REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES

Département des sciences de la matière

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de Master

En Chimie

Spécialité :

Chimie Pharmaceutique

Par :

HENTABLI Meriem

FELFLI Faiza

Thème :

Développement d'un procédé biocatalytique pour la transformation des médicaments

Soutenu publiquement le 25/06/2025, devant le jury composé de :

Abouseoud Mahmoud	MCA	UYFM	Présidente
Sefha Farida	MCA	UYFM	Examinatrice
Euldji Amel	MCB	UYFM	Examinatrice
Dr. Ahmedi.A	MCB	UYFM	Encadreur

Année Universitaire 2024/2025

Remerciements

Louange à Dieu, par Sa grâce les bonnes œuvres s'accomplissent, et grâce à Sa volonté, les chemins se tracent et les objectifs se concrétisent. Nous Le remercions pour la patience, la persévérance et la force qu'Il nous a accordées tout au long de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à ma promotrice, Madame le ***Docteur Ahmedi A****., pour son encadrement précieux, ses conseils judicieux et son suivi constant, qui ont été d'un apport essentiel dans la réalisation et l'orientation de ce travail.*

J'exprime également toute ma gratitude aux membres du jury, Monsieur ***Abouseoud Mahmoud****, président du jury, Madame* ***Sefha Farida*** *et Madame* ***Euldji Amel****, les examinatrices du travail, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire et pour leurs remarques scientifiques pertinentes, qui ont enrichi le contenu de cette recherche.*

Je tiens également à remercier chaleureusement l'équipe du laboratoire de Chimie 2 pour l'accueil, l'accompagnement et les moyens techniques mis à ma disposition, qui ont grandement facilité la réalisation de la partie expérimentale de ce projet.

Enfin, je dédie une pensée pleine de reconnaissance à mes deux familles, la famille ***FELFLI*** *et la famille* ***HENTABLI****, pour leur soutien moral, leur encouragement constant et leur présence indéfectible tout au long de mon parcours universitaire. À toutes et à tous, je dis merci du fond du cœur.*

Dédicace

———————————————————————————————

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents que Dieu me les garde.

À ma sœur ***Khadidja.***

À mes frères ***Mohamed et Sid Ali.***

À toute ma famille, qui a toujours été mon soutien et ma force, je vous remercie du fond du cœur.

À toutes mes amies : ***Rabia, Nadia, Maroua, Khawla, Faiza, Naima, Nawal, Roumaissa, Zina et Hoda...***

Votre compagnie a été une précieuse ressource tout au long de ce voyage, et vos souvenirs resteront gravés dans mon cœur.

À tous ceux qui ont cru en moi et contribué à ce que j'atteigne ce stade, professeurs, collègues et proches...

Je vous dédie ce carnet, fruit d'années d'efforts et de travail acharné, et chaque lettre qu'il contient porte en elle une part de vous

Meriem.

Dédicace

———————————————————————————————

À mon cher grand-père,
qui a quitté ce monde physiquement, mais demeure vivant dans mon cœur grâce à mes prières et à ma fidélité.
Je prie Dieu de lui accorder Sa miséricorde et de lui réserver une place dans Ses vastes jardins.
À ceux qui m'ont soutenue tout au long de ma vie et ont été ma source de force :
À ma mère aimante, source d'amour et de sérénité ;
à mon père généreux, mon modèle et mon premier soutien ;
à mes frères et sœurs : ***Hicham****,* ***Bilal, Hajer et Soundes*** *;*
et à mon neveu, ***Imad Al-Din****.*

À ma chère amie ***Meriem,***
qui a partagé mes joies et mes peines.

À mes camarades de classe :
Zina, Roumissa, Naima, Hoda, Nawal, Bushra, Rehab, Fatima, Souhila et Khawla ,Rabia, Ghizlane*.*
À mes amies du sport :
Ghofran, Bassoum, chaima, Rasha, Bushra, Aya, Shahra, Nour, Taous, Bushra Sabour, Fifi, Alaa, Malika, Aya, Nasira, Ferial, Marwa .

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.
À mes chers collègues du cours de chimie pharmaceutique,
je dédie ce modeste travail comme un témoignage d'amour, de loyauté et de souvenir éternel.

Faiza

الملخص :

يهدف هذا العمل إلى دراسة فعالية إنزيم البيروكسيداز المستخلص من اللفت في تحلل دواء الأموكسيسيلين، وهو من المضادات الحيوية واسعة الاستخدام. الهدف الأساسي من الدراسة هو تحديد العوامل المؤثرة في تحلل الأموكسيسيلين باستخدام إنزيم البيروكسيداز الحر.

وقد أظهرت النتائج أن أفضل ظروف للتحلل تشمل pH :معتدل (7.0)، درجة حرارة 40 درجة مئوية، تركيز أموكسيسيلين 500 مغ/لتر، تركيز بيروكسيد الهيدروجين 0.008 مول/لتر، ومدة تفاعل قدرها 120 دقيقة. في هذه الظروف، تم تحقيق مردود تحلل مرتفع بلغ 99.61٪. كما كشفت الدراسة عن بعض الخصائص الحركية للتفاعل، مثل السرعة القصوى للتفاعل.

الكلمات المفتاحية: بيروكسيداز ،عملية تحفيز حيوي ، أموكسيسيلين، التحلل الإنزيمي, مردود، الحركية الإنزيمية

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude portant sur l'efficacité de la peroxydase extraite du navet dans la dégradation de l'amoxicilline, une substance pharmaceutique couramment utilisée. L'objectif principal de cette recherche est d'identifier les facteurs influençant la décomposition de l'amoxicilline à l'aide de la peroxydase libre.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer les conditions optimales de dégradation, à savoir : un pH neutre 7, une température de 40 °C, une concentration d'amoxicilline de 500 mg/L, une concentration de peroxyde d'hydrogène de 0,008 M, et un temps de réaction de 120 minutes. Dans ces conditions, un rendement élevé de 99,61 % a été atteint avec l'enzyme testée. Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en évidence certaines propriétés cinétiques de la réaction enzymatique, telles que la vitesse maximale de réaction.

Mots-clés : Peroxydase, procédé biocatalytique, Amoxicilline, Dégradation enzymatique, Rendement, Cinétique enzymatique.

Abstract:

This work is part of a study on the effectiveness of peroxidase extracted from turnip in the degradation of amoxicillin, a commonly used pharmaceutical substance. The main objective of this research is to identify the factors influencing the decomposition of amoxicillin using free peroxidase. The obtained results allowed the determination of optimal degradation conditions, namely: neutral pH (7.0), temperature of 40 °C, amoxicillin concentration of 500 mg/L, hydrogen peroxide concentration of 0.008 M, and a reaction time of 120 minutes. Under these conditions, a high degradation yield of 99.61% was achieved. Moreover, the study highlighted certain kinetic properties of the enzymatic reaction, such as the maximum reaction rate.

Keywords: Peroxidase, Biocatalytic process, Amoxicillin, Enzymatic degradation, Yield, Enzymatic kinetics

Table des Matières

REMERCIEMENTS

DÉDICACE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABBREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE..... 1

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 GENERALITES SUR LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES.....4

I .1 .1 Historique des produits pharmaceutiques……..…….4

I.1.2 DEFINITION..... 4

I.1.3 CLASSIFICATION DES SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES..... 4

I.1.4 COMPOSITION D'UN MEDICAMENT..... 5

I.1.5 DIFFERENTES FORMES DES MEDICAMENTS.....8

I.1.6. STABILITE DES MEDICAMENTS.....8

I.1.7 LES MEDICAMENTS DANS L'ENVIRONNEMENT..... 9

I.1.7.1 PRESENCE DES MEDICAMENTS DANS L'ENVIRONNEMENT.....9

I.1.7.2 SOURCES ET VOIES DE REJET DES MEDICAMENTS DANS L'ENVIRONNEMENT..... 12

I.1.7.3 LES RISQUES LIES A LA PRESENCE DES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT.....13

I.1.7.4 IMPACT DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES REJETES SUR L'ENVIRONNEMENT.....13

I.1.7.5 TOXICITE ET IMPACT SUR LA FAUNE ET LA FLORE..... 14

I.1.8 LES METHODES DE TRAITEMENT DES EFFLUENTS PHARMACEUTIQUES.....14

I.2 LES PEROXYDASES..... 16

I.2.1 HISTORIQUE..... 16

I.2.2 DEFINITION.....16

I.2.3 NOMENCLATURE (EC).....16

I.2.4 SOURCES ET CLASSIFICATION..... 17

I.2.5 PEROXYDASES DES PLANTES.....18

I.2.5.1 POLYMORPHISME.....19

I.2.5.2 SPECIFICITE DE SUBSTRAT.....20

I.2.5.3 ASPECTS PHYSIOLOGIQUES..... 21

I.2.5.4 STRUCTURE ET SITE ACTIF.....21

I.2.5.5 LE CYCLE CATALYTIQUE DES PEROXYDASES..... 23

I.2.5.6 MECANISME D'ACTION..... 24

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE

II.1 OBJECTIF DU TRAVAIL.....29

II.2 PRODUITS, MATERIELS ET METHODES..... 29

II.2.1 PRODUITS UTILISES.....29

II.2.2 MATERIELS UTILISE.....31

II.2.3 METHODES EXPERIMENTALES.....31

II.2.3.1EXTRACTION DE LA PEROXYDASE.....31

II.2.3.2PURIFICATION DE LA PEROXYDASE.....32

II.2.3.4DOSAGE DES PROTEINES.....34

II.2.3.5DEGRADATION DE L'AMOXICILLINE PAR PEROXYDASE LIBRE..... 36

II.2.3.6EFFET DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA BIODEGRADATION DE L'AMOXICILLINE PAR LA PEROXYDASE LIBRE.....36

II.2.3.7CONCLUSION..... 42

CHAPITRE III : RESULTAT ET DISCUSSION

III.1 EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA PEROXYDASE..... 43

III.2 CALCUL DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE POUR LES DEUX EXTRAITS..... 43

III.3 DOSAGE DES PROTEINES..... 44

III.4 EFFET DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA BIODEGRADATION DE LA SOLUTION SYNTHETIQUE DU AMOXICILLINE PAR LA PEROXYDASE LIBRE.... 46

III.4.1.COURBE D'ÉTALONNAGE DE L'AMOXICILLINE..... 47

III.4.2.EFFET DE PH SUR LA DEGRADATION DE L'AMOXICILLINE..... 48

III.4.3.EFFET DE TEMPERATURE SUR LA DEGRADATION DE L'AMOXICILLINE..... 49

III.4.4.EFFET DE LA CONCENTRATION DE L'AMOXICILLINE (ÉTUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE)..... 50

III.4.5.EFFET CONCENTRATION DE PEROXYDE D'HYDROGENE ET SUR LA DEGRADATION DE L'AMOXICILLINE

..... 53

III.4.6.EFFET DE LA CHARGE EN ENZYME SUR BIODEGRADATION DE L'AMOXICILLINE..... 54

CONCLUSION GENERAL.....42

REFERONCES BIBLIOGRAPHIQUE

Liste des figures

Chapitre I:

Figure I.1 : Concentration la plus élevée de diclofénac mesurée dans les eaux de surface par rapport aux concentrations prévisibles sans effet (PNEC) de 0,1 µg/L 11

Figure I.2 : Principales sources des rejets pharmaceutiques concernés dans l'environnement 12

Figure I.3 : Cycles de peroxydase végétale de classe III.....19

Figure I.4 : Schéma de la structure générale des peroxydases des plantes 22

Figure I.5 : Structure de la Ferriprotoporphyrine IX des peroxydases.....23

Figure I.6 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase de HRP.....23

Figure I.7 : Cycle catalytique de la partie hémine de la peroxydase.....24

Figure I.8 : Modèle de la réaction de HRP-C avec H_2O_2 comme unique substrat 26

Chapitre II

Figure II.1 : Structure chimique de l'amoxicilline.....30

Figure II.2 : Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet.....32

Figure II.3 : Protocole de purification de la peroxydase par précipitation à l'acétone 33

Figure II.4 : La solution mère d'albumine.....34

Figure II.5 : La solution de réactif de Bradford.....35

Figure II.6 : Incubation de l'étude à essai à une température optimale.....39

Chapitre III

Figure III.1 : Activité enzymatique pour les deux extraits : EP et EB.....44

Figure III.2 : Courbe d'étalonnage de l'albumine.....45

Figure III.3 : Courbe d'étalonnage de l'amoxicilline..... 47

Figure III.4 : La courbe de rendement en fonction du pH.....48

Figure III.5 : La courbe de rendement en fonction de la température..... 49

Figure III.6 : La courbe de la cinétique de la concentration de l'amoxicilline en fonction du temps.....50

Figure III.7 : La courbe de rendement en fonction de la concentration de l'amoxicilline ……...51

Figure III.8 : La courbe de la vitesse en fonction de la concentration d'amoxicilline …….. 52

Figure III.9 : La représentation graphique selon le modèle de Lineweaver-Burk 53

Figure III.10 : La courbe de rendement en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène.....54

Figure III.11 : La courbe de rendement en fonction de la concentration de peroxydase libre 55

Figure III.12 : La courbe de rendement en fonction du temps.....56

Figure III.13 : La courbe de la concentration finale de l'amoxicilline et dégradé en fonction du temps.....57

LISTE DE TABLEAU

Tableau I.1 : Tableau synthétique des différentes formes galéniques classées selon leur mode d'administration..... 7

Tableau I.2 : Nombre de pays à travers le monde dans lesquels les produits pharmaceutiques ont été détectés dans l'environnement aquatique..... 20

Tableau I. 3: Principales classes des composés phénoliques.....29

Tableau II.1 : Propriétés des différents réactifs utilisés.....31

Tableau II.2 : Équipements, matériel et verrerie utilisés..... 46

LISTE ABREVIATION

Abréviation	Signification
ASB	Albumine sérique bovine
ACt tot	Activité totale
ACT sp	Activité spécifique
DO	Densité Optique
E	Enzyme
EB	Extrait Brut
EP	Extrait Purifié
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish Peroxydase
POX	peroxydase
S	substrat
UV	Ultraviolet
PPCPs	Pharmaceuticals and Personal Care Products

Symbole	Signification	Unité
[ALB]	concentration d'albumine	mg/l
T	Température	(°C)
T	Temps	(min)
λ	Longueur d'onde	(nm)
R	Rendement	%
Km	Constante de Michaelis Menten	(mg/L)
Vmax	Vitesse maximale de réaction	(mg/Lmin)
V0	Vitesse initiale de réaction	(mg/L.min)
pH	Potentiel hydrogène	
[POX]	Concetration de péroxydase	UI/L
[AMX]	Concentration d'amoxicilline	g/l

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE :

Les produits pharmaceutiques sont des produits de consommation soumis à une réglementation très stricte et encadrée de manière rigoureuse. Le processus de fabrication des médicaments est hautement qualifié et fait l'objet d'une surveillance étroite. En effet, un médicament est le résultat de nombreuses années de recherche, depuis les essais chimiques sur les animaux jusqu'à son application chez l'homme (Chair, 2024).

Le cycle de vie des produits pharmaceutiques comprend plusieurs étapes : la recherche, le développement, la production, la distribution, l'utilisation, puis l'élimination. Durant ces différentes étapes, des résidus peuvent être libérés dans l'environnement, notamment par l'excrétion après usage, la fabrication industrielle ou l'élimination inadéquate des médicaments non utilisés (Patel et al., 2019).

Bien que leur utilité thérapeutique soit indéniable, plusieurs études récentes alertent sur le devenir et l'impact de ces substances dans les écosystèmes, soulignant l'importance de stratégies durables de gestion et de traitement (Boxall, 2014).

La détection de résidus de médicaments dans les milieux aquatiques remontant aux années 1980 a incité les chercheurs à poser des questions sur l'impact environnemental et sanitaire de ces contaminants(Fatta-Kassinos et al., 2011; Garric & Ferrari, 2005). Chaque année, des milliers de tonnes de médicaments destinés à l'homme ou aux animaux sont effectivement utilisés à travers le monde et rejetés, que ce soit sous leur forme initiale ou après métabolisation, dans le milieu environnemental. De nombreuses recherches sur le terrain ont clairement prouvé la présence de résidus de médicaments dans l'environnement, faisant de leurs rejets un problème écologique en pleine émergence(Bottoni et al., 2010; Fatta-Kassinos et al., 2011; Fent et al., 2006; Liebig et al., 2006).

On a découvert des traces de médicaments dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les eaux usées, les boues des stations d'épuration, ainsi que dans quelques prélèvements d'eau potable.

Quand on parle de divers polluants environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds ou les hydrocarbures, le danger sanitaire redouté est plus précisément associé aux médicaments. Ces derniers sont des substances ayant une activité biologique significative, même à des concentrations faibles. Bien que certains impacts sur la faune et la flore soient désormais assez bien compris (Fent et al., 2006; Pal et al., 2010) (résistance bactérienne due

aux antibiotiques ; effets endocriniens perturbateurs des hormones et des molécules connexes ; génotoxicité de divers traitements anticancéreux...), les répercussions sanitaires de la contamination environnementale due aux effluents pharmaceutiques demeurent encore largement inconnues et les techniques pour les détecter sont difficiles, non standardisées et insuffisamment avancées(Garric & Ferrari, 2005).

