REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Chimie

Spécialité :
Chimie Pharmaceutique

Par :

Mme. MEZAZA Houria.
Melle. CHERGUI Razika.

Thème :

Caractérisation des produits polymériques issus d'un traitement enzymatique.

Soutenue publiquement le : 21/06 /2018. Devant le jury composé de :

Mr. NEDJIOUI.Mohamed	Grade : MCA	UYFM	Président
Mr. HADIDI Nour Eddine	Grade : MCA	UYFM	Examinateur
Mme .AHMEDI Afaf	Grade : MCB	UYFM	Encadreur

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Tous d'abord je remercie mon grand dieu pour m'avoir donnés la santé, le courage et la volonté pour achever mon travail.

Les travaux de recherche qui font l'objet de cette thèse ont été réalisés au niveau de laboratoire de faculté de la science et au niveau de laboratoire de Hall technologie de l'université de Médéa dont je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé afin de finaliser ce travail.

*Et Cette étude a été réalisée aussi dans le laboratoire de toxicologie du complexe **SAIDAL**, c'est avec un sentiment de profonde satisfaction que nous remercions: **Monsieur BEN YAHIA**, pour nous avoir accueillis dans le laboratoire.*

*Il me tient particulièrement à cœur de remercier ma promotrice, **Mme AHMEDI Afaf**, MCB à l'université de Médéa, pour toute l'attention qu'elle nous a accordée. Pour l'encadrement, les conseils, la disponibilité et la patience.*

*Nous tenons également à remercier les membres du jury qui ont pris la peine de juger ce travail à savoir : **Mr, NEDJIOUI. Mohamed** ; et également **Mr, HADIDI Noureddine** ; (MCA à l'université de Yahia Fares de Médéa).*

*Nous exprimons notre gratitude à **Mr, BOULARES Moustafa** Pour Son Aide*

Nos remerciements vont à nos enseignants qui ont contribué à la réussite de notre cursus.

Dédicace

Je Dédie Ce Travail :

A Ma Très Chère Mère :

Tu Es L'exemple De Dévouement Qui N'a Pas Cessé De M'encourager Et De Prier Pour Moi. Puisse Dieu, Le Tout Puissant, Te Préserver Et T'accorder Sante, Longue Vie Et Bonheur.

A Mon Très Chère Père :

Rien Au Monde Ne Vaut Les Efforts Fournis Jour Et Nuit Pour Mon Education Et Mon Bien Etre. Ce Travail Est Le Fruit De Tes Sacrifices Que Tu As Consentis Pour Mon Education Et Ma Formation.

A Mes Frères; Ahmad, Bachir, Abed El Kader, Lakhdar, et leurs femmes, et Kaddour.

A Mes Sœurs : Noura Et Son Mari, Mebarka.

A L'espoir De ma Vie Mon Marie BOULARES Moustafa Pour Son Aide Et Ses Encouragements, Et Sa Famille.

A Mes Enseignants De L'école Primaire Jusqu'à L'université Dont Les Conseils Précieux M'a Guidée; Qu'ils Trouvent Ici L'expression De Ma Reconnaissance.

A Mon Binôme Razika Qui A Partage Avec Moi Les Moments Difficiles De Ce Travail Et A Sa Famille.

A Tous Mes Amies; Karima, Hayezia, Rekaya…

A Tous Mes Collègues De M2 Chimie Pharmaceutique.

Le Meilleur Pour La Fin, A Ma Très Chère SALMI BACHIRA.

«Houria»

Dédicace

Je Dédie Ce Modeste Travail :

A Ceux Qui M'ont Mis Au Monde, Que Je Respecte Et Qui M'honorent, Ma Mère Et Mon Père.

A Mes Frères : Farouk Et Sa Femme, Toufik, Ayoub, Azzedine.

Ames Sœurs : Khadîdja, Assya, Amina, Et Leurs Maries, Ahlam, Safia, Soumia.

A Mon Binôme Houria Qui A Partage Avec Moi Les Moments Difficiles De Ce Travail.

A Mes Amies; Soumia, Hayat, Karima, Hizia, Amina, Khadîdja, Razika, Salma, Fatima, Sabrina, Saadia, Naima.

A Tous Ceux Qui M'ont Encourage Tout Au Long De Mes Études.

A Tous Mes Amies De 2eme Master Chimie Pharmaceutique.

Razika

الملخص

يندرج هذا العمل في اطار دراسة خصائص المركبات الناتجة بعد التحلل البيولوجي لصبغتي الازو(اسود ايريوكروم ت و احمر كونغو) ، باستعمال انزيم البيروكسيدازالنباتي المستخرج و المنقى من اللفت الابيض "براسيكا رابا" بعد ذلك تثبيته بدمجه داخل الجينات الكالسيوم . خصائص النواتج المترسبة اثر المعالجة الانزيمية للصبغتين بواسطة البيروكسيداز تحققت بالتحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية و المرئية و الاشعة تحت الحمراء ،و اختبارات التسمم وتسمم النبات و تعيين ذوبانها و درجة انصهارها.

اكد التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية و المرئية للمحاليل الناتجة على ان المعالجة الانزيمية للصبغتين ادت الى محاليل ناتجة ليس لها قمة امتصاص في مناطق الاشعة فوق البنفسجية و المرئية ما يثبت ان المركب الناتج لا يذوب. بالتسلسل تحليل الرواسب بالأشعة تحت الحمراء اكد اختفاء الكرو موفور ما يعدم وجود أي اثر تسممي او تسمم نباتي.

ايضا الرواسب المتحصل عليها بواسطة المعالجة لا تذوب في الماء ، الكحول (إيثانول) و في المحاليل العضوية (اسيتون) ، و لها نقطة انصهار اكبر من 300°م.

الكلمات المفتاحية : صبغة، بيروكسيداز، معالجة، رواسب، مميزات، تسمم.

Résumé :

Ce travail a pour objectif d'étudier les caractéristiques des produits polymériques obtenus après la biodégradation des deux colorants azoïques (Rouge Congo(RC) et Noir Eriochrome T(NET)) en utilisant l'enzyme peroxydase végétale extraite et purifiée à partir du navet blanc "*Brassica rapa*" puis immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium. La caractérisation des produits précipités suite au traitement enzymatique des deux colorants par la peroxydase se fait par des analyses spectrales UV-Visible et FTIR, par des tests de toxicité et phytotoxicité et par la détermination de leur solubilité et leur point de fusion.

L'analyse spectrale UV-Vis des surnageant a confirmé que le traitement enzymatique des deux colorants conduits aux surnageant qui ne présentent aucun pic dans les régions UV et visible ce qui confirme que le précipité est un produit polymérique insoluble. Par la suite, l'analyse des précipités par FTIR, a montré la disparition de groupement chromophore et qu'ils ne présentent aucun effet toxicologique ni phytotoxiques. Ainsi, les précipités générés après traitement sont insoluble dans l'eau, les alcools (l'éthanol) et les solvants organiques (l'acétone) et ils ont un point de fusion supérieur à 300°C.

Mot clés : colorant, peroxydase, traitement, précipité, caractérisation, toxicité

Abstract:

This work aims to study the characteristics of the polymeric products obtained after the biological breakdown of the two azo dyes (Congo Red and Eriochrome black T) by using the vegetable enzyme peroxidase extracted and purified from the white turnip " *Brassica rapa* " then immobilized by inclusion in calcium alginate. The characterization of the precipitated products following the enzymatic treatment of the two dyes by peroxidase is made by spectral analyses UV-Visible and FTIR, by the tests of toxicity and phytotoxicity and by the determination of their solubility and their melting point.

The spectral analysis UV-Visible of the supernatant confirmed that the enzymatic treatment of the two dyes led to the supernatants which do not present any peak in areas UV and visible what confirms that the precipitate is an insoluble polymeric product. Thereafter, the analysis of the precipitates by FTIR, showed the chromophoric disappearance of grouping which do not present any toxicological effect nor phytotoxic. Thus, the precipitates generated from treatment are insoluble in water, alcohols (the ethanol) and organic solvents (acetone) and they have a melting point higher than 300°C.

Key Word: Dye, peroxidase, treatment, precipitate, characterization, toxicity.

Table des matières

Introduction générale 1

Partie A : synthèse bibliographique.

I. Les colorants 3

I.1. Introduction 3

I.2. Définition et structure chimique des colorants 3

I.3. Classification des colorants 4

I. 3.1. Classifications chimiques 4

I.3.2. Classification tinctoriale 6

I.3.2.1. Les colorants acides ou anioniques 7

I.3.2.2. Les colorants basiques ou cationiques 7

I.4. Impact sur l'environnement 7

I.4.1. Les dangers potentiels 7

I.4.2. Les dangers à long terme 8

I.5. Les méthodes de traitement des colorants 9

I.5.1. Méthodes physiques 9

I.5.2. Méthode chimiques 10

I.5.3. Méthodes biologiques 11

A. Traitement aérobie 11

B. Traitement anaérobie 11

I.5.4. Méthodes enzymatiques 12

I.6. Conclusion 12

II. Les enzymes 13

II.1. Introduction 13

II.2. Définition 13

II.3. Propriétés des enzymes dans les réactions chimiques 14

II.4. Structure de l'enzyme 14

II.5. Classification et nomenclature 15

II.5.1. Nomenclature 15

II.5.2.classification 16

II.6. Cinétique enzymatique 16

II.6.1. Equation de Michaelis - Menten 18

II.6.2. Unité d'activité enzymatique 18

II.6.3. Facteurs influençant la vitesse des réactions enzymatiques 19

A) influence de la température 19
B) influence du ph 19
C) influence de la force ionique du milieu 19
D) influence des inhibiteurs 20
II.7. Conclusion 20

III. Immobilisation des enzymes 20
III.1. Introduction : 20
III.2. Définition 20
III.3.techniques d'immobilisation 21
III.3.1.immobilisation par liaison à un support 21
A. Adsorption 22
B. Ionique 22
C. Liaison covalente 23
III.3.2. Réticulation 23
III.4. Propriétés des enzymes immobilisées 24
III.4.1. Propriétés physico-chimiques 24
III.4.2. Propriétés cinétiques 24
III.5. Conclusion : 25

IV. La peroxydase 25
IV.1. Introduction 25
IV.2. Définition 25
IV.3. Histories 26
IV.4. Nomenclature (Ec) 26
IV.5. Sources et classification 27
IV.6. Application industrielles de la peroxydase 29
IV.7.cycle catalytique de peroxydase 31
IV.8.Conclusion 32

Partie B : Matériel et méthodes

V **: Matériel et méthodes** 33
V.1. Introduction 33
V.2. Produits, matériels et méthodes 33
V.2.1. Produits utilisés 33
V.2.2. Caractéristiques des colorants utilisés 34
V.3. Matériel utilisé 34

V.4. Méthodes expérimentales..... 35
V.4.1. Extraction de la peroxydase 35
V.4.2. Purification de la peroxydase par l'acétone..... 35
V.4.3. Mesure de l'activité enzymatique des extraits avant et après la purification . 35
V.4.4. Dosage de la quantité des protéines des extraits avant et après la purification 37
V.4.5. Immobilisation de la peroxydase immobilisée dans l'alginate de sodium 38
V .4.6. Caractérisation physico-chimique des billes d'alginate/peroxydase 39
V.4.7. préparions des précipitée par la décoloration avec la peroxydase 40
V.4.8. Caractérisation des produits de transformation 42
V.4.8.1. Analyse spectrale 42
V .4.8.2. Test de phytotoxicité 42
V.4.8.3. Test de toxicité 42
V.4.8.4. Test de solubilité 43
V.4.8.5. Test de point de fusion 43

Partie C : Résultats et discussion.

VI. Résultats et discussion 45
VI.1. Extraction et purification de la peroxydase 45
VI.1.1. Calcul de l'activité enzymatique pour les deux extraits:..... 45
VI.1.2. Dosage de la quantité des proteins 46
VI.2. Immobilisation de la peroxydase de navet blanc 47
VI.3. Caractérisation des produits de transformation 48
VI.3.1. Analyse des surnageant par spectrophotomètre UV-vis 48
VI.3.2. Analyse des colorants et précipités par spectroscopie IR : 49
VI.4. Test de phytotoxicité 54
a- Le blé 54
b- La fève 56
VI.5. Test de toxicité des polymères 57
VI.6. Test de solubilité des précipités obtenus 58
VI .7. Determination de Point de fusion 59

Conclusion générale 60
Références bibliographiques
Annexe

Liste des figures

Partie A : Synthèse Bibliographique.

Fig.I.1 : Exemple des groupes chromophores et auxochromes 3

Fig.I.2: Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau 9

Fig.II.1. Représentation schématique d'une enzyme 14

Fig.II.2. Nomenclature des enzymes..... 15

Fig. II.3. Evolution de la concentration du substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E) en fonction temps 17

Fig.II.4. Relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat 17

Fig.III.1.méthodes d'immobilisation des enzymes par inclusion 21

Fig.III.2. Fixation des enzymes à un support. 21

Fig.III.3. Adsorption des enzymes sur un support. 22

Fig.III.4. Mode de fixation non covalente sur un support 22

Fig.III.5. Liaison covalente entre l'enzyme et le support 23

Fig.III.6. Réticulation et co-réticulation des enzymes. 23

Fig. IV.1. Structure de la peroxydase de Raifort (navet noir) 27

Fig. IV .2.Mécanisme réactionnel de la peroxydase 31

Partie B : Matériel et méthodes

Fig. V.1: Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet 34

Fig. V.2: Protocole de purification de la peroxydase par précipitation à l'acétone. 35

Fig.V.3. protocole de l'immobilisation de la peroxydase par l'alginate de sodium. 38

Fig.V.4. Protocole expérimental de décoloration par la méthode enzymatique. 40

Fig.V.5. Test toxicologique sur les souris 42

Partie C : Résultats et discussion.

Fig. VI.1. Réaction entre le gaïacol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase 44

Fig.VI.2. spectre UV. Visible de la solution initiale (50mg/L) de NET et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions expérimentales déterminées 47
Fig. VI.3. Spectre UV. Visible de la solution initiale (50mg/L) de RC et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions expérimentales déterminées. 48
Fig. VI.4. Spectre IR de RC 49
Fig. VI.5. Spectre IR de produit généré après traitement enzymatique du RC. 49
Fig. VI.6. Spectre IR de NET 51
Fig. VI.7. Spectre IR de produit généré après traitement enzymatique du NET.....51
Fig.VI.8. Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les solutions des colorants non traitées et surnageant traité. 54
Fig. VI.9. Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les solutions des colorants non traitées et surnageant traité. 56

Annexes

Fig.A.1 : Variation de la DO en fonction du temps pour EEB et l'EEPP (pH6, T ambiante,λ= 474nm).
Fig.A.2 : Courbe d'étalonnage de la protéine suivant la méthode de Bradford.
Fig.A.3. photos des colorants et laures précipités et surnageant aprée traitement enzymatique RC et NET.
Fig.A.4. photos des billes de peroxydases avant et aprée traitement enzymatique de RC et NET.

Liste des tableaux

Partie A : Synthèse Bibliographique.

Tableau I.1. Principaux groupes chromophores et auxochromes classés par intensité croissant 4

Tableau I. 2. Classifications chimiques des colorants 6

Tableau II.1.Classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'union Internationale de biochimie 16

Partie B : Matériel et méthodes

Tableau.V.1. Propriétés des différents réactifs utilisés. 32

Tableau.V.2. Caractérisation physicochimique des colorants utilisés 33

Tableau. V.3. Equipements et Verrerie utilisant. 33

Tableau V.4. Caractères de solubilité substance vis-à-vis solvant 42

Partie C : Résultats et discussion.

Tableau. VI.1. Caractérisation des deux extraits avant et après purification. 46

Tableau .VI.2 : Caractéristiques des billes de la peroxydase. 47

Tableau VI.3 : étude comparative des positions et d'intensité des bandes IR de RC et le produits formé après sa décoloration. 50

Tableau VI .4 : étude comparative des positions et d'intensité des bandes IR de NET et de produit formé après sa décoloration. 51

Tableau VI.5. Résultat de test de phytotoxicité pour les colorant et leurs surnageant sur le blé. 53

Tableau .VI.6 . Résultat de test de phytotoxicité pour les colorant et leurs surnageant sur La fève 55

Tableau VI.7. Essaie de la toxicité aigüe des produits formés suite à la transformation enzymatique des deux colorants azoïques sur les souris. 57

Tableau. VI.8. Solubilité de précipité du RC. 57

Tableau. VI.9. Solubilité du précipité de NET 58

Liste des abréviations :

Abréviation	Signification
E	Enzyme
EC	Enzyme Commission
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
NET	Noir Eriochrome T
P	Produit
Prx	Peroxydase
RC	Rouge Congo
S	Substrat
SN	Surnageant

Nomenclature et symbole :

Symbole	Signification	Unité
λ	Longueur d'onde	(nm)
V_{moy}	Volume moyen des billes.	(cm^3)
m_{moy}	masse moyenne des billes.	(mg)
ρ_{moy}	masse volumique moyenne des billes.	(mg/ml)
D_{moy}	Diamètre moyen des billes.	(cm)
AE	Activité enzymatique.	(UI/mL)
DCO	Demande chimique en oxygène	(mg/L)
DO	Densité optique	
LMT	Longueur moyenne des tiges	cm
LMF	Longueur moyenne des feuilles	cm
LMR	Longueur moyenne des racines	cm

NMF	Nombre moyenne des feuilles	
TG	Taux de germination	(%)

Introduction Générale

Introduction Générale :

Actuellement, de nombreux problèmes de pollution de l'environnement sont générés par les émissions industrielles et les déchets urbains liés aux activités humaines. Ils résident dans la contamination du sol, de l'eau et de l'air par divers composants organiques et inorganiques. [Adriano.2001]. De plus, Depuis 1856, lorsque le premier colorant synthétique a été signalé, l'utilisation des colorants dans les industries a augmenté de façon remarquable. Environ, un million tonnes des colorants synthétiques sont produits chaque année. La majorité de ces colorants synthétiques sont des dérivés azoïques. De nombreuses industries (textile, papeterie, plastique, agroalimentaire…) sont de gros consommateurs de colorants pour colorer leurs produits grâce à leur grande solubilité dans l'eau. Ces colorants synthétiques sont à la fois toxiques et responsables de la coloration des eaux. Il en résulte alors des eaux de rejets colorés qu'il est nécessaire de traiter avant leur rejet. [Anjaneyulu. 2005].

Actuellement, les procédés disponibles sont divers : classiques et alternatifs. En général, les procédés conventionnels sont classés comme traitements : physiques, chimiques et biologiques. L'incapacité de ces procédés réside dans la transformation inefficace des molécules réfractaires ou toxiques et dans la production d'une nouvelle pollution. [Boucherit .2016]

Durant les dernières années, de nombreuses études sur la dégradation enzymatique des colorants sont axées sur l'identification et la caractérisation des enzymes pouvant les dégrader. Les enzymes, grâce à leur pouvoir catalytique et surtout leur spécificité, prennent de jour en jour une position importante parmi les méthodes de traitement les plus efficaces du point de vue technico-économique pour le traitement de la pollution engendrée par les colorants. D'autre part, la technique d'immobilisation a permis de surmonter quelques contraintes liées à l'utilisation des enzymes tels que l'inhibition par le substrat, la réutilisation du biocatalyseur et sa stabilité dans les conditions physico-chimiques extrêmes.[Zille. 2005].

Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent connues dans les moindres détails, on s'est intéressé à l'une des plus répandues qui soient, la peroxydase. Les peroxydases constituent un groupe important d'enzymes, largement répandu dans la nature, que ce

soit dans les plantes (la source la plus commune est le navet, la racine de radis ou de raifort (radis noir, le navet...), les bactéries ou les animaux. Cette classe enzymatique utilise le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), pour oxyder des composés organiques, ce qui lui vaut son nom. [Alton. 2005]. Le choix de la peroxydase est basé sur sa stabilité, son activité de conversion et la précipitation des substrats en produits pouvant être éliminés facilement du milieu réactionnel [Boucherit.2016].

L'objectif de ce travail est de montrer l'efficacité de la peroxydase extraite d'une source végétale du navet "*Brassica rapa*" dans le traitement des colorants azoïque le Rouge Congo "RC " et le Noire ériochrome T "NET" et génération des produits non toxique. Dans ce contexte, notre étude est intéressée à trois parties essentielles :

La première partie A : une synthèse bibliographique qui rassemble :

- Les données essentielles sur les colorants, puis un aperçu sur les différentes méthodes de traitement des effluents colorés, principe, avantages et inconvénients, en particulier par voie enzymatique.
- Ensuite nous avons discuté les différentes caractéristiques des enzymes notamment la Peroxydase.

