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

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master** en chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

Salem Nadhira

Melikaoui Amel

Thème :

Etude de comportement des billes à base d'un biopolymère pour l'encapsulation d'une biomolécule

Soutenu publiquement le 15/06/2024, devant le jury composé de :

Mlle. Euldji A	MAA	UYFM	Présidente
Dr. Ghardaoui.D	MCB	UYFM	Examinatrice
Dr. Ahmedi.A	MCB	UYFM	Encadreur

Année Universitaire 2023/2024

Remerciements

Le premier et le dernier sont à **Allah**.

Qu'Allah m'accorde les capacités nécessaires pour accomplir cette tâche.

Merci à notre superviseur **Dr .A. Ahmedi**, nous tenons à vous remercier pour les conseils et les encouragements que vous avez prodigués à nos patients lors de notre séjour en tant qu'étudiant.

On a eu beaucoup de chance d'avoir un patron qui se souciait autant de notre travail et qui était toujours disponible pour répondre à nos questions et demandes.

Nous remercions **Mlle A.Euldji** qui a accepté de présider le jury de notre mémoire

Nous remercions **Mme D. Ghardaoui**, Docteur à l'Université Yahia Farès de Médéa qui a accepté de lire et jugé notre travail.

Un merci spécial **à tous** ceux qui nous ont soutenus pour mener à bien ce travail

Merci à tous et à toutes

Dédicace

Tout d'abord, je remercie le **Dieu**, notre créateur de m'avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

A ma **Mère**, la source de tendresse et la lumière qui guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite, pour tous ses sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A mon **Père** que je le remercie énormément pour ses efforts, ses conseils et sa surveillance.

A mes chères sœurs **Ahlem, Nassima**, mon chèr frère **Mohamed Islem** et ma nièce Taline pour leurs soutiens moral.

A mon mari **Abdallah**, et ma belle-famille.

A toutes mes Amies sans exception

Nadhira

DEDICACE

Avant toute chose, Je remercie « Allah » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

A ma chère mère

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie

A mon très cher père

Qui m'a supporté, aidé, encouragé et m'a donné la force et la volonté de faire du bien pour mes études et de continuer ce travail.

Merci papa pour vos efforts fournis jours et nuits Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie

À ceux avec qui j'ai passé les plus beaux jours et vécu les meilleurs souvenirs, ce sont les personnes les plus heureuses de ma réussite, ma sœur et mes frères.

Amel

الملخص

يأتي هذا العمل ضمن دراسة فعالية واستخدام البيروكسيداز المستخرج من اللفت في تحلل مادة البرسيتامول تعتمد هذه الدراسة على تحديد العوامل المساهمة في تحلل برسيتامول باستعمال إنزيم البيروكسيداز المثبت داخل الجينات الكالسيوم.

سمحت النتائج على تحديد العوامل القصوى في تحلل برسيتامول عند درجة حموضة 2.0 وعند درجة حرارة 30 درجة مئوية وتركيز برسيتامول 1غ/ل وتركيز الماء الأوكسجين1.2مول/ل. المردود المحصل عليه في ظل هذه الظروف هو 97% مع البيروكسيداز المثبت في هذه الدراسة استطعنا أن نعرف الخصائص الحركية للتفاعل الإنزيمي مثل السرعة القصوى. وأخيرا نستطيع إعادة استعمال الإنزيم المثبت في الشروط القصوى حتى 3 مرات أين حللنا أكثر من 79.15 %من البرسيتامول

الكلمات المفتاحية:بيروكسيداز، البوليميراتالحيوية،الاحتواء،مردود التحلل.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude de l'efficacité et de l'utilisation de la peroxydase extraite du navet dans la décomposition d'une substance pharmaceutique (paracétamol). Cette étude s'appuie sur l'identification des facteurs contribuant à la décomposition du paracétamol grâce à l'enzyme peroxydase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium.

Les résultats ont permis de déterminer les facteurs maximaux de décomposition du paracétamol à un pH de 2,0 et à une température de 30 °C, avec une concentration de paracétamol de 1g/l et une concentration de peroxyde d'hydrogène de 1.2 M. Le rendement obtenu dans ces conditions est de 97% avec la peroxydase éprouvée. Dans cette étude, nous avons pu connaître les caractéristiques cinétiques de la réaction enzymatique, comme la vitesse maximale. Enfin, nous pouvons réutiliser l'enzyme stabilisée dans des conditions extrêmes jusqu'à 3 fois, où nous avons analysé plus de 79.15 % du paracétamol.

Mots clés : peroxydase, biopolymère, inclusion, rendement de dégradation,

Abstract

This work is part of a study of the effectiveness and use of peroxidase extracted from turnips in the decomposition of pharmaceutical effluents (paracetamol). This study is based on the identification of factors contributing to the decomposition of paracetamol using the peroxidase enzyme immobilized by inclusion in calcium alginate.

The results made it possible to determine the maximum decomposition factors of paracetamol at a pH of 2.0 and a temperature of 30 °C, with a paracetamol concentration of 1g/l and a hydrogen peroxide concentration of 1.2 M. The yield obtained under these conditions is 97% with the proven peroxidase. In this study, we were able to know the kinetic characteristics of the enzymatic reaction, such as the maximum speed. Finally, we can reuse the stabilized enzyme in extreme conditions up to 3 times, where we analyzed more than 79.15% of paracetamol.

Key words : peroxidase, biopolymer, inclusion, degradation yield.

Table des Matières

REMERCIEMENTS

DÉDICACE

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABBREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : LES ENZYMES

I. Les enzymes…… 3
I.1. Définition et propriétés des enzymes : …….. 3
I.1.1. Définition des enzymes …….. 3
I.1.2. Propriétés des enzymes …….. 3
I.2. Structure des enzymes …….. 3
I.3. Classification des enzymes…….. 5
I.4. Cinétique enzymatique …….. 5
I.4.1. L'activité enzymatique …….. 6
I.4.2. Vitesse de réaction …….. 6
I.4.3. Les phases de la réaction enzymatique : …….. 6
I.4.4. Équation de Michaelis-Menten …….. 7
I.4.5. Facteurs influençant l'activité catalytique : …….. 9
9

CHAPITRE II : IMMOBILISATION DES ENZYMES

II Immobilisation des enzymes …….
II.1 Définition de l'enzyme immobilisée 13
II.2 Avantages de l'utilisation d'enzymes immobilisées 13
II.3 Les différentes méthodes d'immobilisation : …….. 13
II.3.1 Méthodes d'immobilisation chimique …….. 14
II.3.2 Méthodes d'immobilisation physique …….. 14
II.4. Domaines d'applications des enzymes immobilisées …….. 17
19

CHAPITRE III : PEROXYDASE

III. Peroxydase …….. 20
III.1. Définition de la peroxydase …….. 20
III.2. Rôle de la peroxydase 20
III.3. Structure de la peroxydase : …….. 21
III.3.1. Composition et structure moléculaire ..…… 21
III.3.1.1. Composants moléculaires …….. 21
III.3.1.2. Structure moléculaire …….. 22
III.4. Les différents isoformes de peroxydase et leur structure : …….. 23
III.5. Classification …….. 25
III.6. Mécanisme d'action …….. 27
III.7. Activité enzymatique : …….. 30

III.8. Application de la peroxydase ……..……. 32

CHAPITRE IV : LES EFFLUENTS PHARMACEUTIQUES

IV. Les effluents pharmaceutiques ……..... 34
IV.1. Caractéristiques des effluents pharmaceutiques :..... 34
IV.2. Origines et sources ..…….....…. 35
IV.3. Les risques environnementaux ……..... 36
IV.4. Risques sur la santé humaine ……..... 36
IV.5. Initiatives pour réduire l'impact ..……..... 37
IV.6. Bonnes pratiques pharmaceutique ……..…….....…. 38
IV.7. Règlementations et normes ……..... 38
IV.8. Recherche et développement des technologies plus propres pour Les effluents pharmaceutiques ……..……. 39
IV.9. Méthodes de traitement ……..……. 39
IV.10. Méthodes biologiques ……..……. 40
IV.11. Méthodes enzymatique ……..……..... 40
IV.12. La peroxydase ….....…….....…. 41

CHAPITRE V : MATÉRIEL ET MÉTHODES

V. Matériel et méthodes : ……..…… 42
V.1. Produits utilisés dans chaque expérience ……..... 42
V.1.1. Source d'enzyme peroxydase ……..... 43
V.1.2 Solvant de purification ……..... 43
V.1.3. Dosage des protéines ……..... 43
V.1.4. Substrats de l'enzyme…… 45
V.1.5. Produits utilisés dans immobilisation : ……..……..... 45
V.1.6. Solutions tampons ……..... 46
V.2. Matériels utilisés ……..…….... 46
V.2.1. Equipement ……..…….... 46
V.2.2. Verrerie ……..... 46
V. 2.3. Matériel 46
V.3. Méthodes expérimentales ……..... 47
V.3.1. Extraction de la peroxydase 47
V.3.2. La Purification de la peroxydase ……..... 47
V.3.3 Principe activité enzymatique avant et après purification ……..... 48
V.3.4. Dosage des protéines ……..... 49
V.3.5. Immobilisation de peroxydase immobilisée dans alginate de sodium 49
V.3.6. Caractérisation physico-chimique des billes d'alginate/peroxydase…..…… 50
V.3.7. Dégradation du paracétamol par peroxydase immobilisée : ……..……..... 51
V.3.8. Effet des paramètres opératoires sur biodégradation du paracétamol par la Peroxydase……..... 51
V.3.8.1. Effet pH ……..... 52
V.3.8.2. Effet de température ……..... 52
V.3.8.3. Effet de la concentration H_2O_2 ...……..…… 52
V.3.8.4. Effet de la concentration du paracétamol ……..……..... 53
V.3.8.5. Effet de la charge en enzyme ……..…… 53
V.3.8.6. Cinétique dans les conditions optimales ……..……. 53
V.3.8.7. Réutilisation de l'enzyme immobilisée ……..... 53

CHAPITRES VI : RÉSULTATS ET DISCUSSION

VI.1. Extraction et purification de la peroxydase …….…….. 55
VI.1.1. Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits : …..……. 55
VI.1.2. Dosage de la quantité de protéines …….…….... 56
VI.1.3. Comparaison entre les deux extraits EEB, EEP ……..... 57
VI.2. Immobilisation de la peroxydase de navet …….……..... 58
VI.3. Effet des paramètres opératoires sur la biodégradation du paracétamol par la peroxydase immobilisée ….....…….... 59
VI.3.1. Effet de pH …….……..... 59
VI.3.2. Effet de la température …….…….. 61
VI.3.3. Effet de la concentration initiale du H_2O_2 …….……...… 62
VI.3.4. Effet de la concentration du paracétamol ……..…….. 63
VI.3.4.1. Rendement de dégradation du paracétamol ……..... 63
VI.3.4.2. Vitesse de dégradation du paracétamol ……..... 64
VI.3.5. Effet de la charge en enzyme …… …….……..... 65
VI.3.6. Cinétique dans les conditions optimales ……..……..……. 65
VI.3.7. Cycles de réutilisation de l'enzyme immobilisée ……...…….. 66

CONCLUSION GENERALE ……..... 68
REFERONCES BIBLIOGRAPHIQUE

Liste des figures

Chapitre I : Les enzymes

Figure I.1 :	Forme clé-serrure du complexe ES	**4**
Figure I.2 :	Forme induite du complexe ES	**5**
Figure I.3 :	Suivi de la cinétique réactionnelle	**7**
Figure I.4 :	Les phases de la réaction enzymatique	**8**
Figure I.5 :	Représentation de l'équation de Michaelis-Menten L'activité	**9**
Figure I.6 :	l'activité catalytique en fonction de latempérature	**10**
Figure I.7 :	L'activité catalytique en fonction de pH	**11**
Figure I.8 :	Effet de la concentration d'enzyme	**11**
Figure I.9 :	Effet de La concentration du substrat	**12**

Chapitre II : Immobilisation des enzymes

Figure II.1 :	Méthodes d'immobilisation d'une enzyme	**14**
Figure II.2 :	Le couplage covalent des enzymes	**15**
Figure II.3 :	Immobilisation par Adsorption physique	**16**
Figure II.4 :	Immobilisation par réticulation	**17**
Figure II.5 :	Inclusion dans un gel	**18**
Figure II.6 :	L'échange des ions	**18**

Chapitre III : Peroxydase

Figure III.1 :	Structure chimique de la peroxydase	**20**
Figure III.2 :	Structure chimique Groupements prosthétiques	**22**
Figure III.3 :	Peroxydase de raifort	**23**
Figure III.4 :	Peroxydase glutathion	**24**
Figure III.5 :	Structure fongique de la peroxydase	**25**
Figure III.6 :	Cycle catalytique de peroxydase	**28**
Figure III.7 :	Explicative sur formation du complexe enzyme-substrat	**28**

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Figure V.1 :	Structure de l'albumine	**44**
Figure V.2 :	Structure chimique de bleu de Coomassie	**44**
Figure V.2 :	Structure chimique du paracétamol	**45**
Figure V.4 :	Protocole d'extraction et de purification de la peroxydase	**48**
Figure V.5 :	Expérience de dosage des protéines par la méthode de Bradford	**49**
Figure V.6 :	peroxydase dans l'alginate de sodium	
Figure V.7 :	Les tubes à différentes concentrations de H_2O_2 dans une T° constante :	**53**

Chapitre VI : Résultats et discussion

Figures VI.1 :	Activité enzymatique pour les deux extraits EEP et EEPP	**56**
Figures VI.2 :	Le graphe représente la concentration de l'albumine en fonction du la DO	**56**
Figure VI.3 :	Billes d'enzymes immobilisées	**58**
Figure VI.4 :	Effet du pH sur la décomposition du paracétamol par la	**60**

peroxydase immobilisée
Figure VI.5 : Effet de la température sur la dégradation du paracétamol par peroxydase immobilisée **61**
Figure VI.6 : Effets de la concentration de H_2O_2 sur la dégradation du paracétamol par peroxydase immobilisée **62**
Figure VI.7 : Effet de concentration du paracétamol sur le rendement de la dégradation du paracétamol avec peroxydase immobilisée **63**
Figure VI.8: Effet de la concentration du paracétamol sur le rendement de la dégradation du paracétamol avec peroxydase immobilisée **64**
Figure VI.9 : Effet de la charge en enzyme sur le rendement de la dégradation du paracétamol avec la peroxydase immobilisée **65**
Figure VI.10 : Cinétique de décomposition du paracétamol avec la peroxydase encapsulé dans les billes d'alginates **66**
Figure VI.11 : Cycles de réutilisation de l'enzyme encapsulé **67**

Liste des Tableaux

Chapitre V : Matériel et méthode

Tableau V.1: Produits utilisés dans chaque expérience : **42**

Chapitre VI : Résultats et discussion

Tableau VI.1 : Caractérisation des deux extraits avant et après purification : **57**

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BPF	Les Bonnes Pratiques Pharmaceutiques
DCE	Directive-cadre sur l'eau
DO	Densité optique
E	Enzyme
EEB	Extrait enzymatique brute
EEP	Extrait enzymatique purifié
ES	Enzyme Substrat
GPx	Glutathione Peroxydase)
HRP	Horseradish Peroxydase
Lip	Lignin Peroxydase
OMS	Organisation mondiale de la santé
P	Produit
POD	Fungal peroxydase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
S	Substrat
TPO	Thyroïde Peroxydase
UE	Union Européenne
UV	Ultra-violet

Symbole	Signification	Unité
$[E]_t$	Concentration totale en enzymes	(Ul/ml)
$[S]_\circ$	Concentration initiale du substrat	(g/l)
K	Constant de vitesse	
R.	Coefficient de corrélation	
T	Temps	(min)
T	Température	(°C)
pH_{opt}	pH optimal	
ʎ	Longueur d'onde correspondante à l'absorbance maximale	(nm)
R	Rendement de décoloration	%
V_0	Vitesse initiale de réaction	(mg/L.min)

K	Constante catalytique	$(s)^{-1}$
$\mathbf{K_M}$	Constante de Michaelis-Menten	(mg/L)
Vmax	Vitesse maximale de réaction	(mg/Lmin)
$\mathbf{V_{moy}}$	Volume moyen des billes	(cm^3)
$\mathbf{m_{moy}}$	Masse volumique moyenne des billes.	(mg)
$\mathbf{D_{moy}}$	Diamètre moyen des billes.	(cm)
AE	Activité enzymatique	(Ul/ml)

Introduction générale

Introduction :

Enzymatique n'est pas un concept nouveau, il existe depuis plus de 100 ans.Cependant, ce n'est qu'au cours des 40 dernières années que des applications généralisées d'enzymes immobilisées ont émergé dans la synthèse de divers intermédiaires médicamenteux complexes. Le procédé enzymatique se fait dans des conditions douces qui ne produisent pas de sous-produits internes [1].

À l'état immobilisé, les enzymes sont faciles à manipuler, la séparation des produits est facilitée par l'élimination des impuretés protéiques et elles sont réutilisables (particulièrement utiles pour les enzymes coûteuses). Haute stabilité dans des conditions physiques et chimiques extrêmes, transport facile des enzymes d'un endroit à un autre, rendant l'ensemble du processus plus respectueux de l'environnement, les enzymes immobilisées conviennent à tous types de processus industriels [1].

La peroxydase est une enzyme multifonctionnelle présente dans divers organismes. Elle joue un rôle crucial dans la détoxification cellulaire et la défense immunitaire des plantes. Sa structure moléculaire comporte des sites actifs spécifiques pour les réactions enzymatiques.et des isoformes qui varient dans leur structure et leur fonction. Les méthodes pour mesurer son activité incluent la spectrophotométrie [2].

Les applications de la peroxydase incluent la chimie pharmaceutique, la biocatalyse, le traitement des eaux usées et la fabrication de produits alimentaires. Son utilisation est polyvalente, allant de la biotechnologie à l'industrie alimentaire [2].

Alors, la peroxydase est une enzyme essentielle avec de nombreuses applications, notamment la dégradation des effluents pharmaceutiques, parce que Les résidus pharmaceutiques ont des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine, mais il existe des différentes méthodes de traitement des déchets pharmaceutiques, telles que la précipitation chimique et l'oxydation, ces procédés sont cependant non-destructifs. Ils se limitent, dans la plupart des cas, à un transfert des polluants au lieu d'un traitement radical. Il est donc nécessaire d'améliorer les procédures, d'utiliser des technologies respectueuses de l'environnement et de respecter les réglementations en vigueur. La recherche et l'innovation visent à minimiser les effets négatifs, notamment par des techniques d'oxydation sophistiquées et des biotechnologies [3]

Dans cette étude, nous avons pour objectif d'étudier le comportement des billes à base d'un biopolymère « alginate de sodium » pour l'encapsulation d'une enzyme extraite à partir d'une plantedans la dégradation d'une solution synthétique préparé par une substance pharmaceutique. Le travail se divise en trois parties :

1. Une partie bibliographique portant sur les enzymes notamment la peroxydase et les facteurs influençant leur activité, les méthodes d'immobilisation, ainsi que les effluents pharmaceutiques.
2. 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 immobilisée dans de la dégradation du paracétamol
3. Une troisième partie consacrée pour la discussion des résultats obtenus.

Enfin nous avons terminé le manuscrit par une conclusion générale synthétisant les principaux résultats de cette étude, ainsi que les perspectives ouvertes par ce travail.

Chapitre I
Les enzymes

I. Les enzymes

I.1.1 Définition des enzymes :

Les enzymes sont des protéines spécifiques qui jouent le rôle de catalyseurs biologiques dans les réactions chimiques cellulaires. Elles permettent d'accélérer les réactions chimiques en diminuant l'énergie d'activation requise pour accélérer la réaction. Les enzymes jouent un rôle crucial dans de multiples activités biologiques, comme la digestion, la respiration cellulaire et la production de protéines [4].