Afin de limiter la propagation de ces contaminants dans l'environnement, plusieurs stratégies de traitement ont été développées. Parmi ces méthodes, on distingue les procédés physico-chimiques tels que l'adsorption, l'ozonation ou encore la photodégradation. Cependant, ces technologies présentent souvent des limites, notamment en termes de coût, de production de sous-produits toxiques ou d'efficacité partielle contre certains composés pharmaceutiques persistants (Rivera-Utrilla et al., 2013; Rizzo et al., 2013) Face à ces contraintes, les approches biocatalytiques, en particulier celles faisant appel aux enzymes oxydatives, attirent un intérêt croissant pour leur sélectivité, leur efficacité à température ambiante et leur impact environnemental réduit(Bilal et al., 2017)

Dans cette optique, l'utilisation des enzymes oxydatives constitue une alternative prometteuse, notamment en raison de leur spécificité, leur biodégradabilité, et leur faible impact environnemental. La peroxydase est l'une des enzymes les plus étudiées à cet effet. Extraite de sources végétales comme le raifort (*Armoracia rusticana*) ou le navet (*Brassica rapa*), elle catalyse l'oxydation de divers composés organiques en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), menant souvent à la précipitation ou à la transformation en produits moins toxiques(Husain, 2010a; Regalado et al., 2004a)

Plus précisément, la peroxydase végétale libre se distingue par sa facilité d'extraction, sa bonne activité catalytique dans des conditions modérées de pH et de température, et son potentiel démontré dans la dégradation des composés pharmaceutiques, notamment les antibiotiques, les anti-inflammatoires et les analgésiques (Bilal et al., 2017; Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006)

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'efficacité d'une enzyme végétale oxydative, en l'occurrence la peroxydase libre, dans la dégradation d'une solution synthétique contenant une substance pharmaceutique. Cette approche vise à proposer une méthode alternative, respectueuse de l'environnement, pour limiter la contamination pharmaceutique des

écosystèmes, et contribuer ainsi à la réduction des risques écotoxicologiques, notamment l'apparition de résistances bactériennes liées à la présence persistante de résidus médicamenteux. Le travail est intéressé à trois parties essentielles :

1. Une partie d'étude bibliographique qui rassemble :

    - Des informations générales sur les médicaments et leur impact sur la pollution de l'environnement, en particulier leur persistance dans les milieux aquatiques.
    - Les différentes méthodes utilisées pour l'analyse et le traitement de ces composés.
    - Enfin, nous avons parlé de l'enzyme peroxydase en général et plus particulièrement de la peroxydase extraite d'une source végétale.

2. Une partie "Matériel et méthodes" :

    Décrivant les processus d'extraction et de purification de l'enzyme ainsi les étapes d'étude des facteurs influençant l'activité de la peroxydase libre dans de la dégradation de l'amoxicilline.

3. Une troisième partie qui s'intéresse essentiellement à la discussion des résultats obtenus.

    Enfin le mémoire se termine par une conclusion générale résumant l'essentiel du travail élaboré et les perspectives qui peuvent être envisagées dans le futur.

Chapitre I : Etude bibliographique

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1 Généralités sur les produits pharmaceutiques

I .1.1 Historique des produits pharmaceutiques :

On sait bien que l'usage de médicaments remonte à des milliers d'années, dans les civilisations orientales, chinoises et méditerranéennes antiques. Des archives témoignent de la pratique de divers thérapeutes anciens, tels que le grec Galen, qui employaient une multitude de remèdes dans leur art médical. Les premières substances thérapeutiques disponibles pour atténuer la douleur étaient des extraits naturels présentés sous forme d'herbes, de végétaux, de racines, de lianes et de champignons. L'histoire commerciale des médicaments débute à la fin du XIXe siècle avec l'introduction de l'acide acétylsalicylique, connu sous le nom d'aspirine, sur le marché en 1899. C'est véritablement après la Seconde Guerre mondiale que l'augmentation du nombre de principes actifs commercialisés a connu une véritable explosion. En 2013 en France, on dénombre 2800 principes actifs qui constituent la base de 11000 médicaments. Chaque un de ces principes actifs appartient à une catégorie thérapeutique qui correspond à une application spécifique (anti-inflammatoires, antiépileptiques). L'analgésique était de loin la classe thérapeutique la plus consommée, représentant plus de 25% du volume des pharmacies pour le paracétamol, l'ibuprofène, la codéine et le tramadol. On note également la présence d'autres classes thérapeutiques à forte vente, comme les antibiotiques (tels que l'amoxicilline), les hypolipémiants (comme le gemfibrozil) et les psychotropes (par exemple, les benzodiazépines). (Djebiha & Mahyadine, 2023).

I.1.2 Définition :

Un produit pharmaceutique est défini comme toute substance ou mélange ayant des propriétés thérapeutiques ou préventives contre les maladies chez l'homme ou l'animal. Il peut s'agir de toute substance ou mélange destiné à être utilisé chez l'homme ou l'animal, ou à leur être administré, dans le but d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant des effets pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques. Les médicaments sont constitués d'ingrédients actifs qui confèrent leurs propriétés thérapeutiques et d'excipients qui sont des substances qui n'ont pas d'activité pharmacologique(Djebiha & Mahyadine, 2023).

I.1.3 Classification des substances médicamenteuses :

Les substances médicamenteuses peuvent être classées en fonction de :

- Leur effet prévu (antibiotiques, analgésiques, etc.).

- Leur structure chimique (parmi les antibiotiques : quinolones, céphalosporines, etc.).

- Leur mode d'action (antimétabolites et agents alkylants).

- Leurs propriétés physico-chimiques leur permettent de traverser les membranes biologiques(Moulay, 2020).

Compte tenu de l'intérêt récent qu'ils suscitent, ils sont souvent considérés comme des contaminants émergents et sont souvent classés dans la catégorie des « micropolluants » puisque les concentrations retrouvées dans les milieux aquatiques sont de l'ordre du nanogramme ou du microgramme par litre(Djebiha & Mahyadine, 2023).

I.1.4 Composition d'un médicament :

Les médicaments se composent de deux éléments principaux :

- **Ingrédient actif (IA) :**

Le principe actif est une molécule, qu'elle soit biologique, minérale ou organique, naturelle ou synthétique, qui donne au médicament son effet thérapeutique. On évalue son activité biologique et sa toxicité à l'aide de tests adéquats et comparatifs, et sa structure chimique est généralement connue. (Chair, 2024).

- **Excipient ou Adjuvant :**

D'après la pharmacopée européenne :« Un excipient est une substance d'origine chimique ou naturelle qui facilite l'emploi du médicament, sans toutefois présenter un effet de guérison ou de prévention ». Il s'agit d'un élément inerte en soi dans le traitement de la maladie, mais qui facilite l'administration, la distribution et la conservation du principe actif médicamenteux. Sa qualité repose sur son inertie face au principe actif, à l'emballage et aux organismes.(Chair, 2024).

Les excipients sont organisés en diverses catégories, chacune fournissant au principe actif les caractéristiques qui lui font défaut. On peut mentionner :

- **Les diluants :** ce sont des composés qui servent à augmenter le volume de la poudre afin d'obtenir la forme désirée.

- **Les liants :** ils renforcent l'adhérence entre les particules et offrent une résistance mécanique adéquate.

- **Les lubrifiants :** ils agissent comme des facilitateurs d'écoulement.

- **Les déliants :** aussi appelés désintégrants. Ces produits sont généralement conçus pour absorber l'eau et leur expansion aide à favoriser la pénétration du liquide dans la structure du comprimé.

- **Les colorants :** des substances teintées utilisées comme indicateurs d'un mélange de poudres homogène ou pour identifier le produit fini.

- **Les édulcorants ou correctifs :** des agents de modification du goût qui rendent une préparation plaisante ou qui masquent le goût désagréable d'un ingrédient actif.

- **agents de conservation :** substances conçues pour prévenir la décomposition chimique ou la modification microbiologique d'un médicament.(Chair, 2024; Dangoumau, 2006).

Ainsi, les excipients sont employés pour garantir les fonctions suivantes :

- Simplifier l'administration des principes actifs : cela concerne les solvants pour les solutions injectables et orales, ainsi que les excipients utilisés dans les pommades, les suppositoires, etc. Cela inclut également les agents aromatisants, les édulcorants et les colorants.

- Accroître l'efficacité de l'ingrédient actif en prolongeant sa durée d'action, par exemple.

- Garantir la stabilité : cela inclut les conservateurs (antiseptiques, antifongiques, antioxygène...) ainsi que les acides, bases et tampons qui facilitent l'ajustement du pH. (Chair, 2024).

- **Récipient :**

Les récipients sont conçus pour l'emballage du médicament, offrant une protection contre les influences extérieures tout en le rassemblant dans un contenant, agrémenté d'une notice d'instructions. (Chair, 2024).

- **Formes galéniques :**

La forme galénique d'un médicament, désigne la forme individuelle sous laquelle sont mis les principes actifs et les excipients (matières inactives). Cela se réfère à la forme physique finale du médicament tel qu'il sera administré à un patient : comprimés, gélules, sachets, solutions

orales, suspensions injectables, etc. Les formes galéniques les plus courantes sont résumées dans le tableau I.1 (Chair, 2024).

Les différentes formes galéniques et leur mode d'action

Tableau I.1.Tableau synthétique des différentes classées selon leur mode d'administration :

Mode d'administration	Forme galénique	Mode d'action
Voie orale (à avaler)	Comprimés enrobés, nonenrobés, solubles, effervescents, gélules.	Le médicament est avalé et le principe actif se libère plus ou moins rapidement selon la forme galénique.
		Le principe actif est libéré très rapidement
Voie rectale (par le rectum).	Suppositoires, lavements, crème locale	Forme de médicament très utilisée chez les bébés, les personnes handicapées ou les patients souffrants de pathologies sévères de l'estomac.
Voie transcutanée (par la peau) Voie respiratoire (par installation)	Pommades, gels, patchs.	Application et action locales.
	• Inhalateurs. • Inhalation ou Comptegouttes et atomiseurs (nez).	Action locale utilisée pour les pathologies ORL et respiratoires.
Voie parentérale (par aiguille ou cathéter)	Injections, perfusions, implants.	Action rapide, utilisée pour la vaccination ou la diffusion lente et prolongée et pour la prise de traitement en milieu hospitalier.
Voie oculaire (par les yeux) Collyres,	Pommades, inserts.	Traitement local des pathologies ophtalmiques ou allergiques.

I.1.5 Différentes formes des médicaments :

Les produits pharmaceutiques sont présentés sous différentes formes parmi lesquelles on peut citer :

- Les formes solides :

Les comprimés, gélules, poudres et dragées sont des exemples de formes solides. Les formes solides résistent mieux à une conservation prolongée en raison de l'absence d'eau. Pour cette même raison, les problèmes d'incompatibilité y sont plus aisément résolus et les saveurs déplaisantes plus facilement dissimulées. (Chair, 2024).

- Les formes liquides :

Ces formes sont particulièrement appropriées pour les enfants, car elles se prêtent à être avalées plus aisément et peuvent faciliter l'ajustement des doses selon le poids.On peut les aromatiser pour améliorer leur acceptabilité.Exemples : solution liquide, sirop, suspension à boire,etc(Chair, 2024).

I.1.6. Stabilité des médicaments

1) Définition :

La stabilité d'un médicament se réfère à sa capacité à maintenir ses caractéristiques chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des paramètres définis pendant toute la période de validité. La stabilité des formulations pharmaceutiques dépend à la fois de facteurs externes (tels que la température, l'humidité et la lumière) et de facteurs internes. Il est nécessaire de distinguer les facteurs associés aux matières premières, à la formulation pharmaceutique et à l'emballage parmi ces derniers.(Chair, 2024).

2) Facteurs influencent la stabilité d'un médicament

a. Les facteurs internes

- **Système médicamenteux :** Le médicament est un système artificiel contraint qui présente un déséquilibre thermodynamique. Son comportement dépend de son niveau d'entropie, c'est-à-dire de son degré de « désordre ». À tout moment, la progression de ses états instables se dirige vers d'autres états où l'énergie libre sera moindre. (Chair, 2024).

- **L'état physique du milieu :** Les émulsions et les suspensions sont particulièrement instables, présentant une propension innée à se détériorer. (Chair, 2024).
- **Incompatibilité entre les différents constituants :** Elle peut être de nature chimique ou physique (substances ordonnées à un taux dépassant leur coefficient de solubilité, etc.)(Chair, 2024).

b. Facteurs externes :

- **La température :** Elle stimule et facilite toutes les réactions chimiques ou biologiques, peut entraîner des modifications d'état physique et encourage la croissance des micro-organismes. (Chair, 2024).
- **La lumière :** Notamment si elle est riche en radiations ultraviolettes, elle entraîne des modifications moléculaires, des dépolymérisations ou des décompositions. (Chair, 2024).
- **L'air atmosphérique :** L'air atmosphérique est le principal élément externe qui provoque une altération. Les principaux composants, l'oxygène et l'humidité, sont des agents dévastateurs par le biais de processus d'oxydation, d'hydrolyse ou d'effervescence. Dans la plupart des situations, l'humidité est le terrain propice à toutes les autres modifications. (Chair, 2024).
- **La manipulation de fabrication brutale :** Ces manipulations peuvent provoquer l'émergence de gradations susceptibles de favoriser la modification ultérieure : autoclave, broyage avec chauffage (Chair, 2024).

I.1.7 Les médicaments dans l'environnement :

I .1.7.1 Présence des médicaments dans l'environnement :

La présence de molécules pharmaceutiques dans les rejets et les environnements aquatiques remonte aux années 80. Cependant, plusieurs événements récents ont contribué à souligner la problématique de leur présence dans notre milieu environnemental..(Djebiha & Mahyadine, 2023)

Chaque année, des milliers de tonnes de médicaments destinés à l'homme ou aux animaux sont effectivement employées à travers le monde et ensuite relâchées dans l'environnement, sous leur forme originale ou après transformation.(Defarges et al., 2011)

L'attention portée au développement des études sur le comportement et les effets de ces molécules sur l'environnement et la santé humaine s'est donc récemment intensifiée. Il est désormais établi que des molécules pharmaceutiques de diverses classes thérapeutiques se trouvent dans les environnements terrestres et aquatiques, concomitamment à d'autres produits chimiques (adjuvants pour la préparation pharmaceutique, articles d'hygiène personnelle, produits phytosanitaires, plastifiants, retardateurs de flammes, etc.), et ce dans le monde entier.(Djebiha & Mahyadine, 2023).

De plus en plus d'études révèlent la présence de résidus de médicaments dans l'environnement à travers le monde. Basé sur une étude de plus de 1000 publications internationales, on a découvert des traces de produits pharmaceutiques dans 71 pays du monde, couvrant tous les cinq groupes régionaux des Nations Unies. On a surtout identifié les médicaments dans les eaux superficielles et les rejets d'eaux usées, mais ils ont également été repérés dans les nappes phréatiques, le fumier et divers autres environnements. On a détecté plus de 600 principes actifs pharmaceutiques (ou leurs métabolites et produits dérivés) dans l'environnement.Ces substances relèvent de plusieurs catégories thérapeutiques (Andreas Weber et al., 2014):

• les antibiotiques,

• les analgésiques,

• les hypolipidémiants,

• les bêtabloquants,

• les produits de contraste utilisés en radiologie,

• les œstrogènes synthétiques.

Bien que la majorité des observations soient publiées dans les nations industrialisées, on constate une tendance croissante à mener des campagnes de surveillance dans les pays émergents et en développement. Ces actions ont mis en lumière la portée internationale de la présence des produits pharmaceutiques dans l'environnement. Par exemple, le diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien, a été repéré dans les milieux aquatiques de plus de 50 nations à travers le globe(Andreas Weber et al., 2014) (Figure.I.1).

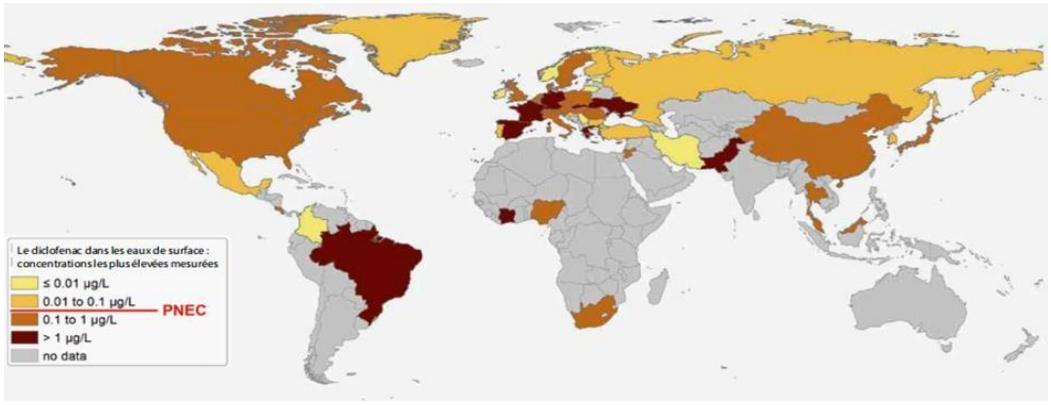


Figure.I. 1 : Concentration la plus élevée de diclofenac mesurée dans les eaux de surface par rapport aux concentrations prévisibles sans effet (PNEC) de 0,1 µg/L(Andreas Weber et al., 2014).

Plusieurs produits pharmaceutiques disponibles à l'échelle mondiale ont été repérés tant dans les nations développées que dans les pays en développement. (Andreas Weber et al., 2014)(Tableau.I.2)

Tableau.I.2 : Nombre de pays à travers le monde dans lesquels les produits pharmaceutiques ont été détectés dans l'environnement aquatique(Andreas Weber et al., 2014)

Produit pharmaceutique	**Classe thérapeutique**	**Nombre de pays à travers le monde dans lesquels les produits pharmaceutiques ont été détectés dans l'environnement aquatique**
Diclofenac	Analgésiques	50
Ibuprofène		47
Naproxène		45
Paracétamol		29
Acide acétylsalicylique		15
Sulfaméthoxazole	Antibiotiques	47
Triméthoprime		29
Ciprofloxacine		20
Ofloxacin		16
Norfloxacine		15
Œstrone	Œstrogènes	35
Œstradiol 17-β		34
Éthinylestradiol 17-α		31
Œstriol		15
Carbamazépine	Antiépileptiques	48
Acide clofibrique	Hypolipidémiants	23

I .1.7.2 Sources et Voies de rejet des médicaments dans l'environnement :

L'environnement est contaminé par les médicaments provenant de diverses sources, à la fois diffuses et ponctuelles. Les principales origines environnementales des produits pharmaceutiques comprennent les rejets d'eaux usées municipales, le lessivage et l'écoulement des sols agricoles, ainsi que les opérations aquacoles(Moulay, 2020).

