République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de Master

En chimie

Spécialité : Normes et contrôle de qualité

Par :

Etudiant 1 : BENYAHIA Amel
Etudiant 2 : ZOUAK Khadidja

Thème :

Etude comparative et caractérisation de quelques peroxydases : standard et extraites de plantes

Soutenue publiquement le :04 /06 /2016., Devant le jury composé de :

Mme.ZOUAMBIA.Y	*MCA*	*Université de MEDEA*	*Président*
Mme.YAHOUM.M.M	*MAA*	*Université de MEDEA*	*Examinateur*
Mme.SAFHA.F	*Magister*	*Université de MEDEA*	*Examinateur*
Mme.BOUCHERIT.N	*MCB*	*Université de MEDEA*	*Encadreur*

Année universitaire 2015/2016

Remerciements

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

Nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à Dr BOUCHERIT Nabila notre promotrice qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils et encouragements et aussi pour l'attention, la patience, la gentillesse, et la confiance dont il a fait tout au long de notre travail. Grand merci.

Nous remercions également nos enseignants durant cinq ans sans exception, ainsi que les membres de jury qui ont bien voulu juger notre travail, et tous les enseignants qui ont contribués à notre formation du primaire jusqu'aux études supérieurs.
Ce serait manquer à un devoir très important que de ne pas remercier l'ensemble des membres du Hall Technologique, et particulièrement Mme. BOUAISSA Nassima, pour leur disponibilité et leur aide.

Nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à l'ensemble des membres de la bibliothèque, et à tous ceux qui ont participé au bon déroulement de ce travail.

.... Dédicace ....

Je dédie ce travail de fin d'études :

À la mémoire de mon père

ÀMachère mère :*qui a consacré tout ce qu'elle possède pour ma réussite*

À mon cher frère : *Abdelnnour*

Àmasœur : *Siham*

À mes grands pères et mes grandes méres.

À Mes tantes :*Razika et Djawhar*

À Toute la famille : *Benyahia*

À Toute la famille :*Bellache*

À mon fiancé.

Une spéciale dédicace à ma chère amie Khadidja

À Toutes mes amies : *Fatima,Abir, Amina, Zakia, Naima,faiza, Mariem, Nawal, Akila, Amira, Asmaa,Massouda,Ratiba.*

A toute la promotion NCQ 2016 sans exception

AMEL

.... Dédicace....

Je dédie ce travail de fin d'études :

À mes très chers parents *qui ont consacré tout ce qu'ils possèdent pour ma réussite*

À mes chers frères : *Mohamed et Abdou*

À mes chères sœurs : *Bachira, Dalila, Fethia, et Houda*

À mon très cher neveu : *Iyade.*

À ma belle-sœur : *Zahra*

À mon amie et mon binôme Amel

À toutes mes amies

À toute la promotion NCQ 2016 sans exception

Khadidja

ملخص : *دراسة مقارنة و تمييز لبيروكسيداز : نموذجية و مستخلصة من النبات.*
ثلاث انواع من البيروكسيداز ذات مصدر نباتي تم تحديد مميزاتها كما تم تحديد خصائصها الحركية
كل من بيروكسيداز اللفت و القرع تم استخلاصهما بطريقة استخلاص صلب- سائل و حساب النشاط الإنزيمي لكل منهما
أثبتت النتائج أن درجة الحموضة 7 و 6 و درجة الحرارة 40 درجة مئوية يعطيان أقصى نشاط إنزيمي للبيروكسيداز المستخلص و البيروكسيداز النموذج.
شوارد الحديد الثنائي تعمل كمحفز لكل من بيروكسيداز القرع و البيروكسيداز النموذجي بينما البولة , ال EDTA و شوارد الكالسيوم الثنائي تعمل كمثبطات لنفس أنواع البيروكسيداز, كما أن أل EDTA و شوارد الحديد الثنائي يعملان كمثبطات لبيروكسيداز اللفت.
بيروكسيداز اللفت و الفجل يحافظان على استقرارهما لمدة ساعتين في درجة حرارة 50 درجة مئوية و بيروكسيداز القرع يظهر أكثر حساسية للحرارة
الحركية الإنزيمية لأنواع البيروكسيداز الثلاثة تتبع المسار Michaelis-Menten بالنسبة للماء الاوكسيجيني و الفينول .
السرعات القصوى قدرت ب: $2.7.10^{-4}$, $4.87.10^{-4}$ و $2.29.10^{-4}$ ممول/ د بالنسبة للفينول من اجل بيروكسيداز القرع, اللفت و الفجل على الترتيب.
البيروكسيداز المستخلص أثبت قدرته على إزالة ملون اخضر المالاشيت بمردود تفكيك أكثر من 93%
الكلمات المفتاحية :بيروكسيداز , قرع ,لفت , فجل , نشاط إنزيمي ,الخصائص الحركية

Résumé : Etude comparative et caractérisation des peroxydases : standard et extraites des plante

Trois peroxydases d'origine végétales ont été caractérisées et les paramètres cinétiques ont été déterminés.

Les peroxydases de navet et de courgette ont été extraites et les activités enzymatiques ont été calculées. Les résultats montrent qu'un pH de 7 et 6 et une température de 40°C donnent une activité enzymatique maximale des peroxydases extraites et de la peroxydase standard : HRP (peroxydase de raifort).

Le cation Fe^{2+} est un activateur pour la peroxydase de courgette et d'HRP, tandis que l'urée, l'EDTA et les Ca^{2+} sont des inhibiteurs pour les mêmes peroxydases et l'EDTA et le Fe^{2+} sont des inhibiteurs pour la peroxydase de navet.

Les peroxydases de navet et de raifort, conservent leurs stabilité pendant 2 h à 50°C, et la peroxydase de courgette parrait plus sensible à la température.

La cinétique enzymatique des trois peroxydases est de type Michaelis-Menten par apport le peroxyde d'hydrogène et le phénol. Les vitesses maximales sont de $2.29.10^{-4}$, $2.7.10^{-4}$ et de $4.87.10^{-4}$ mmol/min par apport le phénol pour les peroxydases de courgette, de navet et de raifot respectivement.

Les peroxydases extraites montrent leurs capacité de décoloration du vert malachite avec des rendements de dégradation de plus de 93 %.

Mots clés : peroxydase, courgette, navet, HRP, activité enzymatique, paramètre cinétique.

Abstract: ***A comparative study and characterisation of peroxidases: standard and extracted from plants***

Three vegetable peroxidases were characterized and the kinetic parameters were given. Zucchini and turnip peroxidases were extracted and the enzymatic activities were calculated.

The results show that a pH of 7 and 6 and a temperature of 40°C give a maximum enzymatic activity of extracted peroxidases and standard peroxidase: HRP(horse radishperoxidase).

The Fe^{2+} ions is an activator for the peroxidase of zucchini and horse radish, while the urea, the EDTA and Ca^{2+} are inhibitors for same peroxidases and the EDTA and Fe^{2+} are inhibitors for the turnip peroxidase.

Horseradish and turnip peroxidases, preserve their stability during 2h at 50°C, and the zucchini peroxidase was more sensitive to the temperature.

The enzymatic kinetics of three peroxidases is of Michaelis-Menten type for the hydrogen peroxide and the phenol. Maximum speeds are of $2.29.10^{-4}$, $2.7.10^{-4}$ and of $4.87.10^{-4}$ mmol/min per contribution the phenol for peroxidases of zucchini, turnip and horse radish respectively.

The extracted peroxidases show their capacity of discolouration of the green malachite with efficiency of degradation more than 93%.

Key words: peroxidase, zucchini, turnip, HRP, enzymatic activity, kinetic parameter.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviation et symboles grecs

INTRODUCTION GENERALE 01

CHAPITRE I : LES ENZYMES

I.1. Introduction 03

I.2. Définition 03

I.3. Nomenclature et classification 04

I.4.Caractéristiques 05

I.5. Catalyse enzymatique 05

I.5.1.Site actif 06

I.5.2. Intéraction enzyme substrat 07

I.6. Cinétique enzymatique 08

I.6.1. Cinétique de Mechaelis-Menten 08

I.6.2. Méthodes graphiques de détermination des constantes cinétiques 09

A-Représentation de Lineweaver-Burk 10

B-Représentation de Hanes- Woolf 11

I.7. Effecteurs de la réaction enzymatique 11

I.7.1. Effecteurs physiques 11

A- Effet du pH 11

B-Effet de la température 12

I.7.2. Effecteurs chimiques 13

A-Les inhibiteurs 13

A.1- Inhibiteurs compétitifs 13

A.2-Inhibiteurs non compétitifs 14

A.3-Inhibiteurs incompétitifs 15

B- Les activateurs 15

I.8. Réaction à deux substrats 16

I.9. Unités d'activité enzymatique 17

I.10. Applications des enzymes 17

I.11. Conclusion 17

CHPITRE II: LA PEROXYDASE

II.1. Historique 19

II.2.Généralité 19

II.2.1.Définition 19

II.2.2.Structure 20

II.2.3. Site actif et acides aminés impliqués dans la catalyse 20

II.3 Classification des peroxydases 21

II.3.1. Peroxydases des animaux 22

II.3.2. Peroxydases microbiennes 22

II.3.3. Peroxydases des plantes 22

II.4.Mode d'action 22

II.5.Cycle catalytique de la peroxydase 23

II.6. Rôles de la peroxydase dans l'organisme vivant 23

II.7. Applications de la peroxydase 24

II.7.1. Dégradation des colorants synthétiques 24

II.7.2. Traitement des composés phénolique 24

II.7.3. Dégradation des pesticides 24

II.7.4. Synthèse des polymères 25

II.7.5. Utilisation de la peroxydase dans des produits cosmétiques protecteurs de la peau 25

II.7.6. Mise en application de biosenseurs analytiques 25

II.7.7. Tests immunoenzymatiques 26

II.7.8. Dosage du cholestérol 26

II.7.9. Application à l'analyse et les tests de diagnostic 27

II.8.Conclusion 27

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1.Introduction 29

III.2 MATERIEL ET METHODES 29

III.2.1.Matériel et réactifs 29

III.2.2. Méthodes 31

III.2.2.1. Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-visible 31
III.2.2.2. Extraction et purification de la peroxydase de la courgette et de navet blanc 32
III.2.2.3. Test d'activité enzymatique 34
III.2.2.4. Dosage de la quantité des protéines dans les extraits enzymatiques 35
III.2.2.5. Détermination des paramètres de purification à l'acétone 36
III.2.2.6. Effet des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique de la peroxydase 37
A) Effet du pH 37
B) Effet de la température 38
C) Effet des effecteurs chimiques 38
D) Stabilité thermique 39
E) Stabilité en fonction du temps 39
III.2.2.7. Détermination des constantes cinétiques K_M et V_M 39
III.2.2.8. Application 40
A) Effet du pH 40
B) Effet de l'activité enzymatique 41
III.3. RESULTATS ET DISCUSSION 42
III.3.1.Test d'activité enzymatique 42
III.3.2.Effet des conditions physico-chimiques sur l'activité enzymatique de la peroxydase 42
A) Effet du pH 42
B) Effet de la température 44
C) Effet des effecteurs chimiques 45
D) Stabilité thermique 46
E) Stabilité en fonction du temps 48
III.3.3. Paramètres cinétiques 50
III.3.4. Application 56
A) Effet du pH 56
B) Effet de l'activité enzymatique 58
III.4. Conclusion 60
CONCLUSION GENERALE 61
Références bibliographiques
Annexes

Listes des figures

Chapitre I

Figure. I.1	Schéma simplifiée de mode d'action d'enzyme	03
Figure .I.2	Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme	05
Figure. I.3	Structure et localisation et du site dans la chymotrypsine	07
Figure. I.4	Forme induit, clé-serrure	08
Figure .I.5	Représentation graphique de Lineweaver-Burk	10
Figure .I.6	Représentation graphique de Hanes-Woolf	11
Figure .I.7	Effet de pH sur l'activité enzymatique	12
Figure .I.8	Effet de température sur l'activité enzymatique	13
Figure .I.9	Mécanisme réactionnel de l'inhibition compétitive	14
Figure .I.10	Mécanisme réactionnel de l'inhibition non compétitive	14
Figure. I.11	Mécanisme réactionnel de l'inhibition incompétitive	15
Figure. I.12	Mécanisme réactionnel d'un activateur F	15
Figure. I.13	Différents mécanismes de réactions enzymatiques à deux substrats	16

Chapitre II

Figure .II.1	Structure de la peroxydase de raifort	20
Figure .II.2	Site actif de la peroxydase	21
Figure .II.3	Cycle catalytique de la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène	23
Figure .II.4	Principe du test ELISA de détection d'anticorps par la peroxydase	26

Chapitre III

Figure.III.1	Protocole expérimental de préparation et de purification de l'extrait enzymatique de peroxydase de navet	33
Figure.III.2	Réaction entre le phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase	34
Figure .III.3	Effet de pH sur l'$AE_{rés}$ de la peroxydase de Courgette à λ_{max}=502nm et de Navet à λ_{max}=504 nm .	43
Figure .III.4	Effet de température sur l'$AE_{rés}$ des trois peroxydases .	44
Figure.III.5	Variation de l'$AE_{rés}$ de la peroxydase de courgette en fonction du temps à différentes températures (50 °C, 60 °C et 70 °C)	46

Figure. III.6	Variation de l'$AE_{rés}$ de la peroxydase de navet en fonction du temps à différentes températures (50 °C, 60 °C et 70 °C)	47
Figure.III.7	Variation de l'$AE_{rés}$ d'HRP en fonction du temps à différentes températures (50 °C, 60 °C et 70 °C)	47
Figure .III.8	Variation de l'$AE_{rés}$ des EEB de courgette et de navet peroxydase en fonction du temps. (pH 7, substrat : phénol et T=4°C)	48
Figure.III.9	Variation de l'$AE_{rés}$ des EEPP de courgette et de navet peroxydase en fonction du temps (pH 7, substrat : phénol et T=4°C)	49
Figure. III.10	Variation de l'$AE_{rés}$ d'HRP en fonction du temps. (pH 6, substrat : phénol et T=4°C)	49
Figure.III.11	Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de H_2O_2 pour les trois peroxydases	51
Figure.III. 12	Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[H_2O_2])$ pour l'$EEPP_{courgette}$	51
Figure.III. 13	Représentation de Lineaweaver-Burk:$1/V_0=f(1/[H_2O_2])$ pour l'$EEPP_{navet}$	52
Figure.III. 14	Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[H_2O_2])$ pour l'HRP	52
Figure.III.15	Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du phénol pour les trois peroxydases	53
Figure.III. 16	Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[phénol])$ pour l'$EEPP_{courgette}$	54
Figure.III.17	Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[phénol])$ pour l'$EEPP_{navet}$	54
Figure.III. 18	Représentation de Lineaweaver-Burk: $1/V_0=f(1/[phénol])$ pour l'HRP	55
Figure. III.19	Effet du pH sur le rendement de décoloration du Vert Malachite par la peroxydase de Navet	56
Figure. III.20	Effet du pH sur le rendement de décoloration du Vert Malachite par la peroxydase de Courgette	57
Figure.III.21	Effet d'AE sur le rendement de décoloration du Vert Malachite par l'HRP	57
Figure.III.22	Effet de l'AE de la peroxydase de courgette sur la dégradation de vert malachite	58
Figure.III.23	Effet de l'AE de la peroxydase de navet sur la dégradation de vert malachite	58
Figure.III.24	Effet de l'AE d'HRP sur la dégradation de vert malachite	59
Photo.III.1	Effet de l'AE sur le rendement de décoloration du vert malachite par la peroxydase de navet	59
Photo.III.2	Effet de l'AE sur le rendement de décoloration du vert malachite par la peroxydase de courgette.	60

Liste des tableaux

Tableau III.1	Propriétés des différents réactifs utilisés	30
Tableau III.2	Volumes des réactifs utilisés lors de la détermination de la quantité des protéines	36
Tableau III.3	Paramètres de purification des extraits EEB et EEPP	42
Tableau III.4	Effet des effecteurs chimiques sur l'activité des peroxydases	45
Tableau III.5	Valeurs des constantes cinétiques K_M et V_M pour le peroxyde d'hydrogène	53
Tableau III.6	Valeurs des constantes cinétiques K_M et V_M pour le phénol	55

Abréviation et symboles grecs

Abréviation	**Signification**	**Unité**
A	Activateur	
AE	Activité enzymatique	UI/ml
$AE_{rés}$	Activité enzymatique résiduelle	%
AS	Activité spécifique	UI/mg
AT	Activité totale	UI
DO	Densité optique	
E	Enzyme	
[E]	Concentration d'enzyme	
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique	
EEB	Extrait enzymatique brut	
EEPP	Extrait enzymatique partiellement purifié	
ES	complexe enzyme-substrat	
FP	Facteur de purification	
HRP	Peroxydase de raifort (Horse Radish peroxidase)	
I	Inhibiteur	
K	Constante catalytique	
K_M	Constante de Michaelis–Menten	mM
R_d	Rendement de décoloration	%
RP	Rendement de purification	%
t	Temps	s
T	Température	°C
T_{opt}	Température optimale	°C
V	Volume	ml
V_M	Vitesse maximale de réaction	mmol/min
V_0	Vitesse initiale	mmol/min

Symboles grecs

ε	Coefficient d'extinction molaire	$cm^{-1}M^{-1}$
λ_{max}	Longueur d'onde correspondante à l'absorbance maximale.	nm
τ_a	Taux d'activation	%
τ_i	Taux d'inhibition	%

Introduction générale

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditionsdouces où, normalement, elles seraient très lentes si elles ont lieu, c'est parce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques: les enzymes.**[1]**

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques dont la structure est spécifiquement liée à leur fonction. L'activité catalytique des enzymes repose sur des interactions multiples avec d'autres molécules biologiques qui sont propres à chaque enzyme. Comparées à des catalyseurs chimiques, les enzymes sont capables d'amener plus rapidement une réaction à sa position d'équilibre.Depuis leur découverte, les enzymes ont constituées un centre d'intérêt très convoité par les biochimistes mais aussi par les chimistes pour essayer de comprendre comment les enzymes peuvent catalyser les réactions cellulaires.Grace au modèle proposé par Michaelis-Menten qui a le mérite de s'appliquer à un grand nombre de mécanismes enzymatiques, il est possible de déterminer, en fonction du substrat, les paramètres cinétiques propres à chaque enzyme et d'entirer des informations très utiles**[1]**.Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent connues dans les moindres détails, on s'est intéressé à l'une des plus répandues qui soit, la peroxydase : (EC : 1.11.1.7).**[2]**

Les peroxydases sont des enzymes utilisant les peroxydes pour oxyder leur substrat. Elles participent à la défense de la cellule contre les peroxydes, à la formation de la paroi cellulaire et la régulation hormonale. Les oxydations peuvent être observées à l'œil nu ou mesurées au photomètre ou au colorimètre. Il suffit pour cela d'utiliser un réactif donnant un produit coloré.

La source traditionnelle performante en peroxydases, est le raifort cultivé, cette dernière a été largement étudiée, et elle a fait l'objet de commercialisation. Son emploi dans diverses applications analytiques, adonné un écho favorable. Cependant, sa stabilité modérée à la chaleur et aux fortes concentrations en H_2O_2, est à l'encontre de son application à l'échelle industrielle. D'autre part, la plante productrice est de culture assez difficile puisqu'elle exige un sol profond et riche en humus, de plus, elle ne pousse pas partout dans le monde, ce qui pose des contraintes d'ordre économique. Pour toutes ces raisons, et vu l'intérêt que peut encore offrir ce type d'enzymes dans de nouvelles applications, l'axe de recherche reste

toujours orienté vers la prospection d'autres sources plus performantes en peroxydases en vue de remplacer la peroxydase de raifort. **[2]**

Ce travail s'inscrit dans le but de caractériser et d'étudier comparativement trois peroxydases d'origine végétale: de raifort (standard : HRP) et extraites des plantes (navet banc et courgette). Pour cela, notre travail sera consacré en premier lieu en une étude bibliographique qui se compose de deux chapitres rassemblent des généralités sur les enzymes notamment la peroxydase, ainsi que ses applications auxles différents domaines.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude expérimentale qui regroupe d'une part toutes les méthodes et les principes appliqués pour l'étude de quelques paramètres : le pH, la température, quelques effecteurs chimiques ainsi que la détermination des constantes cinétiques pour le phénol et le peroxyde d'hydrogène.

Et d'autre part, à la présentation des différents résultats établis après les différentes expériences.

Enfin le manuscrit se termine par une conclusion générale et les perspectives pouvant être envisagée dans le futur.

I.1. Introduction

Les réactions essentielles pour le fonctionnement d'un être vivant sont trop lentes, et sans la présence d'enzymes, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible.

La compréhension du mécanisme moléculaire des processus biologique reste un des objectifs majeurs de la biologie moderne. En particulier, l'étude des réactions enzymatiques vise à comprendre les mécanismes réactionnels mais aussi à établir de manière quantitative comment une enzyme est capable d'accélérer spécifiquement une réaction chimique.
Puisque les enzymes agissent en modifiant la vitesse de la réaction, il est nécessaire d'étudier la cinétique des réactions pour comprendre leur mode d'action. **[3]**

I.2. Définition

Les enzymes sont des biocatalyseurs capables d'accélérer les réactions biochimiques qui se déroulent dans une cellule pour atteindre une vitesse compatible avec le fonctionnement normal d'une cellule. Le fonctionnement d'une cellule, sa vie, sa reproduction demandent que l'ensemble des réactions se produisent de façon coordonnée et régulée mais aussi à une vitesse suffisante. **[4]**
Les enzymes sont des catalyseurs de nature protéiques qui agissent en très faibles quantités pour catalyser la transformation d'un substrat et aboutir à la formation d'un produit **[5]**, (figure I.1).
La plupart des enzymes sont des protéines, mais certaines sont composées d'ARN (on les appelle ribozymes) **[6]**.

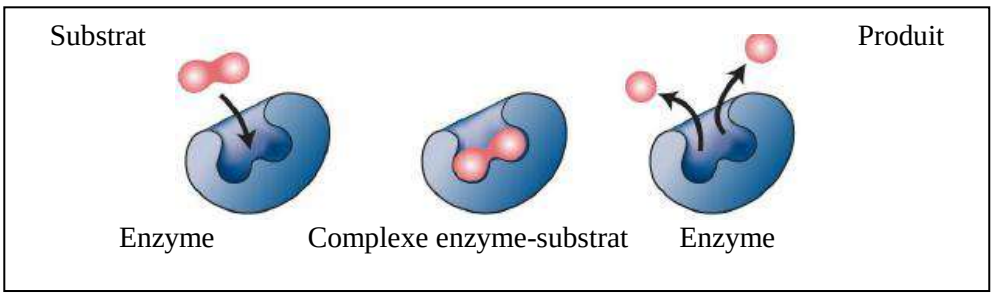


Figure I.1. Schéma simplifiée de mode d'action d'enzyme **[7]**.