I.1.2 Propriétés des enzymes :

- Les molécules d'enzyme sont volumineuses et, en raison de leur taille importante, elles présentent des taux de diffusion faibles. Ainsi, les enzymes créent des structures colloïdales dans l'eau.
- L'action catalytique des enzymes permet d'accélérer la vitesse des réactions chimiques qui se déroulent dans les systèmes biologiques et impliquent un substrat biologique.
- La majorité des enzymes ne sont pas plus impliquées dans les réactions qu'elles provoquent. De la même manière, certaines enzymes qui participent à la réaction sont récupérées sans subir de changement qualitatif ou quantitatif à la fin de la réaction.
- La plupart des enzymes ont une action très spécifique.
- Les enzymes, étant de nature protéique, sont sensibles à la chaleur. La vitesse d'action d'une enzyme augmente à mesure que la température augmente, le taux étant souvent multiplié par 2 à 3 pour une élévation de 10^{oC}.Les enzymes catalysent l'inversion des réactions qu'elles catalysent.
- Les enzymes ont aussi une sensibilité au pH, car le pH d'un milieu aura un impact sur leur efficacité et leur activité est maximale à un pH spécifique [5]

I.2. Structure des enzymes :

Une enzyme est beaucoup plus volumineuse que son substrat. Ils sont constituées de plusieurs acides o-aminés de la série 1. Unis entre eux par une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa [5]

Le site (ou centre) actif d'une enzyme est la région ou se fixe (ent) le(s) substrat(s) et (le cas échéant) le coenzyme, où la réaction a lieu. Le site actif est localisé au fond d'une poche de zone interne hydrophobe de la protéine.

Les liaisons entre enzyme (au niveau des chaines latérales, le plus souvent polaires, des quelques acides aminés constitutifs du site actif et substrat (s) ne sont pas de nature covalente, même si transitoirement de telles liaisons peuvent se former au cours de la catalyse La spécificité de l'enzyme pour son substrat est l'une des caractéristiques de la catalyse enzymatique

Nature de site actif :

Le site actif joue un double rôle : celui de site de fixation du substrat et celui de site catalytique :

a. **Site de reconnaissance** : permet la reconnaissance et maintien du substrat avec des liaisons faibles constitué de certains acides aminés

b. **Site catalytique :**

Clé-serrure : La forme du site actif est complémentaire à celle du substrat (**figure I.1**) [6]

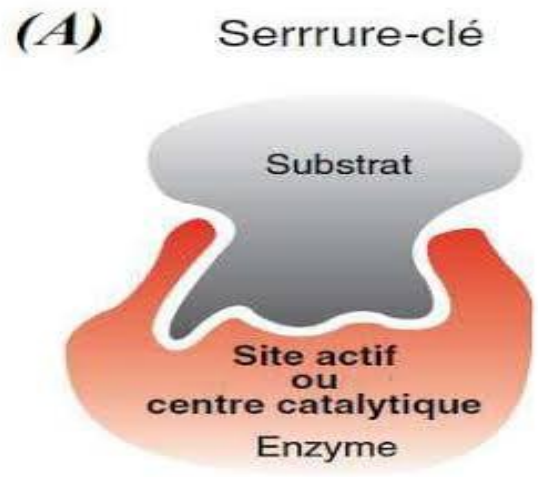


Figure I.1 : Forme clé-serrure du complexe ES [6]

Forme induite : L'enzyme change sa conformation lors de la liaison : Du substrat (suppose que l'enzyme a une structure flexible) (figure I.2)

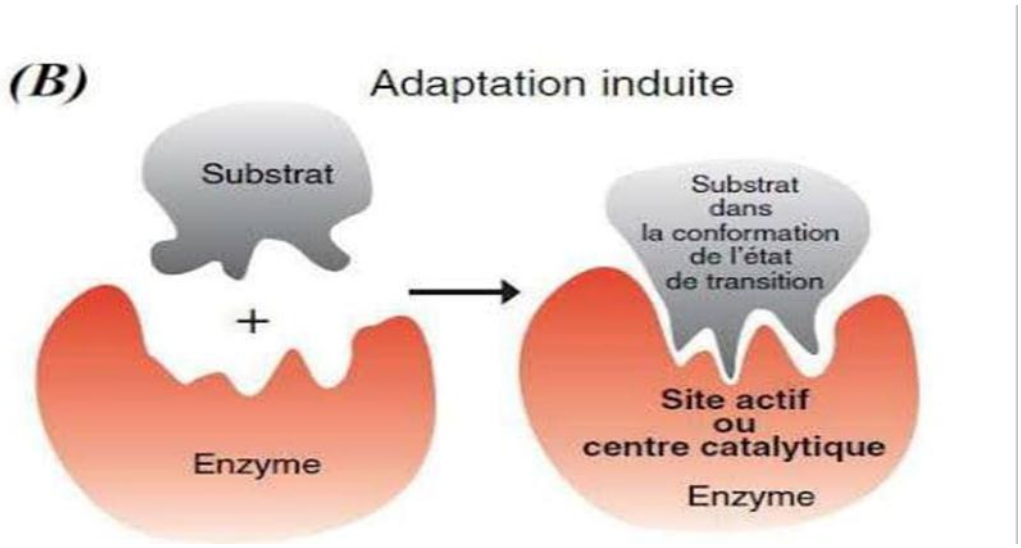


Figure I.2 : Forme induite de l'enzyme [6]

I.3 Classification des enzymes

I.3.1 Classification des enzymes :

Selon les réactions catalysées, les enzymes peuvent être classées dans six grandes familles :

1. **Oxydoréductases** : sont des enzymes qui permettent le transfert d'électrons et de protons d'un donneur vers un accepteur.Ces enzymes sont principalement des déshydrogénases, tandis que d'autres sont des oxydases, des peroxydases et des réductases.
2. **Transférases** : catalysent les transferts de groupements d'une molécule à une autre
3. **Hydrolases** : catalysent des réactions d'hydrolyse (coupure des liens C-C, C-O, C-N et autres par de l'eau).
4. **Lyases** : catalysent l'addition ou l'enlèvement de groupes à des liens doubles
5. **Isomérases** : catalysent le transfert de groupes dans une même molécule pour produire des formes isomères
6. **Ligases** : forment des liens C-C, C-S, C-O et C-N lors de réactions de condensation couplées à l'utilisation d'ATP [4]

I.4. Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique est une branche de la biochimie qui étudie la vitesse des réactions catalysées par les enzymes et mesure leur affinité pour les substrats. Même sans avoir isolé aucune enzyme, les chercheurs peuvent analyser mathématiquement leur activité en mesurant les concentrations de substrats et de produits de la réaction et en observant comment ces quantités changent au cours du temps. Cette analyse permet de déterminer les mécanismes et les propriétés cinétiques des réactions enzymatiques, ce qui est essentiel pour comprendre leur fonctionnement dans les systèmes biologiques[7]

I.4.1 L'activité enzymatique

L'activité d'une enzyme est le fait d'une capacité d'activité catalytique dans des conditions expérimentales bien définies : Concentration initiale en substrat, pH, température,concentration en enzyme,…..

Ses modes d'expression sont :

- L'IUPAC et l'IUB recommandent l'adoption d'une unité internationale: U.I [7]. qui représente la quantité d'enzyme permettent la transformation d'une micromole de substrat par min [8]
- les katals (ou kat) : kat représente la quantité d'enzyme transformant une mole de substrat par seconde

Cette activité est classiquement ramenée à:

l'unité de volume de la solution enzymatique (concentration d'activité catalytique ou CAC encore appelée concentration d'activité enzymatique ou CAE, en UI par unité e volume ou kat par unité de volume).

- la masse d'enzyme (activité spécifique ou AS en UI par unité de masse ou kat par unité de masse).
- la quantité de matière transformée par mole d'enzyme (activité enzymatique molaire ou AEM,

encore appelée activité molaire spécifique ou AMS

I.4.2 Vitesse de réaction

La vitesse d'une réaction chimique est une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps. La vitesse de la réaction peut être définie à partir de la disparition des réactifs ou à partir de l'apparition du produit. Si

la concentration d'un réactif, représentée par [S], varie d'une quantité Δ[S]pendant l'intervalle de temps D *t*, la vitesse est donnée par *v S* = - Δ [S]Δt. En d'autres termes, la vitesse est la variation par unité de temps de la concentration de l'une des substances initiales ou finales. (Figure I.3)[8]

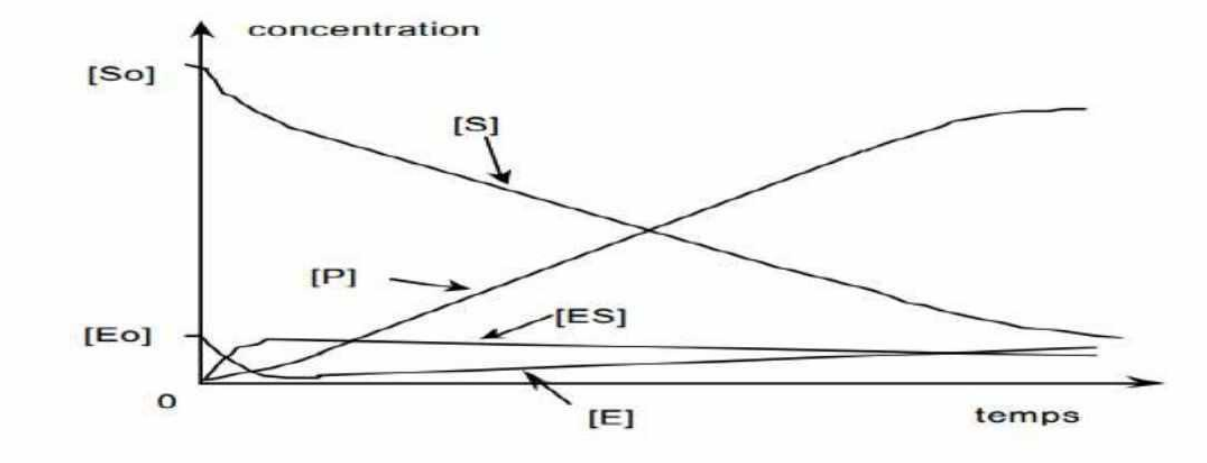


Figure I.3: Evolution de la concentration du substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E) en fonction du temps **[9].**

Si la variation est considérée sur un temps infiniment court, nous obtenons la vitesse instantanée de la réaction [8]:

$$\mathbf{V} = -\frac{1}{\alpha}\frac{d[S]}{dt} = \frac{1}{b}\frac{d[P]}{dt} \qquad \text{..... (1)}$$

Où $\boldsymbol{\alpha}$ et $\boldsymbol{b}$ représentent les coefficients stœchiométriques de la réaction limitant la vitesse. Les deux variations de la concentration définissent la vitesse de la réaction v, qui peut indifféremment être définie en termes d'apparition des produits ou de disparition des réactifs puisque chaque molécule de S consommée est convertie en une molécule P. Si la réaction implique plusieurs substrats ou plusieurs produits, la vitesse de la réaction peut être définie vis-à-vis de chacun de ceux-ci.

I.4.3. Les phases de la réaction enzymatique:

Lorsque l'enzyme et le substrat sont mélangés, la vitesse de la réaction est nulle. Ensuite, elle augmente généralement rapidement jusqu'à atteindre une valeur maximale, puis reste constante pendant un certain temps. Pendant cette période, la vitesse de réaction ne

dépend que de la concentration de l'enzyme et est totalement indépendante de la concentration du substrat, ce qui correspond à une cinétique d'ordre zéro. Enfin, dans une dernière phase, le substrat est consumé, la vitesse de réaction est diminuée et entre dans une phase du premier ordre et elle dépend de la concentration du substrat Comme nous pouvons le voir sur le graphe ci-dessous (figure I.4) qui décompose la cinétique enzymatique en quatre phases distinctes[10]

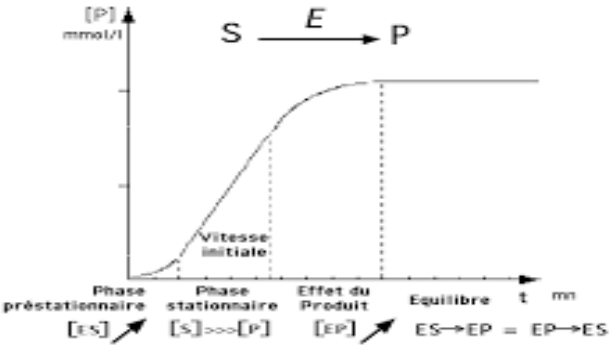


Figure I.4 Les phases de la réaction enzymatique (substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E)) [10]

- **Phase pré stationnaire** : On distingue une première phase très brève, au cours de laquelle la vitesse de la réaction est croissante. Durant cette phase, les molécules de substrat se lient avec l'enzyme la concentration du complexe enzyme-substrat augmente

- **Phase stationnaire** : Lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont occupées par des molécules du substrat la vitesse de la réaction est maximum et reste constante tant que la concentration du substrat est grande et celle du produit petit. C'est ce qu'on observe lors des premières mesures.

- **Effet du produit** : Lorsque la concentration du produit augmente, la réaction inverse commence à concurrencer celle qu'on mesurait la vitesse diminue

- **Phase d'équilibre** Enfin dans une dernière phase, tardive, la vitesse de la transformation inverse devient égale à celle de départ les concentrations ne changent plus, on est à l'équilibre

I.4.4 Équation de Michaelis-Menten

L'équation de Michaelis-Menten décrit comment la vitesse de réaction varie en fonction de la concentration du substrat (**figure I.5**) [11] :

$$E+S \leftrightarrow_{K-1}^{K1} ES \xrightarrow{k_2} E+P$$

Où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit et Ki sont les constants de vitesse des réactions élémentaires

L'équation de Michaelis-Menten : $$\mathbf{V_0 = \frac{v_m \times [S]}{k_m + [S]}} \quad \textbf{(1)}$$

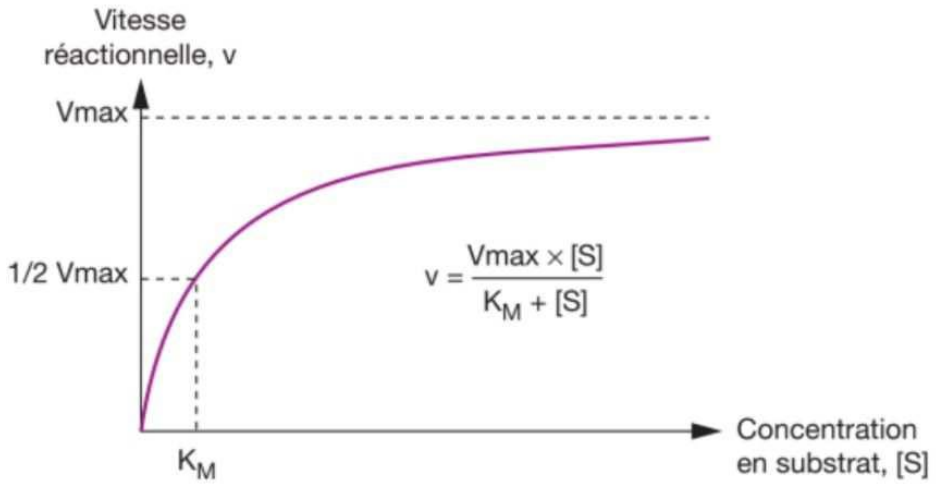


Figure I.5 Représentation de l'équation de Michaelis-Menten$V_{m\times}$[s] [11]

Elle fait intervenir la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m),

Avec : $$\mathbf{K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad \textbf{(3)}$$

I.4.5 Facteurs influençant l'activité catalytique :

a) Effet de température

La dépendance à la température des réactions catalysées par une enzyme présente un optimal car l'augmentation thermodynamique de la vitesse de réaction (1 sur la figure I.6) est suivie d'une forte baisse provoquée par la dénaturation thermique de l'enzyme (2 sur la figure I.3). L'optimum se situe généralement entre 40 et 60 °C.

Certaines enzymes insensibles à la température peuvent présenter un optimum à près de100 °C. **[12]**

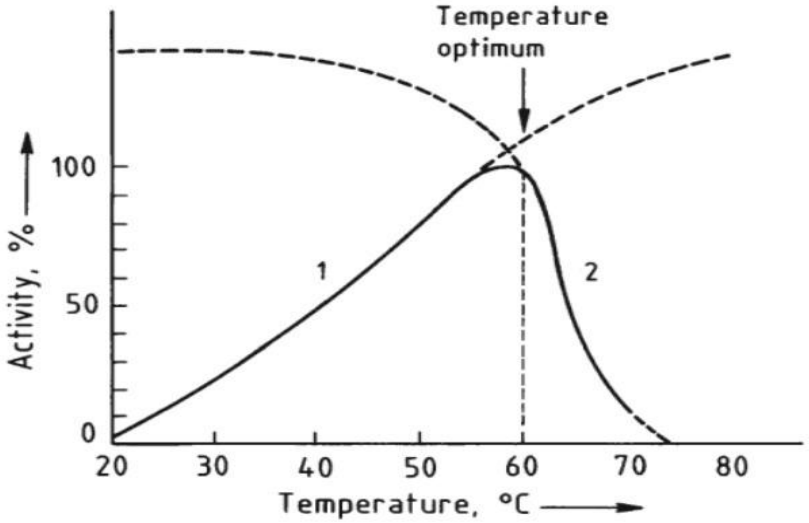


Figure I.6 : L'activité catalytique en fonction de température**[12]**

b) Effet de pH

Toutes les enzymes ont une plage de pH optimale pour leur activité. L'optimum dépend non seulement du pH mais également de la force ionique et du type de tampon. Cela peut également être influencé par la température, le substrat et les concentrations de coenzyme. Pour la plupart des enzymes, le pH est compris entre 5 et 7 des valeurs extrêmes de 1,5 et 10,5 ont été trouvées pour la pepsine et pour la phosphatase alcaline **(Figure I.7) [12]**

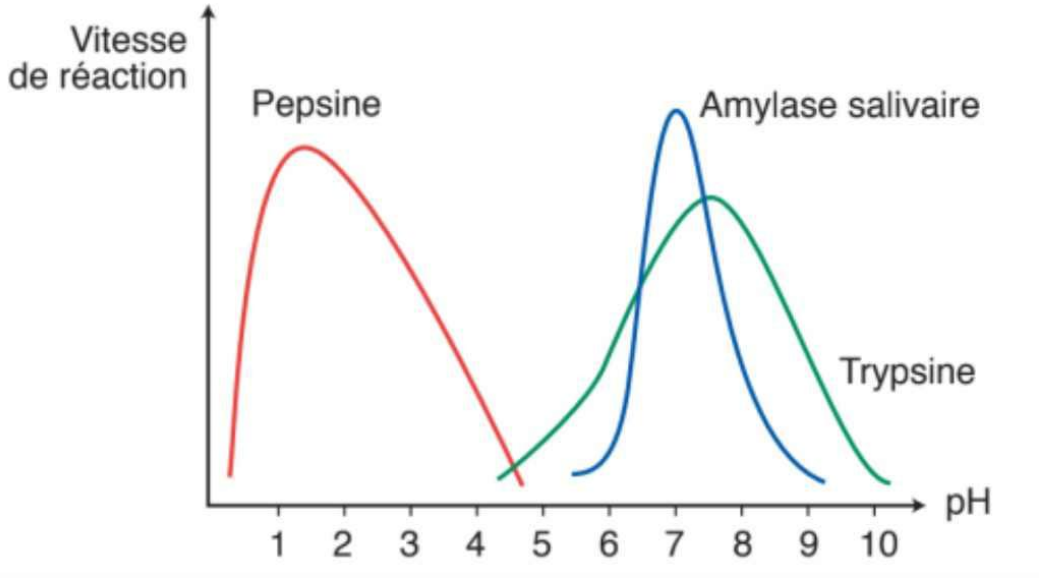


Figure I.7: L'activité catalytique en fonction de pH **[12]**

c) Effet de la concentration d'enzyme :

L'augmentation de la concentration d'enzyme accélérera la réaction, tant qu'il y a suffisamment de substrat disponible pour se lier. Une fois que tout le substrat est lié, la réaction ne s'accélèrera plus, car il n'y aura plus de substrat à lier aux enzymes supplémentaires **[13]**

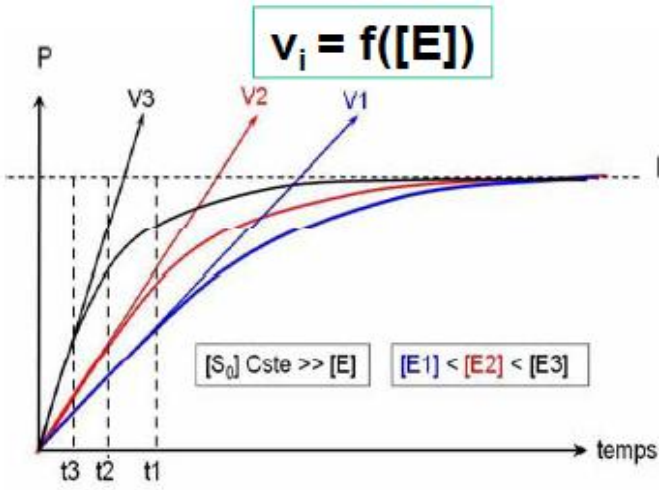


Figure I. 8: Effet de la concentration d'enzyme **[13]**

Effet de La concentration du substrat :

Augmenter la concentration du substrat augmente également l'activité de réaction jusqu'à un certain point. Une fois que toutes les enzymes se sont liées, toute augmentation de substrat n'aura aucun effet sur le taux de réaction, car les enzymes disponibles seront saturées et fonctionneront à leur taux maximal **[14]**

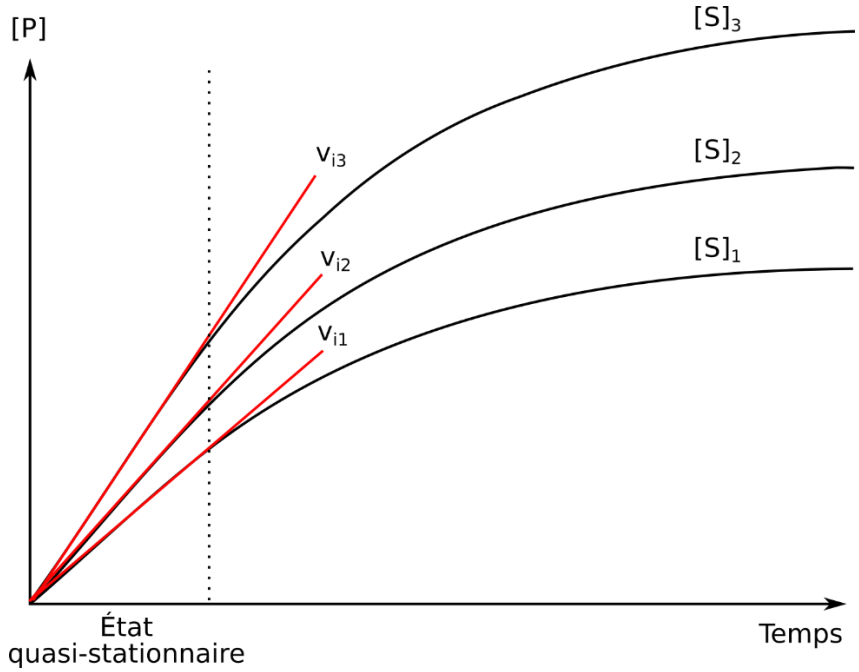


Figure I.9 : Effet de La concentration du substrat **[14]]**

Chapitre II : Immobilisation des enzymes

II Immobilisation des enzymes :

II.1 Définition de l'enzyme immobilisée

Une enzyme immobilisée est une enzyme fixée sur un support solide, comme une membrane, des billes de gel, ou un polymère, plutôt que d'être en solution. Cela permet de la réutiliser plusieurs fois, d'améliorer sa stabilité et sa résistance à des conditions extrêmes, et souvent, de faciliter sa séparation des produits de réaction. Les principaux composants d'un système enzymatique immobilisé sont [15]:

-L'enzyme.

