REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie
Département du Génie des Procédés et l'environnement

Mémoire de Fin d'Études pour l'obtention du diplôme de Master

En : Génie des Procédés
Option : Génie des Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème :

Étude de l'activité catalytique de la peroxydase dans un milieu organique

Proposé et dirigé par :

M^{r}.ABOU SEOUD MAHMOUD

Co-promotrice :
M^{elle} AHMEDI Afaf.

Etudié par :

KIRDI Rachida

Promotion 2011 / 2012

Dédicaces

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur à ceux qu'on aime :

À ma mère

À mon adorable mère qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur.

Merci pour tes prières adressées à l'eternel. Merci pour la profonde affection et les efforts déployés pour les bases de mon éducation.

Enfin ! Merci tout simplement d'être . . . ma mère.

À la lumière de ma vie, À toi mon père

À la source de générosité, de bonne heure celui qui à consacré sa vie pour que je réussie dans tout ce que j'entreprends. À qui je dois tout ce que je suis aujourd'hui.

Merci mille fois mon père.

*À mon unique sœur : « **Zineb**», à qu'elle je souhaite une très belle vie.*

*À mes très chers frères : « **Djilali**», « **Bilale** ».*

*À ma très chère amie et ma formidable sœur : « **soumia**», son amitié, sa loyauté, à qui je souhaite une très belle vie.*

*À ma ***clique***, avec qui j'ai passé de très bons moments et qui je les n'oublierai jamais.*

*À mes meilleures amies : « **Rofaida** », « **Toba**».*

*À toute la promotion de génie des procédés pharmaceutiques **2011 -2012.***

À ceux qui ne sont pas dans mon mémoire mais ils sont toujours dans ma mémoire.

Remerciements

En premier lieu, j'exprime mes profonds remerciements à "Allah Tout-Puissant" qui ma a soutenu le long de notre travail.
Ensuite je tiens à remercier mes chers parents pour leur patience et encouragement à finir un chemin commencé il y'a si longtemps.

La préparation de ce mémoire a été rendue possible grâce au Dr. Abou SEOUD MAHMOUD, Mon encadreur, qui ma beaucoup aidé par ses conseils et ses critiques.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Mr. BENKORTBI, chef de département et les membres de jury qui ont bien voulu juger mon travail.

J'adresse mon chaleureu remerciements à tous les enseignants de l'université Dr. Yahia Fares de Médéa et à tous les enseignants au long de ma vie scolaire.

Ce serait manquer à un devoir très important de ne pas remercier l'ensemble des membres du Hall Technologique et particulièrement, Mr.Alouaoui Rédha, Mr.Atsamnia pour leur disponibilité et leur aide.
Un spécial remerciement est adressé à Mériem Kraouache , Amina, Nassima, Leila, pour leur soutien.

Enfin, un grand merci pour mes collègues sans exception et à tous ceux qui ont participé au bon déroulement de ce travail.

Objectif

Notre objectif dans cette partie consiste à étudier l'optimisation de l'agrégation de la peroxydase de Navet "BRASSICA CAMPESTER RAPIFERA" par un polymère industriel. Nous avons choisi pour ce but, un agent d'agrégation qui est le glutaraldehyde.

Cette étude passe dans un premier temps par la mis en évidence d'une étude comparative entre la purification partielle de la peroxydase par l'acétone et la purification sur gel Sephadex.

La deuxième partie, consiste a optimisé les différentes paramètres: concentration de l'enzyme, concentration de glutaraldehyde, et vitesse d'agitation, ainsi que le temps de contacte sur la formation des agrégats actif.

Enfin, on complète cette étude par le teste d'activité des agrégats formés.

تلخيص:

في هذا العمل اهتمامنا بدراسة سلوك التحفيز لإنزيم البيروكسيد المستخلصة من اللفت في وسط عضوي.

لهذا أولا ثم استخلاص الإنزيم وتقنينه للحصول على مستخلص مع نشاط معين عالي له من الاستقرار يسمح لنا بأداء التشابك أو التجمعالخطوة الثانية : تمثلت في عوامل التشابك المثالية باستخدام عامل التشابك هو غلوتار الزهيد.وتضح آن الشرط المثلى لتحقيق أقصى قدر من التشابك وفقا لاعالى نشاط إنزيم : (1ml=0407iu/ml) ونركز عامل التشابك غلوتار الزهيد 0.8%v/v ;سرعة التفاعل 3ساعات.

دراسة القدرة التحفيزية للبيروكسيداز المشبكة في وسط عضوي , أجريت باستخدام تفاعل نموذجي : تفكيك الفينول في

مذيبين عضويين الاسيتون و الهيبتان, مقارنة مع التي أجريت مع الإنزيم الحرة في وسط مائي .

أثبتت الدراسة الحركية لإنزيم الحرة والمثبتة قدر ب 15د و50د ومحصول ومعدل تفكك قدر ب51% و16.9ميكرومول/ل.د و26.5%و9.4 ميكرومول/ل.د للاستون و16.9%و11.2 ميكرومول/ل.د للهيبتان

وأخيرا ,الدراسة الطبقية للسائل العلوي بواسطة الأشعة فوق البنفسجية أظهرت أن تفكك جزئي فينول كان فعالا لنوعين

(الحرة و متشابكة)

المفاتيح:

البيروكسيد.تنقية.تفكك.تجمع.ركيزة.

Résumé :

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à étudier le comportement catalytique de l'enzyme peroxydase extraite à partir de Navet "BRASSICA CAMPESTER RAPIFERA" en milieu organique. Pour cela, en premier lieu, l'enzyme a été extraite et purifiée afin d'obtenir un extrait à activité spécifique élevée ayant une certaine stabilité permettant de procéder à la réticulation qui le conditionnement adopté pour la mise en œuvre en milieu organique. La deuxième étape consistait à optimiser les conditions d'agrégation en utilisant l'agent de réticulation le glutaraldehyde. Il s'est avéré que les conditions optimales permettant d'atteindre le maximum d'agrégation ayant l'activité la plus élevée étaient : une concentration d'enzyme (1 ml= 0.407 UI/ml), la concentration de l'agent d'agrégation : glutaraldehyde 0.8 %(v/v), une vitesse d'agitation de 200 rpm, et un temps de contacte est 3 h.

L'étude du pouvoir catalytique de la peroxydase réticulée en milieu organique a été menée en prenant comme réaction modèle, la dégradation du phénol dans deux solvants organiques, l'acétone et l'heptane, en comparaison avec celle menée avec l'enzyme non réticulécen milieu aqueux. L'étude cinétique de l'enzyme libre et immobilisé montre un temps de contact de 15 min et de 50 min, et de rendement et une vitesse de dégradation de 51%,16.9 µmol/L.min, et (26.5%, 9.4µmol/L pour l'acétone et 26.8%, 11.2µmol/L.min pour l'heptane) respectivement.

Enfin, l'étude spectrale par spectrophotométrie UV-visible montre que la dégradation de la molécule de phénol est efficace par les deux types d'enzymes (libre et réticulée)

Mots clés : peroxydase, purification, dégradation, agrégation, substrat

Abstract:

In this work we are interested to achieve a double objective; the first one is to purify the peroxidase from turnip "BRASSICA CAMPESTER RAPIFERA" Whose specific activity is five times higher than purified by acetone. The second is to optimize the conditions of aggregation of the peroxidase purified by acetone, and ends with a comparison test between the activity of aggregates formed, in an organic medium with the enzyme purified in acetone with an aqueous medium. We found the following results:

- For optimum aggregation conditions: The enzyme concentration is (1 ml = 0.407 IU / ml) , the concentration of aggregating agent: glutaraldehyde is
  0.8 ml
  The stirring speed is 200 rpm, and the contact time is 3 h.
- The kinetic study of free and immobilized enzyme shows a contact time of 15 min and 50 min, and yield and rate of degradation of 51%, 16.9 µmol / L.min, and (26.5%, 9.4 mol / L for acetone and 26.8%, 11.2µmol/L.min for heptanes), respectively
- Study of spectral supernatant by UV-visible spectrophotometry shows a degradation of the phenol molecule which is effective for both type of enzymes (free and aggregated)

Keywords: peroxidase, purification, degradation, aggregation, substrate

Liste des figures

Chapitre I :LES ENZYMES

Figure. I.1. Le site actif…… **4**
Figure .I.2. La forme induite…… **5**
Figure.I.3. la forme clé-serrure…….. **5**
Figure.I.4. Un catalyseur diminue l'énergie d'activation d'une réaction chimique…….. **6**
Figure.I.5. Evolution de la concentration du substrat (s), produit(p), complexe(ES), et de l'enzyme en fonction du temps,……..... **7**
Figure.I.6. Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne…….. **9**
Figure.I.7.évolution de concentration de produit en fonction du temps…….. **10**
Figure.I.8. Influence de la concentration enzymatique sur la vitesse initiale …… **10**
Figure.I.9. Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale…….. **11**
Figure.I.10.représentation graphique de linéarisation de Michaelis-Menten,A ;selon lineweaver-Burk,B ;selon Eadie-Hosftee……. **12**
Figure.I.11. Effets de température(A) et de PH(B), sur l'activité enzymatique …… **14**
Figure.I.12. Schéma montrant le mécanisme séquentiel ordonné…… **17**
Figure I.13. Schéma montrant le mécanisme séquentiel aléatoire…… **17**
Figure.I.14. Schéma montrant le mécanisme en ping-pong……. **18**

Chapitre II : Les enzymes en milieu organique

Figure. II.1. la concentration de substrat au voisinage d'enzyme…….. **20**
Figure. II.2. (A) le site actif dans un milieu aqueux, (B) le site actif dans un milieu organique…….. **21**
Figure. II.3. Réticulation de l'enzyme avec la glutaraldehyde…… **25**
Figure. II. 4 : Réticulation de l'enzyme avec les Carbohydrate..... **26**
Figure. II.5. Réticulation de l'enzyme avec Thiol…….. **27**
Figure. II. 6 .synthèse des peptides et des peptidomimetiques…… **31**
Figure. II. 7. résolution des mélanges racémiques…….. **32**
Figure. II. 8. La sélectivité dans la transformation…….. **33**

Chapitre III :La peroxydase

Figure.III.1. La structure de l'hémine…….. **35**
Figure.III.2.Structure de la peroxydase de raifort…….. **35**
Figure.III.3. Site actif et les acides aminés impliqués dans La catalyse…….. **37**
Figure.III.4. Le Cycle catalytique de peroxydase…….. **38**

Chapitre IV :Matériels et Méthodes

Figure.IV.1 : Protocole d'extraction de la peroxydase…… **44**
Figure.IV.2 : Dispositif et Protocole de purification par précipitation à l'acétone……. **45**
Figure.IV.3 : Dispositif et Protocole de purification sur gel Sephadex…….. **47**
Figure.IV.4. Réaction entre le phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase…… **48**
Figure. IV.5. Dispositif de L'agrégation dans la glutaraldehyde…… **50**

Chapitre V : Résultat et discussion

Figure.V.1 : Profil d'élutions de la peroxydase de navet purifié sur Une résine Sephadex G-100…… **53**

Figure.V.2 : Courbe d'étalonnage de protéine SAB…… **54**

Figure.V.3 : Activité enzymatique des trois extraits……... **55**

Figure.V.4: Aspect des trois extrait ((A)= l'extrait brut, (B)=l'extrait pareillement purifié par acétone, (c) =l'extrait purifié sur Gel)…… **57**

Figure .V.5. L'effet de l'activité initiale d'enzyme sur l'agrégation……... **58**

Figure. v.6. L'effet de la concentration de la glutaraldehyde sur l'agrégation d'enzyme.. **59**

Figure. V.7. L'effet du temps de contact sur l'agrégation d'enzyme……. **60**

Figure. V.8. L'effet de la vitesse d'agitation sur l'agrégation d'enzyme…… **61**

Figure. V.9. Cinétique de dégradation de phénol pour l'enzyme libre…… **63**

Figure. V.10. Cinétique de dégradation de phénol pour l'enzyme réticulé…… **64**

Figure. V.11. Effet du $[phénol]_0$ sur la vitesse et le rendement de dégradation avec la peroxydase (enzyme libre)…… **65**

Figure. V.12. Représentation de Lineweaver- Burk enzyme libre ($1/V_0$=f (1/ $[phénol]_0$). **67**

Figure. V.13. Effet du $[phénol]_0$ sur la vitesse et le rendement de dégradation avec la peroxydase (enzyme réticulé)……... **68**

Figure. V.14. Représentation de Lineweaver- Burk enzyme immobilisé ($1/V_0$=f (1/ $[phénol]_0$) pour acétone…… **68**

Figure. V.15. Représentation de Lineweaver- Burk enzyme immobilisé ($1/V_0$=f (1/ $[phénol]_0$) pour l'héptane…….. **69**

Figure. V.16.Spectres d'absorption dans le domaine visible de phénol et se liquide surnageant obtenue après le traitement par l'enzyme agrégé(CLEA)…….. **71**

Liste des tableaux

I. Les enzymes

Tableau I.1. Classification des enzymes selon la commission des Enzymes de l'union internationale de Biochimie…….. **4**
Tableau I.2. Différents types d'inhibition enzymatique……... **16**

II. Les enzymes en milieu organique

Tableau II.1. Comparaison pour les trois types d'enzyme (Enzyme soluble, Enzyme immobilisée, Enzyme réticulé)……... **30**

V. Résultat et discussion

Tableau .V.1. Bilan compare la purification de l'extrait brut…… **56**

Tableau. V.2: Paramètres optimaux pour la préparation des CLEA de peroxydase EPP…… **62**

Tableau. V.3. Détermination des constantes cinétiques (V_{max} et K_M) enzyme libre…… **67**
Tableau. V.3. Détermination des constantes cinétiques (V_{max} et K_M) Enzyme agrégé… **70**

I.Les enzymes :

Les enzymes sont catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Les réactions essentielles pour le fonctionnement d'un être vivant sont trop lentes et sans la présence de ces catalyseurs, là vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible. Qu'il s'agisse de réactions complexes comme la réplication de l'ADN, chaque réaction chimique se déroulant au sein d'un être vivant est catalysée par un ou plusieurs enzymes spécifiques**. [1]**

I.1.Définition des enzymes :

Les enzymes sont des biocatalyseur capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes. D'autre part, une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche la présence des réactions secondaires gênantes. **[2]**

Une des caractéristiques particulières de l'enzyme est leur besoin fréquent de cofacteur. Le cofacteur n'est pas une protéine : il peut être un ion métallique (Mg^{2+},Ca^{2+},…) ,ou une molécule organique complexe appelée aussi coenzyme tels que le NAD ,FAD ,CoA,ATP. **[2]**

I.2.Nomenclature et classification :

Généralement le nom des enzymes se termine par le suffixe ase.

De plus, Le nom de l'enzyme indique souvent que fait l'enzyme. Selon les réactions catalysées, les enzymes peuvent être classées dans six grandes catégories. **[1]**

Le grand nombre d'enzymes actuellement connues par suite du développement rapide de l'enzymologie a crée de nombreux problèmes de terminologie et de classification .Dans ce conteste trois mode de nomenclature ont été crées. **[3]**

***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. **[3]**

***Dénomination fonctionnelle :** Une nomenclature ou on ajout e le suffixe <<ase>>soit au substrat, soit au type de réaction catalysé. **[3]**

***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 a l'un des 6 groupes de réaction (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. **[4]**

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 hydrolyse**
4- Lyases	**Catalyse 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-Ligase	**Catalyse la formation des liaison avec clivage de l'ATP**

I.3Structure :

I.3.1.Niveau d'organisation :

I.3.2.Site actif :

C'est une région particulière de l'enzyme au sien de laquelle se déroule la réaction enzymatique proprement dit. Le site actif a une taille restreinte par rapport a la taille globale de la protéine

Il consiste d'au moins deux paries fonctionnelles, peuvent ou non être voisines sur la chaine polypeptidique (si non, la structure tertiaire les amène prés l'une de l'autre). **[11]**

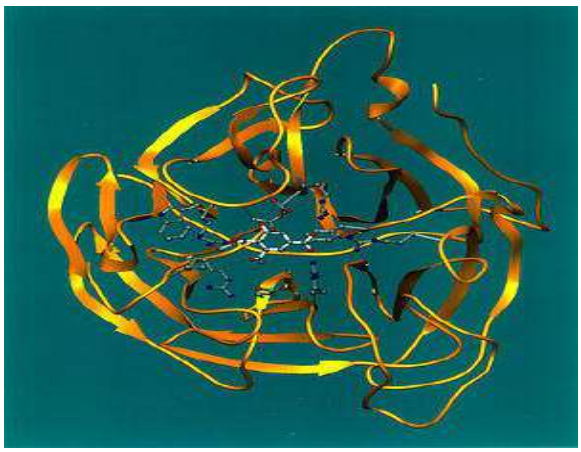


Figure. I.1. Le site actif **[17]**

I.3.2.1.Le site de reconnaissance :

Ce site pour la reconnaissance et maintien du substrat avec des liaisons faible (constitué de certains acides aminées)

I.4.2.2.Le site catalytique :

Le site catalytique est constitué des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liens chimique .ces résidus sont souvent localisés dans le fond de la cavité, et la majorité des cas, possèdent des chaines latérales ioniques ou réactives (ex :His,Lys,Cys,Ser,Asp,Glu)

Deux modèles pour explique la spécificité des enzymatique

Forme induite : L'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat (suppose que l'enzyme a une structure flexible.

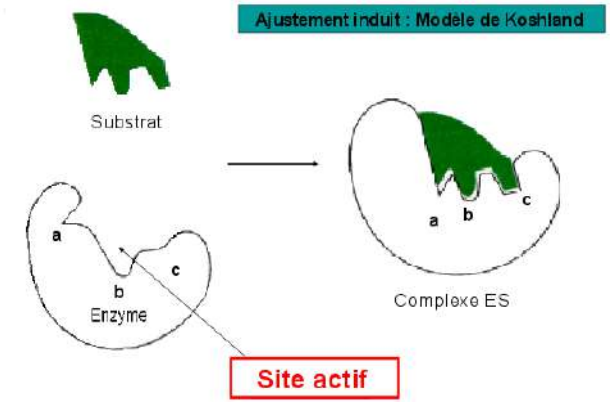


Figure. I.2. La forme induite **[18]**

Clé-serrure : la forme du site actif est complémentaire a celle du substrat

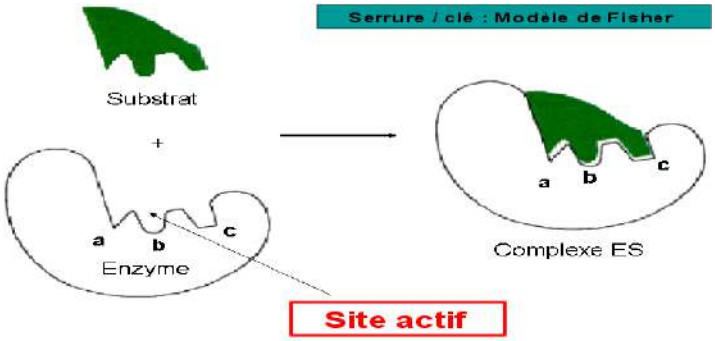


Figure. I.3. la forme clé-serrure**. [18]**

I.4.Nature des interactions substrat-enzyme :

*Les substrats sont liés aux enzymes par des interactions faibles: constantes d'association de 10-2 à 10-8 M et ΔG d'interaction
Entre -3 et -12 kcal/mol (vs. -50 à -110 kcal/mol pour des liens
covalents). **[3]**

*La liaison du substrat au site actif implique souvent de nombreuses liaisons non-covalentes de types

- van der Waals
- électrostatiques
- ponts hydrogènes **[3]**

*Ces 3 types de liaisons non-covalentes diffèrent dans leurs
Contraintes géométrique, force et spécificité. De plus, elles sont profondément affectées (de manière différente) par la présence d'eau**. [3]**

I.5.Catalyse enzymatique :

La catalyse, qu'elle soit chimique ou biologique, repose sur le même principe : elle fait appel a un composé appelé catalyseur pour augmenter la vitesse de réaction sans perturber les fonctions thermodynamique .Ainsi la position d'équilibre d'une réaction n'est pas modifiée et peut être calculée a partir des donnée thermodynamique liées au réactifs (substrat) et aux produits de réaction**. [2]**

En réalité, le catalyseur a pour fonction d'abaisser l'énergie d'activation, nécessaire à la réaction. Figure (I.4)

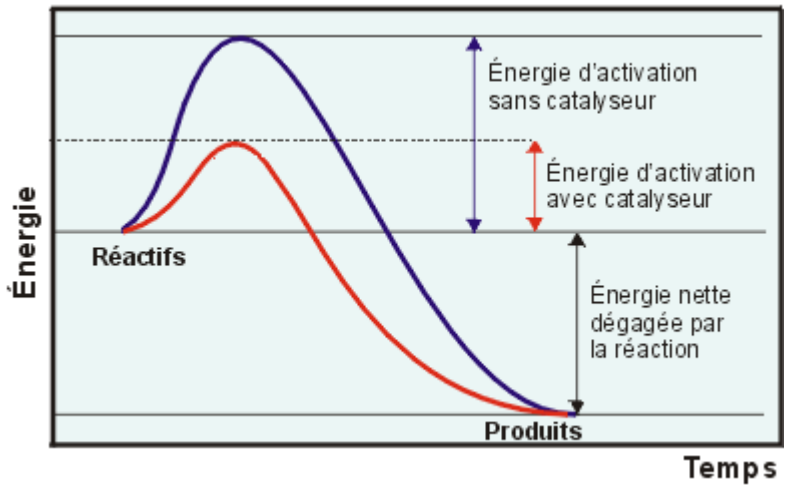


Figure. I.4. Energie d'activation d'une réaction chimique. **[2]**

La courbe bleue : représente les variations d'énergie de la réaction sans catalyseur.

La courbe rouge : la même réaction avec catalyseur, Sans catalyseur, il faut fournir plus d'énergie pour que la réaction se produise.

Avec le catalyseur, la quantité d'énergie à fournir est plus faible donc la réaction se produit plus facilement. **[2]**

I.6.Cinétique enzymatique :

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimique, catalysées par les enzymes (réaction enzymatique), en étudiant leur vitesse c'est-à-dire leur évolution en fonction de temps.

Elle se propose en particulier, d'établir les relations qui existent entre la vitesse de la réaction enzymatique et les concentrations en substrat (s)et en enzyme (E), ainsi que l'influence de certains facteurs : PH, température.