Il est difficile de quantifier ces sources d'émissions car une part significative est diffuse et peu de recherches ont été menées dans ce domaine. La présence de résidus médicamenteux dans l'environnement aquatique est illustrée par la figure I.1 qui met en évidence les différentes sources possibles. Il est possible que certains de ces composés finissent par se retrouver dans l'eau du robinet(Moulay, 2020).

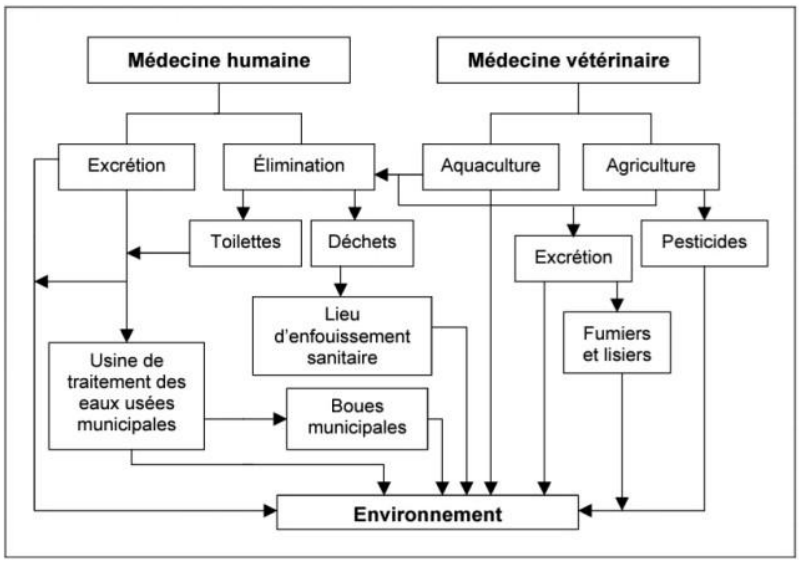


Figure I.2 Principales sources des rejets pharmaceutiques concernés dans l'environnement

Une fois traversant l'organisme, les ingrédients actifs présents dans les médicaments sont éliminés soit sous leur forme active non modifiée, soit sous la forme d'un composé métabolisé. Les eaux usées municipales rassemblent divers médicaments humains (et leurs métabolites) administrés dans les domiciles, les établissements de santé et les soins destinés aux personnes âgées. Les médicaments non consommés qui sont jetés de manière incorrecte dans les lavabos et les toilettes finissent également dans les eaux des égouts municipaux. Les méthodes traditionnelles d'épuration des eaux usées, y compris les processus utilisant des boues activées, ne parviennent pas à supprimer totalement les produits pharmaceutiques présents dans les eaux résiduaires : le taux d'élimination varie de moins de 20 % à plus de 80 % pour certains médicaments. Par conséquent, les résidus sont rejetés dans les rivières, les lacs et les aquifères

souterrains. En outre, il a été prouvé que les usines de production de médicaments rejettent des substances actives dans les cours d'eau environnants.

Les médicaments vétérinaires employés dans l'élevage d'animaux sont rejetés dans les sols où le fumier sert d'engrais. Au fil du temps, les résidus de ces médicaments se déposent dans le sol ou s'infiltrent dans les eaux souterraines et superficielles ; ils peuvent aussi être absorbés par la végétation. Les médicaments vétérinaires utilisés en aquaculture se retrouvent directement dans les eaux de surface(Andreas Weber et al., 2014).

I.1.7.3 Les risques liés à la présence des substances pharmaceutiques dans l'environnement :

On peut considérer les principaux risques liés à la pollution des milieux aquatiques suivant deux aspects :

- risque pour les communautés naturelles. Ce genre de risque se rapporte aux impacts des substances toxiques sur les écosystèmes. Certains contaminants, tels que le mercure, s'intègrent dans les réseaux alimentaires. Les perturbateurs endocriniens peuvent influencer l'équilibre hormonal d'un organisme vivant.

- danger pour la santé humaine associé à l'existence de plusieurs substances chimiques, en particulier celles d'origine pharmaceutique(Djebiha & Mahyadine, 2023).

I.1.7.4 Impact des produits pharmaceutiques rejetés sur l'environnement :

Les produits pharmaceutiques sont des éléments actifs biologiquement qui modifient les processus de régulation des êtres vivants, par exemple en gérant le métabolisme, en touchant l'équilibre hormonal ou en réduisant la transmission de signaux cellulaires. Une fois libérée dans le milieu, cette action biologique peut nuire à la faune et la flore (les « organismes non visés ») et affecter la santé des écosystèmes. Ce phénomène peut se manifester à travers différents mécanismes, dont certains ont été prouvés en laboratoire et suite à des observations sur le terrain ; d'autres pourraient encore être identifiés.

Parmi les cas les plus significatifs d'effets écotoxicologiques démontrés, on trouve l'éventuelle extinction des vautours dans le sous-continent indien due à la consommation de carcasses de bovins traités avec l'anti-inflammatoire diclofénac,une étude réalisée sur un lac impliquant l'éthinylestradiol synthétique utilisé dans les contraceptifs qui a conduit à la féminisation des poissons mâles, et les conséquences de l'utilisation vétérinaire du parasiticide

ivermectine sur la décomposition des excréments, la population d'insectes se reproduisant dans ces derniers et les invertébrés aquatiques.

Pour évaluer les risques environnementaux, on confronte les concentrations anticipées (ou observées) de médicaments dans l'environnement à des niveaux anticipés sans effet (PNEC), issus de tests normalisés en laboratoire réalisés sur des organismes témoins tels que les algues, les daphnies, les poissons ou encore les plantes. Au sein de l'Union européenne, il est indispensable que les nouveaux médicaments mis sur le marché soient accompagnés d'une évaluation du risque environnemental. Toutefois, la majorité des médicaments fréquemment employés ont été lancés avant l'instauration de la loi et n'ont donc pas été inclus.

Le diclofénac, un anti-inflammatoire, en est une illustration éloquente. Dans 34 pays, les concentrations maximales du médicament relevées dans les eaux de surface dépassent les niveaux PNEC (Figure.I.1), ce qui entraîne des conséquences écotoxicologiques défavorables pour les organismes dans ces zones.On retrouve généralement les niveaux les plus hauts en aval des stations d'épuration dans les zones fortement peuplées.(Andreas Weber et al., 2014)

I .1.7.5 Toxicité et impact sur la faune et la flore :

Il existe deux catégories d'études cherchant à prouver la toxicité des médicaments sur les organismes vivants. En premier lieu, il y a des recherches sur la létalité (ou toxicité aiguë), où un organisme est exposé à une concentration progressive de polluants jusqu'à ce qu'il meure. Le deuxième type implique des recherches d'observation ou de simulation de l'environnement naturel (toxicité chronique), avec des niveaux de concentration en médicaments qui sont comparables aux pics maximums observés dans le milieu environnant.

Une des propriétés des micropolluants organiques, notamment les perturbateurs endocriniens, est que l'ajout de multiples composés pourrait exponentiellement amplifier la toxicité du mélange total. En d'autres termes, 1+1 ne donne pas seulement 2, mais potentiellement plus.

On a pu observer ce phénomène à maintes reprises, en notant que les faibles concentrations présentes dans l'environnement ou employées en laboratoire ne pouvaient justifier uniquement les altérations comportementales et/ou hormonales de certains organismes vivants, à moins d'envisager une toxicité combinée.(Djebiha & Mahyadine, 2023)

I.1.8 Les méthodes de traitement des effluents pharmaceutiques :

Il existe diverses méthodes de traitement des effluents pharmaceutiques afin de réduire leur influence sur l'environnement. Voici quelques méthodes fréquemment employées (Kidd et al., 2024; Wu et al., 2023) :

1) **La filtration membranaire :** Utilisée pour éliminer les PPCPs individuels de l'eau, mais avec des limites telles que faible efficacité et coût élevé.
2) **Le charbon actif granulaire :** Une méthode courante pour l'élimination des polluants.
3) **Les boues activées :** Utilisées dans les stations d'épuration, mais avec des difficultés à minéraliser complètement les polluants.
4) **La photolyse et les procédés d'oxydation avancés :** Efficaces mais coûteux et parfois limités.
5) **La biorestéation :** une méthode novatrice et prometteuse pour la dégradation des ppcps, a attiré beaucoup d'attention grâce à sa spécificité lâche du substrat, son efficacité et ses conditions de réaction douces.
6) **L'oxydation photocatalytique et irradiation UV :** Méthodes rapides mais nécessitant plus de temps que les approches biologiques.
7) **La dégradation enzymatique :** Utilisation d'enzymes hémiques à base de myoglobine pour une dégradation efficace des polluants
8) **Traitement par les peroxydases :**

La peroxydase est une enzyme qui favorise l'oxydation de différents substrats en employant le peroxyde d'hydrogène comme source d'électrons. Peut utiliser la peroxydase pour traiter les effluents pharmaceutiques (Kidd et al., 2024) :

- Traitement des eaux usées : L'intégration de la peroxydase dans les dispositifs de traitement des eaux usées permet l'élimination des traces de produits pharmaceutiques avant leur dispersion dans l'environnement, aidant ainsi à diminuer la pollution.
- Dégradation des composés pharmaceutiques : La peroxydase peut être utilisée pour catalyser la dégradation des composés pharmaceutiques présents dans les effluents en produits moins toxiques. Elle peut oxyder les groupes fonctionnels des médicaments pour les rendre moins actifs ou les décomposer en fragments plus simples. Par exemple, elle peut dégrader les médicaments comme :

  -le diclofénac sodique,
  -Le 2-mercaptobenzothiazole,
  -Le paracétamol,
  -Le furosémide.

I.2 LES PEROXYDASES :

I.2.1 Historique :

Bien avant la définition du terme « enzyme », Planche (1810) a observé que les extraits de racine issus de différentes plantes pouvaient oxyder et par conséquent colorer le gaïac (un bois très dense, incolore lorsqu'il est réduit), en présence du peroxyde d'hydrogène (H2O2). Ce type d'enzyme, entre autres, a pour rôle de dégrader les peroxydes, qui sont des dérivés nocifs de l'oxygène, tel que le peroxyde d'hydrogène. C'est cette caractéristique qui lui confère son appellation. La peroxydase, l'une des enzymes les plus largement distribuées, est souvent minutieusement étudiée parmi des milliers d'autres identifiées. La production de la Prx est couramment dérivée de la racine de raifort ou du radis noir (horseradish en anglais) comme source traditionnelle. C'est pourquoi les chercheurs la connaissent plutôt sous les initiales HRP (horseradish peroxidase) (Medjeldi marzougui, 2012).

I.2.2 Définition :

On trouve les peroxydases (peroxydase EC 1.11.1.7) de manière répandue dans la nature. La peroxydase, dont l'activité a été découverte chez les plantes, les microorganismes et les animaux, joue un rôle significatif dans ces organismes. Il s'agit d'oxydoréductases qui font appel aux peroxydes (tels que le peroxyde d'hydrogène) en tant que co-substrat pour l'oxydation de divers composés organiques et/ou inorganiques.

La majorité des peroxydases sont des hémoprotéines dont le poids moléculaire peut varier de 30 à 150 kDa. Elles sont capables de catalyser l'oxydation d'une vaste gamme de substrats, en se servant du H2O2 ou d'autres peroxydes comme agents oxydants.(Boucherit, 2016; Regalado et al., 2004b).

I.2.3 Nomenclature (EC) :

La nomenclature EC (EC est le sigle de 'Enzyme commission') est un classement numérique des enzymes, fondé sur la réaction chimique qu'elles catalysent. La première édition de cette classification a vu le jour en 1961 et elle est régulièrement actualisée par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB).

Le code enzymatique se compose des lettres majuscules EC, suivies de quatre chiffres séparés par des points. Chaque chiffre symbolise un stade dans la précision de classification de l'enzyme. Le premier chiffre, variant entre 1 et 6, dénote le type de réaction catalytique : 1.

Oxydoréductases (EC 1) ; 2. Transférases (EC 2) ; 3. Hydrolases (EC 3) ; 4. Lyases (EC 4) ; 5. Isomérases (EC 5) ; 6. Ligases ou synthétases (EC 6). Le deuxième chiffre fait référence au substrat général participant à la réaction, le troisième concerne le substrat spécifique impliqué, et le quatrième représente le numéro de série attribué à l'enzyme.

Par exemple, le code EC de la peroxydase est 1.11.1.7, et il est structuré de la manière suivante: 1 représente une oxydoréductase ; 1.11 : englobe les oxydoréductases qui interagissent avec les peroxydes en tant qu'accepteurs d'électrons ; 1.11.1 : concerne celles qui se servent de H2O2 comme peroxyde ; 1.11.1.7 : spécifie exactement une peroxydase.(Medjeldi marzougui, 2012).

I.2.4 Sources et classification :

En effet, on trouve plusieurs variétés de peroxydases, car ces enzymes sont présentes chez presque toutes les formes de vie : animaux, plantes et microorganismes (bactéries et champignons). Elle est absente uniquement chez les anaérobies stricts, où l'oxygène moléculaire est toxique.(Medjeldi marzougui, 2012).

Les peroxydases animales se distinguent de celles présentes chez les végétaux et les microorganismes par leur séquence d'acides aminés. (Medjeldi marzougui, 2012), elles sont classées en trois familles :

- **classe I :** Il s'agit de peroxydases intracellulaires, à savoir : la cytochrome c peroxidase et l'ascorbate peroxydase, qui proviennent d'une origine bactérienne.(Husain, 2010b).

- **classe II :** (Peroxydases fongiques extracellulaires) Ce type de peroxydase a la capacité d'oxyder des substrats présentant un potentiel redox très élevé, notamment la lignine. Cette catégorie comprend les lignines peroxydases (LiP), les manganèses peroxydases (MnP) et les peroxydases versatiles. Les lignines peroxydases oxydent directement leurs substrats, tandis que les manganèses peroxydases libèrent des ions Mn3+ (sous forme de chélates organiques) qui, par la suite, oxyderaient des molécules à forts potentiels redox. Finalement, les peroxydases qualifiées de « polyvalentes » (VP) ont la capacité de réaliser les deux sortes de mécanismes.(Ruiz-Dueñas et al., 2001).

- **classe III :** (Peroxydases des plantes) Se sont des peroxydases végétales (EC 1.11.1.7 donneur H2O2, oxydoréductase) présentent une affinité pour le gaïacol, souvent considéré comme le substrat universel pour cette catégorie d'enzymes, ce qui explique leur appellation courante de gaïacol peroxydase.

Ces peroxydases ne sont pas clairement définies, car elles catalysent l'oxydation de divers substrats, y compris des composés phénoliques tels que le gaïacol. On les qualifie donc de 'non spécifiques' ou de 'dépendantes de la phénol peroxydase'.

Cette hémoprotéine, ayant un poids moléculaire situé entre 28 et 60 kDa, renferme un groupe prothétique (porphyrine de fer) ainsi qu'une apoprotéine qui comprend approximativement 330 acides aminés acides. Au sein de la superfamille des peroxydases végétales, les séquences d'acides aminés se sont révélées extrêmement variables, affichant parfois moins de 20% d'identité dans les cas les plus divergents. La plupart de ces enzymes sont glycosylées et on prévoit qu'elles seront localisées dans les parois cellulaires ou dans les vacuoles.(Jouili et al., 2011)

Dans la cellule végétale, la peroxydase joue un rôle dans divers processus physiologiques :

1. Photosynthèse et respiration ;

2. Synthèse et dégradation hormonale ;

3. Décomposition du H2O2 dans le cytosol ;

4. Oxydation des substances toxiques ;

5. Synthèse de la paroi cellulaire et production d'éthylène ;

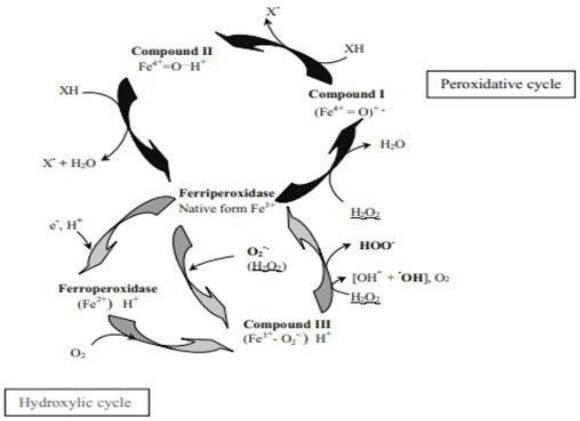
6. Réaction de défense ; etc.(Boucherit, 2016)

I.2.5 Peroxydases des plantes :

Les peroxydases végétales (peroxydases de classe III) sont présentes dans toutes les plantes terrestres. Ils font partie d'une vaste famille multigénique. Peut-être à cause de la multitude d'isoformes et de leur expression très variable, les peroxydases végétales participent à une multitude de processus physiologiques durant le cycle de vie des plantes. Les peroxydases, grâce à deux cycles catalytiques possibles, peroxydatif et hydroxylique (FigureI.3), ont la capacité de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (•OH, HOO•), de polymériser les éléments constituants de la paroi cellulaire et d'ajuster les niveaux de H2O2.

Les peroxydases, qui modulent leur activité et leur expression en réponse à des stimuli internes et externes, sont présentes à toutes les phases de développement des plantes, y compris lors de situations stressantes auxquelles la plante doit s'adapter.