Certaines enzymes ne sont constituées que d'une partie protéique qui assure les deux fonctions. D'autres comprennent une partie protéique « apoenzyme » spécifique de la fixation du substrat et une partie non protéique « cofacteur ou coenzyme », spécifique de la réaction

catalysée. Des ions métalliques (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}…) peuvent être nécessaires à la réaction « métalloenzymes ».

I.3. Nomenclature et classification

Le nombre considérable d'enzymes connues à rendu impératif le développement d'une classification et d'une nomenclature. Celles-ci ont été établies dés 1961 par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie. Les enzymes sont classées en fonction de la nature des substrats qu'elles transforment et le type de réaction qu'elles catalysent, en général, en rajoutant le suffixe «-aze» au nom de leur substrat ou à un mot ou une phrase faisant référence à leur activité. Chaque enzyme possède un numéro de code recommandé par la Commission Internationale d'Enzymologie et constitué de l'acronyme E.C. suivi de quatre chiffres, séparés par des points.

Le premier chiffre indique la classe de l'enzyme (type de la réaction catalysée).

Le deuxième chiffre indique la sous-classe, c'est le mécanisme de la réaction.

Le troisième chiffre indique la nature des molécules impliquées dans la réaction.

Le quatrième chiffre indique le numéro d'ordre de l'enzyme **[8]**.

Les classes sont au nombre de six :

- Classe 1 : **oxydoréductases** catalysant des réactions d'oxydoréduction, exemple : alcool déshydrogénase.
- Classe 2 : **transférases** assurant le transfert de groupement fonctionnel, exemple : Glucose 6-phosphate.
- Classe 3 : **hydrolases** catalysant des réactions d'hydrolyse, exemple : b-galactosidase.
- Classe 4 : **lyases** ce sont des enzymes qui enlèvent un groupement au substrat en laissant une double liaison ; ou au contraire, fixent un groupement sur une double liaison, exemple : pyruvate décarboxylase.
- Classe 5 : **isomérases** catalysant des réactions isomérisation, exemple : maleate (cis-tans) isomérase.
- Classe 6 : **ligases** formation de liaison couplée à l'hydrolyse d'ATP, exemple : acétate-coA ligase **[9]**.

I.4.Caractéristiques

En tant que catalyseurs, les enzymes :

✓ augmentent les vitesses de réaction, sans modifier la constante d'équilibre, en diminuant l'énergie libre d'activation.

✓ se retrouvent intacts à la fin de la réaction, bien qu'ils se soient intimement liés aux substrats et produits.

✓ sont produits par la cellule : tous les enzymes sont des protéines sauf les ribozymes.

✓ sont spécifiques : ils transforment un substrat donné (spécificité de substrat) grâce à une réaction donnée (spécificité d'action).

✓ sont réglables : certains enzymes modifient leur activité catalytique en réponse à des signaux métaboliques, ce qui permet l'ajustement de l'offre métabolique à la demande cellulaire. **[10]**

I.5. Catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique repose sur les mêmes principes que la catalyse chimique. L'enzyme, permet d'augmenter la vitesse d'une réaction sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci et d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction, (figure I.2.a), en augmentant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps, (figure I.2.b) **[11].**

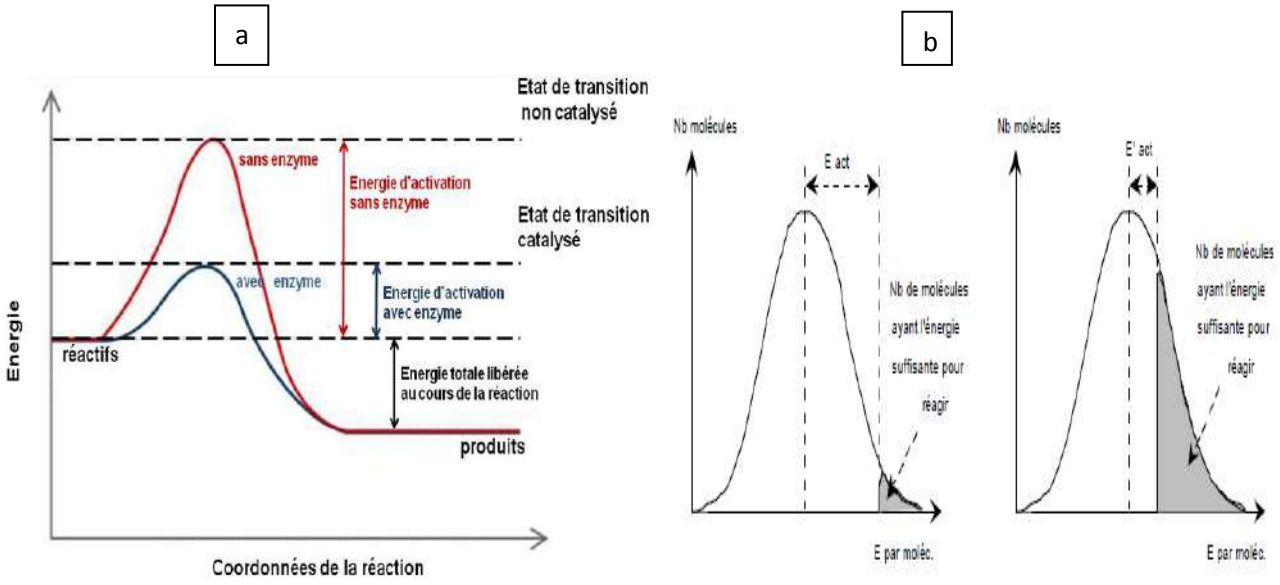


Figure I.2. Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme **[11].**

Cependant, pour que l'enzyme fonctionne, elle doit se combiner avec son substrat. La structure de chaque enzyme présente un site actif, capable de fixer spécifiquement le substrat, et contenant les groupements catalytiques responsables de la transformation de ce dernier en produit.

I.5.1.Site actif

Le site actif d'une enzyme est la région qui fixe les substrats, c'est une entité tridimensionnelle où le site actif n'occupe qu'une partie réduite du volume de l'enzyme.
Il est composé de deux éléments :

✓ *Site de liaison* : reconnaissance et maintien du substrat par des interactions faibles non covalentes ou covalentes.
✓ *Site catalytique* : intervention d'acides aminés ayant des potentialités réactives

Ces deux parties sont constituées d'acides aminés éloignés dans la structure primaire mais proches dans la structure 3D. **[12]**

La figure I.3 présente la localisation du site actif dans la chymotrypsine.

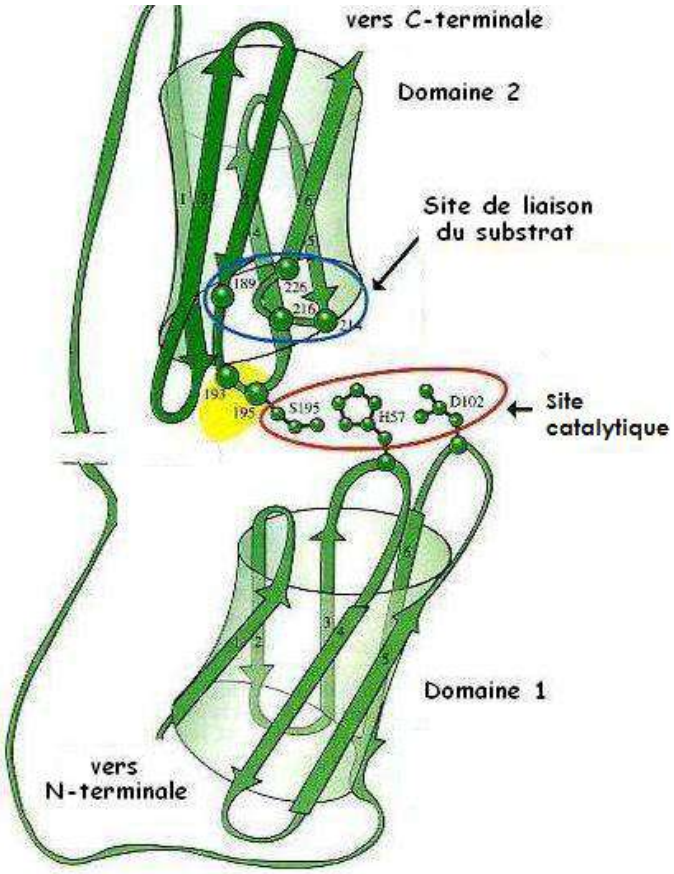


Figure I.3. Structure et localisation et du site dans la chymotrypsine **[13]**

I.5.2. Intéraction enzyme substrat

Pour que l'enzyme fonctionne, elle doit se combiner avec son substrat. La structure de chaque enzyme présente un site actif, capable de fixer spécifiquement le substrat, et contenant les groupements catalytiques responsables de la transformation de ce dernier en produit.

La formation d'un complexe enzyme-substrat est la première étape de la catalyse enzymatique : $E + S \longrightarrow ES$.

Avec :

E : enzyme.

S : substrat.

ES : complexe enzyme-substrat.

Le pouvoir catalytique des enzymes vient du fait qu'elles mettent en présence des substrats dans des orientations favorables pour la formation des états de transition. Les enzymes rapprochent les substrats au sein de complexes enzyme-substrat (ES). Les substrats sont fixés au site actif selon la forme clé-serrure. (Figure I.4). **[12]**

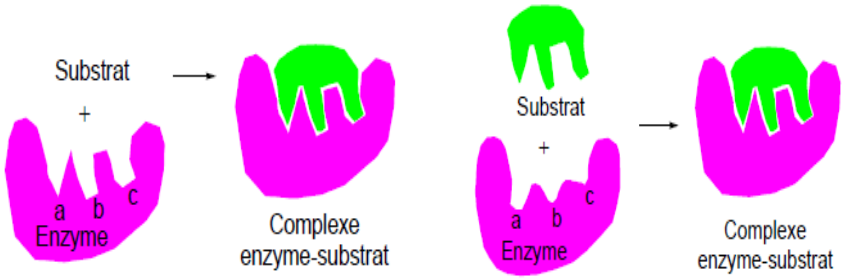


Figure I.4. Forme induite: clé-serrure. **[14]**

Les différentes interactions des mécanismes catalytiques utilisés par les enzymes sont au nombre de six :

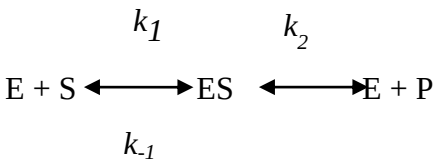
1. Catalyse acido-basique.
2. Catalyse covalente.
3. Catalyse par ion métallique.
4. Catalyse électrostatique.
5. Catalyse par effets de proximité et d'orientation.
6. Catalyse par liaison préférentielle au complexe de l'état de transition. **[12]**

I.6. Cinétique enzymatique

La cinétique est la science qui a pour objet l'étude de la vitesse des réactions chimiques. La cinétique enzymatique englobe le rôle biologique des catalyseurs enzymatiques et les mécanismes qui permettent leur extraordinaire activité catalytique. L'objectif de la cinétique enzymatique est de déterminer la vitesse maximale de la réaction que l'enzyme catalyse et à mesurer son affinité pour les substrats et les inhibiteurs. L'analyse de l'influence des conditions de la réaction sur sa vitesse, couplée à l'étude de la structure et des propriétés chimiques de l'enzyme, donne des informations sur la nature du mécanisme de l'activité catalytique**. [15]**

I.6.1. Cinétique de Mechaelis-Menten [16]

La réaction enzymatique globale est composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme.



Avec: E : enzyme

S : substrat

P : produit

ES : complexe enzyme-substrat

K_1 , k_{-1}, k_2: les constantes cinétiques.

La vitesse instantanée de cette réaction est donnée par :

$$V_0 = dp/dt = k_2[ES] \qquad (I.1)$$

Avec :

t : le temps

L'équation de Mechaelis et Menten, repose sur l'hypothèse qu'un équilibre rapide entre les concentrations en enzyme, en substrat et en complexe enzyme-substrat s'établit au cours de la réaction catalysée. La concentration totale du substrat $[S]_0$ doit être très supérieure en comparaison à celle de l'enzyme $[E]_0$ avec ($[E]_0 << [S]_0$) :

$[E]_0 = [E] + [ES]$

La vitesse de la réaction s'écrit sous la forme appelée l'équation de Mechaelis-Menten :

$$V = (V_M.[S])/(K_M+[S]) \qquad (I.2)$$

V_M : Vitesse maximal de la réaction ou encore $V_M = K_2 [E]_0$

K_M : c'est la constante de Mechaelis-Menten : Concentration de substrat lorsque l'enzyme est à demi-saturation :

$$K_M = (K_{-1} + K_2)/K_1 \qquad (I.3)$$

I.6.2. Méthodes graphiques de détermination des constantes cinétiques

La représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten est portion d'hyperbole qui passe par l'origine. Les biochimistes utilisent des méthodes de linéarisation pour la détermination des constantes cinétiques. **[6]**

A. Représentation de Lineweaver-Burk [17]

Les valeurs de K_M et V_M sont déterminées, à partir de la vitesse de réaction pour différentes concentrations de substrat.

L'équation de Mechaelis est transformée en une expression d'une droite :

$$1/V = (K_M/V_M*[S]) + 1/V_M \qquad (I.4)$$

Cette équation est appelée de Lineweaver-Burk, sa représentation est illustrée par la figure I.5.

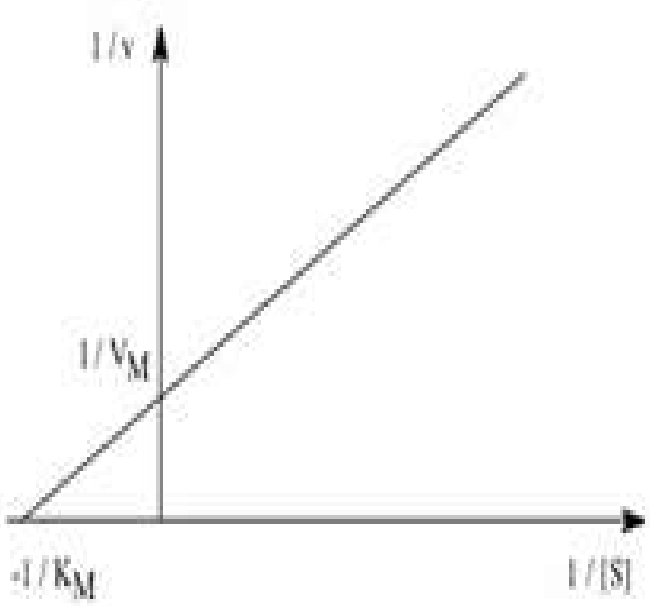


Figure I.5. Représentation graphique de Lineweaver-Burk**. [18]**

Tout déplacement de $-1/K_M$ vers la gauche indique une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat car K_M diminué.
Inversement, tout déplacement vers la droit indique une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat car K_M à augmenté.

B. Représentation de Hanes- Woolf [17]

Dans cette représentation, la multiplication de l'expression 1/V=f (1/[S]) par [S], donne :

$$[S]/V = [S]/V_M + K_M/V_M \qquad (I.5)$$

La représentation correspondante est une droite dont la pente vaut $1/V_M$, l'ordonnée à l'origine K_M/V_M et l'abscisse à l'origine $-K_M$

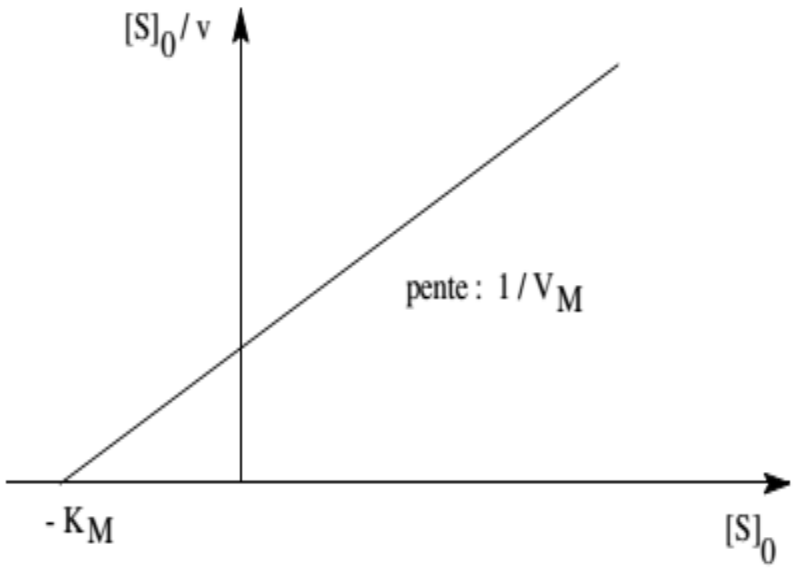


Figure I.6. Représentation graphique de Hanes-Woolf. **[18]**

I.7. Effecteurs de la réaction enzymatique

I.7.1. Effecteurs physiques

A. Effet du pH

En fonction des valeurs de pH, deux effets sur la réaction enzymatique sont distingués :

- Aux valeurs extrêmes, il dénature, par modification de l'état d'ionisation des chaines latérales des acides aminés.
- Aux valeurs intermédiaires il influe sur l'activité en modifiant l'état d'ionisation des chaines latérales des acides aminés du site actif et celui du substrat

-la résultante de ces deux effets se traduit par une courbe (en cloche) AE=f (pH), passant par une valeur maximale pour un pH dit pH optimal. Le pH optimal de la plupart des enzymes est voisin de la neutralité. **[10]**

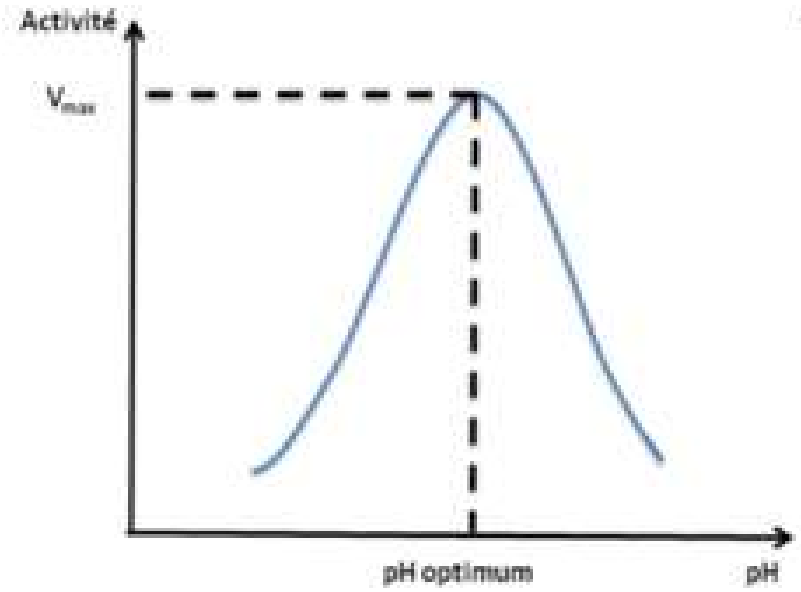


Figure I.7. Effet du pH sur l'activité enzymatique [19]

B. Effet de la température

Toute variation de température peut agir sur un système enzymatique par deux effets indépendants qui doivent être considérés séparément :

- Elle accélère la réaction enzymatique, 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 secondaires et tertiaires), donc sa désactivation.

La résultante de ces deux effets se traduit par une courbe AE=f(T) généralement dissymétrique, passant par une valeur maximale pour une température optimale. En deçà de température optimale, la vitesse est multipliée par 2environ tous 10°C.la température optimale de la plupart des enzymes est proche de celle du milieu cellulaire. Cependant, certains organismes adaptés à des conditions de vie extrêmes ont des enzymes dont la température optimale avoisine celle du point d'ébullition de l'eau. **[10, 13]**

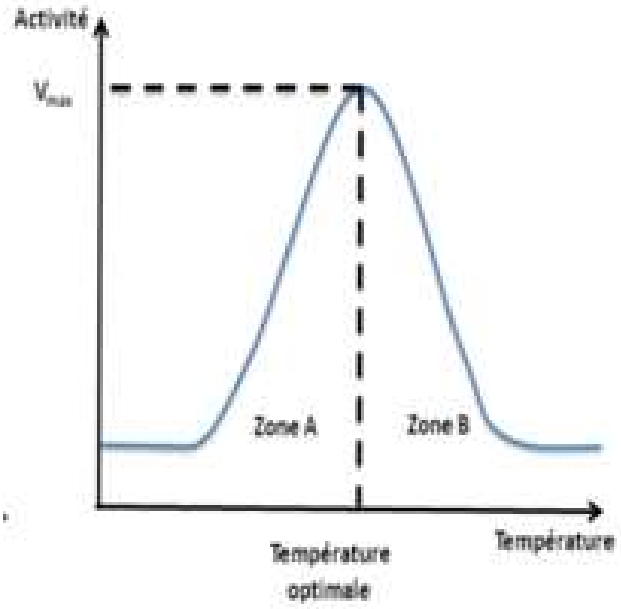


Figure I.8.Effet de la température sur l'activité enzymatique [19]

I.7.2. Effecteurs chimiques

On distingue les inhibiteurs, qui diminuant l'activité enzymatique, et les activateurs, qui l'augmentent.

A. Les inhibiteurs

Les inhibiteurs spécifiques ralentissent la vitesse de la réaction enzymatique, jusqu'à la stopper.

Cette inhibition peut être levée dans des conditions réactionnelles particulières (inhibiteurs réversibles) ou ne pas l'être (inhibiteurs irréversibles).

