramètres étudiés sur les propriétés d'encapsidation de l'enzyme peroxydase.

Nous avons calculé la volume des particules d'alginate de colcium, en les comparants, nous avons trouvé $V_{F5} \geq V_{F4} \geq V_{F6} \geq V_{F3}$. Cela est dû à la concentration en alginate, car la concentration plus élevée en alginate permet d'obtenir un gel plus visqueux et donc plus résistant.

La détermination de l'efficacité d'immobilisation des billes d'alginate de Calcium pour les quatre formulations retenues (F3 à F6) a permis de cibler les formulations optimales à savoir :F4 et F5, ayant des valeurs de 69.41 et 63.55 %, respectivement.

Ainsi, et en appliquant la méthode de TAGUCHI, nous avons également étudié la transformation de la chlortetracycline par la peroxydase libre et par la peroxydase immobilisée dans les particules obtenues de ces formulations (F4 et F5), en fonction de trois paramètres tels que : les concentrations de chlortetracycline, de peroxyde d'hydrogène et le pH (pris chacun à trois niveaux), où nous avons obtenu des rendements de transformation optimums de : 74.35 (essai N°3), 63.59 (essai N°7) et 66.66 % (essai N°1), pour l'enzyme libre, immobilisées correspondantes aux formulations N°4 et N°5, respectivement.

Enfin l'analyse FTIR réalisée d'une part sur les billes d'alginate de calcium contenant la peroxydase, l'alginate de sodium et sur la peroxydase, et d'autre part sur la chlortetracycline, le précipité récupéré après traitement enzymatique de ces molécules nous a confirmé que :

- La peroxydase a été immobilisée dans le réseaux polymérique d'alginate de calcium
- Que soit à l'état libre ou immobilisé, la peroxydase à transformé les molécules de clortetracycline. Ce dernier résultat, a été aussi confirmé par analyse par spectrophotométrie UV-visible.

En conclusion, dans notre étude nous avons atteint l'objectif ciblé, mais il sera intéressant de poursuivre ce travail par :

- Application des méthodes d'encapsulation non réalisée sur la peroxydase, telle que : l'émulsification-gélification interne et externe, etc.
- Analyse qualitative et quantitative des produits de transformation issus de la transformation enzymatique.
- Appliquer le traitement de la peroxydase sur d'autres molécules polluantes.

Références Bibliographiques

[1] N.Tandjaoui, "Contribution à l'étude de l'élimination des colorants textiles par voie enzymatique" Mémoire de master, Université Y. farés, Médéa (2011).
[2] M. Kula, R. Kroner, H. Hustedt, (1982). Purification of enzymes by liquidliquid extraction. In réaction engineering Springer, Berlin, Heidelberg, pp.73-118.

[3] S. Berja, L. Smail, B. Saka, S. Neggazi, E. Hullaf, Y. Benazzoug, G. Kacimi, L. Boudarene, S. Aouichat Bougerra, "Glucotoxicity Induced Oxidative Stress and Inflammation In Vivo and In Vitro in Psammomys obesus: Involvement of Aqueous Extract of Brassica rapa rapifera, National Library of Medecine", (2016).
[4] E, Murano, "Utilisation de polysaccharides naturels dans les techniques de microencapsulation" d'applied. Ichtyologie ,245-249. (1998).
[5] http://unt-ori2.crihan.fr: consulté le 26/04/2022.
[6] http://fr.m.wikipedia.org :consulté le 23/04/2022

[7]H.Qayum,"PeroxydaseMediatedDecolorizationandRemediationofWasteWater ContainingIndustrialdyes",areview.EnvironScienceBiotechnologie9:117–140,(2010).
[8]E.Torres, I.Bustos-Jaimes, S.LeBorgne. "Potentialuse of Oxidative Enzymes for the Detoxification of Organic Polluants", AppliedCatalysisB:Environmental46,1–15(2003).
[9] http://jean-jacques.auclair.pagesperso-orange.fr/exaosite/peroxydase.htm, consulté le 14-06-2022