La vitesse de la réaction enzymatique correspond à la quantité du substrat disparu ou du produit libérée par unité de temps, elle dépend de 3 facteur : la concentration de substrat, la concentration de l'enzyme et l'affinité enzyme substrat. **[1]**

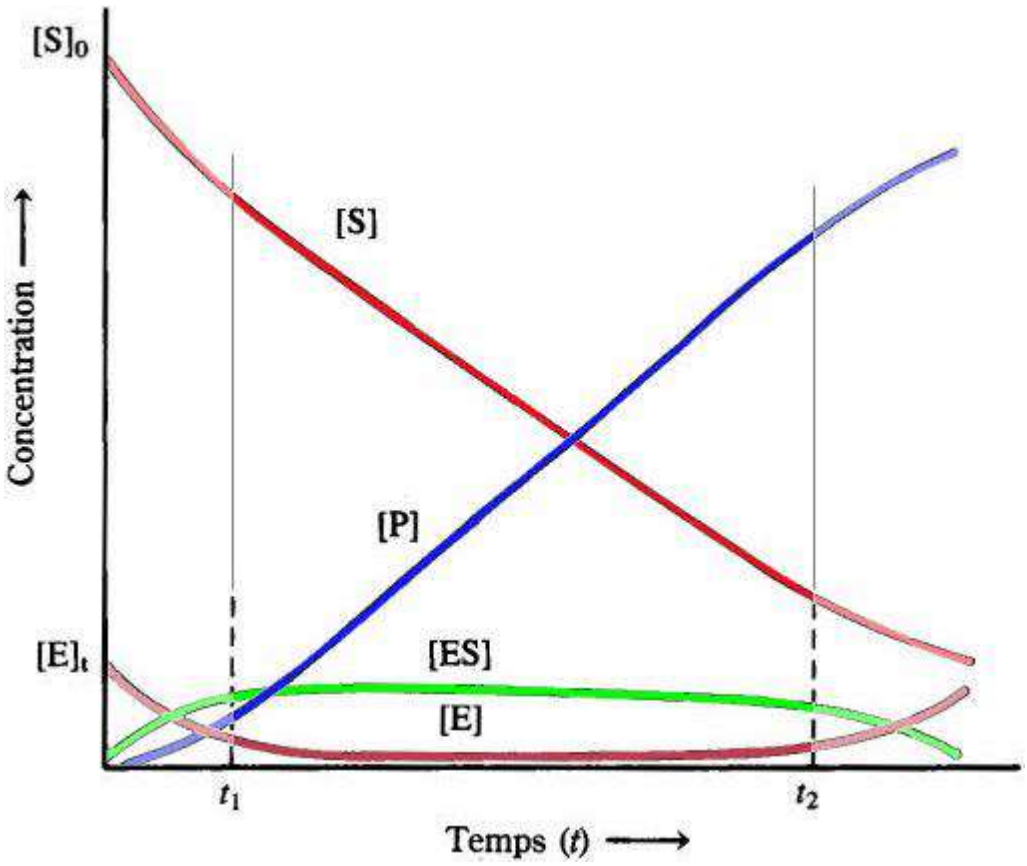


Figure. I.5. Evolution de la concentration du substrat (s), produit(p), complexe(ES), et de l'enzyme en fonction du temps. **[5]**

Phase I : S est rapidement complexe en ES

Phase II : [EL] →0 et [ES] est maximale, [S] diminue, [P] augmente.

Phase III : dissociation du complexe ES,[S] → 0,est maximale et EL est régénérée intacte.

I.6.1.Cinétique de Michaelis-menten :

La base de leur théorie (fondée sur l'hypothèse d'équilibre, est l'idée fondamentale que l'enzyme (E) et son substrat (S) s'associent pour formé un complexe enzyme-substrat réversible ES. **[24]**

$$E + S \leftrightarrows (E.S) \leftrightarrows (E.P) \rightarrow E + P \qquad (1)$$

Si on mesure la vitesse initiale de la réaction immédiatement après avoir mélangé (E) et (S), la vitesse de la réaction inverse est négligeable

Puisque cette vitesse est proportionnelle à la concentration de (P) et que cette dernière est pratiquement nulle, alors la réaction comme suite. **[10]**

$$E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P \qquad (2)$$

Cette hypothèse permet d'établir l'expression de la vitesse de la réaction enzymatique qui donnée par l'équation suivante [25] :

$$V0 = \frac{VM\ [S]0}{KM+[S]0} \qquad (3)$$

Cette équation est appelée equation de Michaelis-menten ou **[10] , [26]** :

- V_M est la vitesse de la réaction lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat (l'enzyme est a saturation) :$V_M=K_2[E]_0$
- K_M est la concentration de substrat lorsque la moitié des molécules d'enzyme sont complexées au substrat (l'enzyme est a demi-saturation) :

$$KM = K = \frac{[E][S]0}{[ES]} \qquad (4)$$

Cette démonstration met au point plusieurs conclusions :

1. La représentation V_0= f ($[S]_0$) est de type hyperbolique Figure(I.6)
2. La vitesse maximale initiale V_M atteinte pour une concentration $[E]_0$ et pour une concentration très grande de $[S]_0$ devant K_M ;
3. La constante de Michaelis-menten, est égale à la concentration de substrat S correspondant à $V_M/2$

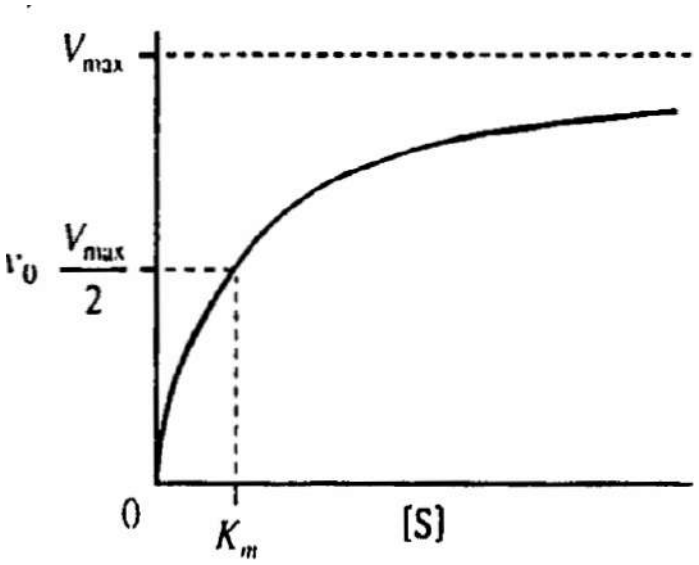


Figure. I.6. Représentation graphique d'une cinétique Michaelienne [2]

I.6.2.Détermination des constantes cinétique :

Nombreuses sont les techniques physique ou chimique qui permettent de suivre les paramètres d'une cinétique, pour en citer quelques-unes :

- ✓ Spectrophotométrie.
- ✓ Fluorescence.
- ✓ Titrimétrie ….

Généralement, les expériences sont établies pour une concentration donnée d'enzyme et différentes valeurs de la concentration en substrat.

Il faudra toujours avoir en mémoire que l'équation de Michaelis-menten a été établie dans des conditions particulières ([P]=0, [S]>>[E] $_{0,\ soit}$ a l'état pré-équilibre soit a l'état stationnaire) **[15],[12].**

I.6.2.1.Mesure de la vitesse initiale :

Au cours des études cinétique, on suit les réactions et on analyse leurs variation en fonction des modifications de milieu (concentration de substrat, pH, température, présence d'inhibiteur ou d'activateurs).

Chaque fois que l'on parle de vitesse, il s'agit de vitesse initiale, lorsqu'on met l'enzyme en présence du substrat, on observe la formation de produit, La courbe qui représente la variation de la concentration du produit en fonction du temps permet de mesurer la vitesse initiale. On entend par vitesse initiale d'une réaction enzymatique la pente de la partie rectiligne de la courbe [P] =f(t),

On mesure la tangente de la courbe expérimentale prés de l'origine du diagramme**, [15], [1].**

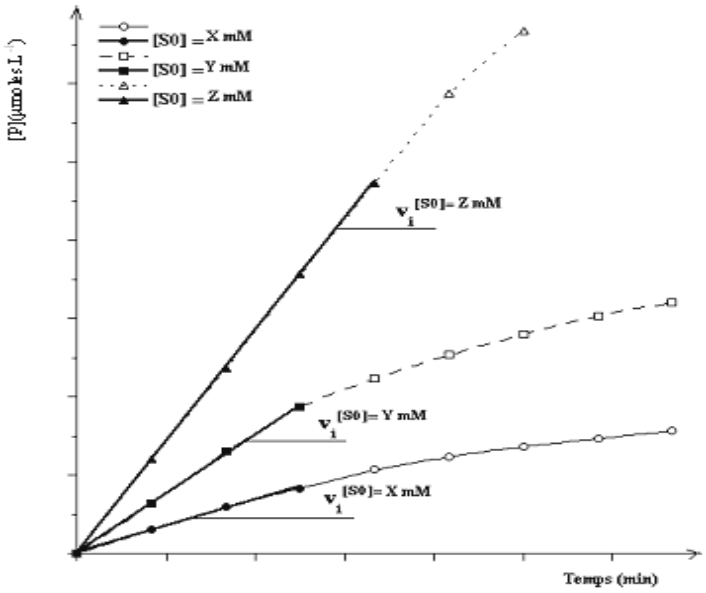


Figure. I.7. L'évolution de concentration de produit en fonction du temps, **[15]**

I.6.2.2.Influence de la concentration enzymatique sur la vitesse initiale :

Pour une concentration constante de substrat, on mesure la vitesse en présence de concentrations différentes d'enzyme Figure(I.8). On constate que cette vitesse varie linéairement et proportionnelle a la concentration d'enzyme, mais il existe toujours des limites a cette linéarité. **[13]**

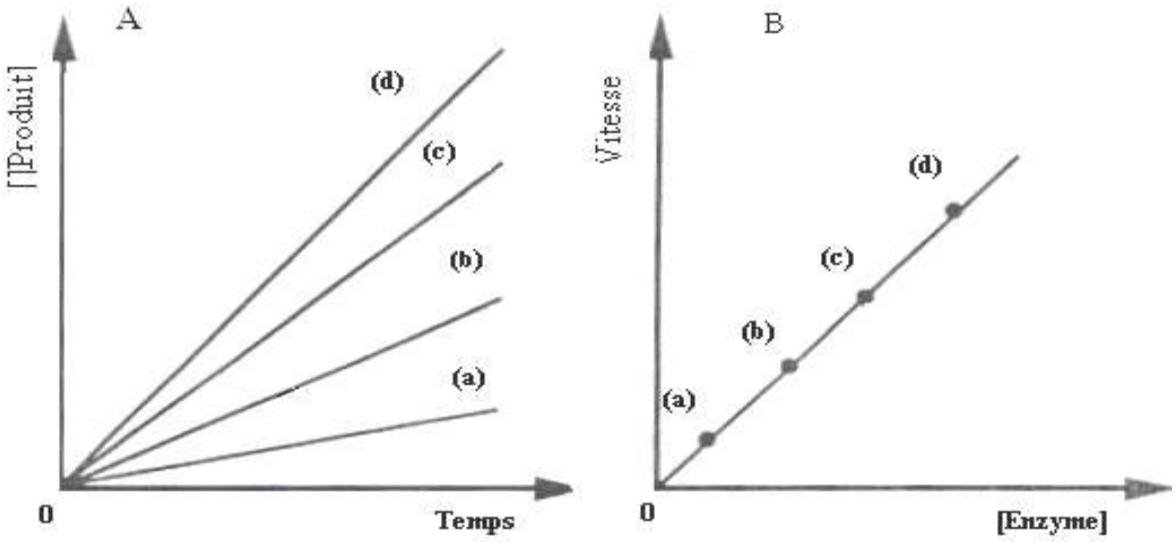


Figure .I.8. Influence de la concentration enzymatique sur la vitesse initiale **[13]**

I.6.2.3.Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale :

On effectue une série de mesures de vitesse initiale en présence d'une concentration constante d'enzyme, mais en présence de la concentration variable de substrat, les différentes mesures portées sur un graphique $V_0=f[S]_0$ font apparaitre une courbe d'allure différente. **[13]**

Cette courbe indique l'existence d'une vitesse maximale, V_M qui ne peut être dépassée même en augmentant indéfiniment la concentration de substrat Figure(I.9)

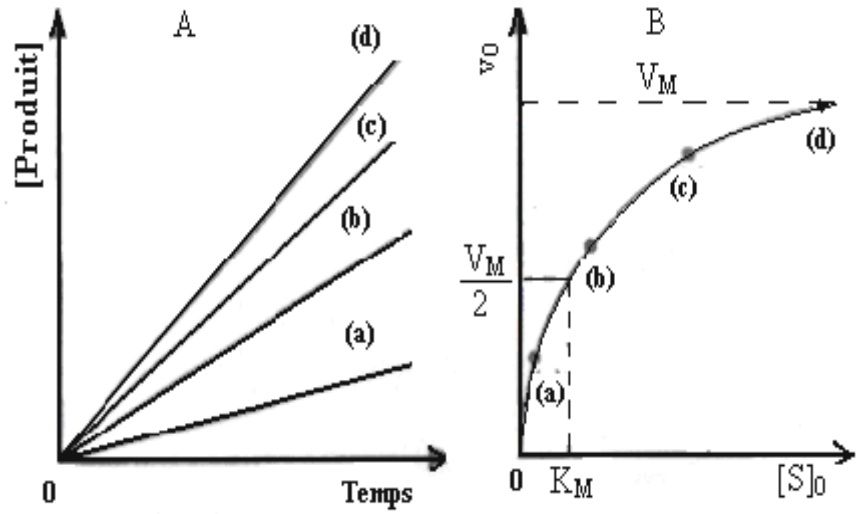


Figure. I.9. Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale **[13]**

I.6.3.méthode graphique pour la détermination de K_M et V_M :

Dans le développement d'un essai enzymatique, il est important de connaître la valeur de k_M de l'enzyme et d'ajuster la valeur de V_M.

Si l'on veut déterminer graphiquement V_M et K_M, la courbe $v_0=f([S]_0)$ s'avère trop imprécise. On préfère placer les points expérimentaux sur un diagramme où ils s'alignent sur une droite afin que l'essai soit accompli dans le minimum de temps requis pour une précision donnée.

Parmi les différentes transformations de l'équation de Michaelis-menten réalisées dans ce but, la représentation de Lineweaver et Burck et celle d'Eadie et Hofstee et qui nécessitent des données expérimentales pour la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale du substrat pour une concentration fixe d'enzyme offrent chacune des avantages particuliers :

a. Méthode de Lineweaver – Burck. **[13], [41]**

La réciproque de l'équation de Michaelis-Menten est très utile pour l'analyse des données de cinétique :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]_0}{V_M \cdot [S]_0} \quad (5)$$

Et qui se simplifie en: $$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_M}{V_M} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (6)$$

L'avantage de cette transformation mathématique est qu'elle permet de tracer un graphique $1/v_o = f\,(1/[S]_0)$ dont la courbe est en fait une droite pour les enzymes obéissant à la relation Michaélienne et qui détermine séparément la valeur de V_M et celle de K_M.

Figure (I.10)

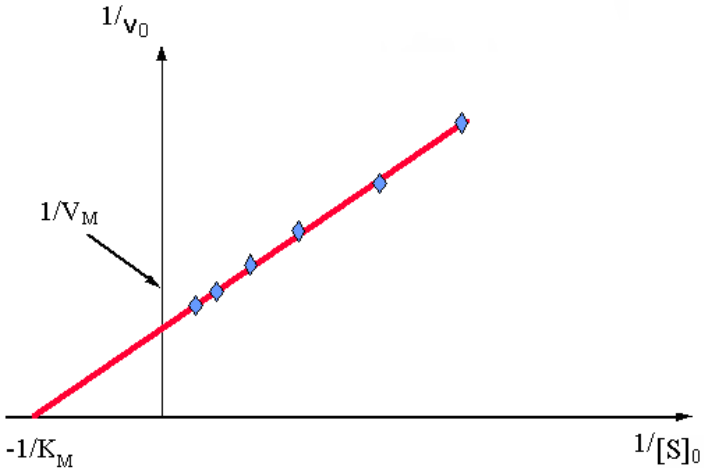


Figure .I.10.représentation graphique selon lineweaver-Burk. **[15]**

b. Méthode d'Eadie Hofstee :

Une transformation différente de l'équation de l'équation de Michaelis-menten conduit à la formule d'Eadie et Hofstee : **[13], [8]**

$$v_0 = V_M - \frac{v_0 K_M}{[S]_0} \quad (7)$$

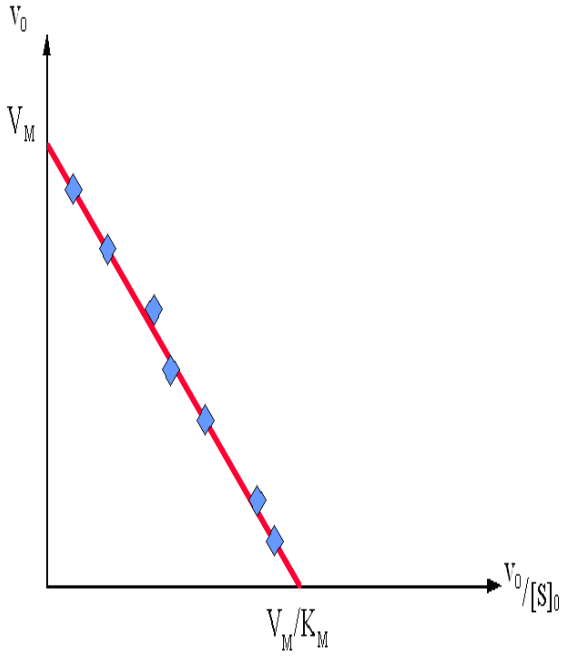


Figure. I.11.représentation graphique selon Eadie-Hosftee**, [15]**

Cette représentation présente l'avantage de répartir les points expérimentaux d'une manière uniforme sur le diagramme, et de donner une meilleure idée de la dispersion des résultats, et donc la qualité de l'expérience.

I.7. L'activité enzymatique (catalytique) :

Il est difficile de mesurer la quantité d'enzyme en unités de masse ou de concentration molaire c'est-à-dire l'activité enzymatique est définie en termes de vitesse de réaction

Les unités les plus utilisées sont les suivantes :

Unité officielle : Katal (Kat), quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde, Le Katal n'est jamais utilisé, car beaucoup trop grand, On doit utiliser des sous unités comme les µKat(10-6Katal)ou pKat(10-12 Katal).

Unité Internationale (UI) : qui est la quantité d'enzyme qui catalyse

La transformation de 1 µ mole de substrat par minute.60UI valent donc 1 µKat.

L'activité molaire : le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme**. [15] [14]**

I.8.Effecteurs influençant l'activité enzymatique :

I.8.1.Effecteurs physicochimiques :

- **Température :** Elle deux effets sur la réaction chimiques Figure (I.12) elle
  -elle accélère toute les réactions chimiques, en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.
  -elle entraine progressivement la dénaturation de la protéine (destruction des structures secondaire et tertiaire), donc sa désactivation. **[15]**

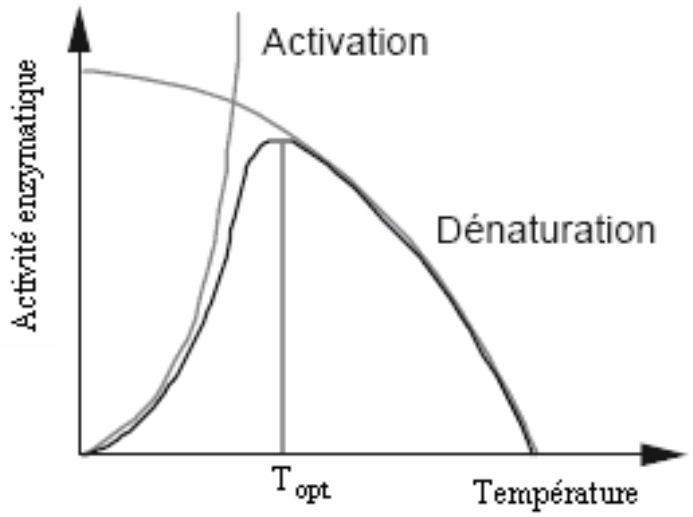


Figure. I.12 L'activité enzymatique en fonction de la température. [9]

- **pH :** Le résultat de l'effet de PH sur l'activité enzymatique donne une courbe <<En cloche >> **(**Figure. I.13).cette courbe passant par une valeur maximale pour un PH dit PH optimal, le PH optimale de la plupart des enzymes est voisin de la neutralité [6].

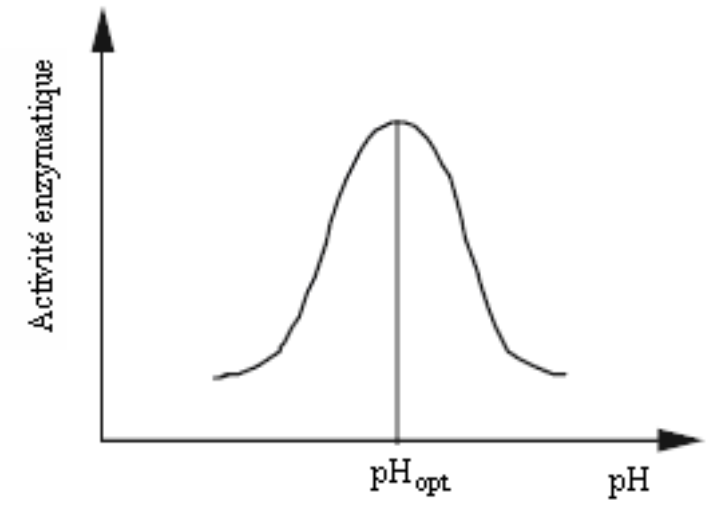


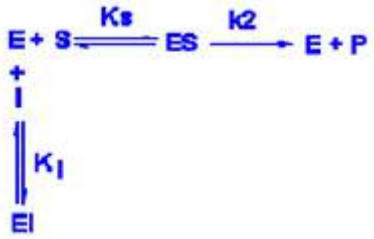
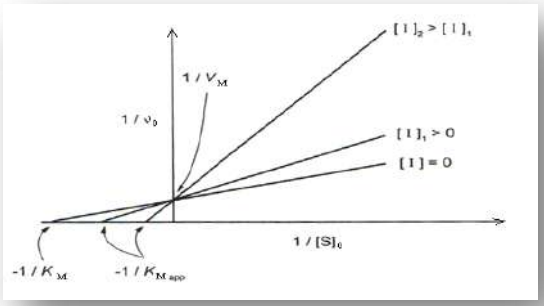
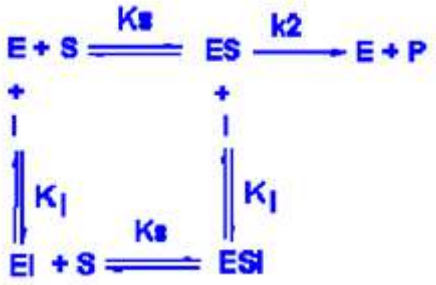
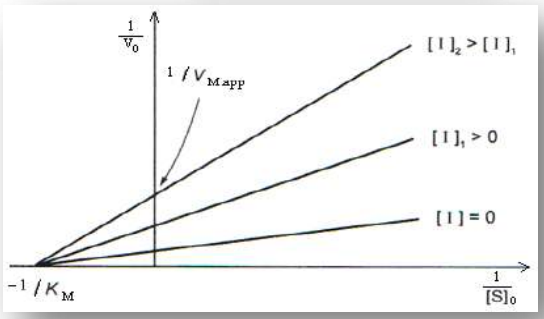
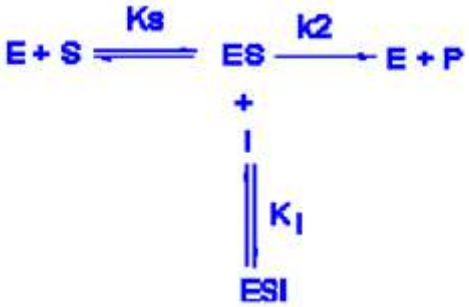
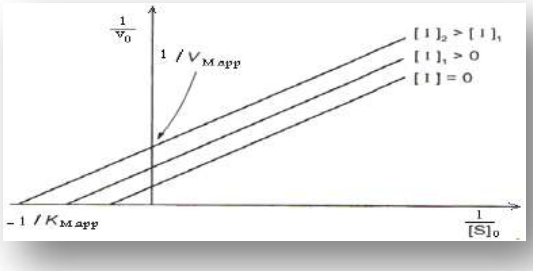
Figure. I.13. L'activité enzymatique en fonction du pH. [9]

I.8.2.Effecteurs chimiques :

On distingue les inhibiteurs, qui diminuent l'activité enzymatique, et les activateurs qui l'augmentent. **[15]**

- **Les activateur :** Les activateur sont de petites molécules qui s'associent a l'enzyme ou au complexe enzymatique enzyme-substrat par exemple : Mg^{++}, Zn^{++} et qui augmentent relativement son activité.
- **Les inhibiteur :** L'inhibiteur est une molécule qui fixe à une enzyme et interfère avec son activité, en empêchant la formation ou la décomposition du complexe enzyme-substrat

Tableau I.2. Différents types d'inhibition enzymatique **[8]**

Type	Mécanisme	Représentation de lineweaver-Burk.
Compétitionà3	L'inhibiteur à une structure spatiale semblable a celle de substrat Il se fixe sur le site actif d'enzyme et prend la place de substrat 	 $v_0 = \frac{V_M\ [S]_0}{[S]_0 + K_M(1 + \frac{[I]}{K_I})}$
Non-compétitif	L'inhibiteur et le substrat n'ont pas de structures apparentées et l'inhibiteur se lie à un site différent de celui de substrat. En conséquence, l'inhibiteur se fixe a l'enzyme libre E et au complexe ES. 	 $v_0 = \frac{\frac{VM}{(1+\frac{[I]}{K_I})}[S]_0}{[S]_0 + K_M}$
Incompétitif	L'enzyme et le substrat forment d'abord le complexe enzyme substrat, puis l'inhibiteur se fixe à ce complexe. 	 $v_0 = \frac{\frac{VM}{(1+\frac{[I]}{K_I})}[S]_0}{[S]_0 + \frac{K_M}{(1+\frac{[I]}{K_I})}}$

I.9.Réaction a deux substrats :

I.9.1.Mécanisme séquentiel ordonné :

La théorie dans ce cas devient un peu plus compliquée, il faut en particulier distinguer différents mécanismes selon l'ordre de fixation et de largage des différents substrats et produits.