-La matrice (le support).

-Le mode de fixation de l'enzyme à la matrice

II.2 Avantages de l'utilisation d'enzymes immobilisées :

L'utilisation d'enzymes immobilisées présente plusieurs avantages par rapport aux enzymes libres en solution :

1. **Stabilité accrue** : Les enzymes immobilisées sont souvent plus stables que leurs homologues en solution. L'immobilisation peut protéger les enzymes contre les conditions environnementales défavorables telles que les variations de pH, la température élevée ou les solvants organiques, ce qui prolonge leur durée de vie utile.

2. **Réutilisation** : Les enzymes immobilisées peuvent être récupérées et réutilisées plusieurs fois, ce qui réduit les coûts et la quantité d'enzyme nécessaire pour une réaction donnée. Cela permet également de simplifier les processus de purification et de récupération des produits, ce qui est souvent difficile avec les enzymes libres en solution.

3. **Facilité de séparation** : L'immobilisation des enzymes sur un support solide permet de les séparer facilement des produits de réaction, ce qui simplifie le processus de purification des produits. Parmi les méthodes de séparation se trouvent la filtration et la centrifugation..

4. **Contrôle amélioré des réactions** : En immobilisant les enzymes sur un support solide, il est possible de contrôler plus précisément leur environnement

microenvironnement, ce qui peut influencer leur activité catalytique et améliorer la sélectivité des réactions.

5. **Compatibilité avec différents réacteurs** : Les enzymes immobilisées peuvent être utilisées dans une variété de réacteurs, y compris des réacteurs en continu, des réacteurs à lit fixe ou des colonnes chromatographiques, ce qui offre une grande flexibilité pour leur utilisation à grande échelle dans différents processus industriels.[15]

II.3Les différentes méthodes d'immobilisation :

L'immobilisation des enzymes permet de stabiliser celles-ci au cours de leur utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique. Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien chimiques que physiques. On peut notamment citer les méthodes, couramment utilisées, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients.[16]

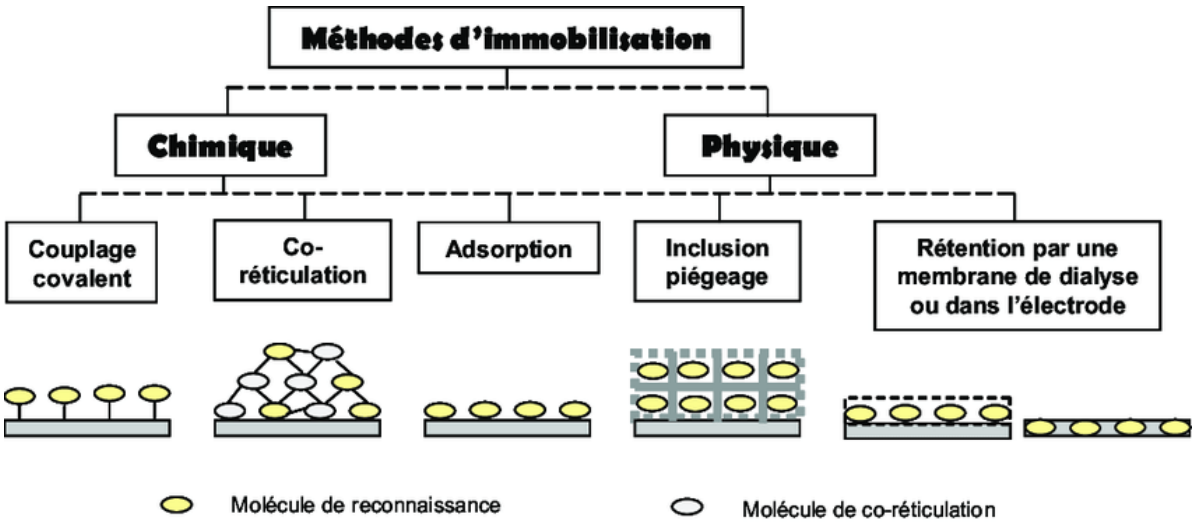


Figure II.1 : Méthodes d'immobilisation d'une enzyme [16].

II.3.1. Méthodes d'immobilisation chimique :

a) Immobilisation d'enzyme par Le couplage covalent :

Le principe de cette méthode d'immobilisation est de faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme avec un groupement fonctionnel du réactif (figureII.2). En général, les groupements fonctionnels du réactif sont des fonctions carboxyliques, thiols,

hydroxyles ou encore amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme, n'intervenant pas dans la catalyse enzymatique, dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule.**[17]**

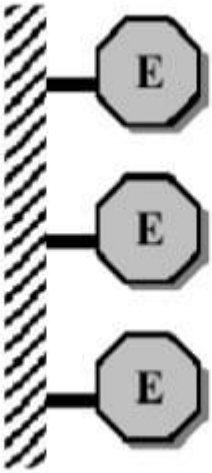


Figure II.2. Le couplage covalent des enzymes **[18].**

Cette méthode d'immobilisation présente principalement comme avantage de fixer l'enzyme de façon permanente et augmente la stabilité de celle-ci, lui conférant une durée de vie plus importante. Cependant, les réactifs indispensables au greffage risquent de dénaturer l'enzyme et donc de provoquer une perte d'activité. [18]

b) Immobilisation d'enzyme par L'adsorption

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface (**FigureII.3**). L'immobilisation est alors due à des interactions faibles de type Van der Waals, liaisons hydrogène, transfert de charges (liaisons ioniques), échanges d'ions ou encore à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles). **[17]**

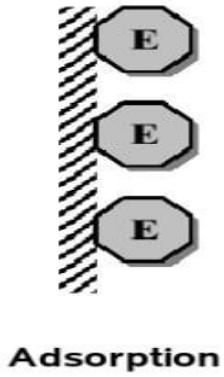


Figure II.3 : Immobilisation par Adsorption physique **[18]**

Cette technique d'immobilisation présente plusieurs avantages. C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données. De plus elle est facilement réversible, économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme. Cependant, elle présente un inconvénient majeur puisque, du fait des interactions faibles liant l'enzyme au support, ces systèmes sont peu stables, l'enzyme se désorbant au cours du temps. De plus, il peut être nécessaire de procéder à des modifications de la surface du support afin de permettre l'adsorption du bio récepteur[18]

c) Immobilisation d'enzyme par La réticulation

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulant qui vont permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques. Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation, on parle alors de Co-réticulation (figureII.4) [17].

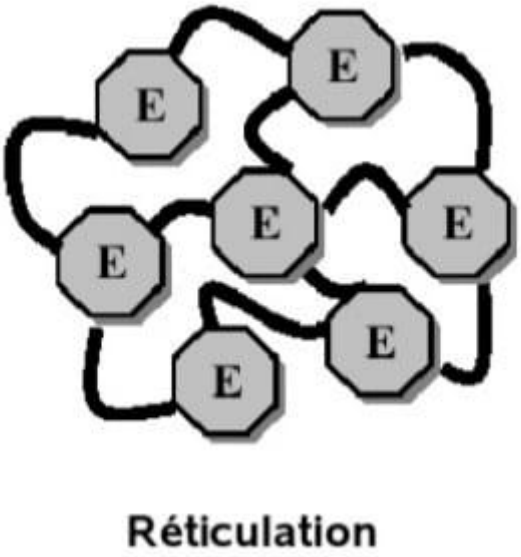


Figure II.4 : Immobilisation par réticulation **[18]**

Les enzymes, après avoir été adsorbées sur un support, sont mises en contact avec un agent réticulant afin de donner un réseau enzymatique tridimensionnel et qui contrairement à l'enzyme seule est insoluble. Cette méthode d'immobilisation présente l'avantage d'être assez simple à mettre en œuvre et de plus de par les liaisons chimiques, elle offre une bonne stabilité au système. Cependant, une perte d'activité enzymatique peut être observée. En effet outre l'utilisation de réactifs potentiellement non biocompatibles et pouvant altérer l'activité de l'enzyme, les propriétés physiques du système sont modifiées, leur donnant des propriétés mécaniques médiocres. [18]

II.3.2 Méthodes d'immobilisation physique

a. Immobilisation d'enzyme par inclusion

Les molécules d'enzyme sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau « réseau tridimensionnel d'une matrice », ou emprisonnées dans des microcapsules délimitées par une membrane semi perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules du substrat ou des produits de la réaction) [17].

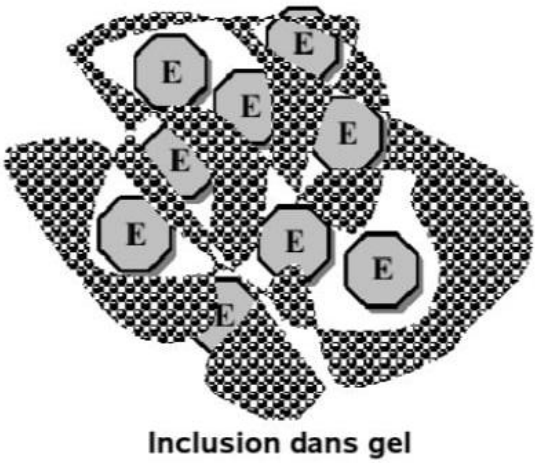


Figure II.5 : inclusion dans un gel [18]

b. Les supports utilisés : On utilise comme matrice pour l'inclusion plusieurs polymères :

Gel à partir des polymères naturels : l'alginate, carraghénane,

Les alginates$(C_6H_8O_6)_n$sont des polymères saccharidiques extraits principalement des algues brunes [19]. Les principales alguesexploitées relèvent des espècessuivantes : Laminariale, Ascophylle, Fucus.

Les alginates existent sous forme de sels decalcium insolubles dans l'algue. Après un prétraitement acide qui sert à déplacer le calcium, le polymère est extrait par une solution alcaline. La soude conduit au sel de sodium de l'alginate qui est très soluble dans l'eau. La structure suivante(**Figure II.6**) montre l'échange des ions.



Figure II.6 : l'échange des ions [20]

Gels à partir des polymères synthétiques : le gel de polyacrylamide, fibres de poly acétate de cellulose.

II.4 Domaines d'applications des enzymes immobilisées :

Grâce à leur grande spécificité d'action (bio spécificité), les enzymes immobilisées constituent un outil de fabrication et d'analyse important dans de nombreux secteurs médical la recherche et contrôle et de la production industrielle de métabolites.[17]

Analytique : En médecine, des papiers imprégnés des solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du cholestérol, de l'acide urique, des hormones…). - Les techniques ELISA utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux - mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques

Thérapeutique : Le traitement de certains troubles pathologiques (dus à une déficience enzymatique) par l'administration d'enzymes se heurte à des difficultés : Destruction par les protéases ou hydrolyse par les macrophages. Dans ce cas l'enzyme est associée à une molécule protectrice (albumine, dextrine, polyéthylène glycol), ou alors incluse dans des microcapsules.

Agro-alimentaire : - Amélioration des propriétés de boissons alimentaires : viscosité,

- Amélioration de la production des produits lactés

Chapitre III :

Peroxydase

I. Peroxydase

Avant même que la notion d'enzyme eut été formulée. Tel faisant de la prose sans le savoir. Planche constatait en 1810 que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder en présence d'eau oxygénée.

III.1. Définition peroxydase

La peroxydase est une enzyme présente dans de nombreux organismes, y compris les plantes et les animaux. Elle joue un rôle crucial dans la détoxification des cellules en catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. De plus, la peroxydase est impliquée dans divers processus biologiques, tels que la défense immunitaire des plantes contre les pathogènes. En biologie moléculaire, la peroxydase est souvent utilisée comme marqueur dans les réactions d'immunoprécipitation et d'immunohistochimie. Elle est également employée dans des tests biochimiques pour détecter la présence de peroxyde d'hydrogène [21]

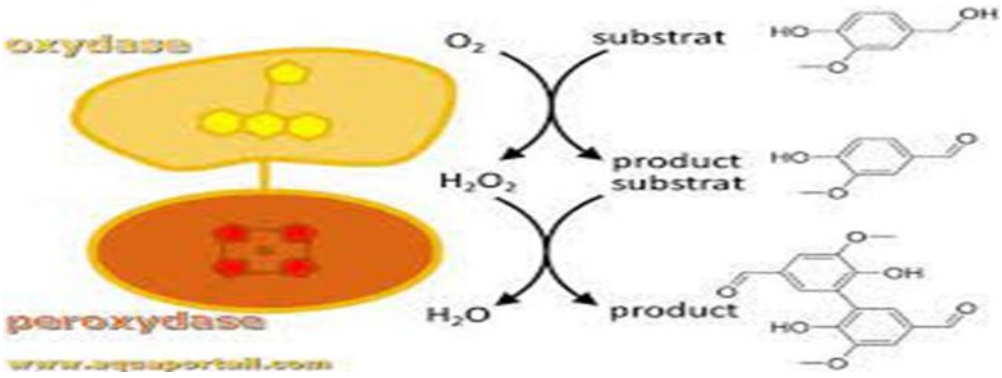


Figure III.1 : Structure chimique de la peroxydase [21]

III.2. Rôle peroxydase

Le rôle de la peroxydase est multifonctionnel et crucial dans divers processus biologiques. Voici quelques-uns de ses rôles principaux [22] :

a. **Détoxification** : La peroxydase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une molécule potentiellement toxique, en eau (H_2O) et oxygène (O_2). Cette réaction de détoxification est essentielle pour protéger les cellules contre les dommages oxydatifs.

b. **Réactions redox** : La peroxydase est une enzyme redox, facilitant les réactions d'oxydation et de réduction en transférant des électrons entre différents substrats. Elle participe ainsi à la régulation des équilibres redox cellulaires.

c. **Marqueur en biotechnologie** : En laboratoire, la peroxydase est utilisée comme marqueur dans diverses techniques d'analyse, telles que l'immunoprécipitation et 'immunohistochimie. Elle facilite la détection de protéines spécifiques dans des échantillons biologiques.

En résumé, la peroxydase joue un rôle clé dans la protection cellulaire, la réponse immunitaire, la régulation redox et d'autres processus biologiques, faisant d'elle une enzyme essentielle dans la physiologie des cellules végétales et animales.

III.3. Structure de peroxydase

Les peroxydases sont des hémoglyco-protéines. Elles sont caractérisées par la Présence d'un hème central de type-b, pris en sandwich entre le domaine distal (Extrémité N- terminal) et le domaine proximal (Extrémité C-terminal) de la protéine. De ce fait, l'hème constitue le groupement prosthétique de l'enzyme et la chaîne Polypeptidique est l'apoenzyme (Fe^{3+}) [Henriksen ; 1998]. Il y a trois genres d'hème Biologiquement importants (a, b et c) mais le plus commun dans les peroxydases est L'hème b. La liaison entre la protéine et l'hème n'est pas covalente et l'état d'oxydation du fer III (Fe^{3+}) [Dunford, 1999]. Les peroxydases ont aussi deux sites de liaison pour les ions Ca^{2+}. Le calcium est supposé stabiliser la protéine et n'intervient pas au niveau du site catalytique, même si sa présence influence fortement l'activité de l'enzyme.[21]

III.3.1. Composition et structure moléculaire

III.3.1.1. Composants moléculaires :

- **Groupements prosthétiques** : Certains types de peroxydases contiennent un groupement prosthétique appelé hème, qui joue un rôle clé dans leur activité catalytique.[23]

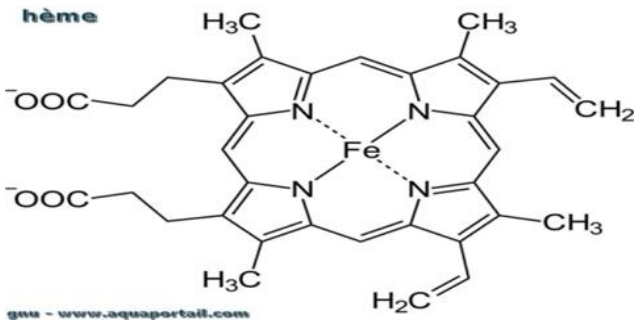


Figure III.2 : structure chimique Groupements prosthétiques [23].

- **Groupements polypeptidiques** : La structure moléculaire de la peroxydase est principalement composée de chaînes polypeptidiques. Ces chaînes sont formées d'une séquence spécifique d'acides aminés.

III.3.1.2. Structure moléculaire :

- **Structure tertiaire** : La peroxydase adopte une structure tertiaire tridimensionnelle spécifique. Cette structure est cruciale pour son activité enzymatique et peut varier entre différentes isoformes de peroxydases.

- **Sites actifs** : La structure moléculaire de la peroxydase comporte des sites actifs où se déroulent les réactions enzymatiques. Ces sites sont spécifiques aux substrats, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2 O_2).

- **Sites de liaison pour les substrats** : Certains types de peroxydases ont des sites de liaison spécifiques pour les substrats, ce qui confère une sélectivité dans les réactions catalysées.

- **Catalyseur** : La partie chemique de la peroxydase agit comme un catalyseur lors des réactions d'oxydation et de réduction, facilitant la décomposition du peroxyde d'hydrogène.

- **Ponts disulfures** : Des ponts disulfure peuvent exister dans la structure, renforçant la stabilité de la peroxydase.