A.1. inhibiteurs compétitifs

Analogues structuraux du substrat, ils se fixent par des liaisons non covalentes au site actif de l'enzyme à la place du substrat. Ils diminuent l'affinité de l'enzyme pour le substrat, donc augmentent la K_M, mais ne modifient pas la V_M (Figure I.8). **[10]**

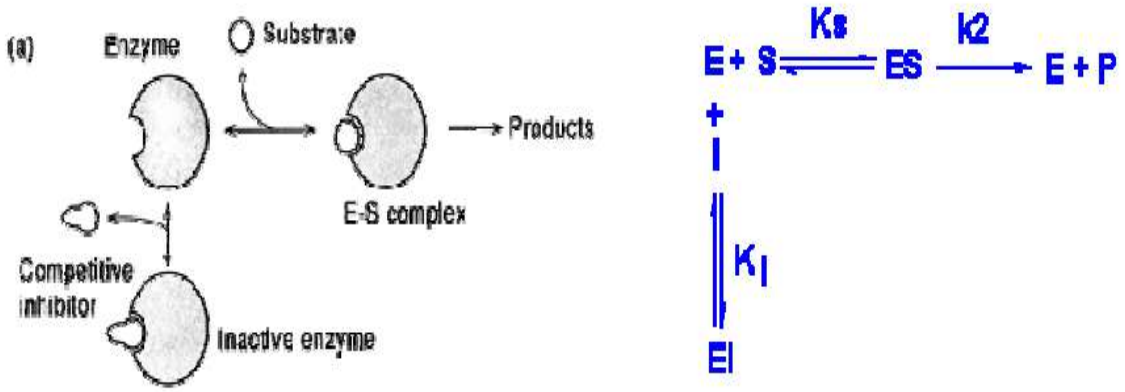


Figure I.9. Mécanisme réactionnel d'un inhibiteur compétitif. **[3, 20]**

A.2. Inhibiteurs non compétitifs

L'inhibition non compétitive est rare, mais elle entre dans la composition de l'inhibition mixte. Les inhibiteurs non compétitifs se fixent de façon non covalente du site actif de l'enzyme, à la fois sur l'enzyme et sur le complexe ES. (Figure I.9)

Ils ne diminuent pas l'affinité de l'enzyme pour le substrat, donc ne modifient pas la K_M, mais diminuent la V_M puisque l'inhibiteur ne peut être déplacé du complexe ternaire ESI par un excès de substrat**. [10]**

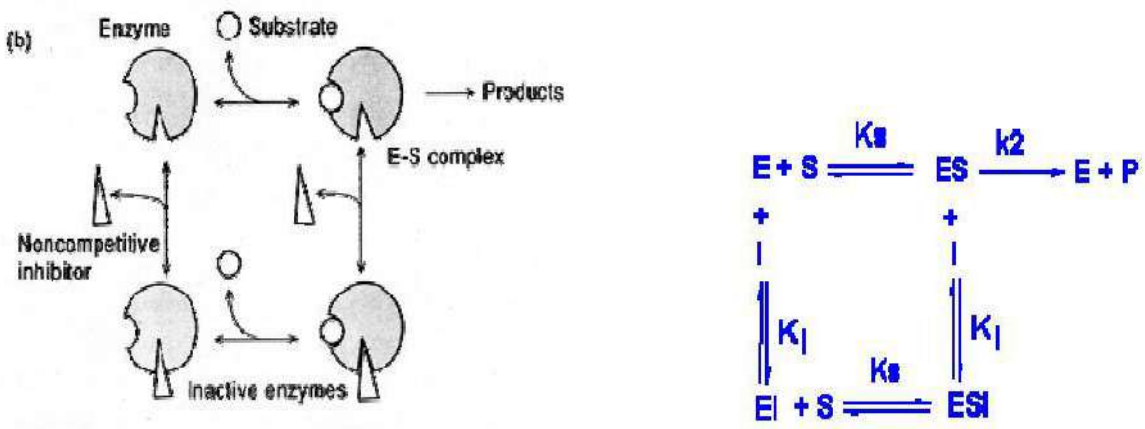


Figure I.10. Mécanisme réactionnel d'un inhibiteur non compétitif. **[3, 20]**

A.3. Inhibiteurs incompétitifs

Ce type d'inhibition est aussi appelé inhibition par blocage du complexe intermédiaire. L'enzyme et le substrat forment d'abord le complexe enzyme substrat (ES), puis l'inhibiteur se fixe à ES pour donner le complexe ternaire ESI. (Figure I.10). **[10]**

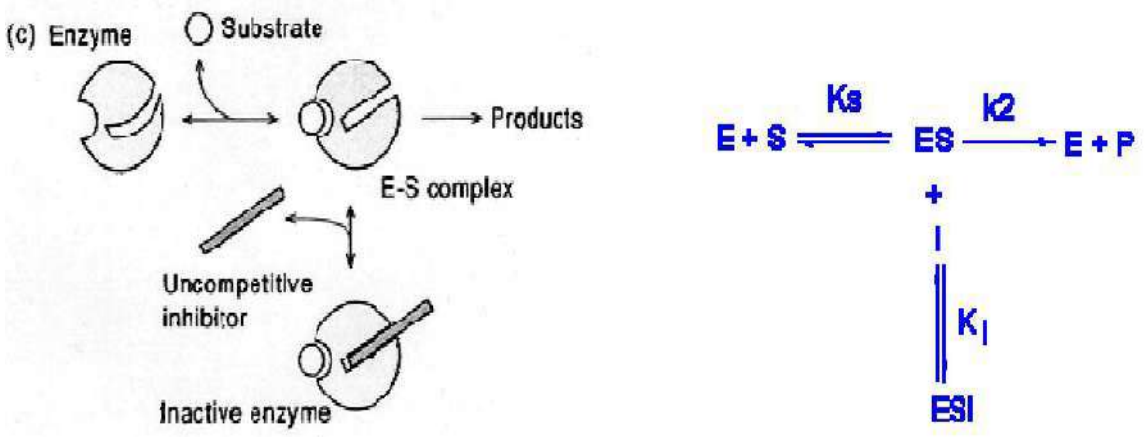


Figure I.11. Mécanisme réactionnel d'un inhibiteur incompétitif. **[3, 20]**

B. Les activateurs

Les activateurs sont des molécules capables de mettre en œuvre à la réaction enzymatique ou chimique afin d'augmenter la vitesse catalytique de la réaction puis on obtient l'enzyme sous forme intacte et le produit, la vitesse sera influencé par des facteurs importants sont : la température, la concentration en substrat, le pH de milieu. On peut distinguer une association au hasard avec l'enzyme ou selon un mécanisme séquencé avec le complexe ES. Le mécanisme indiqué sur figure I.11 traduit la multifonctionnalité d'un activateur F. **[10]**

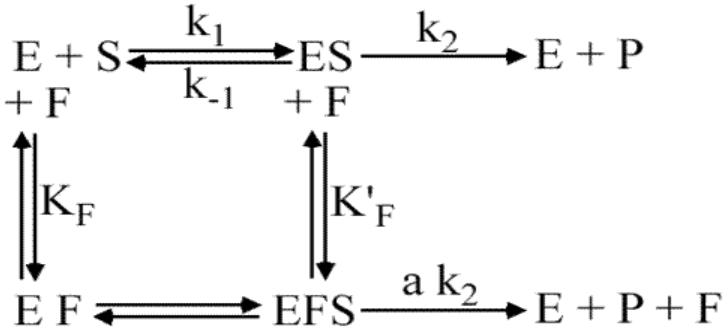


Figure I.12.Mécanisme réactionnel d'un activateur F. **[21]**

I.8. Réaction à deux substrats [22]

Les réactions enzymatiques qui impliquent deux substrats et qui conduisent à la formation de deux produits représentent environ 60% des réactions enzymatiques connues. La présence de deux substrats pose le problème de leur ordre de fixation de l'enzyme.

Si les deux substrats se fixent l'un après l'autre avant que les produits de réaction ne quittent l'enzyme : la fixation est séquentielle. Si c'est toujours le même substrat que se fixe le premier : la fixation est ordonnée. Au contraire, celle- ci est aléatoire si les deux substrats peuvent se fixer dans n'importe quel ordre. Les mécanismes ou un ou plusieurs produits sont libérés avant que tous les substrats aient été ajoutés sont appelés des réactions Ping-pong. (Schémas de Clecland (figure I.12).

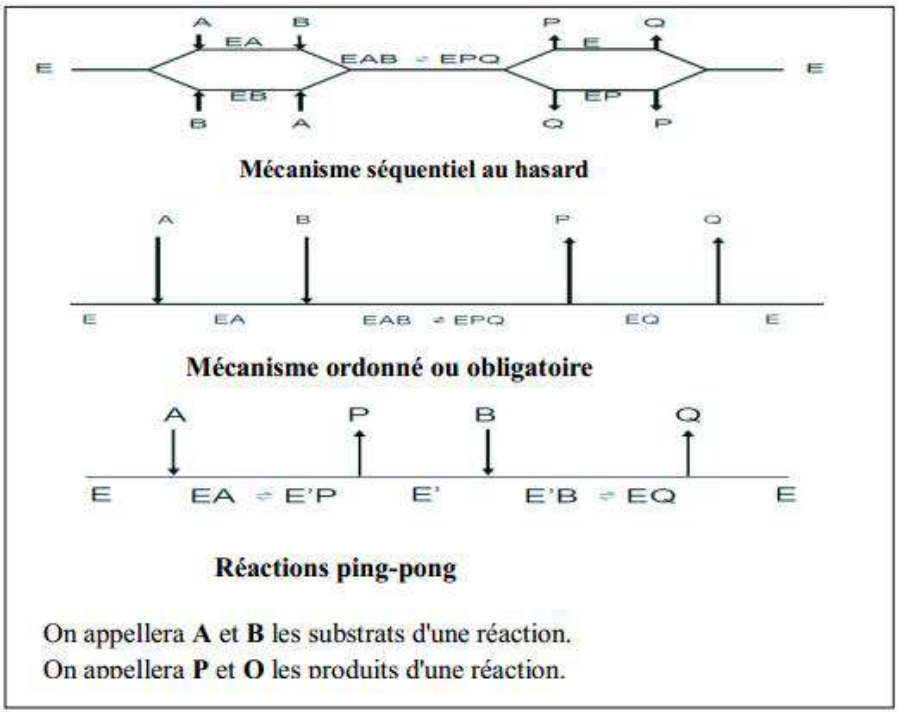


Figure. I.13. Différents mécanismes de réactions enzymatiques à deux substrats**. [23]**

Pour étudier la cinétique et faire la distinction entre ces différents mécanismes de réactions à deux substrats, on trace les courbes en doubles inverses ($1/V_0=f\ (1/[S]_0)$). Une autre méthode plus facile permet d'étudier la cinétique des réactions à deux substrats. Elle est basée sur la mesure les variations de vitesse de la réaction en excès d'un des deux substrats. Dans ce cas, on se ramène à une cinétique à un seul substrat. On définit une constante de Mechaelis K_M^A et K_M^B pour chaque substrat.

I.10. Unités d'activité enzymatique

L'activité d'une enzyme est obtenue par la mesure de la vitesse d'une réaction qu'il catalyse dans des conditions définies, et puisque cette vitesse varie avec la concentration d'enzyme, il est utile de définir une unité indépendante de la concentration d'enzyme :

- l'activité spécifique : par un milligramme d'enzyme et par unité de temps ;
- l'activité moléculaire : nombre de molécules de substrats catalysés par molécule d'enzyme et par unité de temps ;
- l'unité d'activité catalytique, ou l'unité d'activité enzymatique utilisée dans le cas où l'enzyme n'est pas purifiée.

L'IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) et l'IUB (International Union of biochemistry) recommandent l'adoption d'une unité internationale U.I. **[24]**

L'unité internationale U.I est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole (1 μmole) de substrat par minute. Une autre définition de l'unité d'activité enzymatique est le Katal. Un Katal est la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion d'une mole de substrat en produit en une seconde. **[25]**

I.12. Applications des enzymes

Plusieurs industries ont reconnait d'exploiter l'énorme potentiel des enzymes, car les procédés pourraient être réalisés en beaucoup moins de temps, avec des conditions opératoires réalisables ou des matières premières moins chères. Les principaux faisant intervenir les enzymes sont nombreux. Les principales applications sont en agroalimentaire, en pharmaceutique, en détergents, en environnement ainsi qu'en extraction du pétrole et de gaz naturel. **[26]**

I.13. Conclusion

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditions douces où, elles seraient très Lentes en absence d'enzymes.

Ces catalyseurs, sont nombreux dans les organismes vivants (quelques milliers). Elles sont caractérisées par une haute spécificité, ce qui a attiré l'attention des chercheurs et industriels afin d'exploiter le potentiel catalytique de ces molécules biologiques.

Cependant, l'emploi des enzymes nécessite de prendre certaines précautions notamment afin de conserver leur propriétés catalytiques.

II. LA PEROXYDASE

II.1. Historique

Avant même que la notion d'enzyme eût été formulée, tel M. Jourdain faisant de la prose sans le savoir, Planche constatait en 1810 que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc de recolorer la teinture de gaïac (incolore à l'état réduit) en présence d'eau oxygénée . **[27]**

En 1818, Thenard fut le premier à décrire les propriétés de l'eau oxygénée (H_2O_2) et Schönbein, en 1855, décrit l'oxydation de certains composés organiques, catalysée par des extraits issus de plantes ou d'animaux, en présence de solutions diluées de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le nom de peroxydase fut donné en 1898 par Linossier, à un extrait de pus humain présentant une telle activité**.**

Les fameuses peroxydases de raifort furent l'outil de base des premiers travaux moléculaires sur les peroxydases végétales et c'est en 1976, grâce aux travaux de Brathwaite, 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. 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. **[28]**

Aujourd'hui, la source la plus commune de peroxydase est la racine de radis ou de raifort (radis noir). C'est pourquoi les chercheurs la connaissent plutôt sous les initiales de HRP (HorseRadish Peroxydase en anglais). **[27]**

II.2.Généralité

II.2.1.Définition

Les peroxydases (EC1.11.1.Z), sont des enzymes oxydoréductases très abondantes chez les plantes et d'autres organismes vivants. **[29]**

Les peroxydases sont des hémoprotéines, ils ont un poids moléculaire s'étendue de 30.000 à 150.000 Da **[30].**Catalysent la réduction de peroxydes (ROOH) comme accepteur d'électron tels que le peroxyde d'hydrogène et oxydation de variété de composés organiques et minéraux variable d'une classe de peroxydase à une autre.**[31]**

II.2.2.Structure

L'étude classique du modèle d'une peroxydase HRP permet de découvrir la structure de l'enzyme. Elle partage avec d'autres une structure chimique appelée hème contenant du fer ionisé et capable de se lier à l'oxygène. **[27, 31]**

L'hème des peroxydases est constitué par une métalloporphyrine dont l'ion métallique est le fer ferrique (Fe^{3+}) associe à quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole par quatre liaison de coordination. **[28]**

La peroxydase tire profit de sa grande surface étant une molécule de grande taille (son poids moléculaire est de 40 000g/mol et sa composition chimique est la suivante: (carbone47%, hydrogène 7.35%, azote 13.2%, souffre 0.43%, fer 0.127%) **[27, 32]**

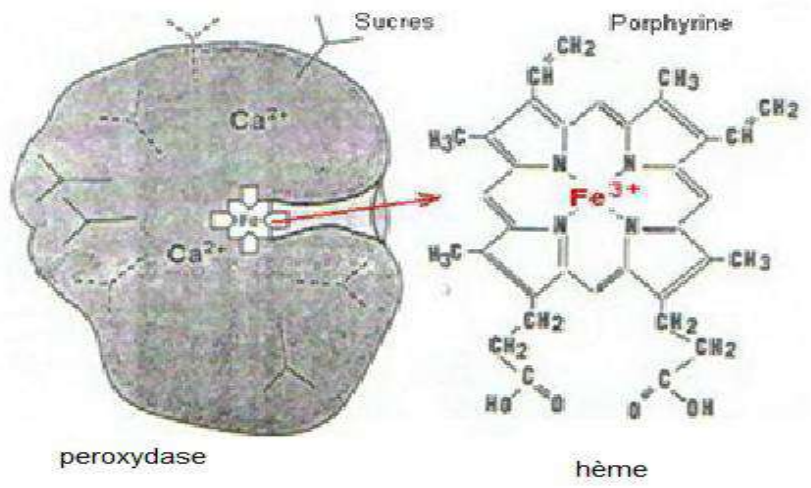


Figure .II.1 : Structure de la peroxydase de raifort. **[29]**

II.2.3. Site actif et acides aminés impliqués dans la catalyse

L'étude cristallographique menée par Henriksen et ses coauteurs (1998), sur les interactions entre la peroxydase et le substrat, a montré la position de ce dernier dans une écrevisse (site actif). Le substrat est orienté vers une portion de l'hème, ses parties apolaires sont dirigées vers la face hydrophobe (Phe 179, Pro 141, Ala140, Pro 139, Phe 68, Gly 69) et ses tranches polaires sont orientées vers His 42 et Arg 38, à proximité du fer.

Les acides aminés His 42, Arg 38 et His 170, 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 d'Arg 38 (polaire) par Leu (apolaire) diminue également l'affinité de l'enzyme pour H_2O_2 et surtout pour le 2ème substrat. Ces résidus acides aminés semblent directement impliqués non seulement dans la formation des complexes avec les 2 substrats mais aussi dans la réaction proprement dite. **[2]**

Les ions Ca^{2+}, pourtant assez éloignés du site actif, sont indispensables pour une catalyse efficace, car ils participent indirectement au maintien de l'intégralité structurale du site. Ils sont intégrés à un réseau de liaisons qui passe par His 48, l'hémine et His 170. En résumé, la structure du site actif ainsi que les acides aminés impliqués dans la catalyse sont illustrés sur la figure II.2. **[33]**

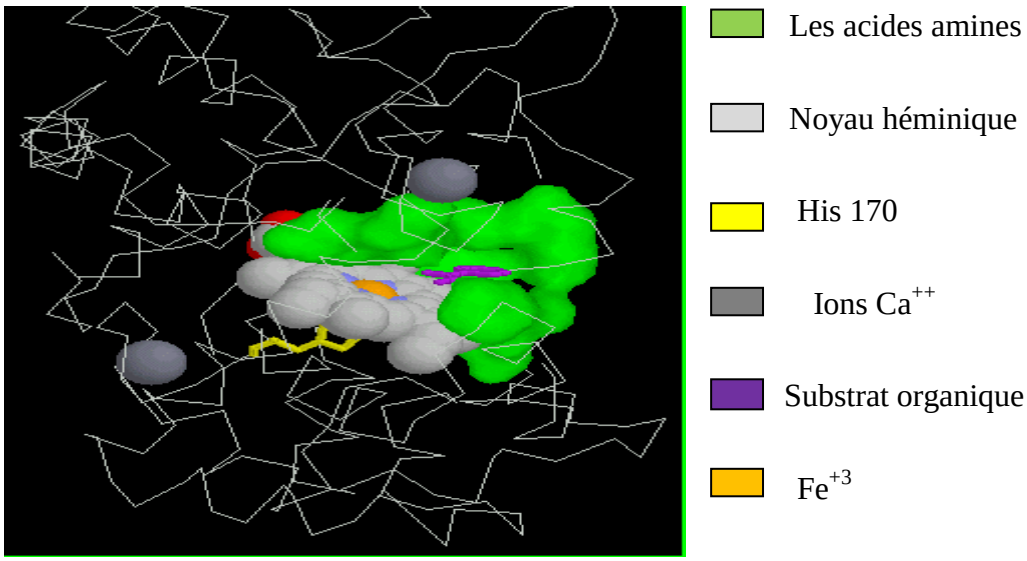


Figure. II.2 : Site actif de la peroxydase. **[33]**

II.3 Classification des peroxydases

En réalité, il n'y a pas une peroxydase mais des peroxydases car ce type d'enzyme existe chez presque tous les êtres vivants : chez les microorganismes, chez les plantes et chez les animaux. **[27]**

Cette citation nous permet de distinguer trois superfamilles des peroxydases en fonction de leur origine : **[34]**

II.3.1. Peroxydases des animaux : les peroxydases du règne animal diffèrent de celles des végétaux et de microorganismes par la séquence en acides aminés. Celles de mammifères renferment les familles suivantes :

Lactoperoxydase (LPO), éosinophile peroxydases (EPO), thyroïde peroxydases (TPO) et glutathion peroxydases (GPO).Quelques peroxydases d'invertébrés comme les arthropodes, les mollusques, les poissons et la drosophile ainsi que celles présentes chez l'homme ont fait l'objet de travaux de recherche**. [2]**

II.3.2. Peroxydases microbiennes : surtout d'origine fongique, dont les principales :

- Manganèse peroxydase (MnP) : elle est appliquée industriellement dans l'oxydation des composés phénoliques et des colorants en présence de Mn. Ce type de peroxydase est isolé de différents microorganismes, tels que : Phlebia tremellosa, Phanerochaete chrysosporium. **[34]**

-Lignine peroxydase (LiP) : Ces monomères sont des glycoprotéines impliquées dans la dégradation de la lignine, le plus souvent étudié pour décoloration des teintures. **[35]**

II.3.3. Peroxydases des plantes : (EC1.11.1.7)

Appelées aussi peroxydases de classe III, sont très répondues dans le monde végétal (raifort, navet, courgette, tomate, etc.). Dans une même plante et au niveau d'un même tissu, plusieurs forme de peroxydase peuvent exister. **[36]**

Certaines peroxydases de cette classe sont bien connues en raison de leurs applications industrielles. La peroxydase de raifort donne une dégradation effective et précipitation importante des colorants azoïques industriels rejetés dans les effluents.
Les autres peroxydases sont aussi utilisées pour la décoloration des colorants en raison de leur cinétique et leurs propriétés biochimiques. **[37]**

II.4.Mode d'action

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

$$RH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} R + 2\,H_2O_2$$

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

Le complexe enzyme-cofacteur catalytiquement actif est appelé un holoenzyme. La partie protéique de l'holoenzyme, enzymatiquement inactive est l'apoenzyme. **[38]**

II.5.Cycle catalytique de la peroxydase

Le cycle catalytique de la peroxydase se produit par des réactions en plusieurs étapes, il implique (figure II.3) :

-Premièrement, l'enzyme à l'état natif réagit avec un peroxyde d'hydrogène. Cette étape incluse le transfert d'un oxygène de peroxyde vers l'état ferrique d'enzyme pour former un composé intermédiaire instable qui est le composé I avec la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau. Dans cette étape, le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferryl (FeIV = O).

-Par la suite, le composé I oxyde un substrat (RH) pour donner un radical ($R^{\bullet}$) et le composé II qui à son tour oxyde une seconde molécule de substrat pour donner l'hème native. **[39]**

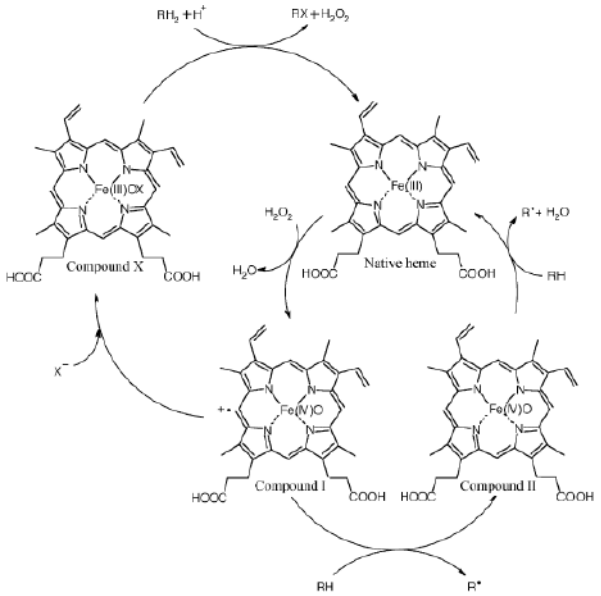


Figure .II.3. Cycle catalytique de la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène. **[40]**

II.6. Rôles de la peroxydase dans l'organisme vivant

Dans les cellules végétales, les peroxydases rentrent dans plusieurs réactions métaboliques :

- La respiration et la photosynthèse ;
- La synthèse et la dégradation des hormones ;
- La décomposition de H_2O_2 du cytosol ;
- L'oxydation des composés toxiques ;

- Réponse de défense; etc. **[27, 41]**

II.7. Applications de la peroxydase

II.7.1. Dégradation des colorants synthétiques

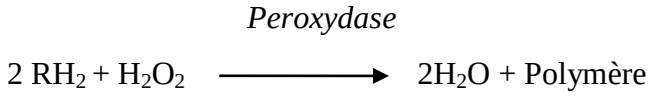
Certains colorants synthétiques ne s'éliminent pas des eaux usées par un traitement biologique conventionnel en raison de leurs structures, et le traitement des effluents contenant des colorants implique généralement d'autres méthodes.