Ces mécanismes peuvent être distingués selon l'influence de la concentration d'un substrat sur V_M

L'enzyme à la forme d'une poche, l'un des substrats doit pénétrer en premier. **[1]**

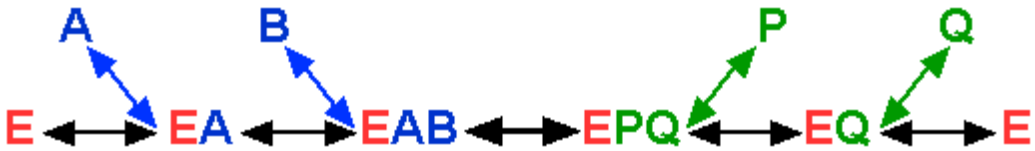


Figure. I.12. Schéma montrant le mécanisme séquentiel ordonné **[1]**

On appellera **A** et **B** les substrats d'une réaction.

On appellera **P**et **Q** les produits d'une réaction.

I.9.2.Mécanisme séquentiel aléatoire :

Si les sites de fixation sont les deux accessible à la surface de l'enzyme, l'ordre de fixation importe peu

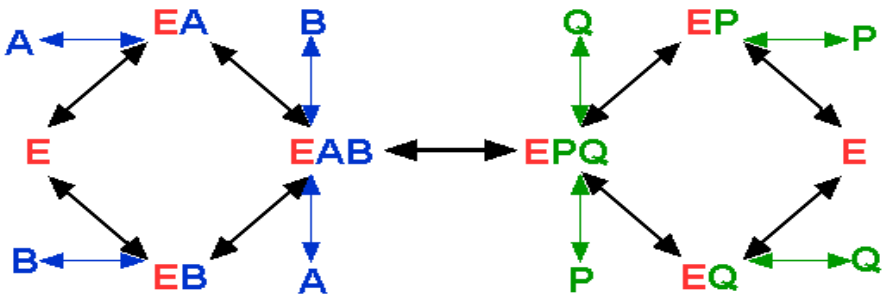


Figure. I.13. Schéma montrant le mécanisme séquentiel aléatoire. **[1]**

I.9.3.Mécanisme en ping-pong :

Souvent un premier substrat transmet un groupe chimique à l'enzyme, qui le transmet au second substrat (réaction de transfert de groupe). Un premier produit quitte avant que le second substrat vienne se lier. Après la première réaction, l'enzyme est modifiée. C'est la deuxième réaction qui restore l'état initial. **[1]**

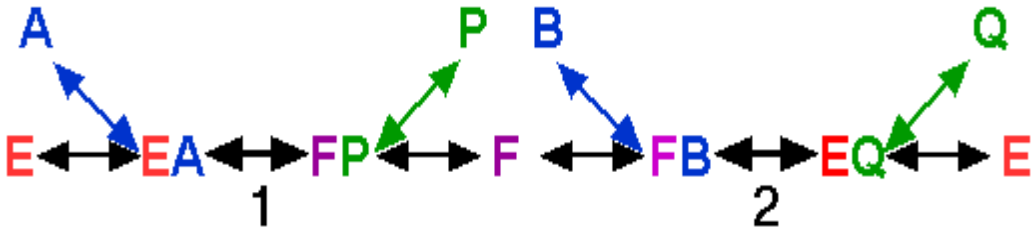


Figure. I.14. Schéma montrant le mécanisme en ping-pong. **[1]**

II. Les enzymes en milieu organique :

Les enzymes sont les catalyseurs du monde vivant et par conséquent sont opérationnelles dans l'eau, qui est le solvant des cellules. L'idée selon laquelle l'eau était le solvant indispensable aux réactions enzymatiques a longtemps dominé l'étude des enzymes, et c'est seulement dans les années 80 que des travaux relatant l'activité d'enzymes dans des milieux non-aqueux comme les solvants organiques ont été publiés. **[31]**

L'application de la biocatalyse dans les systèmes non aqueux a ouvert de nombreux nouveaux domaines de recherche. L'utilisation de substrats hydrophobes et la formation de nouveaux produits peuvent être envisagées. **[36]**

Dans la seconde moitié du siècle dernier, de nombreux efforts ont été consacrés à l'élaboration de divers reliés l'enzyme immobilisées dans le but de faciliter leur utilisation dans des procédés continus.et améliorée les performances d'enzyme comme l'activité, la stabilité et la sélectivité, qui peuvent être réalisé par immobilisation d'enzyme

Le développement de biocatalyseurs immobilisés qui sont stables dans une large gamme de pH et la température et sont tolérants aux solvants organiques est un défi majeur dans la biocatalyse industrielle. **[30]**

II.1. Intérêt des réactions enzymatiques en solvant organique :

II.1.1. solubilisation des espèces organiques :

La transformation biocatalytique de plusieurs substrats hydrophobes ou ayant une solubilité très limitée dans l'eau devient limitée par le transfert de masse. L'utilisation d'agents solubilisant n'est pas toujours aisée vue leur action sur l'enzyme et par la suite sur les difficultés qui peuvent avoir lieu lors de la séparation des produits. Le conditionnement de l'enzyme afin d'utiliser en milieu organique permet de surmonter ces problèmes.

II.1.2. limitation des phénomènes d'inhibition :

Dans les réactions enzymatiques réalisées en phase solvant organique, l'enzyme n'est pas solubilisée au niveau moléculaire, mais elle est en suspension.

La réaction chimique a donc lieu au voisinage de l'enzyme dans une réaction à l'interface hydrophile (l'enzyme) / hydrophobe (le solvant organique) qui est ainsi formée.

Une conséquence importance de cette interface est la quasi-disparition des phénomènes d'inhibition par le substrat ou par le produit que l'on peut rencontrer dans les réactions enzymatiques réalisées en milieu aqueux. (Figure. II.1)

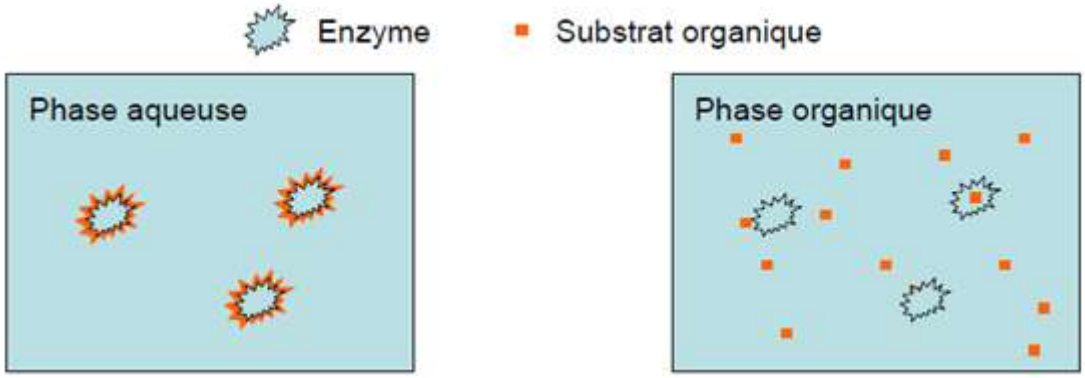


Figure. II.1 : la concentration de substrat au voisinage d'enzyme. **[30]**

II.1.3. Recyclage de l'enzyme:

Les enzymes utilisés dans un milieu organique sont généralement retenu dans un support ce qui facilite leur réutilisation a la fin de réaction.

On plus le recyclage de l'enzyme est important dans les procédés continus pour une productivité élevée. **[36]**

II.1.4. Stabilité de l'enzyme :

L'eau est souvent considérée comme le meilleur solvant pour les réactions enzymatiques. Toutefois, l'eau est capable de réagir de plusieurs façons avec l'enzyme, provoquant ainsi son inactivation. Des exemples de telles réactions comprennent l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans l'enzyme, désamidation de chaînes latérales d'acides aminés, et la destruction des résidus de cystine

En outre, la flexibilité d'enzyme causée par l'eau, qui se traduit par une forte activité catalytique, facilite ces réactions d'inactivation. Il a été ainsi réalisé que l'élimination de la majeure partie de l'eau provenant de l'environnement de l'enzyme peut entraîner une stabilisation marquée par rapport à la situation en solution aqueuse. Il a été montré que les enzymes dans des milieux organiques peuvent exprimer une activité considérable, même à 100 ° C. **[32]**

Plusieurs études ultérieures ont confirmé que la stabilité des enzymes diminue généralement avec l'activité croissante de l'eau. Il convient de souligner que c'est l'absence d'eau qui est important:

les préparations enzymatiques pauvres en eaux, tels que les poudres enzymatiques sèches entourées par le gaz, présentent également une thermostabilité élevée. Lorsque la stabilité

opérationnelle de diverses préparations de protéase a été étudiée, aucun effet probant de l'activité de l'eau n'était observé. [**35]**

L'augmentation de l'activité catalytique des enzymes avec une température croissante, permet la possibilité d'utiliser des enzymes à des températures élevées dans des milieux ou l'activité de l'eau est faible.

Cependant, dans une étude ou la réaction catalysée par chymotrypsine il a été constaté que l'augmentation de l'activité catalytique en raison de la diminution de l'activité de l'eau était plus grande que l'augmentation de la température de réaction. **[33]**

II.1.5. Spécificité de l'enzyme dans les solvants organiques:

L'origine de spécificité d'enzymes est leur capacité à utiliser l'énergie libre pour se lier avec le substrat pour faciliter la réaction. L'énergie nette de cette liaison est la différence entre l'énergie de liaison du substrat avec l'enzyme et celle avec l'eau, un moyen pour changer spécificité de substrat (en plus de la modification du site actif de l'enzyme) est destiné à remplacer l'eau avec un autre milieu réactionnel. Cette étude a étudie expérimentalement. (Figure. II.2). **[35]**

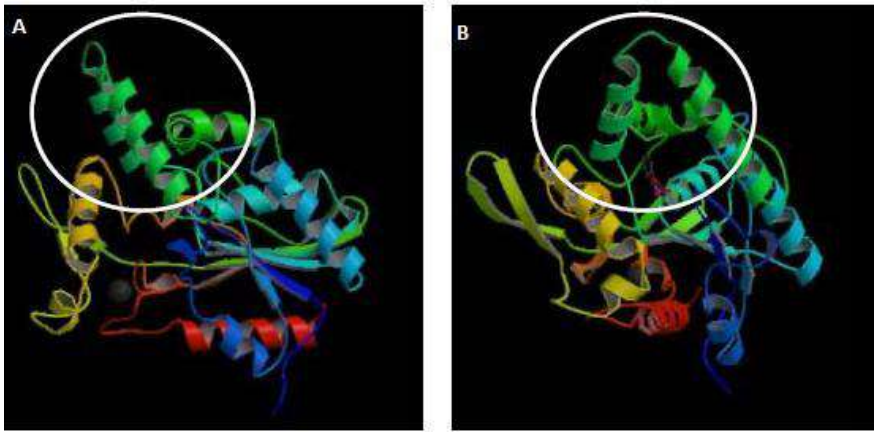


Figure. II.2. (A) le site actif dans un milieu aqueux, (B) le site actif dans un milieu organique.

Le moteur principal pour la liaison au substrat enzymatique dans le cas de la chymotrypsine (et plusieurs autres hydrolases) est une interaction hydrophobe.

Il a été constaté que lors de la réaction de transestérification dans l'octane, l'ester de sérine est trois fois plus réactif que celui de phénylalanine, en outre, l'ester d'histidine, dont la réactivité dans l'eau est de 0,5 % de celui du substrat phénylalanine, devient 20 - fois plus réactif dans l'octane.

Des données qualitativement similaires ont été obtenues pour la subtilisine. **[38]**

II.1.6. Nouvelle réaction enzymatique dans des milieux non aqueux:

De nombreux procédés enzymatiques ne sont pas réalisables dans l'eau, a cause de plusieurs facteurs tels que :

- Équilibres thermodynamiques défavorables,
- Des réactions secondaires
- L'insolubilité de substrats.

Dans des solvants non aqueux, la lipase (et autres hydrolases) peut catalyser une variété de réactions (les estérifications, transestérifications et oximolysis), tandis que dans l'eau, ces processus sont presque complètement supprimées par l'hydrolyse. **[36]**

II.2. la réticulation des enzymes utilisés dans un milieu organique :

L'immobilisation est coûteuse et nécessite une matrice inerte sur lequel l'enzyme peut être immobilisée. En outre, cette matrice doit souvent être modifiée chimiquement pour quelques enzymes. **[39]**

L'interaction entre l'enzyme et la matrice dilue la concentration efficace des enzymes.

Le chargement d'activité de l'enzyme sur le support est généralement de 0,1-10% w / w.

Ainsi l'immobilisation n'a que partiellement résolu le problème de la faible activité enzymatique pour biotransformations en milieu non aqueux.

La Réticulée d'enzyme est une technologie qui offre une approche unique pour soulager les inconvénients d'immobilisation. **[33]**

Les types de réticulation les plus efficaces qui présentent des novelles propriétés pour la catalyse dans un milieu organique sont :

- cristaux d'enzymes réticulées CLECs (crosslinked enzyme cristals)
- Agrégats d'enzymes réticulées CLEA (crosslinked enzyme agérates)

II.2.1. Cristaux d'enzymes réticulées CLECs :

Ce type d'immobilisation diffère du deuxième type par une seule étape qui est la cristallisation

II.2.1.1. Préparation des cristaux d'enzymes réticulées :

CLECs sont préparés en deux étapes : la première étape est la précipitation de microcristaux en enzymes. La deuxième étape est la réticulation avec des agents bifonctionnels à de fortes liaisons covalentes intra-et intermoléculaire entre le groupe ϵ-amino des résidus lysine des enzymes.

La stabilité thermique et protéolytique ainsi que l'insolubilité dans des solvants aqueux et organiques sont améliorées. **[35]**

- **Cristallisation des Enzymes :**

La cristallisation est un outil puissant pour la purification, l'isolement, et le stockage des enzymes. L'efficacité de la cristallisation pour la purification est généralement supérieure à celle de toute autre méthode. En général, les enzymes sont beaucoup plus stables sous forme cristalline que sous forme soluble ou amorphe. En outre, les enzymes cristallisées sont plus concentrés et plus purs. **[34]**

La cristallisation de macromolécules exige la création d'un état de sursaturation.

Lors de la préparation d'une CLECs. Les conditions de cristallisation doivent être optimisées pour obtenir les CLECs de taille appropriées pour l'application prévue, la taille des cristaux peut être changée en contrôlant la cinétique de cristallisation.

Des cristaux de taille (50-150) A° sont préférables pour des applications de biocatalyse, car ils offrent une combinaison de propriétés de filtration bonnes et de l'activité. Une granulométrie d'environ 10 µm est de préférence pour des applications de biocapteurs et en cosmétiques. Dans ces cas, il est crucial de définir un ensemble de conditions de cristallisation qui permet, d'obtenir un rendement élevé de cristaux de taille et de forme déterminées, avec un minimum de perte de l'activité fonctionnelle. **[39]**

- **Limitation de la cristallisation :**

Certaines enzymes sont difficiles à purifier et à cristalliser en raison de la structure moléculaire, qui peuvent exister dans plusieurs conformations, ce qui rendre difficile la formation d'un cristal hautement ordonné. Les énergies attendre de contact protéine-protéine sont comparés à ceux entre les petites molécules, mais il ya moins de contacts pour des cristaux de protéines dans en proportion de leur poids moléculaire, de sorte que cette énergie est apparemment faible. **[39]**

Par conséquent, l'étape de sursaturation est également beaucoup plus élevée pour les protéines en comparaison avec de petites molécules. En faisant varier l'état de cristallisation et en utilisant différents types de précipitant, on peut produire des cristaux avec une conformation plus favorable dans des conditions de cristallisation peut avoir des effets nuisibles spécifiques, tels que la perte de cofacteur. Dans la cristallisation, des formes cristallines sont fonctionnellement inactif ou moins actif que d'autres formes cristallines de la même enzyme. Cela se produit lorsque les centres sites actifs ne sont pas exposés au volume de la solution disponible pour des substrats. **[35]**

- **Pureté de l'enzyme cristalliée :**

Les enzymes les plus couramment utilisés ont moins de 25% de protéines. Pour une meilleure efficacité durant la cristallisation, la pureté de l'enzyme doit être au moins comprise entre 90et 95% **[33].**

La purification d'une enzyme améliore également l'énantiosélectivité. La plupart des enzymes commercialement disponibles ne sont pas très pures et peuvent contenir des additifs, des sels, des sucres. **[39]**

II.2.2. La réticulation :

La réticulation est considérée comme deuxième étape pour la réticulation des cristaux d'enzyme (formation des cristaux enzymes réticulées CLECs), et c'est la seule étape pour la formation des Agrégats d'enzymes réticulées CLEA

II.2.2.1.Procédé de réticulation :

C'est une association de deux différentes molécules telles que l'enzyme avec un anticorps, ou avec un agent de réticulation comme le glutaraldehyde.

L'augmentation de la longueur de la chaîne de l'agent de réticulation augmente la flexibilité de d'enzyme réticulé. Les conditions de réticulation tels que le pH, la concentration de protéines, la température, la concentration des réactifs, le temps réticulation, doivent être soigneusement optimisés. **[36]**

L'agrégation physique de molécules d'enzyme peut causer une perturbation de la structure originale tridimensionnelle de la protéine, par l'addition de sels, de solvants organiques, de polymères non ioniques à une solution de protéine. Ces agrégats solides sont maintenus ensemble par des liaisons non covalentes, qui peuvent facilement se replier et se redissoudre lorsqu'ils sont dispersés dans un milieu aqueux. La réticulation chimique de ces agrégats serait de produire des agrégats d'enzymes réticulées dans lesquels la superstructure est réorganisée en maintenant leur activité **[39].**

Les Agrégats d'enzymes réticulées peuvent également être préparés par la méthode simple à l'aide des agents de réticulation. Les Agrégats d'enzymes réticulées de la pénicilline acylase (EC3.5.1.11) et de la lipase ont été préparés par Linqiu Cao et al. avec le glutaraldehyde. **[35]**

II.2.2.2. Les agents de réticulation :

- **Glutaraldehyde :**

C'est un réactif dialdéhyde, c'est le plus utilisé.

Glutaraldehyde est peu coûteux et facile à manipuler. La longue chaîne d'oligomères de glutaraldehyde formées dans des solutions aqueuses est donnée dans la figure (Fig. II.3)

La réticulation avec le glutaraldehyde forme des liaisons covalentes fortes entre les groupes aminés et des résidus lysine au sein et entre les molécules d'enzyme dans un réseau cristallin. Parce que la plupart des liens sont entre les macromolécules adjacentes dans le réseau. **[34]**

La réticulation est aussi irréversible le mécanisme n'est pas entièrement comprise. La réticulation avec le glutaraldehyde confère plusieurs avantages. Les cristaux de l'enzyme qui sont normalement très fragiles, deviennent plus robustes et solides après réticulation. Ils deviennent complètement insolubles dans une variété de conditions, mais restent perméables au soluté. Ils sont insensibles aux variations de pH et température, qui peut varier sur une large gamme sans dissolution ou de la détérioration des cristaux réticulés**. [39]**

Les conditions de réticulation devraient être soigneusement optimisées avec des concentrations étudiées de glutaraldehyde. Une concentration de 0,1-5% de glutaraldehyde est recommandée pour donner une meilleure réticulation. L'enzyme ou le cristal réticulé avec un excès de glutaraldehyde sont de couleurs jaune-brun et mécaniquement durs. **[30]**

L'analyse de la séquence d'acides aminés après réticulation donne le nombre de résidus lysine qui ont été réticulés. Rose et al, ont signalé que dans le cas de la réticulation avec la thermolysine, environ 8 résidus de lysine sont modifiées. Les 3 autres résidus lysine qui sont impliqués dans les interactions intra- et intermoléculaires ne sont pas accessibles au glutaraldehyde. **[39]**

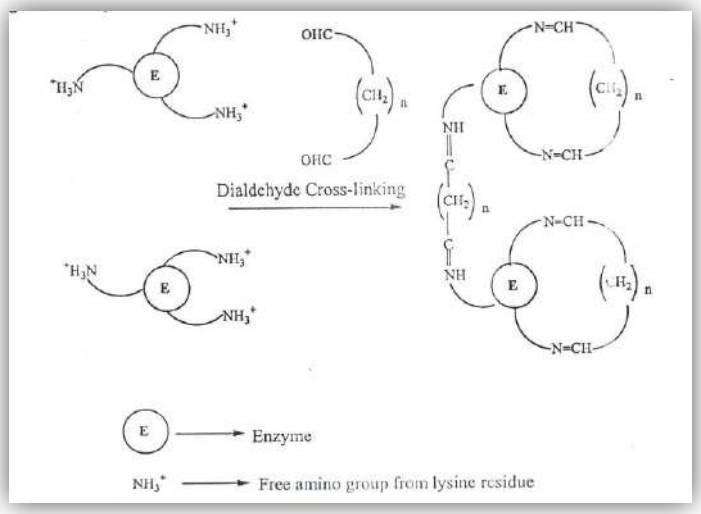


Figure. II.3. Réticulation de l'enzyme avec la glutaraldehyde.

- **Glucides :**

  Procédé de stabilisation d'un autre réseau est exclusive pour la réticulation des groupements glucidiques de la glycoprotéine ou une combinaison de glucides et de chaînes latérales d'acide aminé. **[36]**

Dans ces hydrates de carbone de glycoprotéine réticulés, les interactions sont fixées par voie chimique des liaisons croisées, avec une meilleure stabilité lors du stockage dans des environnements agressifs et pour empêcher la dénaturation. Dans le cas d'enzymes ayant un résidu de lysine dans leurs sites actifs, la réticulation avec glucides est préférable, car le glutaraldehyde a une grande affinité pour la lysine, qui peut conduire à l'inactivation des enzymes par la fixation du site actif.