Il est important de noter que la structure exacte de la peroxydase peut varier entre différentes espèces biologiques et même entre différentes isoformes de la même enzyme. Des techniques telles que la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie peuvent être

utilisées pour déterminer la structure moléculaire spécifique d'une peroxydase particulière. Si vous aviez en tête un autre terme avec "peroxydase" ou si vous faisiez référence à quelque chose de différent, veuillez le préciser pour des informations plus précises. [21]

III.4. Les différents isoformes de peroxydase et leur structure

Les peroxydases sont une famille d'enzymes qui comprend différentes isoformes présentant des variations structurales. Les isoformes de peroxydase peuvent différer dans leur séquence d'acides aminés, leur structure tridimensionnelle, leur spécificité de substrat et leurs propriétés cinétiques. Voici quelques exemples d'isoformes courantes de peroxydase et certaines de leurs différences structurales :

- **Peroxydase de raifort (HRP - Horseradish Peroxydase)** :
  - ❖ Origine : Extraite du raifort.
  - ❖ Structure : HRP a une structure en forme de globule avec une poche active contenant le site hémique. Sa structure tridimensionnelle a été bien caractérisée par des études de cristallographie aux rayons X.
  - ❖ Utilisation : Souvent utilisée comme sonde enzymatique dans des applications de biologie moléculaire et dans des tests immuno-enzymatiques. [24]

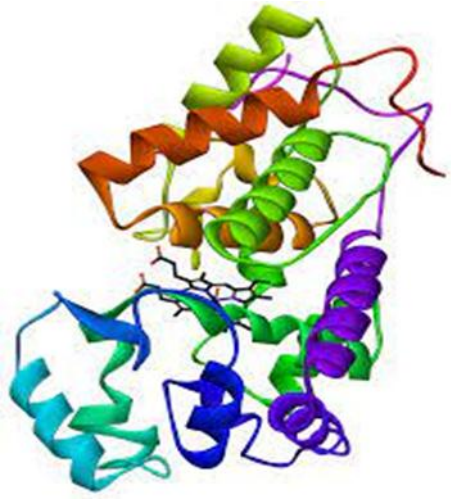


Figure III.3: peroxydase raifort [24]

- **Peroxydase de glutathion (GPx - Glutathionne Peroxydase)** :
  - ❖ Origine : Présente dans divers tissus biologiques, y compris les cellules sanguines.
  - ❖ Structure : GPx a une structure globulaire avec un site actif contenant un sélénium, qui est essentiel pour son activité catalytique.

❖ Fonction : Impliquée dans la protection cellulaire contre les dommages causés par les radicaux libres. [25]

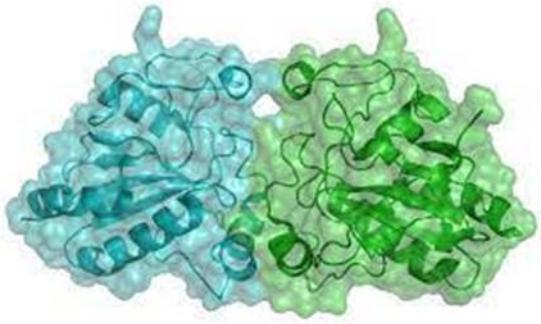


Figure III.4 : Peroxydase glutathion

- **Peroxydase liée à la lignine (Lip : Lignine Peroxydase)**. [25]

❖ Origine : Principalement produite par certains champignons lignolytiques.

❖ Structure : Lip a une structure tridimensionnelle unique avec des sites actifs spécifiques pour la dégradation de la lignine.

❖ Fonction : Joue un rôle crucial dans la décomposition de la lignine dans le processus de décomposition du bois par les champignons. [26]

- **Peroxydase thyroïdienne (TPO - Thyroïde Peroxydase)** :

❖ Origine : Présente dans la glande thyroïde.

❖ Structure : TPO a une structure comprenant des domaines transmembranaires et extracellulaires. La partie extracellulaire contient le site actif pour la peroxydation.

❖ Fonction : Joue un rôle clé dans la synthèse des hormones thyroïdiennes. [27]

- **Peroxydase fongique (POD - Fingal Peroxydase)** :

❖ Origine : Produite par certains champignons.

❖ Structure : Les isoformes de peroxydase fongique ont des structures tridimensionnelles différentes adaptées à leur rôle dans la dégradation de composés organiques complexes.

❖ Fonction : Impliquée dans la décomposition de la matière organique par les champignons. [28]

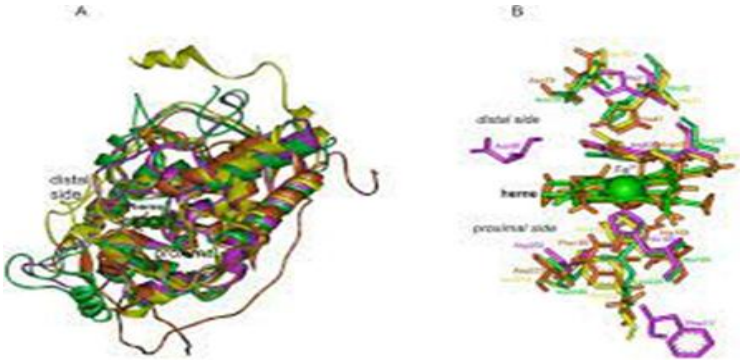


Figure III.5 : Structure fongique de la peroxydase [28]

Ces exemples illustrent la diversité des isoformes de peroxydase avec des rôles spécifiques dans différents organismes et environnements. Les différences structurales entre ces isoformes sont souvent liées à leurs fonctions biologiques spécifiques. Les techniques avancées de biologie structurale, telles que la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN), sont utilisées pour caractériser plus précisément ces différences structurales.

III.5. Classification

01/les classes de peroxydase et leurs spécificités

Il existe plusieurs classes de peroxydases, chacune ayant des spécificités et des fonctions distinctes. Voici quelques-unes des principales classes de peroxydases [29,30] :

- **Peroxydases de type I** : Ces peroxydases utilisent le fer comme cofacteur et sont souvent impliquées dans des réactions de peroxydation impliquant le peroxyde d'hydrogène. Elles peuvent être présentes dans divers organismes, y compris les plantes
- **Peroxydases de type II** : Ces peroxydases utilisent le manganèse comme cofacteur. Elles sont fréquemment trouvées chez les champignons et les bactéries. Elles participent souvent à des processus de détoxification et de défense.
- **Peroxydases de type III** : Aussi connues sous le nom de peroxydases de type lignine ou Ferri peroxydases, elles sont impliquées dans la dégradation de la lignine, un composant complexe de la paroi cellulaire des plantes.

Elles utilisent le fer comme cofacteur et sont importantes dans le cycle du carbone.

- **Peroxydases de type IV** : Ces peroxydases, également appelées cytochrome c peroxydases, contiennent un groupe hème et utilisent le cytochrome c comme donneur d'électrons. Elles sont souvent impliquées dans des réactions de peroxydation liées au métabolisme cellulaire.
- **Autres peroxydases** : En plus de ces classes principales, il existe d'autres peroxydases ayant des spécificités particulières en fonction de leur origine et de leur rôle biologique. Par exemple, la myélopéroxydase, présente dans les neutrophiles, joue un rôle dans le système immunitaire en produisant des composés antibactériens.

Chaque classe de peroxydases a évolué pour répondre aux besoins spécifiques des organismes qui les produisent, ce qui se traduit par des fonctions diverses allant de la défense immunitaire à la dégradation de composés organiques complexes [31].

02/ Ou se trouve enzyme peroxydase ?

La peroxydase se trouve dans divers organismes, y compris les plantes, les animaux et les micro-organismes. Voici quelques endroits spécifiques où l'on peut trouver la peroxydase :

- **Cellules végétales** : La peroxydase végétale est une enzyme largement répandue dans le règne végétal, présente dans divers organes et tissus, tels que les feuilles, les racines, les fruits et les graines. Elle catalyse la décomposition de l'eau oxygénée en eau et en oxygène en utilisant des cofacteurs. En résumé, la peroxydase végétale est une enzyme multifonctionnelle cruciale, et dans une autre part peroxydase peuvent être présentes dans certains aliments d'origine végétale. Cependant, le niveau peut varier en fonction du type d'aliment.

- **Cellules animales** : Les cellules animales peuvent également contenir des peroxydases. Elles participent à la protection cellulaire en détoxifiant le peroxyde d'hydrogène et en contribuant à des processus redox.

- **Sang** : Dans les animaux, y compris les humains, la peroxydase est présente dans certaines cellules sanguines, comme les neutrophiles. Elle participe à la réponse immunitaire en détruisant les agents pathogènes.

- **Tissus divers** : La peroxydase peut être présente dans divers tissus et organes, contribuant à des fonctions spécifiques telles que la protection contre le stress oxydatif.

- **Micro-organismes** : Certaines bactéries et champignons produisent également des peroxydases. Ces enzymes peuvent être impliquées dans des processus métaboliques spécifiques ou dans la réponse aux conditions environnementales.

Il est important de noter que la peroxydase peut être présente à des concentrations différentes selon le type d'organisme, le tissu ou l'organe considéré. Les propriétés spécifiques de la peroxydase varient également en fonction de son origine [32].

III.6. Mécanisme d'action

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

$$\text{Peroxydase} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Composé I} + H_2O$$

$$\text{Composé I} + RH_2 \longrightarrow \text{Composé II} + RH$$

$$\text{Composé II} + AH_2 \longrightarrow \text{Peroxydase} + AH + H_2O$$

Le cycle catalytique des peroxydases commence par une oxydation de l'enzyme et une réduction et le peroxyde d'hydrogène pour produire le composé I, (le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferry (FeIV = O)). D'une part le composé I oxyde le substrat (RH) pour donner le radical correspondant, et d'autre part, il se réduit pour produire le composé II. Les composés I et II réagissent simultanément avec une deuxième molécule (RH). Comme dernière étape le composé II est réduite de nouveau à l'état ferrique, correspondant à la forme native de l'enzyme, En résumé, le cycle catalytique est montré sur la figure II.7

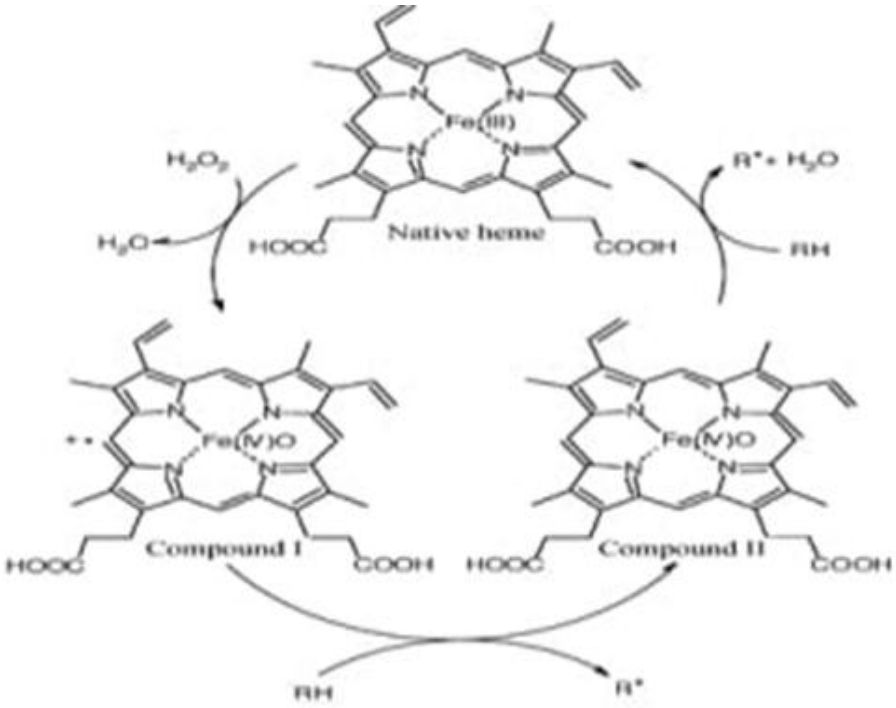


Figure III.6 : Cycle catalytique de peroxydase [32]

01/ Réactions catalysées :

La peroxydase est une enzyme impliquée dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène ($H_2 O_2$), un composé potentiellement toxique pour les cellules. Le mécanisme enzymatique de la peroxydase peut être expliqué en plusieurs étapes :

- **Formation du complexe enzyme-substrat** : La peroxydase forme un complexe avec le peroxyde d'hydrogène. Ce processus implique généralement des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène entre l'enzyme et le substrat.

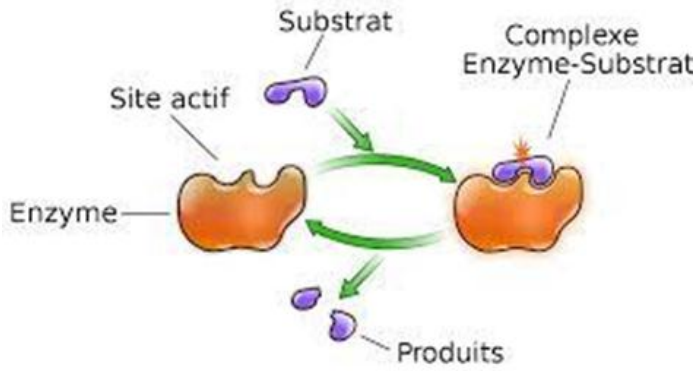


Figure III.7 : schéma explicatif sur formation du complexe enzyme-substrat [32]

- **Formation d'un complexe ternaire** : La peroxydase peut également former un complexe ternaire avec un cofacteur tel que le fer ou le manganèse, qui est essentiel pour son activité catalytique.

- **Activation du peroxyde d'hydrogène** : Le complexe enzyme-substrat facilite la dissociation du peroxyde d'hydrogène en ions hydroxyle (OH^-) et radical hydroxyle (•OH). Cette réaction est favorisée par la présence du cofacteur.

- **Réaction en chaîne** : Le radical hydroxyle formé peut ensuite réagir avec une molécule voisine de peroxyde d'hydrogène, induisant une réaction en chaîne de décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau (H_2O) et dioxygène (O_2).

Le rôle de la peroxydase dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène est crucial pour plusieurs organismes, car cela contribue à maintenir l'équilibre redox et à prévenir les dommages cellulaires liés à l'accumulation du peroxyde d'hydrogène [33].

02/ Les substrats lesquels peroxydase agit

La peroxydase agit principalement sur des substrats variés, catalysant des réactions de peroxydation qui impliquent généralement le transfert d'oxygène. Voici quelques-uns des substrats sur lesquels la peroxydase peut agir :

- **Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)** : La réaction la plus connue implique la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène, jouant un rôle clé dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène.

- **Phénols** : Certains types de peroxydases peuvent oxyder des composés phénoliques, produisant des radicaux phénoliques. Cette activité est importante dans la détoxification de composés phénoliques et dans la formation de mélanine.

- **Substances organiques** : La peroxydase peut oxyder diverses substances organiques, y compris les amines aromatiques, les thiols et d'autres composés organiques réduits, participant ainsi à des réactions de peroxydation impliquant l'oxydation de groupes fonctionnels.

- **Acide ascorbique** : Certains types de peroxydases peuvent oxyder l'acide ascorbique (vitamine C), ce qui peut influencer le métabolisme de cette vitamine.

- **Composés halogénés** : Certaines peroxydases, en particulier celles produites par des champignons, peuvent catalyser la peroxydation des ions halogénures (Cl^-, Br^-, I^-), formant des radicaux halogénures.

La diversité des substrats que la peroxydase peut transformer témoigne de son rôle crucial dans plusieurs voies métaboliques, y compris la détoxification, la défense immunitaire et la signalisation cellulaire. [34]

III.7. Activité enzymatique

01/Méthodes utilises pour mesurer activité de peroxydase

Plusieurs méthodes sont couramment utilisées pour mesurer l'activité de la peroxydase. Ces méthodes sont basées sur la détection des produits de réaction générés par l'activité catalytique de l'enzyme. Voici quelques-unes des méthodes les plus fréquemment employées :

- **Dosage spectrophotométrique** : Cette méthode mesure le changement d'absorbance à une longueur d'onde spécifique résultant de la formation des produits de réaction colorés. Une réaction courante utilise le substrat chromogène gaïacol, qui forme un produit oxydé coloré en présence de la peroxydase. Leurs avantages sont analyse quantitative (analyse quantitative précise), large gamme de concentration (échantillon diluée ou concentré), sensibilité et précision

- **Dosage colorimétrique avec le peroxyde d'hydrogène** : La peroxydase utilise le peroxyde d'hydrogène comme substrat, générant de l'eau et de l'oxygène. Des systèmes de détection colorimétrique sont utilisés pour mesurer la formation de colorants liés à la production d'oxygène. Leurs avantages sont la sensibilité (détecte quantités minimes de substrats), spécificités (résultats précis) et économique (peu couteux)

Ces méthodes offrent des moyens sensibles et spécifiques pour évaluer l'activité de la peroxydase dans divers contextes.[35]

02/ Paramètres qui peut affecter son activité

L'activité de la peroxydase peut être influencée par divers paramètres, et la compréhension de ces facteurs est cruciale pour interpréter les résultats expérimentaux. Voici quelques-uns des paramètres clés qui peuvent affecter l'activité de la peroxydase :

- **pH** : La peroxydase a une plage de pH optimale dans laquelle son activité est maximale. Des variations significatives du pH peuvent affecter la charge des résidus d'acides aminés de l'enzyme, altérant ainsi son activité catalytique.

- **Température** : La température influence l'activité enzymatique. La plupart des peroxydases sont actives à des températures modérées, mais des températures extrêmes peuvent dénaturer l'enzyme et réduire son activité.

- **Concentration en substrat** : La disponibilité en substrat, comme le peroxyde d'hydrogène, peut influencer l'activité de la peroxydase. Cependant, à des concentrations élevées de substrat, la vitesse de réaction peut atteindre un plateau.

- **Cofacteurs** : Certains types de peroxydases nécessitent des cofacteurs spécifiques, tels que le fer ou le manganèse. La présence ou l'absence de ces cofacteurs peut fortement affecter l'activité enzymatique.

- **Inhibiteurs** : Certains composés peuvent agir comme inhibiteurs de la peroxydase. Par exemple, des ions cyanurent ou des composés phénoliques peuvent interférer avec son activité.

- **Stabilisateurs** : Des agents stabilisants peuvent être utilisés pour maintenir l'intégrité de l'enzyme pendant le stockage ou dans des conditions expérimentales difficiles.

La compréhension de ces paramètres permet de contrôler les conditions expérimentales pour obtenir des mesures fiables de l'activité de la peroxydase. Des ajustements appropriés de ces facteurs peuvent également être nécessaires pour adapter l'étude aux conditions spécifiques de l'organisme, du tissu ou de l'environnement étudié. [36].

III.8. Application de peroxydase

La peroxydase trouve diverses applications en biotechnologie et dans l'industrie en raison de sa capacité à catalyser des réactions de peroxydation. Voici quelques-unes de ses utilisations notables :

1) Importance de la peroxydase en chimie pharmaceutique :

- Tests diagnostiques : La peroxydase est souvent utilisée comme marqueur dans les tests diagnostiques en chimie clinique. Elle permet de détecter la présence d'antigènes ou d'anticorps dans des échantillons biologiques.

- Immun essais : exploitent la capacité de la peroxydase à catalyser des réactions colorimétriques. Cela permet de quantifier des substances spécifiques.

- Tests de contaminants : Dans la production pharmaceutique, la peroxydase est utilisée pour détecter la présence de contaminants, contribuant ainsi à garantir la qualité des produits pharmaceutiques.

- Traitement des eaux : La peroxydase peut être utilisée dans le traitement des eaux usées pharmaceutiques, contribuant ainsi à réduire l'impact environnemental des résidus pharmaceutiques dans l'eau.

En résumé, la peroxydase joue un rôle clé en chimie pharmaceutique, aussi bien dans les applications diagnostiques que dans la recherche et le développement de médicaments. Son utilisation en tant qu'enzyme biocatalytique offre des perspectives intéressantes pour l'industrie pharmaceutique [37].

2) Le domaine de la chimie :

- Chimie analytique : La peroxydase est utilisée comme outil enzymatique dans des méthodes analytiques pour détecter la présence de certaines substances. Par exemple, elle est utilisée dans des dosages colorimétriques ou fluor métriques.

- Biocatalyse : La peroxydase est employée en biocatalyse pour des réactions d'oxydation ou de réduction spécifiques, offrant des avantages en termes de sélectivité et d'efficacité.

- Développement de médicaments : En chimie pharmaceutique, la peroxydase peut être utilisée dans des étapes clés de la synthèse de médicaments ou dans des réactions enzymatiques pour produire des composés thérapeutiques.