Certains auteurs ont montré que la destruction oxydative des composés colorés est considérablement stimulé par des enzymes oxydatives, et peut-être d'un intérêt pratique pour la décoloration des colorants synthétiques.

Les enzymes telles que les peroxydases, peuvent être impliqués dans la décoloration de colorants azoïques tels que Orange II, et d'autres. **[42]**

II.7.2. Traitement des composés phénolique

Les peroxydases sont connues aussi pour polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que le phénol, les phénols substitués et les amines aromatiques présents dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres industries , y compris plastiques, textiles et les industries forestières. Le traitement peroxydasique de composés phénoliques se fait leur polymérisation selon la réaction :



La majorité des études sur la transformation des phénols des effluents, se rapporte sur les peroxydases de raifort, navet, courgette (BGP) sous forme libre ou immobilisée. **[42-44]**

II.7.3. Dégradation des pesticides

Les pesticides trouvent une large application en agriculture. Il a été estimé que certains affectent le système nerveux et d'autres sont considérés comme des poisons. Leur transformation voire leur élimination considère donc une importance des chercheurs. La chloroperpxydase est capable de transformer les pesticides halogénés : 2, 3,5 -6 tétrachlorophénol et pentachlorophénol, et les principaux produits de la réaction sont polyméries. **[19]**

II.7.4. Synthèse des polymères

Les radicaux libres produits par catalyse de la peroxydase peuvent participer à différentes réactions post-enzymatiques. La polymérisation par oxydation de composés aromatiques catalysées par les oxydoréductases permet la production de nouveaux polymères fonctionnels et de synthétiser les composés phénolique : résines avec une bonne conversion chimiosélectif.

Dans une autre étude, la peroxydase de soja catalyse la polymérisation oxydative de cardanol, en utilisant du méthanol, de l'éthanol, du propanol-2, t-butylel'alcool ou de 1-4- dioxane. La production de polymères conducteurs a un intérêt remarquable en raison de leur large gamme d'applications, y compris la protection contre la corrosion, optique affichage, les diodes électroluminescentes, etc. **[39]**

II.7.5. Utilisation de la peroxydase dans des produits cosmétiques protecteurs de la peau

La peau utilise un ensemble de mécanismes protecteurs pour se défendre contre les attaques de l'environnement. Un des mécanismes protecteurs les plus étudiés est le système de pièges à 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 provoqué par les UV. La capacité à 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. **[19]**

II.7.6. Mise en application de biosenseurs analytiques

Les électrodes basées sur la peroxydase ont une utilisation répandue dans les systèmes analytiques pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques.

Une fois la peroxydase est Co-immobilisée avec du peroxyde d'hydrogène, ces électrodes peuvent être exploitées pour la détermination du glucose, alcools, glutamate, choline. Les biosenseurs à base de cette enzyme peuvent aussi être utilisés pour la détermination des produits phénoliques et les amines aromatiques. **[45]**

II.7.7. Tests immunoenzymatiques

Les tests ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) sur lequel la peroxydase est utilisée pour le marquage d'un anticorps, ont été développés pour le dépistage des anticorps monoclonaux contre les mycotoxines. Les mycotoxines peuvent être détectés par des techniques chromatographiques. Ces techniques sont coûteuses. **[46]**

Le principe du test de détection d'anticorps consiste à analyser un sérum contaminé contient des anticorps primaires spécifiques de l'antigène. Si ces anticorps sont effectivement présents dans le sérum, ils reconnaissent l'antigène. Les anticorps secondaires sont spécifiques des anticorps primaires ; dans le protocole du test ELISA, ils sont fixés à une enzyme : la peroxydase. Cette enzyme catalyse une réaction colorée en présence d'un substrat incolore. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'anticorps à doser **[47]** (figure II.4)

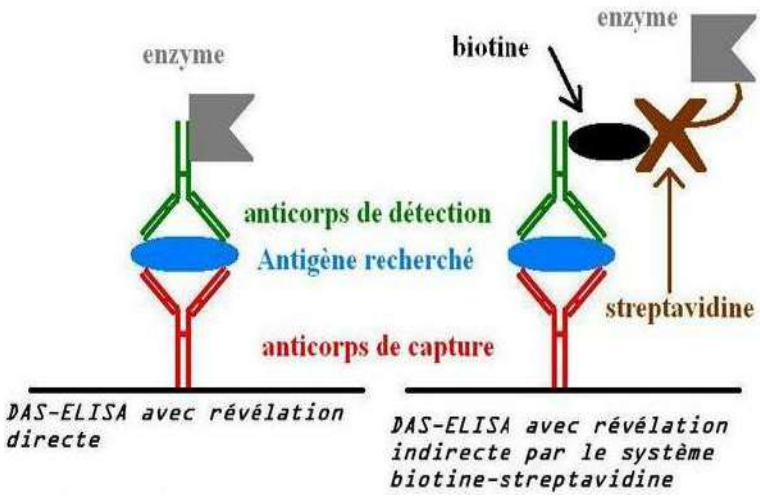
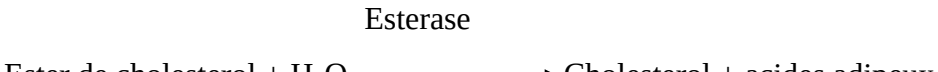
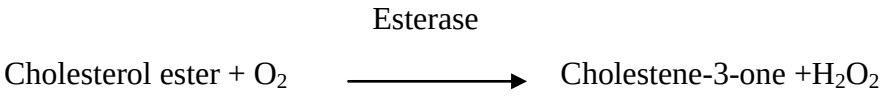


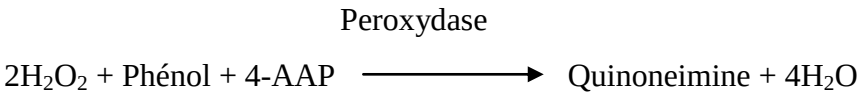
Figure .II.4. Principe du test ELISA de détection d'anticorps par la peroxydase. **[48]**

II.7.8. Dosage du cholestérol

Cette technique consiste en la réalisation d'un capteur électrochimique enzymatique capable de détecter de façon sélective et rapide le cholestérol, substance importante en ce qui concerne la suivie de la santé humaine. Elle consiste à mettre au point une électrode à peroxydase permettant la détection et le dosage du peroxyde d'hydrogène, intermédiaire formé au cours de l'oxydation enzymatique du cholestérol, le dosage de cet intermédiaire a permis par la suite de détecter et doser le cholestérol selon les réactions suivantes**[49]** :



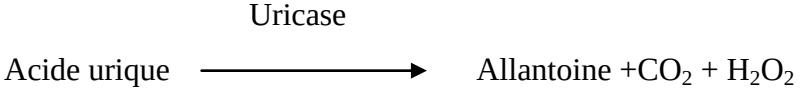


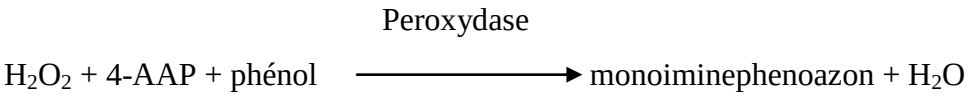


II.7.9. Application aux tests de diagnostic

Le lactose contenu dans le lait et les produits laitiers est déterminé par la technique basée sur l'immobilisation de β- galactosidase et du HRP sur un support polymérique : étant la β-galactosidase l'enzyme clé pour détecter le lactose, l'intervention de la peroxydase permet la formation de produits colorés, les couleurs développés sont utilisé pour estimer la concentration du lactose. **[50]**

Le même principe est appliqué pour le dosage de l'acide urique, après la purification des différents isoenzymes des peroxydases de racines et de sous racines de navet *(Brassica napus*), ils ont élaboré une technique de diagnostic simple, rapide et économique pour le dosage de l'acide urique. Le test est basé sur les réactions suivantes : **[51]**





II.8.conclusion

Les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une grande variété de substrats, en présence des peroxydes tels qu'avec le peroxyde d'hydrogène.

Plusieurs rôles physiologiques des peroxydases de classe III interviennent, entre autres, dans le métabolisme des parois, le métabolisme hormonal, dans la réponse aux stress abiotiques et dans les interactions plante-micro-organismes.

Une importance primordiale de cette classe d'oxydoréductase réside dans la transformation des composés aromatiques tels que les phénols, les amines aromatiques et les colorants, qui

constituent la majore classe de polluants dans les eaux usées à partir d'un certain nombre d'industries.

Dans d’autres domaines tant en technologie qu’en médical, les peroxydases sont très efficaces en prouvant leurs aptitude dans ces applications.

III.1 Introduction

Ce chapitre est divisé en deux parties : la première décrit le matériel et les méthodes utilisés pour la caractérisation de trois peroxydases : HRP (standard), de navet et de courgette (extraites). Les résultats obtenues sont représentés et discutés dans la deuxième partie.

La caractérisation se fait par l'étude de quelques paramètres tels que les constantes cinétiques, le pH optimal, la température optimale, la stabilité (thermique et en fonction du temps), ainsi que l'effet de quelques agents chimiques sur l'AE. A la fin on a terminé par une application de peroxydase sur la dégradation d'un colorant.

III.2. MATERIEL ET METHODES

III.2.1.Matériel et réactifs

♦ **Matériel**

- Agitateur.
- Centrifugeuse Hettich ZENTRIFUGEN (6000 $tr.min^{-1}$).
- pH-mètre type : DENVER.
- Mixeur domestique.
- Spectrophotomètre UV –Vis (UV mini-1240 SHIMADZU)
- Balance électronique : sartorius
- Etuve MEMMERT 40050-IP20.
- La hotte.
- Chronomètre.
- Thermomètre.
- Bain-marie : memmert.

♦**Verreries de laboratoire**

♦**Réactifs :** les différents réactifs utilisés lors de cette étude sont présentés sur le tableau III.1

Tableau III.1. Propriétés des différents réactifs utilisés.

Réactif chimique	**Structure chimique, masse molaire (g/mol)**	**Fournisseur**
Acétone	C_3H_6O, M = 58, 0791 g/mol	**Sigma-Aldrich**
4aminoantypiryne	C_{11} H_{13} N_3 , M=203,27g/mol	**-**
Acide borique	H_3BO_3, M=61.83g/mol	**Sigma-Aldrich**
Biphtalate de potassium	$C_8H_5KO_4$, M=204 g/mol	**-**
Chlorure de Calcium	$CaCl_2$, M=110.98g/mol	**Riedel-de Haën**
Chlorure de sodium	Na Cl, M = 58.443g/mol	**Sigma-Aldrich**
Chlorure d'hydrogène	HCl, M=36.461g/mol	**Sigma-Aldrich**
Chlorure de potassium	KCl, M=74.551g/mol	**Riedel-de Haën**
Ethylène Diamine Tétra-Acétique	EDTA, M=292.242g/mol	**Sigma-Aldrich**
Hydroxyde de sodium	NaOH, M=39.997g/mol	**Riedel-de Haën**
Phosphate mono potassique	KH_2PO_4, M=136.085g/mol	**Sigma-Aldrich**
Sulfate de fer	$FeSO_4$, M=151.91g/mol	**Riedel-de Haën**
sulfate de magnésium	Mg SO_4, M=246.47g/mol	**Riedel-de Haën**
Urée	$CO(NH_2)_2$, M=60.0553g/mol	**Sigma-Aldrich**

♦ **Substrats**

- **Vert Malachite:** C'est une poudre de couleur bleu vert, très soluble dans l'eau. Il est caractérisé par son utilisation comme indicateur coloré.
- **Peroxyde d'hydrogène: 30%**

  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 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/cm^3.

- ***Enzyme***
- **HRP** : Horse Radish Peroxidase (Sigma-Aldrich).

Peroxydase : type X.

Source : raifort.

Forme : Suspension sulfate d'ammonium.

[Protéines] = 7 mg/ml.

Activité spécifique = 386 unités/mg.

Température de conservation : (2-8) ^{0}C.

III.2.2. Méthodes

III.2.2.1 : Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-visible [52]

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

A. Domaine spectral

Le domaine UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

- Visible: 800 nm- 400 nm
- Porche-UV: 400 nm - 200 nm
- UV-lointain : 200 nm - 10 nm.

B. Principe

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $kJ \cdot mol^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

A. Loi d'absorption de la lumière - loi de Beer-Lambert

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l.

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. La détermination de la concentration des colorants est effectuée par dosage spectrophotométrie dans le domaine de visible, en utilisant la loi de Beer-Lambert.

$\text{Log } (I_0 / I) = \varepsilon.C.L$ (III.1)

Où : $\text{Log } (I_0 / I)$ = Absorbance notée : A

Avec:

ε: Coefficient d'extinction (L/mol)

C : Concentration de soluté

L : Epaisseur de la cuve (cm)

I_0 : Intensité de l'énergie d'irradiation arrivant sur l'échantillon (Lumière incidente)

I : L'intensité de la radiation qui a traversé l'échantillon (Lumière transmise)

III.2.2.2 Extraction et purification de la peroxydase de la courgette et de navet blanc

1- *Préparation de l'extrait brut* : 100 g de fruit végétaux (courgette ou navet) bien rincée avec l'eau distillée (navet épulché) et coupée en cubes puis broyé avec 100 ml d'eau distillée dans un mixeur, on obtient un homogénéisât liquide. Ensuite, ce dernier est filtré sur multicouche de gaze, le filtrat est considéré comme extrait enzymatique brut (EEB).

2- *Préparation de l'extrait partiellement purifié* : dans une burette, on met un volume fixe d'acétone refroidi à 4°C et un volume équivalent de l'EEB (refroidi préalablement à 0°C) dans un bêcher dans un bain d'eau glacée sous agitation magnétique, ajouter de l'acétone goutte à goutte, le mélange extrait/acétone est mis dans le réfrigérateur pendant 2h. ce mélange a subit une centrifugation à 3000 tr/min pendant 10min. finalement, on dissolve les culots dans un volume de 100 ml de tampon pH 7, c'est l'extrait enzymatique partiellement purifié (EEPP).

Les différentes étapes d'extraction et de purification de la peroxydase de navet sont résumées sur la figure III.1 (et celles de courgette sont résumées en annexe 1). **[53]**

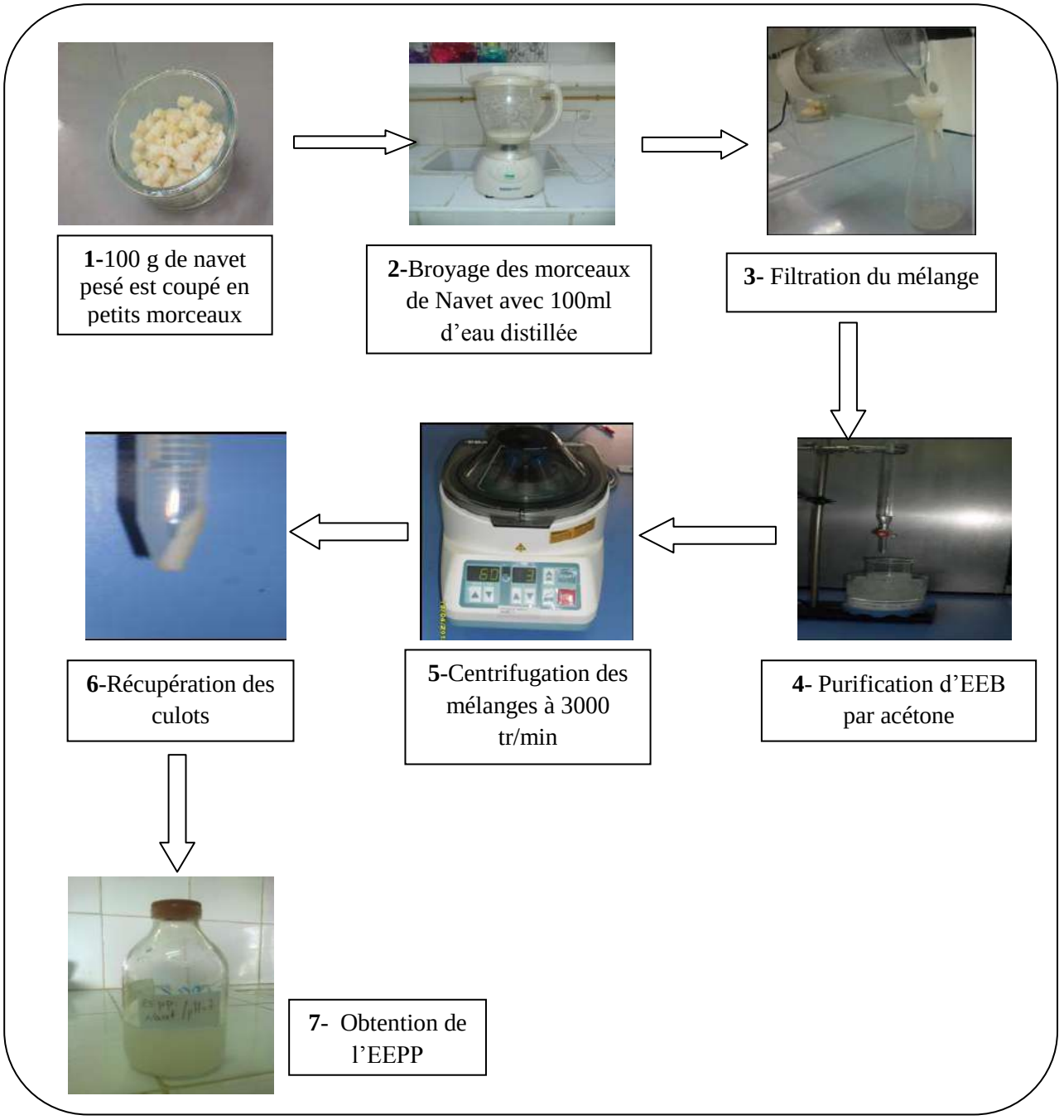


Figure III.1 : Protocole expérimental de préparation et de purification de l'extrait enzymatique de peroxydase de navet.

III.2.2.3. Test d'activité enzymatique

La méthode de mesure de l'AE est basée sur la réaction colorimétrique qui utilise le peroxyde d'hydrogène, le phénol et le 4-aminoantipyrine (agent chromogène) en présence de peroxydase selon la réaction suivante illustrée dans la figure III.2

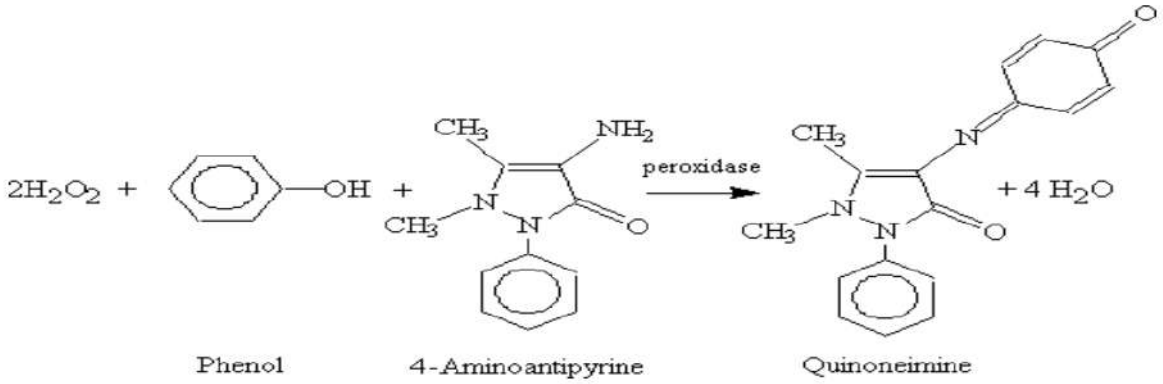


Figure.III.2. Réaction entre le phénol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité de la peroxydase qui transfère 1µmol du peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C. Cette activité est calculée à partir de la relation suivante III.2.

$$AE=\frac{\left(\frac{dC}{dt}\right)\times Volume\,de\,mélange\,réactionnel}{volume\,d'enzyme\,injectée} \qquad \text{(III.2)}$$

(dC/dt): variation de la concentration au cours du temps.

D'où l'AE sera donnée par l'expression III.3.

$$AE=\left(\frac{dC}{dt}\right)\mathbf{x}\frac{10^6}{10^3}\frac{Volume\,de\,mélange\,réactionnel}{volume\,d'enzyme\,injectée}\text{, …. [UI/ml].} \qquad \text{(III.3)}$$

Pour avoir le dc/dt, il faut déterminer la courbe cinétique : DO=f (temps) et la courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène : DO = f ([H_2O_2]. **[54]**

- **Expérience N°1**

L'essai d'AE se fait par préparation de 3 tubes à essais contenant ***:***

- 2 ml de solution tampon pH 7.
- 1 ml d' H_2O_2 de concentration 0,01M.
- 1 ml de phénol à 0.01M
- 1 ml de 4-Aminoantipyrine à0.01M

Dans les tubes à essais préparer trois, dont chacun contient 5 ml du mélange (A) le premier servira comme blanc, le 2ème est y ajouté 0.1 ml d'Extrait enzymatique à la stabilisation de

la couleur on fait un balayage pour déterminer λ_{max}. après avoir la fixer on prend le 3ème tube, et on lui ajoute 0.2 ml d'EE, on déclenche immédiatement le chronomètre, et on note la DO chaque 10 secondes pendant 4 min.

(On obtient la courbe DO = f (temps (min)) = A.t.)

- **Expérience N°2**

Cette expérience a pour objectif de déterminer la courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène pour chaque extrait. Pour ce faire, une série de tubes à essais (8 tubes) avec des concentrations finales en H_2O_2 variant de (2.10^{-5} à 2.10^{-4})mol/l avec des mélanges réactionnels contenant le phénol, 4-aminoantipyrine et la solution tampon pH 7. La lecture des DO se fait à λ_{max}. Finalement, on trace la courbe DO = f ([H_2O_2]) =ε. [H_2O_2].