La deuxième partie B : ou on a cité le matériel et les méthodes utilisés tels que :

- Les méthodes d'extraction, purification et immobilisation dans des matrices polymériques d'alginates de sodium de la peroxydase de navet.
- Production du précipité obtenu après traitement enzymatique des deux colorants RC et NET par la Peroxydase de navet dans les conditions optimales déjà obtenus dans les travaux antérieurs
- Caractérisation des précipités par des analyses spectrales UV-Vis et IR, les tests de toxicité et de phytotoxicité ainsi la détermination de solubilité et de point de fusion.

La troisième partie C : qui s'intéresse essentiellement à la discussion des résultats obtenus.

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

Partie A :

Synthèse Bibliographique.

I. LES COLORANTS

I.1. Introduction

L'industrie des colorants constitue aujourd'hui un domaine capital de la chimie. Les colorants sont employés pour l'impression et la teinture des fibres textiles, des papiers, des cuirs, des fourrures, des bois, des matières plastiques et des élastomères. Ils servent aussi à préparer des peintures, des encres d'imprimerie, des vernis et, comme additifs, à colorer des produits alimentaires et pharmaceutiques. Ils sont utilisés dans l'industrie textile, cosmétiques, la coloration des métaux (aluminium anodisé), la photographie (sensibilisateurs), la biologie (coloration des préparations microscopiques), les indicateurs colorés, et certains d'entre eux sont employés en thérapeutique (antiseptiques, antimalariques, etc.)[Mansour et al.2011].

I.2. Définition et structure chimique des colorants

Un colorant est une substance colorée qui interagit avec le milieu dans lequel elle est introduite, et le colore en s'y dissolvant et/ou dispersant lui conférant la propriété de teindre. Cette propriété résultant d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements.

Les colorants ont la propriété d'absorber une partie du spectre lumineux dans le visible (de 380 à 750nm). Cette absorption est favorisée par leur structure chimique comprenant des groupements chromophores (noyaux aromatiques ou hétérocycliques à doubles liaisons conjuguées) pour la couleur, et des groupements auxochromes pour assurer la solubilité du colorant dans l'eau, ou établir des liaisons efficaces avec les groupements chimiques du support à colorer. [Djelal et al.2008 ; Mansour.2011] (Fig.I.1).

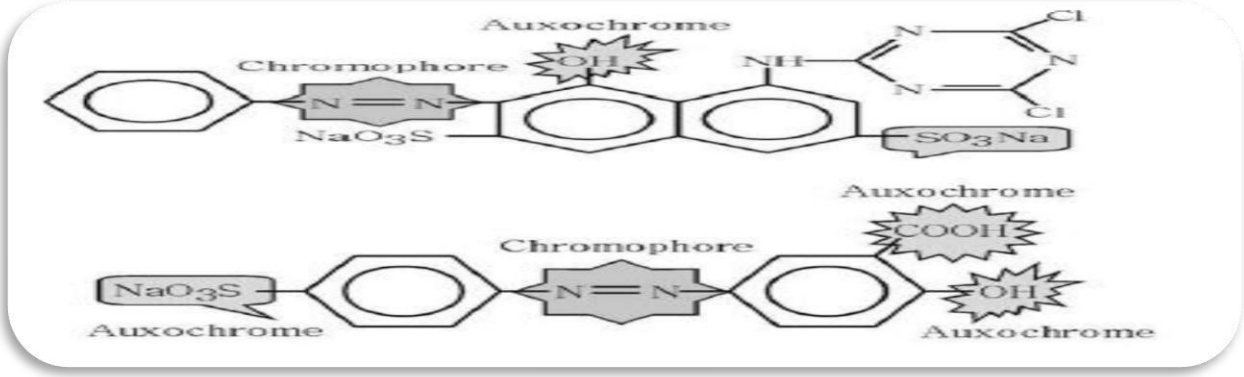


Fig.I.1 : Exemple des groupes chromophores et auxochromes [Djelal et al.2008].

De manière générale, les colorants consistent en un assemblage de groupes chromophores, auxochromes et de structures aromatiques conjuguées (cycles benzéniques, anthracène, perylène, etc.) [Mansour.2011]

Tableau I.1. Principaux groupes chromophores et auxochromes classés par intensité croissante [Mansour. 2011].

Groupe chromophores	Groupe auxochrome
- Azo (-N=N-).	- Amin ($-NH_2$).
- Nitrozo (-N=O).	-méthyle amine ($-NHCH_3$).
- Carbonyl (>C=O).	-Diméthyle amine ($(-N(CH_3)_2$).
- Vinyl ($-C=CH_2$).	-hydroxyl (-OH).
-nitro (NO_2).	- Alkoyle (-OR).
-thiocarbonyle (C=S).	-carboxyl (-COOH).

I.3. Classification des colorants

Les principaux modes de classification des colorants reposent soit sur leur constitution chimique, soit sur leurs méthodes d'application aux différents substrats que sont les fibres textiles, le papier, le cuir, les matières plastiques, etc. [Abed. 2013]

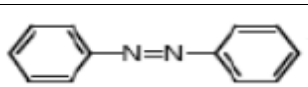
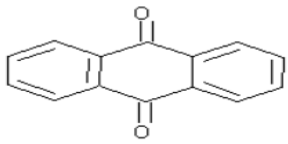
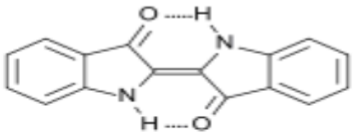
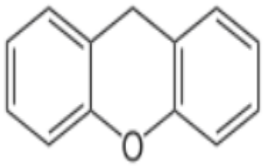
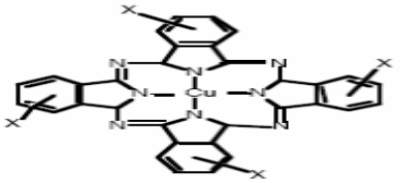
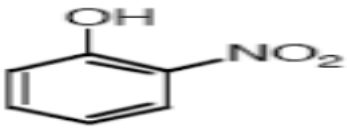
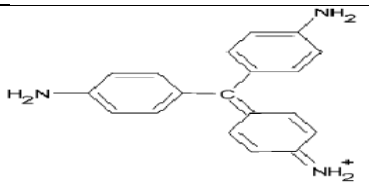
I. 3.1. Classifications chimiques

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore. Cette classification s'intéresse les fabricants. De même, les principaux groupements chromophores sont classés comme suit [Hammami.2008] :

- **Les colorants azoïques :** Les colorants "azoïques" sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Ces structures qui reposent généralement sur le squelette de l'azo benzène, sont des systèmes aromatiques ou pseudo-aromatiques liés par un groupe chromophore azo (Tableau I. 2).
- **Les colorant anthraquinoniques :** D'un point de vue commercial, ces colorants sont les plus importants après les colorants azoïques. Leur formule générale dérivée de l'anthracène montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amines (Tableau I.2).

- **Les colorants indigoïdes :** Ils tirent leur appellation de l'Indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues sélénié, soufré et oxygéné du Bleu Indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise (Tableau I.2).
- **Les colorants xanthène :** Ces colorants sont dotés d'une intense fluorescence. Le composé le plus connu est la fluorescéine. Peu utilisé en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accident maritime ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie (Tableau I.2).
- **Les phtalocyanines :** Ils ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyano benzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.) (Tableau I.2).
- **Les colorants nitrés et nitrosés :** Ces colorants forment une classe très limitée en nombre et relativement ancienne. Ils sont actuellement encore utilisés, du fait de leur prix très modéré lié à la simplicité de leur structure moléculaire caractérisée par la présence d'un groupe nitro (-NO_2) en position ortho d'un groupement électrodonneur (hydroxyle ou groupes aminés) (Tableau I.2).
- **Les colorants triphénylméthanes :**Les triphénylméthanes sont des dérivés du méthane pour lesquels les atomes d'hydrogène sont remplacés par des groupes phényles substitués dont au moins un est porteur d'un atome d'oxygène ou d'azote en para vis-à-vis du carbone méthanique. Le triphénylméthane et ses homologues constituent les hydrocarbures fondamentaux d'où dérivent toute une série de matières colorantes (Tableau I.2).

Tableau I.2: Classifications chimiques des colorants [Hammami.2008].

Colorants	Structures
Azoïques	
Anthraquinoniques	
Indigoïdes	
Xanthène	
Les phtalocyanines	
nitrés et nitrosés	
Triphénylméthanes	

I.3.2. Classification tinctoriale

Cette classification est utilisée par le teinturier. Elle caractérise la propriété de solubilité du colorant dans le bain de teinture, son affinité pour les diverses fibres et sur la nature de la fixation. Celle-ci est de force variable selon que la liaison colorant/substrat est du type ionique, hydrogène, de Van der Waals ou covalente. D'une autre manière, cette classification est liée à la nature du groupement auxochromes [Hamide. 2015]

I.3.2.1. Colorants acides ou anioniques

Très solubles dans l'eau grâce à leurs groupes sulfonate ou carboxylate, ils sont ainsi dénommés parce qu'ils permettent de teindre les fibres animales (laine et soie) et quelques fibres acryliques modifiées (nylon, polyamide) en bain légèrement acide. L'affinité colorant - fibre est le résultat de liaisons ioniques entre la partie acide sulfonique du colorant et les groupes amino des fibres textiles. [Mansour.2011].

I.3.2.2. Colorants basiques ou cationiques

Sont des sels d'amines organiques, ce qui leur confère une bonne solubilité dans l'eau. Les liaisons se font entre les sites cationiques des colorants et les sites anioniques des fibres. En phase de disparaître dans la teinture de la laine et de la soie, ces colorants ont bénéficié d'un regain d'intérêt avec l'apparition des fibres acryliques, sur lesquelles ils permettent des nuances très vives et résistantes [Oubaghra. 2011].

I.4. Impact sur l'environnement

Le principal problème environnemental est celui des quantités d'eau rejetées et de leur charge chimique. Les autres questions importantes sont la consommation énergétique, les émissions dans l'atmosphère, les déchets solides et les odeurs qui peuvent représenter des nuisances significatives dans certains traitements.

I.4.1. Dangers potentiels

- **Eutrophisation :** est la modification et la dégradation d'un milieu aquatique, lié en général à un apport excessif de substances nutritives (azote provenant surtout des nitrates agricoles et des eaux usées, et secondairement de la pollution automobile, et phosphore, provenant surtout des phosphates et des eaux usées), qui augmentent la production d'algues et d'espèces aquatiques.

Sous l'action des microorganismes, les colorants libèrent des nitrates et des phosphates dans le milieu naturel. Ces ions minéraux introduits en quantité trop importante peuvent devenir toxiques pour la vie piscicole et altérer la production d'eau potable. Leur consommation par les plantes aquatiques accélère leur prolifération anarchique et conduit à l'appauvrissement en oxygène par inhibition de la photosynthèse dans les strates les plus profondes des cours d'eau et des eaux stagnantes [USGS.2006].

➢ **Sous-oxygénation** : Lorsque des charges importantes de matière organique sont apportées au milieu via des rejets ponctuels, les processus naturels de régulation ne peuvent plus compenser la consommation bactérienne d'oxygène. Manahan [Manahan.1994] estime que la dégradation de 7 à 8 mg de matière organique par des micro-organismes suffit pour consommer l'oxygène contenu dans un litre d'eau.

➢ **Couleur, turbidité, odeur:** l'accumulation des matières organiques dans les cours d'eau induit l'apparition de mauvais goûts, prolifération bactérienne, odeurs pestilentielles et colorations anormales. ont évalué qu'une coloration pouvait être perçue par l'œil humain à partir de 5.10^{-6}g/L. En dehors de l'aspect inesthétique, les agents colorants ont la capacité d'interférer avec la transmission de la lumière dans l'eau, bloquant ainsi la photosynthèse des plantes aquatiques.

I.4.2. Dangers à long terme

❖ **Persistance :** les colorants organiques synthétiques, en particulier azoïques, sont des composés très résistants à la dégradation biologique naturelle. Cette persistance est en étroite relation avec leur réactivité chimique :

- Les composés insaturés sont moins persistants que les saturés;
- Les alcanes sont moins persistants que les aromatiques;
- La persistance des aromatiques augmente avec le nombre de substituants;
- Les substituants halogènes augmentent la persistance des colorants tels que les groupements alkyles [Mansour.2011].

❖ **Bioaccumulation :** désigne la capacité des organismes à absorber et concentrer dans tout ou une partie de leur organisme (partie vivante ou inerte telle que l'écorce ou le bois de l'arbre, la coquille de la moule, la corne, etc..) certaines substances chimiques, éventuellement rares dans l'environnement (oligoéléments utiles ou indispensables, ou toxiques indésirables).Chez les animaux et l'homme, les teneurs en substances toxiques pouvant aller jusqu'à cent mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau.
Ainsi, chez un même organisme, cette capacité peut fortement varier selon l'âge et l'état de santé, ou selon des facteurs externes (saison, teneur du milieu en nutriments ou cofacteurs). Certaines substances non ou peu dégradables comme les colorants sont persistantes dans les organismes (bio-persistance) vivants car elles ne sont pas métabolisées. Leur possibilité

d'accumulation est d'autant plus important que les organismes n'ont pas d'autres alternatives que de les éliminer (processus long) ou de les stocker (Fig.I.2).

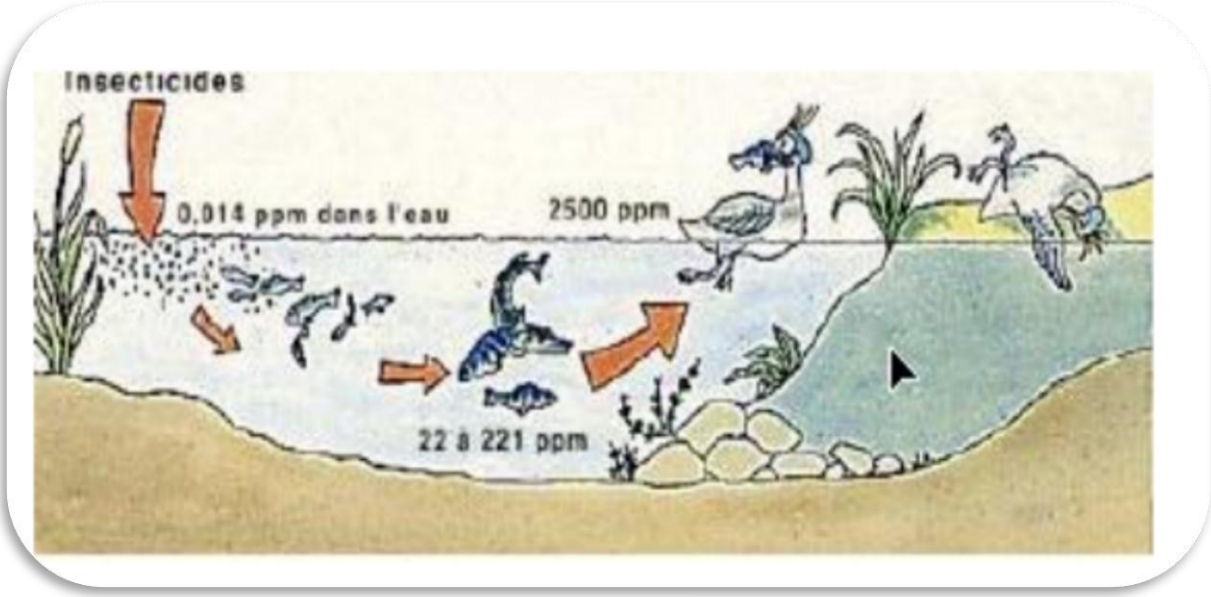


Fig.I.2: Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau [Hamide.2015].

❖ **Cancer**: si la plupart des colorants ne sont pas toxiques directement, une portion significative de leurs métabolites l'est. Leurs effets mutagènes, tératogènes ou cancérigènes apparaissent après dégradation de la molécule initiale en sous-produits d'oxydation: amine cancérigène pour les azoïques et leuco-dérivé pour les triphényl méthanes.

❖ **Les sous-produits de chloration (SPC):** le chlore utilisé pour éliminer les microorganismes pathogènes réagit avec la matière organique pour former des trihalométhanes (THM) pouvant atteindre plusieurs centaines de mg/L. Les SPC sont responsables de développement de cancer du foie, des poumons, des reins et de la peau chez l'homme [Hammami.2008].

I.5. Les méthodes de traitement des colorants

I.5.1. Méthodes physiques

- **Adsorption (sur charbon actif) :** Lors de l'adsorption, le polluant est transféré de la phase liquide vers la phase solide. Le charbon activé est l'adsorbant le plus communément utilisé pour la réduction de la couleur, mais cette technique n'est efficace que sur certaines catégories de colorants (cationiques, à mordant, colorants dispersés, de cuve et réactifs,

pour un type donné de carbone, dans une certaine gamme de PH [Hao.2000 ; Raghavacharya.1997] et pour une concentration en impuretés relativement constante. De plus, ces techniques non destructives requièrent des opérations postérieures onéreuses de régénération et de post-Traitement des déchets solides.

- **Filtration membranaire :** La filtration sur membrane pilotée par pression hydraulique se décline en microfiltration, ultrafiltration, nano filtration et osmose inverse. Parmi les quatre types de procédés, la nano filtration et l'osmose inverse sont les plus adaptés à la réduction partielle de la couleur et des petites molécules organiques, mais l'osmose inverse reste la plus répandue. La nano filtration s'applique surtout au traitement des bains de teinture de colorants réactifs en agissant comme un filtre moléculaire, tandis que la microfiltration retient les matériaux colloïdaux tels que les colorants dispersés ou de cuve grâce à une "membrane écran" . L'ultrafiltration ne s'applique qu'à la réduction de la DCO et des solides en suspension [Calabro.1990 ;Anselme.1996 ; Taylor.1996], et ne se montre réellement efficace qu'en combinaison avec la coagulation/floculation.

- **Coagulation –floculation :** La coagulation –floculation est un processus physico-chimique par lequel des particules colloïdales ou des solides en fine suspension sont transformés, à l'aide des coagulants et floculant chimiques en espèces plus visibles et séparables (les flocs). Les particules colloïdales sont déstabiliser tout d'abord par l'addition des sels tels que $Al_2(SO_4)_3$ ou $Fe_2(SO_4)$. Les floculant facilitent l'agglomération des particules déstabilisées conduisant à la formation des flocs. Les flocs formés sont ensuite séparés par décantation et filtration puis évacués [Van Der Bruggen.2003]. Par ailleurs, la coagulation - floculation ne peut être utilisée pour les colorants fortement solubles dans l'eau. D'importantes quantités de boue sont formées avec ce procédé : leur régénération ou réutilisation reste la seule issue mais demande des investissements supplémentaires

I.5.2. Méthode chimiques

Ces procédés s'appliquent aux colorants en faible concentration et qui résistent aux traitements de biodégradation. L'oxydation et la réduction sont les méthodes chimiques les plus connues. Les réactifs les plus utilisés pour le traitement d'oxydation sont H_2O_2, O_2, O_3, Cl_2, NaOCl et MnO_4, et pour la réduction, le $Na_2S_2O_4$. L'oxydation chimique conduit à la destruction ou la décomposition de la molécule du colorant.

Il a été observé que l'oxydation chimique avec l'un de ces oxydants n'est pas toujours efficace pour le traitement des polluants organiques persistants, et les colorants dispersés. Dans ce cas, on fait appel aux procédés d'oxydation avancée. [Boucherit.2016].

I.5.3. Méthodes biologiques

L'utilisation des microorganismes pour la biodégradation des colorants synthétiques représente une méthode simple et intéressante.

A. Traitement aérobie

Les polluants sont décomposés par des bactéries aérobies et autres microorganismes en une boue qui sédimente. Les polluants organiques sont oxydés jusqu'au dioxyde de carbone. Après épuration, la boue est séparée des eaux usées par sédimentation dans un décanteur, une partie est recyclée et le surplus est évacué après pressage ou centrifugation. Si ces techniques sont adaptées à un grand nombre de polluants organiques, elles ne sont pas suffisamment efficaces pour les rejets textiles. De nombreuses classes de colorants telles que les azoïques, les colorants acides (à cause des groupes sulfonés) et les colorants réactifs y sont récalcitrants, et la diminution de coloration est essentiellement due à une adsorption sur les boues, plutôt qu'à la dégradation de la molécule de colorant. Seuls les colorants de structure chimique simple, faiblement substitués, et de faible poids moléculaire, ont des taux de décoloration importants [Hamide.2015.].