- Détoxification chimique : Elle peut être impliquée dans des processus de détoxification chimique, en catalysant la transformation de composés indésirables ou toxiques.

- Études cinétiques : En chimie cinétique, la peroxydase est souvent utilisée comme modèle pour étudier les réactions enzymatiques et comprendre les mécanismes réactionnels.

- Études structurales : La peroxydase est également utilisée dans des études structurales pour comprendre la configuration tridimensionnelle de l'enzyme, ce qui peut être important pour la conception de catalyseurs.

Ces applications illustrent la polyvalence de la peroxydase en tant qu'outil dans le domaine de la chimie, offrant des possibilités dans divers contextes, de la synthèse organique aux applications analytiques.[38]

3) Utilisations industrielles :

- Traitement des eaux usées : Les peroxydases peuvent être utilisées dans le traitement des eaux usées industrielles pour dégrader les composés organiques nocifs avant leur rejet dans l'environnement.

- Fabrication de produits alimentaires : La peroxydase est utilisée dans l'industrie alimentaire pour la conservation des aliments en inhibant l'activité des microorganismes et en prolongeant la durée de vie des produits.

- Production de médicaments : La peroxydase est impliquée dans la production de médicaments et de produits pharmaceutiques, notamment dans la synthèse de certains composés médicamenteux [39].

Chapitre IV

Les effluents pharmaceutiques

IV. les effluents pharmaceutiques [40] :

Les effluents pharmaceutiques se réfèrent aux résidus de médicaments et de substances pharmaceutiques présents dans les eaux usées provenant des installations de production pharmaceutique, des hôpitaux et de l'utilisation quotidienne de médicaments par les individus. Ils posent des défis environnementaux car ces composés peuvent contaminer les ressources en eau.

L'importance de gérer les effluents pharmaceutiques réside dans les risques potentiels pour la santé humaine et l'écosystème aquatique. Ces résidus peuvent avoir des effets néfastes sur la faune et la flore aquatiques, et il existe des préoccupations croissantes quant à leur impact sur le développement de résistances antimicrobiennes.

La surveillance et le traitement approprié des effluents pharmaceutiques sont essentiels pour minimiser leur impact sur l'environnement et protéger la santé publique. Des réglementations et des pratiques de gestion durable sont mises en place pour aborder cette problématique complexe.

IV.1. Caractéristiques des effluents pharmaceutiques :

Les caractéristiques des effluents pharmaceutiques varient en fonction des substances utilisées dans la fabrication des médicaments, des processus de production et des pratiques d'utilisation. Cependant, certaines caractéristiques communes incluent :

- Présence de médicaments actifs : Les effluents pharmaceutiques peuvent contenir des résidus de médicaments actifs non utilisés ou rejetés pendant le processus de fabrication ou après leur utilisation médicale.

- Métabolites et produits de dégradation : Les produits de dégradation des médicaments, formés pendant leur métabolisme dans le corps humain ou lors des processus de traitement, peuvent être présents.

- Excipients et substances auxiliaires : Les excipients, qui sont des substances ajoutées aux médicaments pour diverses raisons (stabilisation, coloration, etc.), peuvent être présents dans les effluents.

- Variabilité selon les médicaments : Les caractéristiques dépendent du type de médicaments produits ou utilisés. Par exemple, les effluents d'une usine produisant des antibiotiques peuvent différer de ceux d'une usine produisant des analgésiques.

- Éléments trace métalliques : Certains médicaments contiennent des éléments métalliques comme des catalyseurs, et ces traces peuvent se retrouver dans les effluents.

- Impact sur les résistances antimicrobiennes : La présence d'antibiotiques dans les effluents pharmaceutiques suscite des inquiétudes quant à leur contribution au développement de résistances antimicrobiennes.

La surveillance et le traitement des effluents pharmaceutiques sont cruciaux pour minimiser leur impact environnemental et sanitaire. Des normes réglementaires sont souvent établies pour encadrer la gestion appropriée de ces effluents. [40]

IV.2. Origines et sources :

Les effluents pharmaceutiques proviennent de différentes sources, reflétant les diverses étapes de production, d'utilisation et d'élimination des médicaments. Voici les principales origines et sources des effluents pharmaceutiques :

- Installations pharmaceutiques : Les usines de production pharmaceutique génèrent des effluents lors des processus de fabrication, de formulation et de conditionnement des médicaments. Cela peut inclure des rejets de résidus chimiques, des solvants et d'autres produits utilisés dans la production.

- Hôpitaux et établissements de santé : Les effluents pharmaceutiques peuvent provenir des hôpitaux, des cliniques et d'autres établissements de santé. Cela inclut les déchets médicaux, les médicaments non utilisés et les résidus de traitements médicaux.

- Usage domestique : L'utilisation quotidienne de médicaments par les individus contribue également aux effluents pharmaceutiques. L'élimination inappropriée de médicaments, telle que la toilette, peut entraîner leur présence dans les eaux usées.

- Agriculture : Certains médicaments vétérinaires utilisés dans l'agriculture peuvent contaminer les effluents, en particulier dans les zones où l'élevage intensif est pratiqué.

- Réseaux d'assainissement : Les effluents pharmaceutiques provenant des sources susmentionnées peuvent également atteindre les réseaux d'assainissement et, par conséquent, les stations d'épuration des eaux usées [40].

IV.3. Les risques environnementaux :

Les effluents pharmaceutiques présentent plusieurs risques environnementaux importants, principalement en raison de la présence de substances actives, de produits de dégradation et d'autres composants chimiques. Voici quelques-uns des risques associés à ces effluents :

- Contamination de l'eau : Les effluents pharmaceutiques, s'ils ne sont pas correctement traités, peuvent contaminer les sources d'eau, y compris les rivières, les lacs et les nappes phréatiques.

- Développement de résistances antimicrobiennes : La présence d'antibiotiques dans les effluents pharmaceutiques peut contribuer au développement de résistances antimicrobiennes chez les micro-organismes présents dans l'environnement.

- Impact sur les organismes terrestres : perturbant l'équilibre écologique.

- Altération des processus biologiques : Certains composés présents dans les effluents peuvent interférer avec les processus biologiques normaux chez les plantes, les animaux et les micro-organismes, compromettant ainsi la biodiversité. [41]

IV.4. Risques sur la santé humaine

Les effluents pharmaceutiques présentent des risques potentiels pour la santé humaine, principalement liés à l'exposition à des résidus de médicaments et à d'autres composants chimiques. Voici quelques-uns des risques associés aux effluents pharmaceutiques sur la santé humaine :

- Développement de résistances : ce qui peut rendre les traitements antibiotiques moins efficaces chez les individus.
- Effets allergiques et sensibilisation : peuvent causer des réactions allergiques ou des sensibilisations chez les individus exposés.
- Effets cancérogènes : Certains médicaments ou leurs produits de dégradation peuvent présenter des risques cancérigènes.
- Impacts sur la santé mentale.

Il est important de souligner que le niveau de risque dépend de la concentration des substances, de la durée d'exposition et de la sensibilité individuelle [41].

IV.5 : Initiatives pour réduire l'impact :

Les entreprises pharmaceutiques et les autorités environnementales mettent en œuvre diverses initiatives visant à réduire l'impact des effluents pharmaceutiques sur l'environnement. Voici quelques-unes de ces initiatives :

1. **Optimisation des processus de production** : Les entreprises pharmaceutiques travaillent à améliorer l'efficacité des processus de production pour réduire la quantité de déchets générés, y compris les effluents pharmaceutiques.

2. Utilisation de technologies propres : L'adoption de technologies propres et de méthodes de production plus durables contribue à minimiser la génération d'effluents et à réduire l'empreinte environnementale.

3. Évaluation des risques environnementaux : Les entreprises effectuent des évaluations des risques environnementaux pour identifier les substances potentiellement problématiques et mettre en place des mesures pour les réduire.

4. Collaboration avec les autorités réglementaires : Les entreprises collaborent avec les autorités réglementaires pour s'assurer de la conformité aux normes environnementales et pour identifier les meilleures pratiques [42].

IV.6. Bonnes pratiques pharmaceutiques

Les Bonnes Pratiques Pharmaceutiques (BPF) pour la gestion des effluents pharmaceutiques sont essentiels pour minimiser l'impact environnemental de l'industrie pharmaceutique. Voici quelques pratiques importantes dans ce contexte [43]:

1. Caractérisation des effluents : Effectuer une caractérisation détaillée des effluents pharmaceutiques pour comprendre la nature des contaminants présents.
2. Traitement des effluents : Utiliser des technologies de traitement des effluents pharmaceutiques efficaces pour éliminer ou réduire les niveaux de contaminants à des niveaux conformes aux normes réglementaires.
3. Suivi des normes réglementaires : S'assurer que les pratiques de gestion des effluents pharmaceutiques sont en conformité avec les normes réglementaires nationales et internationales.
4. Technologies propres : Explorer et mettre en œuvre des technologies propres pour réduire l'empreinte environnementale des procédés de fabrication et de traitement des effluents.

IV.7. Règlementations et normes

Les réglementations et normes concernant les effluents pharmaceutiques peuvent varier d'un pays à l'autre. Voici quelques exemples de réglementations et d'organismes qui peuvent jouer un rôle dans la gestion des effluents pharmaceutiques [44] :

- Union Européenne (UE) : La Directive-cadre sur l'eau (DCE) de l'UE établit un cadre pour la gestion de l'eau, y compris des objectifs de qualité pour les eaux de surface et souterraines.

- Organisation mondiale de la santé (OMS) : L'OMS fournit des directives sur la qualité de l'eau potable et peut influencer les normes nationales.

- Pharmacopées (ex. USP, Pharmacopée européenne) : Les pharmacopées définissent des normes de qualité pour les médicaments, mais peuvent également inclure des directives pour la gestion des effluents pharmaceutiques.

- Normes ISO (ex. ISO 14001) : La norme ISO 14001 concerne les systèmes de gestion environnementale et peut être utilisée par les entreprises pharmaceutiques pour établir des pratiques responsables en matière de gestion des effluents.

Ces mesures visent à minimiser l'impact environnemental des effluents pharmaceutiques

IV.8 : Recherche et développement des technologies plus propres pour les effluents pharmaceutiques :

La recherche et le développement de technologies plus propres pour le traitement des effluents pharmaceutiques sont cruciaux pour minimiser l'impact environnemental de l'industrie pharmaceutique. Voici quelques axes de développement et d'innovation dans ce domaine [44] :

a) Traitement avancé par oxydation : Exploration de techniques avancées d'oxydation chimique, telles que l'utilisation de l'ozone, du peroxyde d'hydrogène ou d'autres oxydants, pour décomposer efficacement les composés pharmaceutiques dans les effluents

b) Biotechnologies avancées : Utilisation de biotechnologies émergentes, telles que la bio remédiation améliorée par des micro-organismes génétiquement modifiés, pour dégrader spécifiquement les composés pharmaceutiques dans les effluents.

c) Technologies de réduction des substances chimiques : Développement de technologies de réduction des substances chimiques, telles que l'utilisation de catalyseurs spécifiques, pour convertir les composés pharmaceutiques en substances moins toxiques.

IV.9 : Méthodes de traitement :

Plusieurs méthodes de traitement des effluents pharmaceutiques existent pour minimiser leur impact sur l'environnement. Voici quelques-unes des méthodes couramment utilisées [42,43] :

a. Précipitation-chimique :

- Description : Utilisation de réactifs chimiques pour induire la formation de précipités insolubles, permettant la séparation des contaminants.
- Objectif : Élimination des ions métalliques et de certains composés pharmaceutiques par précipitation.
- Avantages : Séparation efficace, élimination les impuretés, rapidité

b. Oxydation chimique :

- Description : Utilisation d'oxydants chimiques tels que l'ozone ou le peroxyde d'hydrogène pour décomposer les composés organiques.
- Objectif : Dégradation des substances pharmaceutiques en produits moins toxiques.
- L'efficacité du traitement dépend de la nature des contaminants présents et des conditions spécifiques de chaque installation**.**
- Avantages : dégradation des contaminants, synthétiser de nouveaux compose.

IV.10. Technologies biologiques

1. **Lits bactériens** :

- Description : Les bactéries fixées sur un support (gravier, plastique, etc.) décomposent les composés organiques présents dans les effluents.
- Objectif : Traitement biologique pour éliminer les contaminants organiques.

2. Réacteurs à biomasse immobilisée :

- Description : Les micro-organismes sont fixés sur des supports et peuvent être mis en contact avec les effluents pour traiter les contaminants.
- Objectif : Amélioration de la biomasse pour une dégradation plus efficace.

IV.11. Méthodes enzymatiques

1. **Dégradation enzymatique** : Les enzymes peuvent décomposer les composés pharmaceutiques présents dans les effluents en produits plus simples et moins nocifs.
2. **Détoxification enzymatique** : Certains enzymes peuvent neutraliser les effets toxiques des composés pharmaceutiques en les transformant en substances non toxiques.

3. **Bio remédiation enzymatique** : Les enzymes peuvent être utilisées pour stimuler la croissance de microorganismes capables de dégrader les composés pharmaceutiques dans les effluents.

IV.12. La peroxydase

La peroxydase est une enzyme qui catalyse l'oxydation de divers substrats en utilisant du peroxyde d'hydrogène comme donneur d'électrons. Peut utiliser la peroxydase pour traiter les effluents pharmaceutiques [42] :

1. **Dégradation des composés pharmaceutiques** : La peroxydase peut être utilisée pour catalyser la dégradation des composés pharmaceutiques présents dans les effluents en produits moins toxiques. Par exemple, elle peut oxyder les groupes fonctionnels des médicaments pour les rendre moins actifs ou les décomposer en fragments plus simples.
2. **Traitement des eaux usées** : La peroxydase peut être intégrée dans des systèmes de traitement des eaux usées pour éliminer les résidus pharmaceutiques avant le rejet dans l'environnement, contribuant ainsi à réduire la pollution.

Chapitre V
Matériel et méthodes

Introduction

Le but de cette partie expérimentale est d'étudier le comportement des billes sphériques préparées à base d'alginates de calcium pour l'encapsulation d'une biomolécule enzymatique extraite à partir du navet dans la dégradation d'une solution synthétique de paracétamol. La peroxydase utilisée est extraite d'une source végétale, le navet, et purifiée avec un solvant organique, l'acétone.

La peroxydase obtenue sera fixé par inclusion dans un gel naturel, un biopolymère qui s'appelle alginate de sodium. Le taux de dégradation des solutions de paracétamol par la peroxydase immobilisée repose sur l'efficacité et la facilité d'utilisation de l'enzyme.

V. Matériel et méthodes

Tableau V.1 : produits utilisés dans chaque expérience

Expérience	**Produits**
1) Extraction	-Navet -Eau distillé
2) Purification	-Acétone -Enzyme brut
3) Dosage des protéines	-Albumine - Réactif Bradford -Na OH 1M
4) Réactif Bradford	-Bleu de Coomassie -Ethanol -Acide phosphorique
5) Tampon 6	-Hydrogénophtalatede potassium 0.1mol/l -Na OH 0.1M
6) Immobilisation	-Alginate sodium -Chlorure de calcium
7) Effet de pH	-[H_2O_2]0.1M .solution tampon à différentspH -la masse des billes d'enzyme constante - la solution du [PRCTM]constante

8) Effet de la température	- $[H_2O_2]$0.1M - solution tampon pH optimale -la masse des billes d'enzyme constante -la solution du [PRCTM] constante
9) Effet de la concentration du H_2O_2	- [H2O2] - Solution tampon pH optimale -la masse des billes d'enzyme constante -la solution [PRCTM] constante
10) Effet de la concentration du paracétamol	-$[H_2O_2]$optimale -Solution tampon pHoptimale -la masse des billes d'enzyme constante - la solution du [PRCTM] variable
11) Effet de la charge d'enzyme	- $[H_2O_2]$ optimale - Solution tampon pH optimale - la masse des billes d'alginate variable - la solution du [PRCTM] optimale

V.1.1 : Source d'enzyme peroxydase

Navet : Nous avons extrait la peroxydase d'une substance naturelle trouvée dans les fermes de la wilaya de Médéa.

V.1.2 : Solvant de purification :

Acétone

- ✓ Sa formule est : C_3H_6O
- ✓ La masse molaire : 58.078 g/mol
- ✓ La densité : 0.819

V.1.3 : Dosage des protéines :

a) Albumine : principale protéine de transport dans sang

- ✓ Sa formule : $C_6H_8N_2O_4$



Figure V.1 : Structure de l'albumine

b) Hydroxyde de sodium :

✓ Sa formule : Na OH

✓ La masse molaire : 39.997 g/mol

c) Bleu Coomassie :

✓ Sa formule : $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$

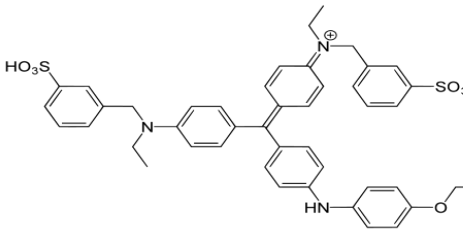


Figure V.2 : Structure chimique de bleu de Coomassie

d) Ethanol :

✓ Sa formule : C_2H_6O

✓ La masse molaire : 46.068 g/mol

e) Acide phosphorique

✓ Sa formule : H_3PO_4

✓ La masse molaire :97.994g/mol

f) Hydrogénophtalate de potassium :

✓ Sa formule : $C_8H_5KO_4$

✓ La masse molaire : 204.22 g/mol

V.1.4. Substrats de l'enzyme

a) **Eau oxygénée :** est un composé chimique inorganique

- ✓ Sa formule : H_2O_2
- ✓ Lamasse molaire : 34.0147 g/mol
- ✓ Aspect : liquide, claire, incolore
- ✓ Densité : 1.45g/cm^3
- ✓ Structure : liaison simple H-O-O-H

b) **Paracétamol :** est un médicament utilisé comme analgésique et antipyrétique

- ✓ Sa formule : $C_8H_9NO_2$
- ✓ Nomenclature IUPAC : N-(4-hydroxyphényl) éthionamide
- ✓ Masse molaire : 151.16g/mol
- ✓ Aspect : solide cristallin blanc

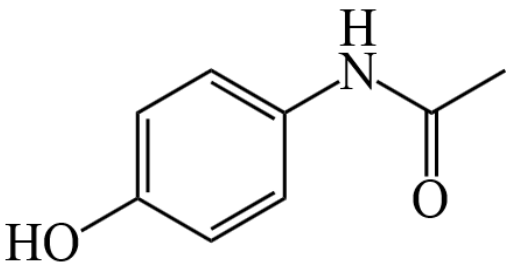


Figure V.3 : Structure chimique du paracétamol

V.1.5. Produits utilisés dans l'immobilisation :

a) **Support D'immobilisation : Alginate sodium :**

- ✓ Sa formule : $C_6H_7NaO_6$
- ✓ La masse molaire : 198.1 g/mol

b) **Agent De Gélification : Chlorure de calcium :**

- ✓ Sa formule : $CaCl_2$
- ✓ La masse molaire :110.98 g/mol

V.1.6. Solutions tampons :

- Solution tampon pH 2.0
- Solution tampon pH 4.0
- Solution tampon pH 6.0
- Solution tampon pH 8.0
- Solution tampon pH 10.0

V.2. : Matériels utilisés :

V.2.1: Equipement :

- Balance
- Mixeur
- Support de titrage
- Centrifugeuse
- Agitateur
- pH mètre
- Chronomètre
- Micromètre
- Spectrophotomètre
- Pro-pipette

V.2.2 : Verrerie

- Cristallisoir
- Becher (50,100, 200,250,1000) ml
- Eprouvette graduée 50 ml
- Erlenmeyer (50,200,250) ml
- Burette (25,50) ml
- Fioles jaugées
- Tubes à essai
- Verre de montre

V. 2.3 : Matériel

- Papier filtre
- Entonnoir
- Boite pétrie
- Spatule

V.3. Méthodes expérimentales :

V.3.1. Extraction de la peroxydase

La peroxydase est une enzyme présente dans divers endroits de la nature, notamment dans les micro-organismes, les plantes et les animaux. Dans notre étude, nous mettrons en évidence sur la peroxydase alimentaire, notamment la peroxydase extraite du navet**.**

Le protocole d'extraction : Comme suit :

- Nous prendrons 100 grammes de navet, coupés en petits morceaux.
- puis, nous avons mesuré 200 ml d'eau distillée.
- Ensuite, nous allons mélanger les deux derniers dans un cristallisoir, à l'aide d'un mixeur nous allons mixer le tout jusqu'au nous obtient un mélange bien homogénéisé.
- Après que nous obtenons un mélange homogène, on va passer à la filtration, on utilise le papier filtre et entonnoir ; on verse notre solution sur le papier la solution qu'on obtient est considérée comme une solution de peroxydase brute.