Ces enzymes multifonctionnelles sont capables de générer une paroi solide ou de produire des ROS pour lui conférer plus de souplesse ; elles peuvent empêcher les agressions biologiques et chimiques en élevant des obstacles physiques ou en répliquant avec une importante production de ROS ; elles peuvent également participer à une symbiose plus pacifique. Ils sont finalement là depuis les premières heures de l'existence d'une plante jusqu'à ses derniers instants. Malgré l'apparente contradiction de certaines fonctions, l'ensemble du processus est sans doute sous le contrôle d'un ajustement minutieux qui reste à déterminer.(Passardi et al.,2005).



FigureI.3 Cycles de peroxydase végétale de classe III. (Passardi et al., 2005)

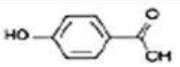
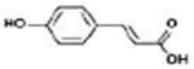
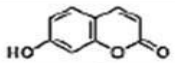
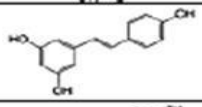
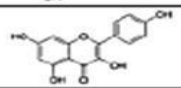
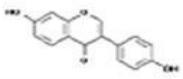
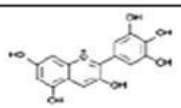
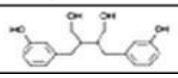
I.2.5.1 Polymorphisme :

On trouve ce type d'enzymes sous différentes variantes (iso peroxydases) au sein d'une même plante et dans un même tissu. Elles se distinguent par certaines caractéristiques physicochimiques et catalytiques. Cette grande diversité moléculaire peut être identifiée par électrophorèse en milieu non dénaturant (migration vers l'anode et la cathode), ou plus facilement par focalisation isoélectrique (IEF). D'après le pHi, on peut différencier les isoformes acides (pHi $\leq$ 7), qui sont séparées en environnement basique (électrophorèse anodique), des isoenzymes à acidité modérée (7< pHi < 9) ou à forte alcalinité (pHi > 9), qui se séparent en milieu acide (électrophorèse cathodique).(Medjeldi marzougui, 2012)

I.2.5.2 Spécificité de substrat :

Les Peroxydes végétaux supportent une variété de substrats fournissant de l'hydrogène, mais ils sont habituellement spécifiques au second substrat oxydant H2O2. On mentionne, entre autres, les composés phénoliques (illustrés au tableau I.3), l'extensine (constituant de la membrane cellulaire), les promoteurs de croissance tels que l'acide 3-indole acétique, les porphyrines comme la chlorophylle, ainsi que les terpènes, les acides gras polyinsaturés, les alcaloïdes et l'acide ascorbique parmi les substrats naturels. Cette vaste capacité d'oxydation est probablement largement définie par le potentiel fortement oxydant des intermédiaires enzymatiques temporaires (les composés I et II), qui se forment durant le cycle catalytique. Ainsi, les Peroxydes ont le pouvoir d'oxyder tous les composés chimiques qui fournissent des électrons (ou de l'hydrogène) (Medjeldi marzougui, 2012)

Tableau.I.3. Principales classes des composés phénoliques

COMPOSES PHENOLIQUES				
Squelette carboné	**Classe**	**Exemple**	**Formule**	**Origine**
C6	Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	Acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide p-coumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone		Noix
C6-C2-C6	Stilbénoïdes	Trans-resvératrol		Raisin
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kaempférol		Fraises
	Isoflavonoïdes	Daidzéine		Graines de soja
	Anthocyanes	Delphinidol		Raisin Cabernet-Sauvignon
$(C6-C3)_2$	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales

I.2.5.3 Aspects physiologiques :

Les Peroxydes de la classe III remplissent d'autres rôles en plus de leur fonction principale, celle de décomposer les peroxydes nocifs pour la cellule.

Elles entrent en interaction avec des molécules phénoliques (sources de la lignine) qui, une fois oxydées, forment des barrières structurelles caractéristiques face aux processus infectieux et à toute autre forme de stress habituel.

Elles participent à divers processus physiologiques associés au développement de la plante et à celui de l'auxine, à la polymérisation de l'extensine, protéine membranaire, ainsi qu'au 'cross-linkage' des polysaccharides présents dans la paroi cellulaire.

Elles sont également impliquées dans la biosynthèse de la lignine et de la subérine, la production de phytoalexines ainsi que l'oxydation des régulateurs de croissance comme l'acide indole-3-acétique.

Les caractéristiques des Peroxydases, notamment leur polymorphisme notable associé à leur nature acide/basique, leur distribution subcellulaire variable et leur capacité à oxyder divers substrats, rendent difficile la compréhension de la fonction biologique des différentes iso-peroxydases (Medjeldi marzougui, 2012).

I.2.5.4 Structure et site actif :

-Structure :

Selon certaines sources, le poids moléculaire des peroxydes d'origine végétale se situe entre 32 et 45 Kda, tandis que d'autres le placent plutôt entre 29 et 54 Kda. Ces enzymes, à l'instar de la catalase, sont des hémoprotéines et par conséquent, leur structure est similaire à celle de l'hémoglobine et du cytochrome c(Figure I.4)(Medjeldi marzougui, 2012).

La majorité des peroxydases sont des hémoprotéines (les exceptions contiennent du vanadium, du sélénium ou du manganèse dans le site actif, d'où leur dénomination). Dans ce cas, le groupe héminique joue le rôle de coenzyme et est défini par la présence d'ions Fe3+ comme ion central et de quatre groupes pyrrole : Ferriprotoporphyrine IX (Figure I.5)(Boucherit, 2016)

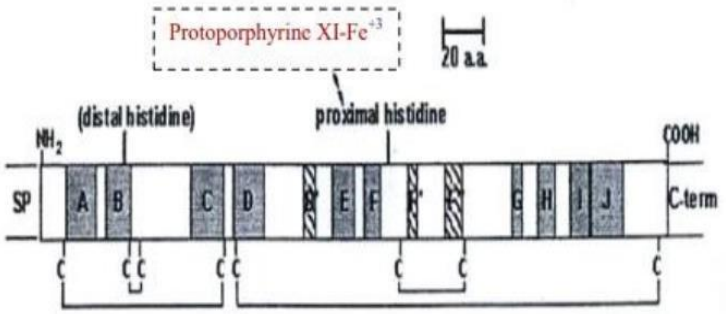


Figure I.4 Schéma de la structure générale des peroxydases des plantes (Aina, 2021)

- Structure primaire : L'enzyme est formée d'une unique chaîne peptidique comportant approximativement 300 résidus d'acides aminés. Les acides aminés His 42, His 170 et Arg 38 sont préservés à travers les diverses Peroxydase. Concernant la Peroxydase C du raifort (HRP-C), le monomère se compose de 306 acides aminés(Veitch, 2004)
- Structure secondaire : le monomère standard est composé de dix segments d'hélices α, dont trois sont préservés dans les peroxydases végétales. La HRP comporte trois hélices α supplémentaires.(Medjeldi marzougui, 2012)
- Structure tertiaire : le monomère typique des Peroxydase, présente deux domaines contenants chacun un atome de ca2+. Deux hélices antiparallèles forment un creux où est inséré l'hème. (Figure I.6)(Medjeldi marzougui, 2012)
- Structure quaternaire : le nombre de sous-unités varie selon le type de Peroxydase. L'illustration de HRP dépeint six chaînes identiques ou monomères, chacun contenant un groupement hème.(Medjeldi marzougui, 2012)

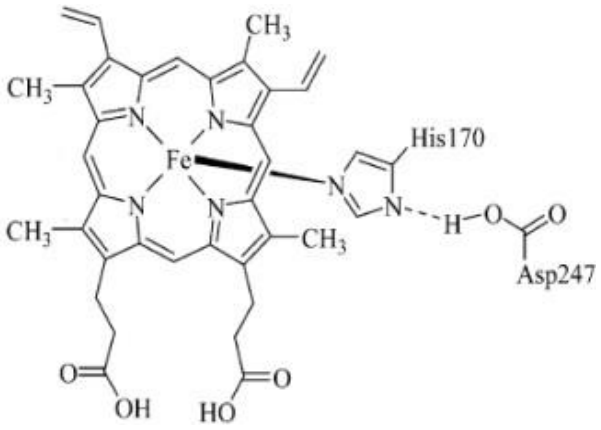


Figure I.5. Structure de Ferriprotoporphyrine IX des peroxydases (Boucherit, 2016)

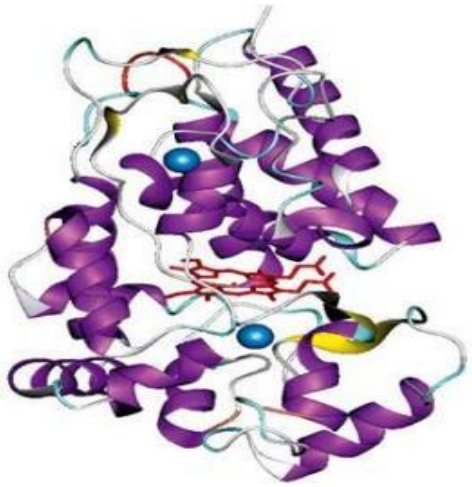


Figure I.6. Structure tridimensionnelle de la peroxydase de HRP (Boucherit, 2016)

-Site actif :

Le site actif des peroxydases est constitué de la partie héminique, où l'ion ferrique (Fe3+) est lié à cinq ligands : quatre sont attachés aux cycles de porphyrine et un à l'azote du noyau de l'histidine 170, qui est un imidazole. La sixième liaison de coordination du fer 3+ sera formée durant le processus de catalyse à l'aide du peroxyde d'hydrogène(De Montellano, 2010; Zakharova et al., 2011).

Effectivement, grâce à la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène (agissant comme accepteurs d'électrons) participe aux réactions d'oxydation des substrats tels que les phénols, les indoles, les amines aromatiques et les sulfonates. En fin de compte, l'oxydation des substrats aromatiques mène à leur polymérisation.(Boucherit, 2016)

I.2.5.5 Le cycle catalytique des peroxydases :

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

Peroxydase + H2O2→Composé I + H2O (I.1)

Composé I + RH2→Composé II+ RH● (I.2)

Composé II + RH2→Peroxydase + RH ● + H2O (I.3)

Où le RH2 est l'électron donneur et RH● est le radical produit de la réaction(Zakharova et al., 2011)

Le cycle catalytique des peroxydases débute par l'oxydation de l'enzyme suivie de la réduction du peroxyde d'hydrogène, générant ainsi le composé I (le composé I renferme un centre oxyferryl avec un fer à l'état ferryl (FeIV = O)). D'un côté, le composé I oxyde le substrat (RH), produisant ainsi le radical associé (R**.**). De l'autre côté, il subit une réduction pour générer le composé II. Les composés I et II interagissent en même temps avec une seconde molécule (RH). En guise d'étape finale, le composé II est de nouveau réduit à l'état ferrique, qui correspond à la forme naturelle de l'enzyme.(Torres et al., 2003)

En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure I.7.

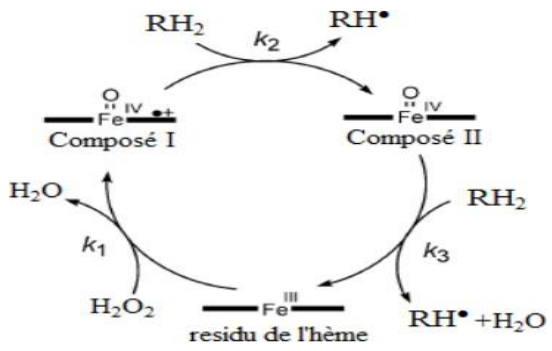


Figure I.7. Cycle catalytique de la partie hémine de la peroxydase (BOUCHERIT, 2016)

I.2.5.6 Mécanisme d'action :

La Peroxydase, comme d'autres protéines, possède une structure chimique 'hème' qui contient du fer ionisé et a la capacité de se lier à l'oxygène. L'activité de ces hémoprotéines est généralement associée à la chimie de l'oxygène ou de ses dérivés.(Medjeldi marzougui, 2012)

• En présence de substrat réducteur :

Les peroxydases, malgré l'hétérogénéité de leurs substrats, catalysent l'oxydation en suivant un cycle catalytique commun se déroulant en trois phases (figure I.7)

Premièrement, le substrat oxydant (H2O2) est impliqué dans la région polaire de la fissure, où il se fixe aux résidus His 42, Arg 38 et à l'ion ferrique. Une fois actif sur le site, le H2O2 entre en interaction avec des résidus d'acides aminés et de l'hème. Cela conduit à la création d'une molécule de H2O et du composé I (Col), instable en raison de l'oxydation de l'hème ferrique en oxyférryl (Fe4+=O+). Par conséquent, H2O2 est réduit et la sixième position de coordination est effectivement remplie. Le Composé I n'est pas simplement un classique complexe enzyme-substrat, il s'agit en réalité d'un intermédiaire enzymatique réactif présentant un degré d'oxydation supérieur (+5) comparé à celui de l'enzyme native (+3). Par conséquent, le composé I peut oxyder une variété de substrats réducteurs grâce à un processus en deux phases consécutives.

Le composé I (CoI) subit une première étape de réduction grâce à une molécule de substrat donneur (AH), suivie d'une deuxième transformation en forme enzymatique intermédiaire.

Le composé II (Coll) présente un état d'oxydation de (+4). Lors de la seconde étape, le composé (Coll) est réduit en présence d'une autre molécule AH2, perdant sa structure radicale pour retrouver sa forme initiale E (Fe3+) et libérer une seconde molécule de H2O.(Aina, 2021)

• En absence de substrat réducteur :

En l'absence de substrats (AH2), le H2O2 peut assumer trois fonctions : celle de substrat oxydant lors de la création du Col, jouer le rôle d'un substrat réducteur semblable à un donneur d'électron ou encore servir d'agent désactivateur (Rodriguez et al., 1997 ; Hernández-Ruiz et al., 2001).

La figure I.8 ci-après, illustre et comprend les deux voies catalytiques ainsi que la voie d'inactivation identifiées. Une des voies catalytiques représente un procédé direct de dismutation (à deux électrons) du H2O2 en O2, qui ressemble à celui de la catalase. L'autre étant un processus en deux phases, impliquant un électron à chaque étape. Ce deuxième processus catalytique entraîne la création du composé III (Colll) et du radical superoxyde (O-2) (Aina, 2021)

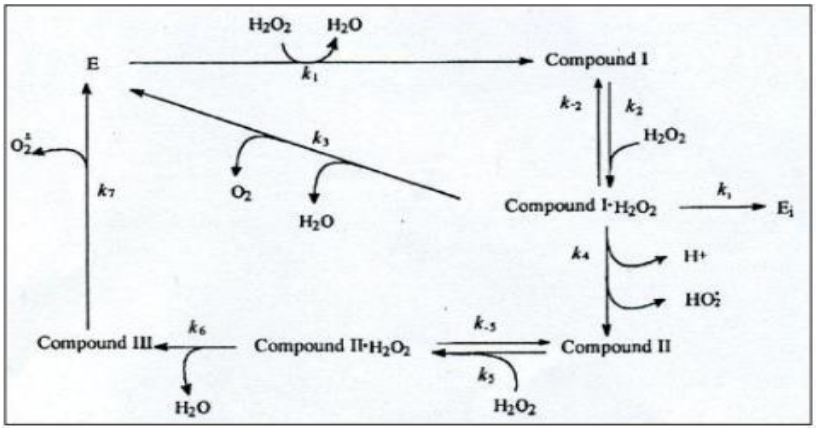


Figure I.8 Modèle de la réaction de HRP-C avec H_2O_2 comme unique substrat(Aina, 2021)

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 Objectif du travail :

La contamination de l'environnement par les résidus pharmaceutiques est un problème croissant, en particulier dans les milieux aquatiques. Des substances telles que l'amoxicilline, fréquemment employées dans le domaine médical humain et vétérinaire, sont régulièrement identifiées dans les eaux usées. Elles peuvent induire des effets écotoxicologiques et contribuer à la montée des résistances bactériennes.

Ce travail a pour objectif d'étudier une méthode de traitement enzymatique de ces polluants, en utilisant la peroxydase libre extraite du navet. Cette enzyme végétale, naturelle et biodégradable, est capable d'oxyder différents composés organiques, offrant ainsi une alternative écologique aux procédés chimiques classiques.

L'étude se concentre sur la dégradation de l'amoxicilline, en évaluant l'effet de divers paramètres expérimentaux (comme le pH, la température et les concentrations en enzyme et en H_2O_2), afin d'identifier les conditions optimales pour une dégradation efficace.

II.2 Produits, matériels et méthodes :

II.2.1 Produits utilisés :

- Les différents réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont présentés sur le tableau

Tableau : II.1. Propriétés des différents réactifs utilisés.

Réactif chimique	Structure chimique	Masse molaire (g/mol
Acétone	C_3H_6O	58.08
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	34.01
Phénol	C_6H_5OH	94.11
4-aminoantipyrine	$C_{11}H_{13}N_3O$	203.24
Sérum Albumine Bovine (BSA)	$C_{2531}H_{3835}N_{58}O_{761}S_{14207}$ (approximative)	66463.5 (approximatif)
Bleu de Coomassie	$C_{47}H_{50}N_3O_7S_2$ (approximatif)	854.04 (approximatif)
Éthanol	C_2H_5OH	46.07
Acide phosphorique	H_3PO_4	97.994
Hydroxyde de sodium	NaOH	39.997
Extrait enzymatique POX (brute/purifiée)	--	--

- Dans cette expérience d'analyse pharmaceutique, j'ai utilisé le médicament amoxicilline comme substance à analyser.

L'amoxicilline est un antibiotique bactéricide appartenant à la classe des β-lactamines, plus précisément aux aminopénicillines (figure). Elle est prescrite pour traiter les infections causées par des bactéries sensibles. C'est l'un des antibiotiques les plus utilisés, en particulier chez les enfants, en raison de sa bonne absorption orale, de son large spectre d'activité antimicrobienne et de son coût abordable. Elle figure également sur la liste des médicaments essentiels établie par l'Organisation mondiale de la santé (« Amoxicilline », 2025).