B. Traitement anaérobie

L'efficacité de plusieurs applications anaérobies sur la dégradation de différents colorants synthétiques a été démontrée par plusieurs auteurs. La décoloration d'un colorant azoïque réactive a été réalisée sous des conditions anaérobiques utilisant le glucose comme source de carbone. Les conditions de réduction dans la digestion anaérobique sont adaptées à la décoloration des colorants azoïques par clivage de la liaison azoïque, entraînant une destruction subséquente du groupe chromophore, mais une minéralisation complète est impossible dans ce type de procédé. La dégradation des molécules initiales entraîne souvent la formation d'amines plus toxiques que la molécule initiale, qui finissent dans les sédiments aquifères peu profonds et les eaux souterraines. Cependant, la majorité des colorants sont bien entendu résistants à cette attaque microbienne, de plus la toxicité des colorants inhibe

la croissance des bactéries, ce qui rend le traitement d'effluents contenant des colorants en station d'épuration difficile, voire impossible. [Hamide.2015]

I.5.4. Méthodes enzymatiques

Ces procédés sont classés entre les procédés chimiques et biologiques. Ainsi, la variété des transformations catalysées par les enzymes a fait ces derniers une cible principale pour l'exploitation des industries biotechnologiques. Cependant, des recherches récentes ont été entrepris pour une optimisation des procédés d'isolement et de purification des enzymes menues de capacité de transformation voire de détoxification des polluants persistants et récalcitrants des effluents industriels [Hamide et al. 2015].

Ainsi, les avantages du traitement enzymatique par rapport aux traitements conventionnels peuvent être résumés comme suit :

- Inhibition par les substances toxiques est très faible;
- Application aux polluants récalcitrants, couvrant un large intervalle de concentrations en polluants, de pH, de température et de salinité;
- Facilité et simplicité du processus;
- Absence de biomasse, et réduction de volume de réacteur;
- Action catalytique efficace, sélective et très rapide;
- Transformation de divers composés aromatiques.

Les enzymes isolées catalysent la détoxication/décoloration des colorants rapidement, (des minutes à quelques d'heures) par rapport aux algues et aux mycètes qui prennent plusieurs jours ou même mois pour fournir les mêmes résultats.

Les enzymes oxydoréductase: peroxydases, laccases et les oxydases de poly phénol ont montré leur potentiel dans la décoloration et la transformation des polluants aromatiques tels que les phénols, les amines aromatiques, les diphényles, les diphenols et les colorants (anthraquinoniques, azoïques, nitro et nitroso) en composés insolubles moins toxiques, qui pourraient être facilement enlevé de la solution [Boucherit.2016].

I.6.Conclusion

Les colorants azoïques et anthraquinoniques constituent la plus grande classe des colorants produits dans le monde. Les premiers trouvent des applications diverses, en particulier dans l'industrie textile. Tandis que les deuxièmes, sont caractérisés par une forte

résistance à la lumière et aux attaques chimiques et microbiennes et présentent une large nuance de couleur, ce qui leurs confère une application importante dans la teinture et l'imprimerie [Jarrar.2011].

II. LES ENZYMES

II.1. Introduction

Les enzymes constituent la classe des protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée. Ils sont sur le point de devenir des composants courants de nombreux processus industriels et de produits ménagers parce qu'elles permettent d'effectuer des réactions chimiques de manière très efficace et stéréospécifique et dans des conditions douces et particulières. D'autre part, les enzymes ne favorisent pas seulement une réaction chimique donnée, mais elles empêchent la présence des réactions secondaires gênantes. Au cours de ces dernies années ; le nombre d'enzymes connues a considérablement augmente et les applications sont multiples en biochimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, plus dans l'industrie agro-alimentaire [Fabiano et al. 2002].

II.2. Définition

Une enzyme est une protéine qui joue un rôle de catalyseur biologique (ou biocatalyseur), c'est-à-dire de composé qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits. Elle est capable d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme, sans pour autant modifier l'équilibre formé. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction. La partie importante de l'enzyme est constituée du site actif. C'est dans ce site, qui prend souvent la forme d'une cavité, que se fixe le substrat qui pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit [Pelmont. 1995].

II.3. Propriétés des enzymes dans les réactions chimiques

- Les enzymes ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions non catalysées, et de plusieurs ordres de grandeur supérieur aux réactions catalysées par des catalyseurs chimiques.
- Les réactions enzymatiques se font dans des conditions douces: (dans l'eau, à pH précis, température ambiante).
- Les réactions enzymatiques sont très spécifiques : à la fois pour le substrat et pour le type de réaction.
- Les réactions enzymatiques peuvent être modulées : La régulation de l'activité enzymatique peut s'effectuer de façon allostérique, par des protéines régulatrices, par une modification covalente de l'enzyme, par une activation protéolytique, par la quantité d'enzyme produite, …etc. [Darnell. 1995].

II.4. Structure de l'enzyme

La macromolécule enzymatique comporte de nombreux replis, qui ont notamment pour effet d'amener à proximité les uns des autre des groupement fonctionnels libres qui seraient mutuellement très éloigné si la macromolécule était en extension, certains de ces replis forment une cavité bien définie, appelée site actif de l'enzyme [Jamin et al.2004] (Fig.II.1).

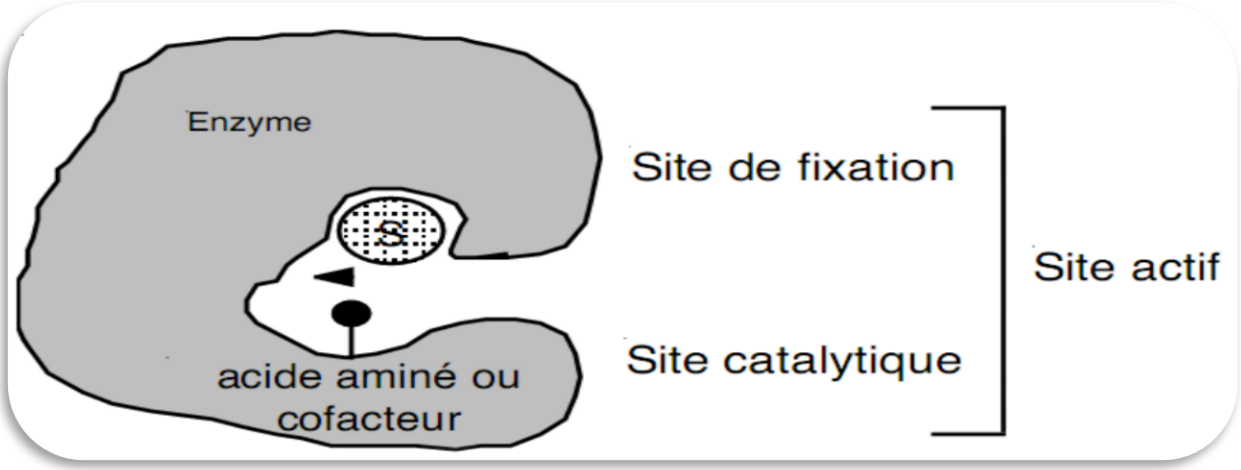


Fig.II.1. Représentation schématique d'une enzyme [Jamin et al. 2004].

- **Notion du site actif**

Le site actif d'une enzyme est la région privilégiée de l'enzyme qui interagit avec le substrat .Les acides aminés du site actif peuvent être divisés en deux groupes (Fig.II.1.):

- Ceux qui interviennent à la reconnaissance spatiale du substrat, en formant avec lui des liaisons non-covalentes (**site de fixation**).
- Ceux qui participent à la transformation chimique du substrat en produit (**site catalytique**).[Bensegueni et al.2005].

II.5. Classification et Nomenclature

II.5.1. Nomenclature

Une codification permet de donner plusieurs informations sur l'enzyme en question. Toutes les enzymes sont répertoriées sous un numéro portant 4 nombres séparés par des points et précédés de EC (ENZYME COMMISSIO) (Fig.II.2).

- Soit (Ec x1.x2.x3.x4) :

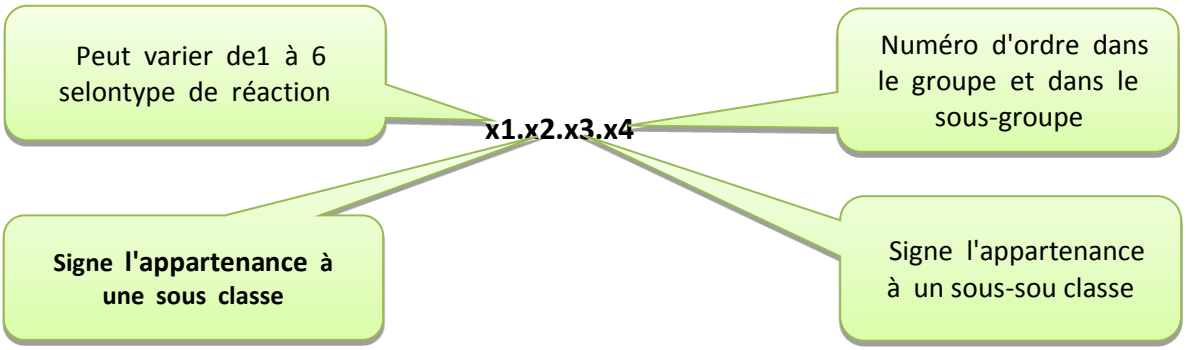


Fig.II.2. Nomenclature des enzymes.

Cette classification **officielle** précise et complète la nomenclature **fonctionnelle**. On trouve encore, à l'heure actuelle, la dénomination ancienne de certaines enzymes telle que trypsine ou pepsine, Cependant, dans la mesure où l'on s'intéresse moins à la nature qu'à la fonction de l'enzyme, on utilise plutôt la nomenclature suivante :

L'Union Internationale de Biochimie recommande l'utilisation du suffixe « ase » couplé parfois avec le substrat (uréase, …), mais généralement avec le type de réaction catalysée (oxydase,…). [Fabiano.2002]

II.5.2.Classification

Selon la commission des enzymes de l'I.U.B. (International Union of Biochemistry), les enzymes se répartissent en six grandes classes. Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases [Bergmeyer.1979]. Le tableau ci dissous présente les grandes lignes. (Tableau II.1):

Tableau II.1.Classification des enzymes selon la commission des enzymes de l'union Internationale de biochimie [Augère .2001].

Classe	Type de réaction catalysée
Oxydoréductases (EC 1.x.x.x)	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène).
Transférases (EC 2.x.x.x)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, … etc.).
Hydrolases (EC 3.x.x.x)	La coupure de liaisons par hydrolase.
Lyases (EC 4.x.x.x)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
Isomérases (EC 5.x.x.x)	Changement de configuration d'une molécule.
Ligases (EC 6.x.x.x)	La condensation de deux molécules par couplage avec la rupture d'une liaison à haut potentiel énergétique.

II.6. Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique étudie la vitesse des réactions enzymatiques, l'approche cinétique des réactions enzymatiques fournie des informations sur le mécanisme de la réaction, la spécificité de l'enzyme par rapport à son substrat, la présence éventuelle d'effecteurs ainsi que sur les propriétés physiques des enzymes. La cinétique enzymatique peut être suivre en mesurant la disparition du substrat ou on mesurant l'apparition du produit au cours du temps. [Augère. 2001] (Fig. II.3.).

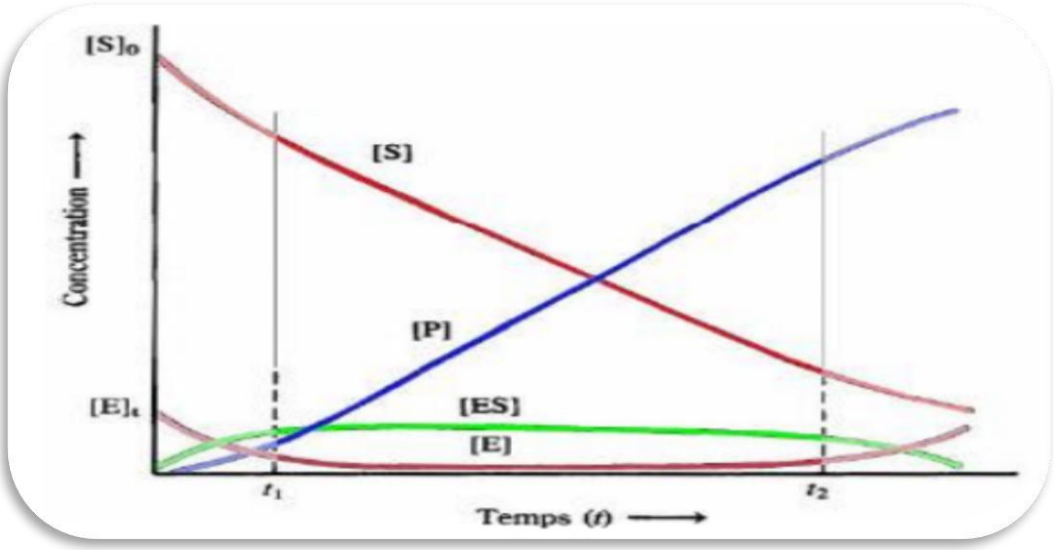


Fig. II.3. Evolution de la concentration du substrat (S), produit (P), complexe (ES), et de l'enzyme (E) en fonction temps [Augère.2001].

Où $[S]_0$ est la concentration initiale de substrat et $[E]_t$ la concentration totale d'enzyme ($[E]_0$=[E] + [ES]).

L'hypothèse de fonction complexe E-S était nécessaire pour interpréter la forme hyperbolique de la courbe vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration de substrat [Voet et al .2001] (Fig.II.4).

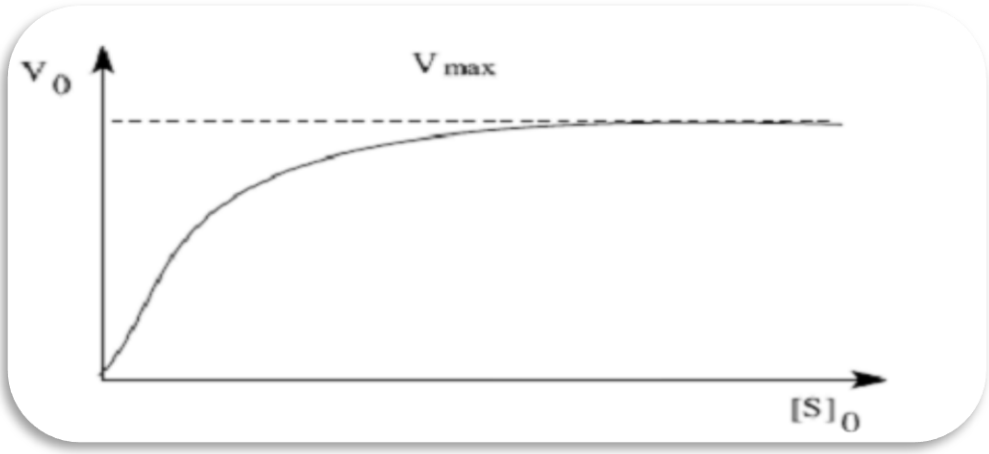


Fig.II.4. Relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat [Voet et al.2001].

II.6.1. Equation de Michaelis - Menten

En 1913 Maud-Menten et Léonor Michaelis résolvent le système réactionnel en posant les hypothèses simplificatrices, suggérées par les études expérimentales : [Cinquin et al.2010]. Le schéma réactionnel s'écrit :

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{K_2} E + P \quad \text{II.1.}$$

Dans ces conditions, la vitesse de la réaction devient **:**

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_M + [S]_0} \quad \text{II.2.}$$

Où

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad \text{II.3.}$$

Cette équation est appelé de Michaelis-Menten où:

V_{max}: vitesse maximale est atteinte lorsque tous les sites de l'enzyme sont saturés par le substrat. C'est-à-dire lorsque $[E]_0 = [ES]$.

K_M: est la concentration de substrat qui sature l'enzyme à moitié. C'est une mesure de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis le substrat: plus l'affinité est élevée, plus K_M est petit. [Jarrar.2011]

II.6.2. Unité d'activité enzymatique

La biochimie s'est aussi occupé de rendre compte de l'activité enzymatique en utilisant un formalisme commun pour l'ensemble des enzymes, il existe plusieurs façons d'exprimer l'activité d'une enzyme [Augère. 2001]:

- **Unité internationale d'activité (UI)** : une unité est la quantité d'enzyme transformant une µmole de substrat par minute dans les conditions optimales de dosage.
- **Unité officielle ; katal (kat) :** la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde (1kal=1mole.s^{-1}), en réalité cette

unité est peu commandé car trop grande, les biochimistes utilisent alors le microkatal (10^{-6} kat), le nanokatal (10^{-9}), ou le picokatal (10^{-12}).

- **Activité spécifique(AS) :** On rapporte le nombre d'unités enzymatiques à la masse d'enzyme contenue dans le milieu réactionnel, on obtient l'activité spécifique en kat.mg^{-1}.

- **Activité molaire spécifique (absolue) (ASM)** : y nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme et par seconde. C'est une caractéristique de l'enzyme et ne peut se calculer que si la préparation enzymatique est pure. L'ASM correspond à la constante catalytique (kcat) ou turn over de la réaction et s'exprime en $seconde^{-1}$. [Genard et al.1996].

II.6.3. Facteurs influençant la vitesse des réactions enzymatiques

a) Influence de la température : la réaction enzymatique a une vitesse globale augmente lorsque la température augmente (a composition constante) mais une augmentation de la température se traduit aussi par une dénaturation de l'enzyme et donc une baisse de l'activité catalytique, la compétition entre les deux effets se traduits par l'existence de la température optimale[Moussard.2002].

b) Influence du pH : la plupart des enzymes ne sont actives que dans un domaine de PH bien défini. l'évolution de l'activité enzymatique en fonction du PH se présente sous la forme d'une courbe de Gauss, ayant une évolution similaire à celle de la température .un PH optimal est observé et dépend du site actif de l'enzyme et de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. en effet, le PH va influer l'activité enzymatique via l'état d'ionisation du site actif de l'enzyme (influence sur la conformation de l'enzyme) ou du substrat (une seule forme est catalysée)[Atkins .1982].

c) Influence de la force ionique du milieu : La nature des sels de la solution tampon ainsi que la variation de la force ionique engendrée par ceux-ci va influer sur la vitesse d'une réaction enzymatique. En effet, une enzyme peut présenter une activité plus ou moins grande selon le tampon de travail choisi et ce pour un même pH. Il est donc indispensable de tenir compte des forces ioniques afin d'obtenir des résultats reproductibles [Kumar et al .2001].

d) Influence des inhibiteurs : Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Il peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place et rendre l'enzyme moins active.

II.7. Conclusion

L'utilisation des enzymes dans divers domaines industriels présente donc un fort intérêt et explique les efforts faits ces dernières années par la communauté scientifique dans ce sens. Cependant, elles restent des entités faisant partie du domaine du vivant et leur emploi nécessite de prendre certaines précautions notamment afin de conserver leur propriétés catalytiques. De plus chaque enzyme présente des particularités, il n'existe pas de solution universelle applicable à l'ensemble de cette classe de protéines[JARRAR.2011].

III. IMMOBILISATION DES ENZYMES

III.1. Introduction :

L'utilisation d'enzyme est de plus employée dans les secteurs industriels du à leur facilité de production, de spécificité au substrat et sa limitation de formation de sous-produits. Cependant, pour la grande d'ampleur commerciale leur facteur de réutilisation devient obligatoire, échouant qu'elle ne serait plus économique. Ainsi l'entretient de leur stabilité structurale pendant n'importe quelle réaction biologique est fortement provocante [Sumitra et al.2013].

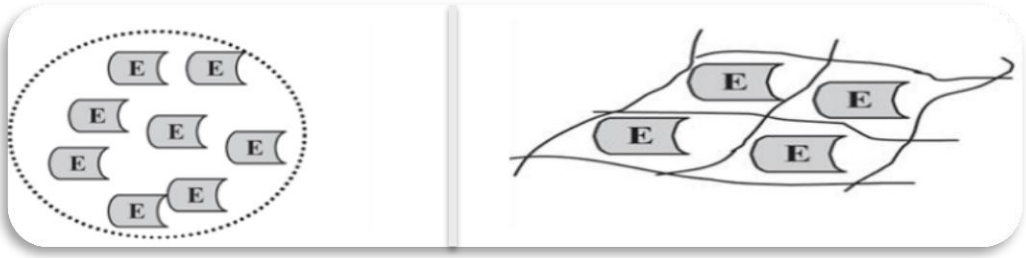
III.2. Définition

Les enzymes immobilisées sont des enzymes physiquement confinées ou localisées dans certaine région définie de l'espace avec la conservation de leurs activités catalytiques, et qui peut être utilisé à plusieurs reprises et sans interruption.