Cette méthode réalise avantageusement la cristallisation des glycoprotéines sur une grande échelle, sans la nécessité pour les effets lourds et potentiellement dénaturants de glycosilation chimique. Figure (II. 4) **[39]**

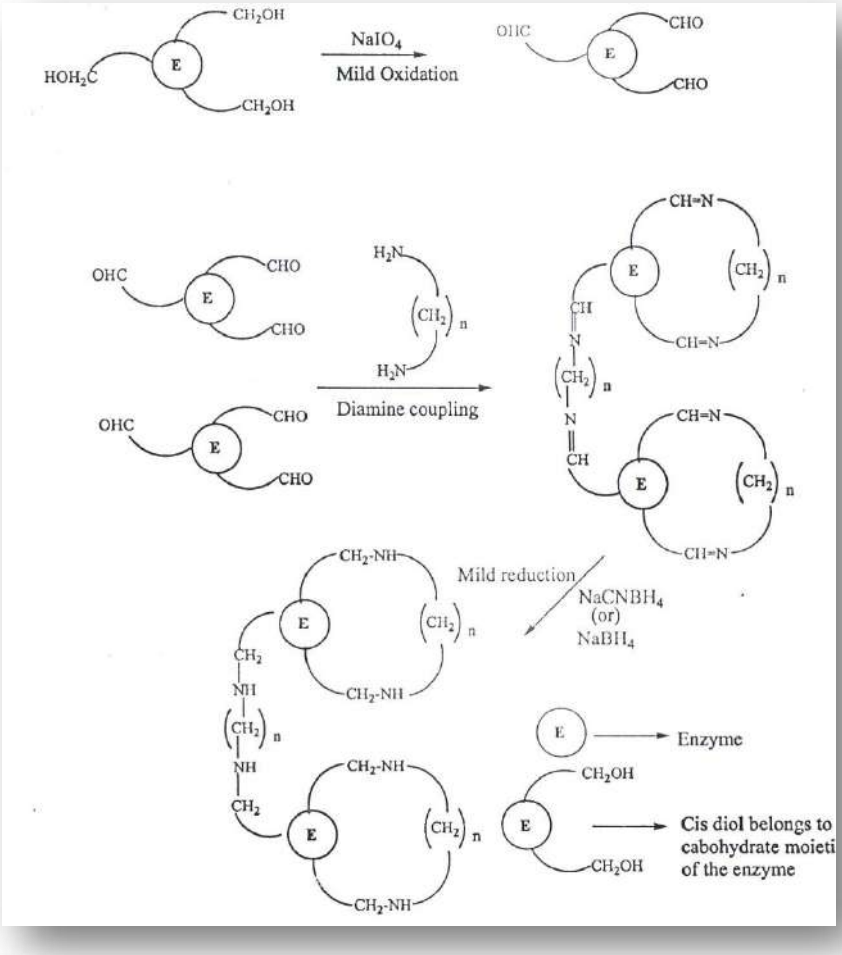


Figure. II. 4 : Réticulation de l'enzyme avec les Carbohydrate.

- **Thiol :**

  Une autre méthode possible de réticulation est à travers les groupements thiols dans ml'enzyme. qui consiste à couplage indirect d'un groupe amine dans une molécule de protéine à un groupe thiol d'une seconde biomolécule, généralement en deux ou trois étapes de réaction. La première étape est l'introduction de groupes thiol dans l'enzyme ou les cristaux d'enzyme. Si l'enzyme n'a pas suffisamment de groupes thiol libres, ils peuvent être introduits par la réduction sélective disulfures cystine avec des réactifs tels que le dithiothréitol (DTT), propionate (SPDP**). [33]**

L'excès de ces réactifs doit être éliminé par dialyse ou par filtration sur gel. La deuxième étape comporte le couplage de la molécule d'enzyme contenant un thiol avec une autre molécule enzymatique contenant des groupes amine avec le réactif hétérobifonctionnel tels que maléimides ou iodoacetamides. Succinimidyle trans-4-(maleimidylmethyl) cyclohexane-1-carboxylate de succinimidyle (SMCC) est l'un des réactifs hétérobifonctionnels maléimide utilisés pour introduire un groupe thiol réactif sur un site d'amine d'un enzyme avec ensuite la réticulation avec une molécule d'enzyme contenant un thiol Figure(II.5)**. [39]**

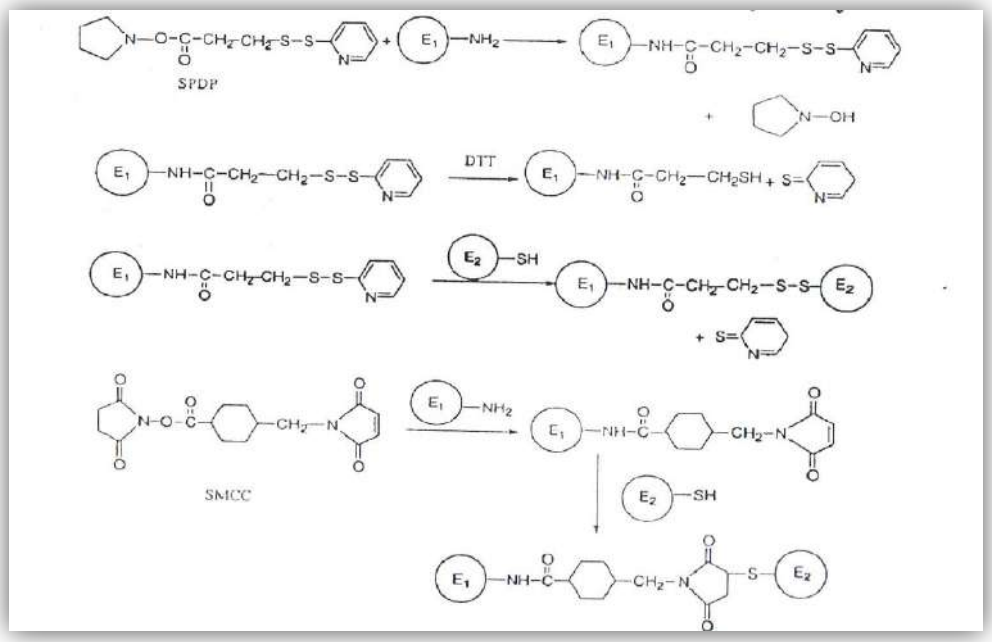


Figure. II.5. Réticulation de l'enzyme avec Thiol.

- **Autre réticulation**

  D'autres réticulant, comme chélateur de métal, de couplage carbodimide, et le couplage diazoïque qui sont utilisés pour la modification de matrices d'immobilisation, ne peuvent pas être utilisé pour la réticulation de protéines cristallines, car les réactifs peuvent inhiber ou inactiver les enzymes lorsqu'ils sont ajoutés directement à l'enzyme. **[34]**

II.2.3. Les propriétés des enzymes réticulés :

II.2.3.1. La stabilité chimique :

La stabilité d'une protéine accrue dans un agrégat est due à des contacts d'addition ionique et hydrophobe entre les molécules de protéines. Quand une protéine est transférée à partir d'une solution à la forme agrégat, une augmentation du nombre de deux interactions polaires (électrostatique) et hydrophobe permet la molécule de protéine d'amélioré considérablement la stabilité des protéines contre la chaleur et d'autres dénaturants en empêchant le déroulement d'inactivation, ou de la dissociation d'enzyme. **[30]**

L'enzyme cristalline ou réticulée maintient sa conformation native à une température élevée et a une faible tendance à s'agglomérer. La réticulation chimique de protéines fournit une stabilisation supplémentaire. est une représentation schématique de la stabilité relative d'une CLEA , CLECs la tolérance de la température, le pH et les solvants organiques provient probablement d'interactions protéine-protéine et les contacts qui se produisent dans le réseau cristallin, qui sont également maintenus dans les CLEA , CLECs. **[39]**

Dans une CLEA, les molécules d'enzyme sont reliées entre eux dans un réseau tridimensionnel des canaux microscopiques entre eux sont formé. Ce réseau fournit la résistance structurale et la durabilité, puisque l'énergie totale de cristallisation ou l'agrégation ainsi que l'énergie nécessaire pour dénaturer la protéine réticulée sera élevé. Les canaux microscopiques permettre au substrat de passer facilement à travers le réseau cristallin et d'accéder aux sites actifs de l'enzyme. Le degré de stabilisation en fonction du nombre de contacts, à la fois intermoléculaire et intermoléculaire entre les molécules d'enzyme. La réticulation des cristaux de protéines fournit également une stabilisation supplémentaire. **[37]**

II.2.3.2. Stabilité mécanique :

Pour l'application industrielle des CLEA comme biocatalyseurs, il est important de comprendre leurs propriétés mécaniques par rapport à la conception des processus et le fonctionnement. **[35]**

Une CLEA doivent résister aux forces de cisaillements associés à l'équipement de traitement tel que les réservoirs d'agitation et à écoulement croisé microfiltres, qui peuvent causer l'attrition des particules et de la fragmentation. Stabilité des cristaux d'enzyme réticulé a été examinée .La stabilité mécanique d'un CLEAs dépend aussi de la forme des cristaux. Ont étudié la stabilité mécanique des deux cristaux hexagonaux et en forme de tige de l'alcool déshydrogénase. Des cristaux hexagonaux affichaient une certaine cassure lors de cisaillement mécanique à une vitesse de rotation du disque 27000 rpm, qui peut être due à l'attrition cisaillement induite, mais aucune rupture n'a été enregistrée dans la tige sous forme de cristaux. **[39]**

II.2.4. Limitations de la réticulation de cristaux d'enzyme :

Lorsque des cristaux d'enzymes sont réticulés dans un réseau tridimensionnel par un agent de réticulation, des canaux microscopiques de l'ordre de (20-55) A° sont formées entre les deux cristaux. Les diffusions des CLEA sont définies par la taille, la longueur et microvironement (charge de surface, etc.) de ces canaux. Perdant ainsi partiellement leur stabilité mécanique lors du stockage.

La taille du substrat est également importante, puisque le substrat avec un poids moléculaire élevé peuvent ne pas diffuser à travers les canaux et donc avoir une réactivité réduite. **[38]** La réalisation des agrégats avec une bonne activité peut être obtenue que par une standardisation correcte des conditions de cristallisation et de réticulation. **[39]**

On peut donc comparer les trois types d'enzymes dans le tableau suivant:

Tableau II.1. Comparaison pour les trois types d'enzyme

(Enzyme soluble, Enzyme immobilisée, Enzyme réticulé). **[35]**

caractéristique	Enzyme soluble	Enzyme immobilisé	Enzyme réticulé
Stabilité	On le conservé seulement a 4°C.	On le conservé seulement à 4°C.	On le conservé jusqu'à 25°C
Activité spécifique	Peut être élevée	Diluée à cause de l'interaction avec la matrice	élevée grâce à l'activité volumétrique élevée
Réaction dans le milieu organique/aqueux	Seulement dans milieu aqueux	Dans un milieu aqueux et moins dans un milieu organique	Réagir dans les deux milieux aqueux et organiques
Séparation a la fin de réaction	Difficile à séparer à partir le mélange réactionnel	On peut les séparé par filtration ou centrifugation	Facilement séparable a la fin de la réaction
Stabilité de (pH, température)	stabilité dans un intervalle de pH et de température	Plus ou moins stable dans un intervalle de pH et de température	Très stables dans un intervalle de pH et de température
La productivité	Basse productivité	Productivité élevée	Productivité très élevée

II.2.6. Applications des CLEA

II.2.6.1. synthèse chimique :

Due à leur stabilité élevée en milieu organique et aqueux, les CLEA ont une application importante dans la synthèse chimique organique complexe car leurs enatioselectivité élevée leur insolubilité dans le milieu leur séparation et recyclage afin de les réutiliser, ce qui permettent d'augmenter la productivité du procédé.

En synthèse pharmaceutique on pourra cites l'exemple de synthèse des peptides et des peptidomimetiques qui sont un groupe important des médicaments modernes.

Les peptides sont préparés par condensation d'acides aminés en présence de protéase qui hydrolyse la liaison peptidique l'équilibre réactionnel peut être inversé en présence de solvant organiques ou par précipitation de tous produits

Les CLEA permettent de surmonter ce problème en facilitant la séparation de phases des produits formés. **[39]**

Les CLEA de subtilésine donnent un rendement de 90% pour la synthèse des peptides à partir des deux formes L et D des acides aminés.

De même les CLEA de thermolysine sont efficaces dans un milieu contenant 90% d'éthanol l'aspartame est aussi produit par ces enzymes dans l'ethylacétate qui peuvent être réutilisés dans plus de 18 cycles alors que la forme soluble n'est utilisable que 2 fois**.**

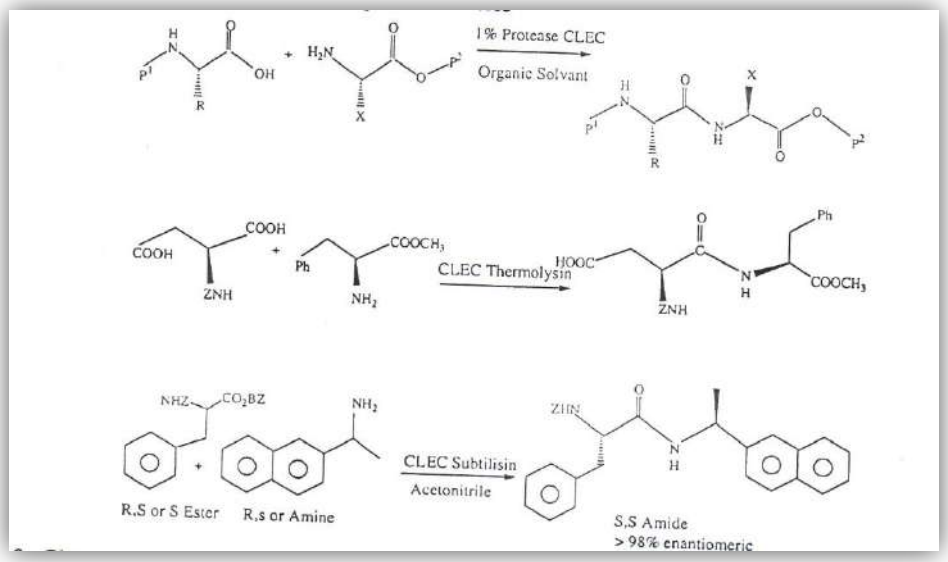


Figure. II. 7 .synthèse des peptides et des peptidomimetiques.

- **résolution des mélanges racémiques :**

Les CLEA de lipases et d'estérases peuvent être utilisés dans la résolution des mélanges racémique d'alcool alors de la transterification eu milieu organique ou l'hydrolyse des mélanges racémiques d'ester ou la concentration de substrat ou de solvant organique doit être élevée. Figure (II. 8).

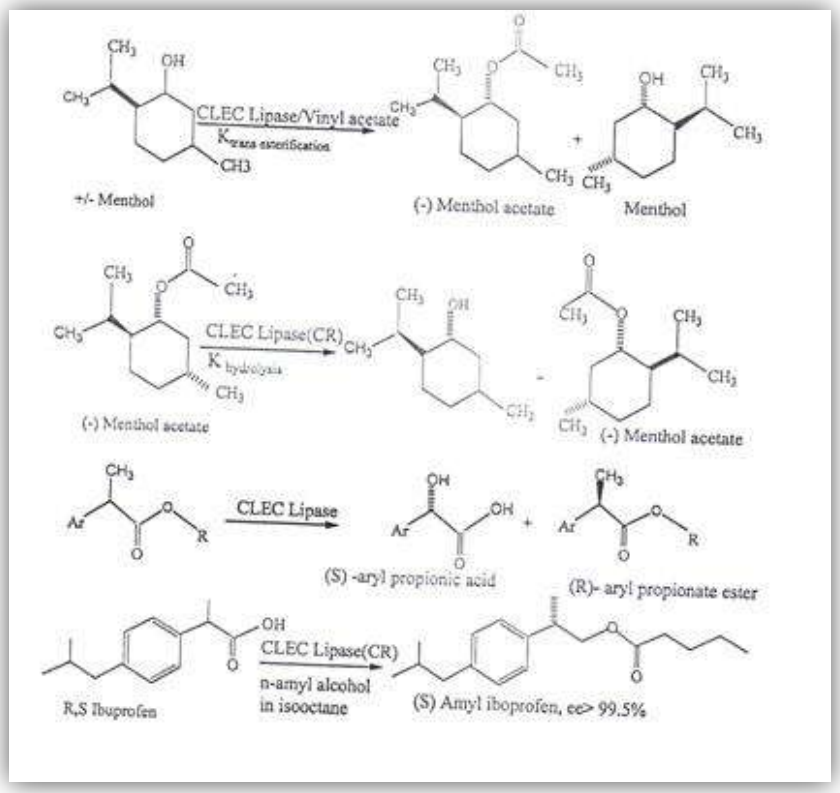


Figure. II. 8. Résolution des mélanges racémiques

- **La sélectivité**

La synthèse des antibiotiques nécessite parfois des températures assez basses et peuvent inclure des étapes qui génèrent des sous produits sans intérêt suite à des réactions parasites

Les CLEA de pénicilline acylase utilisée pour la catalyse de la condensation d'ester

D-pheylglycine avec le 7-aminodesacetoxycephalosporanic acide (7-ADCA)

La forme CLEA est utilisée jusqu'à 1000 fois avec un maintien d'activité jusqu'à 70%de l'activité initiale. **[31]**

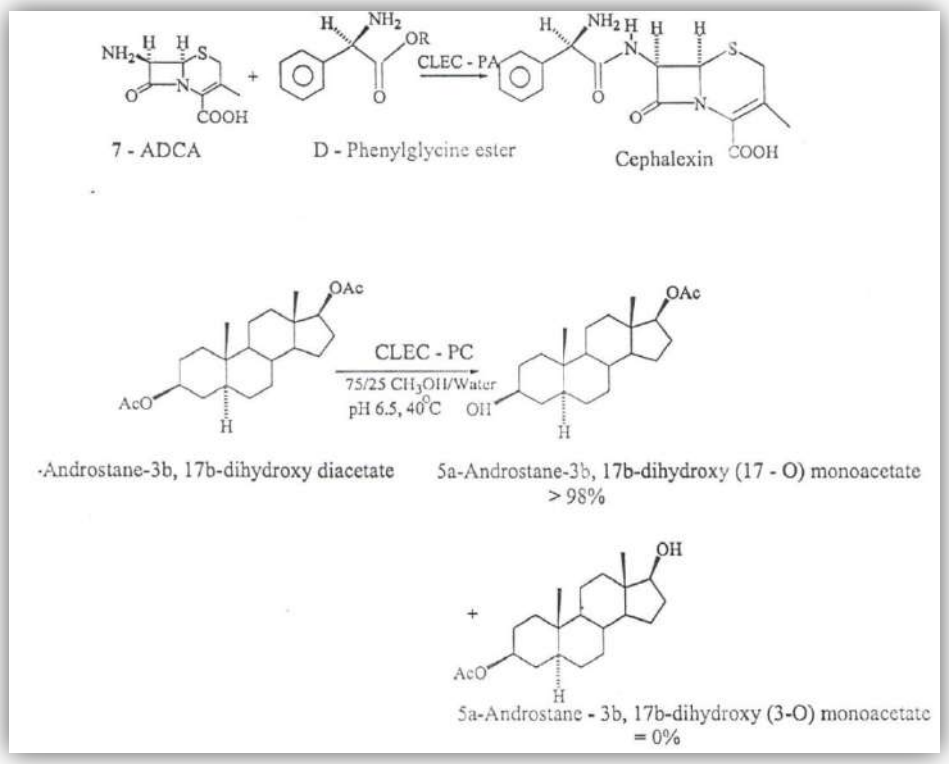


Figure. II. 9. La sélectivité dans la transformation.

II.2.6.2. Les CLEA dans les biocapteurs :

Les CLEA présent une haute densité enzymatique et peuvent ainsi donner une sensibilité élevée en présence de quantités très limités de substrat que sa doit en milieu aqueux ou organiques d'où l'intérêt de leur utilisation dans les biocapteurs des exemples d'utilisation dans le dosage du glucose par le glucose oxydase ou d'urée par l'urease dans le cas de peroxydase pour l'analyse des polluant organiques. **[38]**

II.2.6.3. Application médicales :

L'action protéolytique des enzymes dans l'estomac pour la dégradation des liaisons peptides contenues dans les médicaments est une vois naturelles pour l'assimilation.

Les CLEA peuvent être utilisé comme alternative permettant le changement vers une vois intraveineuse. **[32]**

III. La peroxydase :

III.1.Historique :

Avant même que la notion d'enzyme eût été formulée, Louis-Antoine Planche constatait en 1810 que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc de recolorer la teinture de gaïac (incolore à l'état réduit) en présence de peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée, ce qui valut le nom aux enzymes responsables, les peroxydases. **[43]**

Les fameuses peroxydases de raifort furent l'outil de base des premiers travaux moléculaires sur les peroxydases végétales(Theorell1942) et c'est en 1976, grâce aux travaux de Braithwaite, d'une part, et de welinder, d'autre part, qu'on a pu avoir une première image cristalline d'une de ces enzymes, ainsi que la première séquence protéique. Il a fallu attendre ensuite plus de 10 ans pour voir publier la première séquence nucléotidique d'un messager codant pour une peroxydase de Tabac (Lagrimini et al.1987).C'est principalement sur la base de ces travaux, qu'aujourd'hui les données moléculaires concernant les peroxydases végétales ont pu s'accumuler de manière plus que significative. **[16]**

III.2.Généralités :

Les peroxydases ont requise une position avancée dans les domaines de recherche biotechnologique (enzymologie, biochimie, génétique …etc.) ils sont l'un des enzymes les plus étudié grâce a la diversité de leurs aspects quantitatifs et qualitatifs.

Les peroxydases sont des enzymes universelles du monde vivant, catalysent des réactions d'oxydoréduction impliquant la réduction d'un peroxyde et l'oxydation d'un substrat, variable d'une classe de peroxydase à une autre. **[17]**

Les peroxydases possèdent un pois moléculaire varie entre30 et 150KDa,

et sa compostions chimique est suivante : carbone 47٪, hydrogène 7.35٪, souffre 0.43٪, fer 0.127٪, est constitué de 306 acides aminés, deux glucosamines, huit sucres, une protohématine, et deux ions Ca^{++}.**[46]**

III.3.structure :

Les peroxydases des plantes (EC1.11.1.7), appelées aussi peroxydase de classe III, catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols en présence du peroxyde d'hydrogène(H_2O_2). **[44]**

Ce sont des hémoprotéines, partagent avec d'autre protéines une structure chimique appelée hème, [35] l'hème des peroxydases est constitué par une métalloporphyrine dont l'ion métallique est le fer ferrique (Fe3+) associe a quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole par quatre liaison de coordination. **[18]** (Fig.III.1.)

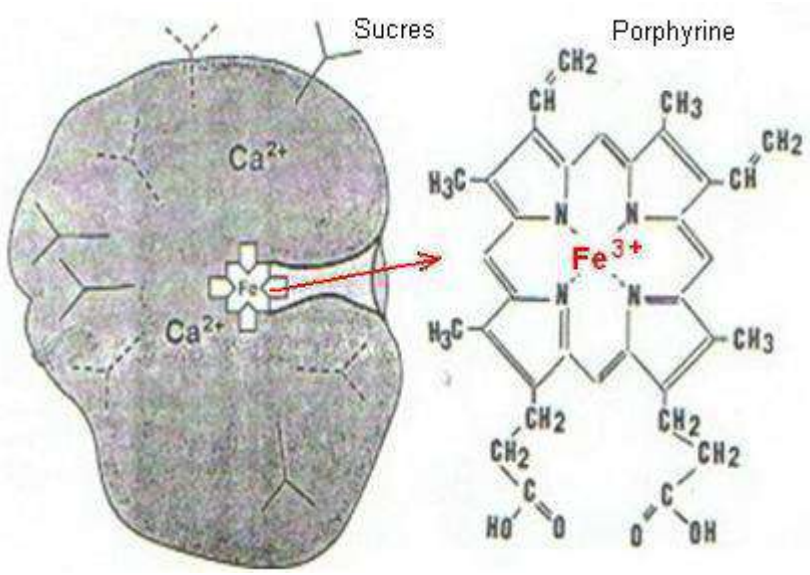


Figure.III.1.Structure de la peroxydase de raifort. **[23]**

III.4.Classification :

On distingue deux grandes familles de la peroxydase : les peroxydases animales, principalement détectées chez les animaux, et, par opposition, les peroxydasses non animales détectées chez les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes.

Les peroxydases non animales sont actuellement sous-divisées en 3 classes **[19], [20]** :

- **Classes I :** contenant la peroxydase des procaryotes tel que : les catalase-peroxydases (CP), les Ascorbates Peroxydases (APX) et les Cytochrome c peroxydases (CcP).

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

- **Classe III :** présentes seulement chez les plantes tel que : raifort (ARMORACIA RUSTICANA), pêche (PRUNUS PERSICA), pomme de terre (ALOCASIA MACRORHIZA), artichaut (CYNARA SCOLYMUS), navet (BRASSICA CAMPESTER RAPIFERA), courgette (CUCURBITA PEPO).