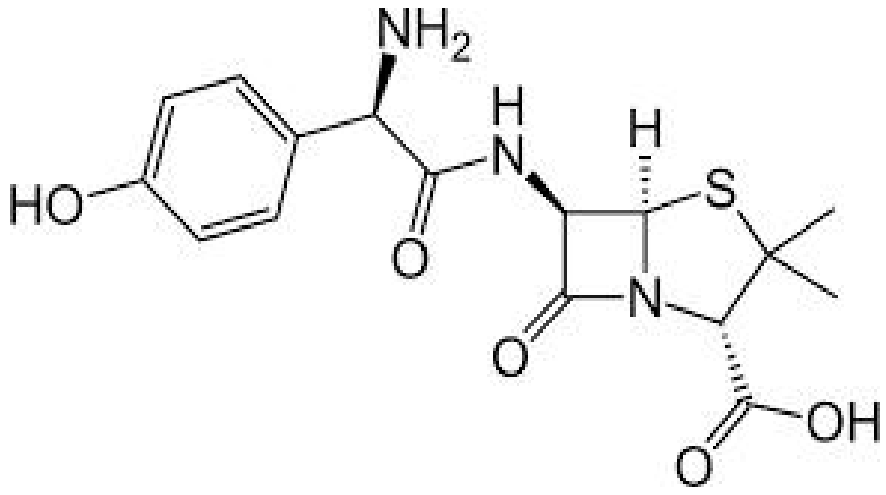


Figure.II.1 .Structure chimique de l'amoxicilline

L'analyse a été réalisée en employant l'enzyme peroxydase libre extraite du plant de navet. Cette enzyme a permis de catalyser la réaction nécessaire à la détection et à l'étude du médicament, offrant ainsi une méthode efficace et spécifique pour son analyse.

II.2.2 Matériels utilisé :

Tableau. II.2. Equipements, matériel et verrerie utilisés

Équipements	Matériel	Verrerie
✓ Spectrophotomètre UV-Vis (SP-3000nano)	✓ Thermomètre	✓ Tubes à essai
✓ Centrifugeuse (Hettich ZENTRIFUGEN)	✓ Support de titrage	✓ Fioles jaugées (10, 50, 100, 200, 1000 ml)
✓ Étuve (MEMMERT)	✓ Chronomètre	✓ Pipettes (1, 5, 10 ml)
✓ pH-mètre (DENVER)	✓ Spatule	✓ Erlenmeyers (50, 200, 250 ml)
✓ Mixeur	✓ Papier filtre	✓ Éprouvettes graduées (50 ml)
✓ Agitateur (AGIMATIC-N)	✓ Entonnoir	✓ Cristallisoir
✓ Bain-marie	✓ Boîte de Pétri (Boite pétrie)	✓ Béchers (50, 100, 200, 250, 1000 ml)
✓ Balance électronique (La balance)	✓ Pro pipette	✓ Burette (25, 50 ml)
	✓ Micropipette	✓ Verre de montre

II.2.3 Méthodes expérimentales :

II.2.3.1 Extraction de la peroxydase

Dans cette expérimentation, la peroxydase a été isolée à partir d'une source végétale spécifique : le navet, reconnu pour sa teneur notable en enzymes oxydatives. Pour isoler cette enzyme, 100 grammes de navet, soigneusement pelés et découpés en petits morceaux, ont été broyés avec 200 ml d'eau distillée à l'aide d'un mixeur pendant 5 minutes. Cette étape permet de libérer les enzymes contenues dans les tissus végétaux. Le broyat obtenu a ensuite été filtré à travers plusieurs couches de gaze propre afin d'éliminer les particules solides.

L'extrait liquide recueilli, contenant la peroxydase brute, est immédiatement placé au réfrigérateur à 4°C pour préserver son activité enzymatique en vue d'analyses ultérieures.

Les différentes étapes d'extraction sont illustrées sur la figure.II.2

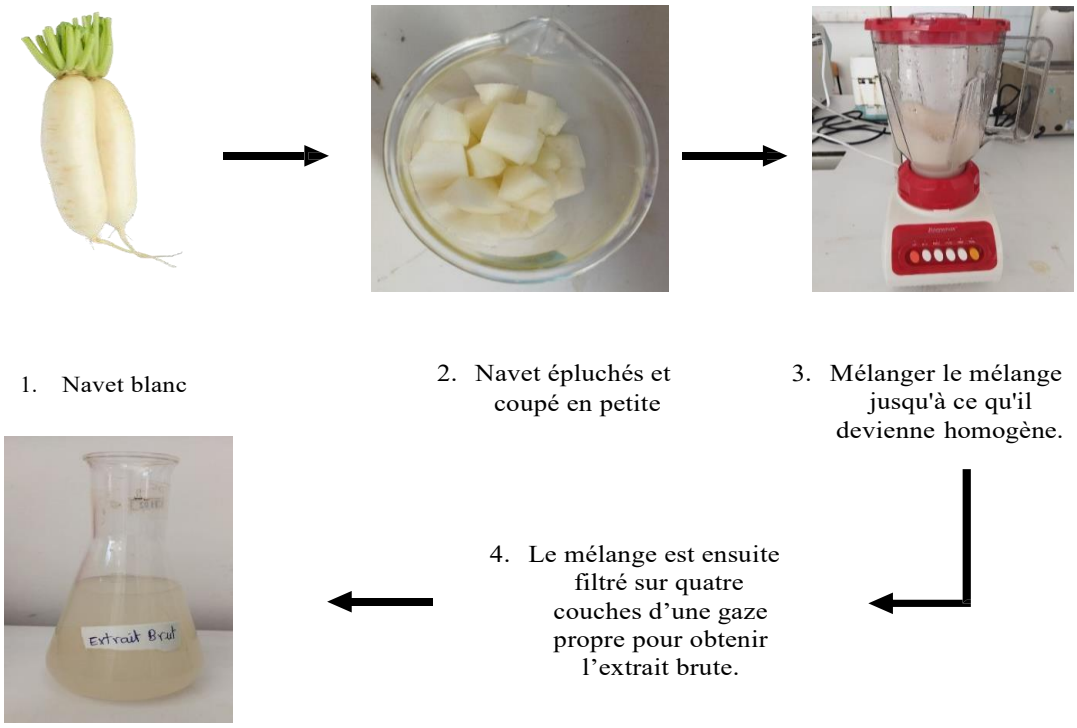


Figure.II.2. Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet

II.2.3.2 Purification partielle de la peroxydase

1. La purification partielle de peroxydase par précipitation en utilisant un solvant organique « acétone » (Boucherit, 2016) est réalisée en utilisant comme suit : On met 25 ml de la peroxydase brut dans un bécher de 50 ml puis on ajoute 25 ml d'acétone froid goutte à goutte pour obtenir un enzyme purifie
2. Une fois que la solution d'acétone aura été complètement versée goutte à goutte, on place notre dernière solution obtenue au réfrigérateur à 4°C et on laisse reposer pendant deux heures. Verser ensuite la solution dans un tube et centrifuger. À 3000 tr .min-1 pendant 10 min. Après avoir séché le précipité, dissolvez-le dans 25 ml de solution tampon à pH6 et conservez le tube dans un réfrigérateur à une température de 4°C.

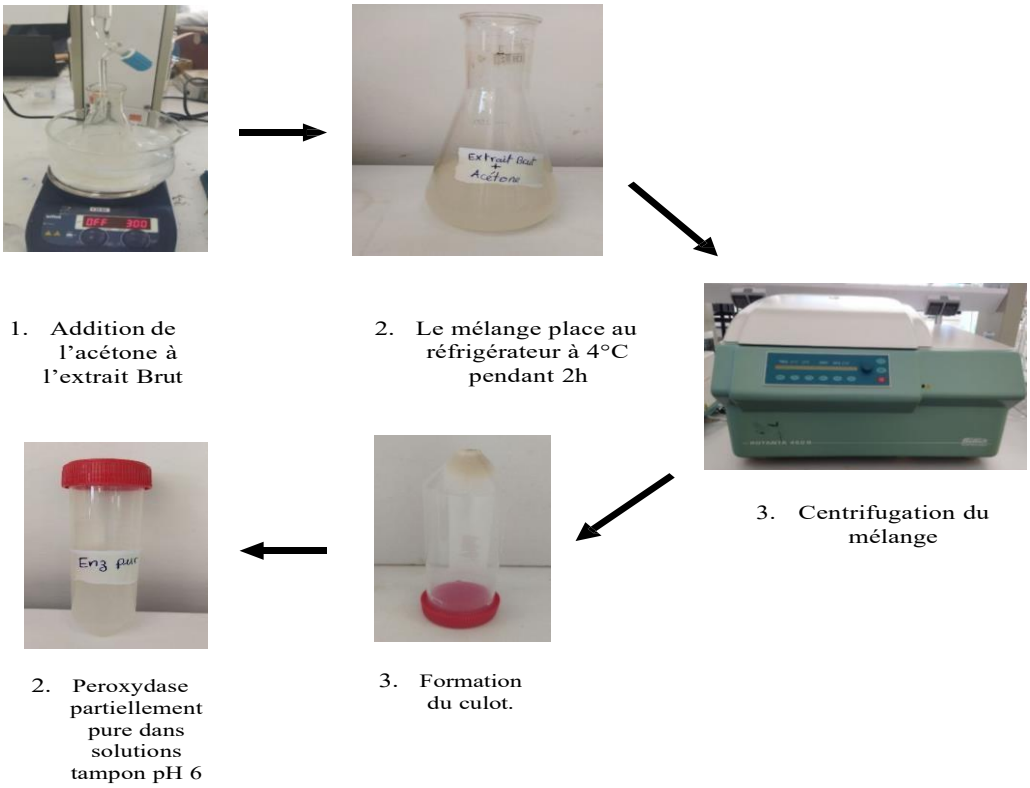


Figure.II.3 : Protocole de purification partielle de la peroxydase par précipitation à l'acétone

II.2.3.3 Activité enzymatique avant et après purification :

Pour cette expérience d'activité enzymatique, le mélange réactionnel est préparé dans une fiole de 50 ml et contient les composants suivants :

- 1 ml de H_2O_2 à 0.1M
- 1 ml de phénol à 0.1M
- 1 ml de 4-amino-antipyrine à 0.01M
- Le volume est complété à 50 ml avec une solution tampon (buffer) au pH 6.

La réaction est initiée par l'ajout de 0.2 ml d'extrait enzymatique à 4 ml du mélange préalablement préparé. Le développement de la couleur est ensuite rapidement suivi à une longueur d'onde de 517 nm (Nicell & Wright, 1997).

- **Principe de la réaction :**

Le principe de cette méthode repose sur la capacité de l'enzyme peroxydase à catalyser l'oxydation des phénols en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans cette expérience,

le phénol est utilisé comme substrat qui est oxydé par l'enzyme. L'élément clé qui rend cette réaction mesurable est la présence de la 4-aminoantipyrine en tant qu'agent de couplage chromogène.

Lorsque la peroxydase oxyde le phénol, des radicaux phénoxyles sont formés. Ces radicaux réagissent immédiatement avec la 4-aminoantipyrine pour former un composé coloré stable appelé quinoneimine. Ce composé se caractérise par une couleur allant du rouge-orangé au rose, et l'intensité de sa couleur est directement proportionnelle à la quantité de phénol qui a été oxydée, et donc à l'activité de l'enzyme.

La quantité de quinoneimine formée est ensuite mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde maximale 517 nm. La mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde permet de quantifier l'activité enzymatique dans l'échantillon (Nicell & Wright, 1997).

II.2.3.4 Dosage des protéines :

La détermination des protéines solubles totales a été effectuée selon la méthode de Bradford (1976). La courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration a été réalisée en utilisant la fraction de sérumalbumine bovine (BSA) comme référence. L'absorbance a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Le dosage des protéines se fait pour l'extrait brut et purifié afin de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme.

1. Préparation de la Solution Mère d'Albumine

Pour préparer la solution mère, dissoudre 10 mg d'Albumine Sérique Bovine (ASB) dans 100 ml d'eau distillée.

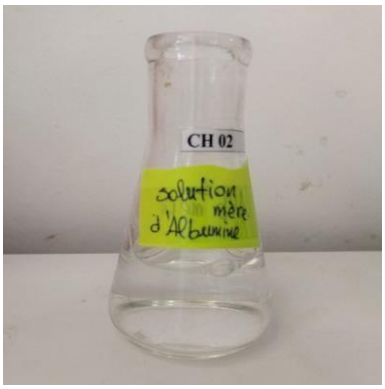


Figure.II.4 : La solution mère d'albumine

2. Préparation du Réactif de Bradford

Dans un premier temps, mélangez 100 mg de bleu de Coomassie avec 50 ml d'éthanol et 100 ml d'acide phosphorique. Une fois le bleu de Coomassie complètement dissous, ajustez le volume total à 1000 ml avec de l'eau distillée. Laissez la solution sous agitation pendant 24 heures. Après cette période, filtrez la solution et conservez-la au réfrigérateur.

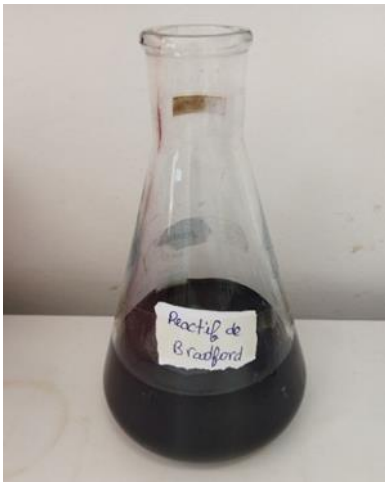


Figure.II.5 : La solution de réactif de Bradford

3. Méthode de Bradford

Cette méthode nécessite sept tubes à essai, chacun contenant :

- 0,25 ml de NaOH 1M
- 5 ml de réactif de Bradford
- Ensuite, ajoutez les échantillons comme suit :
  - Tubes 1 à 5 : Ajoutez 0,1 ml d'albumine à des concentrations différentes, allant de 2 à 10 mg/L.
  - Tube 6 : Ajoutez 0,1 ml de peroxydase brute.
  - Tube 7 : Ajoutez 0,1 ml de peroxydase purifiée.

Agitez tous les tubes, puis laissez-les reposer pendant 10 minutes. Enfin, mesurez l'absorbance de chaque tube à 595 nm.

II.2.3.5 Dégradation de l'amoxicilline par peroxydase libre :

❖ **Préparation de la solution mère d'amoxicilline et détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale :**

- La solution mère d'amoxicilline est préparée en dissolvant un comprimé d'amoxicilline (commercial) de 1 gramme dans 500 ml d'eau distillée ou dans un tampon approprié.
- Des solutions aux concentrations de 100, 200, 300, 400, 500 et 600 mg/L sont obtenues par dilutions de la solution mère.
- Pour déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale de la solution d'amoxicilline, un balayage est effectué dans la zone UV (ultraviolet) entre 200 et 400 nm, sur un échantillon de solution ayant une concentration déterminée, placé dans une cuve de quartz.

II.2.3.6 Effet des paramètres opératoires sur la biodégradation de l'amoxicilline par la Peroxydase libre :

L'utilisation de l'enzyme peroxydase sous forme libre permet d'exploiter sa capacité naturelle à catalyser la dégradation de divers composés organiques, y compris les polluants pharmaceutiques tels que l'amoxicilline.

L'enzyme libre est directement disponible en solution, ce qui facilite son interaction avec les substrats. Nous avons donc testé l'effet du pH, de la température, de la concentration des deux substrats (H_2O_2 et l'amoxicilline), ainsi que la charge en enzyme, sur la biodégradation de l'amoxicilline à l'aide de la peroxydase libre.

1. Courbe d'Étalonnage de l'Amoxicilline

Pour établir la relation entre la densité optique (DO) et la concentration en amoxicilline, une courbe d'étalonnage a été construite. Pour ce faire, une série des solutions d'amoxicilline, avec des concentrations variant de 100 mg/L à 600 mg/L, ont été préparées. L'absorbance initiale à la longueur d'onde maximale (λmax) a ensuite été mesurée pour chacune de ces solutions.

2. Effet de pH :

Des expériences ont été menées pour évaluer la dégradation de l'amoxicilline par la peroxydase libre extraite du navet. Le protocole a été réalisé avec des solutions tampons dont le pH variait de 2 à 10, à température ambiante, sur une durée d'une heure.

❖ Préparation des mélanges réactionnels :

- Prendre 9 tubes à essai.
- Dans chaque tube, introduire 8 ml d'une solution tampon dont le pH est compris entre 2 et 10 (un pH différent par tube).
- Ajouter 1 ml de solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une concentration de 0,1 M.
- Ajouter 1 ml de solution mère d'amoxicilline à 2 g/L.

❖ Mesure de la densité optique initiale (DOi) :

- Mesurer la densité optique initiale de chaque mélange à λmax=307 nm.

❖ Déclenchement de la réaction :

- La réaction est déclenchée par l'ajout de 0,5 ml de peroxydase libre dans chaque tube.

❖ Incubation et arrêt de la réaction :

- Incuber les tubes à température ambiante pendant 1 heure.
- Après 1 heure de réaction, centrifuger le contenu de chaque tube pendant 10 minutes à 3000 tr/min pour arrêter la réaction enzymatique et séparer les composants.

❖ Mesure de la densité optique finale (DOf) :

- Mesurer les densités optiques finales de chaque solution à λ=307 nm.

3. Effet de la température :

L'étude de l'effet de la température sur la biodégradation de l'amoxicilline a été réalisée en utilisant la peroxydase libre, en suivant un protocole similaire à celui de l'étude du pH. Pour cette série d'expériences, la solution tampon au pH optimal (déterminé lors de l'étude précédente) a été utilisée, tandis que la température a été variée entre 20 et 80 °C.