Plusieurs termes a été employée pour le définit : l'enzyme fixée, l'enzyme insoluble dans l'eau, l'enzyme piégée. Cependant le terme "enzyme immobilisée " a été recommandé pour la 1er fois en 1971 à la conférence de génie enzymatique [Beatriz et al .1995)].

III.3.Techniques d'immobilisation

La méthode est basée sur l'occultation d'une enzyme dans le réseau d'un polymère insoluble dans L'eau, dans une fibre creuse, ou emprisonnées dans les microcapsules, éliminées par une membrane semi perméable qui permettre au substrat et au produit de passer mais le maintient l'enzyme [Beatriz et al.1995] (Fig.III.1).



Enzymes encapsulées Enzyme inclut dans un réseau



Enzyme retenue dans une fibre crue

Fig.III.1.méthodes d'immobilisation des enzymes par inclusion [Fabiano. 2002].

Ces procèdes d'immobilisation permettre de piéger fortement l'enzyme, mais elles sont limitées par la difficulté de transfert de masse par la membrane ou le gel. Ainsi les fuites d'enzyme à cause de la distribution large dans la taille de pores des gels synthétique [Goel. 1994].

III.3.1.Immobilisation par liaison à un support

La fixation à un support est la technique d'immobilisation la plus ancienne .la quantité d'enzyme lié au support et l'activité après l'immobilisation dépend de la nature de support. Le schéma suivent indique comment l'enzyme se fixe sur un support [Seung wook. 2007] (Fig.III.2.).

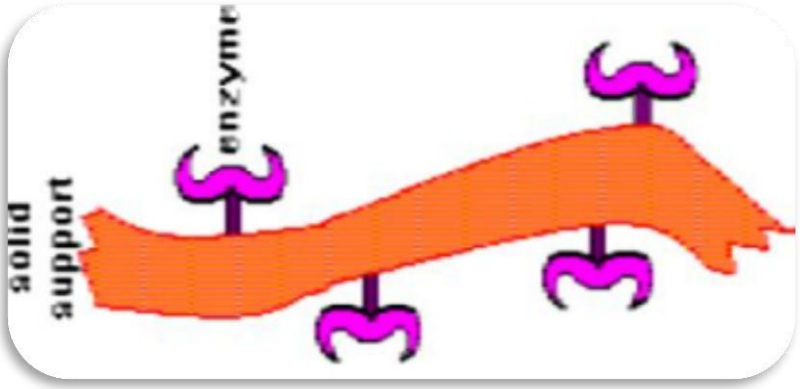


Fig.III.2. Fixation des enzymes à un support [Seung wook. 2007].

La sélectivité du support dépend de la nature de l'enzyme lui-même ainsi la taille de la particule du support, de la surface de contact et de la composition chimique. La fixation d'enzyme sur le support peut être réalisée par différentes manières [D'souza .1999] :

A. Adsorption

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface [Wang et al.1995 ; Ruzgas et al.1996]. 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) (Fig.III.3.).

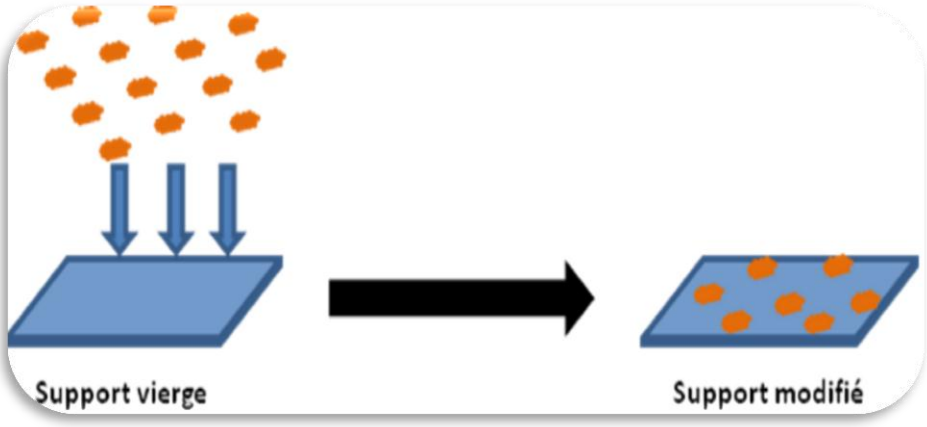
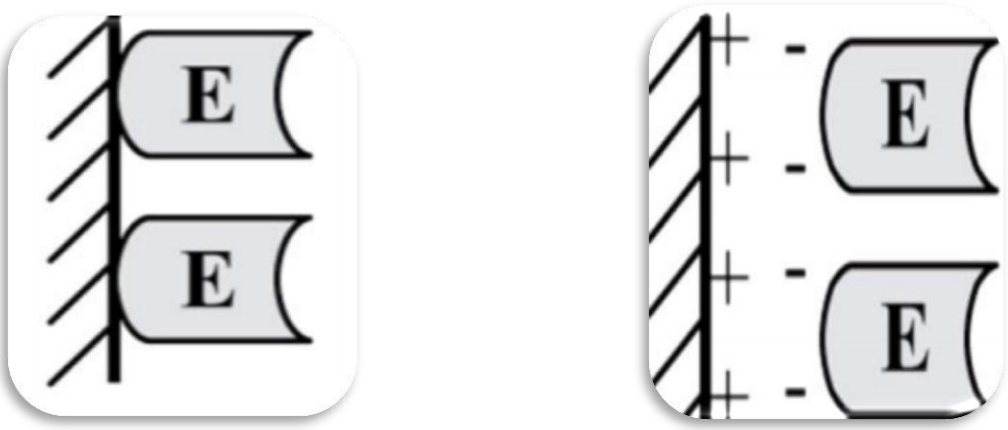


Fig.III.3. Adsorption des enzymes sur un support [Wang et al.1995].

B. ionique

la fixation est fondée sur l'attache ionique réversible de la partie enzymatique au support insoluble dans l'eau. Contenant les résidus d'échange des

ions.la fixation est simple, mais elle cause des changements dans la conformation de l'enzyme et son site actif, ainsi il y a des fuites d'enzyme [Seung wook.2007] (Fig.III.4).



Adsorption Fixation ionique.

Fig.III.4. Mode de fixation non covalente sur un support [Beatriz et al.1995].

C. Liaison covalente

La fixation covalente est basée sur l'adhésion irréversible de groupement fonctionnel réactif du support et la partie non-fonctionnel de l'enzyme. Cette méthode est relativement chère et compliquées dans les procédures qui sont impliquées ; en outre, les rendements d'activité peuvent être bas du à l'exposition de l'enzyme aux environnements durs ou au réactifs toxiques [Seung wook.2007] (Fig.III.5.).

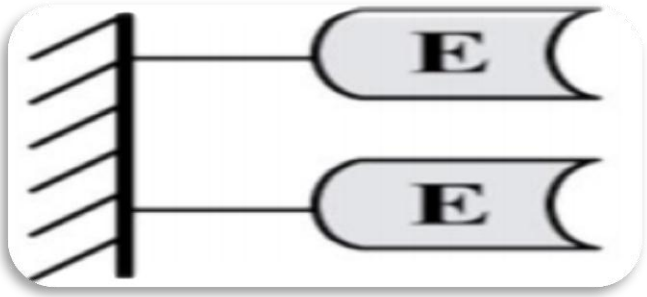


Fig.III.5. Liaison covalente entre l'enzyme et le support [Beatriz.1995].

III.3.2. Réticulation

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulant qui va permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques [Goel.1994]. 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 (fig. III.6).

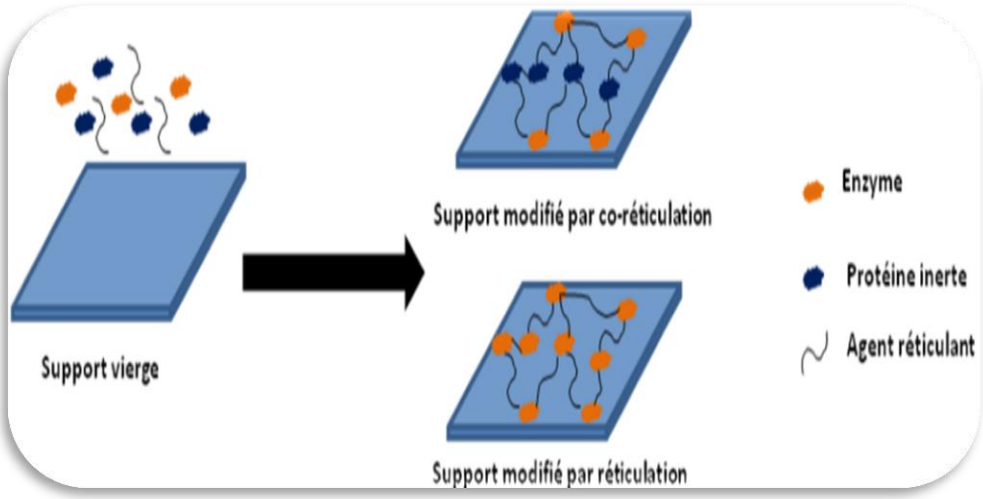


Fig.III.6. Réticulation et co-réticulation des enzymes. [Goel. 1994]

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. [Mindt. 1974]

III.4. Propriétés des enzymes immobilisées

III.4.1. Propriétés physico-chimiques

Une des propriétés importantes est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support [Fabiano .2002].

III.4.2. Propriétés cinétiques

L'immobilisation des enzymes affecte beaucoup leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter

l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale V_{max} et de la constante de Michaelis K_M de l'enzyme ; cette dernière constante pouvant avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le PH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons [Fabiano.2002].

III.5. Conclusion :

La techniques d'immobilisation déjà citée semblent entrainent de manière générale des modifications chimiques qui altèrent les catalytiques de l'enzyme immobilisée.
En conséquence, les enzymes immobilisées avec l'efficacité fonctionnelle de la reproductibilité augmentent son exploitation comme solution de recherche dans les processus médicinaux et biotechnologiques [Sumitra et al.2013].

IV .LA PEROXYDASE

IV.1. Introduction :

La capacité des peroxydases de traiter les polluants organiques est passée en revue, les méthodes enzymatiques ont généralement les bas besoins en énergie ; sont facile à contrôler, peuvent fonctionner dans des conditions irrégulières et avoir un minimum impact sur l'environnement [Torres et al.2003].

IV.2. Définition

Les peroxydases (EC.1.11.1.7) sont des enzymes largement distribuées dans la nature, sont des oxydoréductases, qui utilisent les peroxydes (comme le peroxyde d'hydrogène) comme un Co-substrat pour oxyder une variété de composés organiques et/ou inorganiques.. Leurs activités ont été identifiées aux plantes, microorganismes, et les animaux ou ils jouent des rôles importants.

Les peroxydases sont des hémoprotéines, ils ont un poids moléculaire s'étendue de 30.000 à 150.000 Da. Catalysent la réduction de peroxydes (ROOH) comme accepteur d'électron tels que le peroxyde d'hydrogène et oxydation de

variété de composés organiques et minéraux variable d'une classe de peroxydase à une autre.[Regalado et al. 2004 ; Boucherit. 2016]

IV.3. Historie

Avant même que la notion d'enzyme eût été formulée, planche (1810) constatais que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc de colorer le gaïac (bois très dur, incolore à l'état réduit) en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce type d'enzyme, a notamment pour fonction de décomposer les peroxydes, dérivés toxiques de l'oxygène, comme par exemple le peroxyde d'hydrogène ce qui lui vaut son nom.

Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent connues dans les moindres détails, l'une des plus répandues qui soient, est la peroxydase.

La source traditionnelle la plus commune de la production de la Prx est la racine de raifort ou celle du radis noir (horseradish en anglais). C'est pourquoi les chercheurs la connaissent plutôt sous les initiales HRP (horseradish peroxydase). [Medjeldi Marzougui. 2012 ; Passardi et al. 2005].

IV.4. Nomenclature (EC)

La nomenclature EC (EC est le sigle de Enzyme commission) est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent .La première version de cette classification fut publiée en 1961 et elle est régulièrement remise à jour par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB).

Le code enzymatique consiste en les lettres majuscules EC, suivies de quatre nombres séparés par des points. Chacun de ces nombres représente une étape dans la précision de classification de l'enzyme. Le premier nombre variant de 1 à 6, indique le type de réaction catalysée : 1. Oxydoréductases (EC. 1) ; 2. Transférases (EC .2) ; 3. Hydrolases (EC. 3) ; 4.Lyases (EC. 4) ; 5. Isomérases (EC. 5) ; 6. Ligases ou synthétases (EC. 6) .Le second nombre indique le substrat général impliqué dans la réaction, le troisième, le substrat spécifique impliqué et le quatrième, le numéro de série de l'enzyme.

Par exemple, la peroxydase a pour code EC : 1. 11. 1 .7 qui est construit comme suit : 1 signifie une oxydoréductase ; 1.11 : regroupe les oxydoréductases qui agissent sur les peroxydes comme accepteurs d'électrons ; 1.11.1 : implique celles qui utilisent H_2O_2 comme peroxyde ; 1.11.1.7 : indique précisément une peroxydase. [Medjeldi Marzougui. 2012].

IV.5.Sources et classification

En réalité, il n'y a pas une Prx mais des Prx car ce type d'enzymes existe chez presque tous les êtres vivants : animaux, végétaux et microorganismes (champignons et bactéries).Elle ne manque que chez les anaérobies stricts pour lesquels l'oxygène moléculaire est un poison. [Medjeldi Marzougui. 2012].

Plusieurs travaux ont rapporté la purification des Prx à partir de plantes supérieures [Sakharov et al .2000; Fuhrs et al. 2009], D'algues [Sano et al.2001; Almeida et al.2001], de microorganismes [Burke et Crawford.1998 ; Apitz.2001.] Et d'animaux [Nagai et al. 2002.].

On distingue deux grandes familles de la peroxydase : les peroxydases animales, principalement détectées chez les animaux, et les peroxydases non animales détectées chez les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes. [Regalado et all. 2004 ; Mohsina et al.2009].

Les peroxydases non animales sont actuellement subdivisées en 3 classes :

- **Classe I** : peroxydases intracellulaires ; celles-ci incluent : la peroxydase de cytochrome C de levure (ccp), peroxydase d'ascorbate chloroplaste et de cytosol (APx), et peroxydases bactériennes a gène reproduites. [Conesa et al.2002].
- **Classe II** : peroxydases fongiques extracellulaires ; ce type de peroxydase est isolé de différents mycètes, particulièrement (WRF). La Manganèse peroxydase (MnP) et la Lignine peroxydase (LiP) sont des glycoprotéines, les plus impliquées dans la transformation des colorants synthétiques, leurs sources peuvent êtres différentes. [Husain et al.2010]
- **Classe III**: peroxydases des plantes (Fig. IV.1.) ; catalysent L'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

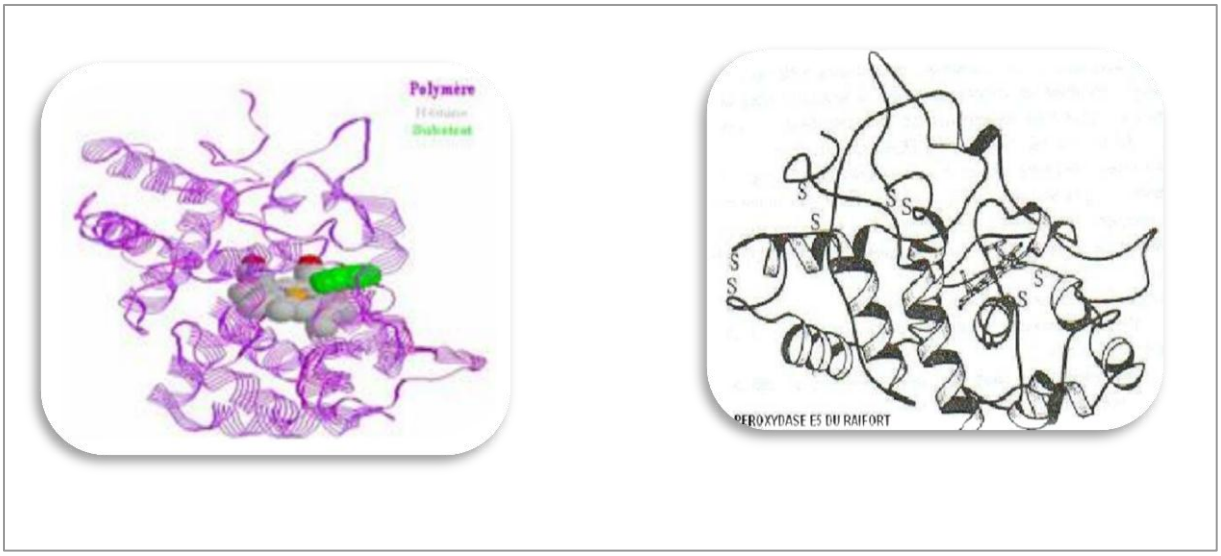


Fig. IV.1. Structure de la peroxydase de Raifort (navet noir) [1]

Ce sont des glycoprotéines contenant de la ferriprotoporphyrine IX comme groupe prosthétique et du calcium.

Les peroxydases jouent de grands rôles dans la croissance, le développe- ment et le système de défense des plantes. Ces enzymes forment une famille multigénique. Ainsi, Un séquençage complet a permis de montrer l'existence de 73 gènes codant une peroxydase de classe III chez Arabidopsis thaliana .La plupart de ces gènes sont exprimés, soit de façon constitutive, soit à la suite de divers stress. L'isoforme E5 de la peroxydase du raifort de 36 Kd, est constitué de 306 acides aminés, deux glucosamines, huit sucres, une protohématine et deux ions Ca^{++} [Morita et al. 1993 ;Tognolli et al.2002] (Fig. IV.1.)

Ainsi, cette classe de peroxydase est très impliquée dans le domaine de biotechnologie : en médecine, en biologie, et en chimie. Depuis plusieurs années, des études ont montrés leur capacité de décolorer et de transformer les phénols, les amines aromatiques et les colorants textiles efficacement. [Cooper et al.1996].

Dans la cellule végétale, la peroxydase intervient dans plusieurs processus physiologiques :

- Respiration et photosynthèse ;
- Synthèse et dégradation des hormones ;
- Décomposition de H_2O_2 du cytosol ;

- Oxydation des composés toxiques ;
- Biosynthèse de la paroi cellulaire et de l'éthylène ;
- Réponse de défense ; etc. [Yoshida et al.2003].

IV.6. Application industrielles de la peroxydase

Récemment, les peroxydases reçoivent une attention particulière comme biocatalyseurs pour les applications de biosynthèse, de biotransformation et autres. La variété des réactions que catalyse la peroxydase a conduit en leur exploitation dans les applications biotechnologiques.

Leurs application industrielles a fait l'objet de plusieurs études, comme l'élimination des peroxydases des rejets industriels, décoloration et traitement des composés phénolique, des amines aromatiques et d'autres réaction de biotransformation. Ainsi il a été montré leur application en biochimie clinique et comme testeurs immunologique [Adam et al.1999].

■ **Dégradation Des Colorants Synthétiques**

A nous jour, plus de 10000 colorants mis sur le marché international avec une production de 7.10^5 tone /an. Ces colorants sont conçus d'une manière qui soit stable et résistantes à la lumière, la température, les détergents et l'attaque microbienne [Torres et al.2003].

En effet, plusieurs activités industrielles utilisent ces colorants et en parallèle, environ de 10-15% des colorants synthétiques produits sont déchargés dans les effluents industriels causent des problèmes environnementales grâce à leurs structure moléculaires complexe et résistance à la dégradation biologique [Regalado et all. 2004].

Ces propriétés rendent les méthodes traditionnelles de traitement insuffisantes et inefficaces. Quelques auteurs ont montré que la destruction oxydante des composés colorés est sensiblement stimulée par les enzymes oxydantes, ces colorants contient au moins un groupe aromatique, ce qui leur fait des substances agréables pour des types de peroxydases ; la peroxydase de raifort (HRP) soyer efficace en dégradation et précipitation des colorants azoïques importants tel que : bleu de Remazol et rouge de cibarcon [Mohsina et al. 2009].

■ **Traitement Des Composés Phénoliques**

Les peroxydases sont connues aussi par leur capacité de polymériser certains composés organiques récalcitrants tels que les phénols, les phénols substitués et amines aromatiques présents dans les eaux usées des raffineries de pétrole et de nombreuses autres industries, y compris les plastiques, textiles et les industries forestières. Leur présence dans les rejets présente un risque major pour la santé publique [Hamid et al. 2009 ; Cooper et al. 1996].