V.3.2. Purification de la peroxydase

1. La purification de peroxydase par **précipitation en utilisant un solvant organique « acétone »** 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. Après que la solution d'acétone sera versé totalement goutte à goutte, on met notre dernière solution obtenue dans des tubes spéciaux pour la centrifugeuse et on l'a démarré pendant 10 min à 3000 tours/min. Lorsque la durée termine on conserve notre tube dans un réfrigérateur a une Température de 4°C.

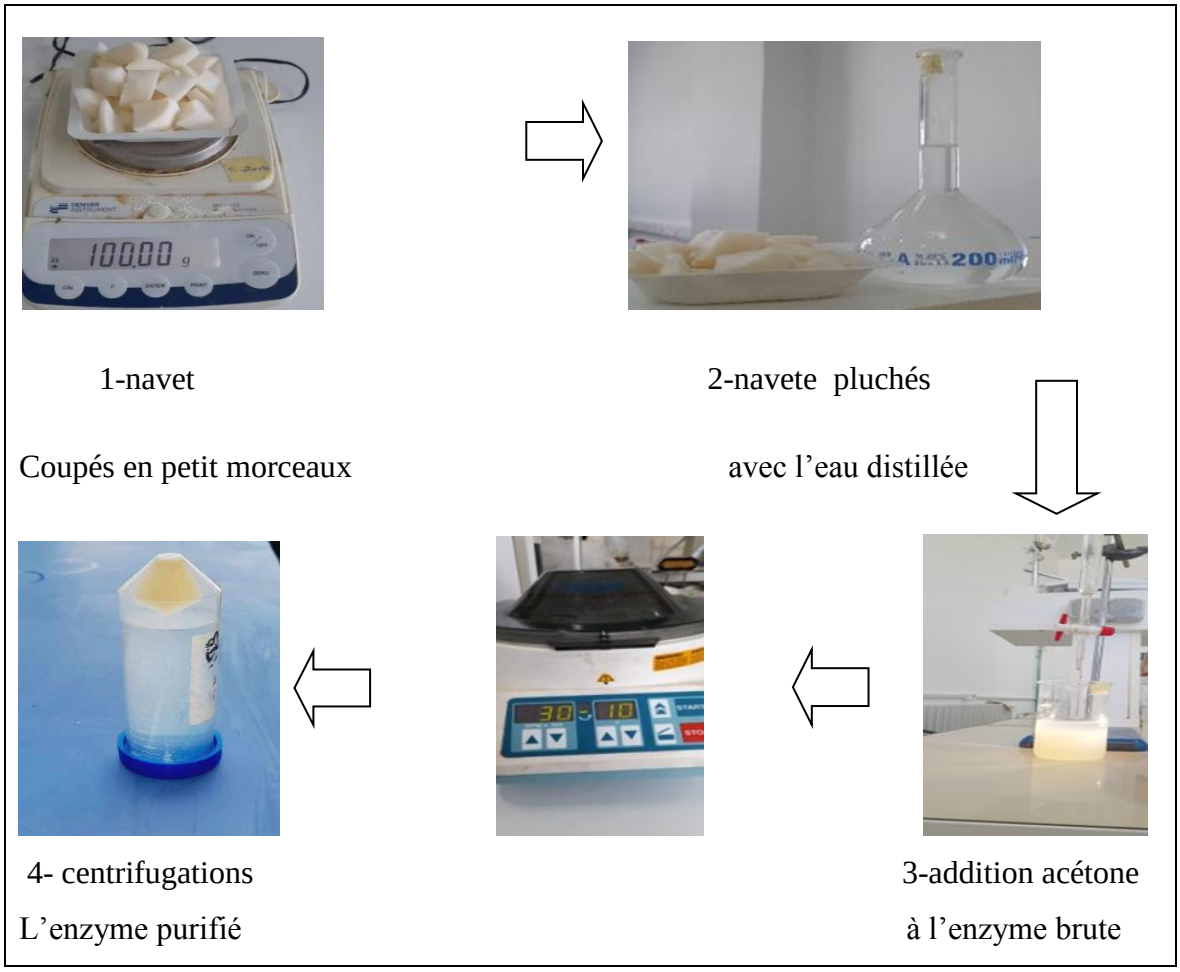


Figure V.4 : Protocole d'extraction et de purification de peroxydase

V.3.3 Principe activité enzymatique avant et après purification

La peroxydase consomme deux molécules d'hydrogène pour oxyder une molécule de phénol en présence de Gaïacol qui joue le rôle d'une substance donneur d'hydrogène. Le produit obtenu est un chromogène de Quinoneimine qui possède une couleur rose absorbe la lumière visible à une longueur d'onde maximal de 517 nm.

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

- 1ml H_2O_2 à 0.1M
- 1 mL de phénol à 0.1M.
- 1 mL de 4-amino-antipyrine à 0.01M.
- Compléter avec solution tampon 6 jusqu'à 50 ml
- La réaction est déclenchée en ajoutant 0.2 ml d'extrait enzymatique à 4 ml de mélange préparé précédemment, et on suit rapidement le développement de la couleur sous une longueur d'onde de 517 nm

V.3.4. Dosage des protéines

Les protéines solubles totales ont été déterminées sur la base de la méthode de Bradford (1976) [45]. La fraction de sérumalbumine bovine (BSA) a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration. 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 avant et après la purification afin de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme.

1. **Préparation de la solution mère de (Albumine) :** Dissoudre 10mg de Sérum bovine albumine dans 100ml de l'eau distillé.
2. **Préparation de réactif Bradford :** Prend 100mg de bleu Coomassie on le mélangé avec 50ml éthanol et 100 ml acide phosphorique, après que le bleu Coomassie se dissoudre complètement on ajoute jusqu'à 1000 ml d'eau distillée puis laisser le mélange sur une agitation pendant 24 h quand la durée se termine on filtre la solution et la conserver dans le réfrigérateur.
3. **Méthode Bradford :** On a besoin de 7 tubes à essai :

- Dans tous ces tubes on met 0.25 ml Na OH de 1M avec 5 ml réactif Bradford
- Dans les 5 premiers tubes on met 0.1 ml albumine de différentes concentrations de 2 à 10 mg/l
- Dans le 6 $^{-ème}$ tube on met 0.1 ml de la peroxydase brute
- Dans le 7 $^{-ème}$ tube on met 0.1 ml de la peroxydase purifié
- Puis on agite tous les tubes ; et on laisse se reposer 10 min
- Ensuite on mesure l'absorbance à 595 nm

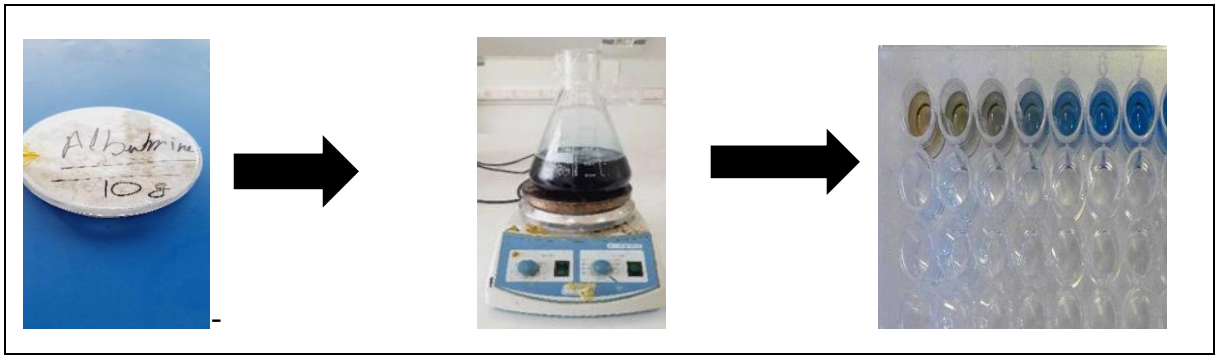


Figure V.5 : Expérience de dosage des protéines par la méthode de Bradford

V.3.5. Immobilisation de peroxydase la dans l'alginate de sodium

Immobilisation des enzymes offre plusieurs avantages techniques qui sont exploités dans divers industriels et de recherche. Elle permet une stabilité améliorée, facilité de récupération et

peuvent être réutilisées d'une manière répétée sans perte significative d'activité enzymatique. A prendre en considération le choix de support alginate est l'un des biopolymères le plus utilise pour immobilisation. La procédure d'inclusion a été réalisée par le protocole suivant :

- Dans un bécher, mélangé 0.15 g d'alginate avec 10 ml d'enzyme purifié
- Laisser la solution précédente sous une agitation jusqu'au l'obtention d'un mélange visqueux homogène
- Laisser la solution se repose pendant 20 min pour éviter la formation des bulles d'air
- Pour préparer les billes de peroxydase immobilisée, on verse le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue dans la solution $CaCl_2$ (0.05M).
- Laisser les billes sous agitation dans le $CaCl_2$ pendant 1 heure
- Rincer les billes avec l'eau distillée et les conserver dans le réfrigérateur à 4°C.

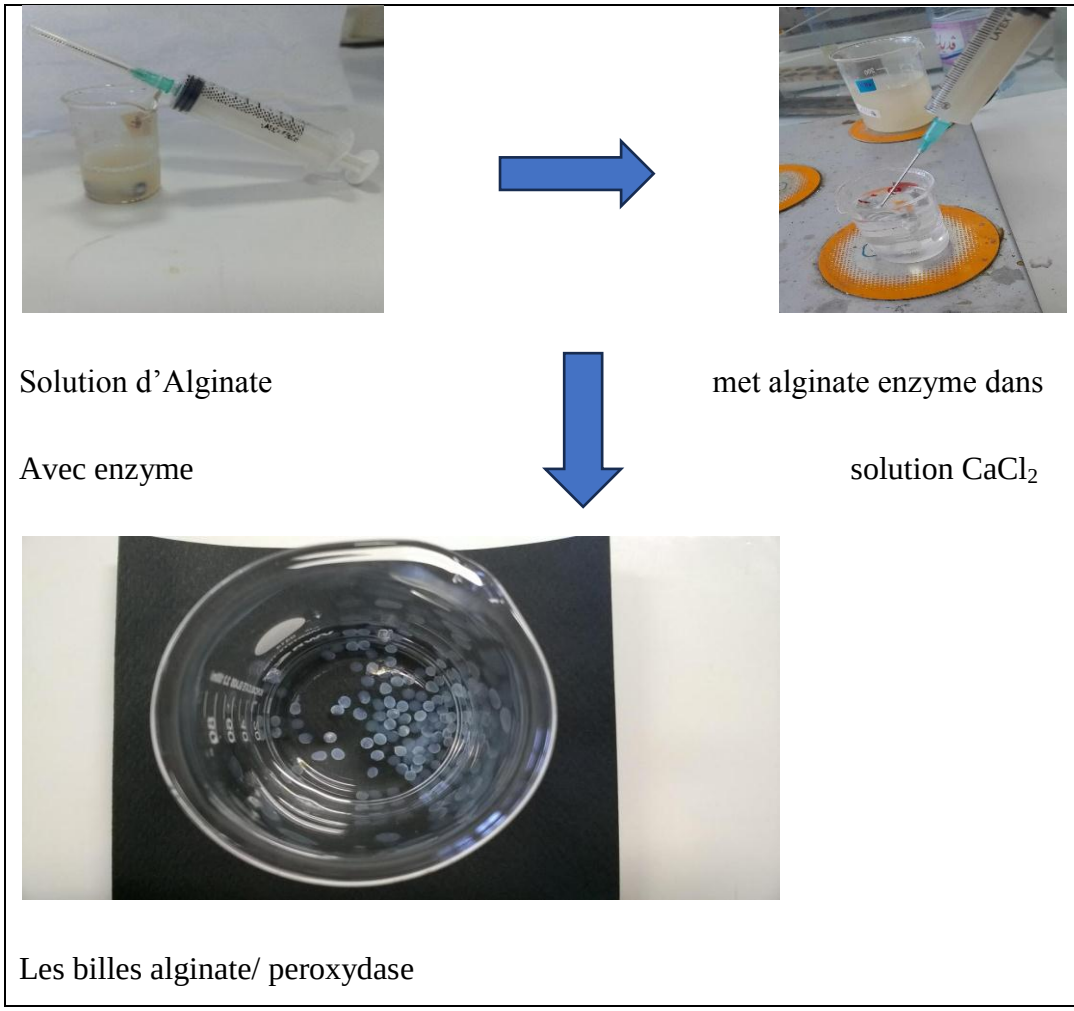


Figure V. 6 : Immobilisation de peroxydase dans l'alginate de sodium

V.3.6. Caractérisation physico-chimique des billes d'alginate/peroxydase

Après l'immobilisation on procède à la caractérisation des billes d'alginate pour déterminer la masse et le diamètre moyen des particules en utilisant un micromètre.

V.3.6. Dégradation du paracétamol par la peroxydase immobilisée

a. **Préparation de la solution mère du paracétamol :** La solution est préparée à partir d'un sachet de paracétamol (commercial) de masse de 500mg dans un litre d'eau distillée ou dans le tampon approprié.

- Des solutions à des concentrations 25, 50, 75 et 100 mg/L sont obtenues par dilutions de la solution mère
- Détermination de la longueur d'onde à absorption maximale de la solution de paracétamol
- En faisant un balayage dans la zone UV (190-350nm), sur un échantillon de solution ayant une concentration déterminée mis dans une cuve de quartz.

b. **Courbe d'étalonnage** : La courbe d'étalonnage de la densité optique (DO) en fonction de la concentration en paracétamol, a été réalisée en variant la concentration du paracétamol de 25mg/L jusqu'à 100mg/L et pour chacune des solutions on mesure l'absorbance initiale à λ_{max}.

c. **Essais de dégradation enzymatique du paracétamol :** L'essai a été réalisé en introduisant dans quatre tubes à essais :
   - Différents volumes de la solution mère de paracétamol (0.5, 1, 1.5, 2) ml pour obtenir la concentration souhaitée (25, 50, 75, 100) mg/l dans un volume 10 ml de mélange ajusté avec
   - 1ml de solution tampon de pH =7
   - 1ml H_2O_2 (1mM).
   - La réaction est initiée en ajoutant 1 ml de solution enzymatique diluée.
   - Après 1 heure de contact, la concentration résiduelle en paracétamol est estimée à partir de la courbe d'étalonnage, en mesurant la DO à $\lambda_{max.}$

V.3.7. Effet des paramètres opératoires sur la biodégradation du paracétamol par la peroxydase immobilisée

L'immobilisation permet d'améliorer la résistance de l'enzyme aux conditions qui lui sont normalement néfastes. Nous avons donc testé les effets de pH, de la température, la concentration des deux substrats H_2O_2 et la paracétamol et la charge en enzyme, sur la biodégradation du paracétamol.

V.3.6.1. Effet de pH :

Les expériences ont été réalisé pour un mélange réactionnel en utilisant des solutions tampons pH variant de 2 à 10 à une température ambiante d'une durée de 1 h puis mesurer la dégradation du paracétamol par la peroxydase du navet selon procédure suivant :

- Prendre 5 tubes à essai, dans chacun introduire 7 ml des solutions tampons diffèrent varient de 2 à 10.
- 1ml H_2O_2 à concentration 0.1 M
- 1ml paracétamol de solution mère 0.5g/L
- mesurer la densité optique initiale pour chaque mélange à $ʎ_{max}$=288 nm.
- Injecter 0.293 g des billes d'alginate /peroxydase.
- à une température ambiante Après 1 h de réaction centrifuger les contenus des tubes pendant 10 min à3000tr/min
- Mesurer les DO finales de chaque solution à ʎ=288 nm.

V.3.6.2 Effet de la température :

Effet de température sur la biodégradation de paracétamol est étudié avec l'enzyme immobilisée, en répètant le même protocole d'effet pH, on fixe la solution tampon de pH optimale obtenue lors de l'étude précédente et en varient la température entre 20 et 80 °C.

- Prendre 4 tubes introduire 8 ml $pH_{optimale}$
- 1 ml H_2O_2 concentration 0.1M
- 1 ml de la solution mère de paracétamol0.5g/L
- Mesurer la densité optique initiale pour chaque mélange à ʎ=288 nm
- Injecter 0.293 g des billes d'alginate /peroxydase
- en varient la température entre 20 et 80 °C
- Mettre chaque tube dans l'étuve à température appropriée
- Après 1 h de réaction, centrifuger les contenus des tubes pendant 10 min à 3000tr/min
- Mesurer la DO finales de chaque solution à ʎ=288 nm.

V.3.6.3. Effet de la concentration du H_2O_2

On répète le même protocole précédent que d'effet de la température, le mélange réactionnel contient les mêmes produits (paracétamol, enzyme immobilisé, solution tampon de pH $_{optimal}$, on met la solution préparée dans la température optimale).

Cette expérience consiste a étudié comment la concentration de H_2O_2 change la DO de dégradation de paracétamol. L'expérience est menée d'une concentration qui se varie de 0.1M jusqu'au 1.2 M.



Figure V. 7 : Les tubes à différentes concentrations de H_2O_2 dans une T° optimal

V.3.6.4. Effet de la concentration du paracétamol

La même expérience sera répétée dans les conditions optimales ça veut dire pH $_{optimal}$, $T°_{optimal}$, $[H_2O_2]_{optimal}$, le seul produit qui va changer est la concentration de la solution de paracétamol

V.3.6.5. Effet de la charge en enzyme

Effet de la charge en enzyme sur la biodégradation du paracétamol est étudié avec enzyme immobilisée, en répétant les mêmes procédures précédentes sauf qu'on prend les valeurs des conditions optimales (pH $_{optimal}$, $T°_{optimal}$, H_2O_2 $_{optimal,}$ $[PRCTM]_{opt}$ et La charge en l'enzyme se varient entre 0.293g au 2.051g de billes

V.3.6.6. Cinétique dans les conditions optimales

La cinétique d'enzyme immobilisée doit être faite dans les conditions optimales qu'on a trouvées de pH, T°, $[C_{H2O2}]$, [PRCTM], m_{billes} afin de déterminer la durée d'obtention du rendement optimal pour une dégradation maximale du paracétamol.

V.3.6.7. Réutilisation de l'enzyme immobilisée

Pour faire apparaitre l'intérêt d'enzyme immobilisée, une réutilisation de peroxydase la encapsulé dans les billes d'alginate est faite avec une masse optimale des billes d'enzymes inclues dans l'alginate de calcium pendant t_{opt} dans les conditions optimales déterminées précédemment

Conclusion

Dans cette étude, la peroxydase de navet a été extraite et purifiée avec de l'acétone, et l'enzyme purifiée a été immobilisée dans une solution d'alginate de calcium. Toutes ces étapes conduisent à la détérioration de la solution synthétique du paracétamol.

Notre but dans l'utilisation d'enzymes immobilisées pour la dégradation de la solution synthétique du paracétamol dans les conditions optimales étudiées est d'avoir un rendement optimal de décomposition de la substance médicamenteuse.

Chapitre VI :
Résultats et discussion

Introduction

Le but de cette partie de l'expérience est de dégrader la solution synthétique du paracétamol à l'aide de la peroxydase immobilisée dans l'alginate de calcium. Notre expérience inclut l'optimisation des meilleures conditions d'élimination du paracétamol. Des expériences ont été réalisées en utilisant une solution synthétique du paracétamol, en variant à chaque paramètre un facteur à la fois incluant les effets du pH, de la température, de la concentration des deux substrats (H_2O_2 et paracétamol) et de la charge en enzyme.

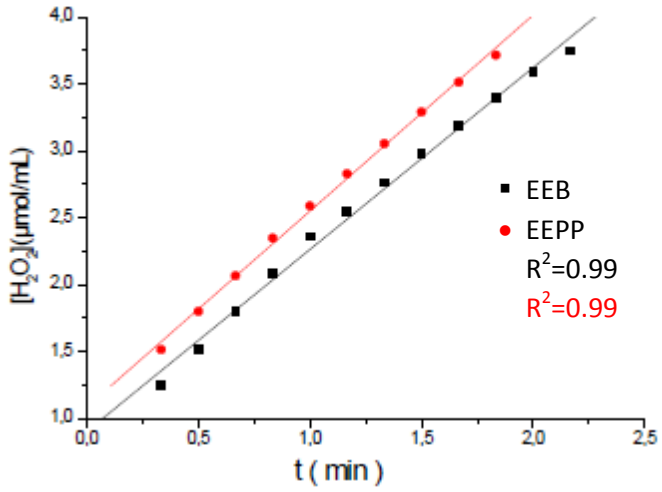
L'étude est terminée par la cinétique dans les conditions optimales ainsi par une expérience de réutilisation d'enzyme encapsulé dans les billes d'alginates. Tous ces efforts et toutes les expérimentations sont menés pour améliorer l'efficacité de la dégradation du paracétamol.