En utilisant la relation III.4, on peut déterminer l'AE de la peroxydase.

$$AE=\frac{A}{\varepsilon}.\frac{10^6}{10^3}.\frac{Volumedemélangeréactionnel}{volumed'enzymeinjectée} \qquad \text{(III.4)}$$

Avec:

A=ΔDO/Δt.

III.2.2.4 Dosage de la quantité des protéines dans les extraits enzymatiques

- **Principe**

La technique de Bradford **[55]** utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines. Ce colorant existe sous 3 formes : une forme anionique colorée en bleu (λ_{max} =595 nm), une forme cationique rouge (λ_{max} = 470 nm) et une forme neutre verte (λ_{max} = 650 nm). C'est la forme anionique qui se fixerait préférentiellement aux protéines grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des protéines (plus particulièrement les groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques).

- **Procédure**

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

Les réactifs utilisés ont les compositions chimiques suivantes :

- Réactifs(1) : Réactifs de Bradford contient :

- Bleu de Coomassie (100mg /l).
- Ethanol 95% (50ml).
- $H_3PO_4$85% (100ml).

Le mélange reste 24 h sous agitation à l'obscurité puis on fait une filtration dur papier filtre.

- Réactifs(2) : Hydroxyde de sodium (NaOH) 1M.
- Réactifs(3) : Gamme d'étalonnage et dosage de la solution

On réalise une gamme d'étalonnage contenant 0 à1 mg /ml de protéine à partir d'une solution mère de 1mg /ml.

La détermination de la courbe d'étalonnage de sérum d'albumine bovin (SAB) est résumée dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Volumes des réactifs utilisés lors de la détermination de la quantité des protéines.

C (mg/ml)	0	0.10	0.25	0.50	0.75	1.00	EB	EPP
$\boldsymbol{V_{Etalon}}$ **(µl)**	100	100	100	100	100	100	100	100
$\boldsymbol{V_{NaOH}}$**(µl)**	250	250	250	250	250	250	250	250
$\boldsymbol{V_{réactif\ de\ Bradford}(ml)}$	5	5	5	5	5	5	5	5

III.2.2.5 Détermination des paramètres de purification à l'acétone

La purification par acétone, est évaluée par la détermination de quatre paramètres: l'activité spécifique, l'activité totale, le rendement de purification et le facteur de purification, ces paramètres sont définis comme suit :

$$AS = \frac{AE}{\text{Concentration des protéines}} \quad \text{(III.5)}$$

$$AT = AE.V_t \quad \text{(III.6)}$$

$$RP = \frac{AT\ (EEPP)}{AT\ (EEB)}.100 \quad \text{(III.7)}$$

$$FP = \frac{AS\ (EEPP)}{AS\ (EEB)} \quad \text{(III.8)}$$

Avec :

AS : activité spécifique.

AT : activité totale.

RP : rendement de purification.

FP : facteur de purification.

V_t : volume total de l'extrait enzymatique purifié, (ml).

III.2.2.6 Effet des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique de la peroxydase

A) Effet du pH

Toutes les enzymes sont sensibles aux variations de la concentration en H^+ du milieu, donc il existe une zone de pH pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Alors le pH est un paramètre essentiel à prendre en compte pour la caractérisation des peroxydases. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de pH (2 à 10) sur la variation de l'AE des peroxydases de navet et de courgette.

Les solutions tampon utilisées, sont préparées selon la pharmacopiée Américaine, **[56]** et sont détaillés en annexe A2.

Procédure, dans une série de mélanges réactionnels contenant **:**

- 1 ml de phénol (0.01 M).
- 1 ml d'H_2O_2 (0.01 M).
- 1 ml de 4- Aminoantypiryne (0.01 M).

On ajoute à chaque tube 2 ml de différentes solutions tampon (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10). La réaction est déclenchée par addition de 0.2 ml d'EEPP. Après agitation, la lecture des DO en fonction du temps pour chaque mélange réactionnel (à la longueur d'onde maximale de chaque extrait enzymatique), se fait à l'aide de spectrophotomètre UV-vis.

Pour chaque pH, la cinétique enzymatique est représentée par la courbe : DO = f (temps).

L'expression de l'activité résiduelle de la peroxydase est donnée par :

$$AE_{rés} = \frac{AE}{AE_{max}} . 100 \qquad \text{(III.9)}$$

Avec: AE_{max}: Activité enzymatique maximale (UI/ml)

B) Effet de la température

L'activité catalytique des enzymes dépend de l'intégrité de leur structure en tant que protéine, une exposition à des températures inappropriées provoque une dénaturation qui entraine une perte de leur activité catalytique, il est donc nécessaire de connaitre la température optimale à laquelle l'enzyme présente un maximum d'activité par la méthode suivante :

Procédure

-Dans un bain-marie, préparer des tubes à essai contenant**:**

• 1 ml de H_2O_2 (0.01 M).

• 1 ml de phénol (0.01 M).

• 1 ml de 4-aminoantipyrine (0.01 M).

• 2 ml de solution tampon de pH_{opt}

- Régler le bain-marie aux températures : (10 à 80 °C).

-La réaction est déclenchée par addition de 0.2 ml d'EEPP. Après agitation, la lecture des DO en fonction du temps pour chaque mélange réactionnel (à la longueur d'onde maximale de chaque extrait enzymatique), se fait à l'aide de spectrophotomètre UV-visible.

C) Effet des effecteurs chimiques

Parmi les agents chimiques, il existe des effecteurs positifs (activateurs) ou négatifs (inhibiteurs) qui affectent considérablement l'activité de l'enzyme, ce sont des composés autres que le substrat.

Procédure

Pour étudier l'effet de ces effecteurs sur l'activité de la peroxydase il faut préparer tout d'abord une solution mère concentrée (0.1 M) pour chacun des effecteurs. De cette solution ; on prélève 0.2 ml et on l'ajoute dans 4.8 ml du mélange réactionnel contenant :

1 ml de 4-AAP + 1 ml de phénol + 1 ml de H_2O_2 + 1.8 ml de tampon. (Le volume des effecteurs ajouté au milieu réactionnel ne dépasse pas 5% du volume global pour éviter l'effet de dilution). Incuber pendant 30 min à la température ambiante.

La réaction se déclenche en ajoutant 0.2ml d'enzyme au mélange réactionnel. La lecture des DO en fonction du temps pour chaque mélange réactionnel (à la longueur d'onde maximale de chaque extrait enzymatique), se fait à l'aide de spectrophotomètre UV-visible.

Les taux d'activation et d'inhibition sont calculés respectivement par les expressions III.10 et III.11.

$$\tau_a = \frac{AE_{\text{avec activateur}} - AE_{sans\ activateur}}{\text{AE}_{avec\ activateur}} .100 \quad \text{(III.10)}$$

$$\tau_i = \frac{AE_{\ sans\ \text{inhibiteur}} - AE_{\ avec\ \text{inhibiteur}}}{AE_{\ sans\ \text{inhibiteur}}} .100 \quad \text{(III.11)}$$

τ_a : taux d'activation.

τ_i : taux d'inhibition.

Cette étude a été effectuée avec les cations métalliques (Ca^{2+}, Fe^{2+} Mg^{2+} et Na^{+}) provenant de $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, et NaCl et de et des effecteurs organiques : urée, EDTA,

D) Stabilité thermique

Afin de suivre la stabilité de la peroxydase en fonction de la température , un volume de 0.2 ml d'EEPP est conservé aux trois températures pendant 2h. l'AE est déterminée.

Procédure :

Préparer des tubes à essai et introduire dans chaque tube 0.2 ml d'enzyme puis incuber dans un bain marie aux températures : 50°C, 60°C et 70°C

A chaque température on dépose 6 tubes contenant l'EE, et chaque 20 minute on fait sortir un tube qui sera refroidi à la température ambiante.

Le test d'activité enzymatique se fait par addition de 5 ml de mélange de : 4-AAP-phénol-H_2O_2 aux concentrations déjà donnée + tampon à pH_{opt}) à 0.2 ml d'enzyme, après on lit la DO en fonction du temps, à la longueur d'onde maximale de chaque enzyme.

E)- Stabilité en fonction du temps

Afin de suivre la stabilité de la peroxydase en fonction du temps, un volume de 25 ml d'EEPP est conservé à la température de 4°C pendant : 25 jours pour Les EEPP et 22 jours pour l'HRP. Pour des temps déterminés, l'AE est déterminée et l'activité enzymatique résiduelle est calculée.

III.2.2.7. Détermination des constantes cinétiques K_M et V_M

Les constantes cinétiques V_M et K_M sont déterminées par apport aux substrats peroxyde d''hydrogène et phénol.

Pour ce faire, en premier lieu l'expérience consiste à préparer des mélanges réactionnels contenant différentes concentrations de H_2O_2 allant de 10 mM à 60 mM et à concentration de phénol de 0.01 M.

En deuxième lieu, et pour une concentration fixe de H_2O_2 de 0.01 M des mélanges réactionnels contenant différentes concentrations de phénol variant de 2 mM à 10 mM.

Tous ces mélanges contiennent le 4-AAP, l'EE et la solution tampon pH_{opt}.

Cette étude consiste à :

1- Mesurer l'AE correspondante à chaque concentration.

2- Tracer dans les deux l'AE en fonction de la concentration de substrat

3- Tracer la courbe 1/AE en fonction de 1/ [substrat]

III.2.2.8 Application

Après avoir réalisé les étapes de caractérisation, nous avons essayé de mettre en évidence l'action de la peroxydase sur une molécule de colorant : vert malachite.

En vue son utilisation comme pesticide antiparasitaire, comme fongicide contre les infections fongiques de certains animaux et comme bactéricide pour le traitement d'infections bactériennes (des poissons et des œufs de poisson en pisciculture notamment), ce colorant présente un risque sanitaire significatif pour les humains.

A) Effet du pH

Dans une série des tubes à essais, on prépare le mélange réactionnel suivant :

- 5.6 ml de solution tampon à différents pH : 2 à 10.
- 2 ml de colorant à une concentration (50 mg/L).
- 2 ml de peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0,01M.

La réaction est déclenchée par l'introduction de 0.4 ml d'EEPP d'AE = 6.012, 6.017, 10.125 UI/ml pour l'$EEPP_{Courgette}$, L'$EEPP_{Navet}$, et l'HRP respectivement.On laisse la réaction se dérouler pendant 20 min. Puis, on l'arrête par centrifugation des mélanges pendant 15 min à une vitesse de 3000 tour/min. Les surnageant récupérés ont subi une analyse des par spectrophotomètre UV-visible à λ_{max} =620 nm (c'est la longueur maximale d'absorption du vert malachite).

La décoloration est traduite par l'expression du rendement de décoloration et est donnée par l'équation (III.12).

$$R_d(\%) = \frac{DO_{initial} - DO_{finale}}{DO_{initial}} . 100 \quad \text{(III.12)}$$

Avec :

R_d : rendement de décoloration.

B) Effet d'activité enzymatique

Dans une série des tubes à essais, on prépare le mélange réactionnel contenant :

- Un volume de solution tampon à pH_{opt}.
- 2 ml de colorant a une concentration 50 mg/L.
- 2 ml de peroxyde d'hydrogène de concentration de 0,01M.

La réaction est déclenchée par introduction de différentes AE de l'EEPP (de 6.012 à 30.06 UI/ml pour la courgette, de 6.017 à 30.085 UI/ml pour le navet, et de 10.125 à 50.62 UI/ml pour l'HRP), on laisse la réaction se dérouler 20 min. Ensuite, ces mélanges sont centrifugés à 3000 tour/min pendant 15 min. Finalement, l'analyse des mélanges avant et après traitement se fait par spectrophotomètre UV-visible à λ_{max} =620 nm.

III.3. RESULTATS ET DISCUSSION

III.3.1.Test d'activité enzymatique

Les courbes d'étalonnage de H_2O_2 pour les trois enzymes ainsi que celle de l'albumine sont mentionnées en annexes : 3,4.

a) Résultats

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Paramètres de purification des extraits EEB et EEPP

Enzymes		**AE (UI/ml)**	**[protéines] (mg/ml)**	**AS (UI/mg)**	**V_t (ml)**	**A_t (UI)**	**R (%)**	**F**
Courgette	**EEB**	6.012	1.855	3.241	142	853.704	100	1
	EEPP	4.8	0.726	6.611	100	480	56.225	2.04
Navet	**EEB**	6.017	1.942	3.098	154	926.618	100	1
	EEPP	4.156	0.660	6.297	100	415.6	44.85	2.03
HRP		10.125	0.056	180.8				

b) Discussion

La procédure de purification de la peroxydase par l'acétone est évaluée par la détermination des paramètres donnés dans le tableau III.3. Elle conduit à un facteur de purification proche de celui calculé après la purification de Mnperoxydase par l'acétone **[57]**. Dans les travaux réalisés par Guerrero et al. (2008) **[58],** un rendement de purification et un facteur de purification de 28.5 % et de 1.3 ont été atteints, respectivement, après la purification par précipitation à l'acétone de la peroxydase de navet.

III.3.2.Effet des conditions physico-chimiques sur l'activité enzymatique de la peroxydase

A) Effet du pH

A.1. Résultats

Les résultats des figures III.3 et III.4 montrent la variation de l'$AE_{rés}$ des peroxydases de navet et de courgette en fonction du pH respectivement.

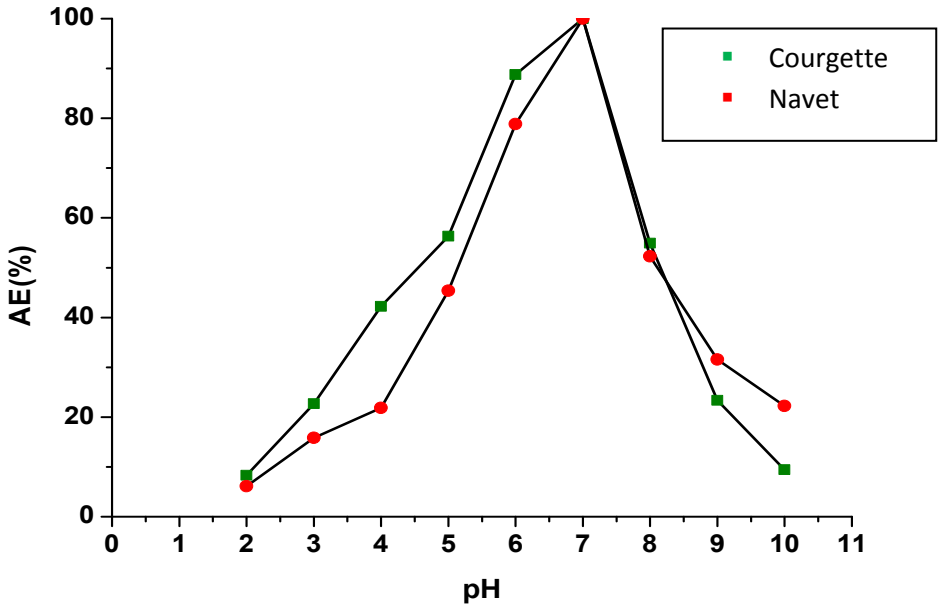


Figure III.3. Effet de pH sur l'$AE_{rés}$ de la peroxydase de Courgette à λ_{max}=502nm et de Navet à λ_{max}=504 nm .

A.2. Discussion

L'activité résiduelle à différents pH est déterminée par un profil sous forme de cloche et qui reconnait un maximum d'activité à une valeur de pH égale à 7 pour les extraits de navet et de courgette. La HRP possède un pH optimal égal à 6 selon les données de référence de cette enzyme.

- Lorsque le 2 ≤ pH < 7, il se produit une perte d'activité avec un maximum de plus de 90 % à pH 2
- Lorsque le 7 < pH ≤10, il se produit aussi une réduction de l'AE, mais cette réduction est moins importante que la précédente (80%).

Nous pouvons dire que, la diminution de l'AE résulte de plusieurs effets :

- Le pH peut affecter la stabilité de l'enzyme, celle-ci peut, dans certains cas, être inactivée irréversiblement.
- Le pH peut affecter les paramètres cinétiques en modifiant les états d'ionisation du substrat et/ou ceux de l'enzyme, l'effet de l'ionisation du substrat peut éventuellement se déduire du comportement d'analogues structuraux du substrat ne comportant pas de groupes ionisables **[59]**.

Etant donné que l'AE de la peroxydase est déterminée pour de nombreux substrats, la variation de l'$AE_{rés}$ en fonction du pH est similaire aux celles de la HRP sur le substrat : o-

dianisidine–HCl, BGP sur le substrat : gaïacol avec un optimum de pH ayant les valeurs de 5, 6 et 7, respectivement **[60, 61]**.

B) Effet de la température

B.1. Résultats

L'illustration de la dépendance de l'AE avec la température pour les peroxydases de navet, de courgette et d'HRP est donnée sur les figures III.5 à III.7.

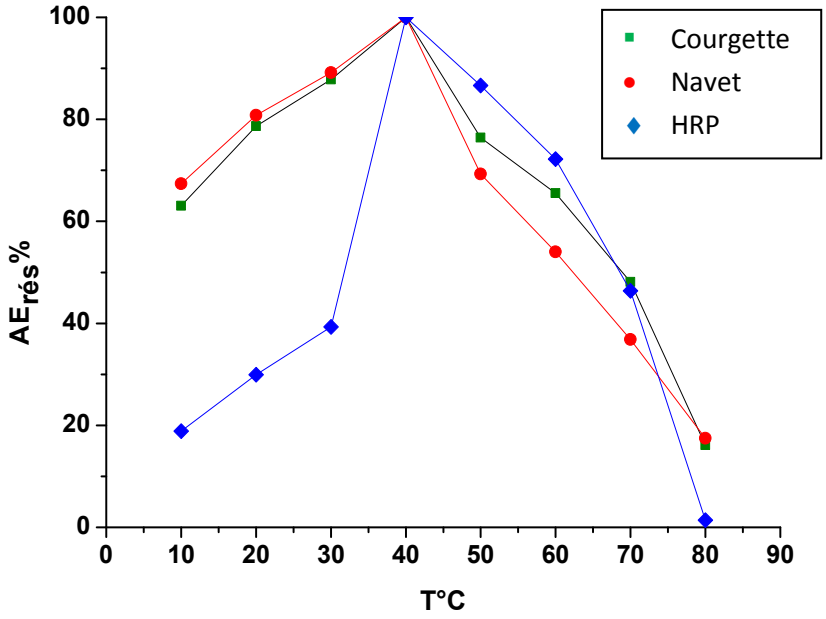


Figure III.4. Effet de température sur l'$AE_{rés}$ des trois peroxydases.

B.2. Discussion

- Pour les trois peroxydases, l'activité enzymatique est maximale à T=40°C
- D'après les résultats, les deux extraits de navet et de courgette, les courbes représentent deux phases :

- *Phase 1* : l'augmentation de la T de 10 à 40 °C entraine une augmentation de l'AE cette augmentation est due à l'activation de l'enzyme. Cette phase est dite de stabilité thermique de la peroxydase.

On peut dire que l'E est stable thermiquement car sa vitesse initiale augmente légèrement avec l'augmentation de la Température.

- *Phase 2 :* l'augmentation de la T au-delà de 40°C, entraine une réduction de l'AE de plus de 80 %, qui peut être due à l'inactivation de l'E. Cette phase est dite d'instabilité thermique de la peroxydase L'élévation de la T au-delà 40°C a pour indice d'inactiver l'enzyme ou de dénaturer la protéine. D'autre part, une élévation de T peut provoquer la

décomposition du peroxyde d'hydrogène, substrat nécessaire à l'initiation du cycle catalytique de la peroxydase.

➢ Pour HRP la courbe représente un profil sous forme de cloche.

- Lorsque 10 < T< 30°C, l'AE augmente légèrement avec l'augmentation de la température.
- Lorsque 30 < T ≤ 40°C, l'AE augmente rapidement avec l'augmentation de la température jusqu'à ce qu'elle atteindre son maximum à la température de 40°C.
- Lorsque 40 < T ≤ 80°C l'AE diminue progressivement avec l'augmentation de la température, mais cette réduction est maximale à partir de T = 70°C (plus de 50 % de perte d'AE) et à T = 80°C l'AE est nulle.

➢ L'HRP se dénature aux valeurs élevée de la T en comparaison avec les peroxydases de navet et de courgette.

C) Effet des effecteurs chimiques

C.1. Résultats

La présence des effecteurs chimiques affecte les réactions enzymatiques en agissant comme inhibiteurs ou activateurs. Afin de montrer cet effet, le tableau III.4 regroupe les différentes valeurs des taux d'activation et d'inhibition.

Tableau III.4. Effet des effecteurs chimiques sur l'activité des peroxydases

Effecteur chimique	HRP		$EEPP_{navet}$		$EEPP_{courgette}$	
	τ_a ou τ_i	Activateur/ Inhibiteur	τ_a ou τ_i	Activateur/ Inhibiteur	τ_a ou τ_i	Activateur/ Inhibiteur
$CaCl_2$	21.19	I	20.76	A	34.70	I
$FeSO_4$	13.92	A	49.01	I	30.86	A
NaCl	7.25	A	12.34	A	26.54	I
$MgSO_4$	21	A	8.03	A	53.96	I
Urée	12.31	I	4.57	A	11.20	I
EDTA	86.54	I	54.36	I	41.56	I

C.2. Discussion

Cette étude permet de faire une comparaison entre les effets des effecteurs sur l'AE des trois peroxydases :

- Parmi les effecteurs utilisés l'EDTA est le seul qui représente le même effet (Inhibiteur) pour les trois peroxydases. Le plus grand taux d'inhibition est observé pour l'HRP qui est égal à 86.54 %.
- Les deux effecteurs : NaCl, $MgSO_4$, agissent comme activateurs pour l'HRP et le navet et inhibiteurs pour l'extrait de courgette.
- L'urée, et le $CaCl_2$ affectent l'AE de la même manière pour les trois peroxydases mais par un effet différent (inhibiteur pour l'HRP et la courgette, et activateur pour le navet).
- Le $FeSO_4$ représente des effets inverses aux deux précédents (activateur pour l'HRP et la courgette, et inhibiteur pour le navet).

D) Stabilité thermique

D.1. Résultats

Comme le pH, la stabilité thermique est un paramètre important en vue d'une application de la peroxydase. L'illustration de la variation de l'AE résiduelle des peroxydases en fonction du temps pour les températures 50, 60 et 70°C est donnée sur les figures III.8 à III.10.