Le mécanisme de transformation peroxydasique des composés phénoliques se fait en premier lieu par la formation des radicaux phénoxy qui après leurs diffusion du site actif de la peroxydase réagissent pour former des dimères, des oligomères ou des polymères insolubles qui peuvent séparés par simple décantation [Ratna et al. 2012 ; Reihmann et al. 2006].

La majorité des études sur la transformation des phénols et des amines aromatiques, se rapporte sur les peroxydases de raifort, de navet et de courgette (BGP) sous forme libre ou immobilisée. Ainsi, un tel traitement se fait dans des conditions expérimentales douces. Par conséquent, des études de l'effet du PH, la concentration en substrat, le temps de réaction et l'effet de quelques additifs ont été étudiés, pour optimiser des états de réaction [Dalal et al.2007; Akhtar et al. 2006].

■ **Synthèse Organique Et Polymère**

Les radicaux libres produits pour catalyser de peroxydase peuvent participer à différentes réactions post-enzymatiques. La polymérisation oxydante des composés aromatiques négociés par des oxydoréductases a été étudiée pour créer les nouveaux polymères fonctionnels et synthétiser des résines phénoliques sans employer le formaldéhyde toxique qui doit être employé dans la polymérisation chimique [Regalado et al. 2004].

■ **Biodétecteurs De Peroxydase**

Un domaine qui offre un grand potentiel pour la peroxydase est son application comme des biocapteurs électrochimiques. Récemment, l'utilisation des électrodes à base de peroxydase est repandue dans les systèmes analytiques. Pour la détermination du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques, la

peroxydase est utilisée sous forme immobilisé avec une enzyme produisant peroxyde d'hydrogène [Regalado et al.2004].

■ **Application Pour Analyse Et Diagnostique**

Le lactose contenu en lait et produits laitiers est déterminé par diverses méthodes analytiques pratiques exigeant les personnes qualifiées et instruments sophistiquées : tel qu'un spectrophotomètre, un biocapteur...etc. Sharma, Sehgal et Kummer (2002) ont développées une simple et économique technologie de Biostrip pour l'évaluation de lactose et HRP sur un support polymère. La Biostrip a été plongé en lait ou un produit laitier et un couleur développé à partir d'un chromogène supplémentaire, il a été employé pour estimer le lactose dans la gamme de concentration < 20-100 g/l [Mohsina et al.2009].

IV.7.Cycle Catalytique De Peroxydase

Le cycle catalytique de la peroxydase se produit par des réactions en plusieurs étapes, il Implique :

Premièrement, l'enzyme à l'état natif réagit avec un peroxyde d'hydrogène. Cette étape inclue le transfert d'un oxygène de peroxyde vers l'état ferrique d'enzyme pour former un composé intermédiaire instable qui est le composé I (cpd I) avec la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau.

Dans cette dernière étape, le composé I contient un centre oxyferryl avec un fer sous l'état ferryl (Fe^{IV} = O). Par la suite, le composé I oxyde un substrat (SH) pour donner un radical et le composé II (cpd II) qui à son tour oxyde une seconde molécule de substrat pour donner l'hème native [Abed et al.2014] (Fig. IV .2).

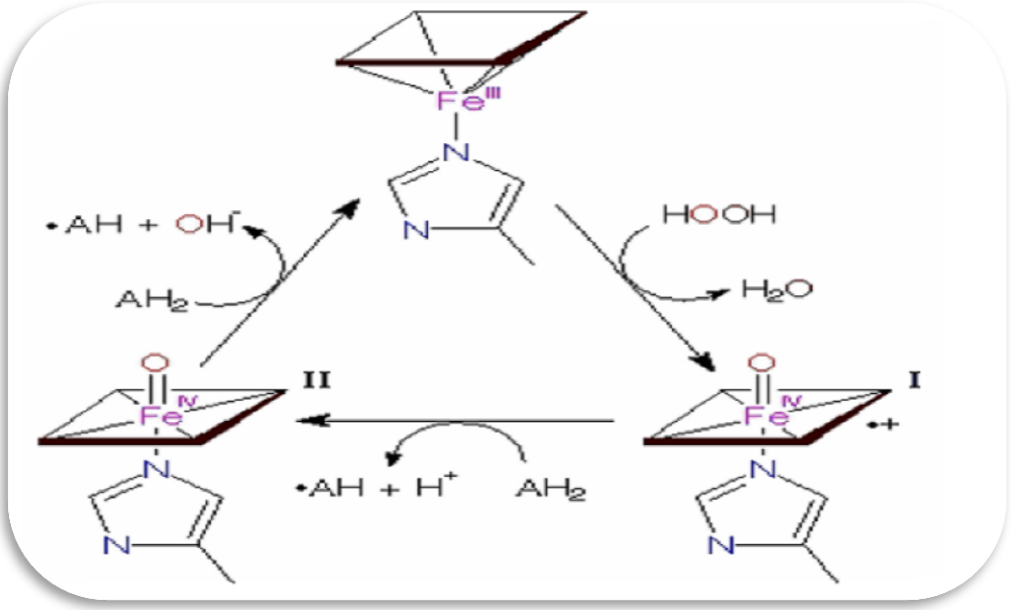


Fig. IV .2.Mécanisme réactionnel de la peroxydase. [2]

IV.8.Conclusion :

Les peroxydases ont de larges spécificités de substrat et peuvent catalyser l'oxydation d'une variété de composés organiques. Les résultats prouvent qu'une oxydation enzymatique peut diminuer la toxicité d'un certain hydrocarbure aromatique polycyclique, phénols, pesticides ; les colorants azoïques….etc. [Torres et al.2003].

Partie B :
Matériel et méthodes

V : Matériel et méthodes

V.1. Introduction :

Dans ce travail, on s'est intéressé à déterminer quelque propriété de deux colorants : RC et NET après traitement enzymatique.

Où nous avons essayé d'atteindre les objectifs suivants :

1. Traitement des colorants par la peroxydase d'origine végétale : il s'agit de navet blanc ;
2. Caractérisation des précipités et des surnageant issus de traitements enzymatique.

Pour ce faire, nous avons adopté le plan expérimental suivant :

-Extraction et purification de la peroxydase de navet blanc

- Application du procédé de traitement sur deux colorants azoïques RC et NET par voie enzymatique.

-Détermination des différentes propriétés des sous-produits récupérés.

V.2. Produits, matériels et méthodes :

V.2.1. Produits utilisés:

Les différents réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont présentés sur le tableau V.1.

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

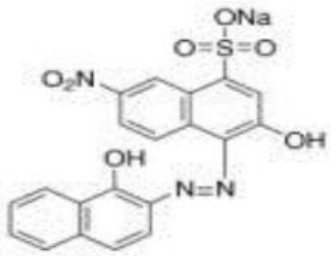
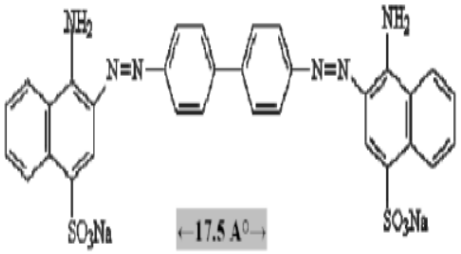
Réactif chimique	Structure chimique
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2 (30%)
Gaïacol	$CH_3OC_6H_4OH$
Acétone	C_3H_6O
Biphtalate de potassium monobasique	$KH_2\ PO_4$ (99%)
Ethanol	C_2H_6O (95%)
Chlorure de potassium	KCl (99.5%)
Acide chlorhydrique	HCl (36%)
Hydroxyde de sodium	NaOH (97%)
Alginate de sodium,	$(C_6H_7Na\ O_6)\ n$

Chlorure de calcium	($CaCl_2$)
Acide ortho phosphorique	H_3PO_4
Protéine	
Bleu de Comassie	G250

V.2.2. Caractéristiques des colorants utilisés :

Les caractéristiques des colorants utilisés sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau.V.2. Caractérisation physicochimique des colorants utilisés

Propriétés	**Noir ériochrome T (NET)**	**Rouge Congo**
Aspect	Solide noir	Solide rouge
Solubilité	80 g/L dans l'eau à 20°C	25g /L dans l'eau à 20°C.
Formule Brute	$C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$
Formule Développée		
Masse molaire	M=461.38 g/mole	M=696.663 g/mol

V.3. Matériel utilisé:

Tableau. V.3. Equipements et Verrerie utilisant.

Equipements:	**Verrerie:**
• Spectrophotomètre UV –Vis. (sp-3000nano) • Spectroscope Infra Rouge(SHIMARDZU). • Centrifugeuse (Hettich ZENTRIFUGEN). • Etuve(MEMMERT). • pH-mètre(DENVER). • Mixeur. • Agitateur (AGIMATIC-N).	• Tubes à essai. • Fioles jaugées (10, 50, 100,1000 ml). • Pipettes (1, 5,10 ml). • Erlenmeyers. • Eprouvettes (50 ml). • Cristallisoir. • Béchers.

• Balance(KERN). • Chronomètre. • Micromètre.	• Burette (100 ml)

V.4. Méthodes expérimentales

V.4.1. Extraction de la peroxydase

Pour notre étude, on s'intéresse à la peroxydase des plantes, particulièrement à la peroxydase extraire de navet, L'extraction de peroxydase a été réalisée selon le protocole suivant : 100g de navet épluchée et coupée en morceau a été homogénéisé avec 200 ml d'eau distillée dans un mixeur pendent 5 minutes, le mélange est ensuite filtré sur quatre couches d'une gaze propre. L'extrait obtenu est considéré comme source de la peroxydase brute. Il est conservé immédiatement sous 4°C pour des utilisations ultérieures [Ahmedi. 2010]. Les différentes étapes d'extraction et de purification sont illustrées sur la fig. V. 1.

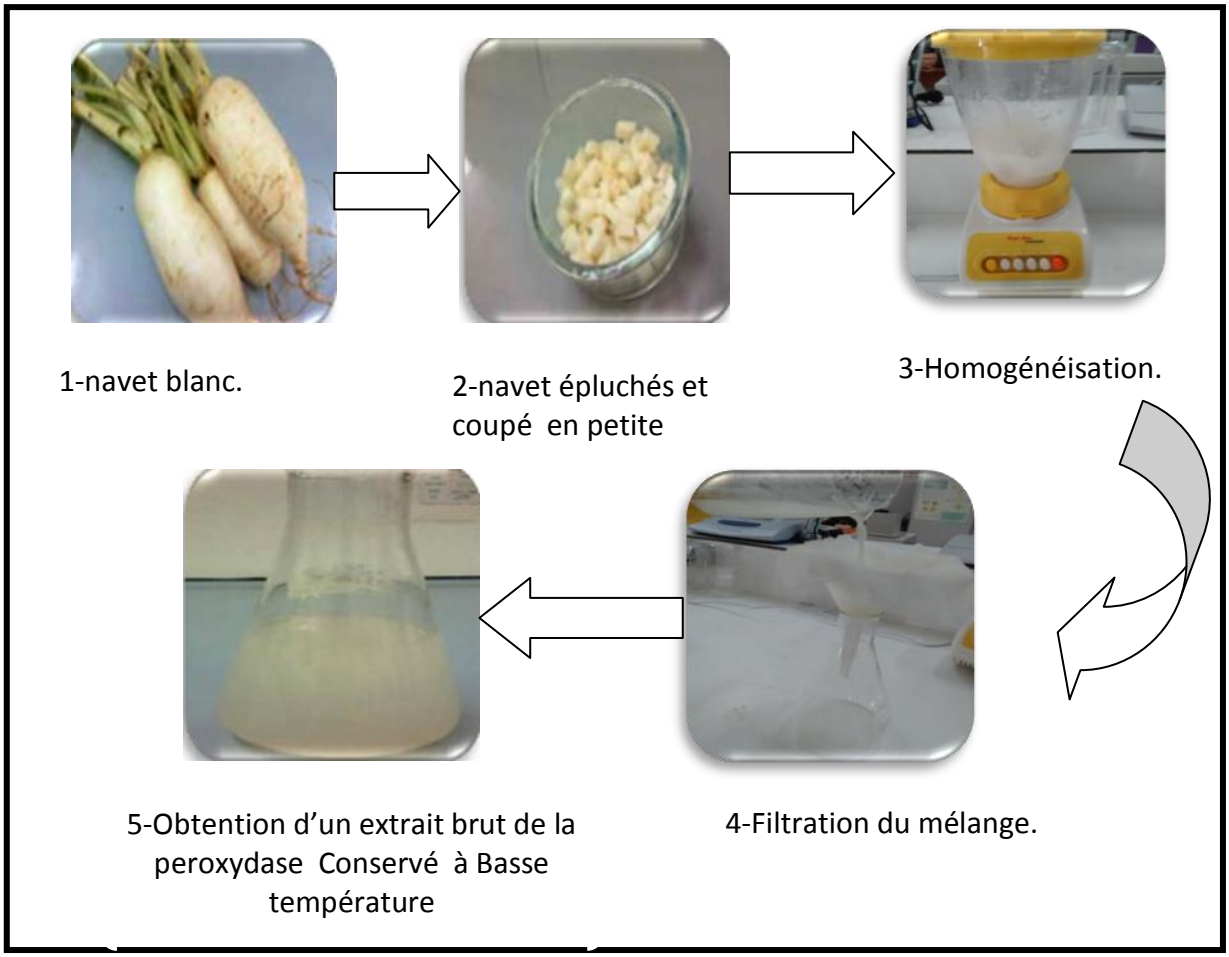


Fig. V.1: Protocole d'extraction de la peroxydase à partir du navet

V.4.2. Purification de la peroxydase par l'acétone

La méthode de précipitation à l'acétone a été appliquée par addition graduelle de 200ml d'acétone pré-refroidi à 200 ml à l'extrait brut de la peroxydase. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C, puis laisser le mélange à la repose pendant 2h à 4°C. La solution est ensuite centrifugée à 3000 tr .min^{-1}pendant 10 min. Ensuite, le précipité est dissout dans 25ml de solution tampon pH6, c'est l'extrait partiellement purifiée (EEPP). (Le protocole expérimental est illustré sur la fig. V.2.

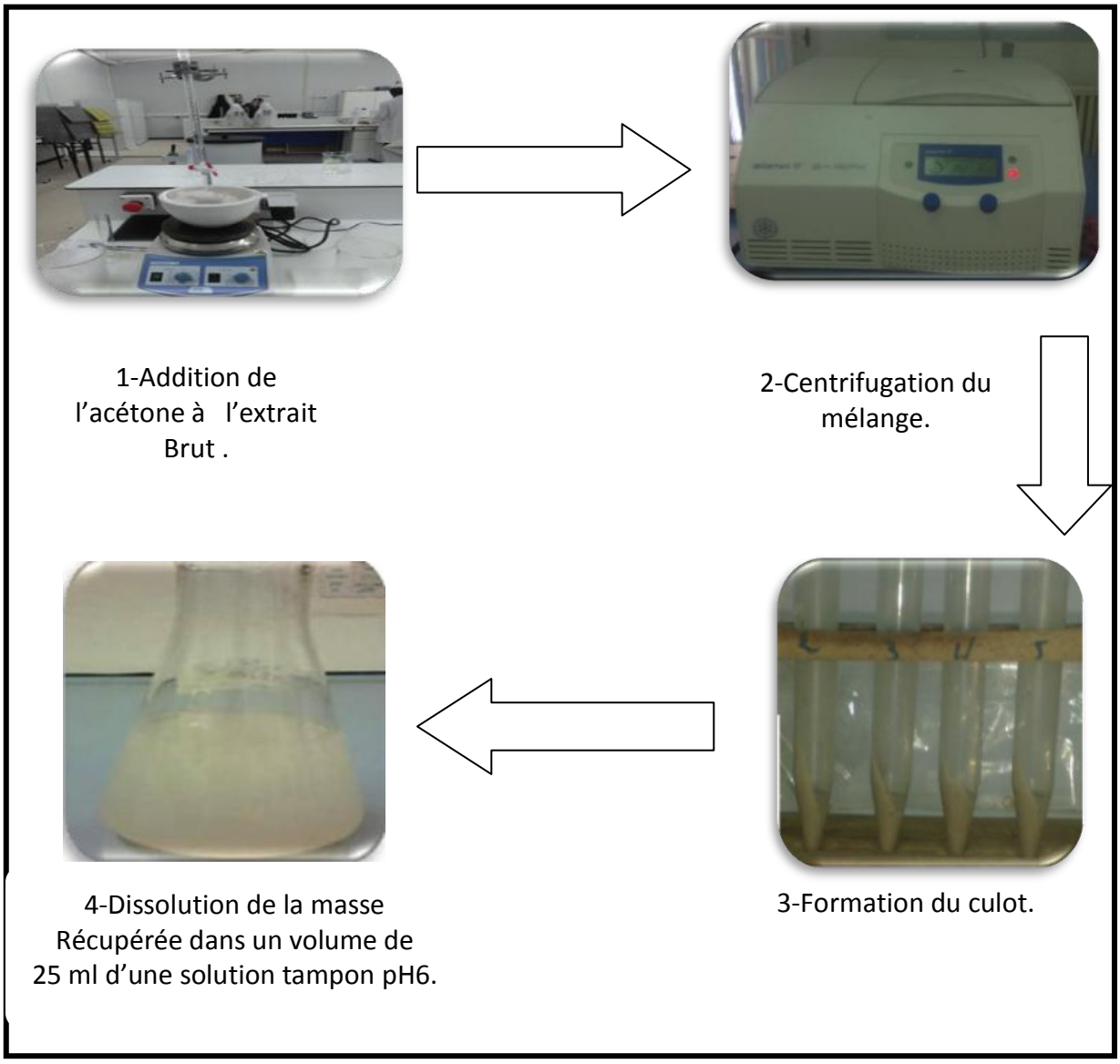


Fig. V.2: Protocole de purification de la peroxydase par précipitation à l'acétone.

V.4.3. Mesure de l'activité enzymatique des extraits avant et après la purification

La peroxydase consomme deux molécules de peroxyde 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 maximale de 474 nm. Le mélange réactionnel utilisé pour doser cette activité est préparé dans une fiole de 50 ml, contient les produits suivants :

- 1 ml de H_2O_2 à 0.1M.
- 1 ml gaïacol à 0.01M.
- Compléter par la solution tampon pH 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 langueur d'onde de 474 nm [Ahmedi. 2010].

V.4.4. Dosage de la quantité des protéines des extraits avant et après la purification

Le dosage de la quantité de protéines de chaque extrait (brut, partiellement purifié) est réalisé par la méthode de Bradford, la procédure de cette méthode avec le graphe sont commentés comme suit :

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance qui se manifestant par le changement de la couleur de bleu de Comassie après l'attachement avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleu, et possède en spectre d'absorption maximal estimé à 595 nm, les formes cationiques (libre) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant liée.

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford se fait selon le protocole suivant [Ahmedi. 2010] :

- Prendre 7 tubes, dans chaque un introduire :
- 0.25 ml NaOH (1 M).

- 5 ml de réactif de Bradford (**voir l'annexe II**).
- Pour les cinq premiers tubes à essais, ajouter 0.1 ml de l'albumine à différentes concentrations [0-100] (mg/L) avec un pas de 20 mg/L. et pour les 2 autres tubes à essais, introduire dans le premier 0.1 ml d'EEPP et dans le deuxième introduire le même volume de EEB.
- Agiter puis laisser les tubes 10 min pour développer la coloration
- Mesurer l'absorbance à 595 nm.

V.4.5. immobilisation de la peroxydase immobilisée dans l'alginate de sodium

L'immobilisation a été réalisée selon le protocole suivant **:**

- Dans un bécher, dissoudre 0.15 g d'alginate de sodium dans 10 ml de la peroxydase partiellement purifiée sous forme libre.
- Laisser le mélange peroxydase/alginate de sodium sous agitation jusqu'à l'obtention d'un mélange visqueux homogène.
- Laisser le mélange au repos pendant 20 min pour éviter la formation de bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$.
- Préparer les billes de la peroxydase immobilisée, en faisant verser le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue, dans 50 ml de solution $CaCl_2$ (0.05 M.)
- Laisser les billes sous agitation dans la solution de $CaCl_2$ pendant 1 heure.
- Rincer les billes avec l'eau distillée et les conserver dans une solution tampon de pH6 dans un réfrigérateur sous une température de 4°C [Ahmedi. 2010].