VI.1. Extraction et purification de la peroxydase

Pour utiliser l'extrait enzymatique obtenu dans notre étude, il est nécessaire de mesurer la quantité de protéines et de quantifier l'activité de l'enzyme peroxydase dans l'es deux extraits de navet (brut et purifié).

VI.1.1. Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits:

L'avancement de la réaction est déterminé en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 517 nm. Il présente une couleur rose due à la décomposition du H_2O_2 et du phénol pour former la quinoneimine. La valeur de vitesse initiale ainsi obtenue (ΔDO/min) est convertie en concentration du substrat H_2O_2 converti (EEB, EEPP) en utilisant le coefficient d'extinction molaire ε=6572 $M^{-1.}cm\ l^{-1}$. Le résultat en fonction du temps est présenté dans la figure suivante (Figure.VI.1) :



Figures VI.1 : Activité enzymatique pour les deux extraits : EEP et EEB

Les peroxydases sont des enzymes de type oxydoréductase qui catalysent la décomposition du peroxyde d'hydrogène en présence d'un substrat secondaire phénolique.

VI.1.2. Dosage de la quantité de protéines

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 595 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS. Le dosage des protéines est réalisé sur l'extrait brut, ainsi qu'après chaque étape de purification, dans le but de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme**.**

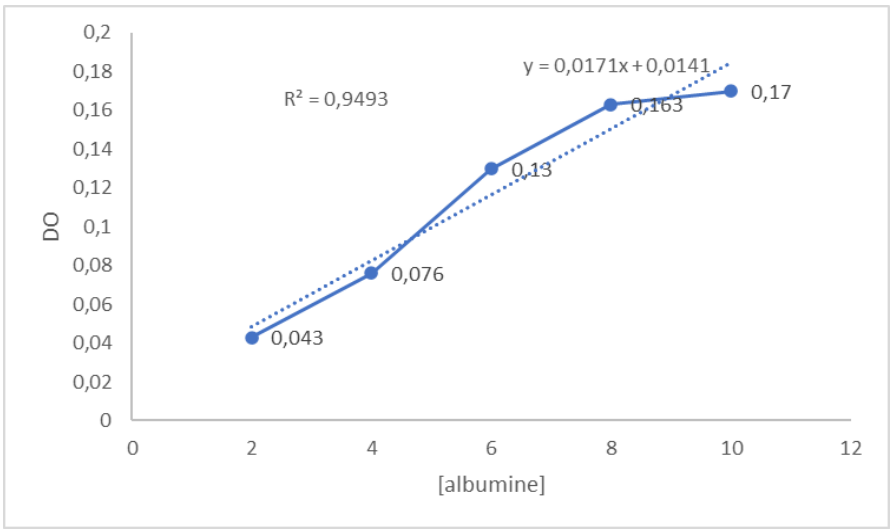


Figure VI.2 : Courbe d'étalonnage de L'albumine

L'albumine sérique bovine est utilisée pour tracer la courbe d'étalonnage DO=F(C). Une solution mère est préparée à 10 mg/100 ml. Albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée comme protéine de référence.

VI.1.3. Comparaison entre les deux extraits EEB, EEP:

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 VI.1 :

Tableau VI.1 : Caractérisation des deux extraits avant et après purification.

Extrait	**Protéine totale (g)**	**Activité totale (UI)**	**Activité spécifique (UI/g protéine)**	**Facteur de purification**	**Rendement de purification (%)**
EEB	10	7707.57	707.750	1	100
EEPP	0.25	2606	10424	15	33.81

Les résultats ont montré que l'activité catalytique totale de l'extrait enzymatique brut obtenu à partir de navet était de 7707.57 UI. Cependant, au cours de l'étape de purification de l'acétone, nous avons remarqué que l'activité tombait à 2606 UI, à la fois l'activité spécifique et le facteur de purification augmentaient. Par conséquent, la purification par

précipitation à l'acétone permet d'obtenir une protéine active plus pure avec une activité spécifique 15 fois supérieure à celle de l'extrait brut. En fait, chaque étape supplémentaire qui augmente la pureté et la stabilité de l'enzyme entraîne une perte de 34 % de l'activité peroxydase totale au fil du temps en raison de la dénaturation lors de l'isolement.

VI.2. Immobilisation de la peroxydase de navet.

L'immobilisation des biomolécules, notamment les enzymes, dans des matrices naturelles est une technique largement utilisée pour améliorer leur stabilité et leur réutilisabilité. Dans cette étude, nous avons exploré l'immobilisation de la peroxydase, une enzyme, dans un gel d'alginate de sodium, un polysaccharide naturel. L'alginate de sodium est choisi pour ses propriétés biocompatibles et sa capacité à former des gels en présence d'ions calcium, ce qui permet de créer une matrice tridimensionnelle stable pour l'enzyme.

Les billes d'alginate formées après l'immobilisation de la peroxydase sont de nature sphérique. Elles présentent un diamètre moyen de 2.88 mm et une masse volumique de 0.02g/cm³. La caractérisation de ces billes a été effectuée à l'aide de diverses techniques analytiques, confirmant leur structure sphérique uniforme et leur densité adéquate pour des applications biotechnologiques. Ces propriétés physiques sont cruciales pour garantir une distribution homogène de l'enzyme immobilisée et pour faciliter leur manipulation et utilisation dans des procédés industriels



Figure VI.3 : Billes d'enzymes immobilisées

VI.3. Effet des paramètres opératoires sur la biodégradation de la solution synthétique du paracétamol par la peroxydase immobilisée

L'immobilisation permet d'améliorer la résistance de l'enzyme aux conditions qui lui sont normalement néfastes. Nous avons donc testé les effets de pH, de la température, la concentration de H_2O_2, la charge de substrat médicamenteuse et de l'enzyme, ainsi la cinétique de la réaction sur le rendement d'élimination de la substance pharmaceutique.

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 :

$$R(\%) = \frac{DOi - DOf}{DOi} * 100 \textbf{(5)}$$

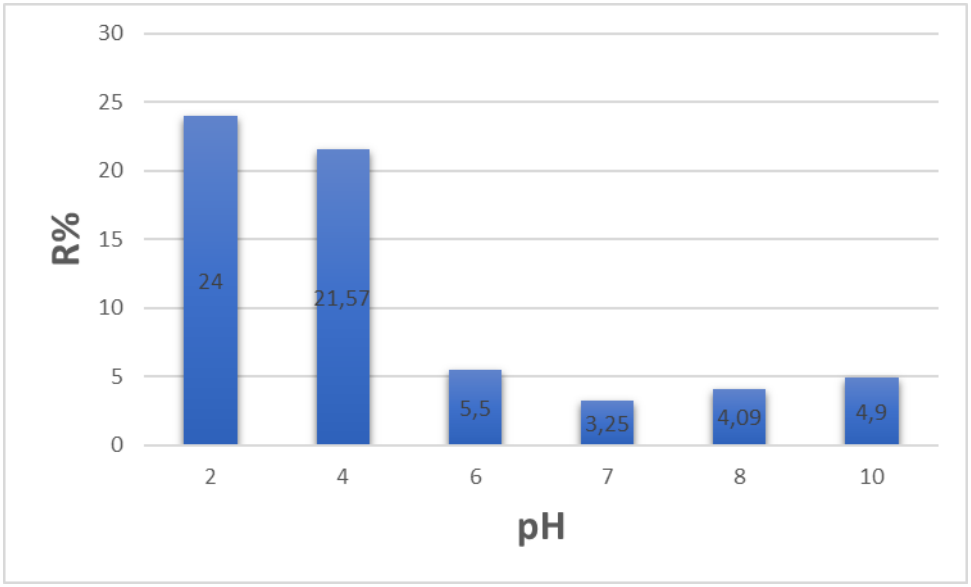
La vitesse de dégradation est déterminée à partir de la pente de la partie linéaire de la courbe qui représente la cinétique disparition du substrat au cours de temps selon l'équation suivante :

$$V = -\frac{\mathrm{d[S]}}{dt} = \frac{[\mathrm{S}]_\mathrm{f} - [\mathrm{S}]_\mathrm{i}}{\mathrm{t_f} - \mathrm{t_i}}$$

VI.3.1. Effet de pH.

Chaque enzyme catalyse des réactions dans une plage de pH optimale où son activité est maximale. De plus, la dépendance au pH indique la protonation et la déprotonation de groupes impliqués dans le mécanisme réactionnel, par exemple des groupes à l'état actif conduisant à une perte d'activité.

Les résultats de cette expérience utilisant de la peroxydase immobilisée dans la plage de pH de 2 à 10 (les zones de pH sont acides, neutres et basiques) sont présentés graphiquement sur la Figures VI.4.



Figures VI.4 : Effet du pH sur la décomposition du paracétamol par la peroxydase immobilisée

L'histogramme présenté sur la Figure VI.4 montre l'évaluation de la biolyse du paracétamol par la peroxydase immobilisée en fonction du pH où on peut tirer les informations suivantes :

- L'évolution du rendement en fonction du pH est similaire aux valeurs à pH 2 et pH 4, mais se différent avec les autres valeurs de pH.
- Lorsque la valeur du pH varie entre 2,0 et 10,0, La décomposition du paracétamol est maximale à pH 2, avec un rendement de 24 %.
- Dans la gamme de pH acide (2-4)، le rendement varie entre 21 et 24%
- Dans la gamme de pH neutre (6-7)، le rendement est faible et varie entre 3 et 6%
- Dans la gamme des pH basiques, les rendements sont très faibles de 4-5 %
- Le pH 2,0 est la valeur de pH optimale qui permet une dégradation maximale de la solution synthétique du paracétamol par des enzymes immobilisées avec un rendement de plus de 20.%

L'enzyme est plus actif à un pH 2 parce que la configuration tridimensionnelle d'enzyme est la plus favorable pour la liaison avec le substrat et la catalyse de réaction

VI.3.2. Effet de la température:

Le deuxième paramètre physique qui influence l'activité enzymatique de la peroxydase est la température. Il joue un rôle important dans le processus de réactions enzymatiques. La dépendance à la peroxydase dans cette étude est illustrée à la **Figure VI.5**.

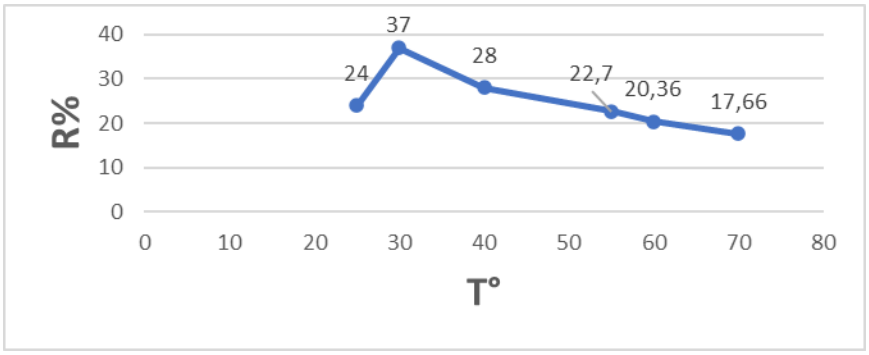


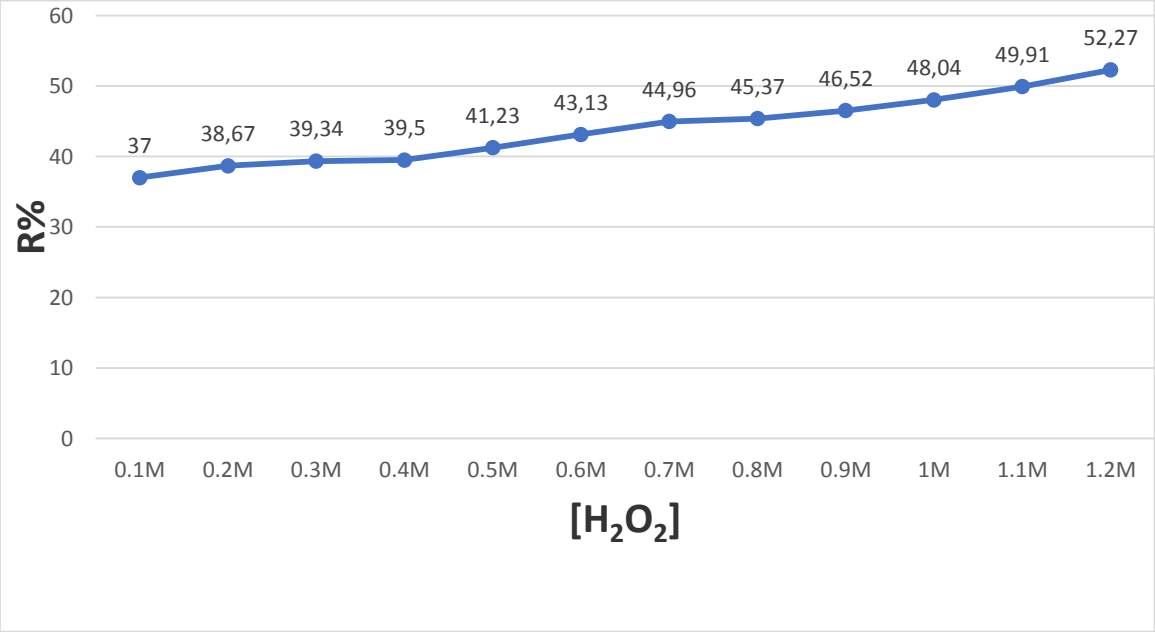
Figure VI.5 : Effet de la température sur la dégradation du paracétamol par la peroxydase immobilisée

- Du schéma précédent, on peut distinguer l'existence de deux étapes : Étape d'activation thermique de la peroxydase (I) : la décomposition maximale du paracétamol a été marquée à la température optimale de 30°C avec un rendement de 37 %
- Étape de dénaturation thermique (II) de la peroxydase : Lorsque la température dépasse 30 °C, le rendement diminue de plus de 10 % avec des variations de température de 30 °C à 55°C. Au-dessus de cette température, l'enzyme se dénature. l'enzyme perd sa structure tridimensionnelle et son centre catalytique. Nous concluons que la peroxydase a les propriétés suivantes : À une température optimale de 30 °C, une dégradation allant jusqu'à 37 est obtenue. La plage d'activation thermique se situe de 20°C à 30°C. La thermostabilité à différentes températures est également une caractéristique importante de la peroxydase où l'enzyme n'a pas été dégradé même après plusieurs heures de stockage à basse température

Au fait à la température optimale de 30°C la cinétique moléculaire est favorable aux fréquences des collisions enzyme-substrat et la structure d'enzyme est suffisamment stable pour maintenir son activité

VI.3.3. Effet de la concentration initiale du H_2O_2 sur le rendement et la vitesse de biodégradation du paracétamol

L'effet de la concentration du substrat principal le peroxyde d'hydrogène sur la décomposition du paracétamol est illustré sur la **Figures VI.6 :**



Figures VI.6 : Effets de la concentration de H_2O_2 sur le rendement de dégradation du paracétamol par la peroxydase immobilisée

Après 60 minutes de traitement, il a été remarqué sur la courbe de la **Figures VI.6** que l'augmentation de la concentration en H_2O_2 améliore l'efficacité de la décomposition du paracétamol par la peroxydase immobilisée. Les taux sont passés de 38,09 à 52,27 pour les concentrations 0.1M et 1.2M, respectivement. En effet, une augmentation graduelle de la concentration en peroxyde d'hydrogène favorise la production d'une plus grande quantité de radicaux hydroxyles nécessaires à l'oxydation des substances organiques. Le rapport molaire idéal de [H_2O_2] est de 1,2 M avec un rendement de 52,27 %.

À de faibles concentrations de H_2O_2, l'activité de la peroxydase augmente rapidement à mesure que la concentration de H_2O_2 augmente. Plus il y a de substrat (H_2O_2)

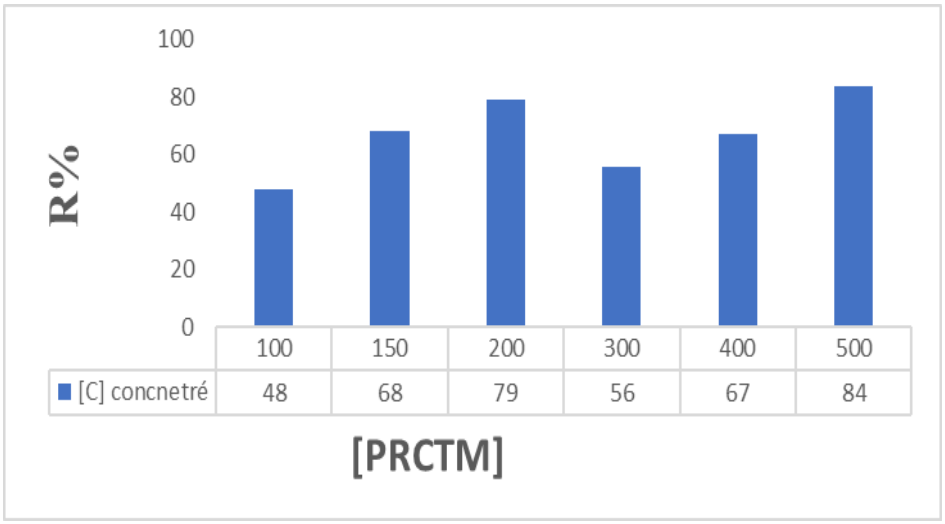
disponible, plus les molécules de H_2O_2 sont susceptibles d'entrer en contact avec le site actif de l'enzyme. La vitesse de réaction augmente donc de manière approximativement linéaire où la saturation enzymatique est atteinte. À mesure que la concentration de H_2O_2 augmente, l'activité enzymatique atteint un plateau, à ce point de saturation, tous les sites actifs de la peroxydase sont occupés par des molécules de H_2O_2 et l'enzyme fonctionne à vitesse maximale (V_{max}).

VI.3.4. Effet de la concentration du paracétamol.

L'étude de l'élimination de notre substance pharmaceutique par la peroxydase immobilisée permet de calculer le rendement et le taux de biodégradation du paracétamol à différentes concentrations de paracétamol.

VI.3.4.1 Rendement de dégradation du paracétamol

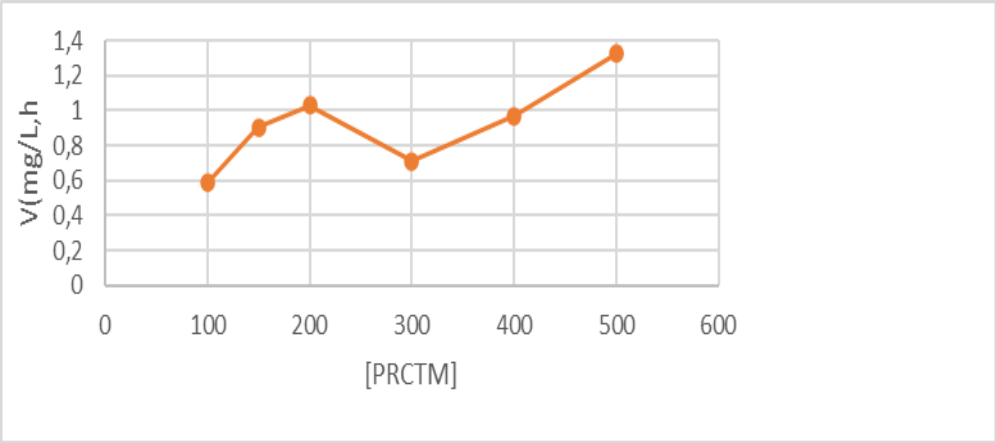
La plupart des réactions enzymatiques impliquent plusieurs substrats et libèrent plusieurs produits. Pour réduire la complexité de l'étude, le développement de la cinétique enzymatique dans ces systèmes implique de traiter l'enzyme comme une enzyme à substrat unique. L'objectif principal de cette étude est de déterminer la concentration optimale de paracétamol qui donne le taux et le rendement optimaux. Pour les concentrations concentrées, les rendements se varient entre 48 à 84 % et la valeur optimale est à 1g /l avec un rendement de 84 %



Figures VI.7 : Effet de concentration du paracétamol sur le rendement de la dégradation du paracétamol avec la peroxydase immobilisée

VI.3.4.2. Vitesse de dégradation du paracétamol

Puisque nous trouvons que le rendement est convergent entre la valeur de 0.2g/L et 1g/l, on a cherché à calculer la vitesse afin d'obtenir la valeur maximale correcte.