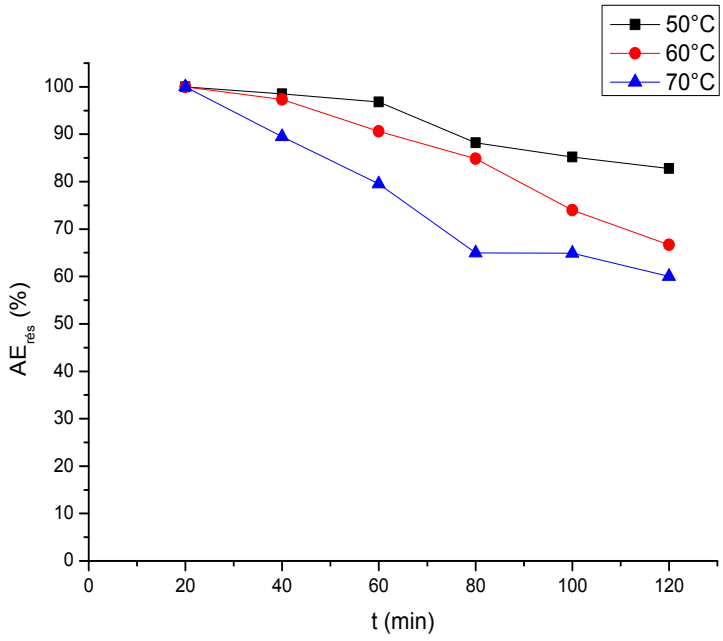


Figure III.5. Variation de l'$AE_{rés}$ de la peroxydase de courgette en fonction du temps à différentes températures (50 °C, 60 °C et 70 °C).

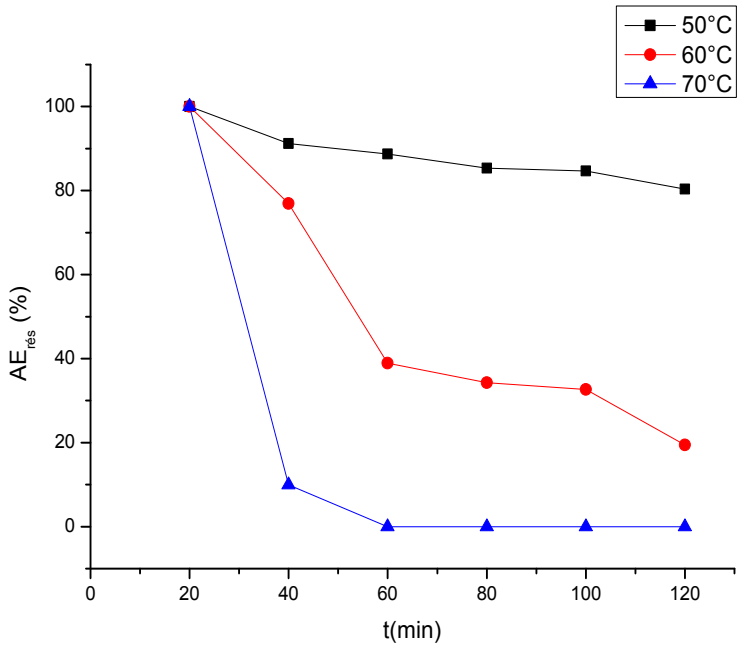


Figure III.6. Variation de l'AE$_{rés}$ de la peroxydase de navet en fonction du temps à différentes températures (50 °C, 60 °C et 70 °C).

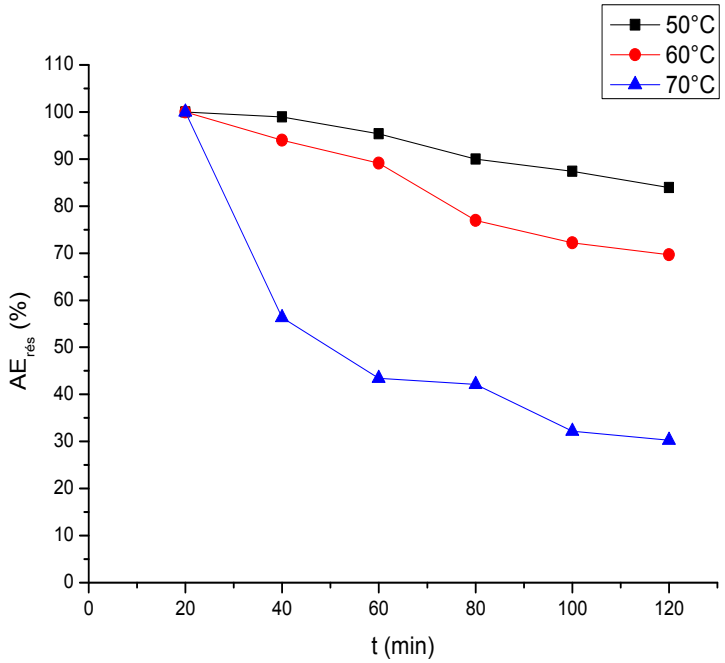


Figure.III.7. Variation de l'AE$_{rés}$ d'HRP en fonction du temps à différentes températures (50 °C, 60 °C et 70 °C).

D.2. Discussion

- Pour chaque température l'AE diminue en fonction de temps.
- A T = 70°C l'inactivation est plus rapide que a la T=60°C, et T=50°C.

- L'AE à T=70°C et à T=60°C diminuer brusquement jusqu'à une valeur minimale. Mais l'activité enzymatique à T= 50°C diminuer légèrement en fonction de temps.
- A T= 50°C les trois peroxydases conservent leur AE de plus de 80%,
- à T=60°C l'HRP concerve plus de 75% de son AE. tandis que la peroxydase de courgette et de navet perdent 35% et 80% de leurs AE respectivement, alors que à 70°C l'HRP et l'extrait de courgette sont plus stable que l'extrait de navet qui est le plus sensible où il perd leur activité complètement à partir de t = 60min.

Des études antérieures ont montré que la température de 70°C conduit en une réduction maximale de l'AE, provoquée par une dénaturation de quelques peroxydases de plantes incubées à cette température de plus de 2 h **[59]**.

E) Stabilité en fonction du temps

E.1. Résultats

La solution d'EE contient des fractions protéiques et non protéiques non éliminées pouvant modifier l'AE de la peroxydase, ce qui rend nécessaire de tester son AE à la température de conservation pour évaluer la perte en activité.

Les figures III.11 à III.13 mettent en évidence la stabilité des peroxydases en fonction du temps à la température 4°C.

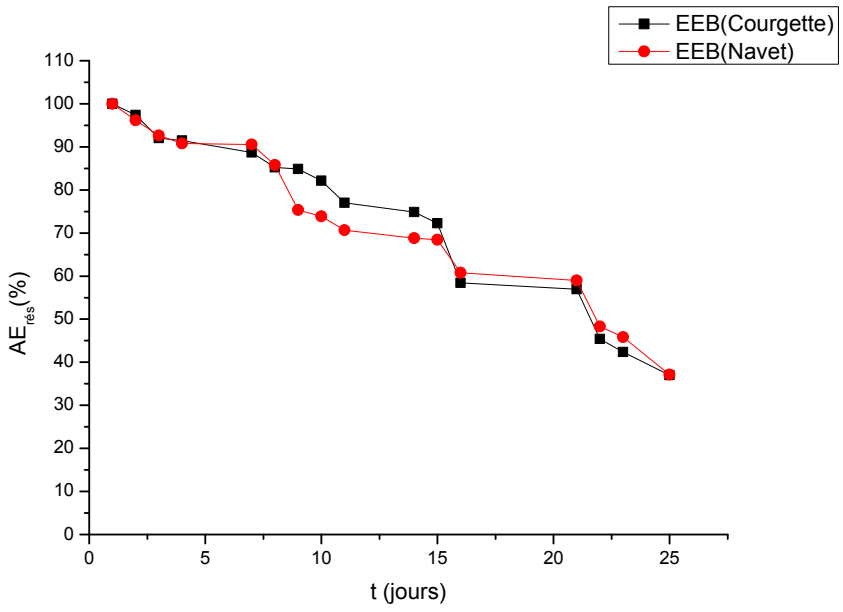


Figure III.8. Variation de l'AE$_{rés}$ des EEB de courgette et de navet en fonction du temps. (pH 7, substrat : phénol et T = 4°C)

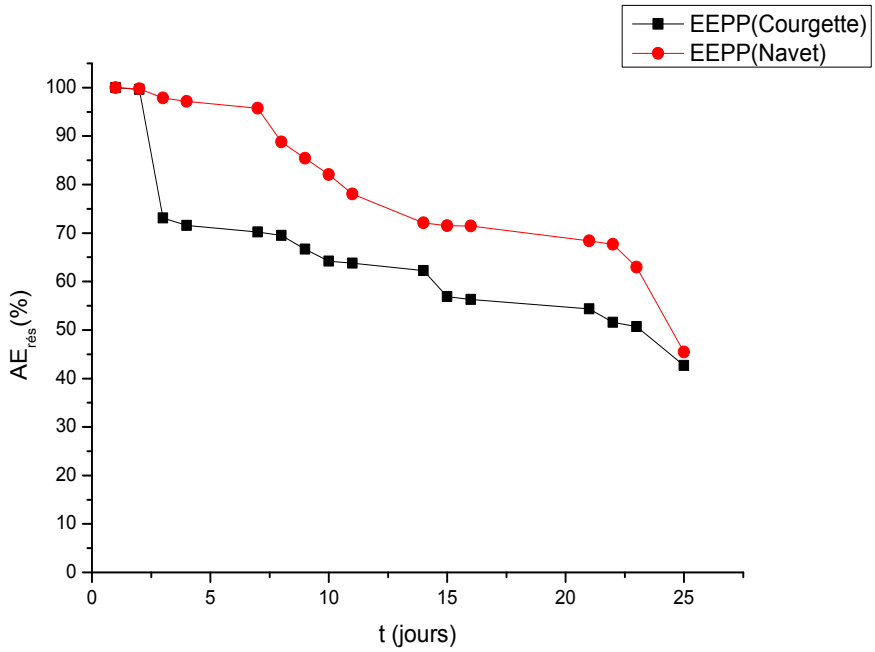


Figure.III.9. Variation de l'AE$_{rés}$ des EEPP de courgette et de navet en fonction du temps. (pH 7, substrat : phénol et T = 4°C)

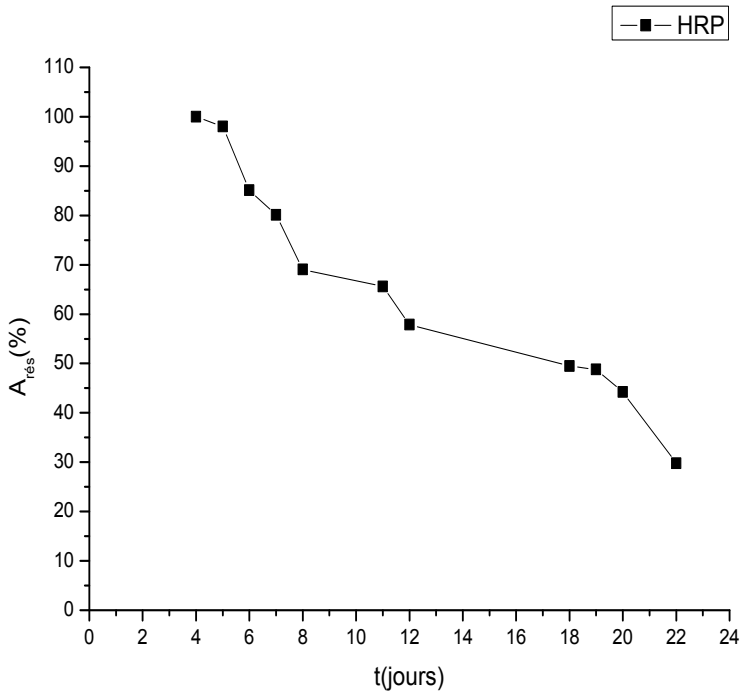


Figure III.10. Variation de l'AE$_{rés}$ d'HRP en fonction du temps. (pH 6, substrat : phénol et T= 4°C)

E.2. Discussion

- pour les extraits EEB, l'AE diminue en fonction du temps, elle perd plus de 55 % au 25ème jours.
- pour les EEPP, l'AE de l'extrait de navet se conserve pendant les huit premiers jours, puis elle perd plus de 50 % de son AE au 25ème jours. Cependant, l'AE de l'EEPP de courgette perd plus de 25 % à partir du 3ème jour, puis la réduction devient faible.
- Le même phénomène de réduction d'AE est observé pour l'HRP : l'activité perd environ 70 % au 22ème jour.

Une fois la peroxydase est mise hors de son contexte naturel, elle se trouve exposée à de nombreux agents (microorganismes, métaux..) qui peuvent l'endommager de manière irréversible, et par conséquent il perde son AE malgré que les conditions de conservation sont respectées. La purification de telle protéine peut se faire dans le but d'éliminer les impuretés présentes dans l'EEB malgré qu'elle provoque une perte substantielle d'activité ou de quantité de la protéine.

Pour une enzyme, sa qualité n'est pas exprimée seulement en terme d'activité malgré qu'elle soit importante mais de garder cette activité stable pendant une longue durée même qu'elle soit faible. Pour notre cas, la peroxydase perd une certaine activité après la purification par l'acétone mais elle reste stable pendant une certaine durée.

III.3.3 Paramètres cinétiques

a) Résultats

Selon la figure III.14, on constate que la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène est hyperbolique : elle est de type Michaelis-Menten pour les trois peroxydases.

$$V_0 = \frac{V_M . [S_0]}{K_M + [S_0]} \qquad \text{(III.13)}$$

La réécriture de l'équation de sous forme d'une représentation linéaire permet la détermination des paramètres cinétiques K_M et V_M.

$$\frac{1}{V0} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_M}{V_M} . \frac{1}{[S_0]} \qquad \text{(III.14)}$$

La détermination des constantes V_M et K_M se fait par la représentation graphique de $\frac{1}{V0}$ en fonction de $\frac{1}{[H_2O_2]}$. Les figures III.15 à III.17, illustrent ces représentations.

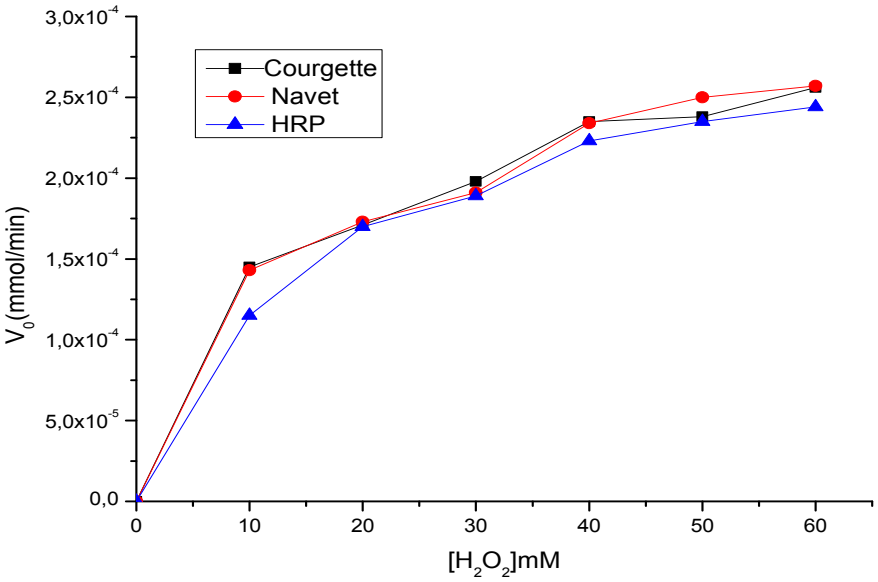


Figure.III.11. Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de H_2O_2 pour les trois peroxydases.

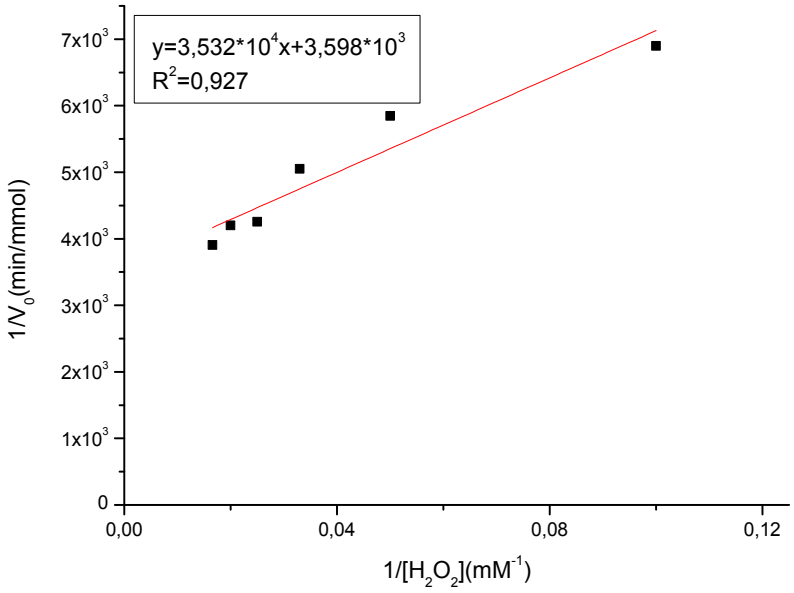


Figure.III.12. Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[H_2O_2])$ pour la peroxydase de courgette

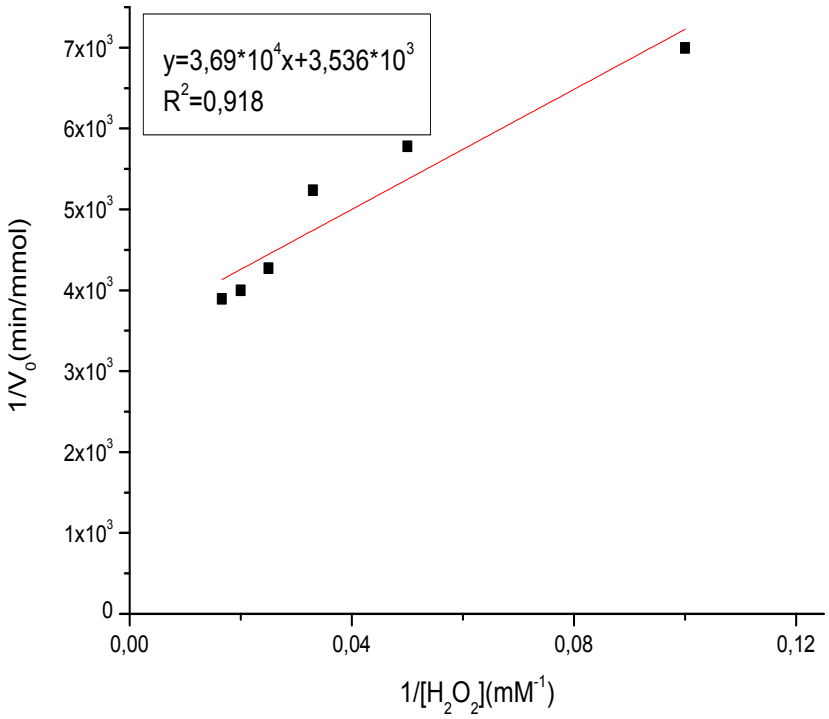


Figure. III.13. Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f\ (1/\ [H_2O_2])$ pour la peroxydase de navet

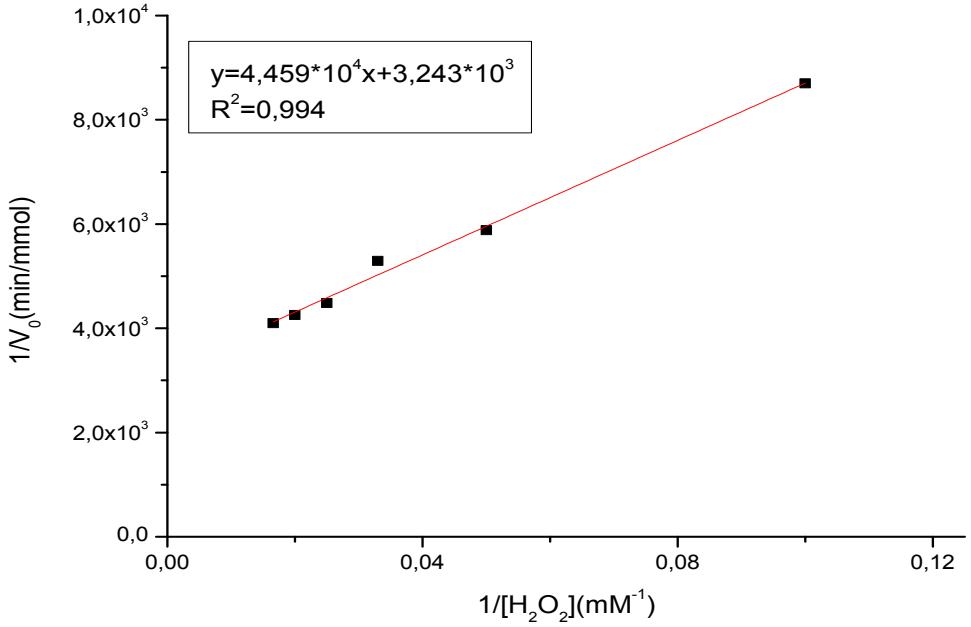


Figure.III.14. Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f\ (1/\ [H_2O_2])$ pour l'HRP.

A partir ces graphes, les valeurs de K_M, V_M sont déterminées et est représentées dans le tableau III.5.

Tableau III.5. Valeurs des constantes cinétiques K_M et V_M pour le peroxyde d'hydrogène

	$V_M .10^4$ (mmol/min)	K_M (mM)	1/ K_M (mM^{-1})
$EEPP_{Courgette}$	2.78	9.82	0.102
$EEPP_{Navet}$	2.83	10.444	0.096
HRP	3.08	16.814	0.059

Le peroxyde d'hydrogène est un co-substrat indispensable pour l'étape d'initiation du cycle catalytique de la peroxydase.

Il est clair à partir de la figure III.14, les trois allures sont similaires, malgré que leurs AE dans les milieux réactionnels sont différentes. Ainsi, et selon le tableau III.5, l'affinité de peroxyde d'hydrogène pour la peroxydase de courgette est proche de celle de navet, tandis que celle pour la peroxydase d'HRP est inférieure.

La vitesse maximale de la réaction enzymatique est atteinte pour les trois peroxydases avec une légère différence. Dans certaines études, une vitesse maximale de 0.69 UI/ml a été estimée pour la peroxydase de raifort (HRP). **[60]**

En ce qui concerne le phénol, la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat pour les trois peroxydases est illustrée sur la figure III.18.