❖ Préparation des mélanges réactionnels :

- Prendre 7 tubes à essai.

- Dans chaque tube, introduire 8 ml de la solution tampon au pH optimal.
- Ajouter 1 ml de solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une concentration de 0,1 M.
- Ajouter 1 ml de solution mère d'amoxicilline à 2 g/L.

❖ Mesure de la densité optique initiale (DOi) :

- Mesurer la densité optique initiale de chaque mélange à λ=307 nm.

- Déclenchement de la réaction et incubation :
  - La réaction est déclenchée par l'ajout de 0,5 ml de peroxydase libre dans chaque tube.
  - Placer chaque tube dans une étuve à la température appropriée (variant de 20 à 80 °C pour chaque tube).
- Arrêt de la réaction et mesure finale :
  - Après 1 heure de réaction, centrifuger le contenu de chaque tube pendant 10 minutes à 3000 tr/min.
  - Mesurer les densités optiques finales de chaque solution à λ=307 nm.

4. Effet de la concentration de l'amoxicilline (Étude de la cinétique enzymatique) :

L'expérience a été réalisée en utilisant 9 tubes à essai. Les réactifs suivants ont été ajoutés dans chaque tube :

- 8 ml de solution tampon $pH_{optimal}$
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 0,1 M
- 1 ml de solution d'amoxicilline à 2 g/L

➢ Cette expérience a été effectuée plusieurs fois en faisant varier la concentration initiale d'amoxicilline dans la solution, avec les valeurs suivantes : (100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/). Pour chaque concentration, la même méthode a été exactement appliquée, ce qui offre la possibilité d'examiner l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse de l'activité enzymatique.

❖ Après préparation des tubes :

1. On mesure l'absorbance initiale (DO_0) de chaque tube à l'aide d'un spectrophotomètre à λ=307 nm.

2. La moyenne des valeurs mesurées est prise comme valeur initiale de référence DO_0.

❖ Ensuite, l'enzyme (peroxydase libre) est ajoutée aux tubes à différents temps :

- On ajoute 0,5 ml de peroxydase libre dans le premier tube, puis on l'incube à $T°_{optimal}$ pendant 90 minutes**.**
- Après 10 minutes, on ajoute la même quantité d'enzyme dans le deuxième tube, qu'on incube également à $T°_{optimal}$, mais pendant 80 minutes**.**
- Toutes les 10 minutes, un nouveau tube reçoit la même quantité d'enzyme et est incubé à $T°_{optimal}$, mais pour une durée réduite de 10 minutes à chaque fois (80 min, 70 min, ..., jusqu'à 10 min pour le neuvième tube).

❖ À la fin des incubations :

- Tous les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes.
- On mesure l'absorbance finale (DOf) de chaque tube à λ=307 nm.



Figure .II.6 : Incubation de l'étude à essai à une température optimale

5. Effet de la concentration du H_2O_2 :

- Dans le cadre de cette expérience, quatre fioles de 50 ml ont été préparées. On introduit dans chaque fiole 12,5 ml d'une solution d'amoxicilline à 2 g/L.(500 mg/l)
- Des volumes variés d'une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 0,1 M ont ensuite été ajoutés afin d'obtenir les concentrations finales suivantes :

    - 3 ml dans la première fiole (0,006 mol/L),
    - 4 ml dans la deuxième (0,008 mol/L),
    - 6 ml dans la troisième (0,012 mol/L),
    - 7 ml dans la quatrième (0,014 mol/L).

- Le volume total de chaque fiole a ensuite été ajusté à 50 ml à l'aide d'une solution tampon de $pH_{optimal}$

- Un tube à essai est attribué à chaque fiole, avec la possibilité d'en utiliser plusieurs pour renforcer la fiabilité des résultats.
- Un volume de 10 ml du mélange est prélevé de chaque fiole et transféré dans les tubes correspondants
- Avant toute addition d'enzyme, l'absorbance initiale (DOi) est déterminée dans le reste du contenu de la fiole à λ=307 nm.
- Les tubes sont incubés pendant 90 minutes à la température optimale déterminée expérimentalement.
- Après incubation, une centrifugation est effectuée à 3000 tours/minute pendant 10 minutes pour séparer les phases.
- Enfin, une lecture de l'absorbance finale (DOf) à λ=307 nm est réalisée sur chaque échantillon.

6. Effet de la charge en enzyme :

- Pour étudier l'effet de la concentration en peroxydase, l'enzyme a été extraite deux fois selon la même méthode précédente. À chaque extraction, 100 ml de l'extrait enzymatique ont été mélangés goutte à goutte avec 100 ml d'acétone, sous agitation.
- Le mélange a été conservé à 4°C pendant 2 heures, puis centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Le précipité obtenu a été séparé et laissé sécher.
- Le premier précipité a été dissous dans 25 ml de solution tampon pH 6, et le deuxième dans 10 ml du même tampon, dans le but d'obtenir un extrait enzymatique plus concentré.
- À partir de l'extrait concentré (10 ml), quatre dilutions ont été préparées comme suit :

  - Dilution 1 : 1 ml d'extrait + 0,5 ml de tampon pH 6
  - Dilution 2 : 1 ml d'extrait + 1 ml de tampon pH6
  - Dilution 3 : 1 ml d'extrait + 1,5 ml de tampon pH6
  - Dilution 4 : 1 ml d'extrait + 2 ml de tampon pH6

- On obtient six concentrations enzymatiques différentes (deux originales et quatre diluées).

- L'activité enzymatique de chaque concentration a été mesurée selon la même méthode décrite dans l'expérience précédente, afin de déterminer la concentration réelle de l'enzyme.
- Dans cette étape de l'expérience, une fiole de 100 ml a été préparée en mélangeant :

  - 25 ml d'une solution d'amoxicilline à 2 g/L,
  - 8 ml de H_2O_2 à 0,1 M,
  - Le volume total de la fiole a ensuite été ajusté à 100 ml à l'aide d'une solution tampon de pH $_{optimal}$

- De ce mélange, on a prélevé 10 ml dans chacun des six tubes à essai. L'absorbance initiale (DOi) du volume restant dans la fiole a été mesurée avant toute addition d'enzyme à λ=307 nm.
- Chaque tube a ensuite reçu 0,5 ml d'un extrait enzymatique différent de peroxydase libre, correspondant à six concentrations enzymatiques distinctes.
- Les tubes ont été incubés à la température optimale pendant 90 minutes. Après incubation, leur contenu a été centrifugé à 3000 tours par minute durant 10 minutes. L'absorbance finale (DOf) a été mesurée à λ=307 nm.

- Cette manipulation a été répétée avec différents temps d'incubation (100, 110, 120 minutes, etc.) afin d'évaluer l'effet de la durée sur la dégradation enzymatique de l'amoxicilline.

II.2.3.7 Conclusion :

Dans cette étude, nous avons utilisé l'enzyme peroxydase extraite du navet sous sa forme libre afin d'étudier sa capacité à dégrader une solution synthétique du médicament amoxicilline.

La forme libre permet une interaction directe entre l'enzyme et le substrat, ce qui peut favoriser une réaction plus rapide dans certaines conditions expérimentales.

Notre objectif principal dans cette expérience est de déterminer l'efficacité de la peroxydase libre dans la dégradation de l'amoxicilline, en identifiant les conditions optimales de réaction permettant d'obtenir un rendement de décomposition aussi élevé que possible.

Chapitre III : Résultats et discussion

Introduction :

L'objectif de cette partie expérimentale est d'évaluer la capacité de la peroxydase libre extraite du navet à dégrader une solution synthétique d'amoxicilline. Pour ce faire, une série d'essais a été menée afin d'identifier les conditions opératoires optimales permettant une élimination maximale de l'antibiotique.

Les expériences ont été réalisées en faisant varier un paramètre à la fois, à savoir : le pH du milieu réactionnel, la température, la concentration en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la concentration en amoxicilline ainsi que la quantité d'enzyme utilisée. Chaque facteur a été étudié dans le but d'optimiser le rendement de la réaction enzymatique.

Une fois les conditions optimales identifiées, une étude cinétique a été réalisée pour mieux comprendre le comportement catalytique de l'enzyme vis-à-vis de l'amoxicilline. Ce travail vise ainsi à mettre en évidence l'efficacité de la peroxydase libre comme biocatalyseur naturel dans le traitement de ce polluant pharmaceutique, en dehors de toute forme d'immobilisation.

III.1 Extraction et purification partielle de la peroxydase :

L'exploitation de l'extrait enzymatique obtenu au cours de cette étude nécessite l'évaluation de la concentration en protéines ainsi que la détermination de l'activité enzymatique de la peroxydase dans les deux extraits de navet, à savoir le brut et le purifié.

III.2 Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits :

Dans cette expérience, l'activité catalytique de la peroxydase extraite du navet a été évaluée par spectrophotométrie, en suivant les variations d'absorbance à 517 nm. Cette absorbance correspond à la formation d'un complexe coloré issu de la réaction entre le phénol et le 4-aminoantipyrine en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), catalysée par l'enzyme. Deux types d'extraits enzymatiques ont été comparés : un extrait brut (EB) et un extrait purifié à l'acétone (EP).

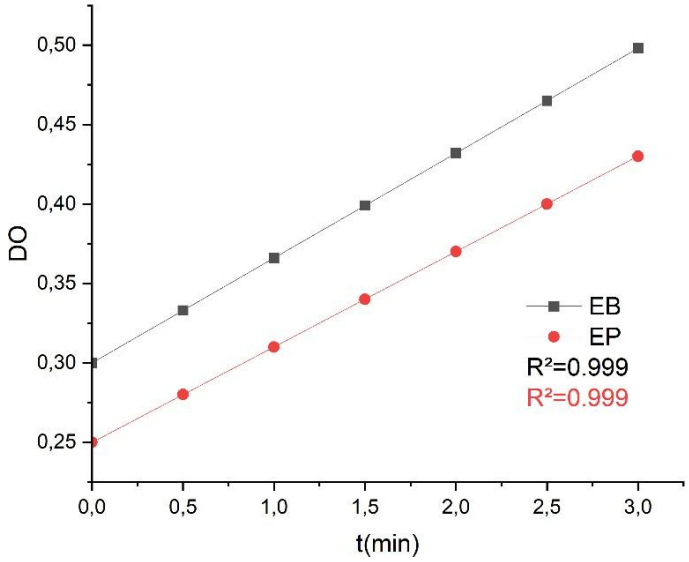


Figure.III.1. Activité enzymatique pour les deux extraits : EP et EB

Les courbes obtenues montrent une augmentation régulière de l'absorbance entre 0 et 3 minutes, traduisant une production progressive du complexe coloré. Cependant, les valeurs d'absorbance enregistrées avec l'extrait purifié sont systématiquement plus élevées, indiquant une activité enzymatique supérieure. Cette amélioration de performance est probablement due à l'élimination d'impuretés ou d'inhibiteurs lors de la purification, ce qui renforce l'efficacité catalytique de l'enzyme. Ces résultats confirment l'impact positif du processus de purification et la pertinence de la méthode utilisée pour le suivi de l'activité enzymatique.

III.3 Dosage des protéines :

L'estimation de la teneur totale en protéines dans les extraits enzymatiques constitue une étape cruciale pour évaluer la qualité de l'extraction ainsi que l'efficacité du processus de purification. Une méthode colorimétrique a été utilisée, basée sur une courbe d'étalonnage obtenue à partir de l'albumine sérique bovine (BSA), avec des concentrations variantes entre 2 et 10 mg/L, et une lecture de la densité optique à 595 nm. Les résultats ont montré une corrélation linéaire fiable entre l'absorbance et la concentration, confirmant la précision de cette méthode pour le dosage des protéines.

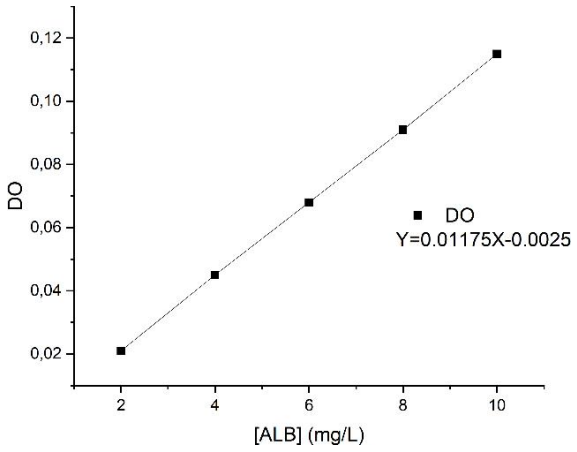


Figure.III.2. Courbe d'étalonnage de L'albumine

Cette méthode a été appliquée à deux extraits enzymatiques : un extrait brut (EB) et un extrait après une première étape de purification par précipitation à l'acétone (EP). Cette étape a permis d'éliminer une grande partie des protéines non spécifiques, contribuant à améliorer la pureté de l'enzyme.

- **Comparaison entre l'extrait brut et l'extrait purifié**

Les résultats de l'activité enzymatique et la quantité des protéines totale contenant dans les deux extraits ne sont pas suffisantes. On fait appel, alors à des notions et à des termes précis : l'activité spécifique, le facteur et le rendement de la purification.

• Activité spécifique est l'activité par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités internationale (UI) par poids de protéines totales.

• Rendement de purification est la proportion en % de l'activité biocatalytique de l'enzyme purifié qui reste par rapport à la quantité initiale.

• Le degré de la purification : est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique par rapport à la première étape

On résume les résultats obtenus dans le tableau (Taleau.III.1**)**

Taleau.III.1.Caractérisation des deux extraits avant et après purification

Extrait	Protéine totale (g)	Activité totale (UI)	Activité spécifique (UI/g)	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
EB	1.032	0.25	0.24	1	100
EP	0.77	0.228	0.296	1.23	91.2

Les données obtenues révèlent une diminution notable de la quantité totale de protéines, passant de 1,032 g dans l'extrait brut à 0,77 g dans l'extrait purifié, ce qui traduit une élimination efficace des impuretés. Par ailleurs, une légère baisse de l'activité totale a été observée, passant de 0,25 UI à 0,228 UI, ce qui reste courant dans ce type de procédé.

En revanche, l'activité spécifique a augmenté de 0,24 à 0,296 UI/g de protéines, ce qui reflète une meilleure concentration de l'enzyme active par unité de masse protéique. En conséquence, un facteur de purification de 1,23 a été obtenu, indiquant une amélioration significative de la pureté enzymatique.

Enfin, le rendement de purification, évalué à 91,2 %, montre une excellente conservation de l'activité enzymatique après purification, soulignant ainsi l'efficacité globale de cette étape, tout en laissant entrevoir des possibilités d'optimisation pour les étapes suivantes.

III.4 Effet des paramètres opératoires sur la biodégradation de la solution synthétique de l'amoxicilline par la peroxydase libre :

Plusieurs paramètres opérationnels influencent de manière critique l'efficacité de la biodégradation des solutions d'amoxicilline synthétique par les peroxydases libres. L'un des facteurs les plus importants est le pH, car cela affecte directement l'activité enzymatique. La concentration en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) joue également un rôle essentiel dans la catalyse du processus d'oxydation.

De plus, la température affecte la vitesse de réaction. Par ailleurs, la concentration en amoxicilline constitue un paramètre clé, car une concentration trop élevée ou trop faible peut limiter l'efficacité de l'enzyme et influencer la cinétique de dégradation.

On se base sur le calcul de deux grandeurs intrinsèques : le rendement et la vitesse, le calcul de rendement de dégradation est déterminé par la relation suivante :

$$R(\%) = \frac{Do_i - Do_f}{} * 100$$

La vitesse de dégradation est déterminée à partir de la pente de la partie linéaire de la courbe qui représente la cinétique disparition du substrat au cours de temps selon l'équation suivante :

$$v = -\frac{\partial[s]}{\partial t} = \frac{[s]_f - [s]_i}{t_f - t_i}$$

III.4.1. Courbe d'Étalonnage de l'Amoxicilline :

La courbe d'étalonnage de la densité optique (DO) en fonction de la concentration en amoxicilline a été réalisée en faisant varier les concentrations de 100 à 600 mg/L. Pour chaque solution préparée, l'absorbance initiale a été mesurée à la longueur d'onde correspondant au λmax, fixée à 307 nm. Le graphique obtenu met en évidence une relation linéaire claire entre la concentration en amoxicilline et l'absorbance, ce qui confirme l'application de la loi de Beer-Lambert, selon laquelle l'absorbance est proportionnelle à la concentration dans une gamme déterminée.

Ce comportement valide non seulement la précision des mesures, mais aussi la pertinence du choix de la longueur d'onde, qui correspond à un maximum d'absorption, assurant ainsi une sensibilité optimale.

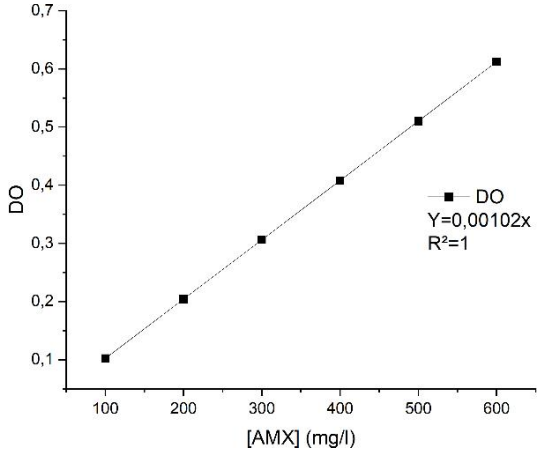


Figure.III. 3 : Courbe d'étalonnage de l'amoxicilline

Par conséquent, cette courbe d'étalonnage constitue un outil fiable et essentiel pour la détermination des concentrations inconnues d'amoxicilline, notamment dans les analyses quantitatives visant à suivre la dégradation ou évaluer l'élimination de cet antibiotique dans les milieux contaminés.