Le protocole de l'immobilisation de la peroxydase par l'alginate de sodium est détaillé dans la figure suivante :

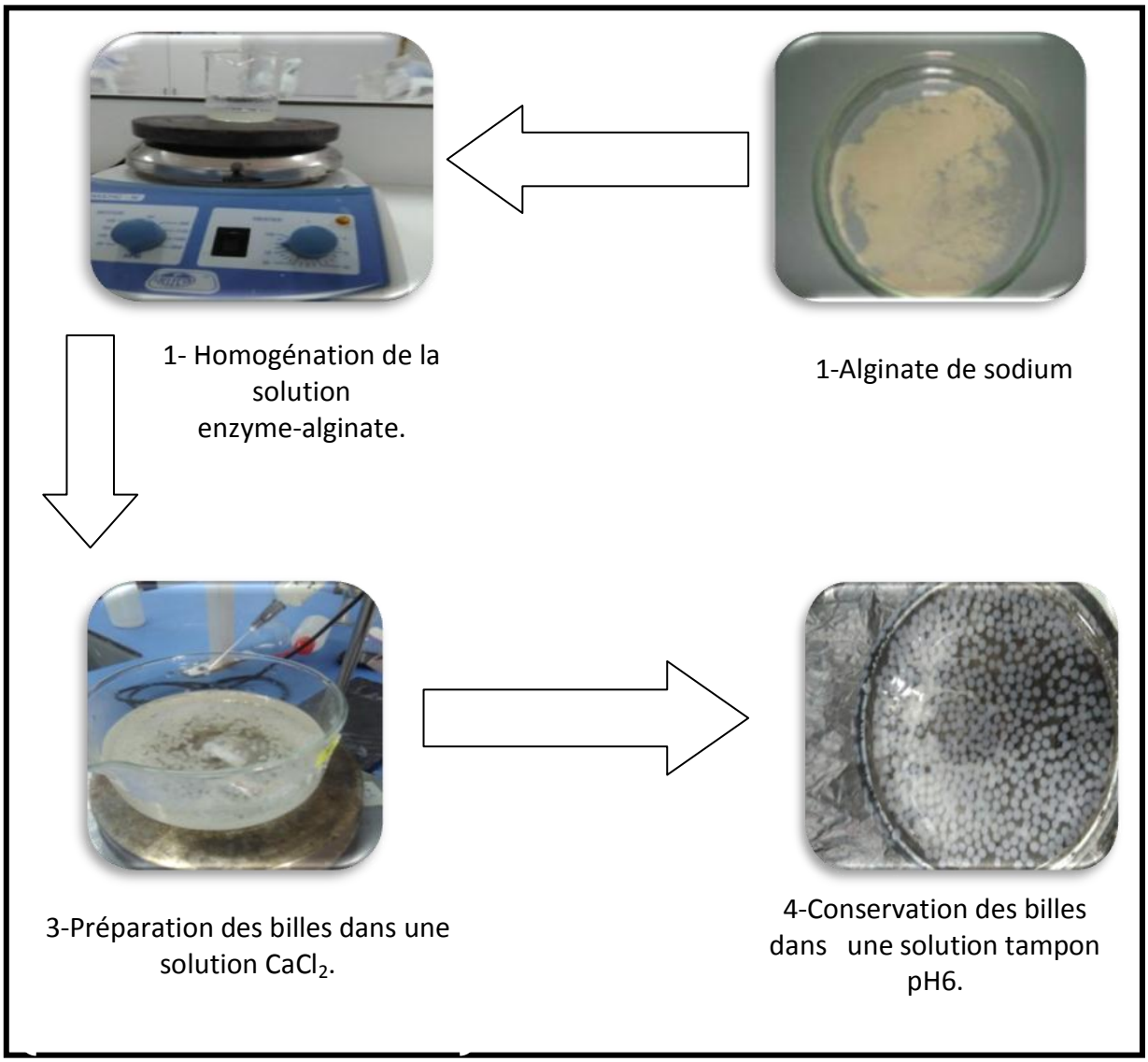


Fig.V.3. Protocole de l'immobilisation de la peroxydase par l'alginate de sodium.

V .4.6. Caractérisation physico-chimique des billes d'alginate/peroxydase:

Après immobilisation, on procède à la caractérisation des billes d'alginate par la détermination de la masse et du diamètre moyen de chaque particule en utilisent un micromètre, et la concentration d'enzyme par bille. Ceci permettra de valoriser l'effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique de l'enzyme libre partiellement purifié et calculer le nombre des billes équivalent pour atteindre la même activité enzymatique avec l'enzyme libre [Ahmedi. 2010].

V.4.7. Préparions des précipités par la décoloration avec la peroxydase :

Un volume réactionnel de 1l, contenant des solutions de concentration fixes de colorant (50mg/L), de peroxyde d'hydrogène (0.05M) et de solution tampon à pH2.

- La réaction est lancée par l'ajoute de 5g de la peroxydase immobilisé.
- Après avoir une dégradation totale les mélanges sont centrifugés à 3000tr/min pendant 10min. Les surnageant et les précipités obtenus sont récupérés pour faire des analyses.

Le protocole expérimental de traitement des deux colorants est résumé sur la fig. V.4.



1-Mélanges réactionnels des colorants : RC et NET à 50mg/l avant traitement enzymatique.



2. Mélanges réactionnels des colorants après addition de H_2O_2 et la solution tampon pH2.



3. Surnageant récupérés après traitement après traitement enzymatique des colorants.



4. Précipités récupérés après traitement après traitement enzymatique des colorants.

Fig.V.4. Protocole expérimental de décoloration par la méthode enzymatique.

V.4.8. Caractérisation des produits de transformation :

V.4.8.1. Analyse spectrale UV-Vis et FTIR:

- Les différents surnageant récupérés sont analysés par spectrophotomètre UV-vis.
- Les différents précipités sont séchés à 60 °C pendant 24 h puis analysés par IR.

V .4.8.2. Test de phytotoxicité:

Les solutions de colorant a 100mg /l et de (surnageant +précipité) seront utilisés pour l'irrigation de 9 graines de fèves et de blé pendant 15 jours en comparant avec un test témoin à base de L'eau distille. Le test est déclenché par arrosage de 100ml de chaque solution dans le pot et le contrôle se fait chaque 24h pendant 15 jours. Cependant, Une comparaison entre les différents échantillons pendant et après germination sera faite pour le témoin, le colorant et le surnageant.

Le taux de germination(TG) (%), la longueur moyenne des tiges(LMT), la longueur moyenne des racines(LMR), des feuilles (LMF) et le nombre moyen des feuilles (NMF) sont mesurés.

V.4.8.3. Test de toxicité :

L'analyse des produits de la transformation enzymatique dans l'effluent ou dans les précipités n'est qu'une approche permettant de mieux comprendre les mécanismes réactionnels. Du point de vue Environmental, il est nécessaire de garantir que le procédé proposé n'engendre pas un autre type de pollution ou des produits de dégradation qui soient à leur tour polluants ou toxiques, et nécessitent par la suite un traitement ultérieur. Pour cela, donc, des tests de toxicité ont été menés sur les produits obtenus après traitement enzymatique.

Mode opératoire :

Le but de ce test est de déterminer la classe de toxicité des produits précipités suite à la transformation enzymatique. Nos expériences ont été effectuées sur sept lots de souris, chaque lot contient cinq souris en utilisant des doses choisies de façon arbitraire entre 1mg/kg et 1 g/kg en englobant les cinq classes de toxicité. Les souris destinées pour le test sont de masse entre 17 et 22 g et l'administration des échantillons des produits se fait par voie orale (le gavage) en donnant 0.5 ml de la solution pour chaque souris. L'observation des anomalies et de mortalité se fait dans les 14 jours qui suivent l'administration du produit à tester.



Fig.V.5. Test toxicologique sur les souris.

V.4.8.4. Test de solubilité :

Les poudres des colorants étudiés (NET et RC) ainsi que leurs précipités récupérés après différents traitement, ont subi le test de solubilité.

Les indications de solubilité figurant sous la rubrique (caractères) sont exprimées en termes ayant la signification présentée sur le tableau V.4, pour une température de 15°C à 25°C:

Tableau V.4. Caractères de solubilité substance vis-à-vis solvant

Termes descriptifs	Volume approximatifs de solvant ml/g de substance
Très soluble	< 1
Facilement soluble	De 1 à 10
Soluble	De 10 à 30
Assez soluble	De 30 à 100
Peu soluble	De 100 à 1000
Très peu soluble	De 1000 à 10000
Pratiquement insoluble	Plus de 10000

V.4.8.5. Test de point de fusion

La technique capillaire est une méthode standard utilisée pour la détermination du point de fusion d'une substance. Selon cette méthode, de fins tube capillaire en verre contenant des

échantillons de substance de précipité obtenu après traitement enzymatique sont introduit dans le bloc de chauffe de l'appareil destiné pour la détermination de point de fusion appelé « Banc Kofler ». Le bloc est chauffé à vitesse constant sur une plage de température allant jusqu'à 300°C comprenant la température de fusion attendue pour la substance, jusqu'à fusion complète de celle –ci (point net).

Partie C :

Résultats et discussion.

VI. Résultats et discussion:

VI.1. Extraction et purification de la peroxydase:

Pour comparer les deux extraits enzymatiques obtenus avant et après la purification, il est nécessaire de déterminer la quantité de protéines et doser l'activité enzymatique de la peroxydase présente dans l'extrait du navet brut et semi purifié.

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

L'avancement de la réaction est déterminé par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 474nm, qui indique l'évolution d'une couleur orange résultant de la décomposition du H_2O_2 et transformation du gaïacol en tétragaïacol (Fig. VI.1). Les valeurs des vitesses initiales ainsi obtenus en DO/min représentées sur la (**fig.A.1**).

La peroxydase est une enzyme de type oxydoréductase qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en présence d'un deuxième substrat de nature phénolique, parmi les composés phénoliques qui donnent à la peroxydase une meilleure activité et qui permettent de faire une étude colorimétrique est le gaïacol (2-méthoxyphénol) selon la réaction suivante :

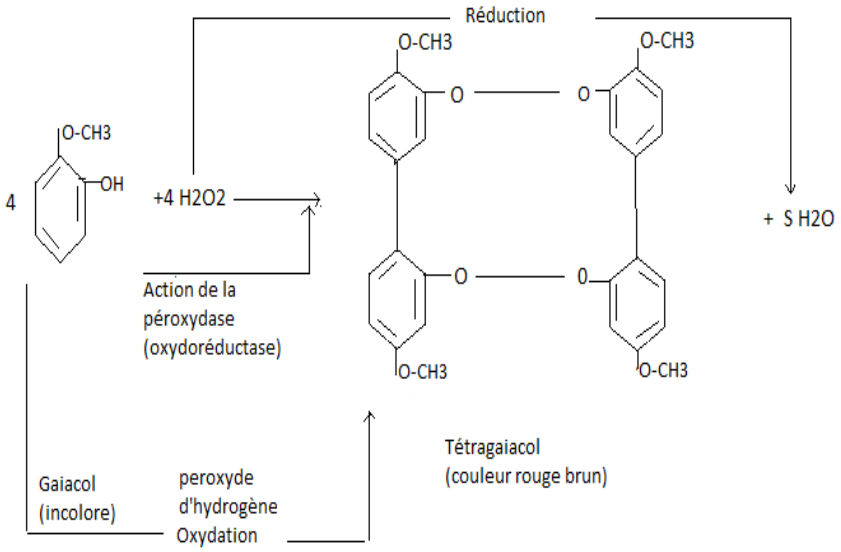


Fig. VI.1. Réaction entre le gaïacol et le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase

Un cycle catalytique de la peroxydase oxyde une molécule de gaïacol et consomme une molécule de peroxyde d'hydrogène, mais, il conduit à des formes qui se polymérisent.quatre cycles sont nécessaires pour former par condensation une molécule de tétragaïacol, produit coloré.

La détermination de l'AE de la peroxydase se fait par l'utilisation de l'expression VI.1:

$$AE = \frac{\text{A.volume de mélange réactionnel}}{\text{volume d'enzyme injécté.D.}\varepsilon} \cdot 10^3 \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \text{(VI.1)}$$

Avec:

A: Vitesse initiale de la réaction.

D: distance parcourue par les rayons lumineux (1cm).

Le coefficient d'extinction molaire $\boldsymbol{\varepsilon}(474)$ est égal à 2050 $mol^{-1}.cm^{-1}$.

D'où on obtient: l'activité enzymatique de la peroxydase de navet égale à 0.39 UI/ml.

VI.1.2. Dosage de la quantité des protéines:

Le dosage de la quantité des protéines est nécessaire, il nous permet de calculer l'activité spécifique et par conséquent, de déterminer le facteur de purification de l'enzyme peroxydase. La méthode utilisée dans notre cas est la méthode de Bradford **(voir annexe II).** Tout d'abord, on trace la courbe d'étalonnage **(fig. A.2.),** qui représente la densité optique (ou absorbance) relative au maximum d'absorption, en fonction de la concentration C de la protéine, obéissant à la loi de Béer-Lambert qui s'écrit comme en suite:

DO=0.0051 [protéine].

La quantité des protéines des deux extraits enzymatiques bruts et semi purifié est déterminée en utilisant cette équation. Les valeurs obtenues sont présentés dans le tableau (Tableau. VI.1.):

- **Comparaison entre les deux extraits EEB, EEPP:**

Les résultats de l'activité enzymatique et la quantité des protéines totale contenant dans les 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 la quantité de la protéine purifié qui reste par rapport à 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 suivant:

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

Extrait	Protéine totale (mg)	Activité totale(UI)	Activité spécifique (UI/mg protéine)	Facteur de purification	Rendement de purification(%)
EEB	**22.78**	**10**	**0.43**	**1**	**100**
EEPP	**3.72**	**2**	**0.54**	**1.25**	**20**

Les résultats montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir du navet est caractérisé par une activité catalytique totale brute de **10 UI.** Mais au cours de l'étape de purification par l'acétone, on remarque que cette activité chute à une valeur de **2 UI;** alors que l'activité spécifique et le facteur de purification augmentent. La purification par Précipitation à l'acétone permet donc l'obtention donc d'une protéine active plus pure. En effet, chaque étape supplémentaire qui permet d'augmenter la pureté et la stabilité de l'enzyme avec le temps, cause une perte de l'activité totale de la peroxydase par dénaturation ou lors de la séparation.

VI.2. Immobilisation de la peroxydase de navet blanc:

Dans cette partie on réalise une immobilisation de la peroxydase de navet en prendre en considération le choix de support, l'alginate de sodium pour former une bille immobilisée.

La méthode d'immobilisation de notre extrait enzymatique partiellement purifié sous les conditions expérimentales déjà mentionnées, conduit à l'obtention des billes homogènes, suffisamment rigides.

Les résultats obtenus sont résumée dans le tableau suivant :

Tableau .VI.2. : caractéristiques des billes de la peroxydase.

Paramètres	**m_{moy} (mg/bille)**	**v_{moy} (mm/bille)**	**ρ_{moy} (mm^3/bille)**	**D_{moy} ($g/cm^{3)}$**
Résultats	8	5.112	1.56	2.21

Le réseau tridimensionnel d'alginate de calcium assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en empêchant la fuite de ce dernier à travers les pores de la matrice.

VI.3. Caractérisation des produits de transformation :

VI.3.1. Analyse des surnageant par spectrophotomètre UV-vis :

Les solutions de colorants (RC et NET) traitées par procédé enzymatique aux conditions expérimentales citées dans le chapitre III, ont été analysées par spectrophotométrie UV-visible en balayant la longueur d'onde de 190 à 800 nm pour les deux colorants. Cette analyse des solutions de colorants et des surnageant a donné des résultats présentés dans les fig. VI.2.et. VI.3.

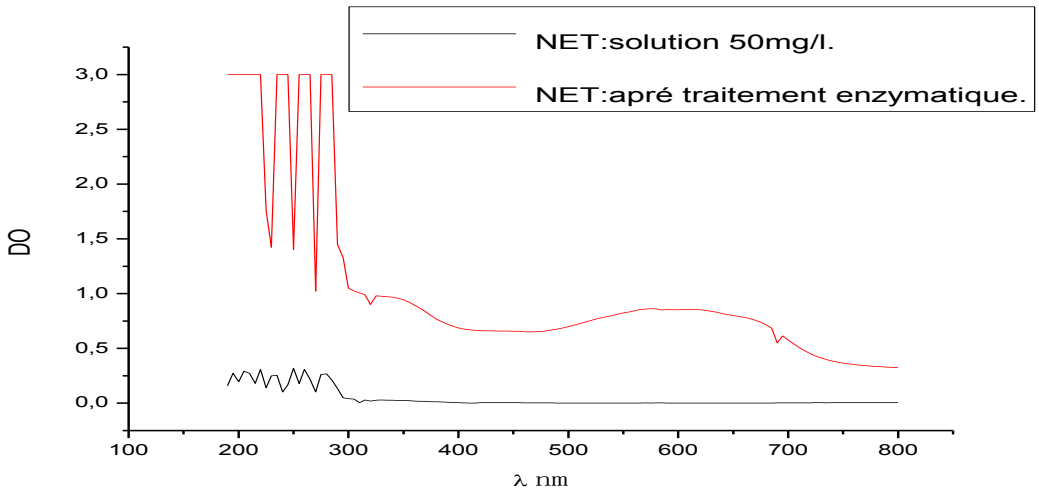


Fig.VI.2. Spectre UV-Visible de la solution initiale (50mg/L) de NET et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions expérimentales déterminées

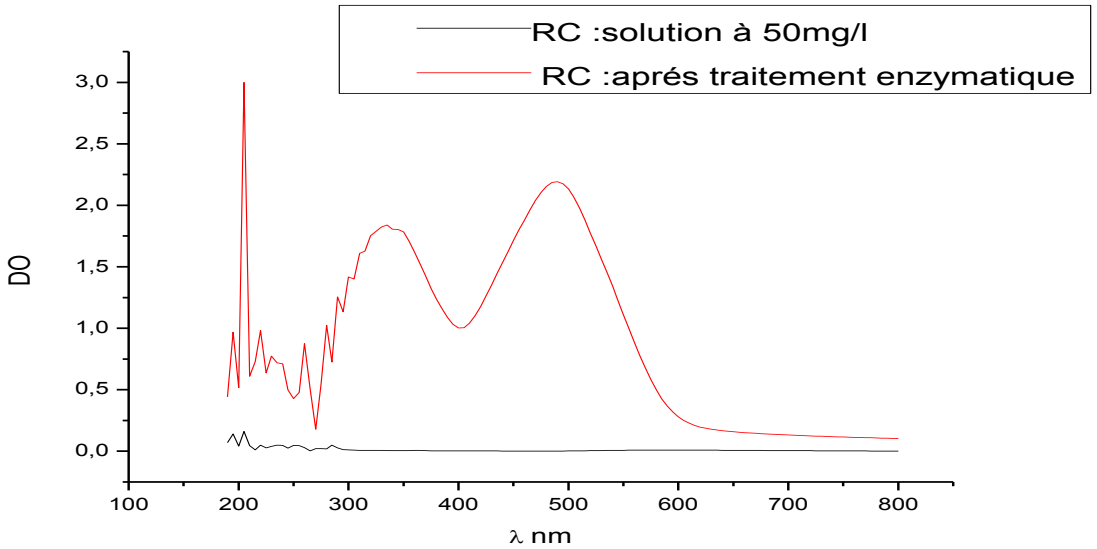


Fig. VI.3. Spectre UV-Visible de la solution initiale (50mg/L) de RC et du surnageant après traitement enzymatique sous conditions expérimentales déterminées.

Le Traitement enzymatique est efficace avec la Prx de telle façon, l'obtention de deux phases solide : précipité insoluble de nature polymérique, phase liquide transparente pour les deux colorants. (Voir **Fig.A.3.)**

- 190-400 (UV) : Présence de pic pour les deux colorants RC et NET ce qui explique la présence de cycle aromatique dans leur structure chimique cependant ces pic sont absent dans le surnageant.
- 400-800(UV-vis) : Présence d'un pic responsable de la couleur donne par le chromophore azoïque, par ailleurs ces pic n'existe pas dans le surnageant.

VI.3.2. Analyse des colorants et précipités par spectroscopie IR :

A la fin de chaque traitement des colorants, les précipités ont été récupérés puis analysés par IR.