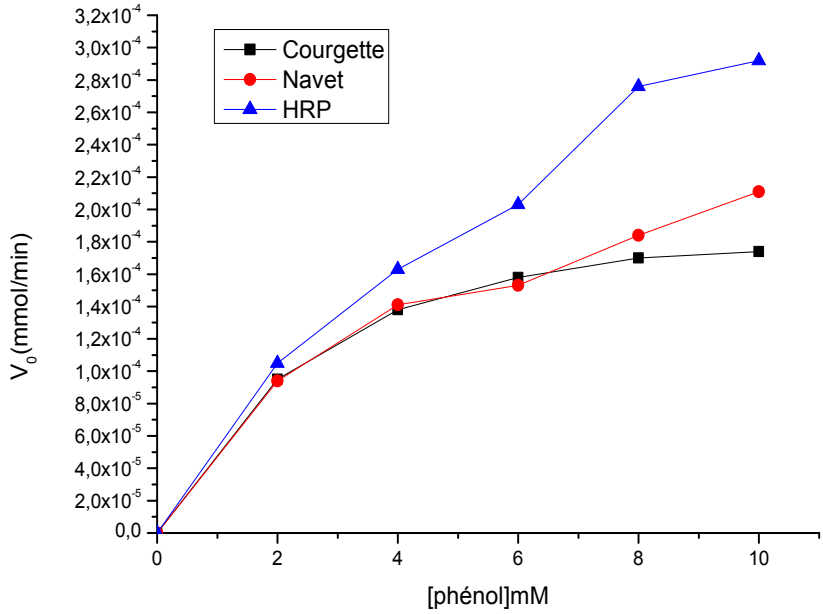


Figure.III.15. Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du phénol pour les trois peroxydases.

De même la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten pour les trois peroxydases (équation III.13) permet de déterminer les constantes cinétiques. Les représentations sont illustrées sur les figures III.19 à III.21.

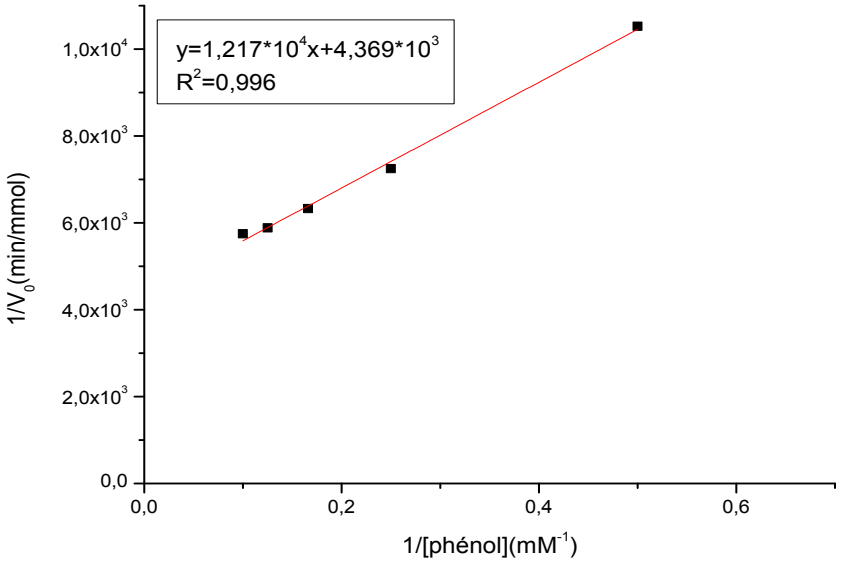


Figure.III.16. Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[phénol])$ pour la peroxydase de courgette

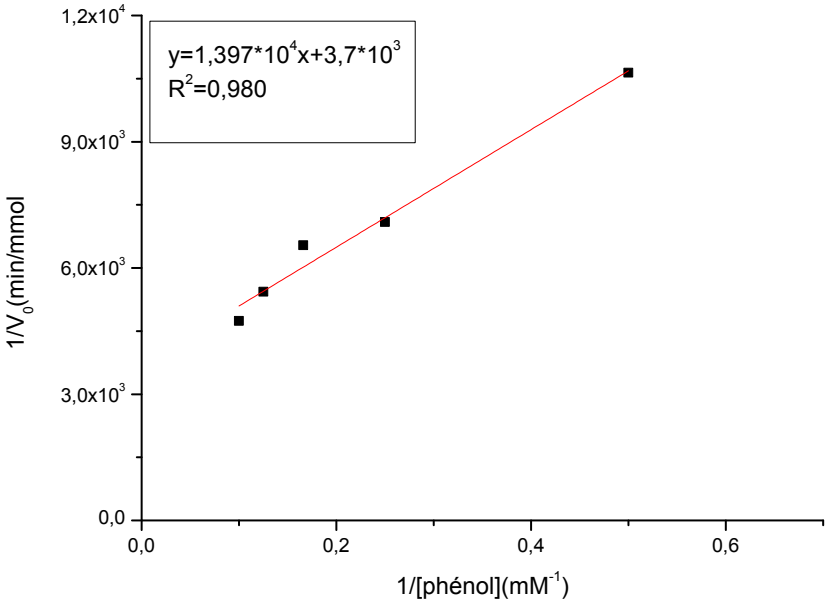


Figure. III. 17. Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[phénol])$ pour la peroxydase de navet

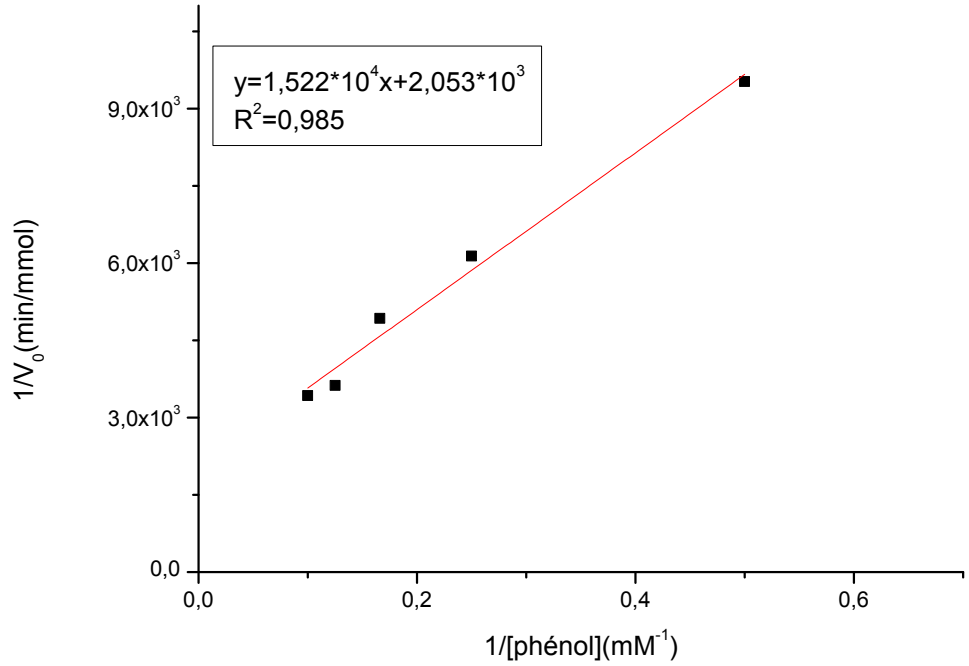


Figure.III. 18. Représentation de Lineaweaver-Burk : $1/V_0=f(1/[\text{phénol}])$ pour l'HRP.

Et les constantes cinétiques sont calculés et données sur le tableau III.6.

Tableau III.6. Valeurs des constantes cinétiques K_M et V_M pour le phénol.

	$V_M.10^4$ **(mmol/min)**	K_M **(mM)**	**1/** K_M **(mM^{-1})**
Peroxydase de courgette	2.29	2.787	0.359
Peroxydase de navet	2.7	3.772	0.265
HRP	4.87	7.413	0.135

K_M est la constante de dissociation du complexe ES et permet d'évaluer l'affinité de E pour son S.

Du tableau III.6, les affinités des peroxydases pour le phénol sont différentes : elle est maximale pour la peroxydase de courgette et minimale pour celle d'HRP.

Cependant, la constante catalytique dépend de la nature de l'enzyme et celle de la molécule électron donner, pour la peroxydase de navet vis-à-vis le gaïacol elle est égale à 3.7 mM, pour celle des grains de soja vis-à-vis le même substrat est de 0.288 mM et pour celle d'HRP pour le gaïacol aussi, elle est de 16.4 mM. **[60]**

III.3.4 Application

Dans le but d'une valorisation des peroxydases étudiées, nous allons appliquer l'enzyme de navet et d'HRP, sur une solution de colorant à application fongicide et autres, c'est le vert malachite. Pour ce faire, une étude de l'effet de pH du milieu réactionnel et celle de l'AE sera montrée.

A) Effet du pH

La majorité des enzymes ont une valeur ou un intervalle de pH où l'AE est maximale pour un substrat donné.

Pour des mélanges réactionnels de traitement de vert malachite aux conditions opératoires de concentrations des substrats et d'AE déterminées, les variation de Rd de traitement des différentes solutions en fonction du pH du milieu sont illustrées sur les figures III.22 à III.24.

A.1) Résultats

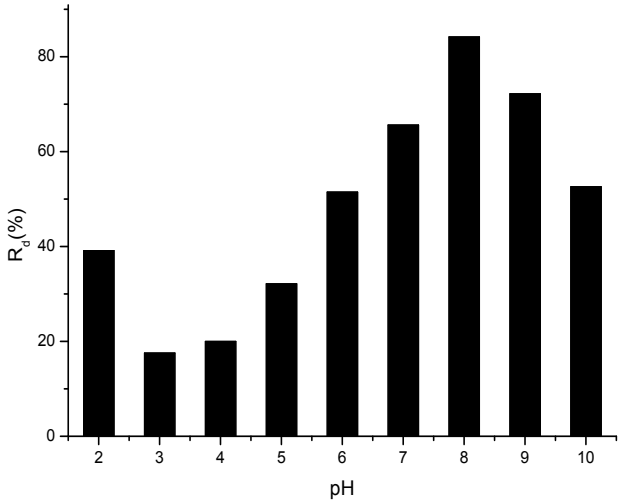


Figure III.19. Effet du pH sur le rendement de décoloration du Vert Malachite par la peroxydase de navet.

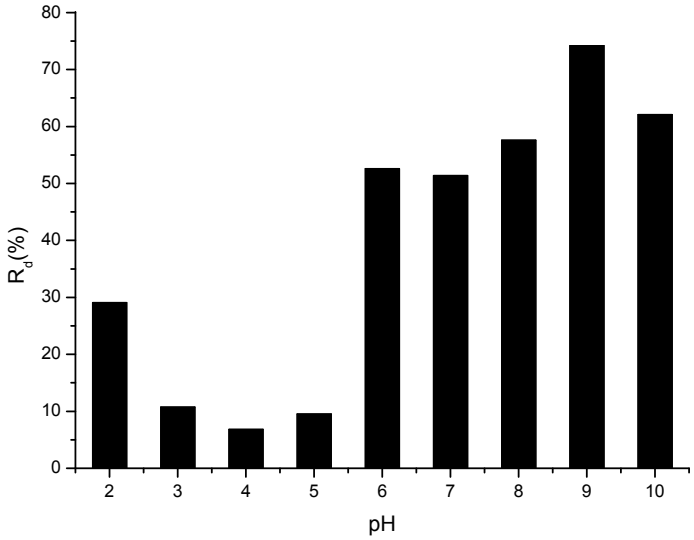


Figure.III.20. Effet du pH sur le rendement de décoloration du Vert Malachite par la peroxydase de courgette.

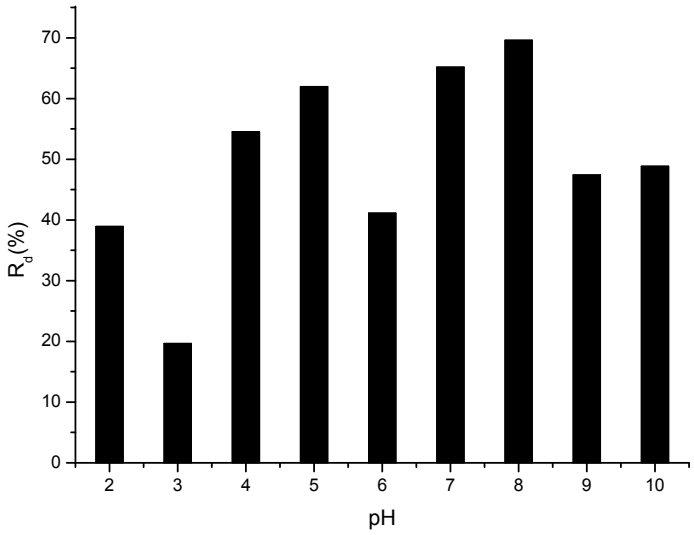


Figure.III.21. Effet du pH sur le rendement de décoloration du Vert Malachite par HRP.

A.2) Discussion

La décoloration par la peroxydase de navet, dépend d'une manière significative du pH du milieu réactionnel. Le maximum de décoloration (84.62, 74.59 et 69.74 % pour la peroxydase de courgette, de navet et de raifort respectivement) est atteint aux pH 8 et 9.

Il a été prouvé dans le travail de Preethi et al. **[62]**, qu'un maximum décoloration de C.I. bleu acide 113 est atteinte aux pH 4, 6.6 et 9.

B) Effet de l'activité enzymatique

La transformation d'une quantité déterminée de colorant est influencée par la quantité d'enzyme dans le mélange réactionnel. Cela dépend aussi de la nature de substrat (affinité enzyme-substrat). Toutefois, afin de montrer l'effet de la concentration de peroxydase et sa nature sur la décoloration du vert malachite, les figures III.25 à III.27 illustrent cet effet.

B.1) Résultats

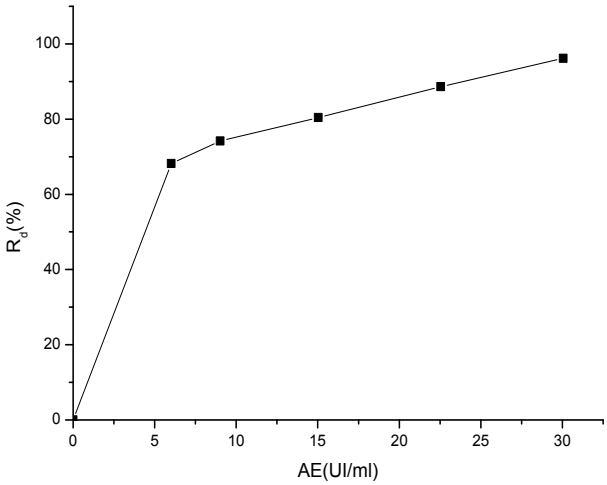


Figure III.22. Effet de l'AE de peroxydase de courgette sur la dégradation de vert malachite

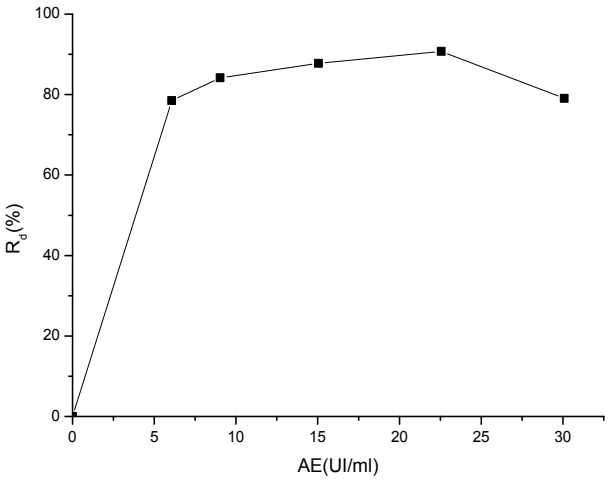


Figure.III.23. Effet de l'AE de peroxydase de navet sur la dégradation de vert malachite

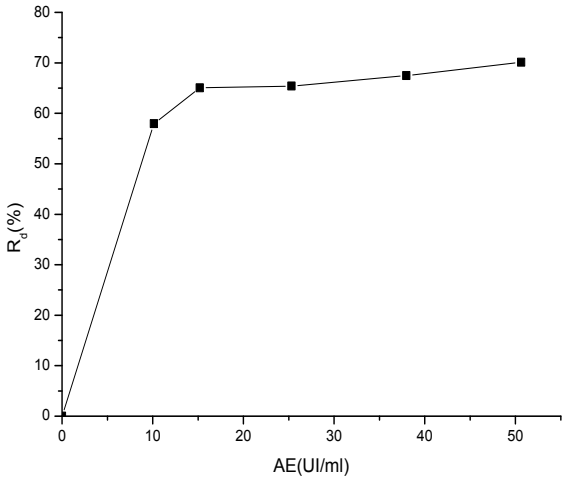
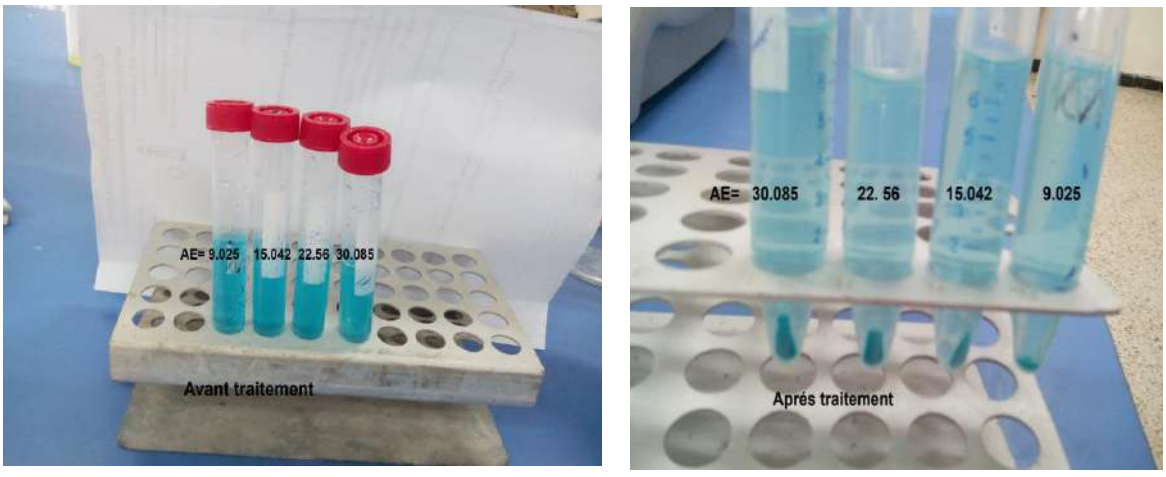


Figure.III.24. Effet de l'AE d'HRP sur la dégradation de vert malachite

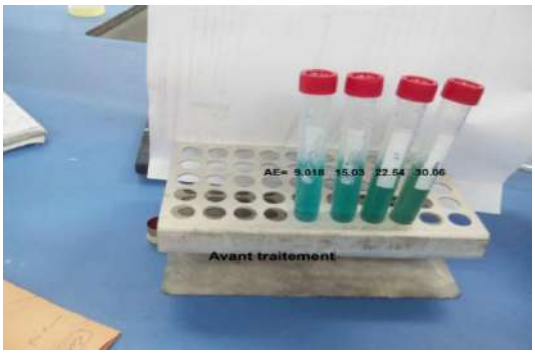
B.2) Discussion

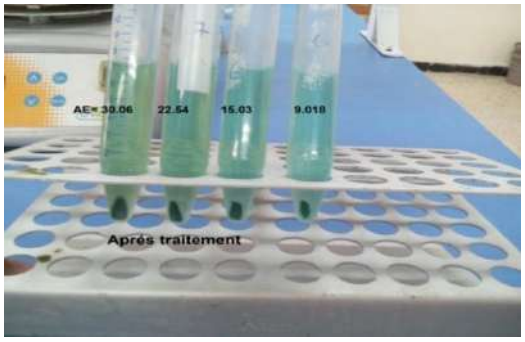
De ces figures, on constate que plus l'AE augmente plus la décoloration est meilleure, pour atteindre un palier où le rendement de décoloration varie légèrement avec la concentration d'enzyme. Ainsi, la décoloration est maximale dans le cas de traitement avec la peroxydase de courgette, ce qui confirme que l'affinité entre la molécule du colorant et la peroxydase est maximale.

Afin de montrer l'effet l'AE des peroxydases, les photos III.1 et III.2 présentent les solutions des colorants avant et après traitement.



Photos III.1. Effet de l'AE sur le rendement de décoloration du vert malachite par la peroxydase de navet





Photos III.2. Effet de l'AE sur le rendement de décoloration du vert malachite par la peroxydase de courgette.

III.4. Conclusion

L'étude des trois peroxydases végétales a permis de déterminer les paramètres tels que : la température, le pH, la stabilité thermique et les constantes cinétiques vis-à-vis le peroxyde d'hydrogène et le phénol.

La présence de cations métalliques et de molécules organiques peut affecter d'une manière importante l'activité enzymatique de la peroxydase. Le comportement d'activation ou d'inhibition dépend de la nature de l'enzyme.

Ainsi, l'application des peroxydases extraites des végétaux de courgette et de navet, ont montré leurs capacité de transformer le vert malachite avec un rendement de décoloration de 97 % pour la courgette.

Conclusion générale

Dans ce travail, l'extraction et la purification de deux peroxydases de courgette et de navet a été réalisée et leur caractérisation y compris celle de la peroxydase de raifort a été montré.

La caractérisation des trois peroxydases d'origine végétale, a compris la détermination du pH et de la température optimals. Ainsi, l'étude de la stabilité thermique de ces enzymes aux températures : 50, 60 et 70 °C a montré que la peroxydase de navet est sensible comparée aux peroxydases de navet et de raifort.

La présence des effecteurs chimiques minéraux et organiques a montré que l'EDTA est un inhibiteur pour les trois enzymes, tandis que les autres peuvent être des inhibiteurs pour certaines et des activateurs pour d'autres.

L'étude catalytique des enzymesa permis la détermination des paramètres cinétiques du modèle Michaelis-Menten : V_M et K_M. Les valeurs de K_M par apport au peroxyde d'hydrogène et par apport au phénol, montrent que l'affinité de la peroxydase de courgette pour ces substrats est supérieure que celles de navet et de raifort.

L'application de la peroxydase a été réalisée et la peroxydase quelle que soit sasource, a montré son efficacité dans la transformation de la molécule de vert malachite. Un maximum de décoloration est atteint à pH : 8 et 9 pour les peroxydases de navet, de raifort et de courgette respectivement.

La concentration d'enzyme dans le milieu réactionnel contenant le vert malachite, parait un paramètre important, les rendements de décoloration atteignent un maximum pour des activités enzymatiques de plus de 30 UI/ml pour les trois peroxydases.

En conclusion, l'étude des propriétés des trois peroxydases a confirmé que celles extraites des plantes possèdent des propriétés similaires à la peroxydase standard de raifort: HRP, ce qui permet l'utilisation des premières dans les applications telles que par exemple le traitement des molécules organiques aromatiques.

En perspective, nous proposons dans le futur de compléter l'étude par :

- D'autres caractérisations des peroxydases étudiées telles que la détermination du poids moléculaire par : chromatographie d'exclusion stérique et détermination du pH isoélectrique par électrophorèse ;
- Mesure de l'activité peroxydasique pour d'autres substrats ;
- Application de la peroxydase dans le domaine médical.

