REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

Kadid Fatna
Saadaoui Salima

Thème :

Traitement d'un polluant organique par enzyme immobilisée.

Soutenue publiquement le : 20 /06 /2017, Devant le jury composé de :

Mme.Zouambie. Y	MCA	UYFM	Président
Mr.Bitam. S	MAA	UYFM	Examinateur
Mme. Maachou. H	MCB	UYFM	Examinatrice
Mme. Boucherit .N	MCB	UYFM	Encadreur
Mme .Lefaoui .S	MCA	UYFM	CO-encdadreur

Année universitaire 2017/2018

Résumé

Ce travail a pour objectif d'appliquer la peroxydase immobilisée pour la décoloration bleu de méthylène.

L'extraction et la purification de la peroxydase de courgette an permis d'obtenir un extrait enzymatique ayant une activité de 2.76UI/ml et une activité spécifique de 22.72UI/mg.

L'optimisation des paramètres : concentration d'alginate de sodium pour immobilisation déencapsulation , la proportion de la phase aqueuse et la teneur du Span80, en utilisant la méthode TAGUCHI, a permis d'obtenir 27 préparations, dont 7 présentent une émulsion eau/huile.

L'étude de stabilité des émulsions formulées, a permis de sélectionner les essais 9 et 18, correspondant aux concentrations d'alginate de sodium de 1% et 1.5%, de span80 de 3% et de phase aqueuse de 35 % .

L'étude de l'effet de la concentration chlorure de calcium utilisé pour l'immobilisation des émulsions stables par gélification montre qu'une efficacité et un rendement d'encapsulation maximal est atteint pour l'essai 18 pour une concentration de chlorure de calcium de 1%.

L'application de la peroxydase de courgette immobilisée dans les microsphères d'alginate de calcium sur d'une solution aqueuse de bleu de méthylène a permis d'obtenir un rendement de décoloration de 15.99%.

Mots clés : peroxydase, microencapsulation, émulsion, immobilisation, décoloration.

Abstract

This work aims to apply immobilized peroxidase to a solution of methyleneblue.

Extraction and purification of the zucchini peroxidase allowed to obtain an enzymatic extract having an activity of 2.76 IU / ml and a specific activity of 22.72 IU / mg.

The optimization of the parameters: concentration of alginate, the proportion of the aqueous phase and the content of Span80, using the TAGUCHI method, made it possible to obtain 27 preparations, that which 7 are a water / oil emulsion.

The studyof stability of the emulsions formulated allowed to select the tests 9 and 18, corresponding to sodium alginate concentrations of 1% and 1.5%, span80 of 3% and aqueous phase of 35% respectively.

The study of the effect of the calcium chloride concentration used for the immobilization of the stable emulsions by gelation shows that a maximum efficiency and a maximum yield of encapsulation (94.99% and 98.54% respectively) were reached for the test18 for a concentration of calcium chloride of 1%.

Application of the zucchini immobilizedperoxidase in the calcium alginate microspheres on aqueous methylene blue solution gave a 15.99%of yield of decolourisation.

Key words:peroxidase, microencapsulation, emulsion, immobilization, decolourisation

REMERCIEMENTS

Tout d'aborde on rend grâce à

Allah

Le tout puissant qui nous a donné la santé et la volonté pour arriver à ce travail.

Et après nous remercions nos parents pour leurs aides.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice Dr ***BOUCHERIT NABILA*** pour l'encadrement de ce mémoire et pour son aide, sa patience et la confiance qu'il nous a accordée.

Nous remercions tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptent d'examiner et de juger notre travail.

Nous tenons également à remercier notre Co-promotrice Dr ***LEFNAOUI SOUNIA***, pour ses conseils avisés et sons calme leur des moments difficiles .

Nous exprimons nos remerciements à l'équipe du *hall technologique et de faculté du science d'université de Médéa et l'équipe de contrôle de qualité de SAIDAL.*

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidé dans ce travail de près ou loin.

Dédicace

Le tout Puissant qui m'a donné le courage et le foie pour mener ce travail à terme.

A mes chers parents qui ont fait Sacrifice de leur noble Existence pour bâtir la mienne et à qui j'exprime ma gratitude.

A mon cher mari Brahim qui été toujours à mes cotés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager, Et ses parents qui m'a aidé avec ses prières.

A ma sœur Djahida et son mari

A mes chers frères Hamza, Omar, Ishak, Youssef, Mohamed et Farid et les femmes des mes frères.

A mes chers amis Nawal , Marieme , Hafidha et Salima

A tous les étudiants et les étudiantes de chimie pharmaceutique.

Fatna.k

Dédicace

Je dédite ce travail :

A mes parents qui mes sont très chers et dont le soutien m'ont toujours aidé à réussir dans la vie j'espère qu'il sont fier de moi et de mon travail .car je suis fier d'avoir des tels parents , Aucune dédicace ne pourra exprimer la profondeur de mes sentiments .

A ma support de ma vie mes chères frères : **MEFTEH** et sa femme **,KAMEL, YOUCEF , HALIM ET AMINE** .

A mes très chères sœurs et son maries .

Ames nièces et neveux :

FERIEL , SID ALI , NARIMEN, RAMI , NOUFEL ,RIHEM, MOHAMED** et **BOCHRA .

A mes chères amies : *FATIHA ,AMINA, HIND, LEILA,FATMA.*

Spéciale dédicace à *HANANE* et *NADJET* et ma binôme *FATNA.*

SAADAOUI SALIMA

Liste des Figures

Figure I.1.Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme. (a) : réduction de l'énergie d'activation, (b) : effet de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules convertis. 5

Figure I.2.Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne. 6

Figure I. 3.Structure de Ferriproto-porphyrine IX ou l'héminique. 8

Figure I.4.Structure Tridimensionnelle de la peroxydase d'arachide. 8

Figure I.5. Cycle catalytique de la partie Hémine de la peroxydase. 9

Figure II.1.Technique d'immobilisation d'enzyme. 15

Figure II.2.Greffage covalent : enzymes-support. 16

Figure II.3.Immobilisation par réticulation et Co-réticulation. 17

Figure II.4.Immobilisation par inclusion dans une matrice gel et dans une microcapsule. 18

Figure III.1. Schéma représentant la morphologie des particules. 20

Figure.III.2. Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage: a)- Microsphère, b)- Microcapsule. 20

Figure III.3. Modes d'émulsion/gélification : a)- gélification interne [G]; b)- gélification externe. 25

Figure IV.1. Monomères d'acides mannuronique M et G de guluronique. 29

Figure IV.2. Polymère d'alginate constitué des monomères M et G liés 29

en 1 -4. L'alternance des monomères forme différents types de blocs.

Figure. IV.3. Composants de spectrophotomètre UV-Vis. 32

Figure IV.4.Spectrophotomètre UV-visible utilisé dans notre étude**.** 32

Figure IV.5.Protocole expérimental d'extraction de la peroxydase par 33 courgette.

Figure IV.6. Protocol expérimental de purification de la peroxydase de courgette. 34

Figure IV.7.Quinoneimine, produit de dosage de l'activité peroxydasique. 35

Figure IV.8. Produits colorés de l'expérience N°02 . 36

Figure IV.9. Préparation des billes d'alginate de calcium. 39

Figure V.1. Variation de l'absorbance du Quinoneimine en fonction de la longueur d'onde. 41

Figure V.2 . Cinétique de transformation du phénol en Quinoneimine. 42

Figure V.3. Courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène, ε =1130 l/mol.cm. 42

Figure V.4. Courbe d'étalonnage de SAB. 43

Figure V.5. Photos de l'émulsion de l'essai N°7 prises sous microscope optique : A : grossissement, B : grossissement. 44

Figure V.6. Photos de l'émulsion de l'essai N°8 prises sous microscope optique : A : grossissement, B : grossissement. 44

Figure V.7. Photos de l'émulsion de l'essai N°9 prises sous microscope optique : A : grossissement , B : grossissement 45

Figure V.8. Photos de l'émulsion de l'essai N°13 prises sous microscope optique : A : grossissement , B : grossissement 45

Figure V.9. Photos des émulsions des essais N°18 et 22 prises sous microscope optique, grossissement 46

Figure V.10. Photos de l'émulsion de l'essai N°26 prise sous microscope optique : A : grossissement , B : grossissement 46

Figure V.11. Photos des émulsions conservées à 4°C pendant 30j. 48

Figure V.12. Particules obtenues après immobilisation d'émulsion alginate-peroxydase (essais N°9) dans les solutions de $CaCl_2$ de différentes concentrations. 49

Figure V.13. Particules obtenues après immobilisation d'émulsion alginate-peroxydase (essais N°18) dans les solutions de $CaCl_2$ de différentes concentrations. 50

Figure V.14. Effet de la concentration de $CaCl_2$ sur l'efficacité et le rendement d'immobilisation de l'émulsion N°9. 52

Figure V.15. Effet de la concentration de $CaCl_2$ sur l'efficacité et le rendement d'immobilisation de l'émulsion N°18. 53

Figure V.16. Spectre FTIR de l'alginate de sodium. 55

Figure V.17. Spectre FTIR de l'EEPP de peroxydase. 56

Figure V.18. Spectre FTIR de la microsphère de peroxydase. 57

Figure V.19. Courbe de balayage de BM (10mg/l). 58

Figure.20. Courbe d'étalonnage de BM 58

Figure V.21. Photos de la solution du BM à 10mg/l et son surnageant après traitement. 59

Liste Des Tableaux

Tableau I.1. Classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie 4

Tableau II.1 : Etapes de développement d'enzymes immobilisées 12

Tableau III.1. Caractéristiques des microparticules 20

Tableau IV.1.Réactifs chimiques utilisés et leurs caractéristiques 28

Tableau IV.2. Caractéristiques du tensioactif utilisé (donnée par le fournisseur) 30

Tableau IV.3. Caractéristiques des huiles paraffine selon la pharmacopée européenne. 31

Tableau IV.4. Tableau de volume final d'émulsion de 100ml. 37

Tableau IV.5. Compositions des différents essais de préparation des émulsions E/H contenant la peroxydase. 38

Tableau V .1. Diamètre moyen des particules formées des essais 9 et 18. 51

Tableau V.2. Activités enzymatiques et activités spécifiques des filtrats obtenus. 52

ABREVIATIONS ET NOMENCLATEUE

Abréviation	***Signification***	***Unité***
A	Absorbance	
AE	Activité enzymatique	UI / min
AS	activité spécifique	UI /mg
AE $_{\text{Filtrat Spécifique}}$	Activité enzymatique spécifique d'un filtrat	UI/mg
BGP	Bitter Gourd Peroxydase	
BM	Bleu de Méthylène	
C $_{\text{initiale}}$	concentration massique de la solution de bleu de méthylène avant traitement .	mg/l
C $_{\text{finale}}$	concentration massique résiduelle de la solution de bleu de méthylène après traitement par la peroxydase immobilisée.	mg/l
Dm	Diamètre moyen des billes	cm
DO	Densité optique	
E	Enzyme	
EB	Extrait enzymatique brut	
EEPP	Extrait enzymatique partiellement purifiée	
Emulsion E /H	Emulsion Eau /Huile	
EI [%]:	Efficacité d'immobilisation	***(%)***
IUPAC	International Union of Applied Chemistry	
FTIR	Fournier transfornated infrarouge	
HRP	Horse Radish Peroxidase	
IUB	International Union of Biochemistry	
K_M	Constant de Mickaelis	
P	Produit	
pH	potential d'hydrogéne	
[p]:	Concentration de produit	mg /l
pk_a :	Constant d'acidité	
RdI [%]	Rendement d'immobilisation	(%)
Rdt de	Rendement de decoloration	(%)
S	Substrate	
SAB	sreum albumine bovin	

[s]	Concentration du substrat	mg/ l
t	Temps	min
TA	tensio actif	
UV- vis	Ultra violet-visible	
V_0	Vitesse initiale de réaction qui détermine l'activité enzymatique	mg/l.min
V_{max}	Vitesse maximale	

SYMBOLES GRECS

symbole	***Signification***	***Unite***
λ	longueur d'onde	nm
λ_{max}	Longueur d'onde correspondante à l'absorbance maximale	
Ɛ	Coefficient d'extinction molaire	l/mol

SOMMAIRE

Liste des figure
Liste des tableaux
Liste des abréviations
Résumer
Introduction générale 1
I.1. Introduction 3
I.2. Définition et propriétés 3
I.3. Nomenclature et classification 4
I.4. Catalyse enzymatique 5
I.4.1. Modèle de cinétique enzymatique : Modèle de Mickaelis-Menten 5
I.4.2. Unités d'activité enzymatique 7
I.5.Les peroxydases 7
I.5.1. Définition 7
I.5.2. Structure 8
I.5.3. Peroxydases des plantes 8
I.5.4. Cycle catalytique 8
I.5.5.Application industrielles des peroxydases 9
I.6.Conclusion 11
Chapitre II : Immobilisation d'enzymes
II.1. Introduction 12
II.2. Intérêt d'immobilisation d'enzymes 13
II.3.Techniques d'immobilisation 14
II.3.1.Immobilisation par adsorption 15
II.3.2.Immobilisation par couplage covalente 16
II.3.3. Immobilisation par réticulation ou cross-linking 16
II.3.4.Immobilisation par encapsulation 17
II.4. Conclusion 18
Chapitre III : Micro-encapsulation 19
III.1.Introduction 19
III.2.Caractéristiques 19
III.2.1.Taille 19
III.2.2.Structure 19
III.3. Matériaux enrobant 21
III.4. Procédés d'encapsulation 21

III.4.1. Procédés mécaniques 21
III.4.2. Procédés chimiques 23
III.4.2. Procédés physico-chimiques 23
III.5.Quantification de l'actif encapsulé 26
III.6. Avantages et applications 26

Partie B : Partie experimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes
IV. 1.Introduction 27
IV.2.Matériel utilisé 27
IV.2.1.Equipements 27
IV.2.2.Verrerie 27
IV.2.3.Réactifs chimiques 28
IV.2.4.Alginate de sodium 28
IV.2.5.Span 80 30
IV .2.6.Huile de paraffine 31
IV.3.Méthodes 31
IV.3.1.Préparation de la solution tampon pH7 31
IV.3.2.Spectrophotométrie UV-visible 31
IV.3.2.Spectrométrie infrarouge 32
IV.4.Extraction et purification de la peroxydase de courgette 33
IV.4.1.Préparation de l'extrait brut 33
IV.4.2.Purification partielle de l'extrait enzymatique brut 33
IV.4.3. Dosage de l'activité enzymatique 34
IV .5.Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford 36
IV.5.1.Principe 36
IV.5.2. Gamme d'étalonnage 36
IV.6.Préparation des microsphères 36
IV.6.1.Formulation des émulsions eau /huile par la méthode de TAGUCHI 36
IV.6.2.Principe de la méthode TAGUCHI 37
IV.7.Immobilisation par gélification 39
IV.8.Application à la décoloration du bleu de méthylène 40
Chapitre V. Résultat et discussion
V.1. Détermination de l'activité enzymatique de l'EEPP de courgette 41
V.1.2. Détermination de l'activité enzymatique spécifique 43
V. 2. Préparation des microsphères de peroxydase de courgette 43
V.2.1. Formulation des émulsions eau/huile 43

V.2.2. Etude de stabilité des émulsions formulées 47
V.2.3. Immobilisation des émulsions par gélification 49
V.2.4. Etude de l'effet de la concentration de $CaCl_2$ sur le rendement et l'efficacité d'immobilisation 51
V.3. Analyse par FTIR 54
V.4. Application à la décoloration du bleu de méthylène 58
Conclusion générale 60
Références bibliographiques
Annexes

Introduction Générale:

L'exploitation industrielle des enzymes dans les différents secteurs a mis en place les chercheurs de la biotechnologie.
Parmi les enzymes d'intérêts : les peroxydases, que ce soit d'origine végétale ou microbienne.
Les peroxydases extraites des végétaux sont des oxydo-réductases, elles rentrent dans plusieurs cycles réactionnels dans la cellule. Cette propriété, a permis aux biochimistes en premier lieu d'initier leurs applications après extraction puis purification, en particulier dans la transformation des composés organiques ou minéraux pouvant être toxiques voire cancérigènes [1].

Parmi les applications d'intérêt environnemental, est la dégradation des molécules organiques comme les phénols, les colorants, les amines aromatiques ainsi que les composés des effluents industriels [2].

L'inconvénient que présentent les méthodes enzymatiques dans le traitement des eaux chargées en polluants, est leurs désactivations par le substrat, et le cout d'extraction et de purification de l'enzyme [3].

A cet égard, des moyens d'immobilisation ont été met en place. L'immobilisation constitue donc une technique efficace qui sert non pas seulement à protéger l'enzyme contre les composants du milieu réactionnel, mais aussi de montrer la possibilité de le réutiliser plusieurs fois [4].

La microencapsulation par gélification est une méthode d'immobilisation basée sur la formulation d'une émulsion en utilisant un polymère organique suivie d'une gélification par un cation polyvalent. Cependant, la microencapsulation est citée parmi les méthodes de formulation pharmaceutique, élaborée pour encapsuler les principes actifs en vue d'une libération modifiée [5].

Dans notre étude, nous nous orientons vers la préparation des microsphères chargées de peroxydase extraite de la courgette par microencapsulation.

Notre manuscrit se devise donc en cinq chapitres :

1. Le premier, portera sur les notions de base sur les enzymes, en particulier sur les peroxydases et leurs applications technologiques.

2. Le second, sera consacré à présenter les principales méthodes d'immobilisation des enzymes.
3. Le troisième, rapportera des généralités sur la microencapsulation et ses applications technologiques.
4. Le quatrième chapitre, récapitule les différents réactifs et matériel utilisés ainsi que les méthodes appliquées au cours de l'étude expérimentale ;
5. Le dernier chapitre, englobe tous les résultats obtenus et les discussions correspondantes.

Enfin, le mémoire se termine par une conclusion générale et perspectives.

Partie A : Partie Bibliographique

Chapitre I : Enzymes, peroxidases

I .1.Introduction

Les enzymes constituent la classe des protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée.

Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzyme. Ils sont caractérisés par leurs aptitude de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire. Par ailleurs, une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche aussi la présence de réactions secondaires gênantes.

I.2. Définition et propriétés

Selon l'IUPAC, une enzyme est une macromolécule, généralement de nature protéique, doués de la propriété de biocatalyse par augmentation de la vitesse d'une réaction de transformation de réactif(s) (substrats) en produit(s) [6].

Ainsi les enzymes sont douées des activités suivantes :

- Elles permettent d'atteindre rapidement l'état d'équilibre de la réaction sans le modifier.
- Elles ont une grande spécificité vis-à-vis le substrat.
- Elles accélèrent des réactions chimiques spécifiques en solution aqueuse, dans des conditions de température en de pH généralement très douces.

Le bon fonctionnement des enzymes nécessite la présence d'une molécule, appelée cofacteur. Ce dernier peut être un ion métallique ou une molécule organique (appelé : coenzyme). Les cofacteurs vont interagir avec l'enzyme afin qu'elle retrouve son état initial et puisse amorcer un nouveau cycle catalytique. De ce fait, ils ont un rôle d'accepteur et/ou de donneur d'électrons et de protons [7].

La nature des différents acides aminés qui la compose influence les propriétés de l'enzyme au niveau de son encombrement stérique, de son point isoélectrique (c'est –à-dire de son comportement basique ou acide),de l'affinité vis-à-vis de l'eau (plutôt hydrophile ou hydrophobe) et de la réactivité du site actif ,la rétention des protéine peut avoir lieu sur les matrices chargées positivement ou négativement ,dans les condition où le pH d'utilisation entraine une opposition de charge entre l'enzymes et le solide .

I.3.Nomenclature et classification

Le grand nombre d'enzymes actuellement connues par suite du développement rapide de l'enzymologie. Cependant, trois modes de nomenclature ont été créés [8] :

- **Dénomination ancienne :** Les enzymes ont d'abord été identifiées par des noms arbitraires qui rappelaient l'origine tissulaire par exemple la pepsine désigne l'enzyme gastrique de la digestion.
- **Dénomination fonctionnelle :** Une nomenclature dans laquelle le suffixe « ase » est ajouté soit au substrat, soit au type de la réaction catalysée.
- **Dénomination officielle :** en 1964, l'Union Internationale de Biochimie a établi une nomenclature par 4 chiffres séparés par des points :

- Le premier chiffre indique la classe, c'est-à-dire l'appartenance à l'un des 6 groupes de réactions (tableau. I.1).
- Le second chiffre désigne la sous-classe de l'enzyme. Par exemple une hydrolase peut couper une liaison ester, peptidique, etc.
- Le troisième chiffre précise la nature de la molécule d'accepteur ou de substrat utilisé.
- Le dernier chiffre est le numéro d'ordre de l'enzyme dans le groupe.

Tableau I.1. Classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, [8].

Classe	*Type de réaction catalysée*
1-Oxydoréductase	Catalyse les réactions d'oxydoréduction
2-Transférase	Catalyse le transfert d'un groupement chimique d'une molécule à une autre
3-Hydrolase	Catalyse la coupure de liaisons par d'hydrolyse.
4-Lyases	Catalyses le clivage par élimination de liaisons C-C, C-O, C-N. une double liaison est formée dans ces réactions
5-Isomérases	Catalyse le changement de configuration d'une molécule
6-Ligases	Catalyse la formation des liaisons avec clivage de l'ATP

Cette nomenclature est généralement donnée entre parenthèses à la suite du nom de l'enzyme fonctionnel. Exemple : peroxydases (E.C. 1.11.1.7).

I.4. Catalyse enzymatique

Chaque enzyme reconnaît spécifiquement une ou plusieurs molécules selon un principe de complémentarité de type clé-serrure, grâce à des sites de reconnaissance et de fixation situés à sa surface. A la fin du processus, l'enzyme retrouve sa structure [9].

Pour que l'enzyme fonctionne, elle doit se combiner spécifiquement avec son substrat au niveau du site actif, contenant les groupements catalytiques responsables de la transformation de ce substrat en produit.

Comme en catalyse chimique, l'enzyme, permet d'augmenter la vitesse d'une réaction sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci et d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction, (figure I.1.a), en augmentant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps, (figure I.1.b) [10].

Ce processus s'effectue des milliers de fois à la seconde

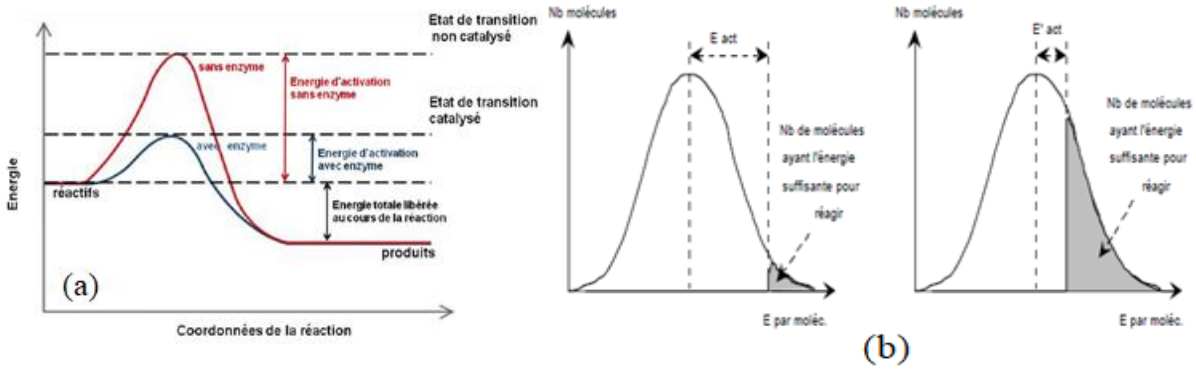


Figure. I.1. Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme. (a) : réduction de l'énergie d'activation, (b) : effet de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules convertis [10].