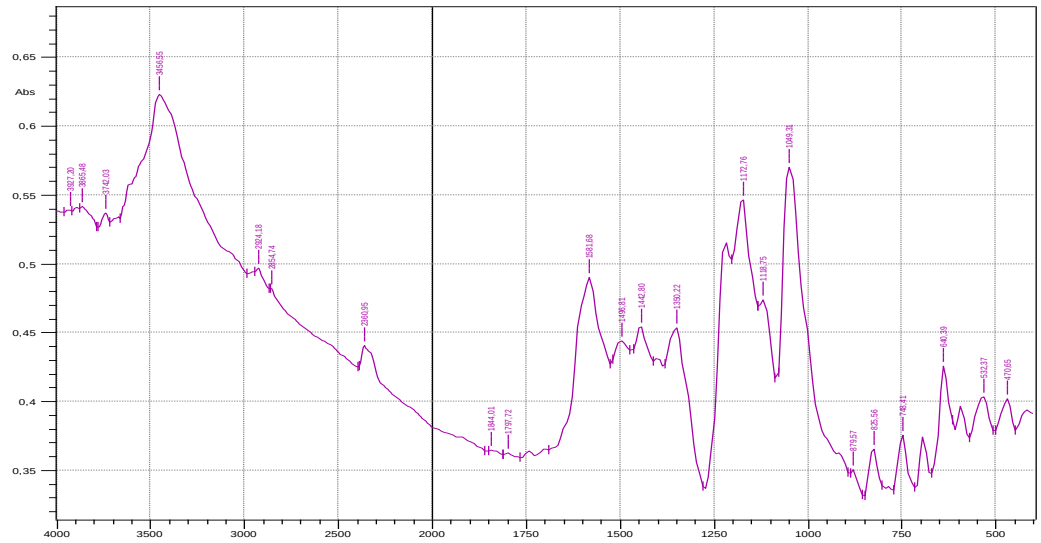


Fig. VI.4. Spectre IR de RC.

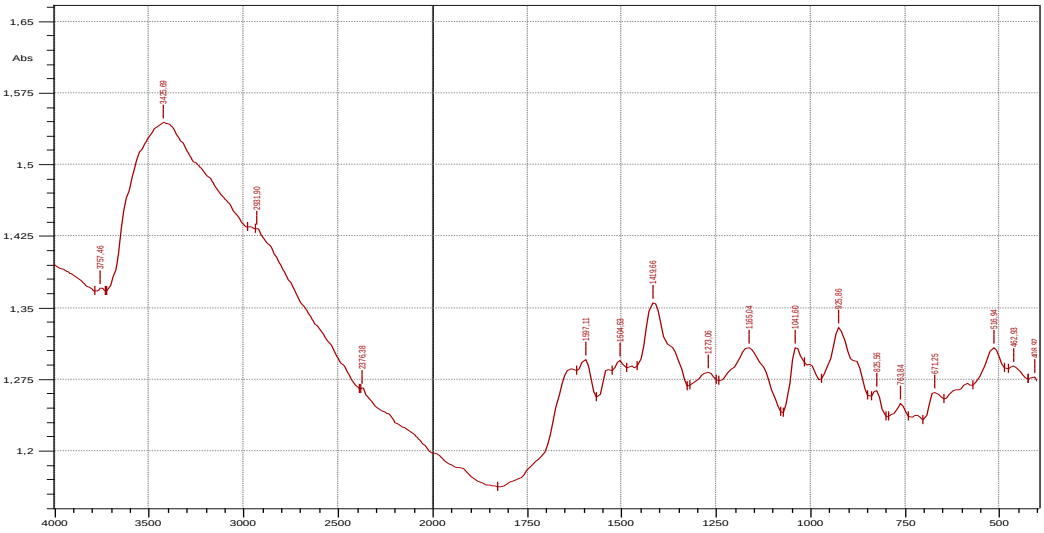


Fig. VI.5. Spectre IR de produit généré après traitement enzymatique du RC.

Les positions des bondes et les intensités sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Tableau VI.3 : étude comparative des positions et d'intensité des bandes IR de RC et le produits formé après sa décoloration.

Intervalle de nombre d'onde (cm^{-1})	RC		Précipitée	
	Nombres d'ondes (cm^{-1})	Intensité	Nombres d'ondes (cm^{-1})	Intensité
400-1000	470.65 ; 532.37 640.39 ; 748.41 825.56	Forte	516.94 ; 671.25 763.84 ; 825.56 925.86	Forte
1000-1400	1049.31 ; 1172.76 1350.22	Forte	1041.60 ;1165.04 1273.06	Forte Moyenne à faible
1400-1500	1442.80 ;1496.81	Moyenne	1419.66	Forte
1500-2000	1581.88	Variable	1504.53 ;1597.11	Forte
2000-4000	2360.95 ; 2924.18 3456.55 ;3742.03	Variable	2376.33 ;2931.9 3425.69	Forte Moyenne

Pour le colorant RC :

Le pic correspondant à 1049.31 cm^{-1} est celui des vibrations de déformation des R-C-O des cycles aromatiques. La présence des vibrations aux nombres d'onde de 1172.76 cm^{-1} concernent l'élongation de C-O-C des éthers cyclique.

Le pic à 1581.68 cm^{-1} est caractéristique de la vibration de déformation -N=N-conjuguée avec la liaison -C=C- du cycle aromatique et l'absorption à 1350.22 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de C-O. Ainsi, l'élongation à 640.39 cm^{1}correspond à la liaison C-OH du groupement alcools.et le pic à 3456.56 correspond à l'élongation de N-H.

Pour le précipité enzymatique du RC

L'apparition et la disparition des bandes d'absorption est remarquable dans le spectre dans les Fig.VI.4.et VI.5.

Disparition du pic correspondant au groupement C=C et apparition d'un pic à 1419.68 cm-1: c'est la déformation –C-N des groupements R-CO-NH_3.

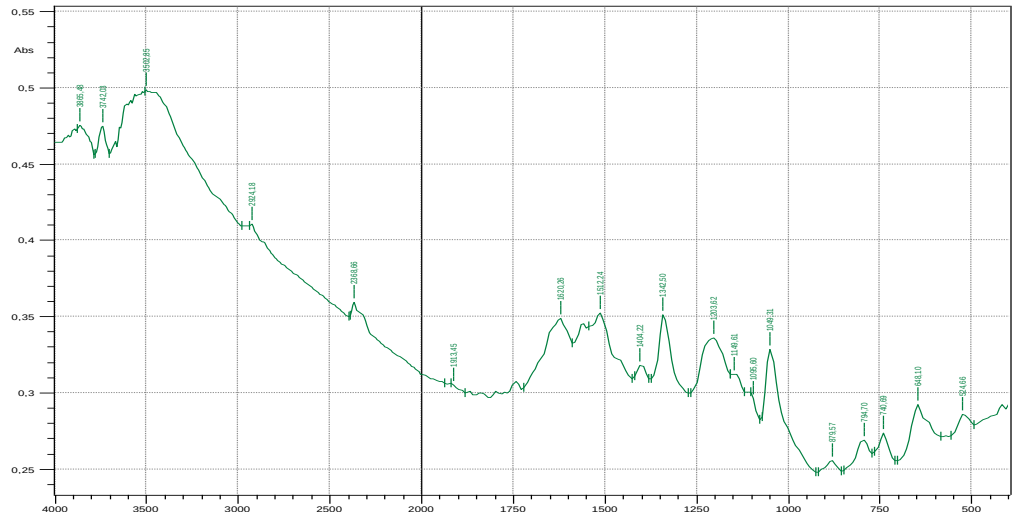


Fig. VI.6. Spectre IR de NET.

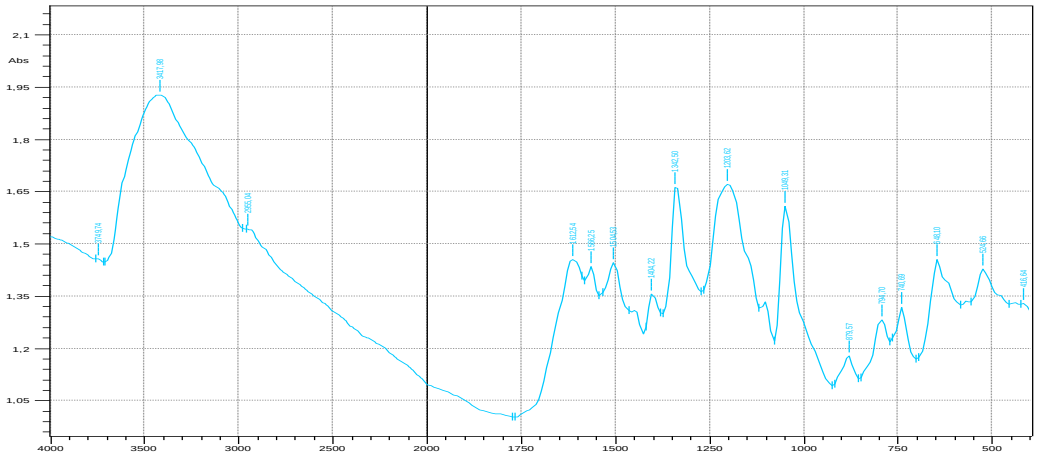


Fig. VI.7. Spectre IR de produit généré après traitement enzymatique du NET.

Les positions des bondes et les intensités sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Tableau VI .4 : étude comparative des positions et d'intensité des bandes IR de NET et de produit formé après sa décoloration.

Intervalle de nombre d'onde (cm^{-1})	NET		Précipitée	
	Nombres d'ondes (cm^{-1})	Intensité	Nombres d'ondes (cm^{-1})	Intensité
400-1000	524.66 ;648.1 740.89 ;794.7 879.57	Forte	416.64 ;624.66 648.1 ;740.69 794.7 ;879.57	Forte

1000-1400	1049.31 ;1203.62 1342.5	Forte	1049.31 ;1203.62 1342.5	Forte
1400-1500	1404.22 ;	Forte	1404.22	Forte
1500-2000	1512.24 ;1620.26	Forte	1504.53 ;1566.25 1612.54	Forte
2000-4000	2368.66 ;3502.85 3772.03 ;3865.48	Variable	3417.98	Moyenne

Pour le colorant NET

Dans la zone 500-1500, un pic à 648.1 cm^{-1} correspond à la déformation de C-OH des alcools. La présence d'une vibration au nombre d'onde de 1049.31 cm-1 de R-C-O des cycles aromatique. Le pic au nombre d'onde à 1342.6 cm-1 correspond de C-N.

Dans la zone 1500-3500 cm-1, les pics aux 1620.26 et correspondent aux vibrations C=C-conjuguée. Tandis que le pic à 3417.96 cm-1 est celui de N-H.

Pour le précipité enzymatique du NET

L'apparition et la disparition des bandes d'absorption est remarquable dans le spectre des Fig.VI.6.et VI.7.

-Disparition du pic correspondant au groupement C=C conjuguée et apparition d'un pic à 3417.96 cm^{-1}: c'est la déformation N-H des groupements R-NH_2.

VI.4. Test de phytotoxicité :

a- Le blé :

Tableau VI.5. Résultat de test de phytotoxicité pour les colorant et leurs surnageant sur le blé.

	L'eau distillée	**Solution 50 mg /L de RC**	**surnageant de RC**	**Solution 50 mg /L de NET**	**Surnageant de NET**
TG	77.77	33.33	88.88	77.77	88.88
LMT	2.64	2.5	3.21	2.25	2.3
NMF	1.72	1.33	1.75	1.8	2
LMF	5.79	5.5	6.81	5.44	6.1
LMR	12.43	6.33	13.25	11.17	13.38

Durant la première semaine, aucun changement n'été Observé sur les essais pour les solutions et leurs surnageant. A partir de la deuxième semaine, les grains ont commencé à germer, Pour ceux arrosés par les solutions de colorant, le nombre de grains qui ont germés était de trois grains pour le colorant RC et sept pour le colorant NET bien que le nombre de grains arrosés par les surnageant issus après traitement le nombre germés était de sept pour le colorant RC et huit pour le colorant NET et sept pour le blanc. (Tableau VI.5.).

Le suivi de la longueur de la tige et la largeur des feuilles durant 15 jours a montré que la Croissance des plantes était mieux après le traitement qu'avant le traitement pour les deux Colorants RC et NET



Grains arrosés par une Solution de 50mg /L de NET.



Grains arrosé par le surnageant de traitement Enzymatique de NET.



Grains arrosés par L'eau distillée.



Grains arrosés par une Solution de 50mg /L de RC.



Grains arrosé par le surnageant de traitement Enzymatique de RC.



Grains arrosés par L'eau distillée.

Fig.VI.8. Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les solutions des colorants non traitées et surnageant traité.

b- fève :

Tableau .VI.6 . Résultat de test de phytotoxicité pour les colorant et leurs surnageant sur La fève

	L'eau distillée	Solution 50mg /L de RC	surnageant de RC	Solution 50mg/L de NET	Surnageant de NET
TG	100	77.77	88.88	77.77	88.88
LMT	2.89	3.31	3.86	3.25	3.36
NMF	5.89	5.63	6.43	5.25	5.43
LMF	2.44	2.41	3.29	2.4	2.43
LMR	16.11	13.5	15.43	12.75	14.29

Durant la première semaine, aucun changement n'été Observé sur les essais pour les solutions et leurs surnageant. A partir de la deuxième semaine, les grains ont commencé à germer. Pour ceux arrosés par les solutions de colorant, le nombre de grains qui ont germés était de sept grains pour le colorant RC et sept pour le colorant NET bien que le nombre de grains arrosés par les mélanges ″surnageant et précipité″ issus après traitement le nombre germés était de huit pour les produits des colorant RC et NET et neuf pour le blanc ,(Tableau .VI.6) .

Le suivi de la longueur de la tige et la largeur des feuilles durant 15 jours a montré que la croissance des plantes était mieux après le traitement qu'avant le traitement pour les deux Colorants RC et NET.

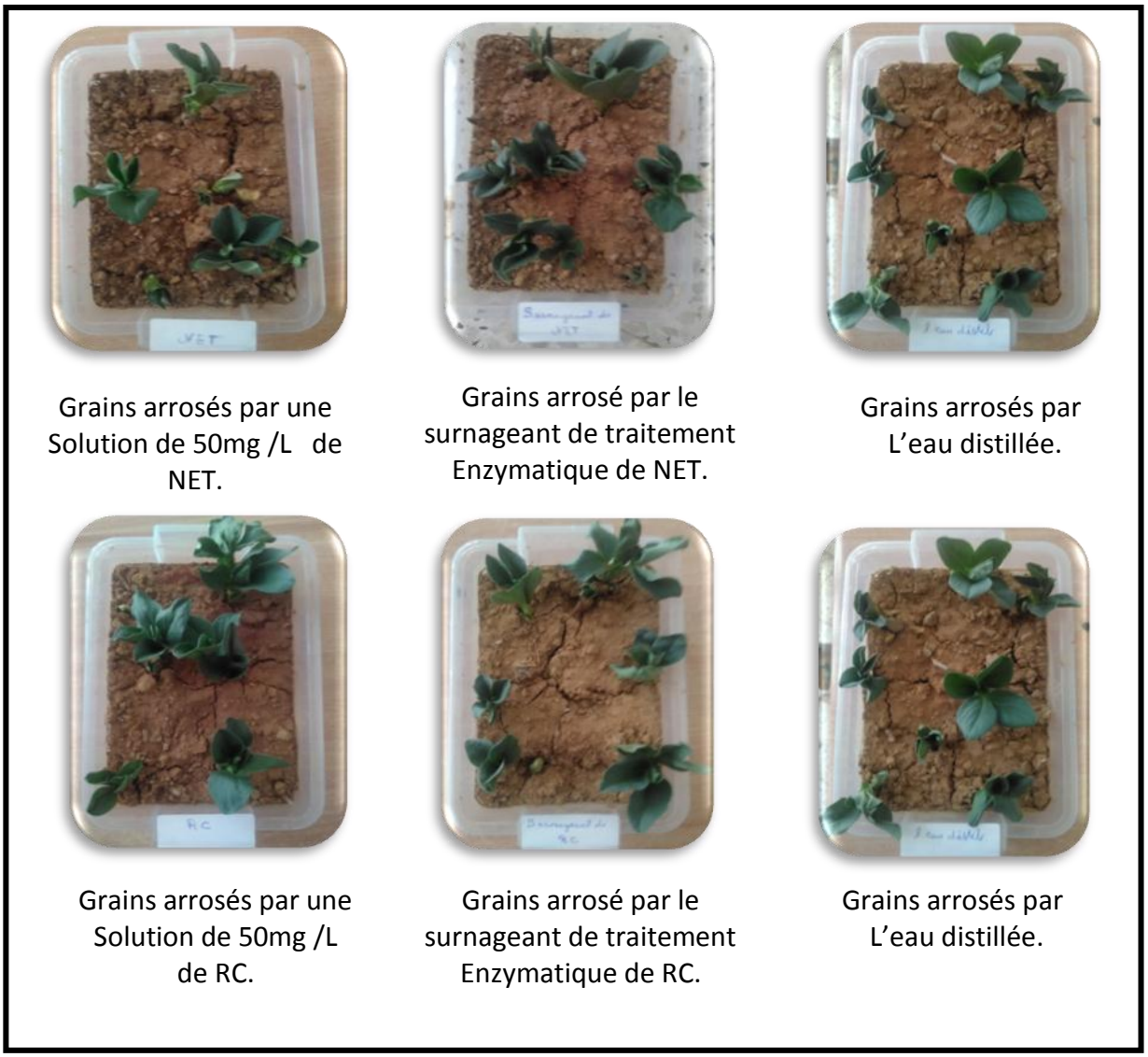


Fig. VI.9. Plantes germées après arrosage par l'eau distillée et par les solutions des colorants non traitées et surnageant traité.

VI.5. Test de toxicité des polymères :

Afin de garantir l'efficacité du procédé de traitement du point de vue environnemental, il nous apparait nécessaire de tester la toxicité des colorants et leurs produits de transformation dans les surnageant, et cela afin de caractériser l'effet de toxicité sur les organismes supérieurs tel que les souris.

Tableau VI.7. Essaie de la toxicité aigue des produits formés suite à la transformation enzymatique des deux colorants azoïques sur les souris.

Nombre de lot	Dose de colorant (mg /kg)	Nombre de souris	La mortalité
Lot1	1	5	0
Lot2	5	5	0
Lot3	25	5	0
Lot4	50	5	0
Lot5	100	5	0
Lot6	250	5	0
Lot7	500	5	0

Le tableau montre que il n'ya aucune anomalie, ni mortalité des souris après l'administration des deux produits formés suite à la transformation enzymatique .les produits sont donc considérés comme non toxiques.

VI.6. Test de solubilité des précipités obtenus

Les résultats du test de solubilité des colorants et leurs précipités dans l'eau distillée, L'acétone et dans l'éthanol, sont résumés sur les tableaux **VI.8 et VI.9.**respectivement.

Tableau. VI.8. Solubilité de précipité du RC.

Solvant	Précipité
L'eau distillée	Insoluble
Ethanol	Insoluble
Acétone	Insoluble

Tableau. VI.9. Solubilité du précipité de NET

Solvant	**Précipité**
L'eau distillée	Insoluble
Ethanol	Insoluble
Acétone	Insoluble

Le test de solubilité pour les deux précipités dans l'eau distillé, l'ethanol et l'acétone a montré que ces produits sont insolubles de nature polymérique.

VI .7. Determination de point de fusion

La mesura da la point de fusion donne une valeur supérieur à 300 °C pour Les deux polymères. Donc les deux polymères sont résistants à la chaleur.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Dans la présente étude intitulée" Caractérisation des produits polymérique issue d'un traitement enzymatique ", notre objectif été consisté d'une part, d'appliquer la méthode enzymatique pour le traitement des solutions azoïque de RC et NET séparément et d'autre part, de caractériser des produits de transformation.

L'analyse des surnageant récupérés après application de la méthode de traitements enzymatique par spectrophotomètre UV-vis, a permis de confirmer la disparition des groupements chromophores azoïques et obtention d'un précipité insoluble et qui ne possède aucune absorbance dans le domine UV-Visible

L'analyse des colorants et leurs précipités par IR: a confirmé la disparition de la bande de vibration des liaisons C=C dans les spectres des précipités.

Le test de toxicité des produits obtenus après traitement enzymatique des deux colorants RC et NET sur les souris à montre que ces produits ne sont pas toxique

Le test de phytotoxicité sur les grains de blé et de fève, a montré que les solutions des colorants et leurs surnageant issus des traitements enzymatiques sont non phytotoxiques.

Le test de solubilité a montré que les précipités sont insolubles dans l'eau distillée l'éthanol et l'acétone si en comparant avec les colorants de départ.

Il est impératif de complétée les résultats obtenu en suggérant d'autre perspectives de Development ou d'amélioration telles que :

- Rendement total de 100% de décoloration et obtention d'une quantité maximale de précipité.
- Analyse des produits par des techniques plus développées tel que HPLC et Valorisation des produits de dégradation enzymatique
- Couplage de traitement enzymatique avec d'autres méthodes pour avoir un rendement total telle que spectroscopie de masse SM.
- Valorisation des effluents industriels.