III.4.2. Effet de pH sur la dégradation de l'amoxicilline :

Le pH du milieu réactionnel joue un rôle crucial dans la modulation de l'activité enzymatique, notamment en influençant la structure tridimensionnelle et les charges de l'enzyme. La peroxydase libre, utilisée dans la dégradation de l'amoxicilline, présente un profil d'activité typique fortement dépendant du pH.

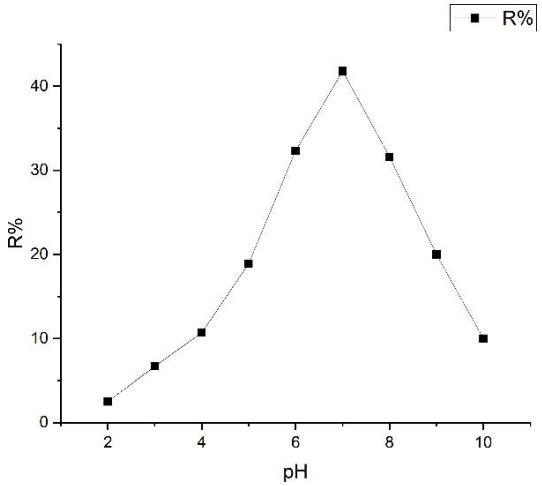


Figure.III.4 : la courbe de rendement en fonction de pH

.

La courbe obtenue montre une augmentation progressive du rendement (R%) entre pH 2 et 7, atteignant un maximum de 41,8 % à pH 7, ce qui correspond au pH optimal de l'enzyme dans ce contexte. Cette efficacité maximale dans un milieu neutre témoigne d'une conformation enzymatique stable et d'une affinité favorable pour le substrat. Cependant, au-delà de cette valeur, le rendement diminue de façon marquée, atteignant 31,6 % à pH 8 et seulement 10 % à pH 10. Cette chute de performance peut être attribuée à une dénaturation partielle de l'enzyme ou à une altération de son interaction avec le substrat en conditions basiques. Ces observations confirment que le pH est un facteur déterminant dans l'optimisation des procédés enzymatiques, et que toute modification de ce paramètre peut compromettre l'efficacité du traitement. Ainsi,

l'identification précise du pH optimal constitue une étape essentielle dans la mise en œuvre de stratégies de dégradation enzymatique ciblée pour les composés pharmaceutiques.

III.4.3. Effet de température sur la dégradation de l'amoxicilline :

La température constitue un paramètre essentiel influençant l'efficacité de la peroxydase dans la dégradation de l'amoxicilline.

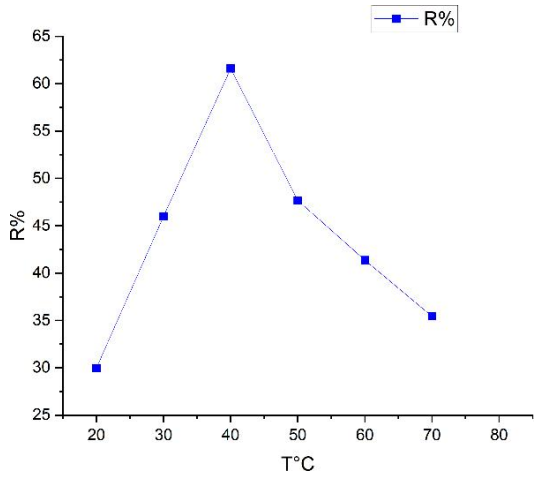


Figure.III.5 : la courbe de rendement en fonction de température.

Les résultats expérimentaux révèlent un profil enzymatique typique caractérisé par deux phases distinctes. Entre 20 °C et 40 °C, on observe une augmentation progressive du rendement (R %), atteignant un maximum de 61,6 % à 40 °C, ce qui correspond à l'activité catalytique optimale de l'enzyme. Cette phase d'activation thermique traduit une stabilité structurelle favorable et une affinité accrue de l'enzyme pour le substrat. Cependant, au-delà de 40 °C, le rendement diminue progressivement, chutant à 47,68 % à 50 °C et à seulement 29,5 % à 80 °C. Cette baisse d'activité est attribuée à une dénaturation thermique partielle ou à une altération de la structure tridimensionnelle de la peroxydase, indispensable à sa fonction catalytique. Ainsi, la détermination précise de la température optimale représente une étape clé pour améliorer l'efficacité du processus de dégradation enzymatique et garantir une élimination optimale de l'amoxicilline dans les conditions expérimentales étudiées.

III.4.4. Effet de la concentration de l'amoxicilline (Étude de la cinétique enzymatique) :

L'étude de la dégradation de l'amoxicilline par la peroxydase libre permet d'évaluer l'efficacité du système enzymatique à travers le calcul de Concentration finale du substrat, rendement et la vitesse initiale de la réaction et à différentes concentrations du substrat. Cette expérimentation vise à comprendre l'influence de la concentration en amoxicilline sur l'efficacité de la réaction enzymatique.

- **Concentration finale du substrat :**

Le suivi de la concentration finale de l'amoxicilline a montré une diminution mesurable dans tous les cas, ce qui confirme une activité catalytique effective de l'enzyme. Toutefois, à mesure que la concentration initiale augmente, la quantité de substrat non dégradée en fin de réaction augmente également, traduisant une limitation de l'enzyme à dégrader le surplus de substrat en condition de saturation.

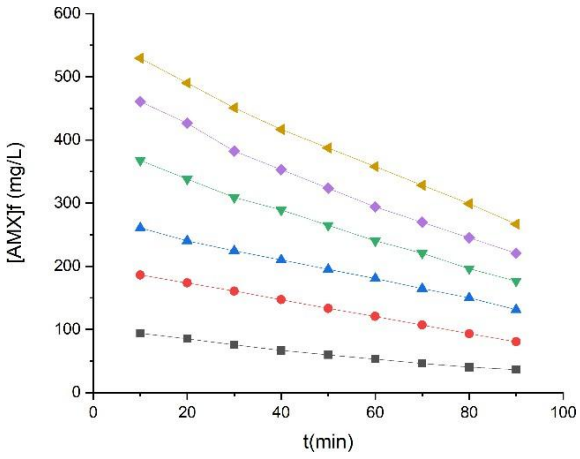


Figure.III.6. La coupe de la cinétique de la concentration de l'amoxicilline en fonction du temps

- **Rendement de dégradation (R%) :**

Les résultats ont montré que le rendement de dégradation est fortement influencé par la concentration en amoxicilline. Le rendement le plus élevé a été observé à la concentration la plus faible (100 mg/L), atteignant **63,7 %**, puis il diminue progressivement pour atteindre environ **55,5 %** à 600 mg/L. Ce comportement peut être attribué au phénomène de saturation enzymatique : à des concentrations élevées, tous les sites actifs de l'enzyme sont occupés, limitant ainsi sa capacité à transformer davantage de substrat. Cette baisse du rendement souligne l'importance d'identifier une concentration optimale qui assure un bon équilibre entre la quantité de substrat disponible et l'efficacité du système catalytique, tout en évitant un excès pouvant entraîner une inhibition relative de l'activité enzymatique.

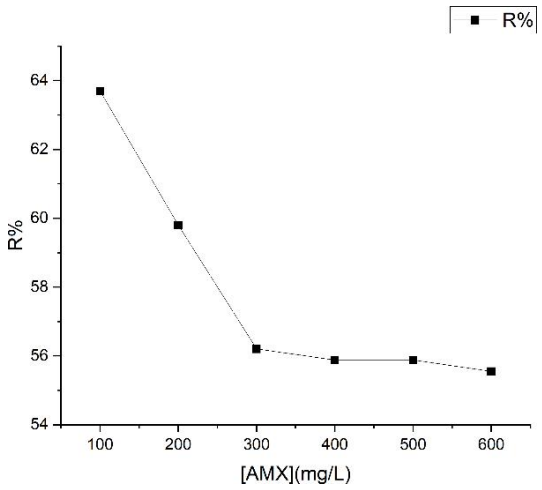


Figure.III.7. La courbe de rendement en fonction de la concentration de l'amoxicilline

- **Vitesse initiale de dégradation :**

La vitesse initiale de dégradation a été déterminée à partir des courbes représentant l'évolution de la concentration de l'amoxicilline en fonction du temps. Les vitesses, exprimées ici en mg/L.min-¹, ont montré une croissance nette entre 100 et 400 mg/L, jusqu'à atteindre un plateau à 3,92 mg/L.min-¹ pour 500 et 600 mg/L, illustrant l'atteinte de la vitesse maximale (Vmax). Ce comportement est typique des systèmes enzymatiques suivant la cinétique de Michaelis-Menten, où l'augmentation du substrat au-delà d'un certain seuil n'accélère plus la réaction.

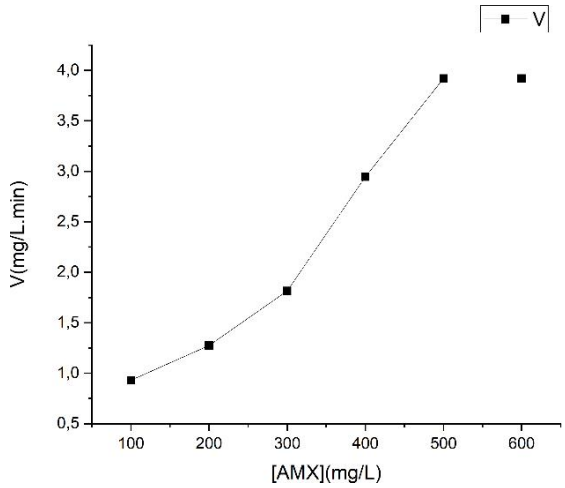


Figure.III.8. La courbe de la vitesse en fonction de la concentration d'amoxicilline

❖ Les résultats obtenus ont permis d'identifier la concentration de 500 mg/L comme optimale pour l'amoxicilline, car elle correspond à une vitesse maximale de réaction tout en maintenant un rendement de dégradation satisfaisant. Cette condition expérimentale représente un bon compromis entre efficacité catalytique et faisabilité pratique. Ce choix permet également de fixer la concentration du substrat à un niveau constant, facilitant ainsi l'étude de l'influence d'autres facteurs importants tels que la concentration en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la concentration en enzyme, et la durée de la réaction, qui sont tous des paramètres clés dans l'optimisation du processus de dégradation enzymatique.

- **La représentation graphique selon le modèle de Lineweaver-Burk**

La représentation graphique selon le modèle de Lineweaver-Burk, construite à partir des vitesses initiales mesurées pour différentes concentrations d'amoxicilline (100 à 600 mg/L), a permis de linéariser la cinétique enzymatique observée. Le tracé de 1/V en fonction de 1/[AMX] montre une droite bien ajustée ($R^2 \approx 0,91$), confirmant que la réaction suit la cinétique de Michaelis-Menten, typique des systèmes catalytiques enzymatiques classiques.

À partir de l'équation de la droite, les deux paramètres cinétiques majeurs ont été déterminés :

- La vitesse maximale (Vmax) est estimée à ≈ 3,30 mg/L/min,
- La constante de Michaelis (Km) est d'environ 937,87 mg/L.

Ces valeurs traduisent une vitesse catalytique notable, mais aussi une affinité modérée de l'enzyme pour l'amoxicilline, en raison de la valeur relativement élevée de Km. Par ailleurs, la forme linéaire du graphique confirme visuellement la saturation de l'enzyme aux fortes concentrations, ce qui justifie le choix d'une concentration de 500 mg/L comme condition optimale dans la suite des expérimentations : à cette concentration, la vitesse de réaction est proche de Vmax sans provoquer une surcharge enzymatique.

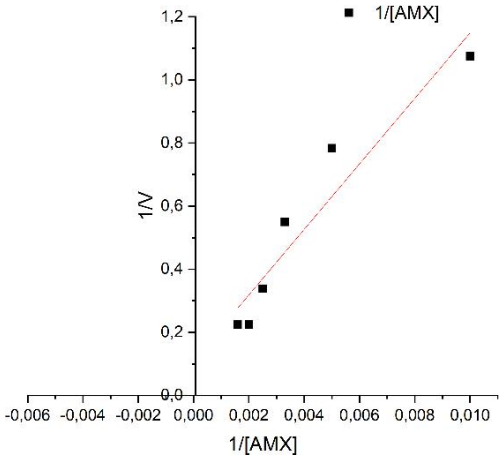


Figure.III.9 : La représentation graphique selon le modèle de Lineweaver-Burk

III.4.5. Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène et sur la dégradation de l'amoxicilline :

L'étude de l'effet du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur la dégradation de l'amoxicilline par la peroxydase libre a permis de mieux comprendre le rôle de ce cofacteur dans l'activation enzymatique. Pour cela, une gamme étendue de concentrations a été testée (0,006 à 0,014 mol/L), englobant des valeurs inférieures et supérieures à la concentration optimale attendue. Ce choix méthodologique visait à confirmer la position réelle du rendement maximal, à analyser les comportements limitants à faible concentration, ainsi que les effets inhibiteurs potentiels à concentration élevée.

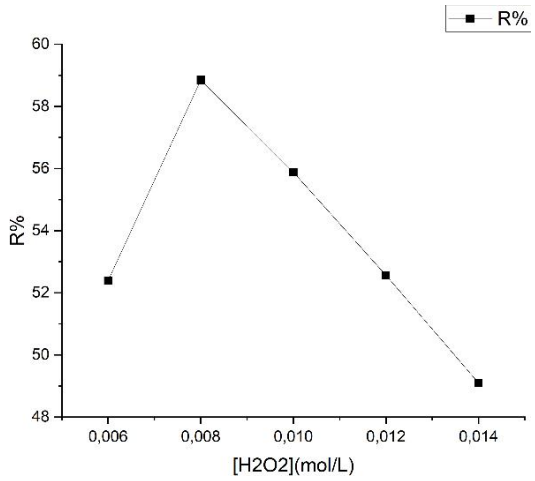


Figure.III.10. La courbe de rendement en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène

Les résultats ont révélé un comportement non linéaire du rendement. Le maximum de dégradation (≈ 58,85 %) a été obtenu à 0,008 mol/L, ce qui confirme son statut de concentration optimale. En dessous de cette valeur (0,006 mol/L), le rendement chute à environ 52,39 %, suggérant une activation incomplète de l'enzyme due à un déficit du cofacteur oxydant. Au-delà de 0,008 mol/L, une baisse progressive du rendement a été observée : 55,88 % à 0,01 mol/L, puis 49,1 % à 0,014 mol/L, ce qui peut être attribué à un effet inhibiteur causé par un excès de H_2O_2 pouvant altérer l'enzyme ou générer des réactions secondaires.

Ainsi, le test de ces différentes concentrations a permis non seulement d'identifier avec précision la concentration optimale de 0,008 mol/L, mais aussi de mieux cerner les limites fonctionnelles du système enzymatique étudié.

III.4.6. Effet de la charge en enzyme sur biodégradation de l'amoxicilline :

- **Effet de la concentration en peroxydase libre [POX] sur le rendement de dégradation de l'amoxicilline (R%) :**

  Le graphique montre l'évolution du rendement de dégradation (R%) de l'amoxicilline en fonction de la concentration en peroxydase libre. On observe une augmentation progressive du rendement lorsque la concentration enzymatique passe de 11,46 à 54,78, avec un R% allant de 76,47 % à 97,84 %. Cette tendance traduit une relation positive entre la concentration en enzyme et l'efficacité du processus de dégradation.

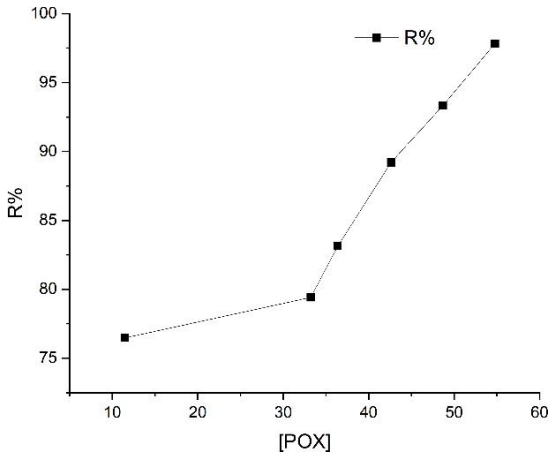


Figure.III.11. La courbe de rendement en fonction de la concentration de peroxydase libre

Cette évolution peut s'expliquer par l'augmentation du nombre de sites actifs disponibles lorsque la concentration enzymatique s'accroît. En début d'expérience, l'élévation du rendement est modérée, probablement en raison d'un nombre limité de sites catalytiques disponibles par rapport à la quantité de substrat (l'amoxicilline). À mesure que la concentration en peroxydase augmente, davantage de molécules de substrat sont prises en charge, ce qui se traduit par une amélioration significative du rendement. Vers la fin du graphique, le rendement approche un plateau, ce qui pourrait indiquer une saturation du substrat, où la disponibilité de l'enzyme n'est plus le facteur limitant.

- **Effet du temps d'incubation (t) sur le rendement de dégradation de l'amoxicilline (R%), en utilisant la peroxydase la plus concentrée :**

Le graphique présente l'évolution du rendement de dégradation (R%) de l'amoxicilline en fonction du temps d'incubation, en utilisant l'extrait enzymatique le plus concentré (dissous dans 10 mL de tampon). Le rendement augmente rapidement entre 10 et 80 minutes, atteignant environ 96%, puis la courbe se stabilise et tend vers un plateau, avec un rendement final de 99,61% à 120 minutes.