III.5.le site actif et les acides aminés impliqués dans la catalyse :

Les acides aminés His 42, Arg 38 et His 17, sont conservés dans les différentes peroxydases.

Le remplacement de certains acides aminés par mutagénèse dirigée (préparation d'un gène synthétique modifié puis exprimé dans E. Coli) complété par des études cristallographiques et/ou cinétiques fournit des renseignements sur le rôle des différents acides aminés :

- Le remplacement de His 42 diminue toujours l'affinité de l'enzyme pour H_2O_2 et ralentit la réaction.
- Celui de Arg 38 (polaire) par Leu (apolaire) diminue également l'affinité de l'enzyme pour H_2O_2 et surtout pour le 2éme substrat. Ces résidus d'acides aminés semblent directement impliqués non seulement dans la formation des complexes avec les 2 substrats mais aussi dans la réaction proprement dite.
- Le cas de Asn 70 est intéressant, son remplacement par Val entraine une baisse de V_M de plus de 90٪ .Cela peut être expliqué en considérant qu'entre Asn 70et His 42 il peut avoir une liaison hydrogène qui ne peut s'établir entre Val 70 et His 42. Cette perte diminuerait la réactivité de His 42 et changerait sa position dans l'espace.
- Les ions $Ca2^+$, pourtant assez éloignés du site actif, sont indispensables pour une catalyse efficace car ils participent indirectement au martien de l'intégralité structurale du site. Ils sont intégrés à un réseau de liaison qui passe par His 48, l'hémine et His 170. **[11]**

  La figure. (III.2) pourra montrer en détail les interactions structurales entre un substrat et la peroxydase :

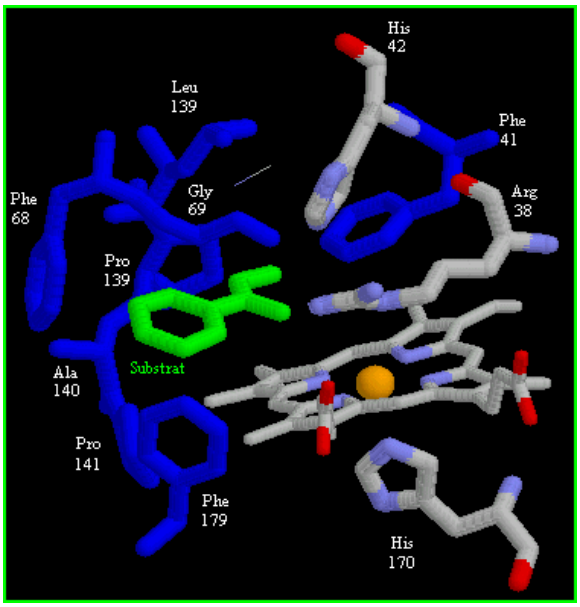


Figure.III.2. Site actif et les acides aminés impliqués dans La catalyse. **[45]**

Le substrat est logé dans une poche dans laquelle il oriente d'une part son cycle apolaire vers la partie hydrophobe (coloré en bleu) constituée par les Ac amines Ph179, Pro141, Ala 140,
Pro139, Phe68, Gly69 (+une portion de l'hémine) et d'autre part ses parties polaire vers His42 et Arg 38, à proximité du fer.

III.6.Cycle catalytique de peroxydase :

La plupart des Hèmes de peroxydase suivent le schéma sur **Figure. (III.3)**, Tout d'abord, un équivalent de peroxyde d'hydrogène réagit avec l'enzyme pour donner le composé I, c'est-à-dire un cation radical porphyrine, l'enzyme réagit avec un atome de fer tétravalent.

Cela constitue une réaction d'oxydo/réduction ou le H_2O_2 est réduit en H2O et l'enzyme est oxydé. Un équivalent oxydant réside sur le fer, générant le oxyferryl (FeIV=0) comme intermédiaire. Le composé I oxyde le substrat pour donner le radical ($^{\cdot}$AH).Il subit une seconde oxydation générant 1.

Le composé II qui contient un centre oxyferryl cordonné a un ligand porphyrique normal (dianionique). Finalement, le composé II est réduit à l'état ferrique natif. La charge nette du composé I est+1 alors que celle du composé II est neutre. **[46]**

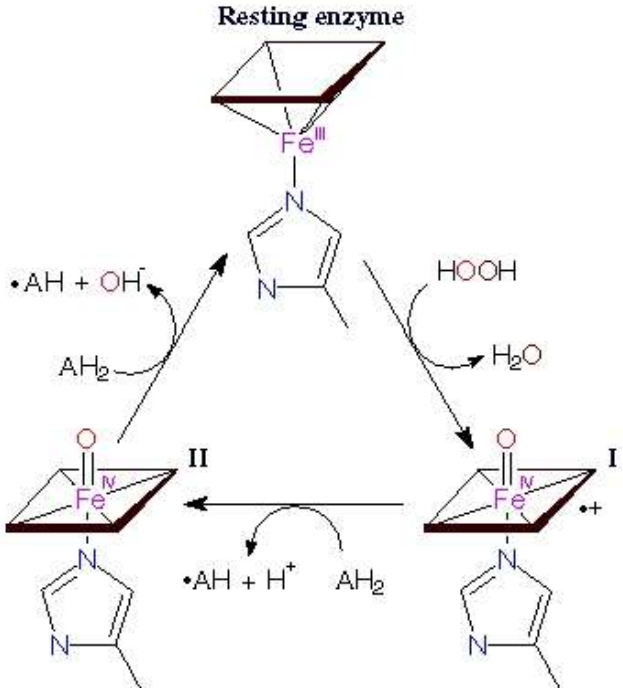
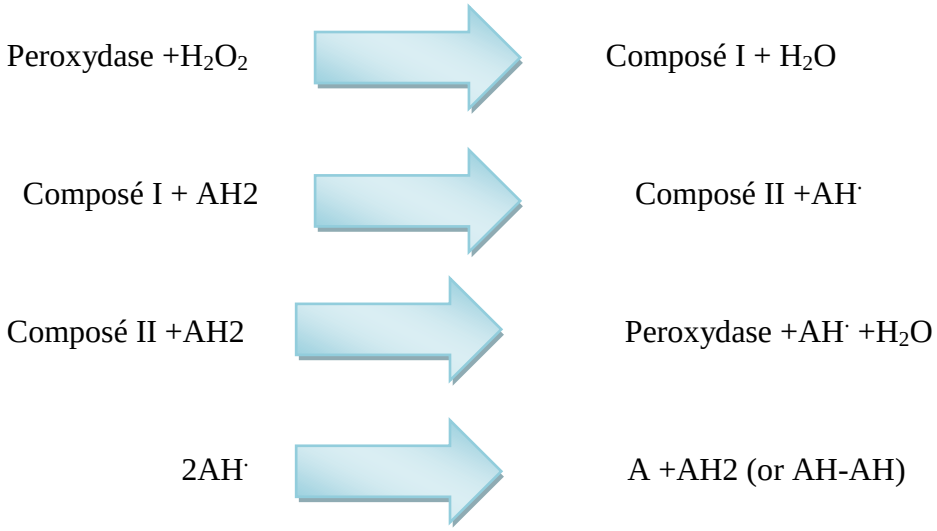


Figure.III.3. Le Cycle catalytique de peroxydase **[23]**

Ce cycle peut être simplifié par les réactions d'oxydoréduction :



En cas d'excès de H_2O_2



III.7.Rôle de Peroxydase :

Ce type d'enzyme unique dans les cellules vivantes a notamment pour fonction de décomposer les peroxydes toxiques générés par les stress oxydatifs (peroxydes dérivés de l'oxygène, hydropéroxydes, peroxy-nitriques).

Les peroxydases assurent aussi d'autres fonctions.

- Certaines interviennent dans le métabolisme de l'iode et sont nécessaires à l'élaboration des hormones thyroïdiennes. D'autres participent au transfert du chlore dans certaines cellules du système immunitaire, permettant ainsi la production d'hypochlorite OCl (eau de Javel) servant à la destruction des microorganismes ingérés.
- Chez l'homme, la glutathion peroxydase est une peroxydase contenant de la sélénocystéine. Elle utilise du glutathion comme électron donneur et est active avec le peroxyde d'hydrogène et un substrat organique hydropéroxyde.
- En biologie végétale, les peroxydases, parfois appelées "isopéroxydases", sont des isoenzymes qui catalysent l'oxydation des composés phénoliques aux dépens du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)[3]. Les peroxydases jouent un rôle dans la synthèse des parois des cellules des végétaux. Les plantes en ont également besoin pour fabriquer la lignine (constituant du bois). À l'inverse, la lignine est exclusivement dégradée par certaines moisissures car elles seules disposent des peroxydases appropriées (champignon de la pourriture blanche du bois) [combinées avec la dégradation des autres composants du bois,

Ex. par les cellulases]. D'autres microorganismes utilisent des peroxydases pour fabriquer des antibiotiques**. [43]**

III.8.Les application de la peroxydase :

- **Décoloration des colorants synthétiques :**

A nous jours, plus de 100 000 colorants commerciaux existent dans les marchés internationaux, avec une production de plus de 7.105 tons par an **[22]**. La résistivité et les propriétés de ces colorants **[21]** (colorants plus stables et résistant à toute attaque microbienne ou à l'oxydation) **[23],** rendent les méthodes traditionnelles de traitement insuffisantes et inefficaces.

Plusieurs autres ont montré que la destruction des composés est stimulée de façon significative par des enzymes oxydatives. Ces colorants dans leurs structure des arrangements aromatique ce qui leurs fait des substrats agréables pour les différentes types de la peroxydase. Récemment, Bhunia et al. (2002), ont été montré que la peroxydase de raifort HRP peut être efficace dans la dégradation et la précipitation des colorants azoïques important, tels que le Remazol et le rouge Cibacron. **[21]**

- **Traitement des composés phénolique :**

Les peroxydases sont connues aussi pour polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que le phénol et les phénols substitués (qui sont largement présents avec des concentrations variables dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autre industries, y compris les plastiques, textiles, fer, acier et les industries forestières), selon la réaction de polymérisation suivante **[21]** :



Les voix enzymatiques de traitement des phénols des eaux résiduaires offre un degré élevé de spécificité, de l'exploitation dans des conditions douces, et de la vitesse élevée de la réaction. La majorité des rapports sur la détoxification des eaux usées contaminées par des phénols, les crésols, et les phénols chlorés, ont utilisé HRP. Récemment, des nouvelles sources de la peroxydase comme le soja et le navet ont été proposés pour la dégradation des phénols. **[17]**

- **Synthèse organique :**

Les radicaux libres produits par le cycle catalytique de la peroxydase peuvent participer aux différentes réactions post-enzymatiques. La polymérisation oxydante des composés aromatiques par les oxydoréductases a été étudiée pour crées des nouveaux polyméries fonctionnels et pour synthétiser des résines phénoliques. Cela peut être réalisé sans l'aide de formaldéhydes toxiques, qui doivent être utilisés dans la polymérisation chimique. **[21]**

- **Biocapteurs à base du Peroxydase :**

Un domaine qui offre un grand potentiel pour les applications de la peroxydase comprenant les biocapteurs électrochimiques.

Récemment, les électrodes à base de la peroxydase ont été utilisées dans les systèmes d'analyse pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et les hydro-peroxydes organiques. Sous l'état immobilisé, avec une enzyme produisant du peroxyde d'hydrogène, ils peuvent être exploités pour la détermination du glucose, des alcools, glutamate et la choline.

- **Application pour analyse et diagnostique :**

  Le lactose contenu dans les produits laitiers est déterminé par différentes méthodes analytiques nécessitant des personnes formées et des instruments sophistiqués tels que un spectrophotomètre, les biocapteurs, etc.

  Sharma et al (2002), a mis au point un BIOSTRIP simple et économique pour l'estimation de lactose en immobilisant la

  β-galactosidase, le BIOSTRIP est plongé dans du lait ou un produit laitier et la couleur développée a partir d'un chromogène ajouté, est utilisée pour estimer le lactose dans la gamme de concentration <20-100g/l. **[21]**

- **Des produits cosmétiques protecteurs de la peau :**

  La peau utilise un ensemble de mécanismes protecteurs les plus étudiés est le système de pièges a radicaux libres. Les pièges à radicaux libres aident à protéger la peau en neutralisant les substances dangereuses qui peuvent être produites par l'exposition au soleil et la pollution.

  La peroxydase qui provient d'un extrait aqueux de fenouil (Foeniculum Vulgare) a la capacité de réduire l'érythème provoque par les UV.la capacité de réduire l'érythème est une mesure des capacités apaisantes, qui peuvent aussi être considérées comme une capacité à piéger les radicaux libres. Lorsque la peroxydase est présente, elle peut agir pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène, apportant ainsi un spectre total de protection contre les radicaux libres**. [16]**

- **Marquage les trajets des neurones :**

  Les techniques de la coloration permettent de mettre en évidence les connexions entre structures nerveuse distantes. La peroxydase du raifort (ou HRP) est un traceur rétrograde d'usage courant utilisé pour établir les trajets extrêmement complexes des neurones dans le système nerveux. Après avoir été injectée, la HRP est absorbée par les extrémités des axones et est transportée de façon rétrograde jusqu'au corps cellulaires. L'animal est ensuite sacrifié et l'on détermine, à l'aide de techniques histologiques, l'emplacement des éléments colorés. Cette méthode a notamment permis d'élucider l'organisation des voies visuelles. **[25]**

IV.1Matériels et produits :

IV.1.1.Source de la peroxydase : l'enzyme de la peroxydase est obtenue d'un navet (BRASSICA CAMPESTER RAPIFERA), disponible dans le marché algérien.

IV.1.2.Equipements :

- Centrifugeuse.
- Spectrophotomètre UV-visible
- Agitateur magnétique
- Mixeur
- Balance
- Etuve
- Thermomètre
- Chronomètre
- Bain-marie
- PH-mètre

IV.1.3.Verreries :

- Tubes à essai
- Fioles jaugées (10, 20, 50, 100, 250,1000 ml)
- Pipettes (1, 2, 5, 10 ml)
- Erlenmeyers
- Eprouvettes (50 ml)
- Cristallisoir.
- Béchers.

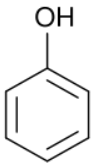
IV.1.4.Réactifs :

Les expériences menées dans le cadre de cette recherche, dans diverses conditions ont nécessité les produits de qualité analytique suivante :

- Acetone (**C_3H_6O , M = 58, 0791 g/mol**).
- Héptane(…)
- Solutions tampons de pH 2 à 10.
- Peroxyde d'hydrogène (**H_2O_2, M= 34.01g/mol).**
- Chlorure de calcium (**$CaCl_2$, M = 110,984 g/mol**).
- Alginate de sodium (**M= 198,1059 g/mol**).
- Glucose (**$C_6H_{12}O_6$ M= 180, 1559 g/mol**).
- 4aminoantypiryne (**$C_{11}H_{13}N_3O$, M=203,27g/mol**).
- ferricyanide de potassium **(K_3 [Fe(CN)$_6$], M=329,244g/mol).**

- La glutaraldehyde :
- **Peroxyde d'hydrogène :**
  - **Formule :** H_2O_2.
  - **Masse molaire :** 34.01g/mol.
  - **Densité à 20°C :** 1.11.
  - **Pureté** : 30%.
  - **Point de fusion** :-33°C.
  - **Point d'ébullition** : 108°C.

- **Phénol :**
  - **Formule brute:** C_6H_6O.
  - **La formule développée :**



  - **La masse molaire :** 94,1112 ± 0,0055 g/mol
  - **T° fusion** : 43 °C
  - **T° ébullition** : 182 °C
  - **Solubilité** : 98 g/L d'eau
  - **Masse volumique** : 1,073 $g \cdot cm^{-3}$

IV.1.5.Dispositifs expérimentaux :

Trois montages, ont été utilisés pour la réalisation de purification de la peroxydase dans cette étude :

IV.1.5.1.Dispositif de purification par l'acétone :

Ce montage comprend une burette de 50ml contient, en dessous de la quelle se trouve un erlenmayer pour contenir l'extrait à purifier placé dans un cristallisoir contenant du glaces. Pour une meilleure homogénéisation de mélange l'ensemble est mis sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique (FIG.IV.1).



FIG.IV.1 : Dispositif de purification par l'acétone

IV.1.5.2.Dispositif de purification sur gel : Ce système est simple, il est constitué d'une burette (1x25cm) contenant le gel (phase stationnaire), La phase mobile est alimentée en continue par l'intermédiaire d'un perfuseur placé en dessus de la colonne (FIG.IV.2)



FIG.IV.2 : Dispositif de purification sur gel

IV.1.5.3. Dispositif de L'agrégation dans la glutaraldehyde : Ce montage comprend un bécher contenir l'enzyme à agrégé placé dans un cristallisoir contenant du glaces. Pour une meilleure homogénéisation de mélange l'ensemble est mis sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique (FIG.IV.3).



Fig. IV.3. Dispositif de L'agrégation dans la glutaraldehyde

IV.2.Méthodes expérimentales:

IV.2.1.Extraction et purification de la peroxydase :

IV.2.1.1.Extraction : Mettre 100g de navet (coupée en morceau) dans un mixeur après avoir épluché avec 200 ml d'eau distillée. Le mélange ensuite Filtrer avec la gaze **.**L'extrait obtenu est considère comme une source de la peroxydase brute, il est conservé immédiatement sous 4°C pour des utilisations ultérieures.

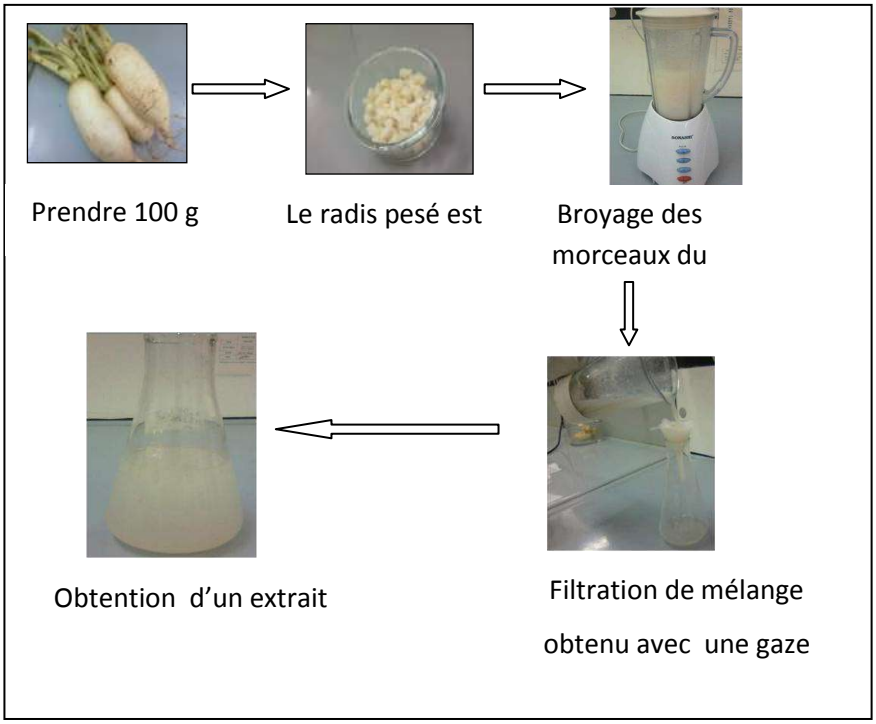


FIG.IV.3 : Protocole d'extraction de la peroxydase

IV.2.1.2.Purification de la peroxydase par l'acétone :

La purification par l'acétone a été réalisé e utilisant le dispositif 1; 200 ml de l'acétone (85٪) pré-refroidi est ajouté a 200 ml de l'extrait brute. Les étapes de la purification sont expliquées dans la figure ci-dessous (FIG.IV.4)



Le dispositif de purification de l'extrait brut de navet par l'acétone

Après 2 heures dans le

Réfrigérateur

Il se forme un précipité



Centrifugation de l'extrait purifié à 3000 rpm pendant 15 min





Récupération de culot qui se trouve au fond de tube.



Dissolution de culot dans 20 ml de tampon pH 6.0 ; la solution obtenue est l'EEPP

FIG.IV.4 : Protocole de purification par l'acétone [50].

IV.2.1.3. Purification de la peroxydase sur gel sephadex :

Il s'agit ici d'une séparation des protéines selon leur taille en utilisant un tamis moléculaire. Cette technique est appelé aussi la chromatographie d'exclusion ou la filtration sur résine Sephadex.

Le sephadex est un gel de dextrane (polymère de glucose produit parleuconostoc mesenteroïdes). Il se présente sous forme de billes poreuses, très hydrophiles et gonflent dans l'eau.

- **Comment choisir de la résine adéquate pour la séparation de la peroxydase :**
  Le type de gel est e fonction du son domaine de fractionnement
  (Exprimé en termes de masse moléculaire), à l'intérieur de cette marge, les molécules peuvent être séparées les unes aux autres (voir Annexe 1).

  Comme la peroxydase possède un poids moléculaire environ
  40 000DA, la résine adéquate pour la séparation est SephadaxeG100 DONT LE domaine de fractionnement est de 4000 A 150 000DA.

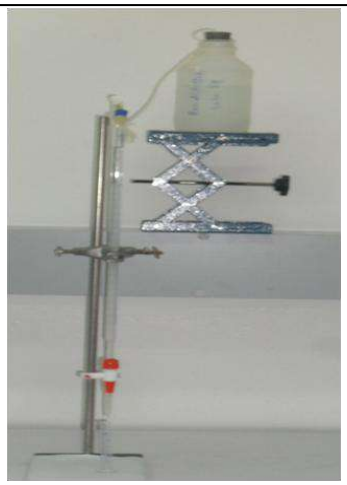
- **Comment préparer la résine sephadex G100 :**
  Avant de procéder à l'analyse des échantillons, la préparation de la phase stationnaire exige une attention particulière. Il est essentiel d'obtenir un gel homogène et parfaitement régulier.
  La première étape consiste a faire gonfler le gel avant son utilisation pour ce 2g de résine poudre est dissoute dans 40 ml d'une solution tampon (PH 6), a une température ambiante, pendant 72 h. Une fois le gel est gonflé est dégazé, il est coulé dans une colonne (1 x 25 cm) et équilibrée avec la phase mobile qu'elle s'agit de même tampon pendant 15 minutes.

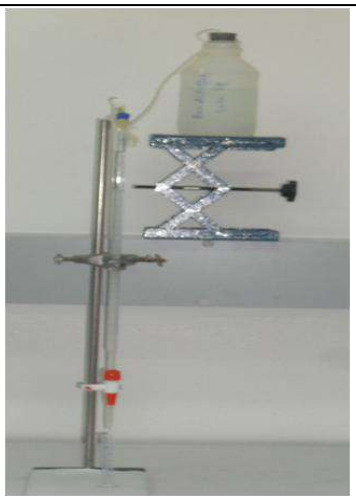
- **Protocole de la purification :**

5 ml d'extrait brut est injecté à l'intérieur de la colonne (dispositif 2) à l'aide d'une seringue. Après la diffusion de tout l'extrait dans le gel, on commence son élution par la phase mobile (tampon PH6). Le débit d'élution est maintenu lent et constant à 13.2ml/l. Pour augmenter l'efficacité de la séparation. Les différentes étapes de cette purification sont expliquées sur la figure suivante (FIG.III.5)

Chaque fraction récupérée a été analysé par spectrophotomètre

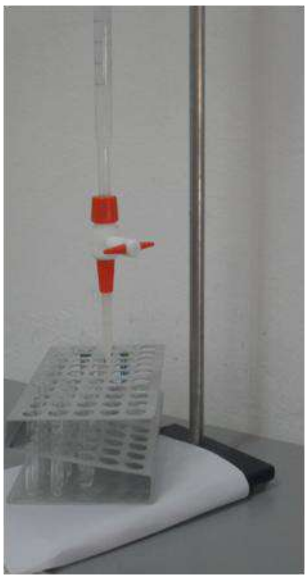
UV-visible, sous une longueur d'onde de 280nm, afin de doser les protéines contenant dans l'extrait. Ensuite, et pour localiser l'ordre de fraction de la peroxydase, nous avons testé l'activité catalytique de chaque fraction selon le protocole d'activité enzymatique de a peroxydase.