I.4.1. Modèle de cinétique enzymatique : Modèle de Mickaelis-Menten

Les modèles de cinétique enzymatique donnent des relations entre la vitesse de réaction (v) c'est-à-dire la quantité de substrat (S) disparu ou la quantité de produit (P) formé par unité de temps au cours d'une réaction (équation I.1) et les conditions expérimentales dans lesquelles se déroule cette réaction [7].

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \qquad \text{(I.1)}$$

Ce modèle est basé sur le fait que la réaction enzymatique globale est composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme [12]:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad \text{(I.2)}$$

Avec:

E : enzyme
S : substrat
P : produit
ES : complexe enzyme-substrat

L'expression de la vitesse de la réaction enzymatique qui est donnée par l'équation suivante :

$$v_0 = \frac{v_{max}.[S]}{[\delta]+KM} \qquad \text{(I.3)}$$

Avec :

V_0 :Vitesse initiale de réaction qui détermine l'activité enzymatique(mg/L.min)

V_{max} :Vitesse de la réaction lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat (l'enzyme est à saturation) : $V_{max}= K_2 [E]_0$,(mg/L.min)

[S] : Concentration de substrat (mg/L)

K_M : Constante de Mickaelis (affinité substrat-enzyme)

K_M exprime la concentration de substrat lorsque la moitié des molécules d'enzymes sont complexées au substrat (l'enzyme est à demi-saturation), (équation I.4) :

$$K_M=K=\frac{[E][S]_0}{[ES]} \qquad \text{(I.4)}$$

La cinétique de Mickaelis-Menten est illustrée sur la figure I.2.

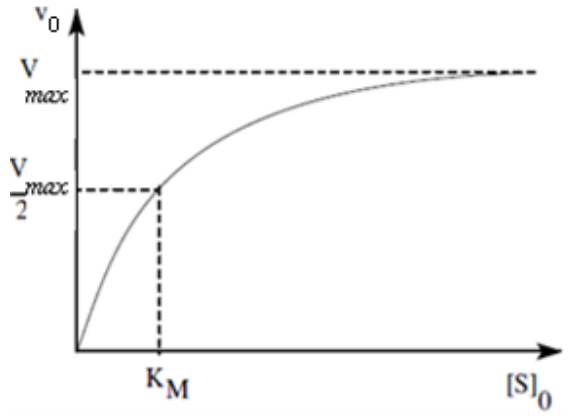


Figure. I.2. Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne [7].

La détermination graphique directe des constantes cinétiques (V_{max} et K_M) repose sur la linéarisation de l'équation Michaelis-Menten. En prenant l'inverse de la vitesse (représentation de Lineweaver-Burk) on obtient, (équation I.5) [8].

$$\frac{1}{V_0} = \frac{KM}{Vmax[S]_0} + \frac{1}{Vmax} \qquad \text{(I.5)}$$

I.4.2. Unités d'activité enzymatique :

L'activité d'un enzyme est obtenu par la mesure de la vitesse d'une réaction qu'il catalyse dans des conditions définies, et puisque cette vitesse varie avec la concentration d'enzyme, il est utile de définir une unité indépendante de la concentrations d'enzyme : soit l'activité spécifique (par un milligramme d'enzyme et par unité de temps), ou l'activité moléculaire (nombre de molécules de substrats catalysés par molécule d'enzyme et par unité de temps). Cependant, dans le cas où l'enzyme n'est pas purifiée, il est utile de définir l'unité d'activité catalytique, ou l'unité d'activité enzymatique [11]. L'IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) et l'IUB (International Union of biochemistry) recommandent l'adorption d'une unité international U.I. [12].

L'unité internationale U.I est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole (1 µmole) de substrat par minute. Une autre définition de l'unité d'activité enzymatique est le Katal. Un Katal est la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion d'une mole de substrat en produit en une seconde [11].

I.5.Les peroxydases

Les peroxydases ont requis une position avancée dans les domaines de recherche biotechnologique tels que l'enzymologie, la biochimie, la génétique, etc.). Ils sont l'un des enzymes les plus étudiés grâce à la diversité de leurs aspects quantitatifs et qualitatifs.

I.5.1. Définition

Les peroxydases (EC.1.11.1.Z)sont des enzymes qui utilisent les peroxydes (comme le peroxyde d'hydrogène) comme un co-substrat pour oxyder une variété de composés organiques et/ou inorganiques.

Elles sont largement distribuées dans la nature, leurs activités ont été identifiées dans les plantes, les microorganismes et les animaux.

Selon la nomenclature établie par la commission européenne des enzymes, les peroxydases se classent en 3 familles. Ainsi, leur nomenclature peut être selon la source : HRP : horse radish peroxidase (peroxydase de raifort), ou selon le substrat : cytochrome c peroxydase, lignine peroxydase [1].

I.5.2. Structure

Les peroxydases sont de nature hemoprotéique, où le groupe héminique est le coenzyme, il est caractérisé par la présence du Fe^{3+} comme ion centrale et 4 groupes pyrrole : c'est le « Ferriprotoporphyrine IX », (voir figure I.3). La structure tridimensionnelle de la peroxydase d'arachide est représentée sur la figure I.4.

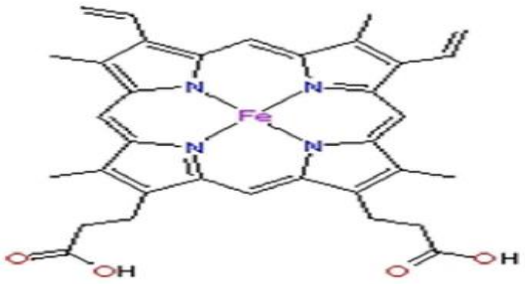


Figure. I.3. Structure de Ferriproto-porphyrine IX ou l'héminique [1]

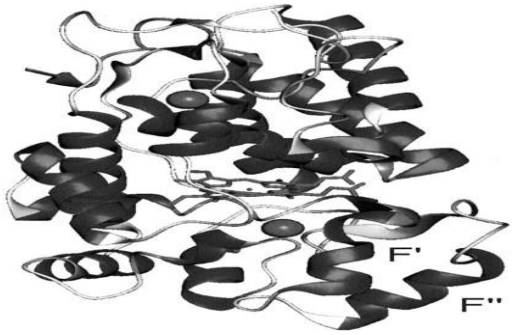


Figure. I.4. Structure tridimensionnelle de la peroxydase d'arachide [1]

I.5.3. Peroxydases des plantes, (classe III), Aussi de nature glycoprotéique, leurs chaine polypeptidique contient environ 350 acides aminés, où leurs séquence varie selon la source, [9]. Elles sont distribuées dans le raifort (HRP), le navet, la courgette (BGP), les grains de Soja, tomate, etc.

Dans la cellule végétale, les fonctions des peroxydases sont multiples, [13]:

1. Décomposition de H_2O_2 du cytosol ;
2. Oxydation des composés toxiques ;
3. Biosynthèse de la paroi cellulaire et de l'éthylène;
4. Réponse de défense; etc.

I.5.4. Cycle catalytique

En général, les réactions catalysées par les peroxydases est représentée comme suit, [14] :

$$\text{Peroxydase} + H_2O_2 \longrightarrow \text{ComposéI} + H_2O \quad \text{(I.7)}$$

$$\text{Composé I} + RH_2 \longrightarrow \text{Composé II} + RH \quad \text{(I.8)}$$

$$\text{Composé II} + AH_2 \longrightarrow \text{Peroxydase} + AH + H_2O \quad \text{(I.9)}$$

Le cycle catalytique des peroxydases commence par une oxydation de l'enzyme et une réduction et le peroxyde d'hydrogène pour produire le composé I, (le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferryl ($Fe^{IV} = O$)). D'une part le composé I oxyde le substrat (RH) pour donner le radical correspondant ($R^{\bullet}$), et d'autre part, il se réduit pour produire le composé II. Les composés I et II réagissent simultanément avec une deuxième molécule (RH). Comme dernière étape le composé II est réduit de nouveau à l'état ferrique, correspondant à la forme native de l'enzyme, [14]. En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure I.5.

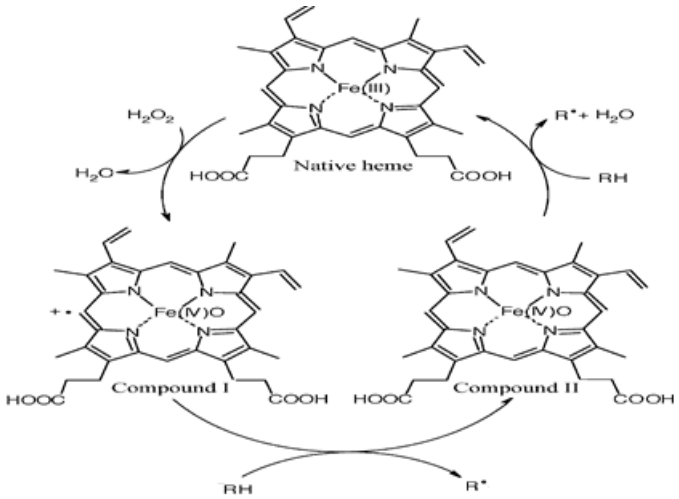


Figure. I.5. Cycle catalytique de la partie Hémine de la peroxydase, [14].

I.5.5.Applications industrielles des peroxydases

Grace à leur diversité, les peroxydases ont été utilisées pour plusieurs applications industrielles, on cite les plus importants :

- ***Dégradation des colorants synthétiques***

A nos jours, plus de 10000 colorants sont mis sur le marché international avec une production de 7.10 ^{5}ton/an. Ces colorants sont conçus d'une manière qui soit stable et résistants à la lumière, la température, les détergents et l'attaque microbienne [15].

En effet, plusieurs activités industrielles utilisent ces colorants et en parallèle, environ de 10-15 % des colorants synthétiques produits sont déchargés dans les effluents industriels, ce qui cause des problèmes environnementales grâce à leurs structure moléculaires complexe et résistance à la dégradation biologique [16].

Ces colorants contiennent au moins un groupe aromatique, ces qui leur fait des substances agréables pour des types de peroxydases.

- ***Traitement des composés phénoliques*** [17]

Les composés aromatiques, y compris les phénols et les amines aromatiques constituent un des classes principales des polluants. Ils sont trouvés dans les eaux résiduaires d'une grande variété d'industrie.

Plusieurs chercheures ont proposé le traitement enzymatique incluant la polymérisation des molécules phénoliques. La majorité des études sur la transformation des phénols et des amines aromatiques, se rapporte sur les peroxydases de raifort, de navet et de courgette (BGP) sous forme libre ou immobilisée.

- ***Synthèses des polymèrs*** [16]

Les radicaux libres produits par catalyse de la peroxydase peuvent participer aux différentes réactions post-enzymatiques, la polymérisation oxydante des composés aromatiques par des oxydoréductases a été étudiée pour créer de nouveaux polymères fonctionnels et de synthèse des résines phénoliques sans employer le formaldéhyde toxique qui doit être employé dans la polymérisation chimique.

- ***Biodétecteurs de peroxydase*** [16]

Un domaine qui offre un grand potentiel pour la peroxydase est son application est les biocapteurs électrochimiques. Récemment, l'utilisation des électrodes à base de peroxydase est répondue dans les synthèses analytiques. Pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et des hydro-peroxydes organiques, la peroxydase est utilisée sous forme immobilisé avec une enzyme produisant peroxyde d'hydrogène.

❖ ***Application pour analyse et diagnostique*** [18]

Le lactose contenu dans le lait et les produits laitiers est déterminé par diverses méthodes analytiques pratiques.

Une technique simple et économique a été mise au point pour l'estimation de lactose en immobilisant la β-galactosidase, le galactose oxydase et le HRP sur un support polymère, pour détecter le lactose.

I.6. Conclusion

La large application des enzymes dans divers domaines industriels explique les efforts faire ces dernières années par la communauté scientifique dans la recherche de nouveau biocatalyseur, en particulier la mise au point des procédés d'extraction, de purification et d'identification. Cependant, ces entités faisant partie du domaine du vivant rendent leur emploi nécessite l'application de certaines précautions afin de conserver leurs propriétés catalytiques.

Actuellement, les chercheurs s'orientent potentiellement vers la mise en application du peroxyde de différentes origines sous forme libre ou fixée dans un support dans les domaines de biotechnologie, environnement, médical, etc.

Chapitre II : Immobilisation des enzymes

II.1. Introduction

Les problèmes liés à l'inactivation des enzymes aux cours des opérations d'une réaction chimique et sa séparation des produit ou son extraction ont orienté les chercheurs vers l'idée de son mise sous une forme protégée fixée dans support un solide.

L'immobilisation d'enzyme constitue donc un domaine très important en vue de l'accroissement de la durée de la vie de l'enzyme voire sa récupération facile pour une réutilisation. Particulièrement pour les applications analytiques, de biomédicale, pharmaceutique, environnementales et industrielles.

L'immobilisation enzymatique s'est développée au cours des années. Le tableau II.1 présente les étapes de son développement.

Tableau II.1 : Etapes de développement d'enzymes immobilisées [19,20]

Etape	Date	Utilisation
1ère	1850	Utilisation empirique dans des procédés tels que l'acide acétique et le traitement des eaux usées.
2ème	1960	Immobilisation enzymatique unique : production de l-aminoacide, isomérisation du glucose, etc.
3ème	1985 -1995	Immobilisation enzymatique multiple du cofacteur et l'immobilisation cellulaire. Exemple : production d'acides aminés à partir de céto-acides dans des réacteurs à membrane
4ème	1995 à ce jour	Développement multidisciplinaire et applications dans différents domaines de la recherche et de l'industrie

Au début, les microorganismes immobilisés étaient employés industriellement dans la production microbienne de vinaigre par percolation de l'alcool sur les copeaux de bois envahis de bactéries. Ainsi que dans le cas de la clarification des eaux usées [19].

Au début des années soixantes, lorsque la base des technologies actuelles a été développée, plus de 10 000 articles et brevets ont été publiés à ce sujet, indiquant l'intérêt considérable de la science , communauté et industrie dans ce domaine [21].

Plus récemment, la technologie des enzymes immobilisées est devenue un champ de recherche multidisciplinaire avec des applications à des échantillons cliniques, industriels et environnementaux [20].

II.2. Intérêts d'immobilisation des enzymes [22]

Les enzymes sont des biocatalyseurs caractérisés par leurs hautes sélectivités, spécificité et activité, très impliquées dans plusieurs applications, mais sous certaines conditions. Une utilisation effective de l'enzyme soluble est limitée par la non réutilisation, l'instabilité voire la dénaturation due à la présence des substrats, des produits ou autres composés de la réaction et la sensibilité aux conditions de l'expérience. En face ces contraintes, il est nécessaire de les remplacer après plusieurs cycles d'utilisation, mais cela implique des dépenses supplémentaires. Il est donc essentiel de trouver une méthode pour stabiliser les enzymes contre leur dénaturation.

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices solides ou dans des gels permet la séparation de la protéine et du produit de réaction, dans deux phases différentes, empêchant la contamination avec le produit. Ce procédé permet alors la réutilisation de la biomolécule. Les matériaux d'immobilisation les plus utilisés sont des matériaux chimiquement inertes, insolubles et rendant insoluble l'enzyme. Ce sont plus particulièrement des matrices polymériques et inorganiques mono, bi, ou tridimensionnelles.

Certains problèmes peuvent intervenir pendant l'immobilisation comme la perte de l'activité enzymatique, la diffusion du substrat et du produit ce qui entraine un cloisonnement de l'enzyme dans la matrice. L'enzyme peut avoir une conformation plus contraignante dans son état immobilisé, provoquant une diminution de son activité ou bloquant son site catalytique. Les matrices de confinement doivent permettre la libre diffusion du substrat vers le site actif et favoriser une conformation spatiale suffisamment libre pour préserver son activité biologique.

L'utilisation d'enzymes est de plus en plus employée dans les secteurs de biologiques, analytiques, biotechnologiques et environnementales :

En industrie agroalimentaire : la glucose isomérase immobilisée par adsorption ou par liaison covalente, est utilisée pour obtenir des boissons riches en glucose et en fructose.

Un autre intérêt, est la conversion de l'amidon en glucose par utilisation de l'amyloglucosidase immobilisé, en utilisant un réacteur à lit fixe.

En industrie pharmaceutique : dans le but de produire les antibiotiques semi-synthétiques, l'acide 6-aminopenicillanique est converti par la pénicilline acylase immobilisé au gel de Sephadex et disposée dans un réacteur à lit fixe.

En ce qui concerne les applications analytiques, on cite les biocapteurs. Ces derniers ont pour applications très variées : médicale (tels que le dosage des cations sanguins, des gaz et des métabolites), environnement (le dosage et la détection des polluants chimiques et des microorganismes présents dans les eaux et les effluents), et dans l'agroalimentaire (la détection et/ou la quantification de sucres, acides, alcools, édulcorants et acides aminés dans les aliments.

En industrie des détergents : 90% des lessives contiennent des enzymes.

II.3. Techniques d'immobilisation

Les principaux composants d'un système enzymatique immobilisé sont: l'enzyme, le support et le mode de fixation de l'enzyme à la matrice. Les termes : solide, support solide, support, transporteur et matrice sont utilisés comme synonymes [23].

La sélection de la méthode d'immobilisation appropriée dépend de la nature de la molécule biologique, du type de transducteur utilisé, des propriétés physicochimiques de l'analyse et des conditions opératoires du biocapteur [23]. Les techniques d'immobilisation des enzymes sont très nombreuses, (figure II.1) [24]:

- ✓ Immobilisation par liaison
- ✓ Par liaison ionique ou covalente
- ✓ Par encapsulation

✓ Par réticulation.

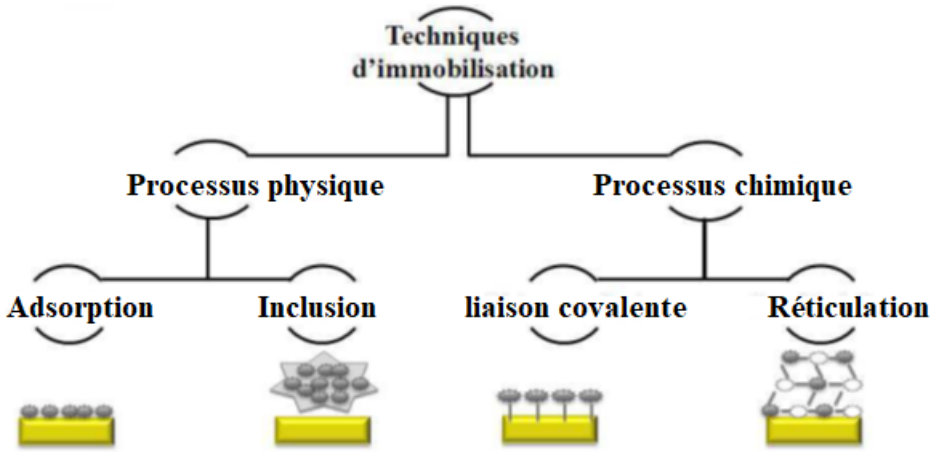


Figure II.1. Techniques d'immobilisation des enzymes [25]

II.3.1.Immobilisation par liaison

✓ **Adsorption** : des liaisons secondaires (liaison hydrogène, forces de van der Waals, ou hydrophobe interactions), s'établissent entre les groupements d'atome d'enzyme et les groupements de support. La fixation est réversible, non spécifique et les risques de désorption de l'enzyme sont importants.

La vitesse d'adsorption et la quantité d'enzyme adsorbée sont déterminées par la nature et la concentration de l'enzyme, la nature du support et du solvant, le pH, la force ionique et la température. L'absence de modification chimique des enzymes constitue un avantage important de cette technique.

✓ ***Fixation ionique*** **:** La fixation ionique s'effectue grâce à une liaison ionique entre la protéine enzymatique et le support qui contient des résidus échangeur des ions. La fixation au support est facile mais elle cause des changements dans la conformation de l'enzyme et son site actif

Les matières utilisées sont organiques (Polymères phénoliques, résines échangeuses d'ions) ou inorganique (alumine, verre poreux, carbonate de calcium, gel de phosphate de calcium, gel de silice, argiles carbone) ou biologiques (cellulose, collagène, concanavalin A-sepharose) [26].

II.3.2. Immobilisation par liaison covalente [27 ,28]

Le principe de cette technique est de faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme avec un groupement fonctionnel du réactif (Figure II.2).

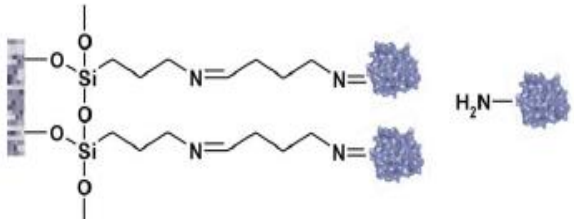


Figure. II.2. Greffage covalent : enzymes-support [29].

Le couplage covalent conduit à des liaisons fortes entre la biomolécule et la surface du transducteur qui contient des groupements. Ces groupements sont généraux de type carboxylique (-COOH), amine (-NH), hydroxyle (-OH) et thiol (-SH) des acides aminés non engagés dans l'activité enzymatique. D'où la nécessité d'immobiliser l'enzyme en présence du substrat [30,31].

La méthode d'immobilisation par liaison covalente est irréversible et permet une adhésion plus forte que celle certains matériaux comme l'or ou le platine, car les groupes cystéine, ou les fonctions thiols, des protéines ont des affinités pour ces métaux [32.33].

II.3.3. Immobilisation par réticulation ou Cross-linking

La réticulation repose sur l'utilisation d'agent réticulant qui permet de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques. Le complexe formé est insoluble, il possède une masse moléculaire élevée. Il existe deux méthodes de réticulation : utilisation des agents réticulants ou que l'agent réticulant soit une protéine inerte et est utilisée afin de faciliter ou améliorer. La réticulation est dite Co-réticulation (Figure II.3).

Cette technique d'immobilisation est simple à mette en œuvre et présente une bonne stabilité au système. Cependant, une perte de l'activité enzymatique peut être observée [34 ,35].

Ce type d'immobilisation a ainsi pu être reporté pour la détection de différentes molécules comme les métaux lourds [36], les nitrites [37], ou bien encore certains polluants organiques [38]. Ainsi, cette technique a permis de développer des biocapteurs enzymatiques [39].

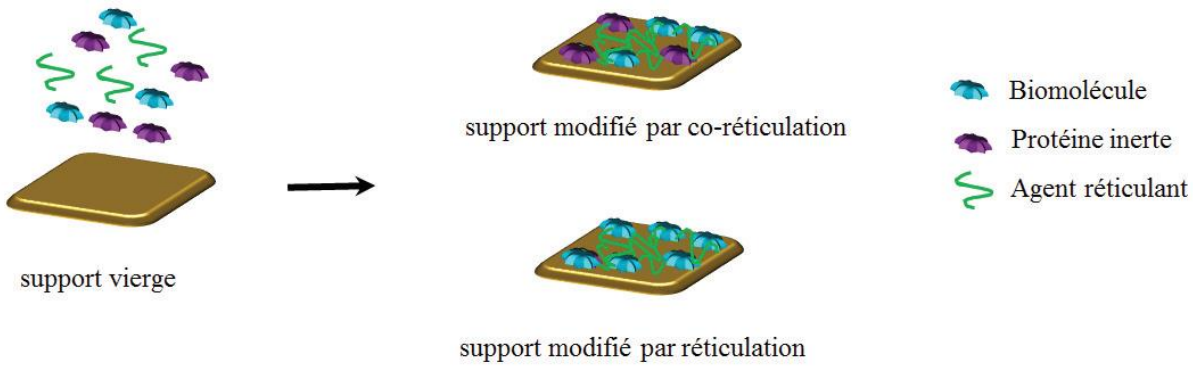


Figure. II.3. Immobilisation par réticulation et Co-réticulation [40].