[10]M.Khanmohammadi, M. B.Dastjerdi, "Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications", Biomaterials Sciences, (2018), 6, 1286–1298

[11]A.Azzouzi,D.Rahmi,« Applicationdesméthodes:enzymatiqueetFentondansl'éliminationd' uncolorant », Mémoire de Master, Université de Médéa (2018).
[12] S. Sakhri, K.tatemante, "Caractérisation des protéines enzymatiques : cas desperoxydases extraites du Navet Rose (Brassica rapa) " Mémoire de master, Université A. Mira, bedjaia, (2018).
[13] A. Kandelbauer,G. M. Guebitz "Bioremediation for the Decolorization of Textile Dyes ". Journal of Environmental Sciences, **26,**270-288, (2009).
[14] A. Dias, A.Sampaio, RM. Bezerra "Environmental Applications of Fungal and Plant Systems: Decolourisation of Textile Wastewater and Related Dyestuffs", University of Trásos- Montes e Alto Douro, **19**, 446-463, Portugal (2007).
[15] C.Regalado, BE.Garcıa-Almendarez, MA. Duarte-Vazquez « Biotechnologicalapplications of peroxidases » Phytochemistry Reviews, **3,**243–256, Kluwer Academic Publishers, (2004).
[16] N. Gurung, S. Ray, S. Bose, and V. Rai, " A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond",
BioMed Research International, 329121, (2013).
[17] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulose, and G. Bohlmann, "Industrial use of immobilized enzymes", Chemical Society Reviews. 42, 6437 (2013).

[18] E. Katchalski-Katzir, "Immobilized enzymes — learning from past successes and failures", Trends in Biotechnology. 11, 471-478, (1993).
[19] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, and X. Wang, "Mini review article, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering", Computational and Structural Biotechnology Journal2(3) e201209017 (2012).
[21]H. hiep nguyen, M. kim, "an overview of techniques on enzyme immobilization", appl sci converg technol 157-163, (2017)
[21] A. Homaei, "Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry" Advances in Food Biotechnology, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd (2015).
[22] Y. Zhang, J. Ge, and Z. Liu, "Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes", ACS Catal. 5, 4503-4513 (2015).
[23] S. Nisha, A. S. Karthick, and N. Gobi, "A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme" Chemical Science Review and Letters, 1(3), 148-155 (2012).
[24]T.Sato, T.Tosa, T.Seiyaku, C.Lid « Enzymes, immobilization Methodes »Osaka, Japan(2006).
[25] G. Kim, S.Moon, « Degradation of Pentachlorophenol by an ElectroenzymaticMethod using Immobilized Peroxidase Enzyme » Korean J. Chem. Eng, 22(1), 52-60, (2005).
[26] F. Ghaemmaghami, I. Alemzadeh, S. Motamed "Seed Coat Soybean Peroxidase: Extraction and Biocatalytic Properties Determination" Iranian Journal of Chemical Engineering 7, 28-38, IAChE, (2010).
[27] V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, "Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes", Advances in Food and Nutrition Research, 2016.
[28] D. Brady, J. Jordaan, "Advances in enzyme immobilisation", Biotechnology Letter (2009) 31.
[29] M.M.M. Elnashar, "The Art of Immobilization using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology", Biotechnology of Biopolymers, Edition Prof. Magdy Elnashar, (2011).
[30]F. Amrouche, « Biodégradation du phénol par immobilisation des bactéries », Memoire De Magister, Ecole Nationale polytechnique d'Alger, 2008.
[31] F. Bouferrache, R. Dahmani, « Optimisation et caractérisation d'un système d'immobilisation d'une substance active » Mémoire de Master, Université de Médéa, 2020.
[32] K. Rihane, Y. Belbahi, " Mise en application de quelques polymères », Mémoire de Master, Université de Médéa, 2020.
[33] S. Ching, N. Bansal, B. Bhandari, "Alginate gel particles–A review of production techniques and physical properties », Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, Vol. 57(6), 1133–1152.
[34] S. Datta, L. Rene Christena, Y. Rani Sriramulu Rajaram, « Enzyme immobilization: an overview on techniques and support Materials », Biotechology 3:1–9(2013)
[35] J. Zdarta, S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, "A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility", Catalysts,2018, 8, 92