Références Bibliographiques

-[1]. Www. perso.orange.fr/Jean-Jacques. Auclair/exaosite/peroxydase html.

-[2]. http://www.didier-pol.net/1peroxydase.html.

- Abed K, Chemam A. (2013) : Traitement enzymatique des colorants azoïques dans un réacteur a peroxydase immobilisée, mémoire de master en génie des procèdes, université de Médéa.

- Adam,W.M. Lazarus, C.R. Saha-Moller, O. Weichold, U. Hoch, D. Haring, P. Schreier.(1999) : Biotransformations with Peroxidases, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 63,73-108.

- Adriano D,C. (2001) ; In : Trace Metals in Terrestrial Environments : Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals (2^{e} éd). New York : Springer-Verlag Ed., 866 p.

-Ahmedi, A. (2010) : étude de dégradation des colorants azoïques par la peroxydase libre et immobilisée, thèse de magistère, université de Médéa.

- Akhtar ,S. Q. Husain. (2006) : Potential applications of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase in the removal of phenols from polluted water, Chemosphere, 65 ;1228-1235.

- Ali. H. (2010) : Biodegradation of Synthetic Dye, A Review, Water, Air and Soil Pollution, 213,251-273.

- Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, da Silva JA, Frausto da Silva JJ, Wever R. (2001) : Valadium haloperoxidases from brown algae of Laminariaceae family. Phytochemistry; 57(5) :633-642.

- Alton, A. et Theil, W. (2005) : peroxydase formula.

- Anjaneyulu, Y. Sreedhara Chary, N. et Samuel Suman, D.(2005) : Decolourization of industrial effluents: available methods and emerging technologies, Review in Environmental Science and Bio/Technology., 4, 245–273.

- Anselme C., Jacobs E.P. (1996):Water treatment membrane processes, New York, McGraw Hill Mallevialle, pp. 401-1087.

- Apitz A, Van Pee KH. (2001): Isolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from Bacillus sphaericus. Arch Microbiol; 175(6) : 405-412.

- Atkins ,W. P.. (1982) : Physical Chemistry, 3rd Ed Oxford University, Press New York.

-Augère B. (2001) : les enzymes biocatalyseurs protéiques. 2ed. Elipe édition marketing SA.

-Beatriz, M. Brena. ET Francisco, B.V. (1995): immobilization of enzymes, p 1-17. J. M. Guisan. 2ed, methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells, Humana press.

-Bensegueni, A. Et Chikhi, A. (2005) : biochimie générale : cours et exercices corrigés, partie II.2 ed. Citra copy. P18-19.

-Bergmeyer, H.U.; Gawekn, K. et al. (1979) : Principes de l'analyse enzymatique (Tech & Doc), Lavoisier. Paris., 17.

- Boucherit N. (2016) : Traitement des colorants textiles par procédés de couplage: Fenton-enzyme, mémoire de Doctora, université Mouloud M, TIZI OUZOU.

- Burke NS, Crawford DL. **(1998)** : Use of azo dyeligand chromatography for the partial purification of a noval extracellular peroxidase from Streptomyces viridosporus T7A. Applied Microbiology and Biotechnology. 49(5) :523-530.

- Calabro V., Pantano G., Kang R., Molinari R., Drioli E. (1990): Experimental study on integrated membrane processes in the treatment of solutions simulating textile effluents. Energy and energy analysis, Desalination 78, 257-277.

- Cinquin ,P., C. Gondran, et al. (2010) : A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. PLoS ONE 5, e10476.

- Conesa A, Peter J, Punt, Cees A.M.J.J. ET Van den Hondel. (2002): Fungal peroxydase: molecular aspects and applications, journal of Biotechnology., 93, 143-158.

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

- Dalal, S.M. Nath Gupta. (2007) : Treatment of phenolic Wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering, Chemosphere, 67 ; 741-747.

-Darnell, J.; Lodish, H. ; Baltimore, D.**(1995)** :Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Université éd.

- Ding J.W., Cai J., Zhang A.D. (2008) : Sens. Actuators B-Chem. 134, P. 908.

-Djamel Edine KATI. (2012): Cours de génie enzymatique, Université de Béjaia – FSNV Département des Sciences Alimentaires. Assuré depuis le 2e semestre de l'année universitaire.

- **Djelal H, Rigail M, Boyer L** ; les effluents industriels et leur traitement.

-D'souza, S.F. (1999): immobilized enzyme in bioprocess, Microbial-biotechnol., 15, 114-132.

-Fabiano, S .(2002): application à la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques, thèse du magistère, Université Claude Bernard, France.

- Fuhrs H, Gotze H, Spech A, Erban A, Gallien S, Heintz D, Van-Dorsselear A, Kopka J, Braun HP, Horst WJ. (2009) : Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in Vigna unguiculata in response to toxic manganese supply and silicon. J Exp Bot. 60(6) :1663-1678.

-Genard, S. Bouchy, M. Foncant, J .F. Et Orfan, Z. **(1996)** : cinétique et catalyse.4 ed. Technique et documentation. p 309.

-Goel, M.K. (1994): immobilized enzymes, Biotech-Environ.

- Hamid, K. Rehman. **(2009)** : Potential applications of peroxidases, Review, Food Chemistry, 115 ; 1177-1186.

- Hamide I, Belkasem D. (**2015)** : Caractérisation des produits de dégradation des colorants par procède de traitement enzymatique et chimique, mémoire de master en génie des procèdes, université de Médéa,

- Hammami S. (2008) : Étude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée. Application à la dépollution des rejets industriels, mémoire de Doctora, Université Paris-Est et Tunis El Manar

- Hao, O.J., Kim, H., Chiang, P.C. (2000): "Decolorization of wastewater". . Crit. Rev. Envrin. Sci.Technol. V. 30, n° 4, 449-505.

-Haytem JARRAR. (2011): Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles, thèse de doctorat, école nationale supérieure de chimie de Montpellier.

- Husain, Q. (2010) : Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes : à review, Review of Environmental Science and Biotechnology, 9 ; 117-140.

-Jamin, M. Saks, V. (2004) : Cinétique enzymatique. 2 ed. Porthland press, Ltd, London.

- Kumar, S.C.J. Tsai, et R. (2001) : Nussinov, Thermodynamic différences among homologous thermophilic and mesophilic proteins. Biochemistry 40, 14152-65.

-Liu G.D., Lin Y.H. (2006), Anal. Chem. 78, P. 835.

- Manahan, **S.E. (1994):** Environmental chemistry, Ed (6), Lewis publisher, U.S.A.,

- **Mansour H, Bougzala O, DridicD, Barilliera D, Chekir, Ghedirab, L, et Masrati R. (2011)** : les colorantes textiles sources de contamination de l'eau : criblage de la toxicité et des méthodes de traitement, Journale of water science 24-209.238.

- Medjeldi Marzougui ,S. (2012) : Peroxydase d'origine végétale : purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservé. Mémoire de master en Biochimie Appliquée : université de BADJI Mokhtar ANNABA. 29-31.

- Mindt, W.P. Racine, Schlapfer, P. (1974) : Enzyme electrode. US Patent 3.838.033.

-Mohsina, H. Khalil-ur-Rehman. (2009): Potential application of peroxydase, Food chemistry. 115, 1177-1188.

-Moussard, Ch. (2002) : Biochimie structurale et métabolique: Médecine, Pharmacie, Sciences. Edition de Boek et Larcier S.A.

- Nagai T, Yukimoto T, Suzuki N. **(2002)** : Glutathione peroxidase from the liver of japanese sea bass Lateolabrax japonicus. Z Naturforsch. 57 :172-176.

- Oubaghra N. (2011) : décontamination des eaux contenant les colorants textiles et les adjuvants par des matériaux naturels et synthétique, université Mouloud M, TIZI OUZOU.

- Passardi et al. (2005) : Prx, abréviation conforme à la notation de gènes

-Pavlov V., Xiao Y., Willner I. (2005): Nano Lett. 4, P. 649.

-Pelmont, J. (1995) : Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble, 7, 652.

- Raghavacharya, C. (1997): "Colour removal form industrial effluents –a comparative review of available technologies". Chem. Eng. World, V.32, 53-54.

- Ratna, B.S. Padhi. (2012) : Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation, International Journal of Environmental Sciences, (3) ; 940-955.

- Regalado, C. Garcia-Almendarez, A.M. et Duarte-Vazquez, E.B. (2004): Biotechnological applications of peroxydase, Phytochemistry Reviews., 3,243–256.

- Reihmann, M. H, Ritter. (2006) : Synthesis of Phenol Polymers Using Peroxidases, Advanced in Polymer Science, 194 ; 1-49.

- Ruzgas, T. E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga. **(1996)** : Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. Analytica Chimica Acta 330, 123-138.

- Sakharov I, Castillo J, Areza J.C, Galev I. **(2000)** : Purification and stability of peroxidase of African oïl palm (Elaies guinensis). Bioseparation. ; 9(3) : 125-132.

- Sano S, Ueda M, Kitajima S, Takeda T, Scheota S, Kurano N, Miyaki S, Yakola A. (2001) : Characterization o ascobate peroxidase from unicellular red alga Galdiera parita. Plant Cell Physiol. 42(4) :433-440.

-Serge, W. et Méhul, P. (2004): toute la biochimie.3 ed. Dunad. Paris. p 137.

-Seung wook, K. (2007): Development of Enzyme Immobilization Technique, Laboratory of Bioprocess Engineering .Department of chemical and Biological engineering. Korea University

-Silvia FABIANO.(2002) : Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : le PEDT, diplôme de doctorat en chimie-biochimie, université CLAUDE BERNARD –LYON I,

- Sumitra, D. Rene Christina, L. Et Sriramulu Rajaram, Y. R. (2013): Enzyme immobilization:an overview on techniques and support matériels, Biotechnology., 42, 6406-6436

- Taylor J.S., Jacobs E.P. (1996): Water treatment membrane processes, New York, McGraw-Hill, pp. 9.1-9.70.

- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., Smon, P. (2002) : Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana. Gene 288, 129-138.

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

- UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY **(USGS)**. **(2006):** Toxicity substances hydrology program, valable sur le site Internet: http://toxics.usgs.gov.

- Van Der Bruggen B., Lejon L., Vandecasteele C., Reuse. **(2003) :** treatment and discharge of the concentrate of pressure-driven membrane processes. Environ. Sci. Techn. 37; 3733-3738.

- Vincent,M. (1996) : Blood glucose: Its measurement and clinical importance. Clinica Chimica Acta 251 ; 3-17.

-Voet, D et Voet, J. G. (2001) : Biochimie. 2ed. Dunod, Paris.

- Wang, J. H, Wu. (1995) : Highly selective biosensing of glucose utilizing a glucose oxidase + rhodium + Nafion® biocatalytic-electrocatalytic-permselective surface microstructure. Journal of Electroanalytical Chemistry 395 ; 287-291.

- Yoshida, K.P.Kaothien, T.Matsui, A.Kwaoka, A.Shinmyo. (2003) : Molecular biology and application of plant peroxidase genes, Applied Microbiology and Biotechnology, 60 ; 665-670.

- Zille, A. (2005): Laccase Réactions for Textile Applications. Thèse de doctorat Université Minho Escola d'Engenharia Italie. 4-19.

Annexes

Annexes

Annexe I :

1. Mesure de l'activité enzymatique avant et après la purification :

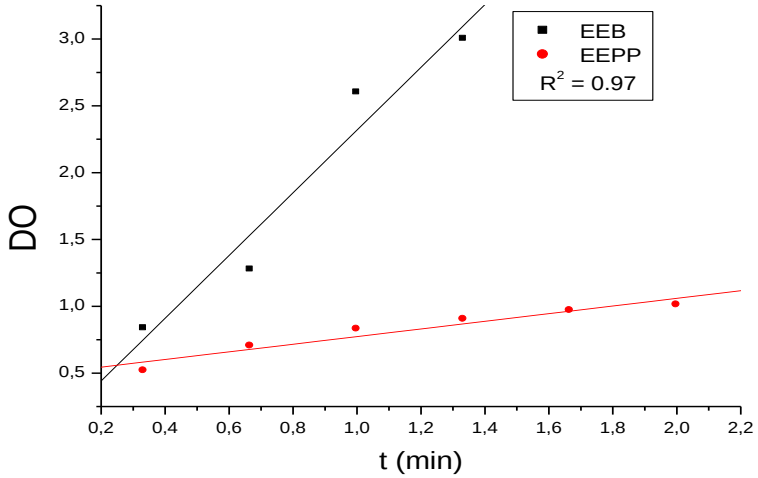


Fig.A.1 : Variation de la DO en fonction du temps pour EEB et l'EEPP (pH6, T ambiante,λ= 474nm).

Annexe II :

1. DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD.

- **Réactifs de Bradford contient:**

-Bleu de Comassie (100mg/l).

-Ethanol 95% (50ml).

-H_3PO_4 85% (100ml).

-Après dissolution, on complète avec l'eau distillée jusqu'à 1000 ml

Le mélange conservé 24 sous agitation puis on réalise une filtration.

La représentation graphique de DO en fonction de concentration de protéine est illustrée dans la figure suivante (Fig.A.2):

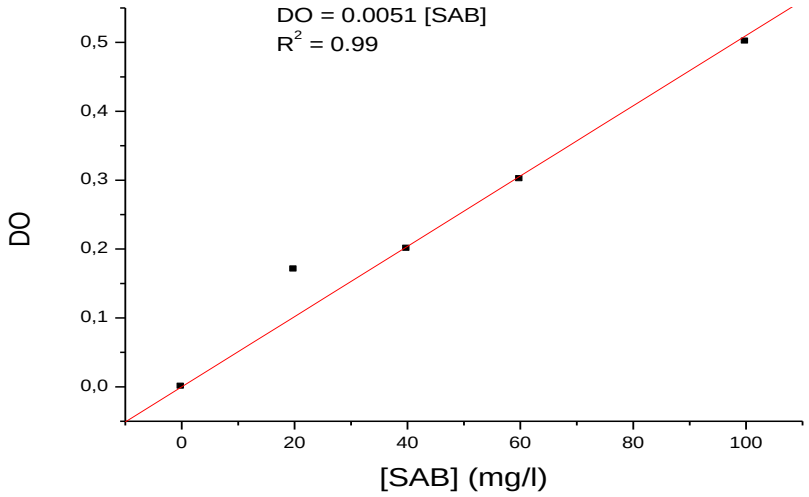


Fig.A.2 : Courbe d'étalonnage de la protéine suivant la méthode de Bradford.

Annexe III:

1. Décoloration par la peroxydase :

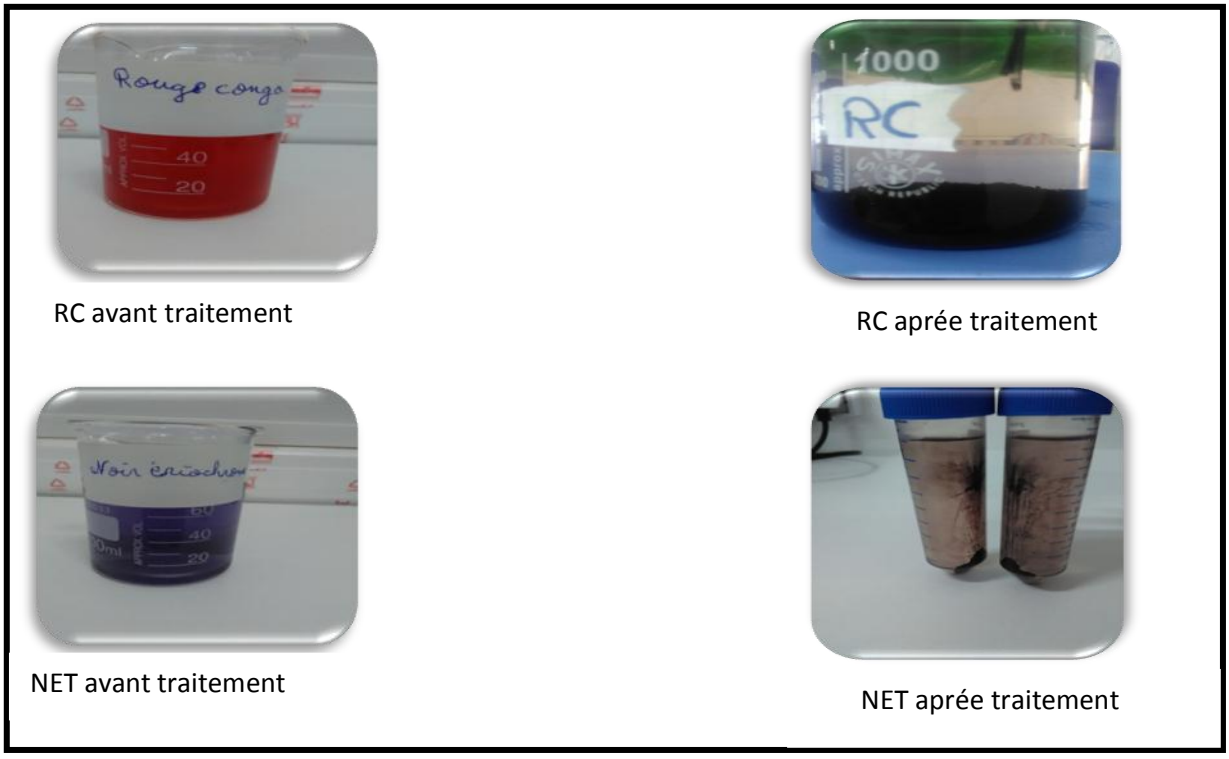


Fig.A.3. photos des colorants et laures précipités et surnageant aprée traitement enzymatique RC et NET.

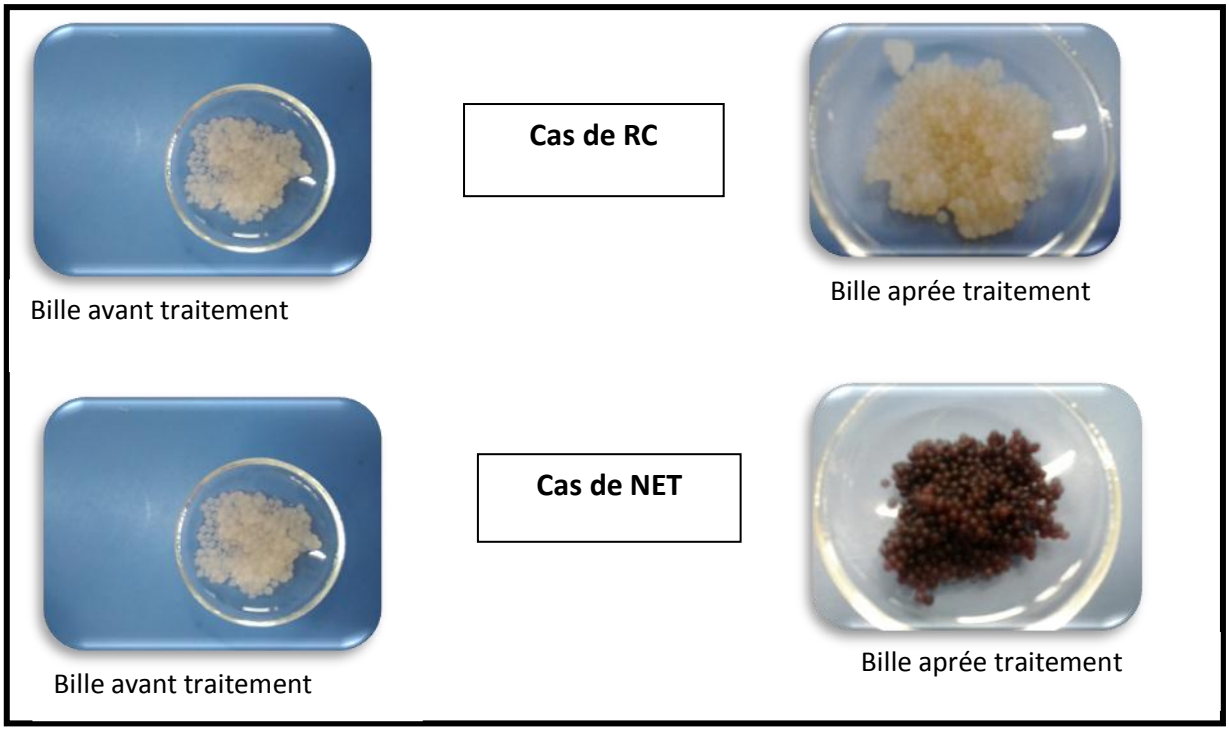


Fig.A.4. Photos des billes de peroxydases avant et aprée traitement enzymatique de RC et NET.