II.3.4. Immobilisation par encapsulation [41,42]

C'est une méthode physique et irréversible. Le principe est basé sur la fixation des enzymes dans une matrice organique ou inorganique.

L'encapsulation consiste à obtenir les formes suivantes :

✓ 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 microencapsulation.

La maille de la matrice ou de la membrane assurent de manière purement physique la rétention de ces molécules tout en permettant la circulation du substrat et du produit de la réaction vers le site actif. La sélectivité est maintenue grâce au contrôle de la porosité du matériau ainsi que de ses propriétés chimiques.

Les matériaux les plus utilisés sont de type gels ou polymères chimiques ou biologiques insolubles tels que : l'alginate, la silice, l'agarose, le chitosane, la gélatine, le polyacrylamide, le polyéthylène glycol, la pectine, etc.

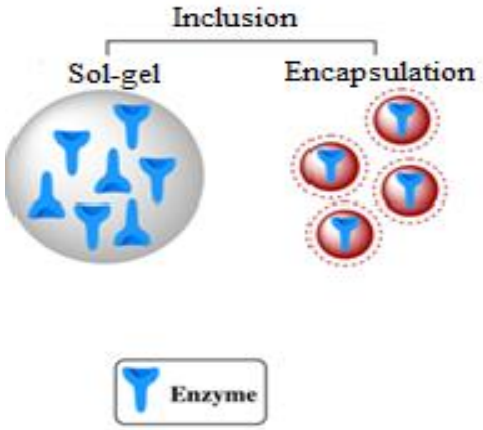


Figure II.4. Immobilisation par inclusion dans une matrice gel et dans une microcapsule [43].

L'encapsulation présente plusieurs des avantages :

Technique économique, facile de mettre en œuvre et peut être appliquée à un nombre élevé d'enzymes, telle que l'enzyme peut diffuser à travers la matrice au cours de l'utilisation et de plus elle n'est applicable que pour des substrats de petite taille. Par ailleurs, les groupements actifs de l'enzyme peuvent réagir avec la matrice et donc entraîner une diminution de l'activité catalytique de celle-ci.

II.4.Conclusion

Les enzymes présentent un intense intérêt dans la biocatalyse. Cependant, l'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicinaux et biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser les enzymes est leur immobilisation sur/dans une matrice appropriée.

La mise en réalisation d'une immobilisation nécessite un choix adéquat de la méthode et du support. L'inclusion dans une matrice organique telle que l'alginate, choisis pour sa haute biocompatibilité vis-à-vis l'enzyme et sa non toxicité, est classée parmi les techniques physiques présentant l'avantage de préservation des propriétés de l'enzyme en terme de stabilité et d'activité.

Chapitre III : Microencapsulation

III.1.Introduction

L'encapsulation est une technique permettant l'inclusion des substances actives solides, liquides ou gazeuses au sein d'un matériau support : matière inactive. Elle conduit à la formation des particules individualisées [44].

La mise en formulation d'une telle technique se fait selon un procédé déterminé afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de maitriser leur libération dans un environnement choisi.

- ***Matières actives :*** sont d'origines très variées, parmi les substances actives que l'on peut protéger ou isoler : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, enzymes, hormones, vitamines, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique etc.
- ***Matériaux enrobant :*** sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides [45].

III.2.Caractéristiques

III.2.1.Taille [46]

En général, les particules obtenues par encapsulation peuvent être classifiées selon leur taille : macro particules (> 5000µm), microparticules (0,2 à 5 000µm) et nanoparticules (<0,2 µm).
Les microparticules contiennent une teneur de matière active allant de 5 à 90% en masse.

III.2.2.Structure [46]

Deux types de structures internes de microparticules polymériques peuvent être observés (Figures III.1 et III.2) :

✓ ***Microsphères :*** sont des réseaux matriciels de matériau enrobant dans le quel se trouve dispersé ou dissout la matière active. Le taux d'encapsulation dans les microsphères varie entre 20 et 35 %.

✓ ***Microcapsules*** : sont des systèmes dits réservoirs ou à membranes constitués d'un cœur de principe actif entouré d'une membrane de matériau enrobant. Le taux d'encapsulation peut être très élevé dans les microcapsules, il est de l'ordre de 85 à 90 %.
D'autres différences entre les deux types de microparticules sont décrites dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Caractéristiques des microparticules [47]

Microparticule / *Caractéristique*	***Microcapsule***	***Microsphère***
Fragilité	Oui	Non
Cinétique de libération	constante au cours du temps	diminue au cours du temps
Considération	procédés complexes souvent	procédés simples
Rapport composé/polymère	50 à 95%	< 30%
Economique	Coûteux	coûteux

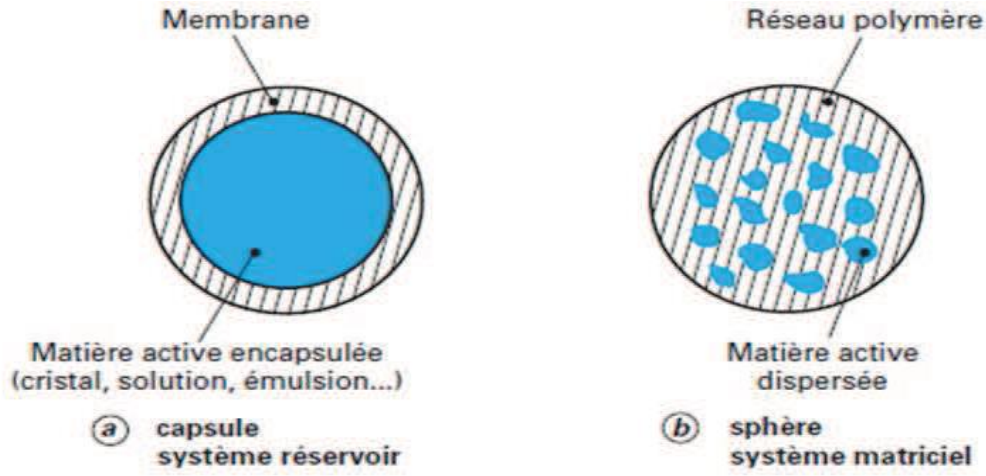


Figure III.1. Schéma représentant la morphologie des particules [48].

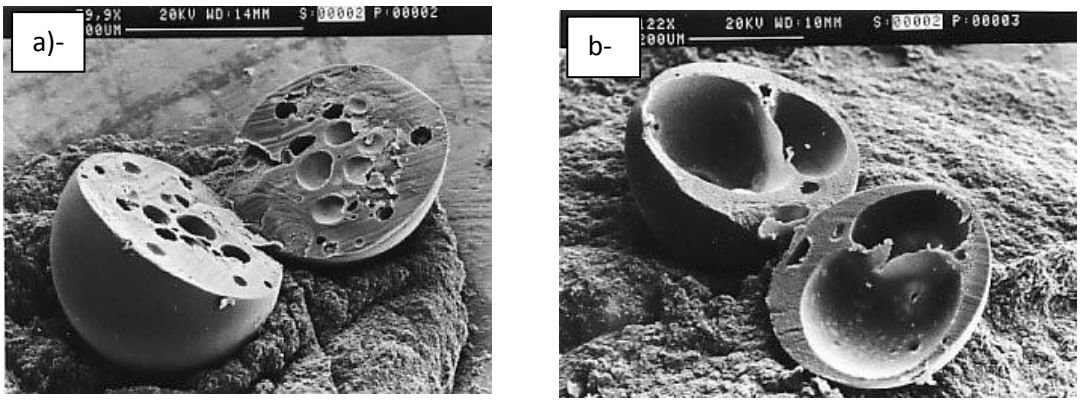


Figure.III.2. Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage: a)- Microsphère, b)- Microcapsule [7].

Ainsi, la membrane d'une microcapsule ou la matrice d'une microsphère se caractérise par [45]:

- La forme ;
- La porosité ;
- Le degré de gonflement ;
- Le potentiel zéta ;
- La mouillabilité ;
- La tortuosité des pores.

III.3. Matériaux enrobant [5]

Le choix adéquat du support utilisé dans les procédés de microencapsulation est primordial, à cause de son effet sur le rendement d'encapsulation et la stabilité des microparticules.

Le polymère d'encapsulation doit satisfaire certaines exigences telles que :

- Inertes vis-à-vis la matière active ;
- Présente une forme facile à manipuler ;
- Capacité de maintenir la matière active dans le cœur de la particule ;
- Capacité d'assurer une protection maximale de la matière active contre les conditions environnementales ;
- Assurer les bonnes propriétés d'émulsification ;
- Applicable dans l'agroalimentaire.

Le tableau II.2. Récapitule les principaux matériaux enrobant utilisés dans les procédés physico-chimiques et mécaniques de microencapsulation.

III.4. Procédés d'encapsulation

Plusieurs procédés permettant l'encapsulation des substances actives sont disponibles. A chaque technique correspondent un intervalle de tailles ainsi qu'un taux d'encapsulation et une structure interne différente. Il y a également diverses possibilités concernant la forme physique finale des microparticules qui peuvent être sous la forme de poudre ou de dispersion dans un liquide. La classification des techniques d'encapsulation disponibles la plus répandue s'intéresse principalement au principe du procédé [5].

III.4.1. Procédés mécaniques [49]: ils sont basés sur le séchage ou la solidification de gouttelettes contenant tous les constituants de la microparticule.

a. **Nébulisation/séchage :** La formulation liquide (solution, émulsion, dispersion de particules solides) composée d'une phase de matière active et une autre phase de la solution de l'agent enrobant est nébulisée. L'aérosol formé est mis en contact avec un flux d'air, porté à une température contrôlée d'où la formation des microparticules solides.

Tableau III.2. Principaux polymères dans les procédés de micro-encapsulation [5]

Matériaux enrobant	Mécanisme mise en jeu	Exemple d'application
Polymères d'origine naturelle		
Alginate de sodium	Mécanique, Dissolution	Biomédicale : encapsulation des cellules, Aromes, Cosmétiques, Parfums, Phytosanitaire
Chitosane	Mécanique	Pharmacie, Administration orale Libération gastrique, Masquage de gout
Amidon	Mécanique, Dissolution	Encapsulation d'arômes, d'huiles essentielles ou aromatiques, de vitamines et d'épices
Gélatine et caséine	Mécanique, Dissolution	Arômes, Parfums, Pharmacie
Gomme arabic	Thermique	
Polymères cellulosiques et leurs dérivés	Mécanique, Dissolution,	Masquage de gout, Administration orale, Libération prolongée ou Déclenchée
Polymères de synthèse		
Copolymères acryliques et Méthacryliques	Thermique, mécanique	Pharmacie, Libération orale, Libération gastrique Libération prolongée
Polyoléfines		Chimie, Biomédical, Phytosanitaire Libération prolongée ou déclenchée par élévation de température
Homopolymères et copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique	Thermique, mécanique	Pharmacie, Libération prolongée Administration parentérale
Lipides solides		
Corps gras solides (esters, alcools, acides gras), glycérides	Thermique, mécanique	Cosmétique, Chimie, Pharmacie Libération prolongée ou déclenchée par élévation de température Stabilisation de matières actives Masquage de goût

b. Enrobage en lit fluidisé **:**La poudre de particules est initialement fluidisée, puis le matériau enrobant est pulvérisé sur ces particules et le film d'enrobage obtenu ensuite séché.

c. Extrusion : Ce procédé consiste en la dispersion de la substance active dans une matrice puis en son extrusion dans un milieu où la matrice se gélifie. Cependant, la perte en molécules actives est grande due essentiellement aux défauts structuraux, à la faible épaisseur de la matrice, ou à la porosité formée pendant ou après le traitement.

III.4.2. Procédés chimiques [47]: ils sont basés sur la formation in situ du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation (polyaddition) anionique d'unités monomères.

a. ***Polycondensation inter faciale en émulsion*** : Dans l'émulsion, chaque phase contient un type de monomère. La réaction se déroule à l'interface entre la phase dispersée et la phase dispersante. Donc, la réaction chimique permet de créer in situ une membrane réticulée à partir de monomères autour de gouttes d'une émulsion.

b. ***Polymérisation radicalaire :*** Il existe 4 procédés pour ce type de polymérisation : la polymérisation en suspension, en émulsion, par précipitation et en dispersion. Ces procédés se déroulent généralement en deux étapes : la nucléation et la croissance.

III.4.2. Procédés physico-chimiques : ils sont basés sur le déclenchement simultanée de l'encapsulation et la formation du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation anionique d'unités monomères.

a. Coacervation [46] *:* elle correspond à un phénomène de désolvatation (par modification de pH, de température ou de force ionique) de macromolécules, conduisant à une séparation de phases. On obtient deux phases : le coacervat (phase riche en polymère et pauvre en solvant) et le surnageant (phase riche en solvant et pauvre en polymère). La coacervation est simple si un seul polymère est présent et elle dite complexe si deux polymères sont présents dans le milieu.

b. Emulsion/Evaporation de solvant [46]*:* l'émulsion constituée d'une phase organique de polymère, de substance active dispersée dans une phase aqueuse contenant un tensioactif. Le solvant organique volatile diffuse dans la phase externe et s'évapore. Ce qui provoque la précipitation du polymère et la formation des microsphères.

c. Gélification thermique [49]: comme dans le procédé précédent, la solidification des particules est obtenue par refroidissement de l'émulsion.

Les substances à encapsuler qui sont souvent des protéines, des enzymes ou même des cellules vivantes.

d. Gélification ou Congélation de gouttes : La gélification de goutte est réalisée à partir d'une solution, dispersion ou émulsion de principe actif dans une solution aqueuse de polymères. Ces polymères doivent être capables de former des gels par changement d'un paramètre physique (température) ou chimique (concentration ionique, pH, etc.).

La congélation de gouttes consiste en la solubilisation ou la dispersion du principe actif dans un matériau enrobant à l'état fondu. L'addition d'un émulsifiant favorise la formation et stabilité de l'émulsion. Sa nature et sa concentration influencent la distribution de la taille des gouttelettes. Par conséquent, lorsque la gélification induite est par voie ionique, l'alginate forme une matrice piégeant le composant actif à l'intérieur [46].

d.1. ***Concepts généraux sur les émulsions :*** Une émulsion est le mélange de deux fluides non miscibles. L'une des phases est dite continue et l'autre phase est dispersée dans la première sous forme de gouttelettes. Les émulsions sont souvent composées d'une phase aqueuse et d'une phase huileuse. Les émulsions sont soumises à des forces répulsives et attractives qui tendent à stabiliser ou à déstabiliser le système [45].

- ✓ **Instabilité des émulsions** [50] : la déstabilisation des émulsions peut être reflétée par :

- *La floculation* : c'est un phénomène réversible de formation d'agglomérats généré parles forces d'attraction entre les gouttes.
- *La coalescence* : la diminution insuffisante de la tension interfaciale, se traduit par la fusion progressive des gouttelettes dispersées, jusqu'à la séparation totale des phases. Il s'agit d'un phénomène irréversible, qu'on peut prévenir en ajoutant à la préparation un émulsionnant approprié.
- *Le crémage ou la sédimentation* : les particules d'une émulsion peuvent, en fonction de leur densité, se déplacer vers le haut (crémage) ou vers le bas (sédimentation). Afin de ralentir ces phénomènes, on augmente souvent la viscosité de la préparation en ajoutant un facteur de consistance ou un agent viscosifiant.
- *La floculation* : les particules dispersées se repoussent car elles portent toujours des charges électriques de même signe. La présence d'électrolytes de charges opposées entraîne la formation d'agglomérats lâches (floculation), redispersables après agitation.
- *L'inversion de phase* : survenant par suite d'une modification chimique du tensioactif ou d'une augmentation inconsidérée de la phase interne ou de la température, elle se traduit par la transformation brusque ou progressive d'une émulsion H/E en une émulsion E/H et inversement : l'émulsion a tourné.

✓ **Stabilisation des émulsions** [46]: Les émulsions peuvent être stabilisées par des émulsifiants qui sont le plus souvent des tensioactifs. Les tensioactifs peuvent être des petites molécules (Tween 20, Span 80 …) ou des polymères.

Le tensioactif grâce à sa nature amphiphile, permet d'assurer la stabilité des gouttelettes de phase dispersée, en réduisant la tension interfaciale.

✓**Formation de l'émulsion** [46] : La phase d'émulsifiassions est prépondérante car elle définie la taille et la distribution de taille futures des microsphères.

Les paramètres influençant la taille et la distribution de taille des gouttelettes sont :

- la vitesse et la durée d'agitation ;
- la nature et la concentration du tensioactif ;
- la nature, la viscosité et le rapport volumique des deux phases non miscibles
- la géométrie du réacteur et des pales d'agitation
- la température …

d.1. Gélification interne [51] ***:*** Elle consiste en l'addition d'un sel insoluble ou partiellement soluble de calcium à l'intérieur des gouttelettes de l'émulsion eau dans huile. Quand le pH diminue les ions et Ca^{+2} sont libérés et la gélification se produit.

d.2. Gélification externe [51] ***:*** La gélification externe consiste à émulsifier une solution aqueuse d'alginate-matière active dans une phase continue non aqueuse, en ajoutant plus tard au milieu une solution de $CaCl_2$pour induire la gélification des gouttelettes et favoriser la séparation des microsphères. La Figure III .3. Illustre le principe des deux modes de gélification.

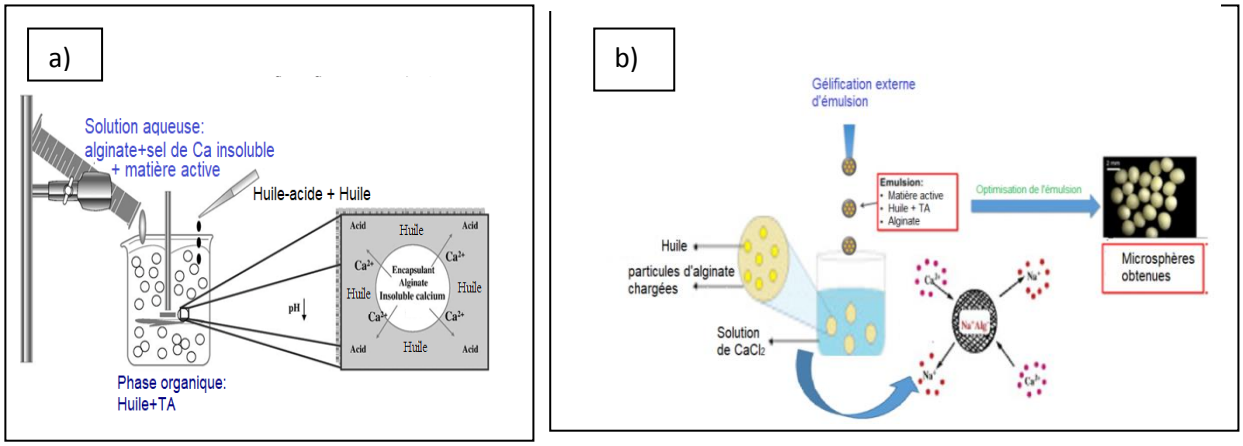


Figure III.3. Modes d'émulsion/gélification : a)- gélification interne [53]; b)- gélification externe [52].

III.5.Quantification de l'actif encapsulé

La matière active présente au sein des microparticules est caractérisée par plusieurs grandeurs [53]. La plus commune est le rendement d'encapsulation (*yield* en anglais) qui a pour formule :

$$\text{Rendement d'encapsulation} = \frac{m(microspheres\ obtenues)(g)}{m(polymere+principe\ actif\ introduits)(g)} \times 100 \qquad \text{(III.1)}$$

Il est aussi utilisé la teneur en principe actif (*loading* en anglais) ou taux d'encapsulation, qui est défini comme :

$$\text{teneur en principe actif} = \text{taux d'encapsulation} = \frac{m(actif\ en\ capsulé)(g)}{m(particules)(g)} \times 100 \qquad \text{(III.2)}$$

Enfin, l'efficacité d'encapsulation (*encapsulation efficiency* en anglais) est également un paramètre utilisé lors de la réalisation de microparticules :

$$\text{Efficacité d'encapsulation} = \frac{masse\ d'actif encapsulé\ (g)}{masse\ d'actif introduit(g)} \times 100 \qquad \text{(III.3)}$$

III.6. Avantages et applications

L'encapsulation se présente donc comme une alternative intéressante pour :

- La protection et la stabilisation d'un principe actif (oxygène, lumière, humidité…),
- La manipulation de produits toxiques ou nocifs,
- La manipulation simplifiée de liquides visqueux,
- La prévention de l'interaction des différents constituants d'un mélange,
- Le masquage d'odeur ou de gout des agréables,
- La diminution du taux de sublimation de produits chimiques,
- Le contrôle de profil de libération de principes actifs
- La vectorisation de médicaments

Actuellement, la microencapsulation est utilisée dans de nombreuses applications industrielles et dans des domaines très varies tels que l'agroalimentaire [54], la cosmétique [55], la pharmacie [56], l'industrie du textile [57, 58]… Dans l'agrochimie par exemple, elle permet une manipulation simplifiée de produits toxiques (pesticides, fongicides…)

Les forces d'attraction entre les gouttes.

Partie B : Partie Expérimentale

Chapitre IV: Matériels et méthodes

IV.1 Introduction

Une partie de notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de la faculté des Sciences et le hall technologique de l'université de Médéa.

Une autre partie, a été effectuée au niveau du laboratoire de contrôle de qualité du complexe Antibiotical-SAIDAL- 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 courgette ;
2. Mise en évidence de l'optimisation d'un émulsion Eau/Huile ;
3. Immobilisation de la peroxydase de courgette en appliquant la méthode de micro-encapsulation ;
4. Etude de l'effet de la concentration de l'agent de réticulation : $CaCl_2$ sur le rendement et l'efficacité d'immobilisation.

IV.2 Matériel utilisé

IV.2.1.Equipements

- Mixeur de type moulines : Moulinex.
- Spectrophotomètre UV – visible de type OPTIMA SP-3000nano.
- FTIR d'un type Shimadzu.
- Homogénéseur de marque KA WERKE à 11000 à 24000 tr /min.
- Microscope optique de type Optika.
- Balance électronique SARTORUIS.
- Centrifugeuse de type Hettich zentrifugen EBA 21 6000tr / min.
- pH mètre pH-2005.
- Agitateur magnétique de type Heidolph MR Hei-standard.
- Pie à coulisse.

IV.2.2.Verrerie

- Tubes à essai.
- Fiole jaugées de : 5ml, 25ml, 50ml, 100ml et1000 ml.
- Pipettes graduées et jaugées de : 0.1 ml, 0.2ml, 1ml et 10ml.
- Erlenmeyer de : 50ml, 100ml et 250ml.

- Eprouvettes de : 10ml, 50ml et 100ml.
- Cristallisoir.
- Buchers de : 50ml, 100ml et 250ml.
- Burette de : 100ml.
- Entonnoir.