[36] Ch. Hian Goh, P. Wan Sia Heng, L. Wah Chan, "Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic Applications », Carbohydrate Polymers 88 (2012) 1–12

[37] E. Vincent, « Les Alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie. Application à la construction d'un biomatériau », Thèse de Doctorat, Université Henri Poincare-Nancy 1, (2010).

[38] https://biochim-agro.univ-lille.fr/polysaccharides/co/Contenu_7_2.html, consulté le 23/05/2022.

[39] A. Basso, S. Serban, "Industrial applications of immobilized enzymes—A review", Molecular Catalysis, 479, (2019).

[40] S. Nisha, S. Arun Karthick, N. Gobi, "A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme", Chemical Science Review and Letters 2012, 1(3), 148-155 .

[41] C. Spahn Shelley, D. Minteer, "Enzyme Immobilization in Biotechnology", Recent Patents on Engineering 2008, 2, 195-200.

[42] S. Fabiano « application a la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour ledosage du glucose et des composés phénoliques » thèse du magistère, UniversitéClaude Bernard, France (2002).

[43] J. Guisan, « Immobilization of enzymes and cells 2nd edn. Humana Press» (2006)

[44] R. Copeland, « Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis 2nd edn. Wiley» (2000)

[45] R. Scherer, J. Oliveira, S. Pergher, D.Oliveira, « Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase. Mat. Res. 14 (2011)

[46] R. Haumont, " Un chimiste en cuisine ", Edition Dunod (2013).

[47] Pharmacopée Européenne ,10éme Edition, (2009)

[48] M.Hamon, F.Pellerin, M.Guernet, G.Mahuzeir, « Chimie analytique, Méthodes spectrales et analyse organique, tome 3 », Edition Masson, 2ème Edition, Paris, 1990.

[49] F. Ghaemmaghami, I. Alemzadeh, S. Motamed "Seed Coat Soybean Peroxidase: Extraction and Biocatalytic Properties Determination" Iranian Journal of Chemical Engineering 7, 28-38, IAChE, (2010).

[50] C.Nigel Veitch, "Structural determinants of plant peroxidase function", Phytochemistry Reviews 3: 3–18, (2004).

[51]G. S. Zakharova, I. V. Uporov3, V. I. Tishkov, "Horseradish Peroxidase: Modulation of Propertiesby Chemical Modification of Protein and Heme", Biochemistry (Moscow), 76,(13), 1391-14012011.

[52]Paul R. Ortiz de Montellano, "Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases", Chapter 5,Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2010).

[53] S. Akhtar, Q. Husain, "Potential applications of immobilized bitter gourd(Momordicacharantia) peroxidase in the removalof phenols from polluted water », Chemosphere 65 (2006) 1228–1235.

[54]Y.Leng, J.Bao, H. Xiao, D. Song, J. Du, S. Mohapatra, D. Werner, J. Wang, "Transformation mechanisms of tetracycline by horseradish peroxidase with/without redox mediator ABTS for variable water chemistry", Chemosphere 258 (2020) 127306

[55] X. Wen, Y.Jia, J. Li, "Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidaseprepared from Phanerochaetechrysosporium – A white rot fungus", Chemosphere 75 (2009) 1003–1007
[56] A.Bhunia, , S.Durani, P.Wangikar, 2001. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Biotechnol. Bioeng. 72, 562e567. (2001)
[57] J.Huang, Q.Chang, Y.Ding, X.Han, H.Tang, "Catalytic oxidative removal of 2,4-dichlorophenol by simultaneous use of horseradish peroxidase and graphene oxide/Fe3O4 as catalyst. Chem. Eng. J. 254, 434e442.(2014).