Figures VI.8 : Effet de la concentration du paracétamol sur la vitesse de dégradation du paracétamol avec la peroxydase immobilisée

Sur le graphe représentant la variation de la vitesse en fonction de la concentration du paracétamol, Il se trouve 3 phases :

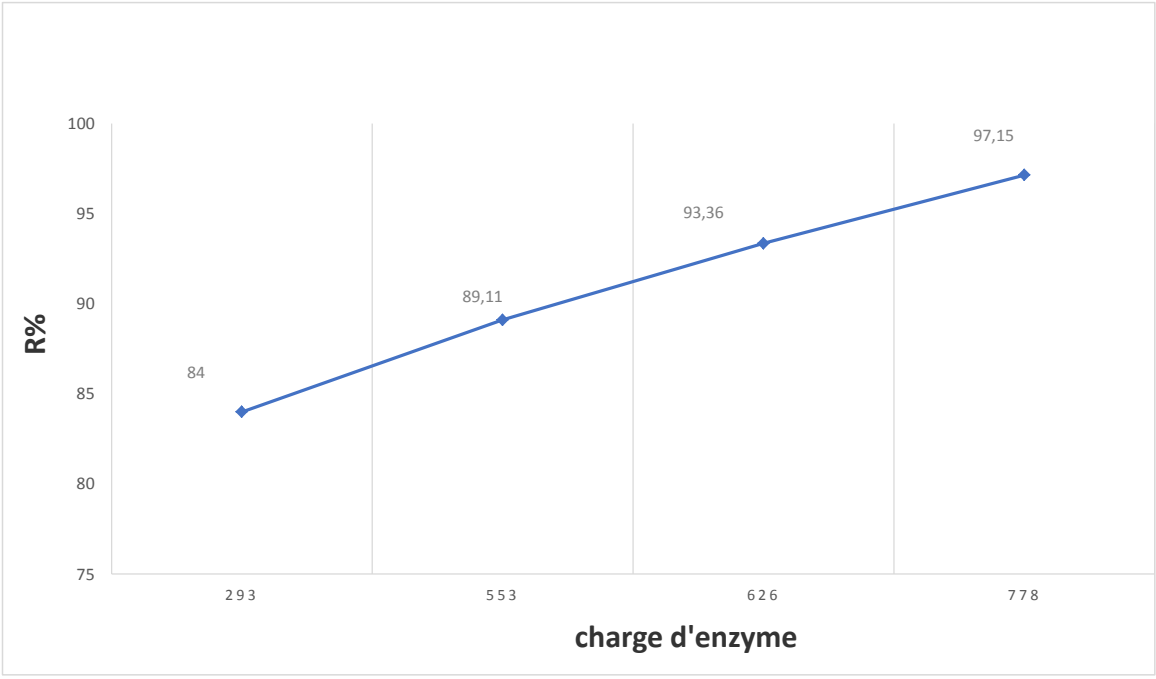
- Phase I (100-200mg/500ml) : une augmentation de valeur de 0.585 jusqu'à 1.03 mg/L.h
- Phase II (200-300mg/500ml) : une petite diminution de 1.03 jusqu'à 0.969 mg/L.h.
- Phase III (300-500mg/500ml) : une forte augmentation de la vitesse jusqu'à 1.3mg/l.h, la concentration de paracétamol de 1g/l est la valeur optimale dans cette expérience.

Le paracétamol, le deuxième substrat et la substance médicamenteuse du cycle benzénique, peut former avec la peroxydase et le peroxyde d'hydrogène un complexe tertiaire qui sera transformé en produit moins toxique et facile à éliminer par précipitation ou centrifugation, ce produit est de nature polymérique moins toxique que le produit de départ. Effet de la concentration du paracétamol a pu montrer que notre biomolécule enzymatique peut éliminer une forte dose de la substance médicamenteuse.

A la fin la valeur optimale finale de cette expérience de la concentration du paracétamol c'est la valeur de 1g/l parce qu'elle a une valeur maximale de vitesse avec un rendement de 84%

VI.3.5. Effet de la charge en enzyme sur biodégradation du paracétamol

Cette étude est menée dans les conditions optimales déterminées précédemment, à savoir un pH de 2, une température de 30°C, une concentration de paracétamol de 1g /l, une concentration en peroxyde d'hydrogène ($[H_2O_2]$) de 1.2M et une durée de 1 heure

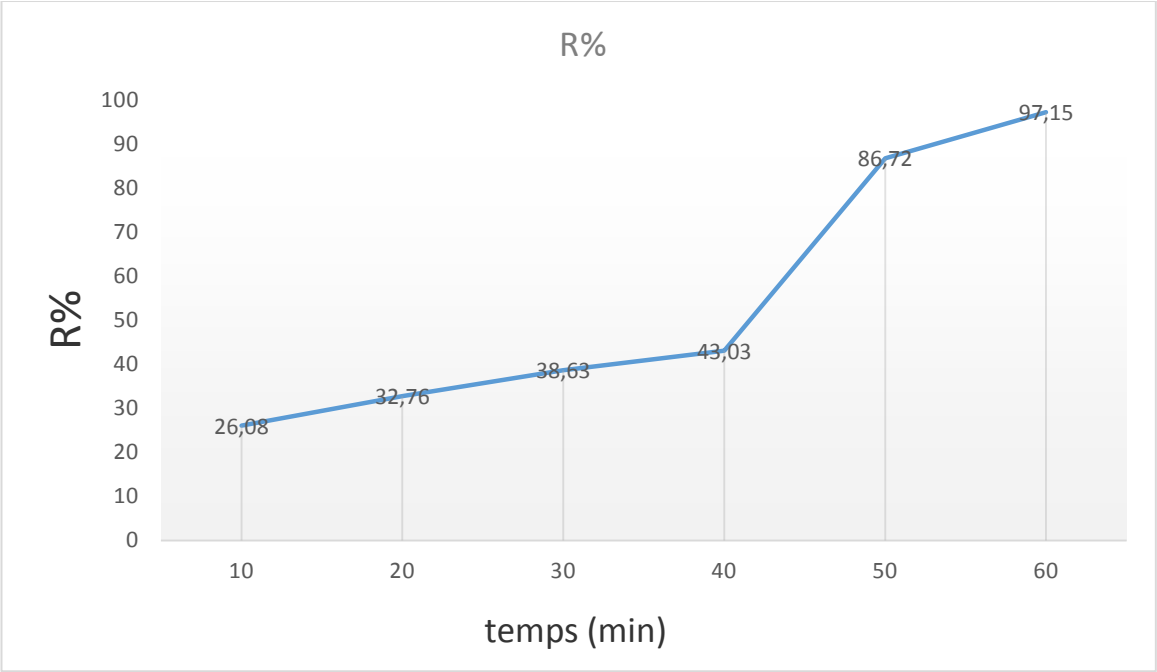


Figures VI.9 : Effet de la charge de l'enzyme sur le rendement de la dégradation du paracétamol avec la peroxydase immobilisée

La courbe démontre que la biodégradation du paracétamol à l'aide de l'enzyme immobilisée est positivement impactée par une augmentation de la concentration en enzyme. L'impact le plus important est observé à 0.727g de billes d'alginates, entraînant un rendement de biodégradation de 97,15 %.

VI.3.6. Cinétique dans les conditions optimale

Après avoir établi les conditions, nous avons chronométré le temps nécessaire pour atteindre une décomposition maximale. Des relevés ont été effectués toutes les 10 minutes pour observer cette progression

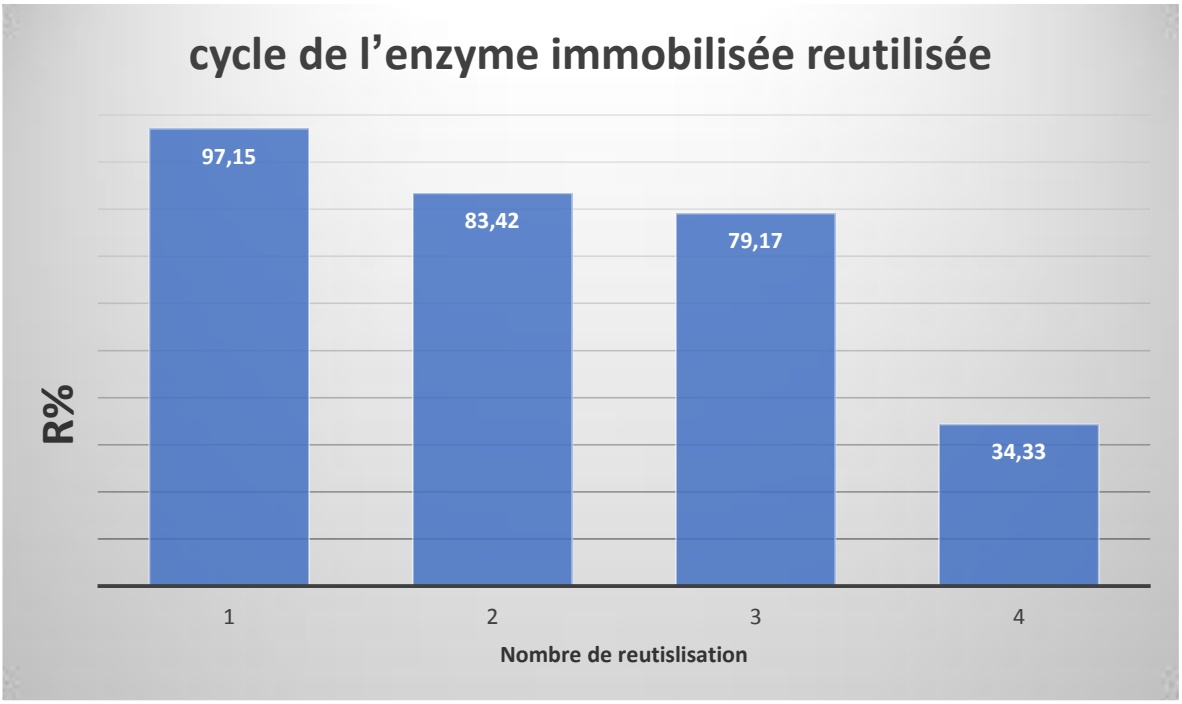


Figures VI.10 : Cinétique de décomposition du paracétamol avec la peroxydase encapsulé dans les billes d'alginates

La figure VI.10 illustre la dégradation optimale du paracétamol dans des conditions idéales, avec un pH de 2, une température de 30°C, une concentration en paracétamol de 1g /L, une concentration de peroxyde d'hydrogène de 1.2 M, et une quantité d'enzyme de 0.727 g. Cette dégradation optimale a été observée en 50 minutes, avec un rendement de 87%.

VI.3.7. Cycles de réutilisation de l'enzyme immobilisée

Cette section vise à évaluer la capacité de l'enzyme à être réutilisée à plusieurs reprises sur une période de temps afin de maintenir son activité catalytique et de minimiser sa libération lors de la réaction.



Figures VI.11 : Cycles de réutilisation de l'enzyme immobilisée

L'observation montre dans la Figure VI.11 que l'activité de la peroxydase reste stable dans la dégradation du paracétamol jusqu'au troisième lot, avec un rendement de 79,17%. Pour une même quantité de billes, on peut conclure que le processus de fixation est efficace, permettant ainsi la réutilisation pratique de la peroxydase dans la dégradation des effluents pharmaceutiques.

Conclusion générale

Conclusion

Nous avons utilisé un procédé enzymatique impliquant la peroxydase extraite à partir de navet pour décomposer le paracétamol, un composé présentant un risque environnemental élevé en raison de sa toxicité. La peroxydase a été obtenue à partir d'une source abondante et peu coûteuse. Après purification à l'aide d'acétone, nous avons obtenu un extrait enzymatique partiellement purifié présentant une activité spécifique de 263 Ul/g de protéine, avec un degré de purification 15 fois supérieur à celui de l'extrait brut. La purification a été réalisée par précipitation à l'acétone, une méthode simple et efficace qui a donné un rendement de purification de 33% .

Pour faciliter son utilisation, l'enzyme purifiée a été immobilisée par la méthode de l'inclusion dans de l'alginate de calcium, formant des billes d'un diamètre de 2,88 mm et d'une masse volumique de 0,02 g/cm^3.

La décomposition du paracétamol avec l'enzyme immobilisée pour les deux substrats, le paracétamol et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, a été étudiée. L'analyse catalytique de l'enzyme dépend de la détermination des paramètres de Michaelis-Menten, tels que l'identité de l'enzyme et sa capacité à atteindre une activité spécifique en fonction de son affinité. Les résultats de la décomposition du paracétamol indiquent un rendement maximal de 97.15 % avec la peroxydase immobilisée, dans des conditions optimales de :

- pH : 2.0
- Température : 30°C
- Concentration de paracétamol : 1g/l
- Concentration de peroxyde d'hydrogène : 1.2 M.
- Ces résultats sont attribués à l'influence des billes d'alginate.

En fin de compte, les billes ont été réutilisées trois fois avec un rendement de 79,17%. Cela souligne l'efficacité et la fiabilité du processus, avec des implications significatives pour la durabilité et l'efficacité des opérations.

En perspective la dégradation du paracétamol par la peroxydase encapsulé peut servir de base pour explorer la dégradation d'autres substances pharmaceutiques et industrielles. Voici quelques points intéressants à considérer pour poursuivre cette étude :

- Identification des produits de dégradation : Utiliser des techniques analytiques avancées telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC)
- Application industrielle : Explorer les possibilités d'appliquer cette méthode de dégradation dans des processus industriels, pour contrôler de médicaments périmés.
- Étude de la régénération de la peroxydase : Investiguer des méthodes pour régénérer l'activité de la peroxydase immobilisée afin d'améliorer sa durée de vie et son efficacité dans le processus de dégradation.
- En poursuivant ces lignes de recherche, il est possible d'approfondir notre compréhension de la dégradation des substances pharmaceutiques et d'identifier des applications pratiques pour cette technologie dans l'industrie et la gestion de l'environnement

Références bibliographiques

[1] Dwevedi, A., & Kayastha, A. M. (2012). Enzyme immobilization: a breakthrough in enzyme technology and boon to enzyme based industries. *Proteome Res. J, 3*, 333

[2] Veitch,N.C.(2004)peroxidase structure mechanismes and functions. chemical revieus,104(3),1091

[3] Smith, J. Standards and Guidelines for Monitoring Pharmaceutical Residues in Environmental Waters, Journal of Environmental Management,2021

[4] Palmer, T. et Bonner, PL (2007). Enzymes : biochimie, biotechnologie, chimie clinique .Elsevier

[5] Holliday, G. L., Fischer, J. D., Mitchell, J. B., & Thornton, J. M. (2011). Characterizing the complexity of enzymes on the basis of their mechanisms and structures with a bio-computational analysis. *The FEBS Journal*, *278*(20), 3835-3845.

[6] Wong, DW (1995). *Enzymes alimentaires : structure et mécanisme* . Médias scientifiques et commerciaux Springer.

[7] Léger, C. (2021). Cinétique Enzymatique (Encyclopédie Universalis).

[8]Cornish-Bowden, A., Jamin, M., & Saks, V. (2005). Cinétiqueenzymatique. EDP sciences

[9] A. Randoux, Gillery, Ph. Bellon, G. Maquart, F. Le Peuch, C.Monboissed. biochimie dynamique, Bruxelles, 3é édition 2006

[10] Brutin, J., et all (2020). BTS Diététique

[11] Champe, P. C., Harvey, R. A.,Ferrier, D. R. (2005). Biochemistry. Lippincott Williams & Wilkins.

[12] Chauvet, E., et al.(2014). Biologie BCPST1: Conforme au nouveau programme 2013

[13] Harper, H. A., et al. (2002). *Biochimie de Harper*. [Sainte-Foy, Québec]: Presses de l'Université Laval.

[14] Prat, R. (2010). Expérimentation en biologie et physiologie végétales. *Expérimentation en biologie et physiologie végétales*, 1-320

[15] Austin, R. (2018). Enzyme Immobilization. Scientific e-Resources.

[16]Torchilin, V. P. (2012). Immobilized enzymes in medicine (Vol. 11). Springer Science & Business Media.

[17] M. I. Kim, et all «Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization» Biotechnology and Bioengineering, 96, 2007, p 210-218.

[18] **Mosbach, K., & Mattiasson, B**. (1976). [31] Multistep enzyme systems. In *Methods in enzymology* (Vol. 44, pp. 453-478). Academic Press.

[19]Skj, G., Grasdalen, H. et Larsen, B. (1986). Séquence monomère et modèle d'acétylation dans certains alginates bactériens. Recherche sur les glucides , 154 (1), 239-250.

[20] Renault, F., et all (2009). Floculation au chitosane des eaux usées biologiques secondaires des cartonneries. Journal de génie chimique, 155 (3), 775-783.

[21]. Smith, A., & Johnson, B. (2019). Structure and function of peroxidase. BiochemicalReviews.

[22]. Roy, T. (2021). Peroxidase : A universal enzyme. Journal of Advanced Research in Biochemistry.

[23]. Smith, J., & Johnson, A. (2023). Prosthetic groups in peroxidase enzymes : Structure and function. Archives of Biochemistry and Biophysics.

[24]. Sugano, M. (1987). Purification and characterization of horseradish peroxidase. Agricultural and Biological Chjkkkkemistry.

[25]. Ursini, F. (2020). Glutathione peroxidase : Structure, function, and regulation. Current Topics in Cellular Regulation.

[26.] Hammel, K. E. (2019). Peroxidases in lignin biodegradation. Current Opinion in Biotechnology.

[27]. Lee, Y. M. (2021). Clinical implications of thyroid peroxidase antibodies. Endocrinology and Metabolism.

[28]. Hofrichter, M. (2021). Engineering fungal peroxidases. Trends in Biotechnology.

[29]. Chen, L. (2021). Applications of type 1 peroxidases in biotechnology and environmental remediation. Applied Microbiology and Biotechnology.

[30]. Zhang, X., & Wang, Y. (2021). Structural and functional insights into type 2 peroxidases. Journal of Biological Chemistry.

[31]. Garcia, C. (2021). Peroxidases in microbial communities : Diversity and functions. Frontiers in Microbiology.

[32]. Garcia, C. (2019). La présence des peroxydases dans les tissus animaux. Comparative Physiology B.

[33]. Johnson, A. (2020). The catalytic mechanism of peroxidases : A computational and experimental study. Journal of Biological Chemistry.

[34]. Johnson, A. (2020). Des reactions catalysées par les peroxydases. Archives of Biochemistry and Biophysics.

[35]. Smith, J. (2020). Substrate specificity of peroxidases. Annual Review of Biochemistry.

[36]. Johnson, A. (2020). Assessment of peroxidase activity. Analytical Biochemistry.

[37]. Johnson, A. (2020). Factors affecting peroxidase activity. Enzyme Research.

[38]. Johnson, A. (2020). Application of peroxidase in pharmaceutical synthesis. Current Opinion in Chemical Biology.

[39]. Brown, R. (2017). Biocatalytic application of peroxidase. Biotechnology.

[40]. Johnson, A. (2020). Industrial application of peroxidase. Enzyme and Microbial Technology.

[41]. Smith, J. (2021). Pharmaceuticals in wastewater : Sources, fate, and environmental impact. Environmental Science and Pollution Research.

[42]. Johnson, A. (2020). Environmental risks of pharmaceutical residues in aquatic ecosystems : Current knowledge and future direction. Environmental Pollution.

[43]. Johnson, A. (2020). Advanced oxidation processes for the treatment of pharmaceutical wastewater : A review. Chemical Engineering Journal.

[44]. Smith, J. (2021). Biological treatment of pharmaceutical wastewater : Current status and future perspective. Critical Reviews in Environmental Science and Technology.

[45].Bradford, MM (1976). Une méthode rapide et sensible pour la quantification de quantités de protéines en microgrammes utilisant le principe de liaison protéine-colorant. Biochimie analytique , 72 (1-2), 248-254.