IV.2.3. Réactifs chimiques

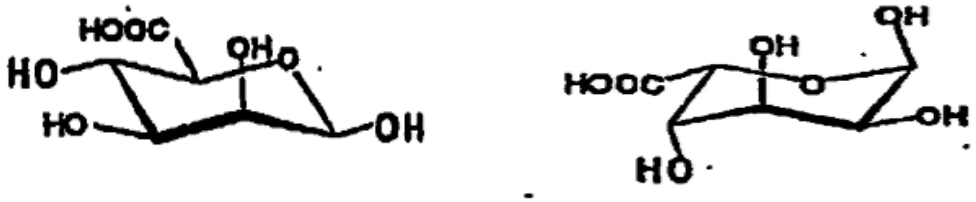
Les différents réactifs chimiques utilisés dans ce travail ainsi que leurs caractéristiques sont résumés dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1.Réactifs chimiques utilisés et leurs caractéristiques

Réactif chimique	**Formule brute**	**Masse molaire (g /mol)**	**Pureté/ densité**	**Fournisseur**
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	34 .01	30	Sigma-Aldrich
Hydroxyde de sodium	NaOH	39.99		Riedel-de Haen
Phosphate de potassium monobasique	KH_2PO_4	136.0855		Riedel-de Haen
Acétone	C_3H_6O	58.079		Sigma-Aldrich
Phénol	C_6H_6O	94.11	99.5	Riedel-de Haen
4-amino-antipyrine	$C_{11}H_{13}N_3O$	203	98	Sigma-Aldrich
Tween 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	1310	99	Sigma-Aldrich
Ethanol	C_2H_6O	46	95	Sigma-Aldrich

IV.2.4.Alginate de sodium [59]

Définition : L'alginate (ou sel d'acide alginique) est le polymère le plus utilisé dans l'immobilisation des protéines (enzymes) cellules, hormones et principes actifs. Il s'agit d'un hétéropolysccharides non ramifié constitué d'unités d'acide β-d-mannuronique (M) et d'acide α-l-guluronique (G) (Figure IV.1), dont la séquence et le nombre varie selon la source. L'alginate provient de deux sources principales: les bactéries et essentiellement les algues brunes.



Acide β-d-mannuronique (M) Acide α-l-guluronique (G)

Figure IV.1. Monomères d'acides mannuronique M et de guluronique G.

b. Structure : ce biopolymère est linéaire. Il est constitué de plusieurs unités (M, G) dont le nombre varie de 100 à 3000. La liaison entre les monomères est de type β-(1-4). Ces acides sont présents dans le polymère sous forme de blocs homogènes poly-M ou poly-G séparés par des régions où ils peuvent alterner (G-M-G-M…) (Figure IV.2).

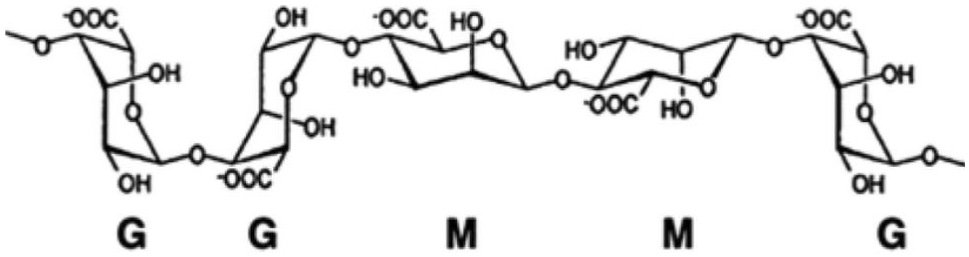


Figure IV.2. Polymère d'alginate constitué des monomères M et G liés en 1-4. L'alternance Des monomères forment différents types de blocs.

b. Propriétés physico-chimiques

- **Formule brute : [**$C_6H_7NaO_6]_n$
- **Composition atomique : le carbone :** 36.38^0/$_0$, l'hydrogène : 3.56^0/$_0$, le sodium 11 ,6^0/$_0$ et l'oxygène : 48,46 ^{0}/$_0$.
- **T° Fusion >** 300°C
- **Solubilité :** La solubilité des alginates en solution aqueuse dépend du degré d'ionisation des groupements carboxyliques portés par les unités monomères. Ainsi, les alginates monovalents sont parfaitement solubles dans l'eau si on leur associe des cations alcalins monovalents car les groupements carboxyliques présents dans les molécules d'alginate sont ionisés. Par contre, l'acide alginique est insoluble dans les solutions aqueuses.

- La présence des ions di-ou multivalents vont non seulement provoquer une agrégation à grande échelle des chaînes polymères pouvant aboutir à une séparation de phases, voire à la formation d'un hydrogel.
- **pKa :** de l'acide alginique varie de 3,7 à 4,2 en fonction de sa composition.

a. Utilisations d'alginate de sodium

✓ Alimentaire : l'alginate de sodium est utilisé comme émulsifiant et gélifiant :

- Utilisé comme additifs alimentaires : l'acide alginique E400, l'alginate de sodium E401, etc.
- Retrouvé dans les laits gélifiés en vue de la préparation de desserts lactés, dans les gelées alimentaires, les glaces et les yaourts.

✓ Médicine : l'alginate de sodium est utilisé dans les inserts oculaires. Il intervient aussi dans la fabrication de produits de moulages dentaires.

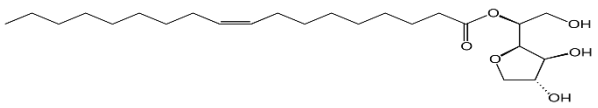
✓ Pharmacie : pansement cutané, pansement hémostatiques.

✓ Pharmacie galénique : il servira comme : agent stabilisant, agent de suspension, agent de viscosité. Ainsi, il est utilisé comme épaississant dans les pommades, crèmes et gel et est plus utilisé comme stabilisant pour les émulsions huile dans eau.

IV.2.5.Span 80 [60]

Ou le monooléate de sorbitane, de la famille des esters de sorbitane (classe de tensioactifs non ionique). Il est utilisé comme émulsifiant dans la préparation des émulsions eau dans huile. Les paramètres de ce tensioactif sont décrits dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2. Caractéristiques du tensioactif utilisé .

Fournisseur	ALDRICH
Nom	Monooléate de sorbitane
Formule	
Masse Molaire	428,61 g .mol^{-1}
HLB	4,3

IV.2.6. Huile de paraffine

Huile d'origine minérale constituée d'hydrocarbures saturés. Elle est utilisée dans les Préparations pharmaceutiques, cosmétologiques et vétérinaires. Et comme graissage de matériels de l'industrie et Auxiliaire de condensation dans l'extraction des oléagineux.
Selon la pharmacopée Européenne, les principales caractéristiques de l'huile de paraffine sont résumées sur le tableau IV.3.

Tableau IV.3. Caractéristiques des huiles paraffine selon la pharmacopée européenne.

Caractéristique	Unité	Valeur
Aspect	---	Très fluide
Odeur	---	Sans
Couleur	---	Incolore
Gout	---	Sans
Viscosité cinématique à 20°C	mm^2/s	30,8-91,4
Masse volumique à 20°C	kg/m^3	810-875

IV.3. Méthodes

*IV.3.1.*Préparation de la solution tampon pH *7*[61]

IV.3.2. Spectrophotométrie UV-Visible [62]

La spectrophotométrie ou la spectroscopie Ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (10 à 400 nm) et du visible (400 à 800 nm).Soumis à un rayonnement électromagnétique dans cette gamme de longueur d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transition électronique(s). Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais ils peuvent être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide.

Les spectromètres UV-visible comportent tous les composants donnés sur la figure IV.3.

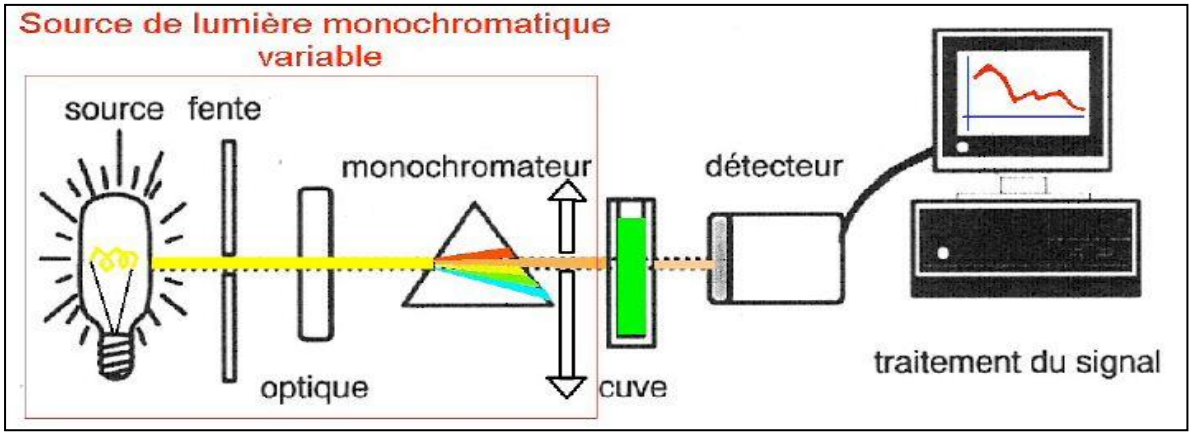


Figure. IV.3. Composants de spectrophotomètre UV-Vis.

Le spectroscope UV-Vis utilisé dans notre étude est représenté sur la figure IV.4.



Figure IV.4. Spectrophotomètre UV-vis utilisé dans notre étude**.**

IV.3.3. Spectrométrie Infrarouge [62]

La spectroscopie IR est basée sur l'absorption des radiations électromagnétiques qui correspond à des longueurs d'onde comprises entre 0.78 et 1000 µm, cette bande spectrale est devisée en trois régions : proche IR (12 500 à 4000 cm^{-1}), moyen IR (4000 à 400 cm^{-1}) et IR lointain (400 à 10 cm^{-1}). La région du moyen infrarouge est la plus utile du fait des informations aboutis sur les structures des composés examinés.

Les spectres obtenus permettent une analyse fonctionnelle des molécules organiques, sont des spectres de vibration-rotation, dans lesquels l'énergie de vibration est beaucoup plus grande que celle de rotation.

IV.4. Extraction et purification de la peroxydase de la courgette [63]

IV. 4.1.Préparation de l'extrait brut

Une masse de 100g de courgette (*Cucurbita pepo*) rincée et coupée en petits morceaux a été homogénéisée avec 200 ml d'eau distille dans un mixeur. L'homogénéisât obtenu a été filtré sur multicouche de gaze, c'est l'extrait enzymatique brut, (Figure IV.5).

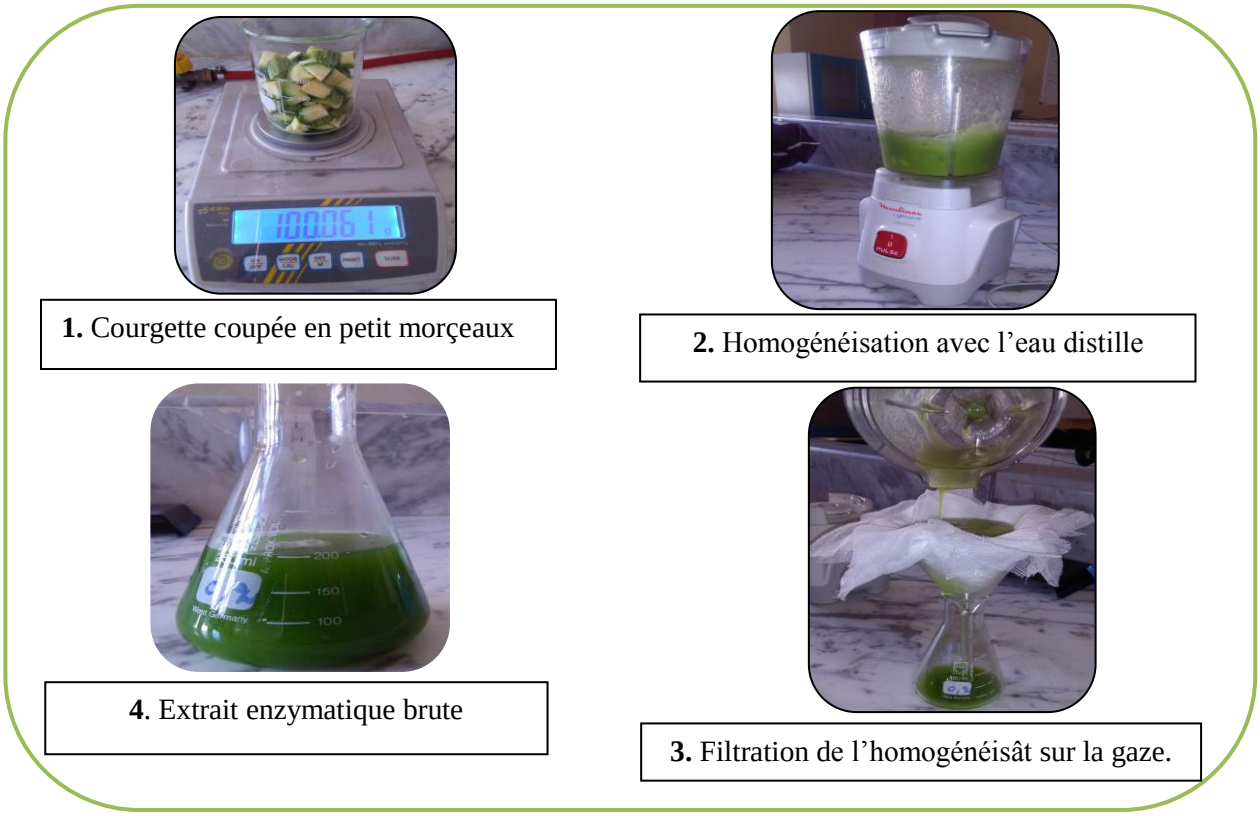


Figure IV.5. Protocole expérimental d'extraction de la peroxydase de courgette.

IV.4.2. Purification partielle de l'extrait enzymatique brut

La méthode de précipitation à l'acétone, [64] a été appliquée par addition graduelle de 200 ml d'acétone pré-refroidi à 200 ml à l'extrait brut de la peroxydase. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C. La solution est ensuite centrifugée à 3000 tr. min^{-1} pendant 10 min. Ensuite, le précipité est dissout dans 100 ml de solution tampon phosphate (50 mM) à pH 7, c'est l'extrait partiellement purifiée (EEPP). Le protocole expérimental est illustré sur la figure IV.6).



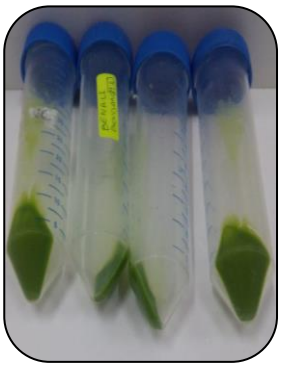
1. Purification par l'acétone à 0°C



2. Mélange : Extrait / Acétone



4. EEPP

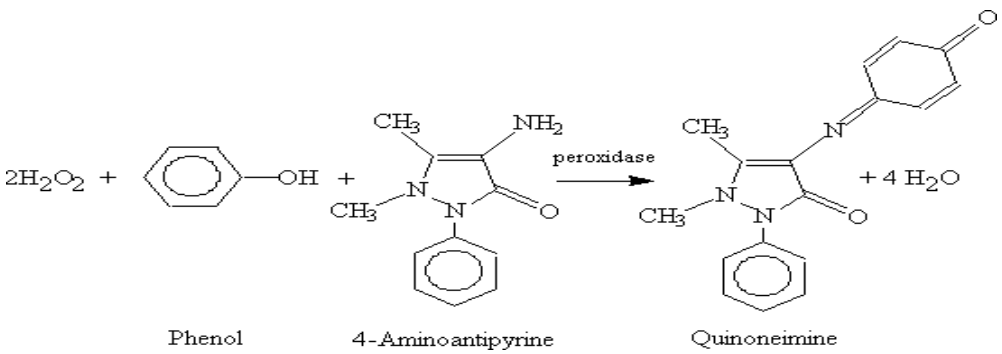


3. Culot récupéré après centrifugation à 3000 tr/min

Figure IV.6. Protocol expérimental de purification de la peroxydase de courgette.

IV.4.3. Dosage de l'activité enzymatique [64]

La mesure d'activité enzymatique de la peroxydase est basée sur utilisation du 4-amino-antipyrine. Le principe de dosage est basé sur la réaction entre le phénol, le peroxyde d'hydrogène en présence de 4-Amino-antipyrine et la peroxydase (réaction IV.1).Le produit formé au cours de cette réaction est un chromogène de Quinoneimine.



(IV.1)

Le Quinoneimine est un produit coloré en rose (figure IV.7) présente des caractéristiques d'absorption particulières dans la gamme visible à une langueur d'onde maximale de l'intervalle de 500 à 520 nm ce qui permet de maitre en œuvre une technique de mesure d'activité enzymatique en continu. La vitesse initiale est alors déterminée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe obtenue. Nous avons basé sur ce dernier principe de mesure de l'AE, pour évaluer l'activité peroxydasique des solutions enzymatiques.

Par conséquent, nous faisons appel à deux expériences :

Expérience N°01 :elle sert à déterminer la longueur d'onde maximale ainsi qu'à étudier la cinétique de la réaction IV.1.La vitesse initiale est alors déterminée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe cinétique de transformation de H_2O_2 obtenue par mesure de la DO après un temps t à 10 s d'intervalle

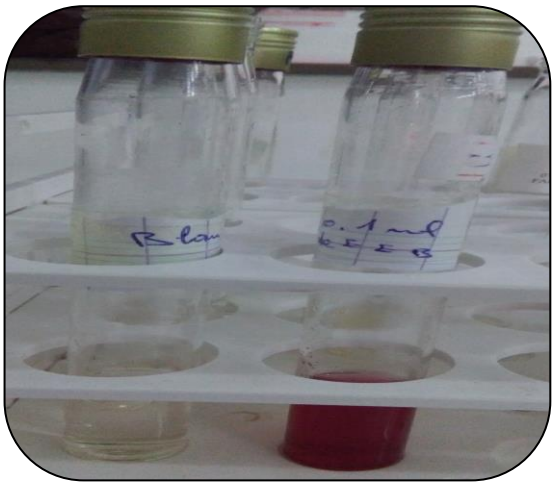


Figure IV.7. Quinoneimine, produit de dosage de l'activité peroxydasique.

Expérience N°02 : sert à déterminer le coefficient d'extinction molaire de peroxyde d'hydrogène, obtenu de la courbe d'étalonnage : la densité optique en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène.

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 IV.8.

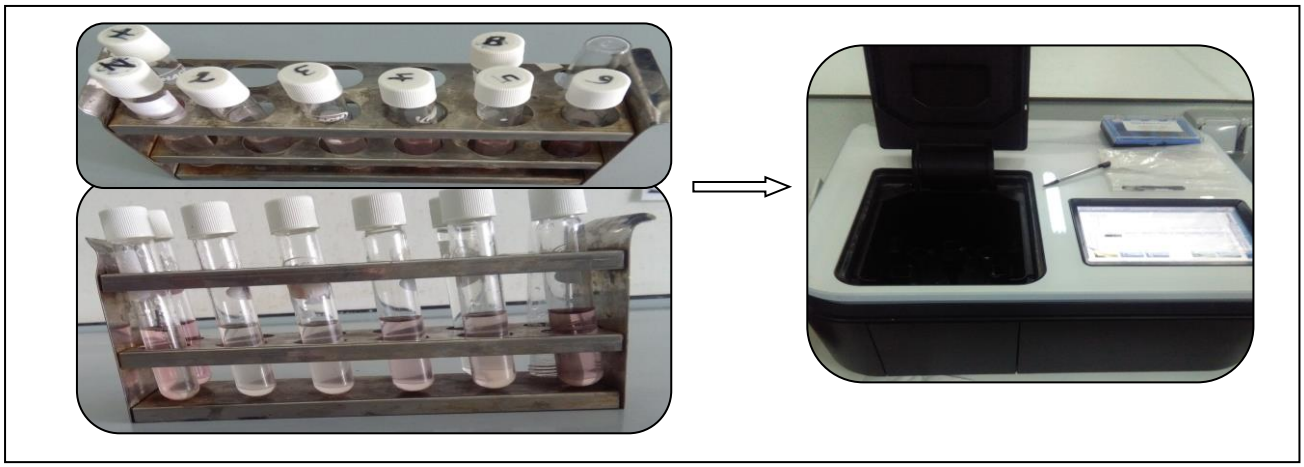


Figure IV.8. Produits colorés de l'expérience N°02.

IV.5. Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford [65]

IV.5.1. Principe

La technique de Bradford utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines. Sous sa forme anioniquese fixerait préférentiellement grâce à des interactions électroniques avec les groupements cationiques des protéines.

IV.5.2. Gamme d'étalonnage

La concentration est déterminée à l'aide d'un courbe étalon de sérum d'albumine bovin (SAB), en ajoutant 0.1 ml de sérum à différentes concentrations à 5 ml du réactif de Bradford et 0.25ml de NaOH (1 M). La densité optique de chaque échantillon sera observée en mesurant l'absorbance à 595 nm.

IV.6. Préparation des microsphères

IV.6.1. Formulation des émulsions eau/huile par la méthode de TAGUCHI [66]

- ***Mode opératoire***

Pour établir les émulsions Eau dans l'huile, on respecte les étapes suivantes :

1. Différentes solutions aqueuses (contenant la peroxydase extraite) d'alginate de sodium aux différentes concentrations sont préparées ;
2. Le Span 80 est dispersé aux différentes proportions (v/v) dans l'huile de paraffine ;

3. Un volume déterminé de la solution aqueuse est ajouté à l'aide d'une seringue dans la solution huileuse (la solution huileuse se trouve dans un bain d'eau glacée). Le mélange est homogénéisé à une vitesse 10 000 tr/min pendant 2min.

IV.6.2. Principe de la méthode TAGUCHI

Pour obtenir l'émulsion la plus stable, on désire optimiser les paramètres dont dépend la formulation. Pour ce faire, nous allons appliquer la méthode de TAGUCHI qui permet un choix optimal des trois paramètres ciblés.

En appliquant cette méthode, à partir de 3 paramètres à trois niveaux nous allons réaliser, un nombre d'essais égale à : $3^3 = 27$ essais 'expériences'. Les niveaux choisis sont résumés sur le tableau IV.4.

Tableau IV.4. Tableau de volume final d'émulsion de 100ml.

Essais	***[Alginate]*** ***C_1 (%)***	***Volume de phase aqueuse*** ***(ml dans 100 ml de mélange)***	***[Span 80]*** ***C_2 (%, v /v)***
1	1	15	1
2	1.5	25	2
3	2	35	3

Le tableau IV.5 présente toutes les combinaisons possibles pour les 27 expériences.

Les formulations obtenues, sont analysées par microscope optique, et seules les émulsions formulées ont un essai de stabilité pendant 30j à 4°C.

Cependant, les émulsions stables seront passé en une étape de gélification externe.

Tableau IV.5. Compositions des différents essais de préparation des émulsions E/H contenant la peroxydase.

Essais	***[Alginate de Na] C_1 (%)***	***Volume de phase aqueuse (ml dans 100 ml de mélange)***	***[Span 80] C_2 (%, v /v)***
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	2	1
5	1	2	2
6	1	2	3
7	1	3	1
8	1	3	2
9	1	3	3
10	2	1	1
11	2	1	2
12	2	1	3
13	2	2	1
14	2	2	2
15	2	2	3
16	2	3	1
17	2	3	2
18	2	3	3
19	3	1	1
20	3	1	2
21	3	1	3
22	3	2	1
23	3	2	2
24	3	2	3
25	3	3	1
26	3	3	2
27	3	3	3

IV.7. Immobilisation par gélification [52]

Pour immobiliser les gouttelettes d'alginate-peroxydase émulsifiées, nous prenons d'une part les formulations les plus stables et de meilleure qualité microscopique, après on préparer une série de solution de $CaCl_2$ à différentes concentrations.

1. On préparer des solutions de $CaCl_2$ de concentrations : 0 .25, 0.5, 1 et 2% (m /v). On met un volume de $CaCl_2$ de concentration déterminée dans un bécher sous agitation magnétique à 250 tr/min. Ensuite, on ajouter la solution d'alginate goutte à goutte (la distante entre la seringue le niveau du liquide est de 5 cm. On laisse le mélange obtenu pendant 1heure. pour chaque émulsion on faire 4 immobilisation en fonction [$Cacl_2$]. **Figure IV.9.**



Figure IV.9. Préparation des billes d'alginate de calcium.

2. Le mélange émulsion-$CaCl_2$ est filtré à l'aide d'un tamis. Les microsphères récupérées sont lavées avec une solution $CaCl_2$ (1mM) contenant 1%de tween80.
3. Les activités enzymatiques et les activités enzymatiques spécifiques de filtrats aux étés déterminés.

- ***Caractérisation des microsphères formées :***
    - Mesure du diamètre moyen : sur 20 billes, on utilise Pied à coulisse.
    - Analyse par infrarouge : on sèche les billes à l'étuve à 30 °C, puis on les broie à l'aide d'un mortier. Finalement, on fait une analyse FTIR.
    - L'évaluation de l'encapsulation de la peroxydase se fait par la détermination de l'efficacité d'immobilisation et du rendement d'immobilisation (expression IV.2 et IV.3. Pour ce faire, une mesure des activités enzymatiques et des

activités spécifiques de l'extrait enzymatique partiellement purifié et des filtrats sont déterminés.

$$EI(\%) = \left(\frac{\text{AE0.V0} - \text{AE Filtrat .VFiltrat}}{\text{AE0.V0}}\right).100 \quad \text{(IV.2)}$$

$$Rdt(\%) = \left(\frac{\text{AE0(spécifique)} - \text{AEfiltrat(spécifique)}}{\text{AE0(spicifique)}}\right).100 \quad \text{(IV.3)}$$

Avec :

AE_0 : Activité enzymatique de l'EEPP (UI/ml)

$AE_{filtrat}$: Activité enzymatique du filtrat (UI/ml)

$AE_{0\ Spécifique}$: Activité enzymatique spécifique de l'EEPP (UI/mg)

$AE_{Filtrat\ Spécifique}$: Activité enzymatique spécifique de l'EEPP (UI/mg)

L'activité enzymatique spécifique est le rapport entre l'activité enzymatique et la quantité des protéines.

IV.8. Application à la décoloration du bleu de méthylène

Les microbilles obtenues sont destinées à un traitement d'une solution aqueuse de bleu de méthylène.

L'expérience consiste à préparer un mélange réactionnel contenant : le bleu de méthylène de concentration 10mg/l, le peroxyde d'hydrogène à 20mM, 10 microsphères chargées de peroxydase de courgette et la solution tampon pH7. La réaction enzymatique se déroulera pendant 30min. Ensuite, le mélange réactionnel sera centrifugé à 3000 tr/min pendant 10min.

La détermination du rendement de décoloration se fait selon l'expression IV.4.

$$Rdt\ de\ coloration = \left(\frac{C_{initiale} - C_{finale}}{C_{initiale}}\right).100 \quad \text{(IV.4)}$$

Avec :

$C_{initiale}$: concentration massique de la solution de bleu de méthylène avant traitement (mg/l).

C_{finale} : concentration massique résiduelle de la solution de bleu de méthylène après traitement par la peroxydase immobilisée (mg/l).

Chapitre V: Résultats et discussions

V.1. Détermination de l'activité enzymatique de l'EEPP de courgette

Dans une première étape, nous avons illustré sur la figure V.1 la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde du produit de la réaction de transformation de phénol (Réaction IV.1) : le Quinoneimine.

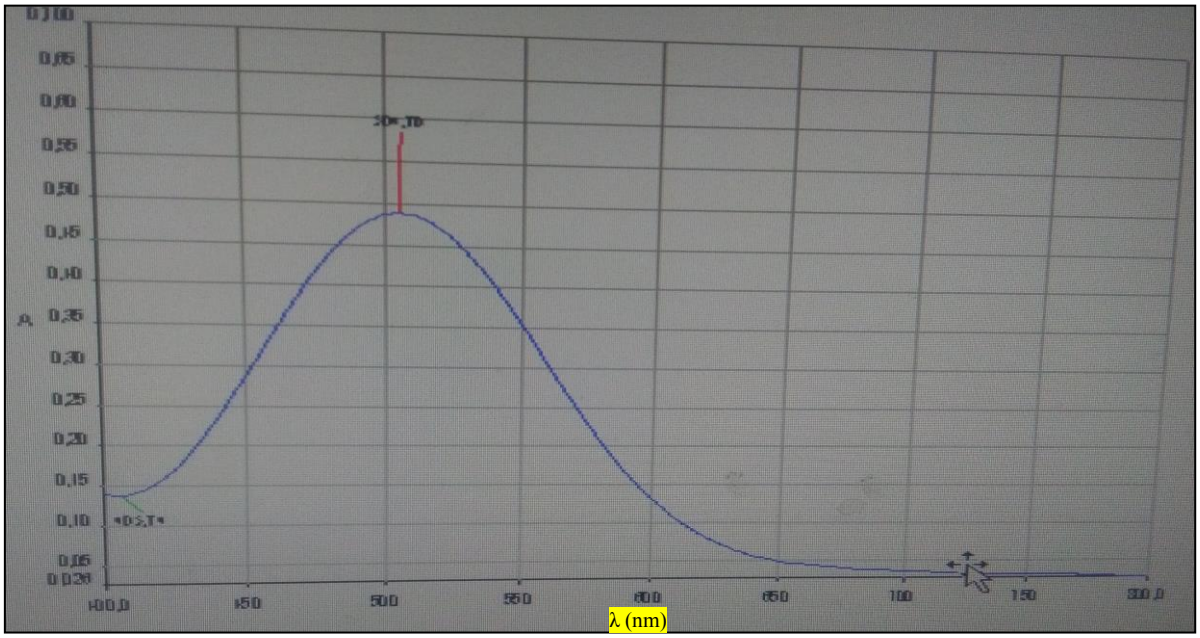


Figure V.1. Variation de l'absorbance du Quinoneimine en fonction de la longueur d'onde.

Il est clair que la longueur d'onde maximale est 504nm.

La deuxième étape nous a permis de déterminer la cinétique de réaction de transformation du phénol en produit coloré (réaction IV.1) assurée par la peroxydase. L'allure est représentée sur la figure V.2.

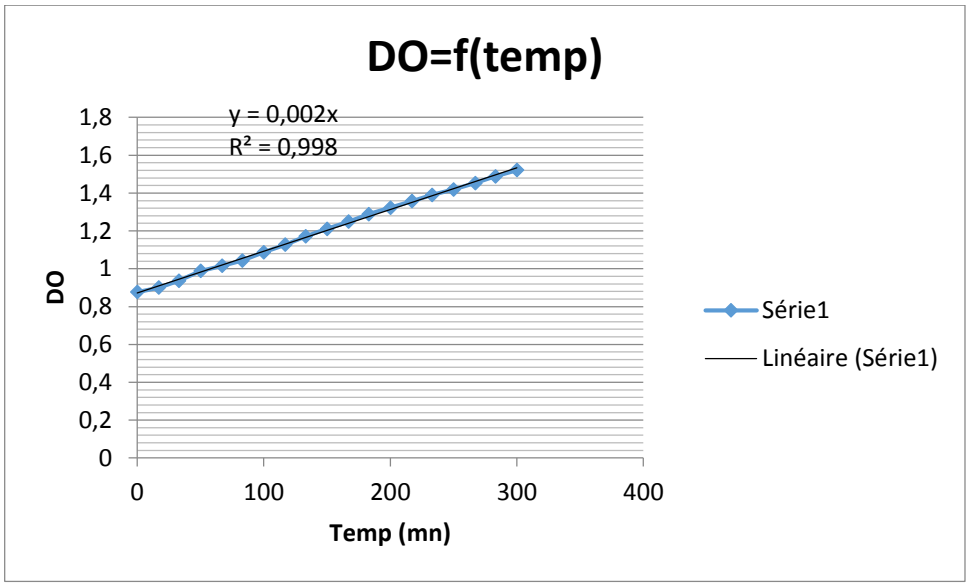


Figure V.2 . Cinétique de transformation du phénol en Quinoneimine à λ=504nm.

Dans une troisième étape nous avons établi la courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène : co-substrat de la peroxydase. Cette courbe est illustrée sur la figure IV.3.

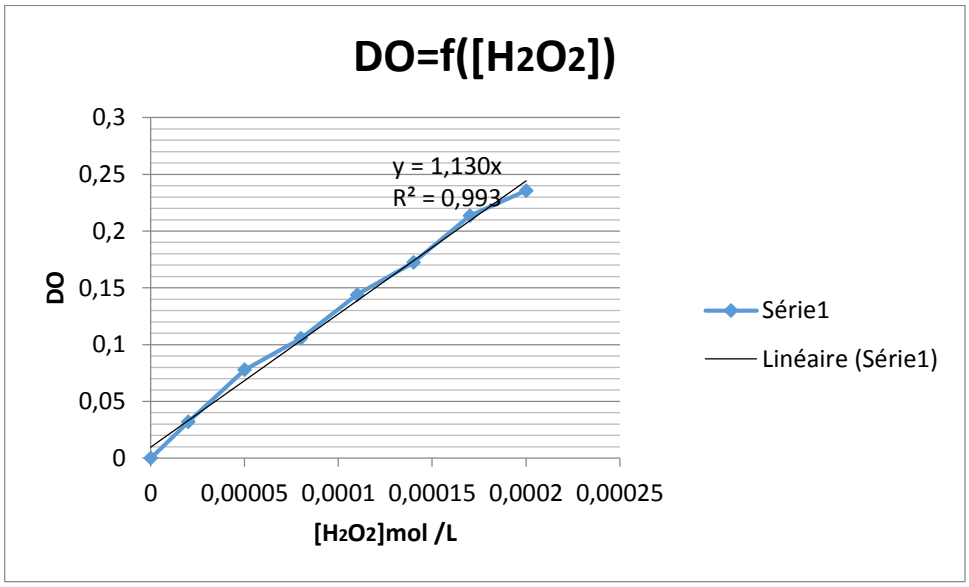


Figure V.3. Courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène, ε =1130 l/mol.cm

Des résultats des figures V.2 et V.3, la valeur de l'activité enzymatique de l'EEPP de courgette est calculer par l'équation :

$$AE = \frac{A}{\varepsilon} \mathbf{x} \frac{10^6}{10^3} \frac{Volumedemélangeréactionnel}{volumed'enzymeinjectée}$$

Et égale à 2.76UI/ml .

V.1.1. Détermination de l'activité enzymatique spécifique

La courbe d'étalonnage de la protéine SAB, est donnée sur la figure V.4.

Le calcul de l'activité enzymatique spécifique de l'extrait enzymatique partiellement purifié donne la valeur de 22.72 UI/mg.

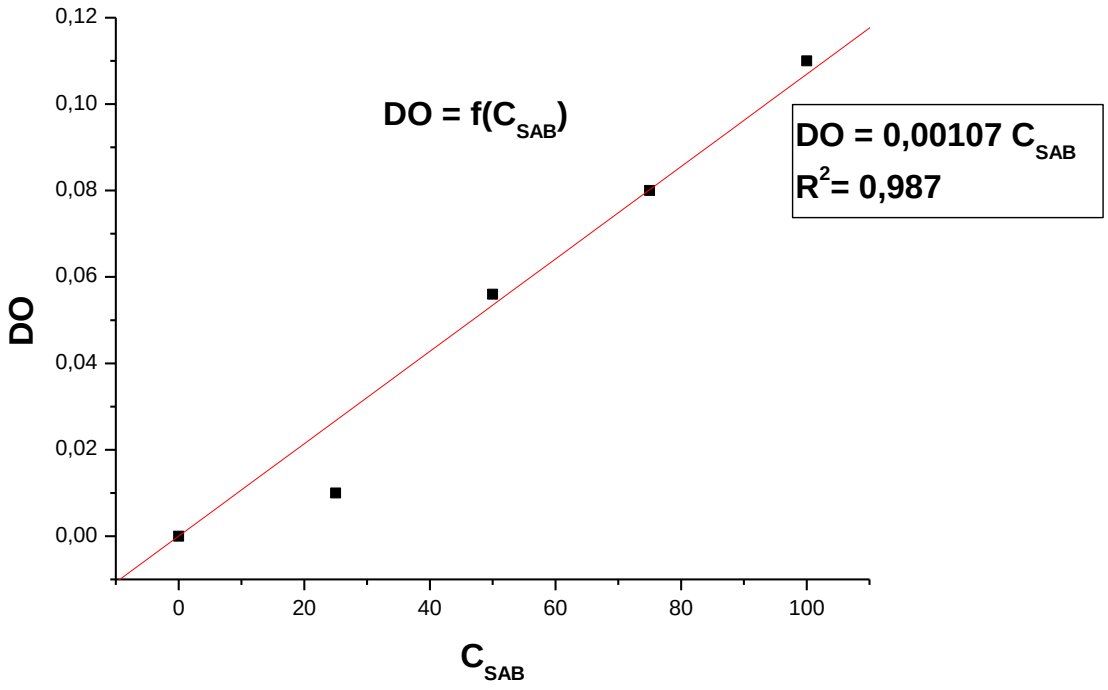


Figure V.4. Courbe d'étalonnage de SAB.

V. 2. Préparation des microsphères de peroxydase de courgette

V.2.1. Formulation des émulsions eau/huile

Les émulsions eau dans huile sont formulées par dispersion des gouttelettes de la solution aqueuse contenant l'alginate de sodium dissout dans l'EEPP d'AE ayant une AE de

2,76UI/ml dans l'huile de paraffine. Ainsi, leur stabilisation est assurée par un agent émulsifiant : Span80.

Sur ce principe, nous avons réalisé les 27 combinaisons décrites dans le tableau IV.4.

Sur les 27 formulations, nous avons effectué une vue par microscope optique. Seules celles qui correspondent aux essais 7, 8, 9, 13, 18, 22 et 26 conduisent aux émulsions eau/huile.

Les photos de ces dernières sont illustrées sur les figures suivantes.

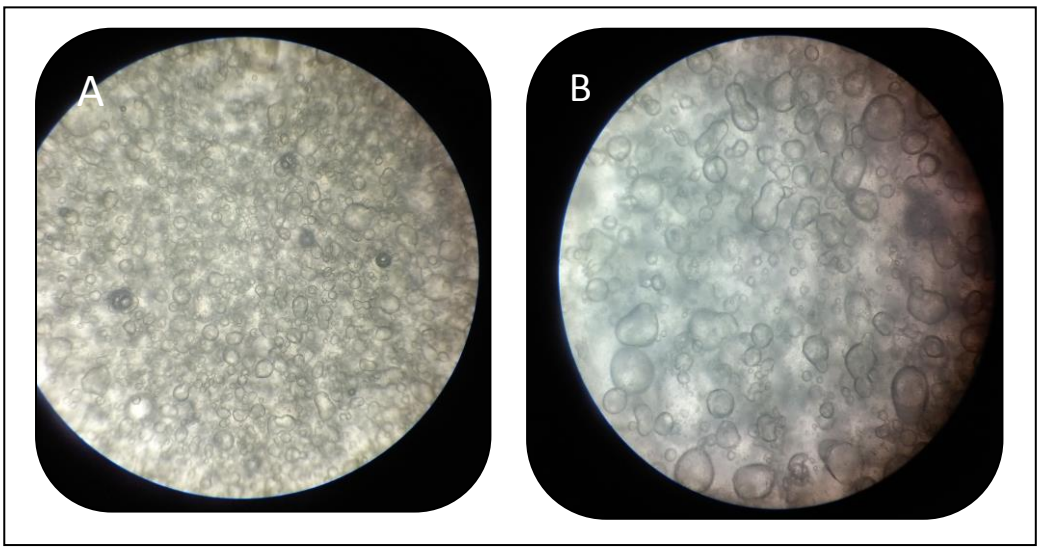


Figure V.5. Photos de l'émulsion de l'essai N°7 prises sous microscope optique :

A : grossissement 40 , B : grossissement 100 .

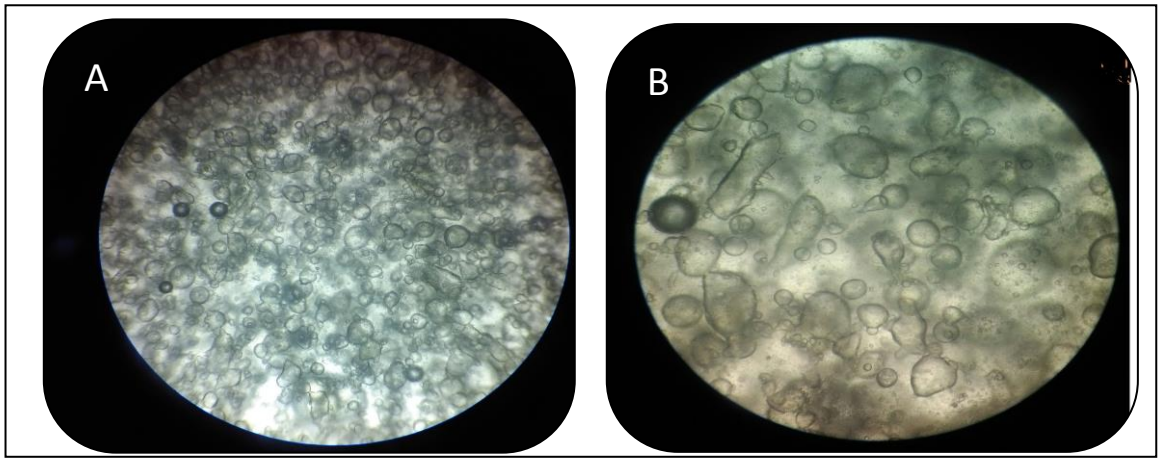


Figure V.6. Photos de l'émulsion de l'essai N°8 prises sous microscope optique : A : grossissement 40 , B : grossissement 100 .

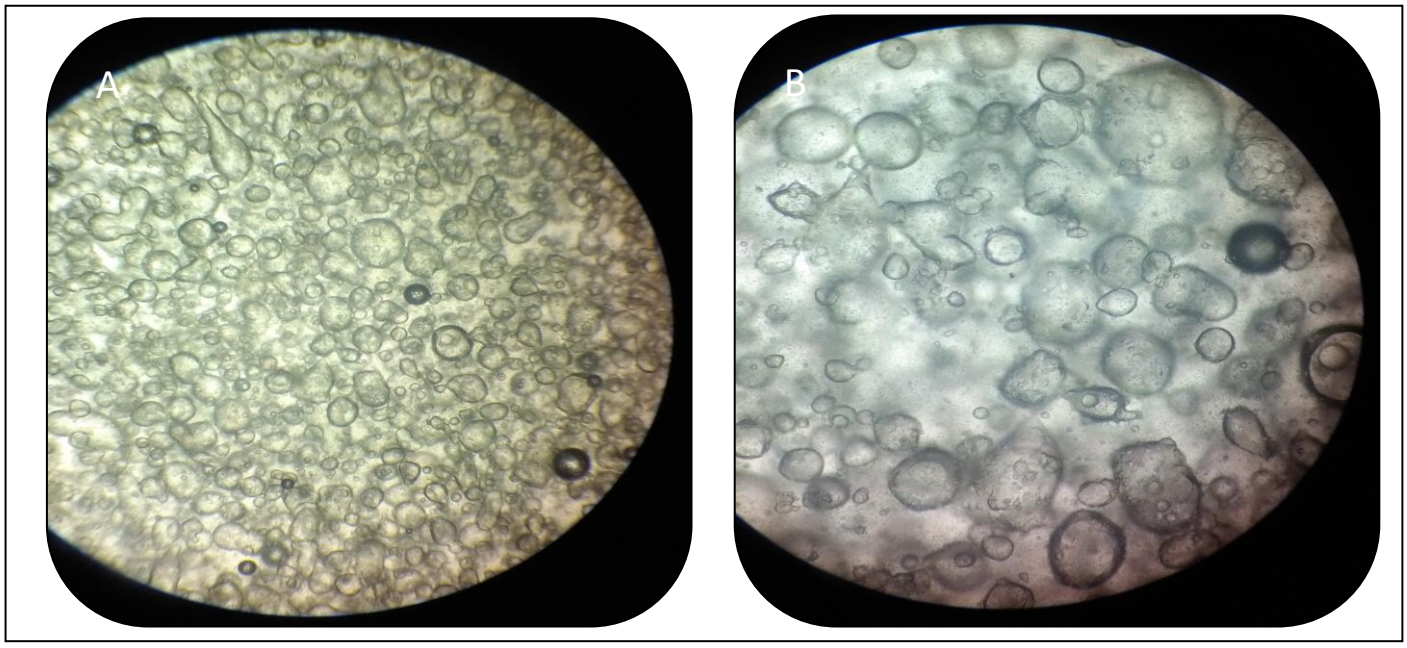


Figure V.7. Photos de l'émulsion de l'essai N°9 prises sous microscope optique : A : grossissement 40 , B : grossissement 100 .

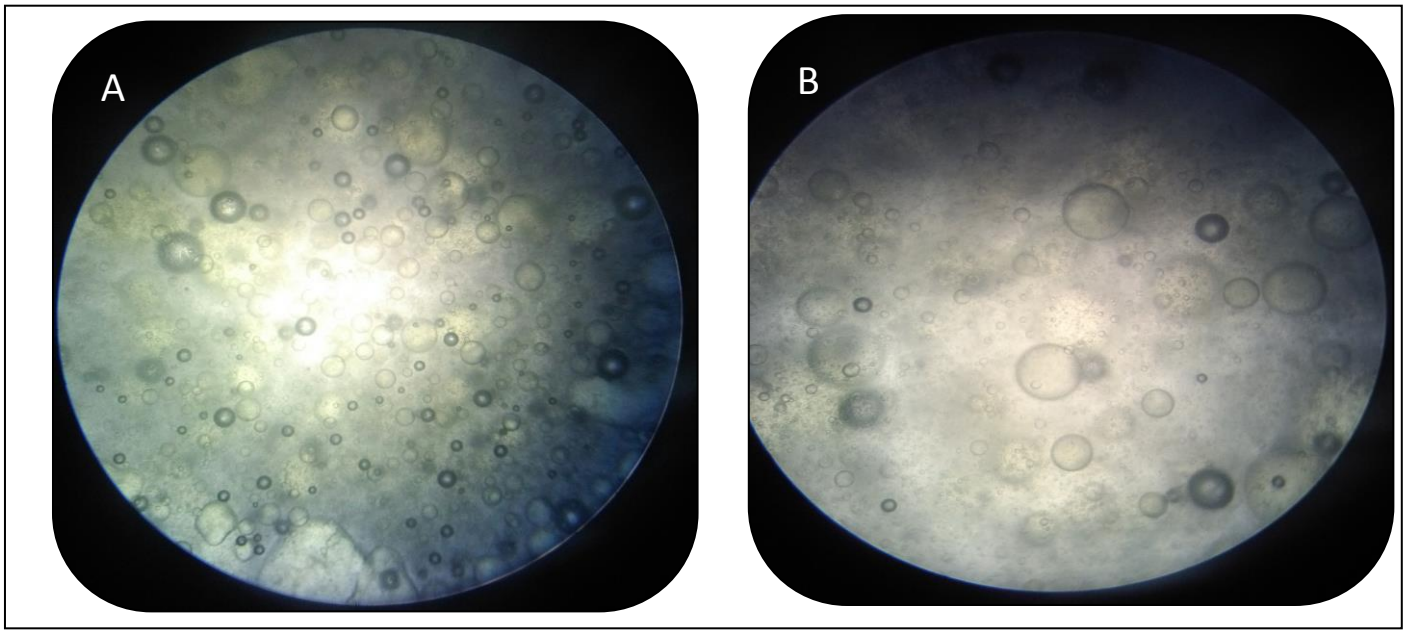


Figure V.8. Photos de l'émulsion de l'essai N°13 prises sous microscope optique : A : grossissement 40 , B : grossissement 100 .

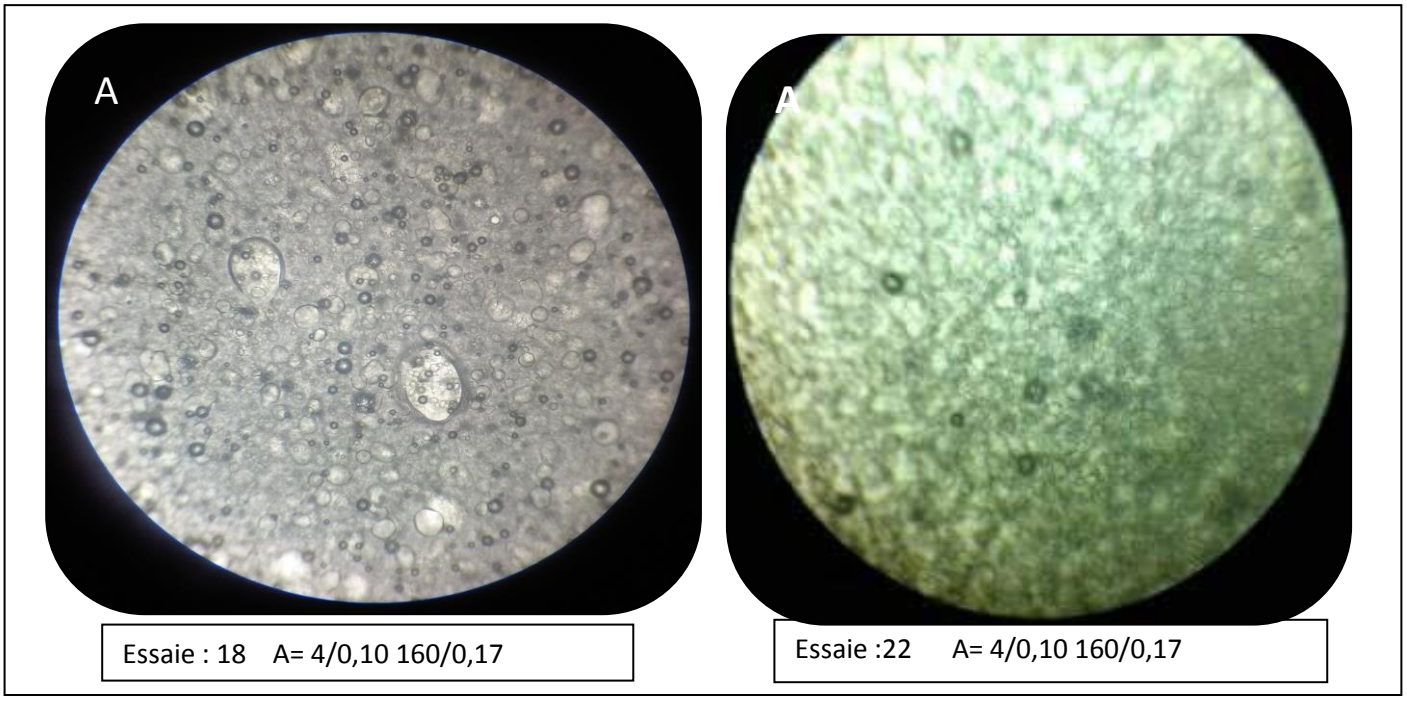


Figure V.9. Photos des émulsions des essais N°18 et 22 prises sous microscope optique, grossissement 40.

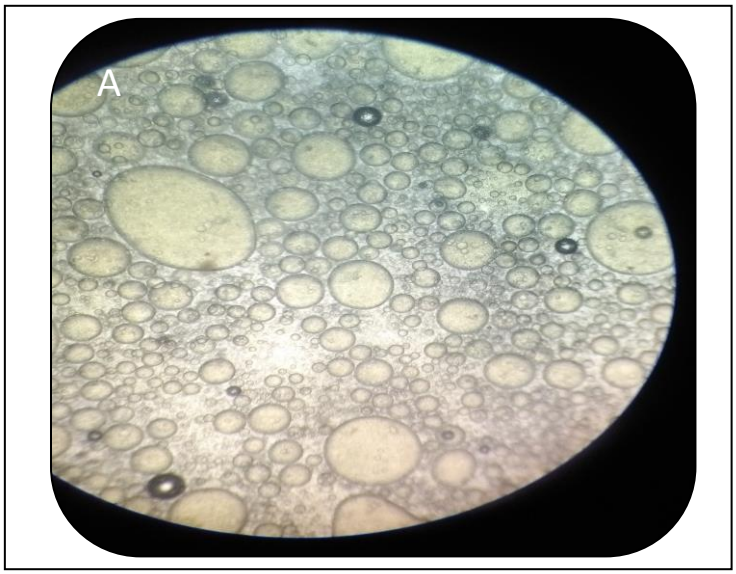


Figure V.10. Photos de l'émulsion de l'essai N°26 prise sous microscope optique : A : grossissement 40

La discussion de ces photos se fait comme suit :

- Pour les essais 7, 8 et 9, la concentration d'alginate est de 1%, la teneur du Span 80 est de 1, 2 et 3% respectivement et la proportion de la phase aqueuse est de 35%. La teneur du TA n'a pas un grand effet, tandis que la proportion de la phase aqueuse influe les gouttelettes de l'émulsion. Les émulsions obtenues sont plus au moins uniformes.
- L'essai N°13, correspond à une concentration d'alginate de 2%, une proportion de la phase aqueuse de 25% et une teneur en Span80 de 1%. Dans ce cas, malgré la formation de l'émulsion, on remarque que la distribution des dimensions des gouttelettes de la phase dispersée n'est pas uniforme.
- L'essai N°18, correspond à une concentration d'alginate de 1.5%, une proportion de phase aqueuse de 35% et une teneur en Span80 de 3%. La phase aqueuse de cette émulsion est constituée de gouttelettes de dimension uniforme.
- L'essai N°22, correspond à une proportion de la phase aqueuse de 25% à 3% en masse d'alginate et 1% de span80, dans ce cas, l'émulsion est composée d'une phase dispersée présentant des gouttelettes de diamètres uniformes.
- L'essai N°26, correspond à une proportion de la phase aqueuse de 35% à 2% en masse d'alginate et 2% de span80. La distribution des gouttelettes de la phase aqueuse dans ce cas, n'est pas uniforme, certaines sont grosses alors que d'autres sont de diamètre moyen.

V.3.2. Etude de stabilité des émulsions formulées

Sur les 7 émulsions formulées, une conservation à 4 °C pendant 30j a été réalisée. Seules les émulsions correspondant aux essais : 9, 13, et 18 ont montré une stabilité comme l'indiquent les photos de la figure V.11. La séparation de phase produite des émulions restantes est de type coalescence.

Ainsi, les émulsions 9, 13 et 18, ont subi une centrifugation à une vitesse de 12000tr/min pendant 2min. on a remarqué que les formulations obtenues ont subi une légère séparation (figure A).

De ces résultats, nous constatons que la teneur du Span80 dans la l'huile de paraffine a influencé fortement la stabilité des émulsions déjà obtenues. Ces émulsions restent homogènes pendant 30j à 4°C. De plus, la formulation N°13 contient une proportion de TA de 1%, où nous remarquons une fusion des gouttelettes, c'est le début de la coalescence. Les photos des différentes émulsions sont représentées en Annexe.

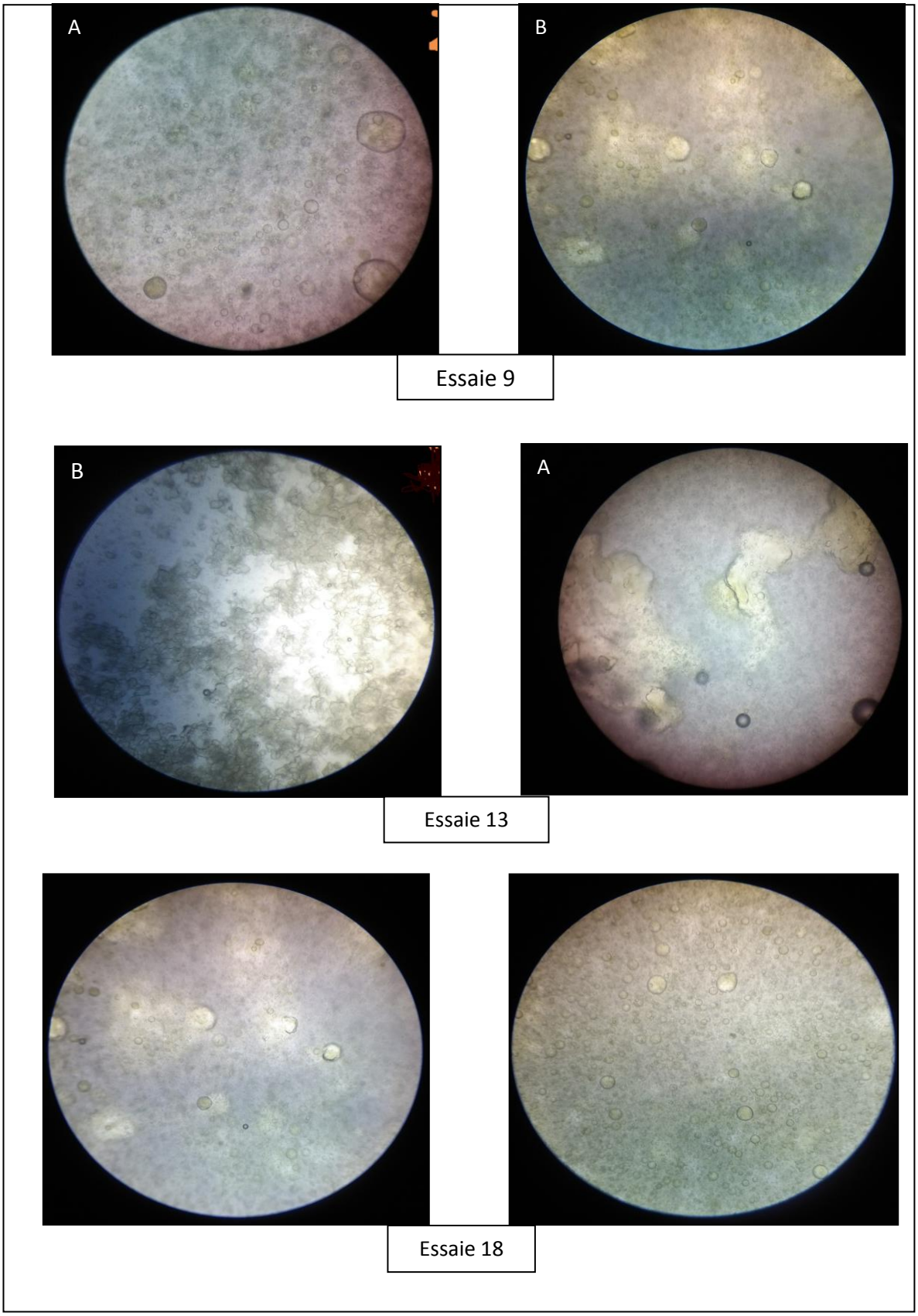


Figure V.11. Photos des émulsions conservées à 4°C pendant 30j.

V.2.3. Immobilisation des émulsions par gélification

Pour chacune des deux émulsions (essais : 9 et 18), nous avons procédé à la gélification de l'alginate-peroxydase dans les solutions de chlorure de calcium à différentes concentrations.

Les figures V.12 et V.13. présentent l'aspect des particules obtenues après immobilisation des émulsions.

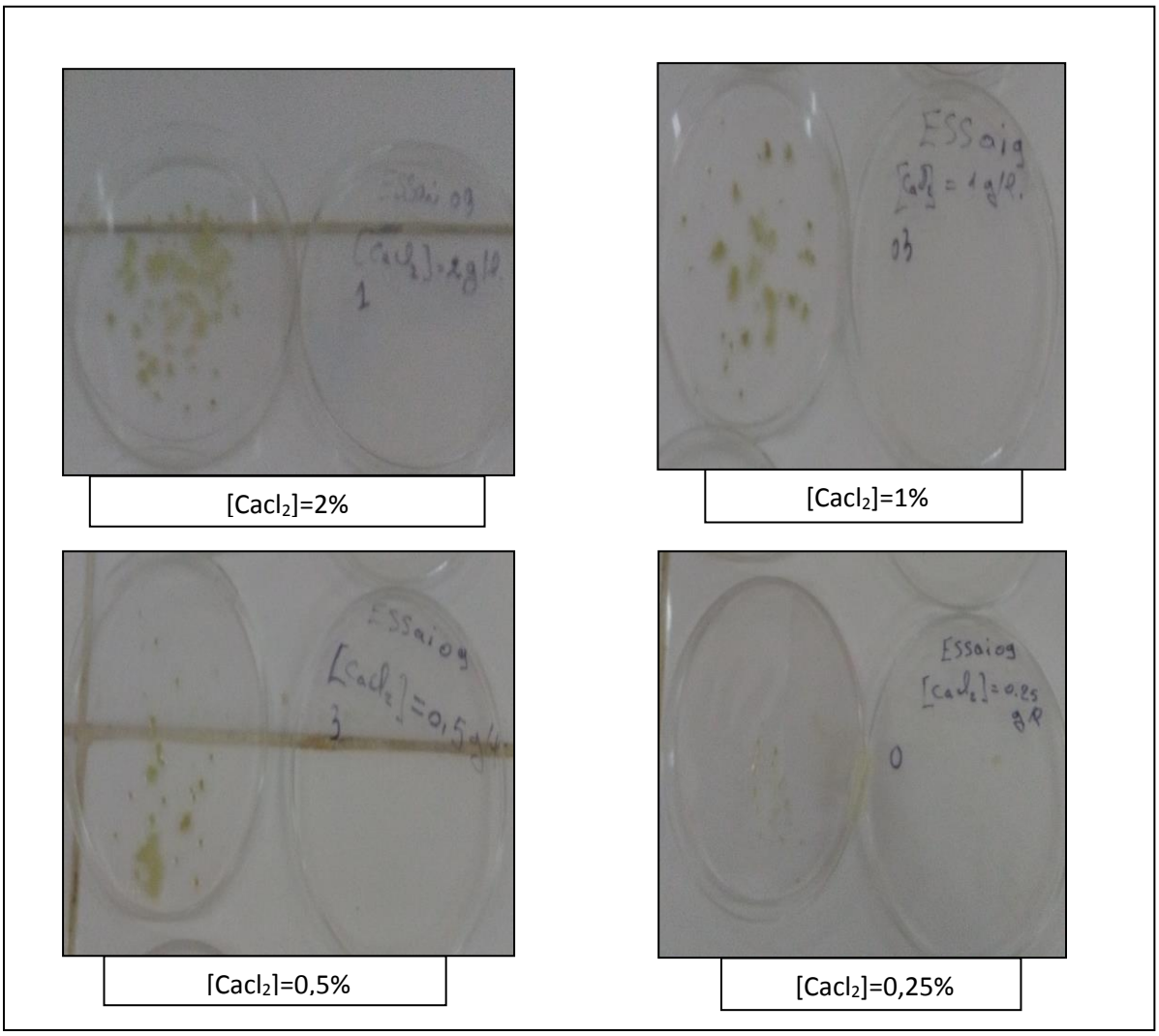


Figure V.12. Particules obtenues après immobilisation de la phase aqueuse alginate-peroxydase d'émulsion E / H (essais N°9) dans les solutions de $CaCl_2$ à différentes concentrations.

De cette figure, Nous remarquons que la distribution des tailles des particules obtenues, n'est pas uniforme pour toutes les concentrations de $CaCl_2$ utilisées. Cela peut être dû aux

Condition opératoire, en particulier la mise en addition dela solution d'émulsion au sein de la solution de chlorure de calcium.

Cependant, la dose de $CaCl_2$, influe d'une manière significative sur l'aspect des particules formées : aux faible concentrations (0.25 % et 0.5%), les microsphères sont de tailles uniformes, tandis que pour les concentrations (1% et 2%), les particules obtenues présentent une distribution de diamètre irrégulière.

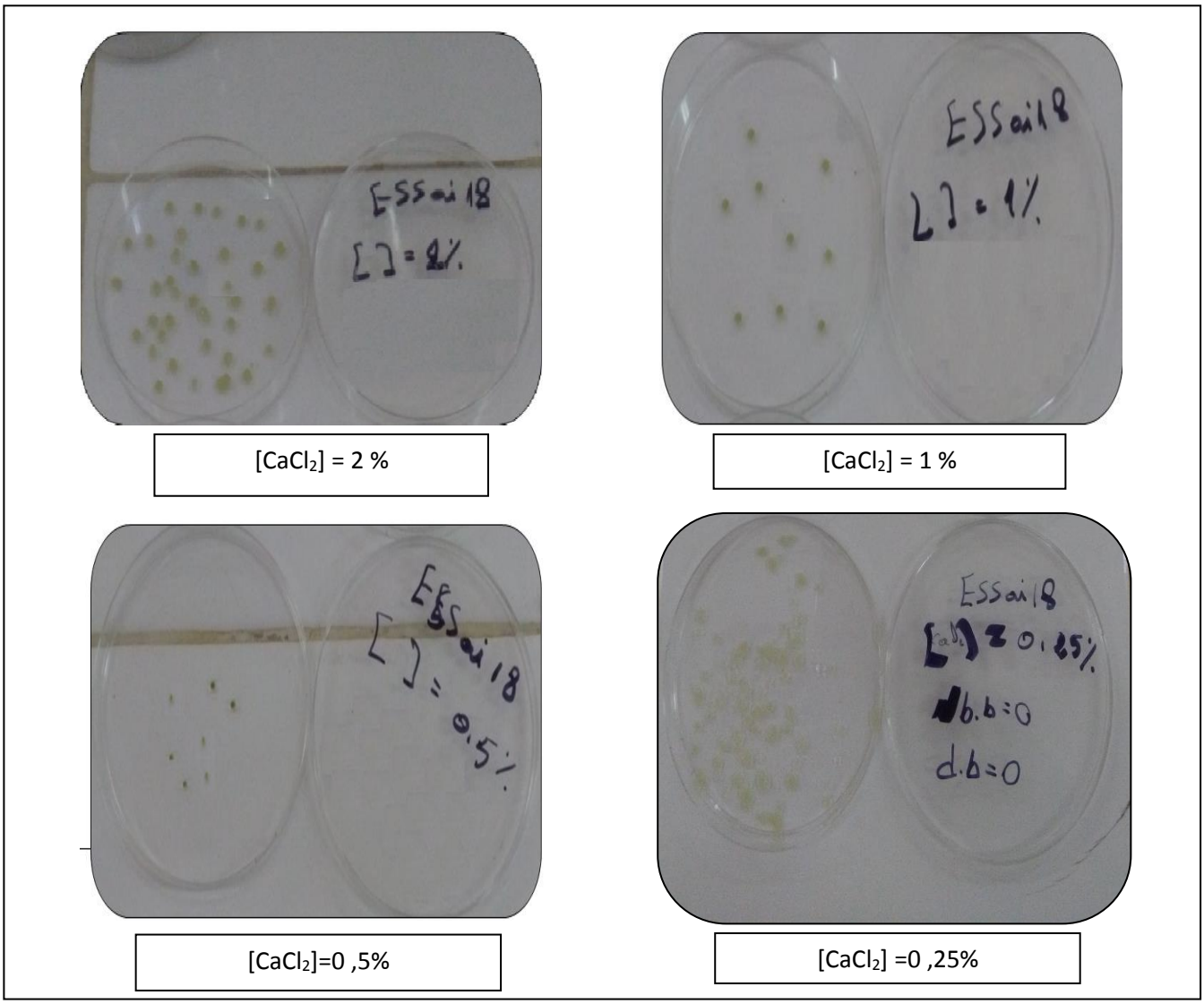


Figure V.13. Particules obtenues après immobilisation de la phase aqueuse de l'émulsion E /H alginate-peroxydase (essais N°18) dans les solutions de $CaCl_2$ à différentes concentrations.

De ces photos, il est clair que la forme et les dimensions des particules dépendent de la concentration de chlorure de calcium. A la concentration 0.25%, il n'y a une immobilisation proprement dite : les billes sont très fragiles, elles se dissolvent facilement. Par ailleurs, à la concentration de 2%, les particules formées sont plus grandes que celles obtenues dans le cas des autres concentrations.

Ainsi, nous avons calculé le diamètre moyen des particules formées. Les valeurs sont données sur le tableau V.1.

Tableau V .1. Diamètre moyen des particules formées des essais 9 et 18.

Essai	***$CaCl_2$ (%)***	***Diamètre moyen (mm)***
9	0,25	1
	0,5	1
	1	1.9
	2	1.8
18	0,25	1.1
	0,5	0.7
	1	1
	2	1.6

V.2.4. Etude de l'effet de la concentration de $CaCl_2$ sur le rendement et l'efficacité d'immobilisation

Parmi les paramètres opérationnels influençant le rendement et l'efficacité de microcapsulation, la concentration de l'agent de réticulation.

Pour montrer l'effet de la concentration de $CaCl_2$, nous avons déterminé en premier lieu les activités enzymatiques et les activités spécifiques des filtrats obtenus à la fin de l'immobilisation. Les résultats sont récapitulés sur le tableau V.2.

En deuxième lieu , et en utilisant les expressions IV.2 et IV.3. Nous avons calculé le rendement et l'efficacité d'immobilisation. Les résultats sont exploités sur les figures V.13 et V.14.

Tableau V.2. Activités enzymatiques et activités spécifiques des filtrats obtenus.

Essaie	***[$CaCl_2$] (mg/l)***	***[protéines] (mg/ml)***	***AE (UI/ml)***	***AS (UI/mg)***
Essai N°9	*0,25*	*0.092*	1,38053	15,07459
	0,5	*0.146*	0,33133	2,27263
	1	*66,35*	0,44177	6,65818
	2	*216 ,82*	0,62124	2,86523
Essaie N°18	*0,25*	*99 ,53*	0,13805	13,8705
	0,5	*126 ,16*	0,16958	2,62625
	1	*143,92*	0,13805	3,06955
	2	*244,85*	0,96637	2,53722

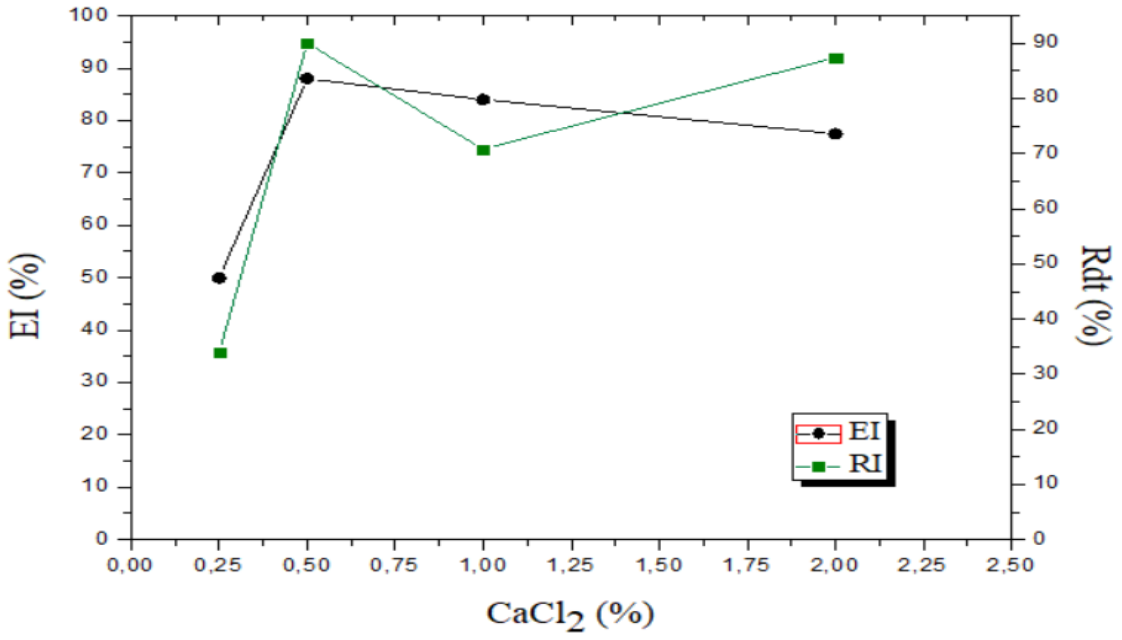


Figure V.14. Effet de la concentration de $CaCl_2$ sur l'efficacité et le rendement d'immobilisation de l'émulsion N°9.

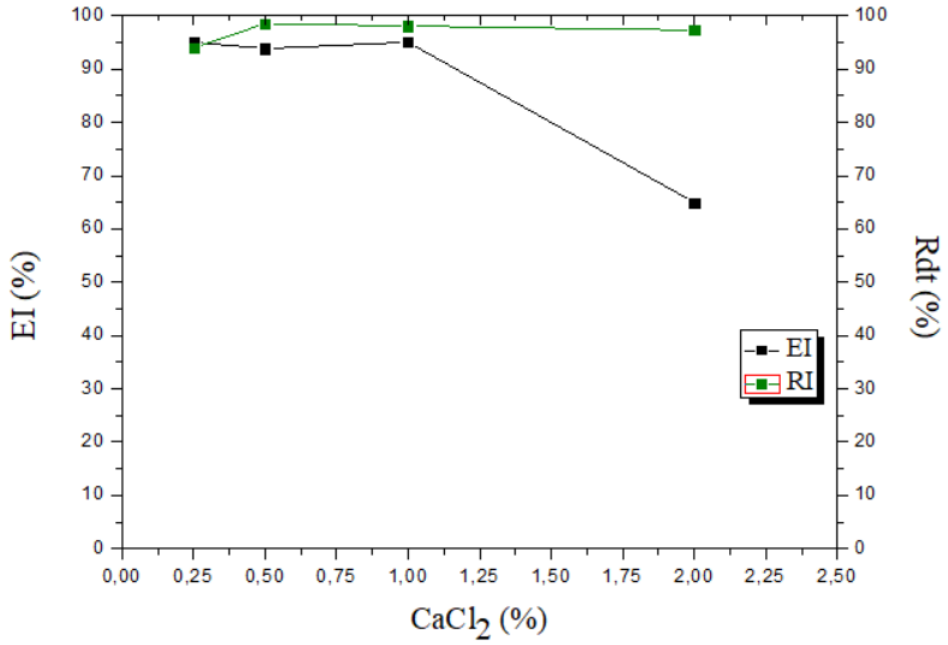


Figure V.15. Effet de la concentration de $CaCl_2$ sur l'efficacité et le rendement d'immobilisation de l'émulsion N°18.

Entre les essais 9 et 18, la concentration d'alginate de sodium est supérieure dans l'essai 18, où nous constatons que l'efficacité d'immobilisation a atteint plus de 98% pour les concentrations en chlorure de calcium de 0.25, 0.5 et 1 % (en masse) puis elle a diminué jusqu'à 65% pour une concentration de 2%.

L'augmentation de la concentration d'alginate peut être conduite à la formation d'une structure dense qui piège les molécules d'enzyme (taille des pores appropriée avec une distribution homogène). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Manjanna et col. qui ont trouvé que l'efficacité d'encapsulation augmente avec l'augmentation de la concentration de l'alginate de sodium [57].

En ce qui concerne l'effet de la concentration de chlorure de calcium, quand sa teneur augmente dans le milieu, l'efficacité d'immobilisation augmente aussi, jusqu'à une concentration de 0.5% pour l'essai N°9 et 1% pour l'essai N°13 (c'est en fonction de la concentration d'alginate de sodium) pour des efficacités d'immobilisation de 95% et de 98 % respectivement. Cela peut être interprété comme suit :

La concentration de l'agent de réticulation comme facteur affectant l'encapsulation par gélification a été étudiée par plusieurs chercheurs, qui ont établi des résultats en accord avec nos résultats. Manjanna et col.ontmontré qu'en augmentant la concentration de chlorure de calcium de 1% à 5%, l'efficacité du piégeage du principe actif augmentait de 83% à 93%

[57]. Néanmoins, une concentration croissante du chlorure de calcium de plus d'une valeur limite a entraîné une diminution graduelle de l'efficacité d'immobilisation pour atteindre moins de 80% (essai N°9).

Il est évident qu'une augmentation de la concentration de chlorure de calcium provoque une réticulation entre les chaînes d'alginate et forme par conséquent une structure cohésive dense, ce qui augmente la capacité des microsphères résultantes à piéger une plus grande quantité de matière active, ce que corroborent également les découvertes de Manjanna et col. et d'autres auteurs [57, 58]. Tandis que, la diminution de la capacité d'immobilisation des microbilles obtenues en augmentant la concentration de chlorure de calcium de plus de 0.5 et de 1% (pour les essais 9 et 18 respectivement) peut être expliquée par le rapprochement prononcé des chaînes d'alginate et par la diminution des dimensions des pores formant les matrices d'alginate.

V.3. Analyse par FTIR

L'alginate de sodium, l'EEPP préalablement séché et les microbilles chargées de peroxydase sont analysées par FTIR. Les spectres correspondant sont illustrés sur les figures V.15, V.16 et V.17 respectivement.

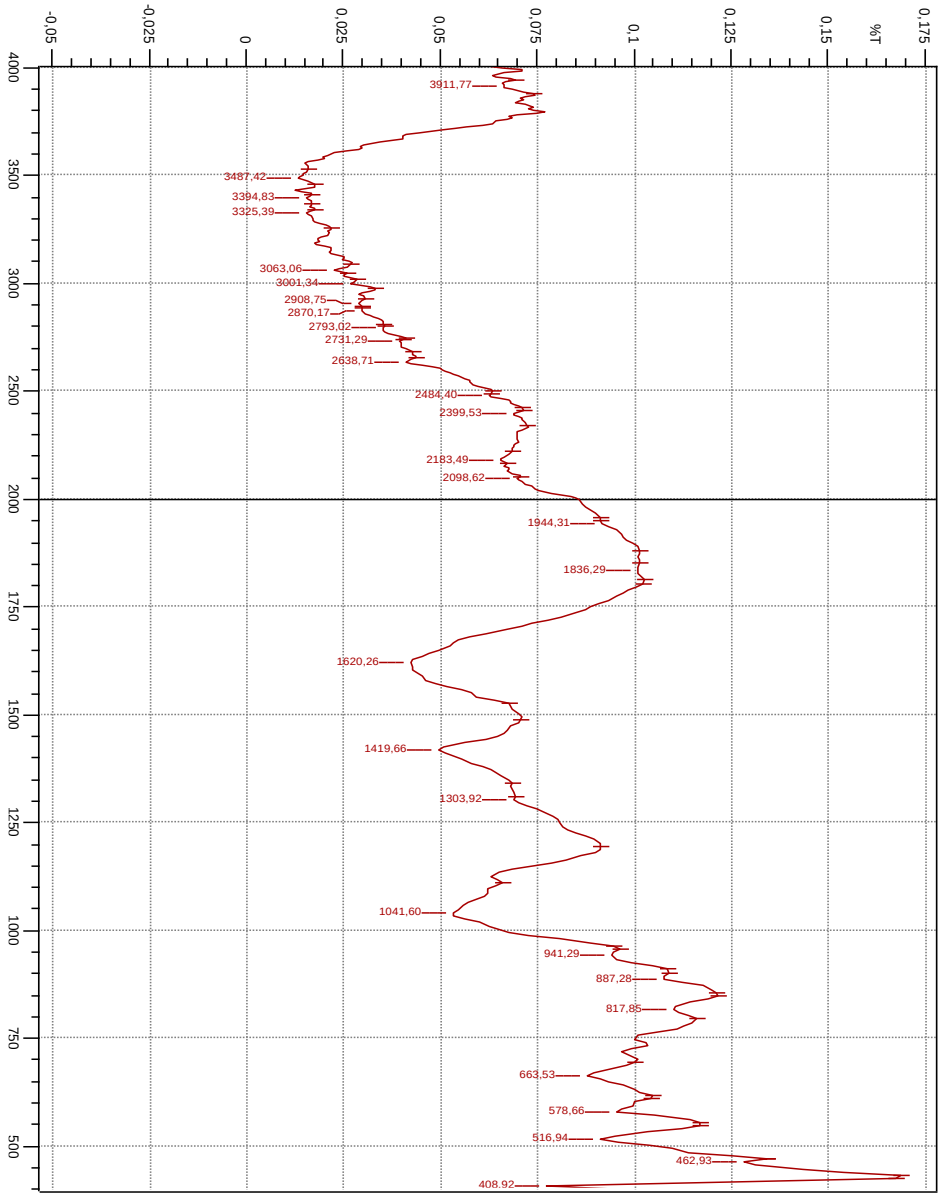


Figure V.16. Spectre FTIR de l'alginate de sodium.

Le spectre de l'alginate de sodium présente les principales bandes d'absorption correspondant aux fréquences suivantes :

3394.83 cm^{-1} : une large bande caractéristique des groupements OH.

1620.26 cm^{-1} : bande caractéristique des groupements carboxylate COO- asymétriques.

1303.92 cm^{-1} : bande caractéristique des groupements carboxylate COO- symétriques.

1041.6 cm^{-1} : faible bande caractéristique des liaisons C-O-C.

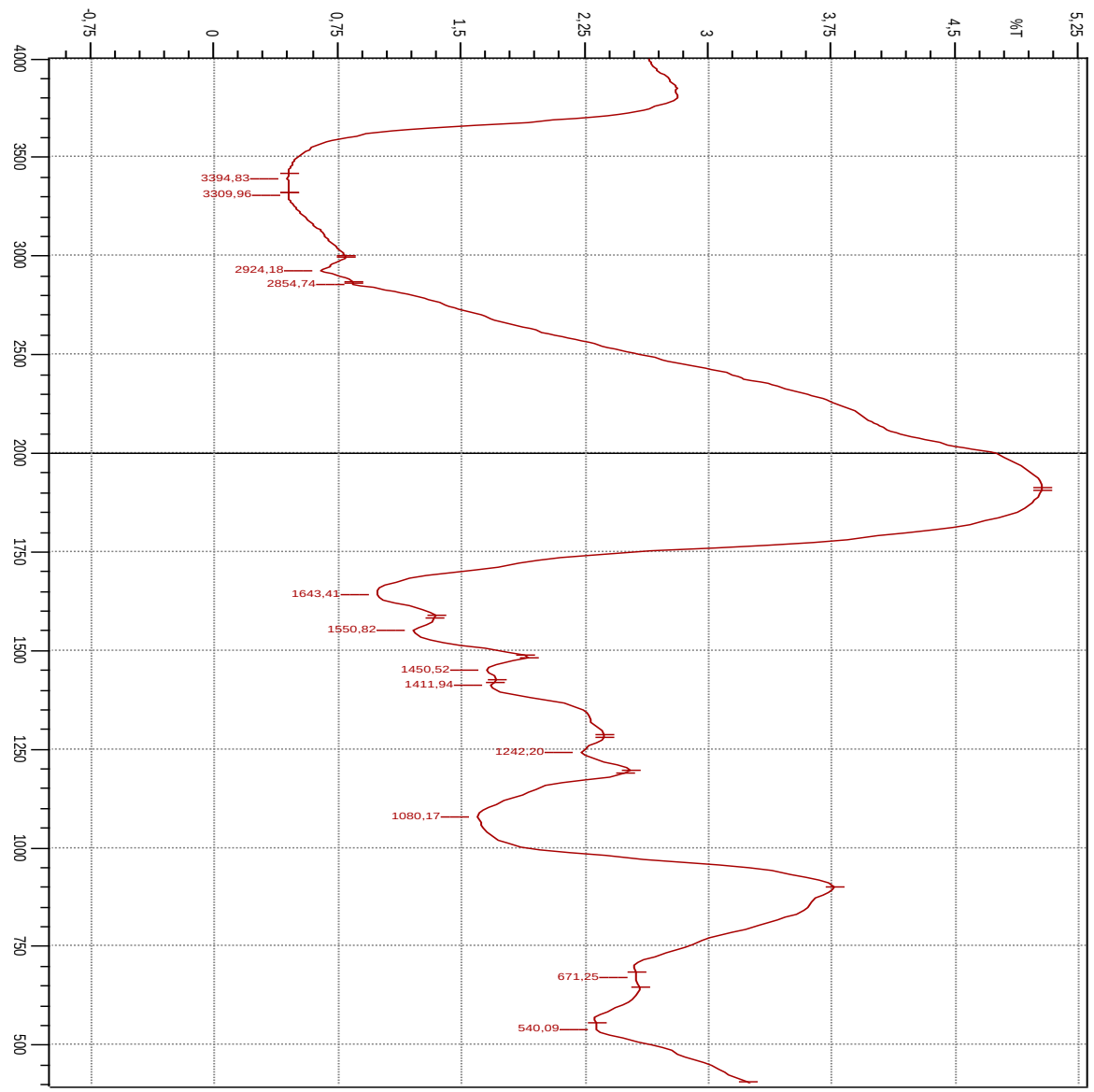


Figure V.17. Spectre FTIR de l'EEPP de peroxydase.

L'analyse du spectre de l'extrait partiellement purifiée de la peroxydase de courgette (après son séchage), permet de sélectionner les principales absorptions comme suit :

3394.83 cm^{-1} : une large bande caractéristique des groupements OH.

3309.96 cm^{-1} : une large bande d'absorption de la liaison N-H

2924.18cm^{-1} et 2854.74 cm^{-1} : faibles bandes d'absorption de C-H des alcanes.

1643.41 cm^{-1} : bande caractéristique des groupements carbonyles des amides.

1450.92 cm^{-1} : faible bande caractéristique de la liaison C-N des amides.

1242.2 cm^{-1} : bande caractéristique des groupements carboxylate C-O-C symétriques.

1080.71 cm^{-1} : forte bande caractéristique des liaisons C-O-Casymetriques.

671.25 cm^{-1} : faible liaison S-H.

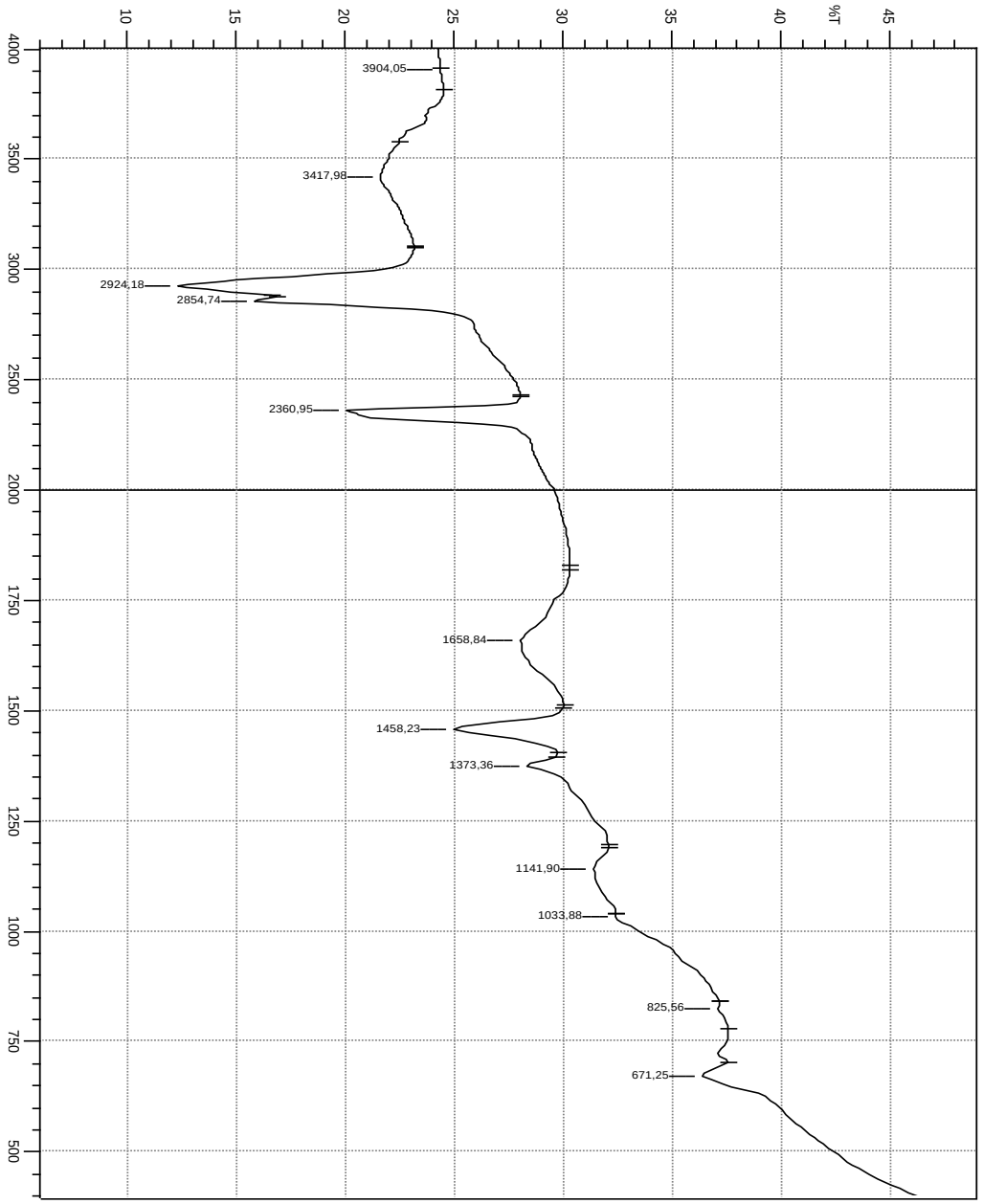


Figure V.18. Spectre FTIR de la microsphère de peroxydase.

Nous constatons de l'analyse de ce spectre, la disparition et le déplacement de quelques bandes d'absorption :

3417.98 cm^{-1} : une large bande caractéristique des groupements OH

2924.18 cm^{-1} et 2854.74 cm^{-1} : fortes bandes d'absorption de C-H des alcanes.

1658.84 cm^{-1} : bande caractéristique des groupements carbonyles des amides.

1458.23 cm^{-1} : forte bande caractéristique de la liaison C-N des amides.

1141.9 cm^{-1} : faible bande caractéristique des groupements carboxylate COO- symétriques.

1033.88 cm^{-1} : forte bande caractéristique des liaisons C-O-C.

671.25 cm^{-1} : faible liaison S-H.

Tous ces résultats confirment l'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate.

V.4. Application à la décoloration du bleu de méthylène

La courbe de balayage et la courbe d'étalonnage du bleu de méthylène est illustrée sur les figures V.19 et V.20.

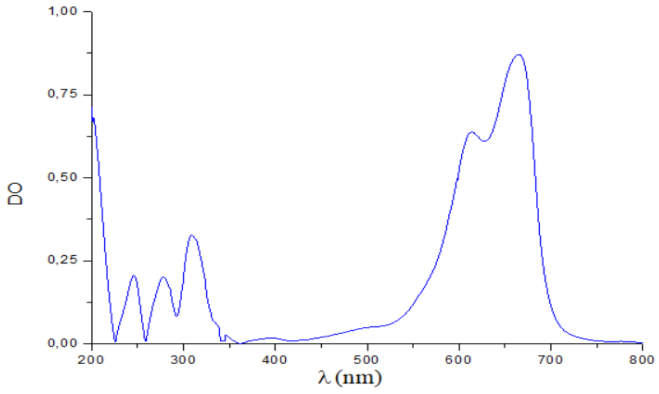


Figure V.19. Courbe de balayage de bleu de méthylène (10mg/l).

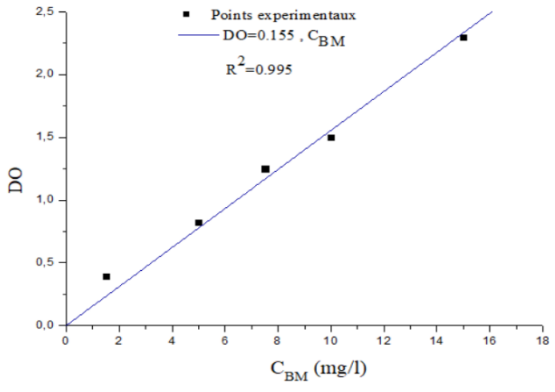


Figure.20. Courbe d'étalonnage de bleu de méthylène .

La mesure des DO des solutions de BM avant et après traitement nous a permis de calculer le rendement de décoloration du BM en utilisant l'expression IV.4. Cette valeur est de 15.9%.

La figure V.21.montre l'aspect des solutions du BM avant et après traitement par la peroxydase de courgette immobilisée.

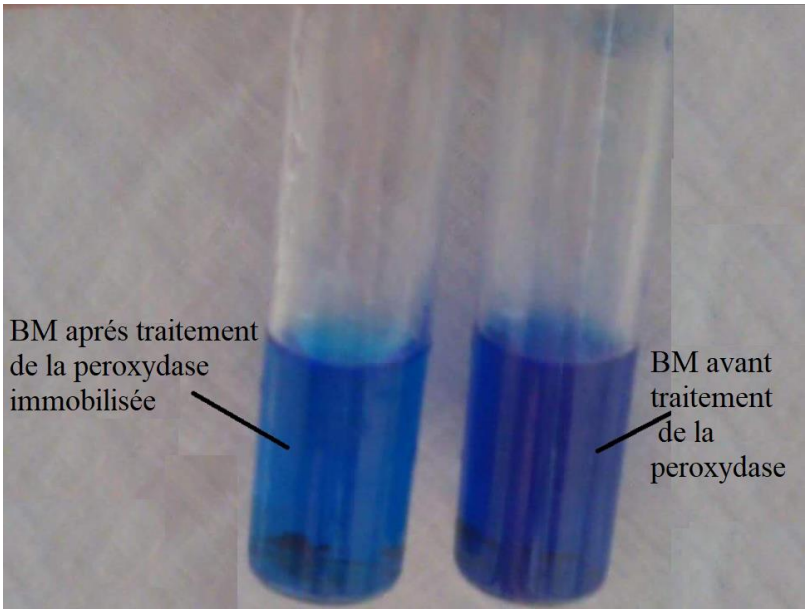


Figure V.21. Photos de la solution du BM à 10mg/l et son surnageant après traitement par microsphère de peroxydase immobilisée .

Conclusion Générale :

L'utilisation des enzymes dans le domaine de traitement des polluants organiques présentent plusieurs inconvénients en particulier sous leur forme soluble. La microencapsulation des enzymes offre une solution technologique ayant pour objectif leurs protection et leurs éventuelle réutilisation

Dans notre travail l'aptitude d'immobiliser la peroxydase de courgette a été étudiée, dont nous avons atteint les objectifs suivants :

- Extraction et purification à l'acétone de peroxydase de courgette. L'extrait obtenu a une activité enzymatique de : 2.76 UI/ml et une activité spécifique de 22.72% ;
- Formulation de 27 émulsions eau (solution enzymatique d'alginate de sodium) dans l'huile de paraffine, dont deux seulement étaient stables après 30j de conservation à 4°C. Ces formulations correspondent aux essais 9 et 18. Les émulsions obtenues contiennent une concentration d'alginate de sodium 1% et 1.5%, une proportion de la phase aqueuse de 35% et une teneur de span80 dans l'huile de paraffine de 3% respectivement.
- Immobilisation des émulsions formulées en utilisant la gélification par le chlorure de calcium. Dans cette étape nous avons optimiser la concentration de l'agent de gélification où un maximum de rendement et d'efficacité d'immobilisation ont atteint des valeurs de 90.036% et 87.99% respectivement pour l'essai N°9 et 94.99% et 98.54% respectivement pour l'essai N°18.
- Etude de l'effet des concentrations d'alginate de sodium et de chlorure de calcium. Ceci a permis de montrer que les propriétés d'encapsulation sont améliorées en augmentant la teneur d'agent de réticulation jusqu'à une valeur critique, au-delà de laquelle une diminution de ces propriétés est constatée.
- Essai de décoloration d'une solution aqueuse du bleu de méthylène à une concentration de 10mg/l par la peroxydase immobilisée dans les microsphères obtenues après optimisation. Le rendement obtenu est de 15.99%

En fin, nous suggérons de compléter l'étude par :

- Optimisation de l'activité enzymatique de la peroxydase destinée à être encapsulée ;
- Préparation des microcapsules à partir des microsphères obtenues en utilisant un biopolymère tel que : le chitosane ;
- Caractérisation des microparticules obtenues par microscope électronique à balayage ;

- Optimisation des concentrations de bleu de méthylène, de peroxyde d'hydrogène, de l'activité enzymatique d'une part. d'autre part, essai de recyclage des microsphères pour d'autres applications.

References bibliographiques:

References bibliographiques

[1] **IUPAC,** Compendium of Chemical Terminology, rassemblé par A D. Mc Naught, A. Wilkinson, The Gold Book, 2ème edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997.

[2] **M. G. Moghaddam, H. Eslahi,D. Omay, E. Z. Rahimabadi**, "Industrial Applications of Enzymes", Review Journal of Chemistry, 4, No. 4, pp. 341–361, (2014).

[3] **M. Matto, Q. Husain**, Calcium alginate–starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter gourd (Momordicacharantia) peroxidase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57(2009)164–170

[4] **I. Eş, J.D. Gonçalves**, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application, Applied Microbiology and Biotechnology, 99(2015)2065–2082

[5] **P. T. da Silva, L. L. M. Fries, C. R. de Menezes, A. T. Holkem, C. L. Schwan, É. F. Wigmann, J. O. Bastos, C. B. da Silva**, "Microencapsulation: concepts, mechanisms, methodsand some applications in food technology", Ciência Rural, Santa Maria, v.44, n.7, p.1304-1311, jul, 2014.

[6] **Weilj .H**. Biochimie générale : 10ed, Dunod paris ,2011.

[7] **B. Augère** « les enzymes biocatalyseur protéique », Edition Ellipses Marketing S.A, (2001).

[8] **LStryer,** "La Biochimie" Flammarion Médecine Sciences, Paris, (1985).

[9] **LStryer**, "La Biochimie" Flammarion Médecine Sciences, Paris, (1985)..

[10] **S. Fabiano** « application àla réalisationde biocapteurs ampérométriques pour le dosage Du glucose et des composés phénoliques » Thèse du magistère , université claude bernard , France (2002) .

[11] **RH. Garrett, CM. Grisham** "Biochimie", DE Boeck Université s.a. 2000 .

[12] **G. Battistuzzi, M. Bellei, C.A. Bortolotti, M. Sola**, Redox properties of heme peroxidases, Archives of Biochemistry and Biophysics, 500(1) (2010) 21–36

[13] **Qayyum Husain**. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. Rev Environ SciBiotechnol

(2010) 9:117–140.

[14] **Eduardo Torres, IsmaelBustos-Jaimes, Sylvie Le Borgne.** "Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants ». Applied Catalysis B: Environmental 46 (2003) 1–15.

[15] **Torres,E .Bustos-Jaimes, I** . :potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants ,Applied Catalysis B: environmental ,46,1-15(2003).

[16] **Regalado ,C.Garcia –Almendarez ,A.M. et Duarte-Vazquez ,E.B** :biotechnological application of peroxydase, phytochemistry Review ,115 ;1177-1186(2009).

[17] **V.A. Cooper, J.A. Nicell,** Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. Water Research, 30 (4)(1996)954-964.

[18] **Mohsin ,H .Khalil-er-Rehman :**potential application of peroxydase, food chemistry, 115;1177-1188(2009).

[19] **Hartmeier W,** Immobilized biocatalysts.Springer, Berlin. (1988).

[20] **Khan A, Alzohairy A,** recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. Res J Biol Sci 5(8):565–575. (2010).

[21] **Tosa T, Mori T, Fuse N, Chibata I**, Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of waterinsoluble aminoacylase. Enzymologia 31:214–224. (1966).

[22] **M G. Roig, J F. Bello, F G. Velasco, C D. De Celis, J M. Cachaza,** « Biotechnology and AppliedBiology Section : Applications of Immobilized Enzymes », Biochemical Education 15(4) 1987.

[23] **Pabai F.** Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application forinter esterification of better fat. Department of food science & agricultural chemistry. McGill University,Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179, **1997**.

[24] **Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., Chovelon J.M.,** « Assenssment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors », Analytica Chimica Acta, 459 :33{41. 2002.

[25] **T T. Nguyen Boisse**, « MicrobiocapteursConductimétriques Utilisant Des Oxydoreductases de La Conception A L'application A L'environnement Et L'agroalimentaire », Thèse De Doctorat, Universite Claude Bernard Lyon, 2013.

[26] **J. Woodward,** Immobilised cells and enzymes : a pratical approach,IRL Press, Oxford, 1985.

[27] **S. E. Godtfredsen**, Microbial Lipases, Microbial Enzymes and Biotechnology, edited byW. M. Fogarty and E. T. Kelly, Elsevier Applied Sciences, Amsterdam, p. 255,1990

[28] **S. Cosnier, C. Gondran, J. C. Watelet, W. De Giovani, R. P. M. Furriel**, and **F. A. Leone**, *Anal. Chem.* 70, 3952 **1998**.

[29] **N Tandjaoui** , "contribution à l'étude de l'élimination des colorants textiles par voie Enzymayique " ,mimoire de Master ,universitéde médéa , 2011 .

[30] **L. M. Moretto, P. Ugo, M. Zanata, P. Guerriero,** and **C. R. Martin,** *Anal. Chem.* 70, 2163, **1998**.

[31] **Godtfredsen SE**, Microbial lipases, in Microbial enzymes and biotechnology, edited by WM Fogarty & ET Kelly (Elsevier Applied Sciences, Amsterdam), 255-273, 1990.

[32] **Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E. & Miller R**. Lipases at interfaces: A review Advances incolloid and int erface science, **2008**.

[33] **P. K. Ghosh, R. K. Saxena, R. Gupta, R. P. Yadav**, and **S. Davidson**, *Sci. Prog.* 79, 119, **1996**.

[34] **Dzyadevych S.V., Arkhipova V.N., El'skaya A.V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N**., « Conductometricenzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis », Current Topics in Analytical Chemistry, 2:179{186. **2001**.

[35] **R. Aravindan, P. Anbumathi, and T. Viruthagiri**, *Indian Journal of Biotechnology* 6, 141, **2007**.

[36] **Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. C**. Production, purification, characterization, application of lipases. Biotechnology advances. 19: 627-662, **2001**.

[37] **Davranov K. & Khalameiser V. B**. Current state of the study of microbial lipases. Chemistry of natural compounds. 33: 113-126, **1997**.

[38] **Bornsheur U. T., Bessler C., Srinivas R. & Krishna S. H**. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in biotechnology. 20: 433-437, **2002**.

[39] **P. K. Ghosh, R. K. Saxena, R. Gupta, R. P. Yadav, and S**. Davidson, *Sci. Prog.* 79, 119, **1996**.

[40] **F Dridi**, « Développement D'un Nouveau Biocapteur EnzymatiqueUltrasensible Pour La Détection Conductimétrique DeL'ochratoxineA Dans L'huile D'olive », Thèse De Doctorat, Université De Carthage Et De l'Université Claude Bernard Lyon1, **2016.**

[41] **R Aravindan, P Anbumathi and T Viruthagiri**, Lipase applications in food industry, Indian Journal of Biotechnology. Vol 6,pp 141-158, April 2007.

[42] **F. Kuralay, H. Özyörök, A. Yildiz,** Sensors and Actuators B 109, 194, 2005.

[43] **E.Benesova , B kralova ,**Affinity Interaction as a Tool for Protein Immobilization , Affinity chromatography . Edition Dr . Sameh Magdeldin , in tech p 29-46 , 2012

[44] **Thies, C**., Microencapsulation. Encyclopiedia of Polymer Science Engineering, 1987.9: p. 724-745.

[45] **W. Hachemaoui, L. Amirouche**, « Microencapsulation d'un principe actif (Amlodipine) dans lamatrice Chitosane/HPMC réticulé par le TPP par le procédéde double émulsion H/E/H », mémoire de Master, Université A. Mira – Bejaia, 2017.

[46] **E. M.S. Latour**, "Synthèse de microcapsules biosourcées pour les applications cosméto-textiles », Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard, Lyon, 2012.

[47] **Atmane MADENE**, « Etude Des Transferts d'Arômes Encapsulés Dans Une Matrice Alimentaire Type Génoise », Institut National Polytechnique De Lorraine, 2006.

[48] **Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H, and Kawashima, Y,** pH-sensitive microsphere delivery increases oral bioavailability of calcitonin. Journal of Controlled Release, 2004. 98(1): p. 1-9.

[49] **H.E. Peiyuan**, « Conception Et Réalisation D'un Système Microfluidique Pour La Production De Gouttes Calibrées Et Leur Encapsulation », Thèse De Doctorat, Université De Technologie De Compiègne, 2009.

[50] **T. S. L. N. Tchaida Martine**, « Essais De Mises Au Point De Formulation De Crèmes Et Laits Corporels A Base Du Beurre De Karite Du Burkina Faso », Université De Ouagadougou, 2004.

[51] **B.Lupo, A. Maestro, M. Porras, J. M. Gutiérrez, C. González**, "Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation toencapsulate Cocoa

polyphenols », Food Hydrocolloids, 2013.

[52] **J.A.Piornos, C. Burgos-Díaz, E. Morales, M. Rubilar, F.Acevedo,** « Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation", Food Hydrocolloids, 63, 139-148, 2017.

[53] **Gupta K.C, Ravi Kumar M.N.V,** 2001. Ph dependent hydrolysis and drug release behavior of chitosan/poly(ethylene glycol) polymer network microspheres, J. Mater. Sci. Mater. Med, 12, 753–759.

[54] **Park, S.J., Shin, Y.S., and Lee, J.R**., Preparation and characterization of microcapsules containing lemon oil. Journal of Colloid and Interface Science, 2001.241(2): p. 502-508.

[55] Obidike, I.C. and Emeje, M.O., Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of Entada africana leaf extract. Journal of Ethnopharmacology, 2011. 137(1): p. 553-561.

[56] **Sanchez, P, Sanchez-Fernandez, M.V, Romero, A, Rodriguez, J.F.,** and **Sanchez Silva, L,** Development of thereto-regulating textiles using paraffin wax microcapsules. Thermochimica Acta, 2010. 498(1-2): p. 16-21.

[57] **Monllor, P., Bonet, M.A., and Cases, F.,** Characterization of the behaviour of flavor microcapsules in cotton fabrics. European Polymer Journal, 2007. 43(6): p. 2481-2490.

[58] **Richard, J., Benoit, J.P.,** Microencapsulation. Techniques de l'Ingénieur Traité Géniedes procédés, 2000: p. 1-20.

[59] **E. Vincent**, 9 février 1987Les Alginates Et Leurs Applications En Pharmacie Et En Ingénierie », Universite Henri Poincare - Nancy 1, 2010

[60] https://fr.wikipedia.org/wiki/Ester_de_sorbitane, consulté le22/05/2018

[61] **The United States Pharmacopeia** : USP 24: The National Formulary : NF 19, Edition : United States Pharmacopeial Convention, 1999.

[62] **M. Hamon, F. Pellerin, M. Guernet, G. Mahuzeir,** « Chimie analytique, méthodes spectrales et analyse organique », Edition Masson, 1990.

[63] **S. Simsek, A. Yemenicioglu**, Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenol oxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms, Process Biochemistry, 42(6) (2007)943–950.

[64] **J.A. Nicell, H. Wright**, A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide, Enzyme and Microbial Technology, 21(4)(1997), 302–310.

[65] **M.M. Bradford,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72(1-2)(1976) 248–254.

[66] **Jacques et philipe Alexis,** Pratique industrielle des plans d'expériences, Paru chez AFNOR en 1999.

Annexes :

ANNEX

Tableau A.1. Tableau de résultat de la DO en déférente concentration de H_2O_2

$[H_2O_2]$ mol /L	2.10^{-5}	5.10^{-5}	8.10^{-5}	11.10^{-5}	14.10^{-5}	17.10^{-5}	2.10^{-4}
V_{H2O2} injecté ml /pour $V_{totale=20ml}$	0,008	0,02	0,032	0,044	0,056	0,068	0 ,08
DO	0,0319	0,0778	0,1054	0,144	0,1723	0,2135	0,2356

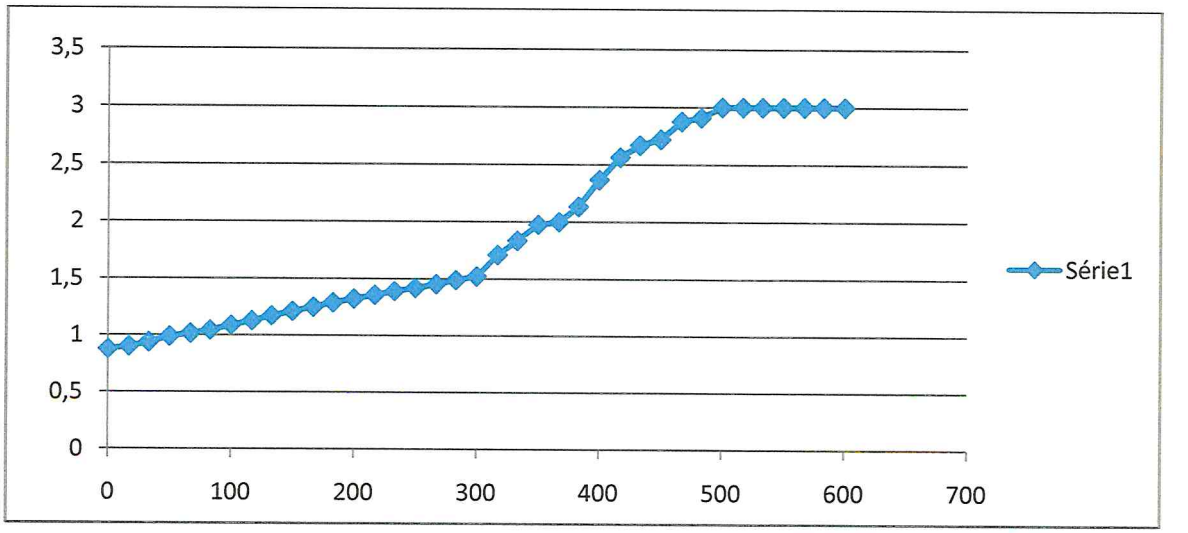
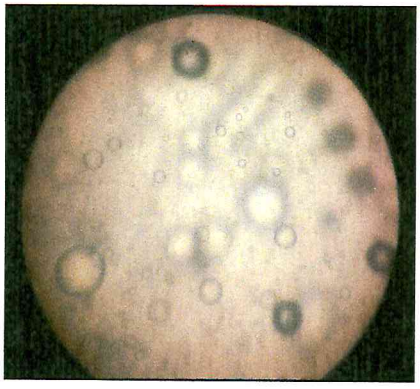
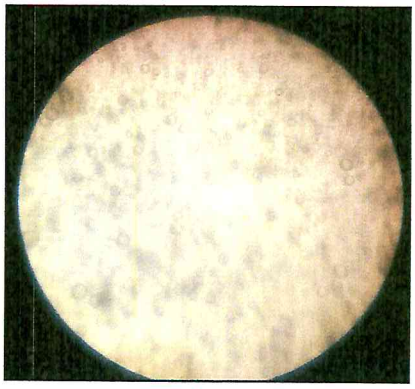


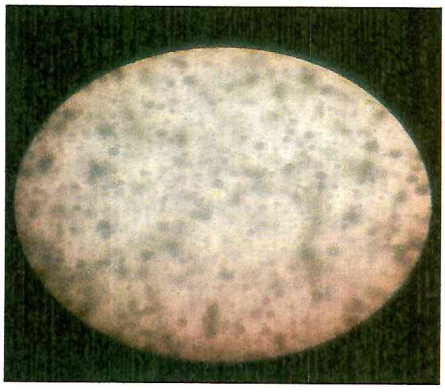
Figure A. 2 Courbe de DO en fonction de temps .



ESSAI N°1



ESSAI N°2



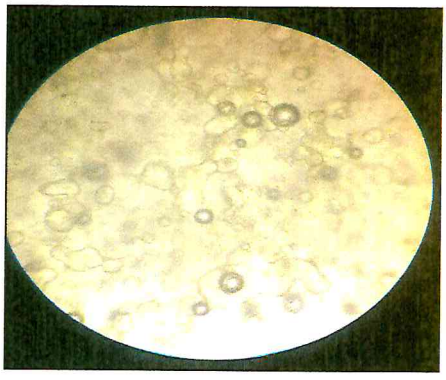
ESSAI N°3



ESSAI N°4



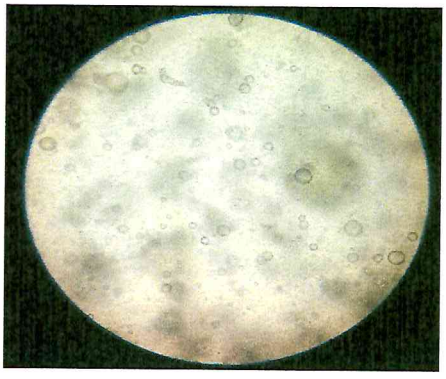
ESSAI N°4



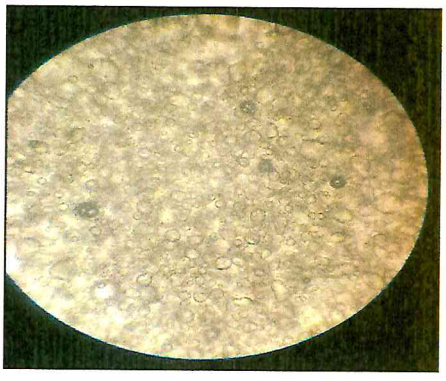
ESSAI N°5



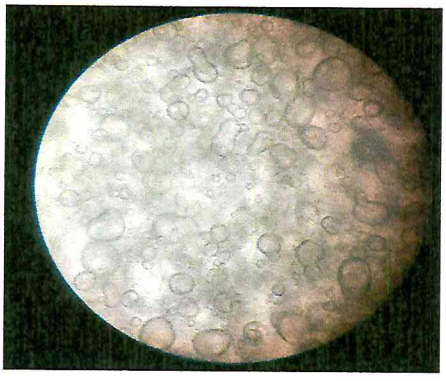
ESSAI N°5



ESSAI N°6



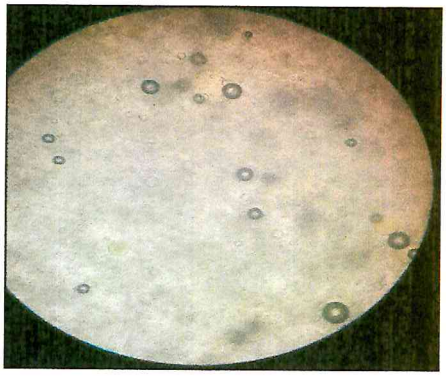
ESSAI N°7



ESSAI N°7



ESSAI N°10



ESSAI N°11



ESSAI N°16



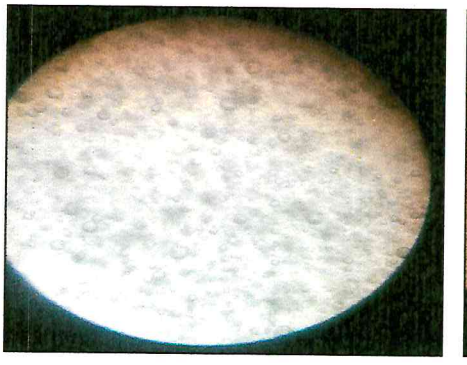
ESSAI N°17



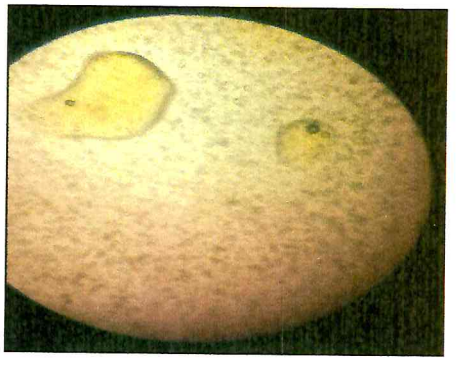
ESSAI N°17



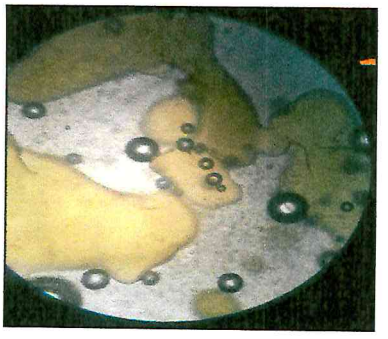
ESSAI N°19



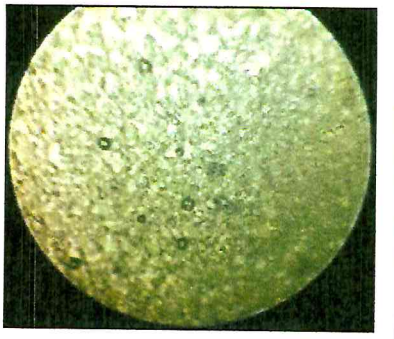
ESSAI N°20



ESSAI N°20



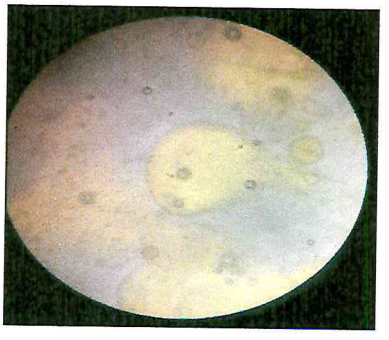
ESSAI N°21



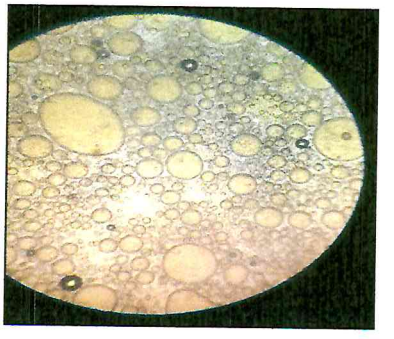
ESSAI N°23



ESSAI N°24



ESSAI N°25



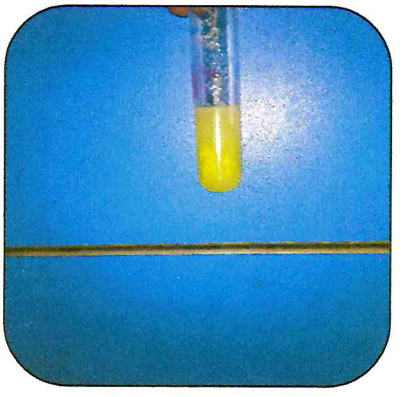
ESSAI N°26



ESSAI N°27



ESSAIE 9



ESSAIE 13



ESSAIE 18