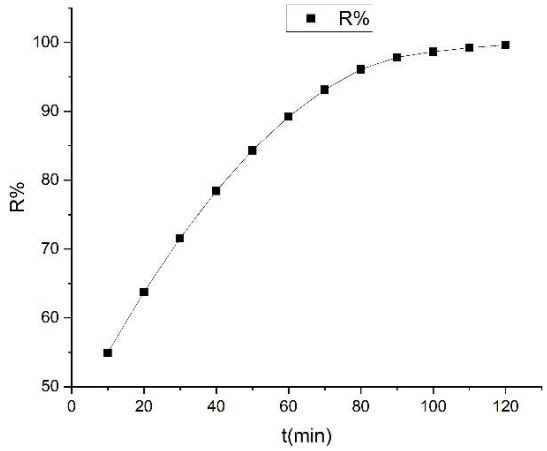


Figure.III.12. La courbe de rendement en fonction du temps

Le graphique montre une augmentation progressive du rendement de dégradation de l'amoxicilline au fil du temps, atteignant un maximum de 99,61 % à 120 minutes. Bien que le rendement semble se stabiliser à partir de 100 minutes, une légère progression est encore observée, indiquant que certaines molécules du substrat nécessitent plus de temps pour être dégradées complètement.

Ce comportement suggère que le prolongement du temps d'incubation jusqu'à 120 minutes permet d'atteindre un rendement quasi-total, ce qui est particulièrement pertinent dans des applications où l'efficacité maximale de la dégradation est prioritaire. Ce temps permet à l'enzyme d'agir sur l'ensemble des molécules d'amoxicilline, y compris celles qui réagissent plus lentement ou sont moins accessibles dans le milieu réactionnel.

Ainsi, 120 minutes peuvent être considérées comme le temps optimal pour assurer une dégradation quasi complète de l'antibiotique, surtout lorsque l'objectif principal est d'atteindre le rendement le plus élevé possible, indépendamment de la durée du processus

.

- **Effet du temps d'incubation (t) sur la concentration de l'amoxicilline dégradée :**

Le graphique illustre la diminution progressive de la concentration finale de l'amoxicilline (Cf) au cours du temps, en présence de la peroxydase la plus concentrée. On observe une chute

rapide de Cf entre 0 et 80 minutes, passant de valeurs élevées à seulement 19,61 mg/L à 80 minutes, puis cette diminution continue de manière plus lente pour atteindre 1,96 mg/L à 120 minutes.

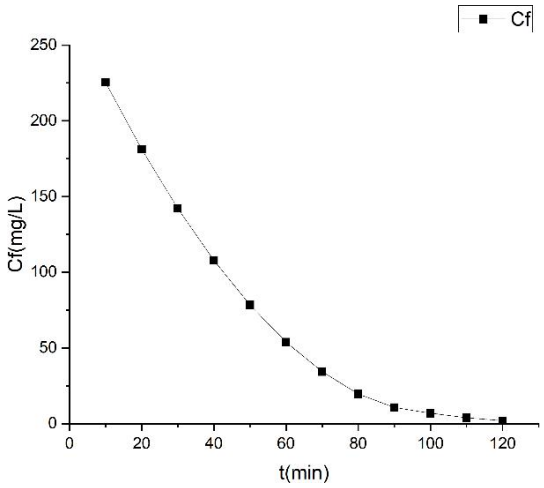
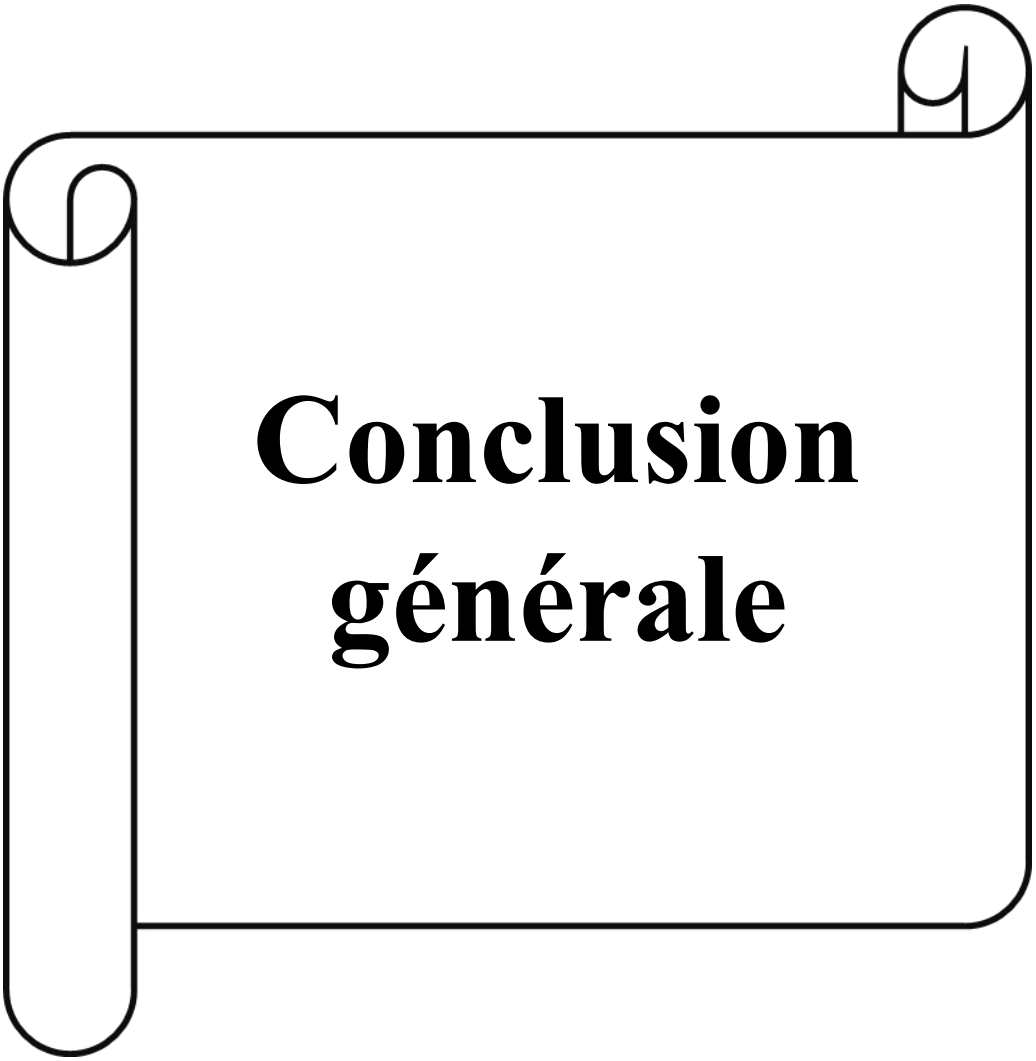


Figure.III.13. La courbe de la concentration finale de l'amoxicilline et dégradé en fonction du temps

Ce profil cinétique confirme l'efficacité élevée de l'enzyme utilisée, et corrobore les résultats observés dans les deux graphiques précédents (rendement croissant avec le temps). La baisse rapide de la concentration du substrat traduit une activité catalytique intense, surtout dans les premières phases de l'incubation, où la concentration en substrat est encore élevée.

Par la suite, à mesure que la quantité d'amoxicilline diminue, la vitesse de réaction décroît naturellement, ce qui correspond à un ralentissement de la cinétique enzymatique.

La très faible concentration résiduelle obtenue à 120 minutes montre que la quasi-totalité de l'antibiotique a été dégradée, ce qui renforce la conclusion selon laquelle 120 minutes constituent le temps optimal pour une dégradation maximale.



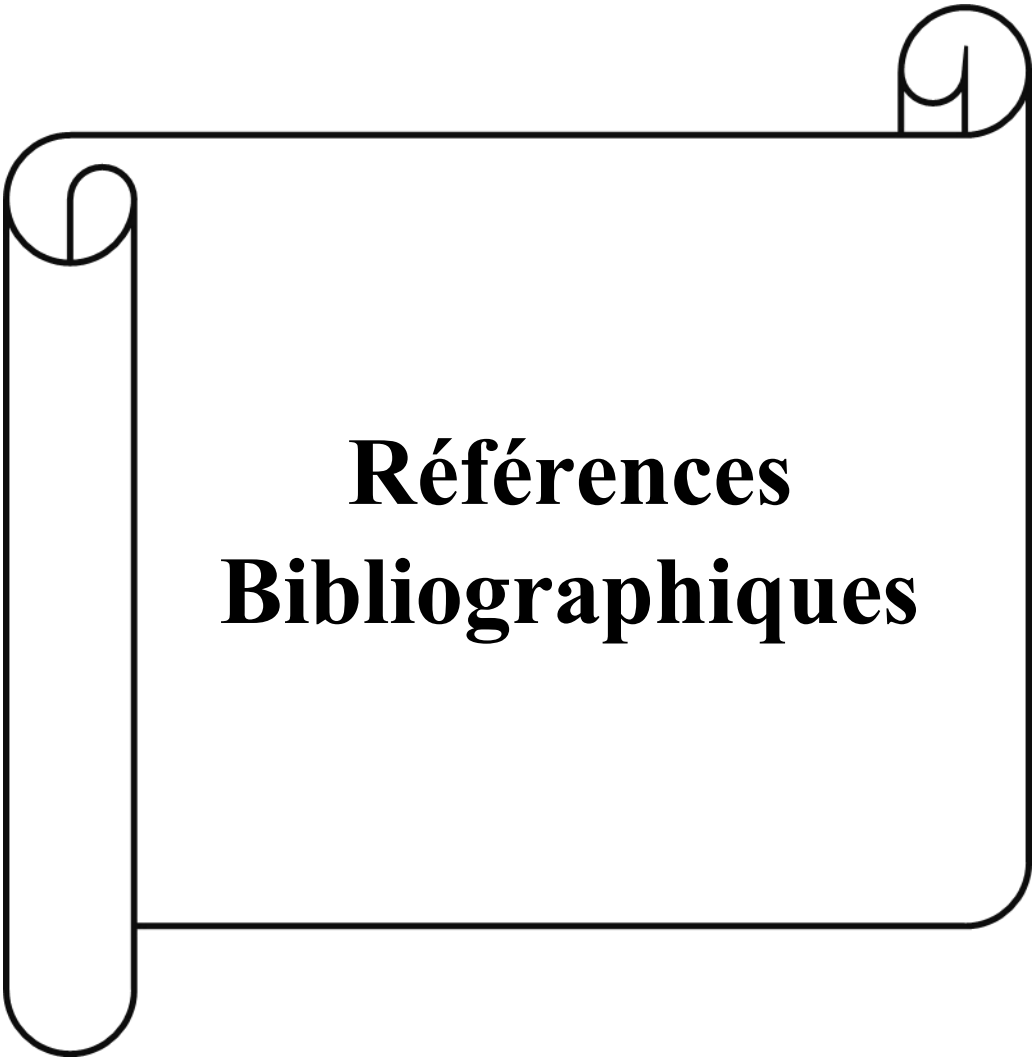
Conclusion générale

Conclusion général :

Dans le cadre de la recherche de solutions écologiques pour le traitement de la pollution pharmaceutique, ce travail a porté sur l'étude de l'efficacité de la peroxydase végétale libre extraite du navet dans la dégradation de l'amoxicilline, un antibiotique largement utilisé et fréquemment détecté dans les milieux aquatiques. L'enzyme a été extraite par une méthode simple et partiellement purifiée à l'aide de l'acétone, aboutissant à un extrait enzymatique présentant un taux de purification de 91,2 % et une activité enzymatique spécifique de 0,296 U/mg de protéine. L'évaluation de ses performances s'est appuyée sur une série d'expériences visant à étudier l'influence de différents paramètres opératoires.

Les résultats ont montré que la dégradation optimale de l'amoxicilline est obtenue dans les conditions suivantes : pH = 7, température = 40 °C, concentration en amoxicilline = 0,5 g/L, H_2O_2 = 0,008 mol/L, enzyme = 54,78 U/mL, durée de réaction = 120 minutes, avec un rendement final de 99,61 %. Une étude cinétique basée sur le modèle de Michaelis-Menten a permis de déterminer les paramètres clés de l'enzyme, confirmant son bon potentiel catalytique dans les conditions expérimentales. Ces résultats mettent en évidence la capacité de la peroxydase végétale à oxyder efficacement l'amoxicilline, faisant d'elle une alternative prometteuse pour le traitement des eaux contaminées par des résidus médicamenteux, d'autant plus qu'elle est facile à extraire et peu coûteuse.

Sur la base de ces résultats encourageants, plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour approfondir ce travail, notamment : l'identification des produits de dégradation à l'aide de techniques analytiques comme la HPLC, l'évaluation de l'utilisation de l'enzyme dans le traitement des médicaments périmés, l'étude de son efficacité vis-à-vis d'autres polluants pharmaceutiques, ainsi que l'optimisation de ses propriétés fonctionnelles en améliorant sa stabilité afin de permettre un usage répété et efficace dans des conditions réelles plus complexes.



Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Aina, chaimaa. (2021). *Etude des caractéristiques des peroxydases d'origine végétale par bio-informatique*. Mémoire de master, Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

Andreas Weber, F., Bergmann, A., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., & Rose, J. (2014). *Les produits pharmaceutiques dans l'environnement – perspective à l'échelle mondiale*.

Bilal, M., Iqbal, H. M. N., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2017). Enhanced bio-catalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish peroxidase in a packed bed reactor system. *Science of The Total Environment*, *575*, 1352-1360. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.215

Bottoni, P., Caroli, S., & Caracciolo, A. B. (2010). Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *92*(3), 549-565. https://doi.org/10.1080/02772241003614320

Boucherit, N. (2016). *Traitement des colorants textiles par procédés de couplage : Fenton-enzyme*.

Chair, S. (2024). *Etude Du Traitement Thermique Des Produits Pharmaceutiques De Forme Liquide*.

Dangoumau, J. (2006). *PHARMACOLOGIE GENERALE*.

De Montellano, P. R. O. (2010). Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases. In E. Torres & M. Ayala (Éds.), *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases* (p. 79-107). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12627-7_5

Defarges, T. M., Guerbet, M., Massol, J., Aumonier, J., Billon, N., Casellas, C., Gatignol, C., Guerbet, M., Houeto, P., Journel, R., Le Louet, H., Lesaffre, B., Massol, J., Defarges, T. M., Ba, A. P., & Sibenaler, C. (2011). Impact des médicaments sur l'environnement : État des lieux, évaluation des risques, communication. *Therapies*, *66*(4), 335-340. https://doi.org/10.2515/therapie/2011040

Djebiha, S., & Mahyadine, D. (2023). *Elaboration et caractérisation d`un matériau mésoporeux à base d`argile et de zéolithe locales. Application à l`adsorption de l`IBUPROFENE® et de produits pharmaceutiques des effluents de NEUROVIT ® et de DIAPHAG®*.

Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater : Current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *399*(1), 251-275. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9

Fent, K., Weston, A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, *76*(2), 122-159. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009

Garric, J., & Ferrari, B. (2005). Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effet biologique : Que savons nous? *Revue Des Sciences de l'eau*, *18*(3), 307-330. https://doi.org/10.7202/705561ar

Husain, Q. (2010a). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes : A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *9*(2), 117-140. https://doi.org/10.1007/s11157-009-9184-9

Husain, Q. (2010b). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes : A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *9*(2), 117-140. https://doi.org/10.1007/s11157-009-9184-9

Jouili, H., Bouazizi, H., & El Ferjani, E. (2011). Plant peroxidases : Biomarkers of metallic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, *33*(6), 2075-2082. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0780-2

Kidd, K. A., Backhaus, T., Brodin, T., Inostroza, P. A., & McCallum, E. S. (2024). Environmental Risks of Pharmaceutical Mixtures in Aquatic Ecosystems : Reflections

on a Decade of Research. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *43*(3), 549-558. https://doi.org/10.1002/etc.5726

Liebig, M., Moltmann, J., & Knacker, T. (2006). Evaluation of Measured and Predicted Environmental Concentrations of Selected Human Pharmaceuticals and Personal Care Products (10 pp). *Environmental Science and Pollution Research - International*, *13*(2), 110-119. https://doi.org/10.1065/espr2005.08.276

Medjeldi marzougui, S. (2012). *Peroxydase d'origine végétale : Purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés* [Thèse de doctorat de Biochimie Appliquée]. BADJI Mokhtar ANNABA.

Moulay, I. (2020). *Étude de l'élimination du chrome VI et de la tétracycline par adsorption sur une argile locale brute et thermiquement modifiée*. 57.

Pal, A., Gin, K. Y.-H., Lin, A. Y.-C., & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources : Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of The Total Environment*, *408*(24), 6062-6069. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, *24*(5), 255-265. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6

Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems : Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*, *119*(6), 3510-3673. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299

Regalado, C., García-Almendárez, B. E., & Duarte-Vázquez, M. A. (2004a). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, *3*(1-2), 243-256. https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047797.81958.69

Regalado, C., García-Almendárez, B. E., & Duarte-Vázquez, M. A. (2004b). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, *3*(1-2), 243-256. https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047797.81958.69

Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. Á., Prados-Joya, G., & Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, *93*(7), 1268-1287. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment : A review. *Science of The Total Environment*, *447*, 345-360. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032

Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases : A review. *Biotechnology Advances*, *24*(5), 500-513. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003

Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions*, *29*(2), 116-122. https://doi.org/10.1042/bst0290116

Torres, E., Bustos-Jaimes, I., & Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, *46*(1), 1-15. https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00228-5

Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*, *3*(1-2), 3-18. https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047799.17604.94

WHO-MHP-HPS-EML-2021.02-eng. (s. d.).

Références Bibliographiques

Wu, G.-R., Xu, J.-K., Sun, L.-J., Li, Y.-F., Gao, S.-Q., & Lin, Y.-W. (2023). Application of engineered heme enzymes based on myoglobin with high peroxidase activity for efficient degradation of various emerging pollutants. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *11*(6), 111471. https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111471

Zakharova, G. S., Uporov, I. V., & Tishkov, V. I. (2011). Horseradish peroxidase : Modulation of properties by chemical modification of protein and heme. *Biochemistry (Moscow)*, *76*(13), 1391-1401. https://doi.org/10.1134/S0006297911130037