1-Injection de 5 ml d'extrait brut dans la colonne

Récupération de culot qui se trouve au fond de tube.



Dissolution de culot dans 20 ml de tampon pH 6.0 ;
la solution obtenue est l'EEPP

FIG.IV.5 : Protocole de purification sur gel Sephadex.

IV.2.2.Caractérisation et dosage d'activité enzymatique des extraits :

Après chaque étape de purification, l'activité totale de la peroxydase, la quantité totale des protéines, l'activité spécifique, le rendement en activité et le facteur de purification sont déterminés.

IV.2.2.1. Mesures de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique des extrait a été dosée en se basant sur la réaction entre le phénol et la peroxydase d'hydrogène en présence de 4-Amino-antipyrine et la peroxydase, le produit formé au cours de cette réaction est un chromogène de Quinoneimine **[42]**

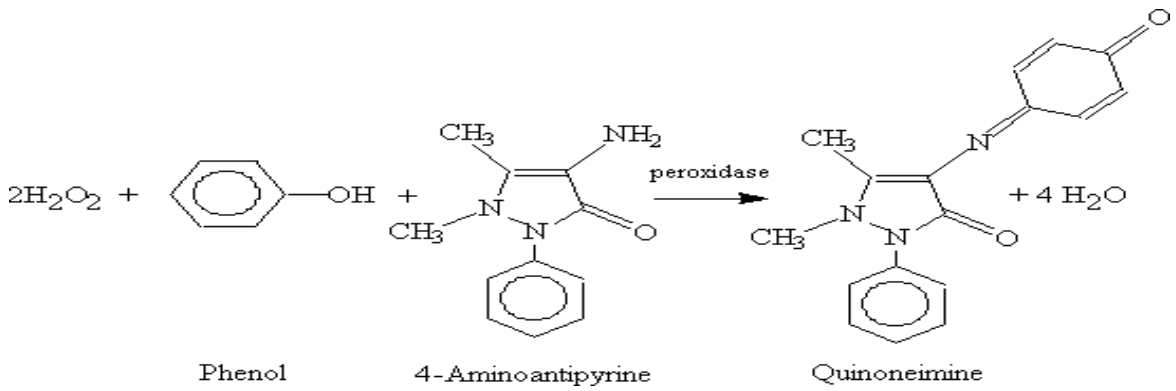


FIG.IV.6. Réaction entre le phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase.

La Quinoneimine présente des caractéristique d'absorption particulières dans la gamme visible a une langueur d'onde maximale de 512 nm ce qui permet de mettre en œuvre une technique de mesure d'activité enzymatique en continu, la vitesse initiale est alors déterminée a partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe obtenue.

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

- 1ml de H2O2 a 0.1 M.
- 1ml de phénol a 0.1 M.
- 1ml de 4-Amino-antipyrine a 0.01M
- Compléter le volume jusqu'un trait de jauger par une solution tampon PH 6.

➢ placer 4ml de mélange réactionnel préparé précédemment dans des tubes a essai.
➢ Ajouté 0.2ml d'EEB/EEPP/EEP ; agiter par retournement entre le pouce et l'index.
➢ Placer rapidement le mélange réactionnel dans la cuve de spectrophotométre.
➢ Lancer la cinétique, par la mesure de densité optique avec un pas de 10 secondes. L'intensité de la couleur est convertie en concentration en utilisant un coefficient d'extinction de 2564 µmole/ml basé sur le peroxyde d'hydrogène (voir annexe II)

IV.2.2.2.Dosage de la quantité des protéines :

La quantité des protéines totale de chaque extrait (brute, partiellement purifié par acétone, purifie sur gel) est réalisée par la méthode de Bradford **[46].**Cette méthode est basée sur le changement de la couleur de bleu de coomassie en fonction de la concentration des protéines.

La concentration est déterminée à l'aide d'un courbe étalon de sérum d'albumine bovin SAB, en ajoutant 0.1 ml de sérum à différentes concentration à 5 ml du réactif de bleu de coomassie. La densité optique de chaque échantillon sera observée en mesurant l'absorbance à 590nm

IV.2.2.Etude de l'agrégation de la peroxydase purifie sur gel et la peroxydase purifie par l'acétone dans la glutaraldehyde :

Dans les buts de mettre en évidence les conditions optimales de l'agrégation de la peroxydase libre, une étude a été mise en jeu. Cette étude comprend :

L'effet de la concentration de glutaraldehyde

L'effet la concentration d'enzyme

L'effet du temps de contact

L'effet de la vitesse d'agitation

Remarque : dans cette étude on a reçue a réalisé que l'agrégation de la peroxydase purifie par l'acétone parce que :

L'enzyme est pure et très lège par rapporte l'enzyme pareillement purifiée, il ne servira pas de faire une agrégation parelle.

Donc cette étude a été réalisée seulement avec l'enzyme purifié avec l'acétone.

$$A_a(UI/ml)=A_{initial}-A_{finale}$$

$$R\,(\%)=\frac{A_{initiale}-A_{finale}}{A_{initiale}}\times 100$$

IV.2.2.1. L'effet de la concentration de la glutaraldehyde :

Pour réalisé cette essai, on varie le volume injecté de la glutaraldehyde

(0.2 ,0.4 ,0.6 ,0.8 ,01) ml tout en gardant le même volume final du mélange réactionnel (11 ml) par la réduction du volume de la solution tampon PH 6

- Le volume d'enzyme injecté est 1 ml
  La réaction est réalisée dans les conditions suivantes :
  Température : 4°C,

Durée : 3 h,
L'agitation : 200 tpm,

IV.2.2.2. L'effet de la concentration d'enzyme purifiée par l'acétone :

Dans cette étude on fixe la concentration de la glutaraldehyde optimisé, et on varie le volume d'enzyme injecté (0.5 ,1 ,1.5, 2, 2.5) ml, tout en gardant le même volume final du mélange réactionnel (11 ml) par la réduction du volume de la solution tampon PH 6 et les autres paramètres sont constant (Température : 4°C, durée : 3 h, l'agitation : 200 tpm)

IV.2.2.3. L'effet du temps de contact :

L'agrégation a été réalisée par les valeurs optimales de la concentration de la glutaraldehyde, et de la concentration d'enzyme déjà trouvés,

Les paramètres physiques sont fixés à 4°C pour la température et PH =6, durée : 3 h,

L'agitation : 200 tpm.

La démarche expérimentale consiste à varier le temps du déroulement de la réaction allons d'un temps de 1h jusqu'un 5h avec un pas de 1h.

IV.2.2.4. L'effet de la vitesse d'agitation:

Dans l'objectif du développement d'un procédé enzymatique industriel, il est utile de savoir si l'agitation peut avoir un impact sur l'agrégation de la peroxydase.

L'influence de la vitesse d'agitation a été étudiée avec des mélanges de :

- 0.6 ml de la glutaraldehyde
- 1 ml d'enzyme purifiée par l'acétone

On complète le volume à 11ml avec La solution tampon PH=6,
Température : 4°C, et la durée optimale :
La vitesse d'agitation est variée entre 100 et 500 tpm avec un pas de 100 tpm

IV.2.3.teste d'activité de la peroxydase de forme agrégat :

L'agrégat testé a été formé dans toutes les conditions optimales déjà trouvé, et l'agrégat formé a été observé avec le microscope (x4 et x10) de grossissement.

Remarque : les solutions de H_2O_2 et phénol, utilisé pour testé l'enzyme de forme agrégat sont préparé dans l'acétone et l'heptane.

IV.2.3.1 la détermination du temps nécessaire pour la mesure de la vitesse de réaction :

Pour testé la réaction de dégradation de phénol, en mesurant la variation de concentration de phénol en fonction du temps afin de déterminer la duré de la réaction permettant d'atteindre le seuil maximal de la réaction. Toutes les conditions physico-chimiques étant fixées.

- Prendre 8 tubes à essai, et introduire dans chacun :
  - 1 ml de H_2O_2 (0.2mM).
  - 1 ml de phénol (0.2mM).
  - 2.8 ml de solution tampon de pH=6.pour l'enzyme libre et 2.8 ml de solvant organique (pour l'enzyme réticulé)
- Mesurer la densité optique initiale.
- injecter 0.2 ml d'enzyme (libre et 0.4g pour de forme agrégat) dans chaque tube.
- incuber les tubes dans l'étuve à température T = 30°C.
- et chaque 15 min centrifuger les contenus des tubes.
- Prendre 2.4 de surnageant, ajouter 0.3 de ferricyanide de potassium (83.4 mM) et 0.3 de 4-AAP (20.8mM).
- mesurer la D.O de chaque solution.
- L'intensité de la couleur est convertie en concentration en utilisant un coefficient d'extinction de 2564 µmol/ml basé sur le peroxyde d'hydrogène (voir annexe II)

IV.2.3.2. Influence de la concentration initiale de phénol (enzyme libre et agrégé):

Pour faire une comparaison entre les deux types d'enzyme, il faut déterminer K_M et V_M pour chaque type. Le même protocole est maintenu sous les conditions fixées de température (30°C) et de concentration initiale en peroxyde d'hydrogène $[H_2O_2]_0$=0.2 mM,

Et on variée seulement la concentration de phénol $[phénol]_0$: de 0.04à 0.28mM avec un pas de 0.04mM. (Les concentrations des réactifs sont données en tenant compte du volume total du mélange réactionnel).

Le rendement d'activité est calculé avec l'équation suivant :

$$R\,(\%) = \frac{DO_{initiale} - DO_{\ finale}}{DO_{initiale}} \times 100$$

IV.3.3.4.Analyse spectrale des produits de dégradation :

- **Test d'absorbance dans le domaine visible des solutions récupérées :**
  Le phénol est caractérisé essentiellement par ça capacité à absorber la lumière dans la gamme visible (250-550) nm, afin d'assurer que le liquide récupéré après le traitement par l'enzyme agrégé n'a pas les propriétés des composes phénoliques, on a effectué un spectre d'absorption comparative entre le phénol et son surnageant obtenue après le traitement enzymatique dans la gamme visible.

Les mélanges réactionnels étaient préparés sous les conditions précédentes et le liquide surnageant après le traitement était récupéré, ensuite son spectre d'absorption était établi dans la gamme visible.

Conclusion générale et Perspectives

Tout au long de cette étude, nous avons optimisé l'agrégation d'enzyme par la glutaraldehyde,

Qui permet de mettre on ouvre la peroxydase extraite à partir d'une culture locale de

Navet "BRASSICA CAMPESTER RAPIFERA" active dans un milieu organique.

Dont notre objectif a consisté d'une part, sur la comparaison entre les deux méthodes de purification d'extrait brut. D'autre part nous nous somme intéressés a l'optimisation des conditions de l'agrégation de l'enzyme, par la glutaraldehyde, et on termine avec le test d'activité de l'agrégat obtenue.

- **La première partie : Purification d'extrait brut**

  La technique chromatographique de purification sur gel Sephadex G100 semble techniquement la plus rationnelle comparé a la précipitation par acétone. Cette technique a permet d'obtenir un extrait purifier possédant une activité spécifique relativement élevé voisin de 19.5 UI/ml et caractérisé par une concentration en protéine 13 fois plus inférieure que celle d'extrait brut. En plus, l'efficacité de purification de notre colonne

  est 61.5%

- **La deuxième partie : Optimisation de l'agrégation**

  Les essais ont montré que le procédé d'agrégation de enzyme est simple et permet de mis en ouvre des biocatalyses active dans un milieu organique.

  D'après cette étude ont a montré que toute les conditions de ce procedé peuvent influer l'immobilisation d'enzyme, les conditions optimales trouvé pour réalisé un agrégat efficace (active, plus stable …) sont :

- La concentration d'enzyme dans le milieu est (1 ml= 0.407 UI/ml)
- La concentration de l'agent d'agrégation : glutaraldehyde est de 0.8 ml
- La vitesse d'agitation est de 200 tpm.
- Le temps de contacte est 3 h.

Le teste d'activité de l'agrégat est réalisé par l'étude de la cinétique de dégradation de phénol (Le phénol utilisé pour le teste d'agrégat est préparé dans l'acétone et l'heptane), pour les

deux type d'enzyme (libre et immobilisé). Cette étude permet de déterminer le temps nécessaire pour le déroulement de la réaction :

- 15 min seulement pour l'enzyme libre.
- 50 min pour l'enzyme immobilisé.

On constat que l'immobilisation avec le glutaraldehyde, a provoqué des modifications sur les propriétés cinétique de l'enzyme en produisant une élévation du temps de réaction, pour 0.2mM phénol.

En outre, la variation de concentration de substrat (phénol) a montré l'applicabilité de modèle de Michaeils –Menten.

La linéarisation de Lineweaver- Burk pour touts les concentrations initiale, permet d'une part de vérifie le modèle cinétique de Michaelis-Menten, et d'autre part de déterminer les constantes cinétiques (Vm, Km) pour faire une comparaison pareille entre les deux type d'enzyme : on a trouvé pour cette étude :

V_{Max}=19.6, K_M= 0.439, pour l'enzyme libre

V_{Max}=9.4, KM=24.18, pour l'enzyme agrégé et le phénol préparé dans l'acétone.

V_{MAX}=11.2, KM= 30.83, pour l'enzyme libre, et le phénol préparé dans l'heptane.

- **En perspectives**

Le présent travail a permis d'avoir une large idée sur l'utilisation de l'enzyme agrégé dans un milieu organique, il est donc intéressent de poursuivre l'étude en traitant les points suivants :

- ✓ Utilisation des techniques biochimiques plus avancées, pour caractériser la peroxydase de navet, et précisément pour identifier les acides aminés incluent dans la rétuculation.
- ✓ L'optimisation des paramètres pour réaliser l'agrégation avec l'enzyme purifié sur gel.
- ✓ Testé l'activité des agrégats dans d'autre solvant, et optimisé la concentration de phénol et de H_2O_2, ainsi que la température, et le PH de milieu pour augmenté le rendement de dégradation de phénol.
- ✓ Extrapolation de ce procédé a grande échelle, peut êtres une solution très intéressante, du point de vue économiques pour les substrats de nature organique, surtout pour un pays très riche en tous de navet comme l'Algérie.

V.1.Purification est dosage de l'activité enzymatique :

V.1.1.Purification de la peroxydase sur gel Sephadex :

Le profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 de l'extrait brute révèle deux pics d'élution comme le montre la figure suivante (FIG.V.1) dont seul le premier pic est doué d'une activité catalytique.

La colonne de (25x1cm), Q=12.5ml/h, le volume des fractions est 1 ml

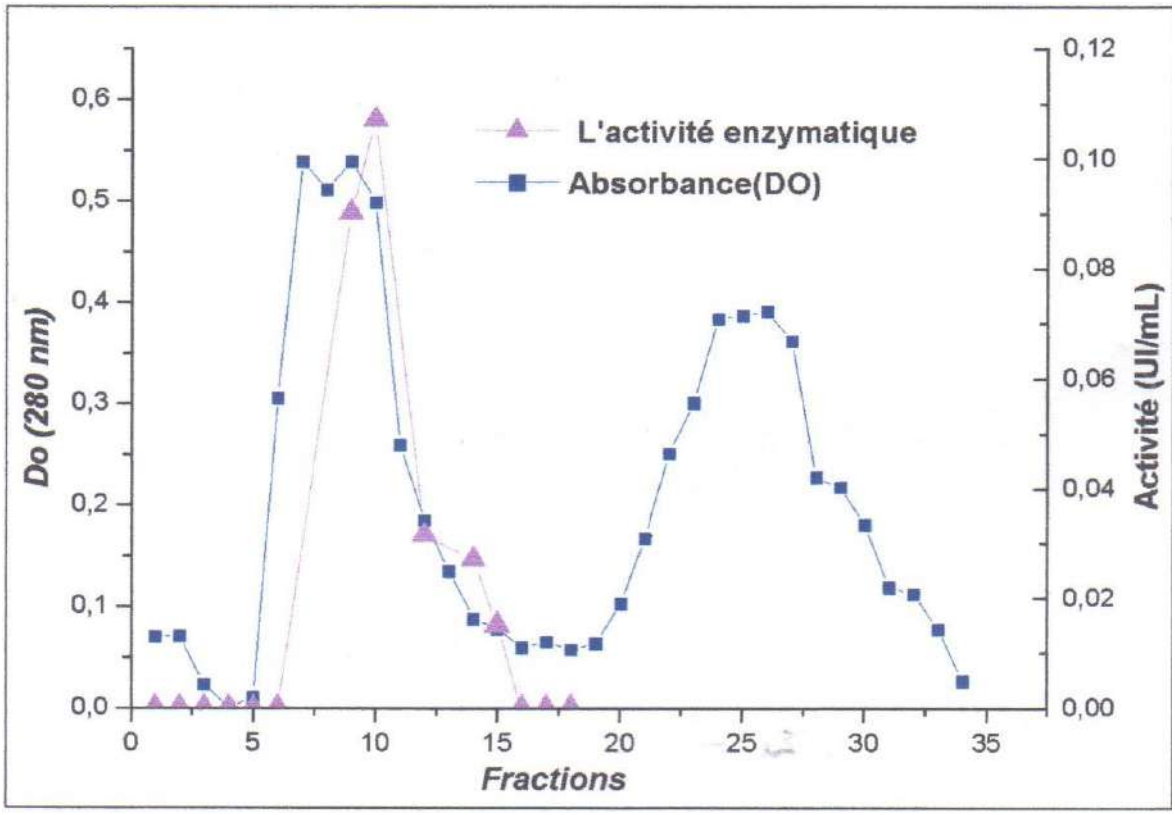


FIG.V.1 : Profil d'élutions de la peroxydase de navet purifié sur

Une résine Sephadex G-100.

On constate d'après le profil que l'enzyme commence a éluer entre les fractions 7 et 14 après 13.67 de la diffusion d'extrait dans le gel.

Le deuxième pique représente les protéines inactives qui se trouvent dans le navet, leur élution donne un pique large relativement par apport au celle de la peroxydase ce qui montre que ces protéines se trouvent avec une grande proportion.

Les fractions douées d'une activité catalytique sont rassemblées puis ont subit un teste d'activité pour calculer l'activité résiduelle de la peroxydase purifié sur gel.

V.1.2.Dosage de la quantité des protéines totales des extraits :

La courbe d'étalonnage de protéine SAB obtenue est la suivante :

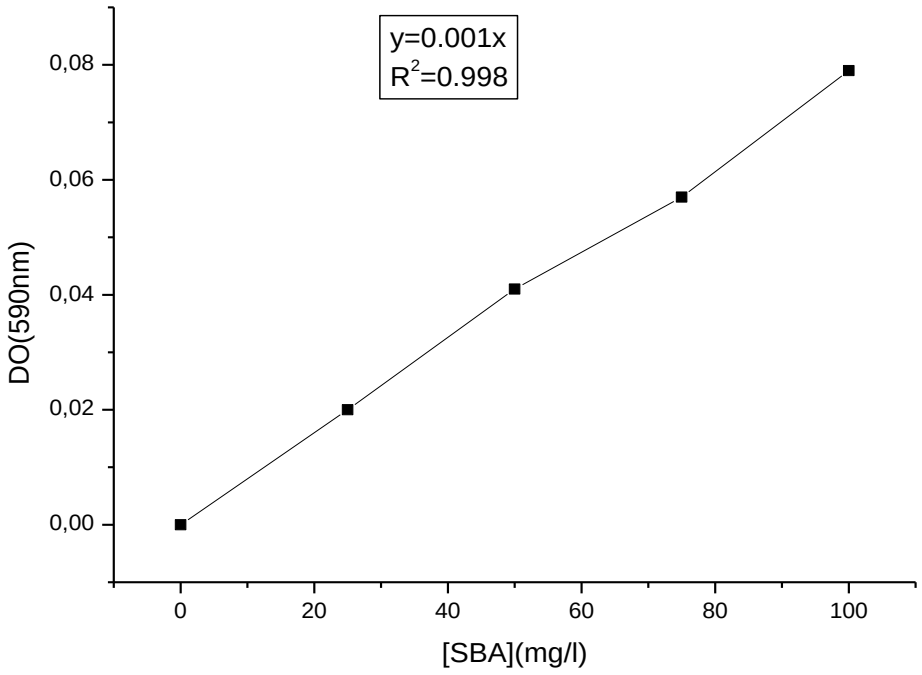


FIG.V.2 : Courbe d'étalonnage de protéine SAB.

V.1.3.Effet de la méthode de la purification sur l'activité catalytique de la peroxydase : concentration saturation

Activité enzymatique : Vmax (µmol/ml min=UI) dans des conditions optimales de température de PH de concentration saturation en substrat et en absence d'inhibiteurs, est la quantité de peroxydase qui transfère 1 µ mol du peroxyde d'hydrogène par minute donc cette activité est calculée a partir de la relation suivante :

$$AE=\frac{\left(\frac{dc}{dt}\right)x\ volume\ \ de\ melange\ \ réactionnel}{volume\ \ d'enzymeinject\ \ é} \textbf{ [28]}$$

La résultat de l'activité enzymatique comparaisons entre les deux protocoles de la purification en se basant sur les et la quantité des protéines totales contenant dans les extraits aussi sur trois autres paramètres qui sont :

- Activité spécifique $=\frac{AE}{[prot\ éine]}$
- Le rendement de purification : est la proportion, en%, de la quantité de la protéine purifiée qui reste par rapport a la quantité initiale$=\frac{AEi}{AEo}$
- Le degré de purification : est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport a la première étape) durant chacune des autres étapes de la procédure $=\frac{Acivit\ é\ spésifique\ \ i}{Activit\ é\ spécifique\ \ 0}$

  L'évolution de la concentration du chromogène du Quinoneimine produit au cours des réactions de dosage de l'activité enzymatique des trois extrait en fonction du temps donne les allures représentés sur la figure (FIG.V.3)

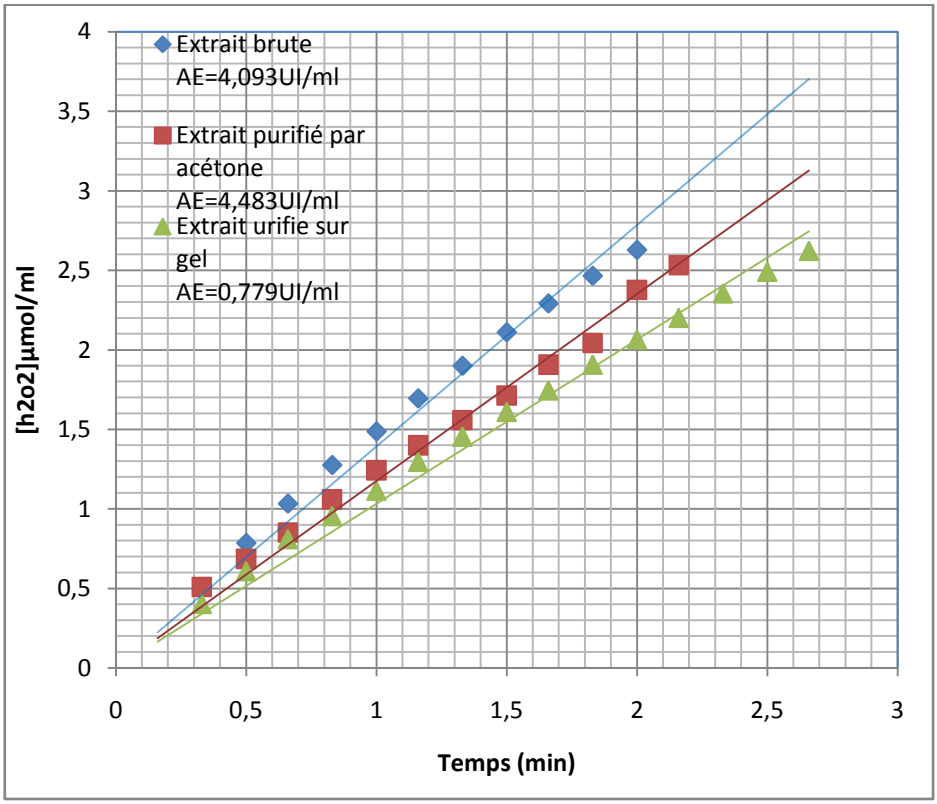


FIG.V.3 : Activité enzymatique des trois extraits.
(PH=6, T=25 °C, volume d'enzyme injecté=0.2ml)

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau .v.1.Bilan compare la purification de l'extrait brut

L'extrait	Activité (UI/ml)	Protéine (mg/ml)	Volume totale (ml)	Activité Totale (UI/ml)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	Rendement	degré de purification
(EB)	4.093	0.525	100ml	409.3	52.5	7.79	100%	1
(EPP)	4.483	0.337	20ml	89.66	6.7	13.33	22%	1.7
(EP)	0.779	0.040	20ml	15.6	0.8	19.5	7.5%	2.5

L'extrait Brut : EB

L'extrait Partiellement purifié par acétone : EPP

L'extrait Purifié sur gel : EP

Les résultats montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir de la culture de navet (BRASSICA CAMPESTER RAPIFERA) est caractérisé par une activité catalytique brute de 4.093 UI/ml.

Par ailleurs et a travers les deux méthodes antérieurs de purification, il a été conclu que l'étape de la purification par acétone de l'extrait enzymatique brut étudiée n'a pas provoquer une grande chute dans son activité contrairement au celle de la purification sur gel.

Cependant, il ressort de bilan protéique que la purification sur gel manifeste le plus grand intérêt et permet d'éliminer environ 92% des protéines non actives.

Nous avons enregistré une augmentation du degré de purification de l'ordre de 1.5 contre0.7pour la purification par acétone. Cependant, le rendement en activité chute à 7.5%.

D'où, il s'avère que l'emploi de chromatographie d'exclusion dans le processus de purification semble être plus prometteur d'obtenir une protéine de plus en plus pure, ayant une activité spécifique de plus en plus élevée.

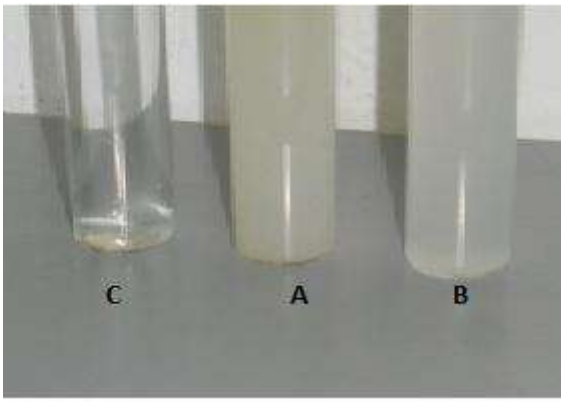


FIG.V.4: Aspect des trois extrait ((A)= l'extrait brut, (B)=l'extrait pareillement purifié par acétone, (c) =l'extrait purifié sur Gel).

V.1.4.Efficacité de la colonne :

L'efficacité de purification de notre colonne est calculée en se basant sur les valeurs de l'activité spécifique d'extrait brut et celle purifié sur gel.

$$\eta = \frac{Aspécifique\ d'EP - Aspécifique\ d'EB}{Aspésifique\ d'EP} \text{X100}$$

$$\eta = \frac{19.5-7.5}{19.5} \text{ x100 } = 61.5\%$$

V.2. Etude de l'agrégation de la peroxydase purifie par l'acétone et la peroxydase purifie sur gel dans la glutaraldehyde :

V.2.1. L'effet de la concentration d'enzyme purifiée par l'acétone :

La concentration initiale d'enzyme a un effet important sur l'activité de la formation des agrégats actifs.

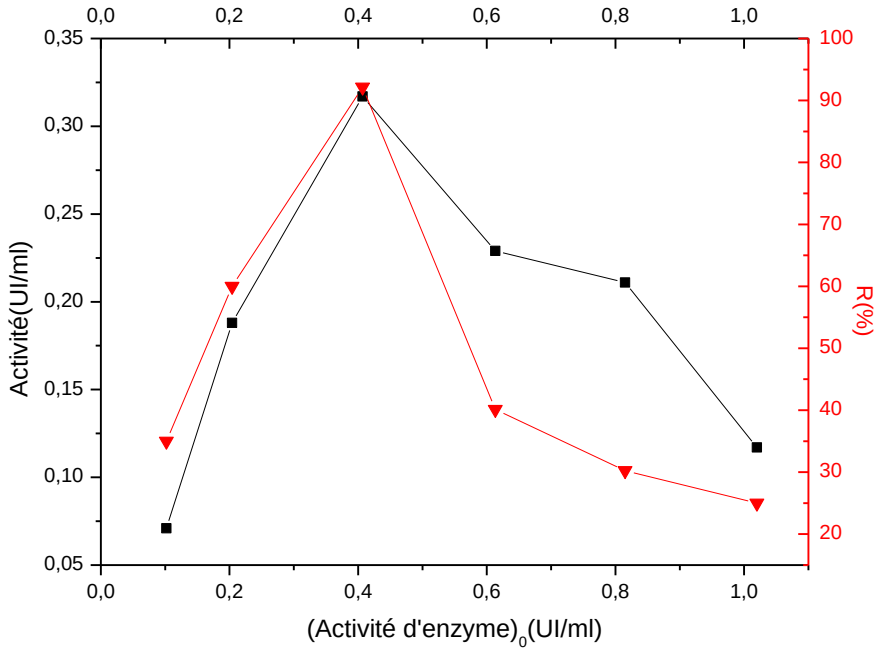


Fig .v.5. L'effet de la concentration initiale d'enzyme sur l'agrégation

(T=4°C, PH=6, glu= 0.6ml, t=3h, l'agitation=200tpm)

Comme on le voit sur la figure (Fig. V.5.) L'activité enzymatique de CLEA, et le rendement d'agrégation augmente avec l'augmentation de la concentration d'enzyme jusqu'un l'ajout de 1 ml d'enzyme ou l'activité et le rendement sont maximal : 0.317UI/ml, 92.15%.

Après l'activité et le rendement d'agrégation diminue avec l'augmentation de la concentration d'enzyme ajouté c'est a cause de l'accumulation des molécules d'enzymes, les sites actif de ce dernier peut être isolé par l'agrégation au hasard de molécule qui conduire a une diminution de l'activité.

Un résultat pareille a été détecté par plusieurs auteurs par l'utilisation de peroxydase de raifort (HRP) ;H Aytran et al (2008)) a étudié l'agrégation par la glutaraldehyde il est trouvé une

maximum d'agrégation pour une concentration d'enzyme pure 0.05 mg/ml, et une concentration plus élevé engendre une diminution de l'activité de l'agrégat formé **[30]**.

V.2.2. L'effet de la concentration de la glutaraldehyde :

L'optimisation de la concentration d'enzyme n'est suffisante pour atteindre une activité de (CLEA) élevé et un rendement maximal

Les molécules de glutaraldehyde bifonctionnelle a été utilisé pour la réticulation physique de molécules d'enzyme, donc la variation de la concentration en glutaraldehyde est assez efficace pour L'activité CLEA (enzyme agrégé).

Dans cette étude la concentration d'enzyme est conservé constant (1ml : 4.483UI/ml), nous avons représenté la variation du rendement d'agrégation et l'activité d'agréation formé en fonction de la concentration de glutaraldehyde Sur la figure (Fig. V.6.).

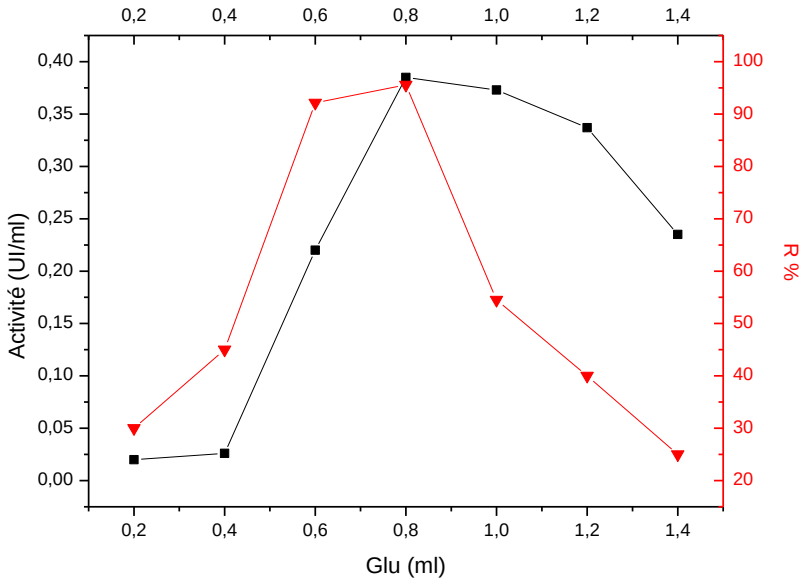


Fig. V.6. L'effet de la concentration de la glutaraldehyde sur l'agrégation d'enzyme

(T=4°C, PH=6, AE(EPP)=0.407UI/ml, t=3h, l'agitation=200tpm)

La courbe suivante montre que chaque concentration de glutaraldehyde peut affecter l'agrégation d'enzyme.

Lorsque le volume de glutaraldehyde est 0.8ml, le rendement d'agrégation, et l'activité de CLEA ont la valeur maximale (0.385 UI/ml ,94.59%)

Et pour les volumes de glutaraldehyde inferieur à 0.8 ml l'activité et le rendement sont faible a cause de la perte d'enzyme dans le milieu.

Au même temps pour les valeurs supérieures a 0.8 ml de glutaraldehyde on un bassement d'activité et de rendement d'agrégation a causse de la formation au hasarde des agrégats du à la concentration de glutaraldehyde élevé par rapport la concentration d'enzyme dans le milieu. Ce résultat a été déjà rapporté par des autres études sur la peroxydase de différente source et Glucose oxydase (Falconer et al, 2011). **[31]** ont trouvé que le volume de glutaraldehyde est 0.72 ml pour une concentration d'enzyme de 350 mg/ml

V.2.3. L'effet du temps de contact :

L'étude l'effet du temps de contacte permet de déterminer le temps nécessaire pour la formation des agrégats,

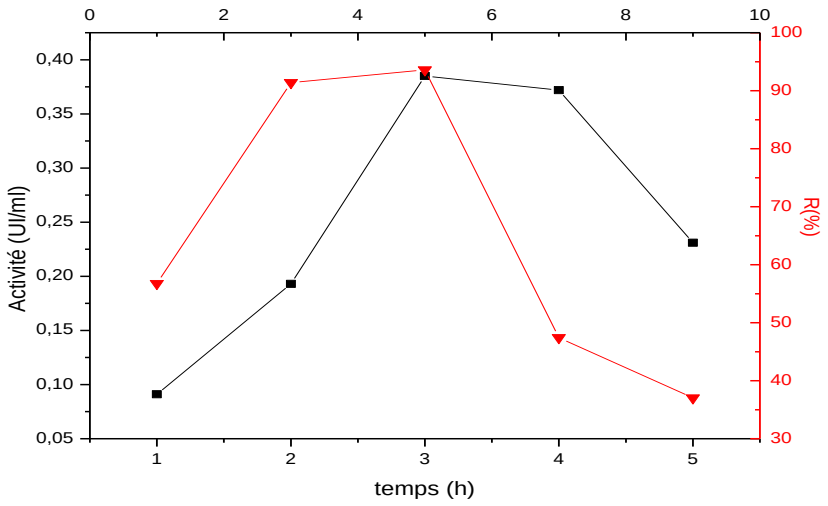


Fig. v.7. L'effet du temps de contact sur l'agrégation d'enzyme

(T=4°C, PH=6, AE(EPP)=0.407UI/ml, glu=0.6 ml, l'agitation=200tpm)

De cette courbe nous pouvons constater que :

La courbe est croissante jusqu'un un temps optimale qui correspond a 3 h ou le rendement et l'activité des agrégats atteindre des valeurs maximales (94.59%, et 0.385 UI/ml).

Puis elle descendante pour des valeurs de temps supérieur a 3h.

La raison d'augmentation de rendement d'agrégation et l'activité des agrégats aux temps inferieure a 3 h est due a la formation des agrégats on continue au bout de cette période mais après la formation des agrégats ces dernies nécessite un temps de stabilisation pour il garde leur conformation finale, se qui explique la diminution de rendement et d'activité de CLEA dans 4h, et 5h, a cause de l'agitation on continu qui influé sur la conformation des agrégats déjà formé.

V.2.4. L'effet de la vitesse d'agitation: L'agrégation c'est un procédé d'immobilisation qu'il faut réaliser avec une enzyme native,

La vitesse d'agitation est un permettre important parce que :

-elle influe sur la conformation native d'enzyme.

-elle déstabilise les agrégats formés.

-elle influe le contacte entre l'agent d'agrégation et l'enzyme.

L'étude de ce permettre est représenté dans la figure (Fig. V.8.)

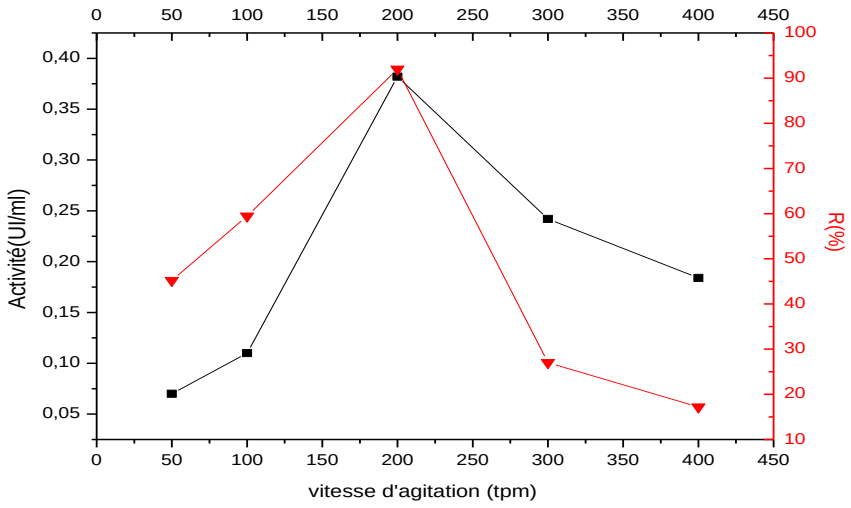


Fig. V.8. L'effet de la vitesse d'agitation sur l'agrégation d'enzyme

(T=4°C, PH=6, AE(EPP)=0.407UI/ml, glu=0.6 ml, t=3h)

De cette courbe on peut tirer les remarques suivantes :

Le rendement et l'activité des agrégats formés sont augmenté avec l'augmentation de la vitesse d'agitation jusqu'à 200tpm (activité est de 0.382 UI/ml, et de rendement de 94.3%)

Inferieure a 200tpm le rendement et l'activité sont bas parce que l'agitation est faible ce qui ne permet on pas d'avoir un contacte intime entre l'enzyme et l'agent d'agrégation.

Et comme l'agitation est supérieur a 200tpm, cause une perturbation de la conformation native d'enzyme, et déstabilise les agrégats déjà formé ce qui donne un rendement et une activité d'agrégat base.

V.3. teste d'activité de la peroxydase en forme d'agrégat CLEA :

- **Vue microscopique des agrégats :**

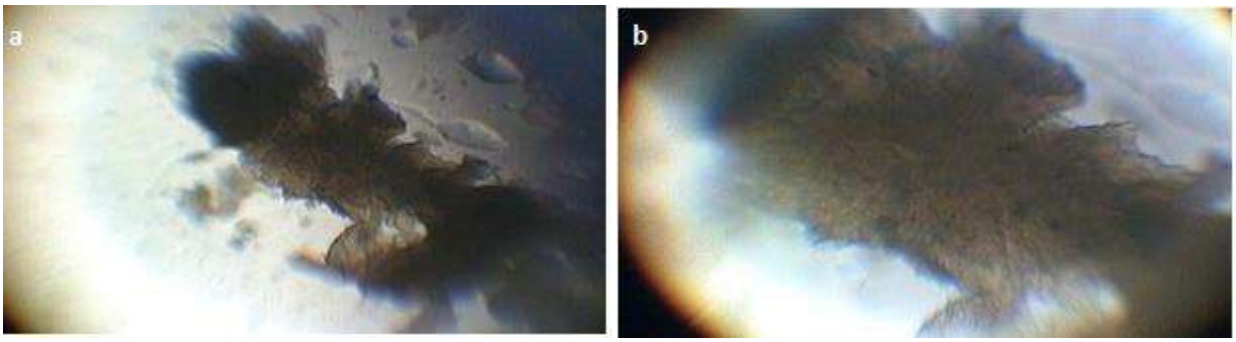


Fig. V.9 : observation microscopique des agrégats forme (a) x4 et (b) x 10.

Ce résultat a été déjà trouvé par des autres études sur la peroxydase de raifort (HRP) ;H Aytran et al (2008). **[30]** ont trouvé la même observation avec le microscope.

V.3.1. la détermination du temps nécessaire pour la mesure de la vitesse de réaction :

***pour l'enzyme libre :** L'évolution des concentrations de phénol avec le temps est représentée sur la figure (Fig. V.10)

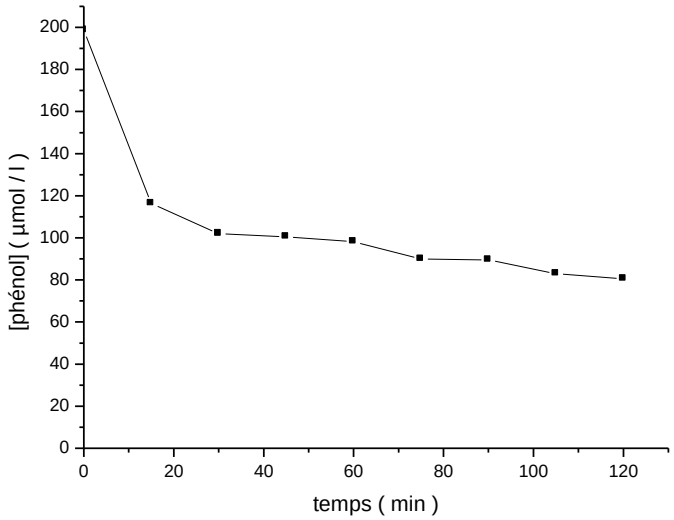


Fig. V.10. Cinétique de dégradation de phénol (pH=6, T=30^0C, [H_2O_2] =0. 2mM, [phénol]=0.2mM, $[EEPP]_0$ =4.483UI/ml).

- La dégradation de phénol par l'enzyme libre est rapide et efficace telle que au bout de 15 minutes on obtient 43% de dégradation de phénol.
- Dans un premier temps (16 min), la concentration de phénol varie linéairement avec le temps. La vitesse de réaction $\frac{d[phénol]}{dt}$ est constante définissant la vitesse initiale V_o ($V_{0\ phénol}$= 5.48µmol/L.min).Suite à cette période initiale, la courbes accèdent progressivement à un plateau ou un équilibre, Une valeur constante de la concentration de phénol sera obtenue (100µmol/L). Cet équilibre est traduit principalement par l'épuisement de milieu en molécule de H_2 O_2 et d'enzyme.

N.B : La vitesse de réaction sera donc mesurée pendant les 16 premières minutes pour la suite de l'étude pour l'enzyme libre.

***pour l'enzyme se forme agrégat :**

L'étude de l'influence du temps de contacte est un pré-requis nécessaire. Le tracé de l'évolution de la concentration résiduelle de l'phénol en fonction du temps, au cours de sa dégradation par la peroxydase donne l'allure montré sur la figure (Fig. V.11)

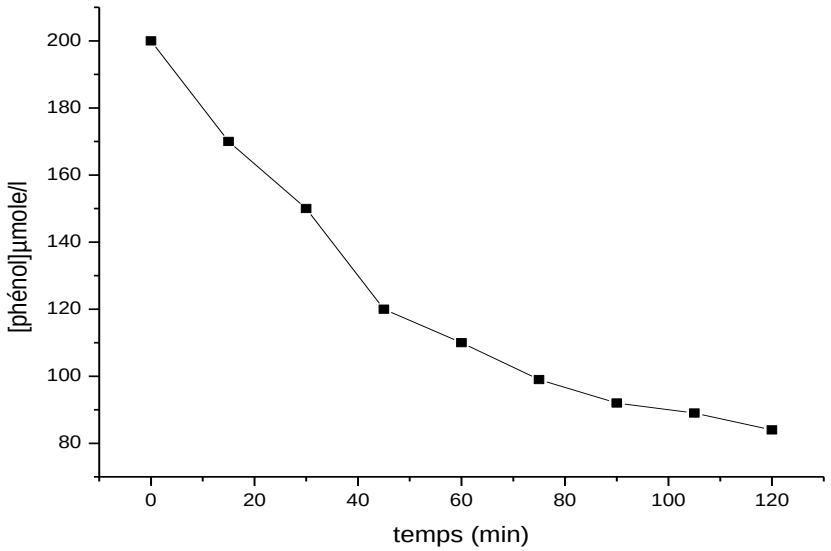


Fig. V.11. Cinétique de dégradation de phénol (pH=6, T=30^0C, [H2O2] =0. 2mM, [phénol]=0.2mM,).

Pour les solvants utilisé dans cette études (acétone et l'heptane), on a trouvé presque les mêmes valeurs de vitesse de dégradation de phénol, ce qui explique que les solvants n'a aucune effet sur l'activité d'enzyme agrégée.

De la mise en contact des agrégats de la peroxydase avec le phénol, résulte une dégradation .A mesure que le temps s'écoule, la quantité de phénol dégradé augmente.

La figure montre que contrairement a l'enzyme libre, l'équilibre n'apparait pas et la vitesse initiale de la réaction est mesurée dans l'intervalle de temps [0-50] minutes.

Cette vitesse est égale à (0.412mg/min (acétone) ,0.401mg/min (pour contre1.759 mg/min avec l'enzyme libre dans les mêmes conditions opératoires (H2O2 (0.2mM), phénol (0.2mM)).

Ce déclin est du au taux de diffusion qui affecte la cinétique intrinsèque de l'enzyme. La vitesse a la quelle le substrat passe a travers le réseau tridimensionnel de glutaraldehyde affecte l'épaisseur de film de diffusion, qui a son tore détermine la concentration du substrat dans le voisinage de l'enzyme et donc la vitesse de la réaction.

On plus dans les réactions enzymatiques réalisées en phase solvant organique, l'enzyme n'est pas solubilisée au niveau moléculaire, mais elle est en suspension.

La réaction chimique a donc lieu au voisinage de l'enzyme dans une réaction à l'interface hydrophile (l'enzyme) / hydrophobe (le solvant organique) qui est ainsi formée.

Une conséquence importance de cette interface est la quasi-disparition des phénomènes d'inhibition par le substrat ou par le produit que l'on peut rencontrer dans les réactions enzymatiques réalisées en milieu aqueux. **[32]**

N.B : a partir de ce résultat, la mesure de la vitesse initiale de la réaction pour la suite de l'étude sera effectuée dans les premiers 50 minutes.

V.3.2. Influence de la concentration initiale de phénol (enzyme libre et agrégé):

***pour l'enzyme libre :** Les représentations des allures V_0= f [phénol] et R (%) =f [phénol] peuvent être constatées sur la figure (Fig. V.12):

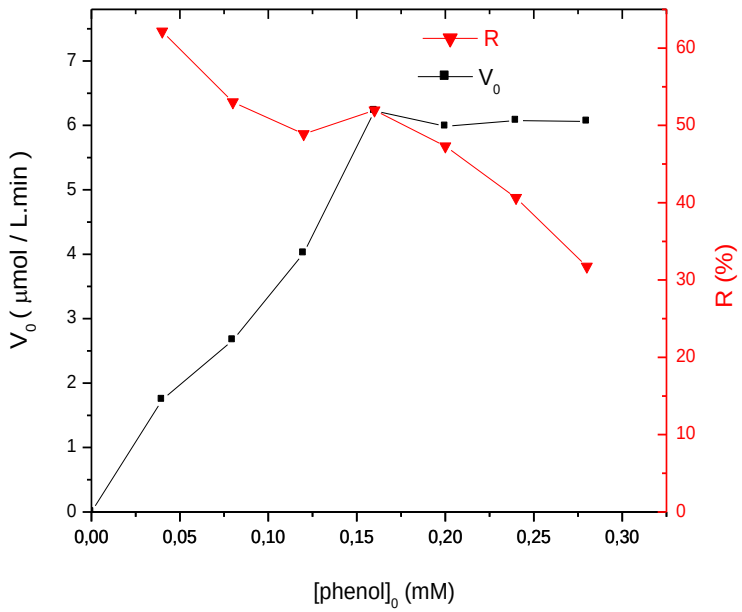


Fig. V.12. Effet du $[phénol]_0$ sur la vitesse et le rendement de dégradation avec la peroxydase

(T =30°C, pH=6, $[H_2O_2]_0$=0.2 mM, $[EEPP]_0$=4.483, t= 15 min)

La courbe du rendement et de la vitesse s'évoluent dans des sens opposés, tel que plus la concentration de phénol présente dans le milieu réactionnel est faible plus que la dégradation est maximale.

Les vitesses mesurées croissent en fonction des concentrations de phénol. Mais cette relation n'est pas linéaire : le graphe de cette fonction est une hyperbole. Lorsque la concentration de phénol est nulle la vitesse est évidement nulle. Cette évolution corrobore avec le modèle de Michaeils –Menten.

Quand la concentration de phénol est inferieur à 0.15mmole/l la vitesse est approximativement proportionnelle à la concentration en substrat. Dans ce cas, la cinétique enzymatique est voisine d'une cinétique du premier ordre. Au-delà de 0.15mmole/l la vitesse ne dépend pratiquement pas de la concentration en substrat, la cinétique tend vers une cinétique d'ordre zéro et l'hyperbole se rapproche de son asymptote, C'est-à-dire que la peroxydase est devenue totalement saturée par les substrats.

L'intersection des deux courbes (vitesse, rendement) définie la concentration optimale de phénol qu'est égale a 6.18µmole/l pour la quelle on a un rendement de 51%

- Le comportement cinétique d'une enzyme est déterminé par les valeurs de V_{max} et $K_{M.}$ qui seront déterminés par la linéarisation du modèle de Michaeils –Menten en double inverse appelée encore courbe de Lineweaver-Berk ($1/_{V0}$ en fonction de $1/[phénol]_0$) :

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right) \frac{1}{[phénol]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

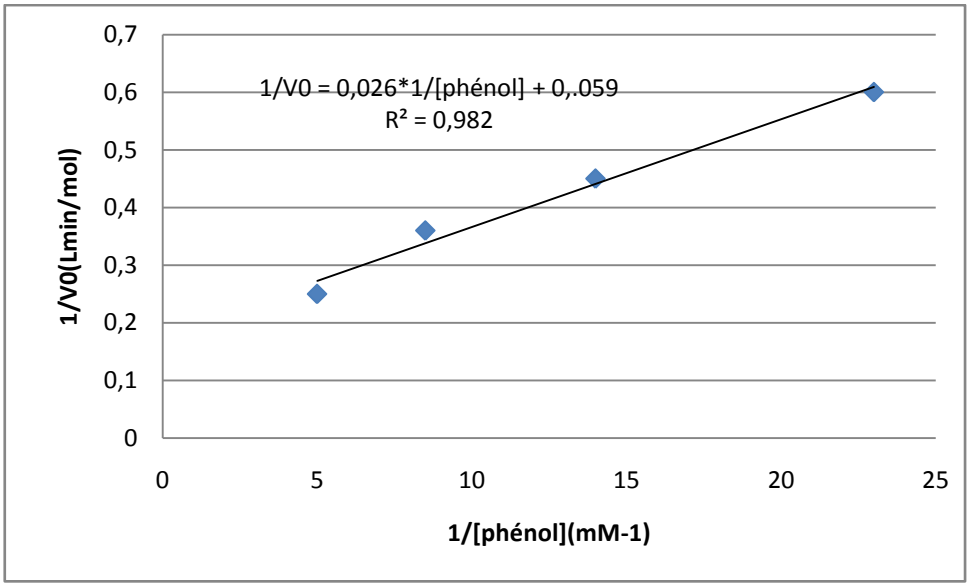


Fig. V.13. Représentation de Lineweaver- Burk enzyme libre ($1/V_0$=f ($1/[phénol]_0$)

Cette représentation (Fig. v.12) est une droite de pente $\frac{K_M}{V_{max}}$ qui coupe l'axe des $\frac{1}{V_0}$ au point $\frac{1}{V_{max}}$ et l'axe des $\frac{1}{[phénol]_0}$ au point ($-\frac{1}{K_M}$). Ces courbes ont des propriétés représentées dans le tableau suivant :

Tableau. V.2. Détermination des constantes cinétiques (V_{max} et K_M)

	phénol
Equation	$\mathbf{V_0} = \frac{16.90[phénol]_0}{0.439 + [phénol]_0}$
V_{max} (µmol/L.min)	16.90
K_M (mM)	0.439
Affinité ($1/K_M$) (mM^{-1})	2.276

***pour l'enzyme se forme agrégat :**

Pour bien maitriser l'effet de l'agrégation d'enzyme sur le processus de dégradation de phénol, on examine l'effet de concentration de phénol sur se dernier.

Pour l'acétone :

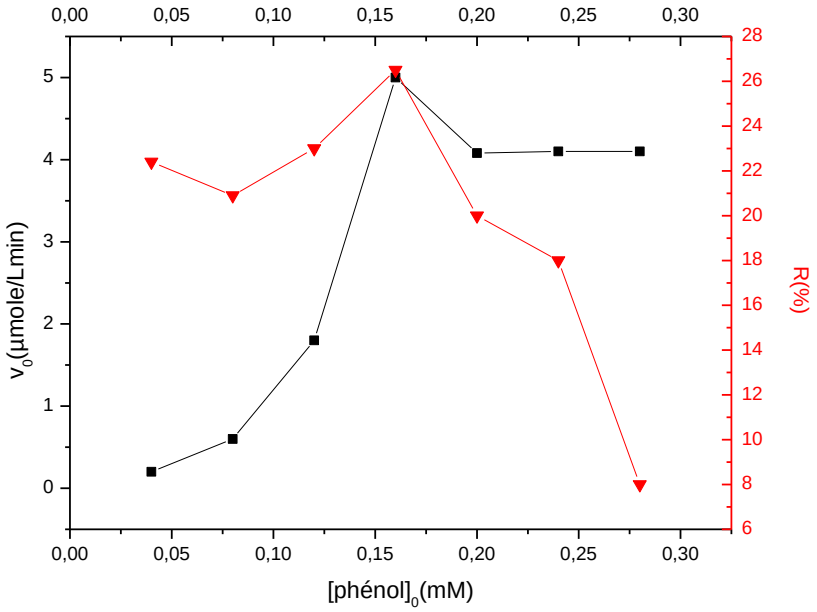


Fig. V.13. Effet du $[phénol]_0$ sur la vitesse et le rendement de dégradation avec la peroxydase

($T = 30°C$, $[H_2O_2]_0 = 0.2$ mM, $t = 50$ min, $m_E = 0.4$g)

Pour l'heptane :

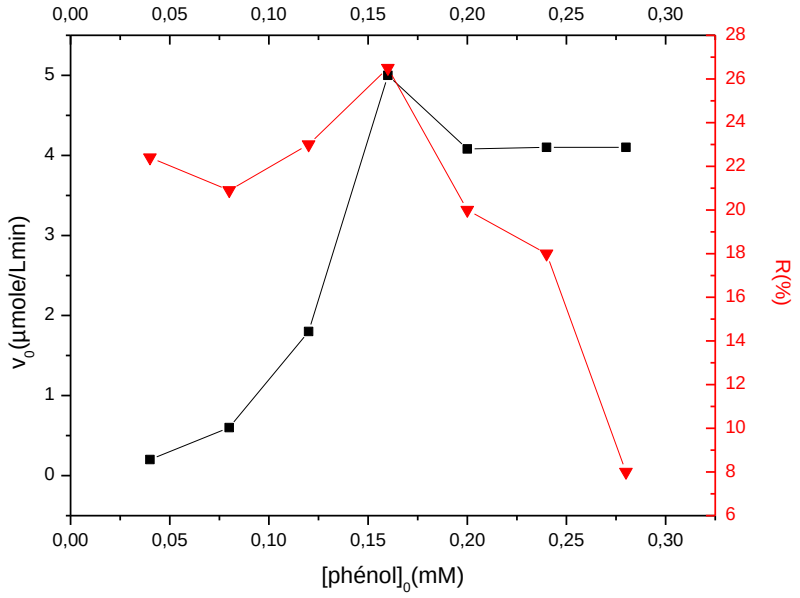


Fig. V.14. Effet du $[phénol]_0$ sur la vitesse et le rendement de dégradation

avec la peroxydase

(T =30°C, $[H_2O_2]_0$=0.2 mM, t= 50 min, m_E=0.4g)

Les courbes obtenues reflètent plusieurs points :

-Le rendement de dégradation est descendent pour les fortes concentrations en phénol

- La concentration optimale de phénol obtenue par l'intersection des deux courbes est, cette valeur démontre l'hypothèse dit que l'enzyme immobilisé se trouve protégée contre les concentrations inhibitrices de son substrat.

Pour les solvants utilisé dans cette études (acétone et l'heptane), on a trouvé presque les mêmes valeurs de vitesse et de rendement qui donne la concentration optimale de phénol (1.3mM) de ce qui explique que les solvants n'a aucune effet sur l'activité d'enzyme agrégée.

L'intersection des deux courbes (vitesse, rendement) définie la concentration optimale de phénol qu'est égale a : -4.5µmole/l pour la quelle on a un rendement de 26.5% pour l'acétone.

-5µmole/l pour la quelle on a un rendement de 26.3% pour l'heptane.

-La courbe de vitesse correspondante a une hyperbole, elle varie également selon le modèle de Michaeils –Menten. Elle présente deux point intéressants pour l'étude comparative avec l'enzyme libre : La Vmax et Km. afin de déterminer leurs valeurs, on procède toujours avec la linéarisation de Lineweaver- Burk on rend l'inverse de l'équation de Michaeils –Menten

(Fig. V.15) et (Fig. V.16).

Pour l'acétone :

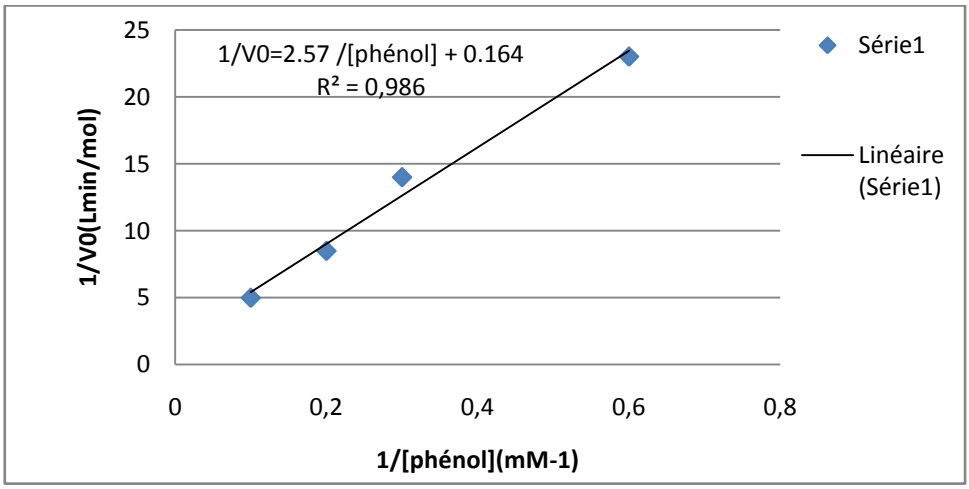


Fig. V.15. Représentation de Lineweaver- Burk enzyme immobilisé

$(1/V_0=f\ (1/\ [phénol]_0)$

Pour l'heptane:

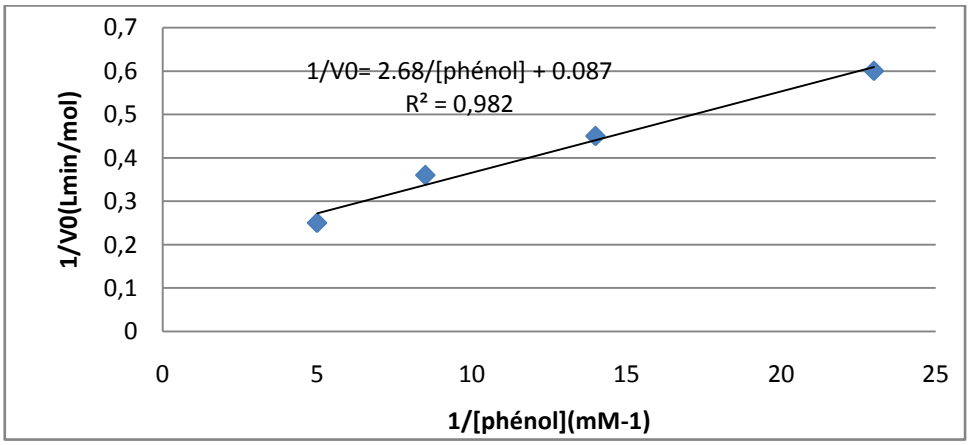


Fig. V.16. Représentation de Lineweaver- Burk enzyme immobilisé

$(1/V_0=f\ (1/\ [phénol]_0)$

La linéarisation du tracé de $1/V_0$en fonction de 1/[phénol], pour touts les concentrations initiale, permet de vérifie le modèle cinétique de Michaelis-Menten. La pente de la droite obtenue, est équivalente a (K_M/V_M) et son ordonnée a l'origine donne ($1/V_{Max}$), d'où les valeurs de K_M et de V_M son les suivants :

Tableau. V.3. Détermination des constantes cinétiques (V_{max} et K_M)

	Pour l'acétone	**Pour l'héptane**
Equation	$\mathbf{V_0} = \frac{9.4[phénol]_0}{24.18 + [phénol]_0}$	$\mathbf{V_0} = \frac{11.2[phénol]_0}{30.83 + [phénol]_0}$
V_{max} (µmol/L.min)	9.4	11.2
K_M (mM)	24.18	30.83
Affinité ($1/K_M$) (mM^{-1})	0.0413	0.0324

D'après ces valeurs, on constate que la K_M a connue une augmentation remarquable para port a son valeur dans l'étude antérieure avec l'extrait libre, et ce revient a la diminution d'affinité entre les molécules de phénol et la peroxydase pour les deux solvants.

V.3.3.Analyse spectrale des produits de dégradation :

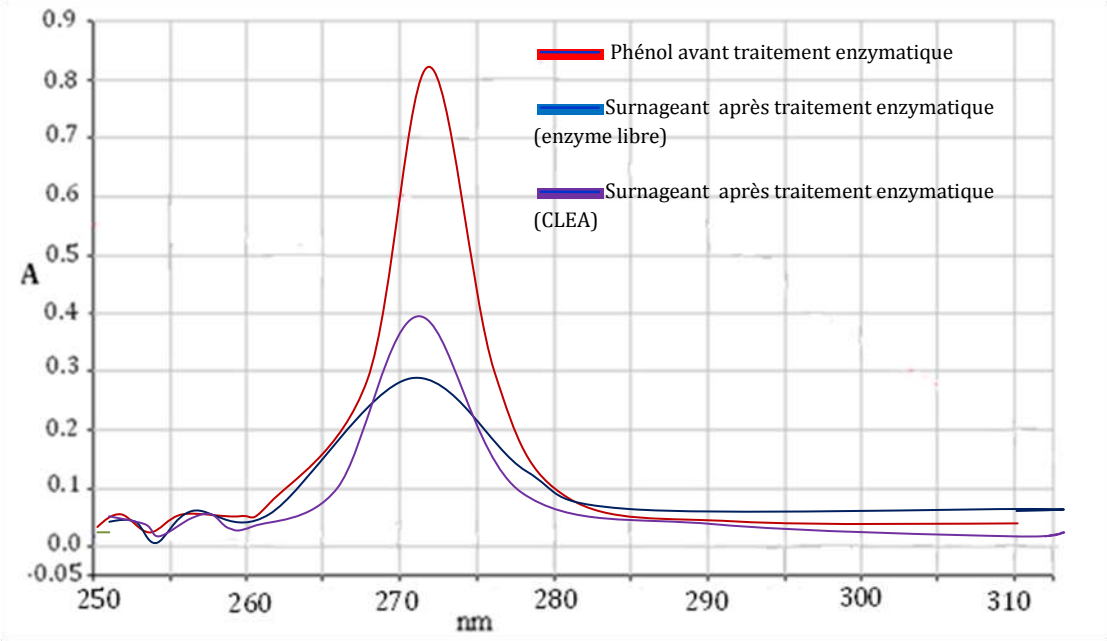


Fig. V.17.Spectres d'absorption dans le domaine visible de phénol et se liquide surnageant obtenue après le traitement par l'enzyme libre (pH=6, T=30°C, $[phénol]_0$=0.16 mM).

L'absorbance initiale de phénol comme le montre la figure (Fig. V.17) est égale 0.819nm, après le traitement enzymatique par la peroxydase libre on remarque la diminution de l'absorbance jusqu'à 0.261nm et de 0.401pour l'enzyme agrégé (CLEA) ce qui montre la dégradation de phénol par l'enzyme de forme agrégat est efficace.

Références Bibliographiques

[1] M.jamin,vasks "cinétique enzymatique" Porthland LTD London (2004)

[2] S.Fabiano «applications a la réalisation des biocapteurs ampérométrique pour le dosage du glucose et des composé phénolique» thèse du magistère, université Claude Bernard, France (2002)

[3] M.Frénot, E.Vierling "Biochimie des aliments: diabétiques du sujet bien portant "centre régionale de documentation pédagogique d'Aquitaine (2001)

[4] B.Augére "les enzymes biocatalyseur protéique" Ellipses édition Marketing S.A. (2001)

[5] J.Borel, A Randoux "Biochimie dynamique" de Boek larcier, département de Boek université .paris Bruxelles (1997)

[6] Ch.Mousserd "Biochimie structural et Métabolique: Médecine, pharmacie, science" Edition France agricole (2003)

[7] B.charpenter , F.Hamon-Lorleach, A.Harlay, L.Ridoux,S.Chanselle "Guide de préparation en pharmacie "Elsevier Masson SAS , ISBN 978-2-294-70290-7,(2008)

[8] E. Robertis"Biologie cellulaire et moléculaire" les presse de l'université laval, Québec

[9] Maloine,SA, Edition, paris.(1983)

[10] Biochimie Structurale, Enzymes, Université de RENNES. (2007)

[11] RH.Garret, CM .Grisham "biochimie" DE Boeck Université Sa. (2000)

[12] B. Augère "les enzymes biocatalyseur protéique "(2002)

[13] A.Derdour, Cours de cinétique chimique, office des publications universitaires.(2003)

[14] Michel Guilloton, Bernadette Quintard. Biochimie, Paris; Dunod. (1999)

[15] Vasantha Laxmi Maddhinni, Hima Bindu,Vurimindi, Degradation of azodye with

[16] horse radish peroxidase, MS, 39217, USA, (2006)

[17] R.Calvet 'Le sol: propriétés et fonctions. Constitution, structure, phénomènes aux interférences'. Edition France agricole. (2003)

[18] J.pelmont "Biodégradation et Métabolisme des bactéries". (2005)

[19] M.Baaziz ,N. Qacif, K . Bendiab, A. Aoud, "les peroxydases des plantes, Aspect théorique et application pratique "congrès international de Biochimie, A gader . (2006).

[20] J .Leclére ,j.orgizzii,B.Rouesset, JL.Chlienger, j.Wémeau "La thyroïdes : des concepts a la pratique clinique Edition scientifique et Médical Elsevier SAS. (2005)

[21] H.Qayyum "Peroxydase mediated decolonization and remediation of Waste Water containing industrial dyes" Environ SCI Biotechnol DOI 10,1007/s 1157-984-9.(2009)

[22] Biotechnologies Annual Review, volume 9 publie par M.R.EL-G ewely

[23] C.Regalado,BE.Garcia-Almendariz, MA.Duarte-vazquez "Biotéchnological applicatior of peroxidases phycochemistry"Reviews, 3,243-256,Kluwer Acadimic. (2007)

[24] A,Kandelbauer, GM ,Guebitz "Bioremediation for the Decolorization of textile Dyes "journal of Environmental science",26,270-288. (2009)

[25] A.Dias, A,Sampario,RM,Bezerra "Environmental Application for Fungal and plant systeme: decolouriasation of texitile waste water and Related Dyestuffs" university of Trasos –Montes e Alto Douro,19,446-463, Portugal (2007)

[26] H,MOhisina,Kh,ur-Rehman "Potential applications of peroxydase " Food chemistry 115:1177-1186,(2006)

[27] Michael s.Gazzaniga,A. Richard, B,George,R. Neuroxiences cognitive; la biologie de l'esprit, De Boeck, Larcier Sa, (2001)

[28] L.Johnson, Scholz, Brooks, The future of enzymes in cosmetics, International Journal of Cosmetic Science, Volume 22, Number 2, April 2000 , pp. 85-94(2006)

[29] Th.Hendriks, H. Wijsman, L C.Van Loon "Pertunia peroxydase a: isolation, purification and characteristics" Eur.J.Biochem, 299, 139-146. (1991)

[30] F. Ghaemmaghami, I. Alemazadeh, S.Motamed seed coat soybean" Peroxidase: Extraction and Biocatalytic Properties"iranian Journal of Chemical Engineering 7, 28-38,Iache (2010)

[31] C.Pionneau, CH.Dubos , P.Costa, C.Lalanne, D.Madur, JM.Gion, N.Bahramn, CH.Pimion"Electrophorése bidimensionnelle des protéines" Inra De Pierroton, (2001)

[32] H. Ayhan,"Carrier Free Cross-linked Peroxidase Aggregates: Synthesis and Characterization"hacettepe journal of biology and chemistry, Hacettepe, J. Biol. & Chem. 36 (3), 255-261. (2008)

[33] J. Jegan Roya, T. Emilia Abrahama, K.S. Abhijithb, P.V. Sujith Kumarb, M.S. Thakurb"Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase".Biosensors and Bioelectronics 21-206–211 (2005)

[34] S.Dordick, "Peroxidase-catalyzed coupling of solid-supported ortho-methoxyphenols" Synth. Catal. 2005, 347(7+8), 1119-1124

[35] P.Adlercreutz," Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents" Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media. Edited by Giacomo Carrea and Sergio Riva Copyright,(2008) ISBN: 978-3-527-31846-9

[36] R.A. Sheldon," Cross-linked enzyme aggregates (CLEAR _ s): stable and recyclable biocatalysts" Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, The Netherlands.(2007)

[37] CH.P. Govardhan "Crosslinking of enzymes for improved stability and performance" Protein technologies and commercial enzymes. (2008)

[38] R. Vazquez-Duhalt, M. Fedorak and D. Westlake"Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents"Department of Microbiology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. (2006)

[39] J. jegan Roy and T. Emilia Abraham "Strategies in making cross-liked enzyme crystals", Biochemical processing sedon enzyme crystals laboratory (CSIR) India. (2003)

[40] J. Partridge, N. Harper, B. Moore , J. Halling, " the enzyme in organic media" *Methods Biotechnol* . (2001)

[41] www.stl_bjb.ac-dijon.fr/bioch/becaract.html

[42] www.esi.umontreal.ca/~badiaa/cinetique-enzyme-1

[43] www.esi.umontreal.ca/~badiaa/cinetique-enzyme-8

[44] www.fad.bf.refer.org/biochimie/cours/licence/enzymo/enzym1.htm

[45] www.didier-pol.net/1PEROXASE html

[46] www.takween.com/ molécules-structure./peroxydase/html

Liste des Annexes

Annexe I : Domaines de fractionnement des gels

Annexe II : Courbe d'Etalonnage de phénol