Références bibliographiques

[1] J.P. Sine, enzymologie et application, Ellipses, France, février 2010**.**

[2] S.Medjeldi Marzougui, peroxydase d'origine végétale: purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés, thèse de doctorat, université Badji Mokhtar, Annaba, 2012.

[3] A. Cornish, M. Jamin, S.Valdeur, Cinétique enzymatique, EDP Sciences, France, 2005.

[4] A. Safa Chaouche, L. Gurroumi, Dégradation enzymatique des phénols par la peroxydase, mémoire de Master, université de Medea, 2011.

[5] J. Marie, C.A.Marie, Le préparateur en pharmacie, TEC et DOC, EM inter. 2000.

[6] P.Cornely, Biochimie, 2édition américaine, De boek.

[7] C.Bendavid, enzyme et coenwyme, cours biochimie, université de Rennes, 2009/2010.

[8] A. Marouf,G. Tremblin, Abrégé de biochimie appliquée, EDP Sciences, France, 2009.

[9] A.Lavoinne,S.Bekri, Aide-mémoire de biochimie et biologie moléculaire, Medecine-Sciences Flammarion, 6 édition, France, 2008.

[10] Moussard, Biochimie et biologie moléculaire, De boeck

[11] L.Stryer, La biochimie, Flammarion Médecine Science, Paris, 1981

[12] J.M. Berg, L. Tymoczko, L. Stryer, Biochimie, 6 édition, Medecine Science Flammarion, Italie, 2008.

[13] S.Weinmane, P.Mehul, Biochimie : Structure et fonction des protéines, Dunod, France, 2000.

[14] L. Stryer, Biochimestry, 2édition, W.H.Freeman, 1981.

[15] H. Chekirine, M.Abada., Séparation, purification, et caractérisation de la peroxydase de navet blanc « brassica rapa », mémoire de Master, université de Medea, 2015.

[16] G. Hennen, Biochimie : Approche bioénergétique et medicale. 4 édition. Dunod, France, 2006.

[17] B. Augère, Les enzymes biocatalyseur protéique, Ellipses édition Marketing S .A, 2001.

[18] G.A. Splitt gerber, Chemical Education, 62 Issue 11, 1008, 1985.

[19] N. Moussa, F. Bachouche, Elimination des colorants textiles par procédés enzymatique et Fenton, mémoire de Master, université de Médéa, 2013.

[20] E.Robertis, Biologie cellulaire et moléculaire : les presses de l'université laval, Québec.

[21] http ://WWW. Cegep-ste-foy. Qc.ca/ profs/gbourbonnais. Consulté le 23 février 2016.

[22] A. Ahmedi, Transformation enzymatique des colorants azoïques par la peroxydase libre et immobilisée, Mémoire de magister, université de Médéa, 2010.

[23] H.G. Reginald, C.M. Gresham, Biochimie, 2 édition, De Boeck, Universités, USA, 2000.

[24] S.Fabiano, application à la réalisation de biocapteurs ampérometriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques. Thèse du Magister, université Claud Bernard, France, 2002.

[25] N. Tandjaoui, Contribution à l'étude de l'élimination des colorants textiles par voie enzymatique, mémoire de Master, université de Médéa, 2011.

[26] P. Demarche, C. Junghanns, R. R. Nair, S.N. Agathos,Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship, Biotechnology Advances, 2011.

[27] http//WWW. didier-pol.net/1PEROXASE.html, consulté le : 03 mars 2016

[28] J.Pelmont, Biodégradation et métabolisme des bactéries, 2005.

[29]http://www.takween.com/etudiants-etudes/peroxydase-cinetique-structure-TP.html. consulté le:14 février 2016.

[30] C. Regalado, A.M. Garcia-Almendarez, E.B Duarte-Vazquez, Biotechnological applications of peroxydase, Phytochemistry Reviews, 3,2004.

[31] K. Abed, A. Chemam, Traitement enzymatique des colorants azoïques dans un réacteur à peroxydase immobilisée, mémoire de Master, université de Médéa, 2014.

[32] WWW.biotech-ecolo.net, Théorique et application pratiques, Agadir, 2006. Consultaté le 23 février 2016.

[33] WWW.Jean.Jacques.auclair.page sperso-Orange.Fr/exaosite/peroxdonnees.htm, consulté le : 16 Février 2016.

[34] N.Duran,E. Esposito Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in waste water and soil treatment : a review, applied catalysis and environmental , 28, 2000.

[35] A. Gottlieb, S. Chaw, A. Smith, A. Wheatley, S. Forsythe, the toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation .J Biotechnol 101 :49-56,2003.

[36] I.M. Shannon, E. Kay, J.Y. Lew, Proxidase isoenzymes from horseradish roots : isolation and physical properties .Journal Biological Chemical, 241,1996.

[37]M.A.Duarte-Vazquez,M.A. Ortega-Tovar, B.E.Garcia-Almondarez,C. Regalado,Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (Brassica napus L. var. purple top white globe) peroxidase .Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78,2002.

[38] N. Soualhi., H. Yahiaoui, Contribution à la biodégradation du 2-nitrophénol par la peroxydase immobilisée, thèse de Master, université de Médéa, 2015.

[39] R.S. Freire, C.A. Pessoa, L.D. Mello, L.T. Kubota ,Direct electron transfer:
anapproach for electrochemical biosensors with high selectivity and sensitivity
Journal of the Brazilian Chemical Society Print version ISSN, 14, 2003.

[40] W. Zongping, X. Miaomiao , H. Kai , L. Zizheng ,Textile Dyeing wastewater Treatment Huazhong University of Science and Technology,Advances in Treating Textile Effluent, 2011.

[41] www.neptune.labunix.uqam.ca.html .Consulté le: 23 février 2016.

[42] H. Zollinger,Color Chemistry. Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments, 3 édition, Verlag Helvetica Chimica, Acta, Zürich, 2003

[43] E.Torres, I. Bustos -Jaimes, S. Le Borgne, Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants' Applied Catalysis B: Environmental, 46, 2003

[44] A. Hazrat, Biodegradation of Synthetic Dyes A Review, Water Air Soil Pollution, 2010

[45] A.Lindgren, T.Ruzgas, I.Gazaryan, L.Gorton,Fundamental and applied aspects of peroxidase biosensors, 2006.

[46] M. Hamid, Khalil-ur-Rehman,potential applications of peroxidases, Food Chemistry 115, Pakistan ,2009.

[47] O. Kawamura, S. Sato, H. Kajii, S. Nagayama, K. Ohtani, J. Chiba, Y. Ueno,A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin-A based on monoclonal antibodies. Toxicon, 27, 1989.

[48] www.technobio fr/article -185840620.html. Consulté le: 13 février 2016.

[49] L .E. Cherpentier, Electrode à peroxydase application à l'analyse du cholesterol, 1994.

[50] A.K. Sherma, N.Sehgal, A. Kumar,A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. Biotechnology Letters, 24, 2002.

[51] E. Agostini, J. Hernandaz-Ruiz, M.B. Arnao, S.R Milrad, H.A. Tigier, M.A. Acostaperoxidase isoenzyme secreted by turnip (Brassica napus)hairy –root cultures :inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. Biotechnology and Applied Biochemistry, 35,2002.

[52] Um5a_fsr/ Filière SMC/ S4/ Module 14/ Cours de Spectroscopie/ Chapitre III/ F.GUEDIRA, cnsulté le 7 mars 2016

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

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

[55] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 1976.

[56] United States Pharmacopeia 30, Edition May, 2007

[57] C.G. Boer, L. Obici, C.G. M. de Souza, R. M. Peralta, Purification and some properties of Mn peroxidase from Lentinulaedodes, Process Biochemistry, 41, 2006.

[58] F.Q. Guerrero, M.A. Duarte-Vazquez, B.E. Garcia-Almendarez, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, C. Regalado, Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase, Bioresource Technology, 99, 2008.

[59] U. Kalsoom, H.N. Bhatti, M. Asgher, Characterization of Plant Peroxidases and Their Potential for Degradation of Dyes: a Review, Applied Biochemistry and Biotechnology, 176, 2015.

[60] S.A. Mohamed, K.O. Abulnaja, A.S. Ads, J.A. Khan, A.T. Kumosani, Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady, Food Chemistry, 128, 2011.

[61] A. Fatima, Q. Husain, R.H. Khan, A peroxidase from bitter gourd (*Momordica charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: A comparison with horseradish peroxidase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 47, 2007.

[62] S. Preethi, A. Anumary, M. Ashokkumar, P. Thanikaivelan, Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. Springer Plus, 2, 341, 2013.

Annexe 1

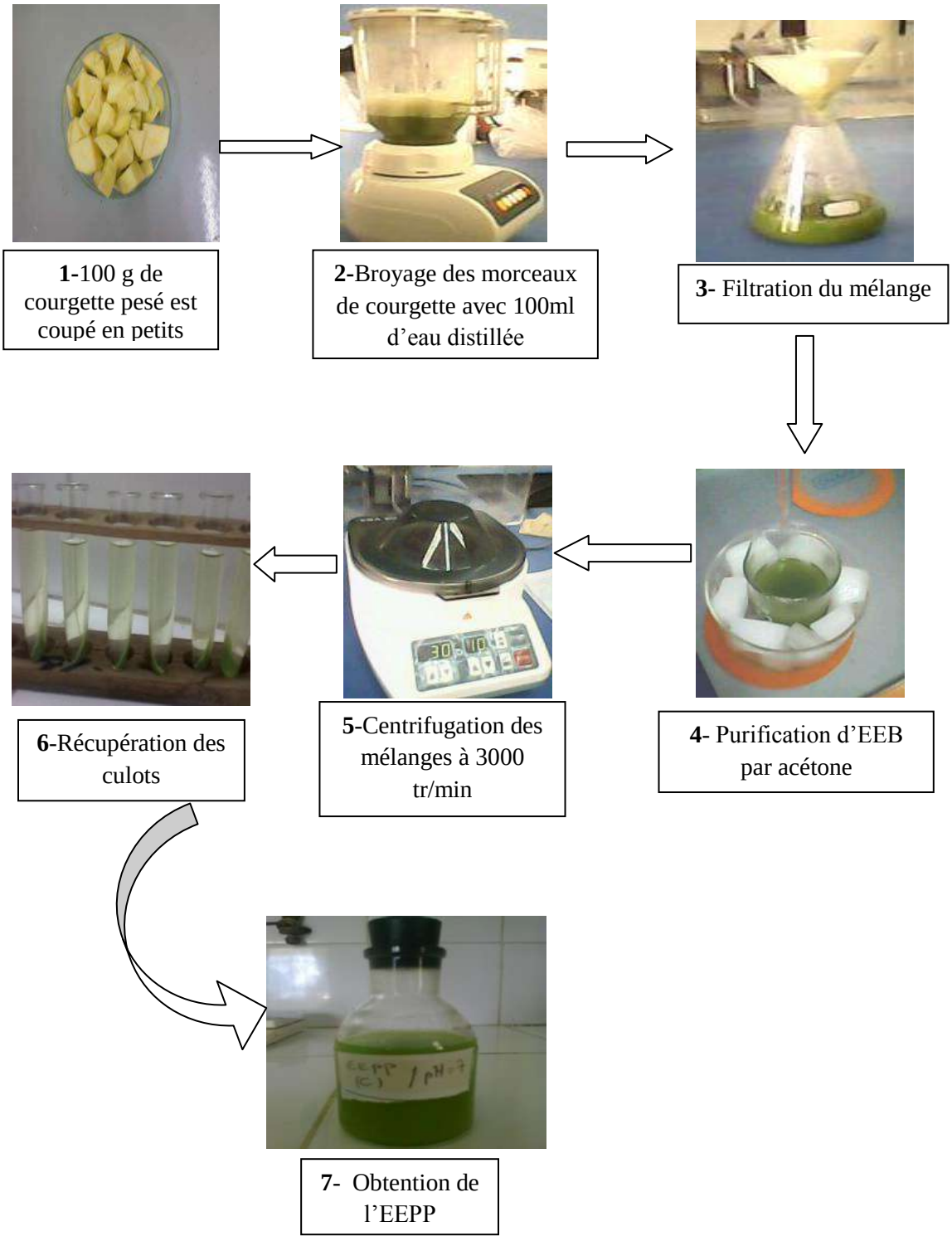


Figure A1. Protocole de préparation et de purification de l'extrait enzymatique de peroxydase de courgette

Annexe 2

Préparation des solutions tampon

Tampon pH 2 :

Pour 100ml : à partir d'une solution de KCl (0,2mole/L) prélever 5 ml dans un bêcher de 250 ml, ajuster le pH à 2 avec HCl (0,2 mole/L) et compléter jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.

Tampon pH 3 et tampon pH 4 :

À partir d'une solution de biphtalate de potassium [$KHC_6H_4(COO)_2$] 0,2 mole/L, prélever pour chaque pH : 5 ml, et ajuster au pH désiré avec HCl 0,2 mole/L, compléter jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.

Tampon pH 5 :

à partir d'une solution de biphtalate de potassium [$KHC_6H_4(COO)_2$] 0,2 mole/L, prélever : 5 ml, et ajuster au pH désiré avec NaOH 0,2 mole/L, compléter jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.

Tampon pH 6, 7 et 8 :

À partir d'une solution de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) 0,2 mole/L, prélever 5 ml, et ajuster au pH désiré avec NaOH 0,2 mole /L.

Tampon pH 9 et 10 :

à partir d'une solution d'acide borique 0,2 mole/L (H_3BO_3) et de KCl 0,2 mole/l, prélever 2,5 ml de chaque solution, et ajuster au pH désiré avec NaOH 0,2mole/L.

Annexe 3

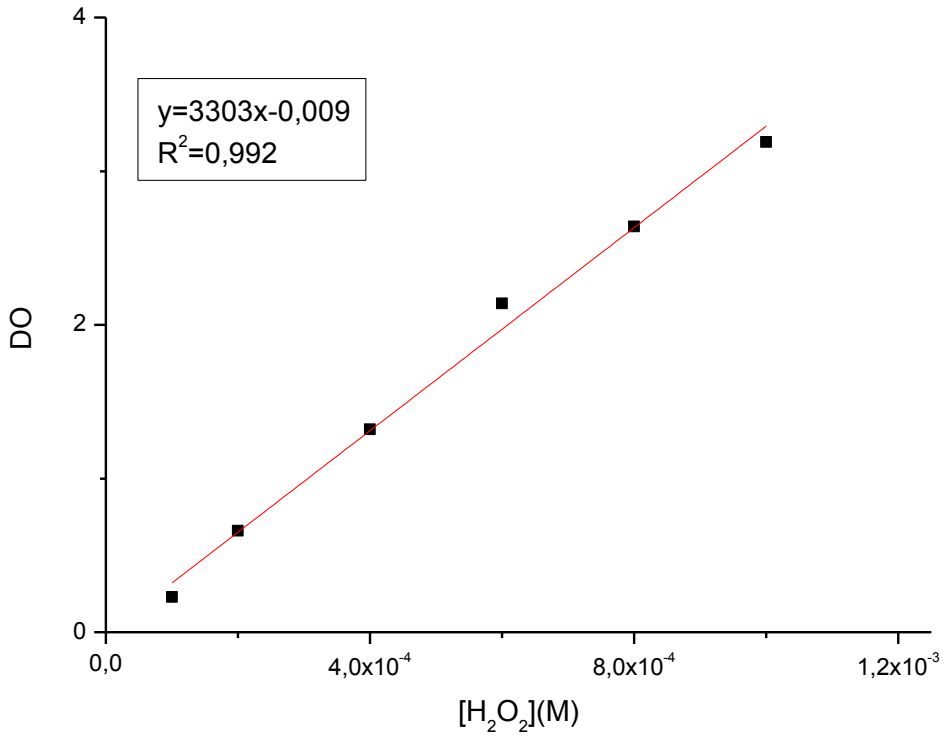


Figure A3.1. Courbe d'étalonnage de l'eau oxygéné pour le navet à λ_{max}=504nm.

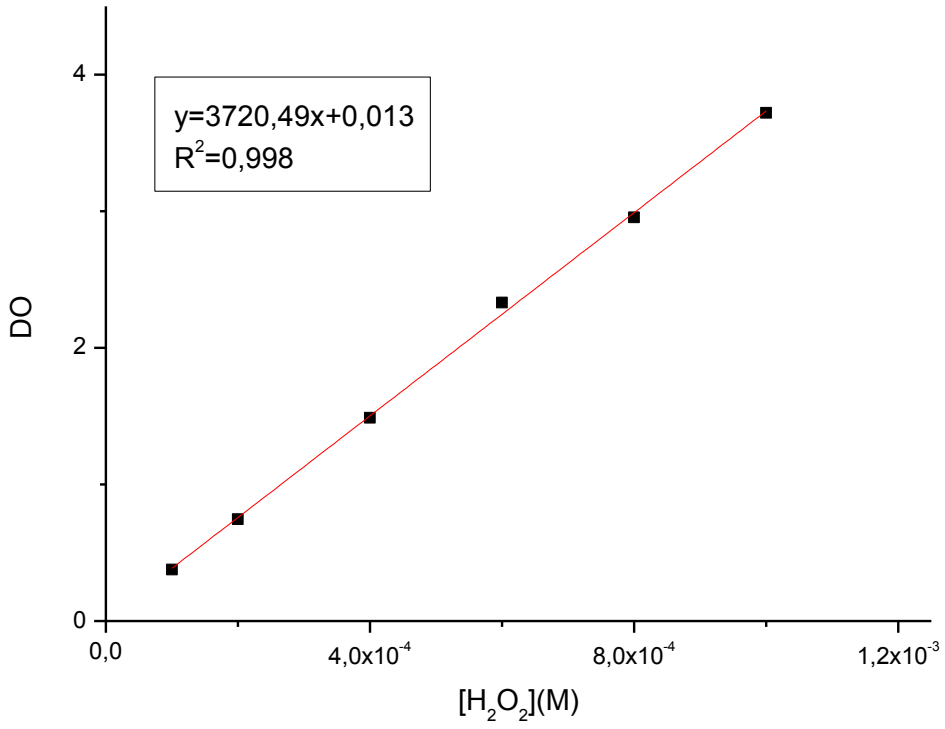


Figure A3.2. Courbe d'étalonnage de l'eau oxygéné pour la courgette à λ_{max}=502nm.

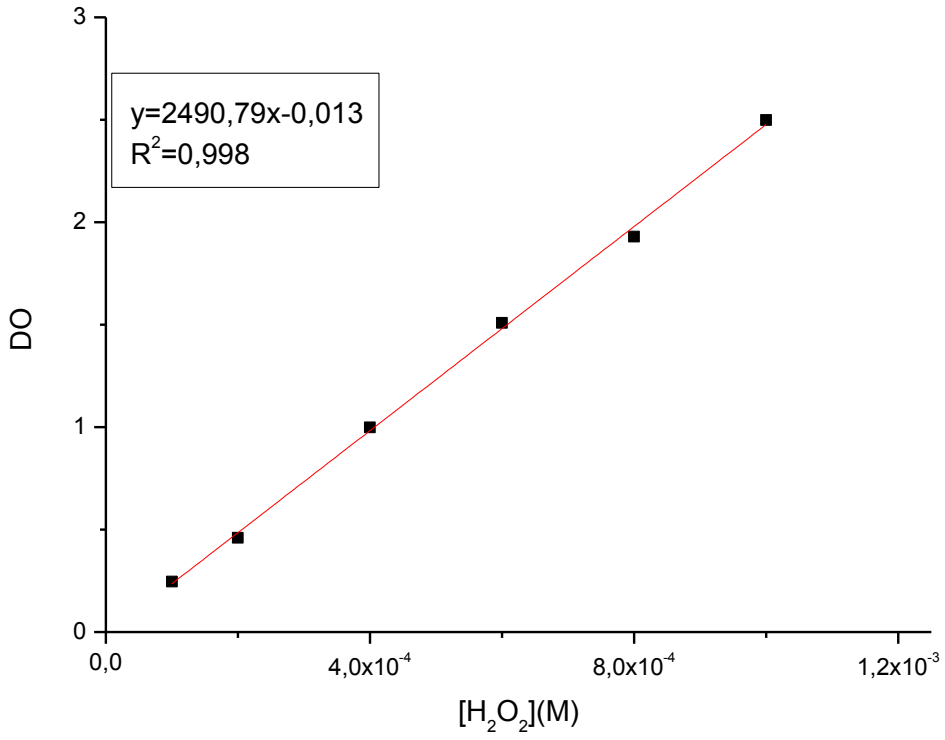


Figure A3.3. Courbe d'étalonnage de l'eau oxygéné pour l'HRP à λ_{max}=508nm.

Annexe 4

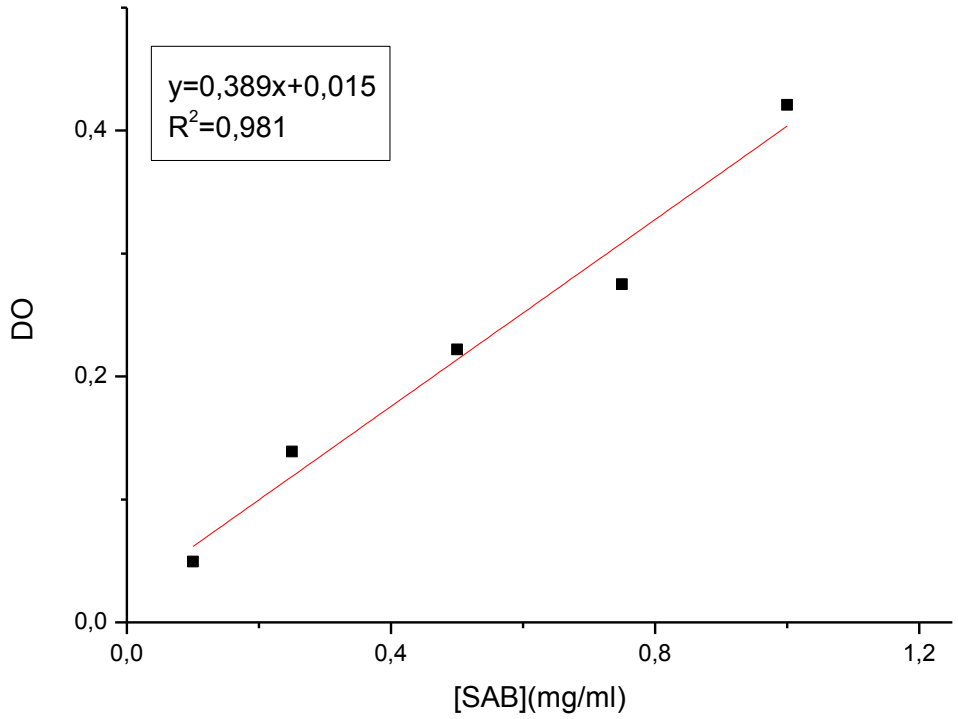


Figure A4.1. Courbe d'étalonnage de sérum d'albumine bovin SAB à λ_{max